

豆科植物组织和细胞培养研究进展

魏小春, 刘俊杰, 马萍, 齐树森, 郑群

(新疆石河子大学 园艺系, 新疆 石河子 832000)

[摘要] 综述了豆科植物组织和细胞培养研究的状况, 以及在组织培养、花药和花粉培养、胚和胚乳培养、原生质体培养、细胞悬浮培养、转化体系的建立等方面取得的进展, 对豆科植物组织和细胞培养的发展趋势进行了总结。

[关键词] 豆科植物; 组织培养; 花粉和花药培养; 胚和胚乳培养; 原生质体培养; 细胞悬浮培养; 转化体系

[中图分类号] Q949.751.9

[文献标识码] A

Recent Research Advances of Tissue and Cell Culture in Legume

WEI Xiaochun, LIU Junjie, MA Ping, QI Shuseng, ZHENG Qun

(*Horticultural Department, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China*)

Abstract: The paper reviews the research situation in legume tissue and cell culture and research advances in tissue culture, anther and pollen culture, embryo and endosperm culture, protoplast culture, cell culture and establishment of transformation system and summarizes the development trend of legume tissue and cell culture.

Key words: legume; tissue culture; anther and pollen culture; embryo and endosperm culture; protoplast culture; cell culture; transformation system

豆科植物约有 650 属, 18000 种, 广布全世界。在分类上, 豆科植物位于菊科植物之后, 为被子植物的第二大科。豆科植物有许多重要的经济植物, 如豆类作物、蔬菜、饲草、绿肥、药用植物、绿化观赏、染料、树胶及树脂及材用树种等, 另外还有一些农田杂草, 是农林牧业生产上很重要的一个科。19 世纪 30 年代, 德国植物学家施莱登和动物学家施旺创立了细胞学说, 在此基础上, 1902 年, 德国植物学家哈伯兰特(Haberlandt)提出了细胞全能性的理论, 即离体的植物细胞具有发育上的全能性, 在适合条件下能够发育成为完整的植株。这一理论为植物组织培养的提出与发展提供了理论基础。植物组织和细胞培养学科的建立和发展, 对植物科学的各个领域, 如细胞学、胚胎学、遗传学、生理学、生物化学、植物病理学、发育生物学等学科的发展均有很大的促进作用, 并在科学研究和生产应用上开辟了令人振奋的多个新领域。近年来发展很快, 广泛应用于植物的快速繁殖、植物品种改良、基因工程育种、种质资源保存、次生代谢产物生产等方面, 对现代农业和医药等领域产生了深刻影响。运用组织培养方法可以在比较简单易观察的条件下研究细胞、组织或器官的繁殖、生长和分化, 以及各种外界因素对它们的影响, 从而为解决农业生产和药物生产中的某些问题开辟了广阔的前景, 目前已有若干重要成果应用于生产实践中。笔者通过对近 30 年来豆科植物组织和细胞培养研究进展的概括, 为教学科研提供一些参考。

1 豆科植物组织培养

利用植物茎尖培养, 使感染病毒的植株重新获得无病害的植株; 通过组织培养中的器官和胚胎培养的大量研究, 在实践上已经用于加速植物的无性繁殖。

1.1 大豆组织培养

大豆组织培养开始较晚, 但进展很快。中国科学院植物研究所与黑龙江省农业科学院合作由栽培大豆胚轴获得再生幼苗。吉林省农业科学院研究人员从大豆下胚轴培养出再生植株。陈云昭等通过大豆组织培养从栽培大豆上胚轴小真叶获得再生植株。蒋兴屯等离体培养野生大豆的下胚轴和子叶, 经愈伤组织产生再生植株。杨振棠等通过培养大豆复叶, 诱导出愈伤组织, 并分化出再生植株。国外大豆组织培养或再生植株的最早记载是 Oswald^[1], 他使用的外植体是栽培大豆种子芽。Evans 培养栽培大豆子叶腋芽, 形成丛苗。而 Kameya 等通过对 7 个种的大豆下胚轴进行培养后发现, 仅从 *G. canesens* 和 *G. tamentella* 两种多年生野生大豆中获得再生植株。Kim^[2]等通过大豆子叶节中的分生组织的增殖获得了再生植株。Barwale^[3]等用未成熟种子的子叶, Wright^[4]等用大豆子叶节、上胚轴和初生叶通过大豆不定芽器官再生途径获得再生植株。Gissler 等利用不同因素对大豆未成熟子叶组织体细胞胚的发生进行处理, 从多种体细胞胚发生途径得到了可驯化并具有大量荚和种子的可育植株。Bailey^[5]等测定了基因型对诱导和保存大豆增殖性

[收稿日期] 2007-09-24

[基金项目] 石河子大学高层次人才科研启动资金专项(RCZX200614)

