

植物体细胞遗传学 简明教程

● 黄百渠 编著
● 东北师范大学出版社



植物体细胞遗传学

简明教程

黄百渠 编著

东北师范大学出版社

内 容 简 介

本书系统地论述了高等植物体细胞遗传学的基本原理、研究范围和方法,并介绍了国内外在这一研究领域中的进展和发展趋势。内容包括:植物组织和细胞培养及离体形态发生;原生质体的游离、培养和植株再生;原生质体融合和体细胞杂交;亚原生质体和细胞器在体细胞遗传学研究中的应用;植物细胞转化的途径;Ti质粒和植物病毒的结构功能以及它们作为植物基因载体的潜力的探讨;体细胞无性系变异和突变体的产生和用途等。

本书可以作为大专院校生物系高年级本科生或遗传学专业研究生的选修课教材和参考书,对从事植物遗传学和育种工作的科研人员也有一定的参考价值。

植物体细胞遗传学简明教程

ZHIWUTI XIBAO YICHUANXUE JIANMING JIAOCHENG

黄百渠 编著

责任编辑:郝景江	封面设计:李冰彬	责任校对:乃 珍
东北师范大学出版社出版	吉林省新华书店发行	
(长春市斯大林大街110号)	东北师范大学出版社激光照排中心制版	
(邮政编码:130024)	长春市第五印刷厂印刷	
开本:850×1168毫米 1/32	1991年5月第1次印刷	
印张:9	1991年5月第1版	
字数:230千	印数:0001-1000册	
ISBN 7-5602-0483-X/Q·14	(压膜) 定价:3.00元	

前 言

植物体细胞遗传学是综合现代遗传学、分子生物学和基因工程技术而发展形成的一门边缘学科。它以植物的细胞培养和原生质体操作技术为基础,研究离体植物体细胞的生长、分化、遗传转化、基因表达及其遗传规律等。植物体细胞遗传学是一门在过去近20年中发展起来的新兴学科,由于它的许多研究手段在很大程度上弥补了经典遗传学和分子遗传学的不足,同时也显示出了在植物改良和育种实践中的应用前景,因此越来越受到植物遗传学家和育种学家的重视。目前,国内还缺少一部将植物体细胞遗传学作为一个完整学科作介绍的教科书或专著。为此,作者在近年来为遗传学专业研究生开设的体细胞遗传学选修课程的基础上,结合国内外的有关文献资料,编写了这本简明教程,目的在于较为系统而又简要地介绍植物体细胞遗传学的基本原理、技术和发展状况。本书可供已具有一定的遗传学、细胞生物学和分子生物学基础知识的大学本科生和研究生作为选修课教材或参考书,对植物遗传和育种科技工作者也有一定的参考价值。

全书共分十一章。在绪论中简要叙述了植物体细胞遗传学的历史、现状、研究范围及发展趋势。第二、三章介绍了作为本学科基础的植物组织和细胞培养的原理和方法,以及各种离体分化和形态发生的方式,包括器官发生、体细胞胚胎发生、单倍体形成等。在随后的三章中,着重描述了原生质体的操作技术,内容有原生质体的游离和培养(第四章),原生质体的分化和植株再生(第五章),以及原生质体的融合和体细胞杂交(第六章)。第七章介绍了原生质体融合的另一一个方面,即通过亚原生质体融合和细胞器的转移获

得部分体细胞杂种的途径及意义。第八章至第十章分别介绍了在不同的层次上对植物细胞实现遗传转化的途径和基本方法,并对其在遗传学基础理论研究与实践应用中的作用和意义等作了初步的探讨。其中第八章叙述了通过化学和物理的方法诱导原生质体摄入外源DNA的途径。第九章和第十章分别对用土壤根癌农杆菌Ti质粒和植物病毒作为基因载体实现细胞转化的潜力和发展现状进行了探讨。最后一章(第十一章)讨论了植物组织和细胞培养中体细胞无性系变异产生的方式和机制,植物生化突变体的分离鉴定及其在遗传分析中的用途。

