

doi:10.16779/j.cnki.1003-5508.2017.06.010

红颜草莓茎尖组织培养的器官发生途径研究

王晓玲¹,唐丽萍²,范雨²,罗晓波^{3*},曾德刚⁴

(1.凉山州劳动职业技术学校,四川西昌 615000;2.四川师范大学生命科学学院,四川成都 610101;
3.四川省自然资源科学研究院,四川成都 610015;4.凉山州农业学校,四川西昌 615000)

摘要:为探究红颜草莓茎尖组培苗器官再生途径,以其茎尖为外植体进行组织培养,观察其器官再生过程中的形态学和解剖学变化特点。结果表明:红颜草莓茎尖离体再生的芽原基起源于茎尖形态学上端表皮层的薄壁细胞,属外起源;表皮层的薄壁细胞先分化形成芽原基,随后芽原基周围的皮层薄壁细胞再分化出叶原基;芽原基和叶原基共同发育形成不定芽;不定芽再生途径为器官型。不定芽基部组织受激素诱导于形成层分化出根原基,同时不定芽基部表皮层细胞也可分化出根原基。故不定根外起源方式既有内起源也有外起源,但不定根都属于诱生根原基。不定芽和不定根中的输导组织将整个组培苗连接成一个整体,形成完整植株。

关键词:红颜;组织培养;器官发生途径;解剖学

中图分类号:S723.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-5508(2017)06-0040-05

Organogenesis Approaches in Tissue Culture of Stem Tips of Benihoppe Strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.)

WANG Xiao-ling¹ TANG Li-ping² FAN Yu² LUO Xiao-bo^{3*} ZENG De-gang⁴

(1. Liangshan Vocational and Technical School, Xichang 615000, China;
2. College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, Sichuan, China;
3. Sichuan Academy of Natural Resource Sciences, Chengdu 610015, China;
4. Liangshan agricultural school, Xichang 615000, China)

Abstract: To study the organogenesis approaches in tissue culture of stem tips of Benihoppe strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.), stem tips were used as explants for tissue culture, aiming to observe the morphological and anatomical changes during organic regeneration. Results showed that the regenerative bud primodium in vitro of Benihoppe Strawberry (*F. ananassa* Duch.) derived from the parenchyma cells in epidermis on the morphologic apex of stem tips, so it originated in exogenous way; Parenchyma cells in epidermis differentiated to form bud primodium, then the leaf primodium would be differentiated from parenchyma cells in epidermis near it; the bud primodium and leaf primodium grew together to form adventitious shoots; Organogenesis type was the way for the bud primodium to regenerate. The tissue of adventitious shoots base was induced by hormone, which would cause the differentiation of root primodium in cambium, the epidermic cells of adventitious shoots base could form root primodium too. Therefore, the way that adventitious roots originated could be exogenous or endogenous, but the adventitious roots were all the induced root primordia. At last, the conducting tissue in adventitious shoots and roots connected the whole tissue culture seedling into a complete plant.

收稿日期:2017-10-17

基金项目:凉山州技术与推广应用项目(15YYJS0051)优质草莓品种引进及组培脱毒育苗技术研究。

作者简介:王晓玲(1972-),女,重庆市潼南县人,高级讲师,主要从事植物学、森林培育等方面研究。

* 通讯作者:罗晓波(1971-),男,四川省射洪县人,高级工程师,主要从事植物学、生物生态学、特色作物栽培、资源植物开发与应用等方面研究。

Key words: Benihoppe strawberry, Tissue culture, Organogenesis approaches, Anatomy

草莓 (*Fragaria ananassa*. Duch) 是蔷薇科 (Rosaceae) 草莓属 (*Fragaria*) 多年生常绿双子叶草本植物^[1], 其果实富含维生素、类胡萝卜素、鞣花酸、叶酸、酚类等生物活性物质^[2,3], 常采用无性繁殖方法进行繁殖。但无性繁殖方法存在繁殖速度慢, 品种易退化、易感染病毒、易生病虫害等问题, 从而导致草莓产量下降, 优良品种不易推广。组织培养技术可快速、有效繁殖优良草莓品种, 解决无性繁殖存在的弊端, 从而满足规模化生产需求。目前草莓的组织培养研究主要集中在草莓不同外植体的选择 (包括叶片、茎尖、花药、离体胚、原生质体、体细胞等)、外源激素种类和浓度的选择, 解决褐化、污染、玻璃化等问题方面^[4-6]。很多学者就次此进行了深入研究, 并且取得了一定的成果。但目前未发现有研究者对草莓茎尖离体器官的形态发生途径进行研究。

