

国外单倍体育种

上海市农业科学院
上海师范大学

上海科学技术情报研究所

国外单倍体育种

上海市农业科学院
上海师范大学

*

上海科学技术情报研究所出版

新华书店上海发行所发行

上海商务印刷厂印刷

*

开本: 787×1092 1/16 印张: 4 字数: 102,000

1974年6月第1版 1974年6月第1次印刷

印数: 1—8,700

代号: 151634·188 定价: 0.50 元

(只限国内发行)

目 录

花药培养的进展	1
人工培养的愈伤组织的早期发育	10
烟草愈伤组织在单独再培养时期器官形成能力的逐步变化	22
烟草 (<i>Nicotiana tabacum</i>) 花粉粒的胚状体的形成	25
从烟草叶的原生质体获得开花的单倍体植物	39
花药起源的烟草单倍体叶组织的二倍体重建	42
单倍体番茄的发育与分化	46
护理培养在番茄单倍体无性繁殖系发育中的应用	51
茄科蔬菜的花药培养	54
十字花科蔬菜的花药培养	58
黄瓜的花药培养	63
玉米的花药培养	65

花 药 培 养 的 进 展

提 要

通过离体花药的无菌培养,从花粉粒长成植株或愈伤组织,在被子植物中已获成功。不同植物的生长诱导对营养和激素的要求是各不相同的。在诱导过程中,花药及植株的年龄都是重要的参数。这一过程对光照没有依赖性而对温度却敏感。这也许因诱导涉及花粉营养细胞内控制 DNA 复制的调节机制的转换。能育的纯合单倍体可用下列两种方法来培植:(1)以秋水仙素处理花粉植株,(2)用从染色体已加倍的花粉愈伤组织获得的植株繁殖。

引 言

本文所阐述的花药培养,只局限于从花粉产生植株的技术。这些植株由于都是来源于配子体,因此染色体数,只具有正常的一半,故称为单倍体。过去单倍体被子植物在许多方面得到应用,特别是用于完成纯合化和解释系统发育途径方面,但却因没有一个产生单倍体的有效方法而使应用受到限制。花药培养是一个卓有成效的方法,已成功地应用于不少植物,从而引起了育种家的注意。

单倍体生长的诱导

花药是由单倍体和二倍体细胞组成的,而后者在数量上要多得多。除花粉外,药壁组织、花丝切端以及药隔都可能导致细胞生长,问题是如何单独诱导花粉细胞生长。在多数情况下,合理地使用植物生长调节剂是可以作到的。例如 Guha 和 Maheshwari 应用曼陀罗为材料进行花药培养,把激动素(6-咪唑氨基嘌呤)加在适量营养物(GM 成分,见附录 1)上,成功的单独诱导了花粉细胞的生长。此外,在激动素里含有生长素 IAA,则使生长从花粉转到花药的二倍体区,导致药隔组织强烈地形成愈伤组织。酵母提取物、酪朊水解物或酵母提取物加上其它生长素 2, 4-D 也可从药隔组织诱导愈伤组织。

生长素在对其它物种花粉细胞生长的诱导上也是有效的。普通甘兰及其杂种(*Brassica oleracea* × *B. alboglabra*)的花药对激动素和 2, 4-D 与 KH 营养物(见附录 1)的混合物有反应,而对水稻来说,在 MS 培养基中(附录 1)加上 2, 4-D 或 NAA 时其花药才产生有益反应。

天然物质也能单独地诱导花粉细胞生长,如椰子乳汁对曼陀罗和甘蓝;梅子果汁对曼陀罗、对曼陀罗属和芸苔属来说,这些天然产物比合成诱导剂更为有效。

对烟草和烟草属的一些种是例外,诱导时不需外加激素。起初,在培养基中也曾包括天然产物和较复杂的用以生长的成分,但随着技术的改进,以及对诱导过程中花药发育期的重要性的更多的了解,用以生长的成分就逐步地简化了,现在看来蔗糖是培养基的唯一成分。

生长素、细胞分裂素、赤霉素、离层酸、嘌呤和嘧啶碱并不能增加诱导花药成功的比例,而且这些化合物中有些在高浓度时还有抑制作用。L-精氨酸、L-天门冬酰胺、L-谷酰胺在某些浓度下有刺激作用。

表1列出了成功地应用了这一技术的物种名录,一些物种,特别是稻属和芸苔属,培养条件可促使花粉愈伤组织的形成,并随之从愈伤组织再生成植株。而在烟草属和曼陀罗属中,最初产物是多细胞的花粉粒或胚状体,并直接发育成植株。为什么这二个属对诱导和胚状体的形成如此驯服尚不得而知。这二个属都很自然地形成单倍体,为此,它们在过去的单倍体研究中常占有突出的地位。曼陀罗属除了是成功地应用于花药培养的第一个属之外,也是描述单倍体现象的第一个属。

表1 花药培养获得成功的物种

A. 从花粉直接形成植株

物 种	营 养 成 分	生 长 素
毛曼陀罗, 曼陀罗	GM	CM 15~30% V/V 或 K 10^{-6} M
花烟草, 粘毛烟草 4n, 黄花烟草, <i>N. sylvestris</i>	H	—
烟草“辉黄”	Hildebrandt 接 Linsmaien 和 Skoog	K 4.0 + IAA 2.0 mg/l
烟草“考罗等双×”、“哥罗”、“依乃辛”、大型“马里兰”、“红花”、“红色×考罗”、“红色×黄色”、“威斯康辛 38”	H	—
烟草“山姆森”	H	—
烟草“白贝莱”	H	—
烟草“爪哇”、“黄色×山姆森”、“黄色×爪哇”	H	—
水稻印度亚种	Blaydes	YE 1 g/l + CM 15% + K 1.0 + IAA 2.0 + 2, 4-D 2.0 mg/l

B. 从愈伤组织再生植株

物 种	营 养 成 分	生 长 素
甘兰“111 崎甘兰”、“野崎甘兰”, 甘兰“叶深”×芥兰	KH 使再生 KH-YE	CM 10% V/V 或 K 1.6 + 2, 4-D 1.0 mg/l CM 10% V/V 或 K 1.0 + NAA 0.5-1.0 mg/l
多花黑麦草 × <i>Festuca arundinaceae</i>		同稻属
水稻及水稻日本亚种 × 水稻印度亚种	MS 使再生用 MS	NAA 5×10^{-6} M 或 2, 4-D $1-5 \times 10^{-6}$ M K $1-2 \times 10^{-5}$ M + IAA 1×10^{-5} M

