

目 录

序

第一篇 植物细胞培养的概念和基础技术	1
第一章 器官发生	3
一、器官发生的植物	3
二、离体培养形态发生过程	23
三、器官再生的技术程序	32
四、展望	35
第二章 体细胞胚胎发生	37
一、历史概况	38
二、胚胎发生植物种	38
三、影响体细胞胚胎发生的因素分析	44
四、体细胞胚胎发生的机理	50
五、胚胎发生的生物化学	54
六、培养程序	59
七、展望	59
第三章 原生质体的游离和培养	62
一、原生质体游离用的酶	62
二、原生质体游离程序	64
三、烟草原生质体游离方法	69
四、原生质体培养程序	71
五、展望	85
第四章 分生组织培养和微繁殖	88
一、应用	88
二、方法	99
三、影响成功的因素	101
四、培养阶段基本要点	104
五、展望	111
第五章 单倍体的离体培养生产	113
一、离体诱导单倍体方法	113
二、影响雄核发育的因素	126
三、纯合植株	130
四、单倍体培养物的冰冻保存	131
五、突变的诱导	132
六、遗传变异性的诱导	132
七、单倍体在加速育成品种上的重要性	133
八、展望	134
第六章 体细胞杂交	135

一、体细胞杂交技术.....	135
二、细胞质杂交.....	149
三、展望.....	156
第七章 离体胚培养	158
一、培养要求.....	158
二、培养方法.....	164
三、应用.....	165
四、展望.....	170
第八章 再生植株的遗传变异	171
一、再生植株的遗传变异性.....	171
二、染色体和核型变化.....	178
三、展望.....	187
第九章 培养细胞和杂种后代的同工酶分析	189
一、概述.....	189
二、程序.....	190
三、展望.....	198
第二篇 植物细胞培养在农业上的应用	201
第十章 细胞培养与作物品种改良	203
一、细胞培养应用潜力.....	203
二、花药培养培育新品种.....	209
三、多年生木本植物的改良.....	214
第十一章 细胞突变体的分离和选择	220
一、细胞突变体.....	221
二、细胞突变体的产生.....	234
三、抗除莠剂细胞突变体的选择.....	240
四、植物胁迫耐性突变体的选择.....	248
五、光自养细胞选择.....	252
六、展望.....	255
第十二章 组织培养在植物抗病性中的应用	258
一、应用.....	258
二、程序.....	262
三、咖啡锈病评价.....	268
四、抗线虫番茄品种育种.....	270
第十三章 植物种质资源的细胞培养保存法	278
一、植物细胞组织保存法的原理.....	279
二、低温保存法.....	280
三、低压保存的程序.....	284
四、愈伤组织的干燥贮存法.....	289
五、细胞缓慢生长保存法.....	289
六、不同植物的保存法.....	290
七、展望.....	297
第十四章 组织培养生产有用化合物	299

一、细胞无性系的选择方法	300
二、植物细胞固定化技术	302
三、紫草宁色素生产	312
四、调味剂的生产	315
五、展望	322
第十五章 细胞培养与作物染色体工程	323
一、远缘杂交的障碍	324
二、克服杂交障碍的技术	325
三、利用远缘杂种的问题	326
四、染色体操作和外源基因转移	328
五、禾谷类染色体工程	333
六、远缘杂交在禾谷类改良中应用	335
七、展望	336
第十六章 植物细胞培养与植物遗传转化	338
一、植物细胞融合的基因转移	338
二、植物原生质体遗传转化	340
三、用农杆菌共培养或用Ti质粒转化原生质体	349
四、展望	359
第三篇 各种植物的组织培养	361
第十七章 禾谷类	363
一、水稻	363
二、小麦	368
三、大麦	374
四、玉米	379
第十八章 薯类	389
一、马铃薯	389
二、甘薯	402
三、薯蓣	408
第十九章 豆类	416
一、大豆	416
二、花生	423
三、豌豆	432
四、菜豆	441
第二十章 饲草类	451
一、豆类饲草	451
二、燕麦	471
三、杂谷	476
四、禾本科饲草	480
第二十一章 绿叶蔬菜类	490
一、甘蓝类	490
二、芹菜	497
三、莴苣	505
四、蕹菜类	515

第二十二章 果根蔬菜类	527
一、番茄	527
二、茄子	543
三、胡萝卜	547
四、石刁柏	557
第二十三章 浆果类	567
一、柑桔	567
二、葡萄	572
三、草莓	582
四、番木瓜	590
第二十四章 果树类	596
一、苹果	596
二、核果	602
三、杏	625
四、杧果	632
五、香蕉	634
第二十五章 树木类	639
一、林木	639
二、松柏	646
三、白杨	657
四、枣椰树	668
五、油棕	673
第二十六章 嗜食类	680
一、甘蔗	680
二、甜菜	687
三、咖啡	694
四、可可	705
五、胡椒	709
第二十七章 工业原料类	715
一、棉花	715
二、烟草	724
三、橡胶树	733

