

文章编号:1001-1498(2011)05-0609-04

牡丹愈伤组织扫描电镜观察

朱向涛^{1,2}, 王雁^{2*}, 彭镇华², 律春燕^{2,3}, 郑宝强²

(1. 浙江农林大学天目学院, 浙江 临安 311300; 2. 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091;
3. 胶州市少海发展管理处, 山东 青岛 266300)

摘要:为揭示牡丹愈伤组织分化过程中的细胞变化规律,以牡丹品种“凤丹”花瓣诱导的愈伤组织为材料,利用电镜扫描的方法,观察了不同培养时间愈伤组织表面结构的变化过程。结果表明:牡丹花瓣愈伤组织类型不同,表面结构有较大差异,同一块愈伤组织上存在不同的发育时期,继代的时间不同,愈伤组织的表面结构也会随之发生变化,继代后 15~20 d 为愈伤组织结构变化最大的时期。初步了解了愈伤组织分化植株的过程,为建立牡丹高效再生体系奠定理论基础

关键词:牡丹,愈伤组织,电镜扫描

中图分类号:S685.11

文献标识码:A

Scanning Electron Microscopy of *Paeonia suffruticosa* Callus

ZHU Xiang-tao^{1,2}, WANG Yan², PENG Zhen-hua², LV Chun-yan^{2,3}, ZHENG Bao-qiang²

(1. Tianmu College of Zhejiang Agricultural and Forestry University, Lin'an 311300, Zhejiang, China;
2. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China; 3. Shaohai Development Management Department of Jiaozhou City, Qingdao 266300, Shandong, China)

Abstract: The embryogenesis and changes of the structure in their surface layer of peony petal calli were observed using scanning electron microscopy. The results showed that there was a correlation between styles of calli and structure in their surface. Different developmental stages exist on one callus, the structure of the callus changed following different generation time, the callus organizational structure changed quickly after 15–20 days of substructure.

Key Words: *Paeonia suffruticosa*; callus; scanning electron microscopy

牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.),芍药科芍药属名贵观赏和药用木本花卉,花大而美,有“花中之王”的美誉^[1]。牡丹的组织培养已经有大量研究,郎玉涛等^[2]对愈伤组织诱导过程中的褐化问题进行了研究,提出了降低褐化率的具体措施。高昌勇^[3]、陈怡平^[4]、王军娥^[5]、时侠清^[6]、李丽霞^[7]等从不同的牡丹品种、不同的牡丹外植体等方面对牡丹愈伤组织诱导进行了研究,得到了诱导愈伤组织的合适的培养基,但尚未建立起一套完整的再生体系,主要是因为牡丹愈伤组织分化困难。本研究利用牡丹幼嫩

花瓣诱导产生的愈伤组织,经过一定阶段的分化诱导,已经成功诱导形成植株,但是愈伤组织的分化率较低,原因可能与愈伤组织发育过程中表面结构的变化有关。为了寻找其具体原因,本研究利用扫描电镜观察了愈伤组织的表面结构特征以及在分化过程中愈伤组织器官发生过程中的形态变化,并有针对性地采取各种手段促进愈伤组织分化,从而提高愈伤组织分化率、揭示愈伤组织分化过程中的细胞学变化规律,为建立牡丹组织培养高效再生体系提供理论依据。关于利用扫描电镜观察愈伤组织的研究在其他

收稿日期:2010-01-08

基金项目:科技部863项目(2006AA100109,2007AA10Z182)及国家林业局“948”项目(2006-4-C07)部分研究内容

作者简介:朱向涛(1982—),男,讲师,博士,主要从事园林植物与观赏园艺研究。E-mail:zxt8202@163.com

* 通讯作者:王雁(1969—),女,研究员,博士生导师,主要从事园林植物与观赏园艺研究。E-mail:wangyan@caf.ac.cn

植物上有相关报道,对玉米^[8]、棉花^[9]愈伤组织进行电镜扫描结果显示,愈伤组织胚性与表面结构具有相关性,不同类型的愈伤组织具有不同的结构。

1 材料和方法

2008年4月,在中国林科院林业所花卉中心实验基地采牡丹‘凤丹’的幼嫩花瓣,并在花卉中心实验室利用幼嫩花瓣诱导形成的愈伤组织,诱导培养基为MS+2,4-D 1.0 mg·L⁻¹+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹+30.0 g·L⁻¹蔗糖+7.0 g·L⁻¹琼脂,继代培养3个月,每15 d继代1次,继代培养基为MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹+30.0 g·L⁻¹蔗糖+7.0 g·L⁻¹琼脂,光照12 h·d⁻¹,光强200 μmol·m⁻²·s⁻¹,培养温度(25±2)℃。