C. 初 报

物 种	营 养 成 分	生 长 素
花菜 茶 大麦 甘薯 番茄 粟 野生一粒小麦 野生二粒小麦		

CM=椰子乳汁, K=激动素, IAA=吲哚乙酸, NAA=萘乙酸, YE=酵母提取液(详见附录 1)

试验表明,上述诱导基质对许多别的物种的花药不易引起反应的。用这些培养基对石刁柏、黄花番红花、风信子杂种、克利夫兰烟草、粘毛烟草、粘毛烟草×克利夫兰烟草、绿色虎眼万年青、腋花矮牵牛、俄亥俄紫露草、郁金香属的 *Praestans*、郁金香杂种、海葱属的 *altissima* 和 *Veltheimia Viridiflora* 等物种作过试验,但无论在二倍体区或单倍体区都未见生长现象。每一物种对诱导都有其专一的要求,因此,通过探索,最终必能为每一物种找到正确的激素和营养成分组合。

有些物种是很麻烦的,因为其二倍体部分很容易形成愈伤组织。这些愈伤组织往往很快地将花药盖没,并使对花粉的观察模糊不清,如花椰菜、*Lilium*、*Amabile*、大卫百合、王百合、番茄、花烟草、*Nicotinra longsdorffii*、豌豆、牡丹的一个种(*Paeonia danrica*)、喜马牡丹、具苞紫露草和 *Tradescantia Palmdosa* 等。单倍体和二倍体愈伤组织同时发育是可能的,而且二倍体愈伤组织生长能超越单倍体愈伤组织,但是单倍体植株还有机会从这种混合组织中再生出来。实际上,作者曾在烟草属中观察到这种混合发育的情况,即整个药壁转向愈伤组织生长,并长出许多二倍体的根。于此同时,花粉则在愈伤组织团内形成胚状体,这些胚状体发育成幼株并最终从愈伤组织内长出来。

但在其它种中,如山德氏烟草,其药壁看来象停留于静止状态,并且有愈伤组织从花药内显露出来,好似源于花粉,但经检查表明只有二倍体分裂。这种情况就要求在把愈伤组织丢弃之前作仔细的研究,因为往往有可能在诱导期间或诱导后不久在愈伤组织培养中出现花药中细胞核有丝分裂。在山德氏烟草中,用高水平的生长素处理的早期培养物中曾见到多细胞花粉粒的形成;而高水平的生长素通常是有利于愈伤组织的形成,但就是在这个例子中,是否继续发育成愈伤组织尚未得到明确的证实。

药 龄 与 诱 导

若干研究者曾提出,诱导究竟发生在花粉发育的任何时期,还是只发生在一个时期。一般说来,有一个时期被发现是临界期,但其它不同时期,如四分体期、单核小孢子期、第一花粉有丝分裂期以及成熟花粉期等在这种或那种物种上都曾有引证。Nitsch 和 Nitsch 第一个指出在烟草中严格地培养具有游离小孢子状态的花药才能保证获得高的幼株产量;较年幼的相当于成熟分裂期的花药以及更老的含有淀粉粒的花药则都是无效的。后发现单核期对水稻属是最适宜的,对曼陀罗属也是如此。因此产生了这样一个概念,即在第一次花粉有丝分裂前的某个时期由于培养转移了花粉的正常发育进程。

在过去也许没有充分强调的一点是:烟草的淀粉积累只是在第一次有丝分裂之后才开始的,并且肯定不是在生殖和营养细胞分化完成之后。表2指出,烟草的花粉在第一次有丝分裂期是最敏感的。在游离小孢子开始期进行培养的花药,其孢子大部分发育正常,并产生典型的具有不均等的生殖细胞和营养细胞的花粉粒。只有在这个时候才开始形成胚状体。因此,诱导过程似乎与第一次有丝分裂后发生的变化有联系。诚然,在幼龄花药的培养中,有些小孢子进行反常的分裂,并产生具相等细胞的花粉粒,然后进入胚状体形成。但是,反常的有丝分裂并不局限于离体培养,在活体中由于不对称花粉分裂机制的失灵偶尔也会发生。因此,假设在离体情况下发生的反常有丝分裂并非诱导过程的结果,看来不是没有道理的。

表2 烟草“白贝莱”药令对花粉胚状体与幼株形成的影响

当花药达到标准时期,每天从10棵植株上采取花蕾。幼株于24~42天内出现。3个月后作培养失败记数。用H培养基,25±1℃,每天光照12小时,10,000勒克司。

时 期	A	B	C	D	E	F	G
单 核 初 期 (花瓣长10~12mm)	7	28	0	0	0	0	0
单 核 晚 期 (花瓣长13~15mm)	100	395	14.7*	12.4	27.1	578	9.9
有 丝 分 裂 期 (花瓣长16~18mm)	61	241	34.8	20.3	55.1	1207	14.3
有丝分裂后期,先于淀粉形成 (花瓣长19~24mm)	8	31	61.3	12.9	74.2	214	11.2

A—总花蕾数 B—总花药数 C—产生幼株的花药% D—产生败育胚状体的花药% E—C+D的总%

F—幼株总数 G—每一成功花药的幼株平均数 * 另有一花药只形成愈伤组织

在芸苔属与羊茅属、黑麦属的杂种中,生长的诱导到目前只在成熟花药上获得。因此,这些发现证实了上述解释。但芸苔属与烟草属不同之处在于其花粉在整个成熟期内都可感受诱导。其不同之处还在于花粉在三核状态时散布。因此看来,这些物种在第二次有丝分裂发生后诱导还能继续进行。在烟草属中,离体培养的花粉粒确有第二次有丝分裂发生,但由于淀粉的沉积,一般都长大并从外壁破裂而产生由内壁包裹的巨型体。这些巨型体不形成胚状体。对芸苔属研究的另一个特征是诱导时的生长素需求情况随花粉粒的成熟而改变,并且要逐步提高其浓度以保证花粉愈伤组织的形成。目前,在成熟烟草花药还未看到这种情况。

