

摘 要

苧麻起源于我国，是一种多年生韧皮纤维作物，其异花授粉特性导致目前生产上应用的品种和其他育种材料都是杂合体，遗传背景非常复杂。育种周期太长是目前苧麻育种实践中的一大难题。国外对苧麻组织培养技术研究的报道较少，国内起步明显较晚。本文从以下几个方面对不同基因型苧麻的器官培养和微繁殖技术进行研究：

1. 生长调节物质对苧麻愈伤诱导及分化的影响研究；

（用三种细胞分裂素和四种生长素类生长调节物质进行单因素、双因素诱导试验，结果表明苧麻的脱分化容易，内源激素含量较高，种类较齐全。单加 2, 4-D 和 6-BA 均能较快地启动苧麻下胚轴、子叶、叶、茎外植体的脱分化。6-BA 与 2, 4-D、IBA、IAA、NAA 组合使用诱导愈伤效果均较好，生长势强；ZT 和 IBA、2, 4-D 组合、KT 与 2, 4-D 和 NAA 组合均有好的诱导效果。细胞分裂素类作用浓度范围 2.0—2.5mg/L，生长素类作用浓度范围 0.2—1.0mg/L，对诱导苧麻愈伤发生及增殖有较好的效应；CTK/AUX 配比大于 1 有利于愈伤诱导，愈伤出根率较低。三种细胞分裂素对苧麻诱导效应研究表明 6-BA 是最有利于苧麻脱分化的细胞分裂素类物质。6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L 和 6-BA 1.0 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L 培养基中分化率较高，均为 15% 以上。而在 ZT、KT 为细胞分裂素的培养基中均不能使愈伤分化。在分化培养基中加入 AgNO₃ 和 AC 能提高愈伤分化率，促进愈伤颗粒化，加入 CM、LH 能加速愈伤增殖，使愈伤色浅，生命力强；但加入 TJ 和 YE 不能使愈伤分化，而且 YE 对苧麻愈伤生长有副作用。）

2. 基本培养基对苧麻不同外植体愈伤诱导及分化的效应；

（研究了七种基本培养基对苧麻不同外植体愈伤诱导及分化的效应，结果表明，MS、MSB、LS、B₅、N₆ 五种基本培养基对苧麻愈伤诱导效果均较好，出愈率几乎全为 100%，愈伤量也较大。Nitsch 和 White 培养基作用效果差。不同外植体间对基本培养基反应不一致。下胚轴脱分化要求较高有机成分。子叶是最易脱分化和分化的外植体。叶对培养基中有机成分要求不高。茎外植体对培养基营养要求成份齐全，而有机成分较高有利于茎成苗。对苧麻而言，较高总 N、P、K 含量对苧麻的脱分化和分化是至关重要的，Cu、Mo、Co 等微量成份并不是必需的。并非有机成份越齐全越有利于脱分化和这种高有机成分培养基来源的愈伤其后的分化。）

3. 光照条件、温度条件及两种碳源对苎麻愈伤生长及分化的影响；

〔方差分析表明，用葡萄糖作碳源比用蔗糖更有利于苎麻愈伤生长；12h 光照/12h 黑暗最有利于苎麻愈伤的生长，其次是全光照条件，黑暗条件下愈伤生长最慢。用葡萄糖作碳源时，愈伤生长量在 30℃、28℃、25℃ 条件下均极显著大于 23℃ 条件下；蔗糖作碳源时，在 25—28℃ 的温度范围内有利于愈伤组织的增殖，而过高或者过低都是不利的。光照处理对分化是有利的，而相对较高温条件虽然能比较好的促进愈伤增殖，但这种来源的愈伤组织分化再生不如相对较低的温度条件下生长的愈伤。〕

4. 基因型对苎麻愈伤诱导及分化的影响

〔十一种基因型的愈伤诱导效应间存在差异。总体上看黄壳早和湘苎 2 号、华苎 3 号、巴西麻 6 号基因型较易脱分化，2004-1 品系的脱分化难，所有基因型在 6-BA0.5-2.5mg/L+NAA0.5mg/L 和 6-BA0.5-2.5 mg/L+2, 4-D0.5 mg/L 的组合中，均有较高的出愈率。此两种组合是苎麻叶愈伤诱导的适用性最广的配方组合。〕

5. 苎麻快速繁殖技术研究。

〔苎麻试管苗容易得到，只要将带分枝的茎节接种在添加 6-BA1.0mg/L 的 MS 培养基中就能长出大量丛生苗，转接后可以迅速得到大量试管苗。最理想的长苗生根培养基是 1/2 MS+NAA0.1mg/L、B₅+0。水培生根法 15d 后长出大量长的白根，而且由于插入水中，幼苗叶不会萎缩。5 叶以上，茎粗 2mm 左右的移栽苗的成活率高。室内炼苗 8d 以上成活率更高。15d 左右即可安全移入大田。〕

关键词：苎麻；器官培养；激素；培养基；培养条件；基因型；微繁

Organ Culture in Genotypes of Ramie and Study on Its Micro-propagation Technology

Wang Xiaoling

(Huazhong Agricultural University, Wuhan)

Abstract

Known as China grass, Ramie is indigenous to China. It is a cross pollination plant. At present, all varieties and breeding materials are hybrid with complex genetic variation. In Ramie breeding work it is difficult to get a strain within a shorter period. Studies on Ramie tissue culture reported little in the world. This article studied on Ramie organ culture and micropropagating technique. The main results are as follows:

1. Study on effects of different hormone combinations on the induction and differentiation of callus from Ramie.

Used three CTK and four AUX as growth regulators in single-factor and double-factor test, the result showed that induction of callus is easy for Ramie for having higher concentration and kinds of endogenous hormone. MS medium supplemented with 2,4-D or 6-BA alone can effectively induce de-differentiation from cotyledons, hypocotyls, leaves and stem of Ramie. Combinations of 6-BA plus an auxin (IAA, IBA, 2,4-D, NAA) and combinations of ZT+2,4-D, ZT+IBA, KT+2,4-D and KT+NAA are all effective on callus induction from Ramie. The suitable concentration for CTK and AUX are respectively 2.0 - 2.5mg/L and 0.2 - 1.0mg/L, and the ratio of cytokinin to auxin is more than one. Study on effects of three cytokinins on the de-differentiation from Ramie indicated that 6-BA is the optimum cytokinin to induce callus from explant of Ramie. Callus can differentiate with a ratio of 15% over on medium added combinations of 6-BA 1.0mg/L + NAA 0.1mg/L + GA₃ 0.5mg/L or 6-BA 1.0mg/L + GA₃ 0.5mg/L. Added AgNO₃ and AC to medium can increase ratio of regeneration, promote callus granulated. Added organic extracts such as CM and LH to culture medium can promote growth, light color and prolong lifetime of callus; however, TJ and YE showed deleterious effects.

2. Study of effects on induction and differentiation of different basic mediums from different explants of Ramie.

Seven basic mediums were studied on their effects on induction and differentiation from Ramie explants. Results showed that MS, MSB, LS, B₅, N₆ have better effects on induction of callus with ratio of almost 100% and rapid growing trendence. Nitsch and White medium showed lowest effects on callus induction. Different type of explant showed different response to seven basic mediums. Higher level vitamins are required in

de-differentiation of hypocotyls; cotyledon is the explant easiest to de-differentiate; leaves have no serious require on vitamins concentration; however stem require more kinds of and higher concentration vitamins for its callus regeneration. Higher level macronutrients ion concentration of N,P,K is important but micronutrients Cu、 Mo、 Co is not essential constituents to induce and differentiate from Ramie. Mediums with more kinds of and more quantity of vitamins are not always produce more callus and are not always beneficial to differentiation of callus come from these mediums.

3. Study of effects on callus induction and differentiation of different light time, temperature and type of carbohydrate source from Ramie.

The results of variance analysis indicated that culture media of glucose as carbohydrate source is superior to of sucrose in induction callus; 12h light/12h darkness treatment benefit to callus growth and all-light superior to all-darkness treatment. Inducing callus with culture media of glucose as carbohydrate source at 30℃、 28℃、 25℃ and 23℃ conditions, callus production significantly decrease with temperature lowdown; however inducing callus with culture media of sucrose as carbohydrate source at 30℃、 28℃、 25℃ and 23℃ conditions, callus production increase within temperature range of 25 – 28℃ and decrease at a range of over 30℃ temperature or down to 23℃. Under light and at lower temperature condition callus are easier to differentiate.

4. Study of effects on callus induction and differentiation of genotype.

Eleven genotypes are studied on their effects on callus induction and differentiation from Ramie. The results showed that genotype can affect callus induction and differentiation. Genotypes of *Huangkezao*, *Xiangzhu2*, *Huazhu3*, *Baxima6* can easily to de-differentiate and *2004-1* is difficulty to. Medium added combinations of BA0.5-2.5mg/L + NAA0.5mg/L and BA0.5-2.5 mg/L+2, 4-D0.5 mg/L are suitable to all Ramie genotypes for their de-differentiation.

5. Study of micro-propagation technique system of Ramie.

Ramie seedlings *in vitro* are easy to get. Stem node transferred onto MS+BA1.0mg/L medium can produce lots of clump-shoot, which can be transferred to 1/2 MS + NAA0.1mg/L or B₅ +0 medium to be cultivated to middle or big seedling with roots. Water-culture-rooting method(WCR) is a ideal way for rooting, which inhibit leaves wilting and can improve the survival ratio of transferred seedlings. Seedlings with 5 leaves and 2mm± stem diameter are suitable to be transferred out of test-tube, and should be placed into room at least 8 days before move to shady shed. After 15d in the shady shed seedlings can be placed to field safely.

Key Words: Ramie; organ culture; hormone; medium; culture condition; genotype; micro-propagation

目 录

·┆┆┆ 文摘

·┆┆┆ 英文文摘

·┆┆┆ 前 言

·┆┆┆┆┆┆ 1 本研究的目的是与意义

·┆┆┆┆┆┆ 2 前人研究基础

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 2.1 影响愈伤组织的诱导、增殖及形态建成的因素

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 2.2 苧麻组织培养研究进展

·┆┆┆┆┆┆ 材料与amp;方法

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 1 生长调节物质对苧麻愈伤诱导及分化的影响

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 2 基本培养基对苧麻不同外植体愈伤诱导及分化效应

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 3 光温条件及碳源对苧麻愈伤生长及分化效应

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 4 基因型对苧麻愈伤诱导及分化影响

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 5 苧麻快速繁殖技术

·┆┆┆┆┆┆ 结果与分析

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 1 生长调节物质对苧麻愈伤诱导及分化的影响

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 1.1 单一生长调节物质对苧麻愈伤诱导效应

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 1.2 两种外源生长调节物质对苧麻外植体诱导的效应

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 1.3 苧麻愈伤的分化

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 2 基本培养基对苧麻不同外植体愈伤诱导及分化的研究

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 2.1 不同基本培养基对苧麻外植体愈伤的诱导效应

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 2.2 不同基本培养基来源愈伤的分化

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 2.3 七种基本培养基部分离子浓度及有机成分比较

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 3 光温条件及碳源对苧麻愈伤生长及分化的影响

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 3.1 不同处理出愈率及愈伤状况

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 3.2 不同来源愈伤组织的分化

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 4 基因型对苧麻愈伤组织诱导及分化的影响

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 5 苧麻组培快繁技术研究

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 5.1 叶面生芽

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 5.2 试管苗移栽成活技术

·┆┆┆┆┆┆ 讨 论

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 1 关于苧麻脱分化

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 2 苧麻愈伤组织分化及分化途径

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 3 激素的作用机理

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 4 温光条件影响苧麻愈伤生长的机理

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 5 关于基因型间诱导差异

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 6 关于材料的一致性

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 7 关于苧麻试管苗玻璃化

·┆┆┆┆┆┆┆┆┆ 8 苧麻试管苗的变异

·┆┆┆┆┆┆ 结 论

·┆┆┆┆┆┆ 参考文献

·┆┆┆┆┆┆ 图版说明

- 图版 I
- 图版 II
- 附录
- 致谢

前 言

1 本研究的目的与意义

苧麻起源于中国,又名“中国草”,在我国有悠久的栽培和加工历史。苧麻纤维品质优良,所以在纺织上有重要地位,在工业上有广阔的应用前景。苧麻业是我国具有民族特色的传统产业,属于劳动密集型行业,发展苧麻有利于我国富余的劳动力资源的配置。建国后我国苧麻产业几经回落,一直处于不稳定的动态发展之中。近年苧麻原麻及产品出口创汇有所上升,1998-2000年三年间创汇10亿美元(熊和平,2001)。目前西部大开发战略的实施和农业产业结构调整给苧麻产业发展带来良好机遇。我国已经加入WTO,专家预测,“入世”后近期给粮食业带来颇为严重的压力(丁声俊,2002),而中国的纺织业将迎来新的发展契机,这更极大地刺激了苧麻产业的发展,苧麻的种植面积正在不断扩大,生产上迫切需要优良的苧麻品种和利用快速繁殖技术迅速扩大优良品种种植面积。

苧麻是多年生宿根型作物,目前生产上应用的品种和其他育种材料都是杂合体,遗传背景非常复杂(李宗道,1989)。实践证明,如采用两个杂合体苧麻亲本进行杂交,要从杂种后代中培育出一个可在生产上推广应用的品种往往需要数年甚至数十年时间;如试图将某一苧麻品种连续自交以获得纯系,则往往随着自交代数的增加,自交后代的生长势明显衰退,或者高度不育,甚至某些基因型的自交后代不能正常地在自然条件下完成生活史周期。育种周期太长是目前苧麻育种实践中的一大难题。在繁殖方法上存在由于扩繁时人为混杂或用种子繁殖造成品种混杂,降低原麻品质的问题。要解决这一问题,实行良种区域化是一项十分关键的措施(李宗道,1992)。目前生产上采用分蔸繁殖、脚麻繁殖、压条繁殖、细切种根、嫩梢扦插等方法,这些方法繁殖系数低,且易带病虫。近年来世界上新选育出来的优良苧麻品种不多,由于繁殖技术不高,使得本来就少的苧麻良种难以迅速规模种植。现在生产上种植面积较大的地方品种,大都是一、二百年前农民选育出来的,甚至还有两千年以上的老品种流传至今(李宗道,1992)。可见,无论是苧麻的育种手段还是繁殖方法上都与当前生产实际需求不协调。

生物技术的不断发展,给育种和良种繁殖提供有力的技术支撑,也给苧麻常规育种和快繁展示了美好的前景。将苧麻花药或未授粉子房进行离体培养,可获得单倍体植株,染色体加倍即可获得各种各样的二倍体纯系,克服目前苧麻种子繁殖中普遍存在的性状分离问题,也为杂种优势利用提供物质基础。幼胚培养可克服苧麻属中各种间的杂交完全不孕的现象,也是优良杂种F1代大量繁殖的一条途径。器官培养产生体细胞无性系变异为苧麻育种提供大量有价值的遗传变异资源。

本课题用新培育成的苧麻优良品种湘苧系列、华苧系列、巴西麻等不同基因型

为材料, 进行器官培养, 寻找最佳培养条件, 建立苧麻优良品种的组培技术体系, 为进一步筛选体细胞无性系变异、进行原生质体培养、体细胞杂交等提供理论和技术基础; 同时以良种苧麻为材料, 研究组培快速扩繁体系, 为生产上迅速扩繁优良苧麻品种提供快繁技术, 满足目前生产上实行苧麻良种区域化种植的需求。

2 前人研究基础

2.1 影响愈伤组织的诱导、增殖及形态建成的因素

愈伤组织的诱导、增殖及形态建成主要受基因型、外植体类型、培养基和培养条件等因素的调控。植物离体培养要获得较高的再生频率, 必须优化培养程序, 协调好各因素间关系。

2.1.1 基因型的影响

基因型在组织培养中的作用主要表现为对外源激素的反应不同。基因型对愈伤组织的形成及分化具有决定作用。不同植物的愈伤诱导与器官分化明显不同, 即使是同属不同种, 甚至在同种不同品种间也有差异。

韩雪梅(1997)用草莓不同品种进行愈伤分化诱导的研究, 结果表明品种基因型的差异对分化率有较大影响。影响草莓花药培养力的各因素中, 作用最强的是基因型(徐振南等, 1995)。黄璐等(1999)研究了不同基因型玉米的再生能力, 表明不同品种玉米幼胚诱导的愈伤组织再生能力差异显著, 再生频率变化范围达 8%—78%, 且再生途径也有不同, 有的品种以器官发生为主要途径, 而有的品种则以体胚途径为主。棉花花药离体培养不同基因型之间愈伤组织诱导率、诱导量也不同(张宝红等, 1999)。水稻不同基因型愈伤组织再生频率也有很大差异(彭美媛等, 1994; 王力等, 1999)。黄芪属的夏黄芪和细叶黄芪由同样来源的外植体诱导愈伤, 分化率前者仅 12.5%而后者则高达 97%(安利佳等, 1992)。

2.1.2 外植体的影响

外植体供体植株的生长周期、发育阶段、生长环境以及外植体取材部位不同可导致外植体生理生化状态差异, 从而影响组织培养的形态发生。同一植物体不同外植体在愈伤的诱导及分化上常常存在差异, 即使同一植株的同一外植体诱导的愈伤组织块间, 器官发生能力的差异也很大。许智宏(1998)提出以不同的器官作外植体诱导的愈伤组织中, 其分化模式有的带有器官来源的特征, 这一点在一些具变态茎叶器官的植物中尤其明显。

