

领域。

外源DNA在卵细胞中的转录以及转录—转译偶联,是研究纯化基因表达的很好途径,尤其是可以通过第二次注射导入基因表达的调控物质,以追查基因表达的改变,研究调控机理。

除了纯化基因和信息分子的表达研究之外,利用卵细胞系统研究染色体或染色质的基因表达也将受到重视。它将有可能为染色体的基因定位,重组染色质中组蛋白和非组蛋白对基因表达的作用等方面的研究增添新的知识。

参 考 文 献

- [1] Gurdon, J.B. et al., 1971, *Nature*, 233: 177—182.
- [2] Gurdon, J. B. et al., 1976, *J. Embryo. exp. Morph.*, 36: 541—553.
- [3] Dumont, J.N., 1972, *J. Morph.*, 136: 153—164.
- [4] Ford, C.C. and Gurdon J.B., 1977, *J. Embryo. exp. Morph.*, 37: 203—209.
- [5] Gurdon, J.B. 1974, *Nature*, 248: 772—776.
- [6] Gurdon, J.B. and D.D. Brown, 1977, in "The Molecular Biology of the Mammalian Gene Apparatus", V. 2: P. 111.
- [7] Gurdon, J.B. 1976, *J. Embryol. exp. Morph.*, 36: 523—540.
- [8] Gurdon, J.B. et al., 1976, *Nature*, 260: 116—120.
- [9] De Robertis, E.M. et al., 1977, *J. Embryol. exp. Morph.*, 40: 199—214.
- [10] De Robertis, E.M. and J.B. Gurdon, 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 2470—2474.
- [11] Etkin, L. D., 1976, *Devel. Biol.*, 52: 201—203.
- [12] Graham, C.F. et al., 1966, *Devel. Biol.*, 14: 349—381.
- [13] Gurdon, J. B., 1968, *J. Embryol. exp. Morph.*, 20: 401—414.
- [14] Gurdon, J.B. et al., 1969, *Biochim. Biophys. Acta*, 174: 614.
- [15] De Robertis, E.M. et al., 1977, in "The Biochemistry of Cell Nuclei", *Biochem. Soc. Symp.*, V. 42: 181—191.
- [16] Colman, A., 1975, *Eur. J. Biochem.*, 57: 85—96.
- [17] Brown, D. D. and Gurdon J. B., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 2064—2068.
- [18] Mertz, J. E. and Gurdon, J.B., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 1502—1506.
- [19] De Robertis, E. M. and Mertz, J. E., 1977, *Cell*, 12: 175—182.
- [20] Rungger, G. and Türler, H., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 6073.
- [21] Treendelenburg, M. F. and Gurdon, J. B., 1978, *Nature*, 276: 292—296.
- [22] De Robertis, E. M. and Olson, M. V., 1979, *Nature*, 278: 137—143.
- [23] Lane, C. D. et al. 1971, *J. Molecul. Biol.*, 61: 73—91.
- [24] Lane, C. D. and Knowland, J., 1975, in "The Biochemistry of animal development" P. 145.
- [25] Sehgal, P. B. et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 5030—5033.
- [26] 李文裕等, 1978, *实验生物学报*, 11: 109—124.
- [27] Woodland, H. R. et al., 1974, *Devel. Biol.*, 39: 134—140.

植 物 组 织 培 养

陈 季 楚

(中国科学院上海植物生理研究所, 细胞生理研究室)

早在1902年Haberlandt [6] 曾进行了多种植物的叶肉细胞、髓细胞等的培养试验。1921—1922, Molliard, Kott与 Robbins等先后在离体根尖及茎尖培养方面取得进展。直到1930

年左右,由于美国的White等人及法国的Gautheret等人的工作,植物组织培养才真正地建立并发展起来,在这期间建立了许多种植物的愈伤组织,开始了形态建成和生理学方面工

