

植物人工种子研究进展*

邵宏波 初立业

(杭州大学生物系) (四平师范学院生物系)

提要 在我国高技术的发展规划中, 生物技术是被重视的首领技术之一^[6]。植物人工种子正是在创建中的生物技术, 由于其具有重大的实践意义和经济价值, 目前美国、日本、法国等都相继地开展了此方面的广泛研究, 并在胡萝卜、芹菜、苜蓿、花椰菜、西红柿等植物中获得成功^[1-7, 26]。我国从事此方面研究很少, 从1985年开始中科院植物所探索了西洋参、玉米、芹菜等植物人工种子的研究, 取得可喜成绩。本文阐述植物人工种子发展历程, 人工种子的概念, 使用的可行性, 优越性及对人工种子技术发展中现存的问题, 前景给予了乐观的估计。

关键词 人工种子; 体细胞胚; 胶囊; 人工种皮; 转化频率; 脱水人工种子

一、人工种子的发展历程

人工种子的产生与植物体细胞胚(somatic embryoid)形成的历史紧密相联系着。胚状体的形成最初见于1958年^[10], 随后有关胚状体的研究层出不穷^[8-25, 27-37]。在此基础上, 人们^[1, 2, 4, 5, 8-25]开始进行植物人工种子的系统研究而且在最近的几年人工种子技术方面获得了突破性的进展^[1, 3-20]。

人工种子(artificial seed)是在离体培养条件下, 由单个细胞产生发育成一个胚状体, 采用理化因素控制胚状体的同步生长, 在胚状体表面包上一层有机化合物作为保护胚状体及提供营养的“种皮”, 创造一个和种子相似的结构——人工种子^[2-4]。总之, 包装体细胞胚产生类似于真种子(合子种子)的原理首先在于体细胞胚与合子胚在形态、生理、生化上的相似性, 通过类似发育阶段产生具有子叶、根和茎端分生组织的体细胞, 根端和茎分生组织间具有共同的维管系统相连, 体细胞胚在一定条件下像合子胚那样具备耐干燥的能力^[5]。由此可见, 人工种子具有许多优越性, 通过细胞悬浮培养产生的胚状体具有数量多(一升培养基可产生十万个胚状体)、繁殖速度快、结构完整等特点; 提供培养的种皮, 可以根据不同植物种类的生长要求而配制可以促进人工种子的快速生长; 在使用过程中也可以进行机械化播种, 大量快速繁殖苗木和人工造林, 时间短, 成效快, 比试管苗繁殖降低了成本, 节省劳力, 是种苗生产的新途径^[2]; 尤其对通过细胞培养技术生产的新的、不能用种子进行繁殖的植物变异株, 用人工种子去代替合子种子繁殖, 就可以克服减数分裂的不稳定性而获得令人满意的效果^[1, 5]。然而人工种子与合子种子一个重要的区别就是合子种子随着水分的失去, 储藏组织的成熟以及种皮变硬, 已基本上停止了生长而变为休眠态或静止态了, 而人工种子却不同了。为了发展人工种子技术, 对自然条件下合子种子的特性, 尤其是抑制生长的主要因子的探讨是很必要的^[5]。

* 本文得到了梁海曼教授的指导, 在此一并致谢。

二、人工种子使用的可行性以及存在的问题。

人工种子技术有巨大的潜力会给植物繁育体系中不合理方法带来益处，如微繁殖和温室茎切方法等。其主要优越性在于大批生产和低花费相结合。虽然该体系能克服其它繁殖方法的许多弱点，但这一技术的可行性仍有赖于该作物的价值及生产竞争产品的费用，也更有赖于这一植物科学领域的进展。利用基因工程方法发展超级作物生产线，使大规模运用这种供应体系成为可能^[1, 2, 3, 5, 7]。