百合科观赏植物风信子花被外植体上的不同部位的细胞再生花芽时, 需要不同浓度的外源激素。单加 BAP 或 ZT2mg/L, 可以诱导花被下部的细胞再生花芽, BAP 或 ZT2mg/L+2,4-D0.1 mg/L 的组合利于花被中部的细胞再生花芽, BAP 或 ZT2mg/L+2,4-D1.0 mg/L 的组合能促进花被上部的细胞分化花芽(陆文梁等, 1994)。获不同外植体的愈伤组织分化绿苗的频率存在差异, 分别是幼穗(75%)>下胚轴(21%)>完整无菌苗(6.4%)>芽稍(2.7%)>幼根(0%)(何立珍等, 1995)。

2.1.3 培养基的影响

2.1.3.1 基本培养基

基本培养基是植物组织培养重要的基质。由于各种植物的遗传特性、生物学特性及生态学特性不同,因而在进行组织培养时,所需的营养成份有所差别,对基本培养基的要求不同。

甜叶菊茎尖外植体在 B_5 、 N_6 为基本培养基时,愈伤组织形成缓慢,且质地不好,易死亡,而在 MS 培养基上愈伤组织生长快,质地好,易分化(沈秀丽等,1997)。 N_6 、LS、MS、 B_5 、White 五种基本培养基对水稻悬浮细胞生长速度的影响各异,在 N_6 、MS 中均能以较快速率生长, B_5 中生长较好,LS、White 中生长缓慢(贝丽霞,1998)。荞麦成熟胚适合于 B_5 培养基,幼胚最适合 MS 培养基,而下胚轴在 B_5 、MS 两种基本培养基上均不适合(侯建华等,1995)。基本培养基对草莓的愈伤组织诱导率 B_5 明显高于 MS、 N_6 等(徐振南等,1995)。基本培养基成分中碳源类型不同及浓度大小对愈伤诱导和生长有影响。刘彤等(2000)研究不同碳源对啤酒花试管苗生长的影响表明,用蔗糖作为碳源啤酒花试管苗生长势普遍较弱,而葡萄糖作为碳源生长势强增殖快。蔗糖对掌状半夏染色体的影响是高浓度的蔗糖引起染色体形态的变化,出现一定数量的环状染色体(李亮亮等,1998);这方面研究还较多(Halgesson, et al., 1972; Nash, et al., 1975; Nickell, et al., 1970; 徐振南等, 1995)。

2.1.3.2 有机附加物

有机附加物并不是愈伤组织生长所必需的,但对愈伤组织的诱导和生长有利。常用的有椰子汁(CM)、水解酪蛋白(CH)、水解乳蛋白(LH)、番茄汁(TJ)、酵母浸出物(YE)、麦芽浸出物(ME)等。

有机附加物 ME 对诱导红江橙珠心愈伤组织有效(唐小浪等,1994)。在培养基中添加脯氨酸对许多植物如小麦、大麦及玉米(Bright, et al, 1985)、粳稻等的花药培养和愈伤组织培养都有提高出愈率、增加再生潜力的作用,而同时添加脯氨酸和丙氨酸对粳、粳稻的培养效果特别明显(罗琼等,1995)。冯双华等(1995)也证实培养基中添加 CH 和脯氨酸(pro)对提高粳稻花药的出愈率及绿苗分化率皆有明显的作用。玉米根尖培养中加入 LH,能提高愈伤组织的生长率(郭丽红等,1999)。附加 CH 和 YE 对红掌试管苗增殖和生长都有影响(蒋泽平,2000)。

2.1.3.3 激素的影响

用于组织培养的生长调节物质主要有细胞分裂素类(CTK)和生长素类(AUX)。培养基成份中激素是一至关重要的组分。王景雪等(2000)以下胚轴为外植体研究油菜不同基因型和激素对高频率植株再生的影响表明,培养基中激素与基因型有显著互作效应,且激素的影响大于基因型,成为主因素。各类植物组织培养的培养基筛选工作也主要是调节生长物质的量及配比。早在 1957 年 Shoog 和 Miller 就已经提出“激素平衡”假说,这对组织培养的愈伤诱导和分化具有重要指导意义。许多双子叶植物的组织培养中两类生长物质的配比平衡是至关重要的。但随着研究的深入,也有一些例外的植物,如罗希明等 1991 年研究沙打旺、红豆草及野火球外植体一次培养再生植株时发现,无论生长素与细胞分裂素的配比如何均有利于苗的形成和体胚发生。百合科观赏植物风信子花被为外植体诱导花芽再生时仅有细胞分裂素就能成功,生长素并不是必需成份(陆文梁等,1994)。旋花属植物中的单细胞组

织无性系可以在不含生长素的培养基中分化茎芽,也可以在低浓度的 IAA 或 KT 中促进茎芽形成(李浚明,1996)。一般而言,植物组织培养中诱导愈伤组织及其增殖、分化时所用基本培养基多数是比较通用的,但对两类生长调节物质的要求各异,且在不同植物、不同外植体、同一外植体不同发育阶段乃至同一外植体不同部位细胞(陆文梁等,1994)所需生长调节物质类型、数量、配比都有不同要求。

关于植物生长调节物质在组织培养上的作用效应研究甚多,但对其作用机理仍没有完全明确的结论。一般认为其对愈伤诱导及分化的影响十分复杂,也有学者对此做了一些研究(王冬梅,1996;崔凯荣等,2000;谷瑞升,1999)。可以肯定外源植物激素必须通过对内源激素平衡的调节才发生作用(韩碧文等,1993;黄学林等,1995)。外源生长素类对白首乌启动脱分化及愈伤增殖时,伴随着内源 IAA 的迅速提高(董新纯,1999);黑麦胚状体的萌发和迅速生长需要高水平的内源生长素,而 2,4-D 抑制内源 IAA 产生,从而抑制了胚状体的萌发(邢登辉,1996)。外源细胞分裂素进入组织后,其中一部分很快被转化成核糖核苷,成为钝化形式,因而细胞分裂素的核糖核苷形式与自由碱基形式相互转变的酶学控制机制,可能影响活性细胞分裂素的量(谷瑞升等,1999),这也可能成为组培外植体诱导中对细胞分裂素量的要求的一种解释。

2.1.4 培养条件

2.1.4.1 温度条件

外界培养条件包括温度条件、光照条件及通气状况等因素。有研究证明外植体在不同的温度条件下愈伤生长量是不同的。草珊瑚愈伤在 23—28℃ 条件下生长快,而在 15℃ 左右及 32℃ 以上严重受抑,且宜在恒温下培养(涂艺声等,1994)。甜菜叶片外植体培养在 31℃ 比 25℃ 产生的愈伤要多,但其形态建成能力却是在 25℃ 培养条件下表达得更充分,说明愈伤生长快、多并不一定具有最强的形态建成能力。

2.1.4.2 光照条件

光作为一种物理因子已被广泛应用于组织培养中光形态建成及其各种反应机理的研究。光的影响分光质和光照时间长短两个方面。一些研究表明,光质对植物形态建成的调控复杂,不同植物、同一植物不同发育时期或不同部分对光质的反应不同。Seibert(1975)等在烟草叶组培中发现蓝光和近紫外光有促进芽的发生和愈伤组织增重的作用。不同光质处理中蓝光、红光对愈伤组织的生长有明显的促进作用(熊丽等,1995;王维荣等,1991;周吉源等,1992;许桂芳等,1994);也有报道认为红光不利于凹叶景天愈伤生长(倪德祥等,1986);王维荣等编译的一文(1989)中有试验表明光对愈伤生长无影响。总之,光质的作用在不同的植物上有明显差异,而引起质的变化因素是光的有无和培养液中激素的种类(张丕方,1988)。例如杨在光照和黑暗下培养愈伤诱导率可达 90%—100%,而苹果在光下培养仅 0%—37.5% 的诱导率,黑暗下培养诱导率为 62.5%—100%(郑均宝等,1999)。

通气状况对愈伤生长及分化有明显影响,一般通气条件好时利于愈伤生长与分化,而全密闭状态则不利。

2.2 苧麻组织培养研究进展

麻类生物技术方面,国外研究较多的是亚麻、红麻及黄麻,苧麻组织培养技术研究的报道很少。国内而言,苧麻相对于水稻、小麦、油菜等大宗粮油作物,组织培养技术研究起步明显较晚,研究进展滞后。1985~1990年间通过细胞工程途径选育的水稻新品种有5个(中花10号、中花11号、花培528等),小麦2个(京花3号等)、油菜1个(蜀杂2号)。此外,生产上已应用的小麦新种质有12个(欧阳俊闻,1990)。而到目前为止,尚未有通过生物技术手段育成的苧麻新品种问世。

近20年国内在苧麻组织培养方面也做了一些方面的积极探索,其研究的特点有两点:第一、研究用材料多为传统的古老的栽培种。湖南地方品种“黄壳早”是最早和最常用的研究材料(颜昌敬等,1982;胡继金等,1982;赵庆华等,1984;胡继金,1991),周朴华等(1980)在苧麻组培简报中用材料为地方品种“白脚麻”,陈喜文等(1996)研究苧麻原生质体用材料是“浏阳大叶绿”,陈德富等(1996)所用三十多种基因型中有几种湘苧系列材料,但其研究重点是苧麻愈伤多样性。唯有郭清泉等(1998)对湘苧3号叶片作了培养研究。第二、基因型、外植体、培养条件的研究都有涉及,但尚未进行因素间的系统研究。前人对苧麻脱分化培养条件、外植体类型作了有益的和基础性研究,由于研究用材料比较单一,又多是老的地方品种,而近年新培育苧麻良种更有研究意义,因此尚有做进一步系统研究的余地。前人在苧麻组织培养方面有以下一些研究:

2.2.1 苧麻器官培养

主要用茎段(包括下胚轴)、叶(子叶、真叶)、种子为外植体进行培养,涉及培养基筛选、激素效应研究,同时在试管苗生根方面也有研究报道。周朴华、李宗道等(1980)用茎、叶组织诱导出愈伤组织,但未能分化出苗,这些研究表明苧麻(基因型为“白脚麻”)内源激素水平较高,即使在无激素培养基上苧麻茎切段也能大量形成愈伤组织(周朴华等,1980);黄记生等以子叶及下胚轴为材料,诱导出愈伤组织并分化得到绿苗(黄记生,1980);莫荣达等(1981)从茎叶诱导愈伤组织后分化出再生植株移栽成活。苧麻不同基因型、相同或不同外植体上形成的愈伤组织在形态上具有广泛变异,多样性复杂(陈德富等,1996),这种多样性复杂的特点对更快筛选出优良苧麻新品种有利。

2.2.2 花药培养

刘国民等1994年报道苧麻花药和未授粉子房离体培养的研究。结果表明,决定花粉愈伤组织发生率高低的因素是基因型,添加有机附加物的培养基有利于愈伤组织生长,2,4-D配以微量6-BA或KT最适宜于诱导苧麻单倍体愈伤组织。实践表明,从苧麻单倍体愈伤组织诱导出绿苗要比从二倍体愈伤组织困难得多。

2.2.3 原生质体培养

1995年陈喜文等首次报道以浏阳大叶绿为材料进行的苧麻悬浮细胞和子叶原生质体的分离和培养结果,并于1996年首次报道了苧麻原生质体培养获得再生植株,

证实了苧麻原生质体的全能性。熊兴耀等 1997 年以三倍体试管苗为试验材料进行了苧麻原生质体培养再生植株和几个主要影响因子的研究, 他们认为 6% 是最适纤维素酶浓度, 蔗糖和葡萄糖是苧麻原生质体培养再生的最适碳源。

2.2.4 苧麻胚状体发生和人工种子研究

由于胚状体在新品种选育和繁殖方面起着越来越重要的作用 (Redenbaugh K et al., 1986; 李修庆, 1990), 因此, 自 1958 年出现胚胎形成以来, 胚状体发生研究一直被人们所重视, 据 1987 年统计, 已有 106 种植物能进行胚胎发生 (周俊彦, 1987)。针对苧麻生产中存在无性繁殖速度慢、有性繁殖易分离、育种周期长等问题, 陈德富等 1993 年对苧麻体细胞胚胎发生及人工种子技术进行初步研究。苧麻胚胎发生较困难 (陈德富等, 1996), 其发生条件仍有待研究。目前, 苧麻人工种子仅以不定芽为包埋材料, 且尚处于试验阶段未能成功应用。

2.2.5 苧麻快速繁殖研究

苧麻大田繁殖多用地下茎或地上茎等材料。80 年代在原来古老的分蔸繁殖、脚麻繁殖和压条繁殖的基础上推出细切种根法、嫩梢水插等更好的繁殖方法, 但这些方法繁殖系数仍然不高, 且易传病虫, 费时费工。利用组织培养技术进行苧麻快速繁殖具有繁殖系数很高、不带病虫、利于工厂化生产等优点, 具有广阔的应用前景。

通过组织培养有两条途径进行苧麻繁殖: 一是器官培养出愈伤组织, 愈伤组织继代分化出再生植株; 二是直接从器官上长出不定芽方式。第一途径需时较长, 且体细胞无性系变异普遍而多样 (潘昌立等, 1996), 一般仅用于育种上; 第二途径对于苧麻快繁、优良品种区域化生产上有重大意义。通过不定芽方式出苗比愈伤组织出苗的数量多、速度快, 产生变异机率小。颜昌敬等 (1982) 认为腋芽试管苗可保证提供遗传上一致的繁殖体, 利于优良品种保持本品种优良特性。组织培养方法快速繁殖苧麻成本高, 技术性强成为制约生产中实际应用的主要因子。为此, 研究降低组培快繁成本、省工序的实用型技术具有重大实际意义。

材料与方法

1 生长调节物质对苎麻愈伤诱导及分化的影响

1.1 材料

用湘苎 2 号为材料, 进行生长调节物质筛选试验。

1.2 设计与方法

1.2.1 无菌苗培养

取适量湘苎 2 号种子, 用一层滤纸包成小包或外面再包一层纱布, 先置于 70% 酒精中消毒 30s, 再用 0.1% 的升汞 ($HgCl_2$) 处理 12min 后, 用无菌水 (SDW) 反复冲洗 4-5 次。将消毒的种子接种于 MS 固体培养基 (Murashige and skoog, 1962) 上, 培养基含蔗糖 3%, 琼脂 7.8%, PH 值调至 5.8, 置于 $121^{\circ}C$ 、 $1.1kgf/cm^2$ 高温高压下灭菌 15-20min, 置于培养箱内 (暗条件下) 发芽, 温度控在 $26\pm 1^{\circ}C$, 7-10d 即可发芽。

1.2.2 试管苗培养

取田间生长的湘苎 2 号麻蔸地下茎, 用含有效成分 10% 的次氯酸钠溶液消毒 30-50min 后, 栽于钵中。钵土用细沙拌上腐熟饼肥后用低浓度次氯酸钠消毒或高温灭菌后使用。钵置于温室内, 待地下茎发芽出苗后, 取嫩梢 (长约 2cm), 先用流水冲洗后转入 70% 酒精中处理 30s, 再放入 10% 的次氯酸钠溶液中消毒 30min 后, 用 0.1% 的升汞处理 4-5min 后, 用 SDW 反复冲洗 5 次后, 在解剖镜下取出长约 1-2mm 茎尖 (可带上 1-2 个叶原基) 接种于附加 IAA 2.5mg/L+6-BA 1.0mg/L 的 MS 固体培养基中。10~15d 后茎尖上生出小芽苗或丛生苗, 待苗高 3-4 cm 时, 再重新用分枝茎转接在 6-BA 1.0mg/L 的 MS 固体培养基上。如此, 便可得到大量试管苗。

1.2.3 外植体来源

种子萌发后 10d 转入人工气候箱中光照培养 5d 后, 下胚轴和子叶可作外植体接种; 茎、叶片外植体取自田间来源的分枝茎生长出的试管苗。

1.2.4 单一激素对愈伤组织诱导效应试验设计

基本培养基为 MS。附加生长调节物质为: 细胞分裂素类 (the cytokinins) 有 6-BA (苄基腺嘌呤)、KT (激动素)、ZT (玉米素)。生长素类 (the auxins) 有 IAA (吲哚乙酸)、IBA (吲哚丁酸)、NAA (萘乙酸) 和 2, 4-D (二氯苯氧乙酸)。设计处理浓度见表 1。

表 1 单加一种生长调节物质的处理水平

生长调节物质	浓度 (mg / L)					
Hormones	Concentration					
6-BA (B)	0.2	0.5	1.0	2.0	2.5	5.0
KT (K)	0.2	0.5	1.0	2.0	2.5	5.0
ZT (Z)	0.2	0.5	1.0	2.0	2.5	5.0
IAA (A)	0.2	0.5	1.0	2.0	2.5	5.0
IBA (I)	0.2	0.5	1.0	2.0	2.5	5.0
2,4-D(D)	0.2	0.5	1.0	2.0	2.5	5.0
NAA (N)	0.2	0.5	1.0	2.0	2.5	5.0

1.2.5 两种生长调节物质的浓度范围及配比的筛选方法

1.2.5.1 细胞分裂素与生长素组合效应筛选

基本培养基用营养成分较齐全的 MS 培养基, 蔗糖 3%, 琼脂 7.8%, 附加的三种细胞分裂素浓度为 1.0mg/L, 四种生长素类调节物质浓度为 0.5mg/L, CTK 与 AUX 两两搭配成为 12 组合。

1.2.5.2 分裂素类和生长素类作用浓度范围筛选

两种生长调节物质处理组合设计见表 2。

表 2 生长素和分裂素 6 × 6 组合设计

生长素类	浓 度	Concentrations (mg/L)					
		0.2	0.5	1.0	2.0	2.5	5.0
Auxins	0.2	T1	T2	T3	T4	T5	T6
分裂素类	0.5	T7	T8	T9	T10	T11	T12
	1.0	T13	T14	T15	T16	T17	T18
	2.0	T19	T20	T21	T22	T23	T24
	2.5	T25	T26	T27	T28	T29	T30
	5.0	T31	T32	T33	T34	T35	T36

