

麻类作物组织培养研究进展

曹雅琴, 郭清泉, 刘 峰

(湖南农业大学农学院, 长沙 410128)

摘 要: 论述了组织培养在生物技术上的重要作用, 概述近些年来国内外麻类作物快速繁殖、器官发生、体细胞胚胎发生、原生质体培养、花药培养的研究进展, 指出麻类作物组织培养存在的问题, 并提出展望。

关键词: 麻类; 组织培养; 愈伤组织; 生物技术

中图分类号: S563.035.3; Q813.1+2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5280(2007)05-0679-06

从1902年德国的Haber landt首次进行离体细胞培养的实验, 组织培养已经有百年的历史。经过多年的不断发展, 组织培养技术已经成为生物科学研究中的一门日臻完善的技术^[1]。组织培养在麻类作物的用途和意义广泛, 通过组织培养可以保存种质资源, 获得各种植物优良品种或纯系; 可以进行优良品种的快速繁殖、培养无毒试管苗、进行品种更新; 克服育种困难, 或进行体细胞杂交, 或进行幼胚培养; 便于诱变, 直接育成新品种; 花粉或花药培养, 缩短自交纯化过程或者多倍体诱导; 建立苧麻基因库, 细胞融合和基因工程操作等。

我国苧麻组织培养研究始于1979年^[2]; 亚麻组织培养始于1978年, 孙洪涛等率先在国际上培育出第一批亚麻单倍体苗^[3]。国外, 亚麻组织培养起步较早, 1946年Link首次报道了亚麻的离体下胚轴有再生成芽的能力^[4]。20世纪70年代末, 中国农业科学院麻类研究所和福建农业科学院等单位已开展了黄、红麻花药培养研究。经过科技工作者20多年的不懈努力, 麻类作物已经在快速繁殖、器官发生、体细胞胚胎发生、原生质体培养、花药培养等几个方面取得了一系列的成就。

1 快速繁殖

快速繁殖能够加速良种繁殖, 直接为大田提供种苗, 为组织培养研究提供无菌苗, 减少了外植体灭菌这一步骤, 并且不受天气和季节的限制。苧麻的快速繁殖研究, 从1981年就开始有了报道。颜昌敬等^[5,6]在研究

中发现, 苧麻“芦竹青”、“黄壳早”、“细叶绿”、“黑皮兜”带1~3个节的茎段在MS+1.0~2.0 mg/L 6-BA 或者MS+1.0~2.0 mg/L 6-BA+0.2~0.5 mg/L GA₃的培养基上培养, 茎段上的腋芽会逐渐长大成苗, 苗上的腋芽也会萌动成苗, 反复切取茎段培养, 可以得到大量的苗。这些苗在生根培养基上10 d左右就会长出根形成完整的植株。陈建荣^[7]以“湘苧3号”的腋芽材料进行快速繁殖, 最佳的培养基是MS+0.05 mg/L 6-BA 或者同时附加1.0~3.0 mg/L 6-BA 和0.5~1.0 mg/L NAA的培养基上, 腋芽也能再生芽, 但是再生芽上容易覆盖愈伤组织或者再生芽生长势不好。

2 器官发生

器官发生应用了细胞的全能性。一个完整的细胞, 即使已经成熟, 也还保持着回复到分生状态的能力。外植体通过器官发生的途径产生再生植株有两种方式: 一种是直接从外植体上产生不定芽; 另一种是先从外植体诱导愈伤组织, 然后从愈伤组织上诱导再生植株。

苧麻可直接从外植体上产生不定芽。1982年颜昌敬等^[8]培养“黄壳早”的茎段和叶片时, 有的茎段和叶片不经过愈伤组织阶段直接形成不定芽。1984年赵庆华等^[9]也发现“黄壳早”的腋芽试管无性繁殖苗叶片偶尔可以在培养基上不经过愈伤组织阶段直接生芽。1991年胡继金等^[10]发现MS+2.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA的固体培养基比较适合“黄壳早”叶片直接生芽, 并认为叶片的中脉处, 特别是中脉维管束的薄壁细胞容易分裂和脱分化并具有较强的分化能力。1995年潘昌立等^[11]也发现叶片不定芽的再生主要集中在中脉上。这种器官发生方式在苧麻里面发生的频率很低。

