

# 植物体细胞无性系变异的研究

李爱仙<sup>1</sup> 许亚东<sup>1</sup> 罗建平<sup>2</sup> 刘惠<sup>1</sup>

( 1 四川省成都农业职业技术学院, 四川成都 61113; 2 四川省宜宾职业技术学院, 四川宜宾 644003 )

**摘要:** 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。本文着重阐述了植物体细胞无性系变异的类型,引起无性系变异的遗传基础,无性系变异突变体的筛选和鉴定方法,并对目前植物体细胞无性系变异在育种中的应用及存在的主要问题进行了讨论。

**关键词:** 组培; 体细胞无性系变异; 突变体

**中图分类号:** 035.2

**文献标识码:** A

## Research on Plant Somaclonal Variation

Li Aixian Xu Yadong Luo Jianping Liu Hui

**Abstract:** Somaclonal variation was a universal phenomenon under tissue culture in plant. This paper summarized the achievement of types, mechanism, method of selection and identification of plant somaclonal variation, and discussed the application and main problems of somaclonal variation in breeding new varieties.

**Key words:** tissue culture; somaclonal variation; mutant

植物体细胞无性系变异(Somaclonal Variation)是指在植物组织培养再生植株的过程中出现的变异<sup>[1]</sup>,是植物组织培养过程中普遍存在的现象。近年来的研究表明,在保持原有性状基本稳定的前提下,植物组织、细胞培养过程普遍引起丰富的变异,一个组织培养周期内可产生1%~3%的无性系变异,有时甚至高达90%以上,远远高于自然突变频率<sup>[2-3]</sup>。对植物体细胞无性系的细胞、再生植株及其后代的研究表明,在这些变异中,有不少变异是对植物性状改良有益的,并且可以稳定遗传,这对植物品种改良和选育新品种具有重要的意义。几十年来,人们利用体细胞无性系变异已经筛选到了许多性状优良的作物。但近年来在遗传转化实践中表明,经历组织培养和再生阶段后,常表现出一些非目的性状的改变,其原因属体细胞无性系变异还是外源基因的插入诱变,往往很难确定<sup>[4]</sup>。因此,体细胞无性系变异一直为众多研究者所关注。本文将对植物体细胞无性系变异的类型、机理、鉴定与筛选方法以及在新品种培育中的

应用作一简要综述。

## 1 植物体细胞无性系突变体产生的来源

植物体细胞无性系突变体,可分为自发无性系变异和诱导无性系变异2种,它们在体细胞无性系变异育种上都有着重要意义。

### 1.1 自发无性系变异

在植物体细胞组织培养中,人们不断地发现,从离体的茎、叶或芽等组织、器官的培养中,由胚状体或原生质体产生的再生植株,经常能发现某些植株在形态、性状等方面与原来亲本性状不同的变异;如,株高、分蘖、穗长和千粒重等,这种变异体经人工选择培养,即可培育成作物新品种。多细胞外植体一般由多种类型的细胞组成,其倍性水平也并不一致,因而Brigh<sup>[5]</sup>建议除原生质体外的其他外植体培养称为复合培养(Complex Culture)。嵌合体也是这类变异的一个重要来源。由于嵌合体是由不同遗传组成的组织和细胞构成的,因此,组织培养中嵌合体的分离就会导致变异的出现。例如,无刺黑莓嵌合体组织培养后产生的苗芽中几乎1/2都是矮化无刺黑莓。不定芽发生是导致嵌合体分离的最通常

作者简介: 李爱仙(1976-),硕士,作物遗传育种专业。

收稿日期: 2007-08-22

的原因<sup>[6]</sup>,这是因为不定芽通常认为是从单细胞或特定组织的少数细胞起源的<sup>[7-8]</sup>。据知,这种自发变异的产生,可能与取材部位以及同一部位不同体细胞的自发变异有关;也可能与在组织培养条件下培养基中的不同组成物质及其含量的影响有关。此外,机械损伤和温度等物理因素以及细胞的代谢产物等皆可引起细胞自发突变。

