

---

**\*成果与应用\***

## 植物原生质体的研究在中国科学院的发展

袁 萍 钱 迎 倩

(中国科学院生物科学与技术局)

我国科学工作者经过近20年的不懈努力,现已全面突破重要禾本科粮食作物和经济作物原生质体再生植株的难关,进入植物原生质体培养和再生研究的国际先进行列。

植物原生质体是指去除细胞壁,由质膜包被的生活细胞。这种细胞经培养能再生植株,从而实现植物功能的全能性。长期以来,常规的有性杂交在不同种属间难以成功,适于双子叶植物基因转移的 Ti 质粒载体,不易将目的基因携入禾本科等植物体内,给作物特别是重要粮食作物的基因工程育种带来困难。而植物原生质体为远缘优良性状和基因的转移提供了较理想的受体系统。通过两种具有不同遗传信息的原生质体融合或有用目的基因导入,经人工选择后可创造自然界没有的体细胞杂种或转基因植物,达到改良品种的品质、提高抗性及其它生产性状的目的。植物原生质体还是一个研究细胞壁再生、质膜等细胞骨架的结构和功能以及分离细胞器的良好实验体系,用以探索生命科学中有关细胞生物学、遗传学、植物生理学以至分子生物学的基本问题。

从 1960 年英国诺丁汉大学 Cocking 教授利用纤维素酶从番茄根尖细胞分离到大量有活力的原生质体以来,植物原生质体培养研究引起了世界各国科学家的极大重视。1971 年和 1972 年世界上第一例来自烟草叶肉细胞的原生质体再生植株和烟草种间原生质体融合的体细胞杂种植株相继问世。此后国际上高等植物原生质体研究迅速发展。人们曾期望的获得地上部结西红柿地下部产马铃薯的杂种植株已不纯属空想。1986 年原生质体融合的杂交组合已达 80 余例。其中,抗病毒病、抗虫、抗寒的马铃薯和番茄,抗除草剂的烟草和油菜,高产优质的脐橙以及胞质不育的水稻等杂种正在大田选育,包心菜和青菜原生质体融合育成的“千宝菜”已进入日体市场。然而植物原生质体培养和再生植株作为体细胞融合、外缘基因导入的基础,其技术的发展经历了一个艰难的过程。1986 年以前,80 多种再生植株大部分属茄科、伞形科、十字花科、芸香科等双子叶植物。单子叶植物的禾谷类和双子叶植物中重要农作物的原生质体培养仍被公认为国际性难题。我国科学家近几年来先后在国际上首次或较早地从玉米、大豆、野生大豆、高粱、谷子、小偃麦、大麦、猕猴桃、哈密瓜、水稻、小麦和棉花的原生质体获得再生植株。中国科学院的原生质体研究在全面攻克难关的过程中进一步得到发展。

---

感谢李向辉先生阅稿,并提出宝贵意见——作者。

## 一、历史的回顾

起步跟踪阶段(1972—1976年):70年代初期,中国科学院遗传研究所、植物研究所和上海植物生理研究所在国内首先开辟了植物原生质体的研究领域。在科研条件不尽如人意的情况下,科研人员自力更生,努力创造实验的基本条件。1973年遗传所502组在国内发表了第一篇关于“几种豆类植物原生质体的游离、培养形成小细胞团”的论文。由于当时选用豆科植物作为研究对象,难度较大,原生质体培养研究的进展缓慢。科研人员及时改用烟草、矮牵牛、胡萝卜等模式植物作为研究对象,在较短的时间内上述3个所相继使烟草、胡萝卜、矮牵牛的原生质体再生成植物。1974年遗传所获得了由小麦和蚕豆原生质体融合形成的细胞团。1975年植物所水稻单倍体愈伤组织起源的原生质体获得了再生细胞团和大量愈伤组织,为80年代中期主要禾本科作物的原生质体再生植株的突破作了最初的技术贮备。与此同时,以原生质体愈伤组织为基础的体细胞融合技术开始起步。在此阶段,遗传所、植物所、上海植物生理所还在国内积极组织学术交流,于1974年和1975年分别在北京、上海召开了全国第一届、第二届植物体细胞杂交工作交流会议,讨论解决研究难题的途径和方法。

同步发展阶段(1977—1985年):1977年后,3所科研人员一方面加速由模式植物转向有经济价值的双子叶植物和重要禾本科粮食作物原生质体的研究。另一方面进一步发展了原生质体融合技术。至1985年底,先后获得了6个科的20余种植物原生质体再生植株,其中包括茄科、伞形花科、玄参科的一些植物以及不易培养再生的单子叶植物棒头草(禾本科)、洋葱(百合科)等。此外,还获得了水稻、大麦、甘蔗、玉米、大豆、绿豆、草木樨、马铃薯、龙胆、灰藜和猕猴桃等重要植物原生质体的愈伤组织。在原生质体再生的基础上建立了技术体系。1981年后的4年间,共获得烟草与矮牵牛(遗传所、1981年)等8种体细胞融合杂种植株,其中有些植株后代进入大田筛选试验,从而为我国体细胞杂交培育全新的植物品种打下了基础。至此,我国的原生质体研究实现了与国外工作同步发展的转变。我院遗传所、植物所、上海植物生理所、华南植物所、昆明植物所、成都生物所的科学技术工作者共发表学术论文近百篇。这个阶段组织了国内的第三、四、五次体细胞杂交工作学术交流会议,并于1984年7月、1986年3月和4月先后举办了二期国内、一期亚洲地区国际性原生质体培养、细胞融合技术培训班。

