

我国水稻细胞工程的研究进展

Progress in the Research of Rice Cell Engineering in China

黄群策

(湘潭师范学院生物系, 副教授 湖南湘潭 411201)

近代植物育种的历史表明, 育种新技术和新方法的应用将会使植物育种在更高的水平上发生一场深刻的革命。水稻细胞工程是近代生物技术的一个重要组成部分, 它是以水稻组织和细胞的离体培养和技术操作为基础的一种实验性很强的育种新方法和新技术。1995年5月31日至6月6日在山东省济南市召开了全国植物细胞工程学术讨论会, 其议题之一就是回顾和总结我国水稻细胞工程的发展历程, 提出今后的研究方向和研究目标。我国水稻细胞工程起步比较晚, 但近年来发展很快, 不论在水稻细胞生物学基础理论研究方面还是在生产实际应用方面均取得了重大的研究成果。

一、细胞培养是水稻细胞工程的基础

植物花粉培养的研究工作始于1953年(Tulecke, 1953), 而利用花药离体培养方法来诱导植物花粉粒形成单倍体植株的研究始于1964年(Guha et al, 1964)。我国水稻细胞培养的研究于70年代初才开始起步, 但在很短的时间内在细胞培养方法、高效培养基的研制、花培育种的诱导效果、试管苗正常化调控技术、雄核发育途径和新品种(系)的选育等方面已经取得了具有世界先进水平的研究成果。

1. 细胞培养方法

根据研究目的和研究材料的差异, 我国已经成功地建立起比较完整的水稻细胞培养的技术体系。从方法上来看, 我国学者主要采用花药培养、花粉粒培养、微室培养、平板培养、细胞薄层培养、胚珠培养、子房培养和胚乳培养等方法来获得愈伤组织和再生苗。水稻细胞培养技术的不断完善为水稻细胞工程的开展打下了坚实的基础。

2. 高效培养基的研制

在细胞工程中所利用的培养基, 其成分主要包括无机盐、碳源、氨基酸、维生素和植物激素等等。国际上早期的细胞培养主要采用MS培养基、Miller培养基和Nitsch培养基。我国学者根据水稻生态多

样性和水稻细胞工程的特点, 先后研制出适合于不同生态型材料的 N_6 、合5、“通用”、 SK_3 和 C_{17} 等培养基。随后, 根据水稻细胞在生长发育过程中对营养物质的需求特点以及在离体培养条件下生长激素对细胞的生理生化、分化和再生的总体效应, 成功地研制出能显著提高籼亚种细胞培养率的MN培养基。研究结果表明, 在MN培养基上, 籼亚种内各品种进行花药培养时, 其诱导率达到3.99%, 这比在其它培养基上进行培养的诱导率提高了1.6~7.6倍。我国高效培养基的研制成功在很大程度上解决了籼亚种花药培养的诱导率比较低的难题, 由此可望提高水稻细胞培养的工作效率, 节省大量的人力物力。

3. 雄核发育途径的研究

关于水稻的雄核发育途径, 学者们过去一直认为水稻以B途径为主。近年来通过对细胞和组织进行培养所获得的研究结果表明, 籼亚种各品种的雄核发育以A-V途径为主。除此之外, 根据各品种的生态差异, 还存在着A-G途径、A-G-U途径和B途径。从籼亚种雄核发育途径的多样性, 学者们找到了籼亚种内各品种在花药培养中愈伤组织诱导率低、绿苗分化率低和白化苗频率比较高的真正原因, 由此将为更好地利用低温预处理方法和改变培养基pH值来进一步改进籼亚种花药培养技术提供了有效的实验依据。

4. 细胞培养的诱导效果

在水稻细胞工程中花药愈伤组织的诱导频率和绿苗分化率是两个重要的技术指标。学者们认为, 在具有高效培养基的条件下, 水稻植株处于小孢子发育时期即单核中期至单核晚期为花药培养效果最好的时期; 在花药接种前进行低温预处理可以明显提高愈伤组织的诱导频率; 在花药接种后进行暗培养能有效地促进花药在短时间内产生出大量的愈伤组织; 利用籼稻品种、粳稻品种和爪哇稻品种进行亚种间相互杂交, 则其杂种 F_1 或 F_2 代材料在花药诱导效果上会表现出明显的杂种优势效应; 在取材前改善水稻植株的生理状况可以提高细

