

再分化率与再分化系数概念的探讨

陈佰鸿*, 毛娟, 苏小玲, 靳兰

甘肃农业大学农学院, 兰州 730070

在植物组织培养和遗传转化研究中, 人们通常用“再分化率”来衡量外植体或受体材料的再分化能力和水平, 再分化率越高, 表明培养基、培养条件和外植体(或受体材料)等综合因素的选择越合理, 建立的再生体系越完善, 在植物细胞工程研究和转基因研究中的可靠性越好。为了能准确地反映外植体再分化的水平和描述单个外植体再分化形成器官的能力, 提出了“再分化系数”这一概念。目前我国的《植物组织培养》和《植物生物技术》相关的教课书中, 对“再分化系数”还没有一个明确的定义, 也没有“再分化系数”这个概念, 导致中文科技文献中, 对外植体再分化能力的定量表述方式五花八门, 甚至有人提出再分化率超过100%的说法。因此, 对再分化率和再分化系数进行准确的定义, 从教学的角度入手, 让学生在课程学习的过程中建立一个科学准确的概念, 是非常必要的。

1 再分化率

1.1 再分化率(regeneration ratio)的概念 脱分化与再分化是植物离体培养的两个基本环节, 在组织培养中, 外植体首先经过脱分化过程, 将已经功能化的细胞恢复分裂能力, 通常是产生愈伤组织, 然后在愈伤组织的基础上(体细胞胚发生途径例外)经过再分化过程形成一定的器官。再分化率的概念应该定义为: 已分化的外植体个数占接种外植体总数的百分数。其数学表达式为: 再分化率(%)=(已分化的外植体数/接种外植体总数)×100。

1.2 再分化率的不同表述方式 再分化研究中, 外植体的主要类型有愈伤组织、叶片(叶盘)、叶柄、下胚轴、茎段、花器官组织等, 再分化的表现形式主要是不定芽、体细胞胚和不定根, 有些用再生植株表示。在植物组织培养的相关文献中, 对再分化率的表述各不相同, 主要有以下几种表述方式。

1.2.1 再生率 在众多文献中, 用再生率表示外植体的再分化能力和水平。王国平等(2008)在枣幼胚子叶再生植株的研究中, 用再生率表示子叶的再分化能力, 其计算公式为: 子叶再生率(%)=(再生芽总数/接种子叶数)×100%; 谢森等(2005)在辐射花粉

授粉诱导黄瓜单倍体一文中研究不同基因型及辐射剂量对植株再生率的影响时, 用植株再生率表示花粉的再分化能力, 其计算公式为: 植株再生率=(再生植株数/100粒种子)×100%。贺柱等(2007)在皇家夏天葡萄离体叶片再生体系的建立一文中, 用不定芽再生率表示从叶片再分化不定芽的能力, 其计算公式为: 不定芽再生率(%)=(再生芽叶块数/接种叶块数)×100; 代色平和包满珠(2003)在矮牵牛花药培养及植株再生研究中, 用再生苗率反映从愈伤组织诱导分化再生植株的能力, 其计算公式为: 再生苗率=再生苗愈伤组织数/诱导的愈伤组织数。梅传生等(1994)在脱落酸对水稻离体培养植株再生率的调控一文中对植株再生率的定义为: 分化培养一个月后分化植株的愈伤组织块数占转移分化愈伤组织块数的百分率。

从上述文献中对再生率的表述来看, 与再分化率的含义基本相同。但是, 有些表述极不规范, 甚至有表述错误, 直接用比值形式表达, 而没有用百分数形式表述。这反映出人们对此问题的认识在概念上有错误。

1.2.2 再生频率 张志宏等(1997)在苹果、李铁松和王关林(2003)在番茄、王朋等(2002)在辣椒、孙崇波等(2003)在草莓离体再生体系建立中, 用再生频率表示叶片再生不定芽的效率, 计算公式为: 再生频率(%)=(再生不定芽的外植体数/接种外植体数)×100%; 邓馨和胡文玉(2000)在草莓叶片再生芽及遗传转化系统的建立一文中, 采用的计算方法是: 再生频率=(再生芽的叶盘数/总叶盘数)×100%; 陈力耕等(2001)在葡萄、王艳等(2004)在油菜再生体系建立研究中, 采用的计算方法是: 再生频率(%)=(再生不定芽的外植体数/调查外植体数)×100%。

