

# The Prevention and Control of Somatic Variation and Its Application in Breeding\*

Yueming Zhao<sup>1,2</sup>, Yanming Zhao<sup>1,2</sup>, Yukun Liu<sup>1,2</sup>, Chengzhong He<sup>1,2#</sup>

<sup>1</sup>College of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming

<sup>2</sup>Key Laboratory for Forest Resource Conservation and Utilization in the Southwest Mountains of China, Ministry of Education,

Southwest Forestry University, Kunming

Email: beiming19870804@163.com, #hcz70@163.com

Received: Sep. 25<sup>th</sup>, 2013; revised: Oct. 18<sup>th</sup>, 2013; accepted: Oct. 29<sup>th</sup>, 2013

Copyright © 2013 Yueming Zhao et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Abstract:** Plant somatic variation is a common phenomenon in the course of tissue culture and it plays an important role in improving varieties and breeding new varieties of plant, but it is also a major problem in the plant tissue culture. In this paper, based on the study of influencing factors we try to find out the ways to prevent and control plant somatic variation. The main genetic bases of plant somatic variation, including chromosome variation, gene mutation, change of DNA repeat sequence, transposon activation, DNA methylation, gene silencing etc., are analyzed. As an effective way of breeding, plant somatic variation still has some problems.

**Keywords:** Somatic Variation; Influencing Factors; Prevention and Control; Genetic Basis; Breeding

## 植物体细胞变异的防控及育种应用\*

赵月明<sup>1,2</sup>, 赵雁鸣<sup>1,2</sup>, 刘玉鲲<sup>1,2</sup>, 何承忠<sup>1,2#</sup>

<sup>1</sup>西南林业大学林学院, 昆明

<sup>2</sup>西南林业大学西南山地森林资源保育与利用省部共建教育部重点实验室, 昆明

Email: beiming19870804@163.com, #hcz70@163.com

收稿日期: 2013年9月25日; 修回日期: 2013年10月18日; 录用日期: 2013年10月29日

**摘要:** 植物体细胞变异在组织培养中是非常普遍的现象, 对改良植物品种和选育新品种具有重要的意义, 但同时也是植物组培的一大难题。本文在研究影响体细胞变异因素的基础上尝试体细胞变异的防控办法, 并对植物体细胞变异的遗传基础做了具体分析, 包括染色体变异、基因突变、DNA重复序列的改变、转座子活化、DNA甲基化状态改变、基因沉默等。植物体细胞变异作为一种有效的育种途径, 仍然存在一些问题。

**关键词:** 体细胞变异; 影响因素; 防控; 遗传基础; 育种

### 1. 引言

起先人们依据细胞全能性学说, 认为本质上是无性繁殖的组织培养所得到的再生植株应当与原植株

\*资助信息: 国家林业公益性行业科研专项(201104076); 云南省中青年学术与技术带头人后备人才培养基金项目(2012HB021)。

#通讯作者。

的基因型完全相同。在许多情况下的确如此, 因而可以借助组织培养技术快速繁殖种苗。但是, 日渐增多的资料表明, 植物离体培养物和再生植株会发生各种各样的变异。Larkin 和 Scowenft<sup>[1]</sup>首次评述了再生植株变异的资料, 并称这种现象为体细胞无性系变异,

即“任何形式的细胞培养物产生的再生植株通称为体细胞无性系”。此外，对于体细胞无性系变异的遗传学基础也有了一定深入的了解，具体表现在：染色体数目和结构变异以及基因突变、基因扩增和丢失、基因重拍、基因沉默、DNA 甲基化和转座子活化等方面。

## 2. 体细胞变异类型

植物体细胞变异包括可遗传的变异(heritable variation)和外遗传变异(epigenetic variation)两类。前者指可以在有性世代和无性繁殖世代稳定保持的变异，后者指不仅在有性世代、有时甚至在无性世代也不能稳定保持的变异。外遗传变异也称发育变异(developmental variation)，即由于外部影响导致基因表达的改变，从而引起表型上的变异<sup>[2]</sup>。对于可遗传变异，又可根据无性系变异在 R2 代是否分离而分为纯合变异和杂合变异。纯合变异在 R2 代及以后世代均不出现分离，而杂合变异在 R2 代出现分离，但一般在以后世代可以稳定传递<sup>[3]</sup>。

## 3. 体细胞变异来源

从来源来讲，一般认为，植物体细胞无性系变异的起源有二：一是外植体中已存在的、于再生植株中表现出来的变异，来源于不同组织、染色体倍性存在差异的细胞，如：薄壁细胞、木质部细胞、韧皮部细胞等，这些细胞在不同组织内的分化和生长是非同步的，当改变外界条件时，这些细胞的发育就会改变方向，从而产生变异。嵌合体是由不同遗传组成的组织和细胞构成的，因而组织培养中嵌合体的分离就会导致变异的出现，来源于有刺黑莓的无刺嵌合体，在组织培养后就获得了半数短刺或者无刺的再生植株<sup>[4]</sup>。另一则主要是组织培养过程本身诱导产生的变异，经组织培养产生的变异要比常规繁殖方法产生的植株表现更多的变异。体细胞无性系变异的变异率可以高达 30%~40%，有时甚至高达 90%，某一具体性状的变异率在 0.2%~3%之间<sup>[5,6]</sup>。组织培养中影响植物体细胞无性系变异频率的因素很多，包括：培养基组成、外植体来源、外植体基因型、继代次数等。

