

盾叶薯蓣类原球茎发育的形态解剖学观察

彭晓英¹, 周朴华¹, 张良波², 蒋道松¹, 周双德¹

(¹湖南农业大学生物科学技术学院, 长沙 410128; ²湖南省林业科学院, 长沙 410004)

摘要:为探讨盾叶薯蓣类原球茎形态建成的发育机理及植株移栽成活率高的原因, 对盾叶薯蓣离体培养条件下形成类原球茎的形态发生过程进行形态学和石蜡切片组织学观察, 并与不定芽的发生进行比较。结果表明: 类原球茎是由愈伤组织中致密的卵圆形胚性细胞团分化出芽原基和鳞片叶, 随后出现初生增厚分生组织和原形成层(维管束原), 其类原球茎形态建成。不定根的发生为内起源, 其维管组织与类原球茎的维管组织相连接, 故移栽成活率高。而不定芽为愈伤组织表面的胚性细胞分裂产生的分生细胞团分化而来, 其不定根通常发生在茎基部形成的愈伤组织表面, 故不易成活。

关键词:盾叶薯蓣; 类原球茎; 不定芽; 形态发生

Morphological and Anatomical Analysis of PLB (Protocorm-like body) Development of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright

PENG Xiao-ying¹, ZHOU Pu-hua¹, ZHANG Liang-bo², JIANG Dao-song¹, ZHOU Shuang-de¹

(¹Bioscience and Biotechnology College of Hunan Agricultural University, Changsha 410128; ²Hunan Academy of Forest, Changsha 410004)

Abstract: In order to investigate and clarify the developmental mechanisms and the high survival rate of *Dioscorea zingiberensis* PLB (Protocorm-like body) transplant, morphological and anatomical characterizations of PLB and adventitious buds *in vitro* were studied using paraffin section techniques. The results showed that the PLB bud primordia and scale leaves were able to regenerate from the elliptical compact embryogenic cell masses, subsequently to form the PTM (primary thickening meristem) and procambium with the occurrence of the PLB morphogenesis. The high survival rate of PLB plantlets was largely due to the fact that the root primordium was inner-genetic and connected with the buds through the vascular system in PLB. The results also revealed that the adventitious buds could be stemmed from the meristematic cell masses derived from embryogenic cells on the surface of callus, while the adventitious roots regenerated from the surface of callus formed at the lowest stem, resulting in the low survival rate of plantlets cultured *in vitro*.

Key words: *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright; Protocorm-like body (PLB); Adventitious buds; Morphogenesis

盾叶薯蓣 (*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright) 系单子叶薯蓣科薯蓣属植物, 为我国特有的甾体激素类药源植物。近年来, 利用组织培养技术诱导试管苗的研究很多^[1-5], 其中盾叶薯蓣类原球茎 (PLB, protocorm-like body) 离体体系的建立能解决长期以

来试管苗移栽困难的难题, 达到真正意义上的快速繁殖。该研究以离体诱导的类原球茎和不定芽为材料, 对盾叶薯蓣类原球茎的发育进行形态学和解剖学观察, 并比较观察盾叶薯蓣类原球茎与不定芽离体形态建成与发育的解剖学结构特点, 以期揭示类

收稿日期: 2009-03-20

修回日期: 2009-05-15

基金项目: 湖南省重点科技攻关项目 (BK0272)

作者简介: 彭晓英, 博士, 讲师, 主要从事植物学研究。E-mail: xypeng@hunau.net

通讯作者: 周朴华, 教授, 主要从事植物学研究

原球茎植株容易成活的原因并为盾叶薯蓣类原球茎发育机理的探讨奠定细胞学基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以盾叶薯蓣 (*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright) 植株带腋芽的茎段作为外植体, 分别离体诱导盾叶薯蓣类原球茎和不定芽。

