

细胞工程在烟草品种改良上的应用

贾 兴 华

中国烟草总公司青州烟草研究所

摘 要

本文在扼要回顾烟草细胞工程发展的基础上, 讨论了它在烟草品种改良上的作用。其中主要回顾了花培育种、细胞培养诱变与抗性筛选、原生质体融合培养技术, 转移外源基因创造培育烟草变异新类型的应用原理及其近 20 年来所取得的主要成就。

细胞工程是当今新技术革命的三大支柱之一, 是生物工程的一个重要方面。它是在最新生命科学成就的基础上, 应用细胞生物学和分子生物学理论、方法和技术, 有计划、有目的地改变植物遗传信息, 创造植物新种或新品种的重要途径之一。由于烟草植物种类较多, 适应性和再生能力较强, 离体的器官、组织、细胞易培养驾驭, 因此一直是植物组织和细胞培养研究的对象和有益助手。在植物细胞工程开拓性技术研究中, 素有“模式植物”或“工程植物”之称^[9,12,17]。鉴于烟草细胞工程技术已较成功, 并在改良和创造新品种等方面展示出了广泛的应用潜能, 以下拟就烟草组织和细胞培养为主要内容的细胞工程在烟草品种改良上的应用原理及其研究进展, 予以回顾。

1 烟草在细胞工程发展中的地位与作用

细胞工程的发展历史可以追溯到 1902 年, 当时德国植物学家 Haberlandt 曾试图采用植物单细胞培养成一个完整植株, 限于当时科学技术的发展, 未能获得成功。但是, 他首次提出了“细胞全能性”的假说。在此以后的 30 多年内, 虽然有人用植物的胚、根尖、茎尖进行过离体培养, 但一直没有大的进展。

从 30 年代开始, 植物组织培养的对象主要集中到了烟草上, 才取得了几项突破性的进展^[3,12]。首先, 美国科学家 White 于 1937 年用兰雪烟草 (*N. Plumbaginifolia*) 与朗氏烟草 (*N. Longsdorffii*) 杂种的茎段形成层诱导出愈伤组织, 建立起了愈伤组织培养并成功地创立了人工合成培养基。40 年代初, White 正式提出了“细胞全能性”学说后, Skoog 和崔微于 1948 年在烟草茎切段组织培养中, 观察到腺嘌呤可以解除培养基中生长素 (吲哚乙酸) 对芽形成的抑制作用, 发现了腺嘌呤与生长素的比例是控制芽和根分化的决定性因素之一。在此基础上, Miller 等 1956 年发现了激动素也可以促进芽的形成, 且效果更好。这些成功的研究, 发现了生长素与细胞分裂素的适当比例在诱发各种不同形式组织中的重要性。

由于在烟草上的重要发现, 促使许多科学家在多种植物上进行试验。1958 年, Stewart 等进行胡萝卜韧皮部的单细胞培养, 单细胞经过类似受精卵发育那样的胚胎发生过程, 最后形成了完整植株。从而, 使植物细胞全能性学说得到证实。

60 年代以来, 继 Guha 和 Maheshwari (1964, 1966) 培养毛叶曼陀罗 (*Datura*

innoxia Mill) 植物花药获得花粉单倍体植株以后, 1967 年 Bourgin 和 Nitsch 用烟草 (*N. tabacum* Var. *Wisconsin* 和 Var. *Maryland Mammoth*) 和林烟草 (*N. sylvestris*) 花药进行离体培养, 成功地诱导出花粉单倍体植株, 并建立了花药培养基和培养技术, 引起了当时育种工作者的关注。相继中田、田中 (1968) 也用烟草品种亮黄 (Bright yellow)、Hicks103 等的花药培养出了单倍体植株。至 1969 年, Nitsch 的研究已扩展到烟草属的 12 个种。Tanaka 和 Nakata (1969)、Kasperbauer 和 Collins (1971) 先后在获得烟草花粉单倍体植物的基础上, 重新把单倍体植株染色体加倍成纯合双倍体^[9]。1971 年, Takebe 等用烟草叶肉原生质体培养出再生植株; 1972 年, Carlson 成功地用融合剂促使粉兰烟草 (*N. glauca*) 与朗氏 (*Longsdorffii*) 叶肉原生质体融合, 首先获得了由两个烟草种间体细胞杂交的细胞杂种植株, 为广泛开展植物体细胞杂交研究、扩大高等植物中广泛趋势遗传型组合、逾越有性杂交不亲和性障碍, 开辟了一个新的阶段^[3]。

