

结球白菜离体子叶不定芽再生过程中的组织学及生理变化

樊明琴, 朱月林*, 朱丽华

(南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

摘要: 以日本引进品种爱知结球白菜(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis* cv. Aichi Hakusai, C₁)为试材, 对离体子叶不定芽再生过程中的组织学和生理变化进行了研究。结果表明, 子叶在离体培养过程中, 不定芽发生方式为器官直接发生。在不定芽形成前, 可溶性蛋白质含量、POD和SOD的活性均呈上升趋势。随着细胞的脱分化, 代谢活动逐渐旺盛, 酶活性增强, 可溶性蛋白质含量增加, 表明不定芽形成过程中形态变化与生理变化紧密相联。培养基中添加AgNO₃对酶活性有促进作用, 并促进不定芽的分化。

关键词: 结球白菜; 不定芽再生; 组织学变化; 生理变化

中图分类号: Q943.1; S634.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2005)02-0138-06

Histological and Physiological Changes in the Process of *in vitro* Shoot Regeneration from Cotyledons of Chinese Cabbage

FAN Ming-Qin, ZHU Yue-Lin*, ZHU Li-Hua

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Aichi Hakusai (C₁), which was a Chinese cabbage cultivar (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis* (L.) Olsson) introduced from Japan, was used as plant material in this experiment. Investigations were carried out on histological and physiological changes during the process of *in vitro* shoot regeneration from cotyledonary explants. Histological observations showed that, adventitious shoots were induced through the pathway of direct organogenesis during the process of explants culture. Before adventitious shoots initiated, soluble protein content and activities of POD and SOD showed the trend to increase. As the cells were dedifferentiated, metabolism activity of cells gradually became stronger; enzymes activity and the soluble protein content were elevated. These results demonstrated that, morphological changes were strongly associated with physiological changes during the process of adventitious shoot induction. Addition of AgNO₃ to the medium increased the activity of enzymes and promoted the differentiation percentage of adventitious shoots.

Key words: *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* (L.) Olsson; Adventitious shoot regeneration; Histological change; Physiological change

植物体外形态发生是植物发育生物学研究的重点之一, 体外形态发生的研究主要依赖于植物组织

和细胞培养方法的建立, 通过组织培养可以建立起比较简单的体外实验系统, 可以重复和大量地产生

收稿日期: 2004-07-07, 修回日期: 2004-09-27。

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目([2001]498)。

作者简介: 樊明琴(1978—), 女, 硕士, 研究方向为蔬菜生物技术。

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: ylzhu@njau.edu.cn)。

器官的原基,它们的离体形态发生可以反映体内器官形态发生的机制^[1]。植物组织培养的研究为植物生长发育提供了重要的实验手段。但多数报道仅限于研究培养条件、培养过程中的细胞学和形态学观察^[2-6]。近年来借助于组织培养技术,对体细胞脱分化与再分化过程中生理生化特性的研究越来越受到重视,并取得了可喜进展^[7-9]。

结球白菜(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis* (L.) Olsson)为十字花科(Cruciferae)芸薹属(*Brassica*)蔬菜,属于离体不定芽再生困难型植物^[10]。最近,我们报道了其高效离体子叶不定芽再生技术^[11],但关于不定芽再生过程中的组织学及生理生化变化尚鲜有报道。本研究通过观察爱知结球白菜离体子叶不定芽形成过程中外植体的组织学变化,测定可溶性蛋白质含量、POD和SOD活性及其同工酶的变化,探讨外植体形态发生与生理生化变化之间的关系,为建立结球白菜高效离体不定芽再生体系提供组织学和生理生化依据。

1 材料与方法

1.1 材料

日本爱知结球白菜(Aichi Hakusai, C1),购自日本农林种苗公司。

1.2 方法

(1) 外植体的培养 切取萌发5 d的无菌苗子叶,分别接种于添加 AgNO_3 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和没有添加 AgNO_3 的2种培养基上。培养基基本成分均为MS+TDZ $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +0.8%琼脂+3%蔗糖,pH为5.8。用培养皿(直径9 cm)进行培养,每皿接种10个外植体。培养室条件:温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,光周期12 h/d,光照度2 500 lx。

(2) 石蜡制片 将 C_1 子叶接种于高效不定芽再生培养基^[11]上,即MS+TDZ $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + AgNO_3 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +0.8%琼脂+3%蔗糖,pH为5.8。 C_1 子叶自培养之日起每天取样,FAA固定,按常规石蜡切片法制片,切片厚度为 $0.8 \mu\text{m}$,番红-固绿染色,中性树胶封固^[12]。

(3) 不定芽再生过程中POD活性的测定及同工酶电泳 分别取培养0、3、5、8、10、12、15和18 d

的子叶外植体,称取外植体300 mg,加 0.05 mol/L 、 $\text{pH} 7.8$ 磷酸缓冲液1.7 mL,冰浴研磨。 4°C 下,以12 000 r/min离心30 min,取上清液40 μL ,用愈创木酚氧化法测定。以每分钟在470 nm处吸光度变化0.01为1个活性单位,酶活力以 $\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 表示^[13]。POD同工酶电泳及染色参考文献^[14]进行。

