

# 植物细胞染色体工程

李国英 译

(东北农业大学园艺系·哈尔滨)

1. 前言 所谓植物细胞染色体工程的含义所指的是,原来多倍体和单倍体等以染色体组的增减和异倍体的产生为目的,对于染色体数的操作是通过杂交进行的,而随着近年来植物细胞组织培养及染色体操作等技术的不断进步,通过花粉培养育成单倍体及采用 PEP 等减数化处理,由分离的染色体移植产生异倍体及基因的部分导入,染色体基因测绘等,包括各种各样内容的操作技术,已经可以进行了。对此,在植物细胞水平的染色体操作,最近已经开始引起人们的注意,即是染色体分离、识别、鉴定、移植等问题已成为人们谈论的话题。

2. 从培养细胞分离染色体 染色体的分离,可能在细胞分裂期开始进行,因此,染色体能够分离的植物体的部位是茎尖及根尖分生组织,或者仅限于花粉母细胞和卵细胞等生殖器官的细胞。在这里,从花粉母细胞以外所获得的分裂细胞数对染色体的分离是不合适的。由于减数分裂期的花粉母细胞是大体完全同步的分裂系,所以对于染色体的提取也是效率高的最好材料。然而,由于花蕾获得时期的限制,不能提供经常实验,这是个缺欠。这一点,对细胞培养来说,如果生育好的话,则可以用经常的实验,这是其优点,以往染色体分裂,大部分是用细胞培养来进行的。对用细胞培养提取染色体时的条件是①迅速增殖细胞培养系的建立。②细胞分裂的同步化。③从分裂中期细胞原生质体的分离。④要提出确定的染色体精制方法等。

(1)迅速增殖细胞系的建立。对于染色体的分离,必需在分裂中期集中进行细胞培养。因增殖慢的细胞,分裂活性低,即使通过同步化处理,也不可能得到高的分裂指数(MI)。在更小(MI)的情况下,因为细胞质原来的蛋白质等污染,使染色体精制变得困难了。因此,迅速增

殖的细胞培养无性系的建立是染色体分离的必须条件。为提高细胞培养的增殖率,一般办法是尽量缩短继代的间隔期,并使得细胞经常处于对数增殖期。Szabados 等隔一天把在新鲜培养基上继代的荷兰芹的培养细胞经过同步化处理,得到了 80%的 MI。作者等用 *Vicia hirsutana* 也得到同样结果,隔一星期继代一次时,即使是同步处理也只多能得到 15%MI,而每周如果继代 2 次,则可以提高到 40%MI。

(2)分裂的同步化。尽管能获得增殖好的细胞也照样仅能得到 2—5%MI,因此,使分裂同步化是非常有必要的。在以染色体分离为目的的时候,因为没有必要使以后的分裂同步化。所以采用 DNA 合成抑制剂把细胞集中于 G1 期,用秋水仙碱使除去抑制剂引起最初分裂的细胞集中于 M 期的方法。5fluorodeoxyuridine(FudR)和 hydroxyurea(HU)等,被用来作为 DNA 合成抑制剂,一般是前者以 2 $\mu$ g/ml,后者以 2.5—5 $\mu$ M 处理 24 小时。最近抗生物素 aphidicolin 对烟草,牵牛花等培养细胞具有很高的同步化作用,这正在引起人们的注意。这些 DNA 合成的抑制剂,由于所采用植物的种类不同,效果往往也有很多不同。像这些种间差异,植物细胞使这些抑制剂具有代谢能力,种间的代谢能力有差异,这被认为是一个主要原因。Sala 指出胡萝卜,水稻、烟草等细胞不论多少都具有把 aphidicolin 分解的能力,特别是胡萝卜显示出仅用 24 小时就把 20 $\mu$ g/l 完全分解了。因此因各个种的不同都有其最适宜地抑制剂,对于处理的浓度和时间,处理次数等最适宜的条件都有研究的必要。另外,DNA 合成抑制剂因其种类不同,效果也有很大差异,为了分裂同步化,今后寻找更有效的物质是非常必要的。秋水仙碱应用范围在 0.5—0.01%之间,即使是单

