

# 植物细胞工程在十字花科作物种质 创新中的研究进展

葛亚明 陈利萍\*

(浙江大学园艺系, 农业部“园艺植物生长发育与生物技术”重点开放实验室, 杭州 310029)

**摘要** 从胚拯救、小孢子培养、体细胞杂交、离体受精、体细胞无性系变异、染色体工程等六个方面综述了植物细胞工程技术在十字花科作物种质创新中的研究进展及应用, 并对其发展前景进行了讨论。

**关键词** 植物细胞工程; 十字花科; 种质创新

种质(germplasm)是决定生物遗传性状, 并将遗传信息从亲代传递给子代的遗传物质, 含有种质并能繁殖的生物体即为种质资源(germplasm resource)。种质资源是地球生命的基础, 也是人类赖以生存和发展的根本<sup>[1]</sup>。种质资源的保存与创新已成为人类今后面临的一项十分严峻而紧迫的任务, 种质资源的保护和利用直接关系到人类的未来。十字花科作物是一类重要的蔬菜和油料作物, 在人们生活中起着举足轻重的作用。但在实际生产中常因种质资源的缺乏而不能被广泛应用。因此, 利用植物细胞工程技术来进行种质资源的创新和利用具有重要的意义。

## 1 植物细胞工程简介

植物细胞工程是以植物细胞为单位, 按照人们的预先设计, 有目的, 有计划地对植物细胞进行加工、改造, 使其遗传和生物学特性发生改变, 从而对植物体进行创造设计的技术。每个细胞都具有有一套极其精密、复杂和高效的功能体系及一套完整的遗传体系。因此, 人们相信通过植物细胞工程可以改良和创造新的生物品质。植物细胞工程涉及胚拯救、小孢子培养、体细胞杂交、离体受精、体细胞无性系变异、染色体工程等多方面内容。植物细胞工程对于作物种质创新的意义在于: 能解决无性繁殖中的种性退化问题; 能将有利基因转移到需要改良的作物中; 能克服有性杂交中不同品种、种、属之间的不亲和障碍; 能实现远缘杂交; 能加速育种进程, 提高选择效率; 能筛选抗性突变体, 进行抗性育种。近年来, 国内外广泛地开展

了这方面的研究, 并取得了一定的进展。

## 2 植物细胞工程在种质创新中的研究进展

### 2.1 远缘杂交与胚拯救

远缘杂交具有能创造新的作物类型、能利用异属和异种的特殊有利性状、能丰富作物的变异类型、创造新的雄性不育源、探索研究生物进化等重要意义。因此, 其在十字花科作物育种中发挥着重要的作用。但是运用传统育种途径进行远缘杂交育种常常受到有性不亲和性的限制, 其主要表现为杂交后胚不能形成或是胚的发育受阻, 只有极少数在不经胚拯救措施下能获得杂交种<sup>[2]</sup>。胚拯救(embryo rescue)技术是指对于在受精完成后易发生胚败育的杂种胚, 在其停止发育前将其从母体分离, 置于人工培养基上进行培养, 从而获得杂种植株的技术。根据其外植体的不同可以分为胚、胚珠、子房培养三种。胚培养的成功与否常常与胚的发育时期和基因型有密切关系。它能克服一些远缘杂交操作中虽然能完成受精作用, 但是由于胚乳发育不良而造成杂种胚最终夭折的不亲和障碍。早期的育种工作由于受到不亲和性和胚败育的限制而使许多远缘杂交种的恢复不能实现。胚拯救措施能在一定程度上克服远缘杂交中的不亲和性, 从而使远缘杂交的研究进程不断得以深入。目前, 借助胚拯救措施已经成功获得了许多十字花科作物杂交种。如 Ripley 等<sup>[3]</sup>

收稿日期: 2003-12-31 接受日期: 2004-03-21

国家自然科学基金资助项目(No.30370903)

\* 通讯作者。Tel: 0571-86971006, Fax: 0571-86971638, E-mail:

