

禾本科植物的组织培养研究及其应用*

邵 宏 波

(北京大学生物学系, 北京 100871)

摘要 禾本科植物是粮食作物的主要来源, 随着人口的增加和生活水准的提高, 人类对粮食的产量、种类和质量的需求也日益迫切^[30'45'54'101'177'178]。根据国外在1982年对90个发展中国家的统计和预测的结果说明到1990年末, 这些国家共缺少72百万吨谷物 而到2000年将缺少144百万吨谷物^[44'127]。近十余年以来, 随着植物分子生物学的迅猛发展^[1'2'6-11'28'32'33'39 46'52'53'114-116'122'133]和作为植物生物技术重要组成部分的植物组织培养技术的日臻完善^[3-6'9-13'15-26'27'34-38'40-42'46-51'55-59'64-97'129], 被公认为非常困难从事的禾本科植物(*Gramineaceae*)的组织培养也取得了异常迅速的发展^[4'12'32'41'45'-50'54'55 59-70 76'78-94'104], 并且已经在作物改良的生产中取得了成效, 显示了越来越大的潜能和威力, 为人类从根本上解决食物问题指出了一条切实可行的途径^[8'12-18'32-35 37 47 75 76'93-97'122-130'142]。本文拟在评述近年来禾本科植物组织培养(主要指胚胎培养、器官培养、细胞培养和原生质体培养)的理论性研究和应用性研究的进展, 并重点描述和讨论在应用上较为成熟和有发展前景的几个领域的发展现状以及利用禾本科植物的组织培养技术而进行的基因转移技术的概况。希望能为我国从事植物组织培养的工作者们提供某些参考资料并对于一些问题进行共同的商榷和探讨。

关键词 禾本科植物; 组织培养; 基因表达的调控; 无性系繁殖; 种质保存; 作物育种; 体细胞杂交; 基因转移技术; 植物基因工程

一、前 言

作为植物生物技术的主要组成部分的植物组织培养技术从1902年 G·Haberlandt 提出细胞全能性理论和进行离体培养开始, 至今已有80余年的历史, 在这段时间里, 植物组织培养研究经历了从梦想到现实, 从理论到实践, 从实验室走向大田和工业以及医药业生产的逐步完善和成熟的发展过程^[15', 18', 47', 71]。目前植物组织培养已经被生物学的许多分支学科如植物生理学、生物化学、遗传学、育种学、病理学、解剖学、植物栽培学、细胞生物学、发育生物学等加以应用并且已产生了明显的社会和经济效益, 得到了国内外各研究机构和产业部门的广泛注意和重视, 成为现代生物科学中最活跃、最有生命力的一个分支^[7', 9', 10', 116', 127', 131]。随着植物分子生物学的发展和而来 DNA 重组技术、高等植物的基因转移技术的进一步完善和成熟, 将会使得改良农作物的遗传操作达到一个全新的更高水平^[16', 36', 52', 139', 143]。

自六十年代末期以来, 由于一些重要农作物相继通过细胞(小孢子、原生质体)培养并诱导成再生植株, 使得国际上许多著名的植物组织培养学家由从事模式植物(model plant)的组织培养研究转向以禾本科植物为对象的组织培养研究, 从而使得难于成功地进行组织培养研究的禾本科植物在该领域中取得了突破性的进展^[12', 95', 99', 134], 并且从此就一直成

* 本文得到杭州大学生物系梁海曼教授的指导, 特此致谢。

为了植物组织培养领域中最为引起重视的热点研究领域之一^[36, 93, 138, 143], 贯穿于全部生物工程(基因工程、细胞工程、酶工程和发酵工程)内容, 并成为它们的重要手段。其原因正是在于改良农作物, 创造出高产、稳产、品质好、高抗病、抗涝、抗虫害、抗高温、抗低温的优良品种以适应多变环境和人类的需要, 正是生物工程的核心内容^[8-10, 13, 23, 32-37, 52, 139]。因而进行禾本科植物的组织培养研究和应用性研究无论在理论上, 还是在实践上均显得越来越迫切, 越来越重要。

我国的禾本科植物的组织培养工作开始于七十年代的初期^[134], 比国外大致要晚五年左右的时间^[13, 144-146], 并且在全国形成一支较大的队伍是在七十年代末期所开展的花药培养研究, 其显著的标志是1978年在北京所举行的植物组织培养会议(Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture)并由此推动了我国从事禾本科植物的组织培养工作^[76, 94, 138, 146]。到八十年代的初期, 我国的禾本科植物组织培养工作的范围、深度均大大地扩大了, 不仅仅局限于花药和花粉的培养^[22, 129], 而且开展了水稻^[128]、小麦^[135, 146]、大麦^[64, 134, 138]、玉米^[140]、甘蔗^[141]、谷子^[12]、高粱^[12]等的胚胎培养、细胞培养和原生质体培养工作并取得了许多进展, 为进行重要农作物的改良提供了丰富的资料和基础^[29, 10, 13-16, 32, 33, 47, 51, 143]。由于篇幅的关系, 本文将主要论述禾本科植物的细胞培养、原生质体培养的研究概况以及与之相关的基因转移技术研究现状。其它方面的问题请参阅王新宇等(1984)^[3]、刘涤(1984)^[21]、丁家宜等^[8, 19]、陈振光^[20]、颜昌敬^[41]、许智宏^[35, 36, 40]、何中虎等(1990)^[43, 44]、李向辉^[10, 32]、王大元^[12]、Lorz等(1988)^[105]、Cohen(1989)^[116]、邵宏波等(1989, 1990)^[47, 48, 51, 56, 57]的综述性文章。

二、禾本科植物组织培养的理论性研究及意义

禾本科植物的组织培养是在植物组织培养达到成熟的阶段, 即在六十年代末期才逐渐开展起来并在七十年代的末期达到高潮^[18]。禾本科植物的组织培养的理论性研究也正是伴随这个时期而开展起来的, 同时它又反过来促进了植物组织培养技术的不断完善和发展并使得禾本科植物组织培养的应用性研究得以迅速发展^[15, 18, 20]。目前, 禾本科植物的组织培养经过近三十年的发展, 已建立了一套比较完整的技术并正在向纵深发展: 一是扩大禾本科植物中有重要经济价值植物(包括野生种植物)的研究和开发利用; 二是与基因转移技术联系起来, 进行植物基因工程的研究, 从细胞和分子水平上, 开拓新的研究内容, 如细胞器移植、外源DNA导入等; 三是加强了细胞的生长、分化和发育的生化机制研究, 加强了体细胞变异的研究, 同时对胚胎发生中的基因表达调控研究也给予了足够的重视^[25, 29, 31, 92-94, 133]。所有这些将使禾本科植物组织培养的研究与应用向更新更高的水平发展。

1. 花药培养及其在遗传学、胚胎学上的意义^[4, 6, 93, 134, 138]

花药培养和花粉培养获得的单倍体和纯合二倍体植物是研究细胞遗传的极好材料。在细胞培养中很易引起变异和染色体变化, 从而可得到作物的附加系、代换系和易位系等新类型, 如在小麦和玉米中, 为开展染色体工程研究开辟了新的途径^[88]。

利用花药培养, 梁海曼等(1985, 1987)^[147, 148]研究了花药壁的形态变化以及其在细胞分化中的作用并认为低温、pH值均影响着花药壁的作用, 从而丰富了植物胚胎学的基础理

论^[92-94]。

2. 细胞培养及其在生理学、发育生物学等上的意义^[22, 31, 33, 148]

细胞是构成生物体的基本单位, 是进行一切生理机能的场所, 因而细胞和组织培养为研究植物生理活动提供了一种极有力的手段。由于在人工控制的培养基上可以加入各种营养物质、生长活性物质和调节物质, 因而利用植物组织培养来研究矿质营养、有机营养以及它们之间的相互关系。近几年来, 这方面的进展也较为迅速。邵宏波等(1990)^[64, 65]在甘蔗和大麦的细胞和组织培养中发现, 甘蔗及大麦的胚性细胞中含有高于非胚性细胞中的蛋白质含量, 而且它们之间的过氧化物酶同工酶谱存在着很大的差异, 对大麦组织培养中的具有不同胚胎发生能力的外植体进行矿质元素分析表明它们之间也存在着差异, 具有强胚胎发生能力的外植体大都含有相对较低的大量元素 Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ 而含有相对较高的微量元素 Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , 这一结果与黄大年等^[25]在甘蔗细胞培养中所观察的结果相似。以上这些结果对于探讨营养生理、离子间的作用与平衡以及植物胚胎发生的机制等均是有益的^[31, 56, 57, 75, 133]。近年来, 利用单细胞培养研究植物的光合代谢也取得了进展^[18, 36, 117]。另外利用细胞培养对研究病理学也提供了方便, 如植物的抗病性用单细胞培养来进行检验和鉴定, 一周之内便可以得到结果^[14, 142]。

