

21—24

植物细胞工程 细胞培养 花药 基因工程

# 科 学

5

## 植物细胞工程的回顾与展望

### Review and Prospects for Plant's Cell Engineering

王海波 程 奇

(中国农业科学院生物技术研究中心) Q 942.

植物细胞工程是以细胞培养和细胞操作为基础,按照人们的愿望,有计划地控制、改造和利用植物的技术体系以及发展这些技术,主要包括组织及细胞培养、花药花粉培养、原生质体培养、细胞融合与基因转化等方面的内容。目前植物细胞工程领域中,组织及细胞培养技术在快繁、脱毒、远缘杂交胚挽救等方面已广为应用。生产次生物质的植物细胞大量培养,有的已发展成产业。以花药培养为基础的单倍体育种不断发展,并取得了显著的成绩,重要农作物原生质体培养取得了较大的突破。细胞融合与基因转化取得了可喜的进展。我国在植物细胞工程研究与应用方面做出了举世公认贡献,特别是花药培养与单倍体育种,近十几年来一直保持着国际领先地位;重要农作物原生质体培养研究,到80年代后期纷纷跃至世界先进水平。

#### 一、植物细胞全能性的提出与证实

1902年德国植物生理学家Haberlandt首次尝试植物组织培养,虽未取得成功,但大胆地提出了高等植物器官和组织可以不断地分割繁殖,直至单细胞的观点。在此观点的启发下,世界各国的科学家广泛地开展了植物组织培养的研究。1943年美国科学家White正式提出植物细胞的“全能性”学说,即每个植物细胞都具有该植物的全部遗传信息和发育成完整的植物个体的能力。1958年Steward等从胡萝卜根的韧皮部愈伤组织悬浮培养,经由单细胞再生了植株,首次证实了植物细胞全能性。1964年,Guha和Maheshunri离体培养曼陀罗花药,意外地发现花药中的花粉发育出了许多胚状体和小植株,这些植株后来经鉴定是单倍体。1971年Takebe等培养酶法游离的烟草叶肉原生质体获得了原生质体再生植株。1972年Carlson等用 $\text{NaN}_3$ 作融合剂,融合粉兰烟草和郎氏烟草叶由原生质体获得了种间细胞杂种植株。从此,植物细胞的全能

性不仅在体细胞,而且在性细胞(花粉)、不完全细胞(原生质体)和融合细胞水平上也得到了证实。植物细胞工程研究与应用由此开始。

#### 二、细胞培养技术的广泛研究与应用

##### 1. 组织培养与快繁

组织培养是一种比较易建立的技术,而且能较快地解决研究和生产中的许多问题。由于病毒一般侵染不到活跃的茎尖分生组织,所以此技术往往是以茎尖培养去除病毒,然后大量繁殖无毒苗的方式来应用。李春玲等无性繁殖大白菜雄性不育系,1个芽可繁殖16000棵苗,得到的植株100%不育(私人交流),为不育系的繁殖提供了一种良好的途径。李志正等利用茎尖培养脱毒宝塔菜,使产量比原来提高3~5倍。在这些技术的应用方面,国外比我们注意得早,60年代用于兰花的生产,获得了巨大的经济效益,以后又扩展到了马铃薯、草莓和石刁柏上。到目前欧美以及东南亚等国家对此技术的研究应用一直非常重视。我国从70年代开始,先是马铃薯脱毒,后又是香蕉、柑桔、苹果、葡萄、杨树等植物的快繁与脱毒,均取得了很大的经济效益。

另外组织培养技术在种质保存、濒临灭绝植物的挽救、远缘杂交材料的创造上具有独特的作用。随着组织细胞培养,特别是体细胞胚人工诱导技术的发展,又兴起了人工种子制造技术,这些杂种优势的固定、低种子繁殖率或无种子繁殖力的植物大量繁殖与种植等将具有重要意义。