在编写过程中,作者尽可能多地查阅和参考了国内外的最新资料,试图较全面和系统地介绍植物体细胞遗传学所涉及的各个研究领域。此外,还将引用的有关的文献列于每章之后,以供对某一课题有兴趣的读者作进一步探讨时参考用。由于篇幅所限,本书对各种相应的体细胞遗传学操作技术和实验方法未作详细的描述,读者可参阅所引用的有关文献报道。

植物体细胞遗传学是一门迅速发展中的学科,新的进展和研究成果不断出现。例如,几年以前原生质体培养和植株再生在禾谷类农作物中还是一个难以克服的障碍。最近这方面已有了突破性的进展,许多重要作物包括水稻、玉米和小麦的原生质体成株相继获得成功。本书对类似的新进展和新的研究手段的介绍难免挂一漏万。作者经验和学识均有限,书中不要和错误之处,竭诚希望各界人士批评指正。

黄百渠

1990年12月于长春

目 录

第一章 绪 论	1
一、引 言	1
二、体细胞遗传学的发展历史和植物体细胞遗传学的出现	3
三、植物体细胞遗传学的研究范围和内容	7
四、植物体细胞遗传学发展的展望	11
第二章 植物组织和细胞培养	16
一、植物组织和细胞培养的发展历史	16
二、植物组织和细胞培养的基本方法	20
(一) 无菌操作	20
(二) 培养基的营养成分	22
(三) 培养基的选择	27
(四) 培养的物理条件	29
三、愈伤组织培养	30
(一) 愈伤组织的诱导	30
(二) 愈伤组织的生长和特征	31
四、细胞悬浮培养	33
(一) 悬浮细胞系的建立	33
(二) 悬浮细胞的生长	35
(三) 单个细胞的培养	37
(四) 影响单细胞培养的因素	39

五、细胞和组织的低温保存.....	40
(一)细胞对低温的反应.....	40
(二)影响细胞存活的因素	41
第三章 植物组织和细胞培养中的离体形态发生	45
一、植物细胞全能性的表达.....	45
二、植物的离体细胞分化和器官发生.....	46
(一)细胞分化.....	46
(二)器官发生.....	48
(三)影响芽形成的因素	50
(四)影响根形成的因素	52
三、体细胞胚胎发生.....	53
(一)体细胞胚胎发生的理论和实践意义.....	54
(二)体细胞胚胎发生的两种方式.....	56
(三)细胞胚性状态的获得、保持和表达	57
(四)胚状体的个体发生和起源.....	59
(五)胚状体诱导和发育中内外因子的相互作用	60
四、单倍体的产生.....	63
(一)花药培养.....	64
(二)花粉培养.....	68
(三)通过染色体加倍得到纯合二倍体的方法	70
第四章 植物原生质体的游离和培养	75
一、原生质体技术是植物体细胞遗传学的基础.....	75
二、原生质体游离技术的发展.....	76
三、原生质体在遗传学和细胞生理学研究中的作用.....	78
四、原生质体游离和提纯的方法.....	80
(一)植物材料的来源.....	81
(二)酶解去壁.....	83

(三)渗透压的调节	85
(四)原生质体的提纯	86
五、原生质体的培养方法	87
(一)液滴培养	87
(二)琼脂平板培养	87
(三)“供养者”原生质体培养	88
(四)共培养法	89
(五)其他方法	89
六、影响原生质体游离和培养的因素	90
(一)供体植物的生理状态	90
(二)供体植物的基因型	91
(三)酶和酶解过程	92
(四)培养基和生长调节物质	94
(五)培养条件	96
七、单倍体原生质体的获得和培养	97
(一)花粉原生质体的游离	98
(二)花粉四分体和花粉母细胞原生质体的游离	100
 第五章 植物原生质体的生长、分化和形态发生	104
一、游离的原生质体的性质	104
(一)形态和结构	104
(二)生理生化活动	106
(三)质膜的性质	108
二、原生质体细胞壁的再生	112
(一)细胞壁再生的一般特征	112
(二)细胞壁合成的时间	115
(三)细胞壁形成的结构研究	116
(四)细胞壁形成中的合成活动	118
三、细胞分裂和细胞团的形成	119
四、原生质体的分化和植株再生	124

