

# 第三章 愈伤组织培养(P76)

# 愈伤组织培养(**callus culture**)

- **定义:**指将外植体接种到培养基上，进行愈伤组织诱导、生长和分化的培养过程。

**愈伤组织**(callus): 植物体的局部受到创伤刺激后，在伤口表面部位的细胞脱分化而而不断增值形成松散排列、无特定结构和功能的薄壁分生细胞群。

愈伤组织培养已被广泛的用于植物突变体筛选、植物细胞转化以及无性快速繁殖等方面的研究。同时，未分化愈伤组织也是植物细胞悬浮培养及原生质体分离和培养主要的材料来源和良好的遗传转化系统。

# 第一节 愈伤组织的诱导和分化

## 一. 愈伤组织的诱导

- 诱导愈伤组织的关键主要是培养条件，其中激素的成分和浓度是最重要的因素。

**脱分化：**从分化状态（细胞分裂已停止）转变为具有分裂能力的分生状态细胞并形成未（脱）分化的愈伤组织的过程。

## 組織培養中的脫分化和愈傷組織的形成



(a)



(b)



(c)

↑ 圖 5-4 文心蘭的(a)根、(b)莖與(c)葉等培植體經誘導後形成癒傷組織



- 从外植体脱分化形成愈伤组织大致可分为三个时期：

诱导期

分裂期

分化期

## 愈伤组织的形成过程

### 愈伤形成大致分为三个时期

1、**启动脱分化时期：即诱导期(启动期)**，诱导期是细胞正在准备分裂的时期。

在诱导期，细胞的大小仍然和外植体时一样，因此外观上未见明显变化，但代谢活化了，细胞内一些大分子代谢动态已发生明显的改变，细胞正积极为下一步分裂进行准备。细胞质增加，出现活跃的原生质流动，贮藏物质淀粉等消失；细胞改变了原有的代谢方式，合成代谢加强，迅速进行蛋白质和核酸的合成，为细胞分裂做准备。

**生长的诱导**:植物的组织、细胞离体培养时，如果给予一定的条件，使已分化成熟（停止分裂）的细胞重新分裂，增殖生长。

## 影响愈伤组织诱导的因素

**植物种类、生理状况**

脱分化难易因物种、器官及其生理状态而异，烟草、胡萝卜易，禾谷类难，花器官易，茎叶难，幼嫩组织易，成熟老组织难。

**外部因素不同，诱导期不同。**

**弱光下植株比强光下的植株外植体易于诱导分裂**

**二氧化碳抑制诱导分化**

**生长调节剂诱导细胞开始分裂**

**损伤刺激能加速脱分化进行，有时还是某些材料能否**

**脱分化的决定条件。**

①**光照**：愈伤组织的诱导需弱光或不需光，在黑暗或散光条件下最好。分化、继代培养一般需光。此时光对器官的作用是一种诱导反应。

②**温度**：外植体接入诱导培养基后，一般采用25-28℃的恒温条件下培养。

③**湿度**：较大，以免引起培养基干缩。

一般双子叶比单子叶植物及裸子植物容易；

二倍体种子植物，无论茎、叶、花等皆易去分化，特别是形成层和薄壁细胞容易诱导愈伤组织。

- 菊芋

刚收获块茎 **22hr**

贮藏**5个月2天**

- 胡萝卜

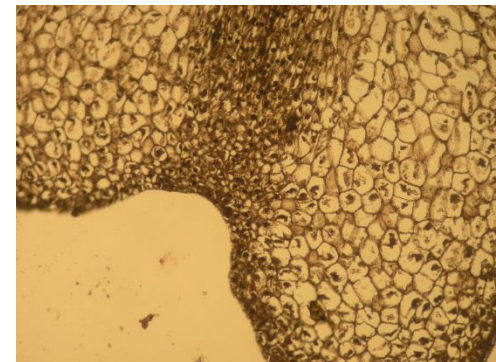
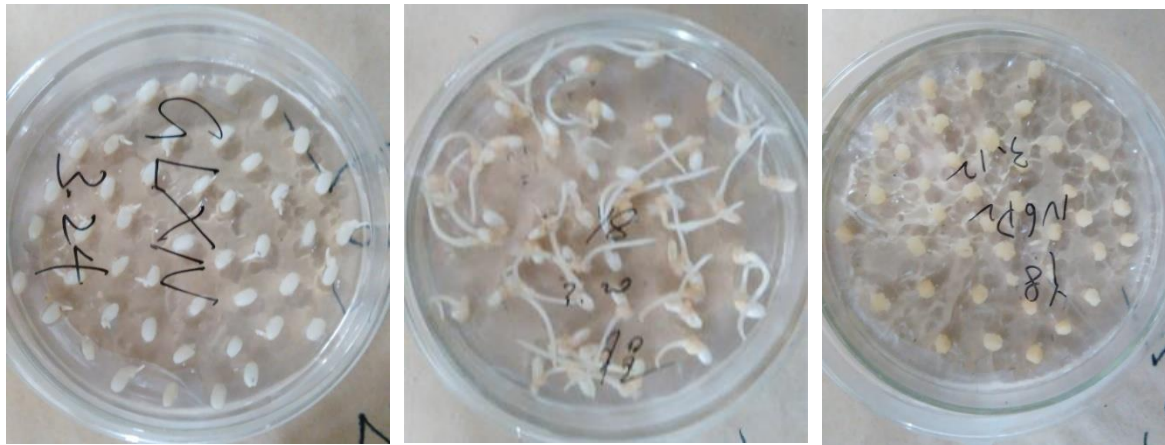
几天

弱光下的植物比强光下的植物易诱导(离体培养前暗处理)

**2、分裂期：**已具有一定功能和结构的分化和成熟的细胞 回复到具分裂能力的分生状态。细胞分裂**标志**着脱分化的完成。

外植体已分化的活细胞在外源激素的作用下，通过脱分化起动而进入分裂状态，并开始形成愈伤组织。

分生状态:细胞变小、细胞质稠密、液泡变小、核和核仁变大并趋向细胞中央



- 分裂期：外植体切口边缘开始膨大，外层细胞通过一分为二的方式进行分裂，而中间的细胞不分裂。另外还有细胞数目增加，体积变小；细胞核和核仁增大到最大等。从而形成一团具有分生组织状态细胞的过程。这时组织细胞代谢十分活跃，发生了一系列生理生化及形态的变化。
- 愈伤组织的特征：细胞分裂快，结构疏散，缺少有组织的结构，颜色浅而透明

## 小麦花粉分化和脱分化第一次有丝分裂的差异

	分 化	脱分化
1、分裂前细胞核的位置	必定在萌发孔对面紧靠胞壁	在花粉粒中无确定的位置
2、分裂前、中的细胞质	除一部分靠胞壁外，大部分集中在核对着萌发孔的一侧	在核的周围分布比较均匀
3、纺锤体	纺锤体不对称，近壁端钝，游离端尖，后期向末端转化阶段，纺锤体轴向发生变化	分裂过程中纺锤体对称
4、新细胞壁	分裂后形成的细胞壁呈弧形，位于正对萌发孔	新细胞壁平直，与萌发孔没有特定的位置关系
5、子细胞	具特定的位置、形态和功能	两个子细胞不具特定的形态和功能

花粉分化的第一次有丝分裂是在有极性的状态下进行的分裂，而脱分化是在失去极性的状态下进行的分裂



- 在脱分化过程中，伴随着**细胞形态结构**的变化
- **脱分化后的愈伤组织其薄壁细胞是非匀质的**:愈伤组织虽然未分化出其它特化组织（如维管束等），其薄壁细胞在组成上仍是有差异的

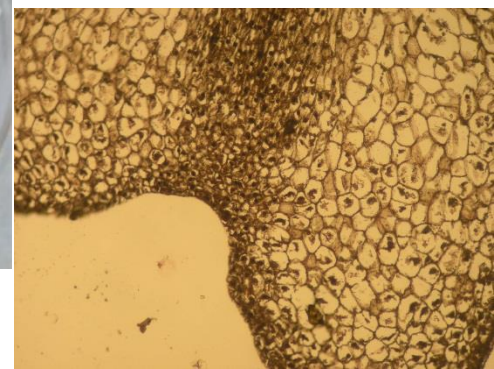
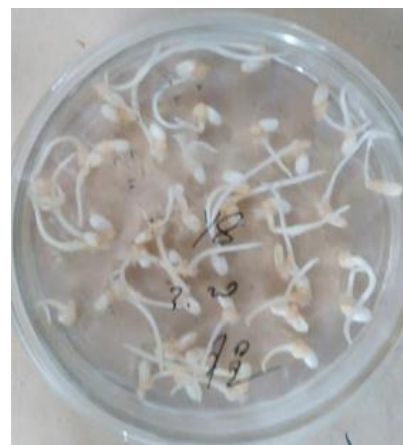
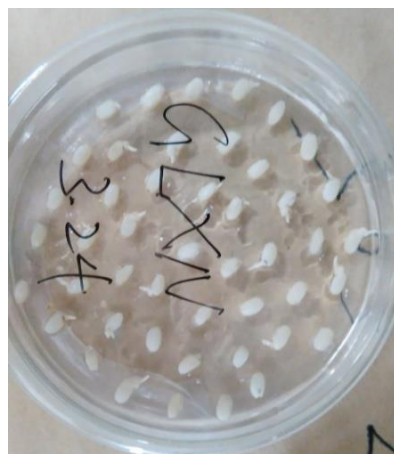
通过脱分化形成的愈伤组织在培养过程中保持具分生能力的薄壁细胞或肉眼观察不出的分化程度较低的状态（内部已形成一定的形态组织或细胞），因此习惯上称愈伤组织是处在“没有分化”、“脱分化”状态的细胞

- **培养组织的生理生化特性也有变化**，原有组织的一些特殊代谢产物（如生物碱或其它次生物质）减少，消失或代之以另外一些前体或结构不同的类似物  
例如:甜菜根一般不形成淀粉，但离体培养时细胞中有相当多的淀粉形成。

**分裂期：**起动后的细胞进行活跃的细胞分裂。

- (1) 细胞的**数目迅速增加**（外层先开始旺盛分裂）。胡萝卜培养**7**天后，细胞数可增加**10**倍。
- (2) 每个细胞平均**鲜重下降**。这是由于细胞鲜重的增加不如细胞数目的增加快的缘故。
- (3) **细胞形态改变**：体积小，成多边型，质浓，液泡小或无，如同根尖和茎尖的分生组织细胞一样。细胞的核和核仁增大到最大。
- (4) 细胞中 **RNA含量减少**，而**DNA含量**保持不变。
- (5) 随着细胞不断分裂和组织生长，**组织的总干重、蛋白质和核酸含量大大增加**，**新细胞壁的合成极快**。

