

粮食作物的远缘杂交

译文集



科学出版社

粮食作物的远缘杂交

(译文集)

邵启全 蒋兴邨 李金国 等译

科学出版社

1980

内 容 简 介

本书选译了1973至1977年国外发表的有关远缘杂交原理、技术方法和育种成就的资料。书中着重介绍了非异源精卵结合的观点和实验结果；克服远缘杂交不亲和性的原理及方法；大麦×小麦、小麦×大麦、小麦×小黑麦等远缘杂交中的细胞遗传学研究的进展；最后介绍了植物属间遗传物质——脱氧核糖核酸（DNA）转化的新方法。

本书可供从事遗传学研究的工作者、育种工作者和高等院校师生参考。

粮食作物的远缘杂交

（译文集）

邵启全 蒋兴邨 李金国 等译

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1980年7月第一版 开本：787×1092 1/16

1980年7月第一次印刷 印张：9

印数：0001—3,800 字数：203,000

统一书号：13031·1263

本社书号：1758·13—10

定 价：1.40 元

前 言

远缘杂交是指种间和属间以及亲缘关系更远的生物类型之间的杂交。它是创造农作物新品种和新型农作物的重要途径。为了对国外的情况加以分析研究,我们从近几年来国外粮食作物有性远缘杂交方面发表的著作中选择了一些文章编译成册,供遗传育种工作者参考。有关远缘杂交的报道很多,我们只局限在有实际应用价值和在理论上、方法上有进展的方面选取资料,按三个问题编排,即通过有性过程的基因转移产生的非异源精卵结合的杂种、克服远缘杂交不亲和性的理论和方法、以及高等植物转化的研究动态。由于手头资料缺乏和编辑时间仓促,错误和不当之处,请批评指正。

邵启全、蒋兴邨、李金国

1978年4月

目 录

前言	(i)
遗传学在农业生产上应用的新途径	F. B. Holl (1)
在没有精卵融合情况下特异基因的有性转移	K. K. Pandey (9)
磨擦禾遗传性转移给玉米的途径	Jack. R. Harlan 和 J. M. De Wet (15)
关于克服禾谷类作物远缘杂交不亲和性的研究	L. S. Bates 等 (21)
用环己(酰)亚胺处理芸苔属花粉克服柱头不亲和性的研究	T. E. Ferrari, D. H. Wallace (25)
花粉自交识别与不亲和性反应的调节机理模型	T. E. Ferrari, D. H. Wallace (29)
花粉蒙导, 花粉壁产生的生长促进物质在克服种间和种内不亲和性中的可能的作用	K. K. Pandey (46)
大麦×小麦的杂种	Anthon Kruse (57)
大麦活体-离体幼胚培养技术	Anthon Kruse (61)
大麦×黑麦杂交引起的单倍体	George Fedak (68)
小麦-大麦杂种提高了部分同源染色体配对率	George Fedak (73)
小麦-小黑麦杂种的减数分裂配对问题	E. Sanchez-Monge 和 E. Sanchez-Monge jr. (76)
用染色体消失法大量产生小麦单倍体	I. R. Barclay (83)
山羊草属(<i>Crassa</i>)(6x)经球茎大麦花粉授粉育成多倍单倍体植株	重信妙子·阪本寧男 (85)
G-分带技术在小麦进化细胞遗传学研究中的应用	GY.Hadlaczky 和 A. Belea (88)
通过易位和吉姆沙染色鉴别三体黑麦	F. J. Zeller 等 (90)
甘蔗基因通过渐渗杂交掺入高粱的细胞遗传研究	J. M. J. de Wet 等 (98)
植物遗传转化研究的现状和展望	B. H. Со́йфер, Н. В. Турбин (102)
在野生型异源DNA的作用下大麦 Waxy 性状的遗传变异	Н. В. Турбин 等 (110)
植物转化研究的最近动向	足立泰二 (120)
砧木组织细胞的退化核 DNA	草薙昭雄 (122)
最近西欧有关嫁接变异与性状转化的研究情况	太田泰雄 (123)
番茄基因组中的细菌 DNA	(124)
外源细菌 DNA 併入植物 DNA 质疑	A. Kleinhofs 等 (125)
显花植物的遗传转化和嫁接杂交	K. K. Pandey (134)

遗传学在农业生产上应用的新途径

F. B. Holl

(加拿大国家研究委员会普赖里地区实验室)

可耕地面积不断减少,而世界人口却迅速增长,这就向我们的遗传资源和使用这些资源的植物育种工作者提出越来越多的要求。革新或新颖的遗传学方法可能会解决某些遗传分析问题和产生作物新的遗传变异。本文讨论了像远缘杂交, DNA 导入,组织、细胞及原生质体培养,以及体细胞杂交等领域的研究现状。植物组织培养方法有助于扩大抗病虫、对环境压力有较强耐性、提高品质的基因库,利用此法有可能培育出新的作物类型。但是,利用革新方法一定要认真分析这些方法的潜力与局限性,以及用这些方法所产生的材料能很容易地纳入现有的作物育种体系中去的能力。

引 言

遗传学是植物育种的科学基础,而育种工作者由于育种目标的急迫性,实际应用遗传学时有一定局限性,从而不能利用遗传分析的全部潜力,除掌握庞大群体的实际困难外,在使用杂交与选育等等经典育种方法时,又受到是否有理想的遗传变异和对性状的遗传学知识(如何遗传的?遗传是什么?)的限制。此外,遗传材料不寻常的组合的天然障碍(不亲和性)和危险情况的存在(人口不断增长的压力和可耕地面积的不断减少),向我们的遗传资源和育种工作者利用这些资源的能力提出了越来越多的要求。