收稿日期: 2007-10-12

作者简介: 曹雅琴(1984-), 女, 湖南郴州人, 硕士研究生。

通讯作者: 郭清泉。

基金项目: 国家自然科学基金资助, 编号30571186。

在亚麻的组织培养器官发生研究中,外植体直接再生出芽的研究比较少,孙洪涛1985年略微提及,但是未报导分化再生系统。姬妍如等^[12]以“双亚5号”的子叶、茎尖、下胚轴为外植体,在B5无机+N6有机+IAA 2.0 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+蛋白胨 25 mg/L+麦芽糖 25 mg/L+活性炭 1.5 g/L的培养基上分化出芽,生根培养基为B5+IAA 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L+多效唑 0.0004 mg/L+H₃BO₃ 15 mg/L+NaMoO₄ 0.5 mg/L,构建了直接分化再生体系。

自1980年周朴华等以苧麻茎、叶为材料进行组织培养研究以来,对影响组织培养苧麻诱导愈伤组织再分化芽的基因型、外植体类型、基本培养基、激素、培养条件、添加物等进行了大量的研究^[11,13~21](表1)。从表中可以看出,对于基因型,湘苧6号、湘苧2号、芦竹青、黄壳早的研究比较多,而且适应性比较好,能够诱导出再生植株;外植体类型以子叶、下胚轴的绿芽诱导率较好,离体叶片最低;基本培养基以MS为最适合于苧麻

组织培养;激素以6-BA最适合于脱分化。在对添加物的研究中,黄记生等^[15]发现,培养基中加入椰子汁、水解酪蛋白、酵母提取膏等三种天然复合物中的一种能促进下胚轴愈伤组织分化出芽,以水解酪蛋白的作用最为显著。潘昌立^[11]证实水解酪蛋白能显著提高不定芽分化率。王晓玲^[22]研究发现,在分化培养基中加入AgNO₃或活性炭能提高愈伤组织分化率,但只加入椰子汁时,酵母提取膏抑制愈伤组织分化。此外,在研究培养条件时,潘昌立^[11]认为昼夜温差能提高愈伤诱导率和绿芽分化率。郭清泉^[20]的研究也表明,低温短日照处理和昼夜温差预处理,不仅加快外植体的愈伤诱导率,而且显著提高分化成芽率。王晓玲^[22]还发现,12 h光照/12 h黑暗处理最适合苧麻愈伤组织的生长,并且用葡萄糖作为碳源对于苧麻下胚轴愈伤组织的生长和分化都要优于蔗糖。在国外,1993年Diva Maria A. Dusi^[23]用苧麻叶片,在B5培养基上也诱导出再生植株。