## 1.2 诱导无性系变异

在植物组织或体细胞培养过程中,如果有目的地利用物理、化学因素对培养的植物组织或体细胞进行处理,诱发其遗传性状发生变异,然后,根据育种目标对变异材料筛选、鉴定和加工以培育新品种或新种质,这就是诱导无性系变异育种(简称诱变育种)。在育种中应用的诱变因素主要有物理诱变因素和化学诱变因素2类。物理诱变因素主要有紫外线、x射线、中子、质子等。化学诱变因素与物理因素相比损伤小、诱导频率较低,但有利突变较多。诱变是创造变异和获得无性系突变体的重要途径,其发生频率受到培养基中的激素配比、外植体的基因型、嵌合性及其不同发育期、染色体倍性水平、继代次数、选择压、诱变剂等因素的影响。一般说来,离体器官化生长(*Organized Growth*)越远,时间越久,体细胞无性系变异频率就越高。从腋芽、茎尖和分生组织进行培养要比从无分生组织功能的叶、根、细胞和原生质体培养产生的变异少<sup>[9-10]</sup>。

## 2 植物体细胞无性系变异的遗传基础

### 2.1 染色体畸变

植物组织培养的再生植株中,染色体畸变包括染色体数目和染色体结构变异2个方面。染色体数目变异又包括整倍体变异和非整倍体变异。Sun<sup>[11]</sup>等对18种基因型的水稻再生植株进行研究,发现其中5种产生了多倍体,最高频率可达13%。叶新荣等<sup>[12]</sup>在6倍体小麦再生植株中观察到多种非整倍体的变异,其中既有染色体数目的增加,也有染色体数目的减少,并且存在着混倍体个体。Amato<sup>[13]</sup>(1985年)对培养无性系细胞中高倍体、单倍体和非整数倍体变异的发生机制做了解释,认为在体细胞培养过程中产生的这3类染色体数目变异,主要源自于有丝分裂过程中纺锤体的异常,不同程度的纺锤体缺失导致染色体不分离、移向多极、滞后或不聚集,最终产生变异细胞。他还认为,培养细胞中的无丝分裂也是染色体数目变异的重要原因。染色体结构变异如缺失、重复、倒位和易位等。在小麦、旱芹、单冠毛菊和阳参等无性系再生植株中发现染色体结构方面的变异。

### 2.2 基因突变

植物组织和细胞经离体培养后,在愈伤组织的脱分化和再化过程中常常会引起基因发生突变。基因突变是指基因序列中碱基发生了改变,导致由一种遗传状态转变为另一种遗传状态,基因突变被认为是体细胞无性系变异的重要来源之一。澳大利亚的Brettell等<sup>[14]</sup>(1986年)曾报道组织培养可引起基因突变,他们从645株玉米杂种胚培养的再生植株中,发现了一个表现稳定的Adhl(玉米乙醇脱氢酶)位点突变体。对变异基因克隆并进行序列分析发现,第七外显子中,一个编码谷氨酸的三联体密码GAG中的A转换为T,使肽链中原来的谷氨酸转变为缬氨酸。近年来,随着分子生物学的迅速发展,分子生物学技术被用来检测体细胞无性系变异是否发生基因突变。

### 2.3 基因扩增和丢失

基因扩增或DNA扩增最初是在研究动物细胞抗药性时发现的,是细胞内某些特定基因的拷贝数专一性地大量增加的现象,是细胞在短期内为满足某种需要而产生足够的基因产物的一种调控手段。最近,王小军等<sup>[15]</sup>(1998年)对离体筛选的8倍体小黑麦耐盐变异体进行研究,认为耐盐细胞系的遗传发生机制具有显性作用的基因扩增,并且,基因扩增的拷贝数随着盐胁迫浓度的增加而增加。基因丢失是指在细胞分化过程中通过丢失掉某些碱基序列而失去基因活性。就目前的研究而言,体细胞无性系中核糖DNA(rDNA)及其间隔序列以及一些重复序列,比较容易发生DNA序列的丢失。目前还不清楚细胞无性系中DNA序列减少对细胞分化、再分化及植株再生究竟有何生物意义。

