

硝酸银与脱落酸相配合影响菜心离体培养之植株 再生方式的组织学研究

张鹏 凌定厚

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘要 菜心带子叶的子叶柄在培养基中是否添加 AgNO_3 与 ABA 可导致两种不同的植株再生方式: 添加 AgNO_3 与 ABA 时由外植体直接出芽, 而不加 AgNO_3 与 ABA 则植株再生经过愈伤组织阶段再分化成芽。培养 1-3d, 子叶柄切口端之皮层及维管束的薄壁细胞开始启动, 细胞迅速分裂而形成分生细胞团和少量愈伤组织。第 4 天, 在不含 AgNO_3 与 ABA 的培养基上, 分生细胞团则形成根原基进而发育成根; 或者去分化形成愈伤组织。在这种条件下, 只有少数芽原基可由培养 15d 后的愈伤组织再分化产生。在含 AgNO_3 与 ABA 的培养基上, 分生细胞旺盛增殖而形成大量分生细胞团, 并由这种分生细胞团直接形成大量的芽原基。10d 左右即可产生为数众多的丛生不定芽。 AgNO_3 与 ABA 相配合抑制了不定根及愈伤组织的形成和生长, 促进大量增生的分生细胞团直接分化为不定芽的芽原基。

关键词 菜心; 离体培养; AgNO_3 ; ABA; 植株再生; 组织学

HISTOLOGICAL STUDIES OF PLANT REGENERATION MODES OF *BRASSICA PARACHINENSIS* BY AFFECTING AgNO_3 AND ABA

Zhang Peng Ling Dinghou

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

Abstract Histological studies revealed that there were two different regeneration modes when cotyledon petioles of *Brassica parachinensis* as the explants were cultured in the medium with or without AgNO_3 and ABA. In mode I, in medium with AgNO_3 and ABA, shoots regenerated directly from the cut end of cotyledon petioles and did not pass through callus stage. After 4 days of inoculation, the vascular parenchyma cells at the cut end of the explant initiated to active division and became meristem centre and then adventitious buds were regenerated. In mode II, in medium without AgNO_3 and ABA, vascular parenchyma cells at the cut end initiated to division and gave rise to form root meristem or/and callus from which shoots and roots were subsequently regenerated. So the two modes of plant regeneration resulted in whether the medium contained AgNO_3 and ABA or not.

Key words *Brassica parachinensis*; *In vitro* culture; Histology; AgNO_3 ; ABA; Plant regeneration

* 现工作单位为山东省果树研究所

1995-07-17 收稿; 1995-10-08 修回

菜心 (*Brassica parachinensis* Bail.) 为华南地区重要的蔬菜作物, 一年四季产销, 具有很大的经济价值, 备受遗传育种学家的重视^[1-4]。大量研究表明, 芸苔属菜心属于植株再生困难的物种。其植株再生频率很低, 愈伤组织进行分化时, 往往形成大量不定根, 从而抑制了芽的分化。为解决这一问题我们曾报道在培养基中附加 AgNO_3 与 ABA 可抑制不定根的分化和愈伤组织的增殖; 促进直接芽再生, 使植株再生频率提高到 85% 以上, 且增加了每个外植体产生不定芽的数目; 同时大大地缩短诱导芽再生所需的培养时间^{*}。从而解决了菜心植株再生频率低的难点^[3,4], 为进一步运用基因工程等技术进行菜心品种改良提供依据。为进一步了解 AgNO_3 与 ABA 相配合大幅度提高菜心植株再生能力的原因, 从植株再生途径上理解 AgNO_3 与 ABA 对菜心植株再生之积极作用, 本文对菜心子叶柄在离体器官发生及植株再生方式进行了组织学的研究。