人工种子繁殖体系有效益的作物如下：

杂交稻：需快速繁殖新的F₁杂交品种。

土 豆：因遗传不稳定性，不能用真实种子繁殖，块茎切片繁殖易感染病害。块茎片难于贮藏是热带地区的主要问题。

老 鹳 草：真实种子费用过高（用于提炼草叶油）。

欧洲无籽黄瓜：真实种子昂贵。

大 蒜：通常用小鳞茎繁殖带来病毒传播，线虫繁殖。

雏 菊：真实种子昂贵。

另外还有一些其它作物的种子通常不适用，因而市场需求能承受高费用的人工种子。

我们知道，体细胞胚要直接在温室或田间种植，就需要包上一层足以适应胚胎着地和保护胚胎又不影响胚胎萌发的基质，即生产人工种子。包裹体细胞胚的这层基质要有足够的硬度以便加工、运输及播种。基质中还应该包含有足够的营养物质及生长发育的调节剂及其它一些能使胚胎发育植株所需要的化合物或生物合成物。理想的人工种皮应含有促进植物生产的微生物和适合各品种的化合物及合适的环境条件。包装过程中必须保证产生单个胚的胶囊。除此之外，人工种子还必须在田间条件下便于处理和机播。

总之，要使人工种子商品化，有三大问题必须解决：

1. 生产高质量的体细胞胚。高质量体细胞胚，必须具备下列特征：形态与发芽（即具有胚根延长部分）与合子胚相似；具有能发育成叶片的顶端分生组织和能产生根的胚根分生组织；能产生与亲本相似的健壮植株，在这里把体细胞胚的胚根延长称为发芽而把体细胞胚长成植株的过程称为“胚胎转化”^[4]。体细胞胚的研究目前都集中在估价胚质量上^[1, 4, 5, 6, 8]。ABA影响体细胞的生长，促进正常的黄蒿和胡萝卜胚形成和发育^[5, 9]。在估价胚质量研究方面，也包括胚萌芽方面的研究，以便确定在标准条件下是否能从体细胞胚复原生长为完整植株^[1, 4]。体细胞胚到完整植株的正规生产通常以转换率（Conversion frequency）表示。转换率用于鉴别改进培养处理的体细胞胚质量和总体系统频率。近二年，Walker及其同事们通过利用从培养皿中选择芹菜胚的方法^[4, 5, 10-14]，转换率由0.5%提高到50—60%，可见对于芹菜、苜蓿等植物利用提高胚转换率来改善胚的质量获得了很大的进展，但是今后需进一步提高体细胞胚的质量和增加从每个培养皿中选择体细胞胚的数目。

2. 必须开发具有上述多种质量的包装基质（即“种皮”）。目前关于基质的研究并不多见。通过有限的实验表明^[4, 5, 7, 9]，许多水凝胶都能把体细胞胚包裹成水合胶囊，这些能形成胶囊的水凝胶列于表1中。褐藻酸钠是最好的化合物之一，该化合物具有易变的特性，这种特性能使体细胞胚胶囊化。这种化合物在25℃的室温下即成胶状，此种胶还能与一

些无毒的二价金属盐结合, 如氯化钙。二价盐的结合是依靠与古洛酸(guluronic acid)分子上羧基团可形成离子键而络合成多聚物的。体细胞胚适合于大规模播种, 人工种皮又必须经久耐用, 褐藻酸盐是苜蓿、芹菜、花椰菜, 山葡萄等体细胞胚非常适合的包装胶^[3-7, 47-52]。人工种子基质的研究需要集中在开发新的包装胶和扩大实验植物的对象。

3. 在人工种子商业化之前, 组织培养产生的体细胞克隆变异又是另一个急需解决的问题。为克服这一困难, 研究者们用规定的可控制的胚形成体系作模本作物, 由此可生产出许多活性体细胞胚, 例如胡萝卜和苜蓿为繁殖项目生产的人工种子, 能为杂交产品迅速繁殖出母本, 随后这两种作物的杂交品种迅速地通过真实种子进行大量繁殖、廉价生产, 此时就不再需要人工种子了^[5, 50-58]。事实上, 多数人工种子发展的研究很少从技术角度上获得有用的品种, 然而这种模式体系为人工种子体系提供了标准的思路, 需要进一步深入地研究以求在各种新变异产生阶段进行扩展人工种子的使用, 并将使研究从模式转向具有坚实经济基础的人工种子作物。

