

国外作物组织培养

7

上海农科院作物所体细胞培养和杂交组



目 录

1. 体细胞杂交与植物的遗传控制	1
2. 用原生质体融合获得的一种新奇植物—拟南芸苔	12
3. 洋葱的组织培养繁殖法	17
4. 甘蔗原生质体的分离和愈伤组织再生	25
5. 大叶钻天杨叶组织离体培养	27
6. 生长素和细胞分裂素对水稻愈伤组织培养物的绿色 部位发生的影响	34
7. 大豆英原生质体的分离、培养和愈伤组织形成	38
8. 高粱和玉米原生质体的分离、培养和融合	42
9. 苯乙酰胺诱导茄子下胚轴愈伤组织形成胚和器官	45
10. 卡那霉素促进植物组织的形态发生	51
11. 从胡萝卜悬浮培养物分离和提纯原生质体的一种改 进方法	55
12. 棉花子叶原生质体培养	59
13. 马铃薯原生质体的分离、培养和杂交	61
14. 用花药培养得到意大利黑麦草的雄核发育植株	63
15. 李属的花药和器官切段培养	67
16. 香豌豆叶肉原生质体的愈伤组织形成	70
17. 拟南芥愈伤组织原生质体培养和植株再生的改进	71
18. 甘蓝叶柄原生质体和叶肉细胞的愈伤组织形成	74

体细胞杂交与植物的遗传控制

I. K. Vasil, W. R. White

和 H. R. Berg

引

言

自发现细胞分裂素及其在植物发育上的作用和证实植物细胞的全能性以来，在体外，从许多植物实现了植株再生。然而最重要作物（那就是禾谷类和豆类）的植株再生仍然存在着极严重的问题，利用体细胞杂交这一新奇方法的一个重要前提是实现用组织培养技术能迅速得到无性系植株。这些无性化程序保证用体细胞杂交或其他付有性方法影响植物细胞的信息成分的任一变化，使有性杂交受限制的植物永远不必通过有性周期。

本文将广泛讨论用组织培养技进行作物遗传控制的潜在力。最有兴趣的是集中在下列几个方面：

(1) 单倍体和纯合植物或组织的生产及其它在突变产生，突变体筛选和杂交上的作用。从这种培养物得到的植株，在中国和日本已导致水稻和烟草品种的改良。这项技术不久将在作物改良利用上有最好的前景。

(2) 植物原生质体的分离和培养，以及诱导原生质体融合后的体细胞杂种的生产。

(3) 为生产胞质杂种 (Cybrids) 的器官移植和无核与有核原生质体的融合方法。

(4) 固氮和固氮细菌与非豆科组织培养强制结合的遗传工程。

(5) 通过 DNA 吸收等的植物遗传转化。

下面的讨论仅限于以上这些方面，其中某些实验工作已在有声望的作者实验室中普遍地进行着。

一 体细胞杂交和遗传控制中的植物原生质体

在现代原生质体研究中许多兴趣应归功于两篇新近的报告：

Power 等 (1970) 讨论诱导原生质体融合的方法, 和 Carlson 等 (1972) 报道用两个烟草种原生质体融合形成的第一个植物体细胞杂种。酶法除去植物细胞的细胞壁不仅提供远缘种原生质体融合的机会, 而且也许可用各种新颖的实验程序, 如细胞器微粒体和外源遗传物质等的导入, 能用于获得不可能用有性方法获得的细胞和植物新基因重组或遗传修饰。

三 原生质体的分离和培养

在上世纪末已成功证实原生质体的机械分离, 但所得到的原生质体的数目有限, Cocking 在 1960 年第一次报道用酶法脱植物细胞壁方法, 能产生相当大量的有活力原生质体。从此以后, 主要地由于有潜能系统和有效的降解细胞壁的商品性酶制剂, 从各种植物细胞、组织和器官分离出大量而同质的原生质体群体的方法。在大多数情况下, 通过把植物细胞或组织浸入粗制的纤维素酶和果胶酶制备原生质体, 可以用一步法也可用二步法。叶组织 (叶肉细胞) 和植物悬浮培养细胞提供了植物原生质体的最适宜来源。随着细胞壁的消失, 原生质体失去保护而渗透膨胀, 因此最重要的是在分离过程和培养初期要保持适当渗透压。用渗透稳定剂 (甘露醇或各种糖) 的酶溶液实现原生质体的分离。