—————→ 小愈伤颗粒



细胞数目增加、体积变小、核和核仁变大、  
**RNA**含量持续上升。从培养外植体的形态变化来看，表现为外层细胞迅速分裂。当细胞体积最小，细胞核和核仁最大，**RNA**含量最高时，标志着细胞处于分裂高峰时期。

### 3、愈伤组织形成期：



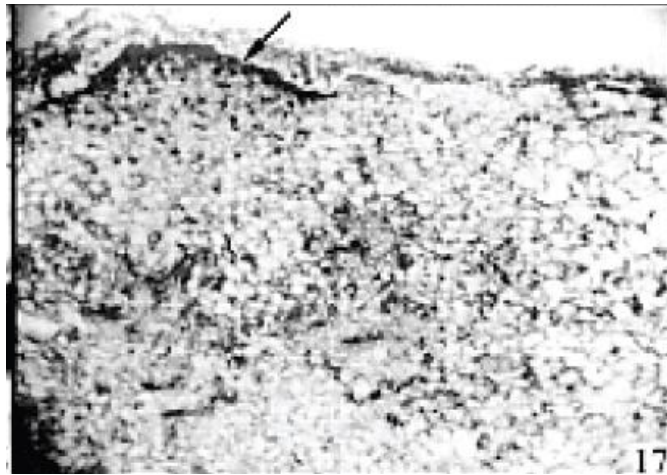
分生区在哪里？

### 3、愈伤组织形成期：

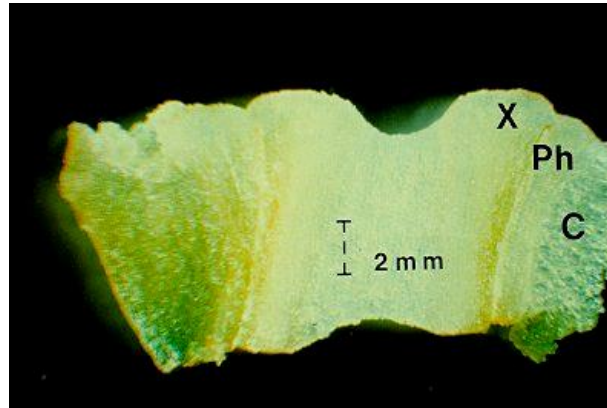
愈伤进一步发育，其周缘近表面部分细胞分裂较多，（垂周分裂）形成愈伤形成层，而愈伤深层细胞显著增大，细胞质变稀薄，液泡变大，核和核仁变小并移到细胞边缘，**RNA**含量下降，在外植体切口处明显可见一团团有一定生长型式的愈伤组织。

三个发育时期各有其主要特征，但并不专一，有时会交叉混杂发生。

**形成期**是指外植体经过诱导期和分裂期后形成了无序结构的愈伤组织的时期。

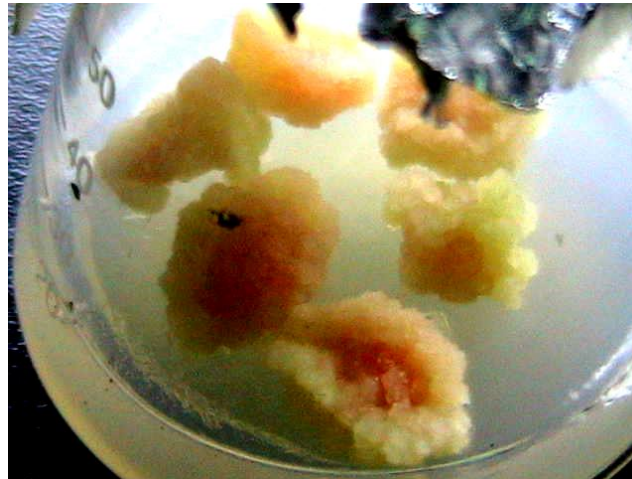


愈伤组织表层与近表层的明显界线



*where the callus (c) arises from*

- 外植体外层细胞发生分裂;
- 分裂期的愈伤组织的特征:细胞分裂快, 结构疏松, 缺少组织的结构, 颜色浅而透明.





## 愈伤组织形成

起始期

改变原来的分化方向和代谢方式，合成代谢加强，合成大量蛋白质和核酸物质为细胞的分裂和增殖奠定基础

分裂期

外植体外层细胞开始分裂，细胞脱分化，愈伤组织结构疏松，缺少组织结构，颜色浅而透明

形成期

Callus表层细胞分裂逐渐停止，而转向其内部的局部地区，并改变分裂面的方向，出现瘤状结构外表，Callus中可以发现维管组织，但不形成维管系统



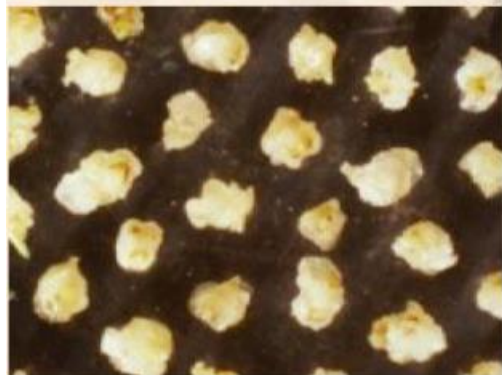
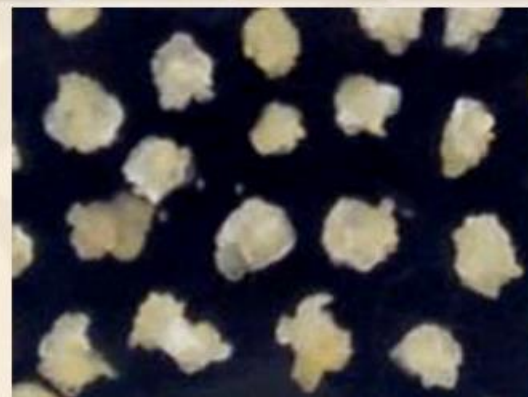
小麦幼胚



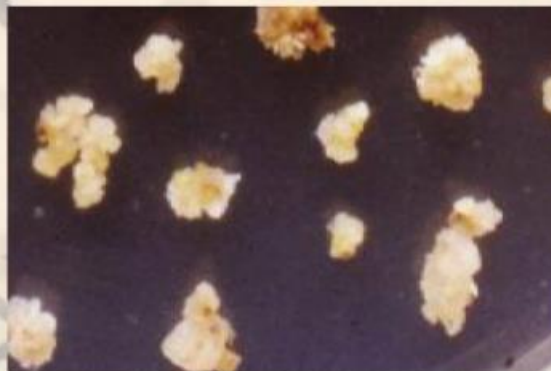
诱导期



分裂期



分裂期



分化期

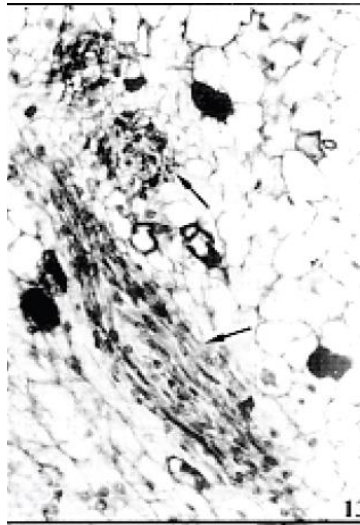


分化期

愈伤组织诱导形成过程

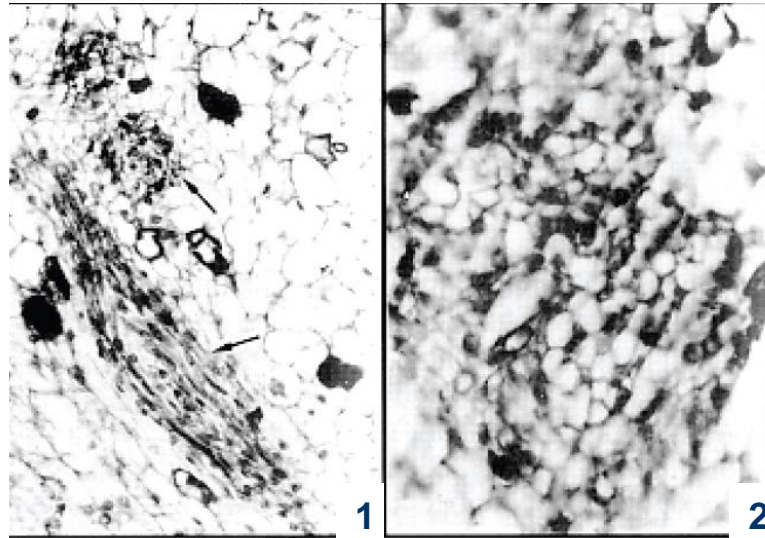
愈伤组织内部的组织分化: 停止分裂的细胞发生生理生化代谢变化而形成不同形态和功能的细胞。分化期最明显特征: 细胞体积不再减小, 保持相对不变化.

- 进入**分化**期后，细胞的平均大小相对稳定，细胞分裂由原来分裂局限在组织外缘的垂周分裂转为组织内部较深层局部细胞的分裂，并改变分裂面的方向，出现瘤状结构的外表和内部分化，结果形成瘤状或片状的拟分生组织（**meristemoid**），称做**分生组织结节**。



成熟的愈伤组织，由薄壁细胞组成，但由于它们在发育上的可塑性，在培养过程中，其内部出现一些特化的细胞和有结构类型的组织（如石细胞、色素细胞、维管组织），尚有分生细胞团或分生结节。

- 分生组织结节可以成为愈伤组织的生长中心，或者进一步分化为维管组织结节——由分生组织结节外围的细胞作平周分裂成为形成层状细胞，并形成了部分维管组织如管胞、纤维细胞等，但不形成维管系统。由于此期细胞分裂已基本停止，细胞内发生生理代谢等的变化而开始形成一些不同形态和功能的细胞，因此有人又将此期称为**分化期**。



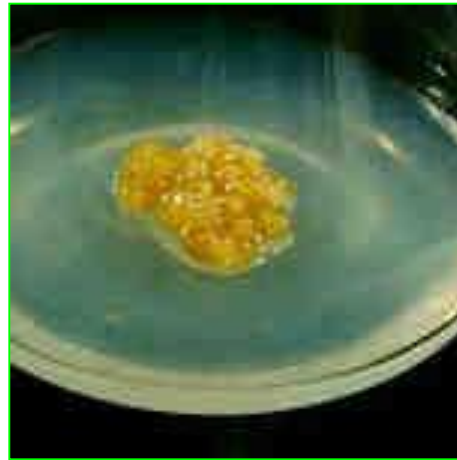
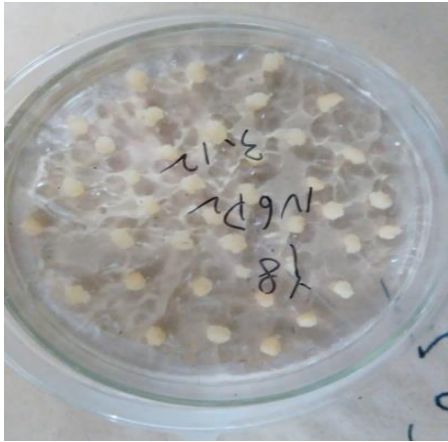
(1)分生组织结节（瘤状、片状）；(2)维管组织结节；