### 2.4 DNA甲基化的变化

真核生物DNA中大约2%~7%的胞嘧啶(C)存在着甲基化修饰,广泛分布于各序列中,绝大多数甲基化发生在CG二核苷酸对上。在植物体内,DNA甲基化多态性以孟德尔方式遗传,但是在群体中等位基因的甲基化/脱甲基化则是一个高频率发生的动态过程,而且,DNA甲基化也会对真菌感染、春化作用和组织培养等环境因素刺激而做出反应。Devaux等<sup>[16]</sup>(1993年)比较了大麦由组织培养形成的DH群体,和由球茎大麦的染色体消失法所得的DH群体的DNA甲基化差异,结果发现,由甲基化引起的RFLP多态性变化96%来自组织培养法的DH群体,说明组织培养的确引起了DNA甲基化变化。

## 2.5 转座子的激活

在组织培养过程中,由于细胞处于高速分裂的状态,所以染色质复制滞后,结果引起细胞分裂后期形成染色体桥和染色体断裂。在断裂部位的DNA修复过程中属于异染色质的转座子发生去甲基化而被激活,并发生转座作用,从而引起一系列的结构基因活化、失活和位置变化,导致无性系变异。Mcclintock在自交的玉米后代中发现了转座子,随后在玉米的体细胞无性系再生植株中,也检测到激活的转座子的存在,并且认为转座子的激活可能起源于染色体断裂和重排及碱基去甲基化等<sup>[17]</sup>。因此,转座因子的激活可能是导致体细胞无性系高频变异的原因之一。

## 3 植物体细胞无性系变异的筛选方法

由于体细胞无性系变异的发生往往没有方向性,变异类型繁多,且劣变机率大于优变,而用于植物育种目标的变异则必须是优良性状,因此对变异进行有效的筛选就至关重要。现在常用的体细胞无性系筛选方法主要有以下几种。

### 3.1 田间表型选择法

田间表型选择法是在田间栽培的大量再生植株中筛选优良变异单株。这种方法工作量虽然大,但较为简单,得到的结果能直观反映变异产生的性状变化,可以对改良的性状作出直接判断,而且,也是迄今为止筛选一些农艺性状(例如株高、穗型、熟期及营养成分)的最有效的方法<sup>[18]</sup>。目前,该方法是体细胞无性系变异筛选突变体的再生植株的最主要方法。米海莉等<sup>[19]</sup>以春小麦品种宁春4号为实验材料,在实验室通过细胞培养产生再生植株,而后通过大田(含盐量为0.3%~0.5%)种植筛选耐盐的突变体。收获耐盐突变植株的种子,用盐水培养,测定15d后幼苗生长量及生理生化变化的结果表明:突变植株产生的后代的抗盐能力远远超过正常的植株。

### 3.2 以选择压力选择体细胞无性系突变体

通过向培养基加入如氯化钠、真菌毒素、除草剂和抗生素等选择压力,或采用干旱或冷热和冰冻处理等环境处理,获得抗性愈伤组织或抗性细胞系,然后经过再生获得抗性突变体植株。这比单纯采用大田筛选可节省大量的人力、物力,缩短育种周期。选择压力筛选方法已在各种体细胞无性系突变体的筛选中应用。陆维忠等<sup>[20]</sup>以小麦赤霉病毒素脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)为筛选剂,对小麦愈伤组织进行抗性突变筛选,最终得到了在

