影响植物组织培养成功的因素

张彦妮

(东北林业大学园林学院, 哈尔滨, 150040)

中图分类号: S603.6 文献标识码: B 文章编号: 1001-0009(2006)03-0132-02

在细胞学说基础上发展起来的植物组织培养是指将植物的细胞、组织或器官的一部分, 在无菌的条件下接种到特定的培养基上, 在一定的容器内培养, 从而得到新个体的方法, 因为是脱离母体培养, 所以也叫离体培养。自 1934 年美国学者 White 等用番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 根进行组织培养, 首次建立了活跃生长的无性繁殖系以来, 经过 100 多年的研究, 植物组织培养现已成为一门日臻完善的技术。近 20 年来, 植物组织培养技术已成为农林业生产及科研的重要组成部分, 成为生物工程技术应用于农业和林业等方面取得进展最大的领域。通过组织培养可获得各种植物优良品种或纯系, 可以进行优良种和品种的快速繁殖、多倍体诱导、次生代谢产物生产、细胞融合和基因工程操作等方面。其中离体快繁是组织培养在林木生产上应用最广泛、最成功的一个领域。但是, 影响植物组织培养成功的因素很多, 一般来说, 主要有: 培养基的成分及 pH 值、供体植物的基因型、外源激素的种类和浓度、外植体的年龄和来源、碳源的种类和浓度, 此外, 继代次数、培养条件、培养方式等也会影响培养成功率^[1]。

1 培养基成分

1.1 基本培养基及 pH 值

不同植物种类、不同外植体培养所要求的基本培养基均有差异。目前植物培养采用的基本培养基主要有 MS、B5、WPM、1/2MS 培养基, 每种培养基中盐浓度不同。培养基中的盐浓度对外植体褐变和试管苗玻璃化均有一定影响。盐浓度过高会导致外植体褐变^[2]。培养基中的氮源除了供给培养物氮素营养外, 还原态氮还具有促进细胞分裂的作用, 硝态氮具有抑制细胞分裂的作用。Kalpana 认为, 培养基中高浓度 NH_4NO_3 对植株再生是必需的, 甚至能代替植物生长调节剂^[3]。

培养基的 pH 值因培养材料不同而异, 大多数植物种类要求 pH 值在 5.0~6.0。适当降低培养基 pH 值可以降低多酚氧化酶的活性和底物利用率, 从而抑制褐变。培养基的 pH 值还可以通过影响培养物的营养元素的吸收过程来影响呼吸代谢、多胺代谢与脱氧核糖核酸合成、植物激素进出细胞等作用, 进而直接或间接地影响愈伤组织形成及形态建成^[4-6]。

1.2 外源激素的种类和浓度

基本培养基能保证培养物的生存与最低生理活动, 但只有配合使用适当的外源激素才能诱导细胞分裂的启动、愈伤组织生长以及根、芽的分化等合乎理想的变化。

常用于组织培养的植物激素有两大类: 即生长素类和细

胞分裂素类。

1.2.1 生长素类 生长素类的主要作用是重新启动有丝分裂, 使已停止分裂的植物细胞恢复分裂能力。常用的生长素有 2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)、NAA(萘乙酸)、IAA(吲哚乙酸)、IBA(吲哚丙酸), 植物生长激素通常被用来诱导愈伤组织形成及其增殖^[7]。不同植物种类对生长素的浓度反应不同, 对多数植物材料的培养而言, 2,4-D 是生长素中诱导愈伤组织和实现细胞悬浮培养最有效的物质, 常用浓度为 0.2~2.0 mg/L, 较高浓度的 2,4-D 对 (*Chinese Leymus*) 组织培养再生芽的诱导和再生非常有效^[8]。在 *A. adsurgens* 愈伤组织诱导的培养基中, 高浓度的 2,4-D 结合低浓度的 BA 对提供胚性愈伤组织的发生是需要的。植物的生根多数是用生长素单独实现的^[9]。有人认为适量浓度的脱落酸 (abscisic acid, ABA), 常可抑制不正常胚状体的形成, 防止胚状体的过早萌发。