局部领先阶段(1986年以后):由于植物原生质体的培养、体细胞的融合技术比较复杂,尚无一定规律可循。1986年以前的20多年,人们一直在探索如何将重要粮食作物和经济作物的原生质体培养成植株。1986年遗传所、上海植物生理所继法国、日本之后,在国内首先将水稻(粳型)的原生质体再生成植株。1987年植物所在世界上首次应用杂种玉米的胚性愈伤组织使原生质体再生植株,引起国际上很大反响。1987—1989年,上海植物生理所突破世界性难关,将6个大豆品种和1个野生大豆品系的未成熟子叶分离的原生质体再生植株。遗传所于1988年几乎与美国同时发表了小麦再生植株的报道。近年来,植物所和上海植物生理所等又在世界上首先成功地将小偃麦、高粱、谷子、猕猴桃、毛白杨、哈密瓜、诸葛菜等植物的原生质体再生成植株。这些成果的取得,使我国在该领域的研究,局部处于世界领先水平,受到国际同行的重视。与美国洛氏基金会、孟山都公司建立了合作关系并得到发展。第七个五年计划期间,3个所的科学家联合院内外兄弟单位,主持、承担了国家重点科技攻关专题“植物原生质体

培养和体细胞融合研究”，“豆科、禾谷类植物转化系统”，“有重要价值的标记基因和受体系统的建立”以及国家高科技研究计划中的“重要粮食作物的原生质体培养、高效成株技术及体细胞融合技术”课题，均较好地完成了计划。

## 二、技术的进步

E<sub>A3</sub>-867 纤维素酶的应用在国内原生质体研究中发挥了较大作用。上海植物生理所 1972 年以野生型绿色木霉中选出突变株制成 E<sub>A3</sub>-867 纤维素酶制剂，酶解细胞壁的效能与日本产的 Onozuka R-10 酶基本相同，且不需配加果胶酶，从而缓解了国内研究工作的急需。至 1976 年，仅该所用 E<sub>A3</sub>-867 纤维素酶制剂就从 20 多种植物材料中分离出原生质体，并把烟草愈伤组织和叶肉组织分离的原生质体分化成植株。1978 年遗传所在矮牵牛培养基 (DPD) 的基础上建立了原生质体培养基和分化培养基配合组成的 D<sub>2</sub> 培养基，并先后使普通烟草、长花烟草、粉蓝烟草及洋地黄等植物原生质体再生出植株。西德科学家 Meijer 和 Stainbiss 等 1983 年用 D<sub>2</sub> 培养基获得了圭亚那柱花草(多年生豆科草)原生质体再生植株。

技术的改进促进了研究工作的发展。虽然 Cocking 1960 年第一次已用酶法游离根的原生质体，但由于根尖细胞壁的组成不同于叶片，采用常规的酶混合液难以获得大量的原生质体。上海植物生理所的科研人员 1981 年在酶溶液中加入较多的 Rhozyme，基本解决了问题，已为国内外广泛采用。植物所在难再生的猕猴桃、玉米、小偃麦原生质体培养研究中，采用以不同组分培养基为特点的分步诱导法，促进了原生质体愈伤组织的繁殖、胚性转移和再化植株的分化。植物所近年来还在世界上较早地进行了水稻、玉米原生质体的超低温保存技术研究，快速化冻后获得再生植株。这项技术的研究成功，提高了原生质体分裂频率，可随时提供遗传转化受体，为研究细胞壁再生和植物细胞的抗性机理，筛选抗寒突变体等基本问题创造了条件。

## 三、应用的实例

上海植物生理所得到的 500 株移栽成活的烟草(草新 1 号)与龙葵野生种原生质体融合的体细胞杂种植株，经与河南省农林科学院烟草研究所合作，现已选育到一个具有生产价值的烟草新品系和一个小叶早熟的新材料。

遗传所将人  $\alpha$ D 干扰素分别转到烟草和水稻品种的原生质体中，获得了经分子杂交检测证明有外源基因整合的再生植株。转基因的第二代烟草正在测定对烟草花叶病毒 (TMV) 的抗性，水稻再生的转化植株已移栽到大田。

遗传所、上海植物生理所已分别以粳稻、糯稻的原生质体再生植株后代中选育到矮秆、抗逆和抗穗颈稻瘟病的一些株系，正在大田试验。其它如猕猴桃、大豆的有益变异株系也正在田间繁殖、筛选之中。

## 四、问题与展望

目前我国科学家虽然在国际上全面突破了主要农作物再生植株的难关，并较早地开展了

实用基因转化原生质体的研究,但仍面临着下述主要问题:(1)再生成功的主要农作物原生质体的分裂及分化频率还不够高,要使其达到与模式植物(如烟草等)原生质体培养类似的频率,以利于基因转移,还有一段距离;(2)存在较多难再生的作物品种种类,需进一步研究其再生规律,使培养技术规范化。因此,进一步掌握提高频率的技术,深入研究培养对象的不同遗传型和培养条件、方法以及形态发生能力间的关系,建立原生质体融合的筛选系统和对杂交产物的细胞遗传学分析技术以及分析转化基因的整合规律、后代的遗传稳定性等,将成为我国科学家下一步奋斗的目标。

随着上述目标的实现,我们将努力推进植物原生质体研究和应用的工作,使其进一步发展,并将可能从抗病、优质、高产的体细胞杂种中,从转移抗虫、抗病毒、高蛋白等基因的后代中以及从原生质体再生植株出现的无性系变异材料中,选育一批作物新品系或新材料。