

·专题介绍·

植物体细胞无性系变异研究进展

李晓玲^{1, 2}, 丛娟², 于晓明³, 董英山^{1*}

¹ 吉林省农业科学院生物技术研究中心, 长春 130033

² 长春工业大学生物工程学院, 长春 130012

³ 东北师范大学细胞与遗传研究所植物分子表观遗传学实验室, 长春 130024

摘要 植物体细胞无性系变异是植物组织培养中的普遍现象, 泛指在植物细胞、组织和器官培养过程中, 培养细胞和再生植株中产生的遗传变异或表观遗传学变异。植物体细胞无性系变异的发生有其遗传学基础, 可从形态学、细胞学、生物化学和分子生物学等多个方面对其进行综合检测和鉴定。植物体细胞无性系变异是植物育种的有利资源, 但同时也是植物微繁和遗传转化工作中需要克服的一大难题, 一直被众多研究者所关注。本文分别从细胞学和分子生物学两个层次综述了植物体细胞无性系变异的遗传学基础及其鉴定方法的研究进展并就其在植物品质改良中的应用现状、存在的问题和应用前景进行了讨论。

关键词 遗传学基础, 鉴定方法, 品种改良, 体细胞无性系变异

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.

植物体细胞无性系变异, 又称植物体细胞克隆变异, 泛指在植物细胞、组织和器官培养过程中, 培养细胞和再生植株中产生的遗传变异或表观遗传学变异(Larkin and Scowcroft, 1981)。植物体细胞无性系变异的产生没有种属特异性, 出现的频率一般比较高(Smith and Drew, 1990)。植物通过体细胞无性系变异, 可产生一系列有益的新性状, 因此对植物品种改良和选育新品种具有重要的意义。然而体细胞胚或通过不定芽繁殖的植株经常出现高频率的体细胞无性系变异现象, 又使其成为微繁和遗传转化实践工作中需要克服的难题之一。因此, 植物体细胞无性系变异一直被众多研究者所关注。随着遗传学和分子生物学技术的不断发展和应用, 植物体细胞无性系变异的机理研究也取得了较大进展。目前, 植物体细胞无性系变异已成为多种植物种质资源创新及其良种选育的一条新途径。

1 遗传学基础

植物体细胞无性系变异的发生具有其遗传学基础, 具体

表现在显微水平的染色体数目和结构变异与分子水平的基因突变、碱基修饰、基因扩增或丢失、基因重排以及转座元件的激活而影响细胞核或细胞质基因的表达等(肖辉海和陈良碧, 2003)。

1.1 染色体变异

植物体细胞无性系再生植株的染色体变异包括染色体数目和结构变异两个方面。染色体数目变异又可分为倍性变异和非整倍性变异。到目前为止, 在水稻、小麦、大麦、玉米和大蒜等植物的愈伤组织或再生植株中均发现了较高频率的单倍体、三倍体、四倍体和八倍体等染色体倍数性变异现象(Sun et al., 1983; Larkin, 1984; Dolezel and Novák, 1985; 刁现民和孙敬三, 1999; Al-Zahim et al., 1999)。此外, 小麦、大蒜和芦笋等物种在组织培养过程中还发生了染色体非整倍性变异, 其中既有染色体数目的增加, 也有染色体数目的减少, 甚至还存在混倍体个体(Larkin, 1984; Al-Zahim et al., 1999; Juan and Ricardo, 2001)。在欧美杂种山杨体细胞无性系变异研究中, 也发现了类似的变化(詹亚

收稿日期: 2006-12-30; 接受日期: 2007-04-27

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30370768, 30490250)、国家863计划(No. 2006AA10Z120)和农业部野生资源保护与利用项目

