

罗士韦 何卓培

(中国科学院上海植物生理研究所细胞生理室)

一、引言

植物组织培养研究与应用的进展,吸引多种学科工作者的参与;它在生产上的作用也日益明显。Carlson 等人开拓性的研究展示出有可能用分子生物学的知识,以高等植物细胞为实验系统,来扩充对高等植物的认识与改良植物的性状。可以像对微生物材料那样设计各种实验,用单倍体、二倍体以至多倍体植物细胞,在比田间试验小得多的空间和较短的时间,在人工控制的环境中操纵大量的基因组,在整体植株水平回收所发生的遗传修饰并研究其有关问题。用高等植物培养细胞最早分离出突变体细胞系的正式报道是:Carlson (1970) 从单倍体(占 60—85%)烟草细胞悬浮培养经甲基磺酸乙酯(EMS)诱变,选择出渗漏的营养缺陷型^[1]。此文发表后两个月,Heimer 等(1970)报告,以硝酸盐作唯一氮源时,从自发突变可分离出能抗苏氨酸的烟草细胞系^[2]。此后,营养缺陷型和抗性两类突变体的研究逐渐展开,至 1976 年至少已有得到 22 个突变体的报道。不过,据 Maliga 认为,其中大部分是否属真正的突变体尚成问题。鉴于突变的定义是 DNA 一级结构中之能遗传的变化,这些变化不是由于遗传分离或遗传重组所引起的。其表现型就是与野生型不同的突变体细胞或突变个体。故若说某一突变的细胞系属于真正的突变体,其最合乎科学的标准,应该是它再生成能育的植株,并把其变异的特性传递给子代,这样该变异的表现型才一定是突变的结果。若从变异的细胞不能再生植株或再生植株不育,而能证明在变异的细胞中有变化了的基因产物

时,例如有与野生型不同的氨基酸顺序的酶,也可以看作是突变的证据。不具备上述两条标准之一的变异的表现型,都不属于真正的突变体,而称作“表型变异体(phenotypic variant)”或(细胞)系(line)较为妥当。

二、突变的诱发

突变可以自发发生(自发突变),也可以受诱变剂诱发(诱发突变)。从有限的资料估计,自发突变频率在悬浮培养细胞约为 10^{-6} — 10^{-7} ,在大部分细胞为单倍体的原生质体约为 10^{-4} — 10^{-5} 。用诱变剂,如 EMS、N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(NG)、N-乙基-N-亚硝基胍(NEU)、乙烯亚胺(EI)、紫外线和 α 射线处理,可以增加存活细胞群中变异型的频率约 10—100 倍。参看(表 1)^[3-8]。

诱变因素 物理的诱变因素如不同类型的辐射:紫外线(UV)、 γ -射线、 α 射线和中子等。

化学的诱变因素按其 DNA 的作用方式可分三类:第一类是与核酸碱基起化学变化而且留在原位,因而引起 DNA 复制时碱基配对的改变。如:亚硝酸、硫酸二乙酯、EMS、EI、硝基胍、亚硝基甲基胍等。第二类是天然碱基的类似物,在细胞内核酸复制时,它们可以掺入到新合成的 DNA 分子中。如:5-溴尿嘧啶、8-氮鸟嘌呤和 2-氨基嘌呤等。第三类是移码诱变剂。如吡啶类物质和 ICR 化合物。