3. 原生质体培养及其理论意义

自从 Cocking 在1960年用酶法首次从番茄根尖分离出大量有活性的原生质体, 并通过培养能再生新细胞壁成为再生细胞以后, 植物原生质体的研究及应用便进入了一个新阶段。

禾本科植物的原生质体培养是在六十年代末到七十年代初期时间内所进行的模式植物烟草原生质体培养技术基础上开展起来的^[9]。最早的报告是 Kao 等(1973)^[150], 随后 Koblitz(1976)^[151]报告了从水稻叶鞘分离的原生质体经培养形成了愈伤组织, Potrykus 等(1977)^[172]培养来源于玉米茎的原生质体获得了愈伤组织。我国学者蔡起贵等^[16]也相继从液体培养的水稻细胞制备的原生质体获得了愈伤组织。上述的报告均未能获得原生质体的再生植物, 并且有些报告的结果不稳定, 难以重复。最近 Coulibaly 等(1986)^[68]、Abe 等(1986)^[107]分别从水稻无菌苗胚芽鞘形成的愈伤组织中分离的原生质体以及从水稻悬浮培养物分离的原生质体再生出了正常的植株。这在重要的禾本科植物的原生质体培养方面是一大进展。同时, Vasil 等(1980, 1981, 1983, 1987)^[69-81, 84]又分别从珍珠粟、羊草、紫狼尾草的胚性悬浮培养物中制备的原生质体通过体细胞胚胎发生(Somatic embryogenesis)途径产生了植株, 这样的实验结果以后又由黄培培(1990)^[38]、Adachi 等(1989)^[68]在普通小麦原生质体培养中观察到, 同时 Wang 等^[104]也在 Indica 型水稻和 CMS 型水稻原生质体培养以及 Shillito 等(1989)^[102]、Prioli 等(1989)^[103]、Rhodes 等(1988)^[106]在玉米、玉米近交系的原生质体培养和 Lurhs 等(1988)^[108]在大麦的原生质体培养中均得到了证实并成功地进行了禾本科植物的原生质体培养工作, 并使得禾本科植物的原生质体培养技术日趋完善, 为进行禾本科植物的原生质体培养的理论性研究和应用性研究提供了丰富的材料来源, 打下了坚实的基础。现将已经成功地进行了禾本科植物的原生质体培养工作的植物列于表 1^[120, 152]。

1) 原生质体的特点^[2, 3, 9, 10, 18, 28, 30, 59-64, 101-109, 117, 130]

表1 禾本科植物的原生质体培养事例(1973—1989)

植物名称	原生质体的来源	最终的培养结果	参考文献
Oryzoideae 稻亚科	悬浮培养的细胞	愈伤组织	[16,153]
<i>Oryza sativa</i> 水稻	悬浮培养的胚性细胞	植 株	[77,104,154,155]
	叶 鞘	愈伤组织和根	[151]
	胚芽鞘愈伤组织	植 株	[68]
Pooideae 早熟禾亚科	叶 片	细胞团	[2,9]
<i>Hordeum vulgare</i> 大麦	愈伤组织	愈伤组织	[101]
	悬浮培养的胚性细胞	白化苗	[108]
<i>Triticum aestivum</i> 小麦	叶 片	二次细胞分裂	[9,159]
	悬浮培养的胚性细胞	植 株	[156]
	悬浮培养的胚性细胞	愈伤组织	[109]
<i>Secale cereale</i> 黑麦	叶 片	愈伤组织	[158]
<i>Triticale</i> 小黑麦	叶 片	二次细胞分裂	[9]
<i>Lolium multiflorum</i> 多花黑 麦草	悬浮培养的胚性细胞	愈伤组织	[161]
<i>Bromus inermis</i> 无芒雀麦	悬浮培养的胚性细胞	胚状体、白化植株	[86,150]
<i>Festuca arundinaceus</i> 竹叶 兰羊茅	悬浮培养的胚性细胞	植 株	[163]
<i>Polypogon fugax</i> 棒头草	胚性愈伤组织及悬浮培 养的胚性细胞	植 株	[12]
Panicoidae 黍亚科			
<i>Saccharum officinarum</i> 甘蔗	悬浮培养的细胞	细胞团及愈伤组织	[41,69,159]
	悬浮培养的胚性细胞	植 株	[38,160]
<i>Panicum maximum</i> 大黍	悬浮培养的胚性细胞	植 株	[162]
<i>Setaria italica</i> 谷子	悬浮培养的细胞	愈伤组织	[164]
<i>Pennisetum purpureum</i> 紫 狼尾草	悬浮培养的胚性细胞	植 株	[59,63,64]
<i>P. americanum</i> 珍珠谷	悬浮培养的胚性细胞	植 株	[60,67]
<i>Sorghum bicolor</i> 双色高粱	悬浮培养的细胞	愈伤组织	[165]
<i>Zea mays</i> 玉米	茎 尖	愈伤组织	[72]
	悬浮培养的细胞	愈伤组织	[166]
	悬浮培养的胚性细胞	植 株	[103,106]
supersweet corn 超甜玉米	悬浮培养的胚性细胞	单倍体和二倍体植株	[163]
inbred corn 近交玉米	悬浮培养的胚性细胞	植 株	[102]

随着原生质体培养研究的不断发展,为作物的改良和基础理论研究开辟了又一个崭新的领域,与其它类的组织培养(如组织、细胞的培养)相比,原生质体培养有许多优越性:第一,一种基因型的同一种组织可以同时产生大量的遗传上一致的分离的原生质体群;第二,每个原生质体都含有该个体的全部遗传信息,而且在适当的培养条件下,有再生与其亲本相似的完整植株的全能性。这就说明,原生质体可以象一粒种子那样再生繁殖;第三,由于它没有细胞壁,它可以像动物细胞那样,在诱导条件下超越性细胞的不亲和障碍,进行各种远缘种间细胞的融合或杂交;第四,原生质体可以摄取外源遗传信息,包括细胞器,细胞核,细菌,病

毒, 质粒以及各种 DNA 分子。因此, 易于在控制条件下进行准确的操作以及重组体、转化体的分离和分析, 是进行遗传转化研究的理想的实验体系, 它是在分子水平和细胞水平上研究遗传信息动态的结合点^[73, 74, 78-85, 88]。经过遗传操作以后的原生质体, 在再生发育过程中能产生遗传重组及形成新的变异植株, 因而它已成为改良作物品种的新途径, 并在改变植物遗传性的应用研究和基础研究中有着广泛应用的前景^[98, 100]。

2) 利用原生质体进行细胞壁再生及质膜研究^[9, 10, 40, 111, 9, 106]

细胞壁是植物细胞特有的结构, 原生质体具有无细胞壁的特性, 因而植物细胞生物学家利用它来研究细胞壁的再生及其各种细胞器在细胞壁再生中的作用。质膜为壁所遮盖着, 是生命活动中起重要作用的筛膜结构, 不具细胞壁的原生质体成为植物细胞质膜研究的很好的实验系统。以前常用有丝分裂末期细胞板的产生来研究胞壁的形成和再生, 这在取材观察或所获得的资料方面均存在一定的局限性, 改用原生质体后, 利用电镜及冰冻蚀刻等技术即可观察细胞壁重新形成的整个过程。另外, 刚分离的原生质体由于质膜充分暴露, 为研究结构与功能及表面的特性提供了极大的方便。

3) 原生质体在细胞核与细胞质相互关系研究中的应用^[10, 17, 33, 37, 55, 73, 117, 118]

现在可以利用原生质体摄取小分子、大分子、病毒及细菌一类的颗粒, 甚至能移植细胞核、叶绿体及线粒体等细胞器, 或用两个不同亲本的原生质体进行融合(即细胞杂交, 融合的结果将导致双方染色体组及细胞质的添加)来进行核与质关系的研究。其优点是扩大了研究的手段及缩短了研究时间, 从而避免了过去利用动物细胞的核移植方法的局限性以及在植物中利用连续回交方法的繁琐手续和不彻底性。目前, 在细胞融合方面, 已获得了品种间、种间、属间杂种植物, 甚致科间的杂种细胞系^[3, 7, 15, 24, 88, 146]。在对杂种细胞的质体和染色体的行为、同工酶的分析及亚显微结构的观察等方面都积累了一些有关于核与质关系的资料, 为深入地阐明核与质关系的规律性打下了基础。