* 通讯作者。E-mail: ysdong@cjaas.com

光等, 2006)。Amato 认为在体细胞培养过程中产生的染色体数目变异, 主要源自有丝分裂过程中纺锤体的异常。在细胞有丝分裂后期, 不同程度的纺锤体缺失导致染色体不分离、移向多极、滞后或不聚集, 最终产生变异细胞。同时, 培养细胞中的无丝分裂也是染色体数目变异的一个重要原因(Amato, 1985)。植物体细胞无性系染色体结构变异包括染色体断裂后经过修复和重新连接所形成的易位、倒位、缺失和重复。现已发现在黑麦草、小麦等植物的再生植株中均存在易位系(Evans and Sharp, 1983; 孙振元等, 2005)。在大蒜和欧美杂种山杨等植物的组织培养过程中, 也发现了诸如次缢痕延长、染色体加长、形成带有随体或长臂较长的大型染色体等染色体结构变异(Al-Zahim et al., 1999; 詹亚光等, 2006)。关于植物组织培养可导致能引起细胞染色体断裂的基因组冲击, 这方面已有很多报道。许多研究还表明断裂位点位于异染色质区, 而不是随机发生的。同时, 染色体断裂可导致易位、倒位和缺失等染色体结构变异(Benzion and Phillips, 1988; Lapitan et al., 1988)。

1.2 点突变、基因重排及基因的扩增和丢失

随着 RFLP、RAPD 等 DNA 分子标记技术的发展和运用, 人们开始在分子水平上认识植物体细胞无性系变异的机理。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。Evans 和 Sharp (1983) 在番茄无性系的 230 个再生植株中发现 13 个变异是由于单基因的点突变造成的, 突变频率高达 5.7%。目前, 点突变已被认为是引起水稻体细胞无性系变异的重要来源(高东迎等, 2002)。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。此外, 在正常的组织培养条件下, 植物基因组还可能发生扩增与丢失或基因重排, 这也是植物体细胞无性系变异的原因之一(Brettell et al., 1986)。

1.3 转座因子的激活

转座因子的激活也是导致植物体细胞无性系高频率变异的主要原因之一(Peschke et al., 1987; Nelson, 1988)。

在玉米的组织培养和再生过程中分别检测到活性 *Ac* 和 *Spm*(玉米的 2 个转座子系统)(Peschke et al., 1987; Peschke and Phillips, 1991), 成为支持这一假说的最初证据。此外, James 和 Stadler (1989)发现 *Mu* 因子在植物组织培养过程中也可保持转座活性, 并可产生新的 *Mu* 同源限制性片段。而对烟草叶片组织进行原生质体的分离与培养, 诱导了 *Tnt1A* 高效表达转座活性, 证明另一类植物转座元件——反转录转座子也可被组织培养所激活(Miller and Miller, 1982)。后来, 在水稻中又发现, 3 个反转座子家族(*Tos10*、*Tos17* 和 *Tos19*)在组织培养过程中均可被激活, 且转座频率随培养时间的延长而增加。同时通过对 *Tos17* 反转座子侧翼序列的分析, 表明其主要整合到植物基因组的低拷贝基因区(Hirochika et al., 1996), 说明反转录转座子的活动有可能导致基因突变。目前的研究结果证明, 在植物组织培养过程中, 许多低拷贝反转录转座子均可被激活(Hirochika et al., 1996; Liu et al., 2004a), 同时一些高拷贝反转录转座子也具有转座活性(Suoniemi et al., 1996)。但可能由于研究方法和技术的限制, 目前尚未发现高拷贝反转录转座子发生转座的直接证据。虽然对于植物组织培养导致转座因子激活引起的遗传学效应能否稳定遗传尚无定论, 但越来越多的证据表明转座因子的激活对植物体细胞无性系变异具有重要作用(朱至清, 1991)。

此外, 利用植物组织培养研究转座因子激活与 DNA 去甲基化变异的相关性, 也日益引起人们的关注。Liu 等(2004a)在水稻组织培养过程中, 发现 *Tos17* 的重新激活伴随着 DNA 去甲基化变异。而在培养基中添加 5-aza-dC 等去甲基化试剂处理材料, 在发生 DNA 甲基化变异的再生植株中却没有检测到具有活性的 *Tos17* 反转座子, 说明 *Tos17* 的活性可能还受到其它机制调控。