细胞壁完全降解后, 要从酶溶液中迅速取出原生质体。其方法是用过滤法或离心法, 并用新鲜培养基反复洗涤。当在蔗糖溶液中离心时, 获得漂浮的原生质体是最纯净的原生质体制剂, 它几乎完全无任何细胞碎片, 洗净的原生质体悬浮在各种营养培养基中, 并进行悬浮培养, 液体悬滴培养, 或混有柔软琼脂营养培养基平板培养。Kao 和 Michayluk 发展的十分复杂培养基, 这个培养基可维持单个的分离原生质体的生长。

原生质体从酶溶液中移出后几分钟内便开始了纤维素微纤维的合成和沉积, 并且当新壁形成时原生质体便丧失其完整的园形。再培养 2~7 天, 发生第一次有丝分裂, 导致形成二个细胞, 在 1~3 周里, 形成了多细胞无性系, 便可作为愈伤组织继代培养, 或放在

液体培养基中得到悬浮培养物。

虽然很多植物的原生质体能再生出细胞壁并持续细胞分裂，但禾谷类作物原生质体的培养特别困难。在水稻、玉米和珍珠谷的原生质体培养中得到一些成果。我们最近从珍珠谷悬浮细胞分裂出原生质体，把它植板在琼脂培养基表面的软琼脂中，大量的原生质体（15~20%）植板效率不仅再生了细胞壁，而且继续分裂形成细胞无性系。当把它们分开和培养在新鲜营养培养基上，便增殖形成愈伤组织培养物。使用迅速增殖的细胞悬浮培养物进行培养，低温下延长细胞在酶溶液中培育，在蔗糖溶液上浮分离出纯净原生质体制剂和改良营养培养基等，便有可能成功地进行珍珠谷的原生质体培养。

象其他体细胞一样，某些生殖细胞原生质体也具有全能潜在性，并在适当营养和激素条件下，将长成正常植株。仔细阅读表1中列出的植物，清楚地表明主要地是包括典型植物系统，如 *Datura*, *Daucus*, *Nicotiana* 和 *Petunia*，到目前为止，尚未实现禾谷类和豆类植物的植株再生。只有马铃薯是重要食用作物。假若体细胞杂交和遗传控制在将来的作物改良中担任重要作用，那么必须大胆尝试实现从重要作物主要是禾谷类和豆类作物原生质体再生成植株，这些作物是人类食物主要的来源。从几种豆类作物原生质体得到了细胞无性系，但是试图诱导这类培养物脱苗和植株的形态发生都失败了。

体 细 胞 杂 交

Power 等(1970)首次报导了用 NaN_3 ，诱导酶法分离原生质体的融合。随后，证实 NaN_3 ，以低频率产生最好的融合，一般地仅分生组织（如根尖）才有效，Keller 和 Melchers(1973)在融合处理研究中发现高 pH (pH 10.5) 高钙 (Ca^{++}) 的培养基在高温 (37°) 下培育混合物导致 25% 以上的融合频率。几乎同时，证实 PEG 引起原生质体的强烈聚集而产生膜融合。用 PEG 处理后随即用高 Ca^{++} 高 pH (10.5) 的培养基冲洗得到原生质体的最有效的融合。PEG 诱导的融合完全是非特异性的，并且能得到很高的融