表1 苧麻器官发生影响因素的研究

影响因素	主要结果	作者及年份
基因型	基因型是苧麻外植体诱导愈伤组织和再生植株的决定因素,相同条件下绿芽诱导率湘苧6号>湘苧2号>芦竹青>湘苧3号>C5	潘昌立 1995 ^[11]
	相同培养条件下,叶片诱导愈伤率湘苧2号>湘苧6号	王晓玲 2003 ^[13]
	相同培养条件下,黄壳早、湘苧2号、巴西麻6号基因型适应性强,华苧1号适应性差	王晓玲 2005 ^[14]
外植体类型	子叶愈伤组织分化芽比下胚轴晚,频率低	黄记生 1980 ^[15]
	茎段愈伤组织分化不定芽频率高于叶片愈伤组织	莫荣达 1981 ^[16]
	绿芽诱导率下胚轴>茎切段>叶片>离体叶片	潘昌立 1995 ^[11]
	子叶最容易脱分化并再分化出芽,下胚轴,茎段,叶片次之	王晓玲 2003 ^[14]
基本培养基	茎尖切成0.2,0.3,0.5 mm的小段并且带1~2个叶原基,以0.5 mm分化成苗率最高	郭运玲 2006 ^[17]
	B5, White 和 BT 培养基只能诱导产生愈伤组织,MS 和 SH 能诱导下胚轴产生不定芽,MS 培养基的分化率显著高于 SH	黄记生 1981 ^[18]
	MS, 1/2MS, N6 三种培养基,MS 最适合于茎尖培养	李树川 1992 ^[19]
	对MS进行改良,1/2MS和3/4MS基本培养基适合于诱导培养,3/4MS基本培养基也适合于分化培养,并且效果良好	潘昌立 1995 ^[11]
	MS, LS, MSB, B5, N6, Nitch, White 等7种基本培养基中,前5种培养基在附加0.5 mg/L 2,4-D和2.5 mg/L 6-BA时均能诱导湘苧3号和湘苧6号的子叶、下胚轴、叶、茎段产生愈伤组织,但对不同基因型的不同外植体而言,5种基本培养基效果不同	王晓玲 2003 ^[13]
激素	2,4-D, 6-BA, KT 或 ZT 都能诱导外植体产生愈伤组织,其中2.0 mg/L 2,4-D最快,KT最慢。下胚轴在含2.0 mg/L 6-BA培养基上可诱导愈伤,并分化出芽。诱导再分化6-BA最适浓度为2.0 mg/L,并且发现6-BA与IAA, NAA, 2,4-D使用,二者2:1的浓度比也不能诱导下胚轴分化出芽	黄记生 1980, 1981 ^[15,18]
	广西黑皮莪茎段和叶片在单独添加2,4-D, NAA的培养基上能诱导愈伤,2.0~5.0 mg/L 6-BA或ZT能诱导广西黑皮莪茎段和叶片产生愈伤并分化出芽	莫荣达 1981 ^[16]
	使用6-BA和IAA组合,可诱导叶片产生愈伤组织,利用IBA和6-BA配合使用,能使苧麻下胚轴在培养20 d左右分化不定芽	潘昌立 1995 ^[11]
	湘苧3号叶片在含有2.0~3.0 mg/L 6-BA和0~0.5 mg/L NAA的1/2 MS培养基上产生愈伤组织,并且分化出芽	郭清泉 1998 ^[20]
	6-BA, KT, ZT 分别和IBA搭配诱导苧麻叶片愈伤组织,启动外植体脱分化ZT>6-BA>KT,愈伤增殖ZT和6-BA>KT,但是ZT诱导的愈伤容易分化根,因此6-BA最有利于脱分化。湘苧3号在KT, ZT的培养基中诱导的愈伤组织不能分化出苗,在含6-BA 1.0 mg/L和GA ₃ 0.5 mg/L的培养基中分化出苗率比较高	王晓玲 2005 ^[21]

亚麻通过外植体诱导愈伤再生植株,在国内,1981年孙洪涛等^[24]完成了亚麻组织培养植株再生的初步研究,成功地利用亚麻的茎尖、子叶、下胚轴为外植体诱导出亚麻的再生植株,并且系统研究了光温条件、培养基、激素及附加物对愈伤组织诱导率及再分化频率的影响,建立了稳定的培养体系,使绿苗分化率达90%以上^[25]。苑志辉等^[26]对亚麻组培再生植株进行了连续三个世代的观察,获得了雄性不育、感病、矮秆等变异植株,有些性状变异在亚麻育种上很有利用价值。姬妍如等^[27]以法国野生种为材料,用茎秆及叶片诱导愈伤组织再分化苗,诱导培养基 B5+IAA 4.0 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+CH 200 mg/L,分化培养基 B5+IAA 0.1 mg/L+6-BA 1.5 mg/L+CH 200 mg/L,结果表明茎秆愈伤分化率和绿苗分化率均高于叶片,野生亚麻愈伤分化成苗对培养基选择性不强。野生品种常规方法繁殖比较困难,用组织培养法繁殖野生品种是一条很有效的途径。

国外,Link 等^[5]首次报道了亚麻的离体下胚轴有再生成芽的能力,20世纪70年代就有关于亚麻胚乳组培过程产生类脂肪酸组成的特性研究报道。80年代,又进行了亚麻组培过程中DNA变化的研究。英国、加拿大的科研工作者依据体细胞无性系变异理论分别培育出了抗立枯病和抗寒的亚麻新品系,为生物技术在亚麻育种上的应用揭开了序幕。90年代至今,对亚麻组织培养的基础理论研究更加深入。葡萄牙 Cunha A 等1978年报道了不同自由甾醇含量和成分与亚麻体细胞胚发生、无根苗形成和愈伤组织生长的关系^[28],找到了适合愈伤组织生长的激素水平搭配。1999年又总结了培养基参数对亚麻下胚轴外植体体细胞胚发生的影响^[29]。印度的P Jain^[30]等研究认为,组培无根苗再生需要一定的Ca²⁺浓度,但在Ca²⁺浓度不足以再生时,噻苯隆(TDZ)导致苗的形成。