株 龄 和 诱 导

最近对烟草的实验表明,植株年龄也是诱导作用的重要参数。在近开花始期产生的花药比那些接近终花期产生的花药有更大的诱导率。在花期的开始阶段,诱导率有所增长,约在开花的第一周达到高峰。之后,随株龄增长而下降。每个花药产生的幼株数也随株龄的增大而显著减低(表3)。这种现象也许与花粉育性的下降有关。从同一原种起源并在相同条件下生长的植株对培养程序的反应也有很大的差异(表4)。

表3 烟草“白贝莱”株令对花粉胚状体与幼株形成的影响(资料来自表2的实验)

日 数	A*	B	C	D	E	F	G
1~2	16(5)	63	28.6	14.3	42.9	322	17.9
3	15(2)	60	50.0	16.7	66.7	464	15.5
6	21(0)	83	51.8	20.5	72.3	637	14.8
7~9	22(6)	86	25.6	18.6	44.2	237	10.8
10	26(13)	103	14.6	6.8	21.4	159	10.6
13~14	21(7)	83	14.5	14.5	29.0	120	10.0
16~17	25(16)	100	8.0	9.0	17.0	34	4.3
20~22	19(4)	76	14.5	21.1	35.6	24	2.2
23~31	11(7)	41	4.9	12.2	17.1	2	1.0

* 符号同表2,括弧内系完全失败的花蕾数。

表 4 表 2 实验中应用的 10 株中最好和最坏植株的累计资料

株 植	A*	B	C	D	E	F	G
最 好	16(4)	63	38.1	17.5	55.6	248	10.3
最 坏	17(13)	65	4.6	4.6	9.2	29	9.7

* 符号同表 2, 括弧内系完全失败的花蕾数。

诱导过程中的光与温度

诱导过程对温度是高度敏感的。所有成功的物种, 都是在 23~28°C 的温度进行培养的。在 15°C 下培养的烟草, 花药只产生较少的胚状体, 且大多数在早期就停止生长 (表 5)。最适的诱导温度是在 25°C 左右。昼夜温度的交替并没有利。

表 5 温度对烟草“白贝莱”花粉胚状体与幼株形成的影响

采用 H 培养基, 以 10,000 勒克司, 每天 12 小时光照。花药为晚单核期和有丝分裂期。在 15°C 的一组中只有一个花药获得幼株, 这些幼株在转移至 25°C 后 14 天出现。实验记录于 77 天后进行。

温 度	A*	B	C	D	E	F	G
15°C 42 天转到 25°C 35 天	10	39	2.5	23.0	25.5	17	17.0
25°C 77 天	10	40	37.5	42.5	80.0	170+	C. 11.3

* 符号同表 2

诱导过程不依赖于光 (表 6)。黑暗中生长的烟草, 其胚状体形成和发育以及幼株的出现同经光照培养的对照一样多。但黑暗中生长的幼株是黄化的, 进一步发育则需要光照。幼株产生率在光照培养下稍高些。

表 6 烟草“白贝莱”花药在 25±0.5°C 时光照与黑暗培养试验

用 H 培养基, 以 2500 勒克司, 每天光照 12 小时。将黑暗中的培养物于 37 天后转移至光照下, 转移后有二个花药产生幼株。花药是晚单核期与有丝分裂期。实验记录于 76 天后进行。

	A*	B	C	D	E	F	G
黑 暗	10	40	32.5	10.0	42.5	71+	C. 5.4
光 照	10	40	37.5	35.0	72.5	132+	C. 8.8

* 符号同表 2

诱 导 的 机 制

在活体中, 继第一次花粉有丝分裂的时期, 是一个强烈的合成活动期。在正常的静止的营养细胞中, 因接受了细胞分裂时的大部分细胞质, 蛋白质和 RNA 合成迅速发生, 细胞从而增大, 先前花粉液泡所占的空间被填充, 细胞核也增大了, 但其 DNA 含量仍停留于 1c

水平。另一方面,产生雄配子的生殖核,在细胞分裂时被破开并只带有小部分细胞质,这个细胞核几乎立即进行 DNA 复制,并进入前期,准备第二次花粉有丝分裂,这一时期在烟草中可保持至萌发后。因此,生殖核的 DNA 含量是处在 2c 水平。在这些细胞中,即使有蛋白质或 RNA 合成的话也是很少量的。所以,花粉粒分化时,在一些细胞中 DNA 合成机构停止,而 DNA:RNA 的转录则仍在进行着。在另一些细胞中,转录工作则被抑制,但并不影响 DNA 合成机构。

在培养中,营养细胞进行分裂并产生胚状体,而生殖细胞大部分则停留于静止状态。营养细胞在第一次花粉有丝分裂后 6 天或稍多的时间内开始分裂,而且在这期间细胞的染色特性发生显著变化。这些变化在 DNA 复制开始并激发起有丝分裂时达到顶点,在这以后,建立起一个正规的细胞分裂周期,新细胞在以平均世代不到二天的时间形成。很明显,诱导机制是复杂的,可能牵连到转录的改变和 DNA 合成的控制系统。

诱导过程的一个有趣的方面是生殖细胞也可分裂,但很少超过一次,子一代细胞与亲代的特征相似,细胞小,带有高度浓缩的核,核的四周包有一层稀疏的细胞质。显然,细胞质合成是稀少的。事实证明,培养过程可以暂时克服使生殖核正常地保持在前期的障碍,而对这一细胞中 RNA 转录的抑制无影响。

Sauter 观察了芍药属中双细胞花粉粒的组蛋白成分,并发现富含 DNA 束缚的赖氨酸组蛋白(被一些人认为在调节基因中是活跃的)的确是以一种转录抑制的形式存在于生殖核内;而高度浓缩的核可以被碱性快绿深深地染色。子代生殖核保持高度浓缩状态表示组蛋白处于活性状态,可能是由于这一原因,生殖细胞才保持静止。另一方面,在扩散的营养核中,碱性快绿染色不多,而这可以被解释为, DNA 束缚的组蛋白不存在,或者它们以结构改变或无活性形式存在,以允许 RNA 转化。

尚待了解的是,在烟草属中所观察到的诱导的细节是否在所有的物种内,尤其是在首先形成愈伤组织的那些物种内都一样,间接证明是一样的。例如在烟草中,包含生长素的培养基所诱导的愈伤组织的形成,总是先由营养细胞形成正常的胚状体,而只有在花药开裂前或开裂后才转向愈伤组织的形成。在稻属也是如此,多细胞花粉粒的形成先于愈伤组织的形成。实际上,在培养的早期使花药免受激素的影响,可避免形成愈伤组织。