遗传学直接、间接地对农业发展作出了许多贡献,现在的问题是,在农业生产上能不能更有效地利用遗传学成果。

植物育种工作者所面临的严重问题中,包括种质资源、遗传变异的利用和遗传弱点。如何有效地获得、估价、推广应用及贮存有价值的种质,通常在我们所用的材料中有许多性状的遗传学是不清楚的,许多天然的遗传变异,留待发掘利用,只要能确定下来就行。现在的农业系统、政府和消费者都一致要求农作物整齐一致。这种整齐一致化的结果必然产生出种质上对病虫害非常脆弱的材料。美国主要农作物遗传弱点委员会的报告(1972)在一定程度上详细谈到了上述问题的严重性。除了这些令人窒息的问题外,育种工作者还必须经常注意产量与品质,以及抗病虫害,环境适应性和掌握品质等农艺性状。没有其它有关方面的配合,单单使用严格的“遗传学”的方法解决上述一系列问题,那么即使说不可能的,也是十分困难的。

农业生产面临的这些问题并不需要什么新的或不寻常的技巧或遗传学知识,只要个人、政府等能意识到这些问题,或进而言之,愿意提供时间、场地和基金即可。国际玉米与小麦改良中心发表了一种乐观的估计:仅常规育种也能使世界主要作物(如玉米和小

麦)的产量在今后二、三十年内走在人口增长的前头(国际玉米与小麦改良中心,1974年)。这项改良计划适用于世界上一些对作物病虫害问题的认识不如北美而搞大面积单一栽培的地区。如果有一、两种主要的流行病,或因他种原因而造成的作物减产,对未来三十年的生产能力将会发生怎样的后果?国际玉米与小麦改良中心在其综述中介绍了在作物育种方面“基础”研究的一些途径的必要性。

在本文中,作者考虑两个基本问题,作者认为这两个问题有助于从遗传学上解决问题,特别还要讨论一些新颖的和革新的育种技术问题。

(1) 遗传变异的识别与选择。

(2) 克服天然物种的障碍,使遗传信息稳定地转移和交换。

讨论这些问题时,有必要指出,任何一个系统,从技术和群体大小上来说,容易掌握是有好处的。

整株法

整株方法的优越性在于所产生的材料更易于纳入后来的作物育种计划。在这一点上,对农业和作物育种工作者来说,任何一项技术和方法,如果不能产生有潜力的育种材料,除了学院式的纯学术意义外,毫无用处,毫无价值。整株研究也有明显的局限性:费时间、需占用大量场地、群体很大,从技术上掌握有困难或不可能进行。

用整株试过两类新的措施:

(1) 远缘杂交:种间、属间、科间的杂交通常是不亲和的。植物通过其发育历史进化产生了一系列保护机理,以便从形态上、生理上和生物化学上维持物种的完整性,重要的生化障碍有:(a)配子的不亲和性(受精前)和(b)杂种破落(受精后)。

远缘杂交方面研究最多和宣传最广的工作是小麦×黑麦杂种的培育,它表明授粉、剥取和培养杂种胚及秋水仙碱处理使染色体数加倍等用的都是最常见的方法。然后才使可育的(或部分可育的)初级杂种纳入植物育种。曾试验过其它一些远缘杂交,但成效不大。例如,最近尝试过豌豆×蚕豆的属间杂交(Gritton 和 Wierzbicka, 1975年),一周后观察到发育的胚衰亡,Gritton 等人认为胚培养方法行不通。

小黑麦的历史发展说明,远缘杂交项目或任何不寻常的遗传组合存在着某些潜在的局限性。早在1876年首次进行了小黑麦的远缘杂交工作,直到1954年加拿大马尼托巴大学重新进行小黑麦育种研究,进展甚微,十年后,国际玉米与小麦改良中心也开展了小黑麦远缘杂交的研究课题,目前仍在进行中。小黑麦发展到现阶段的时间进程表对那些寄希望于用远缘杂交或任何其它新颖方法快速解决问题的人们敲起了警钟。

Bates 及其同事(Bates 和 Deyoe, 1973年; Bates 等人, 1974年)报道了远缘杂交的一些新进展。他们设想,不亲和性的机理可能与动物的免疫化学系统相似,因此或许用适宜的化学药品也能抑制植物的不亲和性。他们测验了下列免疫抑制剂: E-氨基己酸(EACA)、氯霉素、吡啶黄、水杨酸、龙胆酸。然而,尽管实验报告指出这类处理方法有某些前途,但没有提供形成杂种的具体证据。

(2) DNA 导入: 六十年代后期,相当一部份人的注意力集中到采用异源 DNA 作为外来遗传信息的一种来源,用来克服植物自然繁育的障碍。采用了多种多样的措施,从报道的结果来看,有的成功,有的失败(Ledoux, 1971年; Holl 等人, 1974年)。为了严格评

价这一技术,需要选择遗传特性清楚的标记系统,复制的 DNA 的分离和导入方法,以及分析处理材料的选择系统等。

作者在从事固氮的遗传控制研究课题时,曾得到了一些大田豌豆品系,在有豌豆根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum*)条件下,由于缺少简单遗传的单个基因而不能结成根瘤(Holl, 1975 年 a)。用快速再生方法从野生型、结根瘤的植物材料提取了 DNA(Holl, 1975 年 b),然后把它吸入到水琼脂中,在 28°C 黑暗条件下导入突变种子 96 小时,把萌发的幼苗移植到砂土和蛭石各半的混合物中,接种商品生产的豌豆根瘤菌(威斯康辛州、Hansen 接种品公司)。接着使它在缺氮的培养基上生长四周左右(Wilson 和 Reisenauer, 1963 年),检查植株是否长出根瘤。观察到用来源于结根瘤的 DNA 处理,不长根瘤的突变体变为长根瘤的表型(Holl, 1975 年 c)。在使柠檬酸盐缓冲液、无菌蒸馏水、小牛胸腺 DNA 或突变体幼苗 DNA 处理的对照试验中,未观察到形成根瘤。对这些材料子二代和子三代的分析工作正在进行。这些资料说明, DNA 导入后的确发生了影响根瘤发育的病斑的修复,而且或许会传给后代。然而,根据这些资料进行推理,或对观察到的现象提出一种解释的机理,在现阶段大体上还只是推测而已。