三、人工种子的类型

到目前为止, 已形成的人工种子体系有两种: 带有胶囊外壳(种皮, 基质)体系的人工种子和脱水人工种子^[1, 3-7]。

表1 包装体细胞胚的水凝胶^[4, 5]

胶	浓度 (W/V)	络合剂	浓度 (mM)
褐藻酸钠 或 褐藻酸钾	0.5—5.0	CaCl ₂ FeCl ₂ LaCl ₃ Ca(OH) ₂ CoCl ₂ Ca(NO ₃) ₂	30—100
带明胶的 褐藻酸钠	5.0 2.0	CaCl ₂	30—100
带槐豆胶的 角叉藻聚糖	0.4—1.0 0.2—0.8	KCl NH ₄ Cl	500 500
角叉藻聚糖	3.0	KCl	300—500
防护树脂	2.0	NH ₄ Cl 四硼酸钠	300—500 100—120
洋菜	5.0	鞣酸	100
黄耆胶	2.5	CaCl ₂	100
果胶酸钠	2.0	CaCl ₂	100
羧甲基纤维素	2.5	CuSO ₄ CuSO ₄	100 100

1. 胶囊外壳体系人工种子

在水合胶囊里的体细胞胚优于脱水胚的人工种子体系。胶囊将是作物传送的最有效方法, 如那些需要单独预备或是需精细种植的作物^[1, 3]。但是大批单个胚的人工胶囊的制备却带来了技术障碍, 这是胶囊外壳体系人工种子的第一个缺点。此外, 胶囊胚贮存期间存活率降低, 这可能是胶囊阻止了呼吸作用的缘故, 这又是一个缺点。有关把体细胞胚封在普通褐藻制成的粘稠养分藻酸钙中的苜蓿和芹菜体细胞胚胶囊体系的研究一直在发展着^[1-7]。多数研究者们都选择藻酸盐作简易的囊体, 因为它对胚的毒性很低, 对体细胞胚的其它特性很少有影响。该种胶囊先把胚与藻酸钠混合, 然后把它们滴入钙盐槽中, 结果是单个的体细胞胚包裹在清洁坚硬直径约4毫米的小珠子之中。可见坚硬的胶珠在运用过程中对脆性的体细胞胚起保护作用。胶囊可作为营养库(人工胚乳)有助于胚存活并加速其生长, 而且胶囊外形成的一层憎水膜防止了胶囊的破裂和迅速失水, 还有助于减少胶囊的粘附力, 使播种时能使用改型的种子漏斗和真空种植机。

多数人工种子胶囊包装生产方法的研究是用苜蓿体细胞胚进行的。在试管内苜蓿胶囊的

存活率达60%，无菌土壤中约为20%，胶囊体系生产的首蓓已在温室内移植、成熟、开花并将结果。表2列出了首蓓体细胞胚经不同水合胶包裹后在土壤中的萌发率，这是其中的一次实验结果^[3-5]。胶囊也用于其它品种如火炬松和胡萝卜，但是植株复原水平低，在试管内火炬松无复原的，胡萝卜为3—10%发芽。可见今后的努力方向应是扩大寻找新的胶囊体系和合理地扩大供试植物范围。

2. 脱水人工种子

脱水体细胞种子是在前者基础上发展而来，旨在排除水合胶囊种子的缺点。它能解决贮藏问题，无需膜套，在合子胚发育期间，胚经历干燥阶段有助于它的成熟，脱水可以启动合子胚并从生长期进入萌芽期。因而脱水不仅成为提供体细胞种子方便的形式，还可能是体细胞胚发育成熟的重要因素。Kitto和Janick^[19]在

由聚氯乙烯及众多的胚构成的圆形胶片中干燥悬浮的胡萝卜体细胞胚，并重新水化这些胶片，胚在试管内能很好地复原成小植株。为表明脱水体细胞胚完整植株的最高恢复水平，体细胞胚不加外壳。Gray把无外壳的牧草（聚成球形的鸭茅属）体细胞胚脱水，可诱使32%的草在试管内形成完整植株。Gray认为脱水可产生附加作用，成为葡萄打破休眠期的处理因素。这种处理因素要用低温、赤霉素或吡基腺嘌呤来诱导萌发才可以奏效^[6]。这一结果告诉我们，对某些品种的作物，脱水体细胞胚是特别重要的人工种子体系，对这些品种来说，脱水是对胚发育的一种刺激作用。总之，这两种类型的人工种子，各有优点和缺点，在研究中应根据植物的种类、体细胞胚质量以及胶的类别等因素，选择一种合理的人工种子体系以达到最终获得最佳的转换率和萌发率。

