

植物细胞杂交研究的现状

吴 栋

(中国科学院上海植物生理研究所细胞生理室)

自两种比较有效的融合方法(高 pH 高 Ca 法和聚乙二醇法)确立以来,植物细胞杂交的研究进展迅速。至今已有九个国家和地区的实验室得到了 20 多个细胞杂种植株^[1-22]。近年来植物细胞杂交的研究工作主要集中在异核体的筛选,杂种植株的鉴定以及异核细胞在膜融合后的核行为等问题上。现将资料较全的 22 例

细胞杂种列于表 1,并在以下几方面进行一些分析。

一、以组织和细胞培养技术为基础的筛选方法

将 A、B 两种原生质体进行融合处理后,细胞群体中将有三种类型的个体: A 类、

表 1 22 例植物细胞杂种有关资料一览表

编号	作者 (发表年份)	亲 本	融 合 方 法	筛 选 原 理	鉴 定 证 据
1	Carlson (1972年)	<i>N. Langsdoffii</i> <i>N. glauca</i>	硝酸 钠法	在无生长素培养基上,二亲本不能生长,而杂种能生长。选择生长迅速的愈伤组织。	过氧化物酶酶谱,肿瘤形成和叶柄叶形等特点。
2	Melchers (1974年)	<i>N. tabacum</i> , L 二个单倍体品种:s.r.	高 pH-Ca 法	二亲本光敏感,且于不同位点控制叶绿体缺失。在强光下选择绿色愈伤组织。	杂种叶绿体正常绿色,且后代分离。
3	Kameya (1975年)	二个烟草单倍体品系	葡聚糖 硫酸盐法	一亲本为正常绿叶组织,一亲本为双基因控制白化愈伤组织。挑选绿苗,且后代分离白化苗的枝条。	杂种为绿色,且后代以 1/16 机率分离白化苗。
4	Gleba (1975年)	<i>N. tabacum</i> , L 二个品种:C. H; D. B.	PEG 法	二亲本丧失光合能力,一为胞质突变,一为基因突变。选择光合能力恢复的植株。	叶色鉴定。
5	Power (1976年)	<i>Petunia parodii</i> <i>P. hybrida</i>		P.p 只能长到细胞株,但抗放线菌素-D; P. h 能在培养基上生长,但对放线菌素 D 敏感。选择抗放线菌素 D 且生长的愈伤组织。	叶过氧化物同工酶和花色等。
6	Smith (1976年)	同 1		在无激素培养基上,只有杂种细胞生长。选择生长的愈伤组织。	同 1
7	Melchers (1977年)	<i>N. sylvestris</i> <i>N. tabacum</i>	高 pH-Ca 法	同 2	同 2
8	Belliard (1977年)	<i>N. tabacum</i> : ts, sf (胞质为 debneyi)	PEG 法	将培养物诱导出苗后鉴定(亲本中 sf 为雄性不育)。	雄性不育;形态特征。
9	Schieder (1977年)	<i>Datura innoxia</i> 二突变体		二亲本不同位点控制叶绿体缺失。挑选绿色愈伤组织。	叶绿体回复(对照无回复)。
10	Dudits (1977年)	<i>Daucus carota</i> <i>D. capillifolius</i>		D.car. 为白化突变体, D.cap. 为正常植株,但在 C87V 培养基上受抑制。挑选: (1)在 C81V 培养基上生长的愈伤组织, (2)有光合能力的胚。	过氧化物酶酶谱;形态特征。
11	长尾照义 (1978年)	<i>N. tabacum</i> 突变体 <i>N. rustica</i>		N.t 为白化突变体, N.r. 为正常植株。挑选结构坚硬,淡绿色愈伤组织。	抗烟草花叶病毒;以及叶、花、株高等。