利用第6代出现绿色芽点的愈伤组织,分别在继代的第5、10、15、20、25、30 d选取愈伤组织,用2.5%戊二醛固定,室温固定2~4 h,用0.1 mol pH 7.2的PBS缓冲液冲洗3~4次,然后用1% OsO₄固定1~2 h,利用重蒸水冲洗30 min,利用30%、50%、70%、80%、90%、95%、100%乙醇逐级脱水,每级15~20 min,经醋酸异戊酯置换30 min后,用CO₂临界点干燥仪干燥,离子溅射法喷金,用扫描电镜观察照相。

2 结果与分析

2.1 牡丹不同类型愈伤组织表面结构差异较大

牡丹愈伤组织的表面结构在继代周期中是不断变化的。同一块愈伤组织上有2种不同的结构:一种有明显凸起,凸起表面光滑,排列较紧密,质地坚硬,凸起的结构有所不同,有的凸起已经破裂(图1-a-A),这种坚硬的凸起在后期的培养中没有明显变化,不易发育成胚状体;另一种结构则凸起不明显表面开始有裂痕,相对较为平整(图1-a-B),这种结构表明同一块愈伤组织上存在不同的发育时期。另外愈伤组织表面凸起有的不饱满,顶端有凹陷,有的凸起顶端有类似芽的结构,突出于愈伤组织表面(图1-b)。它们之间排列较为紧密,继续培养在裂痕处会出现胚状体的结构(图1-c)。胚性愈伤组织表面结构较为简单,形状和大小相差不大,主要是球状(图1-d)。有的愈伤组织表面还存在粘膜状物质,这与愈伤组织的发育时期有关,随着愈伤组织的发育,粘膜物质逐渐减少(图1-e)。

2.2 不同继代时间对愈伤组织结构的影响

将继代后不同时间的愈伤组织在电镜下观察,

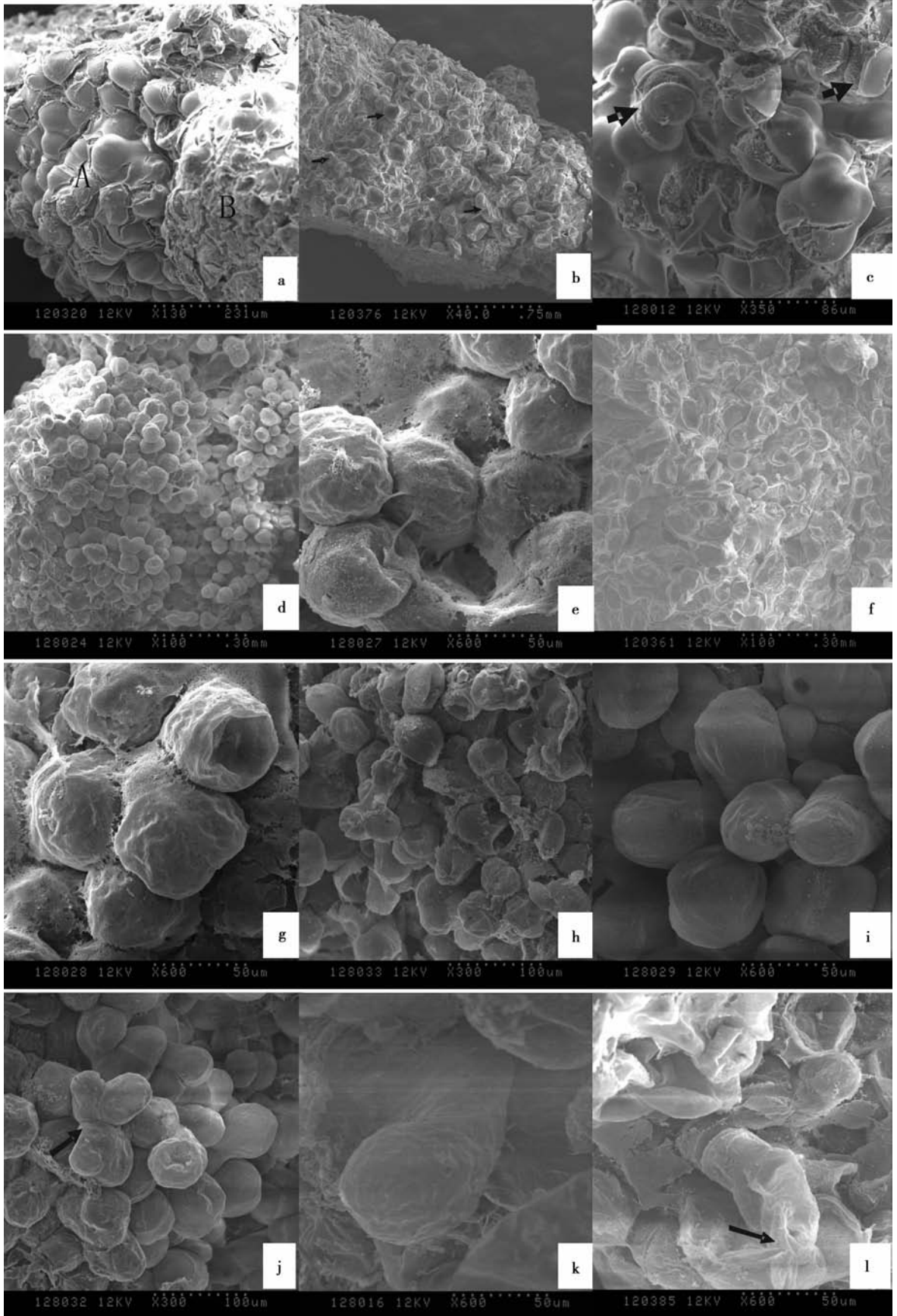
愈伤组织继代后第5天,表层的细胞大多数处于凹陷状态,有少数细胞开始有凸起,凸起的形状为球形,细胞间排列较为紧密,没有明显的空隙(图1-f)。愈伤组织继代后第10天,可以看出凸起的部分开始变大,有一部分细胞还没有完全凸起,还有凹陷的细胞存在(图1-g)。继代后第15天,愈伤组织表面的粘膜物质逐渐减少,凸起细胞开始逐渐扩大,细胞间隙也开始加大,整个愈伤组织表面呈现蜂窝状(图1-h)。继代后第20天,愈伤组织表面基本被球状细胞所覆盖,各个凸起的生长有快有慢,呈现错落有致的现象,形成球形胚,各个胚状体间的空隙较大,胚状体结构饱满,发育良好(图1-i)。继代后第25天,球形胚开始延长,并且有部分胚状体发育成畸形胚,这种胚状体从一个胚细胞中发育而成,而且胚状体的排列更加紧密,生长较为旺盛(图1-j)。继代后第30天,胚状体一端继续伸长而另一端没有明显的变化,胚状体结构逐渐形成(图1-k)。从整个继代过程来看,开始的胚状体基本表现为球状,之后继续发育成圆柱状,在以后的发育过程中,有些胚状体开始不规则增生,产生瘤状突起,有的进一步发育成次级胚状体,继续培养产生丛生苗。