第一篇

植物细胞培养的概念和基础技术

第一章 器官发生

在高等植物中,许多离体培养技术的成功与是否能成功地再生植株有关。事实上,如离体培养分离突变体、原生质体融合和细胞培养等技术的应用在许多农作物受到限制,原因是不能再生植株。只有如烟草和胡萝卜这样少数的农作物在离体培养中得到充分开发,原因是它们容易再生植株。

兹综述离体培养中形态发生的现状,并用表格列示各种植物植株再生的条件,可作为进行难以再生的作物再生研究时的参考。将按科编排进行论述,因为同一科的植物在再生时表现出相似的需要。

一、器官发生的植物

在离体培养中已经有许多种植物可以再生植株,本文不包括胚胎发生再生植株的科。很明显,虽然许多种作物可以从细胞培养再生,某些更加重要的作物,值得注意的是禾谷类和豆类,在这种技术的开发方面是落后的。我们强调了在农业上有用的植物。

(一) 茄科

在离体培养中已经把茄科植物当作模式系统。因为1965年Vasil等从烟草成熟植株的单细胞再生出植株,从而首次证明了全能性。1964年,Guha等在离体培养中从离体花药第一个得到单倍体植株的是曼陀罗属。1971年Takebe等从分离的原生质体再生植株取得成功的首要的是烟草。1972年Carlson等首次从两种烟草(粉蓝烟草和郎氏烟草)获得体细胞杂种。

1. 烟草和其它烟草属植物 栽培烟草品种离体培养容易增殖。生长素和细胞分裂素对于外植体和组织培养物的效应是相当专一的,而且重复性相当好。大多数植物的组织培养中常用的营养液(MS培养基)是根据烟草做的生长实验设计的。从烟草的叶和茎的外植体得到了愈伤组织和悬浮培养物,而且许多烟草属植物用MS培养基加 $4.5\mu\text{M}$ 2,4-D和 2g/l 水解酪蛋白也可得到愈伤组织和悬浮培养物。在MS培养基上,用其它浓度的激素,如 $11.4\mu\text{M}$ IAA和 $2.3\mu\text{M}$ KIN也可得到愈伤组织,但总是需要生长素。在MS培养基上或这种培养基加2,4-D可以保持愈伤组织,水解酪蛋白并非必需。用MS或B₅培养基加入 2.3 — $4.5\mu\text{M}$ 2,4-D很容易得到悬浮培养物。去掉2,4-D,加入细胞分裂素很容易从愈伤组织或悬浮培养物再生苗,如接种在MS加 $5\mu\text{M}$ 6BA的固体培养基上。对于烟草来讲,许多种激素组合已成功地用于再生苗。用生长素和细胞分裂素的组合,如 $11.4\mu\text{M}$ IAA和 $9.3\mu\text{M}$ KIN或 $22.8\mu\text{M}$ IAA和 46.5 — $66.5\mu\text{M}$ KIN代替2,4-D也可诱导再生苗。已经报道从烟草属的19个种愈伤组织再生出苗(表1-1)。在大约三周内可以从烟草愈伤组织获得苗,可以在有 $5\mu\text{M}$ 6BA的MS培养基上用烟草培养物进行增殖。在不加激素的MS, Hoagland或White培养基上或 $\frac{1}{2}$ 浓度的MS加 25 — $75\mu\text{M}$ 3-氨基吡啶上可以再生根,根出现很快,而且许多情况下看来根原基是早已存在的。

表1-1 MS培养基上烟属的各种培养外植体形成苗的情况

种	外植体	形成苗时的生长调节剂 (μ M)
渐尖叶烟草	茎	10 2iP, 1 IAA
非洲烟草	叶	5 6BA
花烟草	花枝	10 KIN, 1 IBA
迪勃纳氏烟草	叶	5 6BA
粉蓝烟草	叶	5 6BA
粘烟草	叶	5 6BA
古特苏比氏烟草	茎	10 2iP, 1 IAA
郎氏烟草	茎	4.7 KIN, 0.06 IAA
特大管烟草	茎	10 2iP, 1 IAA
内索菲拉烟草	叶	5 6BA
耳状烟草	花枝	10 KIN, 1 IBA
	叶	5 KIN, 1 6BA
兰茉莉叶烟草	花枝	10 KIN, 1 IBA
匍匐烟草	叶	5 6BA
黄花烟草	苗	45.17 IAA, 11.9 KIN
	叶	5 6BA
斯托克通氏烟草	叶	5 6BA
香甜烟草	茎	10 2iP, 1 IAA
林烟草	叶	5 6BA
		17.1 IAA, 0.9 KIN
普通烟草	细胞培养物	1 6BA
绒毛状烟草	花枝	10 KIN, 1 IBA
迪勃纳氏烟草×普通烟草	茎	4.7 KIN, 0.06 IAA
N.bacun×粉蓝烟草	叶	5 6BA
普通烟草×林烟草	叶	5 6BA
粉蓝烟草×普通烟草	叶	5 6BA

