

摘 要

红麻 (*Hibiscus cannabinus* L.) 是一种古老而具有新概念的作物, 进入 21 世纪后, 其综合开发利用受到世界各国的重视, 尤其是在美国、日本、法国等经济发达的国家, 因此对红麻进行种质创新显得至关重要。红麻的器官培养和原生质体培养是品种快繁、变异体筛选以及体细胞杂交和遗传转化等生物技术育种的基础。本文对红麻下胚轴、试管苗茎段、子叶、真叶、腋芽及原生质体培养进行了研究。研究结果如下:

1. 以红麻无菌苗的下胚轴、茎段、子叶和真叶为外植体, 研究 MS 附加不同的激素组合对愈伤组织诱导的影响, 发现低浓度 2,4-D (0.05 mg/L、0.1 mg/L) 附加不同浓度 6-BA 诱导下胚轴皮层细胞分裂产生白色坚硬愈伤组织; 高浓度 2,4-D (1.0 mg/L、2.0 mg/L) 附加不同浓度 6-BA 诱导下胚轴维管形成层细胞发生分裂形成黄色疏松愈伤组织。从下胚轴和茎段诱导出的两类愈伤组织有较高的出愈率和较强的生长势。1.0-2.0 mg/L 的 2,4-D、0.1-1.0 mg/L 的 6-BA 组合是子叶、真叶诱导愈伤的较佳激素组合。

2. 红麻的 7 天龄无菌苗子叶、25 天龄无菌苗真叶在附加 3.5 mg/L TDZ 和 0.1 mg/L NAA 的 MS 培养基上可直接诱导出不定芽。品种 722 的 7 天龄无菌苗子叶的不定芽诱导率达到 13 个芽/外植体。但品种 917 子叶却未能诱导出不定芽。

3. 无菌苗节间茎段在附加 0.1 mg/L 6-BA 的 MS 培养基上能长出正常、健壮的苗。在附加 0.2 mg/L TDZ 的 MS 培养基上能诱导出丛生芽, 但丛生芽只有转入 0.1 mg/L NAA 的培养基中后, 茎才能伸长生长。

4. 研究了 IAA、NAA、6-BA 对下胚轴生根的影响, 石蜡切片显示, 不定根发生在维管形成层及其附近的薄壁细胞。

5. 采用暗培养 3 天龄的无菌苗下胚轴, 在含 0.5% 纤维素酶 (Cellulose R-10)、0.5% 果胶酶 (Pectinase) 的酶解液中, 甘露醇为 0.45M 的渗透压条件下, 酶解 12h 的原生质体的产量最高, 活力强。

6. 研究了不同渗透压浓度、不同类型的培养基和不同培养方法对原生质体分裂生长的影响, 结果表明: 以 5.0×10^4 /ml 的密度, 在改良的 KM₈P 培养基中, 附加 0.5 mg/L 2,4-D 和 0.5 mg/L 6-BA, 用微滴法培养, 对原生质体的分裂和愈伤的形成极为有利。

关键词: 红麻 器官培养 原生质体培养 植株再生 组织细胞学

Abstract

As an important fiber crop, many potential applications of kenaf are being identified and developed in 21 century, especially in developed countries such as America, Japan, and France. So make species innovation for kenaf is necessary. It's organ culture and protoplast culture is important basic technique of rapid clonal propagation, selection of mutative plants, somatic hybridization and genetic transformation. In the study, hypocotyl, internode stem, cotyledon, leaf, axillary bud and protoplast were cultured. The main results are as follows:

1. By studies on effects of different hormone combinations on the induction of calli from different explants, the result indicated that: 2,4-D at lower density (0.05 mg/L, 0.1 mg/L), the white hard callus initiate from epidermis and cortex of hypocotyl; 2,4-D at higher density (1.0 mg/L, 2.0 mg/L), the yellow loose callus initiate from vascular cambium of hypocotyls. The two kinds of callus issue from hypocotyls and internode stem sections have high callus ratio and good growth. The optimal hormone combination on the induction of calli from cotyledon and leaf is (1.0-2.0) mg/L 2,4-D+(0.1-1.0) mg/L 6-BA.

2. The cotyledon and leaf can be directly induced adventitious shoots on MS with 3.5 mg/L TDZ and 0.1 mg/L NAA. The variety 722 can obtain highest induction ratio-13 shoots/explant at the same condition. Adventitious shoot was not obtained from 917.

3. Node stem sections placed on MS medium supplemented with 0.1 mg/L 6-BA for axillary bud initiation can obtain normal strong shoots; on MS with 0.2 mg/L TDZ can induced multiple shoots, Shoots elongated and rooted within 2 weeks after subculture on MS with 0.1 mg/L NAA.

4. Studied effects of IAA, NAA, 6-BA on hypocotyls rooting. A systematic histological study indicated direct adventitious roots originated from vascular cambium in hypocotyls.

5. The highest protoplast yield and best activity was obtained from solution of Cellulose R-10 0.5%, Pectinase 0.5% and 0.45M Mannitol with the treatment of 12h for the 3d hypocotyls in the dark.

6.The results of different mannitol concentration, culture media, and culture methods on the division and growth of protoplast had been studied. Under the condition of $5.0 \times 10^4/\text{ml}$ and modified KM_8P , 0.5mg/L 2,4-D and 0.5mg/L 6-BA,droplet culture was the best and beneficial of the division of protoplast and the growth of calli.

Key word: Kenaf , Organ culture , Protoplast culture , Plant regeneration ,
Histologicalcytology

目 录

└─摘要

└─Abstract

└─第一部分前言

└─└─1. 课题的提出

└─└─└─1.1 红麻的用途及国民经济意义

└─└─└─1.2 红麻品种改良的研究概况

└─└─└─1.3 建立红麻组织培养体系的必要性及意义

└─└─2. 研究进展

└─└─└─2.1 植物组织培养再生植株的研究概况

└─└─└─2.2 植物原生质体培养的研究概况

└─└─3. 研究的目的及意义

└─第二部分红麻的器官培养与形态建成

└─└─1. 材料与方法

└─└─└─1.1 材料

└─└─└─1.2 方法

└─└─2. 结果与分析

└─└─└─2.1 红麻愈伤组织的诱导及其细胞组织学观察

└─└─└─2.2 红麻子叶、真叶不定芽的直接诱导

└─└─└─2.3 腋芽的快速增殖和无性繁殖系的建立

└─└─└─2.4 下胚轴生根的诱导及细胞组织学观察

└─└─3. 讨论

└─└─└─3.1 愈伤组织的组织形态学观察

└─└─└─3.2 TDZ 诱导不定芽的高效性及其作用机制

└─└─└─3.3 红麻植株再生的途径

└─└─└─3.4 红麻根的发生

└─第三部分红麻原生质体的游离与培养

└─└─1. 材料与方法

└─└─└─1.1 材料

└─└─└─1.2 方法

└─└─2. 结果与分析

└─└─└─2.1 原生质体的游离

└─└─└─2.2 原生质体的培养

└─└─3 讨论

└─└─└─3.1 红麻原生质体的游离和纯化

└─└─└─3.2 红麻原生质体的培养

└─参考文献

└─图版说明

└─附录

└─致谢

第一部分 前言

1. 课题的提出

红麻(*Hibiscus cannabifolius* L.)又称洋麻,是锦葵科(*Malvaceae*)木槿属(*Hibiscus*)一年生经济作物。红麻原产非洲,在世界分布范围很大,热带、亚热带和寒带均有种植。

1.1 红麻的用途及国民经济意义

传统上,红麻被用作生产麻绳,麻袋,地毯和粗帆布的原料。进入 21 世纪后,随着生活水平的提高,人类对自然纤维的需求和生态、环境意识增强。红麻以其巨大的生物产量(树木的 3-4 倍)、极强的 CO₂ 吸收能力(热带雨林的 3-4 倍以上)、品质可与木材相媲美的优点,引起了多国政府、环保组织及造纸业的重视,被称为“21 世纪的优势作物”和“未来派作物”(程舟等, 2001)。

1.1.1 红麻在 21 世纪的综合开发利用

红麻用途广泛,但早期未得到很好的开发利用,主要作为生产麻绳、麻袋、地毯等的原料。近年来,日本,美国等发达国家在红麻的多用途开发利用方面进行了广泛的研究,已涉及到造纸、无纺布、吸油材料、板材、动物饲料、污水净化、土壤改良剂、塑料填充料、动物垫床、食用等许多领域(程舟等, 2002)。

红麻热在日本各地持续升温,红麻制成的纸张、衣料等产品炙手可热。以经营电工产品著称的松下电工在这种形势下,进入这种绿色材料领域。由日本京都大学和中国南京林业大学共同开发的新技术——将红麻韧皮纤维经多层层压加工成板材,去年 5 月份开始委托位于安徽省的日本独资企业——安徽省山中木业有限公司进行试生产,据说这是世界上第一家利用红麻为原料正式生产这种建筑材料的工厂。红麻板材具有重量轻、透气性好、强度大等优点。其强度是目前强化木结构墙壁的 3.2 倍,抗震强度是其 2 倍。厚度为针叶树合成板一半的红麻板材强度仍比针叶树合成板高,易搬运、加工,具有很强的市场竞争力。除了在中国生产红麻板材外,松下电工计划明年在马来西亚也开始生产。这种现在用于木质住宅和木结构墙壁的板材,将来还可扩大用途,如用作汽车车顶板材、家具板材、玻璃钢的强化材料(山东省东营市科技局, 2003)。

第一部分 前言

1. 课题的提出

红麻(*Hibiscus cannabifolius* L.)又称洋麻,是锦葵科(*Malvaceae*)木槿属(*Hibiscus*)一年生经济作物。红麻原产非洲,在世界分布范围很大,热带、亚热带和寒带均有种植。

1.1 红麻的用途及国民经济意义

传统上,红麻被用作生产麻绳,麻袋,地毯和粗帆布的原料。进入 21 世纪后,随着生活水平的提高,人类对自然纤维的需求和生态、环境意识增强。红麻以其巨大的生物产量(树木的 3-4 倍)、极强的 CO₂ 吸收能力(热带雨林的 3-4 倍以上)、品质可与木材相媲美的优点,引起了多国政府、环保组织及造纸业的重视,被称为“21 世纪的优势作物”和“未来派作物”(程舟等, 2001)。

1.1.1 红麻在 21 世纪的综合开发利用

红麻用途广泛,但早期未得到很好的开发利用,主要作为生产麻绳、麻袋、地毯等的原料。近年来,日本,美国等发达国家在红麻的多用途开发利用方面进行了广泛的研究,已涉及到造纸、无纺布、吸油材料、板材、动物饲料、污水净化、土壤改良剂、塑料填充料、动物垫床、食用等许多领域(程舟等, 2002)。

红麻热在日本各地持续升温,红麻制成的纸张、衣料等产品炙手可热。以经营电工产品著称的松下电工在这种形势下,进入这种绿色材料领域。由日本京都大学和中国南京林业大学共同开发的新技术——将红麻韧皮纤维经多层层压加工成板材,去年 5 月份开始委托位于安徽省的日本独资企业——安徽省山中木业有限公司进行试生产,据说这是世界上第一家利用红麻为原料正式生产这种建筑材料的工厂。红麻板材具有重量轻、透气性好、强度大等优点。其强度是目前强化木结构墙壁的 3.2 倍,抗震强度是其 2 倍。厚度为针叶树合成板一半的红麻板材强度仍比针叶树合成板高,易搬运、加工,具有很强的市场竞争力。除了在中国生产红麻板材外,松下电工计划明年在马来西亚也开始生产。这种现在用于木质住宅和木结构墙壁的板材,将来还可扩大用途,如用作汽车车顶板材、家具板材、玻璃钢的强化材料(山东省东营市科技局, 2003)。

日本 NEC 公司也成功开发出一种新型生物塑料, 这种新型产品比通常采用聚乳酸方法制造的生物塑料具有更高的热阻和强度, 其热阻比后者高 1.8 倍, 强度比后者大 1.7 倍。这种新型材料利用红麻植物中的纤维来增强传统的聚乳酸生物塑料而获得, 具有良好的生态学特性, 可以被用于传统生物塑料以前无法使用的一些领域中, 包括电子器件。而且, 这种新型生物塑料仍然保持传统聚乳酸生物塑料的关键特性, 如隔离液体和防潮湿等特性。(今日电子杂志社·北京)

近日, 一种以红麻为原料的日本东里壁纸进入北京装饰市场。据了解, 这种从前被用于名片、纸巾、厨房用品的材料, 可以替代树浆而比木材的生产量高出很多, 具有资源不枯竭的特点。因此, 红麻壁纸原料分别通过了世界公认的德国安全品质的检测标准, 和日本壁纸制品规格协会的检测, 它使用的是对人十分安全的水性溶剂, 别于对使用者有害的甲苯和二甲苯等挥发性有机化合物(北京娱乐信报 2002)。作为丰田汽车部件制造商的 Araco (爱知县丰田市), 利用能吸收大量二氧化碳的新型植物资源—红麻(Kenaf)作为车身原料, 试验研制出了小型车, 该车于 2003 年 10 月 25 日起在东京国际汽车展上展出, 这是世界上首次使用红麻制作有一定强度要求的汽车车身, 红麻制的车身比铁制的车身更为轻便(KYODO NEWS, 2003)。

综上所述, 红麻具有广阔的开发利用前景。

1.1.2 红麻的生态、环境效益

进入九十年代后, 随着森林资源被大量砍伐, 特别是地球变暖及沙漠化成为严重的环境问题, 依赖木浆造纸已无发展余地。红麻是优质造纸原料, 具有速生、高产、适合江河、湖泊洲滩地生长、不与粮棉争地等特点。大力发展红麻生产, 对于保护森林资源和发展国民经济具有重要意义。

同时, 红麻在种植过程中本身就有环保作用: 单位面积上红麻比一般的林木吸收 CO_2 多 2-3 倍, 呼出氧气是一般林木的 5-6 倍, 有显著的制氧功能和净化空气作用。红麻还具有特强的氮磷钾等吸收能力, 适于各种水体的富营养化治理和生活污水的高度处理。此外, 种植红麻可清除土壤中多余的养分, 改良土壤。日本已把红麻特性及制品写进教科书, 以提高国民对红麻环保作用的认识。

另外, 红麻各种制品本身极为环保。例如以红麻为原料的日本东里壁纸, 它使

用的是对人十分安全的水性溶剂，别于对使用者有害的甲苯和二甲苯等挥发有机化合物。红麻壁纸使用的是非木材类中的前端材料和再生纸，废弃烧毁时不产生废气，如果不烧毁还可以还原于土壤。丰田汽车部件制造商以红麻(Kenaf)作为车身原料试验研制的车身更为轻便，即使燃烧，所产生的有害物质也有所降低，十分便于报废后进行处理。

所以，红麻可作为保护森林资源，净化空气，防止全球变暖的对策之一。

1.1.3 红麻的经济效益

红麻热在日本各地持续升温，红麻制成的产品炙手可热。尺寸为3030×910×4(mm)的红麻板材售价2400日元左右。比同类产品高出2成。松下电工生产的红麻制品，预期到2005年将形成每年销售100亿日元的规模。

我国作为主要的产麻大国，在红麻多用途利用方面明显落后。据统计我国2000年纸品消费为3900万吨。据中国造纸学会预测，到2010年，我国纸品消费量将达到6500-7000万吨，纸品的需求结构也将发生变化，低档品种将逐渐递减，中、高档纸品需求比重将上升。目前，国家每年要花费数十亿美元大量进口纸浆和高档纸品，以弥补国内供给不足。我国是森林资源相对贫乏的国家，红麻是优质造纸原料，具有速生、高产、适合江河、湖泊洲滩地生长、不与粮棉争地等特点，因此大力发展红麻生产，促进红麻的多用途开发利用对于保护森林资源和发展国民经济具有重要意义。

1.2 红麻品种改良的研究概况

世界主产红麻的国家育种工作，都是以系统选育开始，继而集中于杂交育种，引种也是红麻育种中行之有效的一种方法，诱变育种也有应用。

杂交育种是培育抗病、高产、优质红麻新品种的主要手段。我国在红麻繁育过程中，目前尚无雄性不育系用于杂交制种，一般采用化学杀雄法。由于红麻是无限花序，在化学杀雄时需要多次施药，影响昆虫传粉，人们不得不采用既费工又费时的人工授粉方法，这严重阻碍了红麻生产，因此，打破这一“瓶颈”成了育种专家们苦苦寻求的目标。1998年，周瑞阳教授在荆州发现两株雄性可育、不育与半不育并存的红麻植株。2001年，他在海南又发现多种雄性不育材料。中国农科院科技文献信息中心查新报告显示，雄性不育材料发现及应用的研究具有较强的新颖性，创

制出了配合力高、优质、抗炭疽病和立枯病的红麻短日雄性不育系；组配出优质、抗炭疽病、立枯病、适应性广、产量比对照增产 15% 以上、造纸、纺织兼用的超高产杂交组合，为红麻的杂交育种注入了新的生机。

红麻的诱变育种也有过不少报道，日本曾用 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线和 x 射线处理红麻种子，得到了抗茎枯病的品系。有人用秋水仙碱处理杂种后代，得到了花粉完全可育的双二倍体。广东和广西农科院则分别用 ^{32}P 内照射和 γ 射线外照射处理红麻种子，也得到了抗病和早熟的突变后代。贵州省独山麻科所曾利用 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线及其与激光、微波等物理因素处理红麻种子，在 30KR γ 射线处理“南选”的后代中选育了红麻新品种“黔红 1 号”。中国农科院麻类所和湖南省原子能农业应用研究所也着手开展过红麻诱变育种技术研究的课题协作（朱校奇，郭安平，1994）。周瑞阳（1996）通过卫星搭载红麻品种种子，在后代群体中发现了柱头远高于雄蕊管的长花柱突变体，经过连续几年的观察研究表明，这种长花柱性状可稳定遗传且易于接受外来花粉，不利自交，有利于异花授粉的实现，在红麻杂交制种中具有显而易见的利用价值。

1.3 建立红麻组织培养体系的必要性及意义

近年来，在常规育种中，常引进组织培养技术，特别是花药（花粉）和子房的培养，以加速后代的纯合，快速组合多种性状，缩短育种进程，简化选育程序。组织培养技术的发展，还革新了育种方法，如利用组织培养中发生体细胞变异，从中选出优良品种的体细胞突变体筛选育种；利用原生质体融合法获得种内和种间的体细胞杂种植株，从中选育出期望的新品种的体细胞杂交育种；利用原生质体作为目的基因受体，培养成转基因植物，从中选出期望的转基因品种；利用花药和细胞培养中的染色体变异获得非整倍体和多倍体植物，进行作物的染色体工程育种；利用远缘杂种幼胚培养，获得远缘杂种植物，从中可选出新品种或供育种用的新材料的远缘杂种育种（燕平眉，1999）。

红麻作为 21 世纪的优势作物，其多用途利用呼唤种质创新，即要求对红麻进行多方向的遗传改良。组织培养技术的应用可改革现有的常规育种方法，建立新的育种方法，使作物品种改良现代化和高效化。建立红麻的组织培养体系，完善红麻的组织培养技术成为现今红麻育种的基础和必然。

2. 研究进展

2.1 植物组织培养再生植株的研究概况

1902 年, Haberlandt 根据细胞理论 (Schwann, 1939) 预言体细胞在适宜条件下, 具有发育成完整植株的潜在能力。1958 年, Steward 和 Shantz 用胡萝卜根韧皮部细胞悬浮培养, 从中诱导出胚状体并使其发育成完整植株, 第一次证实 Haberlandt 提出的细胞全能性学说。至今, 全世界通过细胞组织培养而成功再生植株的植物已超过 600 种 (焦春梅, 2001)。离体无性繁殖中的器官发生方式有以下五种: 一, 器官发生型, 从器官外植体诱导愈伤组织, 经愈伤组织细胞的分化再生成植株的方式。二, 类胚体发生型, 由植物器官, 组织和细胞培养发生类胚结构, 最后以胚状体成苗的方式。三, 器官型, 从器官外植体诱导不定芽, 再生成植株的方式。四, 不定芽型, 诱导顶端分生组织产生不定芽, 再生成植株的方式。五, 原球茎型, 是兰属特有的器官发生方式 (周维燕, 2001)。

2.1.1 器官发生型的研究概况

根据越来越多的研究报道, 几乎所有的多细胞植物都有诱导产生愈伤组织的潜在可能性, 也就是说, 诱导愈伤组织的成败关键主要不是实验材料, 而是培养条件, 其中激素的成分和浓度是最重要的因素。生长素和细胞分裂素对诱导愈伤组织的产生及促进迅速生长是必需的。最常用的生长素是 IAA, NAA 和 2, 4-D, 使用浓度范围约在 0.01-10 mg/L 之间。最常用的细胞分裂素是 KT 和 6-BA, 使用浓度范围在 0.1-10 mg/L 之间 (崔凯荣, 戴若兰, 2000)。不同植物, 不同组织诱导出的愈伤组织形态各异, 从颜色上可分为无色、淡黄色、浅绿色、绿色、浅灰绿色、深灰绿色等, 在质地上可分为稀泥状、松软块状、松散颗粒状和致密块状等 (薛庆善, 2001)。不同植物愈伤组织器官发生类型也不同, 包括四种: 在愈伤组织上仅分别形成根或芽器官, 即形成无根的芽或无芽的根; 在愈伤组织上先形成芽, 待芽伸长后, 再在其茎基部长出根而形成小植株, 多数植物属这种情况; 在愈伤组织上先产生根, 再从根基部分化出芽而形成小植株, 双子叶植物中这种形式较普遍; 先在愈伤组织的邻近不同部位分别形成芽和根, 然后两者结合起来形成一株小植株, 类似根芽的天然嫁接, 这种情况较少见 (薛庆善, 2001)。

