

# 生物多倍体诱导方法研究进展

陶抵辉<sup>1,2</sup>, 刘明月<sup>1</sup>, 肖君泽<sup>2</sup>, 邓建平<sup>2</sup>

(1.湖南农业大学 园艺园林学院, 中国湖南 长沙 410128; 2.湖南生物机电职业技术学院, 中国湖南 长沙 410127)

摘要: 从生物多倍体的意义、多倍体基因组的形成、多倍体的人工诱导等方面进行了综述,总结了多倍体诱变的物理、生物和化学方法现状,并对生物多倍体诱导中存在的几个问题进行了初步探讨。

关键词: 多倍体; 诱导; 离体培养; 2n 配子; 微管微丝抑制剂

中图分类号: Q-3

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2007)S1-0006-08

## Advances in the Research on Induction Means of Biopolyploid

TAO Di-hui<sup>1,2</sup>, LIU Ming-yue<sup>2</sup>, XIAO Jun-ze<sup>2</sup>, DENG Jian-ping<sup>2</sup>

(1.College of Horticulture and Landscape, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, Hunan, China;

2.College of Biological and Electromechanical Polytechnic, Changsha 410127, Hunan, China)

Abstract: The significance of biopolyploids and formation of polyploidy genomes, ie, man-induced technique werrep. The current physical, biological and chemical ways were reviewed. The problems that existed in the process of polyploidy induction study were discussed.

Key words: Polyploid; Induction; in vitro; 2n gametes; microtubule and microfilament inhibitors

(Life Science Research, 2007, 11(4) S1: 006-013)

1916 年 Winker<sup>[1]</sup>在研究 *Salanum. nigum* 嫁接时从愈伤组织得到了四倍体植物, 首先引入了多倍体这一概念. 多倍体植物在自然界中普遍存在, 并被认为是推动植物进化的重要因素, 是物种形成的途径之一. 自然界中大约一半的被子植物, 三分之二的禾本科植物, 80%的草类, 18%的豆类是多倍体. 蓼科、景天科、蔷薇科、锦葵科、禾本科和鸢尾科中多倍体最多, 许多农作物及果树、蔬菜是多倍体, 如小麦、燕麦、棉花、马铃薯、花生、烟草、甘薯、苜蓿、山药、韭菜、芥菜、苦苣菜和香蕉等均为天然的多倍体. 多倍体在动物中较为罕见, 但也发现了一些多倍体动物, 如鱼、青蛙、鸡、扁形虫、水蛭、海虾等<sup>[2]</sup>, 另外哺乳动物中也鉴定出一只多倍体小鼠<sup>[3]</sup>. 首先发现动物多倍体的是比利时生物学家凡·培内登在研究马蛔虫后提出的. 随着大量分子生物学证据的积累, 有关杂交多倍体动

物物种形成的报道也越来越多<sup>[4]</sup>. Sping<sup>[5]</sup>提出了令人信服的证据, 证明人和其他一些脊椎动物也许是一些古代多倍体, 因为从醛缩酶到锌指转录因子等 50 多个基因家簇, 在无脊椎动物中是唯一的, 而在人类不同染色体上可以达到 4 个等位点与之对应. 另外医学上发现肿瘤细胞中也存在多倍体倾向, 常被认为是由于细胞循环畸变的结果, 但是也有人认为是细胞行为改变的原因. 由于植物繁殖比较容易, 如果自然形成的植物多倍体不能形成种子繁殖后代, 还能依靠营养器官的繁殖产生后代, 因而在生物进化过程中, 植物多倍体被保留下来. 而动物则不同, 尤其是动物有性别分化后, 大多数动物是雌雄异体, 染色体稍有不平衡, 就会造成联会紊乱, 致使动物个体不能繁殖延续, 而无性繁殖的个体, 往往对环境的适应能力不强, 在进化中难以形成稳定的种, 因而在自然界中多

收稿日期: 2007-09-27; 修回日期: 2007-11-27

作者简介: 陶抵辉(1965-), 男, 湖南宁乡人, 湖南农业大学博士研究生, 湖南生物机电职业技术学院研究员, 主要从事农作物育种研究, E-mail: dhuicn@126.com; 刘明月(1957-), 男, 湖南蓝山县人, 湖南农业大学教授, 博士生导师.

倍体动物少见。

自从人类发现生物多倍体现象以来, 各国科学家对此进行了深入研究, 并在农业生产上产生了深远影响。如利用多倍体植物具有生物产量高、器官巨大性、无核不育性、速生性、营养成分或有效成份增加、抗病抗逆能力提高等特性, 选育了大量多倍体农作物品种应用于农业生产, 产生了巨大经济效益和社会效益, 如三倍体西瓜、三倍体甜菜、三倍体毛白杨、异源多倍体小黑麦及花卉植物、中药材多倍体的应用。近 20 年来, 在多倍体水产动物研究上也取得了重大进展, 已先后获得了草鱼、鲤、大西洋鲑、虹鳟等 40 多种鱼类的三倍体及四倍体; 扇贝、中国对虾、日本绒毛蟹等 20 多种经济贝类和甲壳类的多倍体, 以其生长快、产量高、性成熟晚、个体寿命延长、肉质好、风味佳、抗性强等优势在生产上得到应用, 其中一些已进入了商品化生产, 达到了产业化水平。多倍体技术在生产上发挥着越来越重要的作用, 人们也越来越重视多方面研究和利用多倍体生物。