1.2.6 培养基灭菌方法

由于 ZT、IAA、AgNO₃ 受热易分解, 在其它成分高压灭菌后冷却至 60℃ 时, 用针头过滤器过滤除菌后加入, 其余均采用 121℃ 高温、1.1kgf/cm² 高压下灭菌 15—20min 方法。

1.2.7 观察及统计方法

接种后 7d、15d、30d 进行愈伤组织诱导状态观察, 30d 时统计出愈率, 出愈率

是出愈的外植体占接种外植体的百分比, 分化率为分化苗数占出愈外植体百分比。

2 基本培养基对苎麻不同外植体愈伤诱导及分化的效应

2.1 材料

分别用湘苎 6 号叶片和湘苎 2 号下胚轴、子叶、叶片、茎为材料进行愈伤组织诱导。基本培养基七种: MS(Murashige 和 Shoog, 1962)、LS(Linsmaier, Shoog, 1965)、MSB(MS 无机成分+B₅有机成分)、B₅(Gamborg, 1968)、N₆(Chu C C, 1975)、Nitsch(Nitsch, 1951)、White(White, 1963)培养基。

2.2 方法

培养条件为 25±1℃, 12h 光照/12h 黑暗条件下培养。愈伤量的衡量方法两种。对有芽苗直接从愈伤上再生出的组合用目测分级法, 对愈伤中未分化出苗的湘苎 6 号叶片愈伤和湘苎 2 号叶片愈伤用称量法。称量法的具体做法是: 配制好培养基后于接种前将其称重 (W₁), 接种外植体后再称重 (W₂), 接种后 30d 称重 (W₃) 后当即继代将培养基称重 W₄。用下式计算愈伤生长量

$$\text{愈伤量} = (W_3 - W_4) - (W_2 - W_1)$$

诱导愈伤用培养基成分为基本培养基+6-BA2.5mg/L+2, 4-D0.5mg/L+蔗糖 30g/L+琼脂粉 7.8 g/L, 预备试验中知道此种生长调节物质对苎麻各基因型和各外植体均有较好的诱导作用, 能较好减轻由于基因型间和外植体类型间对生长调节物质反应的不一致所引起的脱分化质的差异。湘苎 6 号叶和湘苎 2 号叶愈伤继代在 MSB+6BA2.5mg/L+IAA0.5mg/L+AC2%、MS+6BA2.5mg/L+NAA0.5mg/L+AC2%的两种分化培养基中。

3 光温条件及碳源对苎麻愈伤生长及分化的效应

3.1 材料

用湘苎 2 号下胚轴为材料进光照条件和温度条件与碳源对苎麻愈伤诱导及分化影响的研究。

3.2 方法

光照条件试验设计为两因素 (A×C), 光照时间 (A 因素) 设计三个水平即三种光照时间处理分别是: 24h 光照 / 0h 黑暗处理 (A1)、12h 光照 / 12h 黑暗 (A2)、0h 光照 / 24h 黑暗 (A3); 碳源 (C 因素) 设计两水平即两种碳源分别是: 蔗糖 30g/L (C1)、葡萄糖 30g/L (C2); 3×2 个处理组合。基本培养基为 MS, 琼脂 7.8 g/L, 附加激素组合为 BA2.5mg/L + 2, 4-D1.0mg/L, 每一处理组合播种下胚轴外植体 100 个, 设三次重复, 置于 25℃温度条件下, 光照处理的光强为 2000-2300lux。

温度条件试验设计为两因素 (T×C), 温度条件 (T 因素) 设计四个水平即四种温度条件处理分别是: 23℃ (T1)、25℃ (T2)、28℃ (T3)、30℃ (T4); 碳源 (C 因素) 设计两水平即两种碳源分别是: 30g/L (C1)、葡萄糖 30g/L (C2); 4×2 个处理组合。基本培养基为 MS, 琼脂 7.8 g/L, 附加激素组合为 BA2.5mg/L + 2, 4-D1.0mg/L, 每一处理组合播种下胚轴外植体 100 个, 设重复三次, 将所有处理组合均置于暗条

件下。35d 后观察各处理的出愈率、愈伤质地、色泽及状态，计算愈伤量。用称量法计算出愈伤生长量(g)。

4 基因型对苕麻愈伤诱导及分化

4.1 材料

供试材料有巴西麻 1 号、巴西麻 6 号、芦竹青、宜章雅麻、大叶绿、黄壳早、华苕 3 号、华苕 4 号、湘苕 6 号、湘苕 2 号、2004-1 (品系) 等十一个基因型。

4.2 方法

前面试验结果显示，基本培养基适应性较广的是 MS。细胞分裂素类中 6-BA 能较好地诱导苕麻外植体脱分化和分化，因而细胞分裂素类调节物质选用 6-BA，浓度范围 0.5-2.5mg/L，搭配 2,4-D、IAA、IBA、NAA 四种生长素类物质，浓度为 0.5mg/L，组成 16 个组合。用十一个基因型叶为外植体。培养温度 $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，12h 光照条件下培养。

5 苕麻快速繁殖技术

5.1 材料

用湘苕 2 号为材料。

5.2 方法

用 MS+BA2.5mg/L+NAA0.1mg/L (胡继金, 1991) 培养基作叶面生芽研究。

试管苗的获得。用茎尖培养获得湘苕 2 号试管苗，方法同前。在解镜下取出长约 1-2mm 茎尖 (可带上 1-2 个叶原基) 接种于附加 1.0mg/L 6-BA+IAA2.5 mg/L 的 MS 固体培养基中。10~15d 后茎尖上生出小芽苗或丛生苗 (见图版)，待苗高 3-4 cm 时，再重新用分枝茎转接在 1.0mg/L 6-BA 的 MS 固体培养基上。如此，便可得到大量试管苗。

试管苗生根壮苗。用 MS₀、MS+NAA0.1mg/L、1/2 MS+NAA0.1mg/L、B₅ (不附加任何激素) 四种培养基进行生根壮苗试验。

试管苗移栽钵准备。室内移栽用一次性塑料杯做钵，钵土用田园土、细沙、饼肥各 1/3 组成，少量钵土灭菌在 120℃ 高温下处理 20min，大量钵土用 10% 有效氯的次氯酸钠液喷后，拌匀，盖上塑料膜封闭 60min 后，揭膜通风后备用。

水培生根用凉开水。移栽试验在 2001 年 5 月进行。

结果与分析

1 生长调节物质对苎麻愈伤诱导及分化的影响

1.1 单一生长调节物质对苎麻愈伤诱导效应

单加 2, 4-D (五种浓度水平) 对下胚轴、子叶、茎、叶片, 均能诱导出乳白疏松愈伤组织, 但愈伤组织随即大量生根。单加 6-BA (五种浓度水平) 同样能诱导下胚轴、子叶、茎、叶片大量出愈, 愈伤质地较疏松, 色泽较 2, 4-D 诱导的愈伤深, 但愈伤不生根 (见表 3)。单加 NAA、IBA、IAA 不论何种浓度, 不能诱导下胚轴、茎、子叶、叶长愈伤且外植体不久褐化死亡, 但子叶和叶片均从伤口处诱导出大量根, 出根率 100%。其中 NAA 0.2-2.0mg/L 浓度均能诱导生根, 但 IBA、IAA 为 0.2mg/L 时诱导作用较微弱, 仅长出很少的根。单加 KT、ZT 对所有外植体不能诱导出愈伤或根。单加 2, 4-D 和单加 6-BA 对苎麻外植体愈伤诱导结果列于表 3。

表 3 单加 2, 4-D、6-BA 对苎麻外植体愈伤诱导效应

Table 3 Effects of 2,4-D and 6-BA in MS medium on induction of calli from explants of ramie

激素	外植体类型	外植体块数	出愈率 (%)	生长势	愈伤质地	生根量
Hormone	Explant	No.of Exp.	Ratio	Growth	Texture	Rooting
2, 4-D	下胚轴	50	100	++++	乳白透明疏松	大量生根
	子叶	50	100	++++	淡黄疏松	大量生根
	叶片	50	100	+++	乳白淡黄较紧密	大量生根
	茎	20	100	++	乳白较紧密	大量生根
6-BA	下胚轴	50	100	++++	淡黄较疏松	无根
	子叶	50	100	++++	淡黄较疏松	无根
	叶片	50	100	+++	淡黄灰白较紧密	无根
	茎	20	100	+++	淡黄较紧密	无根

注: ++代表愈伤生长较快; +++代表愈伤量生长快; ++++表示生长量大而生长快。

苎麻对单一细胞分裂素或生长素的反应因种类而不同。2, 4-D、6-BA 较快速地启动苎麻各种外植体的脱分化和分化。而其余几种生长物质单一作用效应不大。同时苎麻不同外植体对单一作用因子反应也不一。下胚轴和子叶对 2, 4-D、6-BA 作用反应更敏感; 出愈快且量较大, 这可能是下胚轴与子叶较嫩, 其内源激素含量及细胞状态较好有关。而叶片、子叶对 NAA、IBA、IAA 等反应表明, 叶较易生根。赵庆华等 (1984) 用黄壳早等材料研究后, 认为凡单加生长素或细胞分裂素, 都不能正常形成愈伤组织, 可能是由于基因型不同的原因。

1.2 两种外源生长调节物质对苧麻外植体诱导的效应研究

1.2.1 生长调节物质组合筛选

表4示不同细胞分裂素类与不同生长素类物质组合对湘苧2号叶愈伤诱导效应。BA与四种生长素类物质组合使用诱导效果均较好,生长势强;ZT与2,4-D、IAA、IBA搭配使用均能启动叶脱分化,但ZT与NAA组合效果差,未能启动愈伤生长,KT与IBA组合效果较差,且易出根,KT+2,4-D效果好,愈伤诱导率高且生长势强,质地疏松,容易再生。KT与NAA组合愈伤诱导率仅62.5%,愈伤生长质地硬但却有一次性分化苗发生。从生长素类看,2,4-D与任一分裂素类物质组合效果均好,而IAA相对较差一些。可见,苧麻的脱分化较容易,有6-BA的组合、ZT和IBA、2,4-D组合、KT与2,4-D、NAA组合均有好的诱导效果。

表4 不同细胞分裂素类与不同生长素类物质组合对湘苧2号叶愈伤诱导效应

Table 4 Combinations of different hormones in MS medium tested for their effect on induction of calli from leaves of *xiangzhu 2*

编号 No.	激素组合 Hormones Combinations	出愈率 Ratio	生长势 Groowth	质地 Texture
1	2, 4-D	100	+++	较硬, 块状
2	6-BA IAA	30	+++	乳白透明, 疏松
3	1.0mg/L IBA	100	+++	突起状, 疏松
4	NAA	90	++++	疏松, 乳白, 灰白
5	2, 4-D	100	+++	疏松, 淡黄
6	ZT IAA	20	++	疏松, 灰白
7	1.0mg/L IBA	100	+++	疏松, 淡黄灰白
8	NAA	0	-	
9	2, 4-D	100	++++	再生苗多 疏松, 乳白
10	KT IAA	50	++	突起点状, 淡黄
11	1.0mg/L IBA	100	+	大量出根, 点状突起, 淡黄
12	NAA	62.5	+	有根及分化苗, 硬块状

1.2.2 细胞分裂素与生长素调节物质的作用浓度范围及配比

用ZT+IBA和2,4-D+KT两个诱导效果好的组合分别进行浓度梯度组合试验。

1.2.2.1 ZT与IBA组合对苧麻叶片愈伤组织的诱导

ZT和IBA不同浓度组合对苧麻愈伤组织诱导的结果列于表5。

表 5 ZT 与 IBA 不同浓度组合对苧麻叶片愈伤组织诱导的效应

Table5 Combinations of ZT and IBA in MS medium tested for their effects on induction of calli from leaves of ramie.

编号 No.	激素组合 Hormones Combinations		接种外植体块数 No.of.Exp	出愈率 Ratio (%)	生长势 Growth	出根率 Ratio of rooting (%)
	IBA	ZT				
1	0.2	0.2	38(30)	80.0	+	50
2	0.2	0.5	50(42)	84.0	+	48
3	0.2	1.0	54(47)	87.0	++	20
4	0.2	2.0	50(50)	100.0	+++	0
5	0.2	2.5	50(35)	70.0	+++	0
6	0.2	5.0	50(50)	100.0	+++	0
7	0.5	0.2	50(26)	52.0	+	50
8	0.5	0.5	68(59)	86.8	++	40
9	0.5	1.0	70(57)	81.4	++	40
10	0.5	2.0	49(45)	91.8	++	15
11	0.5	2.5	61(49)	80.3	+++	10
12	0.5	5.0	65(65)	100.0	+++	5
13	1.0	0.2	70(48)	68.6	+	68
14	1.0	0.5	70(63)	90.0	++	50
15	1.0	1.0	52(47)	90.4	++	20
16	1.0	2.0	61(55)	90.2	++	20
17	1.0	2.5	55(50)	90.9	++++	20
18	1.0	5.0	55(55)	100.0	+++++	10
19	2.0	0.2	48(43)	89.6	+	80
20	2.0	0.5	58(47)	81.0	++	50
21	2.0	1.0	60(60)	100.0	+++	70
22	2.0	2.0	54(51)	94.4	+++	32
23	2.0	2.5	38(37)	97.4	++++	10
24	2.0	5.0	70(70)	100.0	++++	5
25	2.5	0.2	60(60)	100.0	++	90
26	2.5	0.5	45(45)	100.0	++	100
27	2.5	1.0	50(50)	100.0	+++	60
28	2.5	2.0	61(58)	95.1	+++	20
29	2.5	2.5	60(60)	100.0	+++	10
30	2.5	5.0	60(60)	100.0	+++++	2
31	5.0	0.2	45(41)	91.1	+++	90
32	5.0	0.5	36(36)	100.0	+++	90
33	5.0	1.0	50(48)	96.0	+++	70
34	5.0	2.0	35(35)	100.0	+++	20
35	5.0	2.5	50(45)	90.0	++++	0
36	5.0	5.0	50(50)	100.0	+++++	25

注：() 内数代表出愈外植体块数；+代表愈伤量很少；++代表愈伤量较少；+++代表愈伤量较大；

++++代表愈伤量大，+++++愈伤量很大；++++++代表愈伤量很大，生长势强。

出愈率高是正效应，表明生长调节物质组合诱导作用强，易启动脱分化，但愈伤

直接一次分化大量根则不利于再生苗的形态建成，先出根的愈伤组织很难诱导出芽苗，因而出根率是一负效应。生长势是表明愈伤增殖快慢及愈伤量大小的指标，只有出愈率高而且生长势强的组合愈伤量才较大，出愈率高但生长势弱的组合仍不是强势组合，因而，引进公式（1）：

$$Y_{ij} = (\text{出愈率} - \text{出根率}) \times \text{生长势} \quad (1)$$

将生长势中一个“+”记为1，“++”记为2，依此类推，据（1）式将表5中36个组合的数据转换的 Y_{ij} 值列于表6。

表6 表5数据转换的 Y_{ij} 表

Table 6 Value of Y_{ij} transformed from data of table 5

	浓度 (mg/L) Combinations							T _i	Y _i
	IBA	0.2	0.5	1.0	2.0	2.5	5.0		
ZT	0.2	0.300	0.020	0.018	0.096	0.200	0.033	0.667	0.111
	0.5	0.360	0.936	0.800	0.620	0.000	0.300	3.016	0.503
	1.0	1.140	0.828	1.408	0.900	1.200	0.780	6.256	1.043
	2.0	3.000	1.536	1.404	1.872	2.253	2.400	12.465	2.078
	2.5	2.100	2.109	4.254	3.496	2.700	3.600	18.259	3.043
	5.0	3.000	2.850	5.400	3.800	5.880	3.750	24.68	4.113
	T _j	9.900	8.279	13.284	10.784	12.233	10.863		
								T=65.343	$\bar{Y}=1.815$

表7 ZT不同浓度处理下 IBA不同水平对苧麻愈伤生长影响的方差分析表

Table 7 Variance analysis of effect of increasing IBA concentration at different ZT levels on growth of Ramie callus.