### 3.1. 培养基组成

培养基成分会诱导组织培养材料的细胞发生不同程度的变异。植物激素，主要是生长素和细胞分裂

素，在植物离体培养形态发生中起到最重要的作用，它们可以直接作为反式作用因子，或间接激活其它激素和蛋白质，或通过细胞第二信使而调节基因表达。利用 BA 诱导的白桦愈伤组织，其再生植株的染色体数目和 DNA 水平均发生不同程度的变异，随着 BA 浓度的增加，再生植株二倍体细胞比例由 50% 逐渐下降到 40%；DNA 多态性片段的比例由 39% 上升到 61%<sup>[7]</sup>。对兰州百合及野百合单独使用一种激素 NAA 引起的染色体的变异率为 3.5% 及 2.8%，而 BA 和 NAA 搭配引起的变异率普遍高于此值<sup>[8]</sup>。研究不同生长调节物质对河北杨及新疆杨体细胞无性系变异频率的影响，在培养基中分别加入 0.005~0.015 mg/L TDZ 和 0.5~1.5 mg/L ZT，河北杨及新疆杨再生植株中均未检测到变异发生；然而在 0.1~0.2 mg/L 2, 4-D 条件下，经过 1 次继代后，两种杨树再生植株中同样未检测到变异，但经过 3 次及 5 次继代后，随着 2, 4-D 浓度的增大，两种杨树的植株变异频率和位点变异频率都有增大的趋势，且河北杨植株变异频率和位点变异频率最高可达 25% 和 5.4%，新疆杨则分别可达 20% 和 4.5%<sup>[9]</sup>。由此可见培养基中激素的组成对于体细胞的变异具有重要影响。仙客来的胚性愈伤进行固体培养基培养和液体悬浮培养，分别获得了大量体胚，依据体胚萌发后的状态不同进行统计，固体培养基上得到 10.9% 的正常体胚，其体胚变异机率为 89%，悬浮培养得到 6.3% 的正常体胚，变异机率为 94%<sup>[10]</sup>，由此可见，培养基形态对于体细胞变异也有一定的影响。

### 3.2. 外植体来源

研究表明，茎尖、腋芽等具有分生组织的外植体，其变异率低于叶片、根段和茎段等未分化形成分生组织的外植体。在菠萝的顶芽、腋芽和果实不同外植体上诱导出团状愈伤组织，经 7~14 个月的继代培养后均再生了植株，但以果实为外植体的所有再生植株均发生变异，顶芽的有 7% 发生变异，腋芽的变异率为 34%<sup>[11]</sup>。以白杆成熟合子胚为外植体诱导体细胞胚胎发生，胚性愈伤组织继代培养 3a 后发现，随着继代时间的增长，胚性细胞内有些细胞的染色体数目发生了无规律的变化，而再生植株根尖细胞染色体数目比较稳定<sup>[12]</sup>。用 RAPD 分子标记技术，对用芥菜的愈伤组织、子叶块诱导的不定芽、茎段诱导的丛生芽进行

检测显示,前者存在 DNA 水平差异,后两者不存在<sup>[13]</sup>。对中国水仙染色体数目鉴定结果表明,用鳞茎盘切块、子房切片再生形成的小鳞茎,其壮苗生根培养后的根尖细胞染色体数目发生不同程度的变异<sup>[14]</sup>。

### 3.3. 外植体基因型

植物体细胞变异是基因型依赖性的,即随基因型不同,变异的数量和程度也不同。在小麦的体细胞变异中发现,在一个基因型的无性系后代中,某一特定的 SSR 位点上的变异表现一致;而在不同的基因型无性系后代中,有的 SSR 位点上的变异表现为一致,有的 SSR 位点上表现为不一致<sup>[15]</sup>。对兰州百合和野百合进行组织培养,在愈伤组织中其染色体的变异率分别为 54.4% 和 49.4%,变异范围分别为 9~50 条和 12~50 条;在芽端分生组织中兰州百合及野百合的变异率分别为 17.5% 和 9.5%<sup>[18]</sup>。

### 3.4. 继代次数

继代次数是影响体细胞无性系变异最重要的因素之一。对继代培养 12.5 年的普通小麦济南 177 愈伤组织染色体的结构变异进行了研究,并与继代时间为 1.5~8.6 年的进行比较,发现其染色体结构变异的类型发生了改变,并认为长期继代培养不仅能引起染色体数目和结构变异,同时能导致基因消失或表达的改变<sup>[16]</sup>。对菊苣第一代和第二代体细胞再生植株进行 RAPD 标记,发现第一代体细胞无性系没有发生 DNA 多态性变异,第二代体细胞无性系在分子水平发生了 1 条 DNA 多态性变异<sup>[17]</sup>。对番木瓜( $2n = 18$ )主栽品种蔬罗 1 号 1~38 代组培苗体细胞的染色体数的初步观察和统计,发现 1~32 代苗所观察的体细胞染色体全部为  $2n = 18$ ,但是在第 33、36、37 代发现了染色体非整倍性的细胞<sup>[18]</sup>。利用 BA 诱导的白桦愈伤组织,随着继代培养时间的增加,再生植株二倍体细胞比例由 57% 剧减到 30%,DNA 多态性片段比例逐渐上升,变异逐渐加大<sup>[7]</sup>。对草地早熟禾愈伤组织进行继代培养,继代 3 次的愈伤组织在 AFLP 电泳图谱上反映出高频率的谱带缺失,与继代 1 次相比,缺失了 550 条带,增加了 73 条带;继代 5、7、9、11 次的愈伤组织,与继代 1 次相比,其增加和缺失的多态性片段总和分别为 501 条、500 条、521 条、699 条,表明随着