本研究以草莓茎尖为外植体进行组织培养, 并运用形态学观察和解剖学方法对草莓组培苗器官发生途径进行研究, 目的在于揭示草莓茎尖离体培养器官发生途径和植株再生规律; 探索草莓植株高效再生的培养方式和培养条件; 用于指导草莓种苗生产; 同时也为研究出草莓属植物离体再生规律提供理论参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

以草莓品种红颜茎尖为外植体, 红颜草莓采自凉山州德昌县。

1.2 方法

1.2.1 外植体消毒

选取 2 cm 左右生长良好、健壮、无病虫害的红颜草莓匍匐茎的顶芽, 先用 1% 的洗衣粉水清洗一次, 再用流动自来水冲洗 30 min。在超净工作台中,

用 0.1% HgCl₂ 消毒 4 min ~ 6 min, 无菌水冲洗 5 次, 剥取 0.5 cm 健康茎尖作为外植体。

1.2.2 红颜草莓组织培养

以 MS 培养基为基本培养基, 附加不同种类和浓度的外源激素, 每个配方都添加蔗糖 30 g · L⁻¹, 琼脂 7 g · L⁻¹, 调节培养基 pH 值为 6.8。以不定芽培养基诱导不定芽, 以生根培养基诱导不定芽生根 (见表 1)。

表 1 红颜草莓茎尖组织培养配方

培养基名称	配方
不定芽培养基	MS + IBA0.02mg · L ⁻¹ + 6-BA1.0mg · L ⁻¹
生根培养基	1/2MS + IBA0.5mg · L ⁻¹ + 活性炭0.7g · L ⁻¹

注: 1/2MS 指大量元素减半, 其他元素不变。

1.2.3 形态学和解剖学观察

从茎尖接入培养基开始, 每两天观察一次外植体形态变化, 当外植体形态变化后每天观察一次。在整个组织培养过程中每隔 2 d 取相应组织做石蜡切片以研究红颜草莓茎尖组织培养的器官发生途径。切片用 Leica DM 3000 显微镜进行观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 诱导分化不定芽

2.1.1 不定芽形成的形态学观察

红颜草莓茎尖在 不定芽培养基中培养 15 d 左右开始膨大、增厚, 弯曲, 表明切口处的细胞已经开始增殖分化。继续培养, 茎尖上可分化出嫩绿色的突起, 逐渐形成幼芽 (见图 1A), 持续培养幼芽增多 (见图 1B)。将幼芽转接到不定芽培养基中继续培养 15 d 左右, 少量幼芽快速、大量增殖形成簇状不定芽 (见图 1C)。簇状不定芽继续分株转接到不定芽培养基中, 20 d 左右可得到高 3 cm 左右的无根组培苗 (见图 1D)。

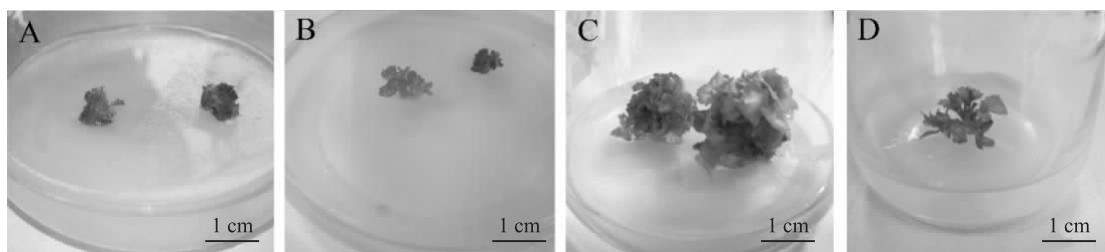


图 1 诱导茎尖分化不定芽的形态学变化

A: 茎尖萌发; B-C: 不定芽; D: 组培苗

2.1.2 不定芽形成的解剖学特征

红颜草莓茎尖形态学上端的表皮及其内侧的几层薄壁细胞首先脱分化恢复分裂能力,先进行平周分裂增加细胞层数,再同时进行平周分裂与垂周分裂从而在表皮处分化出芽原基(见图 2A)。芽原基形成后,芽原基周围的表皮细胞分化出叶原基(见