至此, 烟草的组织培养已从器官、组织、细胞、原生质体和体细胞杂交水平上再生完整植株, 证实了细胞的全能性。可以说, 烟草组织与细胞培养的发展, 贯穿了植物细胞工程发展的全过程。

自 70 年代以来, 随着植物细胞工程技术在理论和实践上的深入发展, 其研究内容已由探索和完善农作物培养技术, 转向把这些技术应用于生产的尝试。

2 细胞工程技术在烟草品种改良上的应用原理

从目前涉及的领域看, 植物细胞工程主要包括: 组织与细胞培养、原生质体培养及其融合、细胞核和细胞器移植、染色体操作以及基因转移等方面。以下主要讨论已开始或将在生产中应用的细胞工程。

2.1 花药和花粉培养

花药和花粉培养是指未成熟的花药或花粉离体在人工培养基上诱导形成植株的过程。花药是植物体上的一个器官, 其培养属于组织培养; 花粉在一般意义上是一个单细胞, 其培养属于细胞培养的范畴。培养离体的花药或花粉, 都是诱导花粉细胞形成单倍体植株。由于花药培养获得花粉植株的方法较花粉培养容易得多, 故应用上多采用花药培养方法。因为花药内花粉小孢子具有单细胞和单倍体的双重特点, 由花粉小孢子再生植株在育种上具有特殊的优点:

其一, 利用单倍体的特点, 在育种工作中可以抓住杂种有性生殖时产生雌、雄配子体的基因分离时机, 不让雌雄配子按正常方向分化为成熟的配子体授精结合, 而诱导脱分化为单倍体植株, 进而使单倍体植株染色体人工加倍, 即能获得相当于同质受精结合的纯系。由此, 可以有效地控制杂交育种过程中杂种的复杂分离现象, 从而达到缩短育种周期的目的。同时, 由于花粉培养形成的单倍体植株, 遗传上不存在成对基因的显隐性作用和双倍体的选择, 性状表现不存在双倍体的干扰。选种时, 通过一次单株选择, 即可完成常规育种需进行的多次单株选择过程, 能有效地简化育种环节, 提高育种效率。

其二, 利用花粉单细胞的特点, 育种上可以把花粉密集地置于培养基上, 用较小的空间和能够重复的选择方案, 进行大群体的人工筛选或诱发突变。

2.2 子房和胚珠培养

按其培养供体的授粉前后, 又分为未受精和受精后子房或胚珠培养。

未受精子房和胚珠培养, 都是诱导雌配子细胞分化成再生植株的过程, 由其再生的植株也是单倍体, 植株的遗传特点与花粉再生的植株相似。只是由于雌配子体含有的胞质基因较雄配子体丰富, 因而遗传上的种间交叉比雄配子消失的少。再生植株中后代的遗传性和生活方面, 雌性细胞来源的植株后代更有益于保持杂交导致的某些优势。近几年, 育种上因此已加强了对胚珠或子房培养的研究应用。

授精后的子房或胚珠培养, 主要用于远缘杂交育种中的杂种后代延续问题。培养授粉杂交后的子房或胚珠, 能把受精后但不能正常发育形成种子的幼胚性细胞培养再生植株, 使杂种得到后代, 延续提供育种利用。

2.3 细胞培养突变体及其筛选

作物品种改良中育种学家的主要任务, 一是创造变异, 二是依既定育种目标对变异体进行选择。虽然传统的杂交方法和诱发突变迄今是育种家借以创造变异的主要途径, 然而近年来人们发现, 植物细胞和组织培养可以成为遗传变异的第三来源。因为越来越多的证据表明, 植物细胞或组织经过一段即使是时间不长的离体培养之后, 常常产生明显的变异, 变异的频率往往很高, 有关研究认为远非辐射诱变所能比拟。

