

## 盾叶薯蓣离体成花的影响因素及组织学观察

杨波<sup>1</sup>, 黄小龙<sup>1</sup>, 胡春根<sup>2</sup>, 姚家玲<sup>1\*</sup>

(1. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070; 2. 华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070)

**摘要:** 研究了居群、外植体类型、激素、铁盐对盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright) 离体成花的影响, 建立了从花序切段高效直接再生花序和小花的实验体系。以不同的培养基对 5 个居群盾叶薯蓣的花序进行离体培养, 利用石蜡切片技术观察再生花序的发生。结果表明 5 个居群的盾叶薯蓣都能直接再生花序, 与花器官相关组织的外植体均具有不同程度的花序再生能力。培养基的组成对离体花序诱导率有很大影响, BA 促进形成花序, KT 与高浓度的铁盐促进形成营养芽。其中, MS + 2.0 mg/L BA + 0.2 mg/L NAA 最有利于花序再生及发育。切片观察表明, 离体再生的花序主要发生于花序轴与花蕾交界处的苞片以及小花的花被片表层细胞。

**关键词:** 盾叶薯蓣; 离体成花; 形态发生

中图分类号: Q943.1; Q949.95

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2009)03-0318-05

## Factors of Flower Inducing and Histological Observation in *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright *in vitro*

YANG Bo<sup>1</sup>, HUANG Xiao-Long<sup>1</sup>, HU Chun-Gen<sup>2</sup>, YAO Jia-Ling<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China; 2. College of Horticulture and Forestry Science, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** *In vitro* flower inducing system was established directly in tissue culture of inflorescences in *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright. Study was made on the factors influencing the inducing efficiency. Inflorescences of *D. zingiberensis* from five populations were used as explants and incubated in different mediums. New inflorescences were induced from the five populations successfully in various frequencies. Explants related to flower organs were capable to regenerate new inflorescences. Cytokinin was found to be the key factor for inducing these inflorescences. Among two kinds of cytokinin, benzyladenine (BA) was essential to induce inflorescences, while addition of kinetin (KT) and high concentration of Fe<sup>2+</sup>-EDTA would led to generation of vegetative buds. MS medium supplemented with 2.0 mg/L benzyladenine and 0.2 mg/L naphthaleneacetic acid (NAA) was optimal to inducing of inflorescences and following growth. Histological observation indicated the inflorescences regenerated from bracts and epidermal cell of the perianth of the explants.

**Key words:** *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright; Flower inducing; Morphogenesis

花的形成是被子植物特有的生理现象, 多数情况下, 植物必须生长到一定阶段才能开始花的发育, 因而在自然状态下研究花的形成受到季节、环境等因素的影响。1946 年 Loo 首次报道田野菟丝子(*Cuscuta chinensis* Lam.) 在试管中开花, 随后越来越多的学者开始利用组织培养技术进行植物离体成花的研究。在离体条件下, 诱导愈伤组织或外植体直接再生花芽已经在 30 多个科、100 多种植物上取得成功<sup>[1]</sup>。陆文樑等建立了风信子(*Hyacinthus orien-*

*talis* L. ev) 的离体生殖器官再生系统<sup>[2]</sup>, 并研究了外源激素对风信子离体成花的影响<sup>[3]</sup>。Liu 等通过西洋杜鹃(*Rhododendron hybridum* Hort.) 的体外成花体系获得微型花<sup>[4]</sup>, 显示了离体微型花的商业价值。由于离体成花具有操作性强、重复性好、不受季节影响等优点<sup>[5]</sup>, 为植物成花分子机制研究提供了便利的实验体系。

盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright) 作为我国特有的植物, 具有悠久的药用历史, 其皂苷元

收稿日期: 2008-06-02, 修回日期: 2008-12-16。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39770084)。

作者简介: 杨波(1981-), 男, 华中农业大学植物学硕士研究生, 主要从事植物细胞工程研究; 姚家玲, 女, 教授, 博士, 主要从事植物发育生物学、植物细胞生物学的教学与研究。

\* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: yaojlm@mail.hzau.edu.cn)。