1 材料与方 法

以菜心 (*Brassica parachinensis*) 品种 49-19 为研究材料, 取 4d 龄无菌幼苗带子叶的子叶柄 (简称为子叶-子叶柄) 为外植体, 插植接种于再生培养基, 使子叶柄切口端插入培养基的深度约为 2mm。培养基为 MS I ($\text{MS} + \text{BAP } 2\text{mg L}^{-1} + \text{NAA } 1\text{mg L}^{-1}$) 和 MS II ($\text{MS} + \text{BAP } 2\text{mg L}^{-1} + \text{NAA } 1\text{mg L}^{-1} + \text{AgNO}_3 \text{ } 4\text{mg L}^{-1} + \text{ABA } 0.5\text{mg L}^{-1}$) 两种。在温度为 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 和 16 h 光照/8 h 黑暗的光周期下培养, 光强为 1600-2000Lx。接种后每天取样, 直至芽和根的出现。材料用 FAA 固定液固定, 按常规石蜡切片整体染色法制片^[5], 用铁矾-苏木精染色, 切片厚 $8\mu\text{m}$; 中性树脂封片。在 Olympus 显微镜下观察并拍照。

2 观察结果

2.1 外植体的结构

菜心正常的子叶横切面呈肾形, 外为一层排列较整齐的表皮细胞, 表皮下即为疏松的皮层薄壁细胞; 皮层无特化的上下皮层之分。皮层中央有一大的中央维管束, 其两侧呈弧形对称排列着两个小的维管束。维管束内含输导组织及维管薄壁细胞。在组织细胞内可见有颗粒状的淀粉粒散生分布 (图版 I: 1)。

2.2 培养过程中外植体的细胞组织学变化

2.2.1 细胞的启动与分裂

在 MS I (不含 AgNO_3 与 ABA) 和 MS II (含 AgNO_3 与 ABA) 培养基上, 外植体在培养的头三天内, 两者在形态和组织学上没有明显区别。培养 1-2d, 外植体形态上无很大变化, 但切口端细胞开始膨大, 在表皮下 2-3 层皮层薄壁细胞至维管束薄壁细胞变化尤为明显: 细胞核增大, 核仁明显, 着色较深, 且有边缘移至细胞中央, 细胞质变浓 (图版 I: 2)。这一时期为细胞的启动期。经启动的细胞立刻进入旺盛的细胞分裂阶段 (图版 I: 2)。分裂方向既有平周又有垂周, 为无规则的分裂。

2.2.2 分生细胞团和少量愈伤组织的产生

细胞反复分裂的结果是切口端显著膨大。培养至第 3 天, 在切口端组织内部靠近维管束周

* 张鹏, 凌定厚. 硝酸银与脱落酸相配合大幅度地提高菜心离体植株再生频率. 植物学报, 1996 (印刷中)

围启动的分生细胞分裂形成了由多个细胞组成的分生细胞团。分生细胞团与周围细胞区别明显: 细胞呈方形或多边形, 且更小; 细胞质更为稠密; 核及核仁更大; 整个细胞团着色很深(图版 I: 3,4)。分生细胞团以外的分生细胞分裂形成了少量愈伤组织(图版 I: 3)。3d 以后, 两种培养基对培养物在形态及细胞组织学上发生明显差异。

2.2.3 培养物在 MS I (不含 AgNO_3 与 ABA) 培养基上的器官发生

在形态上, 外植体培养到第 7 天, 子叶柄切口处有的形成一团淡黄色的愈伤组织, 有的愈伤组织与根同时发生。培养至 15d, 多数培养物已被根或根毛所覆盖, 个别只被少量根毛覆盖的愈伤组织开始转绿。由于根组织的抑制, 直到 20d 时才形成肉眼可见的绿色不定芽, 且植株再生频率十分低, 这就是文献上报道的芸苔属植株再生的主要问题。