1.2 试验方法

1.2.1 盾叶薯蓣类原球茎和不定芽的诱导 将外植体用 0.1% 升汞溶液浸泡 8min, 无菌水冲洗 3 次后, 切割成 0.6~1.0cm 的带腋芽的切段平放在诱导培养基上培养。将诱导出的致密愈伤组织切割后接种至分化培养基, 进行类原球茎和不定芽的分化与增殖培养。待顶芽长至 2~3cm 时, 将类原球茎和丛生的不定芽分别切割并转入生根培养基中进行生根培养。生根培养 10~20d 后, 打开培养瓶盖, 自然光下炼苗 3~5d。洗净试管苗根部粘附的培养基后将其移栽入装有沙土的混合培养基质。待小苗生长健壮后, 定植于大田中。

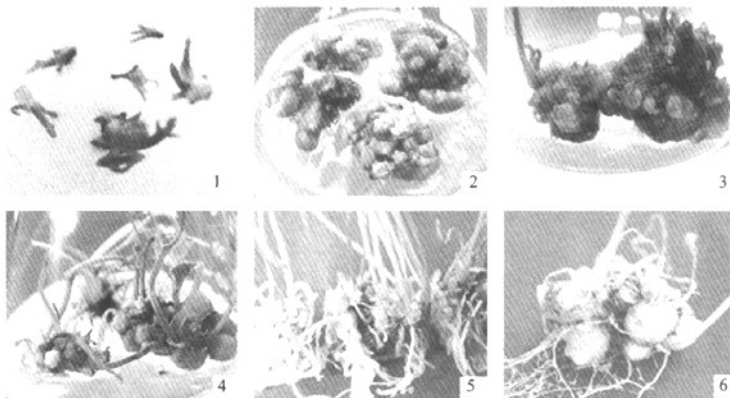
1.2.2 不同发育时期的盾叶薯蓣类原球茎和不定芽的形态解剖学观察 观察类原球茎在不同发育时期的形态学特点, 并分别以不同发育时期的类原球茎和不定芽为材料, 常规石蜡切片法制片, 旋转切片机 (YD-202) 切片, 切片厚度 10~12 μ m。用海氏苏木精染色, 中性树胶封片, MOTIC-BA400 显微镜观

察并拍摄。

2 结果与分析

2.1 盾叶薯蓣类原球茎发生及发育的形态学特征

当带腋芽的茎段接种至诱导培养基上 20d 后, 即可观察到一部分腋芽直接膨大成球状, 而另一部分则在叶腋处膨大成亮绿色的致密愈伤组织 (图版 1-1)。将增殖的致密愈伤组织转人类原球茎分化培养基上培养 8d 后, 愈伤组织上先出现包裹着绿色芽点的白色或浅黄绿色的鳞片叶突起 (图版 1-2), 15~20d 时, 鳞片叶继续包裹着膨大的类原球茎突出愈伤组织表面 (图版 1-3), 类原球茎在原分化培养基上继续生长 10d 后, 顶芽不断伸长, 幼叶开始舒展 (图版 1-4)。而鳞片叶则逐渐栓质化, 颜色由绿色转化为浅褐色。挑选顶芽长 2~3cm 的类原球茎, 转入生根培养基中, 15d 后类原球茎外的鳞片叶着生处 (即茎节处) 陆续产生白色不定根突起, 并长成许多不定根 (图版 1-5)。移栽后植株藤蔓茂盛, 叶片舒展, 光合作用增强, 同化产物不断积累至茎基部的类原球茎中, 导致类原球茎的继续膨大及组织致密化, 其外周的鳞片叶开始出现栓质化加厚并不同程度褐化。类原球茎在土壤中继续生长发育, 增殖产生许多新的小球茎 (图版 1-6), 球茎茎尖向上生长形成幼嫩植株, 也有的茎尖朝水平方向转化为根芽并延伸形成根状茎。



图版 1 不同发育时期的盾叶薯蓣类原球茎

Plate 1 PLBs of *Dioscorea zingiberensis* at different developmental stages

1: 类原球茎直接从腋芽处发生; 2: 致密愈伤组织上诱导出带鳞叶的类原球茎; 3: 顶芽伸出的类原球茎; 4: 长出茎、叶的类原球茎; 5: 生根的类原球茎; 6: 移栽 3 个月后膨大的类原球茎

