

植物体细胞杂交的进展

孙勇如

(中国科学院遗传研究所, 北京)

植物细胞在去除细胞壁以后, 能像受精过程那样互相融合。这为生物学家提供了机会, 在常规不能杂交的亲本之间进行遗传物质重组, 从而开发了植物体细胞杂交的新领域。自从1972年首次获得烟草种间体细胞杂种植株^[1]以来, 该项研究已经历了16年的发展。在这期间, 植物体细胞杂交的研究无论在应用上, 还是在操作技术上都取得了长足的进展。

体细胞杂交的应用研究

将体细胞杂交应用于植物育种的现实问题是近几年来的一个明显倾向。至今已在转移胞质雄性不育特性、获得抗病及抗除莠剂特性等方面取得了显著的进展。同时, 在木本果树植物上也得到了有经济价值的体细胞杂种植株。

(一) 抗病体细胞杂种的获得

体细胞杂交用于育种的一个重要途径是将栽培品种与相应的野生种作为亲本, 经过原生质体融合、选择与再生, 从而获得野生种的抗病特性。研究得比较多的是抗病毒的马铃薯体细胞杂种^[2,3]。马铃薯卷叶病毒与Y病毒是由蚜虫传播的主要病原, 与马铃薯有性不亲和的野生种 *S. brevidens* 对这两种病毒有很高的抗性。它与马铃薯的体细胞杂种, 对这两种病毒的抗性都显著高于马铃薯亲本。这种抗性并不阻止病毒的侵染, 而是降低了病毒的扩展。融合后代存在着不同程度的抗性差异, 并在某种程度上与野生种染色体的转移程度有关。所以这类抗性可能是受多基因控制的。还有人报道^[4]用同样的组合得到了抗晚疫病及马铃薯卷叶病的体细胞杂种。除马铃薯外, 番茄也得到了类似的体细胞杂种^[5,6]。这些研究表明, 通过原生质体融合, 将野生种的有用性状导入栽培品种是一条可行的育种途径。

(二) 通过原生质体融合转移胞质基因控制的性状

与常规的有性杂交过程不同, 原生质体融合涉及了双亲的细胞质。这为胞质基因的遗传操作提供了独特的机会, 不仅可把胞质基因转移到全新的核背景中, 也可使叶绿体基因组与线粒体基因组重新组合。双亲线粒体基因组之间的重组也已被许多实验所证实^[7], 也有叶绿体在融合产物中重组的报道^[8]。这些研究创造了胞质变异的新源泉, 有些可直接应用于植物育种。

一般认为, 异质联合中核与线粒体的相互作用可能导致雄性不育。最近, 有人将普通烟草的原生质体与X射线处理的 *N. africana* 原生质体融合, 获得了胞质雄性不育的胞质杂种。在胞质雄性不育的原生质体作亲本的融合后代, 也能够发现胞质雄性不育的杂种植株^[9]。Chuong^[10]最近将单倍体油菜的原生质体融合, 创建了既为胞质雄性不育, 又抗除莠剂阿特拉金的油菜植株。该杂种是二倍体, 用保持系授粉时能正常结籽。其叶绿体DNA的内切图谱与抗阿特拉金的亲本一致, 而线粒体DNA的内切图谱与胞质雄性不育的亲本一致。已经清楚, 抗除莠剂阿特拉金特性是自然群体中发生的突变性状, 受叶绿体基因组的控制, 这与实验的结果是完全一致的。通过与抗阿特拉金的原生质体融合, 已经获得了具有抗性的烟草^[11]、马铃薯^[12]、萝卜^[13]、油菜^[14]及蕃茄^[15]等的体细胞杂种。

为了定向地转移胞质基因控制的性状, 可以采用“供体-受体”的实验体系。即用辐射等方法, 将供体原生质体的核失活, 这样得到的融合后代具有稳定的受体一方的遗传背景, 但同时具有供体胞质基因组所控制的特性, 从而达到转移胞质基因的目的。这样的杂种, 如果全然没有供体原生质体的核基因特性, 一般被称为胞质杂种。如果仍带有供体一方的核基因特性, 可称为