[作者简介] 魏小春(1983-), 男, 在读硕士, 研究方向: 蔬菜生理。E-mail: jweixiaochun@126.com

通讯作者: 郑群(1968-), 男, 石河子大学副教授, 博士, 从事蔬菜生理生态研究。E-mail: zq1508@sina.com

胚性愈伤和产量、萌发及向成熟体细胞胚转化的影响。Nadolska^[6]等成功地培养出不同育种系的大豆子叶体细胞胚发生。Santarem^[7]等描述了大豆几个栽培种未成熟子叶快速发生大量体细胞胚的改良方法。Komatsuda^[8]等, Jia Li 等等进行了大豆体细胞发生途径再生的基因型筛选工作, 大部分都获得了再生植株。

1.2 花生组织培养

花生的组织培养工作起步较晚。自 20 世纪 50 年代末期, Steward 等培养花生韧皮组织开始, 花生组织培养至今已有 50 年的历史, Heatley 等、Chen 等及梁连登等分别报道了茎尖培养获得再生小植株。Pittman 等和 Kerry 等分别研究了花生叶片不定芽的发生过程及其影响因子。不少学者(Venkat-achalam 等; 李爱民等; Bhatia 等等) 利用胚轴和子叶切段进行不定芽的培养, 指出不同外植体来源对花生离体培养芽分化影响很大。Sastri 等和 Ihson 等分别从子叶和胚的愈伤组织诱导产生出芽体。瞿桢等报道了未成熟胚丛生芽和植株再生。张书标等用花生幼苗叶节为外植体, 诱导产生大量的丛生芽。Sellars 等以未成熟胚为外植体, 诱导出体细胞胚。Bansal 等诱导出少量的花粉胚, 但未能获得再生植株。Baker^[9]等离体培养幼叶产生体细胞胚, 指出不同大小叶片切段对体细胞胚的诱导率有明显影响; 并研究了不同激素类型对花生未成熟子叶体细胞胚形成的影响, 认为 2,4-D 对体细胞胚的形成效果优于 NAA。也有学者认为, NAA 对花生体细胞胚的诱导无效(Hazra 等)。George^[10]等报道了基因型和外植体来源对体细胞胚形成的影响, 结果认为, 外植体的基因型和外植体的来源对体细胞胚的形成影响很大, 未成熟胚轴是诱导产生体细胞胚的很好材料, 未成熟子叶的感应率和每个外植体产生的体细胞胚平均数很低。

1.3 苜蓿组织培养

Saunders^[11]等首先从苜蓿愈伤组织上获得了再生植株, 其它一些种的苜蓿也通过培养细胞和组织获得了再生植株。Johnson 等和 Kao 等利用苜蓿幼芽获得原生质体形成体细胞胚产生植株。Xu 用苜蓿根尖细胞原生质体得到再生植株。Navak 和 Konecna 用叶柄诱导形成体细胞并分化出植株。李聪等用苜蓿子叶接种, 何茂泰等利用野生黄花苜蓿的花药分化出完整植株。Finstad^[12]等鉴定了苜蓿叶柄衍生的愈伤培养物在体细胞胚发生的感受期, 结果表明其存在一种天然的感受性, 而一些植物生长素(2,4-D)可触发诱导。Lai 等在苜蓿体细胞胚成熟过程中增加营养能够提高籽苗的活力。Kamp^[13]等通过改善苜蓿酸铝耐受性的生物技术得到了用于胚发生诱导的大量健壮愈伤。Lecouteux 等进行了提高苜蓿干燥体细胞胚籽苗活力的尝试。Senaratna 等发现, 紫苜蓿种衣抑制体细胞胚早熟萌

发, 并缺少耐干性。Maria 等培养出天蓝苜蓿再生植株。时永杰等对苜蓿子叶、下胚轴、茎、花茎、叶、花序、子房、花药等进行离体培养, 诱导分化成苗。

1.4 蚕豆组织培养

国外蚕豆组培研究始于 20 世纪 70~80 年代, 研究者认为茎尖、上胚轴、茎基节作外植体, 在适宜的培养条件下, 诱芽和生根的效果较好, 继代多次仍然保持旺盛的芽分化能力。Jejklova, Thgan, Sargh 等, 在黑暗条件下发芽 14 d 成苗的子叶节和茎基节为外植体培养得到的再生苗, 后代性状与其原始群体种子繁殖的后代表现一致。Griga^[14]等以合子胚、茎尖为外植体进行培养, 获得了开花的再生植株。Sayegh 以茎尖、茎基节为外植体, 培养 1 周后出现芽, 生根培养 3 周后生根率 55%, 第 5 周达 73%。在国内, 20 世纪 80 年代初, 上海农学院黄德俐等采用秋蚕豆品种三白豆和田鸡青的下胚轴、子叶和去子叶胚为外植体, 经过培养获得了愈伤组织和 11 个绿苗; 同期西南农业大学徐正华等报道, 利用四川成胡 10 号蚕豆品种的上胚轴或下胚轴作外植体, 经培养直接获得蚕豆绿苗 5 株。