四、人工种子在土壤条件下的转换

虽然在试管条件下细胞胚复原成完整植株对于体细胞胚形成学说是重要的，但是最终人工种子仍要在温室或大田长成完整植株。很多研究者向来试验成功地获得与生产条件一样的发芽率。

人工种子在土壤中的萌发，无论在有控制的温箱环境或无控制的温室和大田环境，均需体细胞胚的耐力并形成自己的根、茎、叶，并且也取决于苗的质量，质量高，人工种子在土壤中的转换就高，而且在随后的发育中也稳定。

高质量苗（转换率）应具如下特征：

- a. 苗具有带2片以上叶的顶端分生组织。
- b. 根具有2厘米以上的长度或根虽较短但具次生根。
- c. 根与茎直接相通，没有愈伤组织或下胚轴的肿胀（肥大）。

表2 首蓓体细胞胚经不同水合胶包裹后的发芽率^[4,5]

胶 (浓度: W/V)	络合剂 (浓度)	萌发率 (芽/总数)
对照 (未经包裹)	无	95% (19/20)
褐藻酸钠 (3.2% BOH)	CaCl ₂ 50mM	100% (20/20)
褐藻酸钾 (3.2%)	CaCl ₂ 50mM	100% (20/20)
带有50%明胶的褐藻酸钠(20%BOH)	CaCl ₂ 50mM	85% (17/20)
带有槐豆胶(0.8%) 的角叉藻聚糖(0.8%)	KCl 500mM	85% (17/20)
果胶酸钠 (20%)	CaCl ₂ 100mM	100% (20/20)

d. 绿色植株具有正常的表型。凡具多茎、发育受阻或白化植株等都认为不是高质量苗。

总之, 有关人工种子土壤转换实验报道的不多。最近的报道^[49, 30-32]有数据表明苜蓿体细胞胚的转换频率高达67%, 而相反, 胡萝卜胚流体系播在土中, 能存活一周左右, 发生转换的甚少。

人工种子发生转换后(长出苗)继续长成完整植株的主要限制因子可能是养分(盐和碳水化合物)的有效性。要解决此问题, 胚必须有自身的营养贮备又要外部的营养供应^[1-12], 同时因为人工种子体系在整个生长期都需要这些成分, 因而体细胞胚的营养结构库(种皮, 基质)即要有内源的(淀粉和蛋白质)又要有外源的(人工胚乳)。目前有关这方面研究很少, 今后的努力方向之一要从人工种子的基质方面加深、加宽研究才能在短时间内有所成就。

五、与人工种子相关的其它问题

1. 选择满意的基因型植物进行繁殖。人工种子研究从模式体系转向商业基因型植物是很困难的。很多现行价值很高的基因型并不表现好的体细胞胚形成学特征。除了价值极高的作物外, 只有胚形成过程的费用减少, 人工种子才对真实种子有竞争力。例如, 苜蓿人工种子的花费近于真实种子的20倍。将来费用降低可能要取决于实验室人工胚的产生阶段, 从而使人工种子适合于中等价格作物。由此可见选择基因型的重要性以及人工胚产生阶段的意义。

2. 贮藏、运输和管理人工种子还需要透彻地研究。需要重新制定和估价繁殖效率的参数, 要确定体细胞胚形成和转换成有生产力量的大小, 要有每克植物组织投入、产出的估算方法。所有这些已超出生物学范畴, 但对改善人工种子整体效率水平却是至关重要的, 这也是今后的一个努力方向。