胞培养的诱导效果;利用苯乙酸这种具有弱生长素效应的天然植物生长素可以明显地增强愈伤组织在分化培养基上的分化能力,由此可以提高成苗率并建立起一种快速而高效的一步培养法。

5. 试管苗正常化调控技术的研究

通过细胞工程所培育的水稻再生苗通常都比较弱,根系不很发达,生长比较缓慢,乃至产生所谓的“玻璃苗”,并且移栽后成活率比较低。研究表明,利用植物生长延缓剂 MET 能有效地抑制未成熟胚愈伤组织的诱导频率,从而能明显提高愈伤组织的绿苗分化率,并且, MET 能有效地抑制再生苗地上部分的生长,而促进根系的健壮发育,可以使再生苗移栽后的成活率达到 95% 左右。

6. 同源四倍体材料的利用价值

在同源四倍体水稻的细胞内携带有四套同源染色体。利用这种材料为外植体进行花药培养能显著地增加二倍体的绿苗比例,并且能使花粉植株后代的类型更丰富。以同源四倍体为材料进行花药培养,不但可以培育出二倍体品系,也很容易获得多种多样的三体材料。我国已经建立起一个具有高频率再生植株能力的花粉无性系 A892034,这对水稻细胞工程的理论和应用研究都有重要意义。

7. 新品种(系)的选育

通过细胞培养来选育新品种是水稻育种方法的一项重大创新。经过多年的艰苦努力,我国目前已经选育出 100 多个新品种(系)。通过正式审定并在生产上具有较大增产潜力的新品种主要有中花 8 号、中花 9 号、中花 10 号、中花 11 号、花培 528、赣早粳 11 号和南抗 11 号等等。除此之外,花 8504、朝花矮、SH₈₆、88-26 和 96767 等新品系在生产试种中都表现出各自的优点和一定的实用价值。

二、在体细胞无性系中筛选变异系是水稻细胞工程的重要内容

国外学者 1978 年首次在以纯合二倍体品种 Norin8 为材料所培育出的水稻体细胞无性系中注意到变异现象。随后,这种变异现象引起了学者们的重视。我国学者在关于水稻体细胞无性系变异的研究中主要从影响体细胞无性系变异的有关因素、无性系变异的特点与遗传动态、通过组织培养加诱变处理所引起的遗传变异效应、抗性突变体的筛选和特定突变体在水稻育种中的应用等方面开展了一些探索性研究。研究结果表明:第一,体细胞无性系变异与人工诱发变异存在着一定差异,但两者在水稻新品种选育中可以相互补充,由此会扩大变异谱,使变异类型更加丰富,为新品种的选育提供物质基础。第二,以分化程度比较高的组织或细胞作为外植体,以浓度比较高的植物激素诱导外植体产

生愈伤组织并经过长时间的继代培养,由此所诱导分化出来的再生植株会表现出比较高频率的体细胞无性系变异现象。第三,体细胞无性系发生变异的可能机理涉及到细胞内的“转座子”的效应,这种“转座子”的活动在体细胞无性系产生变异性状过程中起着关键性作用。学者们发现,在组织培养过程中,某些物理因素或化学因素首先激活细胞内的“转座子”,随后会发生染色体断裂、DNA 修复和染色体结构变异,由此导致体细胞无性系发生变异。

在水稻细胞工程的操作过程中,往往会产生出各种各样的变异单株或变异群体,这给育种家们提供了更多的种质资源。当然,体细胞无性系变异不存在着明确的方向性,即有利变异和不利变异以及中性变异都同时存在,由此会给育种家们带来一定的困难。尽管如此,我国学者在对水稻体细胞无性系变异进行筛选的过程中主要在如下 3 个方面取得了明显的突破。

