

芥蓝薄细胞层培养中愈伤组织和器官形成的细胞组织学观察*

郑玉梅 李 育** 王世旎

(华南农业大学农业生物系, 广州, 510642)

摘要 芥蓝 (*Brassica alboglabra* Bailey) 花序轴的薄细胞层, 培养在附加 0.5 mg/L NAA, 5 mg/L BA 以及 0.25 g/L 水解乳蛋白的 MS 培养基上, 诱导出愈伤组织并进一步形成芽和根。显微镜检表明, 表皮和亚表皮都可进行细胞分裂, 分生细胞团起源于亚表皮。器官发生有直接发生和间接发生两类。外植体细胞未脱分化时, 无淀粉累积, 一旦分化启动, 便累积淀粉。随细胞增殖及芽的分化, 细胞中累积的淀粉被利用而消失, 当芽原基形成之后, 又积累淀粉。

关键词 芥蓝; 薄细胞层; 愈伤组织; 器官形成

中图分类号 Q132

薄细胞层培养是用在细胞学上分化了的表皮和亚表皮(皮层厚角组织和薄壁组织)进行离体培养。此法从 1970 年由 Tran Thanh Van 等人最初报道以来, 至今已用 20 多个属的植物进行过薄层培养。芥蓝在东南亚是一种重要的蔬菜植物(Wong et al, 1987) 早先报道的一些组培表明, 其各种大外植体的培养都有较高频率的芽再生(Pau 1987; Pau et al, 1989; Wong et al, 1987)。但至今未见国内、外报道用芥蓝进行薄层培养的研究。本文于 1991 年初至 1992 年 5 月, 做了芥蓝薄层培养中愈伤组织以及苗和根的形态发生的细胞——组织学观察, 试图为进一步研究形态发生的调控机制, 提供依据。

1 材料和方法

本文所用的芥蓝 (*Brassica alboglabra* Bailey) 是取自广州市蔬菜研究所大田栽培植株。用生长旺盛的现蕾期植株, 从茎端向下数, 取其第 2~4 等 3 个节间茎段, 用 70% v/v 酒精浸泡 1 min, 流水冲洗片刻。然后, 在 0.1% 升汞中浸 10 min 灭菌, 再用无菌水冲洗 3 次, 每次 5 min。此后用灭菌刀片沿茎的切向纵切, 取长约 3~4 mm, 宽 2~3 mm 的薄层, 它包含节间表皮和其内方的大约 5~13 层细胞。将此外植体切面朝下, 接种在培养基上。为诱导愈伤组织以及根和苗的形成, 所用的培养基为附加 0.5 mg/L NAA, 5 mg/L BA 和 0.25 g/L 水解乳蛋白的 MS 培养基。培养温度为 26~28 ℃, 每天光照 10 h, 光强 2000 lx。

从培养后第 2 天开始, 每隔 2 天取适量的培养物用于固定, 直到第 12 天后为止。固定液为 FAA 和 Carnoy's 两种。按常规石蜡制片法制片。切片厚约 10 μm, 做连续切片。用铁矾苏木精染色, 或用高碘酸-雪夫试剂(PAS)反应法着色, 用来观察淀粉的积累及变化过程用的材料。用 Olympus 显微镜观察并拍照。

2 观察结果

2.1 愈伤组织的形态发生

培养 2 天后, 肉眼可见外植体开始稍膨大, 其上表面显出凹凸不平。此时的组织切片观察

1994-01-20 收稿

*本文为国家自然科学基金资助项目。

**现在江西省供销社工业贸易公司工作。

表明,已有部分表皮细胞、厚角细胞和薄壁细胞开始进行无丝分裂和有丝分裂。但以劈裂式无丝分裂最为常见(图版-1)。

培养4天后,外植体更加明显增大,组织切片可见,起动的细胞全面地进行活跃的细胞分裂,开始形成愈伤组织块。这些刚产生的愈伤组织细胞,呈多边形,细胞小,细胞质着色更深,液泡少而小,核和核仁更大。由于细胞分裂活跃,细胞数目迅速增多,而且分割是多方向的,使新产生的组织作径向生长,开始出现可见愈伤组织构成的组织块(图版-2)。但是此时尚未见愈伤组织块分化的结构。