继代次数的增加,愈伤组织的变异逐渐增多<sup>[19]</sup>。对香果树的胚性愈伤组织进行组织培养发现,随着继代次数的增多,体细胞胚的变异率不是逐渐升高,而是先升高后下降<sup>[20]</sup>。对苜蓿愈伤组织进行组织培养发现,继代 0~12 周 DNA 含量的变异百分率增加迅速,之后增加速度逐渐趋于平缓、稳定<sup>[21]</sup>。

## 4. 体细胞变异的防控

通过对影响体细胞变异的因素的了解,为了减少组织培养过程中的体细胞变异,应该从以下几个方面加以注意:选取变异频率相对较低的品种,挑选具有分生组织的外植体,例如腋芽、茎尖、根尖,且尽量跳过愈伤组织阶段进行组织培养;培养基的配制,要选取合适的激素浓度,不宜过高,激素的种类也不宜过多,液体培养基优于固体培养基;在培养过程中,严格控制通风、光照、温度和湿度,继代培养次数不宜过多。在林业上,对于老化和体细胞变异较大的树木,可通过组织培养,对其进行复幼处理,从而恢复幼龄树木良好的生根能力,旺盛和通直的生长习性<sup>[22]</sup>。

## 5. 体细胞变异的遗传基础

植物体细胞变异的遗传基础,一直是无性系变异研究所关注的课题。从 1981 年起,科学家们已利用细胞学和分子生物学方法对植物体细胞变异做了不少研究,所获得的结果对认识无性系变异的机理奠定了基础<sup>[23]</sup>。在细胞水平上,体细胞无性系变异包括染色体数目和染色体结构变异两个方面,染色体数目变异又包括整倍性变异和非整倍性变异,染色体结构变异主要是由于染色体断裂后经过修复和重新连结所形成的易位、倒位、缺失和重复,为可遗传变异。在 DNA 分子水平上,体细胞无性系变异包括点突变、基因的扩增和丢失、基因重排、基因沉默、DNA 甲基化、转座子活化等。到目前为止,关于体细胞变异的遗传基础虽然提出了不少观点,但都只能对其中的某些现象进行解释,同时对不同材料的研究还经常出现对立的结果,说明体细胞变异是极其复杂的。

### 5.1. 染色体数目

染色体数目表现在整倍性、非整倍性、混倍性。

植物组织培养中经常出现染色体数变化的现象,随着植物体细胞无性系变异观察研究的广泛和深入,发现发生性状改变的大多数物种并没有发生染色体水平的变异,有些学者提出细胞学的变异只能解释少数较极端的无性系变异,更多的无性系变异则可能是 DNA 水平上的变异<sup>[23]</sup>。以四合木种子萌发幼苗为外植体诱导愈伤组织,对继代培养 1~2a 的愈伤组织进行染色体制片并计数,结果发现愈伤组织在继代培养过程中染色体数目变异显著,有亚倍体、多倍体和超倍体出现,继代培养 1a 以上的愈伤组织中多倍体和超倍体占优势,亚倍体较少,而正常的二倍体则少见,同时还出现了异常的有丝分裂现象<sup>[24]</sup>。对 5 个大蒜品种再生植株分析发现,通过愈伤组织培养诱导再分化形成的再生植株,其细胞染色体数目发生了不同程度的变异,55'-品种的体细胞无性系二倍体率分别为 52%、64%、58%、54%和 62%,其余为多倍体、超倍体和亚倍体细胞<sup>[25]</sup>。对荔枝的非胚性愈伤组织、胚性愈伤组织、胚状体、畸形苗根尖、正常苗根尖的染色体数目检查表明:各种培养物均出现了广泛的染色体数目的变异,除正常的荔枝体细胞染色体数目  $2n = 30$  外,还出现  $2n = 15 - 29$  以及  $2n = 31 - 60$  的染色体异常细胞<sup>[26]</sup>。对苜蓿花药培养再生植株进行流式细胞仪检测,50 株苜蓿花药再生植株幼苗中 42 株四倍体,  $2n = 4x$  与  $2n = 2x$  的混合体为 5 株,单倍体为 2 株,三倍体为 1 株<sup>[21]</sup>。