图 2B)。芽原基和叶原基处的细胞染色较深,细胞质稠密,细胞形态无规则,细胞体积小,细胞核大,无液泡,还可观察到正在进行有丝分裂的细胞(见图 4A)。芽原基和叶原基可发育为不定芽,在芽原基“芽体”旁边还可继续分化出新的芽原基和叶原基(见图 2C,图 3:A-B)。

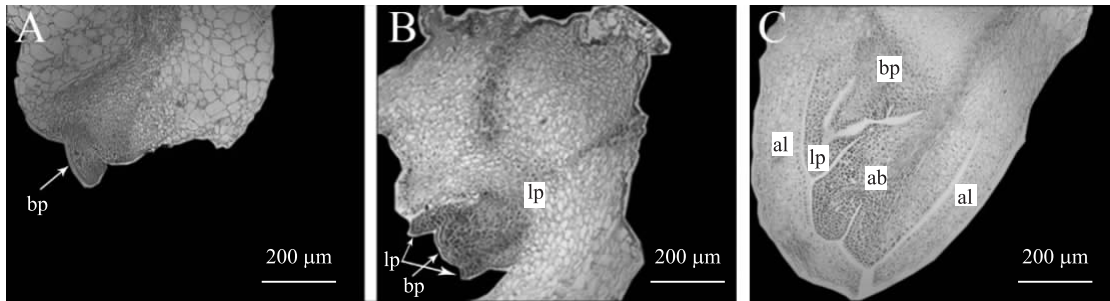


图 2 芽原基分化的显微结构

A: 芽原基; B: 叶原基; C: 不定芽; bp: 芽原基; lp: 叶原基; ab: 不定芽; al: 不定叶

不定芽中存在大量的维管组织(见图 4B-C),这些维管组织为不定芽的快速增殖和生长提供了必需的营养物质。正是由于在适宜的条件和外源激素的刺激,才能诱导红颜草莓茎尖大量形成不定芽,不定芽成簇状存在(见图 1B-C)。同时也说明红颜草莓茎尖在诱芽培养基中诱导获得的不定芽是正常的。

2.2 诱导分化不定根

2.2.1 根形成的形态学观察

无根组培苗在生根培养基中培养 1 周左右后,在无根组培苗基部的组织块上可形成突起(见图 5A-B),培养到 25 d 左右,组培苗基部形成大量不定根(见图 5C-D)。

