

标为  $3.175\beta$ , 所以都是很强的致癌物; 1, 2, 5, 6-二苯并蒽虽然  $K$  区指标为  $3.305\beta$ , 但  $L$  区指标为  $5.67\beta$ , 只略大于  $5.66\beta$ , 故为次强的致癌物; 1, 2, 7, 8-二苯并丁省  $K$  区指标为  $3.24\beta$ ,  $L$  区指标为  $5.42\beta$ , 故无致癌活性。因此这一理论能较好地判别芳香烃的致癌活性。

Allison 等从另一个角度, 即认为致癌物与受体间形成电荷迁移络合物是致癌的必要条件。致癌物应该既是良好的电子给体, 又是良好的电子受体。从几何条件来看, 应该比较容易接近细胞表面或内部的重要生物大分子。这种理论目前比较流行, 而且电荷迁移络合物的形成很容易用可见光区的吸收谱、电子自旋共振技术等测量。虽然具体的细胞受体是什么, 目前还不清楚, 但各种致癌物与吖啶形成电荷迁移络合物, 颜色深浅是形成络合物能力的量度它和致癌活性之间有着相当一致的关系。

以上只是举出几个例子说明量子生物学的研究对象、研究所得的结果及其意义。实际上目前工作已经有了很大进展, 这里不再一一列举。

综上所述, 量子生物学的发展已经成为分子生物学的一个重要分支, 也是生物物理学在微观方面发展的重要方向。虽然它的发展还只不过二十年左右的历史, 还是一门非常年轻的边缘学科, 但由于它所研究的内容正是当前分子生物学还无法解决的关键性问题, 因此具有广阔的发展前途。另一方面它的发展必须同时有实验工作者的支持, 否则无法检验理论本身的准确性。在我国, 必须尽快建立一支队伍开始从事这方面的专业研究。同时, 广大的生物学工作者和生物物理学者也应具备这方面的基本知识, 以便经常互相沟通, 促进发展。

### 参 考 资 料

- [1] Pullman, A. and B.: Quantum Biochemistry, 1963.
- [2] Szent-Györgyi, A.: Introduction to a Submolecular Biology, 1960.
- [3] Zeno Simon: Quantum Biochemistry and Specific Interactions, 1976.
- [4] 永田親義: 《量子生物学入門》, 1975.

[本文于 1978 年 1 月 10 日收到]

## 细胞工程学在遗传与育种上的应用

郑 国 锴

(兰州大学生物系)

### 前 言

以微生物为材料进行遗传与育种的研究。有很多方便。这是由于微生物生长一代的时间短, 有较长的单倍体期, 而且它们能在一定的培养条件下, 在很短时间内生长出大量相对同源的种群, 供我们筛选大量基因型 (Chaleff 和 Carlson, 1974)。对高等植物来说, 就没有这些有利条件, 因此, 在遗传与育种研究上, 受到很大限制。近年来, 细胞生物学方面许多新技术的兴起, 如单倍体育种技术, 植物原生质体的分离、培养, 细胞器的移植和细胞融合等, 大大改

变了过去的面貌, 高等植物也能像微生物一样进行实验操作了。这是一个巨大的革新。

应用细胞生物学的方法, 按照人们预先的设计, 有计划地改变或创造细胞遗传物质的技术, 以及发展这种技术的研究领域, 叫做细胞工程学 (常协恒一郎, 1975)。随着细胞遗传学, 细胞生理学, 分子遗传学以及组织和细胞培养的发展, 细胞工程学在遗传与育种上的重要性将与日俱增。

根据设计要求, 按研究对象中需要改造的遗传物质的不同, 细胞工程学可分为 5 个方面:

- 细胞工程学 {
1. 基因工程学
  2. 染色体工程学
  3. 染色体组工程学
  4. 细胞质工程学
  5. 细胞融合工程学

下面我们将按这 5 个方面分别叙述之。

## 一、基因工程学

基因工程学的研究内容是：排除多余基因，添加有用基因，或以有用基因代替有害基因等。遗传信息的来源有：分离的 DNA，噬菌体携带的选择的细菌基因，完整的细菌，线粒体，叶绿体或特别合成的 DNA 等。工程的顺序是：把某种生物细胞中的遗传物质，从细胞中提取出来在体外进行复制，然后又通过载体（质粒）将这种复制出来的遗传物质（DNA）导入另一种细胞，从而改造这个细胞的遗传结构，使之具有新的性状。在高等生物领域里，这项工程的研究，在理论上已经没有什么障碍，但在实践上目前还无头绪。在高等植物中，已在进行探索性的转化与转入实验，尚未得出令人信服结论。