目前,由于花药间的反应缺乏一致性,诱导机制的研究受到阻碍。在烟草属中,同一花蕾的五个花药都形成胚状体也是相对罕见的。在花药之间形成胚状体的花粉粒比例是不一致的,一般说来,花粉粒的反应变动于 0.5% 以下到 5% 左右之间,但也曾观察到高达 25% 的数值。这一领域的未来发展必须集中于改善培养技术和探索一个花药内花粉粒间习性差异的原因。

诱导后的生长和发育

正如已指出的,诱导后的生长,根据所用培养基的成分可导致形成幼株或愈伤组织。在前一种情况下,多细胞的花粉粒通过类似发育的合子胚阶段而转变成幼株。花粉壁破裂后,细胞释放出来的物质迅速长成球状结构,至少在外观上象一个典型的球状胚。这些结构随后失去其轴的对称性,并通过“心脏期”“鱼雷期”与子叶期而发育成幼株。当胚状体伸长并开始形成子叶节、根和枝分生组织时,花药沿药沟开裂,于是不同发育期的胚状体显现出来。

药壁或退化的营养层组织对胚状体发育的作用尚未明了。曾有过一些关于胚状体发育成一个连于药壁上的胚柄状物的报导,这也许就是二倍体组织的营养作用的标志。然而整个胚状体一般看来好象在整个发育阶段都游离于花粉囊内。

可以着重指出的是,花粉粒和接合子之间发育的相似性直到发育的后期才变得明显。而在这方面,情况与体细胞组织培养时的胚胎发生相同。花粉粒的开始分裂是否遵循受精后在胚囊中发生的同样严格的分割方式尚须进一步研究。有些研究者相信,花粉粒实际上首先发育成胚囊,在这点上,他们大概是受 Stow 工作的影响。多年前,Stow 指出在风信的花粉母细胞处于成熟分裂时,对其鳞茎进行处理可使它形成胚囊状结构。但这种象胚囊的结构,在烟草属的胚形成中尚未见到。例如当生殖细胞分裂时,位于花粉一端的子细胞可能象反足细胞,但是形成包含三个这种细胞的花粉粒是少有的。况且,营养细胞的早期分裂并不形成位于花粉粒相对极的“卵器”,而且没有细胞表现同合子一样的例证。所有的营养细胞的衍生物在形成胚状体中看来是活跃的。当细胞分裂在花粉粒中进行时,细胞体积显著减小,要多至 20~24 个细胞方可以把原先单个营养细胞所占有的空间填满。虽然,这个时期细胞之间可能有大小的差异,但在分裂方式上却没有明显的固定的程序,也没有明显的极性。

诱导后成功的生长决定于适宜的培养基。它必须含有重要的无机盐、维生素和能源(通常是蔗糖)。为烟草属花药的培养,Nitsch 曾把 Marashige 与 Skoog 设计的烟草属体细胞的培养基质加以改进,主要是提高了微量元素水平(成分 H,附录 1)。在这些微量元素中,铁对幼株的发育特别重要,故单独提出来(表 7),还原态铵离子也是重要的,光对这一阶段是有益的(见表 6)。生长素、细胞分裂素、赤霉素、离层酸、morphactins 及其它各种化合物对烟草诱导后对其发育的影响,Nitsch 已作过描述。

表 7 烟草“白贝莱”中铁对幼株发育的影响

H 培养基,光照 10,000 勒克司,每天 12 小时,28°C 白昼/22°C 晚间。花药为单核晚期或有丝分裂期,试验 76 天后开始记录。

铁的浓度	B	C	D	E	F	G	H*
全量	32	59.4	12.5	71.9	313	13.6	82.6
二分之一	27	55.6	25.9	81.5	181	8.2	68.2
四分之一	27	18.5	59.2	77.8	37	1.8	23.8

H* = 产生幼株成功花药的 % (C/E) × 100; 其它符号同表 2

Guha 和 Maheshwari 采用一种比较简单的培养基培养曼陀罗的花药,这种培养基由 Knop 无机盐的半含量加蔗糖和六种微量元素组成(见附录 1)。与椰乳汁混和时,这些营养成分仍可维持少量胚状体长成幼株。同一养分添加酵母提取液和一些维生素后,也可用于芸苔属花药的培养(KH 的成分,见附录 1)。现在已经很清楚的是 GM 养分对诱导后的有效生长是不适宜的*。例如,Braak 发现在曼陀罗属中,当花粉粒开始生长后,将花药从 GM 培养基转移至养分高的培养基(Nitsch H)时,可获得更高数量的幼株。但在烟草中,如将铁的含量提高到 H 培养基水平,则 GH 养分也可获得很高的幼株数量。

当诱导出来的是愈伤组织而不是幼株时,诱导后生长的问题大多数是有关再生的问题,

这在稻属和芸苔属中已被证实是简单的,而且只牵连到培养条件的微小变化。在这二个属中,2,4-D所诱导的愈伤组织不显示对形态发生的作用。在稻属中,用激动素和IAA的混合物代替2,4-D可刺激器官的形成,而在芸苔属中则可从NAA(非IAA)取代2,4-D,酵母提取液可略去。如果用NAA来诱导稻属愈伤组织,不改变培养基,最终也发生器官形成。而在芸苔属中,在椰子乳汁存在下诱导的愈伤组织,只要培养基中略去酵母提取物,则能刺激器官形成(见表1)。

二 倍 化

起源于花粉的烟草单倍体群体成熟时,染色体自然加倍的频率很低。秋水仙碱已被用来增加染色体加倍的频率。Tanalca和Nakata把含秋水仙碱的羊毛脂(0.4%)施于成熟单倍体烟草顶叶的叶腋上,通过不断地切除茎尖,诱导出侧枝,这些侧枝产生可育的二倍体花朵。被处理的植株,大约有2/3是成功的,并结了籽。这些植株中培育出来的幼苗在外形和生长上都是一致的。