酶带相对迁移率 R_f =酶带迁移距离/前沿指示剂迁移距离,起始位置以分离胶和浓缩胶的界面算起,重复2次。下同。

(4) 不定芽再生过程中SOD活性的测定及同工酶电泳 取样时期及酶液提取方法同POD。SOD活性的测定用氮蓝四唑(NBT)法,SOD活性单位以抑制NBT光还原的50%为1个酶活性单位,以 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 表示^[13]。SOD同工酶电泳及染色参考文献^[14]进行。

(5) 不定芽再生过程中可溶性蛋白质含量的测定 取样时期同POD。称取外植体300 mg,参照Bradford的考马斯亮蓝G-250染色法^[15],以牛血清蛋白做标准曲线进行测定,样品加缓冲液(0.05 mol/L , $\text{pH} 7.8$ 磷酸缓冲液)1.7 mL,15 μL 1% PVP,20 μL 2% DTT,冰浴研磨。 4°C 下,以12 000 r/min离心30 min,取蛋白提取液20 μL 加入考马斯亮蓝G-250染色液3 mL混匀,在595 nm下测OD值,可溶性蛋白质含量以 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 表示。

2 结果与分析

2.1 不定芽再生过程中的组织学观察

子叶柄接种在培养基中2 d,切口端细胞开始膨大,子叶柄切口端表皮下2~3层较深层的维管组织薄壁细胞的细胞质增浓,生长活跃并进行旺盛分裂(图1:A),致使切口端显著膨大。培养至3 d时,在切口端组织内部靠近维管束周围的分生细胞进行分裂形成由多个细胞组成的分生细胞团(图1:B),分生细胞团着色比周围细胞深。培养至7 d时,从切口端长出一团微白并有绿色突起的组织,8~10 d时即可出现肉眼可见的绿色芽点(图1:C)。芽点不断生长,第14 d时形成1 cm左右的不定芽(图2)。

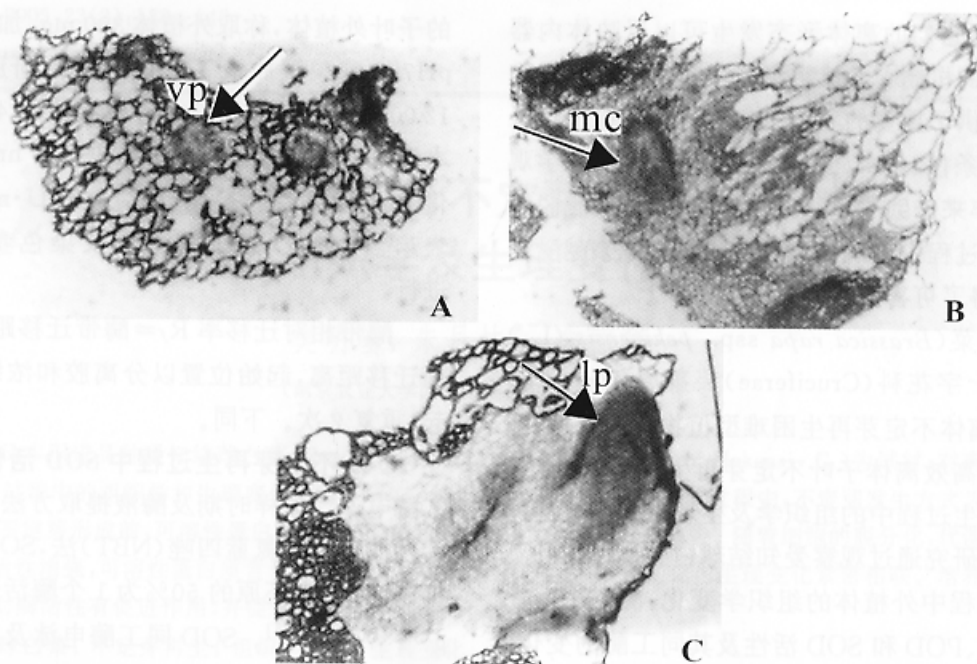


图 1 C_1 子叶不定芽发生过程的组织学观察
A: 培养 2 d 的子叶柄切口端横切面, vp. 示皮层及维管束薄壁细胞组织细胞的启动与分裂, $\times 40$; B: 培养 3 d 的子叶柄切口端纵切面, mc. 示维管薄壁细胞分裂形成的分生细胞团, $\times 40$; C: 培养 8 d 时的子叶柄切口端纵切面, lp. 示叶原基, $\times 40$
A: Transverse section of the cut end of cotyledon petiole after 2 days of culture, showing that the cells initiated to divide into cortex and vascular parenchyma (vp) tissues, $\times 40$; B: Longitudinal section of the cut end of cotyledon petiole after 3 days of culture, showing meristematic cell (mc) masses, $\times 40$; C: Longitudinal section of C the cut end of cotyledon petiole after 8 days of culture, adventitious shoot was formed, showing leaf primordium (lp), $\times 40$

图 1 C_1 子叶不定芽发生过程的组织学观察
Fig. 1 Histological observations of adventitious shoot formation from cotyledons of C_1



图 2 C_1 子叶直接再生的不定芽

Fig. 2 Direct adventitious shoot regeneration from cotyledon petiole of C_1

2.2 不定芽再生过程中 POD 的变化

在添加和不添加