变异来源	DF	SS	MS	F	显著 F 值
Source					F test
ZT 处理间	5	72.4884	14.4977	39.73**	F0.05=2.53
IBA 处理内	30	10.9481	0.3649		F0.01=3.70
总变异	15	83.4365			

表7中F测验结果表明ZT处理间的变异显著大于IBA浓度变化内的变异，即不同ZT浓度对愈伤诱导效应显著高于不同IBA浓度对愈伤组织的诱导效应。在F测验基础上再做平均数间多重比较；用D、B、Duncan（1955）提出的新复极差法。

表 8 不同 ZT 处理对愈伤诱导的差异显著性

Table 8 Multiple comparisons of different ZT treatment

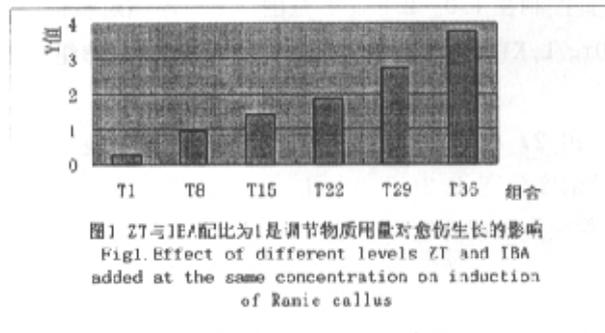
处理	平均数	差异显著性	
		0.05	0.01
Treatment	Mean	Difference significance	
ZT5.0(Y6)	4.113	a	A
ZT2.5(Y5)	3.043	b	B
ZT2.0(Y4)	2.078	c	B
ZT1.0(Y3)	1.043	d	C
ZT0.5(Y2)	0.503	d e	C
ZT0.2(Y1)	0.111	e	C

表 8 结果可知, ZT 为 5.0mg/L 时对愈伤诱导的效应最强, 极显著高于其他浓度处理的效应, ZT 为 2.5mg/L 和 2.0mg/L 处理间在 0.05 水平上差异显著但在 0.01 水平上一致, 但 ZT 水平在 5.0—2.0mg/L 时诱导苧麻愈伤的效应极显著高于 ZT1.0mg/L 以下的浓度水平。因而可将细胞分裂素类物质的浓度范围定为 2.0—5.0mg/L。

将 ZT/IBA=1 配比的组合 Y_{ij} 值列于表 9 并作图 1。

表 9 ZT、IBA 配比为 1 时的不同浓度水平下 Y_{ij} 值Table 9 Value of Y_{ij} combinations added ZT and IBA at the same concentration

编号	组合	Y_{ij}
No.	Combinations	
1	ZT0.2+IBA0.2	0.300
8	ZT0.5+IBA0.5	0.936
15	ZT1.0+IBA1.0	1.408
22	ZT2.0+IBA2.0	1.872
29	ZT2.5+IBA2.5	2.700
36	ZT5.0+IBA5.0	3.750



由图 1 可知, ZT/IBA 配比不变时随着 ZT 和 IBA 浓度增大, Y_{ij} 的值越大, 说明诱导效应越强, 愈伤生长势越强。可见湘苎 2 号叶外植体对外源生长调节物质的要求较高。

表 6 中沿 ZT / IBA=1 的处理 (见黑体数字) 作一斜线, 斜线上面组合均为 ZT / IBA<1 的 15 个组合, 其总和记为 T_s , 斜线下方组合均为 ZT / IBA>1 的 15 个组合, 其总和记为 T_x 。

$$T_s=24.186$$

$$T_x=41.157$$

T_x 几乎是 T_s 的 2 倍, 说明 ZT / IBA>1 和 ZT / IBA<1 两种情况下, 均能诱导苧麻愈伤组织的发生和生长。但前者更有利于苧麻愈伤组织的诱导。从表 6 中数据看, ZT 与 IBA 总量越大出愈率、生长势呈增加趋势。生长势随 ZT / IBA 比例减小而增大。

以上结果表明对苧麻而言, 在有两种外源生长调节物质存在的情况下, 较低浓度组合能够启动其叶外植体脱分化, 且出愈率较高, 达 52% 以上, 但较高浓度的外源生长物质能大大促进出愈和愈伤生长。细胞分裂素类与生长素类物质配比很重要, ZT / IBA>1 更有利, 且出根率较低; 而 ZT / IBA<1 时, 根的分化频率很高, 不利于芽苗的再生。ZT 的作用浓度范围在 2.0—5.0mg/L, 而 IBA 从 0.2—5.0mg/L 均可, 但 IBA 浓度为 2.5mg/L 时出愈率最高, 因而可调整 IBA 浓度范围在 0.2—2.5mg/L。

1.2.2.2 2, 4-D 与 KT 组合对苧麻叶片愈伤的诱导

2, 4-D 与 KT 不同浓度组合对苧麻愈伤组织诱导结果列于表 10。2, 4-D 0.2mg/L +KT 0.2mg/L 组合的出愈率低, 平均为 30%, 其余各组合的出愈率均高达 90% 以上。愈伤色泽乳白、鲜活、质地较疏松, 生长势旺。但从生根率看, 凡是 2, 4-D 浓度高于 KT 浓度时, 虽然也能迅速形成愈伤, 但易先分化根, 且出根率随着 2, 4-D 与 KT 相对浓度的增加, 出根率也增加, 最长达 76% 生根率, 同时, 随着 2, 4-D 与 KT 绝对浓度同时增加也会导致叶愈伤生根率的上升。由表 10 上数据可见, 2, 4-D 浓度在 0.2—0.5mg/L 时, KT 浓度在 0.2—0.5mg/L 内出根率均为 0, 2, 4-D 为 1.0—2.0mg/L 时, KT 宜控制在 1.0—2.5mg/L 范围, 出根率相对较低。2, 4-D 适宜浓度范围即 0.2—2.0mg/L, KT 浓度在 1.0—5.0 间搭配较合适。该组合对诱导苧麻愈伤效果好。

综合 ZT+IBA 和 2, 4-D+KT 组合试验, 认为细胞分裂素类浓度范围 2.0—2.5mg/L, 生长素类浓度范围 0.2—1.0mg/L, 在此范围内两类生长调节物质同时作用对诱导苧麻愈伤发生及增殖有较好的效应。

表 10 2, 4-D 与 KT 组合对苧麻叶片愈伤诱导的效应

Table 10 Combinations of 2, 4-D and KT in MS medium tested for their effects on induction of calli from leaves of ramie.

编号 No.	激素组合 (mg/L) Hormones Combinations		接种外植体块数 No.of Exp.	出愈率 Ratio (%)	出根率 Ratio of rooting (%)
	2, 4-D	KT			
1	0.2	0.2	50	30	0
2	0.2	0.5	50	100	0
3	0.2	1.0	50	100	0
4	0.2	2.0	50	100	0
5	0.2	2.5	50	100	0
6	0.2	5.0	50	100	0
7	0.5	0.2	50	100	0
8	0.5	0.5	50	100	3
9	0.5	1.0	50	100	0
10	0.5	2.0	50	100	0
11	0.5	2.5	50	100	0
12	0.5	5.0	50	93	0
13	1.0	0.2	50	98	10
14	1.0	0.5	50	95	45
15	1.0	1.0	50	100	15
16	1.0	2.0	50	100	30
17	1.0	2.5	50	90	25
18	1.0	5.0	50	100	38
19	2.0	0.2	50	100	76
20	2.0	0.5	50	100	32
21	2.0	1.0	50	100	6
22	2.0	2.0	50	100	4
23	2.0	2.5	50	100	4
24	2.0	5.0	50	100	0
25	2.5	0.2	50	100	40
26	2.5	0.5	50	92	35
27	2.5	1.0	50	90	0
28	2.5	2.0	50	100	13
29	2.5	2.5	50	100	15
30	2.5	5.0	50	100	10
31	5.0	0.2	50	100	48
32	5.0	0.5	50	100	40
33	5.0	1.0	50	100	28
34	5.0	2.0	50	100	18
35	5.0	2.5	50	100	20
36	5.0	5.0	50	100	13

1.2.3 三种细胞分裂素类作用效应

6-BA、KT、ZT 三种细胞分裂素类物质与生长素 IBA 不同浓度组合对苎麻叶愈伤诱导效应见表 11，组合 2、5、8、11 是 KT 和 IBA 组合，30d 后均多发根（组合 8 KT2.0/IBA1.0 未出根），组合 3、6、9、12 是 ZT 和 IBA 组合，30d 后亦多发根（组合 9 ZT2.0/IBA1.0 未出根），组合 1、4、7、10 是 6-BA 与 IBA 组合，30d 后均未发根，说明 6-BA 较 KT、ZT 有较好的抑制愈伤根分化的效应，KT、ZT 与 IBA 配比大于 1 且 KT 与 ZT 的绝对浓度应比 IBA 大 1.0 mg/L 时才能抑制愈伤生根。

表 11 三种细胞分裂素对苎麻叶愈伤诱导效应的比较

Table 11 Comparison of effects of three CTK on induction of calli from leaves

编号 No.	激素组合 (mg/L) Hormones combinations				出愈率及生长势 Induction ratio and growth		
	IBA	BA	KT	ZT	7d	15d	30d
1	5.0	5.0	—	—	0	50	100++++
2	5.0	—	5.0	—	21	50	50+根多
3	5.0	—	—	5.0	32	90	100+++++少根
4	2.0	1.0	—	—	14	50	100++++
5	2.0	—	1.0	—	0	70	100+根多
6	2.0	—	—	1.0	50	100	100+++ (70%出根)
7	1.0	2.0	—	—	27	50	100+++
8	1.0	—	2.0	—	8.5	40	100+++
9	1.0	—	—	2.0	53	100	100+++
10	0.5	1.0	—	—	25	100	100+++++
11	0.5	—	1.0	—	7	70	100+ (80%出根)
12	0.5	—	—	1.0	50	70	100+++ (50%出根)

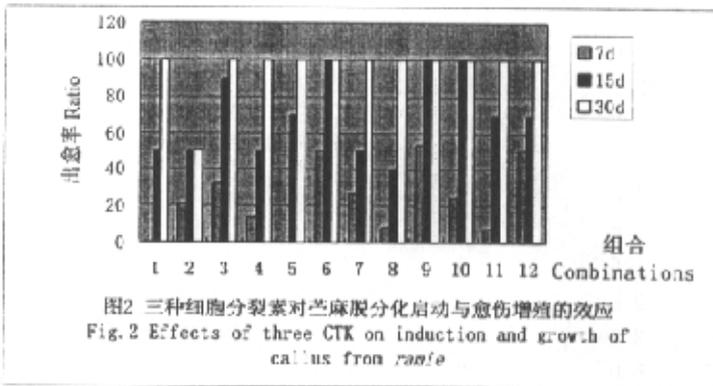


图2 三种细胞分裂素对苎麻脱分化启动与愈伤增殖的效应
Fig.2 Effects of three CTK on induction and growth of callus from leaf

图 2 示 12 组合 7d、15d、30d 出愈率。从图 2 可见，7d 时相同浓度条件组合中 ZT 组合出愈率均最高（组合 3>2>1；组合 6>4>5；组合 9>7>8；组合 12>10>11）；15d 后 ZT 组合出愈率均达 70% 以上，6-BA 组合均达 50% 以上，KT 组合 40% 以上；30d 后除组合 2（KT5.0/IBA5.0）为 50% 出愈率，其余均为 100%。生长势 2、5、11 组合较

弱, 其余组合愈伤生长势均强。以上结果说明从启动苧麻外植体脱分化效应看 ZT>6-BA>KT, 从愈伤增殖速度来看 ZT 和 6-BA>KT; ZT 虽然能快速启动脱分化和使愈伤增殖, 但其诱导愈伤容易先分化根。综合三种细胞分裂素对苧麻诱导效应, 认为 6-BA 是最有利于苧麻脱分化的细胞分裂素类物质。

1.3 苧麻愈伤的分化

1.3.1 苧麻愈伤分化培养基的筛选

选择生长了 30d 的外观较疏松、色泽呈乳白或浅黄的生长势较强的愈伤, 分别转接至不同激素组合的培养基中分化, 结果显示 6-BA1.0 mg/L+NAA0.1 mg/L+GA₃0.5 mg/L 和 6-BA1.0 mg/L+GA₃0.5 mg/L 培养基中分化率较高, 均为 15%以上。而在 ZT、KT 为细胞分裂素的培养基中均不能使愈伤分化。在 ZT2.0 mg/L+2, 4-D0.5 mg/L 培养基上脱分化的愈伤在 6-BA1.0 mg/L+NAA0.1 mg/L+GA₃0.5 mg/L 和 6-BA1.0 mg/L+GA₃0.5 mg/L 培养基中继代 6 次 (每 15d-20d 继代一次), 愈伤能大量增殖但却未能分化, 在光下仅有许多绿色小芽点出现。

1.3.2 不同添加物对苧麻愈伤分化的效应

在 6-BA1.0 mg/L+GA₃0.5 mg/L (BG) 培养基分别添加 CM、TJ、LH、YE、AC、AgNO₃ 组成 8 个组合诱导愈伤分化和增殖, 结果如表 12。

表 12 不同分化培养基对苧麻愈伤分化的效应

Table 12 Effects on ramie callus differentiation of different medium			
培养基 Medium	分化率 Ratio of differentiation	愈伤生长 Growth	愈伤状况 State of callus
BG+LH100+ AgNO ₃ 3.0	21	++++	浅黄团粒状
BG+LH100	17	++++	乳白疏松
BG+AgNO ₃ 3.0	20	++	浅黄绿团粒
BG	15	++	疏松浅黄
BG+CM100ml	19	+++++	乳白颗粒状
BG+TJ100ml	0	+	乳白硬粒
BG+YE100ml	0	-	褐化死亡
BG+AC2%	20	+	淡黄上有白,

由表 12 可见, 在分化培养基中加入 AgNO₃ 和 AC 能提高愈伤分化率, 促进愈伤颗粒化, 而且出现大量绿芽点, 可能是这两种物质具有好的吸附愈伤生长过程中产生的有毒物质的能力, 解除芽体再生的抑制作用; 同时培养基中加入 AgNO₃ 能明显降低细胞染色体的变异率, 提高二倍体细胞的百分率 (李亮亮等, 1998), 从而提高愈伤分化率; 加入 CM、LH 能加速愈伤增殖, 使愈伤色浅; 这种愈伤 40d 以上不继代仍能存活, 生命力强, 说明有机添加物在愈伤生长过程和增殖中有促进作用; 加入 TJ 对愈伤生长有微弱的作用, 但生长很慢, 颗粒化较好, 但分化少。YE 不能使愈伤分化, 而且 YE 对苧麻愈伤生长有副作用。

2 基本培养基对苎麻不同外植体愈伤诱导及分化的研究

2.1 不同基本培养基对苎麻外植体愈伤诱导效应

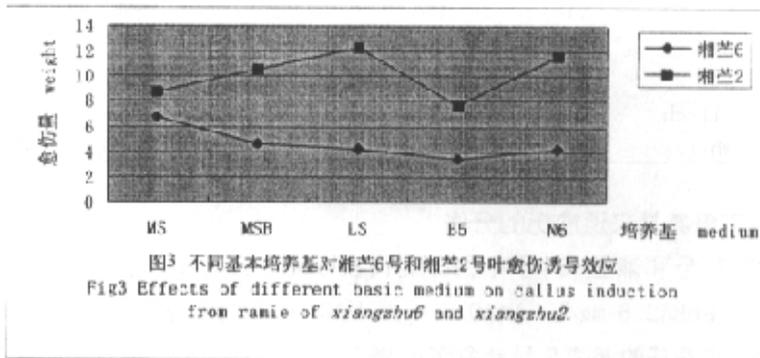
表 13 不同基本培养基对湘苎 2 号外植体愈伤诱导效应

Table 13 Effects of different media on induction of calli from hypocotyls, cotyledons, leaves and stems of *xiangzhu2*

培养基 Type of media	外植体类型 Type of explant	接种外植体数 No. of Exp.	出愈率 Ratio (%)	愈伤生长 Growth and status of calli
MS	下胚轴	50	100	+++ 疏松乳白
	子叶	50	86	+++ 疏松淡黄▲
	叶	50	100	++ 较紧密白
	茎	20	100	+++ 疏松淡黄白
MSB	下胚轴	50	100	++++ 疏松乳白
	子叶	50	96	++++ 疏松淡黄
	叶	50	100	+++ 疏松黄白
	茎	20	100	++ 疏松浅黄▲
LS	下胚轴	50	100	++ 疏松乳白
	子叶	50	100	++++ 疏松淡黄▲
	叶	50	100	++++ 疏松黄白
	茎	20	100	++ 疏松黄白
B ₅	下胚轴	50	100	++++ 疏松
	子叶	50	100	++++ 疏松▲
	叶	50	100	++ 较疏松
	茎	20	100	+ 浅黄较疏松
N ₆	下胚轴	50	100	+++ 较疏松
	子叶	50	100	+++ 较疏松有根分化
	叶	50	98	++++ 较紧密
	茎	20	100	+ 较疏松
Nitsch	下胚轴	50	0	-
	子叶	50	50	+ 死亡
	叶	50	0	-
	茎	20	0	-
White	下胚轴	50	0	-
	子叶	50	10	+ 死亡
	叶	50	0	-
	茎	20	0	-

注:培养基中激素成分为 6BA2.5mg/L + 2,4-D1.0mg/L, ▲示愈伤成苗为一次性成苗。

表 13 显示 MS、MSB、LS、B₅、N₆ 五种基本培养基对苳麻愈伤诱导效果均较好，出愈率几乎全为 100%，愈伤量也较大。但不同外植体间对基本培养基反应不一致。下胚轴在五种培养基中出愈率均为 100%，愈伤生长量在 MSB 和 B₅ 中最大，MS 和 N₆ 中较大，LS 中愈伤量较小，说明下胚轴脱分化要求较高有机成分。五种基本培养基对子叶的诱导均好，LS、B₅、MSB 培养基上出愈率、愈伤量均最大，且 LS 中一次分化频率 40%，B₅ 中一次分化频率 10%；N₆ 上出愈率和生长量也较大，但只有根分化，MS 上虽然出愈率略低于前四种处理为 86%，但生长量较大，且有 10% 的分化频率。子叶在 Nitsch 和 White 培养基上也能启动脱分化，分别有 50% 和 10% 的出愈率，但生长势较弱，不久死亡。可见子叶是最易脱分化和分化的外植体。叶片在五种培养基上出愈率均高达 98% 以上，愈伤生长势以 LS、N₆ 中为最高，MSB 次之，MS 和 B₅ 上较弱，说明叶对培养基中有机成分要求不高，但高有机含量对其生长无负面影响。茎的出愈率是最高的，都为 100%，但愈伤生长势除在 MS 中较强外均较弱，B₅、N₆ 中最弱，但在 MSB 培养基上有 30% 的一次性分化成苗率，可见 MS 利于茎的脱分化及愈伤生长，MSB 利于茎的分化；同时说明茎外植体要求培养基营养成分齐全，有机成分较高有利于茎成苗。Nitsch、White 两种基本培养基对苳麻外植体脱分化极为不利，除子叶有少量出愈外，其余外植体均不见启动脱分化，且在 Nitsch、White 上也不利于愈伤增殖，子叶愈伤生长微弱，不久死亡。为了探讨不同基本培养基对不同基因型苳麻的诱导是否具有相同效应，用湘苳 2 号、湘苳 6 号叶片为外植体，进行愈伤诱导，用称量法得出愈伤量。结果见表 14 和表 15。从表 14、表 15 可以看出，七种基本培养基中 Nitsch 和 White 培养基对湘苳 6 号、湘苳 2 号叶片都不能诱导出愈，其余五种基本培养基均能诱导出愈，出愈率 98% 以上，几乎全为 100%。