##### 2. 植物细胞的大量培养

许多重要药物,迄今尚不能化学合成,只能由植物提取,而自然界中植物资源有限。植物细胞大量培养技术为解决此问题提供了很好的途径。另外,通过对许多植物的细胞培养的研究,还可以发现许多过去未曾发现的具有重要价值的物质加以利用。近年来,植物细胞培养正发展成为一门新兴

的科研产业体系。从紫草、毛地黄、黄连、人参根细胞中生产的紫草素、地高辛、黄连碱、皂甙等均已商品化生产。“七·五”期间,我国在人参、三七、紫草细胞的大量培养方面,取得了良好的进展。

### 三、花药培养的进展与成就

自1964年 Guha 等从曼陀罗花药培养首次获得单倍体植株以来,利用花药培养获得单倍体植株的技术已在10个科、24个属、34个种的250多种高等植物中取得成功,其中由我国首次研究成功的就有小麦、玉米、小黑麦、麻类、茶树等50多种。我国花药培养提供了目前世界上效率最高的方法,所建立的 $N_6$ 、马铃薯、 $C_17$ 培养基,在国际上广泛使用。朱至清等建立的 $N_6$ 培养基不仅适于花药培养,在体细胞及原生质体培养中也为各国广泛使用。近年来,朱至清等又建立了一种已使100个小麦花药产生1000个花粉胚和400个花粉植株的方法;欧阳俊闻也建立了一种新的适合小麦花药培养的 $W_{11}$ 培养基。我国是世界上第一个大面积推广花培品种的国家。在80年代,我国相继育成了一批花培品种或品系,其中,李梅芳等育成的中花8号、9号、10号、11号水稻花培品种丰产、优质、抗稻瘟病和白叶枯病,累计推广500多万亩。另外,葛美芬等将花培技术用于水稻三系的提纯复壮,由提纯后的不育系配置的杂交稻“花粒优63”比原来增产10%。胡道芬等培育的小麦“京花1号”累计推广800万亩以上;河南农科院培育的“花培28”高产抗病小麦,仅1989年就种植106万亩。

原认为,花药培养由于是以单倍体形式选择加倍的二倍体,避免了基因分离的影响,所表现的只是加速育种进程。但多年来的研究发现,花培的效果远不止于此,还有以下作用:可以挽救一些常规育种无法得到的配子重组体;可以诱导或选择出新变异,使得花培品种一般都适应性广、抗旱耐瘠能力强;可以帮助创造新类型。

游离花粉粒培养再生的成功,为单倍体细胞水平上的遗传转化提供了美好前景。

### 四、植物原生质体培养研究的进展

游离的植物原生质体,即去掉细胞壁的植物裸细胞是遗传操作的理想受体,在植物遗传工程研究中占有重要地位,特别是今后在发展多基因高效转化体系上将显示巨大潜力。自1971年 Takebe 等将烟草的叶肉原生质体再生植株以后,注意力便集中到了禾谷类、豆科、棉花等作物原生质体的再生上。但由于不同的植物间由遗传差异所决定的细胞的可培养性不同,在烟草、矮牵牛等植物上适用的方

法,在这些植物上都失败了。于是大豆、棉花,尤其是禾谷类作物的原生质体培养便成了世界性的难题。甚至,有人曾一度怀疑过禾本科植物原生质体的全能性。

经过十多年的努力,禾本科、豆科以及棉花等作物的原生质体全能性表达终于有了大的突破。1985~1986年水稻原生质体再生植株;1987年玉米、大豆原生质体再生植株;1988年小麦原生质体再生植株,1989~1990年谷子、高粱、大麦、棉花原生质体再生植株。近年来,这些作物原生质体培养成功的基因型在不断增多,并已逐渐走向细胞融合及遗传转化研究的应用。目前世界上已有150多种植物原生质体再生了植株,玉米、小麦、谷子、大麦、高粱、大豆、棉花等重要农作物原生质体的成株是我国首先成功或与国外同期成功的。