4) 原生质体在病毒学及遗传操作研究中的应用^[110, 114, 115, 120]

在植物病毒病的研究中, 只有深入了解病毒与寄主细胞的相互关系, 才能提出防治病毒病的新方法。由于原生质体可摄入外界物质, 又可被病毒同步侵染的性质, 因而原生质体成为研究病毒侵染机理以及植物与病毒关系的理想材料系统。以病毒的侵染过程为例, 过去多用叶片为材料, 研究病毒侵染及复制的机理, 存在着很大的困难, 主要是感染频率低(1%左右)及不同步感染(即先感染少数细胞再经反复感染才能达到其余细胞)。利用原生质体后, 由于感染频率可高达85—100%, 并且又是同步感染, 就克服了上述障碍, 病毒学的研究提供了理想的实验数据^[118, 122-124]。

原生质体可以作为理想的受体系统进行各种传质操作的研究^[4, 5, 6, 10, 11, 23, 28, 32, 39, 45, 46, 52, 77-82, 98, 101, 103, 114-117, 139]。例如利用根癌农杆菌中的Ti质粒作为载体把外源遗传物质引入原生质体作转化研究, 已取得了可喜的成绩^[4, 23, 52, 137-139]。在禾本科植物中, 利用原生质体而进行的遗传物质直接转化方法在大麦^[101]、小麦^[23]、水稻^[78, 79]、甘蔗^[23, 80, 82, 125]等植株上均获得了成功, 为作物改良的遗传操作手段和水平开辟了新的途径和方法, 其前景极其诱人。

三、禾本科植物组织培养的应用研究现状

禾本科植物组织培养的应用性研究与其理论性研究是紧密相联的。随着生物技术的发展,特别是植物组织培养技术的进步,植物细胞具有“全能性”的概念已被广泛接受,因而也使得近十年来在难于从事组织培养工作的禾本科植物中在应用方面取得了许多进展。现分以下几个方面论述。

1. 花药(粉)培养在作物改良上的潜力

离体培养花药,可以诱导花粉改变正常的有限分裂次数的配子体发育途径,而转向无限分裂的产生完整植株的孢子体发育途径^[88,93,99,132]。由此可见,经过减数分裂产生的花粉粒(配子体)细胞的染色体数目比原来体细胞减少一半,成为单倍体细胞,由这种单倍体花粉生长分化出的植株,其细胞中染色体只有正常的二倍体植株的一半,这样的植物就叫“单倍体植物”。因而单倍体植物最本质的特征是其细胞中只有一套染色体,这一特征使得单倍体植物在作物改良上具有两个极大的用途:第一,当用秋水仙素对单倍体进行人工加倍成为同源二倍体之后,就变成了“纯合系”,这在自交作物杂交育种时极为有用的;第二,单套染色体不存在显性基因掩盖隐性基因的现象,因而将单倍体用于突变育种将会大大提高工作效率^[89,97,170]。

1) 加速杂种纯合,缩短育种年限^[15,70,134]

在常规育种时,由于杂种后代的不断分离,须经多代自交,连年选育,逐步缩小配子间的差异,才能得到一个稳定的后代,这就需要经过近十个世代。再经品比、区域试验和生产试验,一般育成一个新品种,至少需要10—12年的时间。由此可见,杂交育种的大部分时间是花在杂种后代($F_1 \rightarrow F_{n-1}$)优良性状的稳定上。而通过低世代($F_1 - F_3$)植株的花药培养,诱发其花粉发育成单倍体植株,经人工或自然加倍,立即被纯合成稳定的后代,从中选出优良株系即可进行品比、区域试验和生产试验,不须经逐代选择。因此,一般只需3—5年即可育成新品种。这正是由于花药培养方法可避免异质配子交配的结果,而直接从花粉发育成单倍体植株。加倍后得到纯合的二倍体,从而加速杂种的纯合,大大缩短了育种年限,如我国科学家育出的水稻花粉新品种和新品系已超过100多个,其栽培面积在300万亩以上,其中“花寒早”,“中花8号”、“中花9号”等都已大面积推广并取得显著的增产效果^[70,76,101,129,138,163]。两种育种方法的程序比较见图1。

2) 获得异源附加系、代换系和易位系^[142,146]

在远缘杂交中,由于获得的杂种通常存在着不育性和后代的广泛分离现象,使远缘杂种利用杂交育种十分困难,现在利用花药培养的方法,对远缘杂种花药进行离体培养,在花粉加倍单倍体植株中可以获得异源附加系、代换系和易位系等各种重组体,使有用的异源基因或染色体片段或整条染色体转移到栽培作物上。如,用普通小麦和黑麦进行属间杂交,得到八倍体小黑麦,再用普通小麦对其进行回交,然后取 F_1 花药进行培养,在花粉植株中可以得到稳定的异源代换系和异源附加系(图2)。又如水稻“取手2号”为籼粳杂种,带有抗稻瘟病的Pi-Z¹基因。用“取手2号”和丰产栽培品种“京系17号”水稻杂交,回交后对 F_1 进行花药培养,只用了两年时间就将Pi-Z¹抗稻瘟病基因转移到“京系17号”上,从而育成了抗病、高产的“中花8号”和“中花9号”水稻优良品种。

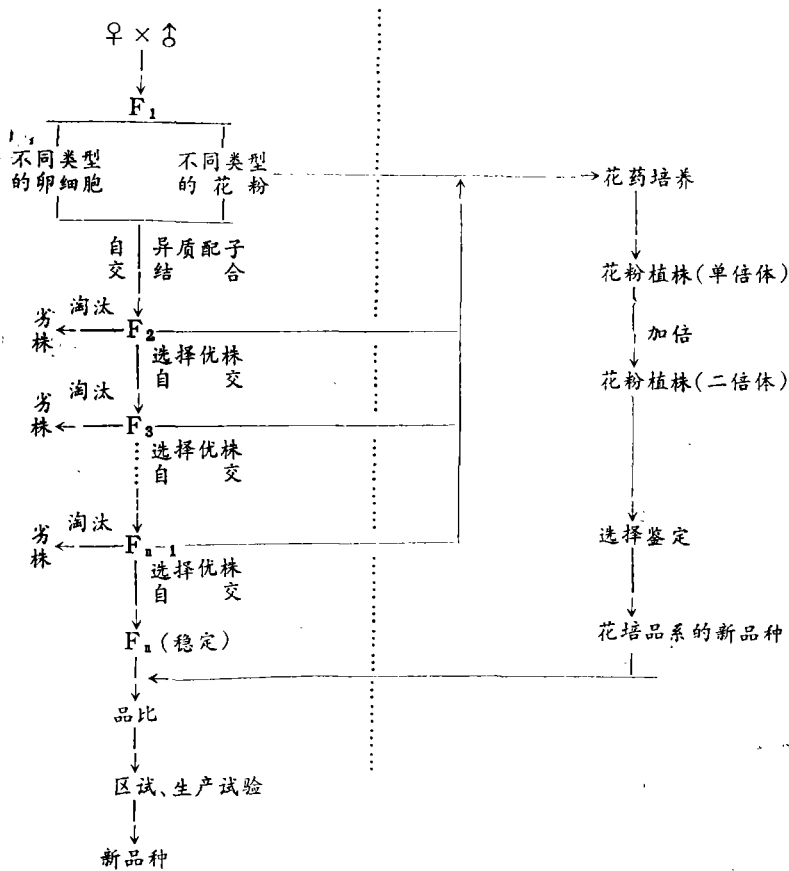


图1 杂交育种(左)与花培育种(右)的比较 [15,146,170]

3) 在异交作物中快速获得纯系并提高突变育种的效率

利用异交作物(如玉米、高粱等)的杂交优势可以大幅度地提高其生物产量,但首要的条件是必须取得一定数量的自交系(纯系)。利用常规方法要花费大量的人力和时间进行多代人工自交(一般需6代以上)。如对异花授粉的作物进行花药培养,产生花粉植株,经过加倍后就得到纯合系,这样只要一个世代就可以得到自交系,大大缩短了选育自交系的年限。单倍体育种法是从杂交后的 F₁ 诱导单倍体并进行染色体加倍得到纯合二倍体,因而该法又可以节省时间、土地和劳力 [89,134,138,140]。而且加倍单倍体在育种中更大的效益表现在提高选择效率上,单倍体加倍成纯合二倍体以后,其表现型和基因型是一致的,因此从表现型上就可以容易地区分不同的基因型,这样便可以大大地降低误选的频率 [15,170]。图3表示了单倍体用于杂交育种时提高选择效率的一般图解。