含量最高可达 16.15%,是目前世界上单株皂苷元含量最高的薯蓣种<sup>[6]</sup>。自 20 世纪 70 年代中期,在盾叶薯蓣品种改良、皂素提取与快速繁殖方面取得了重要进展<sup>[7-10]</sup>,并且形成了一套较完善的快速繁殖体系。我们在组织培养实践中发现盾叶薯蓣有离体成花现象,在此基础上,本研究较系统地观察了盾叶薯蓣的离体成花过程,重点探讨不同居群与外植体、培养基激素及其配比、铁盐浓度等因子对盾叶薯蓣离体成花的影响,试图建立较稳定高效的盾叶薯蓣离体成花实验体系,为进一步研究其花器官属性及成花机理奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料及材料准备

实验选取盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright) 的 5 个居群,田间编号分别为 323、31、4-73、5-88、185,取材于华中农业大学盾叶薯蓣实验田。

分别于 2006 年 3~5 月和 2007 年的 3~5 月盾叶薯蓣生长期,以雄株的成熟花序、花蕾、幼嫩花序(长度 1 cm 以内)、带幼嫩花序的茎段、营养芽茎段等作为离体成花的外植体。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 不同外植体和居群离体成花的比较

取编号为 4-73 的 5 种外植体,将成熟花序和幼嫩花序切成长 0.5 cm 的小段,带幼嫩花序的茎段去掉花序和叶片后切成含节 0.5 cm 的切段,营养芽茎段切取节的部位,花蕾上的小柄去掉后直接用于培养。不同外植体消毒后接种于成花诱导培养基中,于 26℃,每天 16 h 光照和 8 h 黑暗条件下培养,光照强度为 1600 lx。

选取 5 个居群的盾叶薯蓣,以成熟花序为外植体,处理及培养方法如前所述。

#### 1.2.2 培养基成分对盾叶薯蓣离体成花的影响

以编号为 323 的成熟花序为外植体,分别接种在 11 种不同激素配比和 5 种不同铁盐浓度的培养基中,比较培养基成分对盾叶薯蓣离体成花的影响。

#### 1.2.3 再生花的继代

由不同居群的成熟花序所得到的再生花序,切成包含一个花蕾的小段,接种在培养基 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA 中。

#### 1.2.4 盾叶薯蓣离体成花的细胞学观察

取培养 0、1、3、5、7、14、25、30 d 时的外植体及各发育时期的花序,卡诺固定液(纯酒精:冰醋酸 = 3:1)固定 12 h,爱氏苏木精整染,常规石蜡切片法

制片,切片厚 8~10 μm。在 Olympus-BH<sub>2</sub> 型光学显微镜和 YM100 NIKON 体视显微镜下观察并摄影。

### 1.2.5 数据统计与分析

各处理中外植体接种 5 瓶,每瓶 6 个,每个实验重复 2 次。培养 90 d 时统计结果。

本实验定义成花诱导率(%) = (诱导出花序外植体数/接种外植体数) × 100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同外植体及居群离体成花的差异

为了比较盾叶薯蓣营养器官和生殖器官离体成花的差异,以编号为 4-73 的成熟花序、花蕾、幼嫩花序、带幼嫩花序的茎段、营养茎段为外植体进行离体成花的诱导培养。培养 1 个月左右,外植体上开始出现绿色的芽点。随着培养时间的延长,到 2 个月时,开始出现大量肉眼可见的丛生状的花序和少量的营养芽(图版 I:F),培养 3 个月后再生花序上的花蕾陆续开放(图版 I:G)。培养 90 d 时的统计结果见表 1。

结果表明,与花器官相关的外植体都能直接再生花序,成熟花序切段的花序诱导率最高,达到 71.67%,而营养器官不能直接再生花序。

本实验 5 个居群离体成花的差异见表 2。离体

表 1 不同外植体离体成花的差异  
Table 1 Difference of explants on inducing inflorescences *in vitro*

| 外植体<br>Explants | 离体成花率(%)<br>Flowering percentage <i>in vitro</i> |
|-----------------|--------------------------------------------------|
| 成熟花序切段          | 71.67a                                           |
| 幼嫩花序            | 58.34ab                                          |
| 单个花蕾            | 45.00bc                                          |
| 带幼嫩花序的腋芽        | 30.00c                                           |
| 营养腋芽            | 0d                                               |

注:百分数取反正弦值后进行 Duncan's multiple range test;  $p = 0.05$ ; 平均数后带有不同字母的表示具有显著差异。下表同。

Notes: Make arcsine transformation for the data and then make Duncan's multiple range test.  $p = 0.05$ . Different letter behind the mean values means they have significance of difference. The same as below.