## 1 生物多倍体基因组的形成

从目前的研究结果看, 生物多倍体基因组主要起源于 3 种不同途径: 即体细胞染色体加倍 (somatic doubling)、未减数配子的融合 (union of unreduced gametes) 和多精受精 (polyspermy)<sup>[6]</sup>。体细胞染色体加倍可以发生在普遍薄壁细胞、分生组织细胞、幼胚或合子中, 普遍薄壁细胞和分生组织体细胞加倍常常导致产生混合性的嵌合体, 而合子或幼胚体细胞加倍则导致产生完全的多倍性孢子体。从细胞学机制上看, 体细胞染色体加倍是形成多倍体基因组的途径之一, 但对不同类群生物中体细胞加倍的自然发生频率、影响因素以及在物种形成和进化中的作用, 目前还缺乏系统研究。在人工诱导植物多倍体的过程中, 主要采用体细胞加倍方式进行。多精受精是指在受精时两个以上的精子同时进入卵细胞中, 这种现象已在向日葵 *Helianthus annuus* 等很多植物中观察到<sup>[7]</sup>。多精受精也是产生多倍体基因组的一条途径, 但目前普遍认为这不是一条主要途径。自然界绝大多数多倍体是通过未减数(2n)配子的融合而产生的。在减数分裂过程中染色体偶然不减数的现象在一些植物和动物中都已观察到, 这可能是源自第一次分裂染色体不减数, 也可能是由于第二次分裂只有

核分裂而不进行细胞分裂, 或者是在第一次分裂后即发生胞质分裂, 并不再进行第二次分裂, 从而导致产生二倍性的配子。不同生物可以通过不同的途径产生未减数的配子; 不同生物的生物特性不一样, 未减数配子发生频率也不一样。如在植物中行营养繁殖的多年生植物通常具有较高的未减数配子发生频率, Ramsey Schemske<sup>[8]</sup> (1998) 认为这可能是由于营养繁殖方式的存在, 使其对有性生殖的选择压力有所松弛, 从而为 2n 配子或其他无功能配子的产生提供了一个宽松的环境, 促进了 2n 配子的形成, 影响到多倍体的发生。在水产动物的多倍体人工诱导研究中, 主要利用极体排放时的条件控制达到抑制第一极体或第二极体的排放, 从而产生多倍体生物。在精卵结合后抑制卵母细胞第一极体的排放, 则可生成三倍体, 若抑制二倍体受精卵的第一次卵裂, 则产生四倍体。贝类多倍体诱导的机制在于抑制第一极体或第二极体的排放, 因为贝类排放的卵只有受精后才能继续进行减数分裂, 排出第一或第二极体。

自然界中多倍体的产生无论是经历何种途径, 其诱导因子往往是异常的环境条件, 如异常温度(极端高、低温)、水分和养分胁迫、创伤、雷电、射线等均能诱导多倍体的产生, 尤其在 2n 配子形成中这种影响作用更显著。二倍体富利亚薯 *Solanum phureja* 在长期低温的状态下, 产生不减数配子的频率高达 90%, 而在温度有起伏或温暖的环境中只有 57%<sup>[9]</sup>。Grant<sup>[9]</sup> 发现生长在低营养环境中的 F<sub>1</sub> 代吉莉属植物 *Gilia*, 其每朵花产生多倍体的频率大约是生长在高营养环境中的 900 倍。生物在它们的生境中经历了很多影响不减数配子产生的环境因素, 这表明自然环境的改变和大的气候变化是本质上产生多倍体的动力。选择压力也是促进未减数配子形成的重要因素, 由于恶劣的环境促进 2n 配子的形成, 因而也促进了多倍体的形成, 同时由于染色体组增加, 通常多倍体抗性好于二倍体, 导致自然界很多多倍体多分布在高纬度、高海拔地带或其他极端环境中。

多倍体的来源不外乎自然发生、人工合成和诱发突变等主要方式。自然发生的几率很低, 也很不均衡。自从发现多倍体及其利用价值以来, 各国科学家在人工定向诱变多倍体方面作了大量工作, 取得了令人瞩目的成绩, 在农业生产上产生了积极影响。

## 2 生物多倍体的人工诱导

生物多倍体的人工诱导主要采用物理、化学和生物学方法进行. 在成功的范例中, 植物多倍体诱导以化学方法为主, 物理、化学方法在水产动物多倍体诱导中采用较多, 而生物学方法在动、植物中均有采用.

### 2.1 物理方法

物理方法在水产动物多倍体诱导中主要有温度休克法、静水压法、电休克法及高盐高碱法. 温度休克(包括高温和低温休克), 其作用机制是温度的变化引起细胞内酶构型的改变, 不利于酶促反应的进行, 导致细胞分裂时形成纺垂体所需的 ATP 的供应途径受阻, 使已完成染色体加倍的细胞不能分裂, 从而诱导多倍体的产生. 该法主要注意对受精卵进行处理所应选择时刻、处理持续时间和处理时的温度 3 个因素. 洪一江等用冷休克法诱导三倍体兴国红鲤最佳条件为: 人工受精后 5~8 min, 将受精卵置于 2 的冷水中冷休克 10~15 min, 再迅速回温至正常水温 20~25 的水中, 可获得 70%~85% 的三倍体胚胎, 孵化率为 50%~70%. 冷水性鱼类宜用热休克法, 而温水性鱼类宜采用冷休克法. 静水压法系利用专门的静水压设备产生的压力施加于处理对象, 其作用机制是抑制纺垂体的微丝和微管的形成, 阻止染色体的移动, 从而抑制细胞的分裂, 通过抑制第二极体的排放或第一次卵裂产生多倍体. 该方法在水产动物中诱导率很高 (90%~100%), 处理时间短 (3~5 min), 且对受精卵损伤小, 孵化率高. 林琪等用静水压法诱导大黄鱼三倍体最佳条件为: 水温 20~26 受精 2 min 后, 对受精卵施以 450 kg/cm<sup>2</sup> 的静水压处理 2 min, 三倍体诱导率在 65.5%, 孵化率达 70%. 电休克法及高盐高碱法在水产动物多倍体诱导中近来才开始采用, 由于研究及工艺不太成熟而未被广泛采用. 电休克法采用直流或交流电对受精卵进行刺激, 一般电压为 10 V 左右. 高盐高碱法则是采用高 pH 或高盐诱导产生多倍体. 另外, 可利用人工雌核发育技术诱导四倍体, 即运用辐射处理(主要是紫外线)或温度处理等方法使精子染色体失活, 用失活的精子刺激卵进行雌核发育, 并施以处理, 阻止第一、二极体释放, 达到诱导多倍体的目的.

