

中国科学院遗传研究所植物遗传操作研究室论文集

植物细胞培养 与遗传操作

湖南科学技术出版社

中国科学院遗传研究所植物遗传操作研究室论文集

植物细胞培养 与遗传操作

陈 英 李向辉 孙勇如主编

湖南科学技术出版社

湘新登字 004 号

植物细胞培养与遗传操作

李向辉 陈英 孙勇如主编

责任编辑：沙一飞

湖南科学技术出版社出版发行

(长沙市展览馆路3号)

湖南省新华书店经销 湖南省新华印刷二厂印刷

*

1992年10月第1版第1次印刷

开本：850×1168毫米 1/32 印张：15 插页：4 字数：394,000

印数：1—3,100

ISBN 7 5357 1027 1

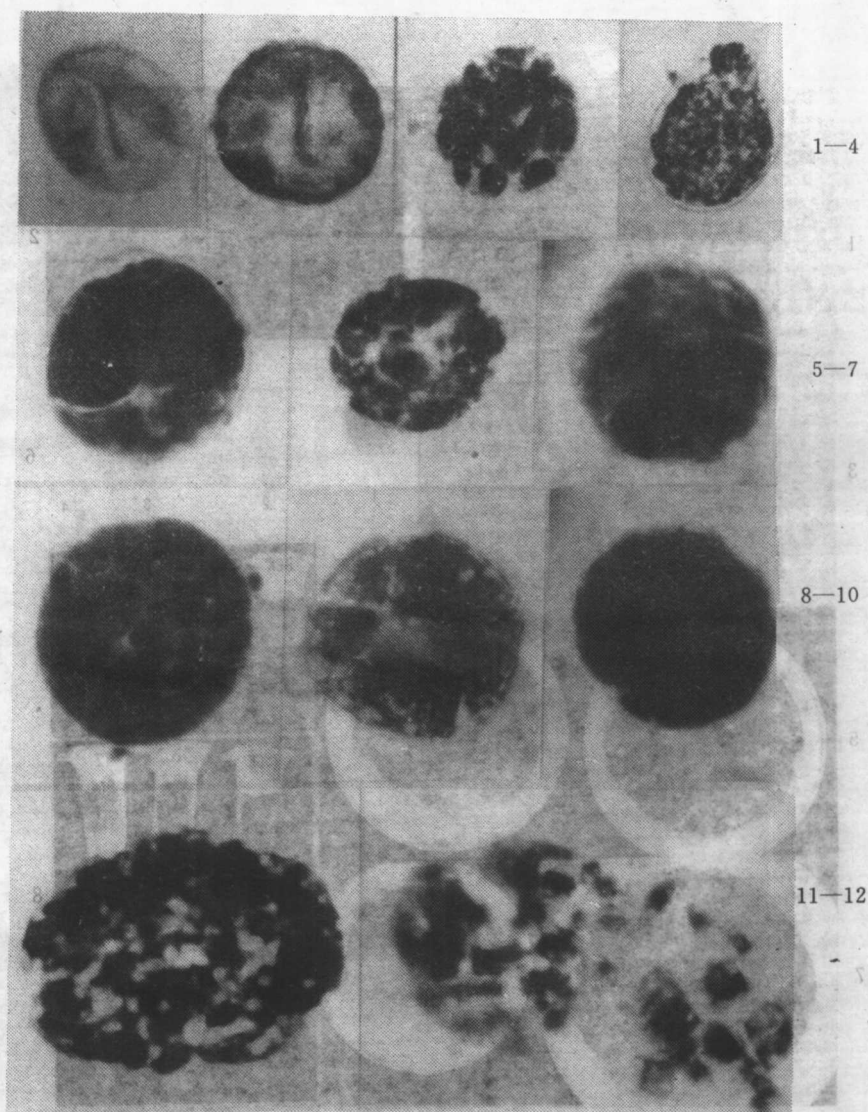
Q·26 定价：10.25元

地科 101—021

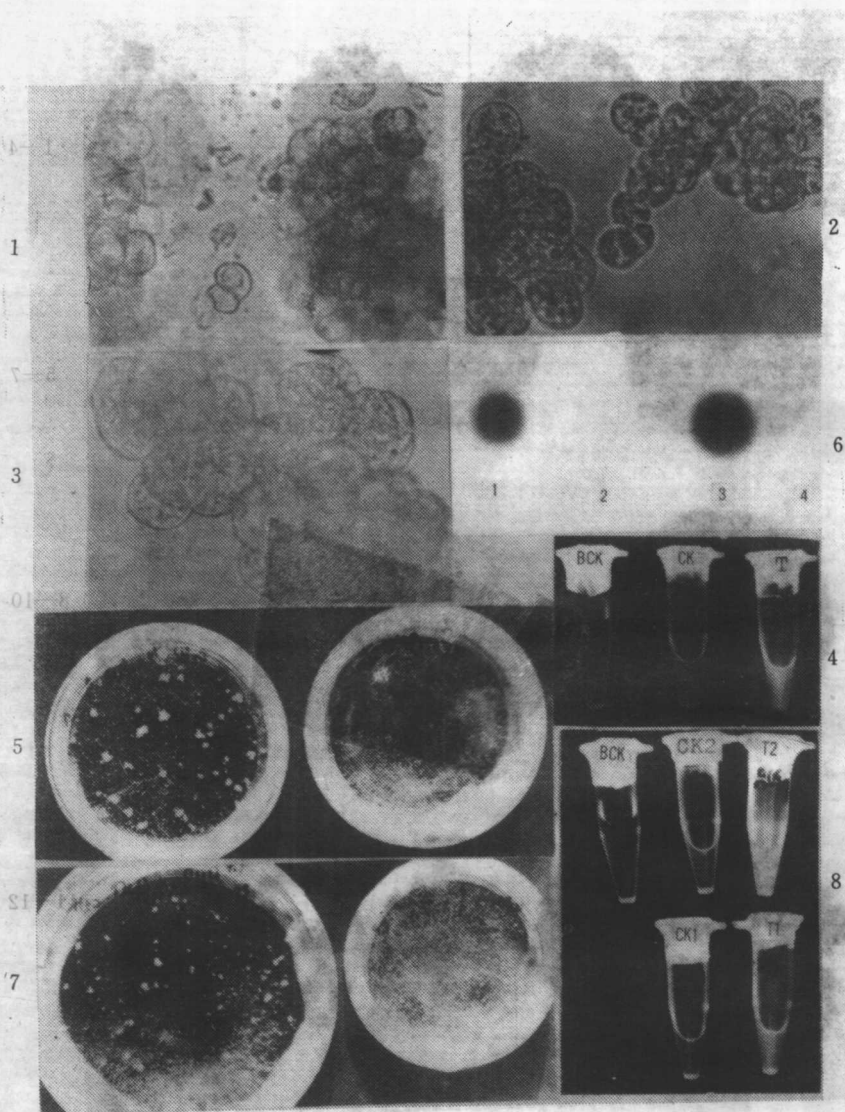
前 言

本书收集了中国科学院遗传所植物遗传操作研究室(六室)的57篇论文。内容包括水稻花药培养、植物原生质体培养、植物遗传转化及体细胞杂交四个方面,概括地反映了该研究室的工作基础、主要成绩及发展方向。水稻花药培养与植物原生质体培养分别是构成该室的两个实验室的工作基础,多年来在这两个方面做了大量的工作,取得了不小的进展,并在某种程度上反映了国内外培养研究的动向与水平。尤其在原生质体培养方面,已将矮牵牛、烟草、黄瓜、芥菜型油菜、油菜、百脉根、壮丽莲掌、洋地黄、哈密瓜、马铃薯、粳稻、籼稻、小麦、玉米等17种植物的原生质体再生完整植株,积累了丰富的经验,为植物遗传操作打下了牢固的基础。该研究室正是在培养研究的基础上,开展了遗传转化与体细胞杂交的研究,承担了国家高技术及攻关的有关课题,成为该研究室当今研究的主要内容与发展方向。不言而喻,培养研究仍是细胞水平上进行遗传操作的基础,不断地改进培养的技术与方法,仍是今后取得更大成绩的重要基础。培养研究与遗传操作,两者相辅相成,互相促进,这就是本研究室今后发展的初步设想。