组织培养法

随着人们能操纵控制培养的植物器官、组织、细胞和原生质体,组织培养成为解决植物遗传学问题的最有希望的新颖方法。

(1) 植物器官培养:植物原生质体技术和体细胞融合的潜力所引起的激情,使植物组织培养的其它领域稍有逊色。无性系的繁殖和无病毒植物的产生,两种方法的应用已取得了一些成功

无性繁殖作为一种保持特殊遗传系的手段,特别是这类材料处于杂合状态,可能是很有用的。Grisp 和 Walkey(1974 年)检验了花椰菜顶端分生组织无性繁殖的潜力。他们提出了这一方法在遗传研究和育种中的用处,并指出了种子生产上这种方法有限的商业应用的可能性。

顶端分生组织在无菌条件下再生的植株,不仅可用于无性繁殖,而且也可用作消除系统的病毒感染的方法。一些研究人员试用这种方法来产生木薯(*Manihot utilisima* Dohl.) (Kantha 等人, 1974 年)、大黄(Walkey, 1968 年)和草莓(Vine, 1968 年)无病毒症状的植株。

也有人建议用植物器官作为媒介物来研究附加异源 DNA 的效应(Holl 等人, 1974 年)。豌豆和大豆的苗尖的 DNA 酶活性低(Holl,未发表的观察报告),苗尖能再生植株,与处理完整种子比较,需要的 DNA 量较少。然而本文前面提到的根瘤系统,作者在实验中没有看到将 DNA 导入根尖后发生变化的证据(Holl, 1975 年 c)。

Hess 等人(1974 年)最近报道了一些实验结果,用标记的细菌 DNA 导入粉兰菸草和矮牵牛的花粉粒。这些实验结果与摄入外源 DNA 相似,未发生大量的降解和再用现象。这些经过处理的花粉可以培养产生单倍体植株,或用来给某些受体种授粉,作为传递和掺入外来遗传信息的媒介。

(2) 原生质体技术:现在已经有了能产生和培养一系列植物组织的原生质体的相当成功的技术。然而,那种“一切就绪”的看法使人忽视了下述实际问题,即:要使原生质体

技术成为搞农业生产的育种工作者手中的一种实用辅助工具,还须在技术上取得重要的进展。

原生质体对高等植物的遗传研究具有某些突出优点。利用原生质体能获得大量而相对同源的单细胞群体。去除细胞壁后可进行各种各样的技术操作,如摄入研究和原生质体融合。有些研究工作者已提出用类似微生物系统的方法使原生质体应用于植物分子遗传学研究(见 Carlson, 1973 年; Chaleff 和 Carlson 1974 年)。在现阶段要实现这一设想还存在下列难题:(1)人们感兴趣的许多植物的原生质体还难于分离和培养。(2)缺乏遗传标记和筛选方法。(3)外遗传效应:离体条件下所表现的性状未能在整株的情况下表现出来。(4)植株性状未能在培养的细胞中表现出来。(5)植株的再生问题是植物原生质体实际应用上的主要障碍。

突变形成与选择

藉助于诱变和筛选技术在生化途径的研究工作中可利用微生物类似法。高等植物的倍性状况使这类分析更为困难,一个理想的补救办法是产生单倍体从而简化遗传分析。通过花药和花粉培养产生单倍体业已获得成功,而大麦则能通过种间杂交而后使染色体消除的办法产生单倍体植株(见 Kasha 所写的一篇单倍体研究的评论, 1974 年)。尽管原生质体系统不一定能反映出整株的状况,但从单倍体植株或细胞培养物来的原生质体有助于确定系统的遗传行为。甚至二倍体细胞也可采用有用的选择(Chaleff 和 Carlson, 1974 年; Ohyama, 1974 年)。

Pelcher 等人(1975 年)以玉米为材料,证明玉米叶片原生质体对 T 型玉米小斑病的毒性反应,与整株的抗病与感病玉米自交系的生理反应有关。这种细胞水平上的区别能力说明了植株的再生一旦成为可能时选择抗病系的潜力问题。

DNA 导入

原生质体可能是 DNA 导入实验的最理想的受体,因为它没有细胞壁, DNA 酶活性低,能大量处理,而且选择群体时容易操作。目前的主要缺点是还没有明确规定的选择系统,从细胞期再生成完整的植株还有困难。

原生质体看来能摄取一些分子量大的外源 DNA,但对于吸取的 DNA 在后来较长时间里的状况尚未进行分析研究(Ohyama, 1972 年)。Ohyama 在普赖里地区实验室用来自细菌的含有产生甘露醇脱氢酶信息的 DNA 导入缺乏这种酶的大豆细胞的原生质体(Holl 等人, 1974 年)。他分离出了能在甘露醇加乳糖上生长的细胞,但未能测量出酶的活性。无性繁殖系生长极为缓慢,而且未能长成足够大量生化分析用的材料。