1: PLBs regenerated directly from axillary buds; 2: PLBs wrapped by scale leaves regenerated from compact callus; 3: PLBs sprouted; 4: PLBs with shoots and leaves; 5: Rooting PLB plantlets; 6: PLBs enlarged after three months period of growth in soil

2.2 盾叶薯蓣类原球茎形态建成的解剖学观察

盾叶薯蓣带腋芽茎段培养形成的愈伤组织在增殖培养基上培养,细胞增殖能力强,生长比较快。幼嫩愈伤组织和培养时间较长的愈伤组织在类原球茎的诱导上有差异。幼嫩愈伤组织体积小,细胞处于胚性细胞阶段,发育形成类原球茎的分化能力弱。随着培养时间的增加,愈伤组织增大成块状,并在表面产生黄褐色变化。从黄褐色愈伤组织的切片观察,外周细胞壁显著增厚并栓质化(图版 2-1),内部细胞也出现再分化,产生针晶成束的粘液细胞、分生细胞团和维管组织结节等。这种愈伤组织继续在原培养基上培养,将老化失去分裂能力。

将出现栓质化的愈伤组织切割成 0.6cm × 0.6cm 的小块转入有细胞分裂素 6-BA 的分化培养基上,内部的一些薄壁细胞脱分化,恢复分裂能力形成胚性细胞(图版 2-2),并继续分裂形成胚性细胞团和分生组织结节(图版 2-3)。胚性细胞团的细胞较小,排列紧密,细胞壁薄、细胞质浓,无淀粉粒,核大且居于细胞中央。胚性细胞发育成胚性细胞团的同时,与周围其他薄壁细胞逐渐形成一个明显的分界面,必将减弱和周围细胞的联系,而形成了与周围细胞发育不同的独特方式。面向愈伤组织内部的胚性细胞团的“基部”细胞,分裂速度减缓并分化发育出维管组织结节。胚性细胞团伸长、增大(图版 2-4)。而面向愈伤组织外部的胚性细胞团“顶部”细胞,分裂能力强并突出愈伤组织表面,出现生长锥的分化(图版 2-5)。随后,从愈伤组织内形成一个带鳞片叶和生长锥的类原球茎突出愈伤组织表面。从切片上观察到这是一个单向极性,和周围细胞形成明显界限,是由体细胞发育起来的类原球茎锥形(图版 2-6)。此后其进一步发育成为一个由鳞片叶、幼叶、生长点、周皮、基本组织和维管束构成,在它的一定部位(茎节)产生不定根的原球茎(图版 2-7)。类原球茎幼叶原基的基部有细胞恢复分裂能力,形成初生增厚分生组织,其分裂衍生的细胞促进类原球茎的扩大;顶端生长点的细胞分裂向下产生初生分生组织(图版 2-8),由表皮原、基本分生组织和原形成层组成。不定根内部的细胞分化形成维管束,与基本组织的维管束相连。不定根通常发生在初生增厚分生组织和原形成层处,属于内起源。

2.3 不定芽发育的形态解剖学观察

致密愈伤组织上诱导产生类原球茎的同时,也

从愈伤组织表面产生少量不定芽,其发生特点如下:

愈伤组织近表面外侧的几层薄壁细胞中出现单个的胚性细胞,其细胞壁薄、细胞核大而圆整、细胞质稠密、无液泡,该胚性细胞进行分裂,形成分生细胞团(图版 2-9),进而形成苗端分生组织突起(图版 2-10),并在基部先分化出鳞片叶(图版 2-11)。苗端分生组织伸长生长,形成带芽茎段。不定芽的形成成为器官发生型,属外起源。

将苗端茎段切下,插入生根培养基生根,十分困难。往往在插入培养基的苗端茎段切口上长出愈伤组织,愈伤组织上产生不定根。从切片观察,它的根原基发生于愈伤组织内部细胞(图版 2-12),属内起源。但是,所产生的不定根和不定芽之间没有维管组织的直接联系。这种试管苗的移栽成活率极低。