六、结束语

人工种子是农业繁殖体系的一场革命, 其发展取决于人工种皮体系与体细胞胚体系技术的发展, 而且这二者是同等重要的。用合适的褐藻酸包装的体细胞胚发育成完整植株的能力与体细胞的质量直接成正比, 高质量体细胞胚是原始亲本的复制品, 高质量的体细胞胚具有同步发芽能力, 其发芽率可与种子媲美。低质量的体细胞胚转化率很低, 但进行转化和成熟试验仍有效。另外还要掌握体细胞胚发育的各个阶段: 愈伤组织出现, 愈伤组织诱导成功, 悬浮细胞培养体系建立, 再生(胚胎发生)和高质量成熟人工体细胞胚的产生^[50-53, 59]。没有高质量的体细胞胚就不能产生高质量的种苗, 当然也无法发展为包装种子系统。若有了高质量的体细胞胚, 而没有有效包装体系也会使发展人工种子的条件和因素不能完善, 不利于人工种子的进展。

我国是一个农业大国, 发展生物工程技术特别是植物遗传工程技术和人工种子技术是发展我国经济的重要决策。最近国务院将生物工程技术列为七大技术发展之首, 说明了研究生物工程技术 and 植物人工种子的重要性。在短短的几年内, 人工种子在温室条件进行繁殖的研究已经取得了不少进展。大田使用则是最终的目标。人工种子的生物学研究, 种子供应及种植方法将朝商业化的大批量繁殖优良植物品种的方面迈进。由此希望植物生物技术和人工种子的

技术不仅成为在实验室工作的科学家手中的攻坚武器, 而且也能成为亿万农民在田里获得优良植物品种的有效武器。只有这样, 才能使地球迅速改变面貌。

参 考 文 献

- [1] Jo Ann. et al, 1987: Trends in Biotechnology 5 (12): 20—27
- [2] 郭仲琛等, 1988: 植物学通报, 5 (1): 5
- [3] 谭晓莲, 1987: 青年植物学研究 1 (1): 48
- [4] Conger et al., 1986: Biotechnology 4 (9): 41—49
- [5] D. J. Grey et al., 1987: In Vitro Cellular & Developmental Biology 23 (1): 29—33
- [6] 朱培坤, 1988: 世界科学, 1: 1—3
- [7] 田中渥夫 (周荣仁译), 1988: 细胞生物学杂志, 10 (3): 115—121
- [8] Indra K. Vasil, 1987: J. Plant Physiol. 128: 193—218
- [9] Gray, D. J. et al., 1985: Trans. Am. Micr. Soc. 104: 395—399
- [10] Stward K. J. et al., 1952: Ann. J. Bot. 16: 495—509
- [11] 邵宏波等, 1989: 松辽学刊, 2: 70—72
- [12] 朴健植等, 1987: 哈尔滨师范大学学报 (自然科学版), 3: 71—73
- [13] Gray, D. J. et al., 1985: Plant Cell, Tissue, organ culture, 4: 123—133
- [14] Conger, B. V. et. al., 1989: Science, 221: 850—851
- [15] Hanning, G. E. et al., 1982: Theor. Appl. Genet. 63: 155—159
- [16] Kitto, S. L. et al., 1985: J. Am. soc. Hort. Sci 110: 283—286
- [17] Nitzsche, W., 1978: Z. Pflanzphysiol. 87: 469—472
- [18] Norstog, K., 1965: Am. J. Bot., 52: 538—546
- [19] Osborne, D. J. B. et al., 1983: Can. J. Bot. 61: 3568—3577
- [20] 中科院上海植生所细胞室, 1978: 植物组织和细胞培养, 上海科技出版社, 1—80
- [21] Songstad, D. D., Conger, B. V., 1986: Ann. J. Bot., 73: 987—990
- [22] Symons, S. J. et al., 1983: J. Exp. Bot., 34: 1541—1550
- [23] Ahuja, P. S. et al., 1982: Z. Pflanzenzuchtg, 89: 139—144
- [24] Chourey, P. S., D. B. Zurawski, 1985: Plant Sci., 39: 171—175
- [25] Chen, C. H. et al., 1981: Proc. S. D. Acad. Sci., 60: 39—43
- [26] 邵宏波, 1989: 国外作物组织培养, 24: 26—37
- [27] Chourey, P. S., D. Z. Sharpe, 1985: Plant Sci., 40: 181—191
- [28] Cooper, D. B. et al., 1986: Theor. Appl. Genet., 71: 784—790
- [29] Coulibaly, M. Y., Y. Demarly, 1986: Z. Pflanzenzuchtg 96: 70—81
- [30] Crooko, D. M., 1933: Bot. Gaz., 95: 209—239
- [31] Bennici, A, 1979: Z. Pflanzenzuchtg, 82: 349—353
- [32] Bennici, A., F. D. Amato, 1978: Z. Pflanzenzuchtg, 81: 305—311
- [33] Bingham, E. F. et al., 1975: Grop SCi., 15: 719—721
- [34] Botti, C., I. K. Vasil, 1983: Z. Pflanzenphysiol., 111: 319—325
- [35] Botti, C., 1984: Conod. J. Bot., 62: 1629—1635
- [36] Boyes, C. J., I. K. Vasil, 1984: Plant Sci. Let., 35: 153—157
- [37] Eyans, D. A. et al., 1980: Z. Pflanzenphysiol., 98: 355—358