自发突变是经常发生的,但其频率很稀

本文是 1981 年 9 月在芜湖举行的全国植物细胞生理专业学术讨论会大会报告之一。

表 1 培养细胞的诱变发生

处 理	存 活 (%)	表 现 型	频 率		种 名	文 献
			自发的	诱导的		
悬浮培养细胞						
EMS (2.5%, 2小时)	10 ^a	抗放线菌酮 ^c	5.4×10^{-8}	7.7×10^{-7}	<i>Daucus carota</i>	Sung 1976 ^[3]
NG (100 μ g/ml, 14小时)	1 ^a	抗放线菌酮 ^c	5.4×10^{-8}	4.4×10^{-6}	<i>D. carota</i>	[3]
NEU (25mM, 直至分解为止)	—	抗氯酸盐 ^e	6.6×10^{-8}	2×10^{-7}	<i>Nicotiana tabacum</i> (n = 2x = 24)	Müller 等 ^[4] 1978
原生质体						
X射线(1000R)	50 ^b	色素改变 ^d	10^{-5}	4×10^{-4}	<i>Datura innoxia</i> (n = x = 12)	Schieder 1976 ^[5]
NG (10 μ g/ml, 0.5小时)	50 ^b	色素改变 ^d		2×10^{-4}	<i>Datura innoxia</i> (n = x = 12)	Krumbiegel 1979 ^[6]
UV(1000 尔格/mm ²)	40—60 ^b	抗缬氨酸 ^d	2.2×10^{-6}	1.4×10^{-5}	<i>N. tabacum</i> (n = 2x = 24)	Bourgin 1978 ^[7]
愈伤组织培养						
EMS(1%, 2小时)	—	形态改变的再生体 ^d	0%	6%	<i>N. sylvestris</i> (用 n = x = 12 的植株开始处理)	Malepszy 等 1977 ^[8]
EI(0.05%, 96小时)	—	白化的地上部/愈伤组织	0%	0.7%		
		形态改变的再生体 ^d	0%	25.3%	<i>N. sylvestris</i> (用 n = x = 12 的植株开始处理)	[8]
		白化的地上部/愈伤组织	0%	1%		

a. 从生长曲线外推。 b. 测定生成愈伤组织细胞的比例。 c. 没有遗传研究的报告。

d. 遗传研究证实, 至少在一些分离体中存在突变。 e. 仅仅考虑硝酸还原酶缺陷型。

少, 稳定的基因往往在一百万次细胞分裂中才发生一次突变。为提高产生突变的频率, 及获得在自发突变中所未见过的新的突变, 人们使用物理的或化学的因素来诱发突变。

诱变因素的剂量和诱变方法的选择 一般凭经验而最终以实验结果为准。可以首先按需要与可能试用一般认为效果较好的方案。例如, 有认为适宜诱变的辐射剂量是照射后存活率在一半多些的剂量。

用复合诱变方法处理微生物或植物材料, 已引起人们的重视, 它可能得到较多的可能有经济价值的突变体。处理方法有: (1) 两种或多种诱变因素同时使用; (2) 同一种诱变因素

连续重复使用和(3)两种或多种诱变因素先后交替处理。一般说, 先用较弱的, 再用较强的诱变因素比较有效地扩大诱变的幅度和位点。

化学诱变剂一般都有毒而且很多有致癌作用^[9]。务必注意不能用口吸取, 并且避免直接接触皮肤。诱变处理后, 可以用大量稀释来中止诱变剂的作用或用解毒剂来中止。例如, 用硫代硫酸钠来中止 EMS 或硫酸二乙酯的作用。

诱变处理通常在 25℃左右, 在培养基中进行。中止处理以后, 培养几个细胞周期的时间, 好让表现型表达。之后, 按所希望的表现型来筛选培养物。

三、突变体的分离、鉴定与保持 诱变或分离所用的材料

烟草是目前采用较普遍而且方便的细胞遗传学研究材料,因为它较易于培养和从愈伤组织较易于再生植株,也较易于得到单倍体。

希望用于育种的材料,则应该用优良的、仅存在个别缺点需要改进的基因型。

植物细胞在连续继代培养的历程中会积累染色体的异常和突变。直接从植株分离得的原生质体或单细胞是最理想的,因为它们(1)实际上是不存在那种染色体的变异;(2)可以避免或限制形成嵌合体。不过,用原生质体目前还限于仅在少数种的植物能形成植株,而且要求较熟练的技术。作为折衷方案是用外植体发生的愈伤组织或从上述那样的原生质体或愈伤组织发生的悬浮培养物。突变细胞在愈伤组织中比在有分化结构的组织中容易存活。已知愈伤组织中不定芽往往是发生自少数几个甚至是单个细胞,这样也可以限制形成嵌合体;若再配合适当的选择手段,杀死或淘汰未突变的亲本细胞,就会更好。

可以用单倍体细胞,因为它们没有等位基因的显性性状掩盖隐性性状的问题,诱变后当代会表现出性状变异,经选择和加倍后,可以成为二倍体纯系。也可以用二倍体细胞,它们也能分离显性突变体。好些抗性突变体似乎是显性的。对分离细胞质突变体来说,二倍体是遗传上更稳定的。