3 讨论

3.1 盾叶薯蓣类原球茎与兰科植物类原球茎的形态发生的比较

盾叶薯蓣类原球茎与兰科植物类原球茎的形态发生^[6-9]一样,均起源于胚性细胞团的再分化。但是兰科植物的胚性细胞团通常发育为球形胚之后形成类原球茎,而盾叶薯蓣愈伤组织中胚性细胞团的发育不经过体细胞胚阶段,而是由致密的卵圆形胚性细胞团分化出芽原基和鳞片叶,其类原球茎形态建成是初生增厚分生组织和原形成层(维管束原)的出现。不定根通常发生在初生增厚分生组织或是木栓形成层的部位,为内起源发生方式。

3.2 盾叶薯蓣类原球茎与种子苗膨大球体在土壤中发育的形态学比较

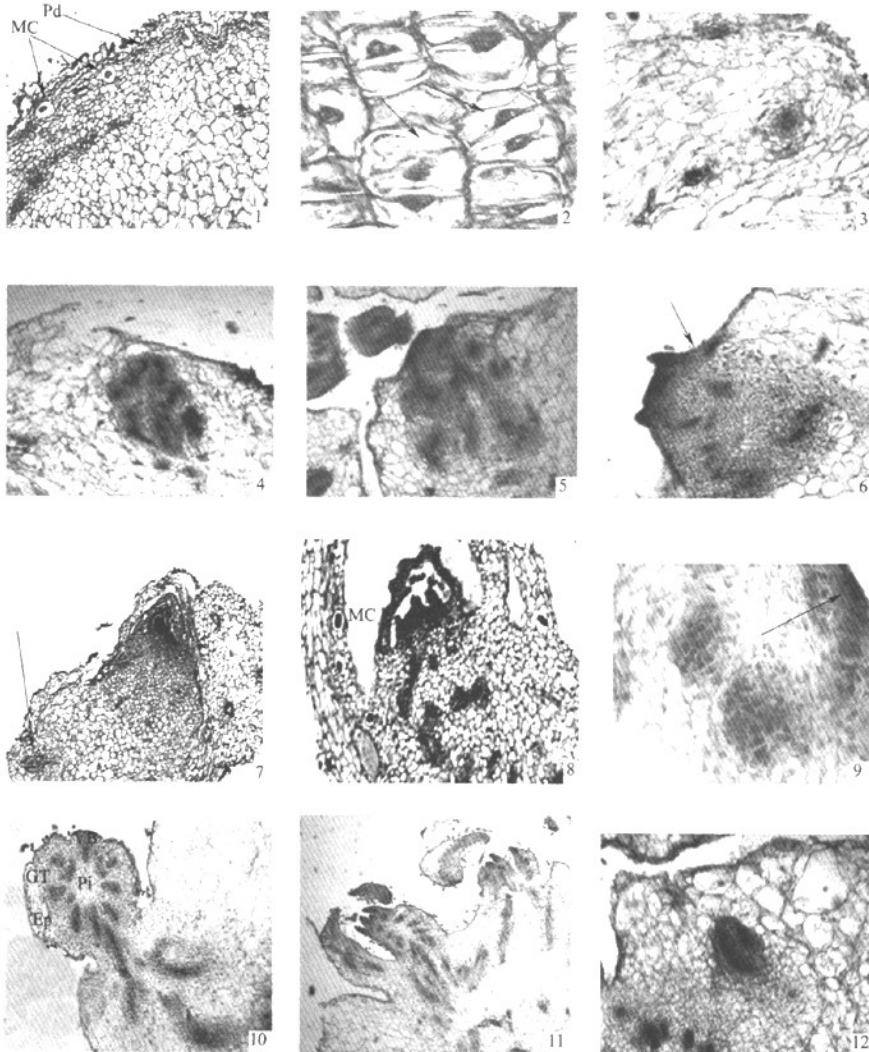
可能是受培养基中植物生长物质调控的影响,类原球茎在土壤中继续生长发育,增殖产生许多新的小球茎,有的球茎茎尖向上生长形成幼嫩植株,也有的茎尖生长一定阶段后(通常在栽种半年以上)才水平方向转化为根芽并延伸形成根状茎。这与曹玉芳等^[10]描述的种子实生苗形成的节部球状体发育成苗的过程有一定的差异,但这种特性并不影响球状体发育形成根状茎而且更有利于球茎的增殖。

