

细胞突变体筛选的研究与进展

尹 光 初

(黑龙江省农业科学院大豆所)

植物突变有自发突变和诱发突变两类。自发突变是自然发生的,一般频率很低;诱发突变是采用物理、化学因素诱发产生的。近三十年来,通过人工诱变在农作物品种改良方面取得了巨大的成就,突变育种作为一条育种途径而为世所公认。

五十年代末期,揭示植物细胞全能性的培养技术已经完成,使突变体的筛选与利用的工作可以从整体水平上转移到细胞水平上来进行,细胞突变体筛选的研究迅速发展起来。在细胞水平上进行突变体筛选,不仅可以大大提高选择效率,而且便于调控,同时不受季节的限制。一毫升培养物具有十万以上的个体,一个培养瓶的细胞就相当于大片土地上的植株;细胞的平均分裂周期不足一天,这就大大节省了时间和空间。七十年代初,Carlson, Binding, Heimer 等人分别在菸草和矮牵牛的培养细胞中筛选出营养缺陷型和几种抗性突变体,相继开展了各种细胞突变体的筛选研究。到七十年代末,至少在20种植物上筛选出60多种突变表现型。近几年来,在筛选技术和表型变异的传递规律方面都有较深入的研究。

一、细胞突变体的筛选系统

植物细胞和植物系统的突变体可分两大类:一类是可用选择系统回收的突变体;一类是不能用选择系统回收的自发突变体。这里只介绍第一类,即可以利用正选择系统和负选择系统回收的突变体。

正选择系统,是指在培养基中加入某种

对正常细胞有毒的化学物质,从而使正常细胞不能生长而突变体却可以生长的系统。这又可以分为两种:一种是一步选择系统,即只需通过一步选择,便可筛选出突变体;另一种是多步选择系统,即通过连续选择才能筛选出突变体。一步选择和多步选择相比,除了在选择速度、实验次数上不相同外,还有一些重要的差别。一步选择系统得到的突变体一般是单基因突变,如抗代谢物和抗抗菌素突变体都是用一步选择系统得到的单基因隐性突变。实验证明。多步选择系统对于那些生化背景不详但较为复杂的突变体的获得颇为有效,因此,可用于抗盐、抗低温和抗旱等突变体的筛选。多步选择得到的突变体,不是由于单基因的变化,而是由于多基因的变化,因此需要更多的步骤,使有关的各基因在所处的环境中逐步发挥功能。多步选择系统还可以增加特定基因的拷贝数,从而提高细胞中相应蛋白质的含量。虽然其中还有许多问题尚需研究,但因为在选择中只是提高了基因的表达水平,而没有破坏发育中的调控系统,这对于育种非常有用。基因拷贝数发生的机制可能是有丝分裂过程中发生的体细胞重组。

正选择系统存在的主要问题是,许多重要基因在细胞培养物中不表达,故很难筛选相应的突变体。如抗除草剂的突变体,许多除草剂只能杀死进行光合作用的细胞,而培养细胞的光合作用极微弱,无法区别突变体和非突变体。为了解决这个问题,可以用实验的方法对叶片造成正选择压力,然后切下组织

上可以区分的突变部位,进行培养,使之再生成植株,借此便可选出抗除莠剂的突变体。

负选择系统,例如 5-溴脱氧尿苷(Brd Urd)系统和高氯酸盐系统。Brd Urd 系统的原理是,合成 DNA 的细胞才能生长,不合成 DNA 的细胞不能生长。生长的细胞可将有毒的 Brd Urd 掺入到其 DNA 中,因而死亡,不生长的细胞无此能力,故存活下来。此系统已用于营养缺陷型和温度敏感型突变体的选择。高氯酸负选择系统的基础是:硝酸还原酶含量高的植物细胞,能在硝酸盐作为氮源的培养基上迅速生长;不含或含量很低的细胞,不生长或生长很慢。高氯酸盐本身并没有毒,但它与硝酸还原酶结合并被催化而形成次氯酸盐则是一种非常有毒的物质。所以,不生长的细胞,就能抗次氯酸盐的毒害;而生长的细胞,则对次氯酸盐毒害非常敏感,以致被杀死。

二、抗病突变体的筛选

这方面的研究工作大多采用正选择系统,也就是利用病原毒素作为细胞筛选剂来选择抗病突变体。已知百余种真菌和细菌病害,分泌致病毒素来伤害寄主细胞。现已查明一些致病毒素的化学成分和作用机理。如稻瘟病的致病毒素为吡啶羧酸和稻瘟素($C_{18}H_{14}N_2O_3$),有抑制呼吸代谢和诱发寄主细胞不正常生物合成,产生香豆素等有毒物质的作用。应用致病毒素作为选择剂,使在培养基中形成一种选择压力,淘汰掉不抗病的细胞,抗病的细胞就存活和繁殖起来。现以筛选抗稻瘟病突变体为例说明有关技术方法。