中国科学院遗传所
遗传操作研究室



■ 图版 I



I 图版 I

目 录

水稻花药培养研究 20 年	(1)
水稻花粉植株的诱导条件及其遗传学表现的研究	(8)
应用花粉培养育成水稻花育 1 号、2 号	(23)
水稻花粉植株的遗传学研究	(32)
水稻花粉植株后代分离的观察	(43)
梗稻花药培养马铃薯简化培养基的研究	(50)
应用正交试验法筛选籼梗稻杂种花药培养基	(60)
水稻游离花粉粒培养诱导形成植株的研究	(72)
水稻游离花粉培养诱导形成绿色植株及有关 作用因素的研究	(85)
Ficoll 密度梯度离心在水稻游离花粉 培养中的应用	(94)
水稻花药液体培养下影响愈伤组织诱导和分化的 一些因素的研究	(98)
低温预处理提高水稻花粉愈伤组织诱导频率 的作用	(108)
水稻雄核发育途径及游离花粉粒培养的活体观察	(118)
梗稻花药培养基基因型差异的研究	(128)
影响籼稻花药培养诱导率的因素及基因型 的作用的研究	(137)
籼稻雄核发育与低温预处理及 pH 值对其的影响	(147)
通过花药培养筛选水稻耐镉突变体	(158)
抗 S- (2-氨基乙基) L-半胱氨酸 (AEC) 水稻突变体的筛选	(168)
植物原生质体培养进展	(178)

矮牵牛原生质体的植株再生·····	(185)
培养基对烟草叶肉原生质体再生细胞的分裂及 植株再生的影响·····	(191)
豇豆叶肉原生质体的形态发生研究·····	(202)
枸杞的原生质体生成愈伤组织·····	(205)
甘蔗原生质体的分离、培养与愈伤组织的形成·····	(209)
黄瓜子叶原生质体苗的再生·····	(214)
芥菜型油菜原生质体再生成植株的研究·····	(218)
豆科牧草百脉根原生质体和外植体植株的再生·····	(225)
水稻原生质体的植株再生·····	(229)
多变小冠花(豆科牧草)原生质体和外植体胚状体 的形成和植株的再生·····	(234)
水稻原生质体培养及植株再生的研究·····	(239)
籼稻原生质体高频分裂及植株再生·····	(250)
小麦原生质体培养——高频率的细胞团形成 和植株再生·····	(254)
马铃薯无菌苗叶肉原生质体再生植株·····	(264)
提高小麦原生质体再生植株频率的研究·····	(273)
水稻原生质体的高密度培养与植株再生·····	(279)
Plant Regeneration from Seedling Cotyledon Protoplasts ·····	(283)
Somatic Embryogenesis from Mesophyll Protoplasts of <i>Trigonella corniculata</i> (Leguminosae) ·····	(292)
Somatic Embryogenesis in Quite a Direct Way in Cul- tures of Mesophyll Protoplasts of <i>Brassica napus</i> L ·····	(302)
Isolation and Sustained Division of Protoplasts from Cotyledons of Seedlings and Immature Seeds of <i>Glycine max</i> L. ·····	(309)
Plant Regeneration from Protoplasts of the Mon-	