3.3 盾叶薯蓣离体培养中类原球茎与不定芽发生的比较

在诱导盾叶薯蓣类原球茎的培养体系中,经筛选的致密愈伤组织大多分化为类原球茎,但愈伤组织表面总有一些不定芽的分化。这两种器官的发生在愈伤组织上的起源有着很大差别。类原

球茎为内起源,是愈伤组织内部的胚性细胞分裂形成胚性细胞团而来;而不定芽为愈伤组织表面

的胚性细胞分裂产生的分生细胞团分化而来,属于外起源。



图版 2 愈伤组织途径诱导类原球茎和不定芽的组织学观察

Plate 2 Cytohistology of PLB and adventitious buds regenerated from callus

1: 栓质化的愈伤组织,箭头示周皮与带针晶束的粘液细胞(100×);2:正在分裂的胚性细胞,如箭头所示(×400);3:胚性细胞团(100×);4:伸长、增大的胚性细胞团(100×);5:出现生长锥分化的胚性细胞团(100×);6:突出愈伤组织表面的具有生长锥和鳞片叶的类原球茎,如箭头所示;7:单向极性的类原球茎(×100);8:产生不定根的原球茎,箭头所示为根原基(40×);9:能产生不定芽的分生细胞团(100×);10:带芽茎段的纵切面图(100×);11:带芽茎段的横切面图(100×);12:根原基发生于愈伤组织内部细胞(100×)

MC:具结晶体的粘液细胞;Pd:周皮;Ep:表皮;VB:维管束;GT:基部组织

1: Transverse section of callus with suberized epidermis(100×);2: Embryogenic cell in division(×400);3: Embryogenic cell masses(100×);4: The embryogenic cell masses elongated and enlarged(100×);5: Epical cones regenerated from cell masses(100×);6: PLB sprouted with epical cone wrapped by scale leaves from compact callus;7: PLB in unilateral polarity(×100);8: PLB with adventitious roots(arrow showed the root primordium);9: Meristematic cell masses capable of regenerating adventitious buds(100×);10: Longitudinal section of PLB stems with buds(100×);11: Transverse section of PLB stems with buds(100×);12: Root primordium originated from internal cells in callus(100×)

MC: Mucous cell with crystal;Pd: Periderm;Ep: Epidermis;VB: Vascular Bundle;Pi: Pith;GT: Ground Tissue

(下转第 238 页)