细胞的细胞器是遗传信息的另一来源,为避免因掌握分离的 DNA 制备品而引起的麻烦,有些工作人员尝试诱导直接摄取细胞器,如 Potrykus 和 Hoffman(1973 年)报道把矮牵牛的核移植到矮牵牛、菸草和玉米的原生质体中。另外还有可能摄取叶绿体、染色体和线粒体。Bonnnett 和 Eriksson(1974 年)介绍了叶绿体的摄取问题,他们说,经过处理的原生质体有 16% 含有引入的叶绿体。这种方法具有某些明显的复杂性,而改变遗传信息内容的这类方法都具有这种复杂性,所谓复杂性是指细胞器的存活与复制和(或)其信息内容,原生质体的培养,含有所需的额外信息,原生质体的选择与植株的再生,等等。

体细胞杂交

植物组织培养方面真正令人感到鼓舞的绝大部分工作是关于体细胞杂交的研究。它又是在最大程度上缺乏理论根据的领域。在讨论体细胞融合时,从农业上来说只有得到了具有两个亲本的某些遗传信息的“杂种”植株,工作才能算“成功”。在上述含义上,已经报道的只有两次成功的实验(Carlson 等人,1972 年),用离体培养方法繁殖出粉兰菸草和郎氏菸草间的天然有性杂交。Melchers 和 Labib(1974 年)将两个有性亲和的光敏感菸草品系融合,得到了一个互补的光抗杂种。这些实验是用 Keller 和 Melchers(1973 年)所发明的高 pH 钙融合方法完成的。尽管这些实验并不一定能代表“模式”杂交系统,但实验确实强调了这一方法的两个关键:(1)能在杂种细胞和亲本细胞之间选择识别;(2)能

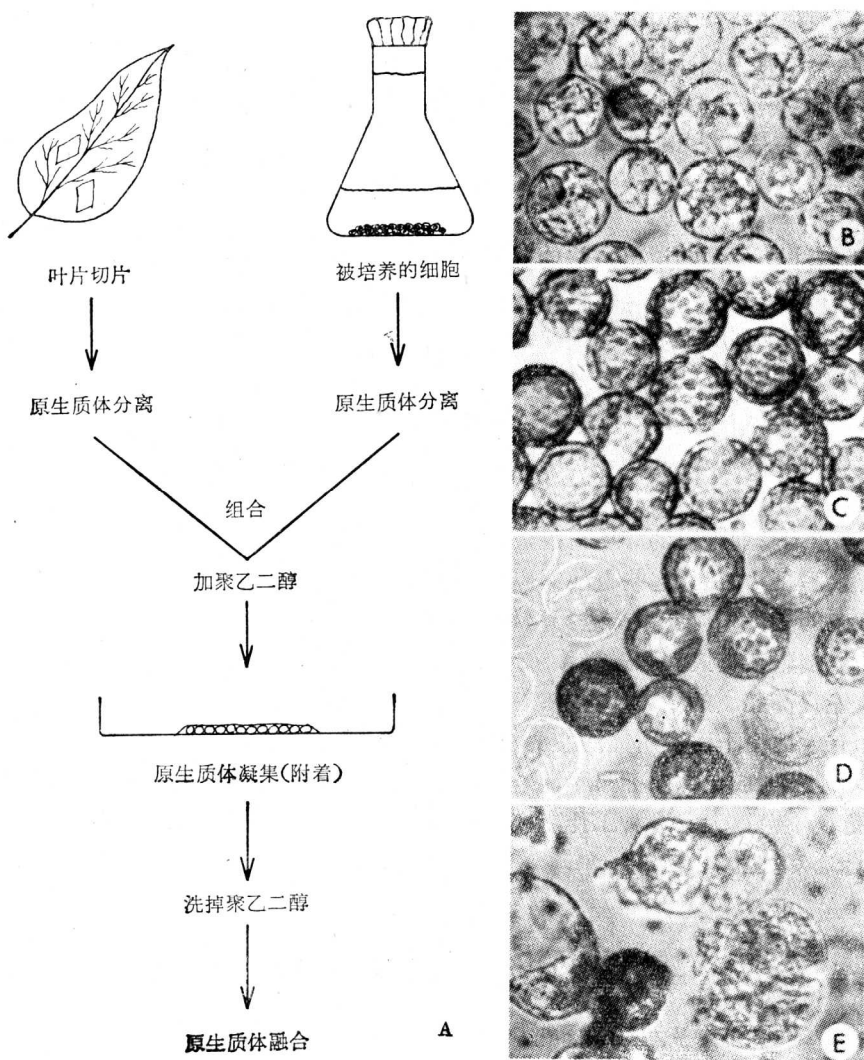


图 1 植物原生质体的分离和融合

A. 原生质体分离和融合程序示意图; B. 培养的大豆细胞原生质体; C. 豌豆叶肉原生质体; D. 加入聚乙二醇前培养的大豆细胞原生质体的混合物; E. 分裂中的杂种细胞。

使细胞培养物再生成植株。

1974年以前,通过原生质体融合搞体细胞杂交只不过是一种“碰运气”的方法而已。普赖里地区实验室的 Kao(Kao 和 Michayluk, 1974年)和在瑞典的 Eriksson 实验室工作的 Wallin(Wallin 等人, 1974年)几乎同时发明了聚乙二醇融合法(附图),使这一方法初具可重复性。属间融合成功率能达到存活的原生质体的 30%。在这 30%的原生质体中又有 10%能培养到细胞分裂阶段。由于从一个亲本带来绿色的叶绿体(叶片中间细胞原生质体),以及受培养的细胞亲本来的细胞质颗粒,所以能鉴定出异核细胞(Kao 等人 1974年)。现在已经搞出了一系列的属间融合组合(Gamborg 等人, 1974年)。在一些组合中,胞壁能再生,随后发生细胞分裂,并已看到核融合现象(Constabel 等人, 1975年)。分裂和杂种细胞的形成看来取决于至少培养一个亲本类型的能力,而不取决于植物的属或科。