在植物多倍体诱导中, 物理方式主要有温度

离辐射(紫外线)、渗透压的改变、离心力、热冲击、超声波、干旱等环境胁迫、逆境处理等. 20 世纪初, 曾用切伤、嫁接、反复摘心法等使之形成加倍的不定芽, 如早期用番茄打顶机械损伤产生四倍体. “切断——愈伤组织法”在葡萄和甘蔗等植物上诱导多倍体试验获得成功 (华北农业大学等, 1976)<sup>[10]</sup>. 俄罗斯玛什金娜 (1990) 利用温度变化诱导白杨及其杂种二倍体花粉率达 94.4%, 用其与其它杨树正常雌花授粉杂交获得了 81.7% 的三倍体杨树个体<sup>[11]</sup>. 李云等 (2000) 采用极端温度处理毛新杨、银腺杨、银毛杨等雌花芽, 均获得了苗期具有巨大性和速生优势的三倍体植株<sup>[12]</sup>. 第一个合成的双二倍体是一个染色体自然加倍的六倍体普通小麦 × 黑麦的杂种, 就是通过热处理方式得来的. 在 1937 年以前, 瑞典植物学家曾用附有低温控制装置的“热刺激仪”使玉米受精后的合子发生染色体数目的加倍, 以此获得了多倍体植株. 辐射诱变常用的射线有电离射线(x 射线、 $\gamma$  射线、中子和  $\alpha$  射线)和非电离射线(紫外线和质子)等. 杨今后和杨新华 (1984) 利用照射剂量为 5 000 Rad 的  $\gamma$  射线辐照刚膨大或休眠的桑树冬芽, 获得了四倍体植株<sup>[13]</sup>. Co 射线处理萌动的杜仲种子可以产生多倍体<sup>[14]</sup>. Smith-Mk<sup>[15]</sup> 抗枯萎病 4 号小种矮型香蕉品种进行  $\gamma$  射线诱导获得突变型四倍体. 物理方法在植物多倍体诱导中系采用类似异常环境条件的处理方法, 其诱变率低, 定向性差, 嵌合体严重, 在一些具营养繁殖优势的植物上有应用, 目前采用该方法诱导正逐步被淘汰.

### 2.2 生物学方法

在水产动物多倍体诱导中, 主要采用的生物学方法有远缘杂交、细胞融合、核移植等. 远缘杂交在鱼类上应用较多. 四倍体与二倍体贝类杂交生产三倍体贝类, 三倍体率高达 100%, 该方法简单, 操作方便, 避免了理化处理时环境因素的影响, 能提高胚胎的孵化率和幼虫的存活率, 适合于生产性养殖. 利用四倍体与异种二倍体杂交可生产异源三倍体, 目前, 太平洋牡蛎四倍体与近江牡蛎二倍体杂交已获异源三倍体后代. 鱼类中通过四倍体与二倍体杂交获得了三倍体虹鳟. 细胞融合指通过对两个细胞施加一定处理, 使其细胞融合, 成为一个细胞, 最终形成四倍性的胚胎, 主要诱导囊胚细胞与囊胚细胞、囊胚细胞与未受精卵、囊胚细胞与受精卵或受精卵与受精卵之间的细胞融合. 该项技术在淡水鱼及藻类育种方面有试尝

试和应用,取得了一定进展.在细胞融合中,聚乙二醇(PEG)为最常用、效果最好的融合剂,脂质体、激光和电融合也有一定的应用价值.姜卫国等<sup>[16]</sup>用聚乙二醇诱导 2 个分裂球融合产生了一定比例的合浦珠母贝四倍体,特别是 PEG 和 CB(细胞松弛素 B)共同处理能产生 20%以上的四倍体胚胎,但幼虫没有培育成功.Guo<sup>[17]</sup>用 PEG 对太平洋牡蛎进行处理诱导培育四倍体,分裂球间的融合产生了 30%的四倍体,并培育到了 D 型幼虫.细胞融合技术是建立在细胞和组织培养技术基础上的,随着动物细胞培养技术的不断研究和发展,该技术将在多倍体创造中发挥重要作用.核移植技术精细和难度大,通过核移植获得多倍体的方法还处于初始阶段.

生物多倍体诱导法在植物领域主要采用有性杂交、胚乳培养、细胞融合(体细胞杂交)、组织培养等.有性多倍化比体细胞多倍化有更多的生物学特点,如更高的杂合性和更高的育性,且与多倍体自然形成的过程有相似之处,一是利用  $2n$  配子,二是利用多倍体亲本.Nilsson-Ehle(1938)最早用四倍体与二倍体杂交获得三倍体无籽西瓜,从而揭开了无籽西瓜应用于生产实践的序幕.Seitz(1954)发现灰杨(*P.canescens*)两性花上的一些花粉没有减数分裂,体型特大,经检测发现为二倍体花粉,用这些花粉对两性花上的雌花进行授粉,得到了大约 1%的多倍体<sup>[18]</sup>. $2n$  配子在自然界广泛存在,利用天然的或理化诱导的  $2n$  配子与二倍体植株的  $1n$  配子杂交获得三倍体,可以大大缩短育种年限,在一些行无性繁殖的果树、林木、马铃薯等应用研究上有积极意义.被子植物中的胚乳是双受精的产物,为一个精细胞与 2 个极核经双受精而来,具有双亲的遗传成份,为三倍体组织,对育种后代性状有一定预见性.通过胚乳培养的三倍体植物具有较高遗传稳定性,其果实是无籽的,胚乳培养目前已成为改良果树的重要途径.如柑桔<sup>[19]</sup>(*Citrus reticulata*)、苹果<sup>[20]</sup>(*Malus pumila*)、猕猴桃、西番莲等经胚乳培养均已获得三倍体植株.山茱萸、枸杞由于果核大、种子多带来加工困难,且降低产量和质量,我国已成功用枸杞胚乳诱变获得了染色体接近三倍体的植株<sup>[21]</sup>.木本植物檀香、杜仲,果树中的红江橙、柚、杨桃等均已成功获得胚乳培养植株.细胞融合或称体细胞杂交或原生质融合,是采用人工方法把分离的不同属或种的原生质体诱导成为融合细胞,再经