chenliping@zju.edu.cn

通过传统育种途径与胚拯救措施相结合, 获得了甘蓝和油菜的种间杂种, 其杂种后代具有自交不亲和性。Banga 等<sup>[4]</sup>以芥菜型油菜作为母本, 以大白菜和芥菜作为父本结合胚拯救措施进行远缘杂交, 获得了父、母本间的属间杂种, 并且组建了其染色体组亲和关系。另外, Chrungu 等<sup>[5]</sup>获得了花粉败育的 *Brassica maurorum* 和 *crop brassicas* 的种间杂种, Rawsthorne 等<sup>[6]</sup>获得了 C3-C4 中间型 *Moricandia nitens* 植株与 C3 植物甘蓝型油菜的属间杂种。在抗性育种方面, Bradshaw 等<sup>[7]</sup>借助胚拯救技术获得了抗根肿病的白菜品种 ECD04 与羽衣甘蓝的杂种。Kumar 等<sup>[8]</sup>通过胚拯救措施获得了抗蚜、抗旱且高产的芥菜和 *Brassica tournefortii* 的种间杂种。众多实例表明, 胚拯救措施作为一种育种辅助手段能够有效地促进远缘杂交种等新种质的获得。目前, 胚拯救措施与传统杂交方式相结合已经成为进行远缘杂交进而获得远缘杂种的有效途径之一。

## 2.2 体细胞无性系变异

Larkin 等<sup>[9]</sup>将不经体外选择而在组织培养植株上发生的变异称为体细胞无性系变异(somaclonal variation), 并且指出体细胞无性系变异的变异谱和随机性甚广, 其中包括染色体畸形, 点突变, DNA 序列的扩增、缺失、转座, 以及线粒体和叶绿体基因组的改变等。体细胞无性系变异普遍存在于植物界。Skirvin 等<sup>[10]</sup>将体细胞无性系变异划分为可遗传变异(heritable variation)和表观遗传变异(epigenetic variation)两类, 前者在有性世代和无性繁殖世代皆可稳定遗传, 后者则两种情况下都不能遗传。Karp<sup>[11]</sup>指出体细胞无性系变异的染色体区域要比传统育种和诱变育种中的区域大。因此, 它可能是一种原来自然界不存在的可遗传变异, 可被用于作物改良。体细胞无性系变异育种与传统育种相比的优点在于: 变异范围广泛; 占用空间小, 费用低; 向培养基中加入诱变剂或给予冷、热等处理能实现定向育种。但是, 体细胞无性系变异应该与传统育种相结合, 进而通过离体选择在短期内筛选出含有优异农艺性状, 如抗盐、抗病等新品种<sup>[12]</sup>。体细胞无性系变异育种成功的关键在于变异体后代的遗传稳定性。因此, 无性系变异的检测就显得十分重要。但无性系变异的检测最初主要靠观察表形和染色体水平的变异<sup>[10]</sup>, 这种方法效率较低。RFLP、RAPD、AFLP、SSRs 等分子标记技术的出现为无性系变异的检测提供了有力工具。Brown 等<sup>[13]</sup>首先将 RFLP 技术应用于无性系检测, 从而实现了 DNA 水平的无性系变异检测。但是由于 RFLP 分子标记存在着费用昂贵等缺陷, 后逐渐被 RAPD 技术所替

代<sup>[14,15]</sup>。近年来, AFLP 技术以其信息量大、操作简单等优点也被用于体细胞无性系变异的检测<sup>[16]</sup>。

体细胞无性系变异在十字花科作物育种上的应用主要包括抗病育种、抗土壤障碍育种、抗除草剂育种及抗高、低温育种。如在抗病育种方面, Carlson<sup>[17]</sup>首次报道可利用病原毒素对植物细胞和原生质体进行体外选择可获得对病原侵染反映改变的再生植株。Sacristan<sup>[18]</sup>通过体细胞无性系变异获得了抗 *Phoma lingam* 的甘蓝型油菜。另外, 乙酰甲基磺酸(EMS)种子诱变结合根弯曲突变体筛选法是目前应用较普遍的耐营养胁迫突变体筛选方法。Chaudhary<sup>[19]</sup>应用 EMS 法诱变产生了芥菜型油菜品种 RLM198 的一些形态突变体, 这些突变体从初级分枝与主茎夹角、开花期等方面对于油菜籽粒产量的提高有重要意义。杜立群等<sup>[20]</sup>将豆瓣菜(*Nasturtium officinale* R.Br.)茎段外植体接种到含 1/3 海水的愈伤组织诱导培养基上, 获得耐盐愈伤组织, 并最终获得 18 个正常生长的耐盐豆瓣菜株系, 经 RAPD 分析, 其中 10 个株系的 DNA 均有变异。尽管利用体细胞无性系变异仍存在着细胞和植株水平变异不一致等局限性, 但是其作为一条安全而有效的育种途径仍有着广泛的潜在利用价值。