原则上在细胞周期中DNA复制最快的时期(S期)作诱变处理,会比较容易通过来不及修复的DNA复制差错而发生变异。

突变体的分离和鉴定的步骤

从发生突变的材料中获得所需要的突变体有赖于得当的分离与鉴定。下面介绍两种分离选择法及鉴定步骤。

分离营养缺陷型或温度敏感突变体的富集法(负选择法) 经诱变处理后的细胞,在含有³H-胸腺嘧啶脱氧核苷或溴脱氧尿苷(BUdR)

或氮鸟嘌呤的基本培养基中培养时,野生型细胞由于在基本培养基中能生长,而把上述三种药品掺入细胞。有³H-胸苷掺入时引起氟自杀;有BUdR掺入的细胞经照光后死亡;掺入氮鸟嘌呤的细胞也死亡。从而分离出在基本培养基中不能生长,因而也不被杀死的营养缺陷型细胞。

分离抗性突变体的直接选择法(正选择法)

直接选择的原理是把大量细胞置于有毒的化合物影响下,亲本细胞不能生长而抗性系得以分离出来。大多数情况下,把在选择条件下生长的能力规定叫抗性。

选择用的培养方法有悬浮培养和洋菜平板两种。分离和鉴定的一般步骤如下:

1. 在抑制培养基中分离出抗性细胞系 经诱变处理后(或供选择自发突变)的细胞群,在含有抑制生长的不同浓度选择剂的培养基中培养,并继代培养几代。从中分离出能存活的或相对不受抑制影响的抗性细胞系作为假定的突变体。供进一步鉴定它是不是真正的突变体,可以按以下几步:

2. 消除漏网的野生型细胞 假定的突变体愈伤组织,在含抑制生长浓度的选择剂的培养基中生长,转培几代,以消除可能逃脱选择剂抑制而漏网的野生型细胞。然后转到不含选择剂的培养基中生长,转培几代以消除可能有对选择剂上瘾的野生型细胞。

3. 在组织培养中表现型的表达 假定的突变体愈伤组织,在含抑制生长的不同浓度选择剂的培养基中生长,比较各样假定的突变体,以发现是否那些愈伤组织无性系都有同样类型和同样水平的抗性。

4. 从抗性的愈伤组织无性系再生M₁(诱变第一代,当代)植株 在抗性的愈伤组织无性系失去分化能力和再生植株能力之前,尽快使它们再生出M₁小植株。

5. 以组织培养物来试验突变能通过再生传递 从M₁植株发生次级愈伤组织。然后试那次级愈伤组织的抗性。

突变体所具有被挑选出来的特性,是不一定在其再生的植株上表达的。抗5-甲基色氨酸(5MT)的烟草细胞系生产色氨酸多于正常,并有改变了的邻-氨基苯甲酸合成酶,但这些特征在再生植株的叶片中不表达,而在从再生植株发生的培养物中表达^[10]。

6. 产生种子和后代 M_1 植株的种子代表 M_2 (诱变第二代),一直试到 M_3 , M_4 。

7. 以组织培养物试验突变能通过种子传递,或者在植株水平试验突变的表达。从 M_2 植株发生愈伤组织,然后试那愈伤组织的抗性。或者用 M_1 或 M_2 的试管内小植株(或它的一个芽),在含抑制生长的不同浓度选择剂的培养基中,试其能否生长和反应是否稳定。若不是真的突变而是外遗传的改变,则通过减数分裂之后,那外遗传改变的特征就消失了。

8. 从突变体品系研究遗传并建立种子贮备。像步骤7那样试验 M_2 、 M_3 的试管小植物。到这一步,就可得到突变的稳定性及其遗传方式的充分证据。于是把真正的突变体进行有性繁殖,建立种子贮备。

突变系的保持 植物组织培养之染色体组,在连续继代培养历程中要变化。保持稳定的突变体的方法,最简单的是贮藏再生植株的种子。或者是从突变细胞系再生植株,取其茎尖无菌无性繁殖。不能再生植株的细胞系可以放在液氮中低温贮藏^[11,12]。

四、分离出的一些细胞系的特征

十年来报道的高等植物突变细胞系大致可分为两大类,即营养缺陷型和抗性突变体。今举例如下:

营养缺陷型

在高等植物方面很少见。最早有上述 Carlson(1970)的工作。近来有Sevage等(1979)^[13]用EMS处理,从南洋金花悬浮培养分离出需泛酸的营养缺陷型。