表1 从培养原生质体再生植株的植物

一览表

种	学名	参考文献
中文名	学名	
石刁柏	<i>Asparagus officinalis</i>	Bui, Deng Ha and Mackenzie, 1973
颠茄	<i>Atropa belladonna</i>	Gosch et al., 1975
油菜	<i>Brassica napus</i>	Kartha et al., 1974
油菜 (单倍体)	<i>Brassica napus</i> (haploid)	Thomas et al., 1976
无芒雀麦	<i>Bromus inermis</i>	Kao et al., 1973
光曼陀罗 (单倍体和二倍体)	<i>Datura metel</i> (haploid and diploid)	Schieder, 1977
	<i>Datura meteloides</i> (haploid and diploid)	Schieder, 1977
南洋金花 (单倍体和二倍体)	<i>Datura innoxia</i> (haploid and diploid)	Schieder, 1975
胡萝卜	<i>Daucus carota</i>	Grambow et al., 1972; Dudits et al., 1976a
花烟草 (单倍体)	<i>Nicotiana glauca</i> (haploid)	Bourgin and Missonier, 1973
	<i>Nicotiana debneyi</i>	H.H. Smith (私人通讯)
长花烟草	<i>Nicotiana langsdorffii</i>	H.H. Smith (私人通讯)
	<i>Nicotiana otophora</i>	Banks and Evans, 1976
	<i>Nicotiana sylvestris</i>	Bourgin et al., 1976; Nagy and Maliga, 1976; Banks and Evans, 1976
	<i>Nicotiana sylvestris</i> x <i>N. otophora</i> (F_1 hybrid)	Banks and Evans, 1976
烟草	<i>Nicotiana tabacum</i>	Takebe et al., 1971; Nagata and Takebe 1971
烟草 (单倍体)	<i>Nicotiana tabacum</i> (haploid)	Ohyama and Fritsch, 1972

续上表

中 文 名	学 名	参 考 文 献
烟草× (F ₁ 杂种)	<i>Nicotiana glauca</i> × <i>N. glauca</i> (F ₁ hybrid)	Banks and Evans, 1976
腋花矮牵牛 矮牵牛	<i>Petunia axillaris</i> <i>Petunia hybrida</i>	Power et al., 1976a Durand et al., 1973; Frearson et al., 1973; Vasil and Vasil, 1974
矮牵牛 (单倍体)	<i>Petunia hybrida</i> (haploid)	Binding and Nehls, 1974
矮牵牛× 拟矮牵牛 (杂种)	<i>Petunia hybrida</i> × <i>P. parodii</i> (hybrid)	Power et al., 1976b
拟矮牵牛	<i>Petunia inflata</i> <i>Petunia parodii</i> <i>Petunia paviflora</i> <i>Petunia violacea</i>	Power et al., 1976a Hayward and Power, 1975 Sink and Power, 1977 Power et al., 1976a
截 藂 千年不烂心 马铃薯	<i>Ranunculus sceleratus</i> <i>Solanum dulcamara</i> <i>Solanum tuberosum</i>	Dorion et al., 1975 Binding and Nehls, 1977 Shepard and Totton, 1977

合频率。能容易地用于种内和种间的融合。PEG诱导植物原生质体和动物细胞的融合，并也发现有益于不经仙台 (Sendai) 病毒帮助的动物细胞融合。

两个不同种的原生质体可形成各种融合产物，如A和B的融合处理产生的产物有：AA, AAA, BB, BBB, AAB, ABB, AB……和未融合的A和B原生质体。在正常的融合条件下，异核融合显然是十分普遍的，已有35~50%异核融合的报告。核融合未造成随后原生质体核融合，因此真正杂种细胞形成也并不普遍。

即使，在原生质体融合后，形成了真正的杂种细胞并不确保杂种组织和植株的复原，如两个亲本种的未融合原生质体，以及同核融合产物的生长强烈地阻挠或限制着存在于群体的一些真杂种，在非选择条件下，生长在正常培养基上恢复的杂种细胞极靠不住。因此，筛选的营养培养基不仅是有利的，而且将优先地只让杂种细胞生长，必须用于分离杂种细胞群体。这样的培养基成功地和优雅地起分离和培养动物体细胞杂种的作用。不幸地，为植物细胞的有效筛选培养基的报告很少。少数情况下，可采用的某些筛选方法确实已成功地用于生产体细胞杂种植物（表2）。