1.5 其它豆科植物组织培养

Villareal 等培养出了含羞草属 *Mimosa tenuiflora* 愈伤组织。Arrillaga 等从幼嫩洋槐外植体子叶、叶片直接诱导出不定芽, 并经过驯化可以成株。李伟^[15]等分别用山槐腋芽、胚轴和子叶得到小植株, 成活率为 77.6%。Sankhla^[16]等比较了利用赤霉素生物合成抑制剂对合欢的外植体再生苗的影响后, 得出了赤霉素状态(生物合成抑制剂或赤霉素)对产苗数起着重要作用。Sinha 等研究了利用 γ 辐射对木田菁离体愈伤生长和再生的影响, 得出低剂量辐射后再生的苗能成功地发根并形成完整的小植株。Zhao 等诱导 4 种田菁属植物的根、下胚轴和子叶而再生成苗。White 等从白车轴草子叶大量直接获得再生植株, 并经过炼苗后, 再生植株可正常开花结籽。Ganapathi 等通过建立苗尖培养物得到丛生苗, 经包裹后所有的苗都可发育, 因此, 包裹的苗尖可能用做人工种子。Marsh 等诱导黎豆和木豆的子叶节、子叶和叶形成愈伤组织, 并发根成苗。Malik 等直接从山魃豆属种子培养物中诱导出高频器官发生和整个植株再生。Thatikunta 等利用无菌木豆 3 周龄叶外植体形成了苗芽。Barna 等将未成熟的鹰嘴豆小叶和子叶经体细胞胚胎发生后再生成植株。Sagare 等通过诱导鹰嘴豆未成熟子叶和未成熟胚轴体细胞胚形成再生植株。Yamada^[17]等筛选出能形成许多拟分生组织的白车轴草愈伤培养系, 经玻璃化作用冷冻保存分生组织愈伤, 并再生成株, 植株再生率达 90%。Griga^[18]等通过对愈伤培养、器官发生和体细胞胚胎发生而形成的豌豆的农学价值分析, 得出: 与非组培植株相比, 品质和数量性状改变并不大。Hardy 等用南美羽扇豆的无菌种子进行微

繁殖成功,并发现了发根率与苗伸长程度的相关性。罗吉凤等^[19]利用贵重经济林木刺云实种子苗的茎尖、叶、茎、子叶、下胚轴和根等各切段培养出了再生植株。梁玉玲等^[20]研究了胀果甘草愈伤组织的培养,Kovalenko等建立了光果甘草毛状根培养体系。而对乌拉尔甘草的研究较少,仅有裴雁曦等研究了植物生长调节剂对甘草愈伤组织诱导的影响。邓百万等^[21]对鹰嘴紫云英、苜蓿、红豆草、甘肃棘豆、红三叶草、白三叶草、胡卢巴和扁蓿豆等 6 种豆科植物进行组织培养诱导成功。孙爱新^[22]、赵杨等^[23]也对新型的工业胶种子瓜尔豆的愈伤组织培养进行了研究。郭连钢等^[24]通过对内蒙古自治区野生豆科锦鸡儿属植物-柠条的组织培养,从未成熟胚上诱导形成愈伤组织和芽,或诱导产生小植株。

豇豆类蔬菜通常存在抗逆性较差、组织再生能力弱、人工组织培养难度较大等问题,所以有关豇豆组织培养的研究报道较少。Al-Khayri等利用豇豆栽培种 *Coronet* 离体萌发籽苗苗尖再生成苗。

2 豆科植物胚和胚乳培养

利用胚培养技术获得不育胚的植株,其目的是使幼胚不经正常的种子发育、萌发的过程而在离体条件下发育成小苗,从而克服胚败育现象。利用胚胎培养技术能够克服杂种不育,利用胚珠或子房培养可以进行试管授粉。而作为三倍体的胚乳的培养,在经济上更有其重要价值。

