

国外作物组织培养

6

上海农科院作物所体细胞培养和杂交组

一九八〇年五月

Q942

中国科学院图书馆

PDG

目 录

1. 试管育种的选择法	1
2. 菠萝组织培养分化植株的变异	10
3. 红花三叶草愈伤组织的植株再生	22
4. 细胞融合育成烟草与黄花烟草体细胞杂种	37
5. 细胞融合育成烟草与粉兰烟草及花烟草体细胞杂种	44
6. 用花药培养获得单倍体植株	51
7. 几种生长激素类物质对莖芽胚轴组织形成不定芽的影响	58
8. 2,4-D 和激动素对莖芽胚轴形成不定芽的影响	66
9. 非洲紫罗兰叶柄切段在试管里繁殖植株的技术	72
10. 用电刺激诱导植物原生质体融合	76
11. 重要作物原生质体植株的再生问题	78
12. 禾谷类作物原生质体的分离和培养	79
13. 芸苔属重要作物原生质体的再生和融合	80
14. 用原生质体融合获得的拟南芥和甘蓝油菜的杂种植物	81
15. 用体细胞杂交方法再合成甘蓝油菜的试验	82

试管育种的选择法

大野清春

育种方法开始是系统选择法，以后有杂交育种法，杂种优势利用，多倍体育种，人工诱发突变育种等，育种技术不断发展，育种效率也不断提高。育种过程，大致可分为诱发变异，选择，固定，繁殖，保存等五个阶段。利用组织培养，也有可能缩短这些阶段的时间，提高育种效率，如育成无病毒苗，快速繁殖品种和品系，花药培养育成纯系等已应用于好几种作物。但是，利用组织培养在育种上作为变异的扩大或诱发变异以及特定变异的选择方法，则是由70年代才开始的。已证实主要植物细胞全能性，即能从培养细胞（单细胞或愈伤组织）再生成完整的植株。在这些再生植株中，也明显产生了极多的变异个体。同时，在培养细胞中所选择的细胞性状，可以从它再生成完整植株上得到反映和证实，然后再从这些相关关系中有目的地选择培养细胞。关于利用培养细胞进行特定性状选择的综述极多，这里主要从育种角度出发，谈谈培养细胞诱发突变和选择的各种问题。

(一) 诱发突变

关于诱发突变，选择个体育种FAO/IARA组织曾作过汇总，世界各国有39种作物上已育成3136个品种，这充分说明突变育种的重要性。突变育种的主要问题，是变异方向不定。为此原因，必须要用大量的素材，及连续照射等长时间的辐照处理，以便获得大量的变异株。

从细胞水平进行诱发突变和选择的试管育种，由于能做到高效的诱发突变，以及宜于控制培养条件，因而特定性状的突变细胞的累积将成为可能，这样就克服了原来突变育种存在的主要问题。但为了能在实践上得到应用，还必须查明选择细胞与再生植株性状之间的联系。

从培养细胞诱发突变，主要应用诱变剂。例如，应用EMS获得

烟草的甲硫基旦氨酸磺基脲抗性，使用 MNNG 获得大豆的 5-溴脱氧尿核甙抗性以及烟草的苏氨酸抗性，用 MNNU 获得烟草的硝酸盐还原酶缺失系统，用 X 射线获得 *Datura innoxia* (曼陀罗属) 色素变异体或用 UV 获得对赖氨酸的抗性等诸多报告。用上述诱变剂，对培养细胞进行处理，本质上与一般用种子或植株进行诱变处理没有差异。当然，不使用诱变剂处理选择突变体也有很多报告。

培养细胞的染色体数，已知变异范围极广。图 1 是用花药培养获得的水稻 ($2n=24$) 花粉愈伤组织染色体数的变异，最高的染色体数可达 114。即使是从愈伤组织再生完整植株的染色体数，也出现了范围极广的染色体数变异。例如在甘蔗上获得了 $2n=94-120$ 范围染色体数变异植株。同时，在烟草上也有报告出现了叶的形态，花器等异常个体。