烟草属有些种间有性杂交后代可产生肿瘤,已经证明粉蓝烟草和郎氏烟草的肿瘤在离体培养时是激素自养的。激素自养不只限于肿瘤,如许多烟草细胞也是如此,包括迪勃纳氏烟草和匍匐烟草和奈特斯烟草。

2. 马铃薯和有关的种 马铃薯的双单倍体无性系也易进行组织培养。块茎、茎尖、下胚轴、叶和茎的外植体都曾用于发生有形态发生潜力的愈伤组织。在加有 2.3μ M IAA, 1μ M GA和 3.7μ M KIN的改良MS培养基上可以从块茎外植体发生愈伤组织,或在加有 9.1μ M的2,4-D的MS培养基上从苗或茎发生愈伤组织。茄属野生种发生愈伤组织需要高的生长素与细胞分裂素比例。通常用NAA和2,4-D,虽然用IAA和6BA也曾经取得成功(表1-2)。当用4.7-46.5 μ M的KIN代替2,4-D时,在茎和苗发生的愈伤组织曾观察到形成苗。当把幼小

的苗转移至有 $2.2\mu\text{M}$ 6BA和 $0.3\mu\text{M}$ GA的MS培养基上或转移至不加激素的培养基上可形成根。

对于*S. xanthocarpum*, *S. sisymbriifolium*, 千年不烂心, 龙葵, *S. khasianum* 和叶绿素缺失的*S. cha coense*可遵照相似的程序。一种改良的MS培养基和White (1943) 培养基加上 $2.3-27.1\mu\text{M}$ 的2,4-D可以用来发生和保持每一种植物的愈伤组织。为了再生植株可去掉2,4-D, 而对于*S. xanthocarpum*来说可把2,4-D的浓度从 $4.5\mu\text{M}$ 降至 $0.5\mu\text{M}$ 。大多数情况下可向苗再生培养基中加入细胞分裂素(表1-2)。对*S. sisymbriifolium*只要转移至加有 $7.4\mu\text{M}$ IAA的Nitsch培养基可以诱导出根。茄子下胚轴切段对于2,4-D没有反应; 但用 $5\mu\text{M}$ NOA或 $43\mu\text{M}$ NAA可以发生愈伤组织。当把愈伤组织移至加有 $2.3\mu\text{M}$ ZEA或 $4.7\mu\text{M}$ KIN, 或用 $1\mu\text{M}$ 6BA代替NAA的MS培养基上时, 可以形成苗; 转移至不加激素的MS培养基上可以诱导生根。

表1-2 茄属的植株再生

物 种	生 长 调 节 剂		苗培养基	外 植 体
	愈伤组织 (μM)	苗 形 成 (μM)		
千年不烂心	未报道	4.7 KIN, 5.7 IAA	MS	叶
<i>S. khasianum</i>	未报道	10 6BA, 0—10 IAA	MS	叶
<i>S. laciniatum</i>	10 IAA, 0.1 ZEA	10 6BA, 9.1—10 IBA	MS	叶
茄 子	4.2 NAA	1 6BA	MS	下胚轴
	5 NOA	4.7 KIN	MS	下胚轴
龙 葵		6.7 IAA		
	13.5 2,4-D	0.49 2iP, 0.1 ABA	MS	髓
	10 IAA, 1—10 6BA	10 IAA, 10 6BA	MS	叶
	未 报 道	4.7 KIN 5.7 IAA	MS	叶
<i>S. sisymbriifolium</i>	2.26 2,4-D, 49.2 2iP, 17.1 IAA	0.03—1.7 IAA, 73.8 2iP	MS	茎髓
马 铃 薯	2.28 IAA, 1.04 GA, 3.73 KIN	1.8 6BA	MS	块茎
	9.05 2,4-D	4.7—46.5 KIN	MS	苗, 茎
	27.15 2,4-D	0.09 2, 4-D	White或MS	苗
	27.9 KIN, 2.9 NAA	8.9 6BA, 0—0.1 IAA	MS	叶