1.2.2 细胞分裂素 细胞分裂素的主要作用是促进细胞的分裂和扩大, 使茎增粗, 而抑制茎伸长, 诱导芽的分化, 促进侧芽萌发生长。常用的细胞分裂素有激动素 (KT)、6-苄基腺嘌呤 (6-BA)、玉米素 (ZT)、噻二唑苯基腺 (TDZ) 等。细胞分裂素在诱导愈伤组织的时候, 一般要和生长素配合使用, 增强生长素的诱导作用和效果。当诱导出胚性愈伤组织之后, 在进行愈伤组织的增殖(继代)、分化再生植株或诱导体细胞胚时, 细胞分裂素的独特作用就得到了体现, 因为此时培养基中生长素的浓度一般要降低甚至除去。在愈伤组织的诱导、器官发生和增殖过程中, 细胞分裂素和生长素的比例是非常重要的^[10], 当细胞分裂素含量高时产生不定芽, 反之, 产生不定根或愈伤组织^[11]。而两者的比例因内、外源激素的含量不同而不同, 并且内、外源激素对植物离体培养形态发生起着相互的连续性作用^[12,13]。BA 对芽的增殖效果比其他细胞分裂素的效果要好^[14]。据分析, BA 诱导芽分化的机理是该激素使植物体的代谢能力加强, 进一步诱导组织内天然激素如玉米素的产生, 进而通过天然激素诱导器官发生。现有许多植物在附加 BA 的培养基上得到了较多的再生不定芽, 建立了较为完善的组织培养再生体系。TDZ 是人工合成的苯基脲衍生物之一, 具有很强的细胞分裂素活性, 也能刺激试管内培养细胞的内源生长素水平, 对植物芽的增殖和再生、体细胞胚胎发生等有着重要的作用。据报道, TDZ 对木本植物组织培养来说是最有效的。已经应用于多种木本植物组织培养体系的建立^[16,17]。另外, 细胞分裂素对某些植物胚性细胞的诱导有抑制作用。因此, 要根据需要选用适当的细胞分裂素种类。

1.2.3 碳源 碳源是植物组织培养不可缺少的物质, 它不仅

能给外植体提供能量,而且也能维持一定的渗透压,常用的碳源有果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、山梨醇等,其中蔗糖能支持绝大多数植物离体培养物的旺盛生长,一直被作为植物组织培养的标准碳源而广泛应用。近来,其他糖类对植物组织培养的效应,引起广泛关注。许多研究表明蔗糖并不一定是最佳碳源,不同植物对不同糖类的反应不完全相同。多数植物组织培养物除蔗糖外,在葡萄糖、果糖为碳源时也能良好生长。糖类的浓度大小不仅影响愈伤率,而且还影响愈伤组织的质地和结构。当糖类(蔗糖或葡萄糖)浓度由4%降到1%时,西黄松子叶愈伤组织由原来致密、干燥状变为松软包围着一层粘液膜的软湿状。山梨醇作为一种糖源可以支持苹果或其他蔷薇科植物愈伤组织的生长。因此,在进行植物组织培养时,选用合适的糖浓度并且配以适当的激素,不仅会提高胚性愈伤组织的诱导率,改善愈伤组织的质量,而且可以控制植株的再生途径,从而提高组织再生的频率。

1.2.4 琼脂 琼脂在组织培养中作为凝固剂,它的主要作用是使培养基在常温下凝固,以做固体培养用。使用浓度常为0.6%~0.8%。一般认为,琼脂含量低容易导致玻璃化现象发生。另外,琼脂还可以吸附某些代谢有害物质。

1.2.5 活性炭 活性炭(Ac)不是组织培养中的必需成分,但现有资料显示,活性炭在许多木本植物的组织培养中起着重要作用。它能吸收潜在的有害物质包括植物细胞分泌的酚类物质,从而减轻培养物的褐变^[14];还能促进芽和根的发生。但活性炭具有较强的吸附能力,它能使培养基内有效物质的浓度降低,从而影响植物的分化^[18]。

2 外植体的选择

植物不同的器官和组织,对离体培养的反应是不同的,其形态发生的能力也是不同的。外植体的种类是影响组织培养效果的主要因素之一。即使是相同的器官,由于其生理学或发育年龄的差异,也会影响形态发生的类型及方式。

同一植株上不同器官的再生能力有所不同,许多植物茎段愈伤组织诱导率高于叶片^[19,20]。外植体脱分化难易程度与其生理状态有关^[21]。

外植体的年龄对组织的再生能力有很大的影响。通常植株的幼嫩组织,如胚、子叶、实生苗的嫩茎和嫩芽、幼龄植株上的组织作为外植体要比老龄化植株上的组织容易诱导成功。一般情况下,外植体越幼嫩就越容易获得再生植株。