所谓植物转化是：在外部引进的异源 DNA（转化 DNA）的作用下，异源 DNA 参与寄主细胞 DNA 的重组，并在寄主的表现型中显示出自己的遗传信息，从而使植物寄主的一定遗传性状产生变异。目前进行这项实验困难较多，在高等植物中导入异源 DNA 时，要防止细胞内水解酶的破坏，进入植物细胞壁也很困难，还有胞饮作用的阻挠，因此，这些异源 DNA 进入受体后大都很快被降解，成功的例证并不多见。

原生质体可能是 DNA 转化实验最理想的受体，因为它没有细胞壁，DNA 酶活性低，能大量处理，而且选择群体时容易操作，因此，现在对植物转化实验的批评，没有涉及原生质体的工作。

1972 年 K. Ohyama, 等以大豆原生质体为材料进行了转化实验。本来，在以乳糖或甘露醇为唯一碳源的培养基上，可能是由于大豆细

胞缺少甘露醇脱氢酶的缘故，大豆细胞是不能培育生长的。Ohyama 等用来自细菌的含有产生甘露醇脱氢酶信息的 DNA 导入缺乏这种酶的大豆细胞的原生质体后，他们分离出了能在甘露醇加乳糖上生长的细胞，但未能测量出酶的活性。无性繁殖系生长极为缓慢，而且未能长成足够大量生化分析用的材料。

目前，转化实验材料都利用整株植物、器官和细胞培养进行。

比利时 Ledoux 实验室，以拟南芥菜为材料，进行了不少工作。在他们 1975 年的报道中说：拟南芥菜的硫胺素合成缺陷的突变体，子叶无叶绿素，幼苗只能生长 15—20 天，突变体种子经大肠杆菌 DNA 处理后，萌发的种子中有 0.7% 能长大并开花结实，这种性状是可以遗传的。后代经回交和自交试验表明，矫正型是显性，核遗传，遗传信息紧密联结在染色体组上，是加入到突变体的基因组上，而不是替代的。Lurquin 和 Hotta (1975) 用大肠杆菌和溶菌小球菌中提取的 DNA 处理拟南芥菜的愈伤组织细胞，经过 7 天培养，分析了这些细胞中分离出来的 DNA，结果没能证实拟南芥菜细胞中有细菌 DNA，既无游离的，也没掺入到基因组中。

西德的 Hess 在 1969—1973 年用矮牵牛叶片的花青素颜色及叶形作转化试验。他用野生型红花矮牵牛叶中提取的 DNA 处理了白花的矮牵牛的幼芽，产生非常高的转化率；达百分之二十五以上。后来换了个地方再做同样实验，转化率降低了相当多。以后，Hess 和 Hoffmann 看到了，从矮牵牛叶肉组织分离出来的原生质体，被以  $^3\text{H}$  和  $^{14}\text{C}$  双标记的 DNA 所整合。还证实有部分给体 DNA 进入了原生质体的核内。可惜的是未能使受体原生质体得到完整的植株。

对 Hess 的一系列研究，有些人提出了不同看法，荷兰的 Bianch 等人从组织学方面深入研究了嵌合体矮牵牛的生长点。他们认为，决定花卉颜色的基因，在鳞茎皮二层一定是显性，因而 Hess 用 DNA 处理幼芽就为时过晚了。

Bianch 想以病毒感染来解释 Hess 的结果。另外, Straub 曾用同样材料作了重复试验,但未得到理想的结果。

在美国的几位科学工作者 Kleinhofs 等 (1975) 对异源细菌 DNA 并入植物 DNA 也发生疑问。他们用豌豆、番茄和大麦等材料进行了广泛深入的研究,都未能证实前人关于异源 DNA 并入几种植物的 DNA 或在这些植物中进行 DNA 复制的结果。他们的结论认为,过去作为外源细菌 DNA 并入植物 DNA 证据的那些实验事实,应看作是污染而不是并入。