随着研究的不断深入, 许多学者对转座因子激活导致植物体细胞无性系变异的机制进行了推断。Larkin 等认为, 在植物组织培养过程中, 由于细胞分裂速度快, 异染色质复制落后, 引起细胞分裂后期染色体桥的形成和染色体断裂。在断裂部位的 DNA 修复过程中, 属于异染色质部分的转座子发生去甲基化而被激活, 转座子

活化后发生转座, 引起一系列的结构基因活化、失活和位置变化, 造成无性系变异(Larkin, 1984; Peschke et al., 1987; Burr and Burr, 1988)。朱至清(1991)提出, 可能首先是转座因子受组织培养中理化因素的诱导而被激活, 然后由转座子的转座引起染色体断裂和结构变异以及结构基因的活化与失活等。随着对植物转座因子研究的不断深入和研究技术的不断发展, 将会发现更多可被植物组织培养所激活的新转座因子种类, 对其活性在植物体细胞无性系变异中的生物学作用和转座机理的研究也会取得更大的进展。

1.4 植物组织培养过程中发生的表观遗传学变异——DNA甲基化变异

随着表观遗传学的兴起和发展, 人们对植物体细胞无性系变异机理的研究更加深入。而对植物组织培养过程中发生的表观遗传学变异研究起步比较晚, 目前主要集中在植物体细胞无性系的甲基化变异和转座元件活性研究两个方面, 且均已取得了一定的进展和突破, 并逐渐成为分子遗传学的研究热点。

DNA 甲基化是指在 DNA 复制以后, 在 DNA 甲基化酶的催化作用下, 将S-腺苷酰甲硫氨酸(SAM)上的甲基转移到 DNA 分子的胞嘧啶碱基上的 DNA 修饰过程。此外, DNA 甲基化还包括少量的 N6-甲基腺嘌呤(N6-mA)及 7-甲基鸟嘌呤(7-mG), 其中 N6-甲基腺嘌呤在真核生物中较少, 而主要在原核生物中存在。在真核生物中, 尤其是在高等植物中, 5-甲基胞嘧啶是含量很丰富的修饰碱基。在基因组中, 大约 60% - 90% 的 CpG 位点被甲基化, 而未甲基化的 CpG 主要集中在基因启动子区域的 CpG 岛(Ng and Bird, 1999)。DNA 甲基化通过两种方式影响基因的表达: 一是直接影响, 即 DNA 的甲基化直接干扰了转录活化因子与 DNA 的结合, 从而使转录无法正常进行, 这种方式不是抑制基因表达的主要方式; 二是间接影响, 在甲基化 DNA 上结合有特异的蛋白质, 这些蛋白质能与转录因子竞争甲基化 DNA 结合位点, 结合蛋白质将在甲基化的 DNA 上形成一个多蛋白质复合体而引起染色体组蛋白乙酰化的改变, 从而导致转录的抑制(Razin, 1998; Curradi et al., 2002)。植物 DNA 甲

基化修饰可通过自己特有的方式传递给后代, 但转基因(Tanaka et al., 1997)、组织培养(Phillips et al., 1994)、种间杂交(Xiong et al., 1999)、渐渗杂交(Liu et al., 2004b; Dong et al., 2006)、植物多倍体形成(Liu et al., 2000)和不良的环境条件(Long et al., 2006)等多种方式或因素也可导致这种相对稳定的表观遗传状态发生变化, 从而改变原来的甲基化水平和模式。甲基化模式的改变则会导致植物产生大量的表型变异, 如花期、育性、花及叶片的形态、植株的形态、颜色及种子的颜色等表型性状的改变(Kakutani et al., 1999; Chandler et al., 2000; Finnegan et al., 2000; Martienssen and Colot, 2001)。