筛选实验可用愈伤组织或细胞进行。具体程序如下:

1. 用含有 2·4-D $2mg/l$,激动素 $0.5mg/l$ 的 N6 培养基,诱导花粉愈伤组织

继代培养 1~2 次。也可以增加植物激素使愈伤组织软化,然后进行液体培养。

2. 诱发突变

用含甲基磺酸乙酯(EMS) 0.1% 的 N6 液

体培养基,培养待试水稻愈伤组织 24 小时,用无诱变剂的 N6 培养液冲洗三遍,转移到固体 N6 培养基上。

3. 稻瘟菌毒素的制备

1) 用熟大麦粒繁殖菌种,于 $28^{\circ}C$ 培养箱中培养,使长满菌丝和孢子。振荡培养稻瘟菌 40 小时,可用 15% 马铃薯培养基或其他植物组织培养基,温度 $28^{\circ}C$,振荡速度 300 次/分。

2) 用 1~2 倍蒸馏水溶解接菌大麦粒,振荡 10 分钟,静置 8 小时,用滤纸过滤出毒素浸提液,再用细菌滤膜抽滤,得无菌毒素粗提液。

3) 滤去液体培养基中的菌丝,再用细菌滤膜抽滤制成毒素粗提液。

上述两种粗提液可用低温真空干燥设备制成固体毒素粗提液;也可按 Tamari 和 Kaji 法提取致病毒素吡啶羧酸和稻瘟素。

4. 突变体筛选

1) 将毒素粗提液用培养液配制成 $\times 2$, $\times 5$, $\times 10$ 各种稀释浓度,用固体物时稀释成 $\times 10$, $\times 50$, $\times 500$ 等各种浓度(采用吡啶羧酸和稻瘟素时可配制成 $10\sim 100ppm$)。

2) 在稻株叶片上或剪叶上注射各种不同浓度的毒素粗提液,充分保湿,2~3 天后观察病灶细胞坏死情况。以确定毒素的致病力,调整合适的处理浓度。

3) 将经过诱变的愈伤组织置不同浓度的毒素培养液中,振荡培养 48 小时,转入含相同毒素浓度的固体培养基中培养,1~1.5 月后观察细胞存活情况,从 95% 以上培养物受抑死亡的试管中,选择生长良好的细胞团块,一半转入相同毒素浓度的培养基中继代繁殖,另一半转入提高一级浓度的毒素培养基中培养,至细胞全部受抑死亡为止。用继代繁殖的愈伤组织部分转入分化培养基分化成苗,部分转到不含毒素的培养基中继代 3~5 次,再转入含有致死毒素浓度的培养基中测定抗性保持情况,若抗性消失则淘汰去相应的愈伤组织分化苗。

4) 抗毒素表现型细胞分化苗的抗病性

田间测定,按常规植保方法进行。

抗病突变体的筛选也可用一步选择系统。值得注意的是筛选时间不宜过长,以免丧失分化能力。目前抗病细胞突变体的筛选,仅局限于可用致病毒素作为选择手段的病害种类,如烟草野火病,甘蔗眼点病,玉米小斑病,油菜黑脚病,马铃薯蔓枯病和晚疫病,水稻稻瘟病和白叶枯病等。

三、抗盐突变体的筛选

抗盐突变体的筛选,近年来进展迅速,至今已在烟草、水稻、甘蔗、番茄、燕麦、苜蓿等几十种植物中进行了研究。在一些植物中得到了耐盐突变体及再生植株,有的建立了耐盐细胞系。

抗盐突变体的筛选大多采用正选择系统。突变体的产生靠自发和诱发突变两种。选择通常在愈伤组织和悬浮培养细胞两种水平上进行。

现以水稻为例简介如下:

1. 愈伤组织或悬浮细胞系统的建立

植物细胞的悬浮培养技术已被广泛应用,这是因为人工培养的细胞易控制突变和单个细胞的全能性。建立悬浮细胞系统包括愈伤组织的诱导、继代培养、单细胞的分离及悬浮培养、细胞团和愈伤组织的再形成,以及植株再生等。

一般操作程序和植物组织与细胞培养技术相同。但有几点值得注意。

1) 要选择最为理想的组织或器官作为外植体。若采用种子苗的部分器官或组织作外植体,可先培养无菌苗。

2) 疏松愈伤组织的筛选,应注意培养基中氨态氮与硝态氮的比例、培养基中激素的含量和比例,以及某些天然有机附加物对愈伤组织生长的影响。以水稻为例,培养基中加入酵母提取物3~5克/升,则愈伤组织生长良好,质地疏松。