在高等植物中是否出现遗传的转化,仍然是个争论的问题。

通过噬菌体为媒介的细菌基因的转导,在细菌中早已被证实。近年来已有人研究了将细菌基因转入高等植物以及其后表现的可能性。由噬菌体将遗传信息转移到植物细胞基因组的现象,叫做转入 (transgenosis)。澳大利亚的 Doy (1973) 及其同事,利用特异的转导噬菌体  $\lambda$  和  $\phi 80$ , 将它们所携带的大肠杆菌的乳酸和半乳糖操纵子基因简单地加到在化学成份完全清楚的培养基上培养的植物细胞中去。这些转入的受体细胞绝大部分是 Doy 实验室育成的番茄和拟南芥菜的单倍体细胞系。在正常情况下,番茄愈伤组织不能生长在以半乳糖为唯一的碳源培养基上。可是当用噬菌体接种到番茄的愈伤组织,在一起培养后,所有愈伤组织都能在含有半乳糖的培养基上缓慢生长。看来  $\lambda$   $\phi$  gal<sup>+</sup> 噬菌体能提供番茄愈伤组织在半乳糖培养基上生长的必需信息。他们还做了其他一些实验,通过这些实验初步证明,在进化上虽为远缘,但具有类似代谢途径的细胞之间可以由噬菌体作媒介发生转入作用。

他们对自己所作的结论是深信无疑的,他们否认转入系由微生物污染所致这一看法。

## 二、染色体工程学

染色体工程学这个名词,虽然在七十年代初期才提出来,但这项工作,早在三十年代就开始了。自 O'Mera 于 1940 年提出了这项工程技

术以后,直到现在,主要研究内容是:按照人们的意图添加同种或异种染色体,消除同种染色体以及替代同源和同祖染色体。这项工作目前多半在六倍体普通小麦与其他种、属之间进行。由于六倍体普通小麦是一种很好的遗传缓冲器,是一种正常的种间杂种 (AABBDD),很容易容纳其他种、属添加染色体。异种染色体添加系可从小麦与外来种、属杂交而得。通常是经过一次或多次与小麦回交,然后自交,来选择某种需要的性状。有人 (Riley 和 Chapman, 1958) 以普通小麦与黑麦杂交,由于黑麦染色体不能与普通小麦配对,在减数分裂染色体重组时,黑麦基因不能转到小麦的染色体上,而只能将黑麦整个染色体加到整个染色体组中。所得子一代杂种为多倍单倍体 (21'W 7'R), 28 个染色体,经秋水仙素处理后,成小黑麦八倍体 (21''W 7R''), 56 个染色体。再与小麦回交得到七倍体 (21''W 7'R), 49 个染色体。与小麦再回交一次就可得到外加的单体植物,单体植物自交后得二体植物 (44 个染色体)。另外,还有一个外加系是加入了黑麦染色体第 II 对,成为 44 个染色体的二体植物,系来自七倍体植物自交的结果。黑麦的四对 (I、II、III、IV) 染色体分别加入到 42 个小麦染色体中成为具有 44 个染色体的异种染色体外加系。它们的后代表现型上的表现各不相同。加入第 II、III 对后能使小麦抗锈病。

下面再谈一下染色体替代问题。染色体替代的主要目的是,把已经知道的抗病性或其他有利特性受某一染色体控制后,把这个染色体替代另一个具有其他性状的品种的染色体。染色体替代有三种:第一种是用普通小麦自身的染色体来替代,叫做缺对或四体植物;第二种是普通小麦一个系统(或品种)的染色体用别的系统的相同染色体来代替,叫做相同染色体替代;第三种是用异种植物的染色体替代,叫做异种染色体替代。现以异种染色体替代为例,把普通小麦的 2A 染色体用黑麦的 2R 染色体替代。为了达到这个目的,首先要育成这种类型植物所必需的基本材料是缺对植物和异种染色体外

加系。这样就可把普通小麦缺对 2A 与小麦 2R 染色体外加系(具有 21 对小麦染色体加上一对黑麦 2R 染色体)杂交,子一代杂种染色体  $2n=42$ , 其中 20 对染色体是除 2A 外的全部普通小麦染色体,二个一价染色体是 2A 和 2R。减数分裂时可产生四种类型配子。其中的一种是具有除 2A 以外的 20 个普通小麦染色体和黑麦的 2R 染色体 ( $n=21$ )。这种配子自花授粉,就得到所期望的异种染色体替代的植物。其中 20 对为除 2A 外的普通小麦染色体和一对 2R 染色体。