表 2 不同居群离体成花的差异  
Table 2 Difference of populations on inducing inflorescences *in vitro*

| 居群<br>Population | 离体成花率(%)<br>Flowering percentage <i>in vitro</i> |
|------------------|--------------------------------------------------|
| 323              | 90.00a                                           |
| 5-88             | 83.33ab                                          |
| 4-73             | 76.67ab                                          |
| 185              | 73.33b                                           |
| 31               | 33.33c                                           |

成花率是外植体培养 90 d 后的统计数据,取 2 次重复实验的平均值。

在其它条件都一致的情况下,发现 5 个居群都具有离体成花的能力,但成花诱导率明显不同(见表 2),编号为 323 的居群成花诱导率最大,为 90%,编号为 31 的居群成花诱导率最低,仅为 30%。说明不同居群的盾叶薯蓣离体成花的能力具有很大的差异。

## 2.2 激素配比和铁盐对盾叶薯蓣离体成花的影响

### 2.2.1 不同激素的对比对盾叶薯蓣离体成花的影响

从表 3 的结果可知,单独使用 BA (0.5 ~ 4.0 mg/L),当 BA 浓度为 2.0 mg/L 时,离体成花率最高,达到 86.67%。单独使用 KT (0.5 ~ 6.0 mg/L),不能诱导花芽与营养芽。单独使用生长素 NAA,也不能诱导离体成花。BA (2.0 mg/L) 分别与 IBA (0.5 mg/L)、IAA (1.0 mg/L) 和 NAA (0.2 mg/L) 组合时,具有很高的成花诱导率(分别为:90%、80% 和 90%)。与单独使用 BA 相比,BA 与上述 3 种生长素的组合使用能促使离体花更好地生长发育。BA 与微量的 2,4-D (0.1 mg/L) 组合使用时,外植体只形成愈伤组织,并且这些愈伤组织在后来的培养中,只能诱导营养芽的产生。KT 与生长素搭配使用时,再生花的诱导率最高为 35.29%,但其后的生长发育状况不如 BA 与上述 3 种生长素的搭配。由此可见,对盾叶薯蓣的离体成花来说,BA 明显优于 KT,适当浓度的 IAA、IBA、NAA 与细胞分裂素组合有利于再生花的诱导及其后的生长发育。

表 3 激素对盾叶薯蓣离体成花的影响  
Table 3 Effects of growth regulators on inducing inflorescences *in vitro*

| 激素配比 (mg/L)<br>Combination of hormone | 生长状态<br>Growth state | 离体成花率 (%)<br>Flowering percentage <i>in vitro</i> |
|---------------------------------------|----------------------|---------------------------------------------------|
| 2.0 BA                                | 生长慢,诱导愈伤量少           | 86.67ab                                           |
| 0.2 NAA                               | 愈伤化                  | 0e                                                |
| 4.0 KT                                | 完全无分化,死亡             | 0e                                                |
| 1.0 BA + 0.1 NAA                      | 生长快,诱导愈伤量居中          | 39.13c                                            |
| 2.0 BA + 0.2 NAA                      | 生长快,诱导愈伤量居中          | 90.00a                                            |
| 4.0 KT + 0.4 NAA                      | 生长慢,诱导愈伤量极少          | 26.66d                                            |
| 6.0 KT + 0.6 NAA                      | 生长慢,诱导愈伤量极少          | 35.29c                                            |
| 2.0 BA + 0.1 2,4-D                    | 愈伤化,无任何器官            | 0e                                                |
| 2.0 BA + 0.1 GA                       | 花序节间延长               | 53.33cd                                           |
| 2.0 BA + 0.5 IBA                      | 生长快,诱导愈伤量少           | 90.00a                                            |
| 2.0 BA + 1.0 IAA                      | 生长快,诱导愈伤量少           | 80.00b                                            |