3. 番茄和有关的种 番茄属植物, 尤其是番茄的组织培养研究, 常用MS培养基从大多数番茄的外植体可以诱导愈伤组织, 但常用叶和下胚轴切段(表1-3)。常用生长素2,4-D, 但在再生时不加生长素。IAA和NAA与KIN和6BA配合用于诱导愈伤组织增殖。在叶子和下胚轴切段的酚氧化作用, 可把培养物放在暗中, 直至形成愈伤组织或向培养基中加入500mg/l的聚乙烯吡咯烷酮的办法予以克服。在愈伤组织诱导培养基中也可形成苗, 但频率低, 在具有较高的细胞分裂素与生长素的比例或在只有细胞分裂素的培养基上效果较好, 在加有 $10.7\mu\text{M}$ NAA或 $11.8\mu\text{M}$ IAA的MS培养基上可以得到根。Coloman和Greyson(1977)曾经指出, 浓度为0.01— $100\mu\text{M}$ GA_3 可促使形成根。两种野生的番茄属植物也用相近的技术得到了苗(表1-3)。番茄看来不象其它茄科植物那样容易用组织培养技术操作, 因为在

表1-3 番茄和有关植物的再生

物 种	生 长 调 节 剂		苗培养基	外 植 体
	愈伤组织 (μM)	苗 形 成 (μM)		
番 茄 Apidice, Porphyre	0.5—2.5 IAA, 1—20 6BA	10 6BA, 0.5 KIN	MS	叶
番 茄 Bizon	22.8—34.3 IAA, 9.3—18.6 KIN	91.3 IAA, 18.6 KIN	MS	茎, 叶, 子叶
番 茄 Karnatak	2.8 IAA,	9 6BA, 2.8 IAA	MS	下胚轴, 子叶
番 茄 杂种 Pol × Pusa pol. 栽培种	5 2iP, 2 IAA	1 ZEA, 1 IAA	MS	叶
番 茄 Rheinlands Rhum	2.3—27.9 KIN, 2.7—32.2 NAA	8.9 6BA, 1.1 IAA	MS	叶
番 茄 Rutgers	11.4—22.8 IAA, 9.3—18.6 KIN	22.8 IAA, 18.6 KIN	MS	叶
番 茄 Rutgers, EP-7	4.5 2,4-D	5 6BA	MS	下胚轴, 叶, 苗
番 茄 Starfire	1 6BA, 1 NAA	1—10 6BA, 0.1 IAA	MS	叶
番 茄 VFNT Cherry	10.7 NAA, 4.6 6BA	9.1 ZEA, 0—2.9 IAA	MS MS	叶 叶
<i>L. peruvianum</i>	未报道	198 ADE	White	根
<i>L. peruvianum</i>	0—217.9 KIN, 10.7—32.2 NAA	8.9 6BA, 0—11.4 IAA	MS	叶

继代培养时愈伤组织会失去再生苗的能力。长期培养的悬浮培养物还不能再生植株。在经过四个月培养的番茄愈伤组织中有20%可以再生正常的植株,但在培养17个月后,只能得到异常的苗,不能形成根。用6BA和IAA曾从愈伤组织获得再生苗,但用KIN和NAA不能再生苗。细胞分裂素与生长素的比例在控制番茄苗形成上看来比用那种专门的激素更重要。

4.矮牵牛属和曼陀罗属 矮牵牛离体培养容易操作。但是这些种的大部分知识是关于从原生质体再生植株的可能性。矮牵牛属中所有的种都在MS培养基中培养过(表1-4)。茎和叶的外植体都能再生植株,根培养用0—107.4 μ M NAA和0.4—35.2 μ M 6BA相结合,或只用2,4-D,也可用2,4-D与低浓度的6BA(0.9 μ M)配合。在所有的种中,用降低生长素浓度和提高细胞分裂素浓度的办法,都可成功地再生苗。在少数情况下,用较弱的生长素代替强的生长素,也能成功,如用22.8 μ M IAA代替22.6 μ M 2,4-D。矮牵牛属中已研究过的四个种都可在离体培养中再生(表1-4)。

表1-4 矮牵牛属和曼陀罗属的植株再生

种	生长调节剂		苗培养基	外植体
	愈伤组织 (μ M)	苗形成 (μ M)		
南洋金花	1 2,4-D或 10 NAA	1 6BA	MS	茎
南洋金花	1 2,4-D	100 KIN	MS	悬浮液
南洋金花(单倍体)	15% CW	9.3 KIN	Nitsch	茎 叶
矮牵牛 Blue Dansy, Comanche, Gypsy	22.6 2,4-D	11.9 KIN	MS	叶
矮牵牛 Celestial x Blue Dedder	0—107.4 NAA, 0.4—35.2 6BA	0.3—2.7 NIA, 1.1—3.9 6BA	MS	根
矮牵牛 Cascade	0.9 6BA			
彭太矮牵牛	4.5 2,4-D	2.3 6BA	MS	叶
<i>P. parodii</i>	4.5 2,4-D	2.3 6BA	MS	叶
<i>P. pendula</i>	未报道	8.9 6BA, 5.4 NAA	MS	花序, 根