ocotyledonous <i>Haworthia magnifica</i> v. Poelln.	(319)
Culture of Maize Protoplast from Suspension Cells and Plantlet Regeneration	(328)
Plant Regeneration from Cotyledon Protoplasts of Xinjiang muskmelon	(332)
Plant Regeneration from an Embryogenic Cell Suspension Culture of Napiergrass (<i>Pennisetum</i> <i>purpureum</i> Schum.)	(341)
植物体细胞杂交的进展	(347)
烟瘤 B ₆ S ₃ 细胞和矮牵牛 W ₄₃ 属间体细胞杂种 植株再生及 LpDH 的表达	(355)
粉蓝烟草与矮牵牛的属间体细胞杂种植株的再生.....	(365)
对粉蓝烟草与矮牵牛体细胞杂种植株 的进一步观察.....	(371)
LpDH 活性作为一种遗传标记在体细胞融合中 的转移.....	(375)
Observation of Somatic Hybrid Progeny between Tobacco and Petunia	(380)
植物细胞遗传转化技术进展	(382)
紫花苜蓿原生质体胚状体的形成及原生质体再生 细胞转化的研究.....	(387)
人 α -干扰素 cDNA 在转化的烟草植株中表达	(380)
Ti 质粒 pGV2206 基因文库的建立及含有 2.020kbT-DNA 片段克隆的筛选	(400)
氮杂胞嘧啶对原生质体转化频率及外源基因 表达的影响.....	(405)
外源基因在水稻愈伤组织中的稳定表达.....	(418)
百脉根转化植株再生的研究.....	(426)
紫花苜蓿原生质体转基因植株再生.....	(430)

甜菜外植体转化植株再生的研究.....	(436)
外源基因转化水稻原生质体的研究.....	(440)
Expression of Brome Mosaic Virus in <i>Triticum mon-</i> <i>coccum</i> Protoplasts and Partially Digested Cells Following Electroporation with BMV-RNA	(449)
Transient Expression of β -Glucuronidase Gene in Pro- toplasts of <i>wheat</i>	(457)

PLANT CELL CULTURE AND GENETIC MANIPULATION.

CONTENTS

Anther culture of rice in twenty Years.	(1)
Investigation on the induction and genetic expression of rice pollen plants.	(8)
New rice varieties “ hua yǔ 1 ” and “ hua yǔ 2 ” developed from anther culture.	(23)
Genetic studies on pollen plants in rice (<i>Oryza sativa</i> L)	(32)
Observation on genetic separation of rice pollen progenies	(43)
Study on simplified potato-medium for pollen culture of keng rice.	(50)
Screening of culture medium for rice anthers with reciprocal cross test.	(60)
Studies on pollen culture in vitro and induction of plantlets in <i>Oryza sativa</i> subsp. keng.	(72)
Green plants regenerated from isolated rice pollen grains in vitro and the induction factors.	(85)
Application of Ficoll density gradient centrifugation in isolated pollen culture of rice.	(94)
The factors affecting induction and differentiation of callus in rice anther float culture.	(98)

A preliminary research on the function of enhancement of callus induction frequency by cold pretreatment in rice anther culture.	(108)
Pathways of androgenesis and observations on cultured pollen grains in rice (<i>Oryza sativa</i> rice (<i>Oryza sativa</i> subsp keng)	(118)
A study on the genotypical differences in anther culture of keng rice.	(128)
Influence of some factors on induction frequency and effect of genotype in anther culture of <i>Oryza sativa</i> subsp indica.	(137)
Research on the androgenesis of indica rice and its response to cold pretreatment and pH changes in induction medium.	(147)
Selection of cadmium tolerant mutants from rice anther culture.	(158)
screening of rice mutant resistant to amino acid analoges . I Screening of a rice mutant resistant to S-(2-aminoethyle) L-cysteine.	(168)
Advances in plant protoplast culture.	(178)
Regeneration of plantlets from isolated protoplasts in petunia hybrida L.	(185)
Influence of medium on the division of cells regenerated from protoplast of tobacco and regeneration of plant	(191)
Investigations of leaf protoplast culture of <i>Vigna sinensis</i>	(202)
Callus formation from protoplasts of chinese wolfberry (<i>Lycium chinese</i>).	(205)
Isolation and culture of sugarcane protoplasts and callus	