产生体细胞杂种的第二步是必然搞出种种选择系统,弄清诱导快速、高频率的形态发生与植株再生所必须的条件。现在还不能预言杂种的遗传组分,或者是否有选择地去除某些或全部外加的信息。但目前从时间上讲至少已经接近能回答其中的一些疑点了。

结 论

从实践来说,新颖的遗传方法的前景到底如何?植物或易于培养的器官(如根尖)的遗传信息交换的方法,为作物育种工作者提供了有用的途径。

倘若不亲和性的障碍能够克服,那么远缘杂交方法也许在提供理想的育种材料方面潜力可能最大,但我们是否面临另外一个小黑麦的难题?

包括单倍体产生、细胞与原生质体培养的组织培养方法,将为植物生化和遗传调节研究取得快速而有效的进展提供实验材料,但必须看到,在离体条件下不是所有的代谢系统都能作遗传分析。

DNA 导入或细胞器的移植可能成为越过天然不亲和性障碍而进行遗传信息交换的高产和有效手段。然而,这些方法的应用,对其真正潜力和(或)局限性作出评价之前,须在明确规定的条件下对各系统进行严格的鉴定。

属间体细胞杂交成功和选择系统使人们能够扩大抗病虫害的、对环境压力有较强耐性的以及能提高品质的基因库,或者有可能培育出崭新的植株类型。目前,用原生质体进行杂交和有效地用于诱变研究的主要技术障碍是缺乏有效的选择方法和细胞无性繁殖方法,以及不能再生成植株。如果不能解决这些问题,那么新颖的方法在生产更多的粮食的斗争中,价值不会很大。育种工作者要想在育种工作中利用这类“工程植物”,仍需付出全部时间、耐心和技巧。

参 考 文 献

- [1] Bathes, L. S. and Deyoe, C. W. 1973. Wide hybridization and cereal improvement. *Econ. Bot.* 27:401—412.
- [2] Bates, L. S., Campos, A., Rodriguez, R. and Anderson, R. G. 1974. Progress towards novel cereal grains. *Cereal Sci. Today* 19:283—285.
- [3] Bonnett, T. H. and Eriksson, T. 1974. Transfer of algal chloroplasts into protoplasts of higher plants. *Planta* 120:71—79.
- [4] Carlson, P. S. 1973. The use of protoplasts for genetic research. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*

- [5] Carlson, P. S., Smith, H. H. and Dearing, R. D. 1972. Parasexual interspecific plant hybridization. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **69**:2292—2294.
- [6] Chaleff, R. S. and Carlson, P. S. 1974. Somatic cell genetics of higher plants. *Annu. Rev. Genet.* **8**:267—278.
- [7] CIMMYT. 1974. CIMMYT review. Int. Center for the Improvement of Maize and Wheat, El Batan, Mexico.
- [8] Constabel, F., Dudits, D., Gamborg, O. L. and Kao, K. N. 1975. Nuclear fusion in intergeneric heterokaryons. *Can. J. Bot.* In press.
- [9] Crisp, P. and Walkey, D. G. A. 1974. The use of aseptic meristem culture in cauliflower breeding. *Euphytica* **23**:305—313.
- [10] Gamborg, O. L., Constabel, F., Fowke, L. C., Kao, K. N., Ohyama, K., Kartha, K. K. and Pelcher, L. 1974. Protoplast and cell culture methods in somatic hybridization in higher plants. *Can. J. Genet. Cytol.* **16**:737—750.
- [11] Gritton, E. T. and Wierzbicka, B. 1975. An embryological study of a *Pisum sativum* × *Vicia faba* cross. *Euphytica* **24**:277—284.
- [12] Hess, D., Lörrz, H. and Weissert, E.-M. 1974. Die Aufnahme bakterieller DNA in quellende und keimende Pollen von *Petunia hybrida* and *Nicotiana glauca*. *Z. Pflanzenphysiol.* **74**: 52—63.
- [13] Holl, F. B. 1973. Cellular environment and the transfer of genetic information. *Colloq. Int. C. N. R. S.* **212**:509—516.
- [14] Holl, F. B. 1975a. Host plant control of the inheritance of dinitrogen fixation in the *Pisum-Rhizobium* symbiosis. *Euphytica*. In press.
- [15] Holl, F. B. 1975b. DNA isolation from plants for use in DNA feeding experiments in *Plant tissue culture methods*. Edited by O. L. Gamborg and L. R. Wetter. National Research Council of Canada, Saskatoon, Saskatchewan.
- [16] Holl, F. B. 1975c. Molecular genetic modification of legumes. In *Proc. of the workshop on uses of molecular genetic modification of eukaryotes*. Univ. Minnesota, Minnesota, U. S. A. In press.
- [17] Holl, F. B., Gamborg, O. L., Ohyama, K. and Pelcher, L. 1974. Genetic transformation in plants. In *Tissue culture and plant science*. 1974. Edited by H. E. Street. Academic Press, N. Y. pp. 301—327.
- [18] Kao, K. N. and Michayluk, M. R. 1974. Method for highfrequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta* **115**:355—367.
- [19] Kao, K. N., Constabel, F., Michayluk, M. R. and Gamborg, O. L. 1974. Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells. *Planta* **120**:215—227.
- [20] Kartha, K. K., Gamborg, O. L., Constabel, F. and Shyluk, J. P. 1974. Regeneration of cassava plants from apical meristems. *Plant Sci. Lett.* **3**:265—271.
- [21] Kasha, K. J. 1974. *Haploids in higher plants*. Univ. Guelph, Guelph, Canada.
- [22] Keller, W. A. and Melchers, G. 1973. Effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion. *Z. Naturforsch.* **28**:737—741.
- [23] Ledoux, L. 1971. *Informative molecules in biological systems*. North-Holland, Amsterdam.
- [24] Melchers, G. and Labib, G. 1974. Somatic hybridization of plants by fusion of protoplasts. I. Selection of light resistant hybrids of 'haploid' light sensitive varieties of tobacco. *Molec. Gen. Genet.* **135**:277—294.
- [25] National Academy of Sciences. 1972. Genetic vulnerability of major crops. Washington, D. C.
- [26] Ohyama, K. 1974. Properties of 5-bromodeoxyuridine-resistant lines of higher plant cells in liquid culture. *Expt. Cell. Res.* **89**:31—38.
- [27] Ohyama, K., Gamborg, O. L. and Miller, R. A. 1972. Uptake of exogenous DNA by plant protoplasts. *Can. J. Bot.* **50**:2077—2080.
- [28] Pelcher, L. E., Kao, K. N., Gamborg, O. L., Yoder, O. C. and Gracen, V. E. 1975. Effects of *Helminthosporium maydis* race Ttoxin on protoplasts of resistant and susceptible corn (*Zea mays*). *Can. J. Bot.* **53**:427—431.
- [29] Potrykus, I. and Hoffman, F. 1973. Transplantation of nuclei into protoplasts of higher plants. *Z. Pflanzenphysiol.* **69**:287—298.
- [30] Vine, S. J. 1968. Improved culture of apical tissue for production of virus-free strawberries. *J. Hort. Sci.* **43**:293—297.