第六章 原生质体融合和体细胞杂交	136
一、植物体细胞杂交的意义	136
二、植物体细胞杂交的历史和概况	138
三、诱导原生质体融合的方法	142
(一)融合的一般特征	142
(二)融合的方法	143
四、杂种细胞的鉴别和筛选	147
(一)融合产物	147
(二)筛选方法的概述	147
(三)利用遗传互补作用进行筛选	149
(四)利用生理互补作用进行筛选	152
(五)通过对亲本细胞的失活和杂种细胞生长能力的恢复进行选择	153
(六)机械分离	154
(七)其他分离方法	155
五、植物体细胞杂交的应用	156
(一)在遗传学分析中的应用	156
(二)体细胞杂交的实践应用	162
第七章 细胞器和亚原生质体在体细胞遗传学中的用途	170
一、目的	170
二、细胞器的分离和转移	173
(一)从原生质体分离细胞器的方法	174
(二)原生质体摄入外源细胞器的途径和方法	175
(三)细胞器的导入及其作用	179
三、亚原生质体的分离及其用途	183
(一)什么是亚原生质体	183
(二)亚原生质体的制备方法	184
(三)亚原生质体的用途及融合实验	188

第八章 植物细胞的转化:外源基因的直接导入	193
一、导 言	193
二、原生质体摄入外源基因的途径和方法	195
(一)多聚氨基酸法	196
(二)磷酸钙-DNA 共沉淀法	197
(三)脂质体法	198
(四)微注射法	200
(五)电激法	201
三、细胞摄入外源物质机制的初步探讨	203
第九章 植物细胞的转化:以 Ti 质粒作为基因载体	207
一、土壤根瘤农杆菌及 Ti 质粒	207
二、Ti 质粒的结构和功能	209
(一)Ti 质粒的基本结构	209
(二)T-区 DNA 的特征	213
(三)T-区 DNA 的转移和整合	214
(四)中间载体的应用	217
三、用 Ti 质粒转化植物细胞的途径	218
(一)原生质体的转化	218
(二)细菌-细胞共培养法	220
四、外源基因的表达	221
(一)外源基因表达的条件	221
(二)非毒性 Ti 质粒的构建及转化细胞的植株再生	224
五、结论和展望	225
第十章 植物细胞的转化:以植物病毒作为基因载体	230
一、植物病毒作为基因载体的条件和选择	230
(一)基本条件	230

(二)病毒的选择	232
(三)病毒载体与质粒载体的比较	233
二、双链 DNA 病毒:CaMV	235
(一)CaMV 的结构和性质	235
(二)CaMV 作为基因载体的探索	238
三、单链 DNA 病毒	241
四、单链 RNA 病毒	242
(一)概 况	242
(二)RNA 病毒的复制和表达	243
(三)RNA 病毒作为基因载体的探索	244
五、结论和展望	245
 第十一章 植物体细胞变异和突变	251
一、植物组织和细胞培养中的变异和突变	251
二、植物体细胞无性系变异的产生	253
(一)什么是体细胞无性系变异	253
(二)培养细胞的遗传性变异	255
(三)培养细胞的生理性变异	260
三、植物体细胞变异和突变机制的探讨	261
(一)关于变异性的来源	261
(二)关于体细胞突变的遗传方式和稳定性	262
(三)关于突变的“热点”	263
(四)关于体细胞突变发生的机制	264
四、体细胞无性系变异在实践中的意义	265
五、生化突变体的筛选	268
(一)植物细胞培养中的生化突变体	268
(二)生化突变体的分离和鉴定	269
(三)植物生化突变体的例子	271

