

RNA 都是遗传信息的携带者,染色质蛋白是否也能作为遗传物质看待呢?这是一个值得重视的研究方向。因为在抗辐射的细胞的核和染色质内含有大量高分子量的非组蛋白,而在辐照敏感的细胞内这种高分子量的非组蛋白的量就相对的减少。假设染色体结构的稳定受这些非组蛋白控制,辐照敏感的细胞内,由于这种特殊的非组蛋白的量很低,染色质的骨架就相对地不稳定,因此辐照后极易崩解,导致细胞死亡,显然组蛋白和非组蛋白对染色体结构功能有决定性的作用,尤其非组蛋白对特异性遗传信息的转录起着重要的作用。如果将来我们能够通过辐照灭活先天性不正常的基因,然后把新的非组蛋白引入细胞有可能纠正基因转录方向的错误,为辐射分子生物学开辟新的研究领域。值得提醒的是虽然细胞培养方法能精确地研究辐照细胞内 DNA 和蛋白的各种变化,但因培养条件也是影响细胞辐射效应的一个主要因素,因此在分析射线对细胞的直接损伤作用的同时还必须考虑到细胞所在环境因素对细胞辐射效应的干涉,才能得出比较准确的结论。

参 考 文 献

[1] B. F. Kimer, D. B. Leeper, and M. H. Schneiderman, 1981, *Radiat. Res.* 85:270—

280.

- [2] H. Schlag, and C. L. Huhle, 1981, *Int. J. Radiat. Biol.* 40:75—85.
- [3] D. B. Leeper, M. H. Schneiderman, and W. C. Dewey, 1973, *Radiat. Res.* 53:326—337.
- [4] J. S. Bedford, and J. B. Mitchell, 1977, *Radiat. Res.* 70:173—186.
- [5] M. H. Schneiderman, W. C. Dewey, D. B. Leeper, and H. Nagasawa, 1972, *Exp. Cell Res.* 74:430—438.
- [6] D. P. Highfield, and W. C. Dewey, 1975, *Methods Cell Biol.* 9:85—101.
- [7] W. C. Dewey, and D. P. Highfield, 1976, *Radiat. Res.* 65:511—528.
- [8] W. A. Nagle, and R. M. Humphrey, 1973, *Int. J. Radiat. Biol.* 23:611—625.
- [9] T. P. Brent, J. A. Bulter, and A. R. Craithorn, 1966, *Nature*, London, 210:393—394.
- [10] W. C. Dewey, and S. M. Robinette, 1969, *Int. J. Radiat. Biol.* 16:495—500.
- [11] D. B. Leeper, M. H. Schneiderman, and W. C. Dewey, 1972, *Int. J. Radiat. Biol.* 21:191—196.
- [12] C. P. Roaphorst, S. A. Saporato, M. L. Freeman, and W. C. Dewey, 1979, *Int. J. Radiat. Biol.* 35:193—197.
- [13] W. C. Dewey, A. Westra, M. H. Miller, and H. Nagasawa, 1971, *Int. J. Radiat. Biol.* 20:505—520.
- [14] E. P. Clark, W. C. Dewey, and J. T. Lett, 1981, *Int. J. Radiat. Biol.* 85:302—313.

禾谷类植物的细胞培养和体细胞胚胎发生

王大元

(中国农业科学院柑桔研究所)

应用组织培养技术于农作物的改良已引起广泛注意,并取得了很大进展^[1]。从组织、细胞或原生质体再生植株是应用此技术的一个重要前提。虽然双子叶植物的细胞培养已取得很大进展,但对单子叶植物,尤其是具有重要农业价值的禾谷类植物 (*Graminaceae*),几年前还认为由组织培养再生植株是相当困难的。至于从禾谷类植物的原生质体再生植株直到目前

都被认为非常困难。Potrykus就培养条件、植物的种和原生质体的来源做了80,000余种不同处理^[2],未能从禾本科植物的原生质体培养获得持续的细胞分裂和产生愈伤组织。Cocking^[3]认为,用禾本科植物的叶片进行组织培养,很难获得愈伤组织。近几年的研究表明,