抗性突变细胞系

抗氨基酸或其类似物的 这方面工作最多

而又集中于人类营养必需的氨基酸或其类似物。不过迄今证明为真正突变体的屈指可数(表2,参考Maliga 1978^[14,15]),其中一例是:Bourgin(1978)用紫外线照射单倍体烟草叶肉原生质体,以缬氨酸作选择剂,选择出抗缬氨酸的烟草突变体。它通过有性杂交,以孟德尔遗传的方式作为单一等位基因以显性或半显性传递这一特性。用雄核发育的单倍体烟草叶肉原生质体。开始密度为每毫升 10^5 原生质体作液体培养,紫外线照射总剂量约 1×10^3 尔格/平方毫米,它把植板率减少到为对照(对照是40—80%)的40—60%。照射组和对照组都在暗处培养至少6天,然后移到2000 lux下。一个月以后,把能生长出的细胞群在含不同浓度L-缬氨酸的固体平板上试验抗性。

2—5个月以后,把能生长的愈伤组织小块移入为再生植株用的培养基。再生出的小植株一方面用无菌扦插繁殖,然后移入花房;另方面培养留一个侧芽的一段1厘米长的茎,在含2mM L-缬氨酸的培养基上,测定再生植株对缬氨酸的抗性。在含2mM L-缬氨酸(这浓度允许种子萌发但抑制无抗性的表现型生长)培养基上,放50粒种子做萌发试验,来试后代对缬氨酸的抗性。在含4.3mM缬氨酸的平板上,从照射组原生质体发生的 5×10^5 细胞集群中得到9群是有抗性的;而从对照组 10^6 中则一个也得不到。那9群中,有2群转到不含缬氨酸的分化培养基后没有活下来;有3群不生芽;有4群分化成小植株。用其中之一的地上部外植体,在含不同浓度缬氨酸的培养基上,试出它(Val^R-1)是抗缬氨酸的。 Val^R-1 植株是雄性不育的、染色体数41—49,与野生型(作父本)回交得的 F_1 幼苗,都像其亲本 Val^R-1 植株那样,抗2mM缬氨酸。从这 F_1 代的二倍体植株自交得的 F_2 幼苗中,无抗性的16,抗性的34。 F_1 与野生型相互回交得的 F_2 幼苗,无抗性的与有抗性的约各半^[7]。

抗抗菌素药物和抗核酸碱基类似物的细胞系,可参看表3^[14,16]。

表 2 氨基酸和氨基酸类似物的抗性系

(此表根据 Maliga 1978^[14]增补后编成)

氨基酸类似物: AEC = S-2-氨基乙基半胱氨酸; AZCA = 铃兰氨酸; DHL = δ -羟基赖氨酸;
 Eth = 乙硫氨酸; Hyp = 羟脯氨酸; MS = S-亚氨基甲亚磺酰丁氨酸; 5MT = 5-甲基色氨酸;
 NOL = 正亮氨酸; PFP = 对-氟苯丙氨酸。

机制: op-ac = 过量生产-积累; op-m = 过量生产-转变为酚类。

植株: - = 不可能; + = 存在; ? = 不知道; + E = 显示表现型; + N = 在植株水平选择。

遗传: R = 隐性性状的; D = 显性性状的; S = 半显性性状的; M = 母性遗传。

种 名	表 现 型	机 制	植 株	遗 传	文 献
假挪威槭 拟南芥菜	PFP	phe op-m	—	—	42, 43
	AEC	减少 AEC 掺入	?	?	36
	5MT	try op-ac	?	?	36
胡萝卜	氨基酸敏感性	?	+ N	?	47
	5MT	phe op-ac	—	—	7
	5MT	减少摄取	+ E	?	Widholm, 1974: Plant Sci, Lett, 3:323
大 麦 烟 草	5MT	try op-ac	+ E	?	46
	Hyp	pro op-ac	—	—	48
	Eth	met op-ac	—	—	48
	PFP	phe op-ac	—	—	39, 40
	PFP, Eth, AEC, 5MT	phe, met, lys, try op-ac	—	—	44
	5MT, IAA 自养	try 与 IAA op-ac	+		Sung, 1979: Planta 145:399
	AEC	?	+ E*	R	19
	5MT	phe op-ac	—	—	7
	AEC	lys op-ac	—	—	48
	DHL	lys op-ac	—	—	48
水 稻 马铃薯	PFP	phe op-m	—	—	39, 40, 41
	val	?	+ E	D, S	[7]
	thr	硝酸盐利用	—	—	35
	MS	?	+ E	R ⁺ , S	[17]
	5MT	try op-ac	+		[10]
	AEC	lys op-ac	+ E	—	49, [34]
	5MT	try op-ac	—	—	45
小 麦	5MT	?	?	?	50
	NOL	?	?	?	50
	5MT	? (不是 op)	+ N	+	Widholm, 1977: Crop Sci., 17: 597
玉 米	AEC	?	—	—	51
	AZCA	?	—	—	51
苜 蓿	Eth	met op			[15]