1.2.3 再分化频率 陈耀锋等(2004)在普通小麦基因转化中良好受体系统的建立一文中, 采用再分化频率表述外植体的再分化能力, 计算方法为: 再分化

收稿 2008-10-20 修定 2008-10-30

* E-mail: bhch@gsau.edu.cn; Tel: 0931-7632466

频率 = (再分化愈伤组织数 / 转分化愈伤组织数) × 100%。

1.2.4 分化率 在有些文献中, 用分化率表示外植体的再分化水平。严格地讲, 这种表述是不准确的。但由于比较顺口, 已成为一种习惯性的称谓, 并广泛地应用在口头表达和书面语言中。柴卫淑等(2004)在水稻花药培养、宣朴等(2004)在小麦花药培养中用绿苗分化率计算再分化能力, 公式为: 绿苗的分化率(%) = (绿苗丛数 / 愈伤组织数) × 100; 梁红等(1997)在丹参、张晓英等(2004)在国槐离体再生培养中, 通过愈伤组织途径诱导不定芽的发生, 再分化率的计算方法为: 分化率 = (能分化出小芽的愈伤组织块数 / 接种愈伤组织块数) × 100%。

还有一些文献中, 作者往往把再分化率(分化率)和再生频率作为两个不同的概念来反映外植体的再分化能力和水平, 导致一些试验数据和结果难以让人们正确理解。如王艳等(2005)在新疆甘蓝型油菜下胚轴的组织培养和植株再生研究一文中, 采用的计算方法为: 再生频率 = (长芽外植体数 / 总外植体数) × 100%, 分化率 = (再生芽数 / 接种外植体数) × 100%, 在他们的试验结果中, 再生频率和分化率分别为 35% 和 122.5%。

2 再分化系数

2.1 再分化系数(regeneration coefficient)的概念

再分化率能从整体上反映出外植体进行再分化的能力, 再分化率越高, 表明外植体能够进行器官再分化的能力越强。但是, 在试验研究中经常会出现以下现象: 在不同的试验处理和材料之间, 外植体的再分化率比较接近, 但不同外植体再分化产生的器官数量之间有较大差异; 而在有些试验中, 外植体的再分化率较低, 大部分外植体不进行再分化或逐渐褐化死亡, 但少数能够进行再分化的外植体, 会产生大量的丛生芽或体细胞胚。由于以上问题, 单纯使用“再分化率”已经不能准确反映试验处理之间的差异。有些研究者为了更准确全面的表述试验结果, 往往采用“外植体平均再生芽数”等比较繁琐的语言进行表达。由于现有的中文文献中没有提出一个能够准确描述上述试验现象的概念, 给研究者在文字表达中增加了一定的难度。

为了能较好地反映外植体再分化的水平, 能准确的描述单个外植体再分化形成器官的能力, 提出“再分化系数”这一概念是非常必要的, 可以有效的

解决上述试验现象中存在的问题。

我们认为再分化系数的概念可以定义为: 在离体培养中, 能够进行再分化的外植体产生再分化器官(不定芽、体细胞胚、不定根等)的平均数。其数学表达式为: 再分化系数 = 再分化目标器官的总数 / 能够进行再分化的外植体总数。

再分化目标器官指试验目标期望所形成的器官, 在不同的再分化途径中, 目标器官不同。在不定芽再生途径中, 目标器官为不定芽, 在体细胞胚途径中, 目标器官为体细胞胚。

2.2 再分化系数的相近表述方式 由于没有再分化系数的明确概念, 在文献资料中, 采用不同的方式来表述与再分化系数含义相近或相同的试验结果。归结起来, 主要有以下几种形式。

2.2.1 平均再生芽数(器官数) 张志宏等(1997)在苹果品种新乔纳金离体再生体系的建立一文中, 采用的计算方法是: 外植体平均再生芽数 = 外植体再生不定芽总数 / 再生不定芽的外植体数。王朋等(2002)在抗虫基因(CpTI)辣椒转化的初步研究中, 采用的计算方法为: 叶片平均再生芽数(个) = 叶片再生不定芽总数 / 再生不定芽的叶片数。孙崇波等(2003)在草莓高效离体再生体系的研究中, 采用的计算方法是: 外植体(叶片、叶柄)再生芽数 = 外植体再生不定芽总数 / 再生不定芽外植体数。