但从愈伤量来看，两种基因型对培养基反应不一（见图 3）。所有处理中湘苳 2 号叶片愈伤量比湘苳 6 号愈伤量都要大，且两种基因型叶愈伤质地不同，湘苳 2 号愈伤较疏松，湘苳 6 号叶愈伤较紧密，这可能是两种基因型对激素成份反应不同的结果。基本培养基对湘苳 2 号的效应是 LS>N₆>MSB>MS>B₅，而对湘苳 6 号的效应是 MS>MSB>N₆>LS>B₅。可以肯定基因型间对基本培养基的要求是有差别的，但对脱分化

的启动没有影响, 只是对愈伤组织增殖速度有影响。从上面结果可以肯定 B₅ 对苎麻叶外植体诱导效应较差。

表 14 不同基本培养基对湘苎 6 号叶片愈伤诱导的效应

Table 14 Effects of different media on induction of calli from the leaves of *xiangzhu 6*

培养基 Type of medium	接种的外植体 块数 No. of Exp	出愈率 Ratio (%)	愈伤量 Weight (g)	愈伤状况 Status of callus
MS	50	100	6.760	叶面突起状
MSB	50	100	4.645	叶面突起状
LS	50	100	4.165	叶面突起状
B ₅	50	100	3.37	叶面突起状
N ₆	50	100	4.205	硬块状
Nitsch	50	0	0	褐死
White	50	0	0	褐死

表 15 不同基本培养基对湘苎 2 号叶片愈伤诱导效应

Table 15 Effects of different media on induction of calli from the leaves of *xiangzhu 2*

培养基 Type of medium	接种的外植体 块数 No. of Exp.	出愈率 Ratio (%)	愈伤量 Weight (g)	愈伤状况 Status of callus
MS	50	100	8.730	浅黄色、较疏松
MSB	50	100	10.630	浅黄、乳白、疏松
LS	50	100	12.220	浅黄、疏松
B ₅	50	100	7.715	浅黄、疏松
N ₆	50	98	11.665	浅黄、灰白、较疏松
Nitsch	50	0	0	褐化死亡
White	50	0	0	褐化死亡

2.2 不同基本培养基来源愈伤的分化

将湘苎 2 号和湘苎 6 号叶愈伤继代在 MSB+6BA2.5 mg/L+IAA0.5 mg/L+AC20g/L、MS+6BA2.5 mg/L+NAA0.5 mg/L+AC20g/L 两种分化培养基中分化。来源于 LS 和 MSB 培养基的湘苎 2 号叶愈伤在 MSB+6BA2.5 mg/L+NAA0.5 mg/L+AC20g/L 分化培养基中 15-20d 分化出再生苗, 再生分化率为 10%。湘苎 6 号来源愈伤未见分化, 可见较高有机成分有利于苎麻愈伤分化。

2.3 七种基本培养基部分离子浓度及有机成分比较分析

七种基本培养基的部分 N、P、K 和 Cu、Mo、Co 离子浓度及有机成分列于表 16。

表 16 七种基本培养基几种离子浓度和有机物成份比较

Table 16 Comparison of ion concentration and organic regredient of basic mediums

离子与 有机物 Ion and organic matter	单位 Unit	培 养 基 Basic medium						
		MS	MSB	LS	B ₅	N ₆	Nitsch	White
NO ₃	mmol/L	39.41	39.41	39.41	25.00	27.99	18.40	3.33
NH ₄		20.62	20.62	20.62	2.00	7.01	9.00	-
总 N		60.03	60.03	60.03	27.03	35.00	27.40	3.33
P		1.25	1.25	1.25	1.08	2.94	0.50	0.138
K		20.05	20.05	20.05	25.00	30.93	9.90	1.66
Cu	umol/L	0.10	0.10	0.10	0.10	-	0.01	0.04
Mo		1.00	1.00	1.00	1.00	-	1.00	0.007
Co		0.10	0.10	0.10	0.10	-	-	-
有机物	mg/L							
肌醇		100	100	100	100	-	100	100
烟酸		0.5	1	-	1	0.5	0.5	0.3
盐酸吡哆醇		0.5	1	-	1	0.5	0.5	0.1
盐酸硫胺素		0.1	10	0.1	10	1	0.1	0.1
甘氨酸		2	-	-	-	2	2	3

从表 16 中可见 B₅ 相对其余几种培养基无机总氮含量较低, 而有机物含量较高; LS 中有机成分仅有肌醇和盐酸硫胺素; N₆ 中缺乏 Cu、Mo、Co 等微量成份和有机成份肌醇, 相对而言 MS、MSB、B₅ 成份较齐全。可见对苎麻而言, Cu、Mo、Co 等微量成份并不是必需的, 对某些基因型(如湘苎 2 号)或某些外植体类型如子叶、叶、下胚轴脱分化没有任何影响, 且愈伤生长势强。另一方面, 对苎麻而言, 并非有机成份越齐全越有利于脱分化和这种高有机成份培养基来源的愈伤其后的分化。LS 对叶、子叶脱分化及分化均有好的效应, 说明对叶、子叶而言, 加入甘氨酸、烟酸、盐酸、吡哆醇等成份不仅不能促进脱分化及分化, 反而不利。而具有较充足有机成份的 MSB、B₅、MS 对下胚轴、茎的脱分化、分化是极有利的。

Nitsch 和 White 两种培养基对苎麻诱导作用很差, 几乎不能启动脱分化, 其原因是 White 主要是大量成分总 N 含量、P、K 含量均低, 分别为 3.33、0.138、1.66 mmol/L, 不能满足外植体脱分化的营养需求, 而 Nitsch 总 N 含量为 27.40 mmol/L (比 B₅ mmol/L 的 27.03 mmol/L 高) 但 P、K 仅分别 0.50、9.90 mmol/L, 与 MS、MSB、LS、B₅、N₆ 比均低很多, 因而, Nitsch 不利于苎麻脱分化的限制因子可能是 P、K 含量低。可见苎麻脱分化要求大量成分中 N、P、K 的含量较高。

3 光温条件及碳源对苎麻愈伤生长及分化的影响

3.1 不同处理出愈率及愈伤状况

35d 后观察所有处理组合在培养基 MS+BA2.5mg/L+ 2,4-D1.0mg/L 中出愈率均为 100%，即全部脱分化。凡光照条件下的下胚轴愈伤呈淡黄色，或略呈浅绿色泽，较紧密，但全光照条件下愈伤明显呈块状，且色泽更浅。黑暗条件下培养的愈伤呈透明状，乳白色，较疏松，也有少数带有墨绿色色素但结构紧密，可能是材料营养状态及个体差异所致。不同温度条件下的各处理愈伤状态较一致，但生长势有所不同。用蔗糖作碳源的处理光照下愈伤色较深，且较疏松一些，而葡萄糖作碳源的处理所长出的愈伤色浅，光照下呈白中有浅绿色泽，较紧密，愈伤块表面明显突起状。

3.1.1 不同光照条件与碳源对苧麻愈伤生长的影响

光照条件与碳源两因素 (3×2) 试验愈伤量结果列于表 17。

表 17 三种光照时间两种碳源处理的愈伤产量

Table 17 The callus weight of different light hour and different carbohydrate source condition

		(a=3, c=2, n=3, acn=18)		(g)	
光照时间	碳源类型 (C)		总和 Ti	Yi	
Light hour	Type of carbohydrate source		Total	Average	
(A)	C1	C2			
A1	1	5.98	10.08	48.39	8.07
	2	5.55	9.54		
	3	6.12	11.12		
	Tij.	17.65	30.74		
A2	1	10.50	23.34	99.47	16.58
	2	9.87	18.76		
	3	11.09	25.91		
	Tij.	31.46	68.01		
A3	1	10.48	8.28	54.45	9.08
	2	10.01	6.37		
	3	10.32	8.99		
	Tij.	30.81	23.64		
总和	T. j.	79.92	122.39	T=202.31	
平均	Y. j.	8.88	13.60		

表 18 三种光照时间两种碳源培养基的愈伤产量方差分析表

Table 18 Analysis of variance of callus weight

变异来源	DF	SS	MS	F	F _{0.05}	F _{0.01}
Source						
处理组间	5	519.37	103.87	43.10 ^{**}	3.11	5.06
光照时间(A)	2	259.60	129.8	53.86 ^{**}	3.89	6.93
碳源(C)	1	100.21	100.21	41.58 ^{**}	4.75	9.33
A×C	2	159.56	79.78	33.10 ^{**}	3.89	6.93
试验误差	12	28.91	2.41			
总变异	17	548.28				

F 测验结果如表 18。方差分析结果表明，A×C 互作显著，处理组间、光照时间、碳源的效应间差异都是极显著的。光照时间×碳源互作显著，说明处理组合的

效应不是各单因素效应的简单相加，而是光照时间处理效应随碳源不同而异。需进一步比较各处理组合的平均数，用新复极差测验。

表 19 处理组合平均数的新复极差测验

Table 19 Shortest significant ranges test of different treatments

处理组合 Combinations	平均数 (g) Mean	差异显著性 Difference significance	
		0.05	0.01
A2C2	22.67	a	A
A2C1	10.49	b	B
A3C1	10.27	b	B
A1C2	10.25	b	B
A3C2	7.88	c	C
A1C1	5.88	c	C

由表 19 可见，A2C2 处理组合愈伤量显著地高于其他处理组合，其次是 A2C1、A3C1、A1C2，它们之间无显著差异，但 A2C1、A3C1、A1C2 均极显著的高于 A3C2、A1C1，A3C2 与 A1C1 之间并无显著差异。光照时间处理 (A) 间的 F 测验极显著，因而进一步进行各光照时间处理平均数的比较。

表 20 光照时间处理平均数的新复极差测验

Table 20 Shortest significant ranges test of different temperature treatments

光照类型 Light	平均数 (g) Average	差异显著性 Difference significance	
		0.05	0.01
A2	16.58	a	A
A3	9.08	b	B
A1	8.07	b	B

由表 20 可见，A2 与 A3、A1 间均有极显著的差异，但 A3 与 A2 无显著差异。碳源处理间的 F 测验极显著。进一步进行各碳源处理平均数的比较。

表 21 不同碳源平均数的新复极差测验

Table 21 Shortest significant ranges test of different temperature treatments

碳源类型 Type of carbohydrate source	平均数 (g) Average	差异显著 Difference significance	
		0.05	0.01
C2	13.60	a	A
C1	8.88	b	B

由表 21 可见，C2 处理的愈伤产量极显著高于 C1 处理。

综上所述，用葡萄糖作碳源比用蔗糖对愈伤生长更有利。就光照条件而言，12h 光照/12h 黑暗最有利于苎麻愈伤的生长，其次是全光照条件的愈伤量较大，黑暗条件下愈伤生长最慢，但差异不显著。

碳源是培养基的基本成分,是作为一种参与代谢的能量物质来调节愈伤生长的,一般外植体即使是绿色叶片的光照下培养也不能自养。试验中 A2 处理即 12h 光照 / 12h 黑暗条件下,用葡萄糖作碳源的愈伤产量极显著高于用蔗糖作碳源的处理,说明此种光照条件下外植体以葡萄糖为能量代谢物质更有利于愈伤生长。用葡萄糖作碳源在黑暗 (0h 光照 / 24h 黑暗) 和全光照 (24h 光照 / 0h 黑暗) 条件下,愈伤生长量均极显著低于 12h 光照 / 12h 黑暗下处理。用蔗糖作碳源的处理在 12h 光照 / 12h 黑暗条件和 24h 光照条件下愈伤生长量均极显著高于黑暗 (0h 光照 / 24h 黑暗) 条件下,说明用蔗糖作碳源时有光照总会比黑暗条件下愈伤生长快,而用葡萄糖作碳源时则不然。

3.1.2 不同温度条件下不同碳源对苾麻愈伤生长的影响

四种温度条件、两种碳源 (4×2) 处理愈伤产量结果列于表 22。

表 22 四种温度条件两种碳源处理的愈伤量

Table 22 The callus weight of different temperature condition and different carbohydrate source condition

		(t=4, c=2, n=3, tcn=24)		(g)	
温 度	碳源类型 (C)			总和 Ti	平均 Yi
Temperature	Type of carbohydrate source			Total	Average
(T)	C1	C2			
T1	1	3.59	4.77	22.20	3.70
	2	3.51	3.52		
	3	3.13	3.68		
	Tij.	10.23	11.97		
T2	1	5.36	9.01	40.56	6.76
	2	5.25	8.34		
	3	5.11	7.49		
	Tij.	15.72	24.84		
T3	1	5.19	12.05	46.98	7.83
	2	4.96	10.05		
	3	4.76	9.97		
	Tij.	14.91	32.07		
T4	1	3.95	13.14	50.13	8.36
	2	3.69	12.95		
	3	3.58	12.82		
	Tij.	11.22	38.91		
总和	T. j.	52.08	107.79	T=159.87	
平均	Y. j.	4.34	8.98		

表 23 四种温度条件两种碳源培养基的愈伤量的方差分析表

变异来源 Source	DF	SS	MS	F	F0.01
处理组组合	7	269.32	38.47	240.44**	4.03
温度(T)	3	78.09	26.03	162.88**	5.29
碳源(C)	1	129.32	129.32	808.25**	8.53
T×C	3	61.91	20.64	129.00**	5.29
试验误差	16	2.52	0.16		
总变异	23				

表 24 处理组合平均数的新复极差测验

处理组合 Combinations	平均数 (g) mean	差异显著性 difference significance	
		0.05	0.01
T4C2	12.97	a	A
T3C2	10.69	b	B
T2C2	8.28	c	C
T2C1	5.24	d	D
T3C1	4.97	d	D
T1C2	3.99	e	E
T4C1	3.74	e	E
T1C1	3.41	e	E

结果显示, T4C2、T3C2、T2C2 愈伤生长量与其他处理组间差异达极显著水平, 且三组间差异都达极显著水平; T2C1、T3C1 间差异不显著, T1C2、T4C1、T1C1 间不显著, 但前者与后者间有极显著差异。温度处理平均数的新复极差测验结果列于表 25。

表 25 温度处理平均数的新复极差测验

温 度 Temperature	平均数 (g) Mean	差异显著性 difference significance	
		0.05	0.01
T4	8.36	a	A
T3	7.83	b	A
T2	6.76	c	B
T1	3.7	d	C

表 26 碳源处理平均数的新复极差测验

碳 源 Type of carbohydrate source	平均数 (g) Mean	差异显著性 Difference significance	
		0.05	0.01
C2	8.98	a	A
C1	4.34	b	B

总的来看, 在 23—30℃ 范围内, 较高的温度条件下利于愈伤生长, 用葡萄糖作碳源

比用蔗糖利于愈伤生长,从表 25 结果看,用葡萄糖作碳源时,愈伤生长量在 30℃、28℃、25℃条件下均极显著大于 23℃条件下,且 30℃、28℃、25℃之间随温度降低,愈伤量均减少,且差异极显著;而用蔗糖作碳源时,四种温度条件下 25℃和 28℃条件下愈伤产量均极显著高于 23℃和 30℃条件下的愈伤产量。可见,用蔗糖作碳源诱导苧麻愈伤时,在 25—28℃的温度范围有利于愈伤组织的增殖,而过高(高达 30℃)或者过低(低达 23℃)都是不利的。

3.2 不同来源愈伤组织的分化

不同光照条件不同碳源、不同温度条件下不同碳源来源的愈伤分别继代在 MS+6-BA1.0mg/L+GA₃0.5mg/L+AC2%的分化培养基中,20-25d 后来源于葡萄糖作碳源的 23℃条件下愈伤和用葡萄糖作碳源的 12h 光照条件下(A2C2 处理处于 25℃条件下)愈伤分化出苗,分化率均为 10%,但 A2C2 来源愈伤分化苗早而壮。可见葡萄糖作碳源利于愈伤分化,而较低温度条件下生长的愈伤分化能力强。因而,从有利于分化和再生的角度看,光照处理是对分化有利的,而相对较高温条件虽然能比较好的促进愈伤增殖,但这种来源的愈伤组织分化再生能力不如相对较低的温度条件下生长的愈伤。

4 基因型对苧麻愈伤组织诱导及分化的影响

表 27 基因型对叶愈伤诱导的效应

Table 27 Effects on induction of callus from leaves of genotypes

编号 No.	激素组合 Hormones		出愈率及生长势 Ratio and Growth				
	6-BA	AUX	巴西麻 1 号	巴西麻 6 号	宜章雅麻	大叶绿	黄壳早
		2,4-D					
1	2.5	0.5	100++	100++	36+	100++▼	100+++
2	2.0	0.5	100++	100++▼	52++	100++▼	100+++
3	1.0	0.5	100+++	100++▼	57+++	100++▼	100+++▼
4	0.5	0.5	100++++	100++▼	50++	100++▼	100+++▼
		IAA					
5	2.5	0.5	10+	12+++	0	0	94++
6	2.0	0.5	18+	15+++	0	0	100++
7	1.0	0.5	60+	20++▼	0	0	100++
8	0.5	0.5	56+	21+	0	0	100+
		IBA					
9	2.5	0.5	0	0	0	0	100+
10	2.0	0.5	0	12+▼	0	24+	100+
11	1.0	0.5	0	10+▼	0	16+	100+++
12	0.5	0.5	0	10+▼	0	30+	96+
		NAA					
13	2.5	0.5	98+	100+++	95+++++	100+++	81+
14	2.0	0.5	100+	100+++++▼	80+++++	100+++	83+
15	1.0	0.5	0	100+++++▼	80+++++	100+++▼	100+
16	0.5	0.5	24+	100+++++	84+++++	100+++	80+

(续表 27)