植物基因组在组织培养过程中可产生广泛的甲基化变异(Phillips et al., 1994)。Brown(1989)在玉米体细胞无性系再生植株中发现了甲基化趋势的变化。Devaux等(1993)在大麦体细胞无性系再生植株中, 用限制性片段长度多态性(RFLP)技术验证了 DNA 甲基化状态的变化。水稻体细胞无性系的甲基化变异与包括管家基因在内的 RFLP 多态性变化密切相关(Müller et al., 1990), 油棕体细胞胚珠由于甲基化的减少而导致雄蕊雌性化变异(Tregear et al., 2002), 这些研究进一步说明甲基化确实与 DNA 水平的变异有关。许多研究表明, 在植物组织培养过程中, 不同植物 DNA 甲基化变异的趋势和模式也存在明显的差异。在已进行体细胞无性系甲基化变异研究的植物中, 如玉米(Kaeppler and Phillips, 1993)、油棕(Matthes et al., 2001)、大豆(Quemada et al., 1987)、水稻(Liu et al., 2004b)、香蕉(Santy et al., 2001)和玫瑰(Xu et al., 2004)等, 多数植物的愈伤组织或再生植株存在 DNA 甲基化总体水平降低的趋势, 而且不同植物体细胞无性系基因组 CCGG 位点的内外侧胞嘧啶残基发生去甲基化变异的频率也存在明显差异。然而在番茄的愈伤组织(Smulders et al., 1995)和豌豆的再生植株(Cecchini et al., 1992)中, 则发生了 DNA 甲基化程度增加的变异。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质量表型变异、转座元件的激活、异染色质诱发的染色体断裂以及高频率的序列变异, 所以 Phillips 等(1994)

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。但是目前关于植物体细胞无性系甲基化变异与表型变异、DNA 序列变异及转座元件激活相关的例子还比较少。

综上所述, 到目前为止, 关于植物体细胞无性系变异的机理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。很难找到表型变异、细胞学变异与分子水平变异之间的直接相关证据, 而体细胞无性系变异的各种细胞学和分子生物学证据有时又是相互关联的。同时, 对不同材料的研究还经常出现相悖的结果。说明植物体细胞无性系变异是极其复杂的, 其机理还有待于进一步深入研究。

2 鉴定方法

目前, 对植物体细胞无性系变异的检测和鉴定, 可以从形态学、细胞学、生物化学和分子生物学等多个方面综合进行。从而使我们能在个体、器官、组织、细胞、蛋白质及 DNA 等不同水平上全面了解和分析植物体细胞无性系变异的遗传机制及其稳定性。

对于细胞遗传学方面的鉴定, 目前常通过观察细胞有丝分裂和减数分裂过程中染色体的数目和行为, 利用染色体核型和形态的配对分析对变异植株的染色体数目和结构变异进行鉴定, 如小麦、大蒜和芦笋等植物体细胞克隆的分析(吴鹤鸣等, 1992; Al-Zahim et al., 1999; Juan and Ricardo, 2001)。但由于不同特化组织类型组织内存在内多倍性(endopolyploidy), 因而有时使检测到的染色体数目存在差异。另外, 离体培养中产生的染色体数目和结构变异又常与培养类型有关(刁现民和孙敬三, 1999)。因此, 在细胞遗传学鉴定的基础上, 还要结合生物化学或分子生物学等检测手段进一步对植物体细胞无性系变异进行分析和鉴定。

对植物体细胞无性系变异进行生物化学鉴定, 经常使用的同工酶酶谱分析有酯酶、过氧化物酶、淀粉酶、多酚氧化酶以及其它一些可溶性蛋白等。但此项技术只能对可溶性蛋白进行分析, 所能检测的范围比较