由上面所举的例子可以看出,染色体工程学的发展,主要是依靠研究者耐心细致的杂交和细心的染色体观察,才能育成各种染色体添加系和异数体系。现在,应用染色体工程学的方法,在许多添加和替代染色体的工作中,已经获得了不少有遗传学和育种学价值的品系。例如,获得了添加单个冰草染色体的小麦品系中间,有的能抗粉露病菌,杆锈和叶锈。这种抗性均呈现显性单因子遗传。将黑麦染色体 III 附加到软粒小麦,使软粒小麦对粉露菌病产生抗性。用冰草的一个染色体替代软粒小麦染色体 3D,使软粒小麦对杆锈的 15 个小种产生抗性。小麦株高与染色体消除有密切关系。几乎去掉任何一个染色体都会影响株高。特别是缺少第二组(B)染色体中的某一个,对株高影响最大,这种单体小麦比整倍体小麦品种矮了四分之一。这与赤霉酸有关系。去掉第二组染色体中任何一个染色体,都能减少植株中赤霉酸的含量,可能是去掉了一些控制赤霉酸合成的基因的缘故。

### 三、染色体组工程学

这项工程主要研究内容是:添加同种或异种染色体组,消除同种或异种染色体组。自 1937 年秋水仙素被应用于生物学上以来,添加染色体组的技术早为大家所熟悉。三倍体无籽西瓜,四倍体大麦,八倍体小黑麦都是由秋水仙素诱导而来。现在,由于原生质体分离技术的发展,也可从原生质体得到多倍体。加拿大的

高国楠等(1976)用聚乙二醇处理胡萝卜原生质体后,得到了频率相当高的四倍体与六倍体植株。这种再生的四倍体和六倍体植株,从频率看,可能是来源于双核和三核合并的产物。这些产物可能是聚乙二醇促使原生质体合并的结果,也可能是原生质体自发融合的结果。这样添加的染色体组的最严重的缺点是后代的遗传性不稳定,尤其是以种子繁殖的作物为甚,即使经过一、二十年这样长时间的选择,仍然不能提高遗传稳定性。

近年来,花药或花粉离体培养成功,这项技术也可在染色体组工程学中加以应用,使自花授粉的多倍体杂种的后代中,分离出来的具有优良农艺特性的材料,能更快的稳定下来。在过去,消除染色体组是比较困难的。现在经花药或花粉培养可从小孢子得到单倍体植物。又可从单倍体植物的叶肉组织分离原生质体,形成愈伤组织,再生成单倍体植株。获得成功的有烟草、矮牵牛、曼陀罗和油菜。

除此以外,还可利用远缘杂交,X射线, $\gamma$ 射线和紫外光照射;化学药品如马来酰肼,甲苯胺兰、氯霉素和氧化二氮以及异源胞质等方法都能诱导单倍体产生。另一项新进展是 Kasha 和高国楠(1970)提出的,用大麦与二倍体的球茎大麦杂交后消除染色体的方法,产生高频率的单倍体。有的结果,单倍体频率可高达 68.5%。在杂交后,球茎大麦的七个染色体消除在胚中,留下的是大麦的七个染色体就成了单倍体的胚。再经过秋水仙素处理就形成了纯合二倍体,利用它可作遗传与育种研究用的材料。其方法与步骤如下。

通过染色体消失产生大麦单倍体的方法,也可能用于其他作物。英国 BarcLay (1975)用中国春小麦与二倍体和四倍体球茎大麦作为父本杂交。无论是与二倍体大麦还是四倍体大麦杂交产生的植株,所有根尖细胞的染色体都是 21 条,与小麦单倍体染色体组型上没有区别。所有的苗,加上 10 株成熟植株,都没有表现出任何球茎大麦的形态特征。这些初步结果已经说明了与球茎大麦杂交,随后用染色体消除的

表 1 大麦与球茎大麦杂交后产生大麦单倍体的程序

| 去雄后的<br>天数 | 程                                             | 序                      |
|------------|-----------------------------------------------|------------------------|
| 0          | 大麦<br>$2n = 2x = 14$<br>去雄                    | 球茎大麦<br>$2n = 2x = 14$ |
| 2          | 授粉                                            | 收集新鲜花粉                 |
| 3—5        | 赤霉素处理: 每一小花滴一滴<br>75ppm 赤霉素, 2 或 3 天          |                        |
| 14—16      | 取出胚进行培养 (22°C, 在黑暗处)                          |                        |
| 22—28      | 分化的胚移到光照下 12 小时, 22°C                         |                        |
| 40—50      | 幼苗(2—3 片子叶期), 用 0.1%秋水仙素处<br>理 5 小时, 冲洗和移植在盆中 |                        |