用辐射方法或化学方法进行诱变育种,通常只能得到百万分之几的诱变率。由于在诱变过程中很难使等位基因的两个成员同时发生变异,而单个的隐性基因的突变往往被显性基因所掩盖并在处理的当代表现不出来。为了使这些隐性变异不致被淘汰,处理当代的种子要全部收下,连续播种,工作量之大是可以想象的。然而通过高等植物的花药培养除了可以在短期内获得大量遗传性稳定的新重组体外,还可以由于培养过程中经常发生基因突变和染色体重排而获得频率很高的新的遗传变异资源 [135,158], 这些对遗传育种,特别是为细胞遗传

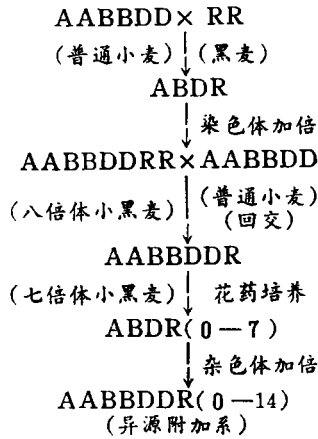


图2 利用花药培养得到小麦—黑麦的异源附加系 [170]

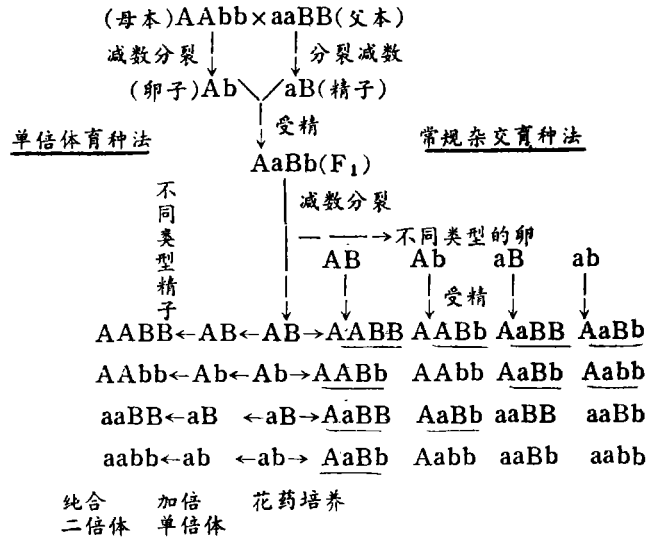


图3 单倍体育种法提高选择效率图解 [15]

表2 不同种禾本科植物花粉植株的倍性变化情况* [101 129 135]

材 料	观察植 株 数	单倍体 植株%	二倍体 植株%	单倍体植株异数倍体 与二倍体植 株之和%	
				株之和%	植株%
玉 米	16	49.90	37.50	87.40	12.60
玉 米	46	60.90	38.30	89.20	10.8
大 表	50	61.80	29.40	91.20	8.8
小 麦	54	70.37	18.52	88.89	11.11
小 麦	72	61.1	26.4	87.5	12.5
水稻(粳)	2496	35.3	53.4	88.7	11.3
水稻(粳)	2087	36.5	57.9	94.4	5.6

*表中数据是参考上述三篇文献基础上重新制定的

和染色体工程创造了基础材料。现将花药培养成功的禾本科植物种类列于表3并将部分禾本科植物花粉植株的倍性变化列于表2。

2. 原生质体培养在品种改良中的应用

原生质体培养是植物组织培养技术中要求最为严格，最能反映某个实验室研究水平和最有发展前途的一门技术，近年在作物品种改良中已显示了不可抗拒的力量和前景 [8-10, 13, 17, 23, 26-36, 37, 42, 45-63, 121, 162]。

1) 体细胞杂交

体细胞杂交或称原生质体融合是以体细胞原生质体，即经特殊酶处理体细胞而脱掉了细胞壁的裸露细胞为亲本进行的融合的一种细胞工程技术。它具有某些有性杂交所没有的特点，经过这种方法所得到的杂种细胞，进一步培养就有可能得到一种自然界所不存在的杂种植物。体细胞杂交研究的进展是建立在植物组织、细胞培养和原生质体培养的基础上。这两个分支的研究使单细胞或原生质体的研究结果反映到整体水平上 [17, 54, 108, 166]。一个单个细胞或进入脱分化状态的细胞团能以独立的有机体形式在一定条件下不断分裂，如果条件进一步改变可使这些细胞进入分化状态而形成完整的植株，此植株就具有着单细胞所具有的遗传特点。这些研究的发展肯定了单细胞遗传操作的可应用性，而且原生质体作为一个裸露的单细胞也具有全能性，同样是进行遗传操作的理想材料 [37, 62, 66, 70, 117, 122, 136]。

体细胞杂交过程比原生质体培养更复杂，可分为四个主要步骤：制备原生质体、用化学或物理方法诱导异种原生质体融合、融合产物的选择培养及融合产物再生成杂种植株。许多

资料均表明,植物的体细胞杂交几乎可以不受亲缘关系的限制,甚致动植物界的细胞都能进行杂交,由此就大大地扩大了亲本遗传基因的重组及杂种变异的选择。然而,由于禾本科植物原生质体再生植株困难以及种类有限,使得这一领域进展不快,但是通过对模式植物的深入研究和利用植物生长物质的调节,已经获得了丰富的资料和经验并在水稻、玉米、大麦的体细胞杂交研究中取得了显著的进展 [419,429,1309,163]。

最近在原生质体转化方面也做了许多的工作 [239,529,101-103,114-116,133,137]。引入的方式主要是通过载体而进行的间接引入。目前这方面的工作以冠瘿瘤的转化研究较多,虽然另外的一些质粒及病毒也可成为有希望的禾本科植物的载体,但是Fi质粒仍然是最有希望的载体 [19,114,115]。

Zörz 等 (1985, 1988) [106] 采用 DNA 直接进行原生质体转化的方法,将外源基因引入了小麦细胞。由悬浮培养的小麦细胞游离的原生质体在 PEG 存在下与环状和线状质粒 DNA 温育,后者为含有可选择性嵌合抗性基因的 PBR322质粒。在卡那霉素抗性平板上筛选转化子,抗性愈伤组织中存在有关的酶活性。Coulibaly 等 (1986) [19,88,130] 也利用原生质体直接转化方法将细菌基因引入水稻原生质体中并使该水稻原生质体得到了再生,经鉴定其再生植株中含有相应的基因。从而为 DNA 介导的作物改良展示了良好的前景。

2) 突变体的筛选

与细胞或组织培养情况一样,在原生质体培养过程中经或不经诱变因子处理均可产生变异(自发突变和人工诱变)。用原生质体进行诱变有许多优点:对外界物理(各种射线)、化学(各种化学诱变剂)因子较敏感;可供处理的原生质体数量大、体积小、培养后分裂频率较高;不会出现用组织或幼苗处理时发生正常细胞生长掩盖突变细胞生长的现象;单倍体原生质体为材料还不存在隐性基因受掩盖的问题,产生的突变体当代便能鉴别等。一旦筛选出具有优良经济性状的突变体,便很快可在生产上得到应用,这是一种有前途的育种方法 [179,142,170]。现将有再生植株的突变体和变异体列于表 4。

3. 禾本科植物组织培养物的超低温保存

种质的保存技术近些年来发展十分迅速,并且日益引起人们的重视 [172,173,178]。随着生物技术的飞速发展,这一技术将会得到应有的发展和完善。禾本科植物的组织培养发展推动了这一技术向纵深发展,并且逐渐在作物的改良、人工种子技术的发展中起到重要作

表 3 获得的花粉植株的主要种类

植 物 种	发生方式*	文 献
大 麦	E、C、P	[91,101]
多花黑麦草	C、P	[91]
黑 麦 草	C、P	[101]
水 稻	C、E、P	[65,149]
黑 麦	C、E、P	[15,112]
小 黑 麦	C、P	[70,74]
小 麦	C、P	[75,88,179]
野生二粒小麦	C、P	[15,111]
尾状山羊草×小伞山羊草	C、P	[93,94]
苇状羊茅	C、P	[15,146]
多花黑麦草×苇状羊茅	C、P	[101]
玉 米	E、P	[163,180,181]
甘 蔗	C、E、P	[110,132]
梯 牧 草	C、P	[15]
甜根子草	C、P	[15,129]
小麦×天蓝冰草	E、P	[129]
高 粱	E、P	[129,179]
粟	E、P	[88]