3 体细胞胚胎发生

体细胞胚胎发生在植物界是一个普遍现象,是细胞全能性的一种表达方式,该研究一直为人们所重视。自1958年Reinert首先在离体的胡萝卜的组织培养中发现以来,人们已经在43科92属的100多种植物的细胞培养中获得体细胞胚^[31]。苧麻体细胞胚胎发生的研究一直到现在还没有取得大的突破。陈德富^[32,33]对苧麻体细胞胚胎发生进行了研究,将“浏阳大叶绿”子叶培养在附加0.5 mg/L CPA,0.05 mg/L BR的CXW培养基上诱导愈伤组织,然后将获得的淡黄色或浅灰绿色的颗粒状愈伤组织转移至附加0.1 mg/L CPA+

0.5 mg/L NAA+1.5 mg/L ZT的CXW培养基上继代,最后继续在添加2.0 mg/L Met+3000 mg/L YE的上述培养基上继代培养,分化出了一些相互独立的胚状体,继而发育成为畸形胚状体幼苗,但胚胎发生频率较低,试验重复性差。如何提高苧麻胚胎发生的诱导率,仍需要进一步研究。

4 原生质体培养

原生质体培养不仅可以诱导成植株,而且可以使不同种间的原生质体相互融合,形成体细胞杂种,还能通过它们裸露的质膜摄入外源DNA、细胞器、细菌和病毒颗粒。麻类作物野生种质资源非常丰富,并蕴含了许多优良的基因资源,由于种间杂交不孕性的存在,使这些基因资源很难充分得到利用。

我国苧麻原生质体培养的研究还没有取得大的突破。陈喜文等^[34,35]用“浏阳大叶绿”的子叶经过酶解游离出原生质体,得到的原生质体通过海藻酸钠包埋培养在附加0.5(1.0) mg/L 2,4-D+0.5 mg/L KT的KM8P培养基上,结果原生质体只能进行有限的几次分裂。经过进一步的研究,陈喜文等^[36,37]用苧麻子叶诱导出愈伤组织并建立悬浮细胞系,再用纤维素酶、离析酶、半纤维素酶的混合液分离悬浮培养细胞,得到的原生质体经过海藻酸钠包埋方式培养在附加0.5 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L KT的KM8P培养基上,得到肉眼可见的小愈伤组织。愈伤组织经过增殖,在含有2.0 mg/L BA的MSB培养基上可分化出芽(6.0%),分化出的幼芽在含有0.05 mg/L NAA的1/2MS培养基上即能分化出根,形成完整的植株。熊兴耀等^[38]以“多倍体3号”的试管苗为材料,由茎段诱导的愈伤组织分离原生质体,用MT+0.5 mg/L KT+0.5 mg/L GA₃+0.02 mg/L NAA+50 mg/L 水解乳蛋白+K8p+6 mg/L 蔗糖的基本培养基以低熔点琼脂糖(LMT)软包埋方式培养,5~6 d后原生质体开始分裂,20~25 d形成细胞团,随后产生愈伤组织,50~65 d能再生成完整植株,并且发现用6%的纤维素酶分离苧麻的原生质体效果较好,蔗糖和葡萄糖是比较适宜的碳源,低熔点琼脂糖(LMT)软包埋培养方式,其原生质体分裂频率高、再生成株所需的时间短。

亚麻原生质体培养研究也比较少。Barakat 和 Cocking 首次以 *L. lewissii*, *L. alpinum*, *L. altaicum*, *L. narbonense*, *L. grandiflorum* 野生亚麻的茎尖和细胞悬浮系为材料游离的原生质体进行培养,其中以 *L. grandiflorum* 为材料进行的原生质体培养获得再生植株^[39]。Ling 和 Binging 报道了以 *L. alpinum*, *L.*

amurense, *L. bologymum*, *L. perenne*, *L. salsoloides* 和 8 种 *L. usitatissimum* 为材料的亚麻原生质体的培养,并在 *L. usitatissimum* 等部分野生亚麻和 4 种 *L. usitatissimum* 为材料的原生质体培养中获得了植株再生的成功^[40,41]。苑志辉等^[42]选用亚麻 (*L. usitatissimum*) Belinka, Viking 和 7309, 948 优质品种的幼苗为材料分离原生质体,采用液体浅层培养、双层培养和琼脂岛法培养 3 种方法进行培养,其中琼脂岛法培养再生细胞的分裂启动比另两种方法早,并且细胞分化频率高。以 7309 和 Viking 为材料的培养获得了再生植株。