表2 下列植物通过原生质体融合产生的体细胞杂种

中文名	拉丁名
南洋金花×南洋金花	1. <i>Datura innoxia</i> + <i>D. innoxia</i> (Schieder, 1977).
	2. <i>Daucus carota</i> + <i>D. capillifolius</i> (Dudits et al., 1977).
粉兰烟草×郎氏烟草	3. <i>Nicotiana glauca</i> + <i>N. langsdorffii</i> (Carlson et al., 1972; Smith et al., 1976).
	4. <i>Nicotiana sylvestris</i> + <i>N. knightiana</i> (Maliga et al., 1977).
	5. <i>Nicotiana tabacum</i> + <i>N. sylvestris</i> (Melchers, 1977).
烟草×烟草	6. <i>Nicotiana tabacum</i> + <i>N. tabacum</i> (Melchers and Labib, 1974; Gleba et al., 1975; Glimelius et al., 1978).
矮牵牛×拟矮牵牛	7. <i>Petunia hybrida</i> + <i>P. parodii</i> (Power et al., 1976b).
	8. <i>Datura innoxia</i> + <i>P. discolor</i> (Schieder, 1978).
	9. <i>Datura innoxia</i> + <i>D. stramonium</i> (Schieder, 1978).

除4，8和9大概是两性不亲和的外，其余全部组合已知能产生有性杂种

第一个报道体细胞杂种植物是用郎氏烟草和粉兰烟草的叶肉原生质体融合产生的。用 NaN_3 处理实现融合。已报道过两个种的原生质体再生细胞壁和偶然通过一次细胞分裂，但从未看到形成愈伤组织。从有性杂交产生的二倍体杂种分离的原生质体也有相同的行为，但约 0.01 % 这种原生质体最后产生细胞团。两个亲本和杂种植株的原生质体生长特性的差异是，仅允许杂种细胞生长，以此作为第一次筛选。再生的愈伤组织随后转移到不含激素的培养基上。这提供限制亲本组织再次有力的选择，已知它们在体外无外源补充激素时不能生长，而杂种组织能继续生长，它们的生长不需要添加激素。从这种选择愈伤组织再生杂种植株同有性二倍体相同，并且它们的染色体数目为 $2N=42$ 个（24 个来自粉兰烟草和 18 个来自郎氏烟草）。

Smith 等 (1976) 也得到粉兰烟草 (G) 和郎氏烟草 (L) 的体细胞杂种，但他们是用 PEG 融合方法和复杂营养培养基。他们也使用 Carlson 等 (1972) 所用的二步筛选法，虽然亲本和杂种原生质体都在它们的培养基中生长，但杂种群体发展更快。更显著的是，没有分离出一个如 Smith 等 (1976) 所发现的 42 个染色体的体细胞杂种植株。这些植株的 $2n$ 染色体数目变化在 56~64 之间，或许从三重融合产生的 ($LL+G=60$ 或 $L+GG=66$)，并且当愈伤组织形成和植物再生时导入某种程度的非正倍体。

Carlson 等 (1972) 和 Smith 等 (1976) 的实验充分地证实原生质体融合的体细胞杂交的可行性。在此必须指出，从这些实验分离出的杂种都是早已知道是有性地产生的生长素自养性质的杂种。所以，这样的系统未必能广泛地或有效地用于体细胞杂种。

Melchers 和 Labib (1974) 融合来自缺叶绿素和光敏感烟草的两个花药分离的原生质体，在融合产物中两个隐性基因的遗传互补的吸引人的有利条件（优势），再生杂种植株呈正常绿叶和抵抗高光强。Gleba 等 (1975) 融合来自核细胞质 (Plastome) 突变体烟草的原生质体获得了正常绿色烟草植株。缺叶绿素突变体最近也用于获得烟草 + *N. Sylvestris* 和 *Datura innoxia* + *D. innoxia* 体细胞杂种。除非在远缘种杂种细胞中控制缺叶绿

素的基因互补事实上意外地困难外，这个系统能广泛地用于体细胞杂种的筛选。

Power 等 (1976) 采用基于不同生长特性和对放射线菌素 D 的敏感性的互补选择系统，获得了矮牵牛和拟矮牵牛 (*P. parviflora*) 的体细胞杂种。

Glimelius 等 (1978) 在原生质体融合之后，因缺 NaNO_3 ，还原酶的突变体烟草选择体细胞杂种。缺 NaNO_3 ，还原酶的突变体完全自养，在含硝酸盐作为唯一氮源的矿质培养基中不生长。缺硝酸还原酶具有隐性遗传性状，发现能在体细胞杂种中互补，因两杂种具有 NaNO_3 ，还原酶活力并能利用硝酸盐。在这些实验中所采用的缺硝酸还原酶细胞系，或许是首次报道高等植物的完全自养细胞系，并清楚地为从原生质体融合后产生的混合群体中优先筛选杂种细胞提高一个十分有力的有效系统。