这些细胞团或细胞分生结节与芽原基，根原基的发生有密切的联系

## 分化期细胞特点：

- A 细胞分裂部位和方向发生改变：
- B 形成瘤状或片状的分生组织结节。或维管组织结节。
- C 细胞的体积相对稳定，不再减少。
- D 出现了各种类型的细胞：如管胞、纤维细胞、薄壁细胞、分生细胞、色素细胞等。
- E 生长旺盛的愈伤组织呈乳白色、白色或浅绿色，老化的多转化为黄色或褐色。

根据愈伤质地划分为:



**Callus exuding sticky  
poly-saccharides**  
渗出粘性多糖的愈伤



**Friable 易碎**



## 二、愈伤组织的继代

愈伤组织诱导并生长一段时期后，必须转移到新鲜培养基上培养，这个过程叫做**继代培养**（营养、水分的耗失和代谢产物积累的毒害）。

- **合适时间**：愈伤生长即将达到顶峰以前，这时处于旺盛分裂时，继代后容易生长，继代间隔一般四周，继代后**3-7**天恢复生长，**2-3**周内旺盛生长，达到顶峰后缓慢下来。
- **大小**：直径**5-10mm**，**100mg**±，太小难以恢复或生长缓慢。
- **方法**：切割成小块转移到新鲜的相同成分培养基上，同时达到繁殖目的，淘汰褐化和坏死的愈伤组织。

生长旺盛的愈伤组织一般呈奶黄色或白色、有光泽，也有淡绿色或绿色的；老化的愈伤组织多转变为黄色甚至褐色。



## 良好的愈伤组织

- ★高度胚性或再分化能力
- ★容易松散
- ★旺盛的繁殖能力
- ★长期继代后不丧失胚性或再分化能力



# 愈伤组织继代遗传稳定性

以往研究认为继代时间长再生能力减弱甚至丧失，但目前多数研究认为长期继代培养的愈伤组织仍有再生能力。

已诱导并建立起来的愈伤组织可以长期保存，如有报道大豆细胞系的愈伤组织在**24℃**和弱光下已保持**15**年。

## 注意

1. 愈伤组织遗传上的不稳定性因基因型、外植体、培养基成分和培养时间而异。
2. 相同基因型的同一种外植体在不同培养基上会产生不同的变异。
3. 培养基成分，特别是外源激素的成分与变异的产生密切相关。

**4. 组织培养中涉及到的遗传变异主要是细胞核组成的改变，变异是不可逆的，这种遗传上的改变可以是染色体畸变，细胞核破碎，或者是由于细胞内复制引起的多倍性以及分子水平上的改变等形式。**

**5. 愈伤组织遗传上的不稳定性因基因型、外植体、培养基成分和培养时间而异。**

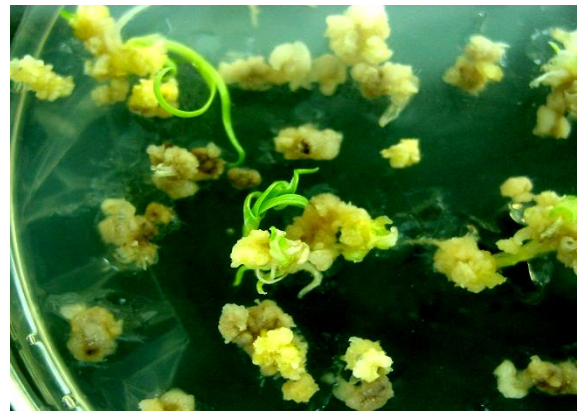
## § 2 愈伤组织的形态建成 (P83)

## 一、愈伤组织的形态建成

外植体细胞在适宜的培养条件下发生脱分化、再分化，产生芽和根，或者形成胚状体，发育成苗或完整植株。

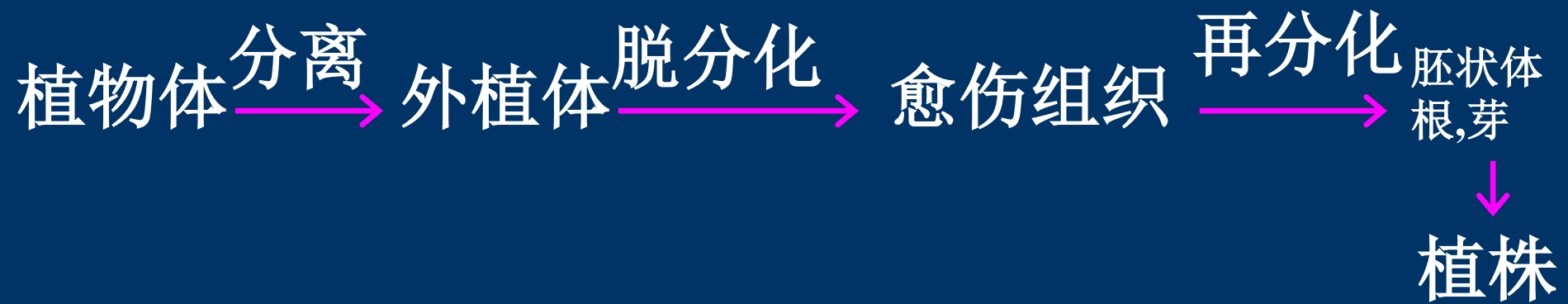


魔芋胚状体



小麦愈伤组织

**再分化(redifferentiation):** 是指脱分化形成的愈伤组织在适宜的培养条件下又分化为胚状体，或直接分化出根和芽等器官形成完整植株的过程。



**脱分化**:是指在人工培养基上外植体经过多次细胞分裂而失去原来的分化状态, 形成无结构的愈伤组织或细胞团的过程。

**再分化**:是指脱分化形成的愈伤组织在适宜的培养条件下又分化为胚状体, 或直接分化出根和芽等器官形成完整植株的过程。

愈伤组织的形态发生方式：器官发生方式  
胚状体方式



## 细胞再分化的类型

(一) 器官发生:离体培养的组织、细胞在诱导条件下经分裂和增殖再分化形成根和芽。

## 1、发生方式:

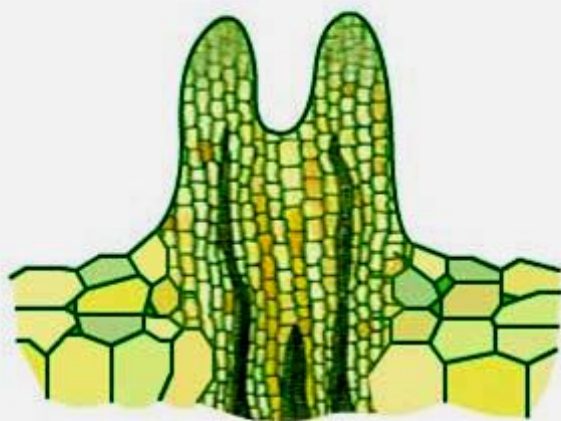
(1) 直接发生: (具有初生分生能力的) 外植体直接分化成器官的过程。(由茎尖、腋芽、原球茎、块茎、鳞茎等器官发生)

**(2) 间接发生：**外植体（已分化的成熟组织）  
经脱分化形成愈伤组织再分化形成器官的过程。

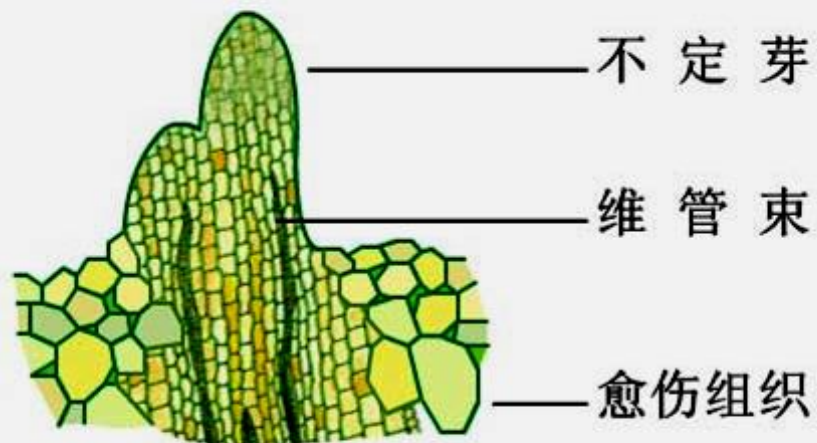
外植体 脱分化 → 愈伤组织(类分生组织) → 器官原基 → 根、芽

**2、特征** (1) 单极性

(2) 器官的维管与愈伤 (外植体)相通



器官发生



### 3、器官发生顺序

#### (1) 先生根后生芽的方式

如颠茄的悬浮培养物，还有根易分化芽难分化的如棉花、苦瓜及许多木本植物，组培中最常见的再生器官类型是根的形成，玉米、油菜、棉花、烟草、蜀葵等的愈伤很易形成根。

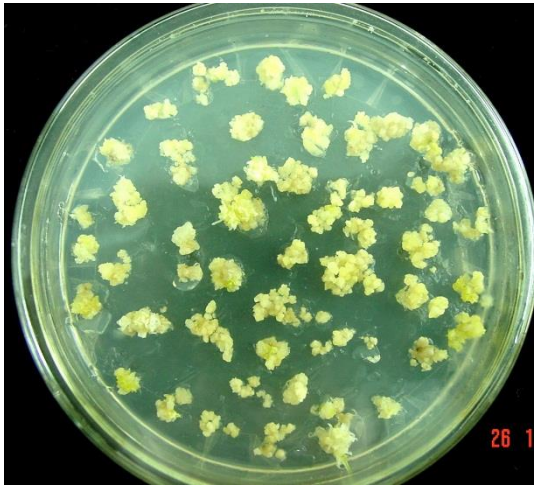
#### (2) 先生芽后生根的方式

如小麦，一般形成的芽其基部很易形成根，而如先形成根，则往往抑制芽的形成。(多见)