在变异体的选择上, 传统方法长期以来一直停留在整体即植株水平上。象烟草等植物, 由于植株营养体大, 有益性状变异频率又较低, 在有限的空间内往往难以在大群体上进行选择, 严重地影响品种改良的进展速度。细胞培养技术体系的建立, 使得对烟草等高等植物的改良可以象对微生物的研究那样, 于人工控制条件下, 利用较少的空间结合多种遗传操作方法, 以细胞为单位一次即可进行大量细胞群体的选择。

目前, 在细胞培养中以某种特殊化合物或各种病原菌毒素及其类似物, 添加到细胞培养环境中作为抗性选择压力或诱变剂, 进而诱变选择各类抗性变异体的研究, 已成为农作物品种改良的一个十分活跃的研究领域。

2.4 原生质体培养及其融合

原生质体培养是指细胞经物理或化学方法去除细胞壁后, 以均一的单细胞群体状态培养形成完整植株的过程。原生质体融合则指将两种不同种类的原生质体诱导直接融合, 产生能够同时表达双亲性状的杂种细胞技术。

原生质体由于没有细胞壁的色被, 对外界环境敏感, 易于摄取外源基因组、细胞器、细菌、病毒、质粒、DNA 等各种生物大分子, 在作物品种改良中是多种遗传操作的理想受体。首先, 原生质体对环境敏感, 易于摄取环境中大分子物质, 这有利于在培养过程中结合理化诱变, 人工创造遗传变异。其二, 原生质体具有彼此融合的能力, 可以有计划地把不同种质的原生质体融合构建细胞杂种, 有利于广泛地组织和引入各种种质的遗传性, 并可以克服远缘间有性不可杂交的障碍。其三, 原生质体能被有选择性钝化处理。用钝化处理的原生质体融合, 可实现细胞器的移植。例如, 使细胞核被钝化的一原生质体与细胞质被钝化的另一原生质体融合, 可形成新的质、核互作关系, 其已为胞质基因转移和快速创造胞质雄性不育系的新途径^[10]。其四, 原生质体因无坚韧的细胞壁, 有助于载体基因的进入。在基因工程中可广泛地用于外源基因的转导转化。

3 细胞工程在烟草品种改良中的实际应用

经过近 20 年的应用技术研究, 烟草细胞工程已有不少成果进入应用或正待应用于生

产实践。

3.1 新品种选育

早在 70 年代初期,我国就开始了烟草花药培养的研究应用,并逐步完善了一种以花药培养生产单倍体植株为育种中间手段,进而人工加倍单倍体获得纯合双倍体,经选择培育新品种的单倍体育种方法。1974 年,首先用这种方法培育出烤烟新品种“单育一号”、继而“单育二号”、“单育三号”、“皖烟一号”相继通过技术鉴定,当时处于世界领先地位^[2]。国外,日本在相近期间也育成了 MC101、F106、F107 等品种^[4]。

目前,花药培养和胚珠培养已综合到常规育种工作中应用。烟草杂交育种工作中,常把早期杂种世代如 F_1 、 F_2 、 BC_1 、复交一代等先进行花药或胚珠培养,由其培养获得单倍体植株后,经染色体人工加倍成相当于自交同质结合的双倍体纯系,待选择出符合育种目标的植株后再纳入常规育种试验程序。这样,使常规育种对杂种后代的连续自交选择过程大为简化,从杂种到纯系至少可节约 2—3 个世代的选择工作。“七五”期间,我国先后对 35 个烟草杂种组合进行花药培养,选育出的部分新品系如烤烟特香型的“3002”、“3041”等品系已进入系列开发利用^[2]。

关于花药培养的育种学价值问题,国际上曾一度众说纷纭,缺乏统一认识。Burk, L.G. (1972) 和 Oinuma (1974) 等认为,烟草单倍加倍体的部分品系与正常自交品系比较,生长势有减退现象,并假定这是由于花药培养或染色体加倍期间发生遗传变异所致^[4, 14]。Arcia, M. A. 等 (1978) 的报道也提到单倍加倍体一代和二代品系生长较慢,平均产量比同组合的 F_1 和 F_2 减产 15%^[13]。Javier, E.L. (1982) 指出,烟草单倍加倍体出现变异,产量低于同来源的对照品系^[18]。Oka 等 (1977) 的试验认为,一些单倍加倍体品系在产量上与亲本平均值无显著差异,对不同环境的适应力与标准品种相似^[4]。然而我国对烟草、水稻等作物的研究表明,经过选择的花粉植株后代,不仅整齐度高,而且生长势未见减退。中国农科院烟草研究所 (1978) 曾比较鉴定了两个单倍加倍体株系的 2—4 代,证明同一品系不同世代间主要经济性状的平均值和变异系数都近似,生长速度也与对照品种相似。并证明经严格选择的前提下,花粉植株后代的遗传性相对稳定,生活力正常,不曾因世代增加而出现明显变异和生活力衰退现象^[5]。Oinuma (1980) 根据几方面的试验结果认为,虽然加倍单倍体是遗传学上的完全纯合体,就农艺适应性而言,它并不比栽培品种差^[4]。