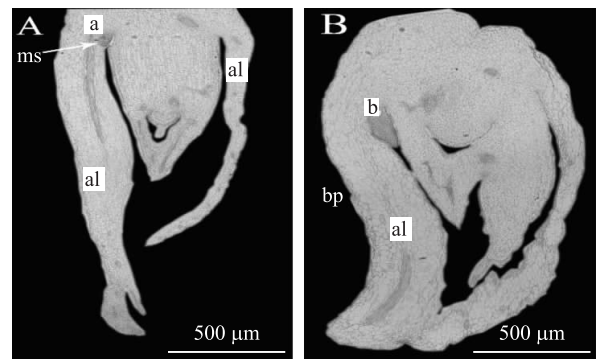


图 3 不定芽显微结构

A-B: 不定芽; ms: 分生组织; al: 不定叶 bp: 芽原基

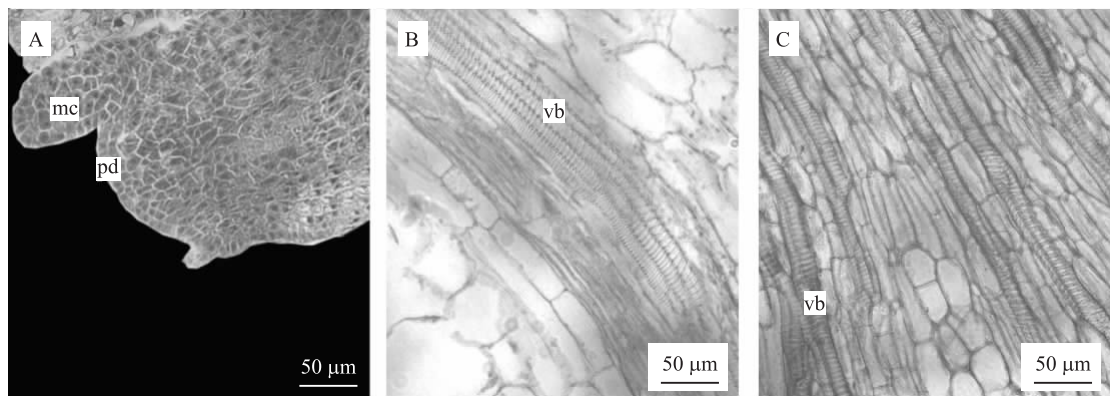


图 4 芽原基细胞特点和不定芽中的输导组织

A: 芽原基细胞特点; B: 不定叶中的维管束; C: 不定芽中的维管束; pd: 表皮; mc: 分生细胞; vb: 维管束

2.2.2 根形成的解剖学特征

从组培苗生根途径的解剖学观察可知红颜组培

苗有两种生根途径:第 1 种:组织深处形成层处的细胞脱分化、在分化形成根原基(见图 6A),根原基处

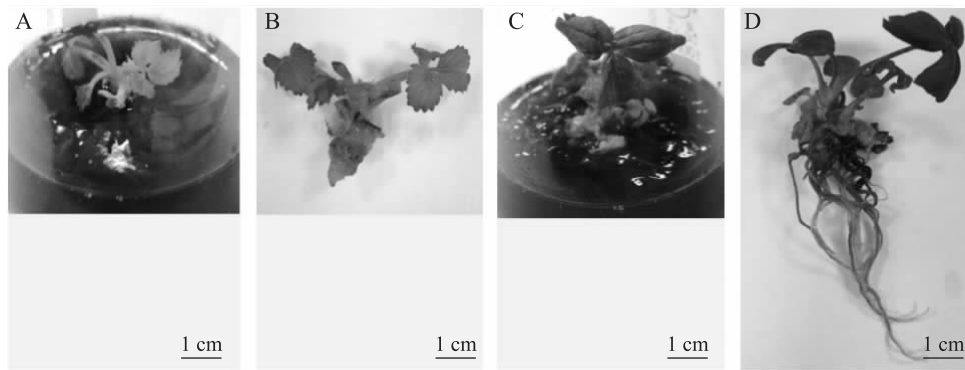


图5 不定根发育过程的形态学变化

的细胞染色深,细胞体积小,与周围薄壁细胞差异明显。继续培养,根原基突破表皮形成不定根(见图6B)。第2种:不定芽基部组织表皮内侧的几层薄壁细胞在激素的刺激下脱分化恢复分裂能力,在表皮处形成分生组织(见图6C(b))。分生组织发育为根原基,继而发育形成不定根(见图6C(a) - D)。

不定根上有大量的输导组织,如不定根上环纹状的导管(见图7A,图7B(b)),梯纹状的导管(见图7B(a))。这些输导组织与不定芽中的输导组织连接,使组培苗形成完整植株。这些输导组织将不定根从土壤里吸收的营养物质运输到植株的各个部位,从而提高组培苗移栽成活率。

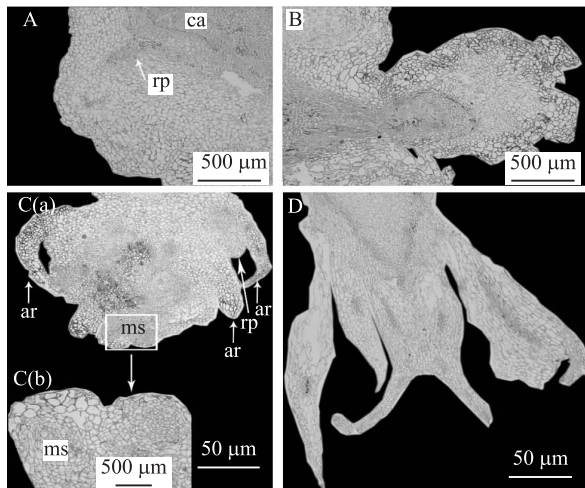


图6 不定根形成的显微结构

A: 内起源的根原基; B: 内起源的不定根; C(a): 外起源的根原基和不定根; C(b): 分生组织; D: 外起源的不定根; rp: 根原基; ca: 形成层; ar: 不定根; ms: 分生组织