离体培养,诱导分化成为多倍体生物.其具体作法是用纤维素酶和果胶酶处理植物细胞,得到大量无壁的原生质体,再经化学或物理方法诱导异核体,进一步融合后成为共核体,经培养后诱导分化出同源或异源多倍体植株.原生质融合是杂交在细胞水平上的发展,克服了植物远缘杂交障碍,是创造多倍体的新途径.1960年,Cocking首次运用酶法去除植物细胞壁获得原生质体.K·J·Kasha等对花粉进行核融合实验,得到了染色体加倍的大麦,这是多倍体育种在农业发展领域中的重大里程碑.Teodoro cardi等<sup>[22]</sup>利用电融合技术将马铃薯和野生种的二倍体原生质体融合,得到了比亲本更有活性的再生植株.自1985年Ohgawara等采用聚乙二醇诱导获得柑桔属与枳属间体细胞杂种以后,柑桔体细胞杂交取得了长足进展,通过原生质融合获得体细胞杂种和胞质杂种已经成为世界范围内柑桔品种改良的重要方法<sup>[23]</sup>.随着化学融合、电融合、PEG融合法技术的发展,已在近百种种内、种间和属间原生质体融合获得了再生植株.组织培养中的“体细胞无性系变异”是一种普遍现象,其中染色体倍性化变异是一个重要方面,在不添加任何诱变剂的情况下,可产生人工多倍体.向日葵瘤组织培养 16 个月时,二倍体占优势,28 个月后,一半的组织为四倍体,其中一个组织系的八倍体细胞多至 96%.邓秀新等<sup>[24]</sup>(1985)在柑桔愈伤组织培养基中加入 1.5 mg/kg 的 2,4-D 处理后,多倍体细胞由对照的 2.5% 提高到 26.0%.Michael 等在未加任何诱变剂的情况下从西瓜的子叶培养中得到了频率较高的四倍体<sup>[25]</sup>.马国斌等<sup>[26]</sup>用西瓜和甜瓜的未成熟子叶、子叶和真叶作为外植体进行离体培养,诱导再生植株过程中发生染色体数目变异,获得了较高频率的四倍体变异.有报道石刁柏和胡萝卜的组织培养过程很容易产生四倍体.利用组织培养方法我国已获得了苹果、葡萄、芦笋、百合等园艺植物的多倍体材料.研究中发现染色体加倍效果与材料的发育阶段、取材部位、培养基类型、培养条件如光照、温度等密不可分,激素种类及其浓度对诱导也有一定作用.郭晓红<sup>[28]</sup>等认为,激素及其累积效应对染色体产生了作用,但其机理有待进一步研究.

### 2.3 化学诱变

采用化学诱变剂进行多倍体诱导是目前最常用、最普遍、最有效、最经济的方法,已经在生产上产生了积极作用.进入商业化和产业化领域.

## 2.3.1 化学诱导剂

### 2.3.1.1 秋水仙素 (Colchicine)

秋水仙素是一种被广泛应用的多倍体化学诱导剂, 在动植物多倍体诱导中均有应用. 它是从百合科秋水仙属秋种番红花秋水仙 (*Colchicum autumnale*) 的种子、球茎中提取出来的一种植物碱, 一般为淡黄色粉末, 纯品为极细的针状无色晶体, 分子式  $C_{22}H_{25}NO_6 \cdot 12H_2O$ , 熔点为 155 , 易溶于冷水、酒精、绿仿, 难溶于热水、乙醚等, 对人体有剧毒, 有麻痹作用, 能使中枢神经系统麻醉而引起呼吸困难. 秋水仙素一般有效诱导浓度为 0.000 6%至 1.6%, 秋水仙素诱导生物体内染色体组加倍的机理与其细胞内微管、着丝粒的结构特性和功能表达密切相关, 秋水仙素是生物细胞内与微管发生特异性作用的专一物质, 适宜浓度的秋水仙素能有效破坏纺锤丝的形成而仍然保持细胞的活性, 可以使分生细胞在复制时所加倍的同源染色体在细胞分裂时不能分向两极, 从而导致新生细胞的染色体加倍. 在一定浓度范围内, 秋水仙素对染色体结构无破坏作用, 在遗传上很少造成其它不利变异, 处理一定时间的细胞可在药剂去除后恢复正常分裂, 形成染色体加倍的多倍体细胞. 近年来随着植物组织培养技术的发展, 结合多倍体诱导, 经秋水仙素处理的器官或组织可被诱导产生不定芽而获得整倍体. 刘庆忠等<sup>[27]</sup>以苹果叶片为材料诱导不定芽, 采用低浓度长时间处理, 发现秋水仙素存在于叶片不定芽原基形成的全过程中, 大大减少或排除了嵌合体形成的可能性.

### 2.3.1.2 除草剂

一些除草剂在某些植物多倍体诱导中表现多倍化程度高、药害轻, 值得引起重视和注意. 如 Chalak<sup>[28]</sup>用安磺灵 (*Oryzalin*, 一种二苯基胺类除草剂) 获得了六倍体猕猴桃; 戊炔草胺 (*Pronamide*, 一种苯基酰胺除草剂)、甲基氨草磷 (*APM*, 一种磷酸酰胺除草剂 *Amiprofos-metyl*) 和氟乐灵 (*Trifluralin*) 在洋葱、甜菜、甘蓝胚培养中诱导多倍体已有成功报道. 张兴平<sup>[29]</sup>用抗微管形成的除草剂在西瓜染色体加倍上进行了试验研究, 认为秋水仙碱并非最佳加倍诱导剂, 实验表明用低浓度 (15~30  $\mu\text{mol/L}$ ) 的重氮除草剂 (如 *Oryzalin*) 可十分有效诱导西瓜染色体加倍, 这类除草剂与纺锤丝蛋白的结合专一, 对染色体损伤小, 引起其他变异的机率比秋水仙碱小, 并且在这些再生植株中不存