1. 早熟品系的筛选

在水稻常规育种中一般通过两条途径,即利用早熟亲本进行有性杂交和采用辐射诱变处理来筛选早熟突变体。实践证明,利用前者则育种时间太长(约需 7~8 个世代),并且原品种的特征特性很难保持;采用后者则其后代的综合性状会变劣,难以获得具有实用价值的材料。学者们在水稻细胞工程的研究中已经发现,体细胞无性系的早熟变异比较多,并且这种变异可以在比较短的时间内(3~4 个世代)趋于稳定,由此可以选育出能保持原品种主要农艺性状的早熟品系。关于利用体细胞无性系变异材料来筛选早熟品系的原理,大多数学者认为,水稻的生育期性状属于数量性状,受微效多基因控制,利用体细胞克隆技术可以将普通栽培稻种细胞内长期处于静止状态的许多基因活化并加以利用,结果,早熟变异体能在很短时间内得到纯化和稳定。

2. 雄性不育性的筛选

目前我国三系杂交水稻组合主要由“野败”(WA)型细胞质雄性不育系配组而成。这种由单一细胞质组配的杂交水稻存在着遗传脆弱性的潜在危险,因而选育出新质源细胞质雄性不育系已经成为我国三系杂交水稻育种的重要研究课题之一。实践已经证明,通过在体细胞无性系变异体中筛选具有雄性不育特性的材料,进而转育和培育出具有实用价值的雄性不育系是一条有效的育种新途径。我国学者自 1989 年起开展这项研究,先后在水稻体细胞无性系突变体中筛选到各种各样的雄性不育单株,现在已经完成了新质源细胞质雄性不育系的三系配套,可望近期在生产上推广应用。

3. 抗病品系的筛选

利用体细胞无性系变异材料以及体细胞变异

体的离体筛选来寻找和发现水稻新抗源为水稻抗性育种的开展提供了新的思路。我国学者的研究发现,水稻对稻瘟病菌的抗性在一定程度上能通过离体细胞得到表达,因而利用致病的生理小种所产生的毒素对离体细胞进行抗病性诱导,则能有效地鉴别和筛选到具有新抗性的个体。此外,利用活体病原菌直接感染水稻愈伤组织,从中筛选出抗菌细胞系,进而培育出抗病品系也是寻找新抗源的有效方法。近年来,我国学者在对水稻抗白叶枯病、抗胡麻叶斑病和抗稻瘟病进行离体诱导筛选中均已取得了可喜的研究进展。

除此之外,我国学者在水稻矮秆体细胞突变体、耐盐性突变体、特种紫色黑米变异体和耐寒性变异体等方面的筛选中均获得了一些具有实用价值的新品系和新种质。

三、原生质体的培养和融合是水稻细胞工程的发展方向

原生质体用于水稻品种改良的一个基本条件是:首先要能获得大量成活的原生质体,随后要使这些原生质体再生出大量的子代细胞,直至再生成完整而可育的植株。

我国于1975年首次获得了梗稻原生质体所形成的细胞团。随后,于1978年获得了愈伤组织。直到1986年才获得了梗稻品种原生质体的再生植株,而1988年才成功地由籼稻品种的原生质体诱导出再生植株。值得注意的是,培养水稻原生质体不是水稻细胞工程的目的,而是进行水稻细胞工程的一种手段,其真正目的在于以此为手段进行异源体细胞融合,并将其作为异源基因转移的受体以及在其中筛选出优良的体细胞无性系变异体。

目前我国在水稻原生质体融合时学者们所采用的方法主要是化学方法(即PEG法)和电融合法。在对异源融合细胞进行筛选时主要采用互补筛选法和机械分离法。近年来我国在如下三个方面进行了比较突出的工作。

第一,对异核体进行鉴定和筛选的技术体系进一步完善。通过异源细胞融合后,如何准确地鉴定和筛选出真正的异核体是原生质体融合的关键技术之一。由于化学抑制剂(如IOA和R-6G等)在水稻异源原生质体融合后对杂种细胞进行筛选时的作用和效果已经得到证实,因而学者们更容易从融合体系中鉴别和分离出真正的异核体。

第二,通过不同物种间原生质体融合产生出体细胞杂种植株。为了从野生稻种中获得抗虫特性,学者们利用广亲和性梗稻品种(*Oryza sativa*)与高抗褐飞虱、白背飞虱的药用野生稻(*Oryza officinalis*)进行原生质体融合,在再生植株后代中已经