不定根初生结构包括表皮、皮层和维管柱3个部分(见图8A)。从初生不定根的横切面上看,表皮细胞接近长方形,细胞排列紧密,细胞壁染色较深。表皮细胞还向外突起形成根毛原基。皮层由几

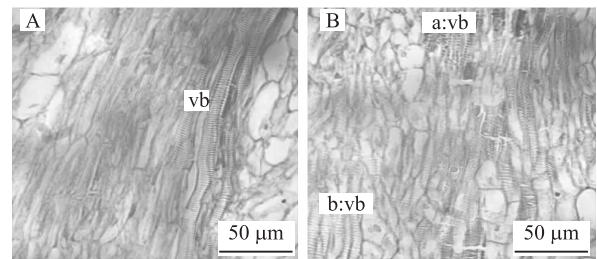


图7 不定根上的维管组织

A: 外起源不定根中的维管组织; B: 内起源不定根中的维管组织; vb: 维管束

层薄壁细胞组成,占初生不定根的大部分。维管柱位于根的中部,由中柱鞘、初生木质部、初生韧皮部、髓四个部分组成(见图8B)。

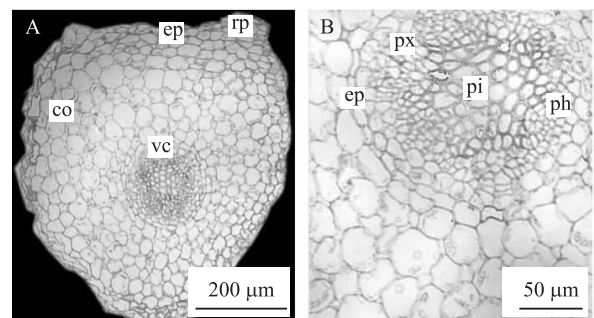


图8 不定根横切

A - B: 不定根横切; rp: 根毛原基; ep: 表皮; co: 皮层; vc: 维管柱; pe: 中柱鞘; px: 初生木质部; ph: 初生韧皮部; Pi: 髓

3 讨论与结论

离体条件下植物器官的发生首先要经历脱分化使外植体上的细胞恢复分生状态,经再分化形成组织、器官、植株^[5]。植株离体再生途径有两种:①体细胞胚发生途径,②器官发生途径^[6]。根据本实验

解剖学分析发现红颜草莓茎尖形态学上端的表皮细胞在适宜的激素刺激和条件培养下脱分化、再分化形成芽原基,芽原基发育为不定芽,在整个过程中未见愈伤组织。这一实验结果表明离体红颜草莓茎尖发育的芽为直接不定芽,芽的起源方式为外起源,植株再生方式为器官型。这都表明离体红颜草莓茎尖形态学上端在较高水平细胞分裂素的诱导下,可以高效的直接再生独立的不定芽。这与龙玉娟^[7]等对大蒜花序轴离体培养的不定芽发生途径结果一致。

关于细胞脱分化、再分化先发育形成芽原基,然后再形成叶原基;还是先形成叶原基后再形成芽原基;或者芽原基和叶原基同时形成等问题存在争议。Colby 在研究直接诱导离体葡萄叶柄发育为不定芽过程中发现原分生组织和不定叶的起始是独立的^[8]。Gaba^[9]和蔡润^[10]在研究甜瓜子叶再生时发现首先形成叶原基,芽原基在不定叶的基部形成。本实验研究发现红颜草莓茎尖离体培养是脱分化、再分化形成芽原基,芽原基周围的薄壁细胞形成叶原基(见图 2A-B)。形成不定芽后,在不定叶和不定芽芽体之间的基部还可形成新的芽原基(见图 3),继而发育形成新的不定芽。本研究结果与亚洲百合花丝组织培养、火百合子房薄层培养时的器官发生方式相似^[11]。