1983年,Christianson等从一个遗传型的未成熟胚培养获得再生植株。在一些其他的研究中,获得了体细胞胚,但进展到鱼雷期就终止发育。Lippmann等报道了大豆未成熟胚的体细胞胚胎发生。Barwale等通过大豆幼胚培养,经体细胞胚胎发生或器官发生,高频率地再生植株,几乎所有被试基因型都能成功。Baker, Eapen等从花生成熟胚成功地诱导出体细胞胚。Lecouteux等利用脱落酸、蔗糖的低温胁迫使苜蓿体细胞胚成熟,胚的质量与其总的蛋白含量相关,并讨论了与人造种子相关的胚的质量。Tian等对长日光周期适应性中国大豆体细胞胚发生作用的离体反应及谱系分析后得出,子叶反应率为 18%~98%,反应型依赖于表型。Beattie^[25]等诱导白三叶草未成熟胚产生不定芽,成苗率 77%。Chengalrayan等培养花生成熟胚至体外开花。Feng等建立了用于营救种间杂种胚的技术。Sagare等详细的阐述了体细胞胚发生,组织研究证实与愈伤期交错,从未成熟子叶和未成熟胚轴间接产生体细胞胚,从成熟胚轴则直接产生体细胞胚。Williams用看护胚乳拯救杂种胚的方法获得了白三叶草离体再生株。Delautour等用看护胚乳技术拯救四倍体狭叶百脉根×百脉根杂种,由于胚已充分成熟,不需要胚乳移植,杂种部分可育。狭叶×巨型百脉根杂种,利用看护胚乳培养心形和鱼雷形胚成

功。

3 豆科植物的花药与花粉培养

花药培养成功,一方面可以作为单倍体育种的有效技术,另一方面对于认识植物细胞的全能性和控制花粉的发育途径有重要的理论意义。通过花药培养技术进行单倍体的研究,已经取得惊人的进展。

早在 20 世纪 50 年代初期,Tulecke 首先成功地培养了几种裸子植物的成熟花粉粒,并观察到一些花粉能够不按正常发育过程而形成愈伤组织。他还用被子植物进行了实验,但失败了。Nitsch关于离体果实培养的工作,促进了对植物的幼小果实、子房、胚珠、种子、胚胎及花部各器官的培养研究。1963年,Yamada等首先报道由紫露草属植物的花药培养中分离得到了单倍体组织。值得特别提出的是 Guha 和 Maheshwari 将毛叶曼陀罗的成熟花药培养在适当的培养基上,从药室中长出了胚状体,并进一步确证了这些胚状体起源于花粉,并从胚状体获得了单倍体植株。这一研究结果使细胞全能性学说得到了广泛的证实,也给高等植物的突变体和遗传育种开辟了新的研究途径。我国科学工作者从 1970 年才开始该项研究。而豆科植物的花药培养研究工作较少,成功的例子不多;徐速等获得苜蓿单倍体植株。

大豆花药培养最早是由 Ivers^[26]等人开展起来的,通过大豆花药培养,从药隔组织形成愈伤组织,并形成类苗器官,只获得了二倍体愈伤组织。母秋华等从大豆花药培养中得到愈伤组织,但没有证明这些愈伤组织是否来源于花粉。1979年,黑龙江省农业科学院获得了大豆花粉植株。简玉瑜等通过花药培养获得了芽状物,并逐渐愈伤组织化。尹光初等用花药培养的方法,获得了花粉愈伤组织,进而分化出完整的花粉植株。刘德璞等进行了大豆花粉培养,观察到大豆花粉的分裂,并获得了大豆花粉愈伤组织。Kadlec等获得了愈伤、胚状体类似物;叶兴国等人通过变动氨态氮和硝态氮比例,增加有机氮等方法分化了一个根、芽齐全的小植株。由于大豆花药培养的难度大,再生植株困难,40 多年来的进展一直很缓慢。Vijay等培养木豆花药诱导胚胎发生,并进一步发育成完整小植株。Zagorska等在用低温和低剂量 γ 射线处理后得到苜蓿单雄生殖苗。何茂泰等从野生黄花苜蓿、赵桂兰等从大豆花药、苟克俭等从甘草花药、曾银位等^[27]和李俊宽等^[28]从花生花药中也获得再生植株。