作,并于1937年首创了合成培养基等。植物组织培养从三十年代至今的五十年里发展是很迅速的,理论上和实践上的一个关键性突破就是“全能性”(Totipotency)的提出及证实。所谓全能性即是指细胞离体后可被诱导、培养并分化成植物的能力,同时该植物具有母体植株细胞全部遗传信息。早在1902年Haberlandt就已经提出了全能性的设想,后来White等人(1943)偶然发现在烟草的个别愈伤组织中长出了植株,于是又进一步提出了全能性问题。直到1958年英籍美国学者Steward^[9]用胡萝卜细胞诱导成植株,植物细胞的全能性才被科学地证明了。目前,植物细胞的全能性已在许多种的植物中不断得到证实,这些细胞可以是体细胞,也可以是性细胞(如花粉粒)。

植物细胞全能性奠定了植物细胞和组织培养研究的理论基础,成为有关工作的一个基本出发点;同时也为细胞和组织培养的实际应用开拓了广阔的前景。例如,它使在细胞水平上的基因工程的研究有了可能。显然,基因工程的结果不应仅仅停留在细胞水平,要体现到植物整体中,而全能性的发现正使之成为可能。

在近20年来的进展中,Cocking等(1960)^[4]首次用酶法脱去了番茄幼根细胞的细胞壁,成功地获得了大量植物原生质体。原生质体培养技术的突破推动了原生质体融合、体细胞杂交及外源遗传信息物质的引入等方面的研究,并取得了很大的进展。此外,由于植物组织和细胞培养研究的发展^[1:10],在工、农业的实际应用上也初见成效,现仅就以下几个主要方面作扼要的介绍。

一、花药培养和单倍体育种 印度人Guha和Maheshwari(1964)进行了曼陀罗(*Datura*)花药的离体培养,由花粉诱导形成了单倍体植株。这是花药培养研究的开端。嗣后,法国的Nitsch及其同事,日本的中田和田中、新关、大野等人又在烟草及水稻这两种重要的农作物中,从花药培养成功地诱导出单倍体植株。花药培养成为诱导形成单倍体植株的

重要手段。现据不完全统计,该项培养技术已在近45个属的植物中获得了成功。其中以烟草属、曼陀罗属、水稻属、茄属及矮牵牛属的研究较多。

因单倍体植株经加倍后可以得到纯合二倍体植物,故植物育种学家极为关注并深入开展了单倍体育种技术的研究。但由于诱导成苗的频率低(例如Wenzel等曾报导油菜花药培养诱导单倍体植株的频率仅为3/10,000左右);单倍体植株白化苗高等原因,目前单倍体育种仍受到较大的限制。

花药培养及单倍体育种近年来在我国得到了很大的发展,取得了较多方面的进展。据报道,由花药诱导成植株的已有水稻、小麦、小黑麦、大麦、玉米、甜菜、橡胶、油菜、茄子、辣椒、烟草、杨树等12种植物,其中在生产上已开始推广应用的品种有烟草、小麦和水稻等。

单倍体育种首先是要得到来源于小孢子的纯合二倍体植株,而在不少植物的花药培养过程中,往往药隔、花丝等部位极易诱导形成愈伤组织及苗,这给鉴定再生植株的倍性造成了极大的困难。Nitsch(1969)^[8]培养烟草离体花粉粒并获得了植株,看来这是直接获得花粉植株的一个有效方法。近年来我国科技工作者在水稻、烟草、茄子的花粉培养方面也得到了单倍体植株。

单倍体育种的实际应用是多方面的,例如法国人Doré关于石刁柏(*Asparagus*)的工作。石刁柏是一种高级蔬菜。它雌雄异株,雄株茎粗而雌株细小,故雄株产量优于雌株,因而在生产上希望种植雄株。Doré利用花药培养获得具YY染色体纯合的“超雄性”植株和XX的雌株,将它们分别进行快速繁殖移栽于大田,然后进行杂交,其F₁子代全部为雄株。该成果已于1977年在生产中推广应用。Doré在上述工作中将,无性系快速繁殖、花药培养技术和正常的育种程序进行了很好的配合,在生产实践中取得显著成果,这种做法是很可取的。