第一章 绪 论

一、引 言

在过去的几十年中,人们对于高等生物的遗传和变异本质的了解有了较大的进展,遗传学研究的方法和手段经历了不断的改革,在许多方面发生了质的变化。这是因为在这段时间内,所有的生命科学都有了巨大的发展,对许多基本生命现象及其生理生化基础的认识有了突破。真核生物遗传学的发展在很大程度上可以归功于以下两个方面的成就。第一,成功地将在细菌和微生物遗传学研究中的一套成熟技术应用到真核细胞中,至使对那些来自于多细胞生物并已分化的细胞也可以像对单细胞的细菌那样进行研究。第二,新的生物化学和分子生物学实验技术的不断出现和完善,为遗传学家们提供了许多有用的研究手段和工具,从而发展起来了一门新的学科——分子遗传学。如今,微生物学的、生物化学的、分子生物学的知识和技术已经成了现代遗传学研究必不可少的工具。

利用这些新技术进行遗传学研究的一个中心是重组 DNA 技术(recombinant DNA technology)的出现。它的出现从本质上改变了遗传学家们研究基因的方式,使他们有可能把所感兴趣的基因分离出来,用微生物学的方法使之克隆增殖,得到足够量的纯净的基因,用以进行化学上的、结构和功能上的研究。同时,可以把分离的和重组的基因转移到一个新的活体细胞或生物体中,用以研究它们在新的遗传背景下的功能及相互影响。这些技术已经越来越成

为遗传学实验中的常规手段。这些在以前都是办不到的。例如,假如我们想要得到一定量的纯的珠蛋白基因,那么就必须设法从人体基因组的 10^6 个不同基因中去寻找它。而且,即使我们具有从基因组中分离出单一基因的技术,从 500 个人体中所能提纯出的珠蛋白基因也不会比利用重组 DNA 技术从一升体积的培养细菌中所得到的多。

现代遗传学研究的另一有力工具是 DNA 序列分析技术(DNA sequencing)和人为改变基因的技术。由 Fred Sanger^[1]在 1977 年发展起来的 DNA 序列分析方法已不断得到改进和完善。如今,确定一段 DNA 分子核苷酸排列的顺序要比确定其他生物大分子的序列更为容易快捷。分离和克隆一个基因,确定其序列,并通过遗传密码来推测这个基因所编码的蛋白质分子的氨基酸排列顺序,目前已是分子遗传学中常用的研究过程。另外,人们对遗传突变的认识和研究方法也有了根本的改观。以前,一个遗传学家可能要用他一生的精力来确定某一生物(如果蝇)的 20 个突变体(mutant)而并不知道这些突变的生化和分子基础。今天,利用现代的生化技术,可以在一天内人为地诱导出上百个基因突变,并且很快地通过确定其 DNA 序列而弄清这些突变的分子生物学本质。在此以前,虽然科学家们已经在果蝇(*Drosophila*)中发现了几百个不同的突变体,但没有一个这样的突变真正从分子水平上被认识。也就是说,不知道某一基因分子结构上的变化与某一蛋白质结构上变化之间的相关性。如今这些已成为遗传学的基础知识。

在遗传学研究的进展过程中,体细胞遗传学(somatic cell genetics)作为一门学科分支得到发展,赋予了遗传学家们探讨基因转移、基因间相互作用和基因功能的许多崭新的途径和手段。区别于在有性生殖和完整个体基础上的遗传学,体细胞遗传学是来自生物体的培养细胞为研究对象的。在很大程度上,体细胞遗传学的发展最初是基于这样两个目标,即在一个细胞群体中变异性的产生和获得,以及不同来源的细胞之间遗传物质的交换及其机理

的探索。从生物学的意义上说,分离的单个细胞不能真正代表它们供体生物体的状况,这些细胞的行为以及被研究的方式更接近于微生物群体。随着细胞培养和细胞融合技术的发展,利用培养细胞来研究生物的一些共同的基本过程,如分化发育、免疫性、衰老过程以及肿瘤生长等,已取得显著的效果。同时,由于高等生物基因工程(genetic engineering)技术的不断完善,以及对细胞培养中促进分化,组织和器官形成及新个体再生(主要在植物中)的各种因素的新的认识,使得培养细胞和分化组织或完整个体之间有可能建立起联系,这为应用体细胞遗传学为工业、农业、医学和育种实践服务提供了前提和基础。