不仅是染色体，即使是基因水平，也出现有明显的变异。作者曾对由 75 粒水稻种子 (单倍体加倍系统) 起源愈伤组织中获得 1121 株个体，分析了当代 (D_1) 与后代 (D_2 、 D_3) 的变异情况。438 个穗行 D_2 系统中，有 34 个系统出现了各种不同的叶绿体突变体。出现的频率，接近用 X 射线处理种子诱变所发生的最高频率。调查 762 个 D_2 系统的种子育性、株高、抽穗日期、形态、叶绿体突变的结果，5 个性状均正常，仅占 28.1%，而 28.0% 保持 2 个性状的重复变异 (表 2)。在 D_3 中，获得的农业上有用的性状，主要是早熟和不同程度的矮秆突变体 (单基因隐性)。如果用放射线连续照射培养中的愈伤组织，则诱发变异的频率更高。

在黑麦草，新的变异体用试管培养法获得成功。从黑麦草和多花黑麦草杂种 ($2n=3x=21$) 发育不全的 3 倍体胚得到的一块愈伤组织，5 年内共获得 2000 个植株的再生。这些植株，最初再生的大多是三倍体的，以后再生的逐渐出现了染色体数和染色体结构的变异体，例如 $2n=20, 18, 19, 15, 30$ 等。同时，减数分裂时通过染色体观察，还发现染色体出现了互换和缺失。看到植株有叶的形态、大小、花的发育、生长力、生存力和多年生等范围极广的变异，还获得了用通常杂交方法不能获得的染色体互换的某些个体。并发现后代也有同样的广泛变异。

营养繁殖的菠萝，后代虽不易鉴定，但也有报告指出获得了极多的变异体，通过形态观察，发现有叶浓绿、蜡质厚、叶密生和叶细等多种变异。

以上所示，通过组织培养，发生了染色体、染色体数和结构、基因和细胞质（参看表3）等各种变异。为了在培养过程中获得更多的变异，有必要配合用射线和诱变剂进行处理。

（二）变异体的选择

突变细胞作为用于植物生理、生物化学或遗传上的研究材料是十分有用的，且在原生质体融合选择体细胞杂种过程中，作为杂种细胞的识别和选择，也是可贵的材料。更进一步说，进行离体诱发突变和选择的技术是育种的关键，因此对于那些突变频率极低的性状还能通过积累以获得高效的选择。

（1）方法

培养细胞的选择，可以通过突变细胞和其它细胞的可见差异和生长差异等进行选择，或控制培养条件进行筛选。作为可以控制的条件，有温度、光照、光强和波长、渗透压、气压及大气组成等物理因素，以及无机盐类和生长调节物质的种类和浓度，或代谢产物和它的衍生物，诱变剂等添加培养基的 PH 等化学因素。根据培养细胞对某些物质的吸收和释放、细胞的培养密度、细胞的互相接触和竞争、其它微生物和培养细胞的共生等生物因素也是可以控制。田端已经研究培养条件对二次代谢产物的生产的效果。然而另一方面，通过细胞水平选择的细胞，和细胞再生植株的性状之间，是否有性状之间相关呢，通过研究，基本一致，但也有特殊的例外。对于这些问题，今后在对代谢等生物化学研究的同时，在组织学上，必须作进一步阐明，这对应用于育种是十分重要的。

（2）愈伤组织和单细胞

采用组织培养选择变异体，利用单细胞或愈伤组织均可进行。如利用单细胞，可应用平板技术等微生物的手段，但必须选用生理上或遗传上均匀一致的细胞，才认为是好的方法。单细胞，应用悬

浮培养，原生质体和花粉培养系也可获得。

悬浮培养作为细胞的选择法是目前常用的方法，在烟草、胡萝卜、大豆等均已选择获得对某些药剂有抵抗性的细胞。原生质体可从叶肉细胞等制备获得大量的均质单细胞，即使用单倍性和多倍性的细胞也可以任意制备取得，优点很多。用烟草的原生质体，已有报告获得了对甲硫基胆氨酸磺基脲抗性的变异体，以及对缬氨酸抗性的植株。花粉是天然的单细胞，一般同步性高，培养花粉母细胞也可用于减数分裂的生物化学研究。培养烟草、玉米、水稻单核靠边期的花粉，从成功诱导愈伤组织中看来也可以进行选择。不仅纯系个体的花粉，而且是基因型不同的杂种花粉，培养后均可作为选择单细胞变异体，最终成为细胞株的材料。

如果悬浮培养技术尚未建立，也可以进行愈伤组织选择。这种方法，在烟草对5-溴脱氧尿嘧啶抗性和玉米对*Helminthosporium*毒素抗性细胞选择的报告中已有报道。用愈伤组织作材料进行选择，突变细胞混在一起的可能性极大，因而再生获得的植株也有可能是非突变植株，有的甚至可能出现嵌合体。