编号 No.	激素组合 Hormones		出愈率及生长势 Ratio and Growth					
	6-BA	AUX	华苳 3 号	华苳 4 号	湘苳 6 号	湘苳 2 号	芦竹青	2004-1
		2, 4-D						
1	2.5	0.5	100++	100+++	100+++	100+++	100+++	0
2	2.0	0.5	100+++	100+++	100+++	100+++	100+++	0
3	1.0	0.5	100+++	100+++	84+++	100+++	100++++	0
4	0.5	0.5	100+++	100+++	82+++	100+++	100+++++	0
		IAA						
5	2.5	0.5	100++▼	0	0	76+++	12+	0
6	2.0	0.5	100++▼	0	0	50+++	15+	0
7	1.0	0.5	100++▼	0	0	100+++▼	10+	0
8	0.5	0.5	30++▼	0	0	95+++	8+	0
		IBA						
9	2.5	0.5	100+++▼	0	0	100+	0	0
10	2.0	0.5	100++▼	12+	0	100+	0	0▼
11	1.0	0.5	100++▼	0	0	100+++	0▼	0
12	0.5	0.5	100++	0	0	100++	0	0
		NAA						
13	2.5	0.5	100+++	100+++	95+++++	100+++	90+++	0
14	2.0	0.5	100+++▼	100++++	91+++++	98++	100+++++	0
15	1.0	0.5	100++	100++++	90+++++	91++	100++++	0
16	0.5	0.5	100++	100+++++	98+++++	50+	100++++	0

注：▼示有分化苗。

表 27 中十一种基因型的愈伤诱导效应存在差异。总体上看黄壳早和湘苳 2 号、华苳 3 号、巴西麻 6 号基因型较易脱分化，在 16 个组合中均有很高的出愈率。黄壳早为 80% 以上，湘苳 2 号 50% 以上，而华苳 3 号全为 100%。2004-1 品系的脱分化难，在 16 组合上出愈率均为 0，但在 6BA2.0+IBA0.5 的 MS 培养基上直接有芽苗生出。除 2004-1 外，所有基因型在 6-BA0.5-2.5mg/L+NAA0.5mg/L 和 6-BA0.5-2.5mg/L+2, 4-D0.5 mg/L 的组合中，均有较高的出愈率。此两种组合是苳麻叶愈伤诱导的适用性最广的配方组合。

基因型在 BA+IAA 和 BA+IBA 组合培养基上出愈差异较大。华苳 3 号对这两种组合较适应，表现高的出愈率和一次性成苗率，巴西麻 6 号在这两组合上虽然出愈率较低，仅 10-20%，但仍能一次性分化成苗。湘苳 2 号在 6-BA1.0+IAA0.5 组合上出愈率 100%，且一次性分化率达 10%。巴西麻 1 号、宜章雅麻、大叶绿、华苳 4 号、湘苳 6 号、芦竹青、2004-1 叶在 6-BA+IAA 和 6-BA+IBA 组合中启动脱分化效果差。

从分化难易程度上看，除 2004-1 外的十种基因型中最易分化成苗的基因型是巴西麻 6 号，在 9 个组合中均有成苗，其次是华苳 3 号，在 8 种组合中成苗，大叶绿和黄壳早在 BA+2, 4-D 组合中能一次性分化苗，湘苳 2 号在 BA1.0+IAA0.5 组合中

分化。而巴西麻 1 号、宜章雅麻、华苎 4 号、湘苎 6 号、芦竹青未见成苗。继代在 MSB+6-BA1.0+NAA0.1+GA30.5+AC2% 的分化培养基中, 仍未见分化。

5 苎麻组培快繁技术研究

5.1 叶面生芽

将带有几片叶的试管苗直接插入 MS+BA2.5mg/L+NAA0.1mg/L (胡继金, 1991) 固体培养基中, 让叶片尽可能接触到培养基直接诱导叶片生芽。一周后即可发现苗接触到培养基的茎、叶部均愈伤化, 且叶片产生红色色素。叶面愈伤化后, 从愈伤上分化出芽体, 同时茎节上腋芽也迅速萌动发出大量丛生苗。并未发生叶面直接生芽。

叶片接于 MS+6-BA2.5mg/L+IBA0.5mg/L 中有叶面直接出芽, 但频率不高, 仅 10% 的出芽率 (见图版 II)。显微镜下观察叶表状况, 可见有大量突出, 呈芽状体, 但出芽似乎受到抑制, 最终愈伤化。关于直接生芽的机理仍有待进一步研究。

胡继金 (1991) 用 MS+BA2.5mg/L+NAA0.1mg/L 组合处理黄壳早叶片, 不经过愈伤化, 直接诱导出大量叶面芽体。本试验用这一组合未能成功诱导叶面大量生芽, 而是愈伤后再分化出芽。但在 MS+6-BA2.5mg/L+IBA0.5mg/L 组合中有 10% 直接出芽, 这可能是由于所用材料基因型不同所致。可以肯定, 苎麻叶面直接出芽是一无性扩繁的良好途径, 但不同基因型对诱导直接出芽的培养基激素有不同要求, 需逐一探索, 而且诱导出芽率不高, 也是制约应用的一大难题。其出芽机理尚待更深入研究。

5.2 试管苗移栽成活技术

组织培养法实行苎麻快速工厂化繁殖的关键技术是试管苗移栽成活技术。成活率的高低直接决定种苗的成本, 成活率越高苗成本越低。影响试管苗移栽成活的因素有苗素质、洗根与否, 炼苗时间等, 本试验主要研究这三因素与试管苗移栽成活率的关系。

5.2.1 小试管苗壮苗生根

表 28 四种培养基中苗长势与根的发生

Table 28 Growth and rooting of seedlings on four medium

培养基 Medium	苗长势 Growth	生根时间与方式 Rooting
MS ₀	较慢	30d 发根慢, 切口处有少量根
MS+NAA0.1mg/L	快, 节间长	6d 茎下端愈伤后生大量根, 细
1/2 MS+NAA0.1mg/L	快, 节间稍长	6d 茎下端愈伤后生大量根, 细
B ₅	稳长	20d 直接于切口处生根, 相较 MS ₀ , 根多

表 28 中四种培养基中, 凡加 NAA0.1mg/L 的组合中均是在愈伤上长出的大量细根, 洗根时容易将根洗掉或不易将培养基洗净, 而在 MS₀ 培养基上发根慢, 根粗但数目少, B₅ 中生根数较多, 较 MS₀ 稍快。从苗的生长看, 加入 NAA0.1mg/L 苗长势较旺,

节间长, 叶大, 移栽时易失水萎缩, 但 1/2 MS+NAA0.1mg/L 中的苗节间稍短。MS 中长苗较慢, 不利于快速增殖, B₅中则稍快。所以, 用 1/2 MS+NAA0.1mg/L、B₅长苗生根。

水培生根。将 4—5 叶以上试管苗取出后从茎基部剪下, 直接插入装有凉开水的小烧杯中, 苗茎基 1/3 插入水中, 7—10d 后就有白色根点发出, 15d 后长出大量长的白根, 而且由于插入水中, 幼苗叶不会萎缩。

5.2.2 移栽苗叶数及茎粗

将试管苗移出后用自来水清洗根部培养基, 移入钵中后当即浇透水, 置于室内进行适应性炼苗。7d 后统计成活率, 结果见表 29。

表 29 不同叶数茎粗苗移栽成活率

Table 29 Surviving rate of seedlings with different green leaves and stem diameter

苗	叶数	茎基粗	成活率
Seedling	No.of leaves	Stem diameter	Surviving rate
大苗	6—7	2mm 以上	90%以上
中苗	4—5	1—2mm	74%
小苗	3	1mm 以下	0% (2d 后死亡)

可见, 移栽苗在 5 叶以上, 茎粗 2mm 左右的成活率高。

5.2.3 炼苗

全部用 5 叶以上、茎粗 2mm 左右的中等以上素质苗进行试验。移入钵中后, 在室内炼苗天数设计为 0d、2d、4d、6d、8d 后移室外荫棚内, 15d (前 8d 在 1/4 自然光强下, 后 7d 在 1/2 自然光强下生长) 后即移入大田。移入荫棚后, 为了保湿每天用喷壶喷水。同时喷 1000 倍的多菌灵液防病, 成活率结果分别是 0%、25%、39%、70%、85%。可见在室内炼苗时间越长, 成活率越高, 为保证成活率在 80% 以上应炼苗 8d 以上。1/4 光照荫棚成活后, 逐渐加大光照至 1/2 自然光强度。15d 左右即可安全移入大田。

讨 论

1 关于苎麻脱分化

苎麻各种外植体脱分化比较容易(除少数基因型外),且苎麻脱分化对激素的种类要求不严格。一般凡添加 6-BA 或 2, 4-D 的组合(浓度在 0.2mg/L 以上)几乎都能诱导形成愈伤,说明苎麻内源激素含量较高,种类较齐全。细胞分裂素 ZT 启动苎麻脱分化速度快于 6-BA 和 KT,但 ZT 来源的愈伤不易再生分化芽苗;KT 最易诱导愈伤生根,但 6-BA 预培养试管苗来源的茎、叶外植体在 KT1.0mg/L+2,4-D0.5mg/L 的培养基上脱分化、分化均好,是一较好组合。不同生长素类调节物质作用于苎麻叶外植体时,其脱分化后愈伤生长的方式略有不同。添加 IAA 和 IBA 时整个叶外植体表面长出突起状愈伤,最终全部愈伤化,色较暗黄而透明;添加 NAA 和 2,4-D 时叶外植体往往先从叶缘开始愈伤化,后整体愈伤化,色较亮白不透明。其原因可能是苎麻叶外植体对不同生长素类的吸收方式不同或者是不同生长素类的作用方式不同。

2 苎麻愈伤组织分化及分化途径

愈伤组织的分化主要取决于愈伤组织的质量,愈伤组织质量的好坏与材料基因型及所用培养基中的碳源、激素、有机附加物等一系列因素有着直接的关系。苎麻愈伤组织容易进行一次性分化,即在脱分化培养基中不继代直接分化出芽苗。只有来源于附加了 6-BA 的脱分化培养基中的愈伤于脱分化后 25-30d 继代在 MS 或者 MSB 附加 6-BA1.0mg/L+GA₃0.5mg/L 的分化培养基中易分化,故 6-BA 是苎麻分化必需的调节物质。这一点和前人的结果一致。培养基中加 2%AC 能促进分化,原因可能是 AC 能吸附愈伤生长过程中的某些抑制分化的物质。加 AgNO₃ 也有利于促进分化,作用机理可能同 AC 一样。试验中即使将继代过 6 次的分裂亢进型疏松的愈伤放在有 AgNO₃ 的分化培养基上也能有明显的团粒状愈伤出现,且有绿点状芽点发生。加入有机附加物 CM、LH 等利于愈伤的保存,促进分化;TJ 的作用甚微,虽然愈伤仍能有微弱生长而且保持长时间不变且颗粒化较好,但分化率不高。而 YE 对苎麻愈伤有负作用,加入后愈伤迅速褐化死亡,可能其中含有某种对苎麻愈伤生长有副作用的物质或者引起苎麻愈伤褐化的物质。

苎麻愈伤不耐继代,继代超过两次以上的(15-20d 继代一次)分化率大大降低,可能是由于多代继代后苎麻染色体变异更大的缘故。关于培养细胞染色体变异发生时间有两种观点。Jiang J 等(1994)认为只有长期培养的愈伤组织再生的植株才有变异,而 Winfield M O 等(1995)认为在培养初期愈伤组织染色体就已经发生

变异, 长时间的培养提高变异频率。试验中曾用液体培养法观察了苎麻愈伤细胞的生长和分裂发现, 最初 30d±生长的愈伤细胞分裂旺盛且胞质浓, 但很多细胞发生畸形分裂; 随着培养时间的延长愈伤细胞胞质越来越少, 最后逐渐成为空的死细胞。可以推测苎麻愈伤染色体变异发生较早。

苎麻愈伤分化均为器官发生型途径, 即愈伤组织先分化出茎芽, 周围的愈伤又分化出根的方式。苎麻胚状体形成困难。试验中仅在愈伤中发现极少类似胚状体的组织, 但没有进一步切片观察证实。寻求苎麻胚状体发生途径尚需进一步细致的摸索。

3 关于激素的作用机理

外源激素在组织培养中的作用已经是不争的事实, 不同植物对激素的要求或者说适应性不同也已经被广泛证实。然而, 激素是如何影响外植体脱分化和分化的, 激素对不同的植物、不同的外植体影响的方式或者作用的途径有何异同, 目前尚无定论。研究证明特异 DNA 序列的甲基化与基因活性的调节有关, 不活动或者持续失活的基因甲基化程度高, 活跃的或持续表达的基因常是低甲基化的。OKKels (1988) 认为, 在体外培养时, 激素的作用是通过培养物体内乙烯含量的变化来控制 DNA 的甲基化程度, 而低水平的 DNA 甲基化是胚胎发生所必需的。2, 4-D 与 DNA 甲基化有关。高浓度的 2, 4-D 可使 DNA 甲基化程度高从而抑制基因的表达, 反之, 低浓度的 2, 4-D 降低 DNA 甲基化程度, 使基因得到表达。诱导愈伤用高浓度的 2, 4-D, 而体胚的发生在低浓度的 2, 4-D 条件下 (Loschiava F 等, 1989)。因此在培养基中加入适量的特定种类的激素, 可以改善愈伤组织的生长, 控制体细胞胚的发生。苎麻对 2, 4-D 的用量不敏感, 试验中曾经用 6-BA10.0mg/L+2, 4-D5.0mg/L 的 MS 培养基诱导湘苎 2 号不同外植体, 出愈率均为 100%, 且生长较好, 结构紧密; 但降低 2, 4-D 用量所形成的愈伤质地较疏松。

外源激素是通过影响内源激素的含量而起作用的说法已经得到很多研究者的认同。有许多研究证明在脱分化和分化过程中内源激素的变化与外源激素有关。关于内源激素的研究, 徐武等 (1997) 发现低温预处理过程中大麦花药内源激素 IAA 有明显升高的趋势。简玉瑜等早在 1980 年研究了水稻愈伤绿苗分化率与内源激素的关系, 认为水稻种子及幼穗愈伤组织绿苗分化率与内源激素有关, 内源 ABA、IAA 含量高则愈伤组织绿苗分化率高。大豆花药愈伤组织中内源激素分析表明, 愈伤组织中内源激素 ABA、ZT、IAA 和 GA₃ 严重缺乏。基因型、外植体对脱分化及分化的决定作用归根结底是由于其内源激素的含量不一致, 这种不一致必然导致在用同一种外源调节物质去诱导不同基因型, 不同外植体类型的作用效应的差异。香雪兰培养前两端 IAA 含量无显著差异, 经过一段时间培养后胚发生端 IAA 含量明显高于非胚发生端, 表明内源激素在体胚发生过程中起关键作用 (Wang L, et al. 1998)。棉花基因

型对体细胞胚胎发生和植株再生起着决定性作用(张宝红等, 1992)。因而, 培养材料的素质对愈伤诱导是至关重要的。同一基因型同种外植体来源于不同生长状态的植株其内源活性物质的含量及分布均有差异。在试验中, 来源生长健壮、叶色正常的较嫩的植株的材料最易脱分化, 且愈伤质地状态好, 生长量也较大, 易于分化, 而凡是来源于生长弱的或叶色黄绿的生长不良的材料, 一般不能诱导愈伤, 很快死亡, 因而这种材料应避免使用。

苎麻对培养基中激素成分的反应表明其内源激素含量较高, 且从下胚轴、子叶、茎、叶对激素的要求看, 茎、叶中含内源激素可能较低, 而且茎中所含的内源生长素类调节物质量较叶中低, 但分裂素类物质含量比叶高些。含内源激素较高的外植体是子叶, 因为子叶是最易启动脱分化的外植体, 而且子叶愈伤质地好易颗粒化; 其次是下胚轴。苎麻内源激素含量测定尚无试验研究。基因型、外植体类型、培养基及培养条件, 尽管都有各自明显或不可忽视的作用, 但它们都是对愈伤组织及培养细胞的生理状态的作用(王海波, 1991)。外植体影响愈伤状态主要是以其内源活性物质的含量及成分来决定脱分化及分化的。因而不难解释苎麻不同来源愈伤的分化的不同。

4 温光条件影响苎麻愈伤生长的机理

光照条件、温度条件对植物外植体脱分化和分化有影响已经被许多研究工作者所证实, 但不同的植物、不同基因型、不同外植体对光照条件、温度条件的要求和反应是不一致的。暗培养对不同基因型草莓叶盘再生芽诱导的作用比较复杂, 有的基因型暗培养比全光照再生芽频率高, 但有的基因型则相反(于冬梅等, 1998); 苹果叶脱分化后要正常分化黑暗环境条件是关键(达克东等, 1995)。本研究中证实苎麻脱分化和分化在光照与黑暗交替的光周期下最有利, 全光照条件比黑暗条件下有利; 光照度对苎麻有何影响尚需作进一步的研究。苎麻对温度的要求从有利于脱分化的角度较高温度有促进作用, 从有利于分化的角度则在较低温度条件下脱分化的愈伤分化率较高。也有研究认为适当低温预处理对湘苎3号叶脱分化的启动和提高分化率有作用(郭清泉等, 1998)。光是植物生长发育程序调节的扳机(trigger), 它控制着植物生长发育过程。根据光对基因表达调控的研究可以看出, 光对植物基因表达有直接和间接调控作用(刘家尧等, 1999)。从不同光照和不同温度条件对苎麻愈伤组织分化的作用效应看, 可以推测光照周期和温度变化对基因表达有影响, 但这种作用是以直接方式作用还是间接作用尚有待研究。

已经有许多研究证实培养基中加入不同碳源对植物组培有影响。这种影响有碳源类型和浓度两方面。不同碳源影响培养物生长的机理也有一些研究。Lam等(1994)用3%的蔗糖处理在暗条件下生长的拟南芥发现, 蔗糖能强烈地抑制天冬酰胺合成酶基因(ASN1)的表达, 蔗糖抑制ASN1的mRNA积累不是由于渗透效应, 是通过碳进行

