

目 录

致谢	(III)
缩略词及基本培养基配方	(IV)
中文摘要	(1)
前言	(3)
材料与方法	(5)
一、体细胞胚胎发生	(5)
二、人五种子的制备	(7)
结果与分析	(8)
一、体细胞胚胎发生	(8)
1. 愈伤组织诱导	(8)
(1) 不同外植体的脱分化差异比较	(8)
(2) 不同基本培养基对脱分化作用的影响	(9)
(3) 环境条件对脱分化的影响	(9)
(4) 生长调节物质对脱分化的影响	(9)
(5) 不同基因型的脱分化差异	(10)
2. 愈伤组织的继代与分化	(10)
(1) 愈伤组织的初继代繁殖	(10)
(2) 愈伤组织的再继代	(13)
a. 品种间差异	(13)
b. 不同激素成分对愈伤组织生长的影响	(13)
(3) 愈伤组织的体胚发生	(14)
二、人五种子的制备	(14)
1. 子叶直接再生不定芽	(14)
2. 人五种子制作及无菌发芽	(15)
(1) 最佳胶浓度筛选	(15)
(2) 人五包埋对不定芽生长的影响	(15)

(3) 人互种子的无菌发芽	(15)
(4) 人互种子在无菌滤纸上的发芽特性	(16)
3. 人互种子的有菌发芽	(16)
(1) 防细菌污染试验	(17)
(2) 防真菌污染试验	(18)
(3) 人互种子在有菌土壤中发芽	(18)
4. 人互种子的贮藏	(19)
(1) 人互种子贮藏期间的变化	(19)
(2) 人互种子贮藏后的发芽	(19)
讨论	(21)
1. 苎麻愈伤组织反应的多样性及潜在的应用价值	(21)
2. 关于苎麻的体细胞胚胎发生	(22)
3. 关于苎麻人互种子的制备技术	(24)
4. 低温和液体石蜡在苎麻人互种子贮藏中的作用	(25)
参考文献	(27)
英文摘要	(I)
图版	(31)
制版说明	(35)

致 谢

本研究和论文是在导师李宗道教授和博士生指导小组周朴华副教授的悉心指导下完成的。在试验过程中还得到了李修庆博士、颜昌敬教授、胡久清教授、董延瑜教授、罗宽教授、何立珍副教授、程尧楚副教授及苾麻研究所陈喜文、黄爱媛、李利良、甘红霞等同志的大力支持和帮助，苾麻研究所、校青年科研基金委员会和研究生办的领导也给予了支持和鼓励，在此一并表示衷心的感谢。

本文采用的缩略词

Abridged words to be used in the paper

AC	Active carbon	活性碳
Ade	Adenine	腺嘌呤
BA	6-Benzylaminopurine	6-苄氨基嘌呤
BR	Brassinolide	油菜素内酯
CH	Casein hydrolysate	水解酪蛋白
CM	Coconut milk	椰子汁
CPA	(4-Chlorophenoxy) acetic acid	对氯苯氧乙酸
2,4-D	(2,4-Dichlorophenoxy) acetic acid	2,4-二氯苯氧乙酸
GA	Gibberellic acid (3)	赤霉素
KT	Kinetin	激动素
LH	Lactoprotein hydrolysate	水解乳蛋白
Met	Multi-effect triazole (PP333)	多效唑
NAA	Naphthaleneacetic acid	萘乙酸
YE	Yeast extract	酵母浸提物
ZT	Zeatin	玉米素

试验用基本培养基配方 (单位:mg/L)
Composition of basic media in the paper (unit: mg/L)

组成成分	MS (Murashige & Skoog, 1962)	SH (Schenk & Hildebrandt, 1972)	B ₅ (Gamborg et al., 1968)	MSB	CXV
大量元素					
KNO ₃	1900	2500	2500	1800	3000
NH ₄ NO ₃	1650	/	/	1850	150
NH ₄ H ₂ PO ₄	/	300	/	/	/
(NH ₄) ₂ SO ₄	/	/	134	/	/
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	400	250	370	450
KH ₂ PO ₄	170	/	/	170	600
NaH ₂ PO ₄	/	/	150	/	/
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	200	150	440	150
微量元素					
KI	0.83	1.00	0.75	0.83	0.83
H ₃ BO ₃	6.2	5.0	3.0	6.2	6.2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	/	/	22.3	22.3
MnSO ₄ ·H ₂ O	/	10.0	10.0	/	/
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	1.0	2.0	8.6	8.8
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.10	0.25	0.25	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.2	0.025	0.025	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.1	0.025	0.025	0.025
铁盐					
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	15.0	27.8	27.8	27.8
Na ₂ EDTA	37.3	20.0	37.3	37.3	37.3
有机物					
肌醇	100	100	100	100	200
烟酸	0.5	5.0	1.0	1.0	1.0
甘氨酸	2.0	/	/	/	2.0
盐酸硫胺素	0.1	5.0	10.0	10.0	10.0
盐酸吡哆素	0.5	0.5	1.0	1.0	1.0
谷氨酰胺	/	/	/	/	150
其他					
蔗糖	30000	30000	20000	30000	/
葡萄糖	/	/	/	/	30000
琼脂	7000	7000	7000	7000	7000
pH值	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8

苧麻人工种子制备技术的研究

陈德富

摘 要

苧麻(*Boehmeria nivea*)俗称“中国草”,是我国重要的纺织工业原料。由于体细胞胚胎发生和人五种子技术是许多现代育种技术的基础,对缩短育种周期,加快良种推广进程具有重要的作用,从而引起广泛的注意和高度的重视,但在苧麻方面尚未见报道。本文首次以苧麻为材料进行了体细胞胚胎发生和不定芽人五种子制备技术的研究。主要研究结果如下:

1. 对苧麻31个品种进行了愈伤组织诱导,并对其愈伤组织多样性进行了较为全面深入的研究。苧麻脱分化以子叶、下胚轴为最适外植体;要求含高钾、磷、硝态氮、肌醇、盐酸硫胺素、低钙与低氨态氮,使用葡萄糖为碳源的CXW为基本培养基;激素组合为0.5mg/L CPA(或2,4-D)和0.05mg/L BB;培养温度为28℃。发现愈伤组织存在明显的多样性,从中可选择出有胚胎发生能力的细胞系。“城步青麻”、“浏阳大叶绿”为母本来源的愈伤组织多样性相对较小,多呈淡黄色或浅灰绿色、疏松、生长适中、颗粒化明显、内部细胞为小而圆、壁薄、内含物丰富。

2. 对上述愈伤组织进行了继代和分化研究。苧麻愈伤组织在继代中仍具有丰富的愈伤组织多样性,但在附加0.1mg/L CPA、0.5mg/L NAA、1.5mg/L ZT的CXW培养基上能获得多样性相对较小、质地结构较好的愈伤组织,并在附加0.1mg/L CPA、0.5mg/L NAA、1.5mg/L ZT、2.0mg/L Met的CXW培养基上获得了少数畸形胚状体幼苗,但试验重复性差。

3. 以“湘苧三号”子叶为材料,在附加2.5mg/L BA的MSB培养基上不经愈伤组织能直接获得20.8%的不定芽分化率,不定芽经转接至附加0.05mg/L NAA的1/2MS壮苗培养基上能获得再生植株。取其茎尖或带芽茎段为包埋材料,能获得5.92的人五种子繁殖系数。

4. 对苕麻人五种子的制作技术进行了开创性研究。

(1) 认为4%的海藻酸钠最适合包埋;在附加0.05mg/L NAA的1/2 MS为人五胚乳,1/4MS为发芽基质的条件下,苕麻人五种子能100%发芽,100%生根;无菌滤纸上,71%发芽,29%生根。

(2) 进行了人五种子的有菌发芽。以100u/ml青霉素、0.1%CTM 为防腐剂,有菌状态下加入人五胚乳中对微生物生长起到一定的抑制作用。制作的人五种子播种到事先用5%甲醛密闭杀菌的沙石肥土中,30d后15.3%发芽,8.2%生根。

(3) 对苕麻不定芽人五种子进行了贮藏研究。单用低温、液体石蜡都不能长时间贮藏人五种子,将两者结合起来能有较好的贮藏效果。贮藏120d后取出,在无菌条件下有25%的发芽率和5%的生根率,这是因为它们结合起到了互补作用,既能防止失水变干,又能抑制人五种子萌发。

[关键词] 苕麻;胚胎发生;不定芽;人五种子;子叶和下胚轴

苎麻人工种子制备技术的研究

前 言

胚状体是植物组织培养中起源于一个非合子细胞, 经过胚胎发育过程形成的胚状结构(朱澄, 1978)。由于具有结构完整, 数量多, 速度快的优点, 因此它不仅为分化的机理研究提供了很好的实验体系(Heslop-Harrison, 1967), 而且在新品种选育和繁殖方面起着越来越重要的作用。目前, 有越来越多的实验证明, 胚性细胞系由于不受外界环境影响, 实验重复性好, 而且有成熟的组织培养经验可供借鉴, 因此它是进行原生质体培养、体细胞杂交及基因转移等现代育种手段的最佳外植体或理想受体之一(李文彬等, 1986; 蔡起贵等, 1987; 李良才等, 1988; Rhodes et al., 1988; 王海波等, 1989; 何玉科, 1990; 虞剑平等, 1990)。胚状体发育的个体还具有同质性, 因此还可采用适当方法加以保护制作人工种子来大量繁殖无性或育性很低的植物, 从而加速良种选育和推广进程(李修庆, 1990; Redenbaugh et al., 1986, 1987a)。所以自1958年发现胚胎形成以来(Steward et al., 1958), 胚状体发生研究一直被人们所重视。据1981年统计, 已有106种植物能进行胚胎发生(周俊彦, 1981), 特别是某些被认为分化困难的作物如棉花相继观察到了胚胎发生过程(陈志贤等, 1987)。因此认为胚胎发生是植物界的普遍现象, 它是植物体细胞的一个基本特征(Johri, 1976; Reinert et al., 1978)。