2.1.2 类胚体发生型的研究概况

最早研究胚状体发生要属美国的 Steward 和德国的 Reinert, 他们利用胡萝卜贮藏根组织作培养材料, 都分别观察到来自体细胞组织的胚的启动和发育过程。随后, 许多学者对关于体细胞胚胎发生做了大量的研究。1993 年统计, 已有 210 种植物成功地诱导出胚状体 (范双喜, 1993)。

植物体细胞胚胎发生是一个复杂的发育过程, 受到多种内、外因素的影响与调节。不同基因型体细胞胚胎发生频率不同, 研究中的许多作物都有这种表现, 如谷子 (张树承, 1987)、水稻 (金坚敏, 1992)、大豆 (杜鹃, 1995) 等, 陈志贤等 (1987) 对棉属 28 个种或品种研究表明, 胚胎发生能力可分为三类: 胚胎发生能力强的基因型; 有一定胚胎发生能力, 但成胚不多的基因型; 基本没有胚胎发生的基因型, 这类基因型品种较多。从外植体来看, 胚状体可以从植物的任何一个部分发生, 诸如根, 茎, 叶, 子叶, 真叶, 胚轴, 小孢子, 单细胞, 原生质体等 (周维燕, 2001)。

植物激素是诱导、调节体细胞胚胎发生最有效的因素, 在体细胞胚胎发生的不同阶段有着不同的作用。许多植物在诱导期加入 2, 4-D 或 TDZ 直接诱导出胚性愈伤或球型胚, 而胚状体的进一步发育却要在去除 2, 4-D 和 TDZ 的培养基上进行。如棉花 (张宝红, 李秀兰, 1994), 木豆 (Sreenivasu, 1998), 胡萝卜 (E.-K. Lee, 2001), 天竺葵 (M. J. Hutchinson, 1997) 等。有些植物先诱导出愈伤组织, 再在不同诱导培养基上再诱导出胚性愈伤组织或胚状体, 如伞型科独活属植物白亮独活的叶柄体细胞胚的发生过程如下: 愈伤组织的诱导培养基为 MS 附加 0.5 mg/L 2, 4-D 和 0.5 mg/L BAP; 在大量元素加倍的附加 1 mg/L 2, 4-D 和 0.25 mg/L Kn 的 MS 培养基继代培养, 在愈伤表面形成大量球型胚; 球型胚在不含 2, 4-D 的培养基上发育成成熟胚; 85% 的胚状体在附加 0.01 mg/L BAP 和 0.01 mg/L IBA 的培养基上长成植株 (A. K. Wakhlu and Sharma 1998)。2, 4-D、TDZ 是诱导胚性愈伤组织中最常用的激素, 但在银杏和大豆中, NAA 的诱导效果要好于 2, 4-D。枣树子叶切块在含有 IBA 和 6-BA 的培养基上, 能顺利地诱导出胚状体, 而 2, 4-D、IBA 或 6-BA 单独使用时都不能诱导出胚状体 (程佑发, 王勋陵 2001)。普遍认为 ABA 对体细胞胚胎发生有促进作用。外源 GA 的应用抑制胚状体发育在胡萝卜 (Halperin, 1970; Fujimura and Komamine, 1975), 蜜橘 (Tisserat and Murashige, 1977), 茴芹 (Noma, 1979) 的培养中早有报道。GA₃ 抑制胚胎发生的作用机制还不清楚, 大量的证据证明 GA₃ 能诱导并促进植物组织中 IAA 的生物合成 (Jindal and Hemberg, 1976; Law, 1987; Law and

Hamilton, 1984; Valdovinos and Sastry, 1968; Law and Davies, 1990)。

普遍认为完全的 MS 培养基适合植物细胞的生长,但对一些物种来说正常的培养条件却不是体细胞胚产生、生长和发育地最佳条件,因为在这种条件下愈伤组织不断的增殖,抑制了细胞全能性的表达,导致很少的植株再生。所以在胚状体发育、萌发过程中,一些物种采用大量元素减半的 MS 培养基。蔗糖是组织培养中细胞生长的主要碳源,常规用量为 3%。但生长在不含或含 1.5%蔗糖的 MS 培养基上的胡萝卜的胚性愈伤更有利于胚状体的产生、发育和萌发(E. K. Lee, 2001)。Komatsuda(1992)在黄豆的培养中也观察到类似的反应。高浓度的蔗糖有利于胚状体的成熟,确不利于胚状体的萌发(Komatsuda, 1992)。蔗糖饥饿处理能促进枣椰胚状体的产生,但不能增加胚状体的萌发率(Veramendi and Navarro, 1996)。

体细胞胚有很大的工业应用前景(如人工种子的发展),但是体细胞胚发育成植株的低转化率成为一个严重的限制(Merkle, 1990; Wetzstein and Baker, 1993)。然而,很多实验表明组织培养过程中的干燥(Parrott, 1988; Yehoshua, 1992; Kazuko and Kazuko, 1994; Liu, 1994; Timbert, 1996)、热(Zimmerman, 1989)、冷(Rajasekaran and Mullins, 1979)处理能增加体细胞胚向植株的转化率。另外通过通风培养减少培养环境的湿度也能有效的促进体细胞胚的发育和萌发(Lee, 1997)。这些实验结果表明培养环境中的物理因子对体细胞胚的诱导,发育及萌发起着很重要的作用。

2.1.3 器官型再生植株的研究概况

在植物遗传转化研究中,外植体通过不定芽诱导途径再生植株有利于保持原有品种或材料的优良农艺性状,再转进由某一目的基因控制的特定性状,即可达到品种改良的目的(周音等, 1998)。

从外植体看,已从不同植物的胚轴,根,茎,子叶,真叶等器官诱导出不定芽。其中大多由子叶和真叶诱导出不定芽(如黄豆,苹果,茄子,兰花,杨树,生菜等)。大豆的下胚轴比子叶结诱导出更多的丛生芽(Kaneda, 1997),花生的下胚轴在植株的器官再生方面也优于其他外植体(Kanyand, 1994)。茄子的子叶,真叶诱导不定芽明显优于其他外植体(Magioli, 1998)。

在激素中,TDZ、BA 是诱导不定芽中最常用的激素。TDZ 在很多植物的不定芽诱导中都优于其他细胞分裂素。TDZ 明显表现一种高效的细胞分裂活性,在诱导分化

中与其他细胞分裂素有着不同的作用,它通过抑制细胞分裂素氧化酶从而抑制细胞分裂素的降解,使内源细胞分裂素水平增加(Hare and Van Staden, 1994)。TDZ 也可能对植物内源激素的水平有调节作用。TDZ 能高效诱导植株的体外再生已在很多植株的培养中得到证实,如猕猴桃(Suezawa, 1988), 苹果(Fasolo, 1989), 葡萄(Matsuta and Hirabayashi, 1989), 梨(Leblay, 1991), 大豆(Kaneda, 1995), 花生(Kanyand, 1994)和几种木本植物(Huettelman and Preece, 1993)。

美国白杨根外植体诱导不定芽的结果表明,TDZ 的诱导效应显著的优于 BA, 但 TDZ 不利于芽的进一步生长和伸长。BA 诱导的不定芽在不添加激素的培养基上能生根, TDZ 诱导的不定芽需要生长素诱导生根。

腺嘌呤、BA, 激动素、TDZ、玉米素在蓖麻的胚轴, 茎尖外植体诱导不定芽中, TDZ 对胚轴不定芽的诱导率最高, BA 对茎尖不定芽的诱导率最高。BA 在几种大戟科植物的微繁中也比其他细胞分裂素有效(Tideman and Hawker, 1982; Ripley and Preece, 1986; Nair, 1979)。TDZ 诱导的丛生芽在继代过程中继续增殖, 这在几种木本植物中也有相同表现(Huettelman and Preece, 1993)。

近年来人们关于 AgNO_3 对单、双子叶作物离体形态发生的促进作用已有较多研究。 AgNO_3 可明显抑制乙烯活性, 通过促进多胺的合成提高茎芽分化及体细胞胚胎发生的频率 (Biddington N. L., 1988; Pulnter E. E., 1992), 还可防止培养物的褐化与玻璃化。当培养基中不含 AgNO_3 和 ABA 时, 生菜植株再生是通过愈伤组织的再分化而实现的; 当培养基中含有 AgNO_3 与 ABA 时, 愈伤组织的生长受到抑制, 而分生细胞团的生长与分化 (出芽) 则十分旺盛, 这时植株再生的途径为外植体直接出芽的方式 (周音等, 1998)。 AgNO_3 在油菜的芽苗分化中也表现出与生菜完全相同的作用效果 (戴林建, 1999)。

2.1.4 不定芽型再生植株的研究概况

不少植物具有大量的腋芽分生组织, 但在整体植物上由于顶端优势效应, 多数腋芽受到内源激素的限制而抑制生长。若将腋芽从整体植株上分离下来, 给以相应的培养条件, 即可形成大量不定芽。不定芽发生型的特点: 不仅繁殖率高, 利用外植体原有的芽, 包括隐芽在内繁殖数量大, 同时能保持该植物种的遗传稳定性。很多植物已可通过器官发生型, 类胚体发生型及器官型再生植株, 但这些再生方式多

受基因型限制，且再生途径较复杂。而不定芽型的再生植株方式对有明显的顶端分生组织和次生组织的植物均适用（周维燕，2001）。这种无性繁殖方式已在至少五千种植物中得到应用（N K Konan，1997）。

2.2 植物原生质体培养的研究概况

原生质体培养得到再生植株由 Takbe 等（1971）最早报道，他采用酶解烟草叶肉细胞分离出原生质体，经液体培养得到再生植株。1985 年以前，原生质体成株主要集中在双子叶植物茄科中的烟草属、矮牵牛属、曼陀罗属、伞形科、十字花科等，而单子叶植物中重要的农作物原生质体培养却难以取得重大突破（夏镇澳，1991）。Vasil 等（1980）采用珍珠粟（*Pennisetum. americanum*）的胚性愈伤组织建立悬浮系，以悬浮细胞分离原生质体，首次实现禾本科原生质体再生植株。此后以胚性悬浮细胞分离原生质体的方法在禾本科植物原生质体培养中得到广泛应用。以 Fujimara 等（1985）从水稻胚性悬浮细胞中分离原生质体培养出再生植株为开端，一些重要的农作物原生质体培养相继取得成功。Haris 等（1998）在小麦上、颜秋生（1990）等在大麦上、Rhodes 等（1988）在玉米上分别得到原生质体再生植株。目前重要的农作物原生质体培养已取得成功，这为在细胞、亚细胞水平进行遗传操作奠定了技术基础。

2.2.1 原生质体制备的起源材料

选择合适的基因型是原生质体培养成功的关键因素之一。同一种植物中，不同的基因型对培养基和培养条件反应有很大差别。在相同条件下，有的品种能够较顺利地完原生质体游离、再生细胞持续分裂发育成愈伤组织及器官分化的全过程，而有的品种则不能。因此，采用多品种或适当品种为起始材料可增加原生质体培养的成功率（陈英等，1992），如番茄的 8 个品种，植板率从 0.1-87%，差异很大（赵颖、梁海曼，1994）。选择合适的游离原生质体的起始材料是原生质体培养能否成功的又一个关键因素，自然条件下生长的植株的各部组织及器官的细胞；无菌苗的胚根、子叶、真叶、胚轴细胞；外植体来源的愈伤组织、体细胞胚及悬浮细胞均可用于游离原生质体。但不同来源的外植体在培养过程中的分裂频率有差异，如向日葵叶肉、茎、子叶、胚轴的原生质体中仅胚轴原生质体能获得较高分裂频率；苜蓿的原生质体培养中，绿色子叶分裂频率大于黄色子叶（赵颖、梁海曼，1994）。

自然条件下生长的植株来源方便，短期可提供大量原生质体，但灭菌不容易，实验不易重复，四季取材困难。无菌苗无须灭菌，实验易控制、可重复、不受季节限制，但试管苗比较弱，制备的原生质体产量低，质膜较敏感易破。愈伤组织、悬浮培养细胞可常年供应，易于控制新生细胞的年龄，处理时操作简便，但染色体数的不稳定性，使植株再生率显著降低。从所获得原生质体的遗传一致性出发，一般认为由叶肉细胞组织分离的原生质体遗传性较为一致。从培养的单细胞或愈伤组织来源的原生质体，由于受到培养条件和继代培养时间的影响，致使细胞间发生遗传和生理差异。因此，单细胞和愈伤组织不是获得原生质体十分理想的材料。但从胚性愈伤组织和胚性悬浮细胞系游离的原生质体生活力旺盛，能够在培养过程中持续地分裂并保持着较强的器官分化能力。因此，胚性愈伤组织或胚性悬浮细胞系一旦建立起来，就可顺利地开展原生质体培养工作，且重复性良好（薛庆善，2001）。

2.2.2 原生质体的分离及纯化

不同植物来源以及同一植物的不同组织部位细胞的细胞壁，其成分和结构是不同的。因此，要获得满意的原生质体，需针对使用的材料，选择适合的分离方法和酶液组成。植物原生质体分离方法目前一般都采用酶法分离原生质体。酶制剂的用量随其酶活性高低而异，参考浓度值为 0.5%-3%，但酶活很高的果胶酶 Y-23 用量一般在 0.05%-0.1% 之间（薛庆善，2001）。分离纤维类植物苧麻愈伤组织的原生质体时纤维素酶浓度为 1% 和 2%，对苧麻细胞壁的离解根本不起作用；纤维素酶浓度为 3% 时，才开始游离原生质体，但产量很低；纤维素酶浓度为 6%，原生质体游离最快，产量最高，活性也最高（熊兴耀等）。用苧麻子叶分离原生质体时，纤维素酶的浓度也用到了 3%（陈喜文等，1995），明显高于水稻（1%-2%）、小麦（2%-3%）、马铃薯（1%）、烟草（0.5%）、甘蔗（1.5%）和矮牵牛（2%）等。酶液和材料鲜重的比例可参照 10:1，即 1 克鲜重材料用 10 ml 酶液。不同的外植体需酶量不同，叶子、子叶可撕掉下表皮或切成小细条，再用酶液浸泡，需酶量少；下胚轴一般切成小薄片，再用酶液浸泡，需酶量也少；愈伤组织及悬浮细胞一般选择较均匀的小细胞团，需酶量较大（许智宏，卫志明）。

原生质体在无稳压剂的介质中易破碎。因此原来由植物细胞壁所产生的机械压力，须由一合适的渗透压来代替，细胞内外的渗透压必须平衡。常用的稳压剂有两

大类：一类为糖醇或可溶性糖（如甘露醇、山梨醇、葡萄糖和蔗糖）组成的有机溶液；另一类为无机盐溶液，常由 CaCl_2 、 MgSO_4 、 KCl 或培养基中的无机盐组成。近年来将合适浓度的甘露醇溶于 CPW 盐溶液中作为稳定剂，成功的从不少十字花科植物和番茄、大豆等植物中分离得到原生质体并分别培养成愈伤组织或再生植株。CPW 盐溶液有机物中以甘露醇最常用，因为它在代谢上是惰性的。山梨醇、蔗糖、葡萄糖均会在不同程度上被细胞所代谢，尤其是蔗糖浓度较高对细胞有害，较少采用。为保护质膜稳定性，稳定剂中除附加钙盐（0.1%）外，还可用葡聚糖硫酸钾（0.5%-1.0%）， Ca^{2+} 能为膜蛋白所束缚，提高膜钙含量，可增强质膜稳定，并有利于细胞分裂；葡聚糖硫酸钾能抑制酶液中某些杂酶和 RNA 酶的活性，有助于质膜稳定，使细胞持续分裂并形成细胞团，如在分离烟草原生质体时，在酶液中加入葡聚糖硫酸钾，一旦洗净酶液进行培养，原生质体很快长壁并持续细胞分裂形成细胞团，而未加葡聚糖硫酸钾的对照，原生质体经一周培养即解体（高国楠，1973；李文安，1979）。为防酶液因醌出现而变褐，酶液中可附加适量含 SH 的保护剂（2 mol/L），如二硫苏糖醇（DTT），不能用其它还原剂（薛庆善，2001）。

原生质体的纯化方法有过滤—离心法、漂浮法、和界面法。一般采用离心法和界面法结合的方法，操作较简单，且能去除原生质体悬浮液里的碎屑，得到纯净的原生质体。

2.2.3 原生质体培养的培养基

最初用于培养原生质体的培养基多是用培养细胞的培养基，常用的有 B5、NT 和 MS 培养基，以后随着人们对原生质体生长的进一步了解，认为原生质体的营养需要与细胞的营养要求还是有一定差异，因此对培养细胞的培养基进行了一定修改。例如 KM 培养基（Kao & Michaluk, 1975），此培养基是改良较成功的培养基，迄今至少有 14 个科 56 种植物的原生质体已在 KM_0P 及其衍生的培养基上得到了愈伤组织。KM 培养基的特点是富含各种有机成分如氨基酸、有机酸、椰乳等。另外，还有 V-KM 培养基（Binding 和 Nehls, 1978），据统计已实验了 200 种以上的植物原生质体，效果很好。除此以外 shepard 的 L/R 培养基，李向辉的 D2 配方等也适于原生质体培养（许智宏，1986）。刘庆昌等（1994）用改良的 1/2 MS 培养基培养甘薯原生质体获得成功，陈喜文等（1996）用 MSB 培养基培养苎麻子叶原生质体，原生质体培养

6d 恢复分裂, 分裂频率为 4.7%, 但原生质体只持续几次分裂即停止生长, 必须采用高度富营养的 KM_8P 培养基。林顺权、陈振光 (1996) 用 MS、 mMS 、 KM_8P 培养基培养的枇杷原生质体发现培养基中最重要的因素是生长调节剂, 基本培养基对其分裂频率无大的影响。可以看出不同植物的原生质体对营养的需要不同。

激素对原生质体的生长发育是非常重要的, 但由于不同的植物种对激素的种类和浓度有很不同的要求, 很多关于原生质体培养对激素需求的报道是相互矛盾的。有的研究认为 2,4-D 是用于原生质体培养的最普遍的生长调节剂, 而细胞分裂素对诱导原生质体分裂是不必要的。但总的来说, 生长素和细胞分裂素是需要的, 并需要二者的适当搭配。同时, 在不同的发育阶段 (起始分裂, 细胞团形成, 愈伤组织形成及器官分化) 需要不断地对激素的种类和浓度进行及时的调整。

一些改良的用作原生质体的培养基, 一般都对氮源作了调整, 以更有利于原生质体的培养, 培养基中的氨态氮, 硝态氮对原生质体培养的胚胎发生及其发育均产生影响。余建民等 (1991) 研究了氮源对陆地棉原生质体培养中的胚胎发生及其发育的影响, 结果表明在培养基中用: (1) 用 2 倍 KNO_3 虽能提高原生质体细胞胚的发生频率和数量, 但绝大多数胚状体发育停止在球形期。(2) 培养基中撤掉 NH_4NO_3 用 2 倍 KNO_3 虽有利与胚状体的发生和发育, 但抑制胚性细胞愈伤组织的发生。(3) 用 $1/2 NH_4NO_3$ 、2 倍 KNO_3 不仅提高胚状体的发生频率, 而且促进其发育, 获得一定数量的鱼雷形胚状体, 此外, 还有利于愈伤组织的生长, 在继代培养中不断诱导胚状体发生。

2.2.4 原生质体的培养方法

植物原生质体培养方法起源于植物单细胞培养方法。早在 1902 年, Haberlandt 通过实验就预言: 体外培养单个细胞可通过其分裂得到愈伤组织。直到 1954 年, 植物单细胞培养才获得成功, Muir 将培养的万寿菊及烟草悬浮细胞植入到长有愈伤组织的培养基上而得到了他们的单细胞克隆, 并建立了看护培养方法。悬浮培养由 De. Roppl 1954 开创, 1960 年 Jones 等完善这一技术, 并建立了微室培养方法。同年, Cocking 应用酶法分离原生质体获得成功, 从而在实验条件下很容易获得大量的原生质体。随着多种使用于原生质体分离的商品酶的出现, 原生质体的培养方法也得到不断的改善, 现在常用的有液体浅层培养、双层培养、琼脂糖包埋法、琼脂岛培养法、以及使用条件培养基或饲喂培养等技术方法。它们各有优缺点, 且不同

的培养方法使用于不同类型的原生质体。原生质体培养方法层出不穷，近年来不同的研究工作者用了不同的方法，也产生了很好的效果，如陈喜文等的海藻酸钠包埋培养，李名扬等的琼脂糖薄层培养。陈喜文等（1996）用海藻酸钠包埋培养苧麻的原生质体，研究证明用此方法原生质体分裂频率高，且能持续发育至愈伤组织；浅层培养、双层培养原生质体易粘连和凝聚，导致原生质体褐化、死亡。普通琼脂糖包埋培养中，由于高温冲击和营养供给的原因，原生质体只发育到 20 个细胞的细胞团，海藻酸钠可弥补这两方面的不足，因为它包埋用的是交联化学反应，且形成的凝胶有一定的通透性，液体培养基的养分可透过凝胶满足原生质体的生长和发育的需要，其效果有点类似琼脂糖软包埋，是较理想的培养方式。