代谢控制的。植物体细胞脱分化后再分化为胚性细胞是受细胞内外多种因子所调控,而这些因子作用的实质是调节特定基因的表达, mRNA 的合成在基因表达过程中起重要作用 (Dong J Z, Dunstan D I. 1996; Reinbothe C 等, 1994)。本试验结果表明不同碳源对苧麻的脱分化和分化是有影响的, 总的来说, 葡萄糖比蔗糖更有利, 这与刘彤等 (2000) 研究不同碳源对啤酒花试管苗生长的影响结果类似; 而且碳源与光照因素和温度因素间有显著的互作效应, 可见碳源在苧麻的组培中也不仅仅是简单的能量代谢物质, 而是通过生理生化途径对脱分化和分化现象在基因表达水平上有更深刻的影响。

关于基因型对光照和温度、碳源间影响以及光照强度和变温处理等尚需进一步研究。

5 关于基因型间诱导差异

基因型通过其遗传学特性决定的生化机制及进程, 控制外植体的状态, 从而决定是否脱分化和愈伤组织增殖的状态。然而, 这种对细胞状态的决定作用必须和培养基及培养条件等外部因素间良好的配合才能发生。根据细胞全能性学说, 构成植物体的每个细胞均具有全能性, 即每个细胞含有的遗传基因是相同的, 在合适的条件下所有的细胞均能表达形成完整的植物体。之所以有的基因型分化容易而有的分化困难, 是因为给予的培养条件和其培养物内在机制不相符造成的。培养容易成功的基因型, 是因为外界培养条件与内在机制吻合, 从而启动了控制细胞分化的基因的表达; 培养没有成功的基因型是因为外界条件满足不了细胞内在的需要的结果。

苧麻是无性繁殖作物, 种子后代性状分离严重, 因此组织培养中应重视基因型的研究。本试验结果表明, 基因型 2004-1 在所给的培养条件下均未能启动脱分化, 原因可能是因为培养条件与内在机制不相符合, 未能启动控制细胞脱分化的基因的表达; 同时也说明 2004-1 基因型的适应性较差。黄壳早和湘苧 2 号、华苧 3 号、巴西麻 6 号基因型适应性强, 脱分化和分化均较容易。在进一步做苧麻原生质体研究和转基因研究时首先选择适应性广或者容易脱分化和分化的基因型较易成功。试验还表明除 2004-1 外, 所有基因型在 6-BA0.5-2.5mg/L + NAA0.5mg/L 和 6-BA0.5-2.5 mg/L+2, 4-D0.5 mg/L 的组合中, 均有较高的出愈率。说明此两种组合是诱导苧麻愈伤的适用性最广的配方组合, 在对其余基因型苧麻进行组织培养时具有指导意义。

6 关于材料的一致性

苧麻是雌雄同株异花的异花授粉作物, 现有的品种都是杂合体, 遗传基础非常复杂。生产上为避免繁殖后代发生变异, 保持优良品种特性, 一般不用种子繁殖。直接来自品种茎尖培养出的试管苗可提供遗传基础基本一致的幼叶和茎段作为外植

体用于组织培养研究，但叶和茎生长愈伤的状态及质量明显不如下胚轴、子叶。下胚轴和子叶来自种子，所以种子播种发芽后的无菌苗，宜先去杂苗，留下形态长势一致的作材料。

苧麻品种的天然种子既有母系一方的遗传，又有父系一方的遗传，至少母系一方遗传特性是一致的。在生产实际中种子繁殖后代分离程度也因品种而异。苧麻由于茎、叶密被茸毛，田间来的外植体消毒困难，成功率不高，耗时耗力；可采用人工去雄和人工授粉或隔离不同品种的方法获得种子做材料，做组织培养时，能较好保证基因型的一致性，减少误差。

7 关于苧麻试管苗玻璃化

苧麻试管苗容易得到，只要将带分枝的茎节接种在添加 6-BA 1.0mg/L 的 MS 培养基（或者再加入生长素类如 IAA、IBA 2.5mg/L）中就能长出大量丛生苗，转接后可以迅速得到大量试管苗。试管苗在培养基中生长快，但容易玻璃化。

在微繁过程中，试管材料的玻璃化（Vitrification）是一种常见现象，玻璃化苗茎、叶透明状，缺绿，呈黄绿色，纤细。玻璃化原因因植物种类不同而不同。Kevers .C. 等（1984，1986）等对玻璃化原因从多角度进行研究。朱青松等（1999）提出培养基中 BA、NAA 含量高皆引起玻璃化，玻璃苗放在阳光下 6-10d 玻璃化程度减轻或恢复正常。重瓣丝石竹试管苗玻璃化也是由高浓度的细胞分裂素尤其是 BA 引起的，加入 KNO_3 可抑制玻璃化（刘非燕等，1996）；及华（1994）提出一种将刺槐玻璃化苗在合适的培养基激素配比下转化为愈伤后再生，恢复正常苗的途径，解决刺槐玻璃化问题。苧麻分枝茎段在有 6-BA 的培养基上生长时间过长时产生的丛生苗易玻璃化，但将玻璃苗转接到 NAA 0.1mg/L 的 MS 培养基上或 MS、 B_5 培养基上，改善通气条件后玻璃化苗能转化为正常苗。

8 苧麻试管苗的变异

苧麻试管苗的移栽容易成活，因而，对优良品种实行工厂化快速微繁是可行的。但由于苧麻是多年生异花受粉植物，遗传基础复杂，染色体倍性复杂，花粉母细胞减数分裂容易出现异常（宴春耕等，1997）。而 6-BA 等细胞分裂素和 2, 4-D 容易引起染色体变异（郭丽红等，1999；李亮亮等，1998；王正询等，1997；王清等，1996，1997；顾蔚，1999），用 6-BA 得到的快速微繁苧麻苗能否保持优良品种的特性尚需作田间形态和纤维品质方面进一步鉴定，或者做 DNA 水平上检测。

结 论

1. 生长调节物质对苎麻愈伤诱导及分化的效应

苎麻的容易脱分化,表明其内源激素含量较高,种类较齐全。单加 2,4-D 和 6-BA 均能快速启动苎麻下胚轴、子叶、叶、茎外植体的脱分化。单加 2,4-D 诱导的愈伤分化大量根。6-BA 与 2,4-D、IBA、IAA、NAA 组合使用诱导愈伤效果均好,生长势强; ZT 和 IBA、2,4-D 组合、KT 与 2,4-D 和 NAA 组合均有好的诱导效果。细胞分裂素类作用浓度范围 2.0-2.5mg/L,生长素类作用浓度范围 0.2-1.0mg/L,对诱导苎麻愈伤发生及增殖有较好的效应;CTK/AUX 配比大于 1 有利于苎麻愈伤诱导,愈伤出根率较低。研究表明,启动苎麻外植体脱分化效应 ZT>6-BA>KT,从愈伤增殖速度来看 ZT 和 6-BA>KT;ZT 能快速启动脱分化和使愈伤快速增殖,但愈伤容易先分化根。综合三种细胞分裂素对苎麻诱导效应,认为 6-BA 是最有利于苎麻脱分化的细胞分裂素类物质。6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L 和 6-BA 1.0 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L 培养基中分化率较高,均为 15%以上。而在 ZT、KT 为细胞分裂素的培养基中均不能使愈伤分化。在分化培养基中加入 AgNO₃ 和 AC 能提高愈伤分化率,促进愈伤颗粒化,加入 CM、LH 能加速愈伤增殖,使愈伤色浅,生命力强;但加入 TJ 和 YE 不能使愈伤分化,而且 YE 对苎麻愈伤生长有副作用。

2. 基本培养基对苎麻不同外植体愈伤诱导及分化的影响

基本培养基对苎麻不同外植体愈伤诱导及分化有不同的效应。MS、MSB、LS、B₅、N₆ 五种基本培养基对苎麻愈伤诱导效果均较好,出愈率几乎全为 100%,愈伤量也较大。Nitsch 和 White 培养基作用效果差。不同外植体间对基本培养基反应不一致。下胚轴脱分化要求较高有机成分。子叶是最易脱分化和分化的外植体。叶对培养基中有机成分要不高,但高有机含量对其生长影响不大。茎外植体对培养基营养要求成份齐全,而有机成分较高有利于茎成苗。对苎麻而言,较高大量成分总 N、P、K 含量对苎麻的脱分化和分化是至关重要的,而 Cu、Mo、Co 等微量成份并不是必需的。并非有机成份越齐全越有利于脱分化和这种高有机成分培养基来源的愈伤其后的分化。

3. 光照条件、温度条件及两种碳源对苎麻愈伤生长及分化的影响

葡萄糖作碳源对愈伤生长比蔗糖作碳源更有利。12h 光照/12h 黑暗最有利于苎麻愈伤的生长,其次是全光照条件的愈伤量较大,黑暗条件下愈伤生长最慢。用葡萄糖作碳源时,愈伤生长量在 30℃、28℃、25℃条件下均极显著大于 23℃条件下,蔗糖作碳源诱导苎麻愈伤时,在 25-28℃ 的温度范围有利于愈伤组织的增殖,而过高(高达 30℃)或者过低(低至 23℃)都是不利的。光照处理是对分化有利的,而

相对较高温度条件虽然能比较好的促进愈伤增殖，但这种来源的愈伤组织分化再生不如相对较低的温度条件下生长的愈伤。

4. 基因型对苎麻愈伤诱导及分化影响

十一种基因型对愈伤诱导效应间存在差异。总体上看黄壳早和湘苎 2 号、华苎 3 号、巴西麻 6 号基因型较易脱分化，2004-1 品系的脱分化难，所有基因型在 6-BA0.5-2.5mg/L+NAA0.5mg/L 和 6-BA0.5-2.5 mg/L+2, 4-DO.5 mg/L 的组合中，均有较高的出愈率。此两种组合是苎麻叶愈伤诱导的适用性最广的配方组合。

5. 苎麻快速繁殖技术研究

苎麻试管苗容易得到，只要将带分枝的茎节接种在添加 6-BA1.0mg/L 的 MS 培养基（或者再加入生长素类如 IAA、IBA2.5mg/L）中就能长出大量丛生苗，转接后迅速可以得到大量试管苗。最理想的长苗生根培养基是 1/2 MS+NAA0.1mg/L、B₅+0。水培生根法 15d 后长出大量长的白根，而且由于插入水中，幼苗叶不会萎缩。5 叶以上，茎粗 2mm 左右的移栽苗的成活率高。室内炼苗 8d 以上成活率越高。15d 左右即可安全移入大田。

参 考 文 献

1. 丁声俊。“入世”对我国粮食产业严峻的挑战与应对策略。粮食与油脂, 2002 (1): 21-23
2. 及 华。刺槐玻璃苗愈伤组织化再生正常植株。河北林学院学报, 1994, 9 (2): 102-104
3. 于冬梅, 胡文玉, 王关林。基因型和培养因子对诱导草莓叶片再生芽的影响。沈阳农业大学学报, 1998, 29 (2): 138-143
4. 贝丽霞。不同培养基对水稻悬浮细胞生长速率的影响。黑龙江农业科学, 1998, (2): 21-22
5. 王 力、张云孙, 陈 屹, 高 照, 张 虹, 杜 娟。影响水稻愈伤组织植株再生频率的因素研究。云南大学学报 (自然科学版), 1999, 21 (2): 113-115
6. 王 清。用组织培养法进行马铃薯体细胞染色体的加倍。甘肃农业大学学报, 1996, 31 (2): 155-159
7. 王 清, 王 蒂, 戴朝曦, 王玉萍。奈乙酸、2, 4-D 对马铃薯愈伤组织细胞染色体倍性的影响。甘肃农业大学学报, 1997, 32 (4): 304-307
8. 王冬梅, 黄学林, 黄上志。细胞分裂素类物质在植物组织培养中的作用机制。植物生理学通讯, 1996, 32 (5): 373-377
9. 王海波。组织培养中细胞状态的调控。作物杂志, 1991 (3): 3-6
10. 王景雪, 孙 毅, 崔贵梅, 刘少翔, 王果萍, 尚勇进, 王 卉。在油菜组织培养中激素及基因型对下胚轴分化的影响。中国油料作物学报。 2000, 22 (1): 10-13, 18
11. 王正询, 刘鸿先。香蕉苗试管繁殖染色体数量畸变的研究。遗传学报, 1997, 24 (6): 550-560
12. 王维荣编译。光对高等植物基因表达的调控作用。世界科学, 1989, 11 (1): 20-22
13. 王维荣, 王咏冬, 欧阳光察, 薛应龙。光质对黄瓜及蕃茄愈伤组织中分化和有关酶的影响。植物生理学报, 1991, 17 (2): 118-124
14. 达克东, 李雅志, 束怀瑞。苹果叶片愈伤组织植株再生研究。核农学报, 1995, 9 (3): 139-143
15. 冯双华, 李达模, 贾凌辉, 周建林, 李阳生。影响籼稻花药培养诱导率作用的几种因素。农业现代化研究, 1995, 16 (5): 317-320
16. 叶光国, 王连铮。大豆花药愈伤组织的分化及其内源激素分析。作物学报, 1997, 23 (5): 555-562
17. 安利佳, 李凤霞, 张俊敏, 罗希明, 何孟元, 郝水。豆科植物组织培养的研究。植物学报, 1992, 34 (10): 743-752
18. 邢登辉, 吴琴生, 刘大钧。黑麦胚性愈伤组织和体细胞胚胎形成过程中内源 IAA 和 ZT 变化的初步研究。生物工程学报, 1996, 12 (增): 295-296
19. 刘国民, 邓明其, 郑思乡。苎麻花药离体培养的研究。作物研究, 1994, (8) 增刊
20. 刘国民, 郑思乡, 周朴华, 邓明其, 李宗道。苎麻花药离体培养的研究: I 雄核发育的细胞学观察。海南大学学报, 1994, 12 (2) 121-128
21. 刘 彤, 赵虎基, 陈 芳, 崔百明, 祝建波。啤酒花茎段培养及快速繁殖技术研究。西北植物学报, 2000, 20 (5): 778-783
22. 刘非燕, 郭达初。重瓣丝石竹试管苗玻璃化发生原因初探。杭州大学学报 (自然科学

- 版), 1996, 23 (4): 382-387
23. 刘家尧, 王学臣, 梁 峰. 植物基因表达的代谢调控. 植物学通报, 1999, 16 (1): 1-10
 24. 许桂芳, 董诚明, 周吉源, 赵 洁, 熊 丽. 不同光质对华黄芪愈伤组织诱导、增殖及器官分化的效应. 华中师范大学学报(自然科学版), 1994, 28 (4): 533-537
 25. 许智宏. 植物生物技术. 上海, 上海科学技术出版社, 1998, 109-125
 26. 朱青松, 梅康凤, 王沙生. 外源生长素对烟草髓愈伤组织分化和内源 IAA 含量的影响. 北京林业大学学报, 1999, 21 (1): 22-25
 27. 陈德富, 陈喜文, 周朴华, 李宗道. 苎麻愈伤组织多样性及体细胞胚胎发生的研究. 湖南农业大学学报, 1996 (3): 239-249
 28. 陈德富. 苎麻人工种子制备技术. 见: 李宗道主编, 苎麻生物技术研究进展. 长沙, 湖南科学技术出版社, 1996, 138-169
 29. 陈德富, 陈喜文. 苎麻体细胞胚胎发生研究初报. 植物学通报, 1998, 15 (3): 65-68
 30. 陈喜文, 陈德富, 周朴华, 李宗道. 苎麻不同来源原生质体的分离和培养的比较研究. 中国麻作, 1995, 17 (3) 1-5
 31. 陈喜文, 陈德富, 周朴华, 李宗道. 苎麻悬浮细胞原生质体培养再生植株. 作物学报, 1996, 22 (1): 112-116
 32. 李宗道. 苎麻遗传. 见: 李宗道主编, 苎麻的生理生化与遗传育种. 北京: 农业出版社, 1989: 129-147
 33. 李宗道. 苎麻优良品种和品种区域化. 见: 苎麻优质高产栽培技术. 湖南科学技术出版社, 1992, 11-18
 34. 李修庆. 植物人工种子概论. 见: 李修庆主编, 植物人工种子研究. 北京: 北京大学出版社, 1990: 1-18
 35. 李浚明. 细胞的全能与器官发生. 见: 李浚明编译, 植物组织培养教程. 北京, 中国农业大学出版社, 1996, 76-94
 36. 李亮亮, 朱宝成, 成亚利, 吴爱民, 李庆余. 掌叶半夏组织培养过程中的染色体变异. 农业生物技术学报, 1998, 6 (1): 23-27
 37. 陆文梁, 梁 斌, Enomotok, Fukunaga Y. 外源激素在诱导风信子花被外植体不同部位细胞再生花芽中的作用. 植物学报, 1994, 36 (8): 581-586
 38. 谷瑞升, 蒋湘宁, 郭仲琛. 植物离体培养中器官发生调控机制的研究进展. 植物学通报, 1999, 16 (3): 238-244
 39. 何立珍, 周朴华, 刘选明, 曹学军, 曹明德. 苎不同外植体离体培养研究. 西北植物学报, 1995, 15 (4): 307-313
 40. 沈秀丽, 徐 仲. 甜叶菊组织培养条件的研究 II. 不同基本培养基、不同碳源对愈伤组织形成及芽诱导的影响. 中国糖料, 1997, (4): 9-10
 41. 张宝红, 李秀兰. 棉花体细胞胚发生和人工种子的制作. 棉花学报, 1992, 4 (2): 1-6
 42. 张宝红, 李凤莲, 李秀兰, 李付广, 刘 方, 姚长兵, 刘传亮. 基因型对陆地棉花药离体培养反应的影响. 棉花学报, 1999, 11 (2): 92-99
 43. 张丕方. 不同激素浓度及光质对烟草叶片不定芽发生的效应. 试验生物学报, 1988, 21 (4):