本文是1982年12月在杭州举行的中国细胞生物学会组织和细胞培养专题讨论会的学术报告之一。

不仅绝大多数禾谷类植物的组织培养物可以再生完整植株^[4],而且原生质体也可培养再生小植株^[5,6]。有趣的是,越来越多的证据表明,在禾谷类植物中,组织培养的植株再生主要是通过体细胞胚胎发生(Somatic embryogenesis)途径^[4]而不是像早期所认为的器官发生(Organogenesis)途径。本文评述近年来禾谷类植物的细胞培养的进展(不包括花药培养),重点讨论与体细胞胚胎发生有关的问题。

一、禾谷类植物组织培养中的体细胞胚胎发生

具有栽培价值的禾谷类植物常被用作研究对象,而对这一科植物的野生种的离体分化的研究较少。在1970—1982年之间,已先后从玉米^[7]、小麦^[8]、水稻^[9]、大麦^[10]、燕麦^[11]、高粱^[12]、黍^[13]等重要禾谷类植物的组织培养再生出完整植株。这些报道均认为再生的植株

是通过器官发生途径而来的。上述报道所用的基本培养基以MS培养基为主,也有使用B₅或SH为基本培养基的。绝大多数结果表明2,4-D是诱导愈伤组织产生的主要因子,从培养基中去除2,4-D或添加BA或NAA可促进器官发生和植株再生。所用的外植体以未成熟的幼胚和下胚轴为多,也有用顶端分生组织、叶肉细胞和花序作为外植体的。Wernicke(1980)^[14]和Vasil(1981)^[15]分别在高粱和珍珠粟的组织培养中观察到体细胞胚胎发生,1982年一些研究工作证明了玉米^[16]、小麦^[17]、水稻^[18]、燕麦^[19]等重要谷类粮食作物和紫狼尾草^[20]、羊草^[21]、多花黑麦草^[22]等禾亚科植物离体培养的再生的主要途径为体细胞胚胎发生(表1)。Vasil认为在禾谷类植物的组织培养中,体细胞胚胎发生是一个非常普遍的现象,但是体细胞胚胎发生的程度却因种而异^[4]。

表1 禾谷类植物组织培养中的体细胞胚胎发生

| 植物名称 | 外植体 | 生长调节剂 | | 参考文献 |
|----------------------------------|------------|----------------------------|-------------|------|
| | | 胚胎发生 | 植株 | |
| <i>Avena sativa</i> 燕麦 | 幼胚, 中胚轴 | 2,4-D 或 2,4,5-T | -2,4-D | 19 |
| <i>Bromus inermis</i> 无芒雀麦 | 中胚轴, 液体培养物 | 2,4-D | -2,4-D | 23 |
| <i>Dactylis glomerata</i> 鸭茅 | 叶 | 3,6-dichloro-o-anisic acid | 降低浓度 | 37 |
| <i>Lolium multiflorum</i> 多花黑麦草 | 幼胚 | 2,4-D | -2,4-D | 22 |
| <i>Oryza sativa</i> 水稻 | 幼叶 | 2,4-D | -2,4-D | 18 |
| <i>Penicum maximum</i> 羊草 | 幼胚, 小穗 | 2,4-D | -2,4-D + BA | 21 |
| <i>Pennisetum americanum</i> 珍珠粟 | 幼胚, 小穗 | 2,4-D | -2,4-D + BA | 15 |
| <i>Pennisetum purpureum</i> 紫狼尾草 | 幼穗 | 2,4-D | -2,4-D + BA | 20 |
| <i>Sorghum bicolor</i> 高粱 | 幼叶 | 2,4-D | -2,4-D | 14 |
| <i>Triticum aestivum</i> 小麦 | 幼胚, 小穗 | 2,4-D | -2,4-D + BA | 17 |
| <i>Zea mays</i> L. 玉米 | 幼胚 | 2,4-D | -2,4-D | 16 |

根据这些报道,下列因素对诱导禾谷类植物的体细胞胚胎发生具有决定性的作用:

(1) 2,4-D是诱导体细胞胚胎发生唯一不可缺少的激素,其作用的浓度范围是0.5—5毫克/升。BA和NAA可以增强2,4-D诱导体细胞胚胎发生的作用,但单独使用BA或NAA并不能诱导体细胞胚胎发生。椰乳也有促进体细胞胚胎发生的作用。

在加有2,4-D的培养基中,组织培养物产生一种胚性愈伤组织(Embryogenic callus)。只有从培养基中去除2,4-D或降低2,4-D浓度,这种胚性愈伤组织才能进一步发育成完整成熟的胚,并形成完整植株。

