

体细胞无性系变异技术在园艺植物育种中的应用

张 硕, 张明方, 杨景华

(浙江大学农业与生物技术学院, 杭州 310029)

摘要:综述了园艺作物中体细胞无性系变异诱变技术在育种中的应用, 以及利用离体诱导技术结合物理化学诱变所获得的育种进展。体细胞无性系变异结合诱导突变大大提高了变异率, 获得了许多有用的突变性状, 最近有人利用体细胞无性系变异克隆获得番茄抗腐烂病突变体 Cmm (*Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense*), 另外结合 γ 射线诱变, 获得香蕉早熟品种“Klue Hom Thong KUI”和“Novaria”。同时利用分子标记辅助选择可以在早期对有用的候选基因型做出鉴别。

关键词:体细胞无性系变异; 物理诱变; 化学诱变; 分子标记

中图分类号: S603.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2006)05-0048-03

体细胞无性系(somaclone)是指从一个祖先通过无性繁殖方式, 产生出具有与其祖先相同遗传性状的后代群体。后来人们发现, 在植物组织培养过程中, 从离体的植物组织或体细胞产生的无性系, 常常会出现各种变异, 即体细胞无性系变异(somadonal variation)。许多研究表明, 体细胞无性系变异是植物组织培养过程中出现的普遍现象, 不限于特定的物种和器官, 变异所涉及的性状相当广泛。迄今为止, 已经在150种园艺作物的约1700个品种中观察到变异, 变异类型包括果型大小、花期、果实的成熟度、果实颜色、自交能力和病毒抗性^[1]等, 这些变异, 有些是不能遗传的生理变异, 有些则是属于遗传性的变异。可遗传的变异经人工选择和培育, 能获得既具有亲本原来的优良性状, 又带来某些新性状的新品种, 即植物体细胞无性系变异育种。通过这种育种手段, 植物在染色体结构和数目、基因组大小、蛋白质和同工酶及分子等水平上都发生了改变, Britt于1996年提出了一个观点认为, 突变的机理在染色体和基因组水平的改变, 包括染色体断裂、倒置、复制、迁移和点突变, 这也为早期进行分子鉴定提供了方便。

体细胞无性系变异的优点在于: 第一, 植物材料选择广泛(腋芽、器官、组织和细胞), 其中离体的腋芽效果较好; 第二, 与辐射化学诱变方法相结合的诱变育种, 提高植物改良效率; 第三, 只改进个别农艺性状而保持优良性状不变, 后代稳定, 且育种周期短, 可以在培养基中加入一定的选择压力而筛选特定的突变体, 且整个过程环境因素单一; 第四, 因为存在细胞质突变, 因此有可能选择到新的细胞质雄性不育系等方面的细胞质基因突变体。



第一作者简介:张硕, 女, 1980年生, 2003年毕业于浙江大学农业与生物技术学院园艺系, 同年保送浙江大学农业与生物技术学院园艺系, 攻读蔬菜学硕士学位, 师从张明方教授, 主要从事西瓜耐冷种质的体细胞无性系变异结合物理诱变技术研究。

收稿日期: 2006-05-10

1 体细胞无性系变异诱导突变体

体细胞无性系变异是继花粉和花药培养之后的又一种实用化的细胞工程育种新方法, 在再生植株中能够在常规育种中所观察不到的更多的变异或重组类型。通过诱变愈伤组织然后再生植株, 各种类型的变异频率会大大提高。体细胞无性系变异可以用于选育不同的抗虫、抗病、抗除草剂的品种, 是一种有效的育种工具。虽然体细胞无性系的机制还未完全清楚, 不过已经有一些研究表明, 基因的改变、点突变、基因重排、DNA改变、编码插入或者换位丢失及DNA甲基化等都是可能的因素。