#### (3) 在愈伤组织上独立生出芽和根的方式(少见)

#### (4) 仅有根和芽的分别再生，形成无芽的根或无根的苗

# 小麦的形态发生



愈伤组织



芽分化



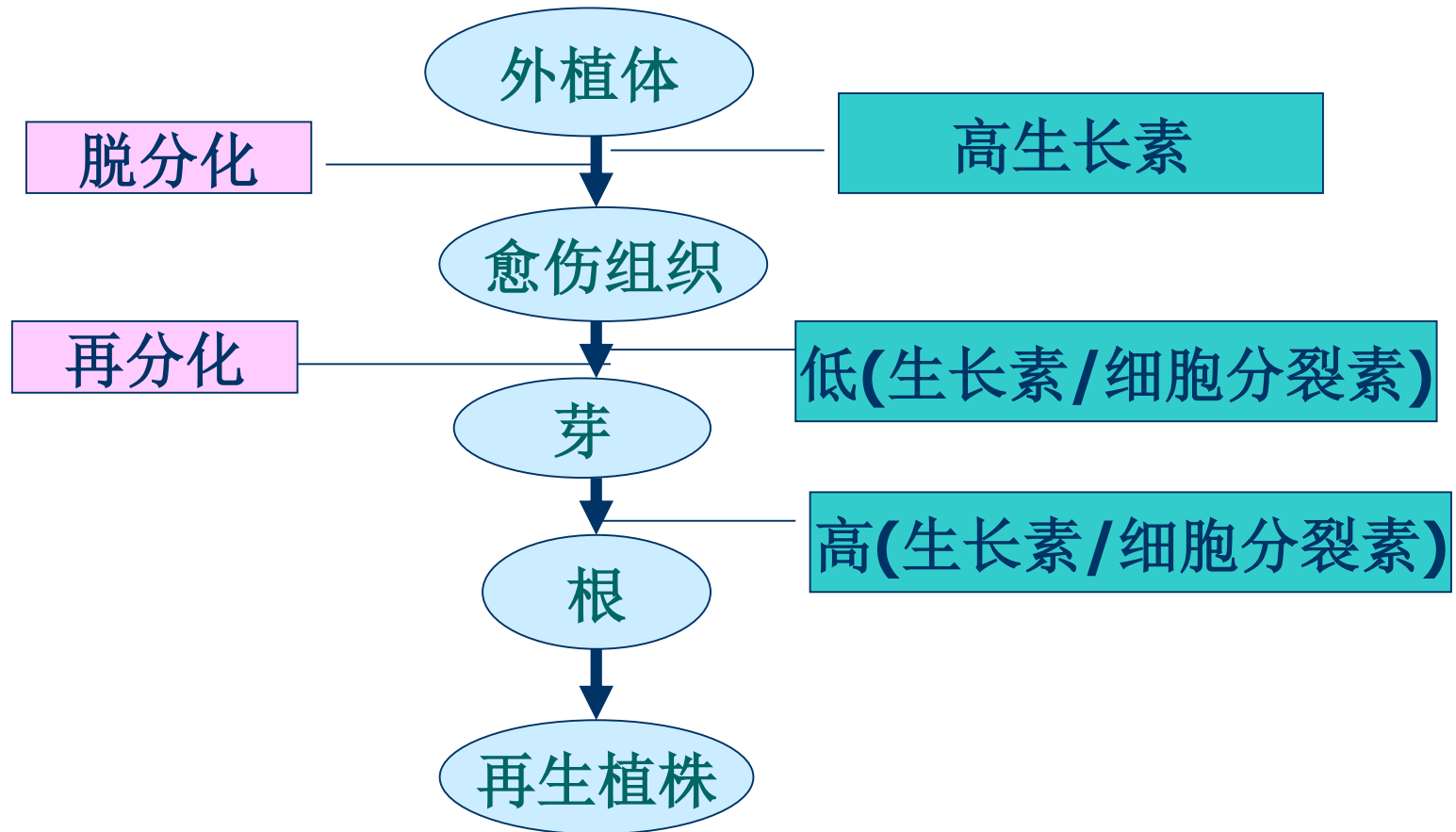
试管苗

## 其它器官发生方式：

- 用组织培养进行花器官形成的研究，  
用烟草的茎切段作培养物时，可以直接分化形成花芽，  
用油菜的花茎切段及花器官培养也可见到形成花芽，  
把这种离体形成的花芽中的花药进行培养时，可得花粉胚状体。
- 在组织培养中，还有变态器官形成，如鳞茎、球茎、块茎等。