* = 在含 AEC 培养基上选择出的 M2 胚。

+ = 两个有相加效应的位点。

**表 3 抗药细胞系(此表根据[14]增补后
编成。所用缩写与表 2 相同)**

种 名	表 现 型	植株	遗 传	文 献
假挪威槭	抗溴脱氧尿苷	—	—	54
	抗氮鸟嘌呤	—	—	55
	抗秋水仙素	—	—	31
南洋金花	抗氨基蝶呤	+ E	?	6
胡萝卜	抗放线菌酮	+ E	?	9
	抗5-氟尿嘧啶	+ E	?	9,56,[16]
	抗秋水仙素	?	?	31
大 豆	抗 BUdR	—	—	57,58
野生烟草	抗链霉素	+ E	?	33
	抗卡那霉素	—	—	8
	抗氯霉素	+ E	+	59
烟 草	抗氯酸盐	+ E	R	10,52,53
	抗链霉素	+ E	M	17,18,23,59, 60,61,62,63,64
	抗放线菌酮	+	不遗传	13
	抗 BUdR	+ E	S	15,[22],65,66
	"	—	—	67
	抗氮鸟嘌呤	—	—	67
	抗 carboxin	+ E	?	68
	利用甘油	+ E	D	[24]
矮牵牛	抗链霉素	—	—	14, 69
单冠毛菊	抗氮鸟嘌呤			Jones, 1979: Theor. Appl. Genet., 54:81
	抗氮尿嘧啶			

抗病毒素的 最早是Carlson(1973)^[17]用烟草 *Havana Wisconsin* 38 单倍体植株叶肉原生质体或单细胞集群, 经 EMS 处理, 植板在MSO(MS, 即 S-亚氨基甲亚磺酰丁氨酸, 其结构似蛋氨酸也似烟草野火病菌毒素, 它能使叶出现与感染野火病菌相同的缺绿病反应)上, 选择得到抗 MSO 和抗野火病菌毒素(尽管抗性不及另一个栽培品种 Burley 21), 并增加游离蛋氨酸含量的突变体, 频率 10^{-7} 。选还有抗性的 3 个愈伤组织使其染色体加倍, 再生成二倍体植株, 其中二株的抗性, 在与野生型杂交中表现为一个半显性基因的遗传。值得注意的尚有 Gengenbach 等(1975, 1977^[18])

选出抗玉米小斑病长蠕孢菌 T 宗病毒素的 Texas 雄性不育细胞质(cms-T)玉米的工作。起初, 他们选出对该病毒素有抗性的自交系 A619 的愈伤组织。在没有选择压力 30 个月仍能维持其抗性, 但不能再生出植株。接着, 他们用能再生植株又对该毒素敏感的另一系 cms-T 基因型, BC, A188(T)。把它的成熟胚建立愈伤组织培养, 在逐步增高该毒素浓度上, 生长 5 代以后(同时定期地再生植株, 试其抗性), 从自发突变选择出抗病毒素突变体, 而且大部分是雄性能育的。对该病毒素和病原的抗性是一致的, 该抗性和雄性能育的特性都只通过母体遗传。

抗氯酸盐突变体 Müller 等(1978)^[4]用单倍体烟草茎发生的愈伤组织($n=24$)悬浮培养, 加 ENU(NEU)诱变, 选择得抗氯酸盐和缺硝酸还原酶的突变体。悬浮培养以每毫升含 100 毫克愈伤组织(过 0.7 毫米筛的)的密度, 加 ENU 到 0.25mM。旋转培养 10 天后, 以 20—100 毫克细胞/毫升浓度, 植板在含 20mM 氯酸钾的平板上 5—10 周。从 92 个集群中挑出 64 个生长的, 移入不含氯酸盐的培养基, 培养至少 10 周, 然后试对氯酸钾抑制生长的抗性。有 9 个集群能生长最好而无坏死, 其中 7 系完全缺硝酸还原酶(NR⁻); 2 系硝酸还原酶活性低(少于野生型的 5%), 其再生植株仍有抗性。分离出 3 年以后, 分析 NR⁻ 中三个系 cnx-68, nia-63 和 nia-95 的染色体数目, 发现中期是 24, 不过 60% 的多于 24, 可见 NR⁻ 来自单倍体细胞。NR⁻ 在以硝酸盐作唯一氮源上不生长, 但在氨基酸上生长很好。认为突变影响了硝酸还原酶的生物合成。