在胚状体研究基础上发展起来的人工种子不仅具有胚状体的一切特性, 而且还具有胚状体没有的一些特性: 可以直接进行大田播种, 加速良种的选育和推广, 节省人力和物力; 在胶囊内添加各种物质, 使得人工种子具有天然种子所没有的特殊价值; 可使不同作物、不同品种的人工种子制作成大小、形状一致, 从而可以用同一式样的播种机进行播种等(Redenbaugh et al., 1987a, b; 郭仲琛, 1990; 陈正平等, 1990; 陈喜文等, 1991; 陈德富等, 1993)。因此自1978年提出设想以来(Murashige, 1978), 即引起世界各国广

注注意和高度评价。欧洲列入尤里卡计划,我国列入“863”计划加以研究开发,并取得显著成绩,目前在体胚发生与筛选,人五种皮与防腐,人五种子的制作流程,土壤中发芽成苗与栽培管理,贮藏及其生理生化,体细胞无性系变异,机械化生产,品质筛选与基因工程等方面都取得了极其重大的进展,其中以模式植物苜蓿、胡萝卜、芹菜的人五种子研究最为深入。在我国,中科院植物所、遗传所、中山大学、北京大学、复旦大学等单位开展的西洋参、银杏树、南方特有果树、高营养胡萝卜、水稻等人五种子研创课题均取得了重大突破(李修成,1990)。

但是由于能够产生符合人五种子技术要求的胚状体植物种类少,胚状体发生的无性系变异就试管苗而言相对较大,且胚状体幼苗有较长的幼年期,因此1985年Kamada认为开发人五种子技术不应局限于胚状体一种材料。他将人五种子概念加以外延,即用适当方法包埋组织培养所获得的具有发育成完整植株的分生组织(芽、胚状体、愈伤组织、生长点等),以取代天然种子而播种的颗粒体,得出了广义人五种子概念。其中由于不定芽等快繁体系已研究多年,技术相当成熟,变异小,因此目前进行过人五种子研究的76种植物中有38.1%以不定芽为包埋材料。

苎麻(*Boehmeria nivea*)是我国的特产和重要出口创汇作物,有关组织培养的研究开展较晚,最早由周朴华等以苎麻茎叶为材料开始研究(周朴华等,1980)。自此以后,苎麻组织培养研究方兴未艾。在快速无性繁殖方面,顾昌敬等首次建立了腋芽增殖技术的程序,并应用于生产(顾昌敬等,1981,1982a, b)。顾昌敬等又在此基础上创建试管苗的管外水插法,改进和简化了试管苗的生产程序(顾昌敬等,1988)。在器官分化研究方面先后报道了由苎麻下胚轴、子叶、茎段、叶片经过愈伤组织阶段分化出不定芽并再生完整植株(黄记生等,1980;莫荣达等,1981,1982;黄记生等,1981a, b;顾昌敬等,1982a, b;赵庆华等,1984),并对苎麻未离体叶面生芽进行了形态和细胞学观察,探讨了细胞脱分化和愈伤组织形成的原因(胡继金,1991)。在单倍体培养方面,顾昌敬等以苎麻花药为材料培育出单倍体植株(顾昌敬等,1986)。在原生质体培养方面,陈喜文等以子叶愈伤组织悬浮系为材料进行

酶解,培养再生出完整植株(陈喜文等,1994)。此外,在低温保存方面也开展了一些研究(李树川,1992)。这些研究成果,不仅对缩短苧麻育种周期,加速良种繁育步伐具有重要意义,而且为进一步发展和利用组织培养技术开辟新的育种途径打下了坚实的基础。但是苧麻体细胞胚胎发生及人五种子制备技术的研究目前尚未见报道。本文首次对其体胚发生及人五种子技术进行初步研究,以期为生产中存在无性繁殖速度慢、有性繁殖易分离、育种周期长等问题的苧麻开辟新的良种繁殖方式和育种途径。

材 料 与 方 法

第一部分 体细胞胚胎发生

一、试验品种

选用本校苧麻研究所原始材料园中的“湘苧三号”、“沅江白里子青”、“沅江芦竹青”、“沅江稀节巴”、“沅江黄壳早”、“沅江大叶白”、“湘苧一号”、“湘苧二号”、“长沙鸡骨白”、“浏阳青叶麻”、“浏阳大叶绿”、“双峰细叶白”、“武冈薄皮种”、“武冈红皮麻”、“武冈厚皮种”、“城步青麻”、“武冈白麻”、“邵阳五号”、“大庸黄壳麻”、“加禾白脚麻”、“宜章雅麻”、“湘苧四号”、“家麻”、“邻水桐皮麻”、“川南红皮小种”、“圆青五号”、“黔苧一号”、“华苧一号”、“广西阳朔黑皮茆”、“古巴苧麻”、“涟源黄叶麻”等31个品种为材料。

二、试验方法

1. 无菌发芽与外植体的准备

1992年12月中旬采收天然种子,晒干,用信封封好置于干燥器中保存备用。无菌消毒前经恒温箱烘烤1hr,脱壳去杂,挑选饱满种子盛于钳锅中,包上纱布,用70%互业酒精浸泡1min,再用含有效氯为2%的次氯酸钠溶液灭菌40-60 min,然后用无菌水反复冲洗4-5次,无菌接种到MSB 固体培养基上发芽。①待长至子叶初露期时置于2℃冰箱中冷藏约一星期,促使下胚轴伸

长,再转置培养箱(室)中使其长至子叶平展期,取子叶、下胚轴为外植体;

②将实生苗转接至含0.05mg/L NAA的MS壮苗培养基上获取试管苗,切取叶片、叶柄、茎段为外植体。取下胚轴、叶柄、幼茎约0.5cm长,叶片0.5cm×0.5cm大小及子叶半片大小按4×4布局接种。

2. 愈伤组织的诱导

将不同品种、不同外植体材料接种到含不同培养基成分的脱分化培养基上,统计产生肉眼可见的愈伤组织(大小约0.15cm以上)所需天数,记为愈伤组织始产生天数;25d后考察愈伤组织的诱导率、大小、颜色、主要愈伤组织的质地状况,以及愈伤组织的多样性;用倒置显微镜(100X--200X)观察不同类型愈伤组织的细胞内部结构(镜检时按陈正华<1986>方法,加少许PICCH染色液)。以上述结果为依据来比较品种与培养基差异,筛选合适的脱分化培养基、品种及外植体类型。

诱导率(又叫愈伤率)为直径大于0.15cm的愈伤组织块数占接种块数的百分比,按四舍五入原则,保留至整数位;愈伤组织大小测量方法为肉眼估计其直径大小,以cm为单位;愈伤组织的多样性为非主要类型愈伤组织所占比例大于40%者为“大”,介于5%至40%之间者为“中”,小于5%者为“小”。

3. 愈伤组织的继代及分化

取在含0.5mg/L CPA和0.05mg/L BR的CXW培养基上产生的子叶、下胚轴愈伤组织进行初继代,即严格选择主要类型愈伤组织转至同一培养基上,以扩大愈伤组织数量,观察愈伤组织多样性在转代中的表现;再取在上述培养基上继代2代以上的“城步青麻”、“武冈红皮麻”、“阳朔黑皮茛”、“浏阳大叶绿”的子叶、下胚轴愈伤组织进行再继代,即严格选择同一类型的愈伤组织在不同培养基上进行扩增,筛选最合适的继代培养基,并选择质地结构较好、较稳定的愈伤组织做体细胞胚胎发生试验。

4. 培养基配制及培养条件

各培养基配制后,在15磅高压下灭菌20min,然后倒入灭菌的Φ8cm培养皿中,冷却后接种,Parafilm封口,25d后转换培养基。所有材料均放置在温度 $28\pm 1^{\circ}\text{C}$,光强1000lux,16hr光/8hr暗的光照培养箱中培养。

第二部分 人工种子的制备

一、供试品种

选用本校苧麻研究所育成的新品种“湘苧三号”，种子来自本所种质资源圃。

二、试验方法

1. 无菌发芽和外植体准备

无菌发芽方法同本文第一部分，取子叶为外植体。

2. 直接再生不定芽

取子叶接种到附加不同激素的MSB培养基上诱导产生不定芽，待再生的不定芽长至0.5cm高时，切下转接至含0.05mg/L NAA的1/2MS(包括蔗糖在内的所有MS成分减半，下同)培养基上壮苗、扩繁，30d后随机取5瓶试管苗统计人互种子繁殖系数。

人互种子繁殖系数=不定芽的增殖倍数×节间数

3. 最佳胶浓度筛选

试验设计了1%、1.5%、2.0%、2.5%、3%、4%、5%、6%共8种浓度的海藻酸钠胶，用吸管逐滴滴入0.1M CaCl_2 溶液中，观察胶状态以及滴入时和置提30min后的成球情况，以此为根据确定最佳胶浓度。为了防止高压对成球能力的影响，海藻酸钠胶和 CaCl_2 溶液都先经15磅高压20min。

4. 人互种子制作

取3-4mm长的茎尖或带芽茎段，搅拌到浓度为4%的海藻酸钠胶中，用内径约为5mm的滴管逐个滴入到用附加0.05mg/L NAA的1/4MS溶液配制的0.1M CaCl_2 中，置提30min后取出，1/4 MS培养液冲洗一次。海藻酸钠通常用含0.05mg/L NAA的1/2 MS(无钙、无琼脂)培养液配制。

5. 人互种子无菌培养基上发芽

将刚制作的人互种子、经过贮藏的人互种子以及用含0.05mg/L NAA的1/4 MS培养液浸泡30min的裸露茎尖或带芽茎段无菌播种到培养基上，定期统计发芽率、生根率，以此为根据筛选合适的发芽基质和胚乳成分，比较包埋对不定芽生长的影响以及不同贮藏处理的效果。发芽基质通常为1/4MS

回体培养基，发芽、生根均以突破种皮3mm为标准。发芽率、生根率均为2-3次重复试验的平均值，按四舍五入原则取整数，每次试验用人五种子40-50粒。

6. 人五种子无菌滤纸上发芽

采用不同碳源为胚乳成分制作的人五种子无菌播种到铺有湿润滤纸的培养皿上进行发芽试验，取2次重复试验的平均值，每次试验用人五种子40-50粒。

7. 人五种子的有菌发芽

比较不同种类和浓度的防细菌剂(医用链霉素、青霉素、头孢拉定)与防真菌剂(农用农抗120<中国农科院生防所>、井冈霉素<武进生物化工厂>、CTM杀菌剂<齐齐哈尔市化工研究所>)对真细菌的防腐效果，筛选最佳防腐剂。防腐剂先用无菌水溶解，加入无菌的人五胚乳中，无菌操作下制作人五种子进行有菌播种。发芽土壤设湿润滤纸(对照)、沙石土、沙石肥土(沙石土和肥土各半掺和而成)、肥土等。播种后注意保湿，观察发芽动态。所有土壤使用前均用5%甲醛喷匀，密闭一周，敞三天以上。