4 豆科植物细胞悬浮培养

悬浮细胞培养增殖速度快,能提供大量的均匀的植物细胞。在生产药物或其它有用的天然产物等方面,有些已初见效果。

20 世纪 40 年代末到 50 年代初,由于在植物生

理及实验形态研究方面产生了许多问题,使植物组织培养的研究进入了一个新的活跃时期。Skoog 和崔微在烟草茎切断和髓培养以及器官形成的研究中发现腺嘌呤或腺苷是可以解除培养基中生长素对芽形成的主要条件之一。经过 Steward 等人对胡萝卜根外植体的培养,于 1958 年他们在悬浮培养中成功地诱导形成了胚状体。1959 年, Melchers 和 Berqmann 培养了金鱼草单倍体苗的组织。在几次继代培养中能保持单倍体状态,但以后倍性则增加。单倍体组织培养或悬浮培养对于研究突变具有特别的意义。Steward 等的工作及 Skoog 等的研究,为组织培养中的器官形成和胚胎发生的研究奠定了基础,使早年提出的细胞全能性假说,得到了科学的证实。20 世纪 50 年代,组培技术又有了较大的发展。使悬浮培养细胞可以通过继代培养进行繁殖。Muir 提出的“看护培养”以及 Berqmann 的琼脂平板培养法,使获得单细胞无性系的一些技术得到发展。根据 Tamaki 的研究,甘草属的欧亚甘草 (*Glycyrrhiza glabra*) 的悬浮培养物能合成不少甘草甜素(占干重的 3%~4%);并且以培养物的提取液处理纸烟草的烟叶要比甘草根处理的烟草要香。经研究证明,在日本用作轻泻剂的决明 (*Cassia tora*) 其愈伤组织培养物中所含的醌类,诸如大黄酚、大黄素和大黄素甲醚(占干重约 6%)比整株种子的含量多 10 倍以上。张根发^[29]等利用光棘豆悬浮细胞原生质体及草木樨状黄芪单细胞培养出再生植株。刘淑兰等利用苜蓿无菌苗的子叶、下胚轴悬浮培养后诱导出胚状体并得到再生植株。张春荣等^[30,31]利用激素处理野葛细胞悬浮培养,更进一步的研究了葛根素合成的影响因素以及工业化方式。

5 豆科植物原生质体培养

通过对原生质体融合的研究,已获得体细胞杂种植物。诱导原生质体融合,进行细胞杂交,可能是克服远缘杂交中某些障碍的重要手段。

Cooking^[32]等开始用真菌的纤维素酶来分离植物的原生质体并获得成功。现已可由多种植物的不同组织得到原生质体,这种分离的原生质体可重新长壁,并进行分裂,在一些材料中形成细胞团。因此,原生质体培养已成为遗传工程研究的好材料。原生质体融合的研究中,通过 PEG、高 Ca、高 pH、NaNO₃ 等方法,已在多种植物原生质体之间看到融合。这无疑会给高等植物的遗传育种带来深远的影响。

豆科植物在国民经济生活中占重要位置。Newell 和 Hammatt 首先在多年生野生大豆 (*G. canescens*, *G. clandestina*) 原生质体培养上获得成功。1980 年高国楠等人首先从豆科植物苜蓿的叶片中分离和培养叶肉原生质体,并通过胚状体再生植株获得成功,大豆、豌豆、赤豆等也相继获得由原生质

培养的植株。许智宏等用根尖为材料,李学宝等人以未成熟子叶为材料经原生质体培养获得植株。继而卫志明、许智宏^[33]等用栽培大豆未成熟种子的子叶分离原生质体经培养得到了再生植株。Wang 等通过水稻和大豆、苜蓿以及百脉根的原生质体融合得到杂种愈伤。张谦等通过研究埃斯基红豆草下胚轴愈伤组织原生质体的培养,得到的苗分化出根并得到再生植株。Brandt^[34]等利用鹰嘴豆顶端分生组织和子叶离体再生生成正常植株并能开花结籽。Mallikarjuna 等很好的利用了胚胎拯救来进行木豆野生种和栽培种的杂交。Zhao 等分离出田菁子叶原生质体,并诱导分化成苗,苗繁殖率 58%,生根率 100%。Rose^[35]等通过苜蓿原生质体培养得到具有卡那霉素抗性愈伤组织诱导成的植株。Vessabutr^[36]等开发了快速繁殖百脉根原生质体的方法。Li 等开发了一种花生原生质体融合和植株繁殖的方法。Selvi 等研究了绿豆的离体繁殖(叶、下胚轴和种子)以及原生质体培养(叶肉和下胚轴细胞)。Zafar^[37]等通过苜蓿外植体(子叶、下胚轴和根)和原生质体(无菌苗叶片)诱导愈伤组织再生成植株。以往为豌豆建立的原生质体再生体系不适用于转化, Petra 报道了一种将高再生率同高转化能力结合在一起的,通过器官发生的豌豆原生质体再生系统。而大豆(周蓉等;卫志明等;张贤泽等;肖文言^[38])、天蓝苜蓿(张相歧^[39]等)、日本小豆(Takashi 等)、花生(周蓉等)、决明(周延清等)、蚕豆(卫志明等)、野生大豆(卫志明)、红豆草(罗希明等)、苜蓿和百脉根的原生质体培养也相继有人报道。李德红等^[40]以黄化绿豆幼苗下胚轴原生质体为材料,探讨了钙信使在激动素诱导原生质体体积变化中的作用。