## 5.2. 染色体结构

染色体结构表现在染色体易位、倒位、缺失和重复。以陆地棉体细胞培养获得的胚性愈伤、体细胞胚和再生植株的根尖为材料,进行染色体制片,观察分析染色体的变化,结果显示,可能是由于染色体的丢失影响到细胞的发育,以致部分具有非正常染色体数的细胞被淘汰,从而导致再生植株中具有正常染色体数目的比例增加<sup>[27]</sup>。在 5 种不同基因型的玉米胚性愈伤组织继代过程中观察到染色体明显的结构变化:有染色体缺失、随体断裂、染色体粘连、染色体凝聚、易位、同源染色体联会、环状染色体,在一些细胞中还出现微核<sup>[28]</sup>。此外在黑麦草<sup>[29]</sup>、大蒜<sup>[25]</sup>、棉花<sup>[30-32]</sup>、伊贝母<sup>[33-35]</sup>、山熏豆<sup>[36,37]</sup>欧美杂种山杨<sup>[38]</sup>等植物的组织培养过程中也观察到类似的染色体结构的变异。

## 5.3. 基因突变

基因突变是指基因序列中碱基发生了改变,导致由一种遗传状态转变为另一种遗传状态。点突变在植物组织培养过程中可以高频率发生,从而引起体细胞无性系变异。点突变与其它几种变异方式相比较,对再生植株的损伤小,且得到的变异能够较快稳定遗传<sup>[39]</sup>。对培养了 20 年的水稻细胞进行检测,发现在与水稻直链淀粉合成相关的两个看家基因 EPSPS、RPS20 内发生高频率的 A/T 转换为 G/C<sup>[40]</sup>。有研究利用 RAPD 分子标记法,在 DNA 水平上分析甘薯品种间遗传差异以及体细胞胚胎无性系的遗传变异,实验筛选了 45 个随机引物,其中 7 个引物 PCR 扩增后在品种间和体细胞胚胎无性系中表现 RAPD 多态性,并在相应胚性愈伤组织中检测到少数 RAPD 变异位点<sup>[41]</sup>。Brettell 等在玉米杂种胚培养过程中,从 645 株再生植株中,分离得到了一株表现稳定的玉米乙醇脱氢酶位点变异植株,该突变体新产生的酶有活性功能<sup>[42]</sup>。对三个西瓜品种再生植株进行 RAPD 分析,结果表明三个品种的基因组 DNA 均发生了不同程度的变异<sup>[43]</sup>。用 mRNA 差异显示技术和 SSR 标记,比较了小麦品种丰抗 8 号及其幼胚培养突变系第 R8 代株系的基因编码区和非编码区的核苷酸序列,证明突变系的 DNA 序列存在大量的突变<sup>[44]</sup>。目前,单基因突变可以用分子生物学技术检测,但对于多基因突变是比较难以达到的,而植物的许多品质、产量等性状都是由多基因控制的,目前缺乏对体细胞无性系中多基因突变的分子生物学检测的报道,所以用分子生物学检测无性系突变有待于进一步研究。

## 5.4. 基因扩增和丢失

基因扩增是细胞内某些特定基因的拷贝数专一性地大量增加的现象,是细胞在短期内为满足某种需要而产生足够的基因产物的一种调控手段。转座子也可以诱导位于中度或高度重复序列的多拷贝基因中那些不表达的拷贝活化,提高基因表达强度,进而导致表型变异。基因丢失是指在细胞分化过程中通过丢失掉某些碱基序列而失去基因活性。在高度重复的基因组中,小麦、黑麦、玉米和烟草等植物中均发现一类编码核糖体 RNA 的那一部分数目可以随条件不同而增加或减少<sup>[45]</sup>。以添加了不同浓度的甘露醇、PP333

和 ABA 的培养基对半夏试管苗进行缓慢生长法保存, 并对保存材料再生后代的体细胞变异进行检测, 结果显示, 保存在添加了 2.0~4.0 mg/l ABA 培养基上的植株检测到 1 条新增标记和 1 条缺失标记, 位点变异率为 1.7%, 个体变异率为 30%<sup>[46]</sup>。以多年生黑麦草成熟胚诱导获得的再生植株为材料, 利用 RAPD 标记方法对其体细胞变异进行了研究, 结果显示在 11 个能扩增出多态性带的随机引物中, 有 4 个引物(S21、S23、S24、S25)能检测到再生植株的多态性差异, 其中 S24 引物在各再生植株中都检测到了与对照不相同的位点。不同再生植株无性系扩增出不同数量的特异性多态带, 与对照相比, 既有缺失带, 也有新增带<sup>[47]</sup>。

### 5.5. 基因重排

基因重排是 DNA 分子内部核苷酸顺序的重新排列。在组织培养过程中, 也可发生基因重排, 这是无性系变异的另一原因<sup>[48]</sup>。在玉米栽培系 A188 的培养细胞中发现, 玉米贮藏蛋白基因座位有高频率的基因重排出现, 重排起源于 DNA 复制过程中的同源染色体重组和缺失、倒位和插入<sup>[49]</sup>。Hartmann 观察到小麦幼胚愈伤组织培养 6 代后获得的再生植株的线粒体 DNA (mtDNA) 发生重排, 并且培养时间越长, 再生植株 mtDNA 变异程度越大, 由此可见, 尽管 mtDNA 有很大的保守性, 但组织培养也可使 mtDNA 发生较大的变异<sup>[50]</sup>。