(3) 多倍性

通过花药培养，已成功地获得50种以上植物的单倍体，天然单倍体的花药培养也有很多成功的例子。因此选择单倍体培养细胞已成为可能。水稻花药培养由于比较容易获得隐性突变的矮秆变异体，因此用单倍性细胞选择隐性变异体有很多优点。应用单倍性细胞选择成功例子是烟草的抗甲硫基胆氨酸磺基脲性和抗链霉素(*Streptomycin*)性。

使用二倍体的成功例子尚有烟草的抗*Picloram*性和玉米的抗*Helminthosporium*性，选择出有显性、半显性的变异性状。获得的二倍体进行植物体的遗传研究，一般不要加倍处理，同时也不会发生在单倍体中常常出现的致死突变和互换等。但是，单倍体和二倍体对于人工选择的反应是不同的，例如单倍体和二倍体的原生质体，对于因诱变剂而进行人工选择的存活率有很大差异，*Datura innoxia* (曼陀罗属)和矮牵牛的单倍体和二倍体原生质体，进行X射线和MNNG处理时，单倍体的存活率极少，相反二倍

体的原生质体即使在高剂量和高浓度情况下也有极高的存活率。选择变异细胞，应分阶段进行选择好呢，还是一次进行致死范围的选择好，以及选择的性状与诱发突变频率之间的相互关系，都是今后重要的研究课题。

(4) 规模

用 γ 射线处理优质、高产、耐冷、抗病的水稻品种藤稔（农林125号），育成抗病新品种黎明，是从 M_1 1000单株、 M_2 25000单株后代中育成的。同时，具有优质强秆系统的北陆100号，用 γ 射线处理了20万粒的 M_1 ，再从 M_2 8万个单株中选育而成的。处理这些植株数与相同程度的细胞（ 10^5 — 10^7 ）看来是必要的规模，用适当的人工选择，大概可以更容易获得优异的变异体。但另一方面，目前的主要问题是选择的细胞必须确保能够做到植株再生。

(三) 实用性状的选择

在细胞水平上从培养细胞中进行性状的选择，有较多研究报告。但是，植株再生，并进行基因分析的成功例子为数极少。培养细胞由于一般是后天变化多，所以极易适应不同的培养条件继续不断的增殖。对于某种药剂的抗性，也不过是种种机遇获得，从育种角度出发，研究确定是遗传的变异以及其它变异的有无则更为重要。

(1) 产量

甘蔗的组织培养，在不进行任何选择的情况下，有人曾对再生植株的产量进行了研究。绝大多数再生植株表现有各种形态变异和染色体数的变异，从114个系统得到的植株，染色体数出现有 $2n=86$ ~ 126 的不同变异。产量的试验结果，从编号F164中获得的再生植株70—6132系统，甘蔗产量增产32%，糖的产量增加34%。并从中选择获得了高糖含量的系统，其中71—4829系统，平均糖含量为14.02%，而亲本的含糖量仅12.13%。甘蔗是营养繁殖作物，所以利用选择变异体是十分有效的育种手段。

但必须指出，目前的研究状况不过是刚刚开始，如果改变作物

的生物合成过程，那可望获得更大的高产。玉米和甘蔗等 C₄ 作物比水稻和小麦等 C₃ 作物具有更高的合成效率。C₄ 作物在利用太阳光能固定二氧化碳的同时，由于光呼吸必然也会释放出多量的二氧化碳。选择阻碍光呼吸的突变体，在烟草上曾进行了试验，即用烟草的单倍体细胞，为获得葡萄糖代谢支路的变异体，选择得到了对 INH 抗性的系统。20 个抗性系统中，有 10 个系统再生获得了植株。从再生植株再诱导出愈伤组织，也是对 INH 抗性的。后代的 INH 抗性与光呼吸的关系，正在继续研究。

(2) 抗病性

抗病变异体，也可用突变来选择，二稜大麦的种子，用 γ 射线乙撑亚胺进行处理，从 120 万个 M₂ 代中，选择获得了 7 个系统的抗性突变。其中有 4 个系统是单基因隐性变异。