6 豆科植物转化体系的建立

外源基因导入大豆,首例报道见于 1984 年。而转基因大豆植株诞生于 1988 年,由 Monsanto 公司报道,这是遗传工程应用于大豆改良上的一个里程碑。此后,McCabe 等利用基因枪转化大豆未成熟胚的生长点,Christou 等利用基因枪转化大豆茎尖;Finger 等用 Biolistics 基因枪转化胚性悬浮细胞;Sato 等用 Biolistics 基因枪转化未成熟胚茎尖及分裂的大豆悬浮细胞培养物;Remande 等建立了向日葵和大豆的转化和再生系统,从而开发了将胚珠导入技术应用与大豆的再生系统;Baker 等建立了可重复、高效的用于大豆转化研究的繁殖系统。Stewart 等利用基因枪转化大豆体细胞胚均获得成功。在国内,卫志明等用 PEG 法,将外源基因导入到大豆的原生质体中获得了 27 棵转基因植株,其转化效率达到了 0.6%,这是通过原生质体途径转化大豆外源基因的首例报导。燕飞等^[41]利用发根农杆菌转化胀果甘草的研究,为规模性培养胀果甘草的有

效成分提供数据基础。张振霞等^[42]对豆科牧草苜蓿、百脉根和三叶草的基因工程进行了研究综述,总结了通过基因工程技术对豆科牧草进行改良和培育。由于豆科植物蒺藜苜蓿的基因组较小,二倍体,遗传学简单,遗传转化相对容易,再生时间较短,因此成为豆科重要的模式植物之一^[43,44]。刘艳芝等^[45]以豆科植物百脉根子叶为转化受体,通过根瘤农杆菌介导方法将外源目的基因 Bar 基因和 Gus 基因导入,经筛选分化、再生,得到具有 Basta 抗性的转基因植株。俞金蓉等^[46]对紫花苜蓿的生物技术研究进行了详细的总结,从组织培养、遗传转化、分子杂交、分子标记等方面阐述了国内外的研究现状及发展趋势。韦正乙等^[47]以 Bar 基因为标记基因,以从酵母中克隆的耐盐基因 HAL1 为目的基因,构建了植物表达载体 pCHAL1。以子叶为外植体,用农杆菌介导法转化豆科植物百脉根。抗性再生苗经 PCR 方法鉴定,HAL1 基因阳性率为 46.7%。初步证明,HAL1 基因已整合到百脉根基因组中,且转基因植株的表型正常。

7 展望

豆科植物植株再生相当困难。近年来,植物组织和细胞培养技术迅猛发展,其应用价值也日益提高。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。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。对于籽用豆类难以再生植株。一般要降低生长素浓度或提高细胞分裂素浓度。组织培养中植物发育的深入研究,重新肯定了器官建成和体细胞胚胎发生的基本模式,和促进其形成的因子,以及增进了对其固有复杂性的了解。

未来的重点应放在及时设计从长期培养物再生植株的系统。高等植物的遗传工程将依赖从单个细胞,比如原生质体再生植株的能力,因此,以后的研究应强调建立和保持细胞培养物染色体的稳定性。这又有可能扩大从细胞培养物再生的作物种类。从细胞培养的再生植株是一个可供利用的遗传变异的新来源。只有当可从细胞培养有效地再生植株时,这种体细胞发生的变异才能成为有用的变异源。没有重要农作物的恒定再生,植物细胞培养在农业上的应用将是有限的。细胞培养中能够产生体细胞胚,使得那些较难通过器官发生途径再生植株的植物有了新的途径。在诱导休眠、人造种子、冷贮藏、干燥贮藏、降温保存等几个方面可有效地利用体细胞胚。

尽管已经取得一些较大的成就,豆科植物原生质体培养仍有困难。无疑试管繁殖技术将成为未来森林、绿化树种和水果类植物理想基因型的无性繁殖方法。我们相信对于未来在这个领域所蕴藏的潜力将是无穷无尽的。单倍体在加速育成品种方面具

有尤其重要的作用。尽管取得了相当大的进展,至今主要困难是,不同作物植株的花粉培养所产生的单倍体的频率低。因而,应研究内外因素对雄核发育的影响,一种理想的体系是离体花粉和它们的原生质体的直接培养。这不但能大规模生产单倍体和纯合植株,而且会促进诱导期突变、转化和生化遗传的研究。利用单倍体培养物的突变能产生抗病、抗旱、抗虫的高产植株。体细胞杂种群体比常规有性杂种有更大变异。早已在体细胞杂种植株的群体内建立了一个已观察到的广泛的染色体数目,它导致种间核 DNA 的均一混合物。另外,广泛的均一核质组合已随原生质体融合产生了。不亲和杂交中,有生活力胚数随胚年龄而减少。培养早期胚发育是有益的。植物对人工培养的反应是受遗传控制的。这种能力似乎可整合任何基因型。其遗传模式类似“修饰基因”。胚研究新方向应是鉴别不同作物的“高反应”基因型,或经杂交和选择创造新基因型,用此作为转移“人工培养可培养性”特征转移给商品栽培品种,以利于将来遗传改良,并列入种子资源库备用。