曼陀罗属还未进行很微细的研究,虽然南洋金花是花药培养、植株再生和体细胞杂交研究的理想材料。在加1 μ M 2,4-D的MS培养基上可以诱导和保持南洋金花的愈伤组织,用1 μ M 6BA可从愈伤组织再生植株。在没有生长调节剂的MS培养基或加1 μ M IAA的Nitsch培养基上可得到根。在加有2.2 μ M 6BA和8 μ M NAA的B5培养基中白花曼陀罗和假白花曼陀罗曾取得再生。而当除去NAA,并把6BA增加至4.4 μ M时可形成苗。在南洋金花从细胞悬浮培养体、茎切段和叶切片上得到苗。

5. 其它茄科植物 经器官发生从其它 8 种茄科植物再生过植株(表 1-5)。在每种情况下, 生长素与细胞分裂素比例大于 1 可诱导愈伤组织, 而生长素与细胞分裂素比例小于 1 可再生苗。可用 White、MS 基本培养基, 在没有激素的或加有生长素(NAA 或 IAA)的培养基中可形成根。在这些茄科植物中几乎用了所有可以利用的外植体(表 1-5)去诱导器官发生。除了表 1-5 所列的各种以外, 曾从野甘草属三个种的花药再生成植株, 在离体培养下未能再生植株。

表 1-5 其他茄科种的植株再生

种	生 长 调 节 剂		苗培养基	外 植 体
	愈 伤 组 织 (μ M)	苗 形 成 (μ M)		
<i>Browallia viscosa</i>	10.7 NAA, 2.2 6BA	4.6 ZEA	MS	叶
<i>B. viscosa</i>	4.5 2,4-D	25 2iP	MS	叶
辣 椒	4.9 2,4-D	4.4—8.9 6BA, 0—5.7 IAA	MS	子叶, 下胚轴
天仙子	0.5 2,4-D, 0.5 KIN	未	MS	幼苗
<i>Physalis minima</i>	4.5 2,4-D	4.4 6BA	White	茎, 叶
灯笼草	未报道	18.6 KIN, 11.4 IAA	MS	叶
<i>Salpiglossis sinuata</i>	0.5 KIN, 0.5—5.4 NAA	9.3 KIN, 0.5 NAA	MS	叶, 花柄
<i>Scopolia parviflora</i>	10 2,4-D	10 IAA, 0.1—10 KIN	MS	茎

总共有 42 种茄科植物在离体培养中再生。器官发生是本科植物植株再生的主要方式。在离体培养的 42 种植物中有 39 种使用 MS 培养基, 虽然 B₅ 培养基可能同样有效。大多数种中用 4.5 μ M 2,4-D 可以诱导愈伤组织, 用 5 μ M 6BA 在大多数种中足以诱导植株再生。在那些用这种处理不能奏效的种中, 常配合使用生长素和细胞分裂素。在茄科植物中, 如果生长素比细胞分裂素大于 1, 则促进愈伤组织形成; 如果小于 1, 则形成苗。这种一般规律可以用于已试过的 42 种植物中的 38 种(表 1-1 至表 1-5)。唯一的例外是千年不烂心, 龙葵和 *Scopolia parviflora* 在这种情况下, 可用 IAA 和低浓度的细胞分裂素相配合来诱导苗。IAA 在离体培养中易破坏, 而且不如 2,4-D 和 NAA 有效。

(二) 十字花科

十字花科包括许多重要作物, 如硬花甘蓝、白菜、抱子甘蓝、油菜、羽衣甘蓝、芥蓝、花椰菜和辣根等, 这些植物离体培养都已再生。除辣根外, 其它植物都属于芸薹属。另一个十字花科植物拟南芥, 容易培养和再生。对十字花科植物的研究重点放在用组织培养进行改良作物和营养繁殖。

从多种外植体可以诱导并保存愈伤组织。从愈伤组织可以诱导苗, 通常用增加细胞分裂素和生长素的比例。十字花科愈伤组织的器官发生能力随着培养时间延长而迅速下降, 尤其在培养了 6—8 个月以后。改变培养基可以提高拟南芥的器官发生潜力。

至少有8种十字花科植物在离体培养中再生(表1-6和表1-7)。花椰菜和拟南芥菜对培养基中激素的细胞学反应因品种和地方小种而异。十字花科植物再生中广泛使用MS培养基(表1-6和表1-7)。在决定培养物的器官发生反应中,用于诱导愈伤组织的外植体的来源是重要的。

