

文章编号: 1007-3213 (2008) 01-0074-03

铁皮石斛离体培养体细胞胚发生的组织细胞学研究

潘超美¹, 童家贇¹, 刘丹霞², 胡爱群², 杨舒晴²

(1. 广州中医药大学中药学院, 广东广州 510405; 2. 广州中医药大学2004届本科生, 广东广州 510060)

摘要:【目的】探索离体条件下铁皮石斛体细胞胚发生过程, 为铁皮石斛的快速繁殖生产和种质资源保存提供技术依据。【方法】取继代培养30 d的铁皮石斛类原球茎作接种材料, 以N₆为基本培养基, 加入植物激素, 并以真菌提取物作诱导子, 对类原球茎和愈伤组织进行诱导培养。【结果】显微观察结果表明铁皮石斛体细胞胚的形成可由愈伤组织的表皮细胞或内部细胞产生。【结论】铁皮石斛通过类原球茎和愈伤组织的诱导培养能获得大量的丛芽。

关键词: 铁皮石斛; 中药培育; 组织培养**中图分类号:** R282.2 **文献标识码:** A

铁皮石斛 (*Dendrobium candidum* wall. ex Lindl.) 为常用中药, 是兰科石斛属植物的新鲜或干燥茎, 《神农本草经》将其列为上品。本品有生津益胃、清热养阴的功能, 治热病伤津、口干烦渴、病后虚热、阴伤目暗等^[1]。由于自然状态下, 生长环境条件苛刻, 生长缓慢, 加上近年来药农的盲目采集, 这种名贵药用植物资源短缺的问题日趋严重, 国内有关学者通过组织培养方法, 成功地建立了石斛的无性繁殖体系, 既保持品种的优良性状, 又能快速大量繁殖。

药用植物组织培养中, 体细胞胚的发生不仅具有普遍性, 而且具有数量多, 速度快, 结构完整的特点^[2], 为高等植物在细胞水平上进行遗传操作及品种改良提供了可靠的依据和有效途径。不少学者在石斛的组织培养方面进行了许多有益的探索, 但对于组织培养过程中铁皮石斛有关组织细胞学的观察, 国内外较少系统的报道。本文以铁皮石斛类原球茎为外植体, 诱导产生以及经愈伤组织培养产生体细胞胚, 对铁皮石斛体细胞胚发生过程进行了组织学和细胞学观察, 为进一步研究药用石斛的快速繁殖生产和种质资源保存提供一些理论依据。现将结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 铁皮石斛类原球茎由种子诱导形成, 由华南师范大学生命科学学院国兰研究中心提供。

选择继代培养30 d、生长旺盛、并生长较一致的类原球茎作接种材料。

1.2 方法 接种材料在含有真菌诱导子和植物激素的N₆培养基 [N₆ + 0.15 mg/L 6-苄氨基腺嘌呤 (6BA) + 0.1 mg/L 萘乙酸 (NAA) + 10 mL P10 真菌提取物^[3], pH 5.8] 中, 自然光照条件下, 28℃培养40 d。每隔7 d取样1次, 取不同发育时期的材料, 保存于福尔马林—醋酸—酒精固定液 (FAA) 中, 用石蜡切片法制片, 铁矾苏木精染色后, 切片在Olympus BX51型 (日本产) 光学显微镜下观察并拍照。

2 结果

2.1 胚性愈伤组织的发生 接种材料培养6~7 d后, 切口处细胞开始分裂增殖, 形成绿白色微小突起的愈伤组织, 呈不规则的卵圆块状突起 (图1), 愈伤组织进一步分裂和分化形成类原球茎, 与原愈伤组织较易分离。类原球茎与愈伤组织比较颜色稍深, 愈伤组织颜色较淡。随着培养时间的延长, 类原球茎和愈伤组织同时逐渐向周围扩大, 随后原球茎逐渐分化发育成叶或小芽 (图2)。显微切片观察发现, 愈伤组织分为胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织两类, 胚性愈伤组织呈淡黄绿色, 组织切片细胞体积较小; 而非胚性愈伤组织是薄壁组织, 细胞呈黄白色, 细胞体积较大, 液泡大, 细胞核不明显。胚性细胞与其周围的薄壁细胞相比, 其特征为

收稿日期: 2007-03-01

作者简介: 潘超美 (1956-), 女, 教授

基金项目: 广东省自然科学基金资助课题 (编号: 20000189)