有限。同时同工酶的酶谱又容易受环境因素的干扰和植物个体发育的影响, 因此, 同工酶的改变只能解释其中很小一部分变异。

近年来, 分子标记技术在植物体细胞无性系变异的检测和鉴定中得到广泛应用。微卫星或 SSR 技术利用特异引物扩增包含重复的 2、3 或 4 个核苷酸的基因组区域, 检测引物退火位置或重复数目发生改变的体细胞无性系变异。RFLP 技术在检测由于碱基插入或缺失而引起限制性内切酶识别位点发生变化的变异时发挥作用, 也是一种较早应用于植物体细胞无性系变异分析鉴定的分子标记技术。如果结合应用一些能特异性地识别甲基化碱基的限制性内切酶, RFLP 对检测因 DNA 甲基化状态改变而引起的植物体细胞无性系变异将非常有效(Devaux et al., 1993; Liu et al., 2004b)。但是对引物和酶的筛选也在一定程度上限制了该项技术的应用。RAPD 则是一种建立在 PCR 基础上的分子生物学技术, 因其快速、方便、经济等优点已成为目前应用最广泛的植物体细胞无性系变异鉴定方法(Juan and Ricardo, 2001; Bouman and de Klerk, 2001)。它可随寡聚核苷酸引物结合位点的变化而检测基因组中更大的部分。而近年来发展起来的 AFLP 分子标记技术则结合了 RFLP 和 RAPD 的优点, 具有方便快捷、信息量大和稳定性强等优点, 已初步应用于多种植物体细胞无性系变异的分析和鉴定, 并检测到相对较多的多态性信息(Vendrame et al., 2000; Carlo and Marka, 2002)。目前, 对于因植物组织培养而引起 DNA 甲基化状态改变的体细胞无性系变异, 常采用成对的可以识别相同碱基的不同甲基化状态(甲基化 / 去甲基化)的限制性内切酶(同裂酶, isoschizomers), 结合 AFLP 标记技术, 即 MSAP 分子标记技术(Phillips et al., 1994)加以检测, 并获得了较多的表观遗传信息(Matthes et al., 2001; Chakrabarty et al., 2003; Xu et al., 2004)。这进一步推动了对植物体细胞无性系甲基化变异模式和机制的研究。

然而, 采用 RFLP、RAPD、SSR、AFLP 和 MSAP 等方法分析, 均发现表型与 DNA 水平变化不一致的现象非常普遍。利用分子标记直接对应某个表型变异虽然

有报道,但这种机会非常少。然而,无论如何,分子标记技术仍然是目前多数研究者用于分析植物体细胞无性系变异的有效工具。

3 应用前景

植物体细胞无性系变异育种是属于细胞水平上的生物技术育种措施,是目前公认的一种有效育种新途径。与其它育种方式相比,利用植物体细胞无性系变异进行植物品种改良具有如下优点:(1)植物体细胞无性系变异育种无需对目的性状的遗传基础进行详细了解,就可改进个别农艺性状;(2)离体培养和离体选择体细胞无性系变异采用的繁殖体小,增殖速度快,因而可以在有限的空间内大规模地进行检测和选择,同时便于与其它诱变处理协同作用和定向选择;(3)因其存在细胞质突变,从而有可能选择到细胞质雄性不育系等新的变异(肖辉海和陈良碧,2003)。

鉴于植物体细胞无性系变异育种的多种优势,应用该技术进行作物品种改良日益受到人们的重视,并已取得了很多可喜成果。在世界范围内,由组织培养技术选育出的优良品种产生了巨大的商业效益,如荷兰每年有千余种观赏植物新品种来自植物组织培养技术。高明尉(1992)以小麦幼胚为外植体,育成了具有高产、早熟、抗病、耐湿和优质等优点的小麦新品种——核组8号。核组8号的育成标志着小麦体细胞无性系变异育种已步入了实用化阶段,随后采用这套技术育成了一大批表现优异的变异品系。同样,利用植物体细胞无性系变异已培育出抗白叶枯病、抗稻瘟病株系等多种优良水稻新品种(高东迎等,2002)。Oono(1978)和 Lutts 等(1999)还分别获得了可以稳定遗传的耐盐性水稻再生植株。此外, Bertin 和 Bouharmont (1997)也以 4°C 低温为选择压,从4个水稻品种中获得了耐寒突变体。目前,在植物抗性育种与生理研究中应用体细胞无性系变异最为成功的是抗病性育种,其次是抗旱、抗盐和抗除草剂等方面的育种。

当然,植物体细胞无性系变异育种历史还很短,在应用上也存在一定的局限性。主要表现在变异类型复

杂、变异方向难以控制、负向变异较多和变异选择并非对所有作物都有效等方面。为了更有效地利用这项技术,今后应致力于以下几个方面的研究:(1)提高目标性状和其它有益农艺性状的变异频率,减少非目的性状变异的产生;(2)广泛建立多种高效稳定的植株再生体系,以创造更多的变异类型及得到新的种质资源;(3)对变异体的生物化学、遗传学和分子生物学基础进行深入研究,以便针对特定性状确定有效的选择指标,进一步提高育种效率。