formation	(209)
Regeneration of shoots from seedling cotyledons protoplasts of <i>Cucumis sativus</i> (cucumber).	(214)
Studies on plant regeneration from protoplasts of <i>Brassica juncea</i>	(218)
Plant regeneration from seedling protoplasts and explants of <i>Lotus corniculatus</i> (forage legume).	(225)
Plant regeneration from protoplasts of rice (<i>ryza sativa</i> L)	(229)
Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts and explants of seedlings of crownvetch (forage legume).	(234)
Studies on protoplast culture of rice (<i>Oryza sativa</i> L) , and plant regeneration from protop last-derived calli	(239)
High frequency division of indica rice protoplasts and plant regeneration	(250)
Culture of wheat protoplast - high frequency microcolony formation and plant regeneration.	(254)
Plant regeneration of mesophyll protoplasts from potato (<i>Solanum tuberosum</i> L)	(264)
Enhancement of the frequency of regenerated plants from protoplasts of wheat (<i>triticum aestivum</i> L).	(273)
High density culture of rice protoplasts and plant regeneration.	(279)
Plant regeneration from seedling cotyledon protoplasts	(283)
Somatic embryogenesis from mesophyll protoplasts of <i>Trigonella corniculata</i> (leguminosae).	(292)
Somatic embryogenesis in quite a direct way in cultures of mesophyll protoplasts of <i>Brass ica napus</i> L	(302)

Isolation and sustained division of protoplasts from cotyledons of seedlings and immature seeds of <i>Glycine max</i> L.	(309)
Plant regeneration from protoplasts of the monocotyledonous <i>Haworthiamagnifica</i> v Poelln.	(319)
Culture of maize protoplast from suspension cells and plantlet regeneration.	(328)
Plant regeneration from cotyledon protoplasts of xijiang muskmelon.	(332)
Plant regeneration from an embryogenic cell suspension culture of Napiergrass (<i>pennisetum purpureum</i> Scuhum).	(341)

Recent progress in plant somatic hybridization.

The somatic hybrid plants from intergeneric fusion between tobacco tumor B ₆ S ₃ and <i>Petunia hybrida</i> w ₄₃ and expression of LpDH.	(355)
Regeneration of somatic hybrid plants between <i>Nicotiana glauca</i> and <i>Petunia hybrida</i>	(365)
Further obsevation of somatic hybrid plant between <i>Nicotiain glauce</i> and <i>petunic hybrida</i>	(371)
Transfer of LpDH activity as marker in somatic hybrid plant between tobacco tumor B ₆ S ₃ and normal tobacco Xanthi.	(375)
Ohservation of somatic hybrid progeny between tobacco and petunia.	(380)

Advances in gene transfer techniques of plant cell

Studies on embryogenesis from protoplasts and on	
--	--

transformation for protoplast-derived cells of alfalfa.	(387)
Expression of human interferon - α cDNA in transformed tobacco plant.	(380)
The establishment of Ti - plasmid pGV 2 2 0 6 gene library and selection of clone containing 2 . 0 2 0 kb T - DAN fragment.	(400)
Effect of 5 ' - azacytydine on transformation frequency of protoplasts and expression of foreign gene.	(405)
The stable expression of foreign gene in callus of transgenic plant.	(418)
Study on transgenic plant regeneration of <i>Lotus corniculatus</i>	(426)
Regeneration of transgenic plants from protoplasts of alfalfa (<i>Medica go sativa</i> L).	(430)
Studies on regeneration of transgenic plants from sugar beet explants.	(436)
Study of introducing foreign genes into protoplasts of rice	(440)
Expression of Brome mosaic Virus in <i>triticum monococcum</i> protoplasts and partially digested cells following electroporation with BMV-RNA.	(449)
Transient expression of β -glucuronidase gene in protoplasts of <i>wheat</i>	(457)