### 5.6. 基因沉默

基因沉默是指生物体中特定基因由于种种原因不表达。研究者最初发现基因沉默产生的变异, 是在水稻的初级再生植株中, 此类植株是个矮化的纯合子, 能通过有性生殖保持。还发现这一突变显示低频率的复原, 且复原不能在再生植株的杂交后代中保持<sup>[51]</sup>。若用 DNA 甲基化抑制剂处理矮化类型可诱导正常表型的复原。这一结果显示, 矮化变异是可逆的, 是基因沉默的结果。还有研究者分析了玉米白色穗轴变异, 发现基因沉默在这一系列变异中发挥重要作用, 已经确认调节玉米穗轴颜色的遗传区段, 且已成功克隆<sup>[52]</sup>。

### 5.7. 转座子活化

转座子是能从基因组的一个位置独立地转移到

与此广泛同源的另一位置上去的一段 DNA。在组织培养过程中, 由于细胞处于高速分裂的状态, 所以染色质复制滞后, 结果引起细胞分裂后期形成染色体桥和染色体断裂。在断裂部位的 DNA 修复过程中属于异染色质的转座子发生去甲基化而被激活, 并发生转座作用, 从而引起一系列的结构基因活化、失活和位置变化, 导致无性系变异, 且此类变异一般不可遗传。转基因沉默是一个受多因素调控的复杂过程, 其中 DNA 甲基化是造成植物转基因沉默的主要原因之一。目前普遍认为, 转基因沉默分为转录水平上的基因沉默(TGS)和转录后水平的基因沉默(PTGS)<sup>[53]</sup>。在组织培养过程中, 玉米的三个转座系统 Ac、Spm 和 Mu 表现出活性。Peschke 等将玉米再生植株作为父本, 与带有受体 Ds 和合适的胚乳标志基因的试管植株杂交, 检测到有 9 棵来自单细胞的再生植株具有 Ac 活性, 之后他又在玉米再生植株的后代中检测到 Spm 活性, 并发现在供体植株中存在着与 Spm 同源的 DNA 序列, 同时认为这些同源序列的激活会导致活性 Spm 的出现<sup>[54,55]</sup>。Evo1a 在一半的玉米再生植株中检测到活性 Spm 的存在; 随后, 又发现了 Ac 的激活<sup>[56,57]</sup>。另外在水稻中也存在活性转座子 mPing/Pong<sup>[58]</sup>。

### 5.8. DNA 甲基化

DNA 甲基化是细胞中最常见的一种 DNA 共价修饰形式。研究发现, 转录水平的 DNA 甲基化主要发生在基因的 5' 端的启动子区域, 使转录因子与启动子的接触受到阻碍, 从而抑制转录<sup>[59]</sup>, 并且甲基化可延伸到基因的 3' 端<sup>[60]</sup>。植物体胚发生与 DNA 甲基化密切相关, 一定程度的 DNA 甲基化水平有利于植物体胚的正常发育<sup>[61-63]</sup>。研究发现, 在油菜种子萌发过程中同时检测到大量的甲基化和少量的去甲基化现象, 而且去甲基化占据绝对主导地位<sup>[64]</sup>。大量的去甲基化是与种子萌发后启动了大量基因的表达相一致的, 同时少量的甲基化事件也暗示部分基因正在关闭, 这似乎表明, 植物通过 DNA 甲基化和去甲基化的方式来实现基因的有序表达。甲基化模式的改变则会导致植物产生大量的表型变异。已有学者分离出与油棕体细胞变异有关的 DNA 甲基化酶基因<sup>[65]</sup>。由于植物组织培养过程中, DNA 甲基化变异往往伴随着高频率的转座元件的激活、异染色质诱发的染色体断裂、质量表

型变异以及高频率的序列变异, 从而影响基因的表达<sup>[39]</sup>, 所以 Philips 等认为 DNA 甲基化变异可能是植物体细胞无性系变异的一个根本原因<sup>[66]</sup>。Devaux 等分析了大麦组织培养形成的 DH 群体, 其中由甲基化引起的 RFLP 多态性变化 96% 来自组织培养的 DH 群体, 说明组织培养的确引起了 DNA 甲基化变化<sup>[67]</sup>。纽荷尔脐橙愈伤组织胚状体再生能力的丧失就伴随着明显的 DNA 甲基化<sup>[68]</sup>。

## 6. 体细胞变异育种

体细胞变异育种需要的外植体材料很少, 增殖速度快, 能在短时间内获得稳定、纯合的突变体; 操作难度小, 适用的作物范围广, 且经济, 易在广大的育种单位开展; 可通过在培养基中加入一定的选择压力以定向选择, 从而筛选到特定的突变体; 为植物育种工作者提供了一个新的变异来源和有效的育种途径<sup>[69]</sup>。组织培养可以改变植物体中遗传重组事件的频率和分布, 这表明体细胞变异的染色体区域要比传统育种和诱变育种中区域要大<sup>[70]</sup>。然而作为植物组织培养中经常发生的事件, 体细胞变异对于利用组织培养技术进行优良基因型快速繁殖、种质资源离体保存、体细胞杂交和基因工程育种也带来了不利影响, 因为在此过程中都需要保持植物原有遗传基础的相对稳定。而另一方面, 然而关于体细胞变异育种仍然存在一些问题, 需要我们注意并加以解决。