方法产生小麦单倍体的潜力是很大的。

单倍体植物在遗传与育种研究方面的用途是很广的。第一, 利用单倍体可进行突变育种的研究。因为隐性突变等位基因由于其半合子的状态, 在表现型上能直接表现出来(包括显性和隐性突变)。通常发现突变和获得纯合的突变, 都需要分析大量各代植株。培养全部基因位点都是纯合的类型就要付出更多的劳动和时间。为了突变育种的目的, 利用单倍体植株, 就可大大排除这些障碍, 只要有突变发生, 可立即被鉴定出来。用秋水仙素处理后, 即可得到纯合二倍体。第二, 抗性育种。培养单倍体细胞和原生质体, 用各种诱导剂处理, 诱导产生突变体。按这种方法用链霉素、5-溴尿嘧啶、DNA 碱基类似物处理, 获得了突变烟草细胞系。Carlson (1973) 从单倍体烟草原生质得到了抗蛋氨酸的类似物愈伤组织, 并再生成完整的植株。这在抗病育种方面很有实用价值。第三, 单倍体育种。我国已进行很多, 获得了烟草、水稻、小麦新品种, 大大缩短了选育时间。第四, 研究高等植物细胞内转录的调节和发育问题。第五, 单倍体还能在进化方面进行研究。一个明显的例子是关于四倍体栽培马铃薯 ( $2n = 2x = 48$ ) 的进化问题 (Howard, 1973)。

四、细胞质工程学

主要研究内容是置换细胞质。置换的方法在一些动物上是采用核移植, 而在植物上过去是进行连续回交。在普通遗传学上常讲的一个例子是柳叶菜属的细胞质遗传。为了置换细胞质, 曾连续回交了二十五代, 最后产生的那个杂种细胞核也并不完全是父本的细胞核, 而细胞质则几乎是母本细胞质。由这个例子看, 用古老的方法费了那么长的时间和精力, 还不能说把全部核换过来。现在的情况不同了, 可以用原生质体摄取小分子、大分子、病毒、细菌一类的颗粒。甚至能移植细胞核、叶绿体、线粒体和液泡形成体等, 完全可以应用新的技术来进行细胞质工程学的研究了。因此, 在细胞质工程学的各个领域里, 在今后的遗传与育种上的贡献是不可限量的。它不仅在生产实践上有无穷的潜力, 而且对细胞学与遗传学的基础理论研究, 如细胞起源、核质关系、亲和性、遗传与环境、细胞器遗传以及基因转录调节的研究都有深远的意义。

核移植在西德 Potrykus 等(1975)和 Binging (1976) 实验室已开始进行。他们以烟草、矮牵牛为材料。制备矮牵牛游离核时, 先在悬浮的原生质体中用蒸馏水将悬液渗透值冲淡一半, 在30分钟内, 大部分原生质体破裂, 放出叶绿体与核, 就可在 0.6M 蔗糖中离心收集核, 然后存放在培养液中(一份 0.6M 蔗糖, 一份 0.5M 甘露醇的 V47 原生质体培养液)。

核与原生质体融合的步骤是: 再使原生质体与核悬浮并沉淀在 0.25M 硝酸钙溶液中, pH6, 去掉上清液, 再把它们悬浮起来, 以适当的比例使核与原生质在试管中混合、离心, 随后加入 45% 聚乙二醇溶液 1 毫升予处理, 使之聚合, 30 分钟后, 徐徐加 4 毫升 0.2M 硝酸钙(被 pH 为 9 的甘氨酸氢氧化钠所缓冲)以诱导融合和摄取核。15 分钟后加 0.2M 硝酸钙 (pH6), 再过 20 分钟, 原生质体用培养液冲洗。最后镜检就可看到许多矮牵牛的核移植到烟草原生质体中, 但在生存 5 天后, 并不卷入到有丝分裂

