

金鱼草下胚轴不定芽发生及细胞学观察^{*}

余迪求 邓庆丽 沈亚楠 李宝健

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

摘 要 采用金鱼草下胚轴为外植体, 培养于附加不同激素浓度组合 MS 固体培养基上. 此外植体对激素的反应表现出很大的差异. 在附加 2, 4-D 培养基上, 下胚轴可诱导形成淡褐色愈伤组织, 但不易分化; 培养于附加 BA 培养基上, 外植体可诱导产生丛生不定芽. 将不定芽转移至附加 NAA 培养基上, 可诱导根的形成. 细胞学观察证实下胚轴不定芽的发生起源于表皮细胞.

关键词 金鱼草, 不定芽发生, 植株再生

分类号 Q 945. 52

金鱼草 (*Antirrhinum majus* L.) 是世界上广泛栽培的草花之一^[1], 为异花授粉植物, 以种子繁殖后代会发生分离, 严重影响观赏效果^[2]. 80 年代后期, 采用金鱼草为材料进行花色色素和花型发育调控的研究, 取得突破性的进展^[3,4], 使之成为分子遗传学和生物工程研究最宝贵的材料之一.

金鱼草组织培养研究最早于 1975 年^[1]. Pande 等^[5]进行了细胞培养, 产生愈伤组织和少量幼苗, 但未生根. 杨乃博^[6]报道用下胚轴培养, 获得愈伤组织、芽和根. 有作者对金鱼草茎尖、腋芽进行离体诱导和增殖, 获得较好的增殖效果和完整植株的再生体系^[1,2,5-8].

本实验对金鱼草下胚轴进行离体培养, 系统研究不同激素浓度和组合对下胚轴不定芽发生的影响规律, 同时利用光镜系统地观察了不定芽发生的组织细胞学过程, 了解不定芽发生部位, 为利用基因工程技术改良品质提供可行的途径.

1 材料和方法

1.1 植物材料

金鱼草 75 和 98 均由英国 John Innes 研究所的 Carpenter 博士提供.

1.2 方 法

1.2.1 金鱼草无菌苗及外植体获得方法 金鱼草 75 和 98 种子经 15% 次氯酸钠处理 10 min 后用无菌水冲洗 3~5 次, 然后接种在 MS 固体基本培养基上, 培养温度为 $(21 \pm 1)^{\circ}\text{C}$, 每天辅以光照 14 h, 光照强度 1 200 lx (以下培养条件相同). 将萌发 15~20 d 的无菌苗下胚轴切成 0.8~1 cm 的小段作为外植体.

* 中山大学“211 工程”基础性研究前沿基金资助项目

收稿日期: 1995-08-31 余迪求, 男, 32 岁, 副教授

- 1.2.2 下胚轴不定芽发生 设计 3 种激素组合,诱导下胚轴不定芽发生,光照培养 15 d 后,观察并统计愈伤组织诱导率 and 不定芽发生情况.
- 1.2.3 不同激素组合对下胚轴不定芽诱导影响 在上述实验基础上,研究 6 种激素组合对下胚轴不定芽诱导影响规律.光照培养 15 d 后,观察并统计下胚轴不定芽发生率.
- 1.2.4 不同激素组合对再生植株根的诱导 设计 3 种激素组合,诱导再生植株根的发生.光照培养 20 d,观察并统计再生植株根的诱导率.
- 1.2.5 金鱼草下胚轴不定芽发生的组织细胞学观察 将下胚轴切段接种于附加 6-BA 2.0 mg/L 和 NAA 0.5 mg/L 的 MS₃ 培养基上,分别于光照培养 0, 2, 5, 7, 9, 10, 12 d 后随机挑出下胚轴 4~5 块,立即投入 FAA 固定液,于 4℃ 固定 24 h.采用常规石蜡切片方法制片.在 Olympus BH 型万用显微镜下观察和拍照.

2 实验结果

2.1 下胚轴不定芽的诱导发生

将金鱼草下胚轴切段分别接种于附加不同激素组合的 MS 固体培养基上.在光照强度为 1 200 lx, (2±1)℃ 条件下培养 15 d 后进行观察和统计,实验结果如表 1 所示.