## 2.3 单倍体育种

自从 Guha 和 Mahesiwari 通过培养毛叶曼陀罗(*Datura innoxia*)的花药首次获得单倍体植株以来, 迄今至少有 250 种以上的植物利用花药培养获得了单倍体植株。1973 年 Nitsch 和 Norreel 在花药培养的基础上创建了花粉培养体系<sup>[1]</sup>。利用花粉培养或花药培养进行作物育种的方法称为单倍体育种。单倍体育种的优点在于: 单倍体染色体加倍可获得纯合二倍体, 从而实现“真正”的育种; 有利于远缘杂交新类型的培育和稳定; 显性和隐性基因都能在单、双倍体中表达, 从而有利于缩短育种年限和自交系的纯合; 易于雌、雄系等特殊育种材料的获得; 可作为外源基因转化的受体系统。长期以来小孢子培养技术由于受胚状体产率和染色体加倍频率下的限制而不能被广泛应用。因此, 国内外学者为建立高效的胚状体形成体系和染色体加倍体系开展了广泛而深入的研究。如 Cloutier 等<sup>[21]</sup>指出油菜游离小孢子胚胎发生能力(MEA)是由核基因控制的遗传性状。刘雪平等<sup>[22]</sup>研究了向 NLN-16 培养基中加 6-BA 和活性炭(AC)对甘蓝型油菜胚状体产率的影响, 指出 6-BA 能显著提高其胚状体的产率; Silva<sup>[23]</sup>的研究表明向培养基中加入活性炭可提高不同甘蓝形态型的胚状体产率。Dias 等<sup>[24]</sup>研究了温度胁迫对小孢子培养中愈伤组织分裂的影响及培育温度和

培养基对花椰菜胚状体产率的影响, 指出 32.5 °C 下培育 1 天、用 1/2NLN-13 培养基代替 NLN-13 培养基能显著提高花椰菜胚状体产率。Lionneton 等<sup>[25]</sup>指出在褐芥小孢子培养基中蔗糖浓度由 17% 降到 10%, 能促进褐芥胚状体产率的提高。Rudolf 等<sup>[26]</sup>指出高浓度的氟乐灵能提高双单倍体产率。十字花科作物中有不少改善作物品质、提高作物抗性等单倍体育种的成功范例报道。如 Mollers 等<sup>[27]</sup>报道通过小孢子培养获得了高油脂含量的甘蓝型油菜胚状体, 并指出高芥酸含量种质的选择可在离体培养的早期阶段开始; Voorrips 等<sup>[28]</sup>报道通过小孢子培养获得了抗根肿病(*Plasmodiophora brassicae*, clubroot)的甘蓝双单倍体系群体, 并用 RFLP 和 AFLP 技术对其两个与根肿病相关的基因进行了定位。

目前, 利用花粉和花药培养进行单倍体育种已经被应用于十字花科作物育种实践, 成为一些作物育种的重要途径。

## 2.4 体细胞杂交(原生质体融合)

体细胞杂交(somatic hybridization)又称为原生质体融合, 分自发融合和诱导融合两类。前者指植物组织或细胞在用酶分离原生质体过程中发生的原生质体自然融合现象; 后者是指分离原生质体以后, 通过加入诱导剂或利用其他方法诱导不同亲本原生质体发生融合的过程。理论上体细胞杂交可在包括种内、种间、属间、科间甚至是界间的任何原生质体间进行。它能克服有性远缘杂交育种中的不亲和性, 而获得亲缘关系很远的体细胞杂种。同时, 原生质体融合能实现胞质基因的重组和转移, 从而达到改良由胞质基因控制的性状的目的。

目前, 体细胞杂交技术已被广泛用于十字花科的细胞质雄性不育、抗病、抗虫、抗逆境等方面的研究。如 Pelletier 等<sup>[29]</sup>报道利用体细胞杂交技术培育出了耐低温的甘蓝型油菜细胞质雄性不育系(CMS)。从此, 利用原生质体融合技术进行细胞质雄性不育转化的研究得以广泛开展, 花椰菜<sup>[30]</sup>、甘蓝<sup>[31]</sup>等十字花科作物先后通过体细胞杂交获得了细胞质雄性不育植株。Hagemori 等<sup>[32]</sup>用萝卜和花椰菜融合得到了抗根肿病的花椰菜。Hansent 等<sup>[33]</sup>利用原生质体融合技术, 获得了抗黑腐病的甘蓝。Kirti 等<sup>[34]</sup>利用体细胞杂交技术, 将抗黑斑病基因导入到芥菜型油菜。Lelivelt 等<sup>[35]</sup>用萝卜或白芥分别与甘蓝型油菜融合, 得到的体细胞杂种表现出了对甜菜孢囊线虫病(beet cyst nematode, *Heterodera schachtii*)高水平的抗性。体细胞杂交最为突出的优点在于它能够实现胞质基因的转化。