另外还应提到,单倍体材料由于其独特的染色体组成,可以作为研究细胞遗传学等基本问题的一个合适的材料。

二、细胞杂交——原生质体分离、培养、融合,大分子引入及突变体筛选。自从Cocking分离培养原生质体以来,已有一百种以上的植物的各部位组织、愈伤组织和悬浮细胞等材料都能脱壁从而分离出原生质体。目前由原生质体培养诱导再生成植株的包括矮牵牛、烟草、石刁柏、石龙芮、颠茄、芸苔、金鱼草、曼陀罗、胡萝卜等,再加上一些已获得愈伤组织但难于分化成苗的,可能有近40种植物。这些工作为体细胞杂交打下了基础。体细胞杂交的过程包括四个主要阶段。即(1)原生质体的分离,(2)原生质体的融合,(3)融合产物的选择性培养,(4)融合体再生成为植株。前面已提到,至今原生质体的分离已不存在太大的问题,用得多的材料来源是叶片。关于原生质体的融合目前已建立了用 NaNO_3 、高pH-高 Ca^{++} 及聚乙二醇(PEG)等三种诱导融合的方法。融合产物的选择性培养往往在很大程度上是成败的关键,目前也取得了一些进展。至于融合体再生植株,一般认为与亲本细胞的该特性平行相关。依上述组织培养程序已得到一批杂种植株^[2]。Carlson等于1972年用粉兰烟草和郎氏烟草为材料,通过体细胞融合,得到了第一个体细胞杂种植株。至今已得到十多种品种和种间的体细胞杂种植株:如烟草的品种间、品系间、种间杂种共有11种;另外矮牵牛种间一种、曼陀罗种间两种、胡萝卜种间一种。但为了获得人们所期望的植物新种,开展农作物科、属间的远缘体细胞杂交的工作则更有意义。在这方面,如德国Melchers等得到了马铃薯和番茄的体细胞杂种植株,匈牙利Dudits等关于胡萝卜和羊角芹间、雀麦与苜蓿间,以及印度Brar在高粱与玉米间获得体细胞杂种植物的工作皆是很好的尝试,他们的有关报道尚属初步结果。这方面目前在理论和实践上尚存在几个难题:1.某些具有优良农艺性状的主要

农作物的原生质体还不易培养和分化。这方面突出的例子,如禾谷类原生质体的培养就甚为困难。2.杂种细胞中染色体的丢失问题。高国楠研究烟草——大豆杂种细胞的细胞遗传时发现烟草细胞的染色体有逐渐丢失的现象,类似于人与小鼠细胞融合后的情况。不过Глеба(1978)最近报道拟南芥菜和野油菜的融合体,经过4—7个月的培养未发现两个亲本染色体的丢失。3.远缘杂种植株的可育性问题。从这些问题来看,体细胞杂交工作的主要障碍还在于细胞的遗传方面。核融合以后的一系列困难的克服要求培养技术有所突破。通过体细胞杂交的整套培养技术获得杂种植株,有可能跨过常规育种时远缘不亲和的障碍,从而开辟植物育种的新途径。这方面我国也已有良好的开端。

外源大分子等遗传物质的引入是研究高等植物遗传控制的另一途径^[3]。自1969年Hess将外源植物性DNA引入植物组织的报道发表以后,关于把外源DNA引入萌发的种子、幼苗、组织、培养细胞及原生质体的工作虽已经历了十年,而由于原生质体无壁、易于操作,以及分离培养成功和再生植株(包括体细胞杂交植株)的获得,近年来原生质体已被广泛地用为研究遗传控制的理想的实验系统。

人们对引入的兴趣是多方面的,包括DNA、细胞核、叶绿体等细胞器、藻类、细菌、病毒等的引入原生质体。引入往往是通过渗入、胞饮作用以及利用载体(如农杆菌的Ti质粒)来进行。引入以后的原生质体基本上能存活;在引入过程中,外源DNA大量降解,细胞器和微生物等引入后很快解体,这些成为技术上的主要障碍。使用DNA酶抑制剂、选择含有少量或不含核酸酶的特殊材料,以及最近有人用人造脂膜将大肠杆菌的DNA包裹起来,然后再引入等都是克服这一障碍的一些可采用的方法,不过至今还未能见成效。在一些实验中还观察到遗传转化的某些现象,但迄今令人信服的遗传转化的证据还不足。