表 1 金鱼草下胚轴愈伤组织诱导

Tab. 1 Calli formation from hypocotyl explants of *Antirrhinum majus* in MS agar medium supplemented with 2,4-D or 6-BA

培养基编号	激素组合 /mg L ⁻¹	外植体数	愈伤组织数	愈伤组织诱导率 %	愈伤组织生长状况
MS ₁	2,4-D 1.5	80	80	100	愈伤组织淡黄色,生长缓慢,不易分化
MS ₂	2,4-D 1.0	136	136	100	愈伤组织淡黄色,生长缓慢,不易分化
MS ₃	BA 2.0 NAA 0.5	38	38	100	愈伤组织黄绿色,或间有淡黄色,生长快,其上很快形成许多不定芽

接种于 MS₁ 和 MS₂ 上的下胚轴 2 d 后即膨大,随后从切口处开始形成愈伤组织,约 15 d 后全部愈伤化,愈伤组织诱导率高达 100%.愈伤组织呈淡黄绿色,生长缓慢.接种于 MS₃ 上的下胚轴 3 d 后稍膨大,随后切口处开始形成愈伤组织,愈伤组织诱导率为 100%.愈伤组织呈黄绿色,间或淡黄色,生长快,但外植体很少全部愈伤化.约 10 d 后,在愈伤组织与未愈伤化的外植体交界面附近,产生许多不定芽.另外在未愈伤化的部位也能产生一些不定芽.我们曾把 MS₁ 和 MS₂ 上的愈伤组织移植于 MS₃ 固体培养基上,进行光照培养,结果发现愈伤组织不能分化生芽生根.但培养时间过长,在愈伤组织表面长出一些根和根毛,同时愈伤组织也表现出老化、褐变倾向.由此可见,2,4-D 可诱导金鱼草下胚轴产生愈伤组织,但通过愈伤组织再生的途径需进一步探索.

2.2 不同激素组合对下胚轴不定芽诱导影响

在上述实验基础上,设计 6 组不同浓度的 6-BA 和 NAA 激素组合,将金鱼草下胚轴切段分别接种其上,光照培养 15 d 后进行统计和观察,实验结果见表 2.

表 2 不同激素组合对金鱼草下胚轴不定芽发生的影响

Tab. 2 Effect of growth regulators on the adventitious shoots regeneration from hypocotyl explants of *Antirrhinum majus*

培养基编号	激素组合 /mg ^o L ⁻¹	不定芽外植体	不定芽发生率 %	愈伤化程度	苗生长状况
MS ₃	NAA 0.5 BA 2	8~12	100	+++	一般
MS ₄	BA 2	6~8	100	++	弱
MS ₅	BA 0.5	4~8	100	+	较弱
MS ₆	NAA 1 BA 1	4~6	100	+	较弱
MS ₇	NAA 0.5	0~1	21.3	-	外植体形成大量根
MS ₈	NAA 2	0	0	-	外植体致死

MS₃ 上的外植体能不断地产生不定芽,不利于原有苗的生长,将 MS₃ 上的不定芽接种到 MS₄ 上,结果发现,MS₄ 能起到壮苗的作用.

2.3 不同激素组合对再生植株根的诱导作用

基于上述实验结果,我们设计 3 种附加不同浓度 NAA 的 MS 培养基,将再生植株分别接种于其上,光照培养 20 d,观察并统计再生植株根的诱导率(见表 3).

表 3 NAA 对再生植株根的诱导

Tab. 3 In vitro plantlets rooting of *Antirrhinum majus* in MS agar medium supplemented with NAA

培养基编号	激素组合 /mg ^o L ⁻¹	根诱导率 %	根生长状况
MS ₉	NAA 0.5	100	大量粗状根,深入培养基里面,少量纤丝状根
MS ₁₀	NAA 1	90	多为纤丝状根,铺满培养基表面
MS ₁₁	NAA 2	100	多为纤丝状根,铺满培养基表面,极少粗状根

从表 3 可见,3 种不同浓度 NAA 对金鱼草再生植株根的诱导率相当高,但根的生长状态表现出一定差异,而 MS₁₀ 培养基上的再生植株长出许多纤状根,似根毛状,同时长出一些粗状的根,而 MS₁₁ 培养基上的再生植株主要形成纤丝状根,布满培养基表面,很难深入培养基内吸收水分和营养(图 1).

2.4 金鱼草下胚轴不定芽发生的组织细胞学观察

金鱼草下胚轴在 MS 培养基培养至第 2 d 时,下胚轴各组织细胞没有明显的变化.当培养到 5 d 时,韧皮部的细胞发生明显的变化,细胞质浓,细胞核体积大,处于旺盛的细胞分裂阶段(图 1 2).表皮部分细胞也开始迅速分裂(图 1 3,箭头指处).第 7 d 时,韧皮部分生细胞的分裂使整个维管束体积进一步增大;而表皮细胞则表现出明显的变化,形成许多分生细胞团.细胞体积小,排列整齐,细胞质浓,细胞核大(图 1 4).此时在外植体的切口处开始形成愈伤组织,愈伤组织内部形成发达的输导系统,导管结构很发达(图 1 5).表皮细胞经细胞分裂形成的分生细胞团经过进一步培养逐渐形成不定芽(图 1 7).切口处的愈伤组织也不断增大,由许多薄壁细胞组成(图 1 6).