3. 研究目的及意义

用基因工程和细胞工程已对许多植物实现了种质创新，但红麻相对滞后。造成这种现状的原因主要因为红麻组织培养体系的不完善。目前田间苗节间茎段（K. S. Mclean, 1991; Nancy A. Reichert and Brian S. Baldwin, 1996），子叶（李树川, 1982），真叶（Nancy A. Reichert and Brian S. Baldwin, 1996），花药（陈祥云等, 1979-1984）离体培养诱导植物植株再生均有报道，但未见更多的深入研究，且存在再生效率低，再生途径繁琐等问题。红麻的原生质体培养起步也较晚，Zhao, Y. X 和 Yao, D. Y 等（1991）从愈伤组织中分离出原生质体，并培养得到了愈伤组织，但未能分化出苗；Nancy A. Reichert 和 Donglong Liu（1996）从叶片中分离出原生质体，培养得到愈伤组织，也未能分化出苗。

本研究拟建立红麻器官及原生质体的培养与再生体系，为诱变与筛选新的育种资源，为经细胞工程与基因工程途径创造新的种质资源奠定基础。

第二部分 红麻的器官培养与形态建成

1. 材料和方法

1.1 材料

本研究所用的材料为红麻 917, KB₂, F76, GM26, 722, BG155, 伊朗裂叶。来自湖南长沙麻类研究所。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗的培养

选取适量籽粒饱满的红麻种子, 先在 70% 的酒精中消毒 4-5 min, 再用 0.1% 的升汞 (HgCl₂) 处理 15-20 min, 后用无菌水冲洗 4-5 次, 将消毒的种子接种于不含任何激素的 MS 固体培养基 (Murashige and Skoog, 1962) 上。培养基含蔗糖 3%、琼脂 0.7%、pH 值调至 5.8、在 121℃、1.1 Kg/cm² 高温高压下灭菌 15-20 min, 置于暗处发芽, 温度为 26±1℃。

1.2.2 愈伤组织的诱导及组织细胞学形态观察

愈伤组织的诱导 取暗中生长 4d-5d 龄无菌苗的白色下胚轴、光下生长 7d-8d 龄无菌苗的绿色下胚轴和子叶、25d 龄试管苗茎段及第一, 二片真叶为外植体接种。下胚轴、茎段切成 5 mm 左右长, 子叶、叶片横切成 2-3 mm 宽的长条, 分别接种于诱导愈伤培养基上, 于黑暗中诱导愈伤, 培养温度为 26±1℃。所用培养基为 MS, 蔗糖为 3%, 琼脂为 0.7%, pH 值调至 5.8, 在 121℃, 1.1 Kg/cm² 高温高压下灭菌 15-20 min。

愈伤组织组织细胞学形态观察:

涂片法: 在载玻片上滴一滴蒸馏水, 用尖头镊子镊取少许松散的愈伤放于蒸馏水中并慢慢捣碎使之散开, 盖上盖玻片, 用橡皮头轻压盖玻片, 使愈伤细胞均匀散开, 即可观察;

石蜡切片法: 取诱导培养基上不同发育时期的下胚轴及子叶, 分别用 FAA 固定液 (70% 酒精: 冰醋酸: 福尔马林=89:6:5) 进行固定, 石蜡切片法进行连续切片, 切片厚度 8~10 μm, 苯胺番红和苯胺固绿双重染色, Olympus 显微系统观察、照相。

1.2.3 红麻子叶、真叶不定芽的直接诱导及其组织细胞学观察

不定芽的直接诱导 取光下生长 7d-8d 龄无菌苗的绿色子叶、25d 龄试管苗第一、二片真叶为外植体接种。子叶、叶片横切成 2-3mm 宽的长条，分别接种于诱导愈伤培养基上，于光下诱导，培养温度为 $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。所用培养基为 MS，蔗糖为 3%，琼脂为 0.7%，pH 值调至 5.8，在 121°C ， 1.1 Kg/cm^2 高温高压下灭菌 15-20 min。

组织细胞学观察 石蜡切片法，取诱导培养基上不同发育时期(4d、8d、12d、16d、20d、24d)的子叶，分别用 FAA 固定液(70%酒精：冰醋酸：福尔马林=89：6：5)进行固定，石蜡切片法进行连续切片，切片厚度 $8 \sim 10 \mu\text{m}$ ，苯胺番红和苯胺固绿双重染色，Olympus 显微系统观察、照相。

1.2.4 腋芽的快速增殖和无性繁殖系的建立

截去光下生长 7d-8d 的种子苗根部，在 1/2 MS 培养基中继代生长，生长 15d 左右去掉试管苗子叶，修成 2-3 厘米长的无根苗，继续在 1/2 MS 培养基中继代生长，20d 左右长成茎段，真叶生长比较旺盛的试管苗。再把这些无菌苗切成带一个节的小段，接种在附加不同激素的长苗的培养基上，腋芽长大成苗，再把每棵苗切成带一个节的小段继续接种，这样每隔 25 天左右可接种一次，迅速增殖出大量的试管苗。

1.2.5 下胚轴生根的诱导及细胞组织学观察

取光下生长 7d-8d 的无菌苗，截去下胚轴下段及根，再将无根苗植入附加不同生长素浓度的培养基中，进行生根试验。

组织细胞学观察 取诱导培养基上不同发育时期(2d、4d、6d、8d、10d)的下胚轴 3-5 mm 的下段，分别用 FAA 固定液(70%酒精：冰醋酸：福尔马林=89：6：5)进行固定，石蜡切片法进行连续切片，切片厚度 $8 \sim 10 \mu\text{m}$ ，苯胺番红和苯胺固绿双重染色，Olympus 显微系统观察、照相。

2. 结果与分析

2.1 红麻愈伤组织的诱导及其细胞组织学观察

F76 无菌苗暗培养 5d 龄下胚轴、光培养 7d 龄下胚轴、25d 龄试管苗节间茎段、光培养 7d 龄子叶、25d 龄试管苗真叶接种在附加不同激素组合的培养基上。暗培养 20d 后观察暗培养 5d 龄下胚轴、光培养 7d 龄下胚轴、25d 龄试管苗节间茎段的愈伤诱导情况，暗培养 30d 后观察光培养 7 天龄子叶、25d 龄试管苗真叶的愈伤诱导情况，统计结果如下：

2.1.1 不同激素组合对红麻不同外植体出愈率的影响

表 1 不同激素组合对红麻不同外植体出愈率的影响

Table1 Combinations of different hormones in MS medium tested for their effect on induce frequency from different explant of kenaf

编 号 No.	激 素 组 合 (mg/L) Hormones Combination 2,4-D 6-BA		出愈率 Ratio (%)				
			暗 培 养	光 培 养	25d 龄试	光 培 养	25d 龄试
			5d 龄下	7d 龄下	管苗节间	7d 龄子	管苗真叶
			胚轴	胚轴	茎段	叶	
1	0.05	0.1	100	57.5	0	0	0
2	0.05	0.5	100	87.5	100	0	100
3	0.05	1.0	100	62.5	100	0	0
4	0.05	3.0	100	70	100	0	0
5	0.1	0.1	100	90	100	0	100
6	0.1	0.5	100	90	100	0	100
7	0.1	1.0	100	100	100	62.5	100
8	0.1	3.0	100	100	100	0	0
9	0.5	0.1	100	85	100	0	100
10	0.5	0.5	100	95	100	60	100
11	0.5	1.0	100	98	100	40	100
12	0.5	3.0	100	100	100	62.5	100
13	1.0	0.1	100	100	100	80	100
14	1.0	0.5	100	94	100	100	100
15	1.0	1.0	100	94	100	90	100
16	1.0	3.0	100	96	100	90	100
17	2.0	0.1	100	100	100	100	100
18	2.0	0.5	100	95	100	100	100
19	2.0	1.0	100	100	100	85	100
20	2.0	3.0	100	95	100	87.5	100

注：接种外植体个数为 40 个/组合

从表 1 可以看出：在各个激素组合上红麻暗培养 5d 龄下胚轴的愈伤诱导率均为 100%；节间茎段除激素水平较低的组合 1 外出愈率也皆为 100%；25d 龄试管苗真叶在 2, 4-D 浓度不大于 0.1 mg/L，细胞分裂素浓度较高（3mg/L 的 6-BA）时，难以诱导出愈伤组织，在其他组合上出愈率也均为 100%；相比之下光下生长 7d 龄的无菌苗下胚轴和子叶愈伤诱导率较低，光下生长 7d 龄下胚轴在 2, 4-D 浓度为 0.05 mg/L 时出愈率较低，在 2, 4-D 浓度大于 0.05 mg/L 的组合上出愈率均达到 90%以上；光下生长 7d 龄子叶诱导愈伤组织 2, 4-D 的浓度要达到较高水平，2, 4-D 浓度

小于 0.5 mg/L 时, 子叶几乎不出愈, 2, 4-D 浓度为 0.5 mg/L 时, 出愈率远小于 80%, 2, 4-D 浓度大于 0.5 mg/L 时, 出愈率均达到 80%以上。可见生长素 2,4-D 在诱导红麻愈伤组织中起着重要作用。不同外植体诱导愈伤组织的难易依次为: 暗培养 5d 龄下胚轴>25d 龄试管苗节间茎段>25d 龄试管苗真叶>光下生长 7d 龄下胚轴>光下生长 7d 龄子叶。诱导 30d 未见出愈的子叶组合上, 在 20d 后部分外植体出现愈伤, 但在 0.05 mg/L 2,4-D 和 3.0 mg/L 6-BA 组合上的子叶变枯黄。

2. 1. 2 不同激素组合对红麻不同外植体愈伤组织生长势的影响

表 2 不同激素组合对红麻不同外植体愈伤组织生长势的影响

Table2 Combinations of different hormones in MS medium tested for their effect on callus growth from different explant of kenaf

编号 No.	激素组合 (mg/L) Hormones Combination		愈伤生长势 (Growth of Callus)				
	2,4-D	6-BA	暗培养	光培养	25d 龄试	光培养	25d 龄试
			5d 龄下	7d 龄下	管苗节间	7d 龄子	管苗真叶
			胚轴	胚轴	茎段	叶	
1	0.05	0.1	**	*	*	0	0
2	0.05	0.5	**	*	**	0	*
3	0.05	1.0	**	**	**	0	0
4	0.05	3.0	*	*	*	0	0
5	0.1	0.1	****	****	**	0	**
6	0.1	0.5	***	**	**	0	*
7	0.1	1.0	*	*	**	*	**
8	0.1	3.0	*	*	*	0	0
9	0.5	0.1	**	**	**	0	**
10	0.5	0.5	***	***	***	*	**
11	0.5	1.0	***	***	***	**	**
12	0.5	3.0	***	***	***	**	*
13	1.0	0.1	**	**	*	**	**
14	1.0	0.5	***	**	**	*	**
15	1.0	1.0	***	**	**	**	**
16	1.0	3.0	**	***	**	*	*
17	2.0	0.1	*	*	*	**	**
18	2.0	0.5	**	**	**	**	**
19	2.0	1.0	**	**	**	**	**
20	2.0	3.0	***	**	**	*	**

注: *——生长势弱, **——生长势稍强, ***——生长势强, ****——生长势很强

由表 2 可以看出: 就外植体看, 暗培养 5d 龄下胚轴愈伤的生长势最优, 光下生

长 7d 龄的下胚轴及 25d 龄试管苗茎段较优, 子叶、真叶愈伤生长势较差; 就生长素看, 2, 4-D 为 0.5 mg/L 时, 各个外植体的愈伤生长势都较优; 就细胞分裂素看, 6-BA 自身未反映出主效规律性, 但对 2, 4-D 有协同效应, 2, 4-D 浓度较低(0.05、0.1mg/L) 时, 低浓度 6-BA 有利于愈伤生长, 高浓度 6-BA 抑制愈伤生长; 2, 4-D 浓度较高(0.5、1.0、2.0mg/L) 时, 低浓度 6-BA 明显抑制愈伤生长; 就愈伤长势看, 2, 4-D 为 0.5 mg/L、6-BA 为 0.5-3.0 mg/L 是暗培养 5d 龄下胚轴、光下生长 7d 龄下胚轴及 25d 龄试管苗茎段诱导愈伤的较佳激素组合。2, 4-D 为 1.0-2.0 mg/L、6-BA 为 0.1-1.0 mg/L 是子叶, 真叶诱导愈伤的较佳激素组合。

2.1.3 不同激素组合对红麻不同外植体愈伤状态的影响

表 3 不同激素组合对红麻不同外植体愈伤状态的影响

Table3 Combinations of different hormones in MS medium tested for their effect on phenotype of callus from different explant of kenaf

编号 No.	激素组合 (mg/L) Hormones Combination		愈伤状态 (Phenotype of callus)				
	2,4-D	6-BA	暗培养 5d 龄下 胚轴	光培养 7d 龄下 胚轴	25d 龄试 管苗节间 茎段	光培养 7d 龄子 叶叶色	25d 龄试 管苗真叶 叶色
1	0.05	0.1	白色坚硬	白色坚硬	白色坚硬	绿色	绿色
2	0.05	0.5	白色坚硬	白色坚硬	白色坚硬	绿色	绿色
3	0.05	1.0	白色坚硬	白色坚硬	白色坚硬	绿色	绿色
4	0.05	3.0	白色坚硬	白色坚硬	白色坚硬	绿色	绿色
5	0.1	0.1	白色坚硬	白色坚硬	白色坚硬	绿色	绿色
6	0.1	0.5	白色坚硬	白色坚硬	白色坚硬	绿色	绿色
7	0.1	1.0	白色坚硬	白色坚硬	白色坚硬	绿色	绿色
8	0.1	3.0	白色坚硬	白色坚硬	白色坚硬	绿色	绿色
9	0.5	0.1	淡黄致密	淡黄致密	淡黄致密	黄绿色	黄绿色
10	0.5	0.5	淡黄致密	淡黄致密	淡黄致密	黄绿色	黄绿色
11	0.5	1.0	淡黄致密	淡黄致密	淡黄致密	黄绿色	黄绿色
12	0.5	3.0	淡黄致密	淡黄致密	淡黄致密	黄绿色	黄绿色
13	1.0	0.1	黄色疏松	黄色疏松	黄色疏松	黄色	黄色
14	1.0	0.5	黄色疏松	黄色疏松	黄色疏松	黄色	黄色
15	1.0	1.0	黄色疏松	黄色疏松	黄色疏松	黄色	黄色
16	1.0	3.0	黄色疏松	黄色疏松	黄色疏松	黄色	黄色
17	2.0	0.1	深黄松散	深黄松散	深黄松散	黄色	黄色
18	2.0	0.5	深黄松散	深黄松散	深黄松散	黄色	黄色
19	2.0	1.0	深黄松散	深黄松散	深黄松散	黄色	黄色
20	2.0	3.0	深黄松散	深黄松散	深黄松散	黄色	黄色

不同激素组合对不同外植体愈伤状态的影响见表 3，可以看出 2, 4-D 对不同外植体的愈伤状态有着一致的影响，2, 4-D 浓度较低时形成白色坚硬的块状愈伤组织（图版 1-1）；2, 4-D 浓度为 0.5 mg/L 时，愈伤组织为淡黄色较致密，表面呈微小颗粒状（图版 1-2）；2, 4-D 浓度渐高时，愈伤组织由黄色到深黄，由疏松到更为松散（图版 1-3、1-4）。2, 4-D 对接种培养后的子叶，真叶叶片颜色也有影响，0.05 mg/L、0.1 mg/L 的 2, 4-D 组合上的叶色为绿色，0.5 mg/L 上的为黄绿色，1.0 mg/L、2.0 mg/L 上的为黄色。

2.1.4 不同激素组合对红麻不同外植体愈伤生根的影响

表 4 不同激素组合对红麻不同外植体愈伤生根的影响

Table 4 Combinations of different hormones in MS medium tested for their effect on adventitious root formation from different explant of kenaf

编号 No.	激素组合 (mg/L) Hormones Combination		生根率 Ratio (%)				
	2,4-D	6-BA	暗培养	光培养	25d 龄试	光培养	25d 龄试
			5d 龄下	7d 龄下	管苗节间	7d 龄子	管苗真叶
			胚轴	胚轴	茎段	叶	
1	0.05	0.1	62.5*	57.5*	80*	0	100****
2	0.05	0.5	60*	27.5*	100*	0	100***
3	0.05	1.0	0	0	85*	0	37.5*
4	0.05	3.0	0	0	42.5*	0	0
5	0.1	0.1	50*	27.5*	100**	0	100****
6	0.1	0.5	40*	0	50**	0	100****
7	0.1	1.0	32.5*	0	67.5**	0	100*
8	0.1	3.0	10*	0	75*	0	0
9	0.5	0.1	0	0	0	0	0
10	0.5	0.5	0	0	0	0	0
11	0.5	1.0	0	0	0	0	0
12	0.5	3.0	0	0	0	0	0
13	1.0	0.1	0	0	0	0	0
14	1.0	0.5	0	0	0	0	0
15	1.0	1.0	0	0	0	0	0
16	1.0	3.0	0	0	0	0	0
17	2.0	0.1	0	0	0	0	0
18	2.0	0.5	0	0	0	0	0
19	2.0	1.0	0	0	0	0	0
20	2.0	3.0	0	0	0	0	0

注：*：1-2root/Explant；**：4-5r/Ex；***：9-10 r/Ex；****：>15 r/Ex

表 4 可以看出:2,4-D 浓度为 0.05 mg/L 和 0.1 mg/L 时,与 0.1mg/L 和 0.5 mg/L 的 6-BA 配比的四个组合上五种外植体均有生根现象,而与 1.0 mg/L 和 3.0 mg/L 的 6-BA 配比的四个组合上五种外植体生根率和根长势都明显降低,2,4-D 浓度不小于 0.5 mg/L 时均无生根现象。表明低浓度 2,4-D 诱导生根,高浓度 2,4-D,6-BA 抑制生根。不同外植体在可诱导生根的培养基上也有不同反应,光培养 7 天龄子叶,不论是诱导愈伤还是生根都无大的反应;光培养 7 天龄下胚轴最大生根率为 57.5%,每个外植体生根量仅为 1-2 根,6-BA 为 1.0 mg/L 和 3.0 mg/L 时生根率为零;暗培养 5 天龄下胚轴最大生根率为 62.5%,每个外植体生根量也为 1-2 根,6-BA 为 1.0 mg/L 和 3.0 mg/L 时,和 0.05 mg/L 2,4-D 配比的培养基上不生根,和 0.1 mg/L 2,4-D 配比的培养基上生根率降低;25d 龄试管苗节间茎段在 8 种培养基上皆生根,且 2,4-D 为 0.1 mg/L 时,每个外植体的生根量在 5 根左右;25d 龄试管苗真叶在 6-BA 浓度为 0.1 mg/L 和 0.5 mg/L 的生根培养基上生根率均为 100%,每个外植体的生根量多达到 20 根,6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时生根率降低,生根量也仅为 1 根,6-BA 浓度为 3.0 mg/L 时,真叶的愈伤诱导和生根同时受到抑制。

2.1.5 红麻下胚轴愈伤发生的组织细胞学形态观察

由表 5 可以看出,愈伤组织发生的部位与生长调节剂的种类和浓度有关,①低浓度的 2,4-D (0.05-0.1 mg/L) 和低浓度的 6-BA (0.1-0.5 mg/L) 诱导表皮和皮层薄壁细胞分裂,形成愈伤组织(图版 2-1、2、3)。②低浓度的 2,4-D (0.05-0.1 mg/L) 和高浓度的 6-BA (1.0-3.0 mg/L) 诱导皮层薄壁细胞分裂,形成愈伤组织。高浓度 6-BA 抑制了表皮细胞的分裂。③高浓度的 2,4-D (1.0-2.0 mg/L) 和低浓度的 6-BA (0.1-0.5 mg/L) 诱导维管形成层细胞分裂,形成愈伤组织。高浓度 2,4-D 抑制了表皮及皮层细胞的分裂(图版 2-4、5、6)。④高浓度的 2,4-D (1.0-2.0 mg/L) 和高浓度的 6-BA (1.0-3.0 mg/L) 主要诱导维管形成层细胞分裂,形成愈伤组织,但也有少量皮层薄壁细胞分裂形成的分生细胞团。可见,细胞分裂素通过诱导皮层薄壁细胞分裂生长形成愈伤组织,而生长素通过诱导维管形成层细胞分裂生长,大量增殖形成愈伤组织。由愈伤组织细胞的大小和长势可以看出,6-BA 起主效的组合愈伤细胞较大,2,4-D 起主效的组合,愈伤细胞较小。

表5 不同激素组合对红麻下胚轴愈伤发生的组织细胞学形态的影响

Table5 Combinations of different hormones in MS medium tested for their effect on callusgenesis's cytohistolog of hypocoty

编号 No.	激素组合(mg/L) Hormones Combinations		愈伤组织 (callus)		
	2,4-D	6-BA	发生部位	细胞大小 (cell size)	长势 (growth)
1	0.05	0.1	表皮及皮层薄壁细胞	较大	弱
2	0.05	0.5	表皮及皮层薄壁细胞	较大	较强
3	0.05	1.0	皮层薄壁细胞	较大	弱
4	0.05	3.0	皮层薄壁细胞	较大	弱
5	0.1	0.1	表皮及皮层薄壁细胞	较大	较强
6	0.1	0.5	表皮及皮层薄壁细胞	较大	较强
7	0.1	1.0	皮层薄壁细胞	较大	较强
8	0.1	3.0	皮层薄壁细胞	较大	弱
9	0.5	0.1	维管形成层	较小	强
10	0.5	0.5	维管形成层	较小	强
11	0.5	1.0	皮层薄壁细胞	较小	强
12	0.5	3.0	皮层薄壁细胞	较大	较强
13	1.0	0.1	维管形成层	小	较强
14	1.0	0.5	维管形成层 (主) 皮层薄壁细胞 (次)	小	强
15	1.0	1.0	维管形成层 (主) 皮层薄壁细胞 (次)	小	较强
16	1.0	3.0	维管形成层 (主) 皮层薄壁细胞 (次)	小	较强
17	2.0	0.1	维管形成层	极小	较强
18	2.0	0.5	维管形成层	极小	较强
19	2.0	1.0	维管形成层 (主) 皮层薄壁细胞 (次)	小	较强
20	2.0	3.0	维管形成层 (主) 皮层薄壁细胞 (次)	小	较强