8. 人五种子贮藏

取人五种子贮藏于黑暗中。贮藏方法设不同温度(24-28℃培养室、15-18℃冬季室、2℃低温冰箱)和是否浸泡于液体石蜡中的交互处理。观察贮藏期间的人五种子颜色、大小、形态等变化；统计贮藏期间和贮藏后无菌培养基上的发芽率。

结 果 与 分 析

第一部分 体细胞胚胎发生

一、愈伤组织诱导

1. 不同外植体的脱分化差异比较

‘湘芸三号’的子叶、下胚轴、叶片、叶柄、茎段等不同类型外植体在含2.0mg/L 2,4-D的CXW培养基上都能产生愈伤组织，先从伤口或边缘处

开始,逐渐向中部扩展(图1)。且以子叶、下胚轴最易获得淡黄色、疏松、半透明状的愈伤组织,愈伤组织生长快;叶柄、茎段、叶片愈伤组织生长缓慢,质地结构表现为块状或白绒毛状(图2)。因此,我们选择子叶、下胚轴为进一步研究的外植体材料。

2. 不同基本培养基对脱分化作用的影响

试验的5种不同基本培养基(含 2.0mg/L 2,4-D)对苎麻子叶、下胚轴脱分化作用影响很大。MS、MSB上的愈伤组织为淡黄色,生长相对较慢,为块状愈伤组织;CXW、B₅上的愈伤组织为淡黄色,生长较快;SH培养基上诱导的愈伤组织呈白绒毛状或松软块状,生长缓慢。分析培养基成分可知,苎麻脱分化要求矿物质元素和维生素含量较高,种类较全,特别是较高含量 K^+ 、 NO_3^- 、 PO_4^{3-} 、盐酸硫胺素、肌醇及谷氨酰胺,而 NH_4^+ 、 Ca^{2+} 要求较低浓度;在碳源方面,葡萄糖比蔗糖更有利于苎麻脱分化。

3. 环境条件对脱分化的影响

比较了不同温度及光照与否对苎麻脱分化的影响。结果显示 28°C 温度比 25°C 温度更易使苎麻进行脱分化,愈伤组织始产生天数提前3d。25d时统计的愈伤组织诱导率从75%提高到86%,但对愈伤组织质地结构没有影响。光照和黑暗对脱分化没有差异。

4. 生长调节物质对脱分化的影响

不同激素种类及浓度的CXW脱分化培养基对“湘苎三号”子叶、下胚轴材料都可不同程度地进行脱分化,说明苎麻内源激素水平较高。但附加NAA,特别是低浓度的NAA,易使愈伤组织或外植体产生不定根,且愈伤组织诱导率不高,生长较慢,质地结构为松软或块状;附加KT,易使愈伤组织呈浅绿色块状或白绒毛状; 0.05mg/L 的BR可大大提高愈伤组织诱导率,并使结构呈现颗粒化状态,但必须在合适生长素存在的条件下才能起到很好的脱分化作用;2,4-D、CPA在较高浓度下(大于 1.0mg/L)易使愈伤组织稀泥化,较适浓度下(0.5mg/L)能很好地使子叶、下胚轴进行脱分化。因此,我们认为对苎麻子叶、下胚轴来说最适的激素组合是 0.5mg/L CAP(或2,4-D)和 0.05mg/L BR。

5. 不同基因型的脱分化差异

试验比较了31个品种的子叶、下胚轴在附加0.5mg/L CAP和0.05 mg/L BR的CXW脱分化培养基上的脱分化差异(表1,2)。可以看出苧麻品种间子叶、下胚轴的愈伤组织诱导率差异不大,但愈伤组织的多样性极其复杂,不仅品种间差异明显,而且同一品种内也存在多类型愈伤组织共存现象。愈伤组织多样性主要表现为以下几种:颜色上,有无色、淡黄色、浅绿色、绿色、浅灰绿色、深灰绿色等;质地上,有稀泥状、松软块状、松散颗粒状、致密块状等;大小上,大的1cm以上,小的不到2mm;根系有无上,有无根、少量根、大量根等。通过对不同类型愈伤组织镜检知道稀泥状愈伤组织的细胞多为长形,无内含物(图3),松软块状细胞多为椭圆形(图4),松散颗粒状多为圆形或短椭圆形,细胞小,核大,质浓的薄壁细胞所组成(图5),白绒毛状质地由白色、极长极大、不透明细胞所组成,致密块状难以夹碎,细胞粘连紧密。但这种细胞结构与愈伤组织颜色、是否产生根系的多样性无关。

二、愈伤组织的继代与分化

(一)愈伤组织的初继代繁殖

严格挑选上述31个品种试验所产生的主要类型愈伤组织在同一培养基上继代一次,即初继代。发现愈伤组织多样性更加复杂,但不同类型的愈伤组织后代生长状况有一定规律。绿色、浅绿色块状愈伤组织生长缓慢,稀泥状愈伤组织不久褐化死亡,说明前者的生长素浓度过低,脱分化不完全,后者生长素浓度过高,导致愈伤材料受到毒害,即不同品种对激素要求不一样;有根产生的愈伤组织后代根系更丰富,且生长发育缓慢或易发黄。此外,还发现尽管接种时进行了严格选择,但后代仍出现了不同程度的愈伤组织多样性,初代差异小的初继代后,愈伤组织类型差异相对较小,初代差异大的经初继代后,差异较大。因此我们选择愈伤组织质地结构为淡黄色、松散颗粒状或松软块状、生长较快、无根、愈伤组织多样性相对较小的“城步青麻”、“浏阳大叶绿”、“武冈红皮麻”、“阳朔黑皮莩”四个品种作为继续研究的品种材料。

表1 不同品种的子叶脱分化差异

Table 1. The difference of induction of cotyledon among various varieties

品种	接种块数 (块)	愈伤率 (%)	直径 (cm)	主要愈伤组织的 质地	愈伤组织 的多样性
湘兰三号	160	92	0.4	淡黄色, 松软块状, 无根	大
湘兰四号	160	98	0.6	淡黄色, 松软块状, 少量根	大
武冈白麻	128	100	0.6	淡黄色, 松软块状或白绒毛状, 大量根	大
家麻	128	91	0.3	淡黄色, 松软块状, 大量根	中
邵阳5号	128	88	0.4	淡黄色, 松软块状, 少量根	中
古巴兰麻	128	98	0.6	淡黄色, 松软块状, 少量根	大
链萼黄叶麻	128	80	0.3	浅绿色, 致密块状, 无根	小
城步青麻	144	100	0.8	淡黄色, 松散颗粒状, 无根	小
沅江黄壳早	128	95	0.8	淡黄色, 稀泥状, 无根	小
沅江大叶白	160	100	1.1	无色, 稀泥状, 无根	小
湘兰二号	128	98	0.3	淡黄色, 松软块状, 少量根	中
长沙鸡骨白	160	98	0.8	淡黄色, 稍稀泥状, 无根	中
浏阳大叶绿	128	100	0.9	淡黄色, 松散颗粒状, 无根	小
双峰细叶白	80	98	1.0	无色, 稀泥状, 无根	小
武冈薄皮种	80	100	0.8	淡黄色, 松软块状, 大量根	小
武冈红皮麻	144	98	1.0	淡黄色, 松软块状, 无根	小
园青5号	80	85	0.3	绿色, 致密块状, 少量根	小
黔兰一号	128	76	0.3	浅绿色, 致密块状, 少量根	小
沅江白里子青	128	97	0.8	淡黄色, 稀泥状, 少量根	中
沅江芦竹青	128	89	0.6	淡黄色, 稀泥状, 少量根	小
沅江稀节巴	160	95	0.4	淡黄色, 稍稀泥或白毛状, 无根	大
湘兰一号	160	87	0.4	无色, 稀泥状, 无根	小
浏阳青叶麻	120	76	0.3	无色, 松软块状, 无根	小
武冈厚皮种	160	73	0.5	淡黄色, 稀泥状, 少量根	小
大庸黄壳麻	128	64	0.3	浅绿色, 致密块状, 大量根	小
加禾白脚麻	128	77	0.3	无色, 松软块状, 无根	小
宜章雅麻	128	74	0.3	浅绿色, 致密块状, 少量根	小
邻水桐皮麻	128	100	0.8	淡黄色, 松软块状, 少量根	大
川南红皮小种	128	76	0.5	淡黄色, 松软块状, 少量根	中
华兰一号	128	75	0.4	淡黄色, 松软块状, 无根	中
阳朔黑皮兜	160	95	0.5	淡黄色, 松软块状, 无根	小