有的学者认为,目前已在生产中的应用的小麦、水稻、烟草等花培品种还没有真正与常规推广优良品种相媲美。就这一问题,我们根据烟草花培育种的实践,认为花培育种毕竟是一种新兴的育种技术,迄今育成的品种还不多。另外,花培育种能否获得真正与常规推广媲美的优良品种,杂交组合的遗传信息是重要基础。根据确立的育种目标,广泛组合遗传信息扩大花培材料的遗传背景,与多种育种方法结合加大花培选择群体,在严格选择和稳定通过鉴定、比较和区域性试验等育种程序的前提下,获得优于常规推广的优良品种是可能的。

3.2 品种改良

自从 Carlson (1973) 首先在烟草 (*N. tabacum*) 叶肉原生质体培养和单细胞培养中,采用野火病类毒素 (*Methionine sulfoximine*) 诱变筛选出抗烟草野火病突变系^[8, 16],为烟草品种改良提供了成功的证据之后,各国科学家利用细胞培养技术,结合理化诱变技

术和在细胞培养环境中添加各种选择剂加压选择,已筛选出了抗病、抗虫、抗除草剂、抗盐、抗旱等多种烟草突变体,极大丰富了烟草的遗传资源。其中,我国周嘉平等(1980)在花药培养中用黑胫病菌培养液粗提物作为抗性选择后,经轮回培养选择递进抗性变异,从烟草感病品种(小黄金 1025)中筛选出黑胫病抗性突变体^[7]。通过多次接种鉴定和人工病圃田间鉴定,突变体达到高抗水平。佟道儒等(1986)则在花药培养中将花药先进行⁶⁰Co- γ 射线辐射处理,进而培养获得了主要经济性状明显优于亲缘品种(G28)的烟草白花突变体^[6]。

利用细胞离体培养直接进行诱变与筛选突变体以期改良烟草品种的研究,迄今以抗氨基酸及其类似物的报道最多。关于细胞培养筛选出的各类突变体,陈少麟(1988)侧重于把与农业生产直接有关的类型有过较全面的综述^[8],在此不再赘述。

3.3 导入有益野生型基因

自从由烟草体细胞分离的原生质体再生成完整植株以及通过原生质体进行体细胞杂交获得成功以来,使育种学家能超越有性杂交过程的局限性,有计划地引入有益野生型基因,扩大遗传变异范围,给人类创造新型作物新品种的设想燃起了新的希望。烟草原生质体融合技术、杂种细胞筛选体系和杂种分析、鉴定方法方面所取得的进展,已跨入了改良植物遗传性状的新领域。

迄今,通过体细胞杂交已获得植物种间、属间体细胞杂种植株的组合已达 40 多个,其中烟草属体细胞杂种几乎占一半。我国龚明良等(1981)报道已先后成功地诱导出普通烟草(*N. tabacum*)与黄花烟草(*N. rustica*),普通烟草与野生烟草的粉兰烟草(*N. glauca*)、花烟草(*N. alata*)、波状烟草(*N. rapanda*)、岛叶烟草(*N. nesophila*)等 6 个组合的种间体细胞杂种植株^[10]。孙勇如等(1982)由粉兰烟草与矮牵牛(*Petunia Parodii*)、黄美娟等(1982)由普通烟草与拟矮牵牛(*Atropa belladonna*)的原生质体融合,获得了两个组合的属间体细胞杂种^[8]。