二、体细胞遗传学的发展历史和植物体细胞遗传学的出现

体细胞遗传学的诞生可以追溯到 50 年代早期关于某些真菌的细胞融合实验^[2]。在这些实验中,来自 *Aspergillus nidulans* 和其他真菌的体细胞(即那些不作为产生配子的前体的细胞)之间经常会发生融合。这一现象可以在显微镜下观察到。当这种融合发生来自于两个遗传学上不同的品系的细胞之间时,就产生了所谓的异核体(heterocaryons)。这种异核体细胞含有两个来自不同融合亲本细胞的核,但它们之间往往并不融合,而是在细胞分裂中各自独立地分裂。随之提出了两个问题。第一,异核体中的两个不同的细胞核之间是否有可能发生融合,从而得到一个含有两组完整染色体的杂合子(heterozygote)? 第二,如果发生了这样的核融合,杂合子在以后的有丝分裂中是否有可能发生某种方式的重组(recombination)?这两个问题的答案都是肯定的。由杂合子发育形成的真菌品系已能通过某些方法鉴别和分离出来。同时,也观察到这些杂合子品系中有时会发生以下两种方式的重组。其中一种方式是体细胞

交换(somatic crossing-over),其结果是产生出一个含有在某些片断上同型的杂合染色体的细胞核。通过分析这些杂合染色体在以后的细胞分裂中的分离类型可以确定基因的次序和着丝点的位置。另一种体细胞重组的方式是在有丝分裂中染色体的错误分配(misdistribution)。这种重组方式为把基因或者连锁基因群定位到具体的染色体上去提供了有用的工具。

由于这些在真菌遗传分析上取得的成功,研究者们开始试图将类似的方法应用到哺乳动物的培养细胞中去。最初是通过培养那些具有能够在细胞水平上被识别的标记性状的杂合体细胞,并观察由这些细胞形成的克隆中标记性状的分离情况来进行遗传分析。但这个方法的成功是很有限的,因为即使是采用了某些能够增加染色体错误分配频率的处理(如秋水仙素),在哺乳动物杂合体细胞中这种染色体错误分配仍然是一罕见的事件,因此很难得到适当的非整倍体细胞以供遗传分析之用。但不久以后研究者们找到了另一种有效的途径。在 60 年代初期,一些研究者在实验中观察到这样的现象,即共同培养中的两个不同物种的哺乳动物体细胞也可以进行融合,融合产物在某些情况下还发生了核融合。这些融合后的细胞可以增殖形成克隆^[3]。随后,这些研究者在一系列的实验中深入研究了这些杂种细胞在长期的培养过程中发生的变化,包括染色体的丢失、显性现象、已专门化的功能在培养过程中的保存、以及杂种细胞酶类的合成等等。与此同时,筛选和分离杂种细胞或由它们产生的细胞克隆的技术也开始发展起来^[4]。稍后,Harris 和 Watkins(1965)^[5]发现用经失活的 Sendai 病毒处理能够大大提高细胞间融合的频率。

在这些技术发明和完善的基础上,体细胞遗传学经历的另一个突破是 Weiss 和 Green^[6]在 1967 年观察到的一个现象。他们发现在人和家鼠体细胞杂种的培养和分裂过程中,会发生染色体的单方向丢失,即人的染色体逐渐丢失而家鼠的染色体被保留下来。以后又进一步发现,在适合人的细胞生长但缺乏家鼠细胞生长所