续表 1

编号	作者 (发表年份)	亲本	融合方法	筛选原理	鉴定证据
12	Schieder (1978年)	<i>Datura innoxia</i> <i>D. stramonium</i> <i>D. discolor</i>	PEG 法 高 pH-Ca 法	D. i. 叶绿体缺失; D. s. 与 D. d. 在确定培养基上不生长。在确定培养基上选择生长的绿色的愈伤组织。	苹果酸酶, 淀粉酶和染色体数。形态特征。
13	Maliga (1978年)	<i>N. tabacum</i> <i>N. kaightiana</i>	PEG 法	N. t. 为单基因控制白化突变体 N. k. 在特定培养基上不生长。选择生长的、绿色的愈伤组织。	磷酸二酯酶, 乙醇脱氢酶, 形态特征。
14	Chupeau (1978年)	同 (1).(6).		同 (6)	同 (6)
15	Menezel (1978年)	<i>N. knightiana</i> <i>N. Sylvestris</i>		N. k. 叶肉细胞; N. s. 白化苗的悬浮细胞, 抗卡那霉素。单细胞挑选, 后由 N. s. 看护培养, 再选绿细胞株。	酯酶酶谱; 杂种绿色且抗卡那霉素; 形态特征。
16	Zelcer Aviv (1978年)	<i>N. t.</i> (<i>N. Suaveolens</i> 质) <i>N. Sylvestris</i>		N. s. 对甘露醇敏感, X射线阻止 N. t. 细胞分裂。挑选抗 X 射线, 抗甘露醇的愈伤组织。	雄性不育; 形态特征。
17	Gleba Sythik (1978年)	烟草	PEG + 高 PH-Ca 法	一为不分化的老细胞, 抗 5-甲基色氨酸; 另一对光敏感。在强光下, 挑选抗 5-MT 培养物, 并诱导出苗。	(不详)
18	Melchers (1978年)	<i>Lycopersicon seculentum</i> <i>Solanum tuberosum</i>		番茄为叶肉组织, 在培养基上不能成苗, 马铃薯为愈伤组织。选择绿色单细胞, 诱导出苗。	核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶。
19	Krumbiegel Schieder (1979年)	<i>Datura innoxia</i> <i>Atropa belladonna</i>		D. i. 叶绿体缺失, 组织有短毛; A. b. 为野生型。选择绿色、有短毛的愈伤组织。	D. i. 的染色体长度是 A. b. 的二倍; 形态特征。
20	Gleba (1979年)	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Brassica campestris</i>	A. t. 为愈伤组织; B. c. 为绿叶, 二亲本在特定培养基上不生长。单细胞挑选, 并在特定培养基上培养。	染色体识别。PAG 酶, 乳糖脱氢酶; 过氧化物酶; 形态特征。	
21	Power (1979年)	<i>Patunia inflata</i> <i>P. parodii</i>	PEG 法	P. p. 在 MS 培养基上只能长到细胞群; P. i. 为白化突变体。选择绿色愈伤组织, 再在 MS 上筛去 P. p.	形态特征。
22	Dudits (1979年)	<i>Daucus carota</i> <i>Aegobadium podagraria</i>	D. c. 为核控白化突变体; A. p. 在特定培养基上不能长壁分裂。挑选绿色愈伤组织, 在无激素培养基上成苗。	**	

*. 编号与参考文献顺序一致。

** 分子杂交法, 鉴定出 A. p. 的特殊 RNA; 根发育显示 A. p. 特征; 均为 D. c. 染色体, 但叶绿体回复。

B类(这两类各自包括了未参与融合的原生质体和同种原生质体间融合的个体)和异核体(A、B间发生融合的个体)。其中异核体只占整个群体的一小部分。所以, 为完成细胞杂交, 筛选措施是必须的。如何把这一小部分的异核体筛选出来, 是近年来植物细胞杂交研究的中心课题之一。

从 22 例细胞杂种中可以看到, 筛选方法目前基本上都可归属于卡尔逊^[1]和梅尔歇斯^[2]首先使用的两类方法: (1)利用遗传性状的差异, 把可能的异核体从亲本中挑选出来; (2)利用遗传控制的代谢过程的差异, 即在培