## 2.5 离体受精

离体受精(*in vitro* pollination)是把精细胞、卵细胞从母体上分离, 运用精、卵细胞融合技术形成人工合子, 并将合子进行离体培养, 使其发育为完整植株的过程。从离体受精的过程来看, 它可能克服孢子体型不亲和性。另外, 植物的离体受精过程有利于雌、雄配子的识别融合机制以及合子胚胎发生等机制的研究。如果结合胚胎发生特性及合子二倍性, 以合子作为受体细胞, 运用微注射 DNA 技术进行遗传操作, 那么就可使转基因植物研究的后期工作简化, 同时可能避免以抗菌素基因作为筛选基因而带来的转基因生物安全隐患。另外, 通过异种植物离体精、卵细胞融合, 并对杂种合子进行人工培养, 可能克服体细胞杂交中存在的亲本染色体间相互排斥的现象和染色体减半现象。

Kranz 等<sup>[36]</sup>首次在玉米上采用电融合方法实现了离体受精的突破, 创建了玉米离体受精这一模式系统, 并且进行了异种植物精卵细胞的融合实验<sup>[37]</sup>, 用玉米卵细胞与高粱、小麦、大麦的精细胞融合实验中, 分别得到了 50%、23%、43% 杂种多细胞团结构。但是他用玉米卵细胞融合油菜精细胞的实验却没有成功, 这表明亲缘关系仍是制约远缘受精的重要因素。目前, 已经有园艺植物如芦笋<sup>[38]</sup>等离体受精研究报道, 尚未见到有关十字花科作物离体受精的成功范例报道。但是作为一种全新的细胞水平的远缘杂交, 它在十字花科种质创新中具有巨大的潜在利用价值。

## 2.6 染色体工程

染色体工程(chromosomal engineering)是指按照人们的预先设计, 通过增加、代换、削减和易位等染色体操作来改变物种染色体组成, 进而实现作物遗传特性定向改变的技术。染色体工程可被用于研究基因定位和异缘基因导入。利用染色体工程可获得双二倍体系、异附加系、异代换系、易位系、单体与缺体系。目前, 染色体工程的主要研究内容是将来自不同种或属染色体组的  $F_1$  经人工诱导或自然加倍来创造双二倍体。利用双二倍体可以把不同种属间的有益性状综合起来, 如可将野生植物与栽培作物进行远缘杂交, 培育出优良的作物新品系和新品种。染色体工程在十字花科作物中的应用亦主要体现在双二倍体的获得上。Matsuzawa 等<sup>[39]</sup>利用 4 个芜菁受体亲本基因型和 5 个萝卜花粉亲本品种进行属间杂交, 将 0.2% 的秋水仙碱溶液喷到  $F_1$  杂交植株(AR,  $2n=19$ )的腋芽上。进行了开放授粉, 从  $F_4$ ~ $F_7$  代  $2n=38$  的植株中筛选获得了 AR-89 双二倍体, 其株型、叶型、开花期介于双亲之间。徐利远等<sup>[40]</sup>在  $MS+0.2\text{ mg/L NAA}+3\text{ mg/L BA}+1\text{ g/L 秋水}$

仙碱+30 g/L 蔗糖+89 g/L 琼脂的培养基中, 接种甘蓝型油菜奥罗与篮花子的杂种 F<sub>1</sub>, 并进行加倍处理, 经快速繁殖后获得了大量的染色体数为 2n=56 的双二倍体幼苗。该技术在油菜与篮花子远缘杂交中首次解决了用常规方法不易获取远缘杂种稳定双二倍体的难题。但总体来看, 目前染色体工程研究进展得较为缓慢。

### 3 展望

迄今为止, 国内外利用植物细胞工程技术进行十字花科作物种质创新已取得了一定的研究进展, 在当代生物技术中显示了其独特的优点。将十字花科作物种质创新从个体水平提高到细胞水平, 可以克服常规育种的许多局限性, 提高育种效率, 实现育种新突破。如通过体细胞杂交、胚拯救、离体受精等技术可以克服常规育种中的远缘杂交不亲和障碍; 通过体细胞杂交实现胞质基因的转化; 通过体细胞无性系变异和小孢子培养实现快速定向抗性育种。同时, 值得一提的是植物细胞工程(不包括植物基因工程)不存在转基因产品的安全隐患, 可被人们普遍接受, 具有十分广阔的发展前景。另一方面, 植物细胞工程中也存在着如后代遗传不稳定、杂和细胞中异缘基因一方排斥另一方等问题, 这还需要进一步加以深入研究和改善。现在, 科学家们已经通过植物细胞工程获得了大量的植物产品, 如生物碱、酶制剂、天然色素、名贵花卉、良种苗木等。因此, 相信在未来几年中, 植物细胞工程在植物种质创新中必将发挥更大的作用。