筛选到带有药用野生稻抗虫性基因的新个体。

第三,通过不同属间异源原生质体融合后向水稻细胞内导入异属所特有的优良基因。大量的研究表明,在大黍(*Panicum maximum*)细胞内带有专性无融合生殖基因。学者们利用梗稻品种02428与大黍进行原生质体融合,在其异核体再生后代中已经观察到一些异常的生殖现象:子房未经授粉作用而膨大;花药内的花粉粒败育;在一朵颖花中长出7~13枚花药;雌蕊由2~3个连体的多柱头和多子房组成等等。除此之外,水稻与狼尾草(*Penisetum sp.*)进行体细胞杂交后转移无融合生殖基因的研究也取得了可喜的进展。这些阶段性成果的取得为进一步开展固定水稻杂种优势的研究提供了新材料和新思路。

四、水稻细胞工程在水稻育种中的科学意义

水稻细胞工程将使水稻育种家们改变过去那种只从水稻植株的外观性状来改良品种的传统育种方法;而今从细胞水平来观察和改造水稻的本质性状,就可使育种工作进入更深的层次,育种效果会更加明显。

水稻细胞工程的深入研究将使育种家们能在更大范围内选用植物的优良基因资源,由此将会扩大水稻杂种后代的变异类型和变异幅度,使综合性状优良的单株在后代群体中的出现机率大大地增加。在自然界,植物各物种的遗传保守性相当明显,各物种之间的生殖隔离使得物种间很难进行遗传物质的交换和转导,而利用常规育种方法完全不能消除这种遗传保守性。水稻细胞工程技术的应用将打破物种间和属间甚至科间的遗传障碍,使得普通栽培稻有可能从近缘的异种植物获得具有特殊价值的异源优良基因,因而将进一步丰富水稻的种质资源,为优良新品种的选育奠定基础。

通过细胞工程培育出胞质杂种将使水稻的遗传体系发生根本性变化。通过异源原生质体融合后所产生的杂种个体就是胞质杂种,其细胞内不仅包含有双亲的核基因组,而且还带有双亲的核外遗传物质。据研究,水稻抗除草剂Atrazine性状和雄性不育性状在很大程度上分别受叶绿体基因组和线粒体基因组控制。通过常规育种方法很难将异源的胞质基因重组在同一个体内,而通过体细胞杂交就可以将两者重组并培育出胞质杂种。

通过细胞工程可以培育出优良的异核体杂种。水稻的主要农艺性状是数量性状,受微效多基因控制,利用基因工程技术很难实现一次性多基因转移,而体细胞杂交则为异源多基因融合和重组打开了方便之门,由此可望培育出优良的异核体杂种。

细胞工程技术与 DNA 重组技术相结合可以更深入地从分子水平探讨水稻育种的新方法,由此将进一步提高水稻育种的研究水平,从而建立起由个体、细胞和分子组成的综合研究体系。这一研究体系的建立将使育种家们克服水稻常规育种的盲目性,增强育种的目的性,在更大程度上定向地改造和改良现有的水稻品种。

五、水稻细胞工程中急待解决的问题

1. 外植体遗传背景贫瘠化

水稻新品种的培育和新种质的创造在很大程度上依赖于水稻的遗传资源和各杂交亲本的合理组配。从目前的研究现状来看,由于桥梁亲本和具有高培养力的亲本多次重复使用,使得目前所获得的杂种材料具有重叠的亲缘关系,其遗传重组范围也日趋狭窄,这有可能会发生遗传脆弱性的潜在危险。为了解决外植体遗传背景贫瘠化问题,除了进一步在普通栽培稻品种资源中继续鉴定和筛选具有高培养力的材料之外,还应该注意通过原生质体融合和基因工程等方法从异种或异属植物中引进优良基因,由此可望进一步丰富水稻细胞工程中外植体的遗传背景。

2. 外植体的绿苗诱导频率有待提高

目前在水稻细胞工程中,外植体的绿苗诱导频率还难以超过 1%,一般情况下为 0.1~0.5%。据研究,普通栽培稻外植体的绿苗诱导频率主要依其基因型而发生明显的变化。一般而言,爪哇亚种>籼粳亚种间杂种>粳亚种内品种间杂种>籼亚种内品种间杂种>籼亚种内的各品种。因而,要提高水稻外植体的绿苗诱导频率则首先应该从遗传上注意筛选具有高培养力的基因资源,然后将其导入优良亲本和杂种细胞中,由此可望达到预期目的。