### 2.2.2 铁盐浓度对盾叶薯蓣离体成花的影响

以 MS 正常铁盐浓度为对照,取其浓度的 1/4、1/2、2 倍和 4 倍,以研究铁盐浓度对盾叶薯蓣离体成花的影响(见表 4)。实验中发现在低倍 (1/4、1/2) 铁盐浓度下,盾叶薯蓣成花诱导率与对照接近,而随着铁盐浓度的升高,其成花诱导率下降至 50% 以下。1/4 铁盐浓度时,在培养的早期(一个月),外植体最早诱导出大量的花芽,进而形成花序,但是花序生长不正常,出现玻璃化现象且很少形成正常的花蕾。1/2 铁盐浓度时,花芽诱导较快,形成的花序发生轻微玻璃化。当铁盐浓度为 MS 正常浓度时,花芽诱导速度适中,发育正常,能够正常开花。铁盐浓度为 MS 培养基的 2 倍和 4 倍时,外植体早期基本未分化出任何器官,3 个月后才开始慢慢分化出营养芽和花芽,其营养芽的数量远高于对照。随着培养时间的延长,在 1/4、1/2 铁盐浓度下,4 个月后外植体开始大量的死亡,而 2 倍和 4 倍的铁盐在 6 个月后仍能够正常生长。结果说明低浓度铁盐促进生殖生长,高浓度铁盐促进营养生长。

表 4 铁盐浓度对盾叶薯蓣离体成花的影响  
Table 4 Effect of  $\text{Fe}^{2+}$ -EDTA on inducing inflorescences *in vitro*

| 铁盐浓度<br>Concentration of $\text{Fe}^{2+}$ -EDTA | 离体成花率 (%)<br>Flowering percentage <i>in vitro</i> |
|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 1/4 MS 铁盐                                       | 86.67a                                            |
| 1/2 MS 铁盐                                       | 83.33a                                            |
| MS 铁盐                                           | 83.33a                                            |
| 2 × MS 铁盐                                       | 50.00b                                            |
| 4 × MS 铁盐                                       | 43.33b                                            |

## 2.3 离体再生花序的继代培养

盾叶薯蓣的成熟花序经离体成花诱导后产生微块茎,切除其表面的新生花序,将剩下的愈伤组织状微块茎分成大小为 0.5 cm<sup>2</sup> 的小块,接种在 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA 培养基上。新生的芽几乎全是营养芽,仅出现极少数花序。将这些微块茎再次继代时,只能形成营养芽(图版 I : H)。说明这种微块茎不具备多次继代并产生新花序的能力。然而,将离体花序切成小段,接种在同样的培养基中,能够再次产生丛生状花序,离体成花率与初始田间外植体无明显差异。

## 2.4 盾叶薯蓣离体再生花序的发生及发育

为确定盾叶薯蓣离体再生花序的细胞组织学发生部位,对接种不同时间的盾叶薯蓣外植体进行切片观察,培养 1 d 时可见花序轴上的幼嫩小花具六枚花被片,花托呈杯状(图版 I : A),但小花不



能进一步发育。此后,外植体切段出现膨大,其增殖既有来自花序轴皮层薄壁细胞的分裂,也有来自其上着生的小花的膨大,但后者更显著。当外植体培养7 d时,小花的苞片和最外侧花被片着生处的表层细胞分裂形成了一明显的致密分生细胞团(图版 I:B)。培养14 d时,各花被片腋处致密分生细胞团突起,形成花序原基(图版 I:C),之后花序原基伸长,花序轴上分化形成小花原基(图版 I:D)。培养30 d,苞片和各花被片着生处的表层细胞诱导形成的花序原基生长发育形成花序和丛生花序(图版 I:E)。综上可知,盾叶薯蓣离体花序主要起源于花序上着生小花的苞片和花被片的表层细胞。