作为早期确定的一种理想筛选系统将能有效地限制亲本细胞型并仍然维持杂种细胞的生长。我们企图用分别抗氨基酸类似物——5-甲基色氨酸 (5MT) 和 S-2-氨基-2-甲基-L-半胱氨酸 (AEC) 的两个变异细胞系，分离 *Nicotiana glauca* 的种内体细胞杂种。这个选择系统基于抵抗类似物是显性性状。 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ AEC 或 5MT 完全抑制了野生型 *N. glauca* 细胞的生长。选择出的自发的抗性细胞系能正常生长，而不被 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ AEC (AEC^R) 和 $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ 5MT (5MT^R) 抑制。在原生质体培养的无性系繁殖后保持抗性的两个细胞系在形态特征都彼此不同。 5MT^R 细胞群体的呈暗白色，细胞系生长占优势，而 AEC^R 细胞群体呈黄色，生长呈紧密的丛状。这些性状表明混合群体中细胞类型的形态差异。为了提高杂种原生质体抵抗两种类似物的存活能力，在进行选择之前，融合原生质应长到约 50 个细胞群。在 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ AEC + $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ 5MT (对照) 中，筛选混合 (1:1) AEC^R 和 5MT^R 原生质体，45~60 天后开始培养在缺两种同系物中，没有发生愈伤组织长大。看到 AEC^R 和 5MT^R 细胞在这样的混合培养物非常一致，但是没有一个是存活，排除了任何 cross feeding 的可能性。因 PEG 融合 AEC^R 和 5MT^R 原生质体 (1:1)，

进行两种氨基酸同系物抗性研究，在通常培养基中35天，筛选了656块愈伤组织，它们具有在含有两种氨基酸同系物培养基中迅速生长的能力（表3）。比较了这些假定的AEC^R+5MT^R细胞杂种和亲本细胞系对这两个同系物的抗性程度。

表3 在200 μ g/ml AEC+30 μ g 5MT 选择系统中AEC^R和5MT^R原生质体的融合和对照实验

原生质体的 来源	选择前的培 养时间 (天)	筛选的细 胞群落数	移入200 μ g/ ml AEC+30 μ g/ml 5MT 后细胞群落生 长的数目
AEC ^R 和5MT ^R 原生质体的混合 物 (对照)	60	5×10^3	0
AEC ^R 和5MT ^R 原生质体混合物 (对照)	45	10^4	0
融合的AEC ^R + 5MT ^R 原生质体	35	656	6*

* 假定杂种愈伤组织。

现在，有力的证据是：

当细胞分裂时，从异核体和真正杂种细胞获得随机排除亲本种之一的染色体。特别是在属间体细胞杂种细胞中出现了这种现象。植物体细胞杂交细胞的染色体排除最优秀实例之一是高国楠的出色工作，他融合了大豆悬浮细胞和粉兰烟草叶肉细胞的原生质体。机械分开形态上相同的融合产物，并培养在约25 μ l 高度复杂营养培养基中。杂种愈伤组织的细胞学分析表明，虽然大豆染色体的结构

或数目未发生明显的变化，仅保留少数几个粉兰烟草染色体。结构上的修饰是由于断裂和与染色体小片粘在一起。杂种组织未器官发生或植株再生。含有完整的非常近缘植物种的染色体组的杂种组织未必能发生正常的器官再生。在体细胞杂种组织中几个或仅部分染色体的稳定性大概未严重干扰再生现象。这样的细胞系也将对绘制高等植物的染色体图是很有用的。

Gleba和Hoffman(1978)机械分离和微滴培养了*Arabidopsis thaliana*+*Brassica campestris*原生质体的融合产物。在大约30个细胞世代(培养6~7个月)后，细胞系的细胞学检查表明，两个亲本的特殊染色体仍然保留在杂种细胞中，并用同工酶分析确认了它们的活性。因此，染色体的丧失或保持依赖于体细胞杂交所用的亲本种的特殊性状。

在有些情况，成功地用现存的适当形态学标记进行融合产物的机械分开。因此，高国楠(1977)和Gleba和Hoffman(1978)分开一个亲本叶的含叶绿体叶肉原生质体和它与另一个亲本悬浮培养物的原生质体融合。这种分开的单个融合产物的培养物在持续生长的微量营养培养基上培养产生了杂种组织。