用组织培养进行选择抗病变异体，由于绝大多数的培养组织与植株对病菌的抗性反应相类似，故也看到有几个成功例子。甲硫基旦氨酸磺基脲在大理花上不出现毒害，但烟草感染野火病出现的毒素与 *Pseudomonas tabaci* 相类似，并在烟草叶上出现与毒素相类似的反应。用 EMS 处理单倍体叶的原生质体以及培养的单细胞，从 2.7×10^7 个原生质中得到了 33 个对 MSO 抗性的愈伤组织，而从 1.9×10^7 个单细胞中得到了 19 块有抗性的愈伤组织。其中有 3 块愈伤组织表现稳定的抗性，因此分化出的植株通过对 F₂ 的分析，这种抗性是由半显性单基因以及累加作用二种因素造成的。

在甘蔗培养中，也选择获得了抗性的系统。甘蔗的 eyespot disease，因感染 *Helminthosporium Sacchari* 而出现毒素 Helminthosporoside，含有这种毒素的培养物用甲基丙烯酸甲酯，放射线处理，从 CP57-603 系统中，选择获得了抗性变异系统。并从 387 个细胞团中选择获得了 108 个有实用价值的抗性细胞团。但是，甘蔗在含有毒素的培养基中培养，不论选择与否，都会出现从感病到抗病的各种变异。同时，用含 5% 毒素的悬浮培养，在感病亲本中获得 27 个抗病细胞团。

玉米的细胞雄性不育 Texus，常感染大斑病菌 *Helminthosporium maydis* 的 T 系统，而正常细胞的却对该病菌抗性。Gen-

genbach等，用具有CmS-T基因型的胚诱导愈伤组织，从中得到了对毒素浓度逐渐增加抗性的细胞团。细胞团经4次选择获得植株仍均是感病的雄性不育，5次以后选择获得的植株已有抗性，从65个个体中有52个个体已回复育性。13个个体虽仍雄性不育，但与有CmS-T基因型的形态有异。这些抗性和恢复育性的性状属母性遗传。

不进行选择有时也有抗性变异体出现的情况。马铃薯如感染早期枯萎病，会产生Alternaria solani脂质样的两种毒素，造成叶的坏死病斑。Martens等通过对由叶肉原生质体获得的500个个体检定毒素抗性结果，出现有抗性的个体。这种对早期枯萎病出现的抗性，经数代营养繁殖后，表现有稳定的抗性。

甘蔗的F1j1病，因病毒在茎部组织大量繁殖，致使叶发育受阻。从感病的Pindar细胞团中分离出38个细胞团，其中有4个系统尽管在不同的栽培年份和地区，都表现稳定的抗性。抗病的Pindar 70-31，含糖量和产量也均名列前茅，成为有希望的系统。

稻热病是我国水稻的主要病害，在进行抗病育种时，有从国外水稻引入的抗性基因，或利用抗性地区等。用水稻培养细胞通过选择是否可以获得抗性品系呢，值得今后进一步研究。

(3) 品质

改变作物的品质，增加对人类有用的成分或减少对人类有害的成分，在育种上是十分重要的。例如抑制油菜脂肪酸合成系统中的油酸→甘(烷)酸系统，结果使有用的油酸、亚油酸积累，育成了无介酸的新品种。同时，也出现了高赖氨酸的玉米Oparque-2突变体，以及赖氨酸含量高20-30%的Hiproly大麦新系统。诱发代谢突变，虽是可能的工作，但选择必须通过大量的分析才能确定，因此化费劳力极多。显然，通过培养改变培养条件选择代谢变异体，效率一定将大大提高。

从培养细胞水平选择改变细胞成份有好多报告，如烟草的MSO抗性植株，增加了叶的旦氨酸含量。同时，高等植物赖氨酸的生物合成有它的自动控制，所以通过选择自动控制的突变体，获得了作

为类似赖氨酸的 SAEC 抗性细胞。水稻的细胞团用 EMS 处理，培养 10 天以后再 2 m M SAEC 处理。这个浓度是杀死野性型细胞的浓度。从中选出的 3 个抗性系统获得了植株再生。培养组织的氨基酸含量达 12.9—26.0%，总蛋白质增加 1.6—23.7%。

在烟草上，也得到了对 5MT 有抗性的系统。这些系统因色氨酸与 5MT 的自动抑制，相反氨基酸合成反应性低，因此发现增加许多游离的色氨酸。再生植株的叶，再次诱导出培养组织，也对 5MT 有抗性，并发现酶的变化，色氨酸增加，但植株叶本身酶活性没有变化。