- [38] Green, C. E., R. L. Phillips, 1975: *Crop Sci*, 15 : 417—421
- [39] Hanna, W. W. et al., 1984: *Theor. Appl. Genet.*, 67 : 155—159
- [40] Haydu, Z., I. K. Vasil, 1981: *Theor. Appl. Genet.*, 59 : 269—273
- [41] Hessemann, C. U., G. Shroder, 1982: *Theor. Appl. Genet.*, 62 : 128—131
- [42] Heyser, J. W., 1984: *Z. Pflanzenphysiol.*, 113 : 293—299
- [43] Ho, W., I. K. Vasil, 1983b: *Ann. Bot.*, 51 : 713—726
- [44] Hooykuas-Vanslogteren et al., 1984: *Nature*, 311 : 763—764
- [45] Hussey, G., 1982: *Ann. Bot.*, 49 : 747—759
- [46] Irvine, J. E., 1984: *Plant cell, Tissue, organ Cult.*, 3 : 201—209
- [47] Hussey, G., A. Falavigna, 1980: *J. Exp. Bot.*, 31 : 1675—1686
- [48] Jones, M. G., K. J. Dale, 1982: *Z. Pflanzenphysiol.*, 105 : 267—274
- [49] Karisson, S. B., I. K. Vasil, 1986a: *Amer. J. Bot.*, 73 : 894—901
- [50] Karp, A., S. E. Maddock, 1984: *Theor. Appl. Genet.*, 67 : 249—255
- [51] Lorz, H. B. et al., 1985: *Molec. Gene. Genet.*, 199 : 178—182
- [52] Lowe, K. et al., 1985: *Plant Cell.*, 41 : 125—132
- [53] Lu, C., I. K. Vasil, 1981a: *Theor. Appl. Genet.*, 59 : 275—289
- [54] Lu, C., I. K. Vasil, 1985: *Amer. J. Bot.*, 72 : 1908—1913
- [55] Lu, C., I. K. Vasil, 1981b: *Ann. Bot.*, 47 : 543—548
- [56] Lu, C., I. K. Vasil, 1982: *Theor. Appl. Genet.*, 62 : 109—112
- [57] Lu, C. et al., 1981: *Z. Pflanzenphysiol.*, 104 : 311—318
- [58] Lu, C., I. K. Vasil, 1983: *Theor. Appl. Genet.*, 62 : 285—290
- [59] 邵宏波等, 1989: *松辽学刊*, 4 : 30—36

ADVANCES IN PLANT ARTIFICIAL SEEDS RESEARCH

Shao, Hong Bo

(Biology Department, Hangzhou University)

Chu Li Ye

(Biology Department, Siping Teachers College)

This paper gave a comment on the advances of plant artificial seeds research at home and abroad. At the same time, the author also pointed out the existing problems in this field and possible accesses to them, and cast a good light on its concept, developmental process and tendency, advantages over zygoted seeds, feasibility of artificial seed application and thought that to develop artificial seeds rapidly and transfer them into commercial goods quickly. It is urgent for researchers to study deeply the technology of somatic embryo quality and its wrapping systems.

Key words Artificial seeds; Somatic embryos; Glue Capsule; Artificial seed coat; conversion frequency; Dehydrated artificial seeds