3 讨论

实验以金鱼草下胚轴为外植体,成功地诱导下胚轴不定芽高频率发生,再生频率达

图 1 金鱼草下胚轴不定芽及其细胞学观察

Fig. 1 The adventitious buds of *Antirrhinum majus* and its cytological observation

1 下胚轴不定芽 $\times 12$; 2 示培养 5 d 后韧皮部细胞的细胞分裂 $\times 400$; 3 示培养 5 d 后表皮细胞分裂 $\times 500$; 4 示培养 7 d 后分生细胞团 $\times 400$; 5 示培养 7 d 后愈伤组织内的导管 $\times 400$; 6 示培养 9 d 后愈伤组织内的薄壁细胞团 $\times 200$; 7 示培养 12 d 后的一个不定芽 $\times 200$

100%, 每块外植体的不定芽发生数平均可达 8~12 个, 再生周期 2 个月, 我们较为系统地观察了不定芽整个发生过程, 并证实不定芽发生起源于外植体的表皮细胞。

实验证实, 仅采用低浓度 BA 即能诱导下胚轴不定芽的发生, 这一结果与杨乃博等人的报道^[6]相似, 但与张学方等^[1]的报道差异较大。另外, 发现低浓度 NAA(0.2~0.5 mg/L) 和 BA(2 mg/L) 配合使用, 对金鱼草下胚轴不定芽的诱导发生效果更佳。

植物外源基因转化试验的成功与植物受体的选择及其植株再生途径密切相关。一般说来, 植物再生途径可分为器官发生及体细胞胚胎发生两种途径。较为理想的是建立高效的不定芽发生和体细胞胚胎发生系统, 用于外源基因转化。用于基因转化的组织培养再生系统要求外植体再生频率至少达 80%, 每块外植体必须再生丛生芽, 其芽数越多越好, 这样才能提高获得转化植株的可能性。组织细胞学观察表明, 此再生系统是通过不定芽途径发生。不定芽发生起源于外植体的表皮细胞, 而且发生频率较高, 因此, 这种再生系统适合于基因转化。

参 考 文 献

- 1 张学方, 辛雅芬, 刘宏伟. 金鱼草茎尖培养与植株再生. 东北林业大学学报, 1991, 19(4): 42~47
- 2 沈洁明, 孙君亮, 杨维东, 等. 金鱼草组织培养. 植物生理学通讯, 1990, (1): 51
- 3 Bradley D, Carpenter R, Sommer H, et al. Complementary floral homeotic phenotypes result from opposite orientations of a transposon at the *Plena* locus of *Antirrhinum*. Cell, 1993, 72: 85~

95

- 4 Coen E S, Meyerowitz M. The war of the whorls genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 1991, 353(5): 31- 37
- 5 Pande H R, Harkiss K J. Cell tissue culture of *Antirrhinum majus*. *Planta Medica*. 1976, 30(4): 328- 330
- 6 杨乃博. 十二种植物的试管无性繁殖. *植物学报*, 1981, 23(4): 284- 286
- 7 Newbury H J. Multiplication of *Antirrhinum majus* L. by shoot-tip culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 1986, 7(1): 39- 42
- 8 Sangwan R S, Detrez C. In vitro culture of shoot-tip meristems in some higher plants. *Acta Horticulture*. 1987, 11: 661- 666

Generation and Cytological Observation of Adventitious Buds from Hypocotyl Explants of *Antirrhinum majus* L.

Yu Diqiu^{*} Deng Qingli Sheng Yanan Li Baojian

Abstract The hypocotyl explants from *Antirrhinum majus* L. were cultured on MS agar medium with different plant growth regulator concentrations and combinations. Large differences were found in the responses of the hypocotyl explants. On the medium with 2, 4-D (1- 2 mg/L), the explants were found to produce healthy, viable and yellowish calli which did not differentiate to generate buds; but on the medium with 6-BA(2 mg/L) and NAA(0. 2- 0. 5 mg/L), the explants produced healthy plantlets and yellowish calli. Shoots formed from the buds on MS agar medium supplemented with 6-BA(0. 5- 2 mg/L) and NAA(0- 1 mg/L). These shoots, if transferred individually to MS agar medium with NAA(0. 5- 2 mg/L), produced roots at their bases. On the medium with NAA 0. 5 mg/L, the roots of plantlets were healthy. Cytological observations indicated that the plant regeneration originated from epidermic cells of the explants.

Keywords *Antirrhinum majus* L. , adventitious bud generation, plant regeneration

* Biotechnology Research Centre, Zhongshan University, Guangzhou 510275