抗病毒素与抗除草剂的细胞系可参看表 4^[14]。

此外, 还有色素突变体(参看表 1, Schieder 1976^[6], Krumbiegel 1979^[6]), 对温度敏感的变异型(Malmberg 1979^[10]), 利用甘油作唯一碳源的烟草突变植株(Chaleff 等 1978^[24])利用麦芽糖的大豆细胞系(Weber

表 4 其他一些抗性细胞系

(此表根据[14]增补后编成。所用缩写与表2相同)

表现型	种名	植株	遗传	文献
耐 铝	番 茄	—	—	77
抗 寒	野生烟草	+	不遗传	74, 79
	辣 椒	—	—	79
	挪威云杉	?	?	80
抗长蠕孢毒素	玉 米	+ E	M	72, [18]
抗长蠕孢苷	甘 蔗	+ E	?	[30]
抗 Fiji 病		+ E	?	[30]
抗毛霉病		+ E	?	[30]
抗除草剂				
4-氨基-3, 5, 6-三氯吡啶羧酸	烟 草	+ E	D, S	[23]
3-氨基-1, 2, 4-三唑		+	?	81
2,4-D	野生烟草	?	?	73
	胡萝卜	—	不遗传	2
	橙	+	?	82
耐 盐	野生烟草	—	—	73, 83
	烟 草	?	?	84
		+ E	—	Nabors 等 1980: Z. Pf- lanzenphys- iol., 97:13
	辣 椒	—	—	83
	橙	?	?	82

1980^[20]等等。目前, 至少从 21 个植物种在细胞水平分离出了 85 个表现型, 其中有 24 个表现型已再生出植株, 而其中仅有 10 例正式报告证实了所选择的特性能有性传递(表 5)。

五、突变细胞系的利用

高等植物突变细胞系的利用可能主要有三方面:

1. 研究细胞遗传, 识别原生质体融合的杂种。在微生物和动物细胞杂交研究中, 利用营养突变体来选择杂种细胞已是普遍采用的方法。突变体可作为遗传标记或通过遗传互补来选择体细胞杂种。若表现型相同的两个突变体

表 5 从组织培养选择出的特征能有性传递的正式报告

表现型	种名	文献
抗 S-亚氨基甲亚磺酰 丁氨酸	烟草	[17]
次黄嘌呤营养缺陷型 ^a	烟草	Carlson等1973:In “Genes, Enzymes and Populations” (A. B. Srb ed.) pp99—107.
赖氨酸营养缺陷型 ^a	烟草	
抗链霉素	烟草	[21]
抗 5-溴脱氧尿苷	烟草	[22]
抗缬氨酸	烟草	[7]
抗4-氨基-3, 5, 6-三氯 吡啶羧酸(Picloram)	烟草	[23]
利用甘油作为唯一碳源	烟草	[24]
抗异烟肼	烟草	[25]
抗玉米小斑病长蠕孢菌 毒素	玉米	[18]

^a 无详细研究。

杂交以后恢复了正常的代谢功能时, 这表明两者的表现型变化是彼此不同的基因突变结果。例如, 抗硝酸盐的两类 NR^- : cnx 和 nia 。当硝酸盐诱导的 cnx 与硝酸盐诱导的或无诱导的 nia 一起匀浆, 在提出物中可检出 NADH-硝酸还原酶, 即此两突变体之硝酸还原酶可在体外重组恢复(Mendel 等 1978)。从这两突变体制备原生质体, 彼此融合后产生的一些愈伤组织, 能在含硝酸盐培养基上生长。这表明形成了杂种细胞, 它是两个突变体的互补, 也重组恢复了硝酸还原酶活力(Glimelius等1978^[26])。又例如, 野生烟草(*N. sylvestris*) 两个抗氨基酸类似物的细胞系: 抗 AEC 和抗 5MT 的, 两种原生质体融合得的杂种细胞具有双抗性; 从而能够选出体细胞杂种, 并鉴定两个系的抗 AEC 特性是显性, 抗 5MT 的是半显性(White 等 1979^[27])。