表1-6 芸薹属的植株再生

种	生 长 调 节 剂		苗培养基	外 植 体
	愈伤组织 (μM)	苗形成 (μM)		
芥 蓝	10.7 NAA, 2.2 BA	21.4 NAA, 2.3 KIN	MS	子叶
芥 菜	未报道	2.7 NAA, 8.9 6BA	MS	下胚轴, 子叶
芥 菜	5.4 NAA, 0.89 6BA	8.9 6 BA, 5.4 NAA	MS	子叶
芸 薹	4.5 2,4-D	5 6BA, 0.3—0.4 GA	MS	叶
甘 蓝 (硬花甘蓝)	5.7—11.4 IAA, 4.7 KIN	46—51 IAA, 14—28 KIN	MS	叶
	未报道	51—57 IAA, 37—42 KIN	MS	叶脉
	未报道	51—57 IAA, 14—93 KIN	MS	茎
甘 蓝 (抱子甘蓝)	11.4 IAA, 2.3 KIN	未成功	MS	叶柄, 茎
甘 蓝 (花椰菜)	0.9 2,4-D, 14 KIN	23.2 KIN	MS	叶脉, 叶柄
甘 蓝 (无头甘蓝)	10.7 NAA, 2.3 KIN	2.4 KIN	MS	茎, 髓
甘 蓝 (红甘蓝)	4.5 2,4-D, 0.5 KIN	11.4 IAA, 9.3 KIN	MS	种子, 子叶
		5.7 IAA, 2.3 KIN		

1. 芸薹属 农业上重要的芸薹属植物有: 甘蓝(花椰菜、抱子甘蓝、油菜和羽衣甘蓝), 芥菜和芥蓝(*B. alboglabra*)。甘蓝的愈伤组织通常在生长素和细胞分裂素同时存在的情况下发生(表1-6)。虽然最常用 $2.3\mu\text{M}$ KIN, 但低至 $0.5\mu\text{M}$ 和高达 $14\mu\text{M}$ KIN也曾取得成功。多种激素可以满足愈伤组织发生和维持时的生长素需要, 如2,4-D, IAA和NAA, 浓度从 $0.9\mu\text{M}$ 2,4-D到 $11.4\mu\text{M}$ IAA(表1-6)。羽衣甘蓝和芥蓝的愈伤组织诱导可由 $10.7\mu\text{M}$ NAA和 $2.2\mu\text{M}$ 6BA促进。芥菜是芸薹属中愈伤组织生长不需要细胞分裂

素的唯一的一种，它可以在 $2.3-4.5\mu\text{M}$ 2,4-D中成功地培养。花椰菜对于 $5\mu\text{M}$ 6BA的生长反应因不同的遗传型而异。

芸薹属的愈伤组织培养物很容易再生植株。通常培养基中必需包含细胞分裂素，如 $2.3-93\mu\text{M}$ KIN（表1-6）。在再生培养基中生长素的浓度可有很大变化。有些不需要生长素，或需要高浓度不太活跃的生长素，如红甘蓝需 $5.7-11.4\mu\text{M}$ IAA与细胞分裂素相配合才能再生植株。对于芥蓝只有在 $5.4-21.4\mu\text{M}$ NAA和 $2.3-4.7\mu\text{M}$ KIN同时存在下才能再生苗。芥菜在有 $5\mu\text{M}$ 6BA存在时可以再生苗。与从多数愈伤组织培养物再生相反，对于植株再生需要 $0.1-2.8\mu\text{M}$ GA_3 。在没有 GA_3 时可以诱导绿色的愈伤组织，但不能形成苗。

2. 拟南芥 与芸薹属相似，培养基加细胞分裂素和生长素可促进拟南芥愈伤组织生长。在 $10\mu\text{M}$ 2,4-D和 $0.25\mu\text{M}$ KIN的改良 B_5 培养基上发生愈伤组织，加 $0.24\mu\text{M}$ KIN和 $5\mu\text{M}$ 2,4-D的改良 B_5 培养基上维持愈伤组织。在 $43\mu\text{M}$ NAA和 $0.25\mu\text{M}$ KIN中也曾发生愈伤组织。曾经有人指出外植体的来源会影响此后从愈伤组织再生植株。从花药再生的愈伤组织有很强的器官发生潜力，而且这种能力可保持18个月之久。从种子、茎和叶发生的愈伤组织这种能力只能保持6—8个月。

降低或除去培养基中的生长素浓度，同时增加细胞分裂素的浓度，可从拟南芥的愈伤组织再生苗。有时在再生培养基中保持低浓度的生长素，如 $1\mu\text{M}$ KIN和 $0.1\mu\text{M}$ GA_3 。有时在苗再生培养基中加 GA_3 ，如 $10\mu\text{M}$ 6BA和 $1\mu\text{M}$ GA_3 ，尽管未证明生长需要 GA_3 。

下列因素会影响拟南芥的形态发生：（1）选择具有高度再生能力的地理小种；（2）愈伤组织每4周继代一次，而不是8周；（3）愈伤组织在弱光下培养；（4）培养基用过氧灭菌；（5）用各氨基酸代替 NH_4^+ 作为氮源；（6）每隔3—6天在 4°C 条件下处理培养物；（7）在转移至再生培养基前去掉培养基的生长素；（8）每20天把幼嫩培养物转至葡萄糖培养基，或把老的培养体转移至含6%葡萄糖的培养基中，因为高浓度葡萄糖抑制幼嫩