注：较大>较小>小>极小

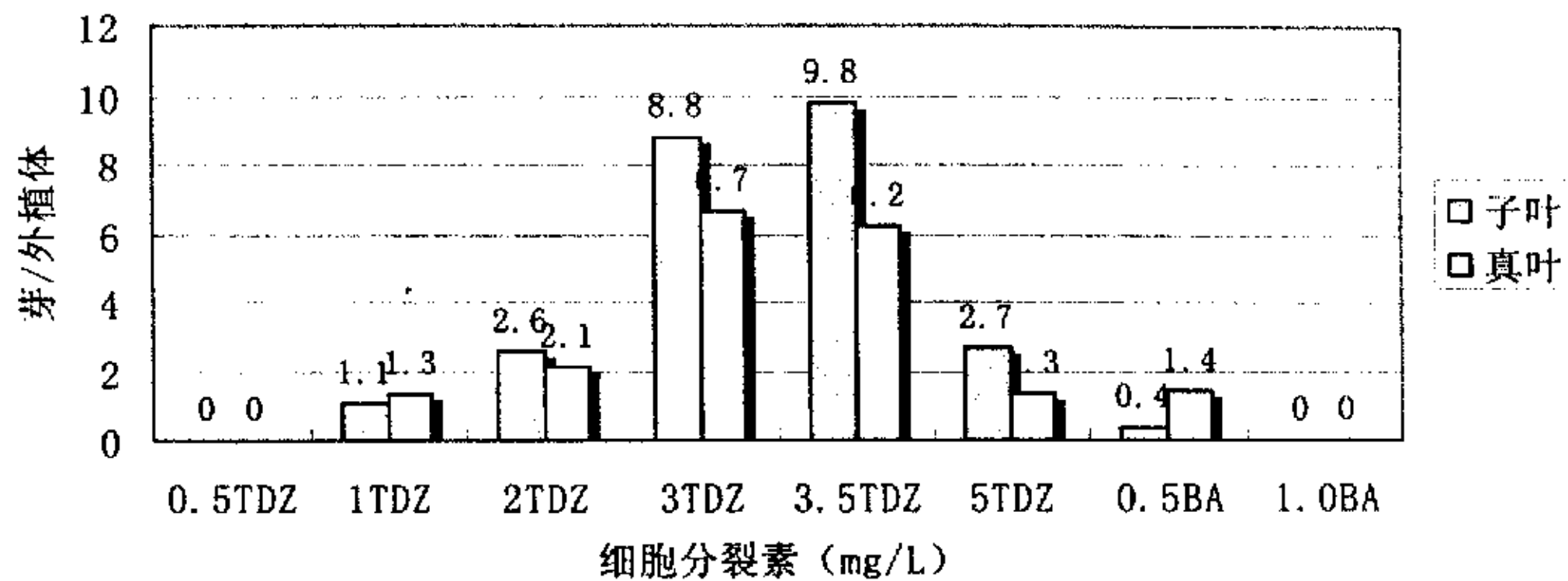
红麻 7d 龄子叶愈伤诱导的组织学观察显示：低浓度 2, 4-D 诱导叶肉细胞发生分裂形成愈伤组织（图版 3-1），高浓度 2, 4-D 诱导维管束薄壁细胞及维管形成层细胞分裂形成愈伤组织（图版 3-2、3、4），这与 2, 4-D 对下胚轴愈伤诱导的效应有些相似。

2.2 红麻子叶、真叶不定芽的直接诱导

以 F76 光下生长 7d-8d 龄的无菌苗子叶及 25d 龄试管苗真叶为外植体研究了不同细胞分裂素（TDZ、6-BA）和不同生长素（NAA、2, 4-D）对红麻子叶、真叶不定芽诱导的影响；以附加 3.5 mg/L TDZ 和 0.1 mg/L NAA 的 MS 培养基为诱导培养基研究了不同品种红麻子叶、真叶诱导不定芽的差异。试验结果如下：

2.2.1 不同细胞分裂素对子叶、真叶不定芽诱导的影响

图1 不同细胞分裂素对红麻子叶、真叶不定芽诱导的影响
Fig.1 Different cytokinins in MS medium tested for their effect on direct shoot induction of cotyledons and leaves of kenaf

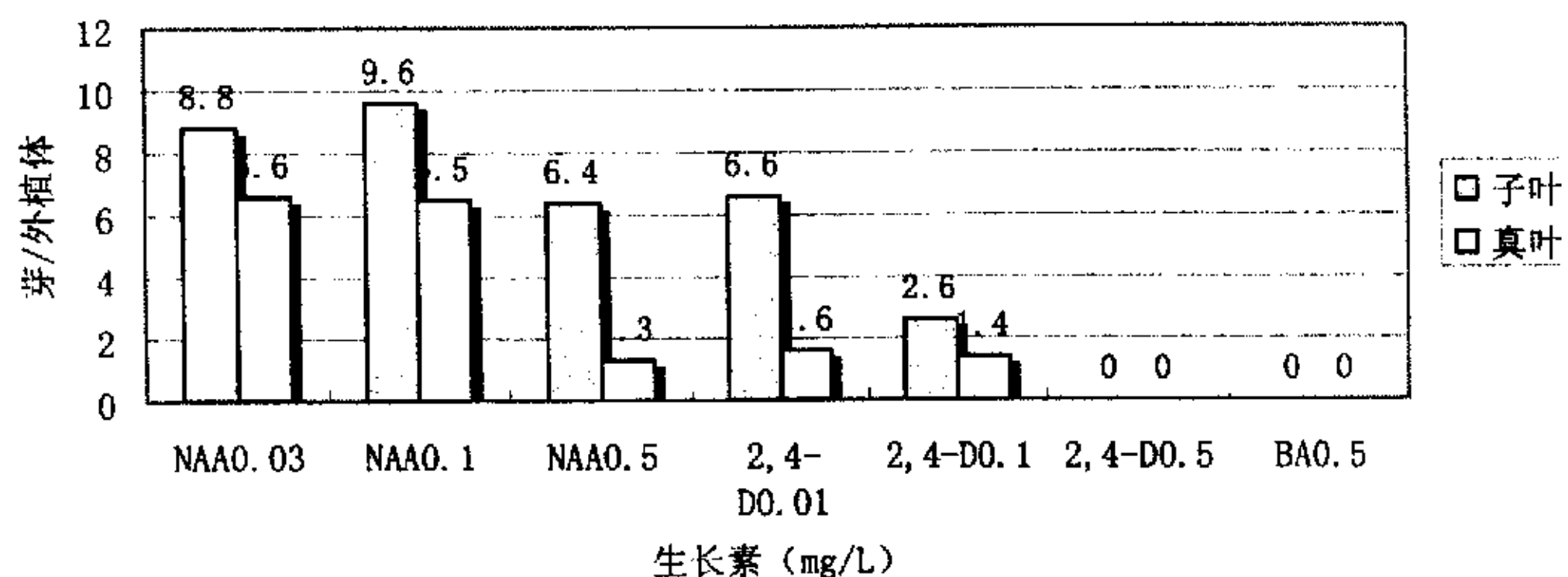


注：各 TDZ 组合均附加有 0.1 mg/L 的 NAA，6-BA 组合上未附加任何其他激素

由图可以看出，TDZ 在一个较大浓度范围（1.0-5.0 mg/L）均能诱导出不定芽，但最适浓度为 3.0-3.5 mg/L，TDZ 浓度过低出芽少，浓度过高抑制出芽。TDZ 诱导培养基上子叶平均生芽个数总体上优于真叶。6-BA 只有在 0.5 mg/L 时可诱导产生少量芽，高浓度 6-BA 严重抑制不定芽的产生，6-BA 对真叶的作用效果优于对子叶的作用效果。

2.2.2 不同生长素对子叶、真叶不定芽直接再生的影响

图2 不同生长素对红麻子叶、真叶不定芽诱导的影响
Fig.2 Different auxins in MS medium tested for their effect on direct shoot induction from cotyledons and leaves of kenaf

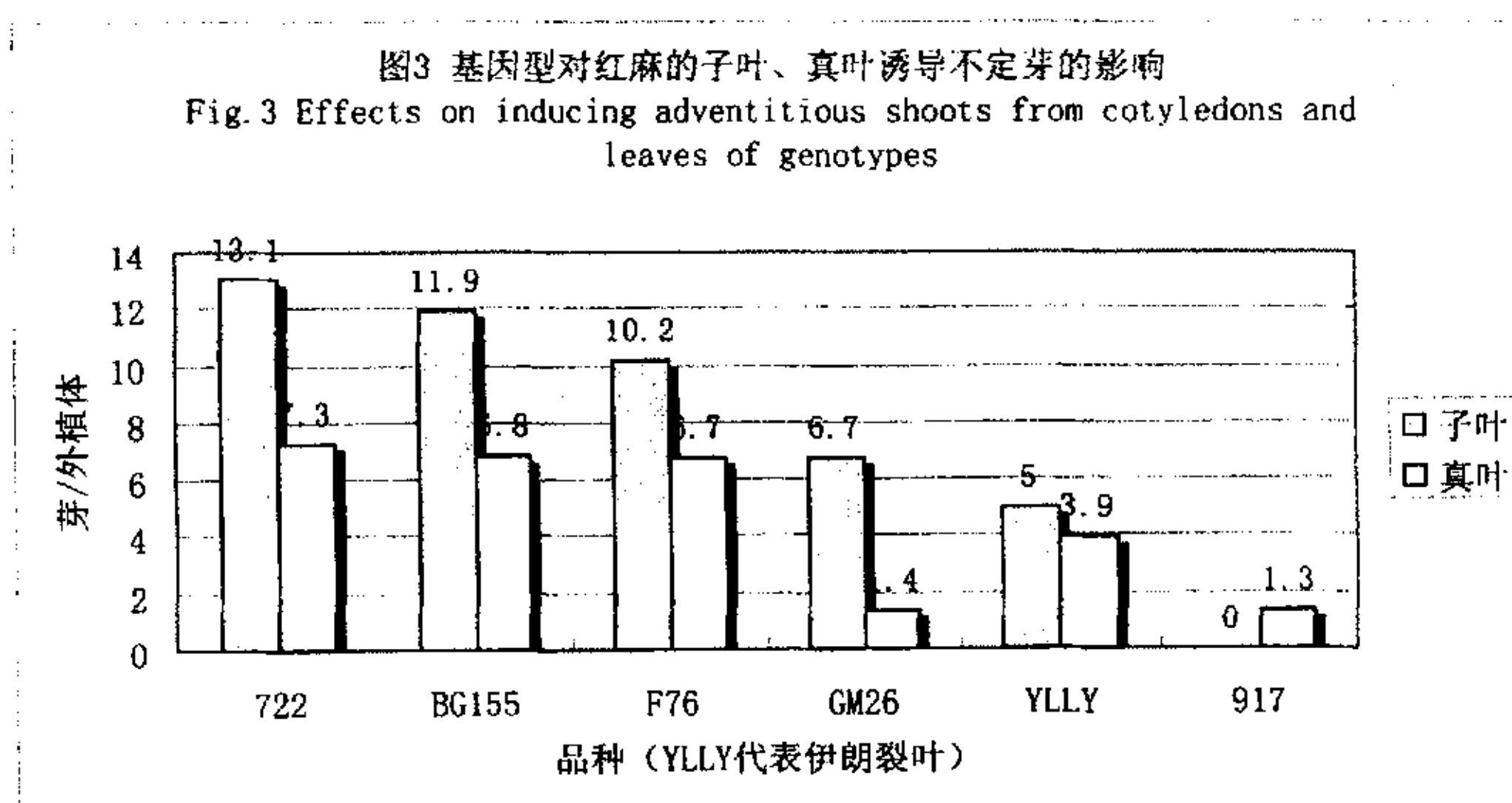


注：各生长素组合均附加 3.5 mg/L 的 TDZ，BA0.5 代表 NAA0.1 mg/L 附加 6-BA0.5 mg/L

由图可以看出：3.5 mg/L 的 TDZ 附加 0.01-0.1 mg/L 的 NAA 是诱导不定芽的最

佳激素组合；2, 4-D 及高浓度的 NAA 对真叶不定芽的诱导有显著的抑制作用；子叶对低浓度的 2, 4-D 及高浓度的 NAA 有一定的耐受性；2, 4-D 为 0.5 mg/L 时不管真叶还是子叶叶色均变黄出愈，不能产生不定芽；0.5 mg/L 的 6-BA 添加 0.1 mg/L NAA，子叶，真叶均愈伤化且大量生根，严重影响不定芽的产生。

2.2.3 不同基因型对红麻子叶、真叶不定芽诱导影响



红麻子叶、真叶诱导不定芽有一定的基因型差异，供试的六个品种中 917 的不定芽诱导率最低，722、BG155、F76 不定芽诱导率较高，Gm26、伊朗裂叶的不定芽诱导率较差。诱导率低的品种的子叶真叶均大量出愈，进一步抑制了不定芽的产生。

在诱导培养基上培养 20 天左右，在子叶的切口、叶角、叶面先产生大量绿色突起的瘤状物，有单个较大的瘤状物，也有几个小瘤状物集成一团（图版 4-1），30 天左右相继产生散生或丛生的不定芽（图版 4-2、4-3）。在叶面也有不经过瘤状物阶段直接长出单个不定芽的状况。诱导率较差的 Gm26、伊朗裂叶最早在切口处形成大量浅绿色瘤状物，第一个芽出现的时期也较早，但在后来的培养中，绿色瘤状物发育极慢，出芽少。诱导率高的 722、BG155 绿色瘤状物出现的较迟，但颜色深绿，发育较快，在培养过程中不断产生不定芽；把不定芽连同瘤状物分割继代到增殖，生长培养基会不断产生更多的不定芽（图版 4-4）。真叶在诱导培养基上大都只产生大量瘤状物（图版 4-6），少见直接长出不定芽，把瘤状物继代到增殖、生长培养基上后才从瘤状物上产生大量不定芽（图版 4-7）。

石蜡切片显示，未经诱导培养的子叶，具有明显的由一层长型细胞组成的栅栏组织和 6-8 层排列不很均匀但较紧密的海绵组织及栅栏组织下有几乎不可见的小维

管束（图版 5-1、5-2）。在诱导培养基上培养初期，叶肉细胞均匀分裂，小维管束明晰可见，有的维管束还连在一起（图版 5-4、5-5）。诱导后期，叶肉细胞不断分裂向表皮方向突起，在上表皮和下表皮方向都有突起，但多向下表皮突起形成瘤状物，瘤状物外围又突起的小细胞团，即为芽原基（图版 5-6、5-7）。

2.2.4 不定芽的增殖和生长

表 5 不同激素组合对不定芽继代增殖、生长的影响

Table 5 Effects on adventitious shoots proliferating and growing of different hormones combination

编号 No.	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	TDZ (mg/L)	不定芽生长状态
1	0.1	/	/	不定芽生长极慢
2	0.3	/	/	不定芽生长极慢
3	0.1	0.01	/	生长快，长势好
4	0.1	0.1	/	愈伤化，长根
5	/	0.1	0.2	玻璃化
6	/	/	/	生长快，增殖少

由表 5 可以看出单加细胞分裂素 6-BA 不利于不定芽的增殖及生长，继续在含 TDZ 的培养基上继代生长易使苗玻璃化，较高浓度的 NAA 又易使瘤状物愈伤化并生不定根，所以 0.1 mg/L 的 6-BA 和 0.01 mg/L 的 NAA 是最佳的增殖生长培养基（图版 4-5）。在增殖培养基上长到 1-2cm 的小苗，分割后在 1/2 MS 培养基上继续生长到 2-3cm 后，移至附加 0.05 mg/L NAA 的 MS 培养基上生根培养，7-8 天可诱导出大量不定根，形成完整植株。

2.3 腋芽的快速增殖和无性繁殖系的建立

在 MS 基本培养基中，附加不同激素，观察不同激素组合对带节茎段外植体诱导腋芽再生的效应，培养 20 天后的统计结果如表 6：

由表 6 可以看出，6-BA 为 0.1 mg/L 时，苗高最高，且粗壮，苗正常，6-BA 浓度小于 0.1 mg/L 时，苗生长正常但长势不好，较矮，6-BA 浓度大于 0.1 mg/L 时，苗玻璃化，生长不好，但苗基部 2-3 个节有腋芽长出。附加 NAA 的组合均生根，0.1

mg/L 的 6-BA 附加 0.01 mg/L 的 NAA，苗生长较好且生根，附加 0.1 mg/L 的 NAA，苗玻璃化。除了附加 0.01 mg/L 的 6-BA 的培养基上没出愈外，其他附加激素的组合茎切口均有愈伤长出。在不含任何激素的培养基上，腋芽生长正常，长势也较佳，但苗较瘦弱。

表 6 不同激素组合对腋芽生长的影响

Table 6 Morphogenic response of axillary buds of kenaf on different hormones combination

培养基编号	激素组合(mg/L) HormonesCombination			苗的生长状况		
	6-BA	NAA	TDZ	切口出愈、生根情况	茎叶生长情况	苗高 (cm)
1	0.01	/	/	无愈、无根	生长慢，苗矮，正常	1-2 cm
2	0.05	/	/	愈伤化	生长较快茎粗，苗正常	3-4cm
3	0.1	/	/	愈伤化	生长快，茎粗，基部节长出腋芽，	5-6cm
4	0.3	/	/	愈伤化	苗稍玻璃化，基部节长出腋芽	2-3cm
5	0.5	/	/	愈伤化	苗玻璃化，基部节长出腋芽	1-2cm
6	0.05	0.01	/	有愈、有根	苗正常，茎粗	2-3cm
7	0.1	0.01	/	有愈、有根	苗正常，茎粗，基部长腋芽	4-5cm
8	0.1	0.1	/	有愈、有根	苗玻璃化	1-2cm
9	/	/	/	无愈、有根	苗正常，茎较细，无腋芽长出	3-4cm
10	/	/	0.22	较少愈伤	丛生芽，茎未抽出	/

所以诱导腋芽生长的最佳培养基为附加 0.1 mg/L 的 6-BA 的 MS 培养基。利用这一特性，把无菌苗再切成 1 个节的小段，接种在上述培养基，腋芽又长大成苗，再把每棵苗分别切成 1 个节的小段继续接种，这样每隔 20 天左右接种一次，很快增殖出大量的试管苗。用上述方法得到的苗，转接到不含激素的 1/2 MS 培养基上，10 天左右可从切口处长出白色根。

接种到附加 0.22 mg/L 的 TDZ 培养基上的节，在腋芽处诱导出丛生芽，但不见茎段伸长，把腋芽培养在不加激素的 MS 培养基上，丛生芽仍少量增殖，但不能生根，也不能生长。分解丛生芽接种在附加 0.1 mg/L 的 NAA 的 MS 培养基上，芽茎段很快伸出长高，但同时抑制其他芽的生长。

2.4 下胚轴生根的诱导及细胞组织学观察

把光照下生长 7d-8d 的无菌苗，去根切割成 2 cm 左右的无根苗，插在附加不同激素的培养基上，15 天后的观察结果：

表 7 不同植物激素对生根的作用

Table 7 Effects on seeding rooting of different hormones

植 物 激 素 Hormones		出 根 天数	每 株 根数	根长	根 特 点	苗 高 (cm)	茎叶生长情况
IAA	0.05	7	15	2-3	细长	7	苗较粗壮
	0.1	7	17	2	较粗	4	苗较粗壮
	0.3	8	20	1	较粗	6	苗较粗壮
	0.5	8	15	1	较粗	5	苗较粗壮
NAA	0.05	7	18	2-3	粗	5	苗粗壮
	0.1	7	10	2	粗	4	苗粗壮
	0.3	8	25	1	粗	3	苗矮
	0.5	9	成团	0.5	粗	2	苗矮, 不正常
6-BA	0.1	12	10	0.5	很细	2	苗矮, 节间难伸长
	0.5	/	/	/	/	2	苗矮, 节间未伸长
1/2MS	/	8	13	5	细长	7	苗细长, 正常

从生根时间来看,低浓度 IAA、NAA 处理的下胚轴 7 天可再生根;较高浓度 IAA、NAA 和不附加任何激素的 1/2 MS 培养基 8 天可诱导出根;而 6-BA 对下胚轴生根有明显抑制作用,附加 0.1 mg/L 的 6-BA 的培养基 12 天才出根,附加 0.5 mg/L 的 6-BA 的培养基未见出根。从每株出根数看,0.3 mg/L 的 IAA、NAA 出根数最高,激素浓度升高,对生根有抑制作用。从根长及根状态来看,IAA 和 NAA 的根长度都随浓度的升高降低,0.5 mg/L 的 NAA 表现最为明显,大量粗短根挤在切口处难以伸长。IAA 诱导的根总体较细(图版 6-2),NAA 诱导的根较粗,有些畸形(图版 6-3),1/2 MS 培养基上的根较 IAA 诱导的根更细更长(图版 6-1),低浓度 6-BA 诱导的根弯弯曲曲,才萌发就长很多侧根(图版 6-4)。就苗长势看,IAA,和低浓度 NAA 处理的苗较正常,高浓度 NAA,6-BA 处理的苗生长畸形,不正常。