## 不定芽方式 (**adventitious bud**)



愈伤组织的形态发生方式：器官发生方式  
胚状体方式

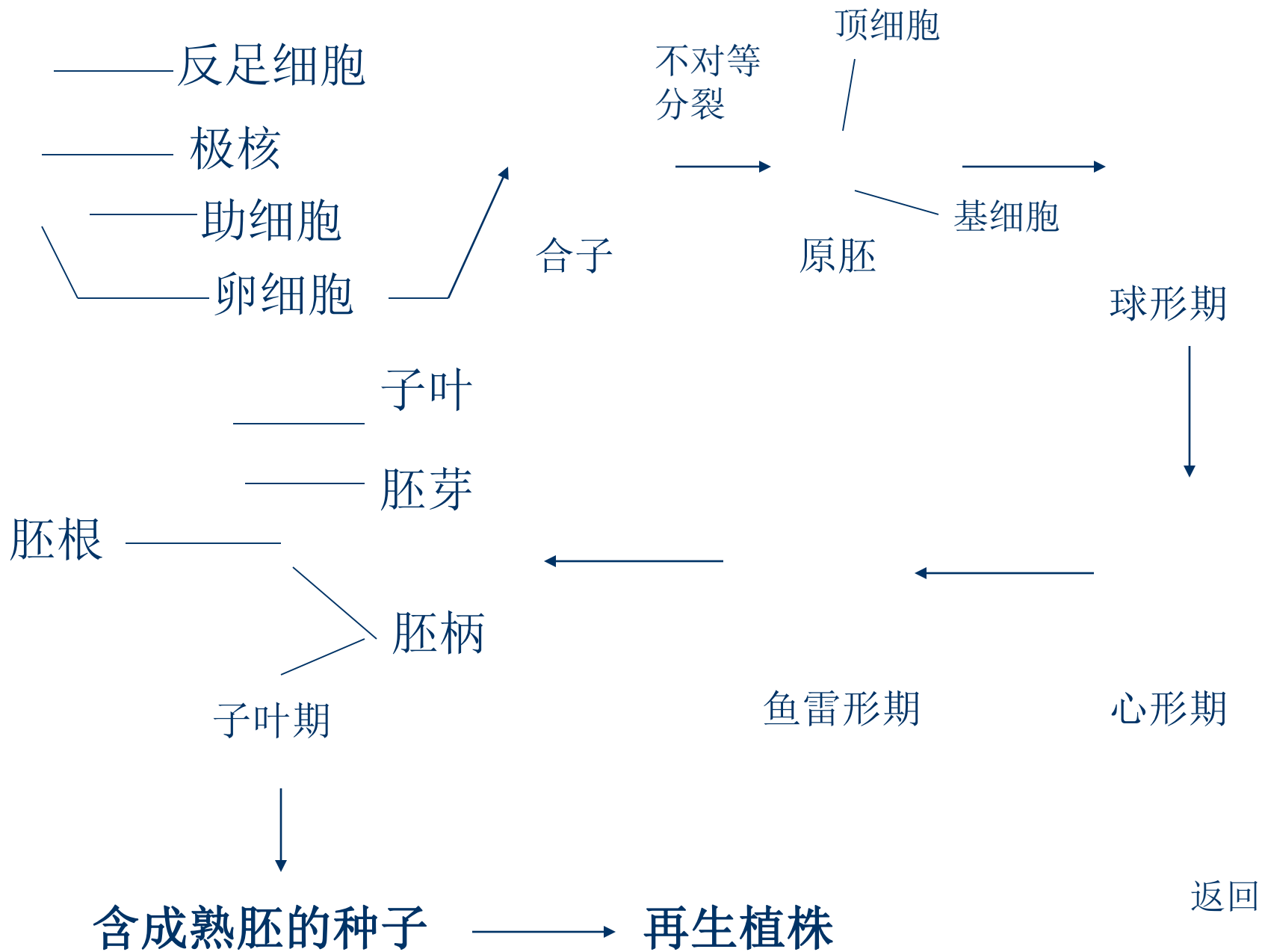
器官发生方式特点

## (二) 体细胞胚胎发生(somatic embryogenesis) :

离体培养的植物体细胞经诱导分化，形成类似于有性合子胚胎发生的各个阶段而发育形成胚胎状结构，最后产生新植株的过程。



**胚状体 (embryoid)**：指在组织培养中，由一个非合子细胞(体细胞)，经胚胎发生和胚胎发育过程（经过原胚、球形胚、心形胚、鱼雷胚和子叶胚5个时期），形成具有双极性的胚状结构。



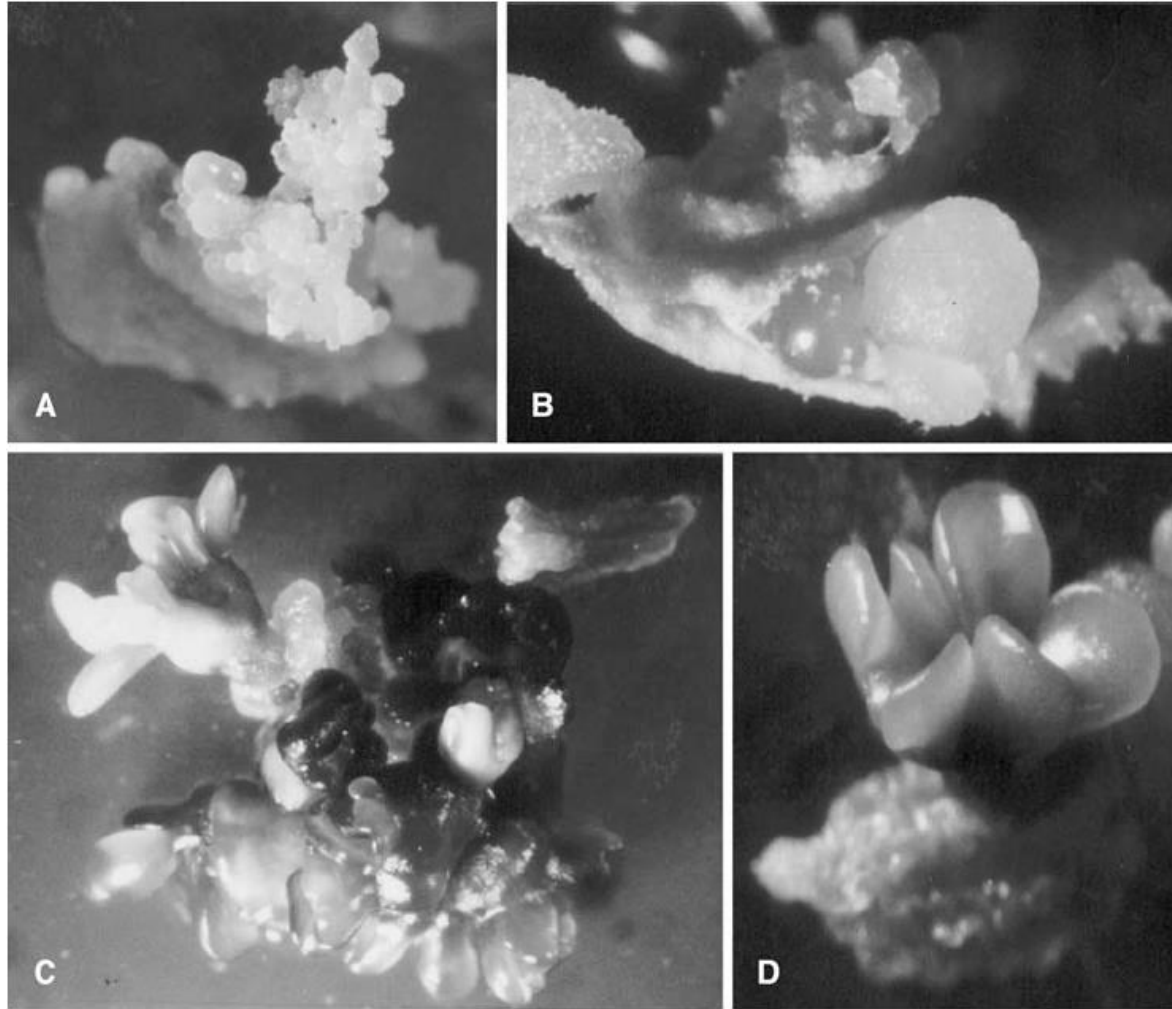


胚的发育



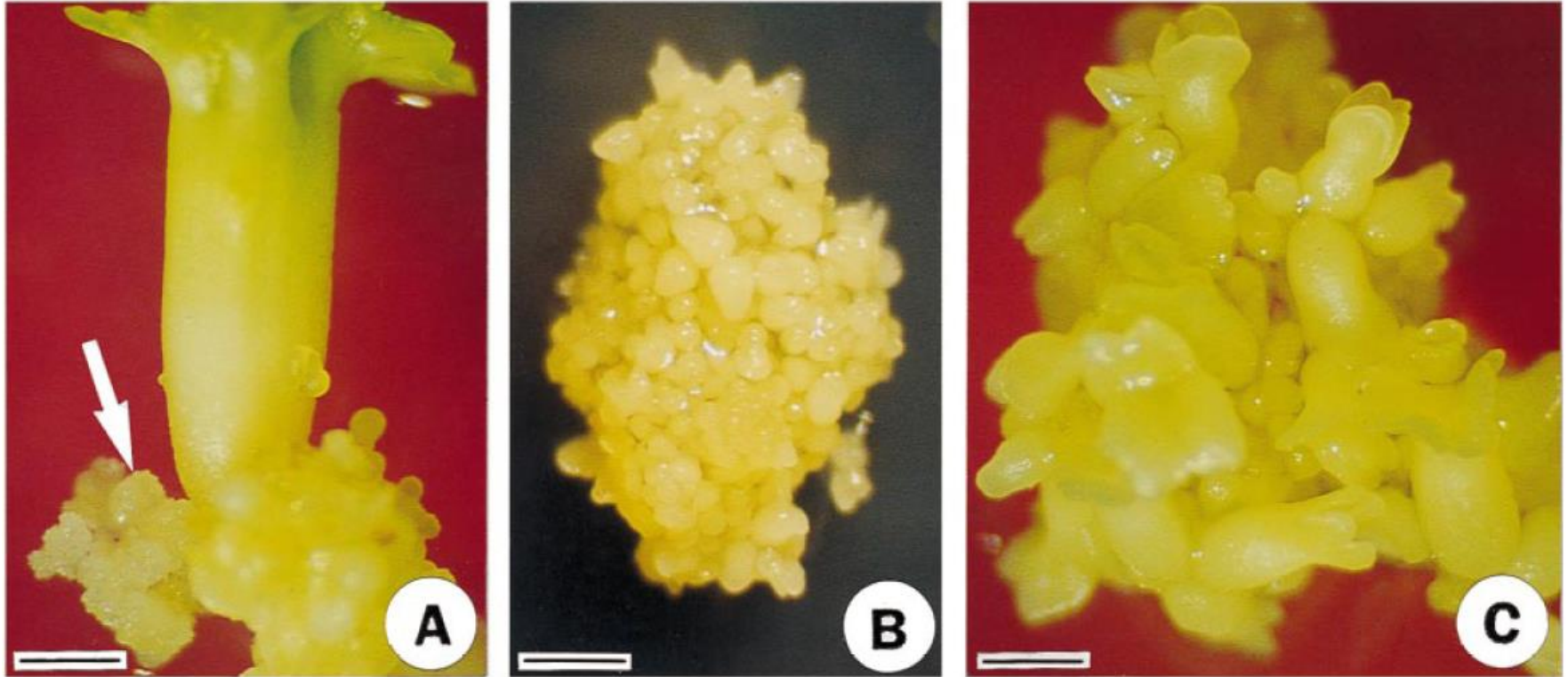
- 在正常情况下，精卵结合形成合子，进行分裂发育成胚——胚胎发生。
- 组织和细胞离体培养形成在形态、结构和功能上类似有性胚的结构被称为体细胞胚。

***Citrus clementina* Hort. ex Tan. microspore-derived  
embryoid induction and regeneration(克里曼丁橘 )**



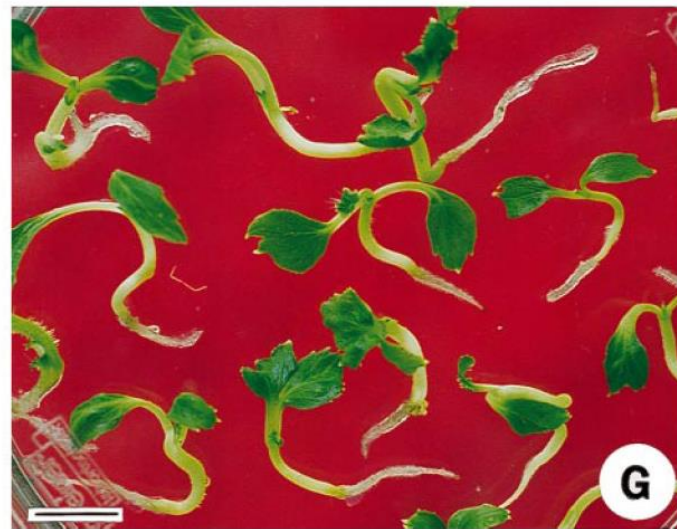
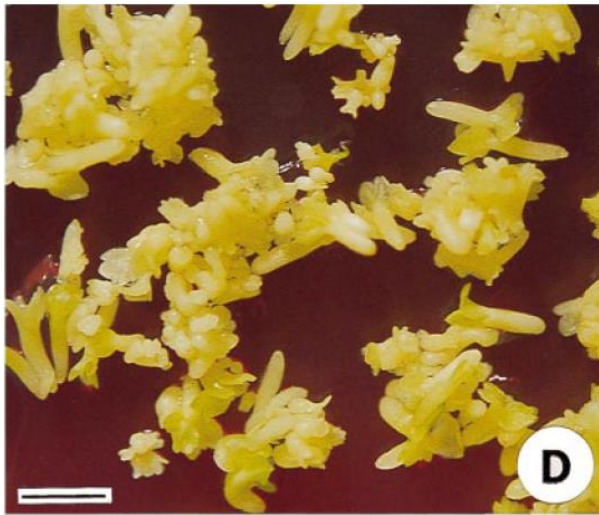
The embryogenic haploid calli were multiplied on MS medium supplemented with 5% sucrose, 0.02 mg/l NAA and 0.8% agar.

## *Eleutherococcus senticosus* 刺五加



Mass production of *E. senticosus* plantlets via embryogenic callus culture. A, Friable embryogenic callus (arrow) formed near the radical portion of primary somatic embryos on MS medium with **4.5 $\mu$ M 2,4-D** after **2 months of culture**. Bar=700  $\mu$ m. B, Numerous globular somatic embryos formed from embryogenic callus after transfer to **medium lacking 2,4-D** after **3 weeks of culture**. Bar=700 $\mu$ m. C, Clusters of cotyledonary somatic embryos after 6 weeks. Bar=700  $\mu$ m.