原生质体培养在所有细胞培养方式中是比较难的一种,它对单细胞分裂能力和分化潜力的要求非常严格。为了满足这些条件,绝大多数的研究者是靠大量的材料群体中筛选少数适宜的基因型来实现,而这样做的结果又往往会使所建体系缺乏普适性。笔者在研究小麦原生质体培养时,提出了用细胞状态调控和愈伤组织改造的方法,使不适于原生质体培养的愈伤组织变成适合的类型,使难分化的愈伤组织变成能分化的类型,还在大麦、水稻、谷子、棉花等作物的细胞及原生质体培养体系中得到了证实,并发挥了作用。

### 五、细胞融合与拆装的研究

原生质体游离培养的成功,为植物的细胞融合和细胞器移植奠定了基础。高等植物的重要经济性状多数是受那些具有复杂关系的多基因控制的,很难通过单基因操作进行有效的转化,原生质体融合为解决这些问题提供了希望。我国利用普通烟草与黄花烟草细胞融合,已培育出抗病、香型香烟。在美国,利用细胞融合将野生马铃薯的抗虫 Leptin 合成酶基因转移给栽培马铃薯,已得到富含 Leptin 的抗虫且块茎商品性状保持不变的体细胞杂种。日本利用原生质体融合已将温州桔与广柑融合,开发出了3种柑类杂种,可望成为理想的水果体系。另外,他们还得到了水稻与稗草的体细胞杂种植株,水稻与野生稻的融合杂种植株及后代,并利用细胞融合成功地实现了水稻胞质雄性不育性的转移。目前将两个不同生物的原生质体融合在一起并不困难,但对于融合子的选择及再生,特别是如何实现双亲的有益重组方面却存在着严重的问题。

关于细胞的拆合方面的研究目前进展不大。分离各种细胞器以及染色体等已不成问题。将细胞器移入原生质体的操作也不很困难,关键是在操作后

的再生上还没有实质性的进展。

## 六、植物基因转化研究的进展

植物组织及细胞培养是植物基因工程的重要基础。尽管有人在试图寻找避开组培和细胞培养的转化方法,但笔者认为培养着的细胞其遗传体系所特有的可控的开放性,是其他任何组织细胞都无法比拟的。因此,这些方法终究不能代替以培养细胞为受体的方法。当目的基因分离构建好以后,植物的基因转化主要是植物细胞的培养以及在此基础上的转化子筛选。目前,随着细胞及原生质体培养技术的发展,植物基因转化,特别是那些重要农作物的基因转化有了新的发展,如用报告基因对水稻原生质体的 PEG、电击转化与植株再生以及对玉米的原生质体电击转化与植株再生等都已成功。在有用的目的基因转化方面,通过农杆菌方法,已获得抗病毒的烟草、蕃茄,以及抗虫的蕃茄、烟草、棉花等。利用原生质体体系已获得带有将 Bt 与 GUS 融合基因和人  $\alpha$  干扰素基因的转基因水稻。

## 七、体细胞无性系变异的研究与利用

以前人们认为细胞培养仅仅是无性繁殖,所衍生出来的后代是完全一样的。但实际情况并非如此。70 年代末,国内外就在十多种植物上发现由离体培养细胞再生的植株中高频率地出现了变异体。利用这一特点,再与理化诱变和条件筛选等配合,人们在广泛地开展新品种培育和新材料创造的研究。近年来我国在选择抗盐、抗病以及雄性不育性的筛选上做了许多工作。另外,对某些突变体还进行了分子水平上的鉴定研究。目前已得到了可遗传的或耐盐或抗赤霉病或抗根腐病的小麦和胞质雄性不育的水稻、抗盐水稻和豆科牧草等。花粉愈伤组织无性系为突变体筛选提供了理想的单倍体体系。这样即使是隐性突变出现也能选出来。另外,原生质体为突变体筛选提供了理想的单细胞体系,实际上原生质体培养过程本身就可以造就出许多无性系变异,如阳体冰等就从水稻大谷早原生质体植株的后代中选出了比原来大谷早增产 76.46% 原生质体品系。