红麻原生质体培养的研究很少。有关研究表明^[43~45],以田间苗叶片为材料经灭菌后游离的原生质体活性极低,以愈伤组织为材料获得的原生质体可分裂生长,但仅能得到小的愈伤组织,其结果均不理想。牛英等^[46]采用暗培养 3 日龄的红麻无菌苗下胚轴,在 0.45 mol/L 甘露醇的渗透压条件下,以 5.0 mg/L 纤维素酶和 5.0 mg/L 果胶酶酶解 12 h,原生质体的产率最高,活力较强。原生质体密度 5.0×10^4 /mL,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组织的形成极为有利。

5 花药培养

花药培养又称单倍体育种。自 60 年代用曼陀罗花药培养首次获得单倍体植株以来,花药培养已在很多种高等植物上获得成功。实践表明,花药培养育种具有选择效率高,快速利用新的种质资源和缩短育种周期等优越性。我国应用花药培养技术已育成烟草、水稻、小麦等作物新品种,并取得了显著的社会和经济效益。

苎麻花药培养目前进行的研究也比较少。颜昌敬等^[47]虽然报道通过花药培养得到了花粉植株,但是没有验证这些植株是否为单倍体植株。刘国民等^[48]报道了苎麻花药和未授粉子房离体培养的研究,但是仅得到花粉愈伤组织,没有能够从愈伤组织进一步分化出芽。通过对花药离体培养得到的愈伤组织进行染色体的检查和细胞学观察,基本确定了这些愈伤组织是起源于花粉细胞营养核的单倍性愈伤组织^[49]。

国内亚麻花药培养研究始于 70 年代。1978 年孙洪涛等率先在国际上培育出第一批亚麻单倍体苗,研究了外源激素对亚麻花药、花瓣、未授粉子房去分化培养的作用^[3],在亚麻脱分化培养中生理活化功能最强的是 2,4-D,其次才是 IAA、NAA;玉米素的活化功能比 6-BA 强;并且亚麻花瓣诱导愈伤组织的频率最

高,其次是子房、花药,找到了适合亚麻花药培养的激素水平搭配。采用 B5, MS, N6 等基本培养基中的大量元素、微量元素对亚麻花药培养效果进行试验,得出了较为适合亚麻花药培养的培养基^[50],并找到了检测再生植株是否为单倍体的合适方法。宋淑敏等^[51]以 1832 (品系) × Fany (法国)、1832 × FR₂、黑亚 7 号 × 保加利亚 4 号的 F₁ 代材料及亚麻品种 7309 和爱尔兰为实验材料,亚麻花药在附加 1 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L KT 的 A 培养基上,愈伤组织的诱导率可达 46.2%,低温预处理亚麻花药下显著提高愈伤组织的产量,亚麻双层培养的效果明显好于固体培养。吴昌斌等^[52]进行了亚麻子房离体受精研究,以双亚 5 号 × 阿丽亚娜为杂交组合,在 B5 培养基中培养获得种皮不完整的种子及直接萌发的幼苗。国外,1979 年就有了关于亚麻花药培养的研究初报。近几年来,从查得文献来看,从事亚麻花药培养研究的主要是加拿大的陈余荣,他所做的是关于油用亚麻的花药培养研究(加拿大以种植油用亚麻为主),他们除了对培养基及培养条件等因素加以研究外,还将分子标记技术应用到抗锈病基因遗传和再生植株的花粉小孢子来源分类中^[53],使再生植株中的二倍体来源鉴定技术达到分子水平。

红麻的花药培养研究比较早,但是近年来的研究不多。李树川等^[54]报道了黄麻花药培养的研究,获得了愈伤组织。陈祥云等^[55]报道,红麻花药培养受基因型的影响,不同品种差异比较大,并认为 MS 培养基是获得红麻花培苗的适宜培养基,MS 培养基有利生根。