无性系阶段及再生植株的后代中能稳定表达的抗J性状,获得了一个抗赤霉病的小麦品系。耿瑞双等<sup>[21]</sup>采用离体培养方法,选择抗赖氨酸和苏氨酸的玉米突变体,不仅获得了积累游离苏氨酸和赖氨酸的突变类型,还筛选到了种子蛋白质组分发生改变的高蛋氨酸和高赖氨酸突变体,性状遗传稳定,育性正常。

### 3.3 生物化学及分子生物学技术鉴定无性系突变体

筛选得到的突变株系或突变体一般要进行生物化学和分子生物学方面的鉴定,为进一步育种应用奠定基础。这些技术主要包括同工酶谱分析及分子标记等。经常使用的同工酶谱分析有I酶、过氧化物酶,淀粉酶、多酚氧化酶以及其他一些可溶性蛋白等。詹亚光等<sup>[22]</sup>在筛选能耐盐的杨树再生植株中发现过氧化物酶发生变化,在相同区带突变株比正常植株的酶在往往多1条带。但此项技术只能用于对可溶性蛋白进行分析,所能检测的范围也很有限,另外同工酶的酶谱又容易受环境干扰及个体发育的影响,因此同工酶的改变只能解释很小一部分变异。

分子生物学技术能够直接对变异的DNA进行分析,比同工酶分析更能直接地反映无性系的变异。常用的鉴定植物体细胞系变异的分子生物学方法有:RFLP、随机扩增多态性(Random Amplified polymorphic DNA, RAPD)、简单重复序列(Simple Sequence Repeat, SSR)等。采用RFLP, RAPD, SSR等方法分析均发现表型与DNA水平变化不相统一的现象非常普遍,这主要是因为植物体基因组非常巨大,植物中非编码序列占基因组的绝大部分,体细胞无性系变异又往往是比较均匀地发生在基因组的各个部位上的缘故。因此,目前的分子标记技术也只能检测有效变异的很小一部分。

## 4 植物体细胞无性系变异在育种中的应用及其特点

### 4.1 耐盐细胞变异体

世界上有大面积的盐渍土。抗盐作物品种选育对我国和世界有着特殊的意义。它的育成可使目前荒芜的大面积盐渍土得到利用,为解决粮食问题做出贡献。近年来已在烟草、水稻、小麦、苧麻等多种植物上进行了抗盐变异体的筛选研究,并获得了成功。田文忠等已得到了对NaCl抗性稳定的水稻再生植株,国外Redy等也已获得了抗盐的再生植株,并且表现一定的抗性稳定性。

### 4.2 温度敏感性变异体

温度敏感性变异体主要有抗旱、耐低温等变异体。

温度、水分是限制植物地理分布的主要因素,也是作物栽培中最主要的2个影响植物生长的限制因素<sup>[23]</sup>。因此,这类抗逆变异体的选育具有重要的实际意义。林定波等<sup>[24]</sup>(1999)曾以轻脯氨酸作为选择压,筛选到了抗寒的柑橘植株。经测定,其抗寒性对照增加2.61℃,并发现抗寒植株叶片中Pro, Leu, Arg的含量均比对照增加2倍以上。

### 4.3 抗病细胞变异体

植物病毒对植物的毒害作用方式是多样的,因此,利用离体培养技术筛选抗病细胞变异体对作物抗病育种有重要意义。孙立华等用水稻种子愈伤组织与白叶枯病病原菌菌丝体共培养,在N6培养基上,诱导再生出具有抗白叶枯病植株。郑康乐等用水稻成熟胚、幼穗愈伤组织与稻瘟病的粗毒素共培养,在N6培养基上筛选出抗稻瘟病的植株。目前,已在玉米小斑病、甘蔗眼点病、马铃薯枯萎病等多种病害上得到了抗病变异体。