## 八、植物细胞工程领域中存在的共性问题

### 1. 适用范围较窄

许多的植物类型或基因型还不能按照人们的目的用现有的技术培养成功。甚至一些重要农作物的基本技术如棉花花药培养研究,至今尚未取得突破。

### 2. 效率低

如有的原生质体培养体系往往只能再生出几株苗;花培育种由于出愈率低,苗分化率低,常常不能形成足够的选择群体;现有的几种细胞大量培养生产次生代谢产物的系统,目前还都产量低,成本高。

### 3. 所建的技术体系稳定性差

同一技术在不同实验室、不同的人操作,甚至不同的批次之间都有差异,难以推广应用。

### 4. 随机性太强

由于组织细胞培养过程中一些作用机制还不太清楚,当无性繁殖扩增保存材料时,对无性系变异现象无法控制,长期培养的材料往往会失去分化能力。而进行无性变异筛选时希望的变异个体又因变异率低而选不出。

上述所有问题归结起来,实际上是来自于细胞培养技术研究得还不成熟这样一个关键问题。而这种情况,又往往是由于绝大多数从事植物组织及细胞培养的研究者多年来只注意了个别事例的成功而忽视了一般规律的探讨造成的。

## 九、如何解决面临的问题

### 1. 重视并加强细胞培养的基础研究和规律探讨

对于细胞培养,国际上曾有一种较普遍的看法,即细胞培养只不过是一些技术和经验的积累,没有什么规律可探讨。笔者认为,任何科学都是由低级到高级、由经验到理论发展起来的,目前植物细胞培养不仅已积累了相当丰富的经验,而且其中的一些规律也已初见端倪。目前离体培养中,基因型作用如何发挥、培养基效应如何表现、无性系变异如何造成,都亟待研究。

### 2. 全面认识细胞培养的作用

细胞培养不仅仅是增殖细胞,可能还有许多未被人们认识的潜在作用。李梅芳等在用  $L_0$  和改良  $N_0$  培养基接种同一水稻组合  $R_0$  (南 65/京丰 2 号)//玻惠吕(粳/粳/粳) $F_1$  代花药的花培研究中发现,来自  $L_0$  培养基的花粉植株多属于粳型或粳粳偏粳型,而来自改良  $N_0$  培养基的花粉植株则多属于粳型或粳粳偏粳型的。张学勇等显微观察普通小麦和毛穗赖草  $F_1$  愈伤组织无性系染色体,发现有大量的端着丝点、双着丝点及环型染色体等变异结构出现和有丝分裂中染色体不均等分裂的现象。染色体结构变异、DNA 扩增、染色质变异、多线染色体形成等现象在小麦无性系再生植株中也已有报道。这表明组织培养还具有一定的选择作用和协助变异作用。另外,有的研究者通过细胞培养可以改变遗传重组能力,这对探究有目的地控制细胞融合

或远缘杂交中两个双亲的遗传重组以及基因转化时基因的定位、高效整合很有启发性。

### 3. 注意多种材料多种基因型的培养

以前人们习惯于从大量的材料里筛选少量的适合培养的基因型来进行研究,这对尽早地建立模式是必要的,但要探讨细胞培养中的规律就不能再继续这样做。经验表明,对难培养植物细胞进行研究所取得的结果往往对推动细胞工程的实质性发展更有作用。再有,也只有大量的材料或有代表性的材料中建立起来的方法才具有较强的普适性。

### 4. 注意探讨培养基中各因素与愈伤组织性状间的关系

在过去的研究中,大多数研究者往往是只注意了不同培养基的效果,使组织或细胞培养成了对培养基和基因型的双重筛选,即使对培养基做些调整,也只是看最后的效果,并未把这些与愈伤组织的性状变化联系起来,结果往往是事倍功半。如果在研究中有意识地建立培养基中各因素与培养物变化之间的关系,而当依据这些认识再去发展细胞工程技术时,就会收到事半功倍的效果。

### 5. 对于已有的技术体系要注意成熟化发展

## 十、今后植物细胞工程发展应采取的战略

### 1. 把对细胞培养的研究作为长期任务坚持下去

(上接第 28 页)