水稻花药培养研究20年

陈 英

1968年,新关和大野首先应用花药培养的方法,从一个非常重要的粮食作物——水稻的小孢子(花粉)获得再生的单倍体植株^[25],至今已经20余年了。我国开始进行这一研究也超过20年。20年来,许多科学家基本上在努力解决两大问题:1. 究明花药(花粉)培养得以再生为完整植株的条件和机理,及所获再生植株的遗传表现,以建立有效的花药培养技术;2. 探索和开拓在水稻品种改良与遗传学研究中如何应用这一技术。这项研究不论在我国,或国际上,都曾是热闹一时,又冷落一时,起起伏伏。但始终总有一批科学家(我国的、日本的、印度的,等等)在勤奋地工作着。长时期来存在的一个主要问题是绿苗产量不高。近年来,由于研究不断深入,对于培养基成分和培养方法的不断改进,梗稻花药培养的绿苗产量已有大幅度提高。少数材料接种100个花药生产的绿苗数可超过100个^[1]。我国几个著名的花培育种实验室,平均绿苗产量已达到8—10个^[2,3],每年可培养出数以万计的花粉植株。这一进步使花培育种出现了勃勃生机,并拓宽了它的应用范围。

20年来的研究成果是多方面的,这里仅对这一技术的发展和应用有较重要意义的几个方面作一简要的回顾和讨论。

一、培养基的研究

70年代,一些科学家根据梗稻、籼稻及籼梗杂种花药培养对培养基成分,特别是对 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比的不同要求,分别研制出 N_6 、合5与 SK_3 培养基^[4-6],经实践考验,证明它们都有较好的作用。

其中特别是 N_6 培养基已在国际上被广泛应用。80年代以来,许多研究者对这些培养基的成份做了进一步改进。如杨学荣等研制的通用培养基^[7],不仅对水稻花药培养有较好的适应性,也被证明对水稻细胞悬浮培养和原生质体培养也有较好作用。 N_6 培养基的有机成分代之以 B_5 培养基的有机成分,并加上 Cu 、 Co 、 Mo 三种成分,与原培养基比,明显提高了培养效果^[8]。最近倪丕冲等用变量分析方法,对影响梗稻花药培养的各种培养基成份做了广泛的研究,所获的最佳组合,可使中花9号与11号花药培养的绿苗生产率达到57.2%与31.5%^[9]。陈英等对影响籼稻花药培养的5种培养基成分用正交法进行筛选,其中最佳组合可将供试的5个籼稻品种的绿苗产量提高3—4倍^[10]。可以看到,关于水稻花药培养的基本培养基还需进一步研究。

培养基的碳源,长时期来人们都主要采用蔗糖。近年来 Steven 等^[26]与 Hunter 等^[27]分别在苜蓿与大麦的细胞和花药培养上用麦芽糖代替蔗糖,极大地提高了它们的胚胎和绿苗生产率。我们在籼稻花药培养中,用麦芽糖部分或全部代替蔗糖,发现3%蔗糖加3%麦芽糖较6%蔗糖显著提高了绿苗分化率和绿苗产量^[41];6%的麦芽糖对两个供试材料的绿苗产量提高了一倍以上(未发表)。

关于培养基的 pH 值,人们一般都调为5.8,最近我们在籼稻花药中,试将 pH 调到6.3—6.8,发现为 pH6.3时,愈伤组织绿苗分化率较 pH5.8有大幅度提高,从而将绿苗产量提高一倍至几倍^[12]。

近年来许多研究者发现,脯氨酸对于很多植物的细胞和花药培养有提高愈伤组织诱导率和增加再生植株潜力的作用。脯氨酸的这一作用在梗稻^[28]和籼稻^[11]中都得到证实。植物的许多天然有机成分对水稻花药培养是非常有益的附加成分,这些早在70年代就已有研究。我们发现马铃薯提取液不仅可以大幅度提高梗稻^[13]和籼稻^[11]愈伤组织绿苗分化率,而且对水稻花药漂浮培养、游离花粉粒培养都有突出的作用^[14,15]。最近张承妹等报道了