2. 细胞耐盐能力的测定

将悬浮培养的水稻细胞接种于含不同氯

化钠浓度的液体培养基中进行悬浮培养。氯化钠的百分浓度(重量/体积)梯度为0、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0。培养三星期后,测定活细胞率。据实验,当氯化钠浓度为1.5%时,活细胞率急剧下降,细胞几乎不能正常生长。当浓度为3.0%时,活细胞率接近于零。因此选择1%的盐浓度作为筛选的合适浓度。

3. 单细胞的分离

将幼嫩的愈伤组织放入含1%氯化钠的液体培养基中,在摇床上进行连续振荡(速度为110转/分),暗室温度28度。连续振荡三周后,过滤离心收集单细胞与小的聚集体。

4. 突变细胞系的选择

将上述收集的单细胞及小的聚集体再悬浮于同样的含盐培养液中进行悬浮培养,一月左右后可获得小的愈伤组织块,及时转入不含氯化钠的分化培养基诱导再生植株。结果表明,某些材料的耐盐或抗盐筛选系的植株再生率明显高于对照。

在抗盐筛选过程中,还可以施加物化诱导因素,以提高诱导频率。

四、抗除莠剂突变体的筛选

许多除莠剂只能杀死进行光合作用的细胞,而培养细胞的光合作用极微弱,因此很难在细胞培养物的水平上区别突变体和非突变体。要选择这类突变体,就必须把着眼点放在完整植株上。叶片的细胞群很象培养皿中的细胞,其中某些部位的细胞也能发生突变。我们可以用实验的方法对叶片造成正选择压力,然后切下组织上可以区别的突变部位,进行培养,使之再生成植株,从而选出抗除莠剂的突变体。

今以菸草为例说明这一过程。取菸草单倍体植株,以5,000拉德的 γ 射线进行处理,叶片中有些细胞可能发生了抗除莠剂毒莠定(pioloram)的突变,但我们很难辨别每个细胞,故应让小苗继续生长到十片左右叶子,这时突变细胞可能发生分裂而形成突变细胞区,这就可以对一群细胞进行选择,而不是

选择单个细胞。这时喷以除草剂,敏感细胞逐渐变成浅绿、黄色和白色,最后死亡,而抗性细胞区仍呈绿色。在无菌条件下取下活的绿色小区进行培养,使之再生成完整植株。这些植株染色体可能加倍,若不加倍可采取人工加倍措施。它们有些是抗除草剂的,但不是全部,尚需进一步选择。

据研究,对除莠剂抗性性状是由一个或两个基因控制的,可按孟德尔定律传给后代。

比如菸草抗百草枯突变体的筛选,可按下列程序进行:

1. 将生长良好的菸草细胞悬浮培养物,培养在含0.5毫克/升、2,4-D和激动素1毫克/升的MS液体培养基中。在细胞生长的晚对数期用16000尔格/毫米²的紫外线照射培养细胞,继而在黑暗中繁殖几代,使突变细胞能够繁殖和表达。用培养液调整细胞密度在10³细胞/毫升,并用血球计数器实测。

2. 用含2×10⁻⁴克分子百草枯的尚未凝固的(约45℃)固体培养基(成分同液体培养基)和等量的细胞悬浮液混合,得到含细胞培养物的选择培养基。取上述培养基10毫升,放入培养皿,待凝固形成平板后用石蜡膜封皿口。置28~30℃下培养,直到培养基中长出直径2~3毫米的愈伤组织无性系。

3. 将得到的抗性愈伤组织转到新配的含除莠剂的固体培养基上,进一步检测抗性,然后转到无除草剂培养基上加快繁殖。

4. 将抗性愈伤组织转到含NAA0.1毫克/升、KT1毫克/升的培养基上,诱导再生植株。从再生植株上取下抗性和对照植株的叶片,用打孔器打成盘状小片,分别漂浮在含不同浓度的百草枯的MS无机营养液上。将装有叶片的培养皿放在日光灯下培养,观察叶色变化,无抗性的圆片逐渐失绿、变白、最后变褐死亡,具抗性的叶片始终保持绿色。

五、抗氨基酸及其衍生物 细胞突变体的筛选

植物细胞中氨基酸的代谢是受末端产物的反馈抑制调控的,筛选对某一氨基酸反馈抑制不敏感的突变体,其细胞氨基酸的含量可能是较高的。因此在细胞培养物中利用氨基酸或其衍生物做为筛选剂,可分离出不受过量游离氨基酸抑制的突变体。作为筛选剂除直接应用某种氨基酸外,较多的是应用氨基酸类似物,如DL-5-甲基色氨酸、氨乙基半胱氨酸、四氧赖氨酸、刀豆氨酸等。这些氨基酸衍生物都有一定毒性,可参加到氨基酸代谢中去,引起错误合成。因此,可以用量小,在操作中便于控制。