(2) 外植体来源对能否诱导体细胞胚胎发生是非常重要的。幼胚和花序是诱导体细胞胚胎发生的最好的材料。幼叶也可被诱导体细胞

胚胎发生。

(3) 外植体的发育时期是一个非常重要的因素。例如对高粱来说, 第三片幼叶产生体细胞胚胎发生的能力最强^[14]。在紫狼尾草中, 以1—3厘米长的花序最适于诱导体细胞胚胎发生^[20]。外植体太嫩或太老, 只能产生一种柔软、松散而没有结构的非胚性愈伤组织, 这种愈伤组织不能被诱导产生植株。

胚性愈伤组织在形态上用肉眼就能很容易将其与非胚性愈伤组织区分开来。其特点是: 色白、密实、具有不同程度的折褶结构。比较近三年关于禾谷类植物体细胞胚胎发生的报道和早期关于禾谷类植物通过器官分化再生植株的一些报道来看, 可以发现二者无论在诱导条件(都以2.4-D为主)和采用的外植体(都以幼胚为主)基本上很相似。我们认为这是由于早期的研究观察不够细致而得出不确切的结论。实际上早期的研究中已有人在无芒雀麦^[27]和大麦^[28]中观察到了体细胞胚胎发生, 但没有引起足够的重视。近三年的工作, 除更深入的进行了一些解剖学方面的观察外, 采用扫描电镜观察, 为体细胞胚胎发生提供了更确切的证据^[15, 20, 21]。

二、胚性细胞悬浮培养物 (Embryogenic suspension) 的建立和特点

组织培养方面的研究者常用“Suspension”一词来描述其液体培养物。由于所用的材料、研究目的和描述标准不一致, 很难对这些不同来源的液体细胞培养物进行比较。实际上Suspension一词的概念是很不一致的。本文所述的液体培养物系指在一定条件下具有体细胞胚胎发生能力的细胞悬浮培养物——胚性细胞悬浮培养物。下面以珍珠粟的胚性细胞悬浮培养物的建立和特点为例^[25], 予以说明。

将从珍珠粟花序诱导产生的胚性愈伤组织切成小片, 转入含2.5毫克/升2.4-D和5%椰乳的MS液体培养基中, 在27℃, 黑暗条件下作旋转振荡培养。振荡速度为150转/分。

在开始2—3周, 每2—3天倒出一部分旧的培养基, 并补充入同样成分的新鲜培养基。待液体培养物的褐变逐渐消失后, 每4—5天换入10—20毫升的新鲜培养基。几周后, 小的细胞团逐渐增多, 继续继代培养, 直到液体培养物中以这些小的细胞团为主要组成。这些小细胞团的特点是: 细胞小而圆, 细胞壁薄, 细胞质非常浓并富含淀粉粒, 没有或很少液泡, 可以看到原生质环流。细胞团常以4—50个的细胞团形式存在, 细胞团内的细胞彼此结合非常紧密, 没有胞间空隙。在液体培养物中可以看到少量球形胚结构的细胞团。将这种细胞悬浮培养物植到含2.4-D的固体培养基的表面, 它们可以经历与正常胚胎发生相类似的过程, 产生具有盾片、胚芽鞘、茎和根的完整胚, 并能萌发产生正常的植株。由于这些细胞团具有正常的胚性细胞特点, 并经历胚胎发生过程, 所以这种液体培养物被称之为胚性细胞悬浮培养物。

目前已从珍珠粟^[26]和羊草^[27]的幼胚, 紫狼尾草的花序(Wang和Vasil未报道)和多花黑麦草^[28]的叶片而来的胚性愈伤组织获得胚性细胞悬浮培养物。研究表明, 这些植物的胚性细胞悬浮培养物是禾谷类植物原生质体培养的理想材料。

三、禾谷类植物的原生质体培养

自从烟草叶片原生质体培养出再生植株以来, 已发现多种双子叶植物叶片的原生质体具有持续分裂和再现细胞全能性, 产生植株的能力。遗憾的是在禾谷类植物中, 不仅不能从叶片原生质体产生再生植株, 甚至很难看到叶片原生质体的持续分裂。因此研究者转向利用其它来源的植物组织作为制备和培养禾谷类植物原生质体的材料。Potrykus等^[29]培养来源于玉米茎的原生质体获得愈伤组织。Deka等^[30]培养水稻胚芽鞘的原生质体获得愈伤组织和根。Koblitz等^[31]培养大麦愈伤组织的原生质体获得了愈伤组织。蔡起贵等^[32]从液体培养