2. 研究细胞生理、阐明代谢过程。例如, 上述的 Mendel 等(1980)^[28]对缺硝酸还原酶

烟草突变体细胞作进一步的生化鉴定,认为,仅保留与硝酸还原酶关联的NADH-细胞色素C还原酶活力,但缺乏黄嘌呤脱氢酶活力的cnx,是它的基因功能受了损伤,那些基因功能是合成活性的含钼辅因子所必需的;而NADH-细胞色素C还原酶活力丧失,但黄嘌呤脱氢酶活力不受影响的nia,是它的硝酸还原酶蛋白结构基因有一突变。也就是说,烟草有活力的硝酸还原酶,至少由NADH-细胞色素C还原酶和含钼辅因子两部分组成。又例如, Hibberd等(1980)^[29]从玉米栽培品种*Black Mexican Sweet*不成熟胚发生的愈伤组织自发突变,选出抗赖氨酸+苏氨酸的突变体D33。其游离赖氨酸、苏氨酸、异亮氨酸和蛋氨酸增加2—9倍,分析天门冬氨酸激酶对其反馈抑制物赖氨酸的 K_i ,也比野生型高约9倍。在六十年代,发现植物光呼吸。有些植物的光呼吸强度可达到光合作用的1/3。有人认为光呼吸是一种损失。Berlyn(1980)^[25]用单倍体烟草悬浮培养分离获得抗异烟肼(INH,光呼吸的一种抑制剂)的烟草突变植株,其种子后代发生的愈伤组织是抗INH的。他讨论了选择出的表现型与光呼吸作用可能的联系。

3. 利用有益突变,研究改良栽培品系的性状。从Carlson(1973)^[17]、Gengenbach等(1977)^[18]和Hibberd等(1980)^[29]的工作,加上Heinz等(1977)^[30]从甘蔗的敏感品系中选择出抗病的亚无性系,包括抗斐济(Fiji)病,抗鞘枯病和抗毛霉病的。Shepard等(1980)^[31]从马铃薯叶肉原生质体再生的植株群,分离出抗马铃薯早疫病交链孢感染的早疫病的无性系。还有Behnke(1980)^[32]选择得到抗马铃薯疫霉培养滤液的马铃薯愈伤组织培养,其再生植株能抗晚疫病等试验,暗示突变体研究提供一种简便的方法,可能获得生产上有用的变种^[33-35]。但这可能性受到的限制,除了获得所希望的突变体之频率低这一天然的缺陷之外,尚有:(1)变异细胞系能否保持再生成植株的能力?往往是用传代不久的组织培

养来分离突变体,才能再生出植株和杂交成功^[14]。也可以一面选择一面进行再生植株的试验,像Gengenbach(1977)^[18]。(2)再生的植株能否保持有性繁殖能力?再生的植株不一定是能育的,这就要求扩大选择的数量。(3)在脱分化的细胞水平上选择出的特性,能否在所需要的特定部位表达出来?(4)即使获得所需某一特定性状的突变个体,还要不损害其他优良的经济性状。有时即使萌发的种子有抗性,但幼苗不能进一步发育,像Chaleff等(1978)报告的实验结果^[23]。上述种种都要求提高设计选择系统的技巧。当大大发挥植物组织培养的潜力和提高设计技巧时,改良栽培品系的机会也将不断增加。

最后谈谈我们的实验结果。我们用EMS诱变烟草愈伤组织,以4-氧赖氨酸(OL)为选择剂,得到抗4-氧赖氨酸的烟草突变细胞系。

用烟草(革新5号)叶片发生的愈伤组织培养,在含OL 1g/l的培养基上连续转培三代。接种回不含选择剂OL的培养基上,转培六代。然后用2%EMS处理2小时。选择能生长的愈伤组织小块,到含OL 4g/l的培养基上培养,从中再挑选能继续生长的组织。这样选择得到抗OL的烟草愈伤组织突变体。这突变体对OL抑制生长的抗性比亲本高十倍多,它离开选择剂转培36代(31个月)以后仍然是稳定的。这突变体对乙硫氨酸(Eth)和5MT不表现交叉抗性。它比其亲本积累赖氨酸多一倍,过氧化物酶同工酶谱带呈现变异^[36]。从这一突变细胞系诱导培养,再生出植株。再生植株与起始的野生型植株的形态不同:叶片形状较狭长,花冠退化。少数植株开出不整齐花,也能见到蒴果。从再生的植株叶片发生次级愈伤组织培养。检查次级愈伤组织培养对OL的抗性,赖氨酸含量和过氧化物酶同工酶谱带。证实了与其野生型亲本不同的上述三项特性都能通过再生传递在次级愈伤组织培养上表达^[37]。