在组织学上, 培养至第 5 天, 可观察到由分生细胞团发育形成的根原基, 未观察到芽原基的存在(图版 I: 5)。根原基顶端可以观察到几层分生细胞, 组成根冠原、皮层原及中柱原(图版 I: 6)。培养至 7d, 根原基已纵向伸长, 横向明显分层, 并突出培养物表面形成不定根(图版 I: 7)。有些分生细胞团在不断分裂增加自身细胞数的同时, 不断分化薄壁细胞而形成愈伤组织, 成为愈伤组织的生长中心, 并导致大量愈伤组织的产生(图版 I: 5,8)。培养至 12d 左右可观察到愈伤组织表层的薄壁细胞再次脱分化形成分生细胞团(图版 II: 1)。分生细胞团不断增殖, 逐渐发育成器官原基。多数为根原基, 少数为芽原基(图版 II: 2,3)。因此不定芽是由愈伤组织产生的, 同时不定根亦可由愈伤组织的表层形成。17d 后, 分化的芽原基可发育成完整的不定芽。

2.2.4 培养物在 MS II (含 AgNO_3 与 ABA) 上的器官发生

外植体培养至 7d, 从切口端长出一团白色致密的并伴有绿色突起的组织。10d 左右即可见这些绿色突起形成肉眼可辨的绿色丛生芽(这种小芽在 MS I 培养基上需 20d 才能产生)。小芽不断长大, 14d 已形成试管小苗。

显微观察表明, 培养至 3d 的外植体在切口端已形成分生细胞团和少量愈伤组织(图版 I: 3)。与在 MS I 培养基不同的是此分生细胞团在以后的培养中能够旺盛增殖, 至 4d 时, 分生细胞团已活跃分裂形成球形的分生组织(图版 II: 4)。球形分生细胞团以单向极性方式不断进行平周分裂向外增加细胞层数, 垂周分裂增加周径的细胞数。增殖结果整个外植体切口端被分生组织所充斥, 并向培养物表面扩增。分生组织连接成片, 并逐渐抑制愈伤组织的生长(图版 II: 5)。培养到第 6 天, 分生细胞团以表面几层细胞分裂最为旺盛, 并突出培养物的表面, 前端变为钝平, 呈“倒三角形”, 结构上无明显分层排列, 为具有原套和原体组织的芽原基(图版 II: 6)。芽原基进一步发育, 两侧产生突起, 出现叶原座(图版 II: 6), 呈向心式发育。当培养至第 8 天已有明显的不定芽的形成, 芽在组织结构上与正常芽相同, 具叶原基、原套和原体(图版 II: 7)。进一步培养, 叶原基长大并出现分叉, 可观察到整个分生组织的表面分化出许多芽原基和不定芽, 使一个外植体最终产生丛生芽(图版 II: 8)。培养物中亦有个别根原基从分生细胞团直接产生, 或在培养后期从组织表面形成。与在 MS I 培养基上产生的大量根及根毛相比较, 培养物在 MS II 培养基上只产生少量的根。因此添加 AgNO_3 与 ABA 可有效地促进芽原基的扩增, 抑制根组织的产生, 从而消除或缓解了根或根毛对芽再生的抑制作用。

3 讨论与结论

细胞组织学观察结果表明,在本实验条件下菜心子叶-子叶柄有两种不同的植株再生方式:由外植体直接(不经过愈伤组织)再生和经由愈伤组织阶段而再生。导致在相同条件下(包括植物生长激素及培养基其他成分)产生不同再生方式的因素是在培养基中是否添加 AgNO_3 与 ABA。显微观察表明,在培养的头 3d,在两种培养基上外植体均表现为细胞启动与分裂。但在分生细胞团产生之后两者开始出现明显差异,主要表现在分生细胞团的发育方向上。在 MS I 培养基上,分生细胞团直接形成根原基并产生大量的不定根,或去分化形成愈伤组织,而不形成芽原基。最终导致不定根和愈伤组织的形成,这就是文献上所报道的菜心离体培养时植株再生率低的原因。但在 MS II 培养基上,分生细胞团旺盛增殖,并直接再生而形成大量的芽原基,且芽原基亦可扩增,因而最终产生大量的丛生不定芽,同时由于 AgNO_3 与 ABA 的作用,根及愈伤组织的生长受到了抑制,促进了不定芽的直接再生。故 AgNO_3 与 ABA 相配合的作用主要表现在,一方面促进分生细胞团的增殖,使分生细胞团直接再生为芽原基,形成大量的不定芽;另一方面抑制愈伤组织的生长和不定根的形成,从而消除了植株再生的抑制因素。虽然有关 AgNO_3 ^[6,7] 或 ABA^[8,9] 对植株再生的促进作用已有报道,但尚未见有关这两种成分的作用而影响培养物植株再生途径的。对于 AgNO_3 与 ABA 对植株再生的作用机制值得深入研究。