不定根发生的石蜡切片观察表明:低浓度的 IAA 作用下,不定根由维管形成层细胞分裂而成,表现为正常的伸长生长(图版 6-7);高浓度 IAA 及 NAA 不定根维管形成层及其附近薄壁细胞分裂形成的分生细胞共同分裂而成,根源基粗短,表现为不正常的增粗生长(图版 6-8),随着维管形成层及其附近细胞的不断分裂,不定根不断形成,在外观表现为切口处不断生出大量的根。

3. 讨论

3.1 愈伤组织的组织形态学观察

关于愈伤组织发生部位的研究较少,李春瑶(1994)用组织学和形态学方法研究甘蔗幼嫩叶片和幼嫩叶鞘培养愈伤组织的形成过程,发现在含 2, 4-D 1.5 mg/L 的 MS 培养基上,叶片愈伤组织发生的部位与叶鞘愈伤组织发生的部位是不同的,叶片愈伤组织由两小维管束之间的薄壁细胞和小维管束与下表皮之间的薄壁细胞进行分裂而形成,而叶鞘愈伤组织则是由维管束薄壁细胞朝下下表皮方向进行分裂而形成。程佑发、王勋陵(2001)对枣树叶片表面形成的愈伤组织进行细胞组织学观察表明,愈伤组织发生时,先是表皮下的细胞分裂、膨大、形成小突起,随着细胞分裂的增多、伸长,就形成了愈伤组织。本研究发现,愈伤组织的发生部位与激素的种类和浓度有一定关系。诱导下胚轴愈伤的试验表明:下胚轴的各个部分都有可能发生分裂产生愈伤,但到底哪一部分分裂形成愈伤,却与植物激素的种类和浓度有关,初步研究表明低浓度的 2, 4-D 和 6-BA 易诱导表皮及皮层薄壁细胞分裂形成愈伤组织,高浓度的 2, 4-D 易诱导维管形成层细胞分裂形成愈伤组织,6-BA 浓度高的组合细胞大小要比浓度低的组合大。棉花上也把愈伤按发生部位不同分为两类(王吉吉之,张大力,1990),现比较如下:

	棉花		红麻	
	I 类愈伤组织	II 类愈伤组织	I 类愈伤组织	II 类愈伤组织
来源	皮层组织	皮层以内组织	皮层组织	皮层以内组织
质地	疏松	紧密	致密	疏松
颜色	淡绿、灰色	深绿, 白色	白色	黄色
产生时间	一周	两周	较早	稍迟
细胞形态	较大, 壁薄, 连接弱	较小, 壁厚, 连接紧	较大	较小
生长速度	快	慢	快	较快
胚胎发生	可产生胚状体	未见胚状体发生	未见胚状体发生	未见胚状体发生

可见在棉花和红麻中两类来源不同的愈伤组织存在较大的差别。红麻不同来源的愈伤组织在继代分化中, I 类愈伤较易变绿, 但极易分化生根, 不能分化出芽, II 类愈伤组织较难变绿, 也不能分化出芽。红麻两类不同来源愈伤组织的再分化潜力及再分化条件有待继续研究。

3.2 TDZ 诱导不定芽的高效性极其作用机制

TDZ 是人工合成的苯基脲衍生物之一, 最初作为棉花的落叶剂使用, 随后人们

发现 TDZ 在芽分化、愈伤组织诱导、体胚发生、生根等方面都表现出很强的活性。目前在苹果、苜蓿、梨、花生、大豆、水稻、小麦、棉花等的器官发生方面都有应用。

一般来说, TDZ 的使用浓度比其他细胞分裂素如 BAP、KT、ZT 要低的多, 通常在 0.002-0.2 mg/L 的范围内。例如, 徐华松等(1999)对莴苣器官发生的研究中用不同浓度的 TDZ 替代 MS 中的 BA, 发现仅用 1/50 BA 浓度(0.1 mg/L)的 TDZ 处理, 已相当于用 BA 处理所得芽数; TDZ 在低浓度下(0.5 mg/L), 可诱导 2001 富士苹果离体叶片再生不定芽, 在附加 6-BA 的再生培养基中, 高浓度 BA(8.0 mg/L)才能高频再生不定芽, 而 ZT 和 KT 不适于诱导 2001 富士离体器官再生不定芽(秦玲等, 2002)。在香椿、大豆、花生、水稻等植物中 TDZ 的细胞分裂素活性也都明显高于 6-BA 和 KT。而本研究中红麻的子叶和真叶须在较高浓度的 TDZ(3.5 mg/L)作用下才能高频诱导产生不定芽。6-BA 在低浓度下(0.5 mg/L), 经长时间的诱导可产生极少量的不定芽, 在较高浓度下(≥ 1.0 mg/L)诱导不出不定芽。这一结果与 Y. Kaneda 等对大豆研究相似, 大豆的子叶结和下胚轴切段在附加 TDZ 2 mg/L 或 BA 1.15 mg/L 的培养基上可以诱导产生丛生芽, 但 TDZ 比 BA 更有效。

TDZ 诱导产生不定芽的途径有以下几种: 一, 先诱导出愈伤组织, 再由愈伤组织发生不定芽, 如莴苣的下胚轴经 TDZ 处理后, 5 天左右有愈伤组织产生, 15 天可见愈伤组织上有绿色芽点, 随后芽长高(徐华松等, 1999); 二, 先诱导出体细胞胚, 再由体细胞胚产生不定芽, 如木豆 10 天龄子叶、真叶在附加 10 mM 的 TDZ 的 MS 培养基上能诱导出胚性愈伤组织和体细胞胚, 在去除 TDZ 的 MS 基本培养基上胚状体继续成熟, 分化出小植株(K. Sreenivasu, 1998)。棉花也有类似反应, 即在 0.01 mg/L TDZ 的培养基上诱导产生胚性愈伤组织, 但 TDZ 却不利于体细胞胚的分化和发育, 只有将诱导产生的胚性愈伤组织转移到不含 TDZ 或其他激素的培养基上, 才能顺利的诱导出体细胞胚, 并发育成熟(张宝红、李秀兰, 1994)。三, 不经过愈伤阶段, 直接产生不定芽, 如大豆下胚轴在含 2.0 mg/L TDZ 的培养基上在切口处直接产生不定芽(Y. Kaneda, 1997)。四, 混合出芽型, 如 2001 富士苹果的离体叶片同时并存两种再生方式, 直接从叶片再生, 或经愈伤组织形成(秦玲等, 2002)。西洋梨叶片在诱导培养基上既可以产生不定芽, 也可以产生体细胞胚(孙清荣等, 2003)。红麻子叶、真叶不定芽的再生方式为第三种类型, 即不通过愈伤组织, 直接再生不定芽。在含 TDZ 的诱导培养基上, 诱导出的愈伤组织为白色松软状、易褐化、不易诱导分化、也未

见胚性愈伤的直接发生。

TDZ 的作用效应在某些物种上表现出一种延续性,即不定芽在不含 TDZ 的培养基上继代培养后,会继续增殖,如蓖麻籽的胚轴在含 TDZ 的诱导培养基上诱导的不定芽,继代到附加 0.5 mg/L BA 的继代培养基上后,不定芽会继续大量增殖(M. Sujatha、T. P. Reddy, 1998)。本研究表明,TDZ 在红麻子叶、真叶不定芽的诱导上也具有延续性。将子叶、真叶上长出不定芽的瘤状物、或发育到一定程度的瘤状物切割继代到附加 0.1 mg/L 6-BA 和 0.01 mg/L NAA 的培养基上,随着不断的分割继代,不定芽会不断长出。在继代过程中还发现诱导出的不定芽的叶片上又长出小苗。秦玲等(2002)在 TDZ 对 2001 富士叶片芽分化的影响的研究中发现,从附加 TDZ 培养基上再生的不定芽,芽呈莲坐状,茎伸长很困难,看不到明显的节,但将再生芽转到试管苗继代培养基(BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L)中,芽可恢复正常生长。本研究也发现相似的现象,在 TDZ 诱导培养基上诱导产生的不定芽,很难伸长生长,只有转到不含 TDZ 的培养基上才能长大。继续继代在含 TDZ 的培养基上的不定芽团,会发生玻璃化。TDZ 的这种诱导不定芽萌发,但抑制其伸长生长的现象,在很多植物中都有体现。

目前 TDZ 对离体植物形态反应的调节机制仍然不是很清楚。Hare 和 Van Staden (1994) 认为 TDZ 的作用机制与其通过作用于细胞分裂素氧化酶抑制细胞分裂素的降解,从而增加了内源细胞分裂素的水平有部分关系。Capelle 等认为 TDZ 可以引起细胞分裂素的积累和合成。John 也提出,TDZ 是通过促进细胞内嘌呤类细胞分裂素的合成或积累而促进愈伤组织的生长、芽的分化及繁殖。TDZ 可促进植物组织乙烯的生成,YIP 等人分别用 TDZ 和 BA 处理豇豆胚轴和小麦萎蒿叶,TDZ 的乙烯释放量远大于 BA,TDZ 浓度低时对万利包心生菜芽的再生有抑制作用,解释为 TDZ 低浓度时,其乙烯释放量大大高于 BA 的,因此,此时乙烯可能起主导作用,导致再生芽数减少;TDZ 浓度高时,虽然乙烯释放量大,但很可能 TDZ 具有很强的细胞分裂素活性,从而在 TDZ 浓度增加时,乙烯的释放量递增,再生芽却不随乙烯释放量的增加而递减(徐华松等,1999)。Thonas 和 Kafferan 实验证明 TDZ 可诱导细胞分裂素的生物合成,并发现 TDZ 可抑制内源生长素的降解;Capele 等发现,TDZ 可使 CTG 核糖核苷酸迅速转变为核苷。

3.3 红麻植株再生的途径

离体无性繁殖中的器官发生方式主要有四种：器官发生型、类胚体发生型、器官型、不定芽型。不同的植物，器官发生的方式不同。就目前的研究看，红麻器官发生方式的难易依次为不定芽型，器官型，类胚体发生型，器官发生型。

红麻植株再生的器官发生型，仅 K.S.Mclean 等（1991）培养田间苗节间茎段获得成功，芽分化频率为 3%-13%。本研究用试管苗节间茎段培养，未能得到再生苗。在愈伤的诱导方面，本研究与 K.S.Mclean 等的研究有很大的相似性，即节间茎段，下胚轴极易诱导出愈，且在诱导培养基上易生根，特别是在含 NAA 的诱导培养基中大量生根。在分化时同样遇到愈伤组织极易大量生根，极难分化的问题。红麻愈伤组织在分化过程中，愈伤增殖快，难以变绿，极易生根，是红麻愈伤分化过程中需要解决的问题。本研究通过提高琼脂，蔗糖浓度，以及附加甘露醇可使愈伤变绿，并降低愈伤生长势，但过高的渗透势好似同时抑制的愈伤的分化。同为锦葵科的棉花，获得棉花再生植株的方法主要是通过胚胎发生途径进行的，器官发生型的成功报道也很少(张宝红等，1995)。

类胚体发生型在红麻的组织培养中也少有报道，陈祥云等于 1979-1984 年进行红麻花药培养的研究中发现，经多代增殖分化培养后的花药愈伤组织的主要特征是：①愈伤组织呈乳白色，愈伤组织的质地非常疏松，外观似“豆腐渣”。②愈伤组织的增殖虽快，但老化亦快，分化能力很低。这些与红麻下胚轴愈伤组织多次增殖分化后的状态非常一致，为此陈祥云等研究了再诱导对提高愈伤组织分化能力的作用，结果在提高蔗糖浓度的条件下得到致密的块状结构及绿色突出物，在研究中发现红麻花药无论新龄，老龄愈伤组织，或已获得而又消失分化能力的愈伤组织，都需要经过再诱导，才能从根本上改变愈伤组织的形态结构和理化特性，并具有分化成苗的能力。为使再诱导培养基中得到的新生绿色分生细胞团发育聚集成瘤状物，将它们转入每升加玉米素 0.5-2 mg/L 的 MS 培养基上继续分化培养。结果发现愈伤组织上的绿色分生细胞团继续增大增多，但随着培养时间的延长，这些绿色细胞团发展呈彼此分离的绿色球状体，经 7-10d 后，又在绿色球状体表面形成一层厚薄不一的乳白色松散愈伤组织，与此同时，圆球状的绿色相继发生逆转消失。获得的瘤状体在经过分化培养可分化成苗。所以红麻花药再生植株，需经过愈伤的诱导，增殖，再诱导，瘤状体和成苗五个复杂的阶段。本研究中红麻下胚轴愈伤的诱导，增殖，再诱导阶段与红麻花药培养的相应阶段很相似，但未能获得瘤状体及成苗。但本研究通过另外的途径获得了彼此分离的绿色球状体，即把子叶或真叶在含 TDZ 的诱导

不定芽培养基上诱导出绿色瘤状物继代到含低浓度 6-BA (0.1 mg/L)和 NAA (0.01 mg/L)的不定芽增殖培养基上时,可直接从绿色瘤状物接触培养基的部位诱导出大量不断分离生长的绿色球状体,这些绿色球状体大多被一层厚薄不一的乳白色透明的愈伤组织包被着(图版 7-1)。该球状体的切片表明:绿色颗粒与其外围包裹的白色愈伤有明显界限,绿色颗粒中的细胞排列整齐有明显的极性分化,且绿色颗粒与其外围愈伤交接处的细胞解体(图版 7-2、7-3)。将球状体转到新鲜的相同的继代培养基上,有的绿色球状体逐渐长大,外围愈伤逐渐老化,变枯白;有些球状体长出一条小根;有些球状体继续分裂生长再分裂产生球状体;但未见苗的分化。崔凯荣、戴若兰等在多种植物中都观察到,早期的胚性细胞与周围细胞还存在胞间连丝,但随着胚性细胞的发育,细胞壁加厚,胞间连丝消失或被堵塞。胚性细胞开始分裂,从二细胞原胚到多细胞原胚始终被厚壁所包围,与周围细胞形成明显的界限。还观察到体细胞胚迅速发育的过程中,相邻细胞逐渐处于解体状态,以致在体细胞胚周围出现较大的缝隙,与其邻近细胞隔离处于相对独立的状态。所以这种绿色球状体有可能是球型的体细胞胚。

器官型植株再生是红麻较有效的再生方式,Reichert 和 Baldwin (1996) 1993 年把田间苗的节间茎段培养在附加 3.0 mg/L TDZ 和 0.1 mg/L NAA 的培养基上诱导出不定芽,1994 年,把试管苗的叶片培养在附加 3.5 mg/L TDZ 和 0.1 mg/L NAA 的培养基上诱导出不定芽。本研究结果表明,红麻试管苗的节间茎段及下胚轴难以诱导出不定芽,子叶比真叶更易诱导直接出芽,真叶在诱导培养基上长成绿色瘤状物,难以出芽,把绿色瘤状物转接到 MS 或附加低浓度 6-BA 和 NAA 的增殖培养基上可长出大量的健壮不定芽。同 Reichert 和 Baldwin 的研究结果相似,红麻不定芽的诱导不仅有外植体的差异,还有基因型的差异,在实验供试品种中,品种 722 最易诱导不定芽,而品种 917 的子叶几乎诱导出不定芽。

不定芽型植株再生几乎不受基因型限制,且同时能保证该物种的遗传稳定性,对一些不易通过其他组织培养途径再生植株的物种具有特别的意义。红麻正常生长时,腋芽受到抑制不能萌发,研究中发现截去试管苗的顶芽,即可诱使腋芽的萌发。腋芽和茎尖在不含任何激素的 MS 培养基上即可萌发,附加 0.1 mg/L 6-BA 的诱导培养基有利于芽健壮的快速生长。附加 0.2mg/LTDZ 的诱导培养基可使茎尖、腋芽产生丛生芽。这一结果与 Cecilia Zapata 等(1999)和 M.Srivatanakul 等(2000)的研究结果相似。

3.4 红麻根的发生

红麻是一种耐渍，耐淹的作物，红麻生长期遇到洪水渍淹，麻茎经 7-10 天可在淹水部位发生白色不定根，这可能是红麻组织培养过程中各外植体及愈伤组织极易生根的内在原因。如红麻的下胚轴，茎段，子叶，真叶外植体以及愈伤组织在不含任何激素的 MS 培养基上，均能生根。实验中发现低浓度的 NAA、IAA、2, 4-D、6-BA、KT 均对外植体及愈伤组织的生根有促进作用。生根能力的强弱依次为真叶>节间茎段>下胚轴>子叶。但本研究中不管是 TDZ 较低浓度下诱导的茎尖发生的丛生芽，还是 TDZ 较高浓度下诱导的子叶、真叶发生的不定芽，在无激素的 MS 培养基上都难以生根，必须继代到附加低浓度 NAA 的 MS 培养基上才能生根，长大。而 Reichert 和 Baldwin (1996) 的研究却显示红麻节间茎段，叶片在附加 TDZ 的诱导培养基上诱导的不定芽，在不含任何激素的 MS 培养基上可生根成苗。M.Srivatanakul 等 (2000) 在附加 TDZ 的诱导培养基上诱导的茎尖丛生芽，也能在不含任何激素的 MS 培养基上生根成苗。而本实验中不定芽的生根没有明显的品种间差异。造成这种相反结果的原因，可能与地域，气候的差异有关。

第三部分、原生质体的游离与培养

1. 材料与方法

1.1 材料

本研究材料为红麻 (*Hibiscus cannabinus* L.) 722 和 BG155, 由中国农业科学院麻类研究所提供。选用红麻无菌苗下胚轴作为原生质体游离的材料。

原生质体分离的酶液中所使用的酶有以下几种: ①纤维素酶 Cellulase onozuka R-10, Yakult Honsha Co.LTD. Japan; ②果胶酶 Pectinase, Fluka。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗的培养

同第二部分的 1.2.1

1.2.2 原生质体的分离与纯化

酶液的组成 按照一定的组成, 将纤维素酶, 果胶酶溶解在一定甘露醇浓度的 CPW 盐溶液中, 附加 0.5 g/L BSA 和 5 mM MES。待酶完全溶解后, 调节 pH 值为 5.6, 然后通过 $\Phi 0.45 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤灭菌。

分离与纯化 在超净工作台上, 取不同苗龄的下胚轴 1g 于直径 6.0 cm 的培养皿中, 用解剖刀去表皮, 然后将其切成细条状, 再用 CPW-13M (CPW 盐+13%的甘露醇) 处理 0.5h~1h, 使植物细胞发生轻微质壁分离, 最后换用 10 ml 配好的酶解液, 用 Parafilm 封口, 置于 50 r/min 的水平摇床上, 在 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 黑暗条件下酶解。每隔 1h 在倒置显微镜下观察一次, 原生质体开始出现后, 以观察时原生质体的平均密度对比前一小时不再增加为最适的解离时间, 以游离出最大量完整的原生质体来探讨较好的酶解条件。待原生质体游离充分后, 用 $50 \mu\text{m}$ (300 目) 孔径的丝网过滤原生质体, 将滤液收集到 10 mL 的尖底离心管中, 以 800 rpm 离心 8 min, 弃去上清液; 再用 CPW-8M (CPW 盐+8%的甘露醇) 溶液洗涤一次; 沉下的原生质体悬浮于 2 ml 的 CPW-8M 溶液中, 然后在另一只 10 ml 的尖底离心管中加入 8 ml 的含有 21%蔗糖的 CPW 溶液 (CPW-21S), 在此液面上缓缓加入上述的 2 ml 原生质体悬浮液, 800 rpm 离心 8 min, 这时在两个液面间出现一条乳白色的原生质体带, 用吸管小心地吸出漂浮于溶液界面的原生质体; 最后用原生质体培养基清洗一次, 即可获得纯净的原生质体。

1.2.3 原生质体的计数与活性鉴定

参考侯岁稳、贾敬芬（2002）设计的一种简易的植物原生质体记数方法：从收集的 1 ml 原生质体悬浮液中用移液枪吸取 10 μ L，滴在载玻片上，加盖 18mm $\times$ 18mm 的盖玻片，在 40 $\times$ 物镜下镜检。统计 5-6 个视野原生质体的平均值 $\bar{X}$ ，则其密度 C 为： $C = [(1000 \div 10) \times (18 \times 18 \div 0.20)] \times \bar{X}$ 。进行活性鉴定时，预先用蒸馏水把 Evans 蓝配成 0.1% 的溶液备用，测定时在每毫升的原生质体悬浮液中加入 1 滴 0.1% 的 Evans 蓝染液，混匀 3 min~5 min，在显微镜下观察原生质体的活力，凡活的原生质体不染色，而无活力的原生质体被染成蓝色，以此计算原生质体的存活率（没有染成蓝色的原生质体/观察到的原生质体总数 $\times$ 100%）。

1.2.4 原生质体的培养

原生质体的培养方法采用如下几种方法进行：

（1）液体浅层培养（Liquid thin culture） 取 2 ml 一定密度的原生质体悬浮液，接种于直径为 6 cm 的玻璃培养皿中使其形成一薄层，用 Parafilm 封口，于恒温箱中暗培养。