今以水稻为例,介绍这一筛选技术。

1. 生长约40天的水稻花粉愈伤组织转入含0.1%浓度的甲基磺酸乙酯培养液中24小时,用无诱变剂培养液洗涤3次,转入固体培养基继代培养约一周。

2. 配制含10⁻⁴、3×10⁻⁴、5×10⁻⁴克分子浓度的DL-5-甲基色氨酸的培养液,转入上述经诱变的愈伤组织振荡培养一天,再转入含有相同药剂浓度的固体培养基上培养。在95%以上细胞团块受抑或死亡的培养瓶中挑选正常生长的细胞,按细胞无性系为单位转移到含筛选剂的培养基上培养一次或多次。但需注意,过多继代会丧失分化能力。

3. 按细胞无性系,将部分细胞团块转入无筛选剂的培养基上继代培养,并取样测定氨基酸含量;部分细胞团块转入分化培养基上使分化成苗。在无筛选剂培养基上生长的愈伤组织,可转入含筛选剂的培养基上测定抗性保持能力,并将保持抗性的细胞系分化成苗。

4. 测定植株茎叶及子粒的氨基酸和蛋白质含量,观察后代抗性保持和传递规律。

这类突变体的筛选,已在菸草、水稻、大麦、玉米等十种植物上有过报道。表

明在突变体细胞中氨基酸含量有显著提高,而且在细胞再生植株上仍有表达。但也有些工作表明,多数突变体仅能增加游离氨基酸的含量。同时表明,这种突变体间表现型差异和后代遗传表现相当复杂。需作深入的研究。

六、营养缺陷型细胞突变体的筛选

早期的营养缺陷型突变体的获得,为当时一个基因一个酶的学说提供了有力的支持。目前,这种突变体可以作为一种标记因子来利用,如体细胞杂交中利用硝酸还原酶缺失突变体的 *Onx* 和 *nia* 系统的互补作用来识别和分离杂种细胞,前者缺乏酶活性所需的钼辅助因子,后者缺乏酶的脱辅基蛋白,两者结合就恢复了硝酸还原酶的活性。为研究高等植物的细胞及分子遗传学提供了有力的手段。

营养缺陷型细胞缺乏合成某种营养的能力。利用基本或低限的培养基,营养缺陷型细胞停止生长,而正常细胞继续生长,用一种可以杀死生长中活细胞的药物把正常型细胞全部杀死,使停止生长的营养缺陷型细胞保留下来,当转移到补充营养的培养基上后,存留的突变体就繁衍并分离出来。用以杀死生长中活细胞的药物有砷酸盐与溴脱氧尿核

苷。

下面以筛选菸草营养缺陷型突变体为例说明这种筛选技术。

1. 取菸草单倍体小苗的切段接种于含有 IAA2 毫克/升、KT0.3 毫克/升、蔗糖 4% 的 LS 固体培养基上,使产生单倍体愈伤组织。再转移到上述配方的液体培养基中,振荡培养,用 120 目尼龙网过滤,得单细胞和小细胞团块,继代培养 1~2 次。

2. 用 0.05~0.1% 甲基磺酸乙酯处理细胞悬浮培养物 24 小时,再用上述配方的培养液洗涤三次,再振荡培养 3~4 天。

3. 在诱变后细胞悬浮培养物中加入浓度为 10^{-5} 克分子的 5 溴脱氧尿核苷,黑暗培养 2 天,用上述配方培养液洗涤二次,洗涤时低速离心(小于 $100 \times g$) 收集细胞。转入到含 IAA2 毫克/升、KT0.3 毫克/升、CH800 毫克/升、YE400 毫克/升、胸腺嘧啶 10^{-5} 克分子的 LS 固体培养基上,加光培养,正常细胞被杀死,存活的是营养缺陷型突变体细胞。对每个长出的细胞团块,分别转入上述培养基继代培养以建立细胞无性系。

4. 营养缺陷型细胞无性系经扩大繁殖后,接种到分别含有各种营养因子(各种氨基酸、维生素、核酸碱基等)的 LS 基本培养基,能在某特定补充成分培养基上生长的细胞,即为该特定成分的营养缺陷型突变体。

黑龙江省谷子栽培研究现状与展望

聂希安

(黑龙江省农业科学院)

谷子在我省南至松花江沿岸,北至黑龙江边都有种植,它不仅在肥沃的黑土上能获得高产,在脊薄的盐碱土、白浆土和风砂土地上也分别出现过亩产六、七百斤、高至八

百斤的高产纪录,其中最大面积的达到 20 亩以上;说明谷子并不是低产作物。

谷子具有粮草兼用、营养丰富、耐贮藏等优点,很受群众欢迎。特别是农村实行个