这方面工作也说明植物组织培养已渗入到分子遗传学的研究领域,并将进一步发挥它的作用。

近年来,在植物细胞突变体的选择和应用的²研究中,植物组织培养已成为一种有效的手段。在细胞或原生质体培养中,通过理化诱变产生突变细胞系,这些突变体除用于遗传和代谢的研究外,还可作为体细胞杂交的带有选择标志的亲本,或用来改进作物的品质。例如,Carlson曾以单倍体的烟草愈伤组织进行细胞的突变筛选,得到了抗蛋氨酸磺基脲(MSO)的组织,并由此再生出蛋氨酸含量水平高的烟草株系。这类旨在提高必要氨基酸含量的氨基酸细胞突变体的筛选工作,显然是提高作物中氨基酸含量的一条途径。在抗病性方面,Carlson曾用甲基磺酸乙脂(EMS)处理,筛选到抗野火病的烟草。在甘蔗中,Heinz等选出了抗斐济病的亚系,Coleman选出抗花叶病毒的甘蔗植株。以上这些方面的工作很多,而如何建立有效的突变体的筛选程序以及突变的细胞株系或愈伤组织进一步分化成植株,还有待继续努力。

三、试管苗及细胞培养无性系的快速繁殖 据不完全统计,现已有300种以上的植物能在组织培养中诱导再生成植株。这是开展无性系快速繁殖的一个有利条件。快速繁殖首先由More(1960)用兰花获得了成功,现已有23个属以上的兰花能用组织培养方法进行繁殖,并发展为试管植物商品化生产。

快速繁殖主要利用下面几种组织培养方式:(1)用茎尖培养,已得到马铃薯、甘薯、柑桔等的无病毒植株。由花原基培养得到了花椰菜的无病毒植株。很多种兰花也是用茎尖培养的方法进行快速繁殖的。(2)直接用器官培养诱导形成不定芽。根据Murashige(1974)综述,已有93种草本植物能生成不定芽。(3)从愈伤组织或细胞培养,包括通过胚状体来繁殖植株。目前快速繁殖主要应用于大量繁殖甘蔗、草莓、葡萄、多种花卉及林木上。已提到

的获得无病毒植株也是一重要方面。其中有些已发展成工业化生产及商品化了。

我国为解决马铃薯无病毒种薯问题,近年来经有关单位协作,通过茎尖培养、快速育苗、病毒检定等方面的研究,已初步解决了种薯感染问题,并在北方得到一定程度的推广。由于种植甘蔗时蔗种需要量甚大(种植一亩需蔗种半吨至一吨),我国已开展利用组织培养快速繁殖蔗苗的工作,在广西已进行了推广。此外还可从珠心诱导不定芽,产生无病毒柑桔苗。

综上所述,应用组织培养于无性系快速繁殖及在实际应用方面已初见成效。

四、植物性药物的生产^[3] 植物性药物的生产也是植物组织和细胞培养在工农业上应用的重要方面之一。高等植物是药物最丰富的来源。早在1950年,人们就已预见通过植物组织培养生产植物性药物的可能性。近20年来,更发展了利用植物细胞的悬浮培养类似微生物发酵的方式进行工业化生产。据1971年的统计,悬浮培养的高等植物细胞能生成植物碱、及酚类等药物成份近30种。据了解这方面目前已有100多项专利,其中包括从薯蓣类植物生产薯蓣类固醇,以及从人参的细胞培养物中生产人参皂苷等有效成分。

进行这方面工作应有一个先决条件,即是所生产的药物的药效必须是肯定的,而且对每种有效成分要有化学或生物测定的方法。当然,在要进一步投产时问题就会更复杂一些。一般认为只有达到每15天能收集1千立升细胞悬浮物,并且达每立升至少含有约1克产品的水平,及在考虑到成本核算后,才有投产的价值。这方面的工作尚处于实验室或中间试验的探索阶段,以此作为生产植物性药物的手段尚有一段距离。