养基内添加某种抑制因素(某种药剂或物理因素), 或缺少生长的某种必需因子, 抑制亲本(1个甚至2个)细胞的生长, 从而挑选出不受抑制的杂种细胞。筛选可以在细胞的不同生长阶段, 即细胞、组织、再生植株三个不同水平上来完成。赖以筛选的差异对两个亲本必需是互补的。由此有的经过一项, 而大量的的是经过两项或多项筛选措施分别把两个亲本在群体中筛去, 选出异核体。每例杂种的具体筛选措施列于表 1。

表 2 统计了 22 例杂种在两类方式三个水平上进行的筛选措施的情况。

表 2 22 例杂种筛选措施情况统计

	代谢过程差异	遗传特性差异
整体水平		3 例
组织水平	8 例	10 例
细胞水平	8 例	3 例

很明显, 筛选措施主要在愈伤组织水平上以及细胞水平上利用代谢过程的差异进行的。第 3、4、8 三例在细胞和组织培养过程中没有附加筛选措施, 而是将所有培养物尽可能诱导出苗, 然而在所得的植株中进行挑选鉴定。第 18、20 两例采用了单细胞挑选的方法, 再进行单细胞培养, 这样使筛选过程大大简化, 这是一项值得重视的新技术。

二、运用遗传分析手段进行鉴定

筛选措施可将异核体与亲本区分开来, 然而这仅提供了获得异核体的可能性。因为: (1) 组织培养过程可能诱发突变; (2) 培养物间可能发生交叉饲养(cross feeding); (3) 直接挑选过程难免发生混杂等, 都可能使预期筛选的培养物混入到异核体的群体中来。还应看到, 许多实验的筛选措施设计本身就不十分严格。所以, 筛选的实际效果只能是提高群体中异核体的比例, 对于获得的可能的杂种植株, 还必需寻找其他证据, 证明具备了亲本双方的遗传信息。可喜的是, 遗传分析的方法为异核体的鉴定提供了多种手段, 对异核体的鉴定已不是一件困难的事情。

纵观 22 例实验, 鉴定证据主要从以下五方面获得:

(一) 再生植株形态。这是普遍采用的一种手段, 有 13 例在杂种植株的形态上找到了双亲的特征。

(二) 细胞学特征。主要有: (1) 叶绿体回复突变, 如果亲本中有白化突变体, 这是一个很有说服力的遗传特征; (2) 染色体观察, 如果两亲本染色体形态差异明显, 这种方法是很

可靠的, 而在远缘杂交组合中, 两类细胞染色体特征差异也往往是很明显的。

(三) 生理特性。已采用的例子有: 肿瘤形成^[1,4,6], 抗烟草花叶病毒^[11]抗卡那霉素^[15], 根发育特性^[22], 雄性不育等^[8,16]。

(四) 同工酶。这也是普遍采用的方法之一。

(五) 分子杂交。这是目前最有说服力的方法。在第 22 例中, Dudits 获得的胡萝卜羊角芹杂种植株的染色体数为: $2n = 18$, 均为胡萝卜的染色体。然而他用分子杂交的方法证明, 杂种中携带了羊角芹特定的 RNA 片断, 从而鉴定了那是杂种。

三、关于异核体的核行为问题

在细胞杂交这一课题刚提出时, 对核行为的复杂性是估计不足的, 似乎异核细胞融合后就成为双二倍体(或双单倍体), 再生的植株可携带亲本的两套遗传信息。高国楠^[2]首先报告了远缘组合中染色体丢失和核行为的情况。随着研究的不断深入, 核行为问题越来越突出。从 22 例杂种实验中足以看出染色体变化的错综复杂。根据现有资料, 膜融合后核行为大致可归纳为以下四种类型:

(1) 核分裂同步, 核融合, 且两亲本的染色体未发现有不亲和现象——杂种细胞有可能发生形态建成过程。

(2) 核分裂同步(或相互影响后同步), 核融合, 但在不同培养时期发生染色体变化(染色体重组, 丢失等)——有可能进行形态发生(或者是带有双亲染色体的杂种, 或者是只有一个亲本染色体的胞质杂种)过程。