尚待观察的是这种染色体加倍的方法是否能普遍地采用。秋水仙碱并不是一种已掌握的既有效又表现一致的简单化合物。故不仅在使用浓度和处理时间上,而且在使用方式、株龄和处理部位上及各物种对这一药剂的反应都是不同的。过去,秋水仙碱用于种子时,具有最好的效果,看来是由于有更好的机会同假定花序的分生组织细胞直接接触之故。因此,作者深信秋水仙碱或其它染色体加倍剂应在花粉生长的早期进行试验测定,最晚不能迟于花药开裂期。在此时期获得成功,将缩短加倍了染色体的植株的生殖时间,这对生长速度缓慢或发育时的营养生长阶段较长的物种(兰科,棕榈科与木本)是有利的。

由于秋水仙碱使用中带来的困难及可能产生的有害付作用,其他研究者则采用愈伤组织的手段获得可育的二倍体植株。这一方法是应用愈伤组织培养时细胞核有丝分裂必然产生染色体自然加倍的现象。如芸苔属和水稻属的研究者指出的,即从愈伤组织再生植株就行了。在芸苔属愈伤组织中包含单倍体、二倍体和非整倍体细胞,而再生过程产生的仅仅是单倍体植株。Nitsch与其同事应用各种细胞分裂素以加速普通烟草和树烟草(*N. sylvestris*)愈伤组织培养中多倍体细胞的积累。添入激动素的愈伤组织于4~6个月的继代培养后,再生时产生的仅有二倍体植株。但用二个苯脲(N-3-硝基苯-N-苯脲和N-3-氯苯基苯脲)取代在大约二个月内就有同样的效果。在烟草和树烟草这二个品种内曾获得许多可育二倍体。愈伤组织技术应用于水稻属上效果很好,目前已获得了一系列的包括二倍体、三倍体、四倍体和五倍体各系的植株。用此法得到的染色体加倍了的植株,需要对其异常现象作仔细的检查,对那些用秋水仙碱处理而得到的植株也是如此。因愈伤组织培养不仅易受到细胞核有丝分裂的影响,同时也受到其它染色体和遗传不测的影响。

结 论

对花粉粒能从发育的正常过程转到产生植株或愈伤组织的发现,为植物细胞生物学家揭示了许多新的问题。但是这一发现的真正意义还在于它的实际应用。由于在烟草属和稻属上所作的工作,使得目前具有足够的详细知识,来对其它重要的粮食作物和有经济价值的

作物进行大规模的检测。最近在小麦属、大麦属和羊茅属×黑麦属杂种的研究进展表明了对比技术的越来越广泛的应用。这一技术在作物育种中的主要长处在于能简易、迅速获得纯系。对雌雄异株的物种以及强制远系繁殖者是重要的。纯系可作为生产 F_1 杂种的亲本，而每个杂种又是遗传上一致的。所希望的杂交亲本必须通过无性繁殖来保持，在自交可亲和的物种中，二个植株的可取属性的组合不再需要自交数年来稳定，而双稳性可更迅速地获得。

花药培养还在别的领域中有潜力。单倍体细胞的分离在目前是一项可行的建议，而且它还可以成为走向基因突变和细胞质遗传研究的重要的一步，在单一基因组内的操作排除了二倍体状态下的许多复杂性。可能最迫切的问题是这些品系中细胞核有丝分裂的控制。在这一点上，材料的选择将是重要的。物种对细胞核有丝分裂的感受性如同一个属内不同品种那样是有着相当大的差异的。例如来自稻属某些品种的单倍体培养物，经继代培养三年以上而倍数水平无显著变化，从其它品种得来的愈伤组织则很快地全都变成多倍体。对于遗传学家，理想的试验测定系统需包括能进行单个花粉粒的平面培养。平面培养被子植物花粉虽经不懈的努力但仍未成功。某些裸子植物花粉用此法诱导了群落的生成。如有可能在无药壁存在的情况下诱导花粉生长也将有助上述问题的解决。因此，未来必将带来对花粉粒培养的更深入的研究，而最近的有关芸苔属成熟花粉粒可以在微型培养室诱导使之分裂的发现，显然是向前进了一步。

附 录 1

花药培养的营养成分

GM (毫克/公升): $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 500, KNO_3 125, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 125, KH_2PO_4 125, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 3.0, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, H_3BO_3 0.5, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.025, 柠檬酸铁 10, 蔗糖 2% W/V, 琼脂 1% W/V, pH 6.0。

KH (毫克/公升): GM 组成分, 硫胺素 0.25, 吡哆醇 0.25, 烟酸 1.25, 甘氨酸 7.5, 酵母浸出液 2500。

H (毫克/公升): KNO_3 950, NH_4NO_3 720, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 185, CaCl_2 166, KH_2PO_4 68, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 25, H_3BO_3 10, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27.9, 事先与 Na_2EDTA 37.5 混和, 肌醇 100, 烟酸 5, 甘氨酸 2, 盐酸吡哆醇 0.5, 盐醇硫胺素 0.5, 叶酸 0.5, 生物素 0.05, 蔗糖 2% W/V, 琼脂 0.8% W/V, pH 5.5。

MS (毫克/公升): KNO_3 1900, NH_4NO_3 1650, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 370, CaCl_2 440, KH_2PO_4 170, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 22.3, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.6, H_3BO_3 6.2, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.025, KI 0.83, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27.9 事先同 Na_2EDTA 37.5 混和, 肌醇 100, 盐酸硫胺素 0.1, 盐酸吡哆醇 0.5, 烟酸 0.5, 甘氨酸 2.0, 蔗糖 3% W/V, 琼脂 1.0% W/V, pH 5.5。

译自《Science Progress, 1971, 59, 236, 227~549》

人工培养的愈伤组织的早期发育

引 言

虽然绝大多数的文献报告,都是关于双子叶植物方面的研究工作。然而事实上,愈伤组织在整个植物界中都能产生。只是单子叶植物中形成愈伤组织的报道为数不多罢了。从孢子植物,裸子植物的配子体,地钱,地衣配子体和凤尾草叶状体中产生愈伤组织也已有过描述。由于愈伤组织早期发育的多数研究工作都是用双子叶植物做的,因此重点就放在这些材料方面。不管它们的来源如何,愈伤组织在创始和发育过程中都包含有强烈地细胞分裂,因此,本评论将以这个过程作为中心内容加以讨论。