2.3 牡丹愈伤组织发育过程中的特异结构

另外在愈伤组织发育过程中,还有许多特殊的结构:(1)胚状体基部呈现圆柱状而顶端则发育成类似于絮状结构(图1-l);(2)细胞表面有许多类似锥形的物质,分布没有一定的规律性,并且这一结构仅出现在继代后第15天的愈伤组织细胞表面(图1-m);(3)胚状体的结构类似三角状,细胞结构饱满,表面有褶皱(图1-n)。

3 结论与讨论

牡丹愈伤组织分化一直是制约牡丹再生体系建立的瓶颈,从组织结构上分析其器官发生的变化规律,可以更加直观地发现问题,针对各个阶段的结构变化,采取合适的措施促进愈伤组织分化。利用产生瘤状突起的愈伤组织进一步培养已成功分化出的植株,进一步证实了牡丹花瓣愈伤组织分化胚状体的途径。从牡丹愈伤组织扫描电镜观察可以看出,不同的愈伤组织培养的不同时间会发生不同的变化,有的愈伤组织可以发育成胚状体,有的则无法完成正常的发育,同一块愈伤组织可能存在胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织两种不同的类型,说明牡丹的愈伤组织发育具有高度的异质性,这与对水稻^[10]



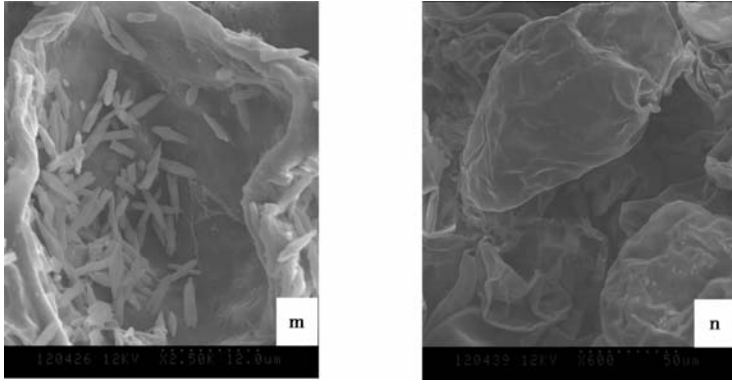


图1 牡丹愈伤组织扫描电镜观察

a 同一愈伤组织上的不同结构(×130);b、c 愈伤组织表面不同的凸起类型(b×40;c×350);d 胚性愈伤组织表面的球状结构(×100);e 愈伤组织表面的粘膜状物质(×600);f 继代5 d的愈伤组织(×100);g 继代10 d的愈伤组织(×600);h 继代15 d的愈伤组织(×300);i 继代20 d的愈伤组织(×600);j 继代25 d的愈伤组织(×300);k 继代30 d的愈伤组织(×600);l、m、n 愈伤组织的特异性结构(l×600、m×2500、n×600)