### 6.1. 有效变异率低

目前存在的主要问题是体细胞变异研究的基础工作不够深入, 缺乏对诱变本身可以引起的某种内在变化的认识, 特别是反映在代谢环节上的特征性变化, 然后从中抓住这些特征, 采取人为的控制手段, 使外植体产生定向变异, 提高有效变异频率。此外, 提高目标性状和其它有益农艺性状的频率, 并使之尽快稳定下来也有待进一步研究。在一个体细胞无性系中, 很可能同时有许多性状发生突变, 对于改良品种有积极作用的性状, 我们应该促使其发生, 对于改良品种有害的性状, 我们应该避免。

### 6.2. 细胞全能性保持

在长期的离体培养过程中, 植物细胞全能性的保持是一个很重要的问题。因为早就注意到多倍体和非整

倍体细胞的离体形态发生能力大大降低, 以至丧失。除了遗传上的原因外, 其后天因素, 如驯化作用以及培养过程中内源代谢产物的积累和变化等, 都可能影响组织分化和再生能力。许多变异性, 无论是遗传的、生理的或是后天因素引起的都可以干扰细胞的正常代谢活动和发育, 结果是细胞或愈伤组织分化能力丧失, 或是只能再生出异常的植株。

### 6.3. 遗传稳定问题

近年来在很多工作上发现。选择的变异体的变异特性, 有的能在后代中继续表达或稳定地遗传下去而有的不能, 或是往往只能在部分个体上传递下去, 或完全消失。以高粱纯系 401-1 为材料, 通过幼胚培养, 有小盾片细胞产生的再生植株后代出现株形矮小, 叶形窄短的突变体, 该突变体经过 15 个世代形状是稳定遗传的<sup>[71]</sup>。以优良假俭草选系 E-126 为材料, 经低温诱导和筛选获得可稳定遗传的体细胞抗寒突变体<sup>[72]</sup>。总之。在了解体细胞变异发生的原因、性质及其遗传传递规律的基础上, 突变体筛选及其利用能发挥更大的作用。

## 7. 展望

植物体细胞变异的遗传基础和主要影响因素的研究, 既可丰富植物细胞遗传学理论, 也为植物的育种实践提供了指导。组织培养作为一种基本手段和工具, 无性系变异必将严重影响组培技术在现代生物技术中的广泛和深入应用。外植体脱分化时, 细胞的异常分裂是体细胞变异的主要来源, 激素在细胞分裂中起到关键的作用, 同时也是无性系变异最重要的外部影响因素, 一般认为经历外植体脱分化的间接形态发生方式, 与使用生长素有关, 探讨培养基各激素间的平衡可以降低组培无性系变异, 同时能够使正常或目的类型得到选择, 虽然报道不多, 但确实是值得研究借鉴的方法。目前激素与体细胞变异的遗传基础的关系的了解极少, 所以, 首先从激素入手, 研究激素以及不同激素间的相互作用与体细胞无性系变异遗传基础的关系, 并以此为基础尝试无性系变异防控办法。