- [31] Walkey, D. G. A. 1968. The production of virus-free rhubarb by apical tip-culture. *J. Hort. Sci.* 43:283—287.
- [32] Wallin, A., Glimelius, K. G. and Eriksson, T. 1974. The induction of aggregation and fusion of *Dacus carota* protoplasts by polyethylene glycol. *Z. Pflanzenphysiol.* 74:64—80.
- [33] Wilson, D. O. and Riesenauer, H. M. 1963. Cobalt requirement of symbiotically grown alfalfa. *Plant Soil* 19:364—373.

[周霞仙译自 *Canadian Journal of Genetics and Cytology*,
1975 年, 第 17 卷, 第 4 期, 第 517—524 页]

在没有精卵融合情况下特异基因的有性转移

K. K. Pandey

(新西兰工业和科学委员会遗传学室)

有性杂交是把从两个有机体来的基因结合起来的最常用的方法。然而在植物育种工作中,往往只需引入一个或少数几个特异的基因,就能显著改良一种作物品种。为了消除杂交所带来的不理想的性状,通常需要几代回交和选择,这就大大拖长了育种过程。作者在这里介绍一些实验结果,它说明在两个有机体之间更快地转移所需基因的新方法。

在研究“花粉蒙导”在克服烟草种内杂交不亲和性作用的实验中,作者看到某些未曾预料到的现象。在某些情况下,正像所预期而那样,用经过钴照射(100,000 伦,流量率为347.6 伦/分)杀死的蒙导花粉和具有生活力的母本不亲和花粉混合授粉,结果打破了自交不亲和系统,从而产生了自交后代。蒙导花粉是经过照射的亲花粉,它产生一条花粉管,但不能使胚珠受精。在某些基因型组合中,蒙导花粉释出的物质可使正常的不亲和花粉长出花粉管,使胚珠受精。在其它情况下,蒙导花粉不起作用,一般也不产生种子,但是,在这后面一类组合中(这些组合包括虽有亲缘关系,但形态上有明显差别的种间杂交亲和种 *N. forgetiana* 和 *N. alata*),在出现大量衰退而无生活力的胚珠的同时,有几个组合产生了罕见的有生活力的种子。

从这些种子长出 24 棵正常的能育的二倍体植株。从总的形态特征来看,全部与母本相像。但是,令人惊奇的是,大多数植株的花有颜色,并(或)表现出蒙导花粉源的等位基因不亲和性的特性(表 1)。有十四棵植株做了细胞学检查,全部都是正常的。没有发现额外的染色体片段。

为了研究这一明显的“基因转移”现象,将花有颜色和(或)表现出蒙导花粉源的 S-型等位基因的十四棵植株和几种基因型已知的测试植株杂交(表 2,3)。这些测试性杂交的最明显结果是有 34 株携带了三个来自 G2-1, G2-2, G2-3, D6-1 和 D7-1 杂交的 S 等位基因(表 3)。用任何正常的遗传形式不可能获得这类三等位基因植株,它们的出现有力地证明存在一种不寻常的遗传转移过程。

这些试验结果的其它一些异常特征也说明经照射过的蒙导花粉能不经正常的配子融合作用而发生基因转移:

(1) 这些异常的植株有可能来源于虽经照射处理,但存活下来的极少数花粉的核,然而 1,000,000 伦这种极高的致死剂量不会产生还能存活的花粉粒的误差,这实际上排除了这种可能性。此外,由照射过的核授粉而产生的植株,应该表现出完全的不育性,缺乏活力或形态上有很大缺陷,然而没有看到这类现象。

(2) 在 A 和 B 家系里(表 1)从不同的物种获得蒙导花粉,其后代的花及总的形态上显然具有母本的特征,而且非常明显,有别于 *N. forgetiana* × *N. alata* 的正常杂种。