花培愈伤组织的研究结果一致,而关于愈伤组织异质性的发生原因,有待进一步研究。

从牡丹愈伤组织的发育过程来看,继代后15~20 d是愈伤组织发育最快的时期,经过这一时期后愈伤组织发育开始减慢,这可能与培养基中的成分减少有关,因此继代后15~20 d是较好的继代周期,这段时间继代可以延续供给愈伤组织发育所需要的营养,有利于愈伤组织的快速发育和分化,为进一步分化成体细胞胚奠定良好的基础。

从牡丹愈伤组织表面结构可以看出,同样生长良好的愈伤组织,有的可能发育成胚状体进而分化出植株,有的则由于表面结构的限制,即使条件合适也不能分化,如图1-e中表面的膜状结构大大限制了芽原基的发育,因此,在试验过程中要采用表面划痕、再次切割和干燥处理的方式去除表面粘膜状物质对分化的限制,从而大大缩短分化周期。另外,对同一块愈伤组织上结构不同的两部分要分别处理,对存在胚状体的发生区域要进行选择性的区域继代,才能获得稳定的胚性细胞系,为愈伤组织分化提供合适的材料。对于无胚状体的发生区域要及时切割处理。对于生长较快的胚状体结构,不用经过增殖阶段处理,直接给予适当的诱导分化的培养条件,促进其分化,能够大大缩短培育周期。

也有学者对其他植物的愈伤组织进行了扫描电镜观察, Li等^[11]对钝叶草(*St Augustinegrass*)的研究表明,非胚性细胞细长,排列疏松,而胚性细胞呈椭圆形,排列紧密。同一块愈伤组织上同时存在多个发育阶段,细胞形态结构有差异,这与本文的研究结果一致。陈金慧等^[12]研究发现,杂交鹅掌秋的非胚性愈伤组织细胞体积较大,不易成团,细胞之间孔

隙较多。胚性愈伤组织细胞体积较小,大小均一,多以细胞团形式存在,呈球形。本文的观察表明,胚性愈伤组织表面细胞结构大小相差不大,主要以细胞团的形式存在,主要成柱状结构,更容易形成胚状体。本试验为进一步鉴别愈伤组织的不同结构筛选合适的愈伤组织继代培养提供了依据。

参考文献:

- [1] 陈有民. 园林树木学[M]. 北京:中国林业出版社,1988
- [2] 郎玉涛,罗晓芳. 牡丹愈伤组织的诱导及愈伤褐化抑制的研究[J]. 河南林业科技,2007,27(1):4-6,29
- [3] 高昌勇. 不同牡丹外植体诱导愈伤组织的研究[J]. 安徽农业科学,2007,35(34):11036,11111
- [4] 陈怡平,丁兰,赵敏桂. 用紫斑牡丹不同外植体诱导愈伤组织研究[J]. 西北师范大学学报:自然科学版,2001,37(3):66-69
- [5] 王军娥,巩振辉,李新风. 牡丹愈伤组织诱导与分化技术的优化研究[J]. 西北农业学报,2008,17(5):282-286
- [6] 时侠清,张子学. 凤凰山牡丹药用器官的愈伤组织培养[J]. 核农学报,2005,19(3):186-190
- [7] 李丽霞,曲复宁,由翠荣,等. 应用正交设计方法筛选牡丹愈伤诱导培养基的研究[J]. 烟台大学学报:自然科学与工程版,2005,18(1):41-44
- [8] 向凤宁,张举仁,陈惠民. 玉米愈伤组织的扫描电镜观察[J]. 山东大学学报:自然科学版,1990,25(4):508-514
- [9] 张宝红,刘方,姚长兵,等. 棉花组织培养体细胞胚胎发生的扫描电镜观察[J]. 作物学报,2000,26(1):124-126
- [10] 滕俊琳,王以秀,薛庆中. 水稻花培愈伤组织及其器官发生过程中的扫描电镜观察[J]. 华南农业大学学报,1992(增刊):41-42
- [11] Li R, Bruneau A H, Qu R. Improved plant regeneration and in vitro somatic embryogenesis of *St Augustinegrass* (*Stenotaphrum secundatum* (Walt.) Kuntze) [J]. Plant Breeding, 2006,125:52-56
- [12] 陈金慧,施季森,甘习华,等. 杂交鹅掌秋体细胞胚胎发生的扫描电镜观察[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2005,29(1):75-78