北方园艺 (总 101) 29

独处理,也可以把 10% 的细胞集中于 M 期。特别是在 DNA 合成抑制剂前处理无效的情况下,这是唯一的手段。Hadlaczkzy 等用 0.1% 的芥子经过 14 小时处理,得到 40% 的 MI。秋水仙碱的处理时间一长,就会增加形成微小核等异常细胞的产生,大约以 16 小时为限。由于作为秋水仙碱的诱导体脱秋水仙碱和秋水仙碱同样能够妨碍纺锤丝的形成,所以具有停止在中期分裂的作用。因此,认为对提高胡萝卜细胞的 MI 不太有效。然而,却在许多植物中,秋水仙碱在染色体的加倍处理方面比什么都有效这样的报导。今后,具有同样的物质的探讨也包括其效果的研究将是十分必要的。在植物细胞中,即使经过上述 DNA 合成抑制剂和秋水仙碱的组合处理,那么平均一般也只得到 30—40% 的 MI,但例外的是 Szabados 等用荷兰芹竟获得高达 80% 的值。由于通过处理所获得的 MI 的培养密度、继代间隔,处理的开始时期等都受到很大的影响,所以抑制培养细胞的生长这点是极为重要的。

(3) 原生质体的分离。由于细胞壁的存在妨碍染色体的提取,所以要破坏原生质体细胞,原生质体分离中为了把细胞停止于 M 期,一般是要在酶液中加入秋水仙碱。Hadlaczkzy 等为了防止在长时间的酶液处理中引起染色体的相互粘连和撞坏,采取用 2—3 个小时获得的原生质体的方法。由于染色体相互粘连在酶液的渗透压高时显著,所以,可在不引起破坏的程度下,把渗透压下降到合适的高度。即使用短时间不能完全得到原生质体,但是如果细胞壁已变得十分脆弱,染色体的提取也是可能的。

(4) 染色体的提取。为了获得完整而高纯度的染色体,抑制染色体的酶液的破坏,并且保持稳定的结构状态同时进行核等的划分是十分必要的。所以破坏原生质体时一般是采用含有 EDTA, spermine, DTT, berylene glycol 等的酶活性抑制剂的缓冲液,且一般要在低温下操作。Hadlaczkzy 等在 PH8.6 的 glycinehexylene glycol buffer 中破坏原生质体,把其中 1000Xg 凝聚染色体的主要成份蛋白清除后,剩 1M 蔗糖悬浮液,把其低速离心后,除去核及细胞残渣,就可得到 95% 以上纯度的染色体。这样所得到的染色体即使通过电子显微镜观察也没有发现形态异常的现象,这不仅将成为染色体导入和性状转换的有用材料,而且也是进行染色体及其结构和分子水平剖析的有力材料。

不论什么方法,精制的最大问题都将是因混在其中的蛋白质而引起的染色体相互粘着如何防除的问题。Hadlaczkzy 等人在原生质体刚被破坏之后马上高速离心,把含有染色体大型粒子群和蛋白质含有微细物质

群都分开,对于 buffer 相比原生质体的体积要小得多,甚至可能达到极小的程度。在 Vicia 方面,对于带黄色的细胞 MI 无论怎么高,细胞质的粘性也高,因此染色体的分离是困难的,所以了解细胞的性状和提取染色体难易的关系以及容易提取维持稳定细胞的方法将是研究的重要课题。左右染色体分离的另一个大的重要原因,就是染色体自身的大小。一般具有大型染色体的种其分离就容易,并能获得纯度高的染色体。染色体越小,染色体间的凝聚和细胞质的粘稠度越大,这样,改善关于种的分离方法是今后的重大课题。