【参 考 文 献】

- [1] Oswald, T. H., Smith A. E., Phillips D. V. Callus and plantlet regeneration from cell cultures ladiuo dover and soybean[J]. *Physiol Plant*, 1977, 39: 129-134.
- [2] Kim J et al. Plant regeneration in vitro from primary leaf nodes of soybean seedlings[J]. *J. Plant Physiol*, 1990, 136: 664-669.
- [3] Barwale U. B., Meyer M. M., Widholm J. M. Screening of G. max and G. soja genotypes for multiple shoot formation at the cotyledonary node[J]. *Theor. Appl. Genet.*, 1986, 72: 423.
- [4] Wright M. S., Ward D. V., Hinchee M. A., et al. Regeneration of soybean from cultured primary leaf tissue[J]. *Plant Cell Reps*, 1987, 6: 83-89.
- [5] Bailey M. A., Boerma H. R., Parrott W. A. Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean [J]. *In Vitro Plant*, 1993, 29(3): 102-108.
- [6] Anna Nadolska-Orczyk, Waclaw Orczyk. New aspects of soybean somatic embryogenesis[J]. *Euphytica*, 1994, 80 (1-2): 137-143.
- [7] Eliane R. Santarem. Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos[J]. *In Vitro Plant*, 1995, 31(4): 224.
- [8] Komatsuda T., Ohyama. Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean *Glycine max*[J]. *Theor Appl Genet*, 1988, 75: 695-700.
- [9] Charleen M. Baker. High frequency somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.) using mature, dry seed[J]. *Plant Cell Reps*, 1995, 15(1-2): 38-42.
- [10] Susan Eapen, Leela George. Somatic embryogenesis in peanut: Influence of growth regulators and sugars[J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1993, 35(2): 151-156.
- [11] Saunders J W., Bingham E T. Production of *Medicago sativa* plants from callus tissue[J]. *Crop Sci*, 1972, 12: 804-808.
- [12] Finstad K., Brown D. C. W., Joy K. Characterization of competence during induction of somatic embryogenesis in alfalfa