尽管体细胞无性系变异有诸多的优点, 且已经在大田和观赏植物作物育种中取得了可喜的进展, 不过在园艺作物上获得的相关结果还是很有限。Sotirova V(1999)等通过离体培养番茄“Cristy”和“L. 24-13”两种基因型花粉囊, 获得抗番茄腐烂病突变体 Cmm (*Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense*), 在连续三代的继代后, 证明抗番茄腐烂病突变体可稳定遗传。Güga M(2000)等对豌豆的愈伤组织无性繁殖培养后发现, 豌豆出现对生叶、托叶形态改变、叶子生长位置不规则、花茎缩短、花败育等花叶外形变化的不育系突变体, 并且继代证实这些突变体均能稳定遗传^[2]。

众多研究发现体细胞无性系发生的频率与基因型、外植体来源、培养持续时间、培养基组成有关。Ladyzynski M(2002)等用黄瓜B品系的自交系研究4种离体培养类型(含不同激素的悬浮液和液体培养基)对体细胞无性系变异的影响, 并分别设计不同的培养时间, 观察R0植株的倍数性、R1植株中表型性状的分离和R1种子的发芽力等性状, 结果表明, 不同的培养基获得的变异不同, 并表现出不同的性状, 包括白果树形状叶片、黄绿叶绿素突变体及父本和母本花的花冠有锯齿边缘等突变体^[3]。

2 体细胞无性系结合诱变方法

诱变育种的特点有, 第一, 突变频率高, 变异范围广; 第二, 改良作物个别单一性状比较有效; 第三, 诱发的变异较易稳定, 可以缩短育种年限。但是, 诱变育种也存在一定的缺点, 主要是诱发有益变异较少, 不利突变较多, 突变频率一般也只有0.1%左右, 因此第二代供选的群体必须要大, 以增加

选择机会。此外,诱发突变的方向和性质目前尚难掌握,而且除了某些性状受一对主基因支配外,一般情况下难以在同一处理时间和同一突变中使多种性状均获得改良。

植物细胞和组织离体培养与诱发突变技术相结合,是近年来一项很有前途的育种新技术。在植物离体培养过程中,结合物理化学因素诱发突变,具有处理材料多、突变频率高、突变频广等优点。通过离体培养结合物理化学因素处理所进行的单倍体育种,加倍后的突变体将是纯和的,并可快速繁殖供田间选择和鉴定。由于加倍单倍体是单亲生殖的纯合体,所以是突变研究最理想的起始材料。诱变育种与植物组织和细胞离体培养相结合,对遗传变异的诱发、繁殖、改良选择技术均有较明显的效果。离体培养经过诱变处理后,给予不同的选择压,采用不同的方法筛选出具有抗性的突变体,可以缩短育种年限,加速育种进程。

2.1 体细胞无性系变异结合物理诱变

在离体诱变中使用的诱变剂有物理和化学两类。物理诱变剂主要有X射线、 γ 射线、 α 和 β 射线、核质子、中子和紫外线,除紫外线因穿透力弱只适用于花粉、孢子等单细胞诱变外,其他几种都有较好的诱变效果和重复性,其中X射线和 γ 射线在电离辐射中被广泛应用并且对园艺育种非常有效。而急性辐射更适合结合体细胞无性系变异使用。