3. 由花粉母细胞分离染色体 减数分裂期染色体的一般提取方法是:①由花粉母细胞通过适当的酶液分离原生质体,②把获得原生质体在低渗透压的缓冲液中破坏以后,③通过适当的缓冲液和离心操作重复进行几次提取染色体,这是一种精制的方法。现在由花粉母细胞分离染色体的有百合及 himilocercis 等,采用具有大型染色体的植物种类进行,而对于具有小型染色体的大部分有用植物种,目前还没有这方面的报告。

4. 染色体的识别和鉴定 为了人为的操作染色体,作为其前提条件是必须识别和鉴定构成染色体组的各个染色体。由于染色体的识别和鉴定的正确而传统的手段是核型分析法,所以通常通过对各个染色体的长度,着丝点的位置,髓体的有无等来进行识别。然而,同一染色体组内的染色体相互间的形态往往有很多相似的地方,由于一般都是具有数微米的小型染色体,因此识别起来实际是极其困难的。所以,荧光染色法,C 光谱带法等通过利用染色体部位染色性的不同性质,从各个染色体表现浓淡的谱带的差别进行识别,已经可以广泛的应用了。最近,福井等采用画像解析法,开发了通过多指标综合地识别植物染色体的方法。如果采用这种方法,不给染色体染色识别和鉴定方法将是可能的了。

5. 染色体的划分 如果可以把构成种的染色体组划分成各个相同染色体并可进行各种染色体的转化作用。那么,也就可以了解特定基因在染色体上的位点,这就成了绘制基因图的最有力的手段。就此,使最终的特定基因的分离和无性系繁殖变得更容易了。Haplopappusgracilids 把具有  $2n=4$  的染色体,由狭窄的位置上一次就识别了 2 组相同染色体的形态,delaat 和 Blass 把由本种的培养细胞分离的染色体用荧光染色以后,从其 DNA 含量采用 clec sorter 可以划分上述二种类型的染色体群。今后,我想把这种方法作为具有更复杂染色体结构的种的适用方法进行研究。但构成种的染色体组的各染色体 DNA 量多数没有太大差异,所以采用复数指标识别将是不可能的。其意义在于,上述福井等通过画

像处理的系统的染色体识别法,对于分离的染色体的划分其遗传操作来说是有力的武器。

**6. 染色体导入** 由于细胞壁的存在把染色体直接导入植物细胞是不可能的。因而应该采用原生质体,这种情况,在动物细胞上似乎采用了染色体和细胞长时间孵出的方法,不防碍在短时间引起细胞壁的再生。Szabados 等,对细胞融合通过用 PEG 处理,引起染色体的导入率在  $10^{-4} \sim 10^{-5}$  之间。染色体在原生质体表面接触后,被导入细胞内,但因引起部分原生质体相互间的配合,也有防碍导入的可能。Griesbach 等把 1 毫升左右的原生质体和染色体的量分别为  $1 \times 10^6$  和  $1 \times 10^7$ ,用 35%PEG4000 处理 20 分钟,把导入率提高到 1%。通过 PEG 把 Viciahajastana 的染色体导入曼陀罗的原生质体的,但同时通过融合有形成许多核体的缺点。