的水稻细胞制备和培养原生质体,得到了愈伤组织。上述报道均未能获得原生质体植株,而且有些报道的结果不稳定,难以重复。

Vasil等^[6]从珍珠粟原生质体培养再生小植株的报道为禾谷类植物的原生质体培养提出了一个有希望的新途径。他们从胚性细胞悬浮培养物制备了具有持续分裂能力的原生质体,此原生质体形成愈伤组织,并通过体细胞胚胎发生产生小植株。采用同样的方法,从羊草^[5]、紫狼尾草(Vasil和Wang待发表)均得到源于原生质体的小植株(表2)。Jones^[28]从多花黑

麦草的胚性细胞悬浮培养物的原生质体培养得到了愈伤组织。

采用胚性细胞悬浮培养物进行原生质体培养的程序大体如下:

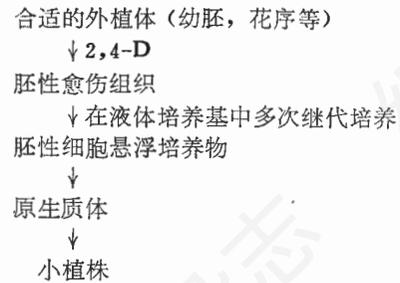


表2 禾谷类植物的原生质体培养

| 植 物 名 称 | 原生质体来源 | 培养结果 | 参考文献 |
|----------------------------------|--------------|-----------|------|
| <i>Bromus inermis</i> 无芒雀麦 | 胚性细胞悬浮培养物 | 白化植株 | 38 |
| <i>Hordeum vulgare</i> 大麦 | 愈伤组织 | 愈伤组织 | 31 |
| <i>Lolium multiflorum</i> 多花黑麦草 | 胚性细胞悬浮培养物 | 愈伤组织 | 28 |
| <i>Oryza sativa</i> 水稻 | 液体培养物 下胚轴 | 愈伤组织 根 | 32 |
| <i>Penicum maximum</i> 羊草 | 胚性细胞悬浮培养物 | 小植株 | 30 |
| <i>Pennisetum americanum</i> 珍珠粟 | 胚性细胞悬浮培养物 | 小植株 | 5 |
| <i>Pennisetum purpureum</i> 紫狼尾草 | 胚性细胞悬浮培养物 | 小植株 | 6 |
| <i>Sorghum bicolor</i> 高粱 | | 愈伤组织 | 39 |
| <i>Zea mays L.</i> 玉米 | 基尖 | 愈伤组织 | 29 |

从胚性细胞悬浮培养物制备和培养原生质体有如下优点:(1)原生质体制备容易,具有很强的分裂能力,实验结果易于重复;(2)不受季节限制,也没有田间材料的污染问题。存在的问题是:(1)胚性细胞悬浮培养物的建立主要是靠经验,重复性差,在一些重要的禾谷类粮食作物中尚未建立这种悬浮培养物;(2)原生质体再生的小植株很难移栽到土壤中去。

回顾禾谷类植物的细胞培养工作,可以看出,发现禾谷类植物中广泛存在体细胞胚胎发生是近几年来在这类植物的细胞培养工作中的一个重要进展。体细胞胚胎发生不仅提供了一个新的无性繁殖途径,而且由于大多数研究者认为体细胞胚胎发生和合子胚的起源一样,也是来自于单细胞,而由单细胞来的植株通常是不含嵌合体的,因而由体细胞胚来的植株从理

论上来讲也是没有嵌合性的,这是突变育种中所需要的一个理想材料。更重要的是目前禾草类植物原生质体培养再生小植株的报道都是利用胚性细胞悬浮培养物,即都与体细胞胚胎发生有关。如果我们回顾其它植物原生质体培养的情况,可以发现在胡萝卜^[83]、柑桔^[84]、苜蓿^[35]金鱼草^[86]等易于由原生质体培养再生植株的植物都是具有很强的体细胞胚胎发生能力。这些事实使我们相信禾谷类植物的原生质体培养工作在今后的一段时间内也必然会有显著的进展。