表 2 不同品种的下胚轴脱分化差异

Table 2. The difference of induction of hypocotyl among various varieties

品种	接种块数 (块)	愈伤率 (%)	直径 (cm)	主要愈伤组织 质地	愈伤组织 的多样性
湘兰三号	96	76	0.6	淡黄色, 松软块状, 少量根	由
湘兰四号	80	88	0.7	淡黄色, 松软块状, 大量根	大
武冈白麻	80	85	0.7	白绒毛状或稀泥状, 少量根	大
家麻	64	74	0.8	淡黄色, 松软块状, 少量根	中
邵阳5号	64	63	0.3	淡黄色, 松软块状, 少量根	中
古巴兰麻	64	82	0.7	淡黄色, 松软块状, 无根	大
涟源黄叶麻	64	43	0.4	浅绿色, 致密块状, 无根	小
城步青麻	80	91	0.9	淡黄色, 松散颗粒状, 无根	小
沅江黄壳早	80	76	0.6	无色, 稀泥状, 无根	小
沅江大叶白	96	94	0.9	无色, 稀泥状, 无根	小
湘兰二号	80	43	0.5	浅绿色, 致密块状, 大量根	中
长沙鸡骨白	96	52	0.6	无色, 稀泥状, 无根	由
浏阳大叶绿	80	88	0.8	无色, 松软颗粒状, 无根	小
双峰细叶白	48	64	0.7	无色, 稀泥状, 无根	小
武冈薄皮种	48	76	0.9	淡黄色, 松软块状, 大量根	大
武冈红皮麻	80	84	0.8	无色, 松软块状, 无根	小
园青5号	48	47	0.9	浅绿色, 较致密块状, 少量根	小
黔兰一号	64	32	0.6	无色, 松软块状, 少量根	中
沅江白里子青	64	66	0.5	无色, 稀泥状, 少量根	中
沅江芦竹青	64	48	0.6	无色, 稀泥状, 无根	小
沅江稀节巴	80	81	0.6	无色, 稀泥状, 无根	中
湘兰一号	80	62	0.4	无色, 稀泥状, 无根	小
浏阳青叶麻	80	57	0.5	无色, 稀泥状, 无根	小
武冈厚皮种	80	54	0.6	无色, 稀泥状, 少量根	小
大嘴黄壳麻	64	37	0.5	浅绿色, 较致密块状, 少量根	小
加禾白脚麻	64	25	0.5	无色, 松软块状, 无根	小
宜章雅麻	64	28	0.5	浅绿色, 较致密块状, 少量根	小
邻水桐皮麻	80	93	0.8	无色, 松软块状, 少量根	大
川南红皮小种	64	63	0.7	浅绿色, 较致密块状, 少量根	中
华兰一号	80	33	0.6	淡黄色, 松软块状, 无根	中
阳朔黑皮兜	80	89	0.5	淡黄色, 松软块状, 无根	小

(二) 愈伤组织的再继代

1. 品种间差异

“城步青麻”、“浏阳大叶绿”、“武冈红皮麻”、“阳朔黑皮莩”在含 0.5 mg/L CPA 和 0.05mg/L BR 的 CXW 培养基上初继代后再继代培养, 其愈伤组织多样性又表现出新的变化。其中“武冈红皮麻”、“阳朔黑皮莩”差异最大, 以致无法选择某一特征的愈伤组织, 且愈伤组织为水渍状, 转接能力差, 不能继续培养。“城步青麻”、“浏阳大叶绿”的愈伤组织多样性相对较小, 结构较好。因此我们选择以“城步青麻”、“浏阳大叶绿”为母本来源的子叶、下胚轴愈伤组织无性系为本试验进一步研究的品种材料。

2. 不同激素成分对愈伤组织生长的影响

将“城步青麻”、“浏阳大叶绿”的愈伤组织转接至表3所示培养基中, 结果为: ①在仅以NAA为生长素的情况下, 愈伤组织易生根, CAP、2,4-D能抑制根发生; ②细胞分裂素KT、Ade对愈伤组织颗粒化形成没有作用, ZT及低浓度的BA对愈伤组织颗粒化形成有一定的促进作用, 但高浓度BA易使组织变致密块状并产生不定芽; ③BR不能促使愈伤组织形成颗粒化结构; ④适当加一些Met(2.0mg/L)对愈伤组织颗粒结构的形成有一定促进作用。

表3 不同激素成分对愈伤组织生长的影响

Table 3. Effects of various hormone combination on growth of calli

激素组合	大小(cm)	质地结构
2,4-D _{0.1} -i-a _{0.5} +KT _{0.1} -o _{0.5}	0.4-0.7	淡黄色, 松软块状
CPA _{0.1} +KT _{0.55}	0.5	淡黄色, 松软块状
NAA _{0.5} -4-a ₀ +KT _{1.0}	0.5-0.6	淡黄色或浅绿色, 松软块状, 有根
NAA _{0.1} -o _{0.5} +ZT _{0.5}	0.5-0.7	淡黄色, 松软块状或颗粒状, 大量根
2,4-D _{0.05} -o _{0.5} +BA _{1.0} -o-2-a ₀	0.3-0.45	绿色或深灰绿色, 致密块状, 有不定芽
BR _{0.01} -KT _{0.05}	0.4-0.5	淡黄色, 松软块状
CPA _{0.1} +NAA _{0.5} +Ade ₂₀	0.6	淡黄色, 松软块状
CPA _{0.1} +NAA _{0.5} +ZT _{1.5}	0.8	淡黄色, 松散颗粒状, 无根
CPA _{0.1} +NAA _{0.5} +ZT _{1.5} +Met _{2.0}	0.8	淡黄色或浅灰绿, 松散颗粒状, 无根
2,4-D _{0.05} +NAA _{0.5} +BA _{0.1}	1.0	淡黄色, 松散颗粒状或块状

注: 基本培养基为 CXW, 品种为“浏阳大叶绿”; 表中激素浓度单位为 mg/L。下同

(三) 愈伤组织的体胚发生

试验了表4所示的培养基,大部分不能产生体细胞胚,仅“浏阳大叶绿”子叶来源的愈伤组织在附加0.1mg/L CPA、0.5mg/L NAA、1.5mg/L ZT、2mg/L Met及3000mg/L YE的CXW培养基上继代培养6代后颗粒化变得更加明显(图6),然后在愈伤组织上分化出了一些相互独立的体细胞胚(图7),并发育为畸形胚状体幼苗(图8)。但试验重复性极差,以后多次重复均未长出类似的幼苗。说明苎麻胚胎发生较困难,其发生条件仍有待进一步摸索。目前条件下研究人工种子的制备技术只能选用不定芽为包埋材料。

表4 不同培养基上的愈伤组织分化试验
Table 4. The differentiation of calli on various media

激素组合	质地特征	大小(cm)
$NA_{0.5}+BA_{0.5}$	浅灰绿或深灰绿色,松散颗粒状	0.5
$NAA_{0.5}+BA_{0.5}+AC_{1000}$	褐色,致密颗粒状,渐死亡	0.2
$CPA_{0.1}+NAA_{0.5}+ZT_{1.5}$ $+Met_{2.0}+YE_{3000}$	极浅灰绿色,松散颗粒状,有少数体细胞胚幼苗产生	0.8
$ZT_{2.0}+YE_{3000}$	淡黄色,松软块状	1.0
$NAA_{0.1}+ZT_{2.0}+Met_{2.0}+YE_{3000}$	淡黄色,松软块状	1.0
$BA_{1.0}+YE_{3000}$	浅灰绿色或绿色,致密块状	0.7
$NAA_{0.1}$	淡黄色,松软块状	0.6
CX	淡黄色,松软块状	0.5

第二部分 人工种子制备

一、子叶直接再生不定芽

取子叶接种到含不同激素成分的MSB培养基上,25d后,统计观察发现:在附加 $BA_{2.5}$ mg/L(下同)、 $BA_{2.5}+GA_{0.5}$ 、 $BA_{0.5}+GA_{0.5}$ 上的子叶颜色变深绿、硬而脆、体积增大2倍以上,其中在附加 $BA_{2.5}$ 、 $BA_{2.5}+GA_{0.5}$ 上的子叶直接分化出肉眼可见,数量1-5个不等的**不定芽**(图9),分化率分别为20.8%和17.2%。附加 $BA_{2.5}+NAA_{0.1}$ 的MSB培养基上,未见不定芽发生,但在伤口处出现直径约为2mm的淡黄色、疏松、半透明状的愈伤组织。说明对于苎麻子叶直接再生来说,细胞分裂素BA是必须的,且要求较高浓度;赤霉素对再

生有一定的抑制作用;NAA则易使其愈伤化,并完全抑制不定芽的发生。待再生的不定芽长至0.5cm高时,切下转至含0.05mg/L NAA的1/2 MS培养基上壮苗、生根、扩繁获得再生植株。一个月后,统计试管苗增殖情况发现,苗数从原接的4.8增殖到6.6,节间数为4.30。即可推算出人工种子繁殖系数为5.92。

二、人工种子制作及无菌发芽

1. 最佳胶浓度筛选

试验结果表明胶浓度低于3%则滴制时浮于水面,30min后成半球型或块状,易于粘连,高于5%则有拖尾现象,制成的球过硬(图10)。因此我们选择4%浓度为制作人工种子的胶浓度。

2. 人工包埋对不定芽生长的影响

人工包埋对包埋材料的生长有一定影响,一方面给包埋材料以营养和生长物质,一方面给包埋体以毒害。目前认为被广泛使用的海藻酸钠包埋体系对包埋体损害较小。表5是人工包埋制种对苎麻不定芽发芽生根的影响。可以看出,海藻酸钠包埋系统对不定芽发芽生根不仅没有负面影响,反而对生根有明显的促进作用,缩短发芽与生根的时间差,从而提高其转换率。这也许是因为人工胚乳的养分和生长物质NAA作用的结果。

表 5. 人工包埋对不定芽发芽生根的影响
Table 5. Effects of encapsulation on germination and rooting of adventitious buds

处 理	5d	15d	25d	35d	45d
不定芽(对照)	29/0	96/24	96/53	98/73	98/73
人工包埋	36/0	94/45	96/90	99/97	99/97

注:表中“99/97”表示每一时期的“发芽率(%)”/“生根率(%)”,下同

3. 人工种子的无菌发芽

试验了6种胚乳成分,2种发芽基质。结果表明以1/2MS+NAA_{0.05}为胚乳成分,1/4MS为发芽基质较佳。播种后2-3d即可发芽(图11),5-6d有根系突

出,此时真叶开始平展,25d时100%发芽,35d时100%生根(图12),即100%转换成植株健壮、根系齐全的幼苗(表6、图13)。

表 6. 人工种子在无菌培养基上的发芽特性
Table 6. The germination of artificial seeds in sterilized media

人工胚乳	基质	播种粒数	4d	8d	13d	17d	20d	25d	35d
1/2MS	1/2MS	40	6/0	15/0	21/0	27/0	35/4	44/8	46/13
	1/4MS	60	13/0	22/0	35/0	40/3	50/8	65/15	70/25
1/4MS+NAA _{0.05}	1/2MS	30	7/0	17/0	33/0	43/7	50/17	60/20	76/27
	1/4MS	30	17/0	27/0	53/13	60/23	67/30	73/37	77/50
1/2MS+NAA _{0.05}	1/2MS	45	11/0	29/0	44/7	84/18	93/22	96/27	96/53
	1/4MS	40	20/0	45/5	65/35	85/60	95/95	100/95	100/100
1/2MS+NAA _{0.05} +BA _{0.05}	1/2MS	35	9/0	17/3	34/3	51/6	66/9	77/17	86/51
	1/4MS	20	15/0	40/5	50/15	70/25	90/30	95/50	95/80
1/2MS+NAA _{0.05} +IAA _{0.1}	1/2MS	23	13/0	26/0	35/4	52/9	57/13	65/22	74/35
	1/4MS	20	15/0	45/0	65/15	85/30	95/50	95/70	95/90
1/2MS+IBA _{0.05}	1/2MS	26	4/0	27/0	35/0	38/4	46/8	50/12	69/50
	1/4MS	20	15/0	30/5	55/0	75/15	80/30	85/30	90/50