**7. 通过微小核细胞导入少数染色体** 培养细胞一经秋水仙碱处理就暂时停留在分裂中期像,随着处理时间的延长染色体中就有一群向分裂终期像移动,各群分别被包上核模,就形成在一个细胞内具有复数的微小核状态。由于微小核的形成和处理时间同时增加,所以在某一时间原生质体化后,把这些微小核搜集出来。一个微小核中包含染色体的种类及数量是没有规律性的,哪个染色体被包含在哪,鉴定是困难的。由于已经能够用 PEG 法把分离的核用其未来的形式导入微小核的原生质体内,所以如果用同样方法就将可以比较容易的把 1~几个染色体导入。作为普通问题引起原生质体和微小核之间的膜间的融合频率高的可能性就在于此,在这种情况下,DNA 作为直接受体被放出,使分辨率增高。因而染色体不可能完全导入,即使仅仅导入部分基因也是好的。为了解决这样的缺点,把微小核包上细胞膜就形成细胞,把这些和受体细胞原生质体融合的方法,即如果是微小核细胞,和变成受体的原生质体融合,则把少数的染色体作为微小核导入是可能的。一般认为 CIPC 不引起染色体自身异常分裂抑制剂,能引起体细胞分裂异常,作为获得染色体的减数及单倍体的手段已经引起人们注意,最近伊藤等,把从第一分裂中期第二分裂中期的花粉母细胞通过用 CIPC 处理,引起减数分裂异常,出现了具有大小各种各样核的多分子,这样在这一

系统中多数是形成具有一个个微小核的细胞,可以期待比微小核单独导入还要高得多的转化作用系的出现。

**8. 转化作用体的选择** 为了选择转化作用体有好的效果,一般采用抵抗=抑制性等耐药性基因给供体一方而又必须把营养要求性等遗传给有缺欠的受体细胞一方。通过染色体导入使转化作用达到目的时,导入原生质体的染色体效率是极低的,由于一般原生质体自身分裂增殖率也不太高,所以这些变异细胞系的利用是必要而不可缺少的条件。最近这样地细胞系多数可以得到,但由于能够分离肝心的染色体细胞系为数有限,所以必须预先用载体把耐药性基因导入这些细胞系。

**结束语** 为了弄清分离染色体的导入,转化作用及染色体上的基因位置,在动物细胞上已经有了一般的成功技术。然而,对于植物细胞,采用染色体转化作用成功之例还尚不知晓。作者等也通过把从 Nicia hajastna 分离的染色体导入到曼陀罗的泛酸细胞中,看到了转化作用的可能性,但现在仍是不成功的。作为在植物细胞中这种研究迟缓的理由是:①染色体的分离技术尚未建立。②细胞高频率的移植方法尚未确立。③尽管染色体导入已获得成功,但原生质体的分裂增殖频率一般较低,获得转化作用频率必然很低。④从事染色体导入研究人员极少。①~③无论哪个问题都是很难的。但是,对于植物染色体工程来说,上述无论哪个问题都是不可逾越的,可望今后研究有更大进展。(原文 6800 字,译自《日本千叶大学园艺学部“特集”新兴植物细胞工程》)

## 呼兰县镇北原野九队园艺场

优惠提供纯正果树苗,苹果苗有:龙冠、锦红、一串铃、龙秋、金红、黄太平、大秋、红玲当、花红早熟品种, K9、77—6、78—1—1;李苗有:绥李 3 号、6 号、12—15、9—8、109,极早熟 15 号、壮育 216 号;梨苗有秋香、晚香、山丁、樱桃苗及种子。代办检疫保湿邮寄、火车发运、品种简介函索即邮。联系人:田广来,电话:(04667) 323314,邮编:150500。信寄呼兰县二轻供销公司(民政招待所院内)郭玉珍,电话:(04667)321535。

人的大城市占 6.4%;20 万至 50 万人的中等城市占 28.2%;20 万人以下的小城市占 59.8%。侯捷说,我国的城市已占全国 15.5%的人口,完成了 50%以上的国民生产总值和 70%以上的工业生产总产值,同时它集中了全国 90%以上的高等院校和科技力量,在经济发展和现代化建设中具有十分重要的地位。

北方园艺 (总 101) 31

## 小 资 料

**我国城市总数为 620 个** 我国今年新增城市 50 个,城市总数已达 620 个,城市人口约两亿。建设部部长、中国市长协会执行会长侯捷日前在于上海召开的全国女市长工作会议上透露了上述消息。据悉,在这些城市中,100 万人以上的特大城市占 5.6%;50 万至 100 万