文于1988年10月27日收到。

不对称杂种。

(三) 木本体细胞杂种的获得

木本植物生育期长, 育种过程中广泛存在着有性不亲和的现象, 而且还会遇到花期不遇、有性器官退化等一系列问题。所以常规育种比草本植物更困难, 花费的时间与精力也更多更长。基于这些原因, 体细胞杂交在木本植物上有更大的应用潜力。近几年, 榆树、杨树、柑桔、檀香、櫻桃、洋梨及中华猕猴桃的原生质体相继再生了植株, 为木本植物的体细胞杂交奠定了基础。Ohgawara^[16]将甜橙的原生质体与飞龙的原生质体融合, 得到了体细胞杂种植株。最近, 美国人 Grosser^[17]将甜橙的悬浮培养细胞的原生质体与豪壳刺属的 *Severinia disticha* 愈伤组织的原生质体融合, 得到了属间异源四倍体的体细胞杂种植株。*S. disticha* 具有抗病、耐寒、耐盐等优良性状, 适合作柑桔的砧木, 但与甜橙有性不亲和。通过叶片的形态、染色体数、磷酸葡萄糖变位酶 (PGM) 与苹果酸脱氢酶 (MDH) 的同功酶分析, 证实了所得植株的杂种性质。该杂种的获得为改良柑桔的砧木提供了可能的途径。木本体细胞杂种的研究虽然刚刚开始, 但可以预见, 在不久的将来会有重大的进展。

体细胞杂交技术的进展

植物体细胞杂交包括了一系列复杂的技术环节。近年来在一些关键的技术, 包括融合方法、杂种细胞选择以及杂种植株的鉴定等, 都不断地得到改进与发展。

(一) 融合方法的进展

自从高国楠^[18]发展了PEG融合技术以来, 这种融合方法一直被应用着, 并不断有所改进。例如用离子交换树脂纯化PEG, 降低了对原生质体的毒害。原生质体在融合前用盐溶液处理, 也提高了融合频率。在PEG溶液中添加某些物质, 如丹豆球蛋白^[19]、15%的二甲基亚砜 (DMSO)^[20]、链霉蛋白酶^[21]等, 都显著提高了融合频率。自从1979年建立电融合方法^[22]以来, 电融合技术因受到工商界的推动, 发展更快。由于电融合过程的各种参数容易控制, 便于掌握, 所以近年来应用电融合仪的人有明显增长。

但是, 目前流行的融合方法都不能控制融合只发生在异质亲本之间, 也不清楚融合时细胞生理状态对杂交过程的影响。所以真正异质一比一的融合频率还很低。真正提高融合的频率, 还有待于这两个问题的解决。

最近, Schweiger^[23]发展了微培养与单细胞融合体系, 是近年来最突出的进展。微培养是在盖玻片上进行的, 简单的原理就是在微滴培养基(约50nl)上覆盖一层矿物油, 防止培养基中水分蒸发, 并防止与相邻细胞的物质交流。每个微滴培养一个原生质体, 这就相当于通常 2×10^4 /ml的原生质体密度。在培养过程中需要经常加入新鲜的培养液, 直至形成微型愈伤组织(直径约300 μ m)。在微培养体系的基础上, 建立了单细胞融合的方法。将异源的两个原生质体移到低离子强度的融合培养基的微滴中, 同一盖玻片上的几个微滴用同一层矿物油覆盖。用一对直径为50 μ m、长10mm的白金电极, 在倒置显微镜下定位后进行融合操作。电融合的产物移到微滴中培养。这套微培养与单细胞融合系统与电子计算机控制的马达联系起来, 大大提高了操作速度, 成为非常有前途的一种技术体系。它不仅是融合方法上的改进, 也基本上解决了融合体的选择问题。但这种技术仍需要两种原生质体在显微镜下有显著的差异。同时, 这套自动操作装置还没有商品化。