(4) 对除草剂、杀菌剂的抗性

如果作物对除草剂的选择性小，那么就能提高除草剂的效率。这对于抗性变异体作用机理的阐明、新药剂的开发都是有用的。atrazine 抗性变异体，在油菜上已有发现，并属于母性遗传。

在培养基中加入 asulan、atrazine、Propbam、2,4-D 等也选择获得了有抗性细胞。选择对除草剂的 4-氨基-3,5,6-三氯皮考啉酸抗性的烟草愈伤组织，并获得植株再生。抗性愈伤组织从 2.7×10^6 细胞得到 54 个系统。植株抗性状是单基因隐性。

(5) 对不良环境的抗性

在世界上，不良环境的土壤耕地有很大分布，耐盐性品种的育种是十分重要的。在烟草 *N. Sylvestris*、*capsicum annuum* 等上已获得对氯化钠有抗性的细胞团。作者在水稻耐盐性突变体选择上也曾进行了试验。将农林 8 号的愈伤组织在含有 1% 氯化钠的培养基中进行继代培养，获得了有抗性的 3 个系统。也进行再生植株，共获 72 个体。用种子育性不降低的 20 个系统在有 1% 氯化钠的条件下进行发芽试验，结果从一个愈伤组织系统获得的 3 个个体的后代表现有抗性，这种抗性在第 3 代仍很稳定，但目前尚未得到最后稳定的系统。

用愈伤组织选择对铝的抗性在蕃茄上已有报道。另外，耐低温的细胞团在 *N. Sylvestris* 上已经得到，但未有植株再生。

结 语

从育种角度大致谈了细胞选择的概况，但一般仅限于小规模进

行。作为问题的全能性的控制，细胞水平性状与再生植株性状之间的联系，哪些性状容易选择均看来尚有必要进行深入的研究。成熟期，种子育性、株高等都是一些在离体条件选择困难的性状，因此有考虑的必要。总之，培养试管选择，适当的诱发变异，以及特定变异的累积，还有高效的选择，都是育种上的重要技术。

参考文献 88 篇略。

赵庆华译自《组织培养》1979年5期。

菠萝组织培养的分化植株的变异

若 欲 晓

从菠萝的幼果实、裔芽、冠芽和腋芽的组织培养中定植了448株植株。检查这项技术在自交不亲和植株营养繁殖上两种可能价值。研究了在育种中非变异体的大规模生产和有用变异体的诱导，以及分化植株之间的变异。

在定植的植株中，发现了关于刺、叶色、叶面蜡分泌和叶密度的许多变异体。也有少数的窄叶或白条纹的叶变异体。在频率上发现了器官间的差异，和这些变异的分布方式。幼果和裔芽以高频率产生变异体，而冠芽和腋芽仅以低频率产生变异体。幼果变异体包括了叶子颜色、刺、蜡和叶密度等性状，但裔芽、冠芽和腋芽的变异体几乎仅限于刺性状。

根据现有发现，假若为了各自的目的，选择适当类型的器官，我们认为有可能采用组织培养方法进行非变异体幼苗的快速繁殖和有用变异体的诱导。

引 言

组织培养在植物育种上有若干价值，特别是估计到这个方法在植物营养繁殖的大规模生产和无病个体、变异个体的诱导上的作用。实际上组织培养方法应用在某些作物上，摆脱了感染病毒和进行大规模生产（Murashige 1974, Nishi 等 1974）。在这种情况下，与其说是变异体不如说是原有表现型的无性繁殖系。

关于不用诱变剂处理而通过组织培养在大规模生产个体中间是否发生变异的研究结果，已有的报道是彼此不同的（Holdgate (1977) 认为有变异，和Murashige (1974, 1977) 认为无变异）。这种不同可能是由于所用的材料和方法之间的差异引起的。按照组织培养的两个对立方向发展，建立具有原始表现型和产生变异体的无性繁殖系。看来对详细地分析变异体的类型，出现方式和培养条件是必要的。

作者在1978年报道了从自交不亲和种菠萝的培养组织诱导出大量再分化植株。本文是对实现大规模生产幼株的再分化植株之间变异体作一番分析，并研究把这种变异体应用到菠萝育种上的可能性。

材料和方法

以菠萝 (*Ananas Comosus* CL.) Merr., 品种 (Smooth Cayenn, Mitsubishi 系) 作为实验材料。所用的五个不体是热带农业研究中心 Okinawa 分部提供的。