（2）微滴培养（Droplet culture） 将 20 μ L 的原生质体悬浮液用移液管滴于培养皿底，用 Parafilm 封口，置于湿润的环境中暗培养。

（3）琼脂糖平板法（Agrose bead method） 将两倍于最终培养密度的原生质体悬浮液与含有 1.4% 低熔点琼脂糖的原生质体培养基在 40 $^{\circ}$ C 的条件下等量混合，用吸管迅速吸取 2 ml 平铺于直径为 6 cm 的玻璃培养皿底部，使其成为一均匀的薄层，用 Parafilm 封口，于恒温箱中暗培养。

愈伤的增殖，分化，当细胞分裂形成肉眼可见的小愈伤后，及时将其吸出平铺到扩增培养基上。

表 8 用作原生质体培养, 生长的培养基

Table 8 The media for protoplast culture and calli amplification

培养基成分 Composition Of medium	培养基类型 (mg/L) Type of medium(mg/L)			
	PM1	PM2	PM3	AM
基本培养基	KK ^①	MSB	KK	MS
甘露醇	0.45M	0.45M	/	/
蔗糖	2%	2%	3%	3%
2, 4-D	0.5	0.5	0.5	0.1
6-BA	0.5	0.5	0.5	0.5
琼脂	/	/	/	8%
PH	5.6	5.6	5.6	5.8

注: ①是 K₃无机盐和改良 KM₈P 有机物组合而成的培养基, 见附录。

2 结果与分析

2.1 原生质体的游离

2.1.1 不同的酶浓度对原生质体产量的影响

采用不同的酶浓度分离原生质体, 原生质体产量与质量如表 1 所示。

表 9 不同的酶浓度对原生质体产量的影响

Table9 The effects of different enzymes concentration on yield of protoplasts

纤维素酶 (%) Cellulase R-10 (Japan)	果胶酶 (%) Pectinase (Fluka)	产量 Yield	状态 Stutas
0.3	0.3	++	完整
0.5	0.3	+++	完整
0.5	0.5	++++	基本完整
0.8	0.3	++	基本完整
0.8	0.5	+++	少数破碎
1.0	0.3	+	较多破碎
2.0	0.5	/	/

注: 1) “+” 代表原生质体少, “++” 较多, “+++” 多, “++++” 极多 2) 品种 BG155

表 8 用作原生质体培养, 生长的培养基

Table 8 The media for protoplast culture and calli amplification

培养基成分 Composition Of medium	培养基类型 (mg/L) Type of medium(mg/L)			
	PM1	PM2	PM3	AM
基本培养基	KK ^①	MSB	KK	MS
甘露醇	0.45M	0.45M	/	/
蔗糖	2%	2%	3%	3%
2, 4-D	0.5	0.5	0.5	0.1
6-BA	0.5	0.5	0.5	0.5
琼脂	/	/	/	8%
PH	5.6	5.6	5.6	5.8

注: ①是 K₃无机盐和改良 KM₈P 有机物组合而成的培养基, 见附录。

2 结果与分析

2.1 原生质体的游离

2.1.1 不同的酶浓度对原生质体产量的影响

采用不同的酶浓度分离原生质体, 原生质体产量与质量如表 1 所示。

表 9 不同的酶浓度对原生质体产量的影响

Table9 The effects of different enzymes concentration on yield of protoplasts

纤维素酶 (%) Cellulase R-10 (Japan)	果胶酶 (%) Pectinase (Fluka)	产量 Yield	状态 Stutas
0.3	0.3	++	完整
0.5	0.3	+++	完整
0.5	0.5	++++	基本完整
0.8	0.3	++	基本完整
0.8	0.5	+++	少数破碎
1.0	0.3	+	较多破碎
2.0	0.5	/	/

注: 1) “+” 代表原生质体少, “++” 较多, “+++” 多, “++++” 极多 2) 品种 BG155

由表 9 可知, 采用不同的纤维素酶, 果胶酶组合游离黑暗条件下 5d 龄的无菌苗下胚轴, 原生质体的产量和状态明显不同。纤维素酶的浓度较低时, 原生质体的产量低, 纤维素酶的浓度增高时, 原生质体破碎渐多, 纤维素酶为 2.0 mg/L 时几乎没有完整的原生质体; 在相同的纤维素酶浓度下, 0.5 mg/L 的果胶酶明显优于 0.3 mg/L 的果胶酶。因此, 0.5%的纤维素酶+0.5%的果胶酶是游离暗培养 5d 龄下胚轴原生质体的最佳酶组合。

2.1.2 不同 pH 值对原生质体产量的影响

表 10 不同 pH 值对原生质体产量的影响

Table10 The effects of different pH on yield of protoplasts

pH 值	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5
产量	/	+	+++	++++	+++	++
状态	/	较多破碎	少数破碎	完整	基本完整	少数破碎

注: 1) $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 黑暗, 5d 龄的下胚轴, 15h 的观察结果 (BG155)

2) “+” 代表原生质体少, “++” 代表较多, “+++” 代表多, “++++” 代表极多

由表 10 可知, 采用不同的 pH 值原生质体的产量明显不同。当 pH 值较低时, 原生质体产量较低, 甚至没有, 可能是低 pH 值导致酶活性过高的缘故, 也可能是 pH 值过低直接对原生质体产生的影响; 随着 pH 值的升高, 原生质体产量升高, 状态也变好; 当 pH 值达到 5.5 时, 原生质体产量最高, 状态也最好(见图版 3), 进一步的升高 pH 值, 原生质体产量下降, 状态也变差, 可能是高 pH 值导致酶活性不高的原因。进一步的实验发现, pH 值在 5.6~5.8 之间都能取得良好的效果。

2.1.3 不同渗透压浓度对原生质体产量的影响

由图 4 可知, 不同渗透压浓度对原生质体产量的影响较大。渗透压太低(0.30M)或太高 (0.65M), 原生质体产量都不高, 可能是原生质体收缩或涨破的缘故; 当渗透压为 0.40M 时, 原生质体产量最高, 游离的原生质体形状, 大小基本一致, 胞质浓; 随着渗透压的升高, 原生质体的产量有所下降; 但渗透压为 0.50M 和 0.55M 时, 原生质体的产量差别不大, 可能是下胚轴的细胞不均一, 能耐受这两种渗透压的原生质体所占的比例差不多所致。所以应采用 0.40M 的甘露醇 (CPW-9M) 作为渗透压

稳定剂。

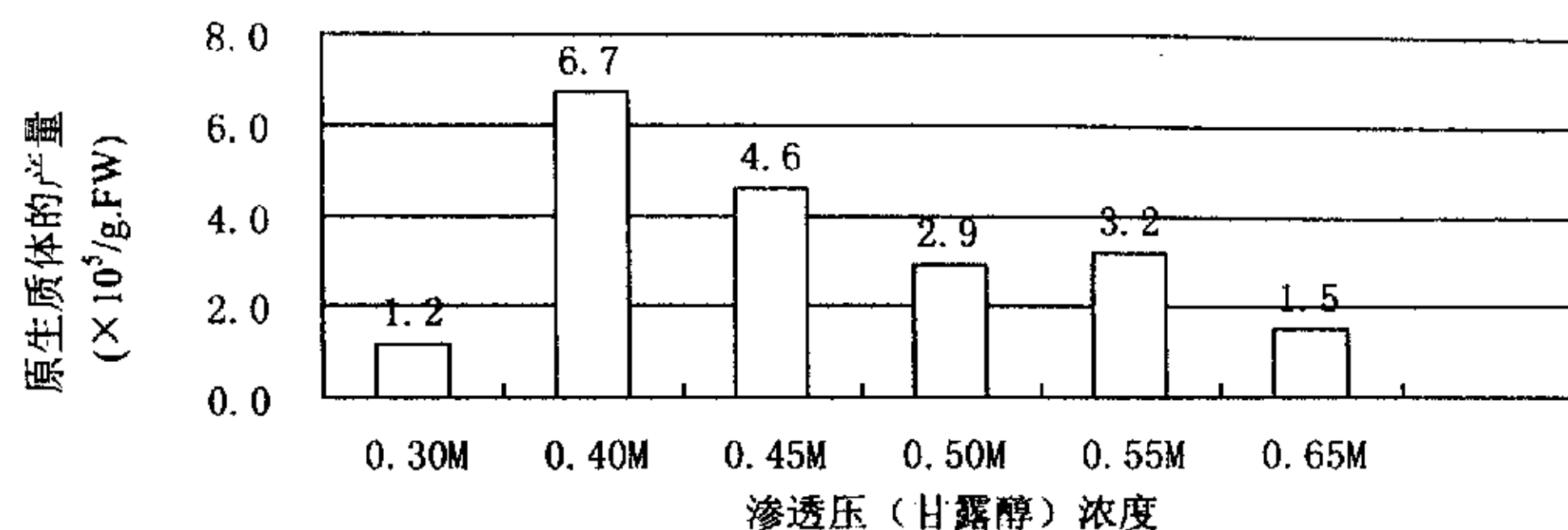


图 4 不同渗透压浓度对原生质体产量的影响

Fig4 The effects of different mannitol concentration on isolation of protoplasts

注：1) $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 黑暗，5d 龄的下胚轴，15h 的观察结果 (BG155)

2. 1. 4 植物材料对原生质体产量的影响

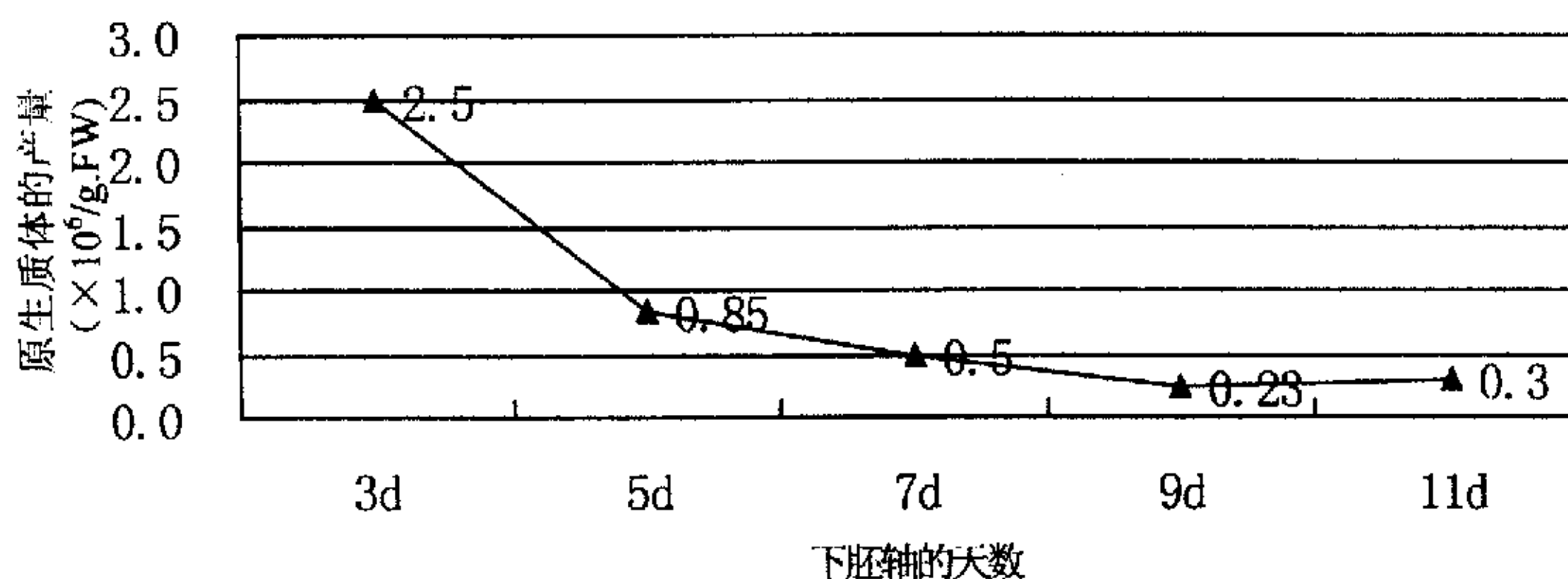


图 5 下胚轴的天数对原生质体产量的影响

Fig.5 The yield of protoplasts from different age hypocoty in the dark

注：1) $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 黑暗，15h 的观察结果 (BG155)

由图 5 可知，采用不同天数的下胚轴为材料，原生质体的产量明显不同。采用 3d 龄的下胚轴，原生质体的产量最高（图版 8-1），并且其细胞质较浓，淀粉粒较多；随着下胚轴生长天数的增加，原生质体的产量下降明显，其细胞质也较少，液泡化的程度较高，细胞显得较脆弱。以上结果表明，下胚轴的苗龄是原生质体的产量的重要影响因素，以暗培养 3d 龄的下胚轴为游离原生质体的

最佳外植体。

2.1.5 不同酶解时间对原生质体产量的影响

表 11 不同酶解时间对下胚轴原生质体产量的影响

Table11 The effects of different isolation time on the yield of protoplasts

酶解时间 (h)	原生质体产量
Time of enzymolysis	Yield of protoplasts
9	+
12	++++
15	++++
17	+++
19	++

注：1) $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 黑暗，3d 龄的下胚轴的观察结果 (BG155)

2) “+” 代表原生质体少，“++” 代表较多，“+++” 代表多，“++++” 代表极多

由表 11 可知，游离的时间不同，原生质体产量明显不同。当酶解时间为 9h 时，只有少数的原生质体释放，随着酶解时间的延长，原生质体的产量逐渐增高。当酶解时间为 12h 时，其产量达到最大值。15h 与 12h 产量相差不大，可能因为这段时间原生质体在不断产生同时也在同时破裂。随着酶解时间的继续延长，原生质体的产量又逐渐下降，酶液中的碎片较多，最早游离的原生质体开始破碎。所以以 12h 作为游离原生质体的最适时间。

2.1.6 原生质体的活性鉴定

对最佳条件下游离的原生质体进行了活性鉴定。结果发现，原生质体的存活率达到 87%。

2.2 原生质体的培养

影响原生质体分裂，小愈伤组织形成以及植株再生的因素很多。为了寻求最合适的条件，比较了不同渗透压，培养方法，培养基等因素对原生质体培养的影响。

2.2.1 不同渗透压对原生质体分裂的影响

表 12 不同渗透压对原生质体分裂的影响

Table 12 The effects of different mannitol concentration on the cell division and colonies formation of hypocotyls protoplast from kenaf

渗透压调节剂		第一次分裂时间	分裂频率(%)	形成细胞团	
甘露醇	蔗糖	(d)	Frequency of	的时间	植板率
(M)	%	Time of first	division(%)	Time of	Plate(%)
		division(d)		microcalli(d)	
0.35	3%	5-6	8.0	18	1.4
0.40	2%	3-4	20.0	12	5.6
0.45	2%	3-4	38.0	12	8.0
0.45	3%	4-5	16.0	15	5.2

注：品种为 722

调整原生质体的密度为 5.0×10^4 个/ml, 采用微滴培养的方法将原生质体培养在 PM1 添加不同浓度甘露醇, 蔗糖的培养基中, 原生质体的生长分裂情况有所不同。甘露醇 0.35M、蔗糖 3% 的培养基中原生质体部分沉底, 分裂时期较晚, 频率低; 其余三种组合, 原生质体皆多上下层悬浮, 甘露醇 0.45M、蔗糖 2% 的培养基中原生质体分裂频率及植板率均稍优于甘露醇 0.40M、蔗糖 2% 的培养基, 且前者的细胞较后者的稍小; 甘露醇 0.45M、蔗糖 3% 的培养基中原生质体第一次分裂时间为 4-5 天, 分裂频率 16%, 形成细胞团的时间为 20 天, 植板率 5.2%, 也较甘露醇 0.45M、蔗糖 2% 的培养基差。

所以原生质体培养的最佳甘露醇和蔗糖组合为甘露醇 0.45M、蔗糖 2%。

2.2.2 不同培养方法对原生质体分裂的影响

将原生质体调整至合适的密度: 微滴培养为 5.0×10^4 /ml, 液体浅层培养和琼脂糖平板培养为 1.0×10^5 /ml。培养在 PM1 培养基中, 原生质体分裂情况明显不同。

微滴培养: 3-4 天即可观察到原生质体第一次分裂, 分裂方式以近均等分裂为主 (图版 8-3、8-4), 培养 7 天统计分裂频率为 40%, 细胞很少粘连。此时添加一次甘露醇浓度降为 0.20M 的 PM1 培养基, 每微滴加 20 μ L, 15 天后统计植板率为 8.5%。用吸管将细胞团 (图版 8-5) 吸出置入另一添加 2 ml 的 PM3 培养基的培养皿中浅层培养, 每天定期轻摇培养皿, 30 天后可形成肉眼可见的小愈伤组织 (图版 8-6)。

表 13 不同培养方法对原生质体分裂的影响

Table 13 The effects of different culture methods on the cell division and colonies formation of hypocotyls protoplast from kenaf

培养方法 Culture method	第一次分裂时间(d) Time of first division(d)	分裂频率(%) Frequency of division(%)	形成细胞团的时间 Time of microcalli(d)	植板率 Plate(%)
微滴培养 Droplet culture	3-4d	40.0	12d	8.5
液体浅层 Liquid thin culture	3-4d	15.0	12d	2.8
琼脂糖平板 Agrose bead method	/	/	/	/

注：品种为 722

液体浅层培养：3-4 天可观察到原生质体第一次分裂，但原生质体之间粘连严重，并见部分原生质体破裂，分裂频率可达到 15%，但再生细胞团状态不好。

琼脂糖平板培养：原生质体大多破裂，未见分裂。可能操作也有问题

2.2.3 不同培养基对原生质体分裂的影响

表 14 不同培养基对原生质体分裂的影响

Table 14 The effects of different medium on the cell division and colonies formation of hypocotyls protoplast from kenaf

培养基类型 Type of medium	第一次分裂时间(d) Time of first division(d)	分裂频率(%) Frequency of division(%)	形成细胞团的时间 Time of microcalli(d)	植板率 Plate(%)
PM1	3d	45.0	15d	8.2
PM2	4d	8.7	20d	1.0

注：品种为 722

调整原生质体的密度为 5.0×10^4 个/ml，采用微滴培养的方法将原生质体培养在不同类型的培养基中，原生质体的生长分裂情况明显不同。在 PM1 培养基中，原生质体 3d 开始第一次分裂，15d 可形成 20 个细胞左右的细胞团；在 PM2 培养基中，

原生质体第一次分裂和形成细胞团分别推迟到 4d 和 20d, 且两者的分裂频率差异很大, PM1 培养的分裂频率和植板率分别为 45% 和 8.2%, 而 PM2 中则分别为 8.7% 和 1%。究其原因, 一是由于 PM1 的有机成分是改良的 KM8P, 富含多种维生素, 氨基酸, 有机酸, 和糖类, 二是, PM1 的无机成分是 K3 的无机盐, 其高 Ca^{2+} 和低 NH_4^+ 对原生质体的存活和分裂有利, 因此, 它较 PM2 即 MSB 培养基具有明显的优越性。

3. 讨论

3.1 红麻原生质体的游离和纯化

Nancy A.Reichert 等 (1996) 以无菌苗叶子为外植体, 用 1.0% 的纤维素酶 (cellulase) 和 0.5% 离析酶 (macerase), 在 30°C 下游离 24h, 成功游离出大量原生质体, 成活力为 53%-87%。用此法游离田间苗叶片原生质体时, 未游离得到有活力的原生质体。X.Z.Liang 等 (2002) 以盆栽苗叶子为外植体, 用 0.8% 的纤维素酶 (cellulase) 和 0.5% 离析酶 (macerase), 在 25°C 下游离 16 h 得到最大量原生质体, 成活力为 74%-94%。据 X.Z. Liang 分析温和的消毒方法和较低的酶液浓度是成功游离盆栽苗叶片原生质体的关键。本研究用红麻暗培养无菌苗的下胚轴作为游离原生质体的原始材料, 在 26°C 下游离 12h 成功地游离出大量具有活力的原生质体。并以暗培养 3d 龄的下胚轴为最佳。可以看出作为纤维植物, 红麻各外植体游离原生质体的需酶量远低于苧麻 (子叶需酶量 3% cellulase 和 0.5% macerase)。本研究用纤维素酶 (cellulase) 和果胶酶 (pectinase) 组合游离无菌苗的子叶和叶片均未得到原生质体, 对于这两种外植体游离原生质体, 离析酶 (macerase) 可能起着关键作用。在游离的温度和时间上, 不同的研究也存在一定的差别, 本文采用的下胚轴较幼嫩, 且去表皮, 所以能在较低的酶浓度, 较短的时间游离出大量原生质体。

外植体的苗龄对原生质体的状态有着较大的影响, 在本试验中, 来源于 5d 龄苗的下胚轴在渗透压为 0.4M 甘露醇时, 得到最高的原生质体产量; 来源于 3d 苗龄的下胚轴在渗透压为 0.45M 甘露醇时, 得到最高的原生质体产量。前者原生质体内含物少于后者, 这可能是后者要求较高渗透压的原因。纯化后的红麻原生质体, 大小有明显的差异, 细胞质的丰富程度也有不同。静置的原生质体分为上下两到三层, 上层胞质稀少, 又大又圆; 下层胞质较为丰富, 大小适中。红麻原生质体离心提纯时, 转速达到 2000 转/分时, 上层酶液中仍残留大量几乎无胞质的较大较圆漂浮于液体表面的原生质体 (图版 8-2), 这些原生质体在培养中难以分裂, 且转速过大不