表 1 在利用照射蒙导花粉克服自交不亲和性的试验中能说明基因转人的初步观察结果

家系的 代号	自交母本 S 基 因型和花色	杂 交 蒙导花粉来源 S 基因型和花色	植株总数*	后 代† 具有稳定的 S 基因型和 有色花的植株数 (黑体 字表示“转入”的特性)	细胞学观察‡
A	<i>N. forgetiana</i> <i>S_{F1} S_{F2}</i> 白 (rr)	<i>N. alata</i> <i>S₃ S₃</i> 红 (Rr)	7 (从 A1 到 A7)	4 <i>S_{F1} S_{F1}</i> 红 2 <i>S_{F2} S_{F2}</i> 红 1 ? 红	正常 (3 株)
B	同 上	同 上	4 (从 B1 到 B4)	1 <i>S_{F1} S_{F1}</i> 红 1 <i>S_{F2} S_{F2}</i> 红 2 <i>S_{F2} S_{F2}</i> 白	正常 (3 株)
C	<i>N. alata</i> <i>S_{F10} S_{F11}</i> 白 (pp)	<i>N. alata</i> <i>S₁ S₂</i> 粉红 (Pp)	5 (从 C1 到 C5)	1 <i>S₁ S_{F10}</i> 粉红色 1 <i>S₁ S_{F11}</i> 粉红色 1 <i>S₂ S_{F11}</i> 粉红色 1 <i>S₃ S_{F11}</i> 白 1 <i>S₃ S_{F11}</i> 白	正常 (3 株)
D	同 上	同 上	8 (从 D1 到 D8)	1 <i>S₃ S_{F11}</i> 粉红色 2 <i>S₃ S_{F11}</i> 白 1 <i>S₃ S_{F10}</i> 白 3 <i>S₁ S_{F10}</i> 白 1 <i>S₁ S_{F11}</i> 白	正常 (5 株)

* 各家系都是来源于一个蒴果，只有 (B) 来源于两个各含有二粒种子的蒴果。在正常情况下，每蒴果含有高达 1000 粒或更多的种子。

† 在 24 棵植株中，只对 14 棵做了细胞学鉴定。

‡ 为了克服在采用高度杂合供试体做试验时，二倍体孤雌生殖在不亲和反应中的衰退问题，在这些试验里只使用了像 S 基因供试体的适当自交的植株。

(3) 在同一些家系里 (A 和 B 家系)，其蒙导花粉亲本在 *S₃* 基因上是纯合的，其后代对一个或其它的母本 S 等位基因来说全部是纯合的，因为如果它们是通过蒙导花粉的正常授粉产生的，它们都应该携带 *S₃* 等位基因。然而蒙导花粉亲本的参与是明确无疑的，因为后代花的红颜色只能来自花粉亲本。

(4) 还有在 A 和 B 家系中，11 棵后代植株中有 9 棵的花是红色。然而，根据亲本的基因型，真正杂交所产生红花与白花的比例应为 1:1。

(5) 外来花粉的污染不能解释表 1 中的异常植株。第一，植株生长在防虫温室中，而又严格控制试验程序。第二，若是污染会产生非常稀少的蒴果，蒴果里结满有生活力的种子。但是，在这些杂交组合中，蒴果很常见，而每个蒴果中有生活力的种子数却太少，所以不能代表偶然发生的污染 (有性混杂)。

(6) 尽管 A 到 D 的杂交组合中的异常植株育性很高 (60—95% 的花粉能染色)，然而和这一属中常见的正常杂交授粉植株相比较，有一些株的花粉表现出程度较高的不育性。

(7) 最后，G1, G2, G3 和 D4 四种异常植株的后代中，发现了表现型上的特殊异常现象。这些异常植株外表看来倒是正常的，“花”枝变为在花芽的部位丛生小叶片的营养枝。把这些植株的茎从基部切掉，会再长出原来类型的无性花序。就作者所知，从未看到或报道过菸草属有这种植株。正是发生了不寻常的遗传重组过程，结果才明显产生了这种奇妙的表现型菸草植株。

表 2 在明显携有转人的花的有色基因的 A 和 B 组间杂交植株后代的分离

家系的代号	杂 交*		分 离		
	♀	♂	红 色	白 色	预期的比例
A2—1	A 2 红	× 白	17	15	1:1
2	[A 2 红	× 白]	5	3	1:1
3	白	× A 2 红	21	9	1:1
A6—1	A 6 红	× 白	7	7	1:1
2	[A 6 红	× 白]	11	7	1:1
3	白	× A 6 红	13	8	1:1
4	A 6 红	自交	11	2	3:1
A7—1	A 7 红	× 白	7	6	1:1
2	A 7 红	× 白	3	7	1:1
3	[A 7 红	× 白]	13	15	1:1
4	白	× A 7 红	9	5	1:1
B1—1	白	× B 1 红	18	15	1:1
B4—1	B 4 红	× 白	24	16	1:1
2	[B 4 红	× 白]	19	17	1:1
3	白	× B 4 红	19	7	1:1
4	红(Rr)	× B 4 红	31 ⁺	4	3:1
5	B+红	自交	29	4	3:1

* 供试植株是正常的二倍体植株，在花色上是纯合隐性基因(rr)在 B4—4 中采用了杂合红花供试体(Rr)。方括弧表示正反交。

⁺ 假如转入基因是杂合的和表现正常时，预期的分离比例应为 1:1。A2—3 和 B4—3 杂交，红花后代显著过剩 ($P<0.05$)。总的来说，红花后代过剩极为显著 ($P<0.01$)。分离比例 3:1。分体的分离和所预期的没有显著不同，但是总的数表明红花后代过剩极为显著 ($P<0.01$)。