参 考 文 献

- [1] Carlson, P. S., 1970 *Science*, 168: 487—489.
- [2] Heimer, Y. M. et al., 1970 *Biochim. Biophys. Acta*, 215: 152.
- [3] Sung, Z. R., 1976 *Genetics*, 84: 51.
- [4] Müller, A. J. et al., 1978 *Molec. Gen. Genetics*, 161: 67—76.
- [5] Schieder, O., 1976 *Mol. Gen. Genet.*, 149: 251—254.
- [6] Krumbiegel, G., 1979 *Environ. Exp. Bot.*, 19: 99—103.
- [7] Bourgin, J. P., 1978 *Mol. Gen. Genet.*, 161: 225—230.
- [8] Malepszy, S. et al., 1977 *Z. Pflanzenzuecht.*, 79: 160—166.
- [9] Ehrenberg, L., 1977 In B. J. Kilbey et al., (ed.), *Handbook of Mutagenicity test procedures*, pp. 401—410.
- [10] Widholm, J. M., 1978 *Abstr. Int. Congr. Plant Tissue Cell Cult.* 4th, Calgary No. 1609, p. 138.
- [11] Maliga, P., 1976 In D. Dudits et al., (ed.), *Cell Genetics of Higher Plants*, pp. 59.
- [12] Withers, L. A. et al., 1977 *Physiol. Plant.*, 39: 171—178.
- [13] Savage, A. D. et al., 1979 *Plant Sci. Lett.*, 16: 367—376.
- [14] Maliga, P., 1978 In T. A. Thorpe (ed.), *Frontiers of Plant Tissue Culture*, 1978., pp. 381—392.
- [15] Reisch, B. et al., 1981 *Theor. Appl. Genet.*, 59: 89—94.
- [16] Sung, Z. R. et al., 1980 *Planta*, 148: 389—397.
- [17] Carlson, P. S., 1973 *Science*, 180: 1366—1368.
- [18] Gengenbach, B. G. et al., 1977 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 74: 5113—5117.
- [19] Malmberg, R. L., 1979 *Genetics*, 92: 215—221.
- [20] Weber, G. et al., 1980 *Genetics*, 96: 213—222.
- [21] Umiel, N., 1979 *Z. Pflanzenphysiol.*, 92: 295—301.
- [22] Márton, L. et al., 1975 *Plant Sci. Lett.*, 5: 77—81.
- [23] Chaleff, R. S. et al., 1978 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 75: 5104—5107.
- [24] Chaleff, R. S. et al., 1978 *Genetics*, 89: 723—729.
- [25] Berlyn, M. B., 1980 *Theor. Appl. Genet.*, 58: 19—26.
- [26] Glimelius, K. et al., 1978 *Physiol. Plant.*, 44: 273—277.
- [27] White, D. W. R. et al., 1979 *Theor. Appl. Genet.*, 55: 107—112.
- [28] Mendel, R. R. et al., 1980 *Mol. Gen. Genet.*, 177: 145.
- [29] Hibberd, K. A. et al., 1980 *Planta*, 148: 183—187.
- [30] Heinz, D. J. et al., 1977 In J. Reinert et al. (eds.), *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture.*, pp. 3—17.
- [31] Shepard, J. F., 1980 In I. Rubenstein et al. (eds.), *Genetic Improvement of Crop. Emergent Techniques.*, pp. 185—219.
- [32] Behnke, M., 1980 *Theor. Appl. Genet.*, 56: 151—152.
- [33] 杜秀达, 1979. 植物生理学通讯, 1979, 3: 76—82.
- [34] Schaeffer, G. W. et al., 1981 *In vitro*, 17: 345—352.
- [35] Thompson, J. F. et al., 1981 In XIII International Botanical Congress Abstracts, Sydney, Australia, 21—28 Aug 1981, pp. 18.
- [36] 何卓培等, 1980. 植物生理学报, 6: 213—219.
- [37] Loo Shih-wei et al., 1982 In *Proc. Symp. Potentials of Cell and Tissue Culture Techniques in the Improvement of Cereal Plants* (in press).