(二) 选择方法的进展

在体细胞杂交技术中, 选择杂种细胞是一个非常关键的环节。多年来发展的选择方法大致可以分为三个类型: 1) 利用或诱发各种缺陷型或抗性细胞系, 用选择培养基将互补的杂种细胞选出来; 2) 利用或人为造成两个亲本间原生质体的物理特性差异, 选出杂种细胞; 3) 利用细胞生长与分化能力的差异进行选择。但是至今还没有一个通用的选择方法, 比较突出的进展可以算是通用杂交亲本的建立与荧光活性细胞分类装置的应用。

1. 显隐性双突变体——通用杂交亲本的建立: Hamill^[24]于1983年通过有性杂交的方法, 将硝酸盐还原酶缺陷的突变体与链霉素抗性突变体综合在一个突变系中, 建立了烟草的双突变

体。这种显隐性双突变体可以与任何一种无选择标记的原生质体融合，由于对方亲本对链霉素敏感，而双突变体又有特殊的营养需要（还原氮），所以很容易用选择培养基将杂种细胞选出来。这种设计非常巧妙，很快被广泛地应用。Toriyama^[25]用补加 50m mol/L 氯酸盐与 229 μ mol/L 5-甲基色氨酸（5MT）的培养基，从 *Sinapis turgida* 的悬浮培养细胞选出了抗 5MT、硝酸盐还原酶缺陷的显隐双突变细胞系。将该细胞系的原生质体与甘蓝（*Brassica oleracea*）的叶肉原生质体融合，先在 NO₃⁻培养基，后在加 229 μ mol/L 5MT 的 NO₃⁻培养基中，选出了杂种细胞并再生了杂种植株。还有人建立了抗卡那霉素、硝酸盐还原酶缺陷的烟草细胞系^[26]。有人则在硝酸盐还原酶缺失的 *N. plumbaginifolia* 细胞系中选出了抗铃兰氨酸（A2C）的显隐双突变体^[27]。他们的研究表明，这类显隐性双突变体都能作为通用的杂交亲本。

2. 用荧光活性细胞分类装置自动分离融合产物：荧光活性细胞分类装置能在很短的时间内选择与分类几千个细胞。其主要原理是利用活体荧光染料的不同颜色反应来区分杂种细胞。如罗达明 123 能染细胞质中的线粒体，使其在荧光显微镜下呈现绿色，而氢化乙锭能染细胞核，使其在荧光显微镜下呈现红色。将两种亲本原生质体分别用不同的染料染色后，进行融合处理，再用这种分类装置自动分离荧光下呈不同颜色的原生质体，将杂合两种颜色的杂种细胞分离出来^[28]。近几年已有人在烟草和油菜用这种技术选出杂种细胞。尽管这种技术效率高，但由于仪器昂贵，应用的人还不多。

（三）杂种鉴定技术的进展

传统的鉴定方法依赖于形态学和染色体数的观察。但是，由于植物的形态受多基因的控制，并有可能发生体细胞无性变异，或者由于染色体数的异常，而产生巨大的变异。多年来，鉴定基因组编码的基因产物——同工酶，成为鉴定杂种的主要依据。

新近重组 DNA 技术已被用来作为鉴定杂种的有力手段。每个种都有典型的限制性内切片段长度多型性的指纹图谱。选择一个同源的 DNA

序列作探针，与 DNA 内切片段杂交以后，就可以根据种特异的图谱鉴定出杂种。Ye 等^[27]用烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合成酶（EPSPS）的基因作探针，根据内切片段长度多型性的图谱证明了杂种中存在着双亲的基因。这种分子杂交的方法还可以估计不对称杂种中有多少供体核基因转入了受体。Imamura^[29]用 X 射线处理天仙子的原生质体，然后与烟草的原生质体融合，用点杂交的方法证明，辐射明显降低了体细胞杂种中供体染色体 DNA 的含量，同时证明完全抑制原生质体分裂的辐射剂量并不阻止供体大量的染色体 DNA 并入融合杂种。

展 望

体细胞杂交的研究实践已经表明，有性不亲和的种间可以通过原生质体融合而得到体细胞杂种植株。亲缘关系较近的亲本间可以由此获得双二倍体，它们往往是可育的，可直接用作育种材料。因而这样的体细胞杂交可以作为某些作物重要的育种途径。