愈伤组织的起原

在自然界中,当植物受到机械损伤以及微生物或昆虫的侵害以后,一般都随即形成愈伤组织。在园艺实践方面,扦插生根以前,几乎必先有愈伤组织的形成。然而在完整植株上形成愈伤组织则是相当少见的现象。同时,由于一般植物多不是无菌的,很难对它进行操作和研究,因此,大多都是从经过消毒的完整植物上切取断片来进行研究。

促进植物断片形成愈伤组织的通常技术,是把殖体(explant)放在含有刺激剂的培养基上培养。切割以后加以培养,可以促进殖体某一特别组织的生长。除了一些较通常的组织如维管形成层和贮藏薄壁细胞以外,根部中柱鞘,胚乳,子叶,叶肉,以及维管束原等组织都能产生愈伤组织。

如果殖体仅由同一类型的细胞组成,所产生的愈伤组织发育也很一致。因此,某些研究工作者曾尽了很大努力,希望能够得到高度一致的断片组织,作为原始研究材料。结果发现,胡萝卜根的次生韧皮薄壁组织和朝鲜蓟块茎的贮藏薄壁组织,都能产生高度一致的愈伤组织。如果殖体是异质的,如一片茎、根或叶,则愈伤组织常常是由很多不同类型的细胞分裂产物所组成。White 从成熟云杉树上取得只含木质部形成层和韧皮部的殖体,发现愈伤组织首先是从形成层发生,然后是韧皮薄壁组织,最后从临近树脂道的细胞形成。这样就很快地产生一个异质性的愈伤组织。有的时候,某些材料在组织上虽然表现一致,但是却由一些具有不同倍性的细胞所组成。Patau 等从烟草髓部切取组织上表现一致的殖体,发现其中 DNA 状态不同,有些组织反映多倍体情况。Torrey 指出,从豌豆根衍生的愈伤组织是由含有不同倍性的细胞所组成。通过调整培养基的组成成分,可能促进某一倍性细胞的增殖,妨碍其它倍性细胞的繁衍。此后,很多研究工作者证实并扩展了这一工作,他们利用不同生长调节剂进行细胞的营养选择试验,发现培养基中的不同组成成分可以刺激不同类型细胞的增殖,从而决定愈伤组织的最终组成。当然,最后可能通过仔细选择培养基的成分,从复杂的异质性组织中选择到某些特殊的细胞群。

诱 导 生 长

一、外加生长因素的作用

在愈伤组织发育方面,已经有了很多详细的文章和评论,这篇评论是对于化学诱导愈伤生长的基本想法和最新发展情况的简短复述。

就愈伤特性来说,离体组织可以分成四组。每组都需要一个碳源,通常是糖和混合矿物质。除此以外,属于第一组的组织如朝鲜蓟块茎的贮藏薄壁组织只需要生长素或有关生长调节剂。第二组,包括烟草髓在内,既需要一种生长素,又需要一种激动素。而第三组则不需要这些附加物。第四组,和第三组相似,是个种类很少的小组,包括萝卜根木质薄壁组织,只需要激动素以诱导愈伤组织的形成。愈伤组织形成的能力,将根据切割时该组织的生理状态而定。同时,不同组织对植物生长调节剂诱导愈伤组织形成的需要情况也不相同。因此,愈伤组织的形成,决定于组织内部和外加于培养基中的生长物质的相互作用而定。

必须注意,由于植物内部季节活动的关系,任何同一组织可能表现不同的反应,因此,仅仅根据一年中某一时期的试验结果就作出结论是不确切的。

二、发育中愈伤组织内部的分区

离体组织的愈伤培养,具有这样一个特点,即细胞分裂并不是在所有的组织里都进行,而是局限于周皮层。离体组织外层细胞的分裂与很多因素有关,如切割面的损伤反应,氧气的利用较多,二氧化碳的放出较快,营养料的利用较好,挥发性抑制物质逸出较快以及光线的影响等。

1. 损伤反应的重要性

在发生某些损伤以后,往往就形成愈伤组织。创伤会不可避免地产生一种损伤反应。Haberlandt 曾重视这种现象。以后 Ellengorn 就损伤对愈伤组织发育的作用方面进行了研究。最近在这方面做工作较多的有 Fosket 和 Roberts 以及 Yeoman 等人。

Fosket 和 Roberts 在胡萝卜损伤反应对愈伤组织形成的作用方面,做过很详细的研究。他们在一系列诱导细胞分裂的培养基上(不加 2, 4-D 和椰子汁)培养圆柱状胡萝卜殖体(10×4 mm),发现分裂量很少。在各种组合条件下培养了三天的一段殖体上,可以分辨出下列四个部分:(1)最外层破裂层(2)二层休眠细胞(3)分裂区,通常约 1~6 层,厚度常有差异(4)细胞不进行分裂的中心区。应用组织化学方法的研究指出, NAD 黄递酶、琥珀酸脱氢酶、细胞色素氧化酶的活性与正在培养着的殖体的损伤反应以及愈伤组织的形成具有密切关系。在培养三天后的分裂细胞层中,这些酶的活性是很高的,但培养时间较长以后,它们的活性与细胞分裂的数量密切相关。酸性磷酸酶的活性与所有殖体的分裂层都有关系,但是对于它与早期愈伤组织形成的关系没有说明。Robertson 和 Yeoman 等把从朝鲜蓟的休眠块茎中分离出来的较小圆柱体(2.4×2.0 mm)培养在含有 2, 4-D 和椰子汁的培养基上进行研究,也能分辨出与以前相似的分层现象。在这个研究中, Fosket 和 Robert 所发现的四个分区,很快地就可以分辨出来,但有一个很重要的区别,那就是在表面层并未分裂的细胞中所含酸性磷酸化酶的活性很强烈。这一发现使 Yeoman 等得以建立一种假说:至少在朝鲜蓟方面,较高的酸性磷酸化酶的活性(一种细胞自溶作用的指标)和细胞分裂具有一定关系。他们认为,外层受了伤但未破裂的细胞,其自溶作用的产物,供给一种物质,

外加物质相互作用,导致下层细胞进行分裂。加了朝鲜蓟块茎组织的自溶产物以后,增加了第一次分裂波细胞分裂数的比例,支持了这一假说。

2. 气体交换

虽然氧气对组织表面分裂区域的发育具有一定的重要性,但是中心组织分裂的受到限制,并不是由于缺乏氧气的结果。Yeoman 等在培养着的朝鲜蓟块茎殖体附近,把氧气压力从 20% 增加到 50%,对参加愈伤组织发育早期第一次细胞分裂的比例并没有改变。他也获得有力证据,反对挥发性气体抑制的说法,不管这种气体是 CO_2 或其它物质。关于这一课题的详细论述,请参考 Yeoman 等 1968 年的报告。