541-543

44. 罗琼,胡延玉,李平,李仁端.提高水稻花药培养效果的研究.四川农业大学学报,1995,13(4):487-491
45. 罗希明,谢雪菊,陈忠亮.沙打旺、红豆草和野火球外植体一次培养再生植株.中国草地,1991,6:79,47
46. 郑均宝,梁海永,王进茂,裴东,李际泉.杨和苹果离体茎尖培养和愈伤组织分化与内源 IAA、ABA 的关系.植物生理学报,1999,25(1):80-86
47. 周朴华,李宗道,徐桥生.苎麻组织培养简报,中国麻作,1980(1):3-32
48. 周俊彦.植物体细胞在组织培养中产生的胚状体 I,植物体细胞的胚状体发生,植物生理学报,1987,7(4):389-397
49. 周吉源,赵洁,杨和平,程井辰.油菜薄层细胞培养中不同光质对愈伤组织诱导和增殖的效应.华中师范大学学报(自然科学版),1992,26(1):77-81
50. 侯建华,耿庆汉.荞麦愈伤组织培养及其分化的研究.内蒙古农业大学学报(自然科学版),1995,16(3):21-25
51. 欧阳俊闻.小麦花药培养研究进展.见:胡含,王恒立主编,植物细胞工程与育种.北京:北京工业大学出版社,1990,1-5
52. 倪德祥.光在植物组织培养中的调控作用.自然杂志,1986,9(3):193-198
53. 赵德修,李茂寅,邢建民,童哲.光质、光强和光期对水母雪莲愈伤组织生长和黄酮生物合成的影响.植物生理学报,1999,25(2):127-132
54. 姚发兴,周吉源,赵洁.甘蔗组织培养中不同光质对植株再生的影响.华中师范大学学报(自然科学版),1994,专辑(1):192-195
55. 郭丽红,陈善娜,龚明,刘家忠,司伟,鲁春华.玉米根尖和成熟胚的愈伤组织培养及悬浮系的建立.云南大学学报(自然科学版),1999,21(1):14-144
56. 郭清泉,陈建荣,杨瑞芳,胡日生.苎麻叶片愈伤组织诱导与植株再生的研究.中国麻作,1998,20(2):1-5
57. 顾蔚.植物激素对蚕豆胚轴愈伤组织染色体加倍和减倍的影响.陕西师范大学学报(自然科学版),1999,27(1):100-102
58. 莫荣达,黄记生.苎麻组织培养再生植株研究.植物生理学通讯,1981(1):52-53
59. 唐小浪,易干军,吴绍彝,彭成绩,李志强,曾赛容.红江橙珠心愈伤组织的诱发及其体细胞胚胎发生与植株再生试验.广东农业科学,1994,(1):20-22
60. 涂艺声,王碧琴,江洪如,奚晰,丁建南.不同色光、温度、PH 对草珊瑚愈伤组织的培养效应.江西科学,1994,12(2):85-89
61. 徐武,李明,张敬,方红曼,李安生.低温预处理过程中大麦花药的内源激素的变化.遗传学报,1997,24(2):165-169
62. 徐振南,万蜀渊.影响草莓花药培养效果的若干因素.上海农业学报,1995,11(3):27-30
63. 晏春耕,杨瑞芳,王春桃,郑思乡,崔国贤,程亮楚,李宗道.苎麻孤雌生殖后代染色体倍性变异的研究.湖南农业大学学报,1997,23(2):123-126
64. 崔凯荣,邢更生,周攻克,刘新民,王亚馥.植物激素对体细胞胚胎发生的诱导与调节.遗

- 传, 2000, 22(5): 349-354
65. 黄璐, 卫志明. 不同基因型玉米的再生能力和胚性与非胚性愈伤组织 DNA 的差异. 植物生理学报, 1999, 25(4): 332-338
 66. 黄学林, 李筱菊. 高等植物组织离体培养的形态建成及其调控. 北京: 科学出版社, 1995: 85
 67. 黄记生, 莫荣达, 叶翠娟. 苎麻子叶及下胚轴离体诱导再生植株研究简报. 广西农业科学, 1980(7): 27
 68. 韩碧文, 李颖章. 植物组织培养中器官建成的生理生化基础. 植物学通讯, 1993, 10(2): 1-6
 69. 韩雪梅. 草莓试管苗分化培养基优化的研究. 生物技术, 1997, 7(2): 27-29
 70. 董新纯, 程炳嵩. 白首乌 (*Cynanchum bungi* Decne) 脱分化诱导与内源 IAA 和核酸变化. 山东农业大学学报, 1999, 30(3): 226-230
 71. 蒋泽平, 仲磊, 李玉巧, 倪意德. BA 与 IAA 及 CH 和 YE 对红掌试管苗增殖和生长的调控. 林业科技开发, 2000, 14(1): 20-22
 72. 彭美媛, 曾德洪, 李茂扬. 水稻愈伤组织再生植株与外植体关系的研究. 湖南农业科学, 1994, 6: 8-10
 73. 简玉瑜, 孙玉华, 陈永祥, 罗希明, 赵桂兰. 大豆花药培养的研究. 吉林农业科学, 1980(2): 54-61
 74. 熊丽, 周吉源, 殷荣华. 光质对石刁柏愈伤组织培养中生长和过氧化物酶的影响. 武汉植物学研究, 1995, 13(3): 253-257
 75. 熊光耀, 甘霖, 郑思乡, 李宗道. 苎麻原生质体再生植株及影响因子的初步研究. 农业生物技术学报, 1996, 4(2): 147-152
 76. 熊和平. 苎麻多功能开发潜力及利用途径. 中国麻作, 2001, 23(1): 22-25
 77. 潘昌立, 李树川, 李育君. 苎麻体细胞无性系变异及其规律的研究. 中国麻作, 1996, 18(1) 1-6, 36
 78. 颜昌敬, 赵庆华, 胡继金, 周朴华, 范鸿芝, 李宗道, 潘昌立, 王春桃. 苎麻组织培养及其在快速繁殖上的应用. 中国农业科学, 1982(2): 1-7
 79. Bright, W J. *Cereal Tissue and Cell Culture*, Martinus Nijhoff Dr w. Junk Publishers. 1985: 1-44
 80. Bhojwani S S, Razdan M K. *Plant tissue culture. In: Theory and practice* [M]. New York :Elsevier Science publishing company INC, 1983: 287-313
 81. Chu C C. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica*, 1975, 18(5): 659-668
 82. Dong J Z, Dunstan D I. Expression of abundant mRNA during somatic embryogenesis of white spruce [*Picea glauca* (Moench) voss]. *Planta*, 1996, 199: 459-466
 83. Gamborg O L, Miller R A, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp cell Res*, 1968, 50: 151-158
 84. Halgeson J P, Upper C D, Haberback G T. Medium and tissue sugar concentrations during cytokinin-controlled growth of tobacco callus tissues. In: *Plant Growth Substances*, Carr D J

- Springer-Verlag, New York, 1972, 484-492
85. Jiang J, Friebe B, Gill B S. Recent advances in alien gene transfer in wheat. *Euphytica*, 1994, 91: 59-87
 86. Kevers C. Vitrification of carnation *in vitro*: changes in water content, extracellular space, air volume, and ion levels. *Physiologie Vegetale*, 1986, 24 (6): 647-653
 87. Kevers C. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro*. *Physiol Plant*, 1984, 61: 69-74
 88. Lam H M, Sheila S Y Peng, Coruzzi G M. Metabolic regulation of the gene encoding glutamine-dependent asparagine synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 1994, 106: 1347-1357
 89. Loschiava F, Pitto L, Giuliano G, Torti G, Nuti-Ronchi V, Terzi M. DNA methylation of embryogenic carrot cell culture and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theor Appl Genet*, 1989, 77: 325-331
 90. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol plant*, 1962, 64(1): 8-10
 91. Nash D T, Boll W G. Carbohydrate nutrition of Paul's scarlet rose cell suspension. *Can J Bot*. 1975, 53: 179-185
 92. Nickell L G, Maretzki A. The utilization of sugars and starch as carbon sources by sugarcane cell suspension cultures. *Plant and Cell Physiol*. 1970, 11: 183-185
 93. Nitsch J P, Nitsch C. Haploid plants from pollen grains. *Science*, 1969, 163: 85-87.
 94. Okkels F T. Role of ethylene and DNA-methylation. *Culture Report*, 1988, 11: 28
 95. Redenbaugh K, Paasch B D, Nichol J W. Somatic seeds: encapsulation of asexual plant embryos. *Biol Tech*, 1986, 4(9): 797-801
 96. Reinbothe C, Tewes A, Lehmann J. Induction by methyl jasmonate of embryogenesis related proteins and mRNA in *Nicotiana*. *Plant Science*, 1994, 104: 59-70
 97. Seibert M, Wetherbee P J, Job D D. The effects of light intensity and spectral quality on growth and shoot initiation in Tobacco callus. *Plant physiol*, 1975, 56: 130-139
 98. Skoog F, Miller CO. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultivated *in vitro*. In: *Biological Action of Growth Substances*. 11th symp. *Soc Exp Biol*, 1957, 11: 118-131
 99. Wang L, Bao X M, Huang B Q, Hao S. Somatic embryogenic potential determined by the morphological polarity of the explant in tissue cultures of *Freesia refracta*. *Acta Botanica Sinica*, 1998, 40 (2): 138-143
 100. White P R. *The Cultivation of plant and animal cells*. 2nd Ed, New York: Ronald Press, 1963
 101. Winfield M O, Schmitt M, Lorz H, Davey M R, Karp A. Nonrandom chromosome variation and morphogenic potential in cell lines of bread wheat (*Triticum aestivum* L). *Genome*, 1995, 38: 869-878

图版说明

Introduction of pictures

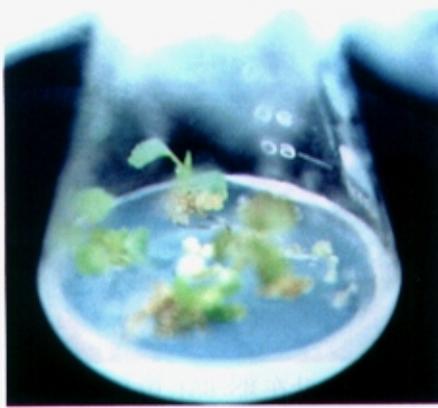
图版 I

1. 湘苎 2 号下胚轴愈伤继代在 MS+BA1.0+GA₃0.5 培养基中的分化
2. 湘苎 2 号叶愈伤
3. 华苎 3 号子叶在 MS+BA2.5+IAA1.0 培养基中一次分化
4. 湘苎 2 号叶外植体在 MS+IBA0.5 培养基中直接生根
5. 湘苎 6 号叶外植体在 MS+BA2.5+NAA0.5 培养基中愈伤
6. 湘苎 2 号分化苗与愈伤分化根连成一体
7. 黄亮早叶在 MS+BA0.5+2, 4-DO.5 培养基中出愈伤并分化
8. 巴西麻 6 号叶在 MS+BA1.0+IBA0.5 培养基中一次性分化成苗
9. 巴西麻 6 号叶在 MS+BA2.0+NAA0.5 培养基中出愈伤并分化

图版 II

1. 湘苎 2 号茎尖成丛生苗
2. 试管苗在 B₃ 培养基中生根
3. 湘苎 2 号叶面生芽
4. 移栽苗成活
5. 外部形态无变异的湘苎 2 号试管苗
6. 苎麻分枝茎在 MS+BA1.0 培养基中产生大量丛生苗

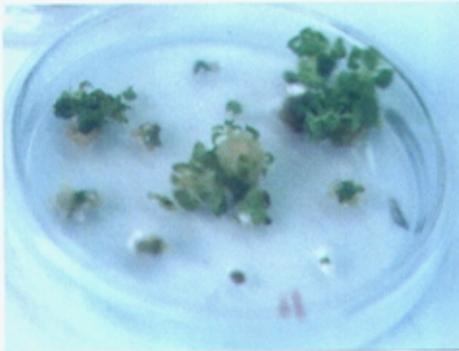
图版 I



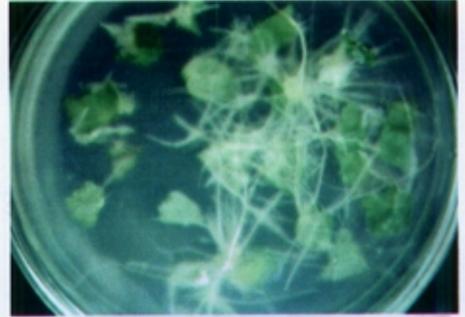
1. 下胚轴愈伤分化苗



2. 湘芷 2 号叶愈伤



3. 华芷 3 号子叶愈伤分化苗



4. 叶外植体在 MS+IBA0.5 培养基中直接生根



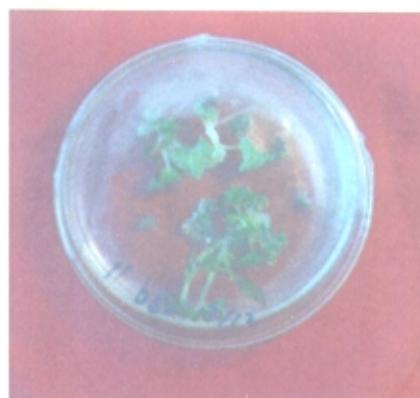
5. MS+BA2.5+NAA0.5 培养基中的湘芷 6 号叶愈伤



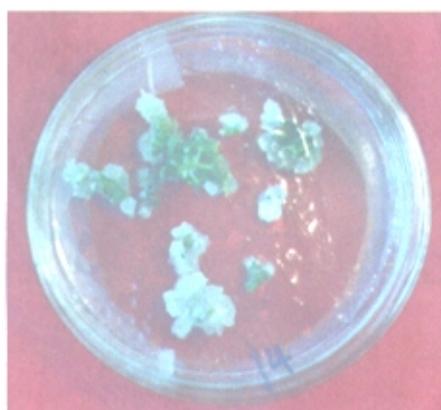
6. 湘芷 2 号分化苗与愈伤分化根连成一体



7. 黄壳早叶在 MS+BA0.5+2, 4-DO.5
培养基中分化苗

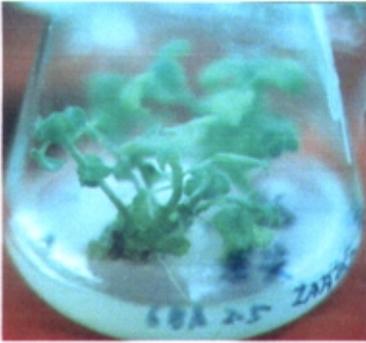


8. 巴西麻 6 号叶在 MS+BA1.0+IBA0.5
培养基中一次性分化苗

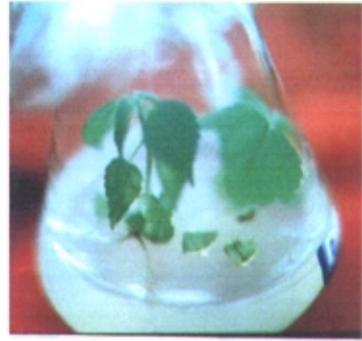


9. 巴西麻 6 号叶在 MS+BA2.0+NAA0.5
培养基中分化苗

图版 II



1. 湘芷 2 号茎尖成丛生苗



2. 试管苗在 B₅ 培养基中生根



3. 湘芷 2 号叶面生芽



4. 移栽苗成活



5. 外部形态无变异的湘芷 2 号试管苗



6. 芷麻分枝茎在 MS+BA1.0 培养基中产生大量丛生苗

附 录

Appendix

缩写词 Abbreviation	英文名称 English	中文名称 Chinese
6-BA	6-benzylaminopurine	6-卞氨基嘌呤
2, 4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid	2, 4-二氯苯氧乙酸
KT	Kinetin	激动素
ZT	Zeatin	玉米素
IAA	Indoleacetic acid	吲哚乙酸
IBA	Indolebutyric acid	吲哚丁酸
NAA	Naphthaleneacetic acid	萘乙酸
GA3	Gibberellic acid	赤霉素
CM	Coconut milk	椰子汁
CH	Casein hydrolysates	水解酪蛋白
TJ	Tomato juice	番茄汁
YE	Yeast extracts	酵母浸出液
AC	Active carbon	活性炭
SDW	Sterile distilled water	无菌水

致 谢 Acknowledgements

本研究论文是在恩师彭定祥教授的悉心指导下进行的，从论文选题、实施到写作，恩师倾注了大量的心血；三年来，恩师不仅在学术上精心培养我，在生活上也给予我亲切地关怀。恩师的谆谆教诲学生将铭记不忘，受益终生！恩师治学严谨的作风、孜孜以求的精神将楷模我未来的人生。

在论文资料收集、试验内容选择、试验操作技能学习以及成文的过程中，得到了导师组全体老师的精心指导；华中农业大学的张献龙教授、王维金教授、胡立勇教授、靳德明副教授以及湖北农学院的田志宏博士、周瑞阳教授、余泽高副教授、严寒老师、刘恒蔚老师给予多方面的指导和帮助，在此表示我衷心的感谢！

感谢湖北农学院试验员许玉华、许娣琼、毛群帮老师的热情支持；感谢小慧师妹和实习学生刘驿敏、潘云峰等在试验过程中给予的帮助；感谢好友李惠英、姚素梅、周国铃在学习期间的帮助和陪伴；感谢父母兄妹和丈夫孩子的强有力的支持！

感谢所有关心和帮助我的人们！

感谢华中农业大学提供给我良好的学术氛围和学习环境，感谢湖北农学院对我论文研究的支持！

王 晓 玲

2002 年 5 月于武汉