利于胞质丰富的原生质体的成活，所以本实验原生质体提纯时采用 700-800 转/分的转速。

3.2 红麻原生质体的培养

红麻原生质体的培养方式对其分裂生长有着重要的影响，Nancy A.Reichert 等（1996）对叶片原生质体培养发现，半固体培养中原生质体的第一次分裂比液体浅层培养晚 9d，小细胞团在培养 40d 后也未发现，而在液体浅层培养在培养 10d 就可以发现。Zhao Y.X 等（1991）培养愈伤来源的原生质体发现，原生质体培养在薄层液体培养基上发生分裂需要的时间长，而培养在滴状培养基或琼脂培养基上所需的时间短。本研究来源于下胚轴的原生质体在滴状培养基上得到最高分裂频率（40%）和植板率（8.5%），培养在浅层液体培养基上的原生质体容易破裂、粘连，分裂频率和植板率较低。而琼脂糖平板法培养的原生质体也大多破裂，未见分裂生长。可见不同来源的原生质体要求不同的培养方式。

Nancy A.Reichert 等（1996）研究的叶片原生质体在培养中有很高的分裂频率（50%左右），而植板率却只有 0.2%左右。本研究中下胚轴原生质体的分裂频率达到 40%，植板率达到 8.5%。分析两者差异的原因有二，一是在叶片和下胚轴的愈伤组织诱导过程中可看出下胚轴比叶片更容易诱导脱分化；二是 Nancy A.Reichert 培养原生质体分裂生长的激素组合是 0.3 mg/L 2,4-D 和 3 mg/L KT，据本研究发现低浓度的生长素配加高浓度的分裂素不利于细胞的分裂生长。所以在进行下胚轴原生质体培养时，选用最适合下胚轴愈伤形成激素组合（0.5 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA）。对于不同激素对原生质体培养的影响有待进一步研究。

本文下胚轴原生质体培养的较佳程序为，原生质体先用微滴培养，培养一周后在微滴上添加一次原培养基；培养两周后，原生质体分裂形成小细胞团后，再添加一次渗透压减半的培养基；培养 4-5 周后，从每个液滴中吸出小细胞团转到另一个培养皿中（个人认为此法有利于去除培养早期无用和有害的代谢物），进行液体浅层培养；培养 8-9 周后，将 1mm 左右的小愈伤转到半固体培养基上进行增殖生长。Nancy A.Reichert 研究的叶片原生质体在进行浅层培养后，转到半固体培养基上得到愈伤。由原生质体分裂形成的愈伤组织，至今未有报道得到再生植株，红麻器官培养得到的愈伤组织也仅有一例报道得到再生植株，这与基因型可能有很大关系。同为锦葵科的棉花在原生质体培养早期，采用活组织（棉纤维、子叶、真叶）或愈伤组织来

源的原生质体，培养仅得到少量细胞组成的细胞团和愈伤，未能得到再生植株，而利用胚性细胞悬浮培养系游离的原生质体，培养时易获得较高的植板率和植株再生率。这是由于构成胚性细胞悬浮培养系的细胞生活力极强，具有较高的分裂能力和胚胎发生能力，且胚性细胞悬浮培养，细胞增殖快，在短时间内可获得大量同步发育的胚性细胞供游离原生质体使用（张宝红，1995）。因此，红麻原生质体培养再生植株的突破，可能也要走棉花的道路，即先诱导不同外植体产生胚性愈伤组织，再从胚性愈伤组织中分离原生质体，进行原生质体培养。

参考文献

References

1. Tatsuro,Murata. 甘薯叶肉和细胞悬浮原生质体植株再生. 国外农学-杂粮作物,1995,2:21-23
2. 王秀松,胡东波,詹庆才. 杜仲愈伤组织的诱导及植株再生的研究. 西北林学院学报,1994,9(4):32-35
3. 王芳,毛鸿才,姚源松. 一种提高陆地棉再生植株率的新方法. 新疆农业大学学报,1997,20(4):64-66
4. 王泽云,林盛. 无刺番麻组织培养快速繁殖种苗的研究. 热带作物学报,1994,15(增刊):13-18
5. 邓小梅,王明麻,黄敏仁,符树根. 香花槐组培工厂化育苗技术研究. 江西农业大学学报(自然科学版),2003,25(1):69-72
6. 邓文,蔡立湘,彭新德,詹庆才,何登骥. 湖南省农业科学院农业生物技术研究综合报告. 湖南农业科学,2002,(湖南省农业科学院百年院庆特刊):18~20
7. 邓建平,杨国顺. 生长调节剂对葡萄扦插生根效应的研究. 湖南农业科学,2001,1:26-27
8. 刑登辉,吴琴生,刘大钧. 禾谷类作物细胞培养--体细胞胚性潜力的诱导与表达. 生物学通报,1994,29(7):1-3
9. 刘凡,曹鸣庆. 生物技术及我国的农作物生物技术育种. 北京农业科学,2001,3:10-12
10. 刘颂颂,招晓东,叶永昌,黄壁松,周志坚,周丽等. 大岛樱的工厂化育苗技术. 广东林业科技,1996,12(4):40-44
11. 向邓云. 植物生长调节物质对植物组织培养形态建成的调节控制. 涪陵师专学报,2001,17(3):119-123
12. 孙清荣,刘庆忠,赵瑞华. 西洋梨叶片直接再生体细胞胚. 园艺学报,2003,30(1):85-86
13. 师校欣,杜国强,高仪,马宝琨,肖建会,贾建航. 苹果离体叶片高效再生不定芽技术研究. 果树科学,1999,16(4):255-258
14. 庄馥萃. 植物纤维和纤维植物. 生物学通报,2001,36(11):16-18

15. 朱永生,陈葆棠,秦发兰,余舜武,张端品. 疣粒野生稻原生质体再生小植株. 中国农业科学,2002,35(12):1556-1559
16. 朱校奇,郭安平. 农作物及麻类作物诱变育种进展简况. 中国麻作,1994,16(2):11-13
17. 何道一,李雅志,王桂荣. 中棉所 12 (*Gossypium hirsutum* C.V. *Zhongmian 12*) 体细胞胚发生及植株再生. 核农学报, 1998,12(6):332~336
18. 宋玉霞,马洪爱,郭生虎,黄慧. 银河 号杨叶外植体再生体系建立. 西北植物学报,2002,22(3):661—666
19. 宋淑敏. 生物技术在亚麻育种上的应用研究现状. 中国麻作,2000,(22)2:17-18
20. 张小红,张红燕,武军,闵东红,康冰,李军超. TDZ 对香椿愈伤组织诱导及芽增殖生长等的影响. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2002,30(5):35-39
21. 张兰英,李耿光,陈如珠,李开莲. 菜心下胚轴原生质体培养和植株再生. 植物学报,1994,36(2):105-110
22. 张宏伟,黄学林,傅家瑞. 大叶相思体细胞胚胎发生的初步研究. 中山大学学报(自然科学版), 1997,36(1):122-125
23. 张寿文,梁雪妮,刘飞虎. 生物技术在苧麻育种上的应用. 湖北农业科学,1999,1:29-31
24. 张宝红,刘方,刘志红,王红梅,姚长兵. 外源激素对棉花体细胞胚胎发生及发育的调控作用. 棉花学报,2000,12(1):17-21
25. 张宝红,李秀兰,李付广. 棉花组织培养研究的现状和前景. 植物生理学通讯,1995,31(1):56-61
26. 张宝红,李秀兰. TDZ 在棉花组织培养中的效应研究. 棉花学报,1994,6(2):78-82
27. 张宝红,李秀兰. 棉花组织培养植株再生技术的研究. 西南农业学报,1995,8(4):42-47
28. 张宝红. 甘薯叶片组织培养一次成苗的研究. 遗传,1993,15(5):27-31
29. 张宝红. 棉花组织培养名录(续). 植物生理学通讯,1994,30(5):386-391
30. 张宝红. 棉花原生质体培养研究进展(综述). 四川农业大学学报,1995,13(1):55-61
31. 张寒霜,李俊兰,高鹏,王海波. 低酚陆地棉的体细胞胚胎发生和植株再生. 河北农业大学学报, 1999, 22(1):9-12

32. 张谦,郑国昌. 雷蒙特红豆草下胚轴愈伤组织原生质体再生植株. 兰州大学学报(自然科学版),1994,30(2):86-90
33. 张鹏,凌定厚. 硝酸银与脱落酸相配合影响菜心离体培养之植株再生方式的组织学研究. 热带亚热带植物学报,1995,4(1):71-76
34. 李学宝,陈光荣,金波. 辣椒(*Capsicum annuum* L.)下胚轴离体培养的研究. 华中师范大学学报(自然科学版),1995,29(3):367-371
35. 李春瑶. 甘蔗幼叶愈伤组织发生的形态学和组织学研究. 广西师范大学学报(自然科学版),1994,12(2):65-69
36. 李雪梅,刘熔山. 小麦幼穗胚性愈伤组织诱导及分化过程中内源激素的作用. 植物生理学通讯,1994,30(4):255-260
37. 杨金玲,桂耀林,郭仲琛. 白木千体细胞胚胎发生的细胞组织学和淀粉积累动态的研究. 西北植物学报 1998,18(3):335—338
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. 陈以峰. 植物体细胞胚胎发生的诱导与调节研究进展. 生物学杂志,1996,69:3-5
40. 陈妹幼,张献龙,聂以春,吴家和. 陆地棉体细胞再生植株技术的改进研究. 棉花学报,2002,14(6):344-347
41. 陈喜文,陈德富,周朴华,李宗道. 苧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
42. 周大云,张宝红,刘方,刘志红. 一种新型的棉花体细胞胚胎发生的快速诱导法. 生命科学研究,2000,(4)3:237-242
43. 周音,张智奇,钟维瑾. 3种生长调节物质对生菜不定芽直接再生的影响. 吉林农业大学学报,1998,20(3):31-34
44. 周容,陈小媚. 花生叶片原生质体游离和培养因子的研究. 中国油料作物学报,1999,21(1):7-9
45. 周维燕. 植物细胞工程原理与技术. 北京, 中国农业出版社, 2001, 55、80-81
46. 周瑞阳,刘少伟,冯长明,刘仁. 卫星搭载红麻种子 SP₂ 代的变异研究. 空间科学学报,1996,16(增刊):142-147
47. 林荣双,梁丽琨,王庆华,肖显华. 花生成熟胚胚轴的植株再生和快繁. 生物技术,2003,13(1):29

48. 金晓玲,何平. 大叶桉愈伤组织诱导与继代培养的影响因素.中南林学院学报, 2003, 23(1)32-36
49. 赵颖,梁海曼. 植物原生质体培养及有关生理基础问题. 广西植物,1994,14(1):74-80
50. 郝岗平,杜希华,史仁玖,张松贺,张慧娟,杨清. 银杏幼嫩茎段培养诱导愈伤组织及其细胞学研究. 西北植物学报,2003,23(4):648—652
51. 徐华松,陆祖军,王永繁,黄学林. TDZ 对莴苣(*Lactuca sativa* L.)器官发生及乙烯形成的影响. 广西植物,1999,19(1):92-94
52. 秦玲,李明,王永熙,韩礼星,黄贞光,赵改荣. 不同细胞分裂素对 2001 富士苹果离体叶片再生的影响. 果树学报,2002,19(4):215-218
53. 莫良玉,吴良欢,陶勤南. 植物有机营养研究中供试种子组合灭菌方法比较. 浙江大学学报(农业与生命科学版),2000,26(6):643-646
54. 郭腾龙. 利用组织培养技术筛选棉花优异新种质. 江西棉花,1995(4):13-14
55. 崔凯荣,刑更生,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
56. 崔凯荣,戴若兰.植物体细胞胚发生的分子生物学.北京,科学出版社,2000,5、23-24
57. 崔海兰,朱延明,齐洋. Thidiazuron 等植物生长调节剂对水稻(*Oryza sativa* L.)愈伤不定芽分化的影响. 东北农业大学学报,2003,34(1):72-76
58. 崔瑾,李式军. 苯基噻二唑基脲(TDZ)和琼脂对芋茎尖生长的影响. 江苏农业科学,2002,6:82-83
59. 曹德菊,程备久,林毅,万平. 抗除草剂基因红麻的分子验证. 中国麻业,2001,23(3):1-4
60. 梁一池,杨华. 植物组织培养技术的研究进展.福建林学院学报, 2002,22(1):1~3
61. 黄文川,杨其光. 一种简化有效的普通烟草原生质体培养方法. 西北农业大学学报,2000,28(3):101-103
62. 黄绍兴,王慧中,黄美娟. 蔗糖浓度对胡萝卜体细胞胚生长与发育的影响. 科技通报,1995,11(2):111-115
63. 焦春海. 湖北省农业生物技术发展现状与对策.湖北农业科学,2001,2:3-5
64. 程玉兰,刁丰秋,吴乃虎,黄美娟. 蔗糖调空培养对胡萝卜体细胞胚内源 ABA 水平

- 的效应. 植物学报,1999,41(7):761-765
65. 程佑发,王勋陵. 枣树体细胞胚发生和组织学研究. 西北植物学报,2001,21(1):142-145
 66. 董合忠,程金亮,刘风学. 棉花下胚轴离体培养不定根发生的组织学研究. 莱阳农学院学报, 1996,13(2):88-94
 67. 董晋江,夏镇澳. 影响谷子原生质体看护培养的一些因素. 植物生理学报,1997,23(4):380-384
 68. 蔡 润,中田和男,平井八十一. 小麦根愈伤组织胚胎发育过程研究. 西北植物学报,2000,20(1):48—53
 69. 谭光轩,舒理慧,何光存. 短花药野生稻的离体植株再生及其组织细胞学观察. 植物生理学通讯,2002, 38(3):217-220
 70. 燕平梅. 组织培养应用于农作物的原理. 太原师范专科学校学报,1999,4:34-35
 71. 薛庆善. 体外培养的原理与技术.北京, 科学出版社, 2001,1041
 72. Bais H P, Sudha G, Ravishankar G A. Influence of putrescine, silver nitrate and polyamine inhibitors on the morphogenetic response in untransformed and transformed tissues of *Cichorium intybus* and their regenerant. *Plant Cell Rep* ,2001, 20:547–555
 73. Carvalho C H S, Bohorova N, Bordallo P N, Abreu L L, Valicente F H, Bressan W, Paiva E. Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes. *Plant Cell Reports* ,1997, 17: 73–76
 74. Cecilia Zapata, Metinee Srivatanakul, Sung-Hun Park, Byung-Moo Lee, Maria G. Salas,Roberta H. Smith. Improvements in shoot apex regeneration of two fiber crops: cotton and kenaf. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1999, 56: 185–191
 75. Collén A M C, Jarl C I. Comparison of different methods for plant regeneration and transformation of the legume *Galega orientalis* Lam. (goat's rue). *Plant Cell Reports* ,1999,19 : 13 - 19
 76. Fan G Q, Zhai X Q, Zhai C J, Bi H T. Callus induction from leaves of different paulownia species and its plantlet regeneration. *Journal of Forestry Research*, 2001,12(4): 209-214
 77. Hammatt N, Grant N J. Shoot regeneration from leaves of *Prunus serotina* Ehrh.

- (black cherry) and *P. avium* L. (wild cherry) *Plant Cell Reports*,1998,17: 526–530
78. Hutchinson M J, KrishnaRaj S, Saxena P K. Inhibitory effect of GA3 on the development of thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium×hortorum* Bailey) hypocotyl cultures *Plant Cell Reports*,1997, 16: 435–438
 79. Kaneda Y, Tabei Y, Nishimura S, Harada K, Akihama T, Kitamura K. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Plant Cell Reports*,1997, 17: 8–12
 80. Komatsuda T, Lee W, Oka S . Maturation and germination of somatic embryos as affected by sucrose and plant growth regulators in soybean *Glycine gracilis* Skvortz and *Glycine max* (L.) Merr. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult* ,1992,28:103–13
 81. Konan N K, Schöpke C, Cárcamo R, Beachy R N, Fauquet C. An efficient mass propagation system for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on nodal explants and axillary bud-derived meristems. *Plant Cell Reports*,1997,16: 444–449
 82. Lee E K, Cho D Y, Soh W Y. Enhanced production and germination of somatic embryos by temporary starvation in tissue cultures of *Daucus carota*. *Plant Cell Rep* ,2001,20:408–415
 83. Liang X Z, Ding S W, Wong S M. Development of a kenaf (*Hibiscus cannabinus*L.) protoplast system for a replication study of *Hibiscus* chlorotic ringspot virus. *Plant Cell Rep*,2002,20:982–986
 84. Lin C S, Chang W C. Micropropagation of *Bambusa edulis* through nodal explants of field-grown culms and flowering of regenerated plantlets. *Plant Cell Reports* ,1998, 17: 617–620
 85. Luo J P, Jia J F. Callus induction and plant regeneration from hypocotyl explants of the forage legume *Astragalus adsurgens*. *Plant Cell Reports* ,1998,17: 567–570
 86. Magioli C, Rocha A P M, de Oliveira D E, Mansur E. Efficient shoot organogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.) induced by thidiazuron. *Plant Cell Reports*,1998, 17: 661–663
 87. McLean K S, Lawrence G W, Reichert N A. Callus induction and adventitious

- organogenesis of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Plant Cell Rep*, 1992, 11:532-534
88. Nayak N R, Patnaik S, Rath S P. Direct shoot regeneration from foliar explants of an epiphytic orchid, *Acampe praemorsa* (Roxb.) Blatter and McCann. *Plant Cell Reports*, 1997, 16: 583–586
 89. Nguyen M V, Nickell C D, Widholm J M. Selection for high seed oil content in soybean families derived from plants regenerated from protoplasts and tissue cultures. *Theor Appl Genet*, 2001, 102:1072–1075
 90. Reichert N A, Baldwin B S. Potential for kenaf improvement via somaclonal variation. *Progress in new crops*. ASHS Press, Arlington, VA. 1996. 408-411
 91. Reichert N A, Liu D L. Protoplast isolation, culture, and fusion protocols for kenaf (*Hibiscus cannabinus*). *Plant cell, Tissue and Organ culture*, 1996, 44:201-210
 92. Sahoo Y, Chand P K. Micropropagation of *Vitex negundo* L., a woody aromatic medicinal shrub, through high-frequency axillary shoot proliferation. *Plant Cell Reports*, 1998, 18: 301–307
 93. Sreenivasu K, Malik S K, Ananda Kumar P, Sharma R P. Plant regeneration via somatic embryogenesis in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp). *Plant Cell Reports*, 1998, 17: 294–297
 94. Srivatanakul M, Park S H, Sanders J R, Salas M G, Smith R H. Multiple shoot regeneration of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) from a shoot apex culture system. *Plant Cell Reports*, 2000, 19 (12) :1165-1170
 95. Sujatha M, Reddy T P. Differential cytokinin effects on the stimulation of in vitro shoot proliferation from meristematic explants of castor (*Ricinus communis* L.), *Plant Cell Reports*, 1998, 17: 561–566
 96. Tang K X, Sun X F. Plant regeneration from protoplast was efficiently improved by a simple procedure. *Journal of Fudan University (Natural science)*, 2000, 39(5):577-581
 97. Thomas L D, David W P, Stewart B R. Correlation of Endogenous Gibberellic Acid with Initiation of Mango Shoot Growth. *J Plant Growth Regul*, 2001, 20:308–315
 98. Tsugawa H, Suzuki M. A low-temperature method for maintaining plant regeneration activity in embryogenic callus of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Reports*, 2000, 19:371 – 375

99. Veramendi J, Navarro L . Influence of physical condition of nutrient medium and sucrose on somatic embryogenesis of date palm. *Plant Cell Tissue Organ Cult* , 1996, 45:159–164
100. Vikrant , Rashid A. Induction of multiple shoots by thidiazuron from caryopsis cultures of minor millet (*Paspalum scrobiculatum* L.) and its effect on the regeneration of embryogenic callus cultures. *Plant Cell Rep* ,2002,21:9–13
101. Vinocur B, Carmi T, Altman A, Ziv M. Enhanced bud regeneration in aspen (*Populus tremula* L.) roots cultured in liquid media. *Plant Cell Reports* ,2000, 19:1146 - 1154
102. Wakhlu A K, Sharma R K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Heracleum candicans* Wall. *Plant Cell Reports*,1998,17: 866–869
103. Xie DY, Hong Y. Regeneration of *Acacia mangium* through somatic embryogenesis.
104. Zhang B H, Li X L, Li F L, Wang W, Li F G. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of elite cotton variety. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*,1995,4(4):11-16
105. Zhang Y J, Qian Y Q, Mu X J, Cai Q G, Zhou Y L, Wei X P. Plant regeneration from in vitro-cultured seedling leaf protoplasts of *Actinidia eriantha* Benth. *Plant Cell Reports*,1998, 17: 819–821
106. Zhao Y X, Yao D X, Harris P J C. Isolation and culture of protoplasts from callus tissue of *Hibiscus Syriacus* L. *Plant cell, Tissue and Organ culture*,1991,25:1

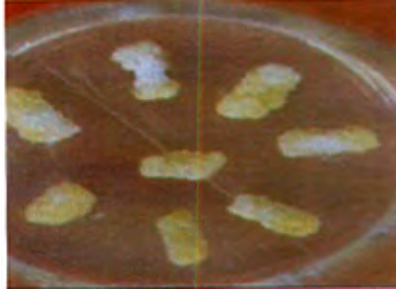
图版说明

Introduction of pictures

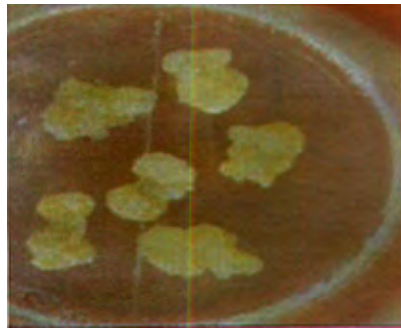
- | | |
|------------|-------------------|
| 图版 1-1~1-4 | 不同类型的愈伤组织 |
| 图版 2-1~2-6 | 下胚轴愈伤组织发生的组织细胞学观察 |
| 图版 3-1~3-4 | 子叶愈伤组织发生的组织细胞学观察 |
| 图版 4-1~4-8 | 子叶、真叶不定芽的诱导 |
| 图版 5-1~5-7 | 子叶不定芽发生的组织细胞学观察 |
| 图版 6-1~6-8 | 下胚轴不定根的发生 |
| 图版 7-1~7-3 | 绿色球状体及其组织细胞学观察 |
| 图版 8-1~8-6 | 原生质体及其分裂 |