表1-7 十字花科植物的再生

种	生长调节剂		苗培养基	外植体
	愈伤组织 (μM)	苗形成 (μM)		
辣根	未报道	5.4 NAA , $0.5-2.3\text{ KIN}$	MS	叶
拟南芥	4.5 2,4-D , 0.2 KIN	0.2 IAA , 4.7 KIN	B_5 或PG	叶、种子, 茎, 花药
海甘蓝	11.4 IAA , 3.7 KIN	11.4 IAA , 3.7 KIN	MS	根
屈曲花	$1-10\text{ 2,4-D}$	10 KIN	MS	叶, 茎
香雪球	19 IAA , 20 2,4-D	600 ADE , 5 6BA	MS	节间
<i>Sinapis alba</i>	4.5 2,4-D	0.9 2,4-D , 9.3 KIN	MS	子叶, 下胚 轴根
水芥菜	5.7 IAA , 2.3 KIN	2.9 IAA , $14-23\text{ KIN}$	MS	茎

培养物形态发生。随着愈伤组织年龄增加, 苗再生能力逐渐降低。外植体的来源也影响愈伤组织保持再生能力的长短。随着愈伤组织老化逐渐失去再生能力, 可能与染色体不稳定性有关, 如在老的愈伤组织中观察到倍性增加。

3. 其他十字花科植物 有6种别的十字花科植物离体培养再生(表1-7)。除辣根外, 一般在生长素与细胞分裂素比例大于1的MS培养基上发生和维持愈伤组织。在愈伤组织培养基中并非一定要加细胞分裂素。降低培养基中生长素的浓度, 并提高细胞分裂素的浓度, 可以诱导再生。辣根可以用 $5.4\mu\text{M}$ NAA和 $0.5-2.3\mu\text{M}$ KIN直接从叶碎片诱导再生苗。

虽然十字花科植物在离体培养中容易生长和再生, 但是遗传型对愈伤组织的建立和植株再生有很大影响。因此对愈伤组织和苗的培养, 激素浓度变化很显著。虽然在开始培养后的6个月内可能丧失从愈伤组织再生植株的能力, 但是对培养技术的特殊改变可以延长再生的时间。离体培养系统尚未用于改进十字花科作物。

(三) 豆科

豆科植物植株再生相当困难。叶用豆类, 如三寸草比籽用豆科植物更加容易在离体培养中再生。已有25种豆科植物可再生植株, 但是频率低或限于一定的外植体来源。

至少有8种不同的培养基已成功地用于再生植株(表1-8)。MS培养基是豆类再生中最常用的。传统地用于其它科植株再生的培养基可能不太适合用于豆类。

与其它科的植物不同, 少数再生的豆科植物可能是由于植物激素的作用。最常用于诱导愈伤组织的生长素是2,4-D, NAA, 2,4,5-T和Picloram(表1-8)。除了寇阿相思树和葫芦巴属是用椰乳和 *Alhagi camelorum* 及牛角花只用2,4-D之外, 其它种在诱导愈伤组织时都用细胞分裂素, 6BA或KIN。在大多数豆类中, 发生愈伤组织时生长素和细胞分裂素的比例是高的, 但也有明显的例外(表1-8)。大多数豆类都需要比其它科植物高的细胞分裂

表1-8 豆类再生

种	生 长 调 节 剂		苗培养基	外 植 体
	愈伤组织 (μM)	苗 形 成 (μM)		
<i>Acacia koa</i>	1% CW, 11.3 2,4-D	22 6BA	MS	根, 根 出条顶端
阔叶合欢	未报道	10.7 NAA	MS	下胚轴
波斯野豌豆	2.9 IAA或 2.25 2,4-D	4.4 6BA	B ₅	根, 叶 下胚轴
落花生	4.5 2,4-D, 9.3 KIN	22 IAA	MS	幼胚
木 豆	未报道	4.7 KIN, 0.06 IAA, 400mg/l CH	White	下胚轴
角豆树	8.9 6BA, 5.4 KIN	9.3 KIN	MS	子叶, 下胚轴

素。

大多数用种子的豆科植物形成根的倾向大于形成苗。对于大多数种，不论生长素和细胞

(续)