行量都很可观。中山医学院靠办《家庭医生》杂志养活了 6 个学术杂志。第六类,办经济实体。第七类,建立基金会,靠个人捐助。第八类,从立法上规定科技人员所在单位代其交纳会费。

实际上,当前最困难的是地方学会,大多处于瘫痪半瘫痪状态。靠自办第三产业可能是生存和发展的最佳手段。中国铁道学会自办了 10 多个小型实体,从清洗公司到小印刷厂,不拘大小,只要能创收就行。实验动物学会通过举办国际学术会议也解决了经费来源问题。中华医学会实行全方位改革,成效显著,1992 年他们召开了 100 多个国内学术会议和 11 个国际会议,全年创收 700 余万元。

### 三、科协在科技与经济结合中的角色地位

为推进科技成果向现实生产力转化,科协于去年在全国范围实施“金桥工程”。全国科协系统计划在 1993~1995 年组织 100 项高新技术成果转化,组织 10—100 项技术攻关和技术承包;帮助 10—100 个地方小企业和乡镇企业提高技术水平和管理水平;培训 50 万农民技术员;普及 10 000 项实用技术;促进人才资源开发和人才市场发育;促进国际合作。

然而,科协作为人民团体,既不具备行政部门的权力和财力,手下也没有专属的科研机构和大专院校,也即无人权。代表们认为,“金桥工程”成功的关键是要扬

植物细胞工程领域中各个方面研究与应用的突破,一些关键问题的解决都将依赖于对植物生长发育及其控制机理的阐明和细胞培养的技术理论水平不断发展和提高。而这些需要的正是长期、持久、连续的研究。

### 2. 把发展和应用融为一体

把应用研究和基础研究割裂开来不利于现代科学技术的发展,尤其是细胞工程研究,许多问题的提出和解决往往需要有“研究→应用→再研究→再应用”等多次循环。

### 3. 搞好已有技术体系的利用

在育种上充分利用花培技术,利用现有的小麦、水稻、玉米、谷子、高粱、棉花、大豆等原生质体或成株体系进行细胞融合和基因转化研究,注意快繁、脱毒、细胞大量培养技术的进一步开发。

### 4. 建立好中长期发展目标

在今后 10~20 年内,应注意原生质体成株技术、细胞融合与选择技术、基因的高效转化技术的实用化发展。

### 5. 力争在本世纪内解决一些实际问题

从目前的情况看要求细胞融合和基因工程解决一些大的实际问题尚很困难,“远缘杂交”加“组织培养”再配合上“诱变选择”,可能是一种比较切实的方案,另外这还可为细胞工程和基因工程研究的发展奠定高起点的基础。(责任编辑 冷远猷)

长避短,结合实际,自创新路。科协的优势在于跨部门、跨行业、跨地区,学科众多、人才荟萃、信息灵通。因此在科技与经济结合上,科协和学会的角色更像是经纪人、信息源、组织协调员、服务员,重在软功夫,不在硬手段。所谓“金桥”就是把企业和科研单位和院校这两个彼此隔离的桥墩,靠学会和各级科协这些架桥人联在一起。

湖北省科协的做法是:1、点、线、面立体推进,具体说,选择 1000 个企业作为长期跟踪扶植的对象;依据本省实际,确立汽车、冶金、烟草三个行业为重点;选择三个镇、一个乡,科协与之建立长期全面的合作关系,为其负责整体发展战略设计,作其科技后盾。2、三个对接:一是大中型企业和乡镇企业对接;二是高层次学会、大专院校与农村技术研究会对接,在优质、高产、高效农业上下功夫;三是学会与企业科协对接,以企业科协为滩头堡进入企业。3、动员专门学会、大专院校科研单位科协和企业科协协同。它们的经验表明,应该扭转认为科协松散无力,解决不了经济发展中的重大问题的想法。

这次会议是在新的形势下,科协和学会改革的动员大会,议题集中在经济方面,至于科协如何在宣传科学、文化和政治参与方面发挥作用涉及不多。现在看,生存还是头等大事。对大多数学会来说,要实现自主和发展还有一段艰苦的历程。

(本刊记者 孙立明)