体细胞杂交研究还表明，在育种实践中更有价值的是前面已经提到的胞质杂种及不对称杂种。为转移细胞质基因控制的性状，通过原生质体融合进行细胞质基因组重组，是一条直接用于育种的简便途径。胞质杂种的局限性在于对核基因控制的性状无能为力。

在远缘不亲和种间或属间的体细胞杂种中，往往亲本一方的染色体全部或部分被消除，但由于遗传物质的重组，杂种中仍保持了该亲本的某些核基因控制的遗传特性，这就是不对称杂种。就是说，不对称杂种是一个广泛的概念，相对于对称杂种来说，它至少在亲本一方有部分的染色体被消除；相对于胞质杂种来说，即使亲本一方的染色体全部消除，仍保留着该亲本的某些核基因控制的性状。特别是后者，由 DNA 重组产生的不对称杂种由于没有额外的染色体，能稳定地遗传，所以最有希望成为育种的重要途径。现在，通过辐射等方法，已能人为地消除亲本一方的染色体，它能使有性过程不能转移的遗传特性随机地转入目的植物中，如果加以重要特性的选择压力，就有可能得到有重要价值的不对称杂

种。由于农作物的经济性状多为多基因控制的性状，与单基因转移的遗传转化相比，它转移的不是单个基因，是它独到的一面。可以预见，这种

不对称体细胞杂交技术与遗传转化技术相辅相成，将共同为农业革命作出巨大贡献。

参 考 文 献

- [1] Carlson, P. S. et al. , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 2292, 1972.
- [2] Austin, S. et al. : *Plant Sci.*, 39: 75, 1985.
- [3] Gibson, R. W. et al. : *Theor. Appl. Genet.*, 76: 113, 1988.
- [4] Helgeson, J. P. et al. : *Plant Cell Rep.*, 3: 212, 1986.
- [5] Kinsara, A. et al. : *J. Plant Physiol.*, 125: 125, 1986.
- [6] Handley, L. W. et al. : *Theor. Appl. Genet.*, 71: 691, 1986.
- [7] Nagy, F. et al. : *Theor. Appl. Genet.*, 66: 203, 1983.
- [8] Medgysy, P. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82: 6960, 1985.
- [9] Menczel, L. et al. : *Mol. Gen. Genet.*, 189: 365, 1983.
- [10] Chuong, P. V. et al. : *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 12: 181, 1988.
- [11] Menczel, L. et al. : *Mol. Gen. Genet.*, 205: 201, 1986.
- [12] Binding, H. et al. : *Theor. Appl. Genet.*, 63: 273, 1982.
- [13] Pelletier, G. et al. : *Mol. Gen. Genet.*, 191: 244, 1983.
- [14] Barsby, T. L. et al. : *Theor. Appl. Genet.*, 73: 809, 1987.
- [15] Jain, S. M. et al. : *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 12: 189, 1988.
- [16] Ohgawara, T. et al. : *Theor. Appl. Genet.*, 71: 1, 1985.
- [17] Grosser, J. W. et al. : *Theor. Appl. Genet.*, 75: 397, 1988.
- [18] Kao, K. N. et al. : *Planta*, 115: 355, 1974.
- [19] Glimelius, K. et al. : *Physiol. Plant*, 44: 92, 1978.
- [20] Norwood, T. H. et al. : *Somatic Cell Genet.*, 2: 263, 1976.
- [21] Kameya, T. : *Cytologia*, 44: 449, 1979.
- [22] Senda, M. et al. : *Plant Cell Physiol.*, 20: 1441, 1979.
- [23] Schweiger, H. G. et al. : *Theor. Appl. Genet.*, 73: 769, 1987.
- [24] Hamill, J. D. et al. : *Heredity*, 50: 197, 1983.
- [25] Toriyama, K. et al. : *Planta*, 170: 308, 1987.
- [26] Brunold, C. et al. : *Mol. Gen. Genet.*, 208: 469, 1987.
- [27] Ye, J. et al. : *Mol. Gen. Genet.*, 208: 474, 1987.
- [28] Alexander, R. G. et al. : *Protoplasma*, 3: 811, 1985.
- [29] Imamura, J. et al. : *Theor. Appl. Genet.*, 74: 445, 1987.