核大, 质浓, 染色较深 (图3)。

2.2 类原球茎体细胞胚的发生与分化 材料经培养3 d左右, 在类原球茎表层细胞开始出现胚性化细胞, 胚性细胞团不断分裂长大向外突起, 形成幼原球茎, 幼原球茎逐渐分出叶原基和顶端分生组织, 此过程连续进行便形成不定芽及再生植株。同时, 在类原球茎表层之下较深层的薄壁组织中的一些核大、质浓的胚性细胞经多次分裂形成胚性细胞团后, 也可继续发育成类原球茎 (图4)。

2.3 愈伤组织中体细胞胚的发生位置 显微观察

结果表明, 体细胞胚形成时, 愈伤组织表层细胞发生不规则的分裂, 产生大量胚性细胞, 其特征是细胞排列紧密, 整齐, 细胞核明显; 培养20 d, 表皮层下的部分细胞经多次分裂形成小而排列紧密的体细胞胚, 体细胞胚继续分裂逐渐分化为芽或叶的原基 (图5), 然后再逐渐发育成芽和叶。此外, 体细胞胚也可以发生于愈伤组织深层的胚性细胞团。这些胚性细胞团继续发育的结果, 则在愈伤组织表面和深层都会形成体细胞胚 (图6)。

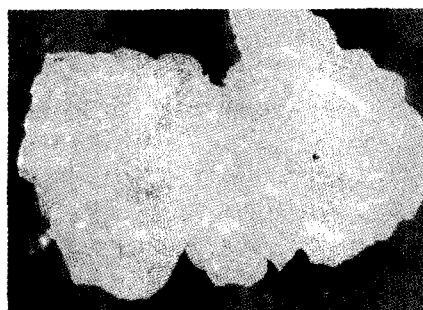


图1 培养6~7 d 胚性愈伤组织形态

Figure 1 Features of embryogenic callus of DCWL cultured for 6~7 days

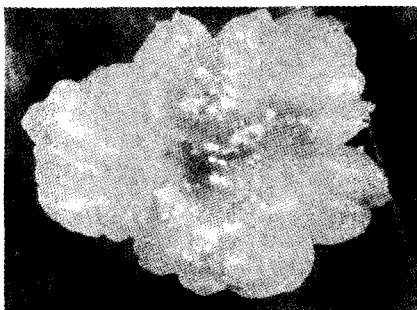


图2 类原球茎分化发育的叶或小芽

Figure 2 Leaves and shoots derived from protocorm-like bodies

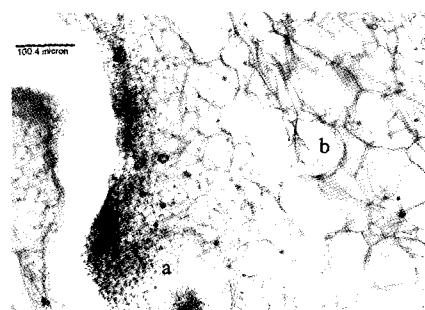


图3 胚性愈伤组织 (a) 和非胚性愈伤组织 (b)

Figure 3 Embryogenic callus (a) and non-embryogenic callus (b)

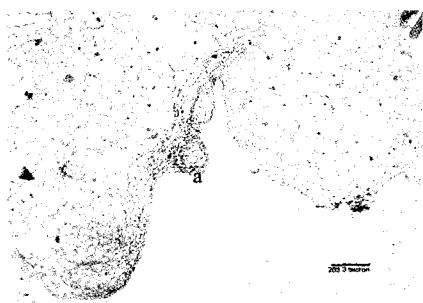


图4 类原球茎

Figure 4 Feature of young protocorm

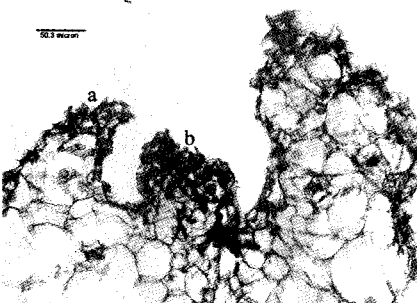


图5 叶原基 (a) 和顶端分生组织 (b)

Figure 5 Leaf primordium (a) and shoot apical meristem (b)



图6 愈伤组织表层 (a) 与深层 (b) 的胚性细胞团

Figure 6 Surface layer (a) and deep layer (b) of embryogenic cell masses of callus

3 讨论

植物的体细胞具有潜在的、像有性过程产生合子胚一样的全能性。这种全能性可以在适宜的条件下被诱导表现出来, 从而达到快速繁殖的目的。本研究表明, 愈伤组织表层细胞经多次分裂形成胚性细胞团, 胚性细胞团分裂长大形成类原球茎, 在一定条件调控下, 类原球茎分化产生叶原基及顶端分生组织, 最后形成不定芽, 此过程与其他兰科植物组织培养中不定芽发生途径是一致的^[4], 并与其子