估算诱变剂量是确定诱导剂的第一步,不同作物、不同品种对诱变剂量有不同的敏感度。一般认为,选用较低的诱变剂量能产生更多的有益突变,剂量的选择大多是研究人员对植物材料、基因型和生理学上的经验总结所决定的。有人建议使用植株半致死率或者20%存活率作为估算诱变剂量的标准。植物生理学上讲,组织的含水饱和度和辐射敏感度相关性很大,所以极度含水的组织辐照后可以提高诱导突变频率。园艺作物上的研究多在辐射敏感度方面,虽然获得的突变体非常有限,但实验所得到的数据为进一步研究的开展打下坚实的基础。Walther和Sauer(1985)用X射线处理欧洲甜樱桃树(*Prunus avium* L.)品种“F12/1”的离体组织,发现茎尖(22Gy)和基部(29Gy)的敏感度有所不同,表明生理学上的原因可引起不同的辐射敏感度。Predieri和Gatti(2000)在研究日本李(*Prunus salicina* Lindl.)时发现, γ 射线照射处理离体组织,低剂量可以促进组织的生长^[4],相似的结论也在葡萄(*Vitis vinifera* L.)上得到^[5]。Lima da Silva和Doazan(1995)对葡萄砧木“Fercal”和“Gravesac”品种用10 Gy至60 Gy剂量范围的 γ 射线处理,发现半致死剂量为20 Gy或30 Gy^[6]。同时,有研究表明,不同的基因型辐射敏感度不同,Rosati等(1990)对葡萄品种“Albana”和“Trebiano Romagnolo”在 γ 射线20 Gy至40 Gy剂量之间处理,两个品种反应出不同的辐射敏感度,后者能耐40 Gy的高剂量。(Novak et al. 1990)香蕉(*Musa acuminata* Colla)的茎尖敏感度,取决于处理的基因型的倍数水平,AA二倍体的半致死剂量在20 Gy至25 Gy之间,AAA三倍体的半致死剂量在30至35 Gy之间,四倍体的半致死剂量在35~40 Gy之间。

2.2 体细胞无性系变异结合化学诱变

在植物诱导育种中化学诱变剂主要有烷化基类家族的化合物包括EMS(ethyl methanesulphonate)、DES(diethylsulphate)、EI(ethyl enimine)、ENU(ethyl nitroso urethane)、ENH

(ethyl nitroso urea)、MNH(methyl nitroso urea)和叠氮化钠等。和物理诱变剂相比较,化学诱变剂较多的作用于基因的变异而非染色体的改变。半致死剂量取决于浓度、时间、方法以及pH环境等因素。

利用体细胞无性系变异结合化学诱变获得香蕉抗镰刀霉菌突变体。Bhagwat和Duncan(1998)等在研究中发现,EMS(100~300 mM)、DES(10~25 mM)和NaN₃(1.1~4.6 mM)三种诱变剂,处理幼芽30~60 min后继代培养,2.3 mM NaN₃处理30 min,25 mM DES处理60 min,200 Mm EMS处理30 min这三种条件处理效果最好^[7]。(Webster et al. 1986)利用离体培养结合EMS用于提高苹果砧木的活力,苹果的成熟期,座果等。

在茄科作物中,Hitomi A(1998)等比较NAA和2,4-D对体细胞胚的诱导作用,结果表明,虽然两种激素对于形态变异都有作用,但在叶形、株高、果型和生活力方面,NAA的效果要比2,4-D的效果效率高,花粉囊数和每串开花数没有明显的区别。随后,在R0到R1代发现叶形和果型形状能稳定遗传,开花数不能稳定遗传。Gichner T(1999)等用EMS、MMS、ENU、MNU分别对离体叶子进行单细胞诱导处理,发现MNU对植物毒性最高,其次是MMS>ENU>EMS,诱导突变的能力ENU最强,其次是MMS>EMS>MNU^[8]。

秋水仙碱多用于多倍体诱导。把香蕉“SH-3362”二倍体的芽尖浸入浓度为0%~1%(2.5 mM)秋水仙碱的液体培养基中,诱导四倍体,结果表明,在0.5%(1.25 mM)秋水仙碱,处理2 h并加入2% DMSO的条件处理后,30%以上的芽尖为同源四倍体,效果最好,遗传稳定的同源四倍体已经在田间经过鉴定,同时出现一些嵌合体 and 恢复二倍体。最近,一些除草剂也用于同样研究,并有较高诱导率。秋水仙碱也用于增大小型水果的果型,秋水仙碱诱导草莓8倍体。虽然在田间多样性筛选中发现芽顶点的染色体数增加,但是没有出现有育种价值的突变体^[9],同时在越橘中也获得四倍体。另外通过秋水仙碱诱导黄瓜品种“C. sativus”(2n=14)得到的四倍体并和黄瓜野生种“Chystric”(2n=24)杂交获得三倍体(2n=26),具有抗病和抗逆特性,并证实稳定遗传^[10]。四倍体西瓜也常由秋水仙碱处理二倍体植株获得,但诱导频率低,且会出现嵌合体,不过,将外植体接种在含有秋水仙素或其他诱导物的诱导培养基上,通过添加不同比例激素,可获得较高频率的四倍体植株^[11]。