* C: 愈伤组织; E: 胚状体; P: 植株

用^[13, 18, 47]。究其原因可有以下几方面。第一, 在植物组织和细胞培养过程中, 不断的继代培养会引起染色体和基因型的变异, 从而产生两种危害: 一是可能导致培养细胞全能性的丧失, 二是一些具有特殊性状的细胞株系, 如具有某种特殊产物的细胞系以及具有某种抗逆性的细胞系, 有可能在继代培养中丧失这些十分宝贵的性状。随着组织和细胞培养的发展, 具有特殊性状的细胞株系日益增加, 特别是细胞工程和基因工程的发展, 迫切需要收集和贮存各种植物的基因型, 使之不发生改变。因此, 在植物组织和细胞培养工作迅速发展的同时, 也逐渐建立和发展了

禾本科植物的种质保存技术; 第二, 由于人口的迅速增加, 对森林和农业土地的急剧开发以及对粮食的迫切需要, 依靠传统的种质保存方法保存农业和园艺上的高产、稳产和抗逆性强的优良品种、杂交后代和亲本、各种突变体会常发生遗传变异, 同时今后植物育种工作的成就将在更大程度上取决于广泛的种质资源的收集与贮备。所有这些都需要建立更有效的长期的种质保存技术; 第三, 通过细胞和组织培养方法建立培养细胞的人工种质库是十分经济和有效的措施, 它可以大大节省对土地和人力的需求。对于依靠营养体繁殖的农作物, 培养组织的人工种质库更具有重要的应用意义。由此, 近年来禾本科植物的种质保存研究取得了许多成就, 现列于表5中^[13, 34, 130, 172, 173], 并将植物组织和细胞超低温保存的主要步骤和环节描绘于图4中。

四、禾本科植物的胚性悬浮细胞系的建立和体细胞胚胎发生

许多的资料表明: 禾本科植物的胚性悬浮细胞系的建立是真正地把生物技术应用于作物改良的基础^[12, 58-64], 它使人们有可能象操纵微生物那样, 在细胞水平上进行植物细胞突变体的筛选^[142]; 更重要的是禾本科植物全能性原生质体的理想来源^[59, 67, 158]。从表1可以清楚地看到这一点, 在胚性悬浮细胞系建立的基础上, 获取具有经过体细胞胚胎发生途径进行再生的, 全能性的大量的、均一原生质体并使这些原生质体进行高频率再生, 现在这样的程序正为越来越多的组织培养学家所采纳^[59, 104, 167, 168, 172]。最近几年的进展又进一步地证明了这样的观点。由此可见, 胚性悬浮细胞系的建立是进行原生质体培养的前提, 而原生质体培养再生成植株是进行禾本科植物中的作物改良的基础和保证, 是进行高等作物的各种遗传操作和修饰的前提条件^[51, 105, 108, 117, 128]。近年来, 研究者经过不懈的努力已

表4 有再生植株的突变体和变异体*

名称	诱变剂	选择剂	机制	遗传方式
大麦	NaN ₃	AEC	U, 根摄取, AEC 减少	R
大麦	NaN ₃	lys+thr	P, F	—
大麦	NaN ₃	羟脯氨酸	P	S
小麦	X射线	5MT	不是过量生产	—
甘蔗	无	抗菲基病药剂	—	R
水稻	无	AEC	lys 过量生产, 积累	—
	无	AEC	lys, Asp, Arg, Ala 过量生产, 积累, 蛋 白质增加	+
玉米	NaN ₃	lys+thr	P	D
	NaN ₃	AEC	lys, Thr, Ile, Met 过量生产	D

*本表是参考文献^[128, 142, 171, 180]基础上重新整理而成。

注: 机制: F: 酶对反馈抑制不敏感, P: 增加了天然产物, U: 改变了摄取方式。

遗传方式: D: 显性性状, S: 半显性性状, R: 隐性性状, +: 性状能通过自交传递, 但未做遗传研究, —: 未见报道。

5MT: 5-甲基色氨酸, AEC: S-2-氨基乙基半胱氨酸

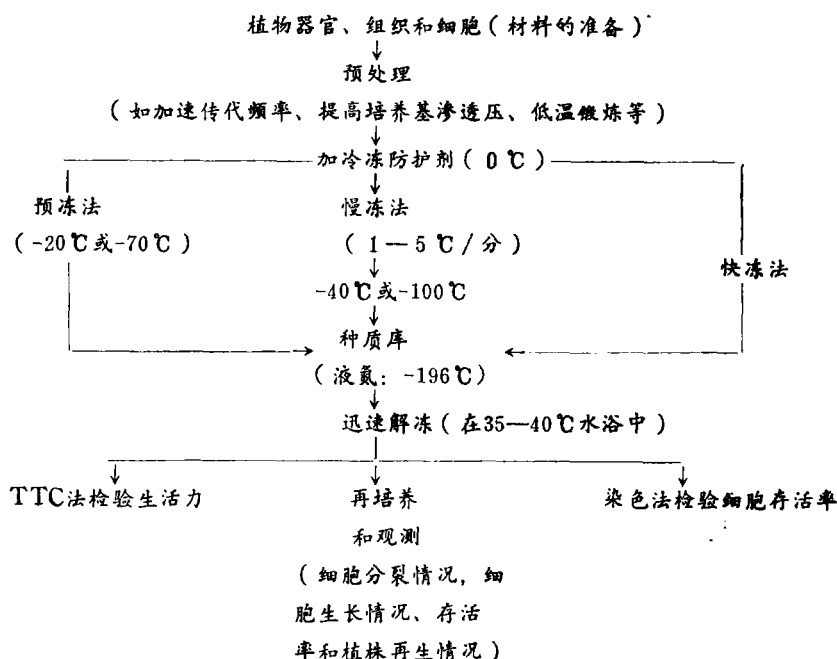


图4 植物组织和细胞冷冻保存的主要步骤

经建立了珍珠粟、大黍、棒头草、紫狼尾草、谷子、玉米、芦苇、水稻、大麦、甘蔗等禾本科植物的胚性悬浮细胞系,为进一步地进行原生质体培养和遗传操作打下了坚实的基础。现将已经成功地进行了胚性悬浮细胞系建立的禾本科植物列于表6。

这里值得一提的是大麦胚性细胞悬浮物的建立所取得的进展。Kott等(1984)^[176]用大麦幼胚来源的胚性愈伤组织进行了悬浮培养的研究,其悬浮培养物通过体细胞胚胎发生途径再生了白化苗,但却未能建立均质分散的悬浮细胞系。Lukhs和Lorz(1988)^[108]报道了建立均质分散、有形态发生能力的悬浮细胞系,从悬浮细胞和由之而来的原生质体都只能偶尔获得白化苗。Muller等(1989)^[176]报道了从大麦胚轴建立了悬浮细胞系,但却没有形态发生和

表5 禾本科植物的低温保存名录*

植物种类	试验材料	观察结果
无芒雀麦	悬浮培养的细胞	38%存活
无芒雀麦	分离的原生质体	68%存活
水稻	悬浮培养的细胞	60—65%存活
	花药	形成愈伤组织并再生成植株
	胚乳	形成愈伤组织并再生成植株
甘蔗	悬浮培养的细胞	60%存活并且再生成了植株
玉米	悬浮培养的细胞	75%存活并恢复生长
高粱	悬浮培养的细胞	25%存活并恢复生长
小麦	悬浮培养的细胞	恢复生长
大麦	悬浮培养的细胞	70%恢复生长,并形成愈伤组织和胚状体
	愈伤组织	恢复生长

*在文献[17、167、172、173、181]基础上整理制作而成的。

植株再生能力。以上所采用的大麦材料最常使用的是幼胚、幼穗和幼嫩的花药, 尽管它们在适当条件下它们这些幼嫩组织都能产生胚性愈伤组织^[70, 101, 110, 111, 113], 但是这些幼嫩的组织作为外植体在应用上受到很大的局限性, 即取材受到严格的时间限制, 而来源于种子的成熟胚作为外植体则不受时间和数量的限制, 但是从成熟胚诱导胚性愈伤组织和建立胚性悬浮细胞系及植株再生却是比较困难的^[15, 54, 55, 174]。严华军(1990)^[174]利用舟麦2号的大麦成熟胚来源的愈伤组织建立了均质性良好、有优良分散性的胚性悬浮细胞系RG, 并且从中再生成了白苗植株, 为大麦的原生质体培养和品种改良、基因转移研究提供了良好的实验系统。