总之,随着对植物体细胞无性系变异发生的原因、性质、影响因素及其遗传规律等认识的不断深入,植物体细胞无性系变异的育种实践和生产应用将进一步发挥更大的作用,这方面的研究在植物品种改良方面具有广阔的应用前景。

参考文献

- 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的发展. 植物学通报 16, 372-377.
- 高东迎,郭士伟,李霞,孙立华,刘蔼民 (2002). 水稻体细胞无性系变异. 植物学通报 19, 749-755.
- 高明尉 (1992). 世界上第一个小麦离体诱变新品种——核组8号. 核物理动态 9, 45-46.
- 孙振元,韩蕾,李银凤 (2005). 植物体细胞无性系变异的研究与应用. 核农学报 19, 479-484.
- 肖辉海,陈良碧 (2003). 植物体细胞无性系变异育种. 湖南文理学院学报(自然科学版) 15, 40-46.
- 吴鹤鸣,陆维忠,周楠 (1992). 小麦体细胞再生植株(R1)的染色体变异分析. 植物学报 34, 226-232.
- 詹亚光,齐凤慧,高瑞馨,杨传平 (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.
- 朱至清 (1991). 体细胞无性变异与植物改良. 陈英主编,植物体细胞无性系变异与育种. 南京:江苏科学技术出版社. pp. 1-10.
- Al-Zahim MA, Ford-Lloyd BV, Newbury HJ (1999). Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. *Plant Cell Rep* 18, 473-477.
- Amato F (1985). Cytogenetics of plant cell and tissue culture and their regenerates. *CRC Crit Rev Plant Sci* 8, 73-112.
- Ben Zion G, Phillips RL (1988). Cytogenetic stability of maize tissue cultures, a cell line pedigree analysis. *Genome* 30, 318-

325.