在嵌合体和植株生长延迟现象. 黄权军等<sup>[30]</sup>用秋水仙碱、戊炔草胺、安磺灵、氟乐灵四种抗微管物质诱导毛新杨 2n 花粉粒研究认为: 秋水仙碱虽然能够诱导高比率的 2n 花粉, 但对被处理的植物材料产生了很大的毒害, 大大降低了花粉产量, 这三种抗微管的除草剂对植物微管蛋白有很强的结合力, 对动物微管蛋白的结合力则较低, 而秋水仙碱对植物微管蛋白的亲性和性要低于对动物微管蛋白的亲性<sup>[31]</sup>, 刚好和另外 3 种除草剂的性质相反, 3 种除草剂一般在  $\mu\text{mol/L}$  浓度下就能诱导植物染色体加倍, 而秋水仙素的浓度则需高出几十倍甚至上百倍, 用以上除草剂更经济有效, 对植物材料及人体毒性更小. *APM* 是一种直接干扰植物微管合成的特异性药物, 其作用类似秋水仙素, 但 *APM* 更能专一性地抑制植物微管蛋白的聚合.

### 2.3.1.3 其他植物多倍体诱导剂

自从 1937 年 Blakeslee 和 Avery 发现秋水仙素具有多倍体诱导效果以来, 已发现有 200 余种化学试剂对植物多倍体有诱导作用, 主要报道的有吲哚乙酸 (*IAA*)、萘啶乙烷、芫荽脑、8-羟基喹啉、对一二甲苯、2, 4-D、萘啶戊烷、氧化亚氮 ( $N_2O$ )、甲基黄酸乙酯、羟胺、吡啶、叠氮化合物、乙烯亚胺、萘乙烷、水合三氯乙醛、二氯代苯、甲苯磺胺苯基苯汞、甲基磺酸乙酯 (*Ethyl meghylsulfonate*, *EMS*)、鬼臼树脂、六氯化苯、三氯乙醛、氯化亚汞、N-亚硝基-N'-二甲胺、哥罗仿、乙醚、亚硝胍 (*N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine*, *MNNG*), 其它苯及其衍生物、有机砷制剂、有机汞制剂 (富民隆、谷仁乐生、磷酸乙基汞)、磺胺剂、藜节碱及其它植物碱、麻醉剂、生长剂、激动素、抗生素等. 这些诱导剂目前已较少使用.

### 2.3.1.4 诱导辅助剂

在生物多倍体诱导过程中, 二甲基亚砷 (*DMSO*)、吐温、赤霉素、甘油、BA 等作为辅助药剂, 在提高染色体加倍效果上有一定的积极作用<sup>[32]</sup>. 有意思的是二甲基亚砷 (*DMSO*) 无论在植物多倍体诱导中还是在水产动物多倍体诱导中均有辅助作用, 在植物多倍体诱导中, *DMSO* 添加浓度一般为 2%~4%, 水产动物多倍体诱导中添加浓度为 0.1%~2%. 二甲基亚砷 (*DMSO*) 是运输化学物质进入组织的一种载体, 在多倍体诱导过程中加入 *DMSO* 可作为一种助渗剂, 能促进化学诱导剂快速进入生物细胞, 从而缩短处理时间, 减少毒害作用, 提高处理效果, 促进多倍化. 谭德冠<sup>[33]</sup>等采用

愈伤组织浸渍在过滤灭菌的秋水仙素溶液(2 500 mg/L 22 h 及 7 500 mg/L 10 h)加 DMSO(体积浓度 2%)诱导刚果 12 号桉离体组织多倍体变异率达到 40%。采用细胞松弛素 B(CB)诱导水产动物多倍体时, DMSO 作为一种助渗剂和保护剂, 使用浓度一般为 1%<sup>[34]</sup>, CB 为一种致癌剂, 水溶性差, 溶于 DMSO 后可促进多倍化, 且处理后需用含 1% DMSO 的水浸洗受精卵, 去除残留的 CB。

### 2.3.1.5 水产动物多倍体诱导剂

6-二甲基氨基嘌呤(6-dimethylaminopurine, 化学式  $C_7H_9N_5$ , 简称 6-DMAP), 为嘌呤霉素的类似物, 抑制蛋白质磷酸化, 通过抑制特定的酶, 破坏微管聚合中心, 使微管不能形成, 从而抑制极体的形成和释放, 形成多倍体生物。6-DMAP 具有水溶性、毒性小、易操作等特点, 逐渐成为目前主流的水产动物化学诱导剂<sup>[35]</sup>。

细胞松弛素 B(Cytochalasin B, 简称 CB), 真菌的一类代谢产物, CB 处理诱发一系列细胞学效应, 如细胞骨架的变化、多核化、破坏微丝等<sup>[36]</sup>。一般认为 CB 特异性破坏微丝, 最终导致细胞分裂时由微丝构成的收缩环解体, 抑制细胞质分裂, 阻止极体释放, 从而产生多倍体。CB 毒性较强, 对其诱导的胚胎及生产者易产生影响, 需用 DMSO 作为保护剂, 其诱导的多倍体嵌合现象较严重。

咖啡因(Caffeine): 其作用效果在于提高细胞内的  $Ca^{2+}$  浓度, 由于微管对  $Ca^{2+}$  浓度敏感, 当  $Ca^{2+}$  浓度极低或高于  $10^{-3}$  时, 会引起微管二聚体的解聚, 阻止细胞分裂, 从而形成多倍体<sup>[37]</sup>。

此外, 聚乙二醇(PEG)、氯化钙、KCl 等化学试剂对抑制细胞分裂, 使染色体加倍也有一定作用。新开发的无毒、高效、经济的新型诱导剂 PA、PC 正在研究应用中。