种	生 长 调 节 剂		苗培养基	外 植 体
	愈伤组织 (μM)	苗 形 成 (μM)		
<i>Crotalaria burhia</i>	1.1 2,4-D, 1.3 NAA, 1.2 KIN	0.5—1.3 NAA, 2.2 6BA	MS	茎, 叶
菝 麻	26.9 NAA	23.3—46.5 KIM	MS	茎, 叶
假 苜 蓿	2.3—14.3 2,4-D	2.2—8.9 6BA	MS	茎, 叶
<i>Glycine conescens</i>	未报道	22 6BA, 0.54 NAA	MS	下胚轴
<i>Glycine tomentella</i>	未报道	22 6BA, 0.54 NAA	MS	下胚轴
铺地槐兰	2.3 2,4-D, 4.7 6BA	2.9 IAA, 4.7 6BA	B ₅	子 叶 下胚轴
草香豌豆	2.3 2,4-D, 4.7 6BA	2.9 IAA, 4.7 6BA	B ₅	茎 尖
牛 角 花	4.5 2,4-D	0.44 6BA	B ₅	茎
苜 蓿	9 2,4-D, 9.3 KIN, 10 NAA	无, 2g/l YE	Blaydes	下胚轴
菜豆Bico de Ouro	18.6 KIN, 5.7 IAA, 每毫升1/4 蚕豆种子	11.4 IAA, 5.4 NAA, 0.9 KIN, 每毫升1/4 蚕豆种子	67-V	叶
豌豆	10.7 NAA, 4.7 6BA	22.2 6BA, 1.1 IAA	MS	上胚轴
四 棱 豆	5.4—26.9 NAA, 0.5 KIN	无	未报道	下胚轴
<i>Stylosanthes guyanensis</i>	9.3 KIN, 9.0 2,4-D	29 6BA, 5.4—10.8 NAA	MS	下胚轴, 根, 茎
<i>Stylosanthes lamata</i>	9 2,4-D, 0.2 KIN	14 KIN	SH	胚 根, 子 叶
<i>Trifolium ondrinum</i>	7 KIN, 5.4 NAA	2.3 KIN, 2.7 NAA	MS	下胚轴悬浮 培养物

(续)

种	生 长 调 节 剂		苗培养基	外 植 体
	愈伤组织 (μM)	苗 形 成 (μM)		
绛车轴草	10 2,4-D, 11 NAA, 10 KIN	11 NAA, 15 ADE	5.5H	下胚轴
红三叶草	0.5 6BA, 0.25 piclorom	0.05—44.4 6BA, 0.03 piclorom	PC-L ₂	子 叶, 分生组织
白三叶草	19.6 2,4-D	2.3 2,4-D, 0.6 KIN	BM	种子
<i>Trigonella corniculata</i>	2.7 NAA, 15% CW	2.7 NAA, 15% CW	MS	叶
香草	2.7 NAA, 15% CW	2.7 NAA, 15% CW	MS	叶

分裂素的浓度是多少,发生根的频率很高。在四棱豆、大豆和菜豆只发生了根未再生植株。对于*Stylosanthes hamata*先发生根,后出苗。叶用豆类也形成根,但其频率低于籽用豆类。在红车轴草和草香豌豆难以生根。

对于籽用豆类难以再生植株。一般讲,要降低生长素浓度或提高细胞分裂素浓度。成功地诱导种用豆类发生愈伤组织的激素浓度是相当高的(表1-8)。有时还要加入独特的附加物。菜豆再生需要蚕豆种子提取物,而木豆再生需4 rad的 γ 射线照射。野大豆能再生,但栽培大豆至今还不能在离体培养中方便地再生,曾经从大豆下胚轴得到苗原基。

叶用豆类植物的激素需要是不太专一的,如苜蓿植株再生不需要激素,在红三叶草不同浓度的各种激素都可引起植株再生。虽然在豆类中曾经用分生组织再生植株,也能从许多种的非分生组织再生植株。从下胚轴、子房、子叶、分生组织、叶、胚根、种子、茎尖和细胞悬浮体得到的愈伤组织都再生植株(表1-8),但外植体的来源对植株再生频率影响很大。如红三叶草,子叶的植株再生率为1%,而分生组织的再生率为30%。

苜蓿下胚轴外植体的植株再生频率可达12%,但这是经过选择的。在一个遗传株系中经过二轮选择以后,植株再生率可以从12%提高到67%。用于再生实验的14个豌豆品系,只有6个经过二个月培养可以再生。经6个月培养,6个品系中只有2个可以再生。对5个红三叶草品种和9个苜蓿品种也有品种间植株再生能力的差别。关于这些品系间的明显的表型差别和通过选择比较容易提高再生频率这一事实表明,豆科的再生植株能力是遗传的。提出筛选大量的遗传品系可能对于达到再生植株是有用的。

从籽用豆类得到的苗很容易生根。几乎所有的情况下都是在有生长素的培养基中生根,1 μM IBA (Acacia), 0.6—26.9 μM NAA (野百合属) 和0.6 μM IAA (*Stylosanthes*) 都曾用过。大多数情况下,如果培养基中有细胞分裂素(KIN或6BA),那么生长素和细胞分裂的比例大于10,如5.7 μM IAA比0.4 μM 6BA (亚历山大车轴草); 0.5 μM NAA比0.05 μM KIN (四棱豆属); 和10.7 μM NAA比0.9 μM 6BA (木兰属)。在香豌豆