3. 光线的影响

光线是影响愈伤组织发育期中分裂细胞分布的另一个复杂因素。组织培养的正规操作法是在日光或人工光照条件下切割,而在暗中或照明条件下加以培养。假如在光照条件下切割朝鲜蓟殖体,而在黑暗中加以培养的话,约有 35~45% 的细胞系在第一次分裂波中进行分裂。如果在低强度的绿光下切割组织,而在绝对黑暗条件下加以培养的话,则有 60~75% 的细胞是在第一次分裂波时进行分裂。从这些观察可知,光线对殖体中细胞分裂的比例,具有抑制作用。Davidson 的最近工作指出,黑暗处理后所增裂的细胞,不是处在不活跃的中心区,而是一般地分布于分裂区内(见图 1)。在第一次 9 或 10 小时的培养期间(直到 DNA 开始复制),用 18 ft 烛光处理 15~20 秒钟,就足够使分裂细胞的比例减半。殖体在 DNA 开始合成以后,对光线就不敏感。在剩余的培养期间,生长也只是受到些微刺激。光线虽然没有改变分裂区的深度,但对该区内分裂细胞的比例,开头似乎有些影响。

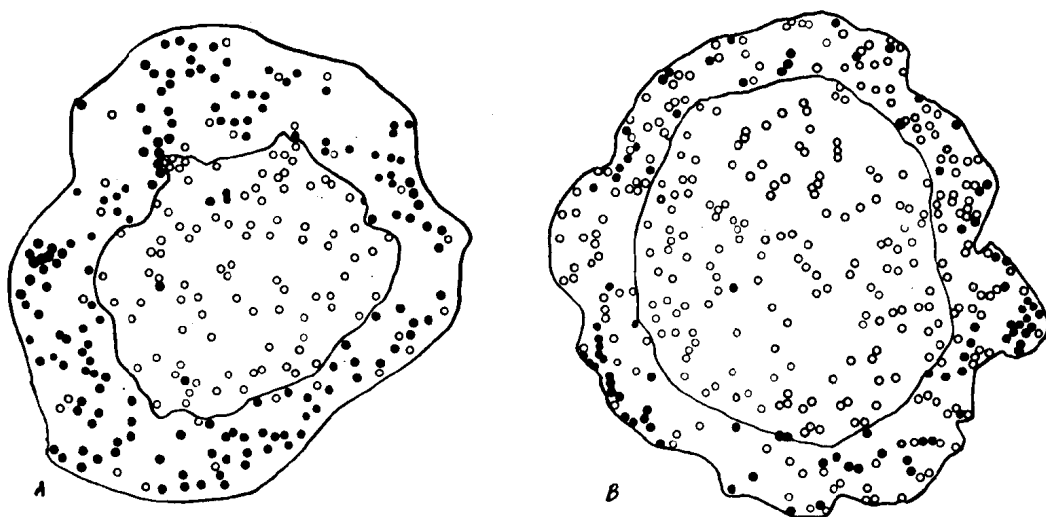


图 1 从朝鲜蓟块茎切割的圆柱形殖体的中段横切面,示 DNA 含量不同的核的分布情况。殖体在含有 10^{-6} M 2, 4-D 的培养基上培养; • 表示 4C 核; ○ 表示 2C 核。在 S 阶段的末期,正在分裂的细胞核。(A)殖体在低强度绿光下切割,置 25°C 黑暗中进行培养。(B)殖体在低强度绿光下切割,用 18-ft 烛光照射 1 小时,然后在 25°C 黑暗中进行培养。

生 长 型 式

殖体愈伤组织发育的过程可以分成三个时期。这三个时期的特点,可以从细胞平均大

小、比例的改变(图2)和组织的解剖方面(图3)看出来。首先有个迟后期,这时期的细胞大小,约略保持恒定,它从切割开始直到第一次细胞数目增加为止。一般地说,这一时期的长度,因所用组织的来源和生理状态而异。接着有个时期,它的特点是从组织最外层细胞出现分裂现象,细胞体积缩小。在这个时期中,愈伤组织的外围区逐渐恢复分生状态,结果形成一种逆行变化(Regressive change)的特殊型式。这一型式的显著特点是,在整个愈伤组织外围区先有了细胞分裂,而在中心区里的细胞则没有分裂。在一定时间之后,则决定于所用组织和培养基情况,组织或是进行分裂并保持相对不分化状态,或多半是以新的发育型式取代这种变化。这个新的发育型式的特点是,由于某些细胞的成熟和另一些细胞的膨大增进了细胞的分化。然而这种体积的增大,将由于那些继续分裂的薄壁细胞的较小体积而得到适当平衡。就是在这第三时期,出现了明显的组织结构,从此将进一步分化为可以识别的器官。这三个时期分别叫做迟后期,分裂期和分化期。由于细胞的分裂和分化作用在第二和第三期间一直在进行着,因此,所用描述名词并不十分确切,只是根据它们在发育过程中主要表现情况而加以命名而已。在整个分裂和分化期中,组织块的生长和分化的速率并不相同。迟后期的细胞体积较为一致。事实上,在这时期中的代谢变化也是比较强烈的。

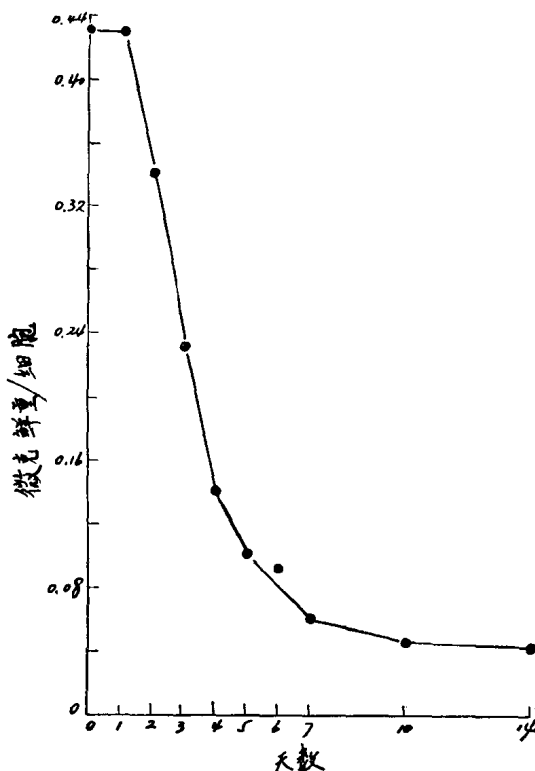


图2 朝鲜蓟人工培养的殖体在含有 $10^{-6}M$ 2, 4-D和20% V/V椰子汁的液体培养基上,置25°C的黑暗中,每个细胞平均鲜重的变化。

一、迟后期(活化期)