## 2.3.2 化学诱导方法

### 2.3.2.1 在体诱导

化学诱变剂的诱导作用只在细胞分裂时期起作用, 对处于静止状态的细胞没有作用, 因而处理的生物组织必须是分裂最活跃、最旺盛的部分或时期, 在植物中一般处理萌动的或刚发芽的种子、幼苗、嫩枝的生长点、芽、花蕾、枝条、球根花卉的鳞片等, 方法一般为用一定浓度的化学诱变剂或乳剂对材料进行浸渍、涂抹、注射、滴液等。为防止药液蒸发过快, 处理部位可加上小棉球、罩上塑料膜(盖), 调入羊毛脂或脱脂棉, 配制成油膏。琼

脂凝胶包埋胚芽等方法解决诱导剂浓度变化问题。另外加入 DMSO 等助渗剂可提高生物组织的渗透性, 使药物容易进入细胞, 提高诱变效果。采用该方法已在多类蔬菜、果树、林木、花卉等上成功获得同源三倍体、四倍体品系。但这种传统的在体诱导处理方法诱变率低、嵌合率高、后代选择难度大, 不易获得大量四倍体且获得的四倍体植株稳定性低等缺点, 同时这种整体水平上染色体加倍的诱导受环境干扰, 并可能产生回复突变<sup>[38]</sup>, 目前应用越来越少。

### 2.3.2.2 离体诱导

随着植物组织培养技术的发展, 越来越多的作物可以通过组织培养再生植株, 使得化学诱变剂在离体组织水平上诱导细胞内染色体加倍成为可能。离体与在体(或称整体)诱导相比较, 有如下几个优点: 1) 容易控制实验条件和重复实验结果; 2) 提高工作效率, 在离体状态下可同时处理大批组织细胞, 从而得到大批染色体加倍的植株。如黄慧君等<sup>[39]</sup>在诱导水稻四倍体时发现, 用组织培养加化学诱导剂的方法平均诱导率比种子发芽期浸种诱导率提高 10 倍, 同时能保证多倍体筛选及选择的成功, 并且一旦筛选出多倍体, 能在短时间内迅速繁殖大量试管苗以供应用; 3) 可减少或避免异倍性细胞嵌合体, 即组织培养技术可通过悬浮培养等手段使培养的细胞高度分散, 直至变成单个细胞群或单个细胞, 由此可克服嵌合体现象, 同时可获得同质的多倍体, 提高诱变效果。

离体外植体一般采用愈伤组织、胚状体、茎尖组织、子房、原生质体、叶片、茎段、丛生芽、种子、胚或单个细胞、花粉等作材料。离体条件下染色体加倍的方法通常有 3 条途径: 1) 将外植体直接用化学诱变剂处理后, 转入不含诱变剂的分化培养基进行分化培养, 获得多倍体植株。亦可将无菌苗的茎尖、茎段、叶片或鳞片、茎尖生长点等用诱变剂处理后, 再进行分化培养而获得多倍体; 2) 在含有化学诱变剂的培养基中培养一段时间进行诱导加倍, 再转入到不含诱变剂的分化培养基中分化成苗, 这种方法避免了诱导剂对外植体的直接伤害; 3) 间接诱导法, 先在不含诱变剂的培养基中培养一段时间, 再转移到含诱变剂的培养基中培养, 培养基可以是固体、半固体培养基, 也可以是液体培养基进行悬浮培养。郑思乡等<sup>[40]</sup>用 0.2% 秋水仙素处理金鱼草发芽种子 24 h, 再转入无添加诱变剂的分化培养基中培养, 获得了

47.1%的变异率,认为采用组织培养结合化学诱变剂对金鱼草进行同源四倍体的诱导可明显提高诱变率,组培过程中获得的大量丛生芽可使变异得到充分表现,利用丛生芽途径可很快稳定四倍体和扩大繁殖系数。

在离体诱导过程中,作物种类、外植体类型、培养基类型、激素种类及比例、基因型、诱导剂种类等均影响多倍体的诱导频率。王小华<sup>[40]</sup>等认为,采用不定芽技术结合组织培养可以加快多倍体的纯化过程,在植物诱导过程中,变异细胞多发生在L-1层或L-层,或成扇形突变,由于变异细胞生活力往往弱于二倍体细胞,竞争力弱,往往表现为回复突变。将变异细胞、组织或器官诱导产生不定芽,由于不定芽由一个或几个表皮细胞发育而来,若这部分细胞是多倍体,则形成的不定芽为多倍体,及时分割继续培养,从而达到早期选择及稳定的目的。

### 2.3.2.3 水产动物化学诱导法

与植物多倍体诱导不同的是,水产动物多倍体诱导根据各种类生育特性的差异进行。如鱼类、贝类、中国对虾等采用诱变剂处理离体卵、精子及受精卵,抑制受精卵第一极体或第一极体的排放,诱导多倍体。对于具抱卵孵化特性的河蟹,为了克服受精卵离体培养困难,采用自然受精的受精卵连同母体一起处理进行多倍体诱导<sup>[42]</sup>。

## 3 问题与展望

自然界中,尽管通过同倍体之间的杂交可以产生新的物种,但是在分布区域重叠的情况下,通过多倍体化形成新物种具有更加重要的意义<sup>[43]</sup>,多倍化在高等植物的进化中起着重要的作用。但令人矛盾和费解的现象是自然界在合成多倍体方面取得了巨大的成功,而人类在这方面却收效甚微<sup>[44]</sup>。其原因一方面可能是自然多倍体是长期自然选择和进化的产物,人类难以在短期内重复和完成这一过程;另一方面可能对多倍体的遗传机制还缺乏深入了解;再者自然诱变环境难于模拟和重复以及目前采用的诱变方法不当、研究不够深入等也是重要原因之一,加强诱变方法及其机理的研究十分必要。

在生物多倍体诱变方法中,采用物理、化学、生物等方法相结合进行多倍体诱导的报道不多见,新方法的采用也很少报道,这些方面的研究值得深入。黄群策等<sup>[45]</sup>采用 $N_2^+$ 离子注入处理后对利