### 3 讨论

成花决定的实质是指分生组织内部部分细胞接受成花信号后,转向生殖生长的状态;当成花决定态的细胞达到一定数量后就开始启动花芽分化和花器的发育。因此,成花决定态是某一组织中的一些细胞获得而不需要整个组织中所有细胞同时获得的状态<sup>[11]</sup>。由此可知,处于生殖生长时期的生殖器官中,必然有处于成花决定态的细胞,理论上推测,采用任何植物的生殖器官为外植体都能在离体的条件下直接再生花器官。而事实并非如此,有实验表明,植物外植体细胞的成花决定态很难通过细胞分裂传递,如烟草革新一号(*Nicotiana tabacum* L. cv. Gexing 1)的花柄具有非常显著的成花决定现象,但花柄薄层细胞块形成的愈伤组织却几乎没有花芽再生的能力<sup>[12]</sup>。本实验结果也证实了这一结论。实验以花序为外植体时,苞片和小花的花被片表面的细胞启动分裂,形成大量的花序。但是我们进行离体再生花序的多次继代培养时,发现其愈伤状结构的微块茎几乎没有分化花序的能力,而离体再生的花序并未失去花序再生能力。由此推测,盾叶薯蓣花序外植体可能由少量非成花决定态的细胞和大量成花决定态的细胞组成。在培养的过程中,或者成花决定态细胞发生逆转而偏向营养生长,或者处于营养生长的细胞具有一定的生长优势而取代

处于成花决定态的细胞,并由此导致微块茎在继代培养时不再具备分化花序的能力。

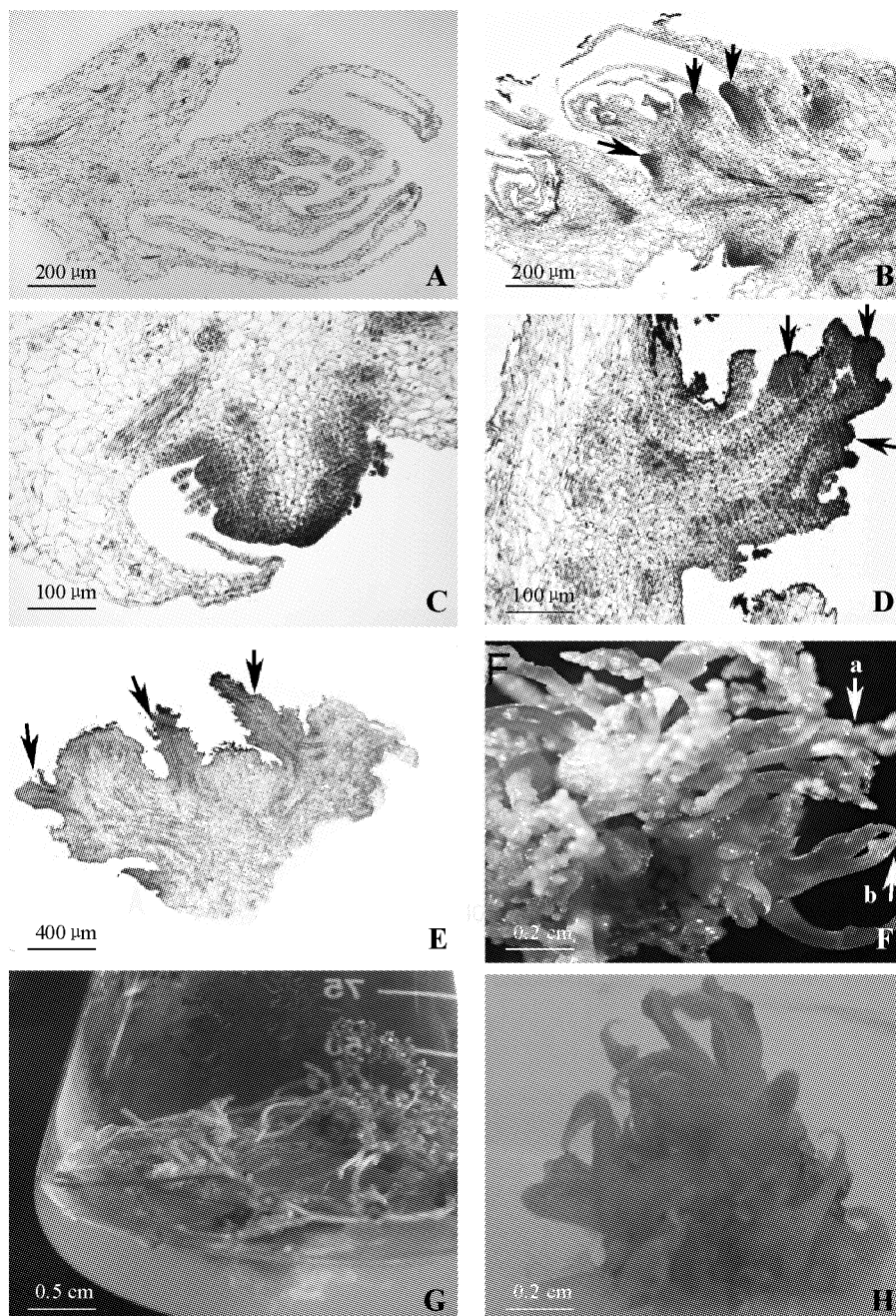
培养基组成及培养条件不合适是导致植物离体条件下不能直接再生花芽的原因。有报道说单独使用植物生长素并不能诱导植物离体成花<sup>[11]</sup>;单独使用BA能够诱导植物离体开花,而其他细胞分裂素只有与BA一起使用时才能诱导植物离体开花<sup>[13]</sup>。本实验中,BA单独使用,能诱导盾叶薯蓣离体成花,而KT与生长素的合理搭配也能诱导植物的离体成花,这可能是物种的差异所致。对盾叶薯蓣离体成花来说,细胞分裂素的种类是其中的关键,BA对离体成花的作用高于KT,细胞分裂素与生长素的合理搭配能改善再生花的生长和发育。