形成层、皮层薄壁细胞、韧皮部、髓射线细胞、愈伤组织等出是比较容易诱导产生根原基的部位^[12,13]。根原基可以分为潜伏根原基和诱生根原基两类^[14]。通过对离体红颜草莓茎尖组织培养的解剖学研究发现,红颜草莓不定芽中不存在潜伏根原基,不定根是在激素诱导下形成的诱生根原基(见图 6)。有的不定根起源于组织深处的维管形成层,也有的不定根起源于表皮内侧的几层薄壁细胞(见图 6)。李志军等发现田旋花不定根也起源于维管形成细胞^[15]。很多植物离体培养的原基都属于诱生根原基,如铁线莲^[16]、杏香兔耳风^[17]、紫花含笑^[18]等。正是由于红颜草莓不定芽生根方式既存在内起源又存在外起源,所以红颜草莓组培苗的生根率和生根条数都很高,可提高红颜草莓茎尖组培苗的移栽成活率。

参考文献:

- [1] 雷家军,代汉萍,谭昌华,等. 中国草莓属(*Fragaria*)植物的分类研究[J]. 园艺学报, 2006, 33(1):1~5.
- [2] Miao L, Zhang Y, Yang X, et al. Colored light-quality selective plastic films affect anthocyanin content, enzyme activities, and the expression of flavonoid genes in strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruit. [J]. Food Chemistry, 2016, 207:93.
- [3] 张正周,郑旗,李娟,等. 草莓果实采后无害化保鲜技术研究进展[J]. 保鲜与加工, 2013,13(2):53~57.
- [4] 马宗新. 我国草莓生物技术研究进展[J]. 农业工程, 2013, 3(5):7~11.
- [5] 王蒂. 植物组织培养[M]. 北京:中国农业出版社,2004. 37.
- [6] 薛银芳,赵大球,周春华,等. 芍药组织培养的研究进展[J]. 北方园艺,2012,(4):167~170.
- [7] 龙玉娟,吴震,杨芸,等. 大蒜花序轴离体培养器官发生途径的解剖学研究[J]. 西北植物学报, 2008, 28(3):470~474.
- [8] Colby S M, Juncosa A M, Stamp J A, et al. Developmental Anatomy of Direct Shoot Organogenesis from Leaf Petioles of *Vitis vinifera* (Vitaceae)[J]. American Journal of Botany, 1991, 78(2):260~269.
- [9] Gaba V, Schlarman E, Elman C, et al. In vitro, studies on the anatomy and morphology of bud regeneration in melon cotyledons [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 1999, 35(1):1~7.
- [10] 蔡润,黄伟华,潘俊松,等. 甜瓜子叶离体培养直接再生不定芽的形态学和解剖学观察[J]. 植物科学学报, 2002, 20(5):338~342.
- [11] 周祖富,艾素云,杨美纯,等. 火百合子房薄层培养器官发生的细胞组织学研究[J]. 园艺学报, 2006, 33(4):883~886.
- [12] De Bary A. Comparative Anatomy of the Vegetative Organs of the Phanerogams and Fems [M]. Oxford:Clarendon Press,1984.
- [13] Fahn A. Secretory Tissues in Plants [M]. London: Academic Press,1979,223~243.
- [14] Davis T D,1994. Biology of Adventitious Root Formation[M]// Haissig B E. New York Plenum Press,123~126.
- [15] 李志军,于军. 田旋花营养器官及不定芽发生的解剖学研究[J]. 植物科学学报,2002,20(3):185~187.
- [16] 张启香,胡恒康,方炎明. 铁线莲品种‘Multi-Blue’不定根的诱导培养及其发生过程的解剖学观察[J]. 植物资源与环境报,2010,19(1):80~85.
- [17] 于宏,戴小英,江香梅. 杏香兔耳风组培苗根系发育解剖学研究[J]. 江西林业科技,2008,(6):25~27.
- [18] 宋晓琛,程强强,戴小英,等. 紫花含笑组培苗生根解剖机理研究[J]. 江西林业科技,2014,(3):1~4.