外植体的选择和处理对褐变有较大影响。Chevre分析了欧洲栗的酚类含量的变化,结果表明,幼龄材料酚类化合物含量少,而成龄材料比较多。

不同季节取材,对植株的再生能力影响差异很大,通常春季是植物生长旺季,植株再生能力也最强,是进行组织培养的最适季。

3 其它影响因素

除了上述因素对植物组织培养中体细胞无性系的建立有广泛的影响外,其它诸如培养条件(包括通气状况、光线、温度)、培养时间、材料处理、接种方式、实验人员的经验以及继代时间的长短等因素也影响到培养时胚性愈伤组织的发生频

率和质量,从而影响组织培养再生体系的建立。

总之,组织培养技术已被广泛地应用于农林业的各个方面,农林业生物技术上的许多成就,尤其是在应用方面的进展,都与植物组织培养技术体系的建立密不可分。因此,植物组织培养在生物技术领域中占有不可替代的地位。深入系统地研究各种植物的组织培养再生体系建立的条件和各个影响因素,对于完善生物技术的理论体系,扩大其应用成果,均有着重要意义。

参考文献:

- [1] 张红晓,经剑颖.木本植物组织培养技术研究进展[J].河南科技大学学报(农学版),2003,23(3):66~69.
- [2] 高国训.植物组织培养中的褐变问题[J].植物生理学通讯,1999,35(6):501~506.
- [3] Kalpana P., Vishnoi R. K., Kothari S. L. Plant Regeneration from Embryogenic Callus of Finger Millet *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. on Higher Concentrations of NH_4NO_3 as a Replacement of NAA in the Medium. *Plant Science*, 1997, 129: 101~106.
- [4] 李浚明.植物组织培养教程[M].北京:中国农业大学出版社,2002:65~67.
- [5] 黄学林,李筱菊.乙烯和多胺的生物合成与植物体细胞胚胎发生[J].植物生理学通讯,1995,31(2):81~85.
- [6] 邓成木,刘进平.热带亚热带植物繁殖[M].长沙:湖南科学技术出版社,2001:97~99.
- [7] Fernando SC. Gamage CKA. Abscisic Acid Induced Somatic Embryogenesis in Immature Embryo Explants of Coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Sci.*, 2000, 151: 193~198.
- [8] Liu GS, Liu JS, Qi DM, Chu CC et al. Factors Affecting Plant Regeneration from Tissue Cultures of Chinese *Leymus* (*Leymus chinensis*). *Plant Cell Tiss. Org.* 2004, 76: 175~178.
- [9] 瞿丽华.植物生长调节物质对组织培养中不定芽不定根的作用[J].辽宁师专学报,2000,2(2):97~99.
- [10] Ramage C., Williams R. R. Mineral Nutrition and Plant Morphogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2002, 38: 116~124.
- [11] 谷瑞升,蒋湘,郭仲琛.植物离体培养中器官发生调控机制的研究进展[J].植物学通报,1999,16(3):238~244.
- [12] 瞿凯荣,戴若兰.植物体细胞胚胎发生的分子生物学[M].北京:科学出版社,2000:22~24.
- [13] 崔凯荣,邢更生,周功克,等.植物激素对体细胞胚胎发生的诱导与调节[J].遗传,2000,22(5):349~354.
- [14] TANG H R, REN I L, Reustle G, et al. Plant Regeneration from Leaves of Sweet and Sour Cherry Cultivars. *Scientia Horticulturae*, 2002, 93:235~244.
- [15] 陈桂芳,姜利华.银荆相思组织培养及快繁技术研究[J].西南农业大学学报(自然科学版),2004,26(2):196~197.
- [16] D'Onofrio C., Morini S. Development of Adventitious Shoots from in Vitro Grown *Cydonia oblonga* Leaves as Influenced by Different Cytokinins and Treatment Duration. *Biologia Plantarum*, 2005, 49(1): 17~21.
- [17] Zeliha Ipekci, Nermin Gozukirmizi. Indirect Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Leaf and Internode Explants of *Paulownia elongata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2004, 79: 341~345.
- [18] 李师翁,范小峰,卢东平.大果良种沙棘愈伤组织诱导及植株再生的研究[J].西北植物学报,2001,21(2):262~266.
- [19] 李琰,张朝红,崔宏安,等.杜仲愈伤组织诱导的研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2003,31(5):153~157.
- [20] 王平,曹福祥,周晓慧,等.针叶十大功劳愈伤组织诱导研究[J].经济林研究,2003,21(4):24~26.
- [21] 金晓玲,何平.大叶榉的组织培养与植株再生植物[J].生理学通讯,2003,39(2):149.