4. 人工种子在无菌滤纸上的发芽特性

人工种子最终目的是直接播种到大田中去。因此在培养基上发芽成功后就应逐渐过渡到脱离培养基条件。为此我们进行了人工种子直接播种到铺有无菌湿润滤纸的培养皿发芽试验(表7)。从试验的4种人工胚乳上的发芽情况来看,其发芽明显不如培养基条件的,说明培养基条件下的1/4MS培养基发芽基质对人工种子发芽生根起着重要的作用。在培养皿条件下人工胚乳仍以15g/L蔗糖为最好,即附加0.05g/L NAA的1/2MS胚乳最好,30g/L蔗糖对发芽不利。麦芽糖对人工种子的发芽生根不如蔗糖。

三、人工种子的有菌发芽

人工种子由于含有大量营养,在有菌条件下易感菌污染,将导致人工种子的腐烂而坏死,因此为了达到人工种子的有菌发芽的目的必须注意两点:

防腐和促进转换。

1. 防细菌污染试验

我们试验了三种医用防细菌剂加入人工胚乳中制作人工种子,放置在暴露空气的情况下,5d后统计种球污染情况(表B)。可以看出,链霉素在试验的两种浓度下均能被感染,青霉素对防治细菌有较强作用,头孢拉定的防腐效果不如青霉素,在高浓度下有一定的防治效果,但低浓度下毫无作用,且其价格远远高于其他试剂(约是青霉素的8倍)。因此我们选择青霉素为人工种子防细菌剂。

表7 不同人工胚乳成分的人工种子在无菌滤纸上的萌发

Table 7. The germination of artificial seeds with various artificial endosperm on sterilized filter paper

人工胚乳	6d	15d	23d	31d	41d
15g/L蔗糖	14/3	42/7	60/9	63/25	71/29
30g/L蔗糖	10/3	34/4	51/8	61/9	63/15
15g/L麦芽糖	14/0	37/3	52/2	60/8	64/9
30g/L麦芽糖	12/0	23/1	27/1	35/4	35/4

表8 加入不同防细菌剂的人工种子污染情况

Table 8. The contamination of artificial seeds when added various bactericide

防细菌剂	浓度	污染率(%)
链霉素	60 u/ml	100
	100 u/ml	100
青霉素	40 u/ml	67
	60 u/ml	50
	100 u/ml	12
	25 mg/L	100
头孢拉定	50 mg/L	67
	100 mg/L	50

2. 防真菌污染试验

试验了三种农用防真菌剂加入人工胚乳中,制作的人工种子直接播种到沙石土中,第5d,第8d观察其菌丝生长情况(表9)。可以看出0.1%CTM有较强的防真菌效果,比不加抗生素(对照)的菌丝生长量明显减少,农抗120作用次之,井冈霉素几乎没有防腐效果,因此选择0.1%CTM为人工种子的防腐剂。

表9 加入不同防真菌剂的人工种子污染情况
Table 9. The contamination of artificial seeds when added various fungicide

防真菌剂及浓度	5d时的菌丝量	8d时的菌丝量
对照(不加)	+++++	+++++
100mg/L 农抗120	++	+++
50mg/L 井冈霉素	+++	+++++
0.1%CTM	+	++

3. 人工种子在有菌土壤中的发芽

在人工胚乳中加入100u/ml 青霉素、0.1%CTM制作的人工种子在有菌条件下播种到经过处理的不同土壤中,7d在沙石肥土中即有人工种子萌发(图14),12d在沙石土、肥土中见人工种子发芽。30d后人工种子已发育成健壮植株(图15),此时统计其发芽率、生根率、污染率(表10)。可以看出,不同土壤条件下其发芽生长状况有很大区别,发芽率以滤纸和沙石肥土方式为最好;沙石土由于保水性能差,种球易干化而导致人工包埋材料的死亡;肥土中由于含有大量病菌,易污染而降低其发芽率。总之,土壤条件下的发芽特性远不如培养基、培养皿的。说明以目前这种海藻酸钠包埋制种系统制作的人工种子在自然条件下萌发、转换还存在一些问题,仍需进一步研究,如开发更好的防腐剂。

表10 苧麻人工种子在有菌土壤中的发芽

Table 10. The germination of ramie artificial seeds on nonsterile soil

土壤类型	播种粒数	发芽率(%)	生根率(%)	污染率(%)
湿润滤纸(对照)	40	22.5	12.5	60.0
沙石土	60	2.5	1.5	35.3
三七肥土	90	15.5	8.3	51.0
泥土	70	2.5	1.4	70.6

四、人工种子的贮藏

1. 人工种子贮藏期间的变化

贮藏期间定期观察发现,随着贮藏时间的延长,人工种子发芽和褐化越来越严重。但不同处理的人工种子在贮藏的4个月内其变化各异(表11、12)。不加液体石蜡贮藏的人工种子逐渐因种球失水变干而死亡,且随温度降低失水变干发生的时间延迟,培养室内贮藏仅20d就完全干化,冬季室温贮藏需45d才完全干化,冰箱中贮藏60d才完全干化。加液体石蜡者虽然能在任何温度条件下很好地保持种球不失水变干,但在较高温度条件下贮藏时,人工种子在贮藏期间会发芽,且随温度提高,萌发率越高,褐化越早;温度降低,人工种子萌发率也随之降低(图16)。因此在人工种子贮藏中,低温能抑制人工种子的萌发,但不能有效阻止种球失水变干,相反液体石蜡能很好地达到保水防干的目的,但不能克服贮藏期间的萌发,且发芽后的幼苗生长畸形,甚至坏死。在2℃低温下浸泡液体石蜡的贮藏方式能贮藏苧麻不定芽人工种子120d。

2. 人工种子贮藏后的发芽

人工种子经各种贮藏方法贮藏30d,60d,120d后取出,无菌培养基上发芽特性见表13。

贮藏30d取出发芽发现,单用低温贮藏的人工种子,其贮藏后无菌发芽率和生根率低于室温(培养室,冬季室温)处理的,表现明显的逆境效应。在培养室温度下(约24-26℃),人工种子在贮藏期间能萌发,但由于种球失水而导致较早发芽的人工种子干化死亡,因而贮藏后的发芽率和生根率低于

冬季室温处理的。用液体石蜡处理的,由于液体石蜡能很好地起到保水防干作用,因此浸没液体石蜡中的人工种子贮藏后的发芽率和生根率比不浸的要高。

表11 人工种子在贮藏期间的变化
Table 11. Changes of artificial seeds after storage

贮藏 天数	不加液体石蜡				加液体石蜡			
	培养室温	冬季室温	冰	箱	培养室温	冬季室温	冰	箱
20d	种球完全干 化,褐色	种球开始变 小,未发芽 生根	种球大小不 变,绿色, 未发芽生根	种球大小不 变,黄化,发 芽多,未生根	种球大小不 变,绿色,少 量发芽,未生根	种球大小不 变,绿色,未 发芽生根	种球大小不 变,绿色,未 发芽生根	种球大小不 变,绿色,未 发芽生根
35d	——	种球变小, 褐色,少量 发芽,未生根	种球开始变 小,部分褐色 未发芽生根	种球大小不 变,发芽多, 未生根	种球大小不 变,绿色,少 量发芽,未生根	种球大小不 变,绿色,未 发芽生根	种球大小不 变,绿色,未 发芽生根	种球大小不 变,绿色,未 发芽生根
45d	——	种球完全干 化,褐色	种球变小, 褐色	种球大小不 变,发芽的幼 苗变黄或褐 死,未生根	种球大小不 变,部分黄化, 发芽多,未生根	种球大小不 变,绿色,未 发芽生根	种球大小不 变,绿色,未 发芽生根	种球大小不 变,绿色,未 发芽生根
60d	——	——	种球完全干 化,褐色	种球大小不 变,褐色,发 芽多,未生根	种球大小不 变,发芽多, 未生根	种球大小不 变,绿色,未 发芽生根	种球大小不 变,绿色,未 发芽生根	种球大小不 变,绿色,未 发芽生根
90d	——	——	——	种球大小不 变,褐色	种球大小不 变,发芽的幼苗 变黄褐死,未生根	种球大小不 变,少量褐化, 少量发芽	种球大小不 变,少量褐化, 少量发芽	种球大小不 变,少量褐化, 少量发芽
120d	——	——	——	——	种球大小不 变,褐色	种球大小不 变,少量褐化, 少量发芽	种球大小不 变,少量褐化, 少量发芽	种球大小不 变,少量褐化, 少量发芽

表12 液体石蜡中贮藏60d、120d的人工种子状况
Table 12. Condition of artificial seeds after 60d, 120d storage in liquid paraffin

处理	绿色粒数 比率(%)	褐色粒数 比率(%)	黄色粒数 比率(%)	已发芽率 (%)
培养室温	8/	68/	24/	27/
冬季室温	25/4	43/91	32/5	15/46
冰箱	65/45	2/33	33/22	0/11

注:表中数据“65/45”分别为贮藏60d/120d的粒数所占比率(%)

贮藏60d后的发芽特性虽然与30d基本一致,但未浸液体石蜡的人工种子完全干化死亡,不能发芽,而培养室温度下浸泡于液体石蜡的人工种子因贮藏期间萌发消耗养料,使得贮藏后的发芽率和生根率明显低于冬季室温和冰箱中贮藏的。

贮藏120d后由于贮藏期间的冬季室温逐渐升高(其实已进入春季,室温升高到10-15℃),人工种子因萌发消耗养料导致养料供应出现问题,且贮藏期过长,致使贮藏后的发芽率几乎为0,而冰箱中贮藏的仍有25%的发芽率和5%的生根率。