中,它们最后的命运如何?还没有看到报道。

叶绿体的移植仍以矮牵牛为例(Potrykus, 1975)。目的是将野生型的叶绿体移植到突变体原生质体中。其步骤是:(1)先将野生型的原生质体放在低渗透值的甘露醇中搅拌后离心( $1,000 \times g$ ),然后再悬浮在0.35M甘露醇(或0.21M硝酸钠)溶液中;(2)收集从白化矮牵牛叶片中刚刚分离出来的第一批原生质体和单个细胞;(3)把原生质体和单个细胞转移到叶绿体悬液(2%纤维素酶溶在0.21M硝酸钠中,pH5.4)中;(4)混合悬液培养在低速的转盘上(约 $10 \times g$ );(5)混合液每隔5分钟离心和再悬浮一次,直到所有单个细胞都转变成原生质体为止;(6)洗去混合群体中游离的叶绿体;(7)在光学显微镜下检查结果;(8)结果约有0.5%的原生质体中含有1—20个不等的叶绿体和50—100个白色体混合在一起。

目前移植叶绿体的技术虽已成功,但有关这方面的报道却很少,只看到Carlson (1973)的简报,以后没有详述。他从非染色体遗传的斑状白化烟草突变体的叶肉细胞中,分离了缺少绿色功能叶绿体的原生质体,与具有正常功能野生型的叶绿体放在一起培养,结果从含有“外来”叶绿体的白化原生质体再生出来完整的绿色植株。但没有提到是否还生长了白化或斑状的植株。他得出结论认为,野生型的叶绿体已进入原生质体,并入的叶绿体能复制,而且正常工作,因而长出了完整的绿色植株。由于以后对此实验再没有详细的报道,因而引起了Potrykus (1975)的怀疑。他认为,在高等植物中,由非染色体遗传的突变白化质体的所有实验,可以期望得到白化、斑状和极少数的绿色植株。在Carlson的结果中,也会期望出现有白化和斑状类型的植株。很可惜,他的报道中没有提到白化原生质体的对照实验。因此,他所得到的绿色植株也可能来自白化原生质体而不是并入了野生型的叶绿体。

细菌摄取也是细胞质工程的重要课题,它往往与固氮问题联系在一起。有些人(Davey和Cocking, 1972)报道:在酶溶掉细胞壁期

间,能将固氮菌引入豌豆叶片原生质体中。从他们的照片上看,摄取的细菌是在以膜为界的小泡内,这个小泡的膜来源于质膜,原生质膜向内侧凹陷,细菌就被包围在内,由内胞饮作用进入原生质体内部。但是这个细菌还可通过外胞饮作用而被排出到液泡或原生质体之外,不一定能进入核内,将它的固氮基因与寄主的DNA整合。后来,Davey等(1973)又成功地分离了含有几团细菌的豆科植物根瘤原生质体,研究使这些原生质体同非豆科植物原生质体融合的可能性。将来有可能把游离的固氮细菌和兰绿藻引入非豆科植物,从而解决农业肥源问题上的一个设想。前几年Pastagte等(1972)成功地从肺炎克氏杆菌中,把固氮的结构基因和调节基因转移到另一不同属的普通大肠杆菌中去。这一成就是令人鼓舞的,它给固氮基因转移到非豆科植物育成高产固氮的谷物品系奠定了基础。

## 五、细胞融合工程学

细胞融合也叫无性杂交,又叫体细胞杂交。融合的结果将导致染色体组和细胞质双方的添加,所得产物如能再生成新的个体,将以崭新的面貌出现于生物界,为学术界大放异彩,前途是未可限量的。细胞融合的范围很广,从种间、属间、科间一直到动植物两界之间都进行了尝试。现在种间融合,如粉兰烟草 $\times$ 郎氏烟草已得到了杂种植株和种子。至于属间和科间融合也能再生细胞壁,分裂多次成细胞团。动、植物细胞杂交也能存活几天。这个新领域的研究,必将对遗传学和育种学作出巨大贡献。但存在的问题还不少,虽然现在已有100多种原生质被分离出来,但从原生质体再生植株的仅十多种,种间融合还未见第二个成功的例子。属间、科间的工作进展也很慢。许多技术问题尚待我们去克服和突破,可以说这个领域的某些研究,仅仅做了一些探索性的工作,只是开端而已!