- 特性差异研究[J]. 植物营养与肥料学报, 1999, 5(1): 40-45
- [8] 孔令旗, 李振声, 李继云. 植物磷营养效率的基因型差异及其遗传控制[J]. 遗传, 1996, 18(增刊): 6-10
- [9] 戴开结, 何方, 官会林, 等. 植物与低磷环境研究进展——诱导、适应与对策[J]. 生态学杂志, 2006, 25(12): 1580-1585
- [10] 邢宏燕, 李滨, 李继云, 等. 小麦品种磷营养特性的类型分析及其年度间稳定性的研究[J]. 西北植物学报, 1999, 19(2): 219-228
- [11] 佟汉文, 黄荣华, 刘易科, 等. 小麦新品种农艺性状与产量的相关及通径分析[J]. 湖北农业科学, 2008, 47(7): 758-760
- [12] 刘建中, 李玉京, 李滨, 等. 黑麦基因组中不同染色体在缺磷胁迫下对普通小麦根系分泌酸性磷酸酯酶(Acph)遗传效应的研究[J]. 遗传学报, 2000, 27(1): 39-43
- [13] 李玉京, 刘建中, 李滨, 等. 长穗偃麦草基因组中与耐低磷营养胁迫有关的基因的染色体定位[J]. 遗传学报, 1999, 26(6): 703-710
- [14] 贾继增, 张正斌, Devos K, 等. 小麦 21 条染色体 RELP 作图位点遗传多样性分析[J]. 中国科学 C 辑, 2001, 31(1): 13-21
- [15] 白志英, 李存东, 孙红春. 小麦中国春-Synthetic 6x 代换系的光合速率与产量性状研究[J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(1): 20-24
- [16] 白志英, 李存东, 冯丽肖, 等. 干旱胁迫对小麦叶片细胞膜透性效应的染色体定位研究[J]. 华北农学报, 2007, 22(1): 1-4
- [17] 白志英, 李存东, 刘渊. 干旱胁迫下小麦叶片脯氨酸和蛋白质含量变化与染色体的关系[J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(3): 325-330
- [18] 白志英, 李存东, 孙红春. 干旱胁迫对小麦染色体代换系旗叶相对含水量和离体失水速率的影响[J]. 华北农学报, 2008, 23(1): 62-65
- [19] 白志英, 李存东, 冯丽肖, 等. 小麦中国春-Synthetic 6x 代换系穗花分化与耐旱基因的染色体定位[J]. 中国农业科学, 2007, 40(10): 2136-2144
- [20] 白志英, 李存东, 孙红春, 等. 小麦代换系抗旱性生理指标的主成分分析及综合评价[J]. 中国农业科学, 2008, 41(12): 4264-4272
- [21] 李学军, 李立群, 王辉, 等. GW3-1 和 IND109 标记对普通小麦粒重的 QTL 定位分析[J]. 西北植物学报, 2008, 28(6): 1106-1111
- [22] Marza F, Bai G H, Carver B F, et al. Quantitative trait loci for yield and related traits in the wheat population Ning 7840 Clark [J]. Theor Appl Genet, 2006, 112: 688-698
- [23] 刘建中, 李玉京, 李滨, 等. 不同生产时期小麦品种有效利用土壤潜在磷特性的鉴定[J]. 作物学报, 1999, 25(5): 560-564
- [24] 刘建中, 李滨, 李玉京, 等. 普通小麦各染色体组有效利用土壤磷基因的遗传分析[J]. 西北植物学报, 1999, 19(1): 1-6
- [25] 李玉京, 刘建中, 李滨, 等. 普通小麦基因组中耐低磷胁迫特性的染色体控制[J]. 遗传学报, 1999, 26(5): 529-538

~~~~~  
 (上接第 232 页)

愈伤组织不定芽的发生是在芽原基基部先分化出鳞片叶, 随后芽伸长。将苗端茎段分割移入生根培养基, 很难从茎上生根<sup>[2]</sup>。大多数情况是苗端基部形成愈伤组织, 愈伤组织上发生根。根与茎的维管系统没有连接起来, 移栽成活困难。而在类原球茎的生长发育中, 生长点基部先分化出鳞片叶, 在鳞片叶基部产生初生增厚分生组织, 其细胞的分裂及衍生细胞的分裂和生长促使类原球茎体积增大。伴随着顶端分生组织的分裂、生长和分化形成芽原基, 其下方分化出原形成层束。芽和不定根的分化及维管束的形成使得类原球茎成为一个整体。故类原球茎的离体诱导再生体系的建立解决了盾叶薯蓣试管苗移栽成活的难题, 为盾叶薯蓣优质种苗的工业化生产奠定了试验基础。