表13 人工种子贮藏后的发芽特性
Table 13. The germination of artificial seeds after storage

贮藏天数	贮藏方式	8d	18d	28d	38d	48d
30d	冬季室温	24/0	39/9	48/27	58/48	58/52
	冰箱	18/0	31/5	33/20	35/25	36/28
	培养室温(液体石蜡)	26/0	41/17	52/35	53/41	53/43
	冬季室温(液体石蜡)	56/0	78/33	82/65	85/76	91/81
	冰箱(液体石蜡)	20/0	30/6	35/18	38/20	38/21
60d	培养室温(液体石蜡)	1/0	2/0	2/0	4/1	4/1
	冬季室温(液体石蜡)	54/0	68/16	68/41	76/51	76/51
	冰箱(液体石蜡)	17/0	20/5	27/9	29/17	29/17
120d	冬季室温(液体石蜡)	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	冰箱(液体石蜡)	19/0	23/2	25/3	25/5	25/5

讨 论

一、关于苎麻愈伤组织反应的多样性

苎麻是雌雄同株、异花授粉作物。目前现有的品种都是杂合体,遗传基础非常复杂,生产上用无性繁殖的方法来避免天然种子繁殖后代的普遍变异从而保持优良品种的种性(李宗道,1989)。在我们的试验中,由于采用

的外植体是种子发芽而来的子叶、下胚轴等材料,既有母系一方的遗传,又有父系一方的遗传,加之我们采用的种子取自种质资源圃,遗传机制显得更为复杂和多样化,从而导致诱导的愈伤组织颜色有无色、淡黄、灰绿、白色至褐色;愈伤组织质地有紧密、疏松、水渍状;愈伤组织大大小小的直径1cm以上,小的不到2mm。这种愈伤组织形态上广泛的变异很可能导致其再生植株的多样性。因为愈伤组织多数来源于一个或少数几个细胞,经过组织培养过程将放大组织培养之前在外植体细胞中积累的变异,再加上组织培养过程产生的变异,使得后代可选择利用的遗传资源更为丰富,再结合组织培养技术,在培养基中加入选择压力可望筛选出有重大突破的特定的细胞突变体及其再生植株,从而可快速创造新品种(Larkin et al., 1981; Krihorian et al., 1983; 朱至清等, 1989)。

但是,这种愈伤组织多样性将导致苎麻体胚发生变得更为困难。本研究经过大量的实验才初步观察到了一些相互脱离的畸形胚状体幼苗,且重复性差。其原因之一可能是苎麻愈伤组织多样性不仅表现在品种和外植体间或同一品种同一外植体的无性系间,而且也表现在同一细胞无性系的不同代数间,从而导致愈伤组织的选择和判别变得更加复杂,研究工作变得更加繁重,不仅要注意充分利用丰富的无性系资源,还要注意无性系的选择和防止混杂。

二、关于苎麻的体细胞胚胎发生

胚状体发生在植物界中是一个普遍现象,是细胞全能性的一种表达方式,较之器官发生方式在理论上与应用上更有意义(Ammirato, 1983)。通过多年来的研究,已积累了丰富的胚胎发生经验,在胚胎发生的基因表达机理方面也取得了一些成果(朱澄, 1978; Tissierat et al., 1978; Sung, Dudits, 1981; Sung, Okimoto, 1981, 1983; 周俊彦, 1982; 韩碧文等, 1988)。但遗憾的是许多物种的体细胞胚质量太低;许多植物,特别是一些重要的农作物甚至还不能产生胚状体。胚状体的发生仅仅停留在经验基础上,而且重复性差,远远不能满足胚状体应用,如人工种子的需要(Redenbaugh et al., 1986)。

本研究中采用子叶、下胚轴等外植体,虽能很好地获得淡黄色或浅灰绿色,疏松,颗粒化明显,细胞小而圆,壁薄,内含物丰富的愈伤组织,但从愈伤组织上产生胚状体相当难,仅初步观察到了一些相互脱离的畸形胚状体幼苗,且重复性差。但是,这些研究为进一步进行苎麻胚胎发生研究提供了一些有益的经验 and 启示。①目前的苎麻品种多为杂合体,遗传背景复杂,后代发生严重分离,因此进行胚胎发生研究时应重视基因型问题,严格控制愈伤组织的多样性,这就需要从众多的愈伤组织无性系中反复选择。我们的试验表明,试验的31个材料中以“浏阳大叶绿”、“城步青麻”为母本的遗传后代中有可能选择出能进行胚胎发生的细胞无性系。这与细胞悬浮培养研究的结果相类似(陈喜文等,1994)。②植物的各种外植体在组织培养条件下,都有可能产生胚状体,但材料的种类和生理状态影响极大。本研究表明,以苎麻子叶、下胚轴特别是子叶为外植体最易获得能产生胚状体的愈伤组织胚性细胞系,而且取材广泛,污染小,生理状态相对稳定,结果相对易于重复。这与棉花的研究相类似(Davidonis et al., 1983; 刘春明等,1991)。但是苎麻子叶、下胚轴外植体较小,且来源于种子,较难控制其基因型问题,这就要求实验设计严格,操作谨慎,以防止不同来源的愈伤组织即无性系的相互混杂。③植物的任何器官和任何组织的细胞,在离体培养中,接受各种因素的作用,细胞会发生脱分化形成无序的愈伤组织块。但由于细胞来源及起作用的因素不同,所形成的愈伤组织块的质地结构有显著不同,即愈伤组织的颜色、大小、疏松程度及内部细胞结构等不同。胚胎发生的经验表明,某一类型的愈伤组织较易产生胚状体。如根芹以淡黄色,半透明状,疏松的愈伤组织为最好(陈德富等,1991);棉花以淡黄色,小颗粒状,较致密(刘春明等,1991)或生长较迅速,呈稀泥状和结节状,水淋淋,半透明灰白色的愈伤组织形成胚胎能力为较强(橙,1987)。因此愈伤组织质地结构的判别是否准确对于能否进行胚胎发生相当重要。我们的研究结果表明,苎麻愈伤组织类型是极其丰富的,其中以淡黄色或浅灰绿色,疏松,生长适中,有生机活力,颗粒明显的愈伤组织有可能产生胚状体。④植物组织培养最重要的工作之一就是筛选最佳的培养条件。在培养条件的众多因子中,

较为重要的是无机物、有机物、碳源、激素水平以及光温条件等。本研究表明苎麻组织培养需要较高含量的钾、磷、硝态氮、盐酸硫胺素和肌醇，氨态氮过高对组织生长不利；葡萄糖比蔗糖更有利于苎麻愈伤组织的生长发育；较高的温度（28℃）比较低的温度更适宜于愈伤组织的生长。这些因素与在棉花的研究相类似（陈志贤等，1987；余建明等，1989）。生长素在苎麻组织培养中是必需的，且以作用力较强的2,4-D, CPA为好，但浓度不可过高，否则易产生毒害；NAA易使苎麻材料产生不定根，但与CPA等结合使用，有很好的作用；细胞分裂素的作用较复杂，脱分化可以不要，但分化是必需的，且以玉米素为最好，曾经获得了畸形胚状体幼苗。此外，添加适量的 YE 和 Met 对愈伤组织的发育是有益处的；光照与否对愈伤组织的生长无差异。这部分结果与黄记生等（1981b）在苎麻下胚轴上报道的相类似。⑤对于体细胞胚胎发生困难的植物通过农杆菌介导的方法引入T-DNA的部分基因，以改变其激素水平，如编码吲哚乙酸的基因1, 2, 编码细胞分裂素的基因4，将可能对苎麻胚胎发生的研究提供一种新的手段。这方面已有成功地将Ti质粒的基因1, 2引入胶烟草细胞，使转化细胞不经激素诱导直接通过胚胎途径再生植株的报道（刘春明等，1990）。我们曾通过农杆菌转导方法很容易地使苎麻叶片产生毛状根和转化愈伤组织，但由于杀菌问题比较困难，研究有待继续进行。

三、关于苎麻人工种子的制备技术

虽然可以通过组织培养快速繁殖的方法加快苎麻繁殖速度，缩短育种周期，但试管苗技术必须经过不定芽诱导、根系诱导等多次转移继代及室外炼苗等过程，需要大量的人力和物力，且粘连在一起的试管苗不能分割，而人工种子技术仅利用茎尖或带芽茎段为包埋材料，即使是连接在一起而不能分割的试管苗，也能获得大量的包埋材料，因此其繁殖速度更快（是试管苗的5.92倍），且一经包埋可直接进行大田播种，无需根系诱导和室外炼苗过程。所以在这点上，人工种子技术优越于试管苗技术，开展苎麻不定芽人工种子的研究是很有必要的，在苎麻生产上有一定的意义。

本文以苎麻不定芽为材料进行了海藻酸钠包埋,其结果表明:在无菌培养基条件下能获得100%的发芽,100%的生根,且比裸露的不定芽发芽率、生根率更高;有菌土壤条件下也能获得15.3%的发芽率和8.2%的转换率;经贮藏4个月后仍有25%的发芽。因此可以说海藻酸钠包埋体系对于苎麻来说也是合适的,其研究结果对于不定芽人五种子及胚状体人五种子的研究具有一定的参考价值。

人五胚乳为包埋材料提供营养,不同的作物要求不同的人五胚乳成分。本文研究表明,人五胚乳成分对苎麻人五种子的发芽影响很大,其中以无机盐、碳源、生长调节物质影响最大。在试验的6种人五胚乳中以附加 0.06 mg/L NAA的1/2MS为最合适。在1/4MS培养基中100%能转换成植株健壮、根系齐全的幼苗;在湿润滤纸上71%能发芽,29%能生根;在有菌土壤中15.3%能发芽,8.2%能生根。但对胚状体人五种子转换率有促进作用的麦芽糖(Redenbaugh, 1987b)不适合于苎麻不定芽人五种子的发芽生长,其原因何在仍有待进一步研究。

目前广泛使用的海藻酸钠包埋系统由于含有蔗糖等营养物质,很容易受细菌、霉菌等微生物的污染,从而使得人五种子还未来得及发芽就腐烂(李修庆等,1990;张天宏等,1990)。因此,为了达到有菌土壤中发芽成苗的目的必须防止人五种子的腐烂,才能使人五种子技术应用到生产中去。本文在这方面进行了一些研究,认为100u/ml医用青霉素和0.1%CTM⁺能在一定程度上抑制微生物的生长,从而使得部分人五种子能在有菌沙石肥土中发芽生长。下一步的工作是如何进一步提高最后的成株率。这是否可以通过基因工程技术来解决,值得研究。因为杨美珠等(1993)报道的转基因马铃薯人五种子在未灭菌的蛭石土中发芽率达91%,成苗率达89%。