3. 原生质体培养和再生植株的技术有待于进一步完善

在我国水稻原生质体培养和再生植株的过程中,首先应该注意的是,水稻品种的遗传背景起着明显的限制作用。目前只有少数水稻品种能再生出完整植株,而大部分水稻品种还难以通过原生质体培养途径再生出完整植株。其次,少数可再生植株的品种,其培养力仍然不很高,植株的绿苗诱导频率还低于 0.1%。除此之外,原生质体培养的周期比较长,从开始工作到诱导出完整的绿苗至少需要半年时间。由此可见,水稻原生质体培养和再生植株的技术还有待于进一步改进和完善。

六、展望

通过育种新方法培育出单位面积增产潜力更大的水稻新品种,对于缓解我国目前人口不断增加而可耕地面积不断减少的矛盾具有重大的现实意义。近年来,我国水稻育种现状表明,由于水稻种质资源的亲缘重叠,利用常规育种方法和技术很难培育出增产潜力更大的水稻新品种。然而,随着水稻细胞工程的研究不断深入,技术不断改进和完善,水稻育种现状将会改观。通过对体细胞无性系变异进行鉴定和筛选,育种家们将更快更容易地培育出新品种。通过远缘体细胞之间融合,进而筛选和培育出异核体和胞质杂种,有可能将异源的优良基因(如抗病基因、抗虫基因、高光效基因、高蛋白质基因和无融合生殖基因等等)不断地引入到水稻的遗传组成中,由此将进一步丰富水稻的遗传基础,扩大水稻的遗传变异幅度。特别值得注意的是,水稻细胞工程的不断发展将为我国一系法杂交水稻的研究寻找到或创造出具有实用价值的无融合生殖材料,由此将开创我国水稻杂种优势固定的新局面。除此之外,水稻细胞工程技术的不断完善将为水稻基因工程的深入研究和应用打下坚实的基础,由此可望水稻育种家们能更主动地对水稻品种进行定向培育。

(责任编辑 王宏章)

(上接第 61 页)

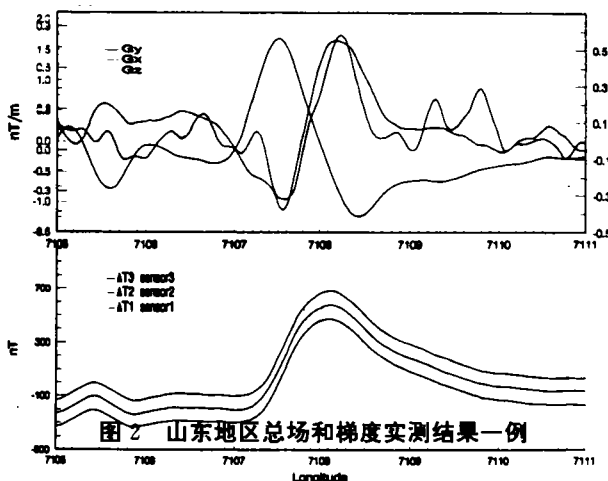


图2 山东地区总场和梯度实测结果一例

Gx、Gy、Gz 的测量结果。剖面上显示,三个 ΔT 曲线间有很好的-致性,三个梯度曲线与三个 ΔT 曲线之间,异常形态的相对关系与理论符合得很好。实测结果显示,梯度比总场的分辨率高,如剖面上经度 7 107 分到 7 110 分段,总场主要在 7 108 分附近显示一个异常峰,在 7 109 分附近只隐约有一平滑弱异常。而梯度结果,特别是垂直梯度,明显显示出四个(不计小峰)异常峰,表明其下方有多个磁源体,总磁异常是多个磁源体的叠加异常。

山东航磁梯度试飞结果还提供了试验区石油地质构造的部分深部细节,并提供了新的油气地段。这些实测结果说明,我国已成功地实现了航磁梯度高精度测量,我国的航磁测量技术已走上了一个新台阶。今后,它将为国内的资源勘探、军事探测以及地下水和海洋方面的探查作出积极的贡献。

(责任编辑 蔡德诚)