## 参考文献 (References)

- [1] Larkin, P.J. and Scowcroft, W.R. (1981) Somaclonal variation—

- A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, **60**, 197-214.
- [2] Skirvin, R.M., McPheeters, K.D. and Norton, D. (1989) Source and frequency of somaclonal variation. *HorScience*, **29**, 1232-1237.
- [3] 高东迎, 郭士伟, 李霞, 等 (2002) 水稻体细胞无性系变异. *植物学通报*, **19**, 749-755.
- [4] McPheeters, K. and Skirvin, R.M. (1983) Histogenic layer manipulation in chimeral "Thornless Evergreen" trailing blackberry. *Euphytica*, **32**, 351-360.
- [5] 丰先红, 李健, 罗孝贵 (2010) 植物组织培养中体细胞无性系变异研究. *中国农学通报*, **26**, 70-73.
- [6] Smith, M.K. and Drew, R.A. (1990) Current applications of tissue culture in plant propagation and improvement. *Functional Plant Biology*, **17**, 267-289.
- [7] 郝爱平 (2005) 白桦愈伤组织再生系统的体细胞无性系变异研究. 东北林业大学, 哈尔滨.
- [8] 王刚 (2002) 百合组织培养及组织培养中的染色体行为. 西北师范大学, 兰州.
- [9] 张琼 (2008) 杨树体细胞无性系变异影响因素的研究. 西北农林科技大学, 咸阳.
- [10] 卞福花 (2008) 仙客来体细胞胚胎的发生、变异及蛋白质组学的研究. 北京林业大学, 北京.
- [11] Das, R.K. and Bhowmik, G. (1997) Some somaclonal variants in pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] plants obtained from different propagation techniques. *International Journal of Tropical Agriculture*, **15**, 95-100.
- [12] 杨金玲, 桂耀林, 郭仲琛 (2000) 自嵌胚性愈伤组织长期继代培养中的分化能力及染色体稳定性研究. *西北植物学报*, **20**, 44-47.
- [13] 徐春霞 (2005) 茎用芥菜不同再生体系的建立及遗传稳定性分析. 浙江大学, 杭州.
- [14] 沈晓燕 (2009) 中国水仙离体形态发生的生理变化与遗传变异研究. 福建农业大学, 福州.
- [15] 杨随庄, 王红梅, 杨晓明 (2007) 小麦体细胞无性系 SSR 位点的遗传变异特性分析. *植物生理学通讯*, **43**, 678-682.
- [16] 陈秀玲, 赵同金 (2002) 长期继代小麦培养细胞的染色体结构变异特征. *山东大学学报: 理学版*, **37**, 548-551.
- [17] 张玉, 白史且, 李聪, 李达旭, 邓永昌, 王涌 (2011) 鑫菊苣体细胞再生植株的遗传稳定性分析. *生物技术*, **21**, 51-54.
- [18] 李卫东, 王冬梅, 黎小瑛 (2006) 用细胞学方法研究番木瓜组培苗的遗传稳定性. *云南植物研究*, **28**, 645-648.
- [19] 李银凤 (2007) 继代次数对草地早熟禾愈伤组织内源激素水平和 DNA 变异的影响. 中国林业科学研究院, 北京.
- [20] 熊丹, 谢伟, 陈发菊, 梁宏伟, 王玉兵 (2008) 香果树组织培养过程中遗传变异的 RAPD 分析. *植物生理学通讯*, **44**, 37-41.
- [21] 耿小丽 (2010) 苜蓿单倍体、纯合四倍体的诱导及愈伤组织 DNA 含量变异的研究. 甘肃农业大学, 兰州.
- [22] 裴东, 谷瑞升 (2005) 树木复幼的研究概述. *植物学通报*, **22**, 753-760.
- [23] 刁现民, 孙敬三 (1999) 植物体细胞无性系变异的细胞学和分子生物学研究进展. *植物学通报*, **16**, 372-377.
- [24] 郭晓红, 慈忠玲, 孙静, 等 (2001) 珍稀濒危树种四合木组织培养过程中的染色体变异. *内蒙古农业大学学报*, **22**, 55-59.
- [25] 张恩让, 程智慧, 周新民 (2004) 大蒜体细胞无性系的染色体变异研究. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, **32**, 73-76.
- [26] 黄素华 (2011) 荔枝体细胞胚胎发生过程中遗传变异的研究. 福建农业大学, 福州.
- [27] 周志林, 聂以春, 张献龙, 胡婷婷 (2008) 棉花体细胞培养中染色体的变异. *江苏农业学报*, **24**, 126-129.
- [28] 向凤宁, 张举仁, 陈惠民, 等 (1994) 玉米胚性愈伤组织的长期继代及其染色体分析. *西北植物学报*, **14**, 157-163.
- [29] 冯霞, 孙振元, 刘建锋, 等 (2005) 多年生黑麦草核型分析与组织培养再生植株染色体变异研究. *林业科学研究*, **18**, 321-324.
- [30] 李克勤, 王品之, 张大力, 等 (1991) 陆地棉组织细胞培养的研究. *西北植物学报*, **11**, 144-153.
- [31] 郑泗军, 吴吉祥, 洪彩霞 (1993) 棉花组织培养中畸形胚产生原因的分析. *浙江农业大学学报*, **19**, 193-197.
- [32] 丰嵘, 王清连, 张宝红, 等 (1996) 棉花体细胞无性系变异的研究. *江西农业大学学报*, **18**, 202-205.
- [33] 王仑山, 丁惠宾, 王亚馥, 等 (1990) 伊贝母愈伤组织在继代培养过程中的染色体变异和分化频率的研究. *西北植物学报*, **10**, 54-60.
- [34] 王仑山, 王亚馥, 杨汉民, 等 (1987) 不同激素对伊贝母组织培养中染色体不稳定性研究. *西北植物学报*, **7**, 226-234.
- [35] 王仑山, 杨汉民, 王亚馥, 等 (1989) 伊贝母组织培养中体细胞胚的形成及细胞组织学观察. *西北植物学报*, **9**, 76-81.
- [36] 董滢, 周庆安 (2005) 山黧豆研究进展. *饲料工业*, **3**, 50-53.
- [37] 杨汉民, 高清祥, 王小兰 (1991) 山黧豆组织培养中的染色体变异. *植物学通报*, **8**, 65-69.
- [38] 詹亚光, 齐凤慧, 高瑞馨, 等 (2006) 欧美杂种山杨体细胞无性系变异的分析. *植物学通报*, **23**, 44-51.
- [39] 李晓玲, 丛娟, 于晓明, 董英山 (2008) 植物体细胞无性系变异研究进展. *植物学通报*, **25**, 121-128.
- [40] Noro, Y., Takano-Shimizu, T., Syonok, K. and Sano, Y. (2007) Genetic variations in rice *in vitro* cultures at the EPSPS-RPS20 region. *Theoretical and Applied Genetics*, **14**, 705-711.
- [41] 薛启汉, 张赞, 向阳海, 朱作为, 陈游 (2000) 甘薯体细胞胚胎发生遗传变异的 RAPD 分析. *江苏农业学报*, **16**, 212-216.
- [42] Dennis, E.S., Brettell, R.I.S. and Peacock, W.J. (1987) A tissue culture induced Adh1 null mutant of maize results from a single base change. *Molecular and General Genetics*, **210**, 181-183.
- [43] 林涛 (2012) 西瓜体细胞无性系的发生和变异研究. 华东师范大学, 上海.
- [44] 王立新, 颜暘, 石海波, 等 (2005) 小麦体细胞无性系的 DNA 突变. *分子植物育种*, **3**, 857-863.
- [45] 陈纯贤, 孙敬三 (1994) 植物体细胞无性系变异研究进展. *生物学杂志*, **3**, 4-6.
- [46] 王爱华, 文晓鹏 (2012) 半夏缓慢生长法保存及体细胞变异的 ISSR 检测. *西北植物学报*, **32**, 1698-1703.
- [47] 冯霞, 孙振元, 韩蕾, 彭镇华 (2006) 多年生黑麦草体细胞无性系变异分析. *核农学报*, **20**, 49-50.
- [48] 李士生, 张玉玲 (1990) 小麦愈伤组织细胞的姐妹染色单体交换. *遗传学报*, **17**, 365-368.
- [49] 张春义, 杨汉权 (1994) 植物体细胞无性系变异的分子基础. *遗传*, **16**, 44-48.
- [50] Hartmann, H. (1958) *Ego psychology and the problem of adaptation*. International Universities Press, New York.
- [51] Fukui, K. (1983) Sequential occurrence of mutations in a growing rice callus. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, **65**, 225-230.
- [52] Kaepler, S.M. and Phillips, R.L. (1993) Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **90**, 8773-8776.
- [53] Baulcombe, D. (2004) RNA silencing in plants. *Nature*, **431**, 356-363.
- [54] Peschke, V.M., Phillips, R.L. and Gengenbach, B.G. (1987) Discovery of transposable element activity among progeny of tissue culture—Derived maize plants. *Science*, **38**, 804-807.
- [55] Peschke, V.M. and Phillips, R.L. (1991) Activation of the maize transposable element Suppressor-mutator (Spm) in tissue culture. *Theoretical and Applied Genetics*, **81**, 90-97.
- [56] Yu, X., Li, X., Zhao, X., et al. (2011) Tissue culture-induced genomic alteration in maize (*Zea mays*) inbred lines and F1 hybrids. *Annals of Applied Biology*, **158**, 237-247.
- [57] Peschke VM, Phillips RL, Gengenbach BG (1991) TGenetic and molecular analysis of tissue-culture-derived Ac elements. *Theoretical and Applied Genetics*, **82**, 121-129.
- [58] Jiang, N., Bao Z., Zhang, X.Y., Hirochika, H., Eddy, S.R.,