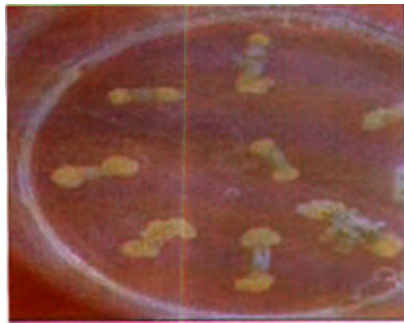
图版 1-1 白色坚硬愈伤



图版 1-2 淡黄色较致密愈伤



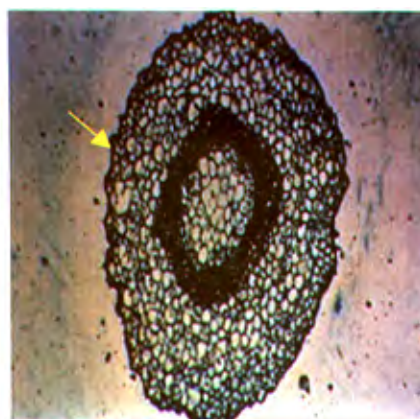
图版 1-3 黄色疏松状愈伤



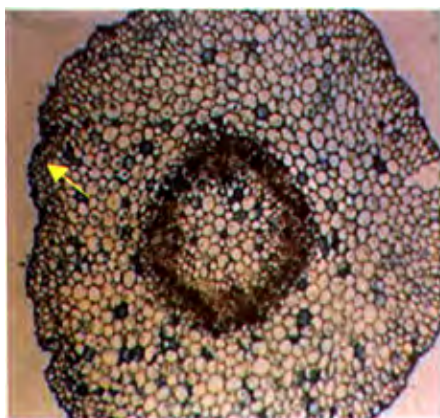
图版 1-4 深黄色愈伤



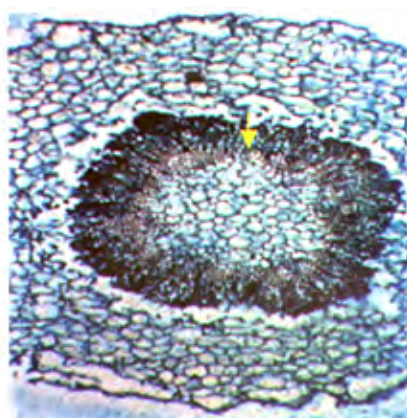
图版 2-1 表皮细胞开始分裂
2, 4-D/BA=0.05/0.5 (10×4)



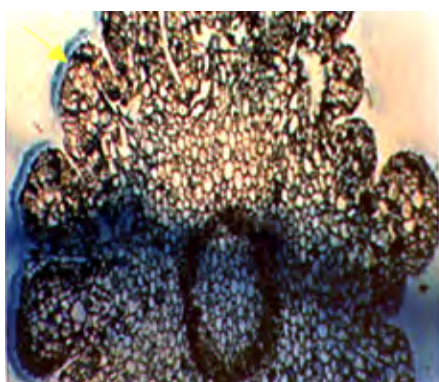
图版 2-4 表皮开始皱缩 1: 0.5
2, 4-D/BA=1.0/0.5 (10×4)



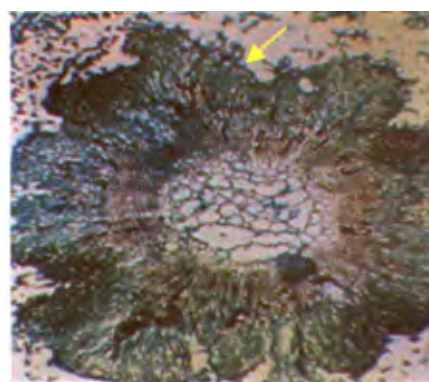
图版 2-2 皮层细胞分裂突起
(10×4)



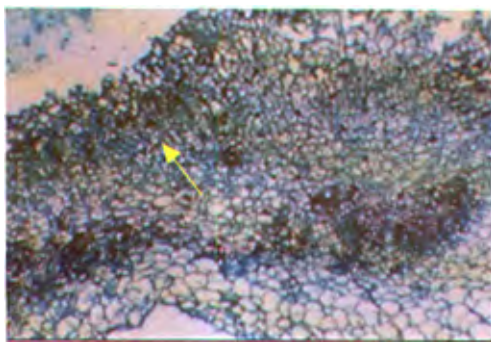
图版 2-5 维管束细胞分裂
(10×4)



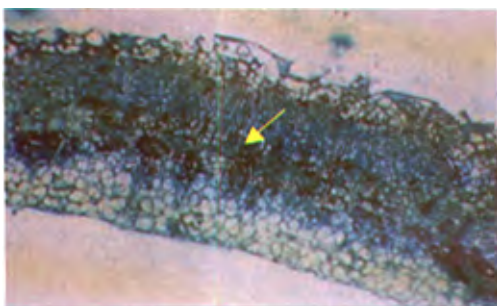
图版 2-3 皮层细胞不断分裂形成愈伤
(10×4)



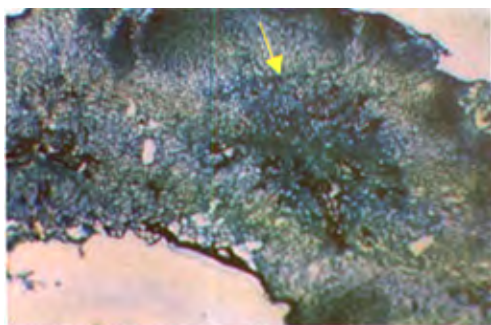
图版 2-6 维管束细胞不断分裂形成愈伤
(10×4)



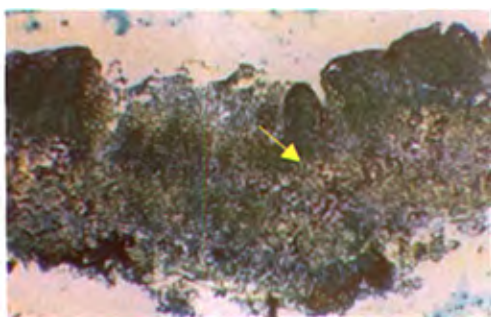
图版 3-1 2, 4-D/6-BA=0.05/0.1 (10×4)



图版 3-2 2, 4-D/6-BA=0.5/1 (10×4)



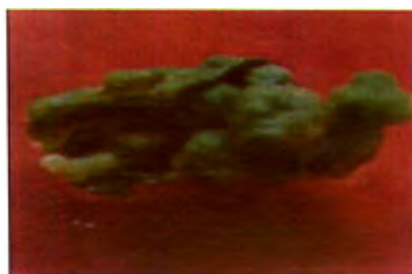
图版 3-3 2, 4-D/6-BA=1/0.1 (10×4)



图版 3-4 2, 4-D/6-BA=2/0.5 (10×4)



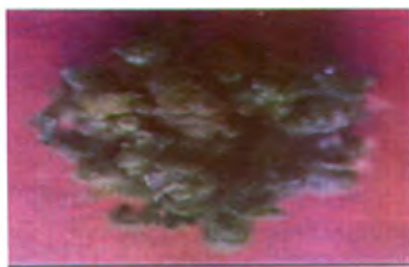
图版 4-1 子叶上的瘤状物



图版 4-6 真叶上诱导出的瘤状物



图版 4-2 子叶叶角瘤状物在诱导培养基上出芽



图版 4-7 真叶瘤状物在增殖培养基上出芽



图版 4-3 子叶叶角、切口、叶脉处出芽



图版 4-4 子叶瘤状物在增殖培养基上出芽



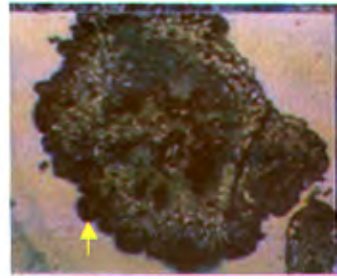
图版 4-8 成活的完整植株



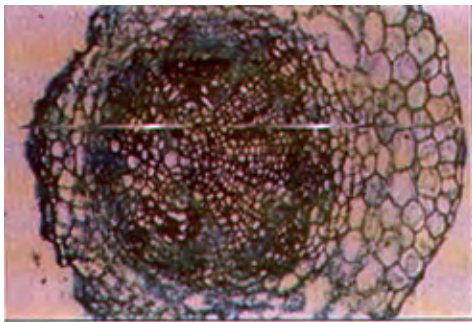
图版 5-1 叶片纵切面 (10×10)



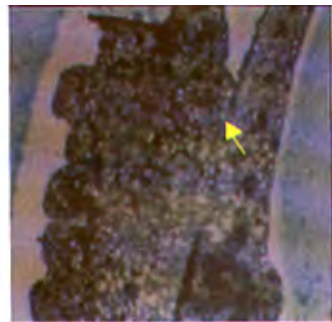
图版 5-2 叶主脉纵切 (10×10)



图版 5-6 瘤状物 (10×4)



图版 5-3 叶主脉纵切 (10×10)



图版 5-7 瘤状物 (10×4)



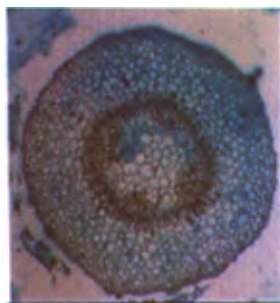
图版 5-5 叶肉细胞分裂生长，小维管束明显可见 (10×4)



图版 5-6 叶肉细胞分裂生长，小维管束相连 (10×4)



图版 6-1 无激素



图版 6-5 未处理 (10×4)



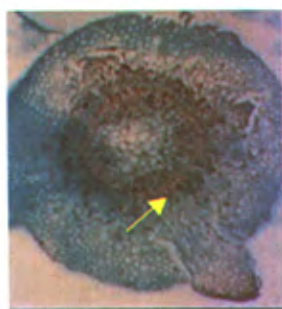
图版 6-2 IAA 0.05mg/L



图版 6-6 未处理 (10×10)



图版 6-3 NAA 0.3mg/L



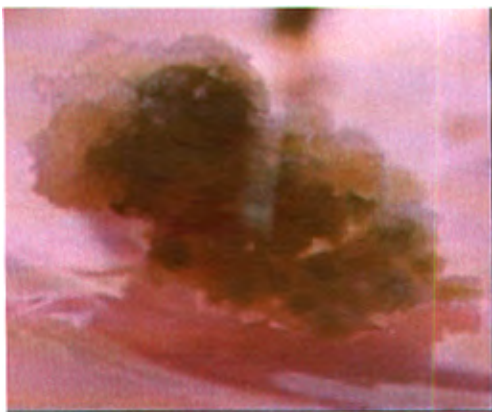
6-7 0.05 mg/LIAA (10×4)



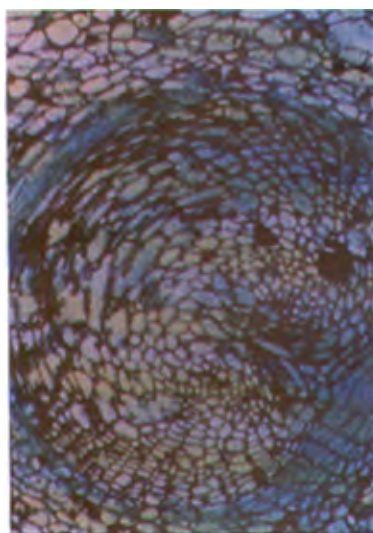
图版 6-4 6-BA 0.1mg/L



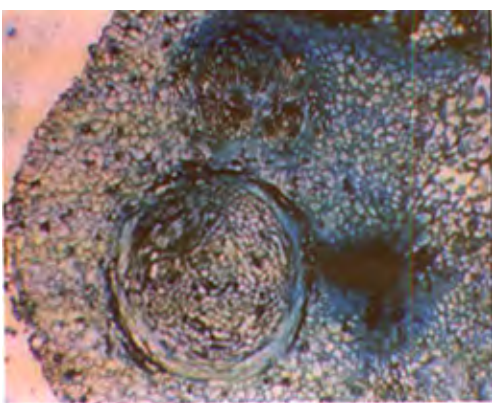
6-8 0.3 mg/LIAA (10×4)



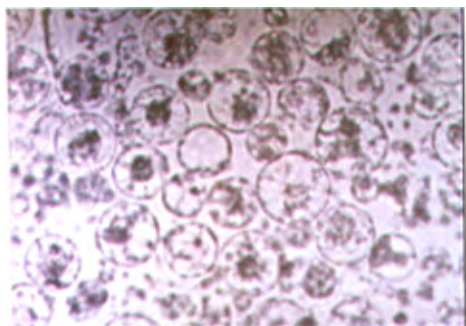
图版 7-1 绿色球状体



图版 7-2 球状体的切片 (10×10)



图版 7-3 球状体的切片 (10×4)



图版 8-1 下胚轴原生质体
(10×10)



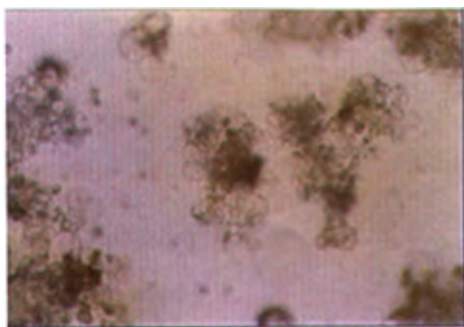
图版 8-2 漂浮在液面的无胞质原生质体
(10×10)



图版 8-3 原生质体均等的第一次分裂
(10×10)



图版 8-4 原生质体不均等的分裂
(10×10)



图版 8-5 微滴培养形成的小细胞团
(10×4)



图版 8-6 微滴培养形成肉眼可见的小愈伤
(10×4)

附录

Appendices

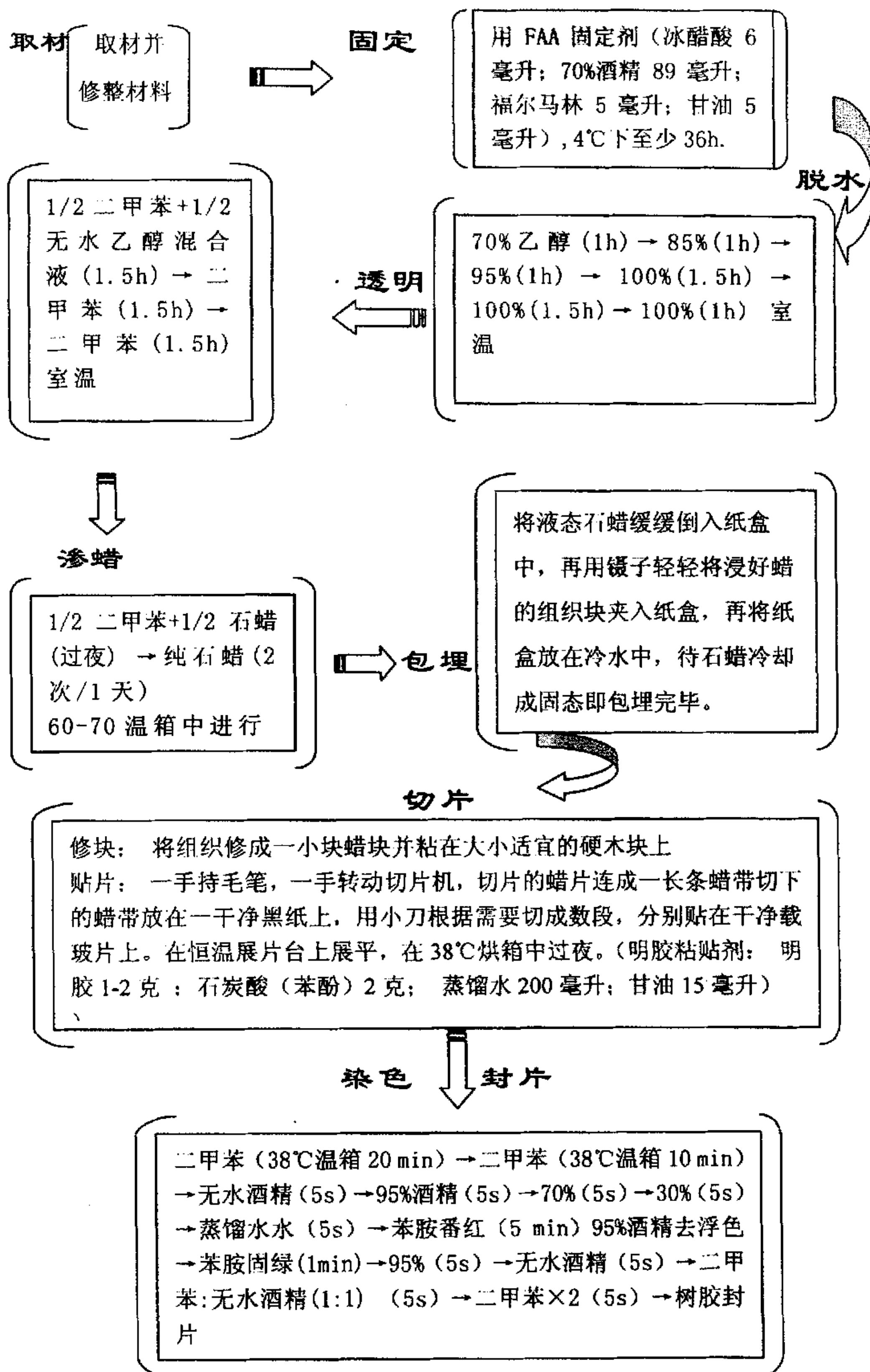
(1) 原生质体培养基的有机化合物 (陈志贤, 1989)

维生素	mg/L	氨基酸	mg/L	有机酸	mg/L	碳源和其他	mg/L
盐酸硫胺素	10	谷 酰 胺	500	柠 檬 酸	40	三磷酸腺苷	100
盐酸比哆醇	1	天冬酰胺	250	延胡索酸	40	辅 酶 A	1
烟 酸	1	脯 氨 酸	100	苹 果 酸	40	肌—肌 醇	100
叶 酸	1	丝 氨 酸	100	丙酮酸钠	20	果 糖	250
泛 酸 钙	5	半胱氨酸	100			木 糖	250
核 黄 素	1					鼠 李 糖	250
V _{B12}	0.1					棉 子 糖	250
生 物 素	0.1					葡 萄 糖	3000
						甘 露 醇	9000

(2) 本文缩略词

缩略词	英文名称	中文名称
Abbreviation	English	chinese
6-BA	6-benzylaminopurine	6-苄氨基嘌呤
BSA	Bovine serum albumen	牛血清蛋白
CPW	Composition of protoplast washing-solution	原生质体洗液
2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid	2, 4-二氯苯氧乙酸
IAA	Indole acetic acid	吲哚乙酸
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid monohydrate	2-(N-吗啡啉) 乙磺酸
NAA	α -naphthaleneacetic acid	α -萘乙酸
SDW	Sterile distilled water	灭菌蒸馏水
TDZ	N-Pneny'N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea	苯基噻二唑基脲

石蜡切片程序



致 谢

Acknowledgements

从本科到研究生的学习期间，我的导师周瑞阳教授都给了我无私的关怀，支持和鼓励，点点滴滴铭记在心。他对科研的热诚、严谨，他为人的宽厚、慈爱，深深的启迪着我，感染着我，影响着我，教会了我如何作学问，如何做人。再多的言语也难以表达的我深深谢意，我只想祝愿我的导师周瑞阳教授永远年轻、永远健康、永远快乐、永远幸福。

我的师兄刘恒蔚老师，在工作和生活给了我很多的关心和帮助。在课题的研究过程中他始终尽心尽力的提供各种支持和建议。他对工作的勤恳、认真值得我永远学习。非常感谢他三年来对我的鼓励和帮助！

在课题的研究过程中，还得到长江大学生科院田志宏院长、陈大清院长，华中农业大学黄燕文教授、张献龙教授，以及长江大学严寒老师、杜何为老师、王晓玲老师、董社琴老师、阮国梁老师的指导和建议。师兄赵合明、付碧石、邱永福，师弟李刚、李伟国、许峰，同学何勇、李应声、朱大世也给了我很大帮助。实习生刘妍妍、周浩、夏明海、雷立山、潘兴森、黄振、王宁、谢先梅协助了部分试验工作。在此一并致以最诚挚的谢意！

本研究在长江大学生科院重点实验室完成。长江大学中日合作中心实验室也提供了大量仪器和设备，金卫兵院长、陈玲老师给了极大的帮助和支持。本研究的材料由湖南长沙中国农业科学院麻类研究所栗建光教授、李德芳研究员提供。也深表感谢！

还要感谢我的家人、朋友以及我的师母给予我的无私的关爱和支持！

最后，谨向三年来所有关心、支持、帮助过我的老师、同学、朋友表示最深切的感谢！

牛英

2004年5月