从以上讨论证明，关于培养突变体或细胞系对药物等的抵抗/敏感，至今仍未广泛地用于植物体细胞杂交实验中。缺硝酸还原酶突变体的工作证明，这样的突变体在体细胞杂种细胞选择中是多么有用啊！因此，为了发展适当选择系统必须进行大量工作，从重要作物分离目标和其他突变体或变异细胞系。

植物组织培养和氮固定

限制重要农艺作物产量的最重要因子之一是固氮的效率。在合成氮肥时需高能量代价和价钱，它将有发展固N的选择来源。固N的主要生物学来源是根瘤菌与豆种植物的很特异的共生联合。因此，试图克服根瘤菌——豆科联合的特异性，即高效细菌菌株能用于根瘤化的合乎需要的豆科植物，和使用非豆科植物具有形成与根瘤菌和其他固N细菌的天生联合。

来自豆科和非豆科植物的植物组织培养显示诱导根瘤菌中的固氮酶活性，并逐步用于策划固氮细菌同非豆科植物种的联合的各种试验：(1)豆科和非豆科植物原生质体的融合，可能再生成能与根瘤菌联合的杂种植株。(2)强迫固氮细菌与非豆科组织培养物的联合，并可能再生成植株。(3)含细菌豆科根瘤原生质体同非豆科原生质体的融合。(4)诱导固氮细菌转移到原生质体。(5)通过胞质 (Plasmids) 或 DNA 使 *nif*-基因从细菌转移到非豆科植物。这些实验手段已在其他地方充分讨论过。

一些最近的研究表明与某些牧草和禾谷类作物根联合的微生物中有固氮酶活力。无生命细菌 *Spirillum* (*A20spirillum*) 和高等植物之间固氮联合的潜能受到显著的注意。我们企图强迫 *A20spirillum brasiliense* SP7 与甘蔗组织培养物的联合。生长在无氮或低氮营养培养基上的甘蔗愈伤组织，用在愈伤组织表面放一滴 (2×10^8 细胞/ml) 的细菌悬浮物进行培育。乙烯 (acetylene) 还原活性测定表明，培育愈伤组织培养物维持着 *A20spirillum* 的群体，它具有活跃地固氮作用，而对照没有乙烯还原活性。由于年幼的和活跃地生长的甘蔗愈伤组织培养物是很少或不含细胞间空隙，细菌生长仅限于愈伤组织的表面。随年龄进程，愈伤组织发展成结实的细胞间空间，并逐步被细菌占领，而埋在形成的囊粘液中，这是植物—细菌的相互关系。细菌主要生长在愈伤组织的胞间空隙系统或其表面，未证实细菌在细胞间生长。大量的细菌似乎接近正常的健康细胞。我们保持的甘蔗愈伤组织培养物与 *A. brasiliense* 培育了约 18 个月，最近从这种联合的培养物再生出幼苗。这个材料广泛地被用来调查，以确定是否在再生植株组织中也存在着细菌。这些实验指出甘蔗愈伤组织和 *A20spirillum* 之间存在一定程度的亲和性。下一步工作是必须完成建立联合的特性。

本文希望主要讨论一些最新和重要的工作来充分证实在植物体细胞杂交和遗传控制中的植物原生质体和细胞培养技术的潜能。同有一些普遍乐观的观点相反，在重要作物的改良上利用这些技术，确实不会即将降临。充分认识这些新技术的潜能依赖于我们能克

服，面对禾谷类和豆类原生质体的培养和植株再生的一系列困难，以及克服分开性状的真正突变细胞系，它们可用作发展随原生质体融合后混合细胞群体的杂种细胞选择程序。

颜昌敬 摘译自《Plant Regulation and World
Agriculture》P63~84, 1980.

用原生质体融合获得一种新奇的植物
——拟南芸苔 (*Arabidobrassica*)
Gleba Y.Y 和 Hoffmann F.