培养6天后,用解剖显微镜观察,可见外植体接近培养基的表面,有一些乳白色的突起。切片观察,此时愈伤组织块进一步发展,细胞分裂常在此愈伤组织周缘的近表面部分先开始,由外向内递减,相应地内部细胞显著增大,细胞质稀少而液泡较多,核和核仁小。这时愈伤组织迅速增大,随后细胞分裂更集中在周缘部分,且较多地作平周分裂,构成所谓愈伤组织形成层,其细胞连续地进行平周分裂,增生的细胞整齐地径向排列,其外表形成了周皮。愈伤组织内部或近表面处出现分生细胞团。分生细胞团进一步发展,其外围的细胞较多地进行平周分裂,并延切向方向伸长,呈现形成层状结构,中央的细胞作多方向的分裂而产生大小不等的多边形细胞。此时的分生细胞团已成为一个生长中心,这种成团的组织,可称为分生组织结节(王凯基等,1979)(图版-3)。

2.2 愈伤组织的分化及器官形成

培养8天后,外植体的近培养基切面及周围,已有大量乳白色的愈伤组织。据组织切片观察,见其内部的分生细胞团已不再分裂形成愈伤组织,而直接形成芽原基或根原基(图版-4)。芽原基形成后,分生细胞团进一步分裂,向外突出形成苗端生长锥,继而出现叶原基,逐渐分化形成了绿芽。根原基形成时,分生细胞团单向的直接向外分裂,形成根的生长点,逐渐穿过其外方组织伸出而成为根。

另一种器官发生方式是散生于愈伤组织表面附近的分生细胞团进行活跃的细胞分裂,增多细胞并向外扩展到愈伤组织表面,分化为苗端分生组织。苗端分生组织进一步分化叶原基而形成芽,而根则直接和分生组织结节联系着,在分生组织结节外围的形成层状细胞,具单向生长时形成根原基。这种由愈伤组织间接发育成的根和芽原基之间,最初没有连接的维管组织。当根和芽形成之后,才逐渐形成连接的维管组织,形成再生植株。

培养10天后,在解剖放大镜下即可见到芽和根,它们都是从近培养基的愈伤组织表面生出的(图版-5)。培养12天后,肉眼即可见所形成的芽和根。

2.3 形态发生与淀粉积累的关系

显微镜检观察PAS反应处理的外植体切片,在刚接种的外植体中,可见其细胞内没有淀粉的积累(图版-6)。培养2天后,可见出现了的细胞分裂活动并积累淀粉。此时可见淀粉呈桃红色的小颗粒,均匀地分布于细胞内(图版-7)。培养4天后,可见细胞分裂更为活跃,产生了分生细胞团。在它们周围的细胞内积累大量淀粉粒(图版-8),颗粒也较大,有些围绕着细胞核外围而分布。培养6天后,淀粉呈减少的趋势,可能是由于此时愈伤组织中产生许多分生组织结节过程中细胞增殖需要,淀粉转化利用之故(图版-9)。培养8天后,当苗端分生组织出现时,在距其顶端一定距离的细胞中,又可见明显的淀粉积累,这是在形成苗端时普遍存在的现象(图版-10)。培养10天后,随着芽原基的分化、生长,淀粉又被利用而渐渐消失。芽原基刚出现时,细胞中无淀粉积累。到芽原基更加长大突出时,其周围的细胞才有淀粉的积累(图版-11)。

3 讨论

在烟草(*Nicotiana tabacum* L.)的薄细胞层培养中,愈伤组织形成和器官产生,都来源于亚表皮细胞(Tran thanh Van, 1980)。在蓝猪耳(*Torenia fournieri* Lindl.)的薄层培养中,根起源于薄壁细胞,芽起源于表皮或亚表皮细胞(Hassane, 1974)。而在*Nautilocalyx lynchel* L. 的薄层培养中芽和根都起源于表皮(Tran Thanh Van et al, 1970)。在本研究中,可见少数表皮细胞能进行无丝分裂,但只作垂周分裂,并不形成分裂中心。而亚表皮细胞既有垂周分裂又有平周分裂,故能行成分裂中心,进而产生愈伤组织或直接形成器官。这和 Klismaszewska 等(1985)在 *Brassica napus* 中的研究结果相同。

陆文樑(1983)在胡萝卜细胞离体培养中的观察和他引证 Cionini (1978)在蚕豆子叶离体培养中的观察,都认为细胞脱分化,进行有丝分裂和无丝分裂,失去原有的分化状态,转变成为具有分生能力的胚性细胞,进行再分化。如前所述,在本项研究中,也观察到类似的情况。在亚表皮中可同时观察到有丝分裂和无丝分裂。这些细胞分裂是脱分化的结果,使得细胞从原来的分化状态进入细胞分裂,形成生长旺盛的胚性细胞。