参考文献

- 1 曹寿椿,李式军.白菜地方品种的初步研究 III.不结球白菜品种的园艺学分类.南京农学院学报,1982,2:30-36
- 2 张兰英,李耿光,陈如珠等.菜心下胚轴原生质体培养和植株再生.植物学报,1994,36(2):105-110
- 3 徐是雄,胡秀清,许霖庆.植物组织培养、外植体的形态发生和中药增效作用的研究.植物生理学报,1980,6(4):419-428
- 4 李开莲,李耿光,张兰英等.菜心愈伤组织的诱导与植株再生.中国科学院华南植物研究所集刊,第6集,1990,81-86
- 5 王蔚魁.植物胚胎学研究中石蜡切片的几种整体染色法.遗传,1981,3(5):33-34
- 6 Chi G-L, Barfield D G, Sim G-E et al. Effect of AgNO_3 and aminoethoxyvinylglycine on *in vitro* shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant *Brassica* genotypes. Plant Cell Rep, 1990, 9(4):195-198
- 7 Chi G-L, Pua E C. Ethylene Inhibitors enhances *de novo* shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris* ssp. *chinensis* (chinese cabbage) *in vitro*. Plant Sci., 1989, 64:243-250
- 8 Inoue M, Maeda E. Stimulation of shoot bud and plant formation in rice callus culture by two-step culture method using abscisic acid and kinetin. Jap J Crop Sci, 1981, 50:318-322
- 9 Yamaguchi T, Street H E. Stimulation of growth of exised culture roots of soya bean by abscisic acid. Ann Bot, 1977, 41:1129-1133

图版说明

bp — 芽原基 Bud primordium; c — 愈伤组织 Callus; cc — 愈伤组织分化中心 Callus differentiation centre;
Ca — 根冠原 Calyptrogen; Co — 原体 Corpus; dc — 分裂之细胞 Dividing cell; l 或 L — 叶原基 Leaf primordium;
mc — 分生细胞团 Meristematic cell masses; p — 薄壁细胞 Parenchyma; Pe — 皮层原 Periblem; Pl — 中柱原 Plerome; r — 不定根 Adventitious root; rp — 根原基 Root primordium; Tu — 原套 Tunic; vb — 维管束 Vascular

bundle; vp — 维管束薄壁组织 Vascular parenchyma

图版 I

1. 未经培养的子叶柄切口端横切面; ×60
2. 培养 2d 的子叶柄切口端横切面, 示皮层及维管束薄壁组织(vp)细胞的启动与分裂(dc); ×150
3. 培养 3d 的子叶柄纵切面, 示细胞分裂形成的分生细胞团(←)及少量愈伤组织(c); ×100
4. 3 的部分放大, 示放大的分生细胞团(mc); ×400

图版 I 5-8 和图版 II 1-3 在 MS I 培养基上培养

5. 培养 5d 时由分生细胞团构成的愈伤组织分化中心(cc)和产生的愈伤组织(c), 及由分生细胞团分化形成的根原基(rp); ×160
6. 根原基形成的初期, 示由几层整齐排列的分生细胞组成的根冠原(Ca)、皮层原(Pe)及中柱原(Pl); ×400
7. 培养 7d 时由根原基伸长形成的不定根(r); ×200
8. 由子叶柄切口端产生的大量愈伤组织(c); ×100