同种原生质体在分离过程中能自发融合,已有不少报道。我们也在小麦、玉米、蚕豆、百合等材料中看到。在玉米、百合花粉母细胞的

原生质体的同核体中发现有 2—45 个以上的核集合在一起(郑国锷, 1976)。异种原生质体的融合必须用诱导剂诱导。现在已有两种效果较好的诱导剂: 一是用高 pH、高钙 [ $\text{pH} = 10.5$ ,  $\text{CaCl}_2$  0.05M (Keller 和 Melchers, 1973)] 另一种是聚乙二醇(PEG) [Kao 和 Michayluk, 1974] 经不少实验室使用, 证明效果很好。据 Gamborg 等(1975)报道, 用聚乙二醇诱导属间与科间的细胞融合, 似乎没有什么生物学上的限制性, 不同科属植物原生质体之间都可融合(表 2)。融合频率高达百分之三十。融合的异核体, 将有 10% 在 48—72 小时内进行分裂, 有的能形成细胞团。

表 2 能形成异核体和进行细胞分裂的植物

| 原生质体的来源 |   |   |   |
|---------|---|---|---|
| 细胞培养    |   | 叶 | 片 |
| 大豆      | × | 大 | 麦 |
| 大豆      | × | 玉 | 米 |
| 大豆      | × | 油 | 菜 |
| 大豆      | × | 豌 | 豆 |
| 胡萝卜     | × | 豌 | 豆 |
| 草木犀     | × | 油 | 菜 |

从表 2 看, 目前在细胞融合方面有一个共同的育种目标, 就是想把豆科植物与禾本科的谷类作物, 或其他经济作物融合在一起, 使谷类作物也能固定空气中的氮为本身所利用。

细胞杂交是否也有不亲和性的问题, 这是大家所关心的。有些作者认为, 在不同属, 甚至不同纲之间的原生质体融合没有不亲和性。但也有人 (Power 等, 1975) 推测, 在葡萄科的爬山虎和茄科的矮牵牛原生质体杂交后, 可能出现不亲和性和染色体消失现象。由于这些工作都没有继续做下去, 因此, 是否有不亲和性的问题, 还不能作出结论。

### 展望及问题

从上面所介绍的细胞工程学的各方面来看, 发展是很不平衡的。在遗传与育种上, 成果的应用也很不一致。有的发展较早, 最近又有新的进展, 如染色体工程学和染色体组工程学

有不少成果已应用到生产实践上。有些是七十年代初期才发展起来的新兴技术, 如基因工程学、细胞质工程学和细胞融合等, 从理论上讲都已经没有多大障碍, 但在技术上、实践上还有不少问题需要我们去克服、解决。不过, 总的来说, 前途还是非常有帮助的。现就下列问题谈谈发展的前景。

第一, 高等植物的转化, 确实是当前遗传学与育种学方面吸引人的重大问题。如果植物转化现象确实存在, 和原核细胞转化一样为大家所信服, 那么, 就可作为崭新的农作物育种方法的基础。要达到这个目的, 还需要在下列各方面进行大量工作。首先要研究给体 DNA 提纯的方法; 其次要选择适合的受体, 最好是选择组织培养细胞或单个原生质体, 好使高等真核细胞能用微生物一样的方法进行研究; 第三, 转化实验结果要有确切的证据, 经得起鉴定和重复。

第二个大问题是固氮问题。长期以来, 人们在解决农业肥源问题上有一个设想, 就是想把稻、麦、棉一类非豆科作物像豆科作物一样, 能结瘤固氮。近年来, 由于细胞工程技术获得了一些新的突破, 出现了可能实现这一理想的途径。例如: (1) 现在已能把固氮基因转移到大肠杆菌, 这就为把固氮基因向非豆科作物转移作出了先例; (2) 通过结瘤的固氮作物与不结瘤作物的体细胞杂交, 也有可能把固氮基因转移。现在已有许多实验室在进行这项工作, 其目的是想在细胞融合或单倍体育种条件下, 将固氮菌的固氮基因转入植物细胞, 获得自主固氮的新植株; (3) 在作物的细胞内诱导出定氮酶。Child (1975) 已把根瘤菌属“豇豆型” 3ZH1 菌株与各种植物(包括小麦)的愈伤组织在一起培养形成了定氮酶。

第三, 植物分子遗传学的研究。由于利用原生质体能获得大量而相对同源的单细胞群体, 操作技术也较方便, 有些工作者 (Carlson 等, 1973, 1974) 已提出用类似微生物系统的方法, 使原生质体应用于植物分子遗传学的研究。现在虽然已经具备了一定的条件, 但在现阶段要实现这一理想, 还必须解决在应用上的一些技