用秋水仙素诱导水稻多倍化的效果明显,认为低能离子束作为新的诱变源具有质量、能量、电荷三位一体的功效,它对生物体的作用主要表现为促使细胞内容物发生原子位移、重组和化合,离子束的诱变作用或刺激作用有助于提高诱导多倍体水稻材料的效果。这对于多倍体诱变寻找新的突破口和建立新的技术体系有所启示。

生物多倍体诱导过程中出现嵌合体的现象是经常的,即一部分细胞或器官为二倍体,而另一部分则为多倍体。在诱导过程中,二倍体向多倍体转化,如果处理时间短、浓度低,在解除处理后二倍体细胞多于多倍体细胞,在竞争中具优势,则产生回复突变,细胞或器官经继续分裂生长后均回复为二倍体,诱变没有效果。随有处理时间延长,二倍体细胞数目越来越少,多倍体细胞数目越来越多,当多倍体细胞数量明显多于二倍体细胞时,去掉诱导剂的抑制作用,多倍体细胞在与二倍体细胞的竞争中处于优势时,则形成多倍体生物个体。当然,当诱变剂浓度过高或处理时间过长时,虽然被诱导的生物体细胞均变为多倍体或高倍体,但细胞活力近于丧失,难于恢复分裂能力而死亡。准确地掌握这一处理时间、浓度、时期对各种生物来说千差万别,工作量大,这其中是否存在一些共性、机理如何?均值得深入研究。近年采用的愈伤组织或其他外植体处理,进行悬浮培养、单细胞培养及植物组织培养中的丛生芽利用将大大提高多倍体纯合体的选择效率。另外,动植物多倍体诱导方法上有同有异,是否存在一些共性,互相参考诱导方法是否会产生意想不到的效果?

自然多倍体形成的主要途径为利用 $2n$ 配子,而目前在人工多倍体诱导中很少采用,对于 $2n$ 雄配子的研究和应用较为深入,而对于 $2n$ 雌配子的研究和应用相对较少。我们可以效法天然多倍体的形成途径,利用 $2n$ 配子进行生物多倍体育种, $2n$ 配子的杂合性和二倍性,使其在生物多倍体育种上极具诱惑力,深入研究 $2n$ 配子的产生条件、遗传控制机制、选择高产 $2n$ 配子的生物个体运用到育种中,必将事半功倍,推动多倍体育种工作朝着简明、实用方向发展<sup>[46]</sup>。

化学诱变是人工创造多倍体的主要方法,而目前使用的化学诱变剂大多为微管微丝抑制剂或称解聚剂,然而目前对化学诱变剂究竟怎样对微管微丝起作用,在诱导过程中微管微丝的形为和结构变化如何等方面研究不多。秋水仙碱为最常

用的诱变剂,近年发现一些微管抑制剂如 APM、Oryzalin、Pronamide、Trifluralin 似乎对某些植物多倍化更为有效。其它一些微管微丝特异性抑制剂<sup>[47]</sup>是否可以用于生物多倍体诱导?如微丝特异性抑制剂细胞松弛素 A (Cytochalasin A, CA) 和细胞松弛素 D (Cytochalasin D, CD), 化学合成微管微丝抑制剂<sup>[48]</sup>如查尔酮类、吡嗪类、咪唑并哒嗪类、苯甲酰胺类、芳酰胺类、咪唑并哒嗪类等。采用新型诱导剂、深入研究具体诱导方法和机理,将在生物多倍体应用上起关键作用。