- Bertin P, Bouharmont J** (1997). Use of somaclonal variation and *in vitro* selection for chilling tolerance improvement in rice. *Euphytica* **96**, 135-142.
- Bouman H, de Klerk GJ** (2001). Measurement of the extent of somaclonal variation in begonia plants regenerated under various conditions, comparison of three assays. *Theor Appl Genet* **102**, 111-117.
- Brettell RS, Pallotta MA, Gustafson JP, Appels R** (1986). Variation at the Nor loci in triticale derived from tissue culture. *Theor Appl Genet* **71**, 637-643.
- Brown PTH** (1989). DNA methylation in plants and its role in tissue culture. *Genome* **31**, 717-729.
- Burr B, Burr FA** (1988). Activation of silent transposable elements. In: Nelson Ded. Plant Transposable Elements. New York: Plenum Press. pp. 317-324.
- Carlo P, Marka LR** (2002). A FLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants. *Plant Sci* **162**, 817-824.
- Cecchini E, Natali L, Cavallini A, Durante M** (1992). DNA variations in regenerated plants of pea (*Pisum sativum* L.). *Theor Appl Genet* **84**, 874-879.
- Chakrabarty D, Yu KW, Paek KY** (2003). Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). *Plant Sci* **165**, 61-68.
- Chandler VL, Eggleston WB, Dorweiler JE** (2000). Paramutation in maize. *Plant Mol Biol* **43**, 121-145.
- Curradi M, Izzo A, Badaracco G, Landsberger N** (2002). Molecular mechanisms of gene silencing mediated by DNA methylation. *Mol Cell Biol* **22**, 3157-3173.
- Devaux P, Hou LM, Ullrich SE, Huang ZX, Kleinhofs A** (1993). Factors affecting anther culturability of recalcitrant barley genotypes. *Plant Cell Rep* **13**, 32-36.
- Dolezel J, Novák FJ** (1985). Karyological and phytophotometric study of callus induction in *Allium sativum*. *Plant Physiol* **118**, 421-429.
- Dong ZY, Wang YM, Zhang ZJ** (2006). Extent and pattern of DNA methylation alteration in rice derived from introgressive hybridization of rice and *Zizania latifolia* Griseb. *Theor Appl Genet* **113**, 196-205.
- Evans DA, Sharp WP** (1983). Single gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture. *Science* **221**, 949-951.
- Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES** (2000). DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Curr Opin Genet Dev* **10**, 217-223.
- Hirochika H, Sugimoto K, Otsuki Y, Kanda M** (1996). Retrotransposon of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 7783-7788.
- James MG, Stadler J** (1989). Molecular characterization of mutator systems in maize embryogenic callus cultures indicates Mu element activity *in vitro*. *Theor Appl Genet* **77**, 383-393.
- Juan PR, Ricardo WM** (2001). Assessment of somaclonal variation in asparagus by RAPD fingerprinting and cytogenetic analyses. *Sci Hortic* **90**, 19-20.
- Kaeppeler SM, Phillips RL** (1993). Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 8773-8776.
- Kakutani T, Munakata K, Richards EJ, Hirochika H** (1999). Meiotically and mitotically stable inheritance of DNA hypomethylation induced by ddm1 mutation of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **151**, 831-838.
- Lapitan NLV, Sears RG, Gill BS** (1988). Amplification of repeated sequences in wheat × rye hybrids regenerated from tissue culture. *Theor Appl Genet* **75**, 381-388.
- Larkin PJ, Scowcroft WR** (1981). Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet* **60**, 443-455.
- Larkin PJ** (1984). Heritable somaclonal variation in wheat. *Theor Appl Genet* **67**, 443-445.
- Liu B, Hu B, Dong YZ, Liu ZL, He MY** (2000). Speciation-induced heritable cytosine methylation changes in polyploidy wheat. *Prog Nat Sci* **10**, 710-715.
- Liu ZL, Han FP, Tan M** (2004a). Activation of a rice endogenous retrotransposon *Tos17* in tissue culture is accompanied by cytosine demethylation and causes heritable alteration in methylation pattern of flanking genomic regions. *Theor Appl Genet* **109**, 200-209.
- Liu ZL, Wang YM, Shen Y, Guo WL, Hao S, Liu B** (2004b). Extensive alterations in DNA methylation and transcription in rice caused by introgression from *Zizania latifolia*. *Plant Mol Biol* **54**, 571-582.
- Long LK, Lin XY, Zhai JZ, Kou HP, Yang W, Liu B** (2006).