术问题。

第四,“工程植物”的培养。目前从原生质体形成再生植株的植物为数甚少。常用的“工程植物”只有烟草、矮牵牛、胡萝卜等很少几种,特别是人们感兴趣的谷类作物还没有育成。有些实验重复性差,为了使细胞工程学的许多新颖的技术能广泛地应用于生产实践上,就必须对一些经济作物,粮食作物的分离、培养、分化的条件摸清楚,在此基础上精心设计,希望能培育出更多的“工程植物”作为细胞工程奇妙的工具。

第五,植物细胞无性繁殖系的培养与保存的研究,也是刻不容缓的工作。在动物细胞培养方面,目前各地实验室已经建立许多不同种类的细胞株。在植物细胞培养方面,细胞无性繁殖系的建立,是一项最基本的工作。细胞无性繁殖系建立后,用特殊方法把它们保存起来,作为素材,在植物体细胞杂交育种的一定目标下,分别选择这些无性系的细胞进行杂交育种。

植物细胞无性繁殖系建立以后,随着就产生了无性系的保存问题。由于微生物菌种长期接种传代后会出现退化现象,因而产生了特殊保存菌种的方法。在动物细胞株的保存上也是这样。在我们的工作中,愈伤组织在长期传代过程中,发现细胞内染色体数目发生改变,分化能力下降。因此,如何克服这些变异是今后无性系保存中需要加以解决的问题,也是必须研究的重要课题。现在,有些人已发现,在无菌

实验室条件下生长的胡萝卜细胞可以被冷藏( $-196^{\circ}\text{C}$ ),然后在解冻以后加以使用。

最近,人造基因转移到生命细胞中显示活性功能已经获得成功,它给细胞工程学的发展又增添了新的内容。不难设想,在最近的将来,人们可能在单个细胞或原生质体的水平上装配人工合成的遗传成份,创造出一棵新颖的植株,将成为现实。

为实现上述一些设想,对当前技术上存在的问题也必须给予足够的重视。在我们的实验过程中经常发现下列一些技术问题:(1)植物的品种、组织和生理状态不同,分离原生质体的质量也不同;(2)表面上看各项条件相似,但分离原生质体的性质差别很大,有的存活率很高,并能继续分裂多次;有的存活率低,在培养中逐渐死去,也有的第二天就全部死亡;(3)即使原生质体的产量多,存活率高,分裂也快,但到一定阶段,就停止向前发展;(4)有些材料虽然已能形成愈伤组织,但仍不能分化成植株;(5)在栽培实验材料时,土壤、肥料、温度、湿度、灌溉、光照、季节等各项条件,以及采叶的部位、叶令和撕表皮的难易等都能影响分离和培养的效果。对这些问题,我们都必须积累一定的经验,才能使实验的结果重复性高。要解决这些问题,必须在毛主席革命路线指引下,用唯物的观点和辩证的方法,以坚韧不拔的毅力,克服一个又一个的难关,攀登科学高峰!

[本文于1977年8月29日收到]

## 科技消息

### 磁学在农业上的应用

几年来,我们为了落实伟大领袖毛主席提出的“备战、备荒、为人民”的战略方针和实现华主席提出的:“全党动员,大办农业,为普及大寨县而奋斗”的伟大号召,我们用磁化水、磁肥、磁场(磁场强度为1,000高斯与2,000高斯二种)对粮食、棉花、水果、蔬菜等进行了各种处理试验,初步看到磁化水、磁肥对作物的生长有一定的促进作用,经处理的作物生长较好、产量较高,能提高果实的含糖量,对某些蔬菜能提前成熟。

例如用磁化水浸泡水稻种子,其发芽率比对照组提高2—5%,发芽势提高25%。大田试验的7个实验组中,5个磁水育秧灌溉组亩产680斤,对照组亩产610斤,增产11.4%,另2个磁水浸种实验组减产6.1%。

在用磁粉施肥的果树实验中单果平均重量比对照组增加26.2克,含糖量相对提高。

在蔬菜试验方面,对茄子、番茄、球基甘蓝、黄瓜、辣椒等无论用磁化水浇灌,施磁粉作基肥,或施放磁块于作物根部,产量都比对照组高,增产幅度介于5—20%间,茄子更为突出,各种处理均增产15%左右。

总之试验工作还有待深化,尤其是磁对作物作用机理,以及磁化水、磁肥等磁效应的标准都需要做深入细致的和大量的工作,任务是艰巨的但也是光荣的,我们决心加快步伐,为农业学大寨,普及大寨县作出更大的贡献。

安徽省磁学在农业上应用协作组供稿