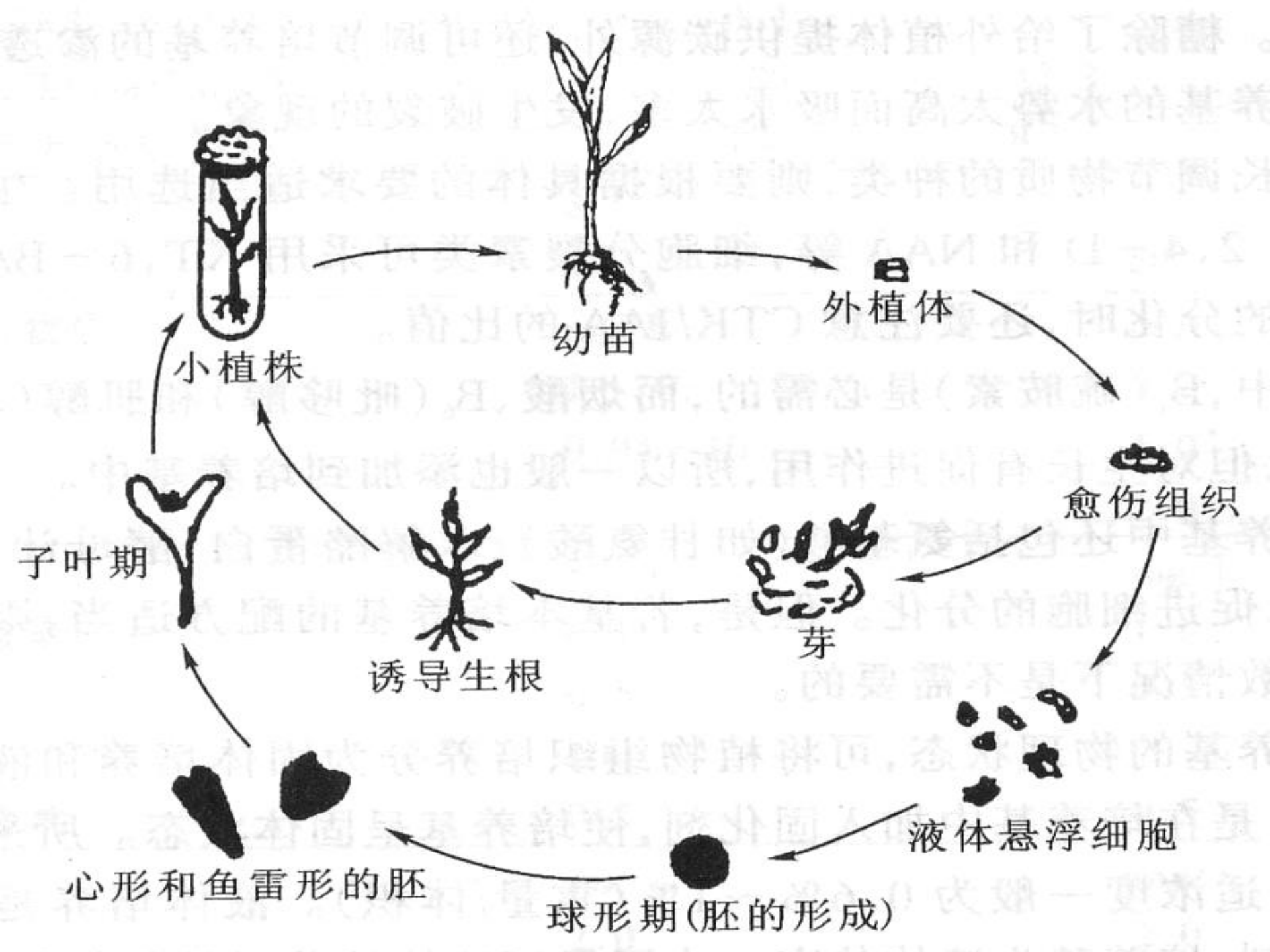




D, Numerous somatic embryos formed from embryogenic callus. Bar=3 mm. E, Individually separated cotyledonary somatic embryos formed from agar medium; note well developed cotyledons. Bar=3 mm. F, Germinating somatic embryos from embryo clusters on MS medium with  $3\mu\text{M}$   $\text{GA}_3$ . Bar=700  $\mu\text{m}$ . G, Small plantlets regenerated from somatic embryos on 1/3 MS medium with 1% sucrose. Bar=15 mm.

## 胚状体与合子胚的比较:

	合子胚	胚状体
质量	萌发率高，质量好	萌发率低，质量差
来源	受精卵	体细胞
胚柄	有，明显	即使有也不明显
形态	固定，体积相对较小	复杂，常有两个以上的子叶，体积较大
变异率	低	高



# 体细胞胚胎发生

## 1、发生方式：

**直接产生：**指外植体组织中原先就存在的胚性细胞在进入培养之后直接进入体细胞胚胎发生而形成胚状体，这种在培养前就存在的胚性细胞被称为**前决定的胚性细胞**（pre-embryonic determined Cells, PEDC）

如：下胚轴、子叶、幼花序的表皮细胞中的胚性细胞可直接产生胚状体。

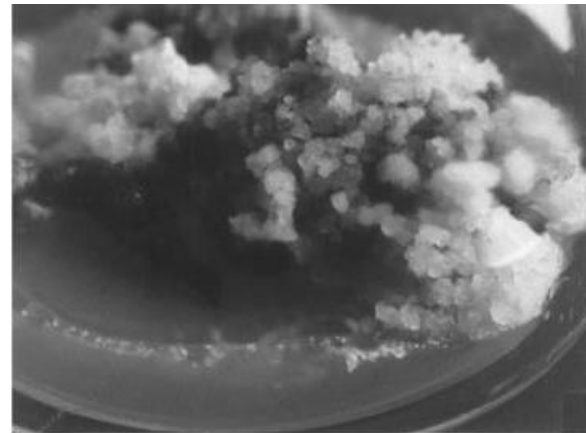
柑桔属的珠心组织

石龙芮的茎胚来自表皮细胞

向日葵下胚轴表皮细胞可培养获得胚状体

**间接产生：**通过对外植体中已分化细胞的发育方向的重决定过程诱导出胚性细胞，然后由这些**诱导的胚性细胞（IEDC）**发育成胚状体。要经历愈伤组织培养的中间阶段，是普遍的胚状体产生方式。

如：槐树子叶,陆地棉(*Gossypium hirsutum* L)下胚轴



陆地棉下胚轴体细胞胚的发生

- 有些植物既可以直接产生又可间接产生

鸭茅:取决于外植体的部位

叶原基:间接产生

叶尖:直接产生

香雪兰:培养基中激素决定(幼叶)(mg/l)

**IAA(2)+IBA(3):直接产生**

**IAA(2)+IBA(5):间接产生**

## 2、细胞胚性状态的获得、保持和表达

(1) 细胞胚性状态的获得：胚胎发生的前题是胚性状态的获得。

**有性胚胎发生：**花芽分生组织是从已丧失胚胎发生能力的营养组织细胞分化而来，在花的发育过程中有些细胞重新获得胚性的趋势变成孢母细胞。

**体细胞胚胎发生：**在离体培养条件下，植物体其它已脱离胚性状态的细胞可重新获得这种状态。

例如：胡萝卜韧皮部细胞在有**2,4-D**时经脱分化产生愈伤组织，有的愈伤细胞可以分化获得胚性状态，在某种程度上象未受精的卵，它们的胚胎发育程序的表达受到**2,4-D**的阻碍，**2,4-D**的去除如同受精一样启动胚胎发生。



## (2) 细胞胚性状态的保持

细胞获得胚性状态后就有一定的稳定性

如：胡萝卜的细胞品系在维持**10年**的分裂和继代后仍保持胚胎发生的潜力，只要去除**2,4-D**就可形成胚状体，

有些植物的表皮层细胞虽已分化，但仍保持胚性状态（石龙芮等），在一定条件下直接产生胚状体，但稳定性在不同物种及不同培养体系间差异极大，经反复继代保存以后，发生能力下降、丧失。

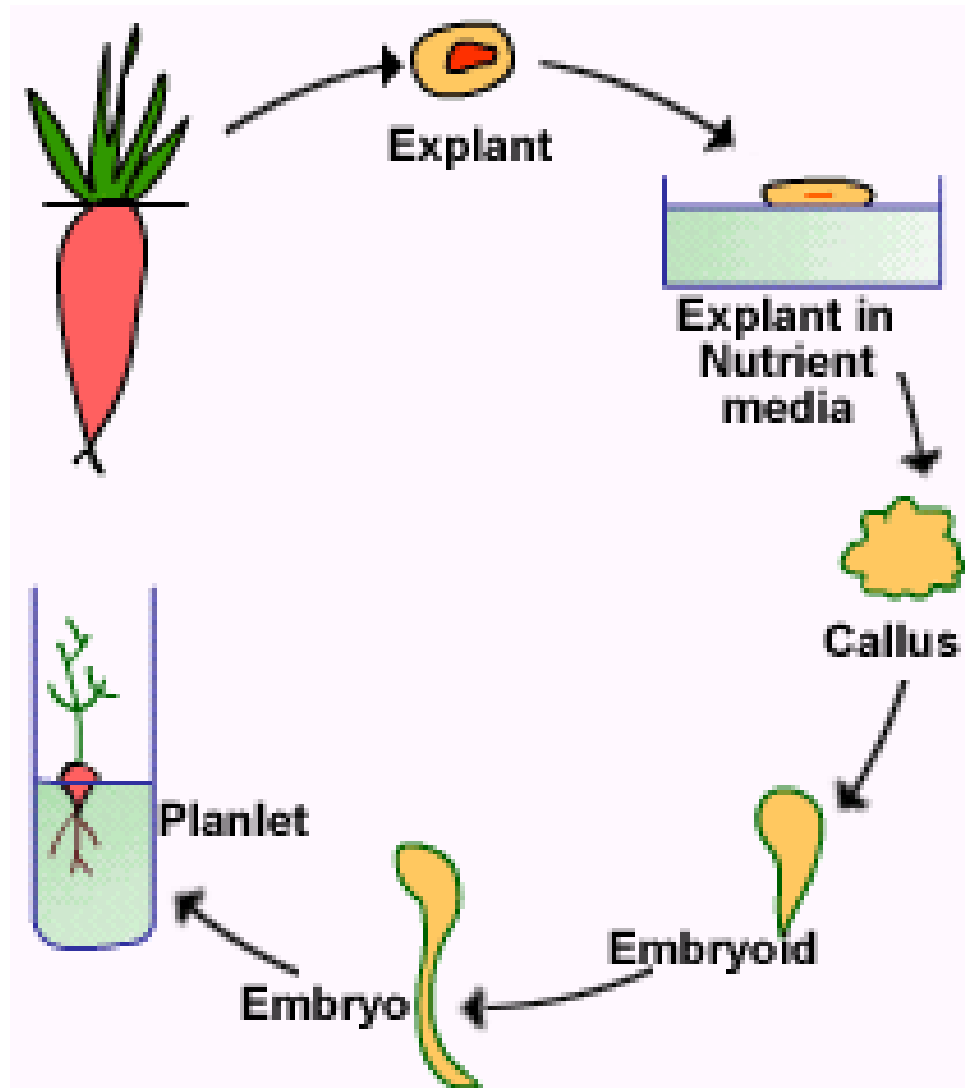


### (3) 细胞胚性状态的表达

从形态上看，从愈伤组织向球形胚过渡的标志是细胞的活跃分裂形成一团致密的没有表皮层的细胞团结构，可以明显的与疏松的愈伤组织区分开。

在胡萝卜细胞培养中，能够分化成胚状体的细胞中，新壁的形成常与细胞的壁相垂直，使细胞团的生长显得有规律并继之由其表层细胞形成胚状体，它们细胞质浓、核大。

在外观上，**胚状体**和不定芽均有光滑、圆形突起的形状。



## （4）体细胞胚的起源

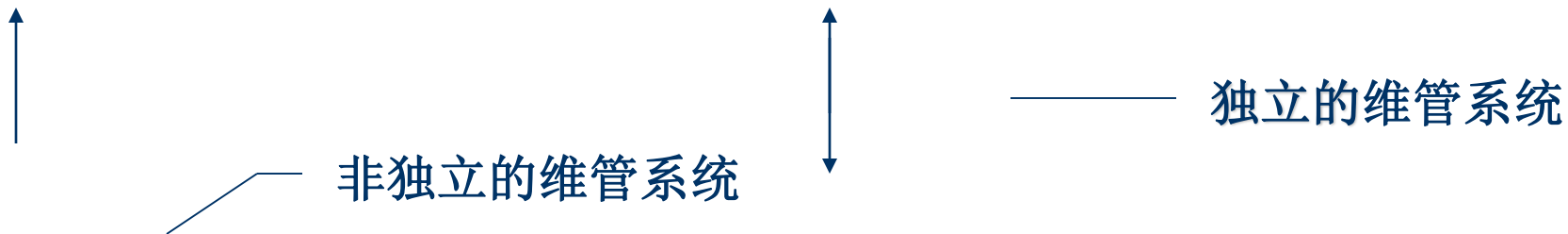
胚状体的形成是来自单个的胚性细胞（单细胞起源）还是一团细胞（多细胞起源）是有争议的。