- Heritable alteration in DNA methylation pattern occurred specifically at mobile elements in rice plants following hydrostatic pressurization. *Biochem Biophys Res Commun* **340**, 369-376.
- Lutts S, Bouharmont J, Kinet JM** (1999). Physiological characterisation of salt-resistant rice (*Oryza sativa*) somaclones. *Aust J Bot* **47**, 835-849.
- Martienssen RA, Colot V** (2001). DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science* **293**, 1070-1074.
- Matthes M, Singh R, Cheah SC, Karp A** (2001). Variation in oil palm (*Elais guineensis* Jacq.) tissue culture-derived regenerants revealed by AFLPs with methylation-sensitive enzymes. *Theor Appl Genet* **102**, 971-979.
- Miller DW, Miller LK** (1982). A virus mutant with the insertion of a copia-like transposable element. *Nature* **299**, 562-564.
- Müller E, Brown PTH, Hartke S, Lörz H** (1990). DNA variation in tissue culture derived rice plants. *Theor Appl Genet* **80**, 673-679.
- Nelson D** (1988). Plant Transposable Elements. New York: Plenum Press. pp. 317-317.
- Ng HH, Bird AP** (1999). DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 158-163.
- Oono K** (1978). Test tube breeding of rice by tissue culture. *Trop Agric Res* **11**, 109-123.
- Peschke VM, Phillips RL** (1991). Activation of the maize transposable element suppressor-mutator (*Spm*) in tissue culture. *Theor Appl Genet* **81**, 90-97.
- Peschke VM, Phillips RL, Gengenbach BG** (1987). Discovery of transposable element activity among progeny of tissue culture-derived maize plants. *Science* **238**, 804-807.
- Phillips RL, Kaeppler SM, Olhoft P** (1994). Genetic instability of plant tissue cultures, breakdown of normal controls. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 5222-5226.
- Quemada H, Roth EK, Lark KG** (1987). Changes in methylation status of tissue cultured soybean cells detected by digestion with the restriction enzymes *Hpa* II and *Msp* I. *Plant Cell Rep* **6**, 63-66.
- Razin A** (1998). CpG methylation, chromatin structure and gene silencing—a three-way connection. *EMBO J* **17**, 4905-4908.
- Santy PE, Virginia AHV, Andrew JK** (2001). Detection of DNA methylation changes in micropropagated banana plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Plant Sci* **161**, 359-367.
- Smith MK, Drew RA** (1990). Current applications of tissue culture in plant propagation and improvement. *Aust J Plant Physiol* **17**, 267-289.
- Smulders MJM, Rus-Kortekaas W, Vosman B** (1995). Tissue culture-induced DNA methylation polymorphisms in repetitive DNA of tomato calli and regenerated plants. *Theor Appl Genet* **91**, 1257-1264.
- Sun ZX, Zhao CZ, Zheng KL, Qi XF, Fu YP** (1983). Somaclonal genetics of rice, *Oryza sativa*. *Theor Appl Genet* **67**, 67-73.
- Suoniemi A, Narvanto A, Schulman AH** (1996). The *BARE-1* retrotransposon is transcribed in barley from an LTR promoter active in transient assays. *Plant Mol Biol* **31**, 295-306.
- Tanaka H, Masuta C, Uehara K, Kataoka J, Koiwai A, Noma M** (1997). Morphological changes and hypomethylation of DNA in transgenic tobacco expressing antisense RNA of the S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase gene. *Plant Mol Biol* **35**, 981-986.
- Tregear JW, Morcillo F, Richaud F, Berger A, Singh R, Suan CC, Hartmann C, Rival A, Duval Y** (2002). Characterization of a defense gene expressed in oil palm inflorescences, induction during tissue culture and possible association with epigenetic somaclonal variation events. *Exp Bot* **53**, 1387-1396.
- Vendrame WA, Kochert GD, Sparks D, Wetzstein HY** (2000). Field performance and molecular evaluations of pecan trees regenerated from somatic embryogenetic cultures. *Am Soc Hort Sci* **125**, 542-546.
- Xiong LZ, Xu CG, Saghai-Marroof MA** (1999). Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Mol Genet Genomics* **261**, 439-446.
- Xu ML, Li XQ, Korban SS** (2004). DNA methylation alterations and exchanges during *in vitro* cellular differentiation in rose (*Rosa hybrida* L.). *Theor Appl Genet* **109**, 899-910.

Progress in Plant Somaclonal Variation

Xiaoling Li^{1, 2}, Juan Cong², Xiaoming Yu³, Yingshan Dong^{1*}

¹ Biotechnology Research Centre, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China

² School of Biological Engineering, Changchun University of Technology, Changchun 130012, China

³ Laboratory of Plant Molecular Epigenetics, Institute of Genetics and Cytology, Northeast Normal University, Changchun 130024, China

Abstract The phenomenon ‘somaclonal variation’ refers to genetic and/or epigenetic changes in cells or regeneration that arise through the culture of plant cells, tissues and organs. Some genetic bases underly the plant somaclonal variation, which can be integratively determined and identified at morphological, cytological, biochemical and molecular biological levels. Plant somaclonal variation is one of available resources in plant breeding, but it is an unwelcome puzzle to be won through in plant micropropagation *in vitro* and genetic transformation. This paper reviews the progress in study of the genesis and identification of plant somaclonal variation at both cytological level and molecular biological level, and discusses the problems and prospects of applying somaclonal variation in breeding and improving plant varieties.

Key words genetic bases, identification method, improvement of varieties, somaclonal variation

Li XL, Cong J, Yu XM, Dong YS (2008). Progress in plant somaclonal variation. *Chin Bull Bot* **25**, 121–128.

* Author for correspondence. E-mail: ysdong@cjaas.com

(责任编辑: 白羽红)