一些实验已实现用融合体细胞原生质体方法进行植物杂交。也表明体细胞杂交产生的杂种不同于通常有性杂交产生的杂种。虽然，到目前为止企图获得远缘种间的有性杂种植株只得到有限的成功。除种间的马铃薯+蕃茄杂种外，仅从属内种间组合中获得完整的杂种植株。

前不久，我们分离出 *Arabidopsis thaliana*+*Brassica Campestris*。细胞学和生物化学分析确认这个细胞的杂种特性，在培养7个月期间发现存在两个种的染色体并在细胞中发挥作用。以后，我们证明某些细胞系容易诱导形成根。现在我们报道从这些细胞再生成苗和开花植株。以及获得再生物杂种性质的证据。

材 料 和 方 法

用机械分开和培养单个原生质体融合产物获得了 *Arabidopsis thaliana*+*Brassica Campestris* 的杂种细胞系。为了形态学研究，我们用六个最特征化杂种细胞系 No 1, 2, 7, 10, 15 和 16，它们都是起源于单个原生质体融合产物。细胞系起始 1977 年 7 月 14 日。根据细胞学分析，系 1, 2, 7 和 16 开始于

8倍体 *Arabidopsis* 细胞 ($X=5$) 与二倍体 *Brassica* 细胞 ($X=10$) 的融合产物, 在头 4~5 个月培养期内, 几乎全部由含 60 个染色体的细胞组成, 然而经 15 个月长期培养染色体数目通常变成 65~75, 虽然偶然中期板带有 60 个染色体。另外, 细胞系 10 和 5 起源于一个 10 倍体 *Arabidopsis* 细胞与一个三倍体或 2 个二倍体 *Brassica* 细胞的融合产物, 至少在培养初期, 细胞含有 80 个染色体, 通常染色体数目后来变成 65~85 个。在所有细胞系中, 观察到恢复的双收缩的染色体类型, 这件事被看成是杂交的结果。

在培养 6~15 个月期间, 对杂种细胞系 1、2、7、10、15 和 16 进行了同功酶和染色体分析, 证明其中 4 个细胞系 (1、2、10、16) 保留全部标记染色体和全部酯酶同功酶, 系 7 逐步失去一条酯酶 *Brassica* 酶带, 但保留全部标记染色体, 而系 15 在 15 个月, 几乎全部都失去酯酶同功酶的 *Brassica* 带和长的 *Brassica* 型特殊染色体。在形态学研究期间, 即 7~10 个月, 这些系的染色体排除过程才明显地开始。

在未器官化生长的时期内, 细胞生长在固体 B, 培养基上, 但改成含有 $1\text{mg}/\text{l}$ 2,4-D, $0.2\text{mg}/\text{l}$ 6-BA 和 $0.2\text{mg}/\text{l}$ NAA。用葡萄糖不如用蔗糖。培养物保持在 28°C 光 (1000Lux , 每天 16 小时)。在杂种细胞系分开后 7 个月开始形态发生实验。转移到不同成份的固体培养基上诱导细胞分生生长, 多用高激素/生长素比。其他条件是 26°C 每天 16 小时光照 ($3-6,000\text{Lux}$)。

染色体和酯酶同功酶分析如同以前所讨论的一样。用带有扫描接头的 Zeiss PMQ III 分光光度计得到凝胶密度图谱。用扫描电镜检查, 再生植株的叶表面结构。

结 果

在含 $1.5\text{mg}/\text{l}$ 6-BA 的 Gramborg 等 (1968) 培养基上成功地使试验的 6 个系中的两个系诱导形成苗。以前在同样培养基上对诱导这些细胞系形成根是有效的。然而苗的形态发生十分困难。

直到现在，总共只看到5个单独的苗再生，其中细胞系1再生出2个，15个系再生出3个，然而每个细胞系导致上百个植株。我们努力诱导其他四个系形成苗，但至今尚未成功。

自产生苗以来，一部分在上述培养基，另一部分苗在无激素B，培养基上无性繁殖。现在在无菌条件下培植有成千株苗和开花植株。由于从两个不同细胞系（1和15）再生的植株，它们在形态、染色体成份和酯酶同工酶上都显著不同。我们将分别讨论它们。