† 包括正常的和“转入”的红花植株。

现拟提出下列事实，做为解释上述实验结果的假说。

极高的照射剂量照射蒙导花粉“打碎”了生殖核，产生了大量微小的染色质片段。生殖核不再能进行分裂，这有助于染色质进一步碎片化。被打碎的染色质从花粉管流到卵里，起了一种“假授粉”的作用。像通常的情况一样，卵细胞的分裂障碍被打破，染色体又进行复制。然而，无组织的花粉染色质的存在，妨碍了合子的初次正常分裂。结果产生带“诱发”的合子生理状态的二倍体卵子。作者假设，至少在一些细胞中，游离的染色质片段会迅速衰退或者消失，它们的无组织作用会很快克服，使后来的有丝分裂得以正常进行。结果这样产生的胚就是孤雌生殖的二倍体。以前很少报道过，利用经过照射的菸草花粉授粉后，得到了孤雌生殖的二倍体。某些异常植株花粉所表现出程度高一些的不育性，主要是由于暴露出有害隐性基因作用的孤雌生殖二倍体的缘故。

蒙导花粉的染色质片段偶尔能和卵子染色质中同源片段联合。这些片段具有破的粘性末端，能嵌进染色体复制过程中形成的缝隙中去。作者提出下述可能来解释，为什么像减数分裂配对那样，花粉染色质片段一定被卵子染色质的同源片段所吸引。一旦诱发了复制，花粉的同源染色质分子能够和新合成的分子竞争成功。因为，在相应的分子重新合成以前，花粉的同源染色质分子在一股链旁边占据了各自的位置。

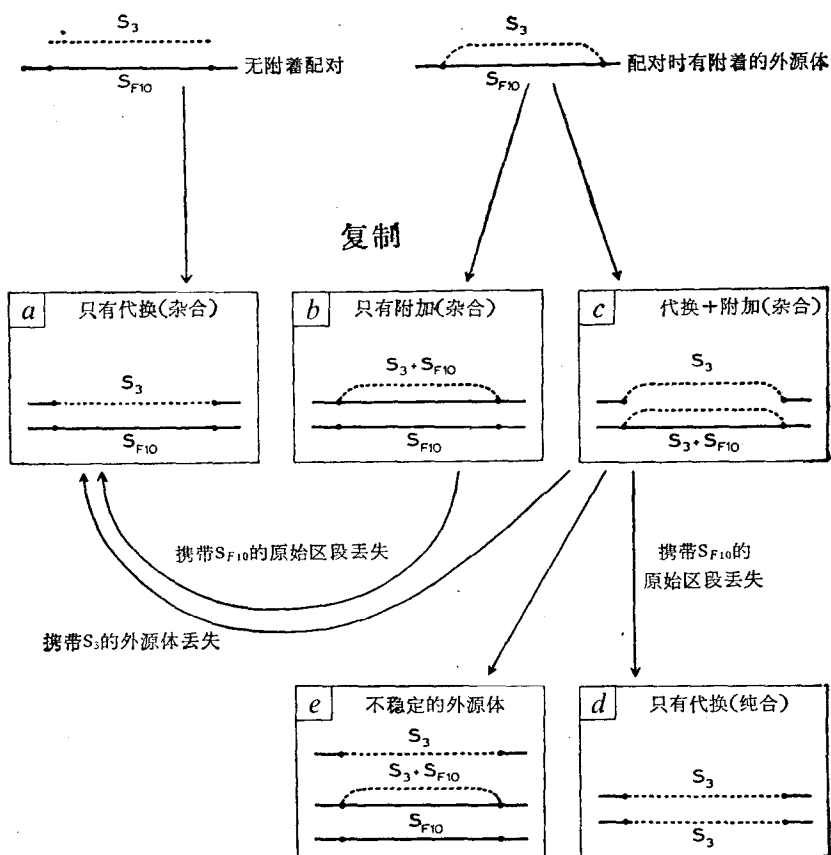


图 1 基因转入方式的示意图
与 a、b、c、e 有关的遗传状态是根据实验观察到的 (见正文)。
———卵染色质单链 (或者复制拷贝)
·····经照射的花粉染色质 (或复制拷贝)。单线表示“染色质”的单链, 而不是 DNA 的单链。

一旦来自花粉的染色质片段和卵子的染色质片段配对, 在复制过程中就容易产生代换或加性作用。染色质转移可能有三种类型 (图 1. a. b. c.)。值得提出的是, 实际上已发现了与这几类基因转移方式相吻合的结果 (表 3)。D 6 植株 说明了三等位基因状态 (图 1 b), 而 G 2 植株可能说明某种三等位基因状态 (图 1 c)。G 2 和 D 7 植株——表明三等位基因状态的第三棵植株——说明了产生三种类型的配子的外源染色体 (exosome) 的不稳定性 (图 1 e)。表 3 中其余的测试株代表代换状态 (图 1 a)。

本研究工作中所观察到的基因转移, 看来十分稳定。未曾得到牵牛花属的转化特征的那样的斑点状或染色花色。只有在极少情况下, 看到显著偏离预期分离比例的现象 (表 3)。但是, 说到花色, 可能有一种恢复携带转入的基因的有色花植株过剩的趋势。这一与转入基因有关的明显选择作用, 与正反交无关。因而, 排除了花粉管生长的可能性。

过去用高等生物作的转化研究远远不能清楚区别染色质转移究竟是取代还是附加模型。这里提出的试验结果, 由于能够鉴定在花柱中是否存在单个 S 等位基因, 因而就能说明存在代换和附加两种情况, 虽然代换拟占主导地位。但是, 还需指出, 在这些试验中所