- 在胡萝卜、甘蔗、芹菜、玉米中跟踪观察认为是单细胞起源的，但在体细胞胚萌发长成的植株中，常能看到嵌合现象，这是支持多细胞起源的证据。
- 按照Williams和Maheswaran（1986）的观点，二者不矛盾：取决于胚性细胞被诱导时与它相邻的细胞状态，如果处于不同的生理和发育状态，这个胚性细胞单独发育成胚状体，如果周围细胞具相同的胚性发育趋向，这团细胞共同作用，形成一个球形胚结构，表现为多细胞起源的。

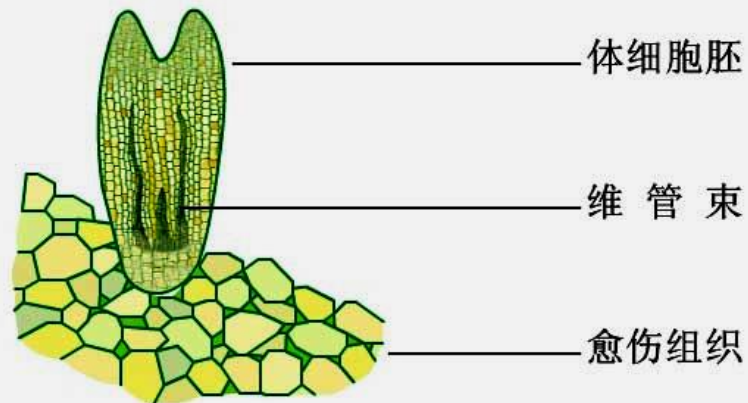
### 3、特征：

胚状体在组织学上具备以下和不定芽不同的三个特征：

- (1). 最根本的特征是具有**两极性**，即在发育的早期阶段，从其方向相反的两端分化出茎端和根端，而不定芽或不定根都为单向极性。
- (2). 胚状体的维管组织与外植体的维管组织无解剖结构上的联系，而不定芽或不定根往往总是与愈伤组织的维管组织相联系。
- (3). 胚状体维管组织的分布是独立的“Y”字形，而不定芽的维管组织无此现象。



## 体细胞胚发生与器官发生



体细胞胚的发生



器官发生

## 胚状体发生途径与器官发生途径形成植株的区别:

- ①胚状体具有两极性，即有茎端和根端。
- ②胚状体的维管组织与外植体的维管组织无解剖结构上的联系。
- ③胚状体维管组织的分布是独立的“Y”字形。

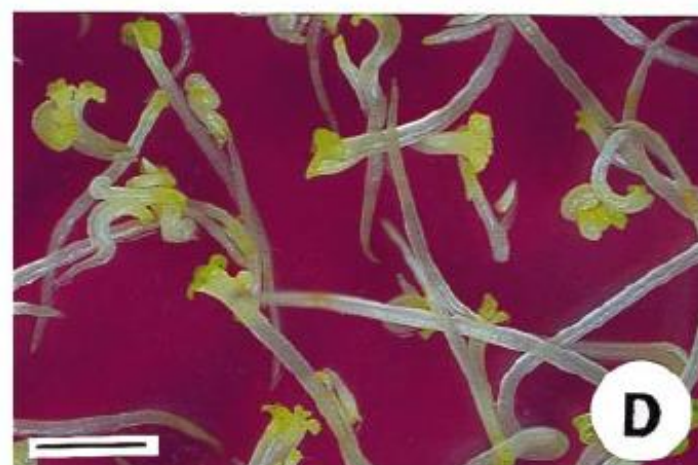
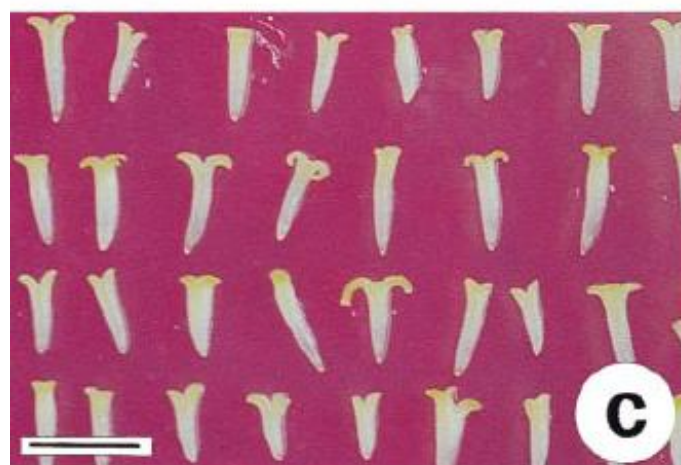
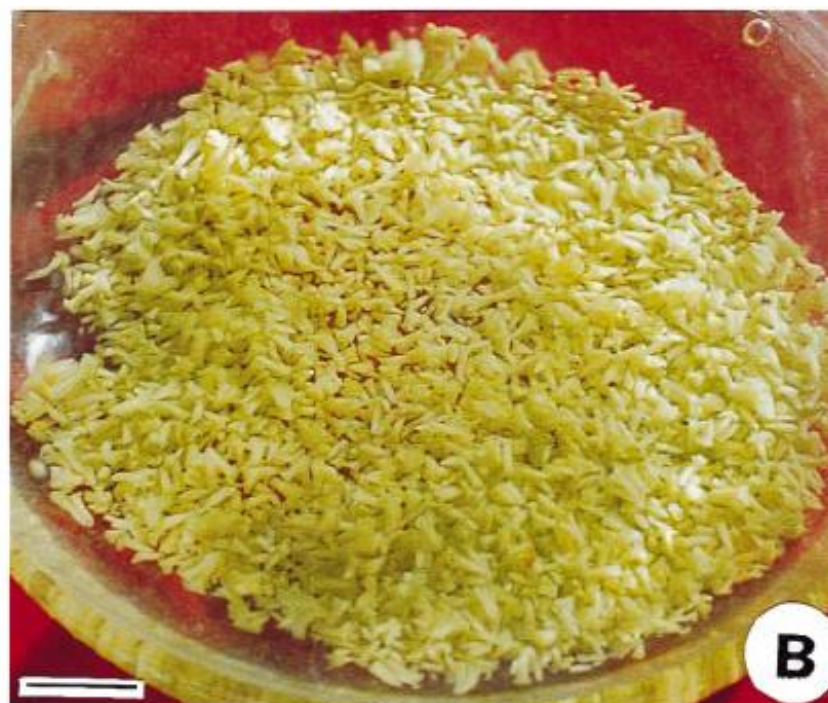
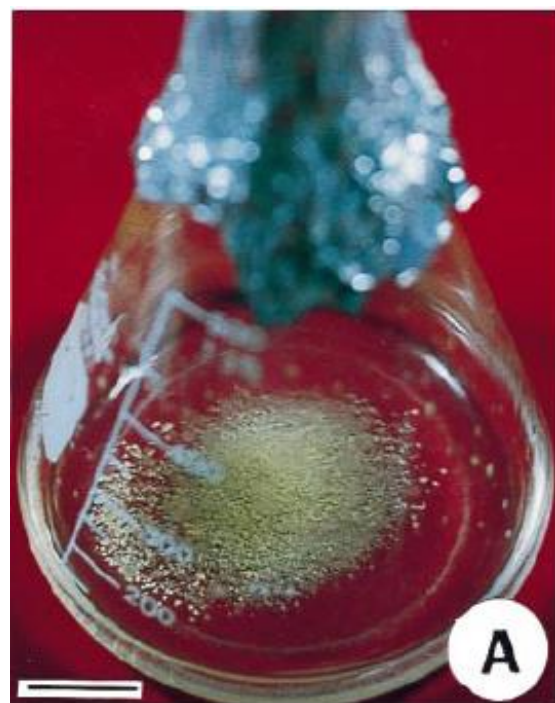
## 胚状体方式比不定芽方式有更多的优点：

- 胚状体产生的数量比不定芽多；
- 胚状体可以制成人工种子，便于运输和保存；
- 胚状体的有性后代遗传性更接近母体植株。



# 人工种子 (P65)



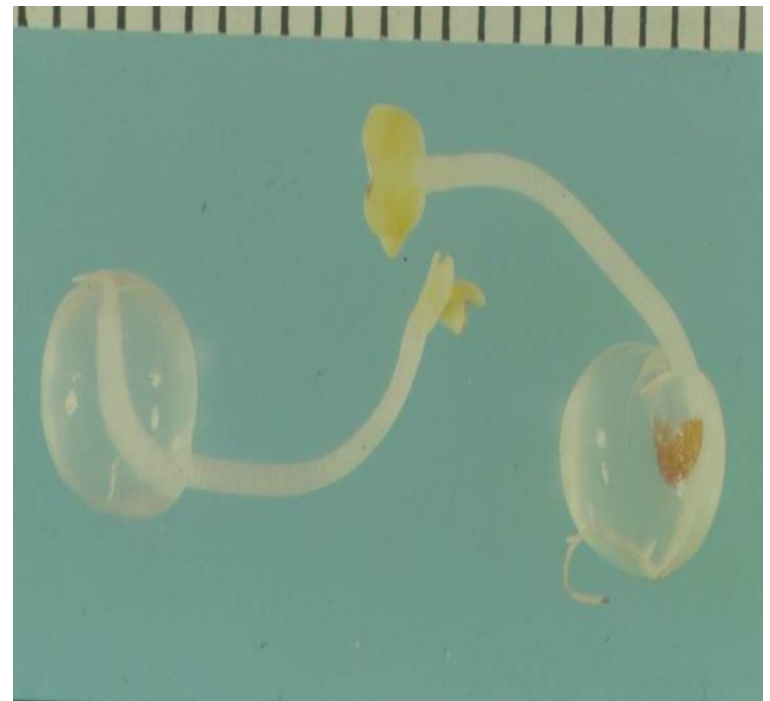
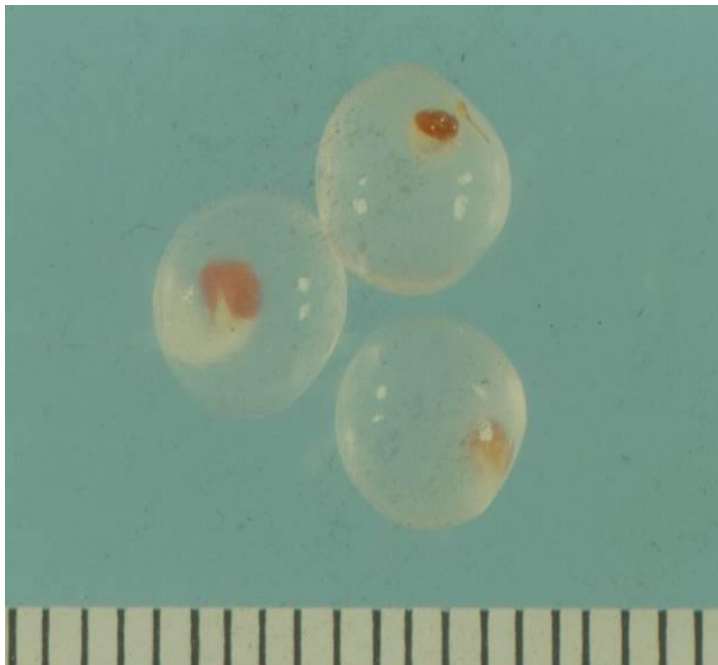


- 人工胚乳：C源、蛋白质、矿质元素、抗生素、亲水剂、生长调节物质

- 人工种皮：胶囊式结构
  - 胚状体
- 海藻酸盐  
+ 螯合物  
Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

- 人工种子意义:大规模工厂化生产种子  
繁殖自交不亲和植物, 珍贵物种或杂种  
人工胚乳中加入生长调节剂或抗生素,增强种子的抗性和种苗的生长.