- tissue culture[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1993, 34(2): 125-132.
- [13] Kamp-Glass M, Powell D, Reddy G. B, Baligar V. C et al. Biotechniques for improving acid aluminum tolerance in alfalfa [J]. *Plant Cell Reps*, 1993, 12(10): 590-592.
- [14] Griga M, Klenoticova H. Plant regeneration in callus Cultures of faba bean (*Vicia faba* L.) [J]. *Rostlinna-Vyroba*, 1994, 40: 697-709.
- [15] 李伟, 丁维力. 山槐的组织培养及植株再生[J]. *植物生理学通讯*, 1993, 29(5): 358-360.
- [16] Daksha Sankhla, Davis Tim D, Sankhla N. Effect of gibberellin biosynthesis inhibitors on shoot regeneration from hypocotyl explants of *Albizia julibrissin* [J]. *Plant Cell Reps*, 1993, 13(2): 115-118.
- [17] T. Yamada, Sakai A, Matsumura T, Higuchi S. Plant regeneration of meristematic callus of white clover (*Trifolium repens* L.) cooled to -196°C by vitrification [J]. *Euphytica*, 1993, 70(3): 197-203.
- [18] Griga Miroslav, Stejskal J, Beber K. Analysis of tissue culture-derived variation in pea (*Pisum sativum* L.)-preliminary results [J]. *Euphytica*, 1996, 85(1-3): 335-339.
- [19] 罗吉凤, 程治英, 吴昊, 等. 刺云实的组织培养[J]. *植物生理学通讯*, 2003, 39(4): 343.
- [20] 梁玉玲, 管延英, 阳丽, 等. 胀果甘草愈伤组织培养及甘草酸含量分析[J]. *河北大学学报(自然科学版)*, 2000, 20(4): 365-368.
- [21] 邓百万, 张兆清, 刘世贵. 几种豆科牧草植物组织培养体细胞胚诱导研究[J]. *汉中师范学院学报(自然科学)*, 2000, 18(1): 72-78.
- [22] 孙爱新, 赵扬, 权俊萍, 等. 用均匀设计法优化瓜尔豆愈伤组织诱导的研究[J]. *石河子大学学报(自然科学版)*, 2004, 22(5): 386-388.
- [23] 赵扬, 吕国华, 孙爱新, 等. 瓜尔豆胚性愈伤组织诱导的初步研究[J]. *安徽农业科学*, 2005, 33(2): 245-246.
- [24] 郭连钢, 马润兰, 贺小勇. 柠条锦鸡儿 (*Caragana korshinskii*) 幼胚的组织培养和繁殖[J]. *内蒙古农业科技*, 2007(5): 46-47.
- [25] Beattie L. D, Garrett R. G. Adventitious shoot production from immature embryos of white clover [J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1995, 42(1): 67-72.
- [26] Ivers D. R, Pamler R. R, Fehr W. R. Anther culture in soybean [J]. *Crop science*, 1974, 14: 891-893.
- [27] 曾银位, 叶茂生. 花生花药培养的研究 III. ABA 及不同种类淀粉对花药愈伤组织分化之影响 [J]. *农林学报*, 2000, 49(3): 25-38.
- [28] 李俊宽, 叶茂生. 花生花药培养的研究 IV. 花粉发育与体胚形成及芽体再生的研究 [J]. *农林学报*, 2001, 50(2): 65-79.
- [29] 张根发, 罗希明. 光棘豆悬浮细胞原生质体培养再生植株 [J]. *实验生物学报*, 1994, 27(1): 117-119.
- [30] 张春荣, 李玲. 水杨酸、茉莉酸甲酯和乙烯利对野葛细胞悬浮培养生产葛根素的影响 [J]. *植物资源与环境学报*, 2003, 12(1): 56-57.
- [31] 张春荣, 李玲. 野葛幼叶细胞悬浮培养生产葛根素等 [J]. *中草药杂志*, 2003, 34(7): 653-656.
- [32] Cooking E. C. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles [J]. *Nature (Lodon)*, 1960, 187: 927-929.
- [33] 卫志明, 许智宏. 大豆原生质体培养和植株再生 [J]. *植物学报*, 1990, 32(8): 582-588.
- [34] Elke B. Brandt, Dieter Hess. In vitro regeneration and propagation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) from meristem tips and cotyledonary nodes [J]. *In Vitro Plant*, 1994, 30(1): 75-80.
- [35] Ray J. Rose, Kim E. Nolan. Regeneration of *Medicago truncatula* from protoplasts isolated from kanamycin-sensitive and kanamycin-resistant plants [J]. *Plant Cell Reps*, 1995, 14(6): 349-353.
- [36] S. Vessabutr, Grant W. F. Isolation, culture and regeneration of protoplasts from birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) [J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1995, 41(1): 9-15.
- [37] Zafar Y, Nenz E, Damiani F, Pupilli F, Arcioni S. Plant regeneration from explant and protoplast derived calluses of *Medicago littoralis* [J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1995, 41(1): 41-48.
- [38] 肖文言, 王连铮. 大豆幼荚子叶原生质体培养及植株再生 [J]. *作物学报*, 1994, 20(6): 665-669.
- [39] 张相岐, 王献平. 天蓝苜蓿原生质体培养再生植株 [J]. *植物学报*, 1996, 38(3): 241-244.
- [40] 李德红, 张瑞凤, 潘瑞焱, 王小菁. KT 和 Ca^{2+} 对绿豆下胚轴原生质体的体积和 CaM 含量的影响 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2003, 11(2): 153-156.
- [41] 燕飞, 梁玉玲, 崔东亚, 等. 发根胀果甘草的研究 [J]. *河北大学学报(自然科学版)*, 2004, 24(5): 526-531.
- [42] 张振霞, 符义坤, 储成才. 豆科牧草基因工程研究进展 [J]. *遗传*, 2002, 24(5): 607-612.
- [43] 陈爱民, 连瑞丽, 孙杰, 等. 豆科模式植物-蒺藜苜蓿 [J]. *植物生理学通讯*, 2006, 42(5): 997-1004.
- [44] 魏臻武, 盖钧镒. 豆科模式植物蒺藜苜蓿基因组研究进展 [J]. *中国草地学报*, 2006, 28(6): 83-91.
- [45] 刘艳芝, 邢少辰, 王玉民, 等. Bar 基因转化豆科牧草百脉根的研究 [J]. *吉林农业科学*, 2006, 31(5): 45-47, 55.
- [46] 俞金蓉, 王永雄, 陈丽梅. 生物技术在紫花苜蓿中的应用 [J]. *草原与草坪*, 2007(5): 65-71.
- [47] 韦正乙, 刘艳芝, 王兴智, 等. HAL1 基因转化百脉根 (*Lotus cirniculatus*) 的初步研究 [J]. *吉林农业科学* 2007, 32(1): 14-16, 46.

(责任编辑: 高红卫)

参考文献著录规则 3

论文集著录格式: [序号] 主要责任者. 文献题目 [C] // 论文集主要责任者. 论文题名: 出版地: 出版者, 出版年: 页码.

- [1] 钟文发. 非线性规则应用 [C] // 赵玮. 运筹学的理论与应用: 中国运筹学会第五届大会论文集. 西安: 西安电子科技大学出版社, 1996: 487-490.
- [2] 辛希孟. 信息拉丁语民信息服务国际研讨会论文集 [C]. 西安: 西安电子科技大学出版社, 1996.
- [3] 张志桢. 间断动力系统的随机扰动及其在守恒方程中的应用 [D]. 北京: 北京大学数学学院, 1998.