除了以上几种,利用细胞培养技术还得到了针对酸壤的抗铝变异体、针对除草剂的抗除草剂变异以及具有某种特殊代谢类型的营养缺陷型细胞变异体等。

### 4.4 细胞变异体在育种中的特点

一是可以有效地避免在整株或器官水平上出现变异而导致的嵌合体现象,能在短时间内获得稳定、纯合的突变体;二是需要的外植体材料很少,增殖速度快,这在实验材料难以获取时尤为重要;三是可通过在培养基(环境)中加入一定的选择压力以定向选择,从而筛选到特定的突变体;四是相对于体细胞杂交及基因工程技术来说,操作难度小,适用的作物范围广,且经济,易在广大的育种单位开展;五是产生的变异多,类型复杂,并非所有的变异都能稳定遗传;六是变异的方向多为自发,难以控制,难以达到预期效果;负方向变异多,或者是出现某一个性状表现优良,而其他性状则出现负方向变异。

## 5 结语

植物组织培养过程中出现体细胞变异是一种很普遍的现象,且许多变异对植物性状改良是有益的,并可以稳定遗传。由于无性系变异改良植物性状的方法具有操作简单、周期短等优点,在育种中已有广泛的应用,是一种非常重要的育种方式<sup>[25]</sup>。为了更好地利用这项技术,该领域的研究应集中到以下几点。

### 5.1 对体细胞无性系变异的产生缺乏人为的控制手段和能力

在一个体细胞无性系中,很可能同时有许多性状发生突变,其中有些性状的改变对品种的改良有积极的作用,有的则会产生有害的影响,从而使该无性系作为一整体失去了在育种中的意义。因此,主要研究方向首先应该是如何提高目标性状和其他有益农艺性状的变异频率,减少非目的性状变异的产生。

### 5.2 许多变异性干扰了细胞的正常代谢活动和发育,最终导致细胞全能性丧失

在长期的离体培养过程中,植物细胞全能性丧失是一个经常遇到的问题。因此,应该广泛建立高效的稳定的植株再生体系,以创造更多的变异类型及得到新的种质资源,这是植物抗性的分子机理研究和育种实践基础。

### 5.3 分离筛选突变体的技术方法少,而且水平也不高

这主要是因为对诱变引起的某些内在变化,特别是反映在代谢环节上的特征特性变化缺乏认识。因此,应该对变异体的生物化学和分子生物学基础进行深入研究,然后从中抓住这些特征,或某一生化环节,作为选择指标来利用。

总之,只有在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上,突变体筛选及其利用才能发挥更大的作用。

## 参考文献

- 1 Larkin PJ, Scowcroft WP. Somaclonal variation—novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor Appl Genet*, 1981(61):19~214
- 2 宋再华,彭守华,简爱兰. 体细胞无性系变异及变异频率. 莱阳农学院学报, 1997, 14(2): 122~129
- 3 Smith M K, Dnaw R A(1990). Current applications of tissue culture in plant propagation and improvement. *Austral J Plant Physiol*, 17: 267~289
- 4 Veilleux R E, Johnson AAT. Somaclonal variation, molecular analysis, transformation interaction, and utilization. *Plant Breeding Reviews*, 1998 (16): 229~269
- 5 McPheeters K, Skirvin R M. Histogenic layer manipulation in chimera 'Thornless Evergreen' trailing blackberry. *Euphytica*, 1993 (32): 351~360
- 6 Marcotrigiano M. Genetic mosaicism and chimeras: Implications in biotechnology. In: YPS Bajaj(ed). *Biotechnology in agriculture and forestry*. 1990 (11): 85~111
- 7 Broertjes C. Mutation of breeding of streptocarpus. *Euphytica*, 1969 (18): 333~339
- 8 Broertjes C, Keen A. Adventitious shoots: Do they develop from