四、低温和液体石蜡在苎麻人工种子贮藏中的作用

农业生产的季节性要求人五种子耐贮藏,而贮藏一直是人五种子研究的热点和难点之一。目前报道的贮藏方法主要有低温法(Redenbaugh et al., 1987b)、干燥法(Gray et al., 1987)、抑制剂法(刘凡等,1991)、液体石

蜡法(羊浩等,1989)及多种方法的结合法(王韵等,1990;陈德富等,1990),其中低温法被认为是人五种子贮藏的较好方法(Redenbaugh et al.,1987;黄上志等,1992)。但本研究表明单用低温方法贮藏人五种子虽然能有效地抑制贮藏期间的萌发而达到贮藏的目的,但贮藏后的发芽率明显降低,表现明显的低温逆境效应,且人五种子种球易失水变干。所以我们认为单用低温贮藏人五种子并不是一种较好的贮藏方法。

由于液体石蜡含有比水更高的含氧量(Rodnight,1954),因此较高温度下浸于其中的人五种子在有种皮供应养分和水分条件下,能够发芽生长,如果贮藏时间较短,其生长量不大,外观难以察觉,加之播种后又能正常发芽,因此被人们错误地认为达到了贮藏效果。小苍兰小球茎人五种子即是如此(羊浩等,1989)。但因此就认为液体石蜡贮藏人五种子是一种较易掌握又经济,在节约能源,延长贮藏期等方面具有潜在意义的一种方法似乎过于草率。因为随着贮藏时间的延长,人五种子必然会发芽突破种皮,而一旦发芽就不能称为贮藏。另外由于液体石蜡为惰性物质,不易溶解和释放人五种子呼吸产生的 CO_2 (Kuble,1927),因此人五种子在液体石蜡中发芽后其幼苗将面临两个问题:人五种子小球内有限养料消耗完后的补给问题和人五种子呼吸产生的 CO_2 排放问题,从而导致人五种子所处环境将愈来愈恶劣,因而出现本试验所表现的人五种子幼苗生长畸形(未见真叶,无根,生长缓慢)和随着贮藏时间的延长而出现幼苗坏死现象,因此贮藏后取出发芽其发芽率低。所以说单靠液体石蜡浸泡方法仅能贮藏人五种子较短时间,不能进行长时间贮藏。

低温与液体石蜡相结合能很好地贮藏人五种子。在本实验条件下贮藏120d后仍有86%的发芽率和6%的生根率。这可能是因为很好地利用了它们的互补性,即利用了液体石蜡保水防干特性和低温对发芽的抑制特性。因此表现为既能防止种球失水变干,又能抑制人五种子萌发,达到长时间贮藏的目的。但对于不同的贮藏期要求,应选择不同的贮藏温度。本研究表明,贮藏1-2个月,宜采用较低的室温(10℃以下),但贮藏4个月则宜采用冰箱温度。

参 考 文 献

- 王树文, 周仁, 王培强, 小麦胚性细胞系的建立及原生质体的培养, 作物杂志, 1989, 3: 26-28
- 王树, 李修氏, 干燥、液体石蜡与2℃低温相结合贮藏胡萝卜人工种子(简报), 见: 李修氏主编, 植物人工种子研究, 北京: 北京大学出版社, 1990, 91-93
- 刘元, 曾海氏, 李修氏, 胡萝卜人工种子在无菌条件下的贮藏及贮藏中种子活力变化的研究, 实验生物学报, 1991, 24(2): 99-107
- 王树, 周海氏, 植物组织培养发生及其细胞组织学研究, 植物学报, 1991, 37(5): 378-384
- 刘世明, 刘海氏, 刘元, 蔡, Y: 启动的基因1, 2对胡萝卜体细胞胚发生的诱导作用, 实验生物学报, 1991, 24(1): 1-8
- 王树, 刘元, 周海氏, 液体石蜡贮藏小苍兰人工种子的试验初报, 北京林业大学学报, 1989, 11(4): 145-148
- 王树, 王正华, 桑建利等, 冬小麦幼胚外植体的植株再生和无性系变异, 见: 植物细胞工程应用研究, 新世界, 北京: 世界期刊出版社, 1989, 1-5
- 王树, 植物组织培养中的胚状体, 遗传学报, 1978, 5(1): 79-87
- 陈正华, 木本植物组织学与细胞学观察技术, 见: 陈正华主编, 木本植物组织培养及其应用, 北京: 高等教育出版社, 1986, 82-83
- 陈正华, 施德光, 木本植物人工种子的特殊问题及其应用前景, 见: 陈正华, Keith Redenbaugh主编, 人工种子, 北京: 高等教育出版社, 1990, 69-86
- 陈正华, 李淑君, Trullinger M.等, 棉花细胞悬浮培养胚胎发生和植株再生某些特性的研究, 中国农学科学, 1987, 20(5): 6-11
- 陈正华, 陈德富, 人工种子的应用前景, 世界农业, 1991, (6): 21-23
- 陈正华, 陈德富, 周冲平等, 植物组织培养与原生质体培养, 作物研究, 1994, 8(增刊): 85-88
- 陈正华, 曾海氏, 李修氏, 低温与液体石蜡相结合贮藏胡萝卜人工种子的研究, 见: 李修氏主编, 植物人工种子研究, 北京: 北京大学出版社, 1990, 103-107
- 王树, 曾海氏, 王正华, 根芽体细胞产量与质量的研究, 植物学报, 1991, 37(1): 26-31
- 王树, 陈德富, 李淑君, 人工种子研究进展及其应用展望, 种子, 1993, (2): 42-48
- 何乐林, 曹海, T-DNA转化后的直接再生, 生物工程学报, 1990, 6(2): 120-125
- 王树, 陈正华, 木本植物原生质体培养及融合, 见: 陈正华主编, 木本植物组织培养及其应用, 北京: 高等教育出版社, 1986, 110-140
- 李良材, 陈一明, 陈英, 水稻原生质体及植株再生的研究, 遗传学报, 1988, 15(5): 321-328
- 李修氏, 植物的生理生化与遗传育种, 北京: 农业出版社, 1989
- 李树川, 植物组织低温保存技术研究, 中国麻作, 1992, (1): 7-11

- 和工人工种子概论,见:李修庆主编,植物人工种子研究,北京:北京大学出版社,1990,1-16
- 李修庆,邢家强,胡萝卜人工种子的制作流程以及在有菌土壤中的发芽或苗,见:李修庆主编,植物人工种子研究,北京:北京大学出版社,1990,52-58
- 李国明,吴敬宇,王海波等,棉花(*Gossypium hirsutum* L.)原生质体培养的体细胞胚胎发生及植株再生,江苏农业学报,1989,5(4):51-60
- 李国明,李修庆,邢家强等,胡萝卜人工种子外膜及胚腔腔的研究,见:李修庆主编,植物人工种子研究,北京:北京大学出版社,1990,41-47
- 李国明,王天泽,李修庆等,转基因马铃薯人工种子的研究,见:陈章良主编,植物基因工程研究,北京:北京农业大学出版社,1993,404-406
- 李国明,李国建,徐国生,苧麻组织培养简报,中国麻作,1980,(1):31-32
- 李国建,徐国生,苧麻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,1983,9(1):299-307
- 李国建,植物体细胞在组织培养中产生的胚状体,Ⅱ.影响植物胚状体发生的因素,植物生理学报,1982,8(1):91-99
- 邢家强,苧麻试管苗离体叶面生芽的细胞学观察,作物学报,1991,17(3):182-187
- 赵庆华,陈昌彦,潘昌立等,苧麻叶片组织培养的研究,中国麻作,1984,(4):9-12
- 李国建,植物体细胞胚胎发生和人工种子的研究,见:郭作琛,桂耀林主编,植物体细胞胚胎发生和人工种子,北京:科学出版社,1990,1-8
- 李国建,曹记生,苧麻组织培养再生植株的研究,植物生理学通讯,1981,(1):52-53
- 李国建,曹记生,植物激素对苧麻茎、叶外植体器官分化的影响,植物生理学通讯,1982,(3):38-41
- 曹记生,潘家强,董家成等,苜蓿(*Medicago sativa* L.)体细胞胚胎发生与成苗的研究,Ⅱ.人工种子形成和种植,中山大学学报(自然科学版),1992,31(2):86-92
- 曹记生,吴崇志,苧麻子叶及下部幼叶诱导再生植株研究简报,广西农业科学,1990,7:27
- 曹记生,吴崇志,苧麻组织培养快速繁殖试验,广西农业科学,1989a,(2):18-17
- 曹记生,吴崇志,苧麻下胚轴组织培养的组织形成,实验生物学报,1989b,(2):111-114
- 曹记生,刘永仁,植物离体体细胞胚胎发生,植物生理学通讯,1988,(1):9-15
- 曹记生,刘永仁,杨进清等,玉米原生质体培养再生,植物学报,1987,29:453-458
- 曹记生,赵庆华,胡朝金等,用组织培养法快速繁殖苧麻良种,中国麻作,1981,(3):28-31
- 曹记生,赵庆华,胡朝金,苧麻组织培养及其在快速繁殖上的应用,中国农业科学,1982a,(2):1-8
- 曹记生,赵庆华,胡朝金等,组织培养法快速繁殖苧麻良种,湖南农业科学,1982b,(1):21-24
- 曹记生,曹利华,苧麻花药培养研究初报,上海农业科技,1986,(4):13-17
- 曹利华,曹利华,陈瑞卿等,组织培养法应用于苧麻快速繁殖,上海农业学报,1988,4:17-20
- 曹利华,曹利华,陈瑞卿等,组织培养法应用于苧麻快速繁殖,上海农业学报,1988,4:17-20