材料和培养基的准备都是前文采用过的方法 (Wakasa 等 1978)。

A 和 B 两个系来自两个幼果，A 系是在含 2mg/l NAA 和 2mg/l BA 培养基产生的，随后在含 NAA ($0.2\text{--}10\text{mg/l}$) 和 BA ($0.1\text{--}10\text{mg/l}$) 上转移 7 次以上的团块状组织发生的。如有必要时，培养基中补充了 0.03mg/l GA₃。通过这些转移后，出现了一些分化的植物器官以及组织的大量增殖。在开始器官分化后，组织转移到仅补充 BA 的培养基上，然后转移到无激素培养基中 2—5 次。这种操作方法提高了苗分化。建立 A 系的再分化植株的时间为 1 年半或 1 年半以上。团块状组织的发生和生长为 4 个月，芽、叶、幼苗等器官的再分化为 5—9 个月，分化器官的发育为 6 个月以上。

B 系是从含 10mg/l NAA 和 1mg/l BA 培养基中形成的团块状组织上发生的，这个团块状组织的器官分化需要进行两次转移，首先移到含 2mg/l NAA 和 10mg/l BA 的培养基上，然后移植到含 1mg/l NAA 和 2mg/l BA 的培养基上。分化器官的生长，在补充 BA 的培养基中连续转移 2—3 次，然后在无激素培养基中栽培。以上过程的总持续时间为 12—13 个月。

C 系是从裔芽长出的团块状组织上发生的。D 系和 E 系来自冠芽，F—L 系来自吸根或裔芽的腋芽。团块组织都在补充 $1\text{--}2\text{mg/l}$ NAA 和 $1\text{--}2\text{mg/l}$ BA 的培养基上发生和生长，情况和前文一样。

在人工培养基上培养的持续时间如下：

C系（来自裔芽）： 9—14个月，经3—5次转移

D系和E系（来自冠芽）： 7个月，经3—4次转移

F到I系（来自腋芽）： 7—9个月，经3—4次转移

从三角瓶取出再分化幼苗，先移栽在含蛭石、砂和土混合物的瓶钵中，然后移栽到木箱土壤中，箱子保持在温室中14—22个月生长一年后，进行了这些植株的形态学观察和记载。

研究中涉及的表现型有叶色、叶表蜡分泌、叶密度、叶上的刺和白条纹的分布方式等。对于叶色变异植株，用下列方法进行叶绿素测定：从一株上取第17或第18叶250mg，在80%丙酮溶液中匀浆，在652nm光谱下用光电比色计测定叶绿素a和叶绿素b的含量。

有关以上性状的原有植株（属于组织培养的供体植物）表现型如下：

叶色： 暗绿

蜡分泌： 在温室中，叶表面复盖着白粉状蜡，

叶密度： 约36片叶，植株的叶展开直径约为1米和高50厘米

刺： 仅在接近叶顶端有一些刺（作为品系表现型的标志）

白条纹： 无斑叶

结 果

从三角瓶中移栽到瓶中的850株幼苗，有448株继续生长，对上述全部性状的研究仅取用了379株。

(1) 变异体性状

再分化植株的叶色表现有暗绿（原有表现型），绿、和黄绿。变异体表现型的绿色色调比原有表现型较淡。叶色易受营养条件和生长时期的影响，关于这一类，本试验无例外。例如，两种叶色变异体（绿和暗绿）的区别，在冬—春期间可用肉眼清楚地看得出来，但在夏季当植株旺盛生长时，则不明显。而黄绿类群同上面两类群

仍可区分，但是这个类群包括了由于根系不足而引起叶色变黄的一些植株。

每株菠萝的总叶数似乎受生长条件的影响。然而，在再分化植株中间，有一些变异体明显地呈密集的叶序。这种性状在成年植株上比在幼年植株上有更明显的表现。当植株 20 厘米高时，一些密叶变异植株的叶相当正常植株的叶 1.5 倍，而且在以后，便成为 2 倍。统计了同一生长条件下的 5 个正常植株和 10 个密叶变异植株的叶数分别为 37.2 ± 6.3 和 69.0 ± 14.9 。

再分化植株有几种长刺的方式：一种是仅在靠近叶尖长几个刺（这是品种的固有性状），另一种是沿叶的两端长许多刺，再一种是仅沿叶的一边长刺。等等。还有刺的大小、形状和排列的整齐度也有变异。