Przetakiewicz等(2003)在小麦等植物再分化研究中, 采用的计算公式为: 再分化系数 = 外植体形成胚性愈伤组织的百分数 × 再生植株的平均数 / 100 (The regeneration coefficient was estimated according to the formula = percentage of explants forming embryogenic callus × mean number of regenerated plantlets / 100)。在这个表达式中, 采用了再分化率乘以已分化外植体平均再生植株数计算再分化系数的方式, 而“已分化外植体平均再生植株数”就是我们提出的“再分化系数”概念。虽然“regeneration coefficient”与我们所提的“再分化系数”在英文表达上属同一概念, 但我们认为, Przetakiewicz等(2003)采用“再分化率 × 再分化系数”的计算方法, 不便于更好地反映试验结果。用再分化率就可以从整体上反映出外植体再分化的能力, 采用再分化系数的目的, 是为了进一步反映出已经再分化的外植体形成目标器官的水平, 有利于更清晰的反映试验结果。由于在其他相关外文文献中没有找到

“regeneration coefficient”的概念及计算方法,所以“再分化系数”的概念还有待商榷。

2.2.2 增殖系数 在组织培养和离体快繁中,通常采用增殖系数来反映继代培养中培养物的增殖速度和效率。它与再分化系数有一定的相关性和相近性。再分化系数侧重于描述初代培养过程中外植体再分化形成器官的水平,研究对象是已经功能化的器官与组织,诱导产生具有增殖能力的器官(不定芽、体细胞胚等)的能力,难度较大。增殖系数侧重于反映用初代培养再分化形成的具有增殖能力的器官,通过继代培养进行数量扩大的能力,研究对象是继代培养材料。

王国平等(2008)在枣幼胚子叶再生植株的研究中采用的计算方法为:增殖系数=(接种30 d的芽苗数/接种的芽苗数)×100%;黄美娟等(2008)在银脉单药花组织培养及植株再生中采用计算方法是:增殖系数(倍)=转接后瓶数/转接前瓶数;吴幼媚等(2007)在柳窿桉优株嫩芽离体培养再生植株技术中采用的计算方法是:增殖系数=1个培养周期产生有效芽总数/接种芽总数;林荣双等(2003)在花生成熟胚轴的植株再生和快繁中采用的计算方法是:增殖系数=新接种的(茎段数+小芽数)/原有的小苗数。从上述文献来看,计算方式各不相同,但都是在描述继代培养过程中材料的增殖倍数。唯独王国平等(2008)在增殖系数计算中采用了百分数形式。

2.2.3 繁殖系数 在组织培养中,繁殖系数与增殖系数应该是同一个概念的不同表达方式,研究对象也是继代培养材料的增殖能力,其计算方法是相同的。唐琳等(1999)在苦瓜离体快繁中,采用的计算方法是:繁殖系数=(增殖后芽的总数×30)/(继代芽数×培养时间);李珉等(2002)在糯米藤的离体快繁中,采用的计算方法与唐琳等(1999)的计算方法是相同的,在计算繁殖系数时考虑了时间因素,都以30 d作为一个理论培养周期,完成一个培养周期所需的实际天数越短,繁殖系数就越高。这种计算方法有利于评价不同植物种类和培养条件对增殖效率的影响。

但是在有些文献中,把增殖系数与再分化系数混为一谈,将增殖系数用在初代培养中来评价外植体的再生能力,这种表达方式是不科学的。如王小素等(1997)在佛手瓜下胚轴离体培养及再生植株研

究中,采用的计算方法是:繁殖系数=佛手瓜的一个下胚轴在一个培养周期(从愈伤组织到成苗80~90 d)内形成再生植株的个数。

张艳等(2001)在金钗石斛培养研究中采用的计算方法是:繁殖系数=(诱导产生芽总数/产生芽外植体总数)×100%,与王国平等(2008)计算增殖系数的方法相同。

2.2.4 增值倍数 在部分文献中,采用增值倍数来描述继代培养过程中外植体的增殖速度。王海娥(2005)在朗姆系绣球的组织培养及植株再生体系研究中,采用的计算方法是:增值倍数=0.5 cm的芽苗总数/接种新梢总数。增值倍数是一种口头表达或非正式表达方式,在书面语言中应采用增殖系数较好。

综上所述,在外植体再分化研究中,用再分化率来反映外植体再分化的能力,用再分化系数来反映外植体再分化的水平。再分化率可以与再生率通用,建议不要采用分化率、再生频率和再分化频率等术语。再分化系数可以作为一个新的专业术语,来弥补目前再分化研究中的缺陷,从而更好地反映出外植体再分化的水平,可以与再生系数通用。增殖系数、繁殖系数应该侧重于描述继代培养过程中培养材料的增殖能力,不应该用于描述外植体再分化的能力和水平。