必需的一种物质(如某种酶)的培养基上,人-家鼠体细胞杂种中的某一条特定的人的染色体会被保留下来,并且这条染色体上恰好带有为培养基中所缺少的那种酶编码的基因。这样,通过采用一系列不同的培养基,其中每一种培养基都适合于人的细胞的生长,但缺少家鼠细胞生长所需的这个或那个物质,就可以建立起一套杂种细胞株,每一细胞株都含有整套的家鼠染色体,加上一条人的染色体。利用这些杂种细胞,就可以把那些为有关的蛋白质编码的基因定位到具体的人的染色体上。同样地,一套家鼠-仓鼠杂种细胞株也被建立起来了。在这一情况下,家鼠的染色体会被逐渐排斥掉。因此可以用同样的方法来定位家鼠的有关基因。

这项体细胞遗传学的研究成果,大大促进了人类遗传学的发展。在此之前直至1968年,仅有三个人的常染色体的连锁基因群被鉴别出来,其中还没有一个基因被具体地定位到单条染色体上。但到了80年代初,已有200多个人的基因被定位了,如今这个数目仍在不断增加。结合应用染色体分带技术(banding technique),目前已能将许多基因准确地定位到染色体的一条臂,一个区域,甚至一条具体的带纹上。

应用体细胞遗传学的有关实验技术,能够将基因以至于整个基因组转移到一个新的细胞环境或遗传背景中去,这为研究基因的功能和相互作用提供了一条区别于传统遗传学研究方法的全新的途径,从而越来越成为进行遗传分析、基因定位的一个重要手段。此外,体细胞遗传学的发展也开始与医学和农业的实践发生了密切的联系,它的一些新的技术和研究成果,如单克隆抗体、体细胞杂交等,已经在癌的研究、基因转移及动植物新品种的培育中发挥了积极的作用。

因此,体细胞遗传学作为一个遗传分析和遗传重建的新工具,最初始于真菌研究中,随后被广泛应用于哺乳动物特别是人的培养细胞中。近年来又开始在维管植物遗传学研究中找到了用武之地,成为植物改良的一个很有希望的新的途径。

高等植物的体细胞遗传学研究应该说始于 70 年代初,也就是以 1970 年在英国科学家 Cocking 所领导的研究室中成功地进行了植物原生质体之间融合的实验为起始点^[7]。然而,这项技术的发展则是以 60 年代早期发明的用酶解法大量游离植物原生质体的技术为基础的^[8]。植物原生质体融合和体细胞杂交的技术得到了很快的发展,成为植物体细胞遗传学研究的一个主要手段。在这方面,出现了许多杰出的工作和成功的报道。例如,Carlson 等人^[9]在 1972 年通过融合来自烟草属的两个不同种的原生质体,获得了一个异源四倍体的新的杂种。另一个著名例子是在 1978 年由 Melchers 等^[10]报道的蕃茄—土豆体细胞杂种的建立。

相对来说,植物体细胞遗传学发展较晚。以高等植物为研究对象和材料而引起分子遗传学家们的注意还是最近的事。其原因主要是,第一,高等植物缺少像某些动物例如果蝇那样的作为遗传学研究材料的许多突出优点(如有一系列的突变体等);第二,植物中缺少如同在哺乳动物中已建立起来的稳定的细胞株,这是因为从单一植物细胞形成纯系细胞克隆的可靠性要比动物细胞小得多;第三、可以用以转化植物细胞的基因载体的发现还仅仅是最近几年的事。但从另一方面看,植物细胞也具有优于动物细胞的方面,即离体培养的植物细胞能够重新分化并有可能再生出新的有生殖能力的植株来。这一特性为研究外源基因在植物细胞中的表达和调控开辟了新的天地,同时也使利用外源基因来改良重要农作物的经济性状成为可能。

随着一系列关键性实验方法的发展和技术难关的突破,植物体细胞遗传学也有了迅速的发展。这些技术上的突破包括:植物原生质体游离、培养和植株再生技术,原生质体融合和杂种细胞的筛选技术,原生质体摄入外源遗传物质的方法,植物基因载体的发现等等。有目的地将有益基因插入到农作物的基因组中去以改变作物性状,是今后育种的一个新的方向。科学家们已开始认真考虑并且着手开展利用植物基因工程和体细胞遗传学的技术来提高作物