(3) 核不融合, 且两个核间重又产生新膜(但这以前细胞质已融为一体了), 两个子细胞以后各自分裂——有可能形态发生(产生胞质杂种或嵌合体)。

(4) 核不融合, 形成多核细胞, 细胞周期紊乱。

以上四种核行为中, 第一、二、三种均有

可能再生植株。分析 22 例杂种实验, 属于第一类的, 只可能在有性杂交亲和的组合中出现。产生的胞核杂种, 因其来源有两种可能(或者第二类、或者第三类), 所以很难断定是否发生了核融合; 其余大量的可确定为第二类, 即产生的杂种发生染色体变化, 特别是染色体丢失。

那么是什么因素促成了染色体的变化呢? 有些例子归结为亲本的生理状况, 如 Power^[2]在矮牵牛和爬山虎的细胞杂交试验中观察到染色体的丢失是由于有丝分裂的不同时期而造成的; Dudits^[22]认为, 在他的胡萝卜与羊角芹细胞杂交实验中, 羊角芹染色体的丢失是因为羊角芹叶肉细胞正处于 G 期。然而, 更重要的起主导作用的因素应该归结为遗传问题。因为大量的染色体丢失事实只有从亲本间染色体携带的遗传信息的差异这一角度才能解释, 而对于亲本间生理状况差异所造成的染色体变化作用机理的进一步探索, 也许也只能在遗传角度找到答案。可惜的是, 有关植物细胞融合后染色体变化机理, 未见到深入的详尽的研究报告, 大量的观察。

十多年来, 在植物细胞杂交研究方面取得了较大的成果, 但还存在着不少困难。细胞杂交的全过程似乎是一条漫长的战线, 每一环节都是一项研究课题。其中, 膜融合后核行为的错综复杂的关系是当前面临的最大的障碍之一。其他诸环节, 如原生质体的游离、融合, 异核体的筛选、鉴定, 异核细胞的培养等, 均迫切要求在机理上有更深入的认识, 技术上有更先进的手段。如何加快植物细胞杂交研究的步伐, 是有关工作者所共同关心的问题。作者

将试图在另文中作一些讨论。

参 考 文 献

- [1] Carlson, P. S., Smith, H. H. et al. 1972 *Prec. Acad. Sci. (USA)* 69: 2292—2294.
- [2-5] 中国科学院上海植物生理研究所细胞室, 1979. 植物细胞培养和细胞杂交资料集, 科学出版社, 第 46, 52, 61, 68, 72, 77, 87 页.
- [6] Smith, H. H., Kao K. N. et al. 1976 *J. Hered* 67: 123—128.
- [7] Melchers, H. et al. 1977 *Inter. Cell Biol.* 1976-77 by B. R. Brinkley. pp 207—215.
- [8] Belliard, G. et al. 1977 *C. R. Acad. Sci. Paris. t.* 284: 794—752.
- [9] Schieder, O. et al. 1977 *Planta* 137: 253—257.
- [10] Dudits, D., et al. 1977 *TAG* 51: 127—132.
- [11] 长尾照义, 1978, 日本作物学会记事 47: 491—498.
- [12] Schieder, O. et al. 1978 *MGG* 162: 113—119.
- [13] Maliga, P. 1978 *MGG* 163: 145—151.
- [14] Chupeau, Y. et al. 1978 *MGG* 165: 239—245.
- [15] Menezel, L. et al. 1978 *Planta* 143: 29—32.
- [16] Zelcer and Aviv 1978 *Z. Pflanzenphysiol* 90: 397—407.
- [17] Gleba, Y. Y. et al. 1978 *Fifth Inter. Pro. Symposium*: p 73.
- [18] Melchers, G. et al. 1978 *Carlsberg Res. Commun.* 43: 203—218.
- [19] Krumbiegel, G. and Schieder, O. et al. 1979 *Planta* 145: 371—375.
- [20] Gleba, Y. Y. et al. 1979 *Naturwissenschaften* 66: 547—554.
- [21] Power, J. B. et al. 1979 *TAG* 55: 97—99.
- [22] Dudits, D. et al. 1979 *Plant Sci. Lett.* 15: 101—112.