## Encapsulation of somatic embryos and creation of synthetic seeds



## 4、影响胚胎发生的因素

### A、植物激素与胚胎发生的关系

(1) 生长素：离体条件下体细胞胚的诱导和发育包括二个步骤

1) 增殖培养基（初级培养基）：含有一种生长素（常用2,4-D浓度0.5-1mg/L）外植体形成愈伤组织，同时诱导出胚性细胞（或团），但不能发育成胚，不断继代增殖胚性细胞团的数量。

**2) 成胚培养基（次级分化培养基）：** 不含生长素或含量极低（**0.01-0.1 mg/L**），它们就发育成成熟的胚状体。

- **2,4-D**等生长素是**诱导**胚性细胞的必需成分，但它**抑制**胚性细胞发育分化成胚。

## (2) 细胞分裂素

1) 与生长素配合使用，提高诱导率，不同植物配比不同。

在许多植物中，生长素和细胞分裂素结合使用提高诱导频率，如柑桔、花椰菜、葡萄、咖啡、苜蓿、烟草、大蒜、蕃茄等，但不同物种所需的生长素/细胞分裂素配比不同。

2) 不同细胞分裂素的效应不同。(胡萝卜：ZT好，KT、6BA抑制)

与不同生长素配合，调节器官发生和胚胎形成。



### (3) 其它激素

- **ABA、GA3**在胡萝卜和柑桔属中会抑制胚胎发生

## B、氮源

- (1) 还原N（即 $\text{NH}_4^+$ ）在初级培养中刺激胚性愈伤形成（次级中可有可无）
- (2) 和 $\text{NO}_3$ 配合，pH不下降

如：  $\text{KNO}_3$ 浓度高，不含还原N，可成胚，但少

Reinert及其合作者在栽培胡萝卜愈伤组织培养中( 培养基均为White培养基 )得到以下结果：

$[\text{NH}_4^+ \text{—氮}]$ (M)	$[\text{NO}_3^- \text{—氮}]$ (M)	体胚发生数 (个/2ml)
10	40	$1131 \pm 219$
0	55	$19 \pm 0.3$
0	95	$11.3 \pm 4.1$

- 从上表可以分析得出，尽管高浓度的氧化态氮同样可以诱导体细胞胚胎发生，但是其诱导率远远低于还原态氮和氧化态氮配合使用时的诱导率。

适当的 $\text{NH}_4^+$  /  $\text{NO}_3^-$ 组合有助于大量成胚

### (3) 其它有机氮源有用

#### 刺激体细胞胚胎发生的作用

如酪蛋白（**CH**）、谷氨酸、谷氨酰胺、丙氨酸和椰乳、丝氨酸等

酵母提取液，麦芽、菜豆提取物、西瓜汁、蕃茄汁、丝瓜伤流液等也有促进作用。

## C、培养基中的其它物质：

- 胡萝卜:高浓度的钾（**20mmol/L**）是胚胎发生必需的；
- 培养基中溶介氧的含量应低于临界值（**1.5mg/L**），否则有利生根而不利成胚，因低水平氧导致细胞内高水平的**ATP**。
- 在培养基中加入**活性炭**可提高胚胎发生频率，它能吸收大量的抑制性代谢产物——酚类物质，促进细胞活性。

D、液体振荡培养使培养组织生长较快，可控制形态发生过程，加速再生植株形成，并决定器官分化方向

如：菊苣根切段培养中，液体的滤纸桥上形成叶芽，

琼脂上形成花芽，形成花芽的外植体比例随琼脂浓度而增加

,

可能是含氧梯度在调节器官分化中起了作用。

## E、培养环境条件的影响

(1) 光照：缺乏系统研究，

烟草在光、暗条件下都能正常形成根芽，但对芽的发育有影响，

秋海棠带表皮的厚角组织培养在诱导成芽时有光有促进作用。

光质：烟草愈伤在白光、兰光下有很多苗分化，暗培养的芽不发育，红光和远红光没有促进作用；

红光处理矮牵牛可促进芽的形成，但可为远红光逆转。

**(2) 温度：**一般用**25℃**恒温培养，较低的夜温可能有促进作用

低温促进秋海棠离体叶形成芽，叶片培养的最初几天的温度有决定性影响，

花菱草中胚状体一般不发育成小植株，而用连续低温（**6℃**）处理可使胚状体形成苗。



## F、影响胚状体发生和发育的内部因素

植物的基因型、外植体和愈伤组织的生理状态可以极大地影响离体分化能力和形态发生途径，是决定是否进入胚胎发生的根本因素，而各种外部因子包括激素的调节仅仅起一种诱发胚性状态表达的作用。

**Thorpe（1980）**提出，培养组织中分生组织细胞的脱分化程度决定了以后形态发生的方式，完全的脱分化，细胞可以发育成胚状体，部分的脱分化，它们可能进入器官发生途径，形成根和芽的原基。

## (1) 基因型

- 不同植物间产生胚状体能力不同

矮牵牛、茄子、颠茄等茄科植物易产生胚状体，而同一科的烟草则难形成，烟草叶肉原生质体培养中，二千个不同激素和浓度组合的处理，只有二个组合产生胚状体。

- 同一物种不同品种间产生胚状体能力不同

如Bhattacharya和Sen（1980）用11个水稻品系的材料培养，只有1个产生胚状体

Haydu和Vasil（1981）用21个紫狼尾草材料培养有19个产生胚状体。

茄子中易于器官发生的品种难于产生胚状体，

甘蔗、桉树和葡萄的杂种材料较易产生胚状体，这些都是基因型的影响。

## (2) 外植体的来源和年龄

少数植物如胡萝卜几乎所有器官都可诱导胚状体，**大多数植物只有处在一定发育时期的某些器官可产生胚状体，**

如石龙芮的花芽只有在小孢子母细胞减数分裂前培养才能产生胚状体，

桑寄生最适培养时间是园球胚（幼胚）

而澳洲火树的成熟胚也可产生胚状体

常春藤只有成熟的茎才能产生胚状体，幼茎只能产生芽

大黍中发育完全未展开的幼叶可产生胚状体，而未分化幼叶及已伸展的叶片则不行。

营养器官中许多植物的下胚轴较易诱导胚状体，有的植物的子叶、幼叶、叶柄、叶鞘和成熟叶片、嫩茎可产生胚状体，

**许多植物的胚状体在发育过程中很容易再度产生新的胚状体。**

如石龙芮、芹菜、人参、葡萄、苜蓿、桉树、甘蔗等都可由形成的胚状体及其长成的幼苗上产生大量次级和三级胚状体，产生多个小植株。

### (3) 培养时间和细胞倍性变化的影响

- 短期培养的幼嫩愈伤最容易产生胚状体，随培养时间延长、能力下降以至丧失，

如胡萝卜诱导后在基本培养基上**4-6**周开始形成胚状体，**16-20**周达高峰，以后下降，到**36**周停止，如果**52**周时转移到诱导培养基成胚能力可恢复，若延迟到**100**周才转移就不能恢复。

柑桔的愈伤组织定期在有激素的培养其中重新诱导和继代培养，成胚能力可保持**6**年。

有些外植体或愈伤组织必须经过一段时间的培养才能诱导得胚状体，如咖啡培养**70**天，人参通过**6**个月，檀香经过**5**次继代培养才能诱导出胚状体。

- 染色体数目的变化或倍性变化并不一定影响形态发生或胚状体发生的能力，如从培养**20**年的烟草组织中得到非整倍体植株，从单倍体油菜植株培养得到胚状体。

## (4) 内源激素水平的变化

- 培养细胞的内源激素水平对胚状体发生有更直接的影响,
- 对离体条件下体细胞胚胎发生, 一个最低限度的内源或外源生长素是必不可少的。

对甜橙驯化愈伤组织的研究中发现, 甜橙的珠心愈伤组织需要IAA和KT才能发生胚胎分化, 经过反复继代培养, 愈伤的成胚潜力逐渐下降, 大约2年以后, 其后代愈伤组织已具备自生激素的能力, 当培养基中有低于0.001mg/L的IAA也会抑制胚胎发生。任何有碍细胞合成生长素的处理(如使用生长素合成抑制剂2-羟基-5-硝基-苯酰溴或7-氮-吡啶, 或辐射分解生长素)都能显著改善胚胎分化情况, 表明甜橙继代培养的愈伤组织成胚潜力的下降, 是由于内源生长素水平太高, 超过临界值所致。

- 综上所述, 在分析和估量各种内外因子的作用时, 应考虑到这些因子是通过某种相互影响和作用的方式对体细胞胚胎发生过程实现调节和控制的, 而不是单独作用的。 (内源生长素水平提高与胚性潜力丧失关系密切)

# 本章小结：

## 1. 愈伤组织的诱导和分化

### (1) 愈伤形成三个时期

起动脱分化时期

分裂期

愈伤组织形成期

### (2) 愈伤组织的继代

## 2. 愈伤组织的形态建成

器官发生方式

胚状体方式

影响因素

- 1、愈伤组织培养含义
- 2、愈伤组织形成分三个时期：诱导期、分裂期、分化期。
- 3、诱导期、分裂期、分化期细胞的特点
- 4、分裂期愈伤组织的特征：细胞分裂快，结构疏松，缺少有组织的结构，维持其不分化的状态，颜色浅而透明
- 5、继代培养的含义
- 7、形态建成含义
- 8、器官发生形成小苗的方式
- 9、胚状体发生途径与器官发生途径形成植株的区别