植物性药物生产一般先诱导发生愈伤组织,再进行细胞悬浮培养,从中筛选出可作为工业生产用的种子,进行大规模发酵式培养,而得到产物。其中以得到生产用的种子为工业

化生产的一个关键。为了使种子高产,进行突变处理、供给前体、酶促合成、生物控制、或利用体细胞杂交育种等均是一些有效手段,此外,选用价廉物美的粗制代用品配制培养基、防止大规模生产时细胞的退化,以及面临化学合成药物的挑战等,也都是些需要重视的问题。

由于药材越来越供不应求,以及植物性药物工业化生产具有能控制产物生成的条件、收集加工方便、不与农作物争夺可耕地等众多优点,这方面的工作肯定会获得迅速进展。

此外在细胞培养物中筛选新的生理活性物质,并用来进行生物转化、合成等研究,无论在理论上及实际上也均是有意义的,近年来同样取得了不少的进展。

植物组织培养虽是一种研究的手段,但近十几年来由于其本身技术上的问题有所突破,已被应用于一系列有关的分支学科的研究。其重要的成就表现在它在工、农、医等生产实践上已越来越发挥其作用,而这些成就又将进一步推动组织培养的研究,赋予它无限的发展前途。

参 考 文 献

- [1] 罗士韦(1978)植物组织与细胞培养研究工作的进展及其应用. 植物生理学报, 4:91-112.
- [2] 夏镇澳. 罗士韦(1979)植物细胞杂交研究的展望. 自然杂志, 2: 112.
- [3] Barz, W., E. Reinhard., M. H. Zenk (ed) 1977. "Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application" Springer-Verlag Berlin.
- [4] Cocking, E. C. (1960) A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. Nature, Lond. 187: 927-929.
- [5] Guha, S. & Maheshwari, S. C. (1964) In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. Nature Lond. 204, 497.
- [6] Haberlandt, G. (1962) Kulturenversuche mit isolierten Pflanzellen. Sber. Akad. Wiss. Wien 111, 69.
- [7] Ledoracion, L. (ed) 1975. "Genetic Manipulation with Plant Material" Plenum Press, New York and London.
- [8] Nitsch, J. P. (1969) Haploid plants from pollen grains. Science, N. Y. 163: 85-87.
- [9] Steward, F. C. (1958) Growth and development of cultivated cells. III. Interpretations of the growth from free cell to carrot plant. Ann. J. Bot. 45: 709-713.
- [10] Street, H. E. (ed) 1977. "Plant Tissue and cell culture" Second Edition. Blackwell Scientific Publication.

文 摘

Jerne网络学说

他认为免疫系统是由 10^{12} 淋巴细胞和 10^{20} 抗体组成,具有双重的特性,表现在(1)T、B淋巴细胞的作用部份是协同的,部份是对抗的。(2)淋巴细胞识别抗原时的反应可以是正的(如增值、激活、抗体分泌)也可以是负的(如抑制和麻痹)。(3)抗体分子有识别和被识别的特性,它们不但有结合部位可以识别抗原,而且有抗原决定簇可以被其它抗体分子的结合部位所识别,这种抗体分子兼指循环抗体和淋巴细胞表面的受体。因此抗体分子和淋巴细胞不但可以识别外来抗原而且可以相互识别。位于可变区的抗原决定簇由于氨基酸顺序的变化,就有千百万种不同的决定簇,这种决定簇称为个体型(决定簇)。因而在一个个

体内一个抗体分子或一个淋巴细胞受体上的个体型能被其它抗体分子和淋巴细胞上的受体所识别,后者是抗个体型的,它们再相继被其它抗体和受体所识别。从而淋巴细胞和抗体分子之间就构成一个极其复杂的网络系统。当受体识别个体型时主要引起刺激,而当受体上的个体型被识别时主要引起抑制,这样组成了一个相互制约的初态平衡的免疫网络。Jerne认为这免疫网络的主要特点就是淋巴细胞是处于受抑状态的。当外来抗原进入时,它刺激了特异性淋巴细胞,使它逃逸抑制,得到增强,从而产生免疫反应,而增强的结果促使免疫系统通过一系列相互制约的反应再度恢复初态平衡状态。

(叶敏)