3 分子标记辅助选择

分子标记比如蛋白质和DNA标记(RFLP、RAPD、AFLP、SSR)等,可以研究体细胞无性系变异结合诱导处理后,候选突变体分子水平上的变异。如果分子标记和目标性状相关,就可以利用分子标记在早期进行辅助选择。利用分子图谱,可以将目标性状的分子标记定位,很多基因图谱比如苹果、梨、日本柿子、杏仁树、桃、甜樱桃、李等已经构建相关性分子图谱^[12~15]。

另有一些研究者结合较为重要的农业特性,提供更多的分子辅助帮助。有人已经用RAPD和ISSR标记对豌豆无性系后代形态和育性变异进行研究。有人也用RAPD鉴定红辣椒体细胞无性系变异,并用于早熟突变体的筛选^[16]。利用FAD(fluorescence in situ hybridization)分析Allium cyaneum R

愈伤组织继代培养染色体变异。同时 FAD 还被用于西瓜倍性的测定^[17]。有人还用 SCGE(single cell gel electrophoresis)鉴定不同化学诱变剂对植物诱变的效率影响^[18]。

4 讨论

重点讨论了园艺作物中体细胞无性系变异结合物理化学诱变技术在育种中的进展。这种技术将传统的育种方式改在试管和室内进行,大大提高了育种效率,目前已成为公认的一种有效育种新途径。不过还存在不少局限性,主要存在几个方面的原因:第一,产生的变异多,但变异类型复杂,并非所有的变异都可稳定遗传,离体选择只对那些在离体培养和移植到大田环境都表现的表型变异有效,也就是说,离体选择只对那些适合离体选择,又能在再生植株后代稳定表达和传递时才有效;第二,变异方向难以达到认为控制的目的,负向变异多,或当有一个性状表现优良,但其他方面则呈现负向,变异也并非总是崭新的变异,可能还要在基础工作和离体培养的方法上下功夫;第三,许多变异干扰了细胞正常代谢活动和发育,导致细胞全能性丧失,这一现象往往和染色体组型有关,不过也有后天因素,比如培养过程中内源代谢产物的积累和变化等,都可能影响组织分化和再生能力;第四,筛选指标太少,没有特征性的代谢环节上的变化,缺乏对诱变本身内在变化的认识,总之,只有搞清变异体表现型发生的原因、性质及其遗传传递规律基础等机理,体细胞无性系变异才能在育种工作中发挥更大的作用。

最近几年,许多科学家致力于分子生物学的研究。这给植物育种带来了很大的进步和生机。更深入的发展基因和基因组研究,发展基因图谱和适合的基因标记可以扩大诱导突变的利用,也使分子技术能在园艺育种中应用。另一方面,利用提供的分子突变的研究,诱变可以在基因功能和基因表达上保持领先。结合遗传学,植物病理学,组织培养生理学,分子生物学,提高突变手段是很有效的方法。很多科学家认为当今育种的研究应当将传统的育种方法和现代生物技术紧密结合。

从研究中发现,通过不同的手段能得到所需的具有特性的种类。育种者应该选择最适合基因型的合适的工具。转基因虽然对育种贡献很大,但是,还是很难被广大消费者所接受。可以预见,在未来,体细胞无性系的诱导突变,继代克隆,和田间鉴定这一途径将被极高的应用于生产。体细胞无性系变异相比早期的选择优良特性的方法,无疑是更好的选择。因此,诱导突变在 20 世纪中期就引起了广泛的兴趣,直至现在更深入的研究,将为 21 世纪的育种事业提供更大的贡献。

参考文献:

- [1] Stefano Predieri. Mutation induction and tissue culture in improving fruits[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2001, 64: 185—210.
- [2] Griga M. Morphological alterations in sterile mutant of *Pisum sativum* obtained via somatic embryogenesis[J]. Biologia Plantarum, 2000, 43 (2): 161—165.
- [3] Ladyzynski M, Burza W, Malepszy S. Relationship between somaclonal variation and type of culture in cucumber[J]. Euphytica, 2002, 125 (3): 349—356.
- [4] Predieri S & Gatti E. Effects of gamma radiation on plum (*Prunus salicina* Lindl.) 'Shiro'[J]. Adv. Hort. Sci. 2000, 14: 215—223.
- [5] Charbaji T & Nabulsi I. Effect of low doses of gamma irradiation on in vitro growth of grapevine. Plant Cell Tiss[J]. Org. Cult, 1999, 57: 129—132.
- [6] Lima da Silva A & Doazan JP. Gamma ray—mutagenesis on grapevine rootstocks cultivated in vitro [J]. Int. Sci. de la Vigne et du Vin, 1995, 29: 1—9.
- [7] Bhagwat B & Duncan EJ. Mutation breeding of banana cv. Highgate (*Musa* spp., AAA Group) for tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense using chemical mutagens[J]. Scientia Hort, 1998a, 73: 11—22.
- [8] Gichner T, Ptacek O, Stavreva DA, Plewa MJ. Comparison of DNA damage in plants as measured by single cell gel electrophoresis and somatic leaf mutations induced by monofunctional alkylating agents[J]. Environmental and Molecular Mutagenesis, 1999, 3 (4): 279—286.
- [9] Predieri S, Fasolo F & Filiti N. In vitro colchicine treatments on strawberry. (*Fragaria*×*ananassa* Duch.) shoots[J]. Acta Hort, 1989, 265: 191—194.
- [10] Chen JF, Luo XD, Qian CT, Jahn MM, Staub JE, Zhuang FY, Lou QF, Ren G. Cucumis monosomic alien addition lines: morphological, cytological and genotypic analyses[J]. Theoretical And Applied Genetics, MAY 2004, 108 (7): 1343—1348.
- [11] Compton ME, Gray DJ, Gaba VP. Use of tissue culture and biotechnology for the genetic improvement of watermelon[J]. Plant Cell Tissue And Organ Culture, JUN 2004, 77 (3): 231—243.
- [12] Oliveira CM, Mota M, Monte—Corvo L, Goulao L & Silva DM. Molecular typing of *Pyrus* based on RAPD markers[J]. Scientia Hort, 1999, 79: 163—174.
- [13] Lu ZX, Sosinski B, Reighard GL, Baird WV & Abbott AG. Construction of a genetic linkage map and identification of AFLP markers for resistance to root—knot nematodes in peach rootstocks[J]. Genome, 1998, 41: 199—204.
- [14] Ortiz A, Renaud R, Calzada I & Ritter E. Analysis of plum cultivars with RAPD markers[J]. Hort. Sci. 1997, 72: 1—9.
- [15] Stockinger EJ, Mulinix CA, Long CM, Brettin TS & Iezzoni AF. A linkage map of sweet cherry based on RAPD analysis of a microspore—derived callus culture population[J]. Hered, 1996, 87: 214—218.
- [16] Kuznetsova OI, Ash OA, Hartina GA, Gostimskij SA. RAPD and ISSR analyses of regenerated pea *Pisum sativum* L. plants[J]. J. Russian Journal Of Genetics, 2005, 41 (1): 60—65.
- [17] Compton ME, Barnett N, Gray DJ. Use of fluorescein diacetate (FDA) to determine ploidy of in vitro watermelon shoots[J]. Plant Cell Tissue And Organ Culture, 1999, 58 (3): 199—203.
- [18] Gichner T, Ptacek O, Stavreva DA, Plewa MJ. Comparison of DNA damage in plants as measured by single cell gel electrophoresis and somatic leaf mutations induced by monofunctional alkylating agents[J]. Environmental And Molecular Mutagenesis, 1999, 33 (4): 279—286.