在禾本科植物组织培养中, 近年来的另一突出进展就是发现并证明了体细胞胚胎发生途径普遍地存在于禾本科植物的组织培养中^[12, 50, 70, 160, 176-169]。禾本科植物组织培养中的体细胞胚胎发生途径是禾本科植物体外再生植株的一条共同途径^[59, 101], 这一途径的高频诱导有特别重要的意义。第一, 通过体细胞胚胎发生再生植株的效率高、速度快、均质性好, 为快速繁殖、人工种子开发和种质保存提供了有效的手段^[47, 50]; 第二, 胚性悬浮细胞物通过继代培养可以在较长时期内保持胚胎发生和再生植株的能力, 变异和不稳定的因素较少影响这类细胞系^[50, 156], 第三, 一般认为体细胞胚是单细胞起源的,^[148, 188, 169], 由此所再生的植株没有嵌合性, 这有利于优良性状的保存、突变育种和遗传分析。有关体细胞胚胎发生的禾本科植物种类及其影响因素等问题, 请参阅王大元(1988)^[12, 51]、张树录(1985)^[168]及韩碧文等(1988)^[47, 168]的综合文章, 这里不再赘述。

五、结束语

综上所述, 可以看出禾本科植物组织培养研究的进展非常迅速。研究者在总结经验的基础上, 继续使这一领域的理论性研究和应用性研究向更高的层次发展, 并最终达到使禾本科植物组织培养技术应用于作物改良和提高产量和质量的实践中去的目的。在继续加深对模式植物组织培养研究的同时, 需要全力来加强禾本科植物的组织培养研究^[177, 178]。在进行探讨禾本科植物组织培养的最佳条件、影响因素和体细胞胚胎发生等问题的同时, 需要对以下几方面问题给以应有的注意。

1. 由于培养过程中所用培养基中的成分的复杂性, 很少有人进行系统的研究^[22, 54, 56]。但是众多的资料说明培养基在禾本科植物组织培养中的重要地

表6 已建立的胚性细胞悬浮培养的禾本科植物

植物名称	材料来源	培养结果	文献
无芒雀麦草	中胚轴	白化植株	[86, 150]
大麦	幼花序	植株	[70, 105]
	胚轴	愈伤组织	[176]
	幼胚、成熟胚	白化植株	[108]
	成熟胚、幼胚	白化植株	[174]
芦苇	种子	植株	[128]
水稻	幼花序、幼叶、胚芽鞘	植株	[51, 104, 153-155]
甘蔗	幼叶	植株	[157, 160]
紫狼尾草	幼穗	植株	[59, 63]
谷子	幼穗	愈伤组织	[164]
黍	幼穗	植株	[59]
珍珠谷	幼胚、幼穗	植株	[60, 64, 67]
玉米	幼胚、幼穗	植株	[51, 103, 106, 163]
鸭茅	叶	植株	[101, 113]
大黍	幼胚、幼穗	植株	[59, 162]
小麦	成熟胚	植株	[109, 156]
多花黑麦草	幼胚	愈伤组织	[161]
竹叶兰羊茅	幼穗	植株	[163]

位。培养基中的大量元素、微量元素对外植体的生长、分化不仅仅是起到供给无机营养的作用,更大的作用可能是调节作用^[54]。禾本科植物的组织培养很难成功,其原因可能正是由于对禾本科植物外植体在离体培养过程中,所用培养基的大量元素、微量元素的多少及其比例关系了解很少,因此使禾本科植物的培养基大多不能使其外植体得到很好的表达。相信,在今后十年内在禾本科植物组织培养的这一领域内会有新的突破并会吸引更多的学者来从事这一复杂领域的工作。

2. 在禾本科植物的组织培养(花药培养、细胞培养和原生质体培养)过程中,常常在一些重要的经济作物如小麦、水稻等植物中,出现比例较高的白化苗,随着禾本科植物组织培养的不断发展,这一问题会显得更加严重。由于白化苗不能进行光合作用,无法自养,在育种和品种改良上无利用价值。因此是一种很大的浪费。目前只知道白化苗的形成和培养温度有关,温度高白化苗出现的比率就高。另外,白化苗在植物的种间差异也很明显,水稻,小麦大约有5%为白化苗,小黑麦中有的品系高达90%为白化苗,而玉米花粉植株中的白化苗比率却极低。因此,有必要对白化苗的成因进行系统的研究,包括从生理上(在元素含量上、培养基成分上)和热击处理上和遗传上进行的深入探讨。

3. 从现在已经成功地进行的禾本科植物的原生质体培养实例来看,建立胚性的悬浮细胞系固然相当重要,但是建立这些胚性悬浮细胞系的关键却是在于获得“优良”的愈伤组织并由此建立理想的悬浮细胞培养系统。研究者们目前还只能在表观上区别愈伤组织的“优”和“劣”,还没有方便、可靠及可行的方法了解愈伤组织的生理,生化性质从而在更深的层次上区分不同质地和不同发育命运的愈伤组织。尽管在同功酶、DNA和RNA及蛋白质等方面进行了一些工作来帮助了解不同愈伤组织的胚胎发生能力,但是这方面的工作范围还很狭小,需要扩大植物种类以及对大分子的动态变化进行系统的研究,尤为重要是需结合分子生物学的新技术和理论来探讨愈伤组织在不同培养基上的反应以及在其分化状态下的基因表达情况,找出其特异基因的表达标记并为愈伤组织性质判定和外植体标准提供证据,只有这样,我们在诱导、选择、保持“优良”愈伤组织并用其建立胚性悬浮培养物,及至进行后续的原生质体培养时,才会避免盲目性。最近,利用组织培养技术结合分子生物学理论和技术在这一领域已取得了很好的结果^[133,137],看到了可喜的苗头。相信,今后的禾本科植物组织培养研究方面将向这一领域靠近。

总之,植物组织培养不仅作为一项技术,在应用方面取得了很多成果并日益受到各国的重视;而且已经作为一门科学正在进行深入的研究,以探索其自身发展的规律。而作为这门科学,植物组织培养学(Plant tissue culturology)的中心内容的禾本科植物的组织培养正随着它的广泛应用和深入研究以及不断取得进展将会为人类做出更大的贡献。

参 考 文 献

- [1] 谷祝平, 1989: 细胞生物学进展。高等教育出版社, 254—275
- [2] 李向辉, 1988: 植物体细胞遗传与作物改良。北京大学出版社, 218—242
- [3] 王新宇、张举红, 1984: 植物学通报, 2(4): 7—13
- [4] 许仁林, 1988: 生物科学动态, 2: 39—44
- [5] 傅世耀, 1983: 生物科学动态, 3: 46—49