更值得提到的是,卜锅章等(1990)在烟草体细胞杂种后代的遗传观察和类型选育中,已成功地利用体细胞杂交技术把黄花烟草的高尼古丁和野生烟草(*N. glauca*)的叶斑病及黑胫病抗性转移到普通烟草种,选育出了有生产利用价值的新品系^[10, 14]。国外, Pandey, R.S 等(1986)也做过类似的报道^[20]。

我国的夏镇澳等(1992),在获得了普通烟草与龙葵(*Solanum nigrum*)属间体细胞杂种植株的基础上,从杂种后代中也选择出了具有对 TMV 和气候斑点病抗性的烟草新品系^[21]。

利用原生质体融合进行细胞质基因重组,转移细胞质控制的性状,是一条直接育种途径。通过普通烟草与粉兰烟草原生质体融合,已得到了稳定的雄性胞质不育系,并已转育成几个栽培品种的不育系开始在生产上试种^[10]。

此外,我国结合基因工程研究,以烟草细胞为受体,通过外源基因的组装转导还获得了抗烟草 TMV 和抗 TMV 与 CMV 的转基因双抗工程株系,为烟草抗病毒病育种展示出了广阔的应用前景^[11]。

总之,随着基础理论研究和实践的深入,烟草细胞工程正在与传统育种方法相结合的发展中扩大应用。

参考文献

- 1 卜锅章等. 普通烟草与黄花烟草体细胞杂种选育出新品系. 中国烟草, 1982, (2): 1—5.
- 2 艾树理. 烟草育种技术研究进展概述. 经济作物新品种选育论文集, 上海科技出版社, 1981, 65—68.
- 3 尹承岱等. 现代植物育种. 北京: 农业出版社, 1991, 77—104.
- 4 江苏省农科院科技情报研究室. 作物育种方法研究 (译文集), 上海科学技术出版社, 1980, 28—43.
- 5 陈瑞泰等. 中国烟草栽培学. 上海科技出版社, 1987, 357—362.
- 6 佟道儒等. γ 射线诱变烟草花药培养的突变体. 核农学报, 1991, 5 (4): 193—198.
- 7 周嘉平. 烟草抗黑胫病突变体的筛选. 遗传学报, 1990, 17 (3): 180—188.
- 8 胡含, 陈英. 植物体细胞遗传与作物改良. 北京大学出版社, 1988, 243—286.
- 9 贾兴华等. 烟草花培育种. 农作物组织培养, 上海科学技术出版社, 1991, 469—481.
- 10 龚明良等. 烟草原生质体融合及其应用. 农作物组织培养, 上海科学技术出版社, 1991, 483—494.
- 11 姚文彪. 基因工程培育抗病毒烟草的技术路线. 烟草科技, 1991, (6): 37—39.
- 12 颜昌敬. 农作物组织培养. 上海科技出版社, 1991, 3—11.
- 13 Arcia, M. A. et al. Crop. Sci, 1978, 18(3): 413—418.
- 14 Bu, G. Z. et al. Chinese Journal of Biotechnology, 1989, 5(4):213—222.
- 15 Burck, L. G. et al, J. Hered, 1973, (63): 355—360.
- 16 Carlson, P. S. Sci, 1973, 180: 1366—1368.
- 17 Heard, A. L, The tobacco exhibition, Beijing, 23, Sep 87.
- 18 Javier, E. L. Tobacco Abstracts, 1983, 27(1—2): 86—37.
- 19 Meredith, C. P. Gen Mainpulation in Plant Improvement, Plenum Press, New york, 1984, 503—528.
- 20 Pandeye, R. S. et al. Z. Plantzenticht, 1986, 96: 346—352.
- 21 Xia, Z. A. et al. Agricultural Biotechnology. China Science and Technology Press, 1992, 505—508.

The Application of Cell Engineering to the Variety Improvement in Tobacco

Jia xinghua

Qingzhou Tobacco Research Institute of CNTC

Abstract

After briefly reviewing the history of the development of tobacco cell engineering, we discussed the potential that the cell engineering may have on the variety improvement in tobacco. In this paper, we mainly reviewed monoploid breeding, mutant induction and resistant screening at the cell level, protoplast culture and fusion and etc. We also reviewed the practical foundations of these techniques in transferring alien genes to produce new tobacco varieties. Finally, we reviewed the main achievements got in the past 20 years.