#### 参考文献 (References):

- [1] WINKLER H. Über die experimentelle erzeugung von pflanzen mit abweichend chromosomenzahlen[J]. Z Bot, 1916, 8: 417-531.
- [2] 叶名文. 动物植物中的多倍体现象及形成[J]. 生物学通报, 1998, 33(2): 21-23.
- [3] THOMAS G. Polyploid: From evolution to landscape plant improvement[J]. Proceeding of the Conf Metropdian Tree Improvement Alliance, 2000, 2: 225-230.
- [4] BULLINI L. Origin and evolution of animal hybrid species[J]. Tree, 1994, 9: 422-426.
- [5] SPING J. Vertebrate evolution by interspecific hybridisation: Are we polyploid? [J]. FEBS Lett, 1997, 400: 2-8.
- [6] RAMSEY J, SEHEMSKER D W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploidy formation in flowering plants[J]. Anun Rev Ecol syst, 1998, 9: 467-501.
- [7] VIGFUSSON E. On polyspermy in the sunflower[J]. Hereditas, 1970, 64: 1-52.
- [8] mc HALE N A. Environmental induction of high frequency of 2n pollen formation in diploid Solanum[J]. Cana J Gene cyto, 1983, 25: 609-615.
- [9] GRANT V. Cytogenetics of the hybrid *Gilia millefolia* achil-leafolia I. Variations in meiosis and polyploidy rate as affected by nutritional and genetic conditions[J]. Chromosoma, 1952, 5: 372-390.
- [10] 华北农业大学, 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 广东农林学院, 广东省植物研究所. 植物遗传育种学[M]. 北京: 科学出版社, 1976. 395-436.
- [11] 玛什金娜. 获得乔木树种二倍体花粉的方法[J]. 国外林业, 1990, 1: 20-24.
- [12] 李云, 朱之悌, 田砚亭, 等. 极端温度处理白杨雌花培育三倍体植株的研究[J]. 北京林业大学学报, 2000, 22(5): 7-12.
- [13] 杨今后, 杨新华. 桑树辐射育种的研究. IV. 多倍突变体的诱导及其鉴定[J]. 蚕业科学, 1984, 10(1): 9-12.
- [14] 毕春侠, 张存旭, 郭军战, 等. 杜仲多倍体的诱导[J]. 河北林果研究, 1999, 14(2): 148.
- [15] SMITH M, HAMILL S D, LANGDON P W. pegg-KG[J]. Mutation Breeding Newsletter, 1993, 40: 4-5.
- [16] 姜卫国, 林岳光, 何毛贤. 合浦珠母贝人工诱导四倍体的研究[J]. 热带海洋, 1998, 17(2): 45-51.
- [17] GUO X, COOPER K, HERSHBERGER W K, et al. Tetraploid induction with mitosis inhibition and cell fusion in the pacific cyster[J]. Crassostrea Gigas (Thunberg) J Shellfish Res, 1994, 13(1): 193-198.
- [18] SEITZ F W. The occurrence of triploids after self-pollination of anomalous androgynous flowers of a Grey Poplar[J]. Z Forstgenet, 1954, 3(1): 1-6.
- [19] 王元. 柑桔胚培养技术的研究 - 多胚性品种未熟胚的早期离体培养[J]. 园艺学报, 1981, 18(1): 1-6.
- [20] 毋锡金. 苹果胚乳愈伤组织的诱导和植株分化[J]. 中国科学, 1977, (4): 28.
- [21] 王莉, 陈素萍, 秦金山, 等. 枸杞胚乳植株诱导和它的倍性水平[J]. 植物学报, 1985, 12(6): 440.
- [22] TEODORO C. Physid[J]. Plant, 1993, 12: 299-302.
- [23] GROSSER J W, OLLITRAULT P, OLIVAEES F O. Somatic hybridization in citrus: an effective tool to facilitate variety improvement[J]. In vitro Cellular and Developmental Biology Plant, 2000, 36(6): 433-449.
- [24] 邓秀新, 刘功弼. 不同诱变剂对柑桔愈伤组织染色体影响[J]. 湖北农业科学, 1985, (3): 19-21.
- [25] MICHAEL E, COMPTON J, GRAY G W E. Identification of tetraploid regenerates form cotyledous of diploid watermelon cultured in vitro[J]. Euphytica, 1996, 87: 165-172.
- [26] 郭晓红, 慈忠玲, 孙静, 等. 珍稀濒危树种—四合木组织培养过程中的染色体变异[J]. 内蒙古农业大学学报, 2001, 22(1): 55-59.
- [27] 刘庆忠, 赵红军, 刘鹏, 等. 秋水仙素处理离体叶片获得皇家嘎拉苹果四倍体植株[J]. 果树学报, 2001, 18(1): 7-10.
- [28] CHALAK L, LEGAVE J M. Oryzalin combined with adventitious regeneration for an efficient chromosome doubling of tri-haploid kivi fruit[J]. Plant Cell Reports, 1996, 16(1): 97.
- [29] 张兴平. 生物技术在西瓜甜瓜遗传改良中的应用[J]. 园艺学年评, 1996, 2: 107-129.
- [30] 黄权军, 张志毅, 康向阳. 四种抗微管物质诱导毛新杨 2n 花粉粒的研究[J]. 北京林业大学学报, 2002, 24(1): 12-15.
- [31] WAN Y, DUNCAN D R, RAYBURN A L, et al. The use of antitubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther derived maize callus[J]. Theor Appl Genet, 1991, 81: 205-211.
- [32] QUARIN C, ESPINOZA F, MARTINEZ E, et al. Chromosome doubling of mature haploid Brussels sprout plants by colchicines treatment[J]. Sexual Plant Reproduction, 2000, 13(5): 315-322.
- [33] 谭德冠, 庄南生, 黄华孙. 刚果 12 号桉离体组织的多倍体诱导[J]. 热带作物学报, 2005, 26(2): 50-54.
- [34] 何毛贤, 姜卫国, 潘金培. 海洋贝类多倍体人工诱导操作研究进展[J]. 南海研究与开发, 2001, 1: 28-40.
- [35] 王冬群, 李太武. 6-DMAP 在贝类多倍体诱导中的应用[J]. 河北渔业, 2003, 127(1): 3-4.
- [36] COPELAND M. The cellular response to cytochalasin B: a critical overview[J]. Bytologia, 1974, 37: 709-727.
- [37] 山本敏. 三倍体诱导方法在水产养殖中的应用[J]. 养殖, 1989, 6: 134-137.
- [38] 郭启高, 宋明, 梁国鲁. 植物多倍体诱导育种研究进展[J]. 生物学通报, 2000, 35(2): 8.
- [39] 黄慧君, 黄道强, 刘丽娟, 等. 水稻体细胞同源四倍体的人工诱导及遗传特性研究[J]. 广东农业科学, 1995, (1): 9-12.
- [40] 郑思乡, 雷小云, 董志渊, 等. 离体培养条件下金鱼草多倍体诱导研究[J]. 云南林业科技, 2003, 105(4): 80-83.
- [41] 王小华, 熊丽, 屈云慧, 等. 中国桔梗多倍体诱导与鉴定[J]. 云南植物研究, 2006, 28(6): 593-598.
- [42] 崔朝霞, 相建海, 周令华, 等. 中华绒螯蟹多倍体诱导技术改进[J]. 海洋学报, 2005, 27(1): 149-153.
- [43] TURELLI M, BARTON N H, COYNE J A. Theory and speciation[J]. Trends Ecol Evol, 2001, 16(7): 330-343.
- [44] 李再云, 华玉伟, 葛爱宏, 等. 植物远缘杂交中的染色体行为及其遗传与进化意义[J]. 遗传, 2005, 27(2): 315-324.
- [45] 黄群策, 李玉峰, 余增亮. 离子注入后诱导水稻多倍化的效果[J]. 激光生物学报, 2006, 15(2): 118-122.
- [46] 张正海, 康向阳. 植物 2n 配子发生及其遗传标记研究进展[J]. 遗传, 2006, 28(1): 105-109.
- [47] 杨民和, 郑重, LEACH J E. 微管、微丝特异性抑制剂处理对水稻抗病性的影响[J]. 植物病理学报, 2003, 33(2): 156-161.
- [48] 武连宗, 宋丹青. 化学合成微管微丝抑制剂的研究进展[J]. 国外医学药学分册, 2004, 31(3): 129-133.