6 问题与展望

虽然麻类作物的组织培养经历几十年的发展,已经取得了一系列的成绩,但是仍然存在一些问题,有待进一步研究。

6.1 器官发生

苎麻的器官发生研究已经做了大量的工作,但是到目前为止还没有为遗传转化构建好分化率高、且稳定的再生体系。苎麻组织培养过程中,愈伤组织分化率低,多次继代以后分化率降低或者不再分化,并且愈伤组织容易褐化。苎麻的内源激素丰富,且不同的基因型之间存在的差异很大,给科研工作带来很大的工作量;在所做的研究中,研究工作者所得到的研究结果很难稳定。苎麻植物组织培养过程中出现变异是一种很普遍的现象,许多体细胞变异对植物性状改良是有益的,并可以稳定遗传,因此在植物育种中被广泛利用,是一种重要的育种手段。但是目前在苎麻的体细胞无性系变异方面,仅潘昌立做了变异规律的研究,证明了利用

体细胞无性系变异进行苧麻品种改良是可行的。进一步通过培养方法和条件的改良,建立苧麻高频率的再分化体系,以及构建适合于多种基因型的再分化体系对苧麻的遗传育种具有非常重要的意义。

在亚麻组织培养中,愈伤组织经5次以上的继代培养后,绿苗的分化频率显著下降,随着愈伤组织继代次数增加和时间的延长,愈伤组织结构由致密型向疏松型转化,并伴有褐变组织大量出现,至使绿苗分化受阻,从而影响了变异植株的产量。因此,寻找一种使愈伤组织在长时间内再分化能力保持相对稳定的培养基或方法是一个值得研究的问题。

6.2 体细胞胚发生

植物胚性愈伤组织具有良好的结构、成苗(胚)率高、适于作为外源基因受体等优点,能够为原生质体培养、人工种子制作、突变体筛选、植物基因工程等提供理想的实验体系。迄今为止,苧麻体细胞胚性愈伤组织的诱导频率不高,细胞胚胎发生的研究效果不甚理想,仅得到了畸形胚状体幼苗,试验的重复性也不是很好。而亚麻、红麻的研究更少,需要进一步研究。

6.3 原生质体培养

原生质体培养可以用于遗传转化和体细胞杂交,在作物品种改良方面起着重要的作用。虽然研究者已经利用苧麻原生质体分化出植株,但是目前还没有建立高效、稳定的原生质体再生体系。建立再生体系,是将原生质体培养应用到苧麻品种改良,创造新材料乃至培育出新品种的基础。亚麻的原生质体培养虽然已获得再生植株,但也存在再生植株频率和生根率较低的问题。红麻的原生质体培养只能得到小愈伤,很难再生出植株。

6.4 花药培养

花药培养为人工大量生产单倍体提供了有效的手段,可以为进一步的育种和遗传研究提供有用材料。苧麻的花药培养研究的很少,而且也没有取得突破性的进展。花药培养的成功将为苧麻育种形成更加有效的育种体系提供技术支持。亚麻花粉植株的诱导频率很不稳定,有些基因型甚至诱导不出花粉植株。红麻的花药培养诱导单倍体植株研究比较早,但是成果不显著,近年来没有更多的研究报道。

因此,如何进一步对麻类作物的各种组织培养方法进行研究,提高麻类作物再分化频率,从而解决麻类作物遗传育种过程中存在的组织培养技术问题,是今后的主要研究方向。

参考文献:

[1] 李浚明. 植物组织培养教程[M]. 北京: 中国农业大学出

版社, 2002: 1-9.