图版 II

1. 子叶柄切口端横切面, 示愈伤组织(c)及其表层细胞再次脱分化形成的分生细胞团(↓); ×200
2. 培养至 16d 时由愈伤组织(c)表面形成的芽原基(bp); ×300
3. 由愈伤组织表面形成的具原套(Tu)、原体(Co)及叶原基(L)的不定芽; ×300

图版 II 4-8 在 MS II 培养基上培养

4. 培养 4d 时子叶柄切口端形成的球形分生细胞团(mc); ×160
5. 连接成片的分生组织; ×120
6. 培养 6d 时, 子叶柄切口端由分生细胞团形成的具原套(Tu)、原体(Co)和叶原座(←)的芽原基; ×200
7. 培养至 8d 时形成的不定芽, 示叶原基(l); ×400
8. 由分生组织扩增形成的芽原基群(bp)及叶原基产生的次生不定芽(→). ×200

Explanation of plates

Plate I

1. Transverse section of uncultured cotyledon petiole; ×60
2. Transverse section of cotyledon petiole cut end after 2 days of culture, showing the cells initiated to division (dc) in cortex and vascular parenchyma (vp) tissue; ×150
3. Longitudinal section of cotyledon petiole after culture for 3 days, showing meristem cell masses(←) and some calli (c); ×100
4. Magnified meristem cell masses (mc) of fig. 3; ×400

Fig. 5-8 in plate I and Fig. 1-3 in plate II were from the cultures on MS I medium

5. The meristem cell masses formed root primordium (rp), callus differentiation centre (cc) and calli (c) after 5 days of culture; ×160
6. The initiating stage of root primordium showing calyptrogen (Ca), periblem (Pe) and plerome (Pl); ×400
7. Root primordium growing and forming adventitious roots (r) after 7 days of culture; ×200
8. Calli (c) formed from cotyledon petiole cut end; ×100

Plate II

1. Transverse section of cotyledon petiole cut end showing callus (c) and the meristem cell masses(↓) on the surface of the callus; ×200
 2. After culture for 16 days, the bud primordium (bp) was formed from surface of callus; ×300
 3. Adventitious bud with tunic (Tu), Corpus (Co) and leaf primordium (L) formed from callus surface; ×300
- Fig. 4-8 of plate II were from the culture on MS II medium
4. Globular meristem cell masses (mc) formed from cotyledon petiole cut end after 4 days of culture; ×160
 5. A large number of meristem tissues (mc) regenerated from a piece of explant; ×120
 6. After 6 days of culture, the meristem cell masses of cotyledon petiole cut end formed bud primordium which consisted of tunica (Tu), corpus (Co) and leaf buttress (←); ×200
 7. After culture for 8 days, adventitious buds were formed, showing leaf primordium (l); ×400
 8. A group of bud primordia (bp) from a piece of explant, showing a secondary adventitious bud initiated from the leaf primordium (→). ×200

《食用菌学报》征订启事

《食用菌学报》系由国家科委批准，全国公开发行的学术类刊物。主要为食用菌专业教学和科研人员、生产单位的技术人员及供销外贸系统和领导机关的专业干部提供食用菌遗传育种、驯化栽培、菇房管理、栽培材料、病虫害防治、生理生化及产后加工等方面的最新研究成果。

《食用菌学报》为季刊，16开本，64页。每期定价5.00元，全年20.00元，需挂号者另加5元挂号包装费。欢迎读者踊跃订阅。

汇款地址：上海市北翟路2901号 上海市农业科学院情报所
邮政编码：201106
开户银行：农行上海市漕河泾支行北新泾营业所
账 号：328-043100993

《食用菌学报》编辑部