植物生理学科学通报, 1990, (3): 271-274

- Tomarato PV. Embryonests. In: Evans DA et al. (ed), Handbook of Plant Cell Culture, 1. Techniques for propagation and breeding, Macmillan Publ, 1983, 82-125
- Waggoner GB, Hamilton WB. Plant regeneration from callus tissues of *Gossypium hirsutum* L. Plant Sci Lett. 1983, 32:89-93
- Wolberg ME, Meier RA, Olson K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res. 1968, 50:151-158
- Younis DI, Conger BV, Songstad DD. Desiccated quiescent somatic embryos of orchardgrass for use as synthetic seeds. In Vitro Cell Dev Biol. 1987, 23(1):29-33
- Yoshida K, Harrison J. Ann Rev Plant Physiol. 1987, 18: 325-348
- Zhu J, EM. Embryogenesis in tissue culture. In colloques internationaux du CNRS, 193, Les cultures de tissu de plantes, 1971, 26-280, 植物生理生化译丛, 科学出版社, 1976, 2: 151-162
- Kanada H. Artificial seed. In: Tanaka R (ed). Practical Technology on the Mass Production of Clonal Plants. Tokyo: CNC Publisher, 1985, 48-51
- Arizumi AB, Connor SAO, Fitter MS. Chromosome number variation and karyotype stability in cultures and culture-derived plants. In: Evans DA et al (ed). Handbook of Plant Cell Culture. New York: Macmillan Publishing Co., 1983, 1: 541-581
- Leibowitz. The solubility of O_2 , CO_2 , N_2 in mineral oil and the transfer of CO_2 from oil to air. J Biol Chem. 1927, 72: 545-548
- Levin RA, Snowcroft AR. Somatic variation--a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor Appl Genet. 1981, 60: 179-183
- Merzlyagina T, Skoog P. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant. 1962, 15: 473-479
- Murashige I. The impact of plant tissue culture on agriculture. In: Thope I (ed). Frontiers of Plant Tissue Culture. Calgary, Canada: University of Calgary Press, 1978, 15-26
- Redenbaugh K, Paasch BD, Nichol JW et al. Somatic seeds: encapsulation of asexual plant embryos. Bio/Tech. 1988, 4(9): 797-801
- Redenbaugh K, Slade D, Viss P et al. Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. HortScience. 1987a, 22(5): 803-809
- Redenbaugh K, Viss P, Slade D et al. Scale up: artificial seeds. In Green CE et al (ed). Plant Tissue and Cell Culture. New York: Alan R. Liss, Inc., 1987b, 473-493

1. G. L. S. Gopal VPS, Zheji B. Aspects of organization--organogenesis, embryogenesis and redifferentiation. In: Street (ed), Plant Tissue and Cell Culture, 1978,389-9,7
2. Jones CA, Jones BS and Kady AS. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic maize cell culture. Bio/technology, 1986, 6:59-60
3. Loughton P. Manometric determination of the solubility of oxygen in liquid paraffin, nitrocell and silicone fluids. Biochem J, 1954, 57:661-663
4. Schanz G, Hildebrandt. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledons and dicotyledons cell cultures. Can J Bot, 1972, 50:199-204
5. Edward FL,Mapes MU,Mears K. Growth and organized development of cultured cells.II. Organization in cultures grown from freely suspended cells.Amer J Bot, 1958, 45: 700-709
6. Yang TB, DeLize D. In: Panopoulos NJ (ed). Genetic Engineering in the plant sciences. Praeger Publisher, 1981, 11-23
7. Yang TB, Okimoto R. Embryonic proteins in somatic embryos of carrots. Proc Natl Acad Sci USA, 1981, 78:3683-3687
8. Yang TB, Okimoto R. Condinate gene expression during somatic embryogenesis. Natl Acad Sci USA, 1982, 79:2861-2865
9. Okamoto R, Yang TB, Murashige T. Somatic embryogenesis in angiosperms. Hort Dev, 1979, 1:1-22

STUDIES ON PREPARATION TECHNIQUE OF RAMIE ARTIFICIAL SEED

Chen Defu

ABSTRACTS

Ramie (*Boehmeria nivea*), or "China Grass", is an important textile material in China. Somatic embryogenesis and artificial seed, being important basic technique in shortening breeding period and fastening popularization of fine varieties, has been attached extensive attention, but are still no report in ramie. For the first time, the paper has used ramie as material and had a preliminary study on somatic embryogenesis and preparation technique of artificial seed with adventitious buds. The main results are as follows:

1. Thirty-one varieties were used to induce calli and callus polymorphism were studied. To induce calli, cotyledon and hypocotyl are suitable explants; CXW medium which contains high potassium, phosphorus, nitrate-nitrogen, inositol, thiamine, but low calcium, ammonia-nitrogen is needed; Glucose is a suitable carbon source; Hormone combination is 0.5 mg/L CPA (or 2,4-D) and 0.05 mg/L BR; Temperature is 28 degrees centigrade. And it has been found the great variation in callus polymorphism, from which clones that have the potency to produce embryo can be chosen. Calli from "Chengbu Qingma" and "Liuyang Dayelu" are relatively little polymorphism. They are yellow or grey-green, loose, medium-grown and with granular spot. They are mainly composed of small, rounded, wall-thinned and cytoplasmic cells.

2. The subculture and differentiation of calli were studied. The callus polymorphism also exists when subcultured but relatively little when subcultured on CXW medium containing 0.1 mg/L CPA, 0.5 mg/L NAA, 1.5 mg/L ZT. Also some abnormal plantlet were obtained which developed from somatic embryo when subcultured on CXW medium containing 0.1 mg/L CPA, 0.5

mg/L NAA, 1.5 mg/L ZT, 2.0 mg/L Met. But the experiment can't be repeated.

3. The cotyledons of "Xiangzhu No 3" can be induced directly to regenerate 20.8% adventitious buds on MSB medium containing 2.5 mg/L BA. The buds were subcultured to 1/2 MS medium containing 0.05 mg/L NAA, then whole plantlets were formed. Encapsulation of their meristems and stems with buds can produce 5.92 (reproduction efficiency) artificial seeds.

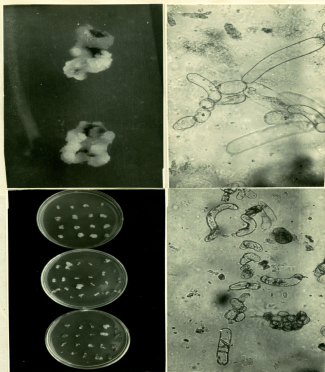
4. The preparation technique of ramie artificial seeds were studied.

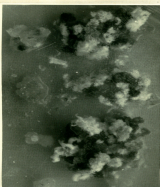
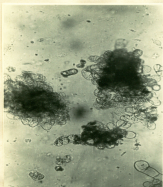
(1) 4% alginate is suitable for encapsulation. Ramie artificial seeds, which have a endosperm of 1/2 MS medium containing 0.05 mg/L NAA, when cultured on 1/4 MS medium, 100% germinated and 100% rooted; while on sterilized filter paper, 71% germinated and 28% rooted.

(2) Nonsterile germination of artificial seeds were studied. 150 µg/ml penicillin and 0.1% CTM, when added to the endosperm in nonsterile condition, have some inhibitory effect on growth of microbes. These seeds, when sowed on sand-garden soil which chemically sterilized with 5% formaldehyde, 15.3% germinated and 8.2% rooted 30 days later.

(3) The storage of ramie bud artificial seeds were studied. Only low temperature or liquid paraffin can't store artificial seeds for a long time. The combination of them have a better effect on storage. The artificial seeds still have 25% germination and 5% rooting-rate on sterile condition after 120 days storage. Because they are mutually complementary, either to inhibit the seeds to dry, or to check the germination.

Key words: Ramie; Embryogenesis; Adventitious bud; Artificial seed; Cotyledon and hypocotyl





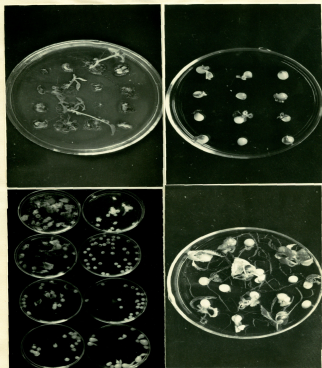




图 版 说 明

图 版 I

- | | | |
|---------------------------------------|---|---|
| 1. 子叶伤口和边缘处产生愈伤组织 | 1 | 3 |
| 2. 不同外植体上产生的愈伤组织
(自上至下: 子叶、下胚轴、叶片) | 2 | 4 |
| 3. 稀泥状愈伤组织的细胞结构 | | |
| 4. 松软块状愈伤组织的细胞结构 | | |

Plate I

1. Calli induced from the wounded and edge of cotyledon
2. Calli derived from various explants
(From up to down: cotyledon, hypocotyl, leaf)
3. Cell structure of scattered calli
4. Cell structure of loosed calli tuber

图 版 II

- | | | |
|-------------------|---|---|
| 5. 松散颗粒状愈伤组织的细胞结构 | 5 | 7 |
| 6. 即将分化的松散颗粒状愈伤组织 | | |
| 7. 愈伤组织上分化胚状体 | 6 | 8 |
| 8. 畸形胚状体幼苗 | | |

Plate II

5. Cell structure of loosed, granulated calli
6. Loosed, granulated calli which will soon be differentiated
7. Embryos differentiated from calli
8. Abnormal embryo seedlings

图 版 III

9. 子叶直接再生出不定芽
10. 不同浓度胶的成球情况
(自上而下, 自左至右浓度分别为
1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 4%, 5%, 6%)
11. 无菌培养基上人工种子的发芽
12. 人工种子的发芽生根

9	11
10	12

Plate III

9. Adventitious buds directly regenerated from cotyledon
10. Ability to turn round of various concentration alginate
(From up to down, from left to right, concentration is
1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 4%, 5%, 6%)
11. Artificial seeds germinated on sterilized media
12. Artificial seeds germinated and rooted

图 版 IV

13. 无菌培养基上发育而成的健壮人工种子幼苗
14. 有菌土壤中刚发芽的人工种子
15. 有菌土壤中生长的健壮人工种子幼苗
16. 不同温度条件下浸泡液体石蜡贮藏120d的人工种子
(自上至下: 2℃ 低温、冬季室温)

13	15
14	16

Plate IV

13. Robust seedling of artificial seed on sterilized media
14. Artificial seeds germinated on nonsterile soil
15. Robust seedling of artificial seed on nonsterile soil
16. Artificial seeds after stored 120d in liquid paraffin under
various temperature (From up to down: 2℃ low
temperature, room temperature in winter)