- [2] 周朴华, 李宗道, 徐桥生. 苧麻组织培养简报[J]. 中国麻作, 1980, (1): 31-32.
- [3] 孙洪涛, 董丽辉, 付卫东, 等. 外源激素对亚麻花药、花瓣未受粉子房去分化培养的作用[J]. 中国麻作, 1984, (3): 41.
- [4] Link GKK, Eggera V. Mode, site and time of initiation of hypocotyledonary bud in *Linum usitatissimum* L [J]. Bot Gaz, 1946, 107: 441.
- [5] 颜昌敬, 赵庆华. 用组织培养法快速繁殖苧麻良种[J]. 中国麻作, 1981, (3): 28-33.
- [6] 颜昌敬, 赵庆华. 组织培养应用于苧麻快速繁殖[J]. 上海农业学报, 1988, 4(增): 17-20.
- [7] 陈建荣, 郭清泉, 杨瑞芳, 等. 苧麻新品种湘苧3号组织培养快速繁殖法[J]. 湖南农业科学, 1998, (6): 18-19.
- [8] 颜昌敬, 胡继金. 苧麻组织培养及其在快速繁殖上的应用[J]. 中国农业科学, 1982, (1): 1-4.
- [9] 赵庆华, 颜昌敬. 苧麻叶片组织培养的研究[J]. 中国麻作, 1984, (4): 9-12.
- [10] 胡继金. 苧麻试管苗未离体叶片生芽的细胞学观察[J]. 作物学报, 1991, 17(3): 192-197.
- [11] 潘昌立, 李树川, 李育君, 等. 苧麻体细胞植株再生及其影响因素的研究[J]. 中国麻作, 1995, 17(1): 1-6.
- [12] 姬妍如, 田玉杰, 宋淑敏, 等. 亚麻直接分化再生系统的初步建立[J]. 生物技术通报, 2005, (3): 40-46.
- [13] 王晓玲, 彭定祥. 基本培养基对苧麻不同外植体愈伤诱导及分化的影响[J]. 华中农业大学学报, 2003, 22(5): 431-435.
- [14] 王晓玲, 彭定祥. 不同基因型对苧麻愈伤组织诱导及分化的影响[J]. 长江大学学报(自科版), 2005, 2(8): 64-66.
- [15] 黄记生, 莫荣达. 苧麻子叶以及下胚轴离体诱导再生植株研究简报[J]. 广西农业科学, 1980, (7): 27.
- [16] 莫荣达, 黄记生. 植物激素对苧麻茎、叶外植体器官分化的影响[J]. 植物生理学通讯, 1982, (3): 39-41.
- [17] 郭运玲, 郭安平, 刘恩平, 等. 苧麻茎尖的组织培养及其诱导植株的再生[J]. 热带植物学报, 2006, 27(1): 73-75.
- [18] 黄记生, 莫荣达. 苧麻下胚轴组织培养的器官形成[J]. 实验生物学报, 1981, 14(2): 111-114.
- [19] 李树川. 苧麻茎尖组织低温保存技术研究[J]. 中国麻作, 1992, (1): 7-11.
- [20] 郭清泉, 陈建荣, 杨瑞芳, 等. 苧麻叶片愈伤组织诱导与植株再生的研究[J]. 中国麻作, 1998, 20(2): 1-4.
- [21] 王晓玲, 彭定祥. 三种细胞分裂素对苧麻愈伤组织诱导及分化的影响[J]. 湖北农业科学, 2005, (1): 17-19.
- [22] 王晓玲, 彭定祥. 光温条件及碳源对苧麻愈伤生长和分化的影响[J]. 中国农学通报, 2004, 20(2): 1-4.