- [6] 高明, 1983: 生物科学动态, 1: 40—48
- [7] 黄明, 吴旻, 1983: 生物科学动态, 1: 1—10
- [8] 卢剑铨, 1988: 生物科学动态, 1: 34—41
- [9] 钱迎情, 1988: 植物遗传操作技术. 科学出版社, 55—86
- [10] 李向辉, 1988: 植物遗传操作技术. 科学出版社, 1—28
- [11] 胡友纪、王世杰, 1985: 生物化学与生物物理进展, 12: 9—12
- [12] 王大元, 1988: 经济植物组织培养. 科学出版社, 73—78
- [13] 罗士韦, 1988: 经济植物组织培养. 科学出版社, 1—9
- [14] 孟征、陈英, 1987: 遗传学报, 14(2): 100—106
- [15] 颜昌敬, 1990: 植物组织培养手册. 上海科学技术出版社, 1—415
- [16] 蔡起贵, 1987: 植物生物技术. 科学出版社, 148—176
- [17] 钱迎情、邹吉涛, 1987: 植物生物技术. 科学出版社, 177—190
- [18] 丁家宜, 1988: 经济植物组织培养实用技术. 江苏科学技术出版社, 1—1.
- [19] 高山林, 1988: 经济植物组织培养实用技术. 江苏科学技术出版社, 98—106
- [20] 陈振光, 1987: 果树组织培养. 上海科学技术出版社, 1—191
- [21] 刘涤, 1984: 2000年的中国植物生理学. 中国植物生理学会编印, 60—65
- [22] 梁海曼, 1978: 花药培养学术讨论会文集. 科学出版社, 50—57
- [23] 薛勇彪, 1988: 生物科学动态, 1: 12—20
- [24] 汪和睦等, 1985: 生物化学与生物物理进展, 3: 52—58
- [25] 黄大年等, 1987: 遗传学报, 14(2): 114—120
- [26] 沈建华, 1983: 生物科学动态, 5: 52—58
- [27] 杨在琨, 1983: 生物科学动态, 5: 71—74
- [28] 谭蓓英, 1983: 生物科学动态, 6: 38—43
- [26] 唐锡华, 1984: 2000年的中国植物生理学. 中国植物生理学会编印, 66—71
- [30] 夏镇澳, 1984: 2000年的中国植物生理学. 中国植物生理学会编印, 54—59
- [31] 崔薇, 1984: 植物学通报, 2(4): 1—6
- [32] 李向辉, 1988: 植物体细胞遗传与作物改良. 北京大学出版社, 243—267
- [33] 李向辉, 1988: 植物遗传操作技术. 科学出版社, 177—196
- [34] 罗士韦等, 1988: 植物遗传操作技术. 科学出版社, 87—104
- [35] 许智宏, 1988: 植物遗传操作技术. 科学出版社, 149—174
- [36] 许智宏, 1984: 2000年的中国植物生理学. 中国植物生理学会编印, 1—6
- [37] 夏镇澳, 1988: 经济植物组织培养. 科学出版社, 52—72
- [38] 黄培培, 1989: 国外作物组织培养, 24: 1—7
- [36] 罗忠训, 1985: 遗传, 7(2): 41—44
- [40] 许智宏, 1985: 遗传, 7(6): 37—40
- [41] 颜昌敬, 1989: 国外作物组织培养, 24: 83—87
- [42] 黄培培, 1990: 国外作物组织培养, 26: 32—37
- [43] 何中虎, 王增裕, 1990: 世界科学, 4: 24—27
- [44] 荣惠, 1990: 世界科学, 6: 32—33
- [45] 邵宏波、初立业, 1990: 世界科学, 4: 27—30
- [46] 邵宏波、初立业, 1989: 生物科学动态, 6: 26—33
- [47] 邵宏波、初立业, 1990: 广西植物, 10(2): 168—174

- [48] 邵宏波、初立业, 1989: 国外作物组织培养, 24: 26—37
- [49] 邵宏波、初立业, 1990: 国外作物组织培养, 26: 62—84
- [50] 邵宏波、初立业, 1989: 生物学杂志, 5: 10—13
- [51] 邵宏波、初立业, 1990: 生物技术通报, 3: 1—5
- [52] 邵宏波、初立业, 1990: 大自然探索, 3: 55—60
- [53] 邵宏波等, 1989: 松辽学刊, 2: 60—63
- [54] 邵宏波, 1990: 杭州大学硕士学位论文, 1—83
- [55] 邵宏波、梁海曼, 植物生理学报, 未发表资料
- [56] 邵宏波、初立业, 1989: 松辽学刊, 4: 58—62
- [57] 邵宏波、初立业, 1990: 松辽学刊, 3: 51—55
- [58] T. D'Achi et al., 1989: *Plant Cell Reports*, 8: 247—250
- [59] I.K. Vasil, 1987: *Plant Physiol.*, 128: 193—218
- [60] Vasil, V. and I.K. vasil, 1981: *Ann. Bot.*, 47: 669—678
- [61] Vas., V. and I.K. Vasil, 1982: *Amer. J. Bot.*, 69: 1441—1449
- [62] Vasil, V. and I.K. Vasil, 1981: *Amer. J. Bot.*, 68: 864—872
- [63] Wang, D. Y. (王大元) and I. K. Vasil, 1982: *Plant Sci. Lett.*, 25: 147—154
- [64] Vasil, V. et al., 1983: *Z. Pflanzphysiol.*, 111: 233—239
- [65] Ling, D. H. (凌定厚) et al., 1983: *Plant Cell Rep.*, 2: 169—171
- [66] Xu, Z. H. (许智宏) et al., 1984: *Plant Call Rep.*, 3: 149—150
- [67] Vasil, V. and I.K. Vasil. 1980: *Theor. Appl. Genet.*, 56: 97—99
- [68] Ceulibaly, M. Y. and Y. Demarly, 1986: *Z. Pflanzzüchtg.*, 96: 79—81
- [69] Larkin, P. J., 1982: *Plant Cell, Tissue and Org. Cult.*, 1: 149—164
- [70] Chu, C. C. (朱至清) et al., 1984: *Theor. Appl. Genet.*, 68: 375—379
- [71] Steward, F. C. et al., 1958: *Amer. J. Bot.*, 54: 705—708
- [72] Potrykus, I. et al., 1977: *Mol. Gen. Genet.*, 156: 347—350
- [73] Jia, J. F. (贾敬芬) and potrykus, L., 1981: *Plant Cell Rep.*, 61: 73—75
- [74] Wei, Z. M. (卫智明) 1982: *Theor. Appl. Genet.*, 61: 101—109
- [75] Ouyang, J. W. (欧阳俊闻) et al., 1983: *ibid*, 66: 71—77
- [76] Li, X. H. (李向辉) et al., 1978: *Proc. of Symp. on Plant. Tissue Culture, Scienc Press (Peking)*, 351—354
- [77] Baba, A. et al., 1986: *Plant Cell Physiol.*, 27: 463—471
- [78] Hull, R. and Davies, J. W., 1983: *Adv. Virus Res.*, 28: 1—33
- [79] Fromm, M. et al., 1985: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 5824—5888
- [80] Uchimiya, H. et al., 1985: *BioTechnolo.*, 3: 1099—1103
- [81] Shillito, R. D. et al., 1986: *Mole. Gen. Genet.*, 202: 189—198
- [82] Werr. W. and Lörz, H. 1986: *Mole. Gen. Genet.*, 202: 368—373
- [83] Ohta, Y., 1986: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 715—719
- [84] Topfer, R. and Steinbiss, H. H., 1985: *Plant Sci.*, 41: 49—54
- [85] Binding, H. and Nehis, R., 1977: *Z. Pflanzenphysiol.*, 85: 279—280
- [86] Kao, K. N. (高国楠) and Michayluk, M. R., 1974: *Planta*, 115: 355—367
- [87] Melchers, G., 1978: *proc. of Symp. on Plant Tissue Culture, Science Press (Peking)*, 279—285