胚发育过程类似^[5]。此外, 铁皮石斛的类原球茎和愈伤组织混合物在转入含真菌诱导子的培养基中培养后, 部分组织分化为叶芽原基和顶芽, 而在接种材料切口处的细胞重新分裂形成新愈伤组织或类原球茎, 这些新生的组织可以进一步发育成胚性细胞团, 因此, 通过类原球茎和愈伤组织的诱导培养可以增加外植体的繁殖基数, 产生大量的丛芽。本实验是在 N_0 培养基的基础上加入了植物激素和真菌提取物作诱导子, 但激素的种类、浓度以及与真

菌提取物加入量的比例对诱导产生胚性细胞团的影响还有待进一步的探讨。

对于兰科植物体细胞胚的发生位置,许多学者认为起源于愈伤组织或原球茎表皮附近的多个薄壁细胞。王熊等^[6]认为类原球茎是分生能力很活跃的分生组织,表面布满发育进程不同的分生区;而谷祝平等^[4]通过对原球茎内部结构的进一步研究后认为原球茎本身并不是一种活跃的分生组织,而只是其近表皮的薄壁组织在一定条件下可以脱分化形成分生组织。本实验所观察到结果,除了少数体细胞胚发生于较深层的愈伤组织外,大部份体细胞胚也是发生于愈伤组织或原球茎表层下的薄壁细胞,从而可推断,从起源上讲,体细胞胚发生途径可能是兰花组织培养中类原球茎产生的主要来源。

显微观察结果显示,铁皮石斛体细胞胚的起源可以通过由愈伤组织或原球茎的表层或表层之下的几层薄壁细胞经多次分裂后而形成,但也有少数起源于较深层的胚状体原始胚性细胞团。在光学显微镜下,这些原始胚性细胞团体积较小,胞质稠密,着色较深,细胞核明显,较易与周围的薄壁细胞区别开来。

本实验结果表明,铁皮石斛类原球茎和愈伤组织的表层细胞或表层以下的薄壁组织细胞均具有潜在分化为体细胞胚的能力,通过对类原球茎和愈伤组织的诱导培养能获得大量的铁皮石斛丛芽。所以,铁皮石斛类原球茎和愈伤组织混合物可用作铁皮石斛快速繁殖生产的外植体以及种质保存的材料。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 586.
- [2] 李浚明. 植物组织培养教程 [M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1992: 95.
- [3] 潘超美, 贺红, 林群英, 等. 真菌诱导子对铁皮石斛 (*Dendrobium candidum*) 组培物生长的影响 [J]. 中国中医药学刊, 2004, 22 (1): 54.
- [4] 谷祝平, 严廷进. 大花蕙兰茎尖组织培养及其形态建成的研究 [J]. 实验生物学报, 1989, 2: 149.
- [5] 余迪求, 杨明兰, 李宝健. 建兰原球茎发生及其无性繁殖系建立 [J]. 中山大学学报论丛, 1996, 2: 13.
- [6] 王熊, 吴敦肃. 建兰类原球茎体生长发育过程中扫描电镜观察 [J]. 植物生理学报, 1991, 17 (2): 192.
- [7] 叶秀萍. 石斛兰组织培养和细胞学观察 [J]. 园艺学报, 1995, 21 (1): 83.

Histocytological Observation of Somatic Embryogenesis in In-Vitro Cultured *Dendrobium candidum* wall. *Ex* Lindl.

PAN Chaomei¹, TONG Jiayun¹, LIU Danxia², HU Aiqun², YANG Shuqing²

(1. College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405 Guangdong, China;

2. Undergraduate Student of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510060 Guangdong, China)

Abstract: Objective To observe the somatic embryogenesis in in-vitro cultured *Dendrobium candidum* wall. *Ex* Lindl. (DCWL), and to supply evidence for its rapid propagation and germplasm preservation. **Methods** Protocorm-like bodies and callus of DCWL subcultured for 30 days was used as the explants, N6 was used as the basic culture with phytohormone added, and fungal extracts as the elicitor. Protocorm-like bodies and callus of DCWL were used for induction culture. **Results** Somatic embryogenesis in in-vitro cultured DCWL derived from the epithelial cells or inner cells of callus of DCWL. **Conclusion** A large amount of buds can be obtained by the induction and culture of protocorm-like bodies and callus of DCWL.

Key words: *DENDROBIUM CANDIDUM* WALL. *EX* LINDL.; MEDICINAL HERB ANIMAL RAISING; TISSUE CULTURE