参考文献

- 柴卫淑, 谭学林, 师佳, 陈联秀(2004). 液体培养基在水稻花药培养中的应用研究. 中国农学通报, 20 (4): 145~146
- 陈力耕, 刘淑芳, 胡西琴(2001). 葡萄高效再生体系的建立及转LEAFY基因的研究. 浙江大学学报, 27 (5): 523~526
- 陈耀锋, 曹团武, 丁云姣(2004). 普通小麦基因转化中良好受体系统的建立. 西北农林科技大学学报, 32 (9): 1~3
- 代色平, 包满珠(2003). 矮牵牛花药培养及植株再生研究. 亚热带植物科学, 32 (2): 55~57
- 邓馨, 胡文玉(2000). 草莓叶片再生芽及遗传转化系统的建立. 植物学通报, (2): 174~178
- 贺柱, 师校欣, 杜国强, 葛静茹(2007). 皇家夏天葡萄离体叶片再生体系的建立. 农业生物技术科学, 23 (2): 74~76
- 黄美娟, 廖玉洁, 刘齐元, 黄海泉(2008). 银脉单药花组织培养及植株再生. 江西农业大学学报, 30 (3): 509~513
- 李珉, 曾涛, 张义正(2002). 糯米藤的离体快繁系统的建立. 四川大学学报(自然科学版), 39 (2): 356~360
- 李铁松, 王关林(2003). 番茄外植体诱导直接分化不定芽建立高频再生系统. 辽宁师范大学学报, 26 (2): 178~182
- 梁红, 何宇清, 赵洁(1997). 生长调节物质对丹参叶片脱分化及根芽分化的效应. 华中师范大学学报(自然科学版), 31 (3): 328~331
- 林荣双, 梁丽琨, 王庆华, 肖显华(2003). 花生成熟胚轴的植株

- 再生和快繁. 生物技术, 13 (1): 29~31
- 梅传生, 汤日圣, 张金渝, 吴光南(1994). 脱落酸对水稻离体培养植株再生率的调控. 农业生物技术学报, 2 (1): 96~99
- 孙崇波, 谢鸣, 蒋桂华, 张慧琴, 黄普乐(2003). 草莓主栽品种丰香高效离体再生体系的研究. 浙江农业学报, 15 (2): 69~72
- 唐琳, 苟小平, 陈放, 贾勇炯(1999). 用离体培养无性繁殖苦瓜. 四川大学学报(自然科学版), 36 (1): 144~147
- 王国平, 李晓梅, 马会勤(2008). 枣幼胚子叶再生植株的研究. 核农学报, 22 (2): 152~155
- 王海娥(2005). 朗姆系绣球的组织培养及植株再生体系研究[硕士论文]. 四川雅安: 四川农业大学, 4~9
- 王朋, 王关林, 方宏筠(2002). 抗虫基因(CpTI)辣椒转化的初步研究. 沈阳农业大学学报, 33 (1): 30~32
- 王小素, 李步勋, 王广东(1997). 佛手瓜下胚轴离体培养及再生植株. 西北农业大学学报, 25 (1): 83~87
- 王艳, 贺宾, 曾幼玲, 高燕, 张富春(2004). 甘蓝型油菜带柄子叶高频再生植株的研究. 中国油料作物学报, 26 (4): 87~90
- 王艳, 曾幼玲, 张富春, 贺宾, 高燕(2005). 新疆甘蓝型油菜下胚轴的组织培养和植株再生研究. 新疆农业科学, 42 (1): 24~28
- 吴幼媚, 王以红, 蔡玲, 黄金使(2007). 柳窿桉优株嫩芽离体培养再生植株技术. 林业科技开发, 21 (5): 63~65
- 谢森, 赵隼, 潘俊松, 何欢乐, 吴爱忠, 蔡润(2005). 辐射花粉授粉诱导黄瓜单倍体. 上海交通大学学报(农业科学版), 23 (2): 153~157
- 宣朴, 郭元林, 岳春芳, 尹春蓉(2004). 低温对小麦花培育伤组织绿苗分化率的影响. 西南农业学报, 17 (2): 146~148
- 张晓英, 尹伟伦, 朱祯, 王华芳(2004). 抗生素对国槐愈伤组织诱导和生长的影响. 北京林业大学学报, 26 (6): 62~65
- 张艳, 范俊安, 李泉森, 叶代峻(2001). 金钗石斛培养初步研究. 时珍国医国药, 12 (2): 189~190
- 张志宏, 景士西, 王关林, 吴禄平, 方宏筠(1997). 苹果品种新乔纳金离体再生体系的建立. 农业生物技术学报, 5 (3): 305~307
- Przetakiewicz A, Orczyk W, Nadolska-Orczyk A (2003). The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale. Plant Cell Tiss Org Cult, 73 (3): 245~256