- one cell. Euphytica, 1980 (29): 73~87
- 9 Evan. D A. Applications of somaclonal variation. Ln: A Mlamhi(ed.). Biotechnology in agriculture. New York: All R Liss, 1988. 203~223
  - 10 刘进平,郑成木,胡新文. 体细胞无性系变异研究进展. 华南热带农业大学, 2001, 7 (2): 22~29
  - 11 Sun ZX, Zhao CZH, Zheng KL, et al. Theor Appl Genet, 1983 (67): 67~73.
  - 12 叶新荣,余毓君. 小麦再生植株的变异研究. 遗传学报, 1989, 16 (5): 105~110.
  - 13 Amato F. Cytogenetics of plant cell and tissue culture and their regenerates. Crc Crit Rev Plant Sci, 1985 (8): 73~112
  - 14 Bretell RIS, Dennis ES, Scowcm WT, et al. Molecular analysis of a Somaclonal mutant of maize alcohol dehydrogenase. Mol Gen Genet, 1980 (202): 235~239
  - 15 王小军,鲍文奎. 八倍体小黑麦耐盐细胞系产生的遗传机制. 植物学报, 1998, 40 (9): 330~338
  - 16 Devaux P, Kifan A, Kleinhofs A. Anther culture and Hordeum bulbosum - derived barley doubled haploids: mutation and methylation. Mol Gol Genet, 1993 (241): 674~679.
  - 17 Smith. R. H. et al. Proc, 5th Ind, cong. Plant Tissue and cell culture, 1982. 489~495
  - 18 朱至清. 植物细胞工程. 北京: 化学工业出版社, 2003. 104~105
  - 19 米海莉,许兴,李树华,等. 春小麦耐盐突变体的筛选及耐盐性的研究. 宁夏农林科技, 2001, 46 (3): 1~4
  - 20 陆维忠,程顺和,沈晓蓉,等. 细胞工程在小麦抗赤霉病育种中的利用. 江苏农业学报, 1998, 14 (1): 9~14
  - 21 耿瑞双,缪树华,何立明. 抗赖氨酸加苏氨酸的玉米种子蛋白突变体. 应用与环境生物学报, 1991, 35 (1): 1~5
  - 22 詹亚光,齐凤慧,杨传平. 欧美杂种山杨愈伤组织再生系统的建立. 植物生理学通讯, 2004, 40 (4): 437~440
  - 23 曹仪植,宋占午. 植物生理学. 甘肃: 兰州大学出版社, 1998. 1~10
  - 24 林定波,颜秋生,沈德绪. 柑橘抗寒细胞变异体的获得及其抗性遗传稳定性的研究. 植物学报, 1999, 41 (6): 136~141
  - 25 韦彦余,赵民安,王晓军. 植物体细胞无性系变异在植物性状改良中的应用. 植物生理学通讯, 2004, 40 (6): 763~772

## 中日双方就农产品进出口问题达成多项共识

中国国家质量监督检验检疫总局局长李长江日前在出席中日高层经济对话前,与日本农林水产省大臣若林正俊进行了对口会谈,双方就各自关心的农产品出口问题达成了多项共识。

为实现在2008年3月底之前解除对中国产南瓜的进口禁令,日方将立即启动国内的相关解禁法律程序。对于中国偶蹄类产品对日出口问题,日方同意在2008年3月底之前,完成对中国35家热加工禽肉生产企业的热加工偶蹄类产品进行考察与确认等相关法律程序后,准予进口。

对于日本输华大米问题,日方表示,将在2008年3月底之前,按双方商定的程序,制定并实施有关检疫性病虫害等工作程序。日方也期望中方在就有关日本输华大米检疫问题达成一致之前,能够允许日本对华出口第二批大米150吨。对此,中方表示肯定。

此外,中日双方还就中国鲜冻禽肉对日出口问题进行了协商。双方同意,在2008年5月世界动物卫生组织(OIE)可能公布的有关“非疫生产小区(Compartment)”前,双方将积极开展检验检疫技术交流和磋商,并按照“非疫生产小区”的规则,尽早实现该问题的解决。

(张晓松)