本研究观察到的无丝分裂,有几种方式,但是以劈裂方式为主。而无丝分裂究竟有多少种方式?各种方式的细胞学特点又怎样?有待进一步研究。

培养中淀粉的动态。在本研究的薄层培养过程中,培养物中淀粉的动态已如前述。Thorpe 等(1970)在烟草愈伤组织的培养中,已注意到在芽的形成之前有一个积累淀粉的时期。随后,积累的淀粉在器官分化过程中被消耗掉。而在非诱导芽形成的条件下,愈伤组织中没有这样的淀粉积累和消失过程。本研究也观察到类似的动态变化过程。

如前所述,本研究的整个培养过程中,采用一种培养基便能形成再生植株。在自然条件下经盆栽,能正常开花结实,产生种子。而以往的许多研究表明,培层培养再生植株,一般至少需要两种以上不同的培养基。例如向日葵(Berhard et al, 1990),烟草(张丕方等, 1989),番油菜(Klismaszewska, 1985)等薄层培养的报道。至于我们获得再生植株的具体过程,将另行报道。

参 考 文 献

- 王凯基,张丕方,倪德祥,等. 1979. 油橄榄组织培养的细胞组织学研究. I 愈伤组织的建成. 植物学报, 21(2): 124~130
- 陆文樑. 1983. 离体培养中胡萝卜细胞脱分化状态下,无丝分裂的活体连续观察. 中国科学, B 辑: 321~326
- Bernard P, Ouaf B, Regis P, et al. 1990. Production of isolated somatic embryos from sunflower thin cell layers. Plant Cell Reports, 9: 47~50
- Hassane C. 1974. Inter-tissue correlations in organ fragments. Plant Physiol. 54: 314~348
- Klismaszewska K, Keller W A. 1985. High frequency plant regeneration from thin cell layer explants of *Brassica napus*. Plant cell, tissue and organ culture, 4: 183~197
- Pau E C. 1987. Plant regeneration from stem derived protoplasts of *Brassica alboglabra* Bailey. Plant Science, 50: 153~160
- Pau E C, Trinh T T, Chua N H. 1989. High frequency plant regeneration from stem explants of *Brassica alboglabra* Bailey in vitro. Plant cell, tissue and organ culture, 17: 143~152
- Thorpe T A, Murashige T. 1970. Some histological changes underlying shoot initiation in tobacco callus cultures. Can J Bot, 48: 277~285

- Tran Thanh Van K. 1980 Control of morphogenesis by inherent factors and exogenously applied factors in thin cell layers. In Vasil Lk ed: Int Rev Cytol 11A. New York: Academic Press, 175 ~ 194
- Tran Thanh Van K, Chlyah H, Chlyah A. 1974. Regulation of organogenesis in thin cell layers of epidermal and sub epidermal cells In: Street H E ed. Tissue culture and Plant science. New York: Academic press, 101 ~ 139
- Tran Thanh Van M, Drira A. 1970. Definition of a simple experimental system of directed organogenesis de novo: organ neof ormation from epidermal tissue of *Nautilocalyx Lynchei* Les cultures de tissus de plantes, 193: 169 ~ 176
- Wong K W, Loh C S. 1987. In vitro regeneration of plantlets in *Brassica alboglabra*. Plant cell, tissue and organ culture, 10: 143 ~ 148

CYTOHISTOLOGICAL OBSERVATIONS ON THE CALLUS FORMATION AND ORGANOGENESIS IN THIN CELL LAYER CULTURES OF RACHES OF *Brassica alboglabra* BAILEY

Zheng Yumei Li Yu Wang Shimao

(Dept. of Agr. Biology, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

The thin cell layers from the rachis of *B. alboglabra* Bailey were cultured on MS medium (MS + 0.5 mg/L NAA + 5 mg/L BA + 0.25 g/L LH). After 6 days of culture, calli grew from the explants, and then regenerated shoots and roots were formed from these calli. Both epidermal and subepidermal cells may be activated to divide. The meristematic cellular masses were derived from the subepidermal cells. Two types of organogenesis occurred: direct and indirect organogenesis. Cytochemical observations showed that there was no accumulation of starch in the cells of explants before cell dedifferentiation. The starch accumulated after differentiation was initiated. With the multiplication of cells and bud regeneration, the starch in the cells was consumed and disappeared. But the starch accumulated again, when the bud primordia were formed.

Key words thin cell layers; *Brassica alboglabra*; callus; organogenesis