### 参考文献:

- [1] 房立晶,白志川,刘世尧,等. 试管开花生物技术研究概况[J]. 南方农业,2007,1(3): 72-74.
- [2] 陆文樑,白书农,张宪省. 诱导风信子再生花芽不断分化花被片的研究[J]. 植物学报,1999,41: 921-926.
- [3] 陆文樑,白书农,张宪省. 外源激素对风信子再生花芽发育的控制[J]. 植物学报,2000,42: 996-1002.
- [4] Liu Y, Chen X. Study on flowering of test tube plantlets about rhododendron hybridum[J]. Seed,2007,26(1): 6-8.
- [5] 关春梅,张宪省. 植物离体器官发生控制机理研究进展[J]. 植物学通报,2006,23(5): 595-602.
- [6] 宋发军. 甾体药物源植物薯蓣属植物中薯蓣皂甙元的研究及生产状况[J]. 天然产物研究与开发,2002,14(3): 892-931.
- [7] 闫立霞,胡春根,姚家玲,等. 盾叶薯蓣花药培养及单倍体植株的获得[J]. 云南植物研究,2007,29(1): 33-37.
- [8] 李运合,胡春根,姚家玲,等. 盾叶薯蓣四倍体诱导的研究[J]. 中草药,2005,36(3): 434-438.
- [9] 毕世荣,张忠福,苏成端,等. 高含量薯蓣皂素植株的细胞克隆[J]. 天然产物研究与开发,1997,9(4): 1-6.
- [10] 梁艳丽,李兰玉,谢世清. 盾叶薯蓣组织培养技术研究[J]. 云南农业大学学报,2006,21(2): 164-168.
- [11] 沈伟其. 植物成花转变及成花逆转的研究进展[J]. 生物技术通报,2001,4: 29-32.
- [12] 陈永宁,李文安. 烟草花柄愈伤组织花芽分化的能力[J]. 实验生物学报,1992,25(1): 67-69.
- [13] Lin C S, Lin C C, Chang W C. In vitro flowering of *Bambusa edulis* and subsequent plantlet survival[J]. Plant Cell Tissue Organ Cult,2003,72: 71-78.

杨 波等:图版 I

YANG Bo, et al.: Plate I



盾叶薯蓣离体成花的形态发生。A. 培养 1 d 的花序切段; B. 小花苞片和外侧花被片表皮细胞启动分裂, 形成致密分生组织细胞团(箭头所示); C. 花序原基; D. 新生花序上形成花原基(箭头所示); E. 丛生的幼花序(箭头所示); F. 由花序离体诱导的丛生芽(a. 花序; b. 营养芽); G. 再生花序开花; H. 丛生芽 2 次继代后只能产生营养芽

The morphogenesis of *in vitro* flowering of *Dioscorea zingiberensis*. A. Inflorescence cultured after one day; B. Compact callus came from bracts and epidermal cell of perianth (arrow); C. Inflorescence primordium; D. Flower primordium (arrow); E. New tufty young inflorescences (arrow); F. Regenerated inflorescences (a) and vegetative buds (b) from inflorescences *in vitro*; G. Flowering *in vitro*; H. Only vegetative buds regenerated from callus