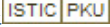
#### 参考文献

- [1] 孟玲, 朱宏涛, 刘锡葵, 等. 盾叶薯蓣的快速繁殖[J]. 天然产物研究与开发, 2000(6): 17-21
- [2] 徐向丽, 刘选民, 周朴华, 等. 盾叶薯蓣组织培养及微块茎的离体诱导[J]. 湖南农业大学学报, 2000, 26(4): 282-285
- [3] 易志军. 盾叶薯蓣愈伤组织培养研究[J]. 经济林研究, 2001, 19(3): 21-22
- [4] 李光明, 刘文海. 盾叶薯蓣同源四倍体的诱导和鉴定[J]. 西北农业学报, 2006, 15(1): 189-192
- [5] 彭晓英, 周朴华, 张良波, 等. 盾叶薯蓣试管株芽的诱导[J]. 热带亚热带植物学报, 2005, 13(4): 319-323
- [6] 陈春满, 叶一枝, 凌绪柏. 象牙白花兰种子及茎尖培养与原球茎形态发生[J]. 园艺学报, 2002, 29(3): 251-254
- [7] 詹忠根, 徐程, 张铭. 兰科植物原球茎(类原球茎)的形态建成[J]. 种子, 2002(5): 36-37
- [8] 丁兰, 王丽, 李淮, 等. 卡德丽亚兰种子非共生萌发及萌发过程中原球茎发育的细胞学研究[J]. 广西植物, 2007, 27(6): 909-912
- [9] 刘贵周, 谢世清. 盾叶薯蓣良种离体快繁关键技术研究[J]. 中国种业, 2005(6): 36-37
- [10] 曹玉芳, 胡正海. 盾叶薯蓣实生苗根状茎的形态发生及薯蓣皂苷积累的研究[J]. 西北植物学报, 2003, 23(7): 1154-1162

# 盾叶薯蓣类原球茎发育的形态解剖学观察

作者: [彭晓英](#), [周朴华](#), [张良波](#), [蒋道松](#), [周双德](#), [PENG Xiao-ying](#), [ZHOU Pu-hua](#),  
[ZHANG Liang-bo](#), [JIANG Dao-song](#), [ZHOU Shuang-de](#)

作者单位: [彭晓英,周朴华,蒋道松,周双德,PENG Xiao-ying,ZHOU Pu-hua,JIANG Dao-song,ZHOU Shuang-de\(湖南农业大学生物科学技术学院,长沙,410128\)](#), [张良波,ZHANG Liang-bo\(湖南省林业科学院,长沙,410004\)](#)

刊名: [植物遗传资源学报](#) 

英文刊名: [JOURNAL OF PLANT GENETIC RESOURCES](#)

年,卷(期): 2010, 11 (2)

## 参考文献(10条)

1. [孟玲;朱宏涛;刘锡葵](#) 盾叶薯蓣的快速繁殖[期刊论文]-[天然产物研究与开发](#) 2000(06)
2. [易志军](#) 盾叶薯蓣愈伤组织培养研究[期刊论文]-[经济林研究](#) 2001(03)
3. [徐向丽;刘选民;周朴华](#) 盾叶薯蓣组织培养及微块茎的离体诱导[期刊论文]-[湖南农业大学学报](#) 2000(04)
4. [曹玉芳;胡正海](#) 盾叶薯蓣实生苗根状茎的形态发生及薯蓣皂苷积累的研究[期刊论文]-[西北植物学报](#) 2003(07)
5. [刘贵周;谢世清](#) 盾叶薯蓣良种离体快繁关键技术研究[期刊论文]-[中国种业](#) 2005(06)
6. [丁兰;王丽;李淮](#) 卡德丽亚兰种子非共生萌发及萌发过程中原球茎发育的细胞学研究[期刊论文]-[广西植物](#) 2007(06)
7. [詹忠根;徐程;张铭](#) 兰科植物原球茎,(类原球茎)的形态建成[期刊论文]-[种子](#) 2002(05)
8. [陈春满;叶一枝;凌绪柏](#) 象牙白花兰种子及茎尖培养与原球茎形态发生[期刊论文]-[园艺学报](#) 2002(03)
9. [彭晓英;周朴华;张良波](#) 盾叶薯蓣试管株芽的诱导[期刊论文]-[热带亚热带植物学报](#) 2005(04)
10. [李光明;刘文海](#) 盾叶薯蓣同源四倍体的诱导和鉴定[期刊论文]-[西北农业学报](#) 2006(01)

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zwyczyxb201002019.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201002019.aspx)