从杂种细胞系1获得的两个再生系1-1和1-2植株，在形态上介于Brassica和Arabidopsis之间。叶多半具有叶柄，厚而宽，园形或有缺刻，无茸毛（双亲有毛状体）。多数植株由于有花青素的叶（Arabidopsis遗传特性）而呈红色。其余植株呈绿色（虽然，用作一个亲本的Arabidopsis细胞系，是来自隐性基因组突变的白苗纯合子）。从杂种细胞系1再生的全部植株是很一致的，且形态正常，但至今仅少数几个长出根，没有一个开花。

用系1-1再生植株的幼根尖进行染色体分析，在所有分裂中期都存在着长的（Brassica型）和短的（次中Arabidopsis型）染色体。相反，我们未能确实鉴定，以前在早期发现双收缩染色体的任何重组。染色体数目在55-60之间，然而变化是由于统计上的误差。虽然，在进行再生研究时，培养7个月以后，杂种细胞系1的大多数细胞有65-75个染色体，但大部分细胞仍然为60个染色体；因此，在再生以前未必发生染色体排除。

植株1-1和1-2和从这些植株获得的第一次愈伤组织的酯酶同工酶分析表明，在所有情况下，皆存在Arabidopsis-和Brassica-的特定带。看到起始杂种细胞系1和再生植株及其产生的二次愈伤组织的同工酶谱之间没有可再现性的差异。

细胞系15（再生系15-1 15-2和15-3）的再生物同细胞系1的再生物相反，在形态上是极其不同的。系15-2和15-3未长苗，而至今仅看到十分不正常的类似芽和类似叶的结构。这些畸形物从未变得充分正常，在达到发育的某一时期后，趋向变褐和死亡。不可能从这种材料进行细胞学分析。酯酶同工酶分析表明仅存在Arabidopsis特异酶带。和系15-2和15-3相反，

系15-1有时产生完全正常形态的苗。就大小和全部形态学来说，这些苗更类似于 *Arabidopsis* 亲本。在1978年7月15日看到了这个系的第一个开花小苗。然而至今，这些植株未大量开花，也没有一株形成了根。大多数植株的叶上密复着茸毛。由于在 *Cruciferae* 解剖学中广泛地采用毛状体分析，我们比较了杂种和亲本的毛状体结构。*Arabidopsis* 叶的毛状体有三个分支，而 *Brassica campestris* 叶不分支。杂种植物叶通常复盖着不同茸毛，茸毛具有1、2、3 和有时甚至有4个分支，图4-C（略）中是看到的一般结构。多数植株的茸毛超过二个分支。少数植株无论是仅有单一 *Brassica* 型茸毛，或是主要是带有3个分支的 *Arabidopsis* 型茸毛。杂种植物毛状体的精细结构，甚至没有不分支的 *Brassica* 型毛状体，更类似于 *Arabidopsis*。

花的形态学也很不相同。大部分植株有重瓣畸形类型，单个的或几个类群；在某些情况下，看到了12个小花的类群。在所有情况下，花大小同 *Arabidopsis* 亲本的花大小。大的重瓣花通常完全是非功能性的，然而有时看到部分地改变成雌蕊和子房的变叶病。另外，发现小的形态上完全的花呈 $(2+2)+4+(2+4)+2$ 的经典公式。这些极端型之间，存在着所有可能中间形式；例如，无雄蕊的花，（最频繁的是外部围绕着较小的退化雄蕊），但另一方面，在形态上正常，或无花瓣的花，花的花瓣和雄蕊都转变成类似叶的结构。还研究了这些不同型的花的某些解剖学。在某些情况下，观察证实开始小孢子发生；然而，雌蕊和子房完全无用。在其他花中，发现了接近完善的雌蕊和带子房的胎座，但花药不产生花粉。*Arabidopsis* 花呈白色，*Brassica* 花有黄色雄蕊。发现杂种花优势的纯白色，但也发现呈淡黄色和扇形的黄色类型。

系15-1植株的染色体统计（用花原基作材料）同愈伤组织系15的染色体数目相比，大大地减少了。大多数植株为30-45个染色体，同一植株内，在数目上有变化。染色体减少证明存在着染色体排除/聚集，它作为形态发生的一个步骤。绝大多数染色体很小，并能当作 *Arabidopsis* 型，然而在多数情况下，至少也存在有1-2个长的 *Brassica* 型染色（但决无b1）。在少数情