愈伤组织生长的诱导,伴随着组织代谢状态的变化。同时由静止细胞(或形成层细胞)转变成合成工作进行得很快的高度活跃单位。活跃过程的确切性质,目前还不清楚。但在细胞组织,离子关系,呼吸活动,蛋白质代谢,酶活性以及核酸代谢方面都具有深刻的变化。

关于这一活跃过程,从胡萝卜,马铃薯和朝鲜蓟的贮藏器官的组织方面,已经积累了不少资料。除此以外,在有利于细胞膨大而限制细胞分裂的情况下,各种贮藏器官对生长调节剂的反应的大量研究工作也在进行着。理解到生长素诱导的细胞膨大,对愈伤组织早期发育的研究并不直接关联,大量资料都把细胞分裂放在最重要的地位加以考虑。对了解活化过程极为重要的某些发现将尽量包括在内。

1. 迟后期的长度

迟后期(活化期)在细胞开始分裂以后即告终止。这一时期的长短由一系列的内部和外部因素而定。有些离体组织如朝鲜蓟的迟后期不到一天,而另一些组织,如胡萝卜的迟后期则可延长到几天。即使从同一来源所得的组织,它的迟后期的长短,也将根据切割时细胞的

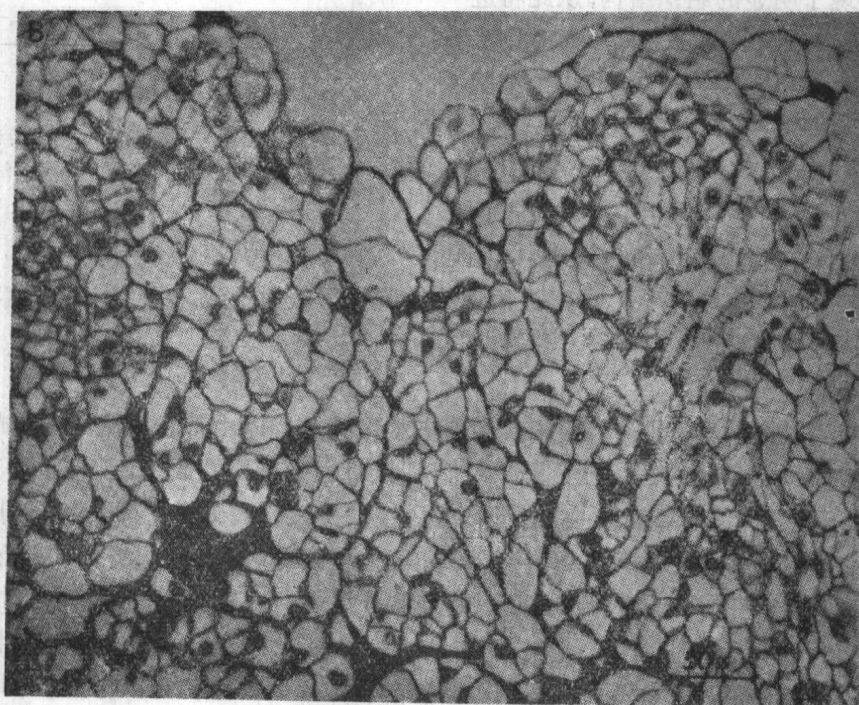
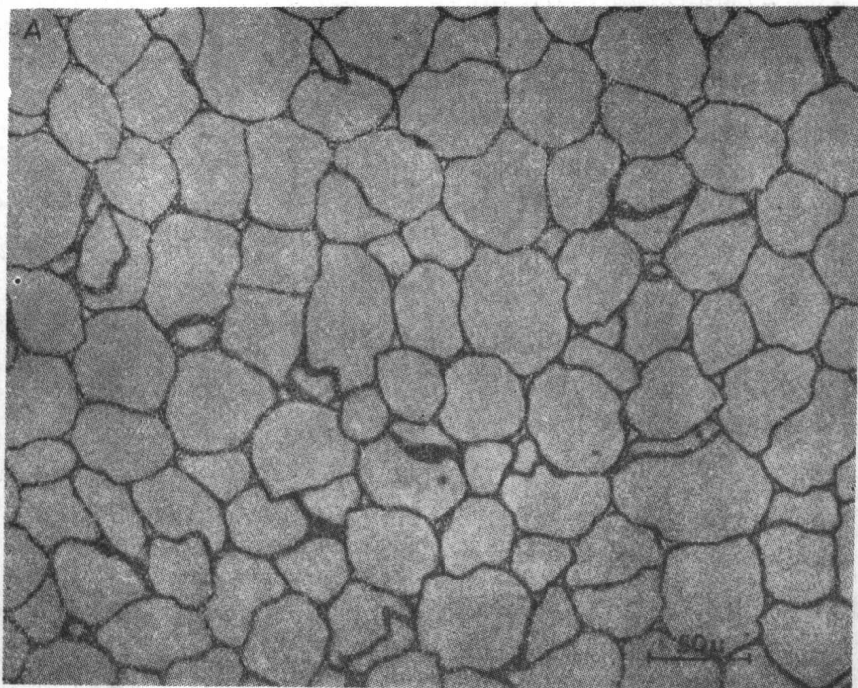


图3 从朝鲜蓟块茎中分离出来殖体纵切面的光学显微照相。(A)新鲜的组织切口显示出具有大液泡的薄壁细胞。(B)在含有 10^{-6} M 2, 4-D 和 20% V/V 椰子汁的琼脂培养基中培养 17 天的殖体外层。图 3(B) 和图 3(A) 比较, 可看到细胞大小明显缩小了。图 3(B) 的右面显示了管胞的分化情况(箭头指处)。