- [23] Diva Maria A Dusi. Transgenic plants of ramie (*Boehmeria nivea* Gaud.) obtained by Agrobacterium mediated transformation[J]. Plant Cell Reports, 1993, 12:625-628.
- [24] 孙洪涛,傅卫东. 亚麻花粉植株的诱导及其后代的初步观察[J]. 遗传学报, 1981, 8(4):369.
- [25] 孙洪涛,傅卫东,董丽辉,等. 亚麻茎尖、子叶、下胚轴诱导再生植株的研究[J]. 科学通报, 1983, 28(21):1332-1334.
- [26] 苑志辉,孙洪涛,吴昌斌,等. 亚麻体细胞无性系的建立及其植株再生[J]. 中国麻业, 2001, (4):8.
- [27] 姬妍如,田玉杰,苑志辉,等. 用组织培养法繁殖野生亚麻的研究[J]. 中国麻业, 2001, 23(4):8-12.
- [28] Cunha A. Differences in free sterols content and composition associated with somatic embryogenesis, shoot organogenesis and calli growth of flax[J]. Plant Science Limerick, 1997, 124(1):20.
- [29] Cunha A. Influence of medium parameters on somatic embryogenesis from explants of flax (*Linum usitatissimum* L.): effect of carbon source, total inorganic nitrogen and balance between ionic forms and interaction between calcium and zeatin[J]. Journal of Plant Physiology, 1999, 155:4-5.
- [30] Jain P. Stimulation of shoot regeneration on *Linum hypocotyl* segments by thidiazuron and its response to light and calcium[J]. Biologia Plantarum, 2001, 44(4):128.
- [31] 秦明波,云月. 植物生物技术讲座(七):植物体细胞胚胎发生和人工种子[J]. 生物学通报, 1994, 29(6):24-26.
- [32] 陈德富,陈喜文,周朴华,等. 麻类愈伤组织多样性及体细胞胚胎发生的研究[J]. 湖南农业大学学报, 1996, 22(3):239-244.
- [33] 陈德富,陈喜文. 苧麻体细胞胚胎发生研究初报[J]. 植物学通报, 1998, 15(3):65-68.
- [34] 陈喜文. 苧麻组织培养和原生质体培养[J]. 作物研究, 1994, 8(增刊):85-88.
- [35] 陈喜文,陈德富,周朴华,等. 苧麻子叶原生质体的分离和初步培养[J]. 湖南农学院学报, 1995, 21(2):11-14.
- [36] 陈喜文,陈德富,周朴华,等. 苧麻原生质体培养及植株再生[J]. 植物学报, 1996, 38(2):43-46.
- [37] 陈喜文,陈德富,周朴华,等. 苧麻悬浮细胞原生质体培养再生植株[J]. 作物学报, 1996, 22(1):112-116.
- [38] 熊兴耀,甘霖,郑思乡,等. 苧麻原生质体再生植株及影响因子的初步研究[J]. 农业生物技术学报, 1996, 4(2):147-152.
- [39] Barakat MN, Cocking EC. An assessment of the cultural capabilities of protoplasts of some wild species of *Linum* [J]. Plant Cell Reports, 1985, (4):164-167.
- [40] Ling HQ, Binging H. Plant regeneration from protoplasts in *Linum* [J]. Plant Breeding, 1987, 98:312-317.
- [41] Ling HQ. Improvement of plant regeneration from *Linum* protoplasts by induction of somatic embryogenesis[J]. Plant Physiol, 1992, 139:422-426.
- [42] 苑志辉,卫志平,徐淑平,等. 亚麻原生质体培养及植株再生[J]. 实验生物学报, 2000, 33(2):163-168.
- [43] Zhan YX, Yao DX, Harris PJC. Isolation and culture of protoplasts from callus tissue of *Hibiscus syriacus* L [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1991, 25(1):1-5.
- [44] Reichert NA, Liu DL. Protoplast isolation, culture, and fusion protocols for kenaf (*Hibiscus cannabinus* L) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1996, 44(1):201-210.
- [45] Liang XZ, Ding SW, Wong SM. Development of a kenaf (*Hibiscus cannabinus* L) protoplast system for a replication study of *Hibiscus schlorotic* ringspot virus [J]. Plant Cell Rep, 2002, 20(1):982-986.
- [46] 牛英,刘恒蔚,周瑞阳,等. 红麻下胚轴原生质体的分离与培养[J]. 湖北农业科学, 2006, 45(2):20-21.
- [47] 颜昌敬. 苧麻花药培养研究初报[J]. 上海农业科技, 1986, (4):13-17.
- [48] 刘国民,邓其明,郑思乡,等. 苧麻花药和未授粉子房离体培养的研究[J]. 作物研究, 1994, 8(增刊):73-78.
- [49] 刘国民. 苧麻花药离体培养的研究 I. 雄核发育的细胞学观察[J]. 海南大学学报, 1994, 12(2):121-128.
- [50] 孙洪涛. 应用多因子试验的方差分析筛选亚麻花药培养基[J]. 植物学通报, 1988, (3):176-181.
- [51] 宋淑敏,孙洪涛,傅卫东,等. 亚麻花药培养研究的进展[J]. 中国麻作, 1996, 18(4):4-6.
- [52] 吴昌斌,孙洪涛,宋淑敏,等. 亚麻子房离体受精研究初报[J]. 中国麻作, 1997, 19(2):16-17.
- [53] Chen Y. Identification of microspore-derived plants in another culture of flax (*Linum usitatissimum* L.) using molecular markers[J]. Plant Cell Reports, 1998, 18:1-2.
- [54] 李树川,陈祥云. 黄麻花药培养的研究进展[J]. 中国麻作, 1980, (1):32-33.
- [55] 陈祥云,李树川. 黄麻花粉植株诱导的研究[J]. 中国麻作, 1985, (3):1-4.