- [88] Huang, B. (黄 斌) and Sunderland, 1982 : *Ann. Bot.*, 49 : 77—88
- [89] Sunderland, N. et al., 1979 : *J. Exp. Bot.*, 30 : 1133—1144
- [90] Cass, D. D. and I. Karas, 1975 : *Can. J. Bot.*, 53 : 1051—1062
- [91] Clapham, D., 1973 : *Z. Pflanzenzüchtg*, 69 : 142—155
- [92] Dale, P. J., 1975 : *Planta*, 127 : 213—220
- [93] Sunderland, N., 1971 : *Science Progress*, 59 : 527—549
- [94] Ku, M. K. (谷明光) et al., 1978 : *Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture*, Science Press (Peking), 35—42
- [95] Chase, S. S., 1969 : *Bot. Rev.*, 35(2) : 117—169
- [96] Hu, Z. (胡 忠) 1983 : *Proc. of Symp. on Somatic Genetics Applied to Cereals*, Science Press (Peking), 291—302
- [97] Chen, Y. (陈 英) and Li, L. T. (李良材) 1978 : *Proc. of Symp. on Plant Tissue Culture*, Science Press (Peking), 199—212
- [98] Schaeffer, G.W. et al., 1979 : *Crop Science*, 19 : 697—702
- [99] Guha, S. et al., 1970 : *Current Science*, 39 (8) : 29—49
- [100] Powell, W., 1988 : *Plant Cell, Tissue and Org. Cult.*, 2 : 291—297
- [101] Jain, S. M. et al., 1988 : *Current Science*, 57(2) : 59—70
- [102] Shillito, R.D. et al., 1989 : *Bio—Technology*, 7 : 581—588
- [103] Perioli, L. M. et al., 1989 : *Bio—Technology*, 7 : 589—594
- [104] Wang, D. Y. (王大元) et al., 1989 : *Plant Cell Rep.*, 8 : 329—332
- [105] Lörz, H. et al., 1988 : *Plant Breed.*, 100 : 1—25
- [106] Rhodes, C. A. et al., 1988 : *Bio—Technology*, 6 : 56—60
- [107] Abe, T. and Futsuhara, Y., 1986 : *Jap. J. Breed.*, 36 : 1—6
- [108] Lärhs, R. and Lörz, H., 1988 : *Planta*, 157 : 71—81
- [109] Maddock, S. E., 1987 : *Plant Cell Rep.*, 6 : 23—26
- [110] Mohanty, B. D. and Ghosh, P. D., 1988 : *Ann. Bot.*, 61 : 541—555
- [111] Rengel, Z. et al., 1986 : *J. Plant. Physiol.*, 124 : 385—392
- [112] Ukai, Y. et al., 1987 : *Jap, J. Breed.*, 37 : 405—411
- [113] Armstrong and Green, C. E., 1985 : *Planta*, 164 : 207—214
- [114] Pierre, P. and Thomas, H. 1989 : *Physiol. Plant*, 77 : 625—632
- [115] Steen, G.P. et al., 1989 : *ibid*, 77 : 427—435
- [116] Joel, I., 1989 : *TIBTECH*, 7 : 295—303
- [117] Schweiger, H. G. et al., 1987 : *Theor. Appl. Genet.*, 73 : 769—783
- [118] Jia, J. F. (贾敬芬) et al., 1983 : *Z. Pflanzenphysiol.*, 122 : 1—6
- [119] Zimmermann, U. and Scheurich, P., 1981 : *Planta*, 151 : 26—32
- [120] Power, J. B. et al., 1970 : *Nature*, 225 : 1016—1018
- [121] Lu, D. Y. (吕德杨) et al., 1982 : *Z. Pflanzenphysiol.*, 107 : 59—63
- [122] Christensen, J. E. and Horner, H. Y., 1974 : *Amer. J. Bot.*, 61 : 604—624
- [123] De Framond, A. J. et al., 1983 : *Biotechnology*, 1 : 262—269
- [124] Stachel, S. E. et al., 1986 : *Mol. Gen. Genet.*, 202 : 179—185
- [125] Crossaway, A. Y. et al., 1986 : *Nature*, 322 : 706—712
- [126] 中国科学院植物研究所主编, 1987 : 中国高等植物科属检索表. 科学出版社, 459—495

- [127] Bodde, T., 1982: *Bioscience*, 32: 675—682
- [128] 吴国良, 叶和春等, 1987: *植物学报*, 29(4): 361—366
- [129] 朱至清, 1988: *经济植物组织培养*. 科学出版社, 29—51
- [130] The International Plant Growth Substances Association and the University of Calgary (Canada), 1988: Abstracts of Papers Presented at The 13th International Conference on Plant Growth Substances, 1—89
- [131] 李金军, 1990: *世界科学*, 6: 34—37
- [132] Comings, D. P. et al., 1976: *Crop Sci.*, 16: 415—470
- [133] Goldberg, R. B. et al., 1989: *Cell*, 56: 149—160
- [134] 胡 含, 1988: *植物体细胞遗传与作物改良*. 北京大学出版社, 1—26
- [135] 谷明光, 1988: *植物体细胞遗传与作物改良*. 北京大学出版社, 102—129
- [136] 侯云德, 1990: *展望九十年代世界高科技发展*. 光明日报, 1月1日
- [137] Chen, Z. L. (陈章良) et al., 1986: *proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 8560—8564
- [138] 陈 英, 1988: *植物体细胞遗传与作物改良*. 北京大学出版社, 68—96
- [139] 陈章良, 1990: *展望九十年代世界高科技发展*. 光明日报, 1月3日
- [140] 吴甲林, 1988: *经济植物组织培养*. 科学出版社, 221—226
- [141] 普吉恕, 1988: *经济植物组织培养*. 科学出版社, 153—159
- [142] 陈少麟, 1988: *植物体细胞遗传与作物改良*. 北京大学出版社, 268—286
- [143] 陈维纶, 1987: *植物生物技术*. 科学出版社, 1—23
- [144] Nishi, J. et al., 1968: *Nature*, 219: 508—509
- [145] Norstog, K., 1970: *Develop. Biol.*, 23: 665—670
- [146] Hu, H. (胡 含) et al., 1981: *Adv. Agron.*, 34: 1—13
- [147] 梁海曼, 1987: *植物生理学通讯*, 3: 1—6
- [148] 奚元令, 1978: *遗传学报*, 5(2): 165—170
- [149] 方国伟, 梁海曼, 1985: *植物生理学报*, 11(4): 366—380
- [150] Kao, K. N. (高国楠) et al., 1973: *Colloques Int. CNRS.*, 212: 207—214
- [151] Koblitz, H., 1976: *Biochem. Physiol. Pfl.*, 170: 287—293
- [152] 侯宽昭, 1984: *中国种子植物科属词典(修订版)*. 科学出版社, 579—582
- [153] Deka, P. C. et al., 1976: *Theor. Appl. Genet.*, 45: 239—243
- [154] Kyojuka, J. et al., 1987: *Mol. Gen. Genet.*, 206: 408—413
- [155] Abdullah, R. et al., 1986: *Bio-Technology*, 4: 1087—1090
- [156] 王海波等, 1989: *中国科学(B辑)*, 8: 828—834
- [157] 颜秋生、李向辉, 1983: *科学通报*, 12: 752—755
- [158] 兰州大学生物系细胞室, 1977: *遗传学报*, 4(3): 242—247
- [159] 颜秋生、李向辉, 1981: *遗传*, 3(4): 20—21
- [160] Srinivasan, C. and Vasil, I. K., 1986: *J. Plant Physiol.*, 126: 41—48
- [161] Jones, M. G. K. and Dale, P. J., 1982: *Z. Pflanzenphysiol.*, 105: 267—274
- [162] Lu, C. Y. (鲁勤义) et al., 1981: *ibid*, 104: 311—318
- [163] Sun, C. S. (孙敬三) et al., 1989: *Plant Cell Rep.*, 8: 313—316
- [164] 杨丽军等, 1986: *实验生物学报*, 19: 497—503
- [165] Brar, D. S. et al., 1989: *Z. Pflanzenphysiol.*, 96: 269—275
- [166] Potrykus, I. et al., 1979: *Theor. Appl. Genet.*, 24: 209—214

- [167] 王大元, 1984: 细胞生物学杂志, 6 (1): 16—20
- [168] 张树录, 1985: 植物生理学通讯, 6 : 15—20
- [169] 韩碧文, 刘淑兰, 1988: 植物生理学通讯, 1 : 9—15
- [170] 孙敬三, 1987: 植物生物技术。科学出版社, 46—62
- [171] 何卓培, 1988: 植物遗传操作技术。科学出版社, 29—54
- [172] 唐 扬, 1988: 经济植物组织培养。科学出版社, 227—235
- [173] 简令成, 1987: 植物生物技术。科学出版社, 191—209
- [174] 严华军, 1990: 杭州大学硕士学位论文, 1—58
- [175] Kott, L. S. and kasha, K. J., 1984: Can. J. Bot., 62: 1245—1249
- [176] Muller, B. et al., 1989: Biochem. Physiol. Pfl., 185: 123—130
- [177] 徐冠仁, 1989: 中国科学院院刊, 3 : 247—248
- [178] 沈允钢, 1989: 中国科学院院刊, 4 : 337—341
- [179] 张自立, 俞新六, 1990: 植物细胞和体细胞遗传学技术与原理。高等教育出版社, 118—302
- [180] Barbara J. Mazur, S. Carl Falco, 1989: Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40: 441—470
- [181] M. K. Smith, R. A. Drew, 1990: Aust. J. Plant Physiol., 17: 267—289

THE RESEARCH AND APPLICATION OF GRAMINACEAE TISSUE CULTURE

Shao, H. B.

(Biology Department, Beijing Universty, Beijing 100871)

Abstract The paper dealt with the situation of cereals tissue culture research, in which the author stressed the importance of carrying on cereals tissue culture, some problems involved in cereals cell culture and protoplast culture and their prospects. The writer gave a detailed description of Graminaceae tissue culture history, analyzed the applied tendencies and prospects about Graminaceae tissue culture basic research and, on author's work basis, pointed out the major factor influencing cereals protoplast culture, establishment of cereals cell suspension culture system. The writer believe that Graminaceae tissue culture will have rapid advancement in the coming ten years. Ten illustrations including six tables and four figures- are involved in the paper.

Key words Graminaceae; Tissue culture; Regulation of gene expression; Micropropagation; Gremplasm conservation; Crop breeding; Somatic hybridization; Gene transfer techniques; Plant genic engineering