- McCouch, S.R. and Wessler, S.R. (2003) An active DNA transposon family in rice. *Nature*, **421**, 163-167.
- [59] Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., et al. (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, **393**, 386-389.
- [60] Houdt, H., Ingelbrecht, I., Montagu, M., et al. (1997) Post-transcriptional silencing of a neomycin phosphotransferase II transgene correlates with the accumulation of unproductive RNAs and with increased cytosine methylation of 3' flanking regions. *The Plant Journal*, **12**, 379-392.
- [61] Xiao, W., Custard, K.D., Brown, R.C., et al. (2006) DNA methylation is critical for Arabidopsis embryogenesis and seed viability. *The Plant Cell Online*, **18**, 805-814.
- [62] Zavattieri, M.A., Frederico, A.M., Lima, M., et al. (2010) Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electronic Journal of Biotechnology*, **13**, 12-13.
- [63] LoSchiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., et al. (1989) DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Tag Theoretical and Applied Genetics*, **77**, 325-331.
- [64] Lu, G., Wu, X., Chen, B., et al. (2006) Detection of DNA methylation changes during seed germination in rapeseed (*Brassica napus*). *Chinese Science Bulletin*, **51**, 182-190.
- [65] Rival, A., Jaligot, E., Beulé, T., et al. (2008) Isolation and expression analysis of genes encoding MET, CMT, and DRM methyltransferases in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in relation to the "mantled" somaclonal variation. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 3271-3281.
- [66] Phillips, R.L., Kaeppler, S.M. and Olhoft, P. (1994) Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **91**, 5222-5226.
- [67] Devaux, P., Hou, L., Ullrich, S.E., et al. (1993) Factors affecting anther culturability of recalcitrant barley genotypes. *Plant Cell Reports*, **13**, 32-36.
- [68] 郝玉金 (2000) 柑桔和苹果等果树种质资源的离体保存及其遗传变异. 华中农业大学, 武汉.
- [69] Bhagwat, B. and Duncan, E.J. (1998) Mutation breeding of banana cv. Highgate (*Musa* spp., AAA Group) for tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* using chemical mutagens. *Scientia Horticulturae*, **73**, 11-22.
- [70] Karp, A. (1995) Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica*, **85**, 295-302.
- [71] 裴忠有, 孙守钧, 曹秀云, 吴耀民, 可成有, 马鸿图 (2000) 高粱 401-1 体细胞突变体遗传研究. *沈阳农业大学学报*, **31**, 242-245.
- [72] 袁学军, 王志勇, 郑轶琦, 刘建秀, 余建明 (2011) 假俭草体细胞抗寒突变体的获得及其 SRAP 分子鉴定. *草野学报*, **20**, 237-244.