关于蜡的分泌，原有类型和变异体之间难以区分。幼年的和生长慢的植株一般趋向是蜡分泌少。所以蜡分泌性状作为变异体分类的一种指标目前仍有困难。

除上面已阐明的四个性状外，还有几个植株的叶宽度只有正常叶的一半，这个类型未显示密叶的性状，在培养基上看到四株植株的叶上有白色条纹。

(2) 不同器官对再分化植株变异体的种类和频率的影响

从不同器官发生的再分化植株之间的变异体频率有显著的差异（表 1）。从幼果形成的 104 株再分化植株中没有原有表现型的个体，全部是变异体。相反，从冠芽形成的 29 株再分生植株只有两个个体是变异体。从裔芽形成的分化植株同从幼果形成的分化植株有相类似的趋势，并以很高频率产生变异植株。然而关于变异种类，如表 1 所示，有两种完全不同的类群，一种类群是变异体的分布相当均匀，它们都是来自幼果的再分化植株。但另一种类群是变异体分布几乎只限于刺变异体，它们来自裔芽和腋芽的再分化植株。

表1 再分化植株性状的变异

器官	变异体的数目*							变异%
	总计	正常	刺	叶色	蜡	叶密度	总变异	
幼果	104	0	70	104	95	57	104	100
裔芽	136	3	133	2	6	0	133	98
冠芽	29	27	2	0	0	0	2	7
腋芽	110	73	37	1	4	1	37	34

* 每个复合变异体也作为一个统计。

① 幼果起源的再分化植株的变异体。

不管来源于两个不同幼果植株之间的变异方式是相同还是不同，把调查到的单一和复合变异体都列于表2中。

表2 从幼果组织得到的变异体

变异的性状	材 料		总计	%
	A 系	B 系		
叶色	0	1	1	1.0
叶色、叶密度	3	0	3	2.9
叶色、蜡	6*	2	8	7.7
叶色、叶密度、蜡	2	0	22	21.1
叶色、刺	1	0	1	1.0
叶色、刺、叶密度	4	0	4	3.8
叶色、刺、蜡	4	33	37	35.6
叶色、刺、叶密度、蜡	28	0	28	26.9
总 计	68	36	104	100

* 包括了窄叶、不正常叶序或有条纹的植株。

从幼果(A系和B系)再分化的全部植株都有叶色变异体，蜡分泌的变异体中A系为60/68和B系为35/36。在变异体优势中A系的刺性状分离为37:31，而其叶密度性状分离只有57:11。而在B系中没有密集叶变异体，但几乎全部变异体都同集中在刺性状

上。

在叶色变异体中，A系的绿色变异体是51/68，但B系仅1/36。假定叶色差异同叶绿素的量成比例，所以进行了化学分析。表3比较了幼果A系的绿色变异体（12个个体）、幼果B系的黄绿变异体（11个个体）、裔芽和冠芽起源的暗绿非变异体（24个个体）和腋芽起源的暗绿非变异体（36个个体）之间的叶绿素浓度。

表3 再分化植株的叶绿素含量

器 官	叶绿素含量 mg/250mg鲜重	叶 色
幼果 A	0.07 ± 0.2	绿
幼果 B	0.05 ± 0.008	黄绿
裔芽和冠芽	0.11 ± 0.03	暗绿
腋 芽	0.11 ± 0.02	暗绿

为了防止即使有个别变异体个体是多倍体，对幼果起源的8个变异体和除刺性状（除幼果外任何器官起源的）的特别正常个体外进行了气孔大小的测定。变异体的气孔最大为 $27.3 \pm 1.8\mu$ ，最小为 $22.8 \pm 1.5\mu$ ，正常个体的气孔为 $25.0 \pm 1.1\mu$ 和 $21.8 \pm 0.8\mu$ 。正常体和变异体之间差异显著。因此，排除了变异体中可能有显著比例的多倍体。

② 裔芽和冠芽起源的再分化植株的变异体

C系（裔芽起源的）变异体比例高，而D系和E系（冠芽起源的）的变异体比例低，如表4所示。然而，值得注意的是这些系中的所有的变异体都是刺变异体。

值得提一提B系（起源于幼果）和C系（起源于裔芽）单个植株。这两个系无论是高比例变异体或是刺性状变异体上都相类似。然而另一方面，起源于幼果的全部变异体都同叶色变异性状相一致，而起源于裔芽的变异体中，叶色变异体仅只2/136。