#### 参考文献 (References)

- [1] 曹家树等。园艺植物育种学, 北京: 中国农业大学出版社, 2001, 28
- [2] Cheng BF *et al. Genome*, 2002, **45**: 110
- [3] Ripley VL *et al. Plant Breed*, 2003, **122**: 1
- [4] Banga SS *et al. Theor Appl Genet*, 2003, **106**: 1244
- [5] Chrungu B *et al. Theor Appl Genet*, 1999, **98**: 608
- [6] Rawsthorne S *et al. Theor Appl Genet*, 1998, **96**: 922
- [7] Bradshaw JE *et al. Ann Appl Biol*, 1997, **130**: 337
- [8] Kumar R *et al. Indian J Exp Biol*, 2001, **39**: 911
- [9] Larkin PJ *et al. Theor Appl Genet*, 1981, **60**: 197
- [10] Skirvin RM *et al. HortScience*, 1994, **29**: 1232
- [11] Karp A. *Euphytica*, 1995, **85**: 295
- [12] Jain SM. *Euphytica*, 2001, **118**: 153
- [13] Brown PTH *et al. Theor Appl Genet*, 1991, **81**: 227
- [14] Godwin ID *et al. Plant Cell Rep*, 1997, **16**: 320
- [15] Nayak S *et al. Plant Sci*, 2003, **164**: 1029
- [16] Polanco C *et al. Plant Sci*, 2002, **162**: 817
- [17] Carlson PS *et al. Science*, 1973, **180**: 1366
- [18] Sacristán MD. *Theor Appl Genet*, 1982, **61**: 193
- [19] Chaudhary RM *et al. Indian J Genet*, 1999, **59**: 175
- [20] 杜立群等。植物学报, 1999, **41**: 633
- [21] Cloutier S *et al. Theor Appl Genet*, 1995, **91**: 841
- [22] 刘雪平等。遗传, 2003, **25**: 433
- [23] Dias JCS *et al. Euphytica*, 1999, **108**: 65
- [24] Dias JS *et al. Sci Hortic*, 2002, **93**: 205
- [25] Lionneton E *et al. Plant Cell Rep*, 2001, **20**: 126
- [26] Rudolf K *et al. Plant Breed*, 1999, **118**: 237
- [27] Möllers C *et al. Euphytica*, 2000, **112**: 195
- [28] Voorrips RE *et al. Theor Appl Genet*, 1997, **94**: 75
- [29] Pelletier G *et al. Mol Gen Genet*, 1983, **191**: 244
- [30] Yarrow SA *et al. Plant Cell Rep*, 1990, **9**: 185
- [31] Cardi T *et al. Theor Appl Genet*, 1997, **94**: 204
- [32] Hagimori M *et al. Theor Appl Genet*, 1992, **84**: 819
- [33] Hansen LN *et al. Theor Appl Genet*, 1995, **91**: 1293
- [34] Kirti PB *et al. Plant Cell Rep*, 1995, **14**: 593
- [35] Lelivelt CLC *et al. Theor Appl Genet*, 1993, **85**: 688
- [36] Kranz E *et al. Sex Plant Reprod*, 1991, **4**: 12
- [37] Kranz E *et al. Plant J*, 1995, **8**: 9
- [38] Marcellán ON *et al. Sci Hortic*, 1999, **81**: 1
- [39] Matsuzawa Y *et al. Plant Breed*, 2000, **119**: 357
- [40] 徐利远等。遗传学报, 1996, **23**: 124

## Progress of Plant Cell Engineering in Germplasm Enhancement of Cruciferace

Ya-Ming Ge, Li-Ping Chen\*

(Department of Horticulture, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University; Key Laboratory for Horticulture Plant Growth, Department & Biotechnology, Agricultural Ministry of China, Hangzhou 310029, China)

**Abstract** In the present article, we reviewed the aspects of embryo rescue, somaclonal variation, microspore culture, somatic hybridization, chromosomal engineering, *in vitro* pollination and their applications in cruciferous crops. Meanwhile, their prospects in future were discussed.

**Key words** plant cell engineering; cruciferace; germplasm enhancement

Received: December 31, 2003 Accepted: March 21, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30370903)

\*Corresponding author. Tel: 86-571-86971006, Fax: 86-571-86971638, E-mail: chenliping@zju.edu.cn