参 考 文 献

- [1] 罗士韦,1978,植物生理学报,4:91—112.
- [2] Potrykus, I. et al. In: Plant tissue culture and its bio-technological application (Eds. W. Barz et al.) Springer-Verlag, New York,

- pp. 323-333.
- [3] Cocking, E. C. 1978, In: Proc. of symp. on plant tissue culture, Science Press, Peking, pp. 255—263.
- [4] Vasil, I. K. et al. 1982, In: Variability in plants regenerated from tissue culture. (Ed. E. D. Earle) Praeger Press, New York, pp. 3—21.
- [5] Lu, C. et al., 1981, *Z. Pflanzenphysiol.* 104: 311—318.
- [6] Vasil, V. and I. K. Vasil, 1980, *Theor. Appl. Genet.* 56: 97—99.
- [7] Green, L. E. and R. L. Phillips, 1975, *Crop Sci.* 15: 417—421.
- [8] Dudits, D. et al., 1975, *Can. J. Bot.* 53: 957—963.
- [9] Nishi, J. et al., 1968, *Nature* 219:508—509.
- [10] Dale, P. J. and E. Deambrogio, 1979, *Z. Pflanzenphysiol.* 94: 65—77.
- [11] Cummings, D. P. et al., 1976, *Crop Sci.* 16: 415—470.
- [12] Gamborg, O. L. et al., 1977, *Plant Sci. Lett.* 10: 67—74.
- [13] Rangan, T. S. 1976, *Z. Pflanzenphysiol.* 78: 208—216.
- [14] Wernicke, W. and R. Brettell, 1980, *Nature* 287: 138—139.
- [15] Vasil, V. and I. K. Vasil. 1981, *Amer. J. Bot.* 68: 864—872.
- [16] Lu, C. et al., 1982, *Theor. Appl. Genet.* 62: 109—112.
- [17] Ozias-Akins, P. and I. K. Vasil, 1982, *Protoplasma* 110: 95—105.
- [18] Wernicke, W. et al., 1982, *Z. Pflanzenphysiol.* 103: 361—336.
- [19] Heyser, J. W. and M. W. Nabors, 1982, *Z. Pflanzenphysiol.* 107: 153—160.
- [20] Wang, D (王大元) and I. K. Vasil, 1982, *Plant Sci. Lett.* 25: 147—154.
- [21] Lu, C. and I. K. Vasil, 1982, *Amer. J. Bot.* 69: 77—81.
- [22] Dale, P. J. 1980, *Z. Pflanzenphysiol.* 100: 73—77.
- [23] Gamborg, O. L. et al., 1971 *Planta* 95: 355—358.
- [24] Norstog, K., 1970, *Develop. Biol.* 23:665—670.
- [25] Vasil, V. and I. K. Vasil, 1982, *Amer. J. Bot.* 69: 1441—1449.
- [26] Vasil, V. and I. K. Vasil, 1981, *Ann. Bot.* 47: 669—678.
- [27] Lu, C. and I. K. Vasil, 1981, *Ann. Bot.* 48: 543—548.
- [28] Jones, M. G. K. and P. J. Dale, 1982, *Z. Pflanzenphysiol.* 105: 267—274.
- [29] Potrykus, I. et al., 1977, *Molec. Gen. Genet.* 156: 347—350.
- [30] Deka, P. C. and S. K. Sen, 1976, *Theor. Appl. Genet.* 145: 239—243.
- [31] Koblitz, H., 1976, *Biochem. Physiol. Pfl.* 170: 287—293.
- [32] 蔡起贵等, 1978, *植物学报*, 20: 97—102.
- [33] Steward, F. G. et al., 1958, *Amer. J. Bot.* 45: 705—708.
- [34] Kochba, J. and P. Spiegel-Roy, 1973, *Z. Pflanzenzücht.* 69: 156—162.
- [35] Santos, A. V. P. et al., 1980, *Z. Pflanzenphysiol.* 99: 261—262.
- [36] Sangwan, R. S. and H. Harada, 1975, *J. Exp. Bot.* 26:868—881.
- [37] Hanning, G. E. and B. V. Conger, 1982, *Theor. Appl. Genet.* 63: 155—159.
- [38] Kao, K. N. et al., 1973, *Colloques Int. CNRS*, 212: 207—214.
- [39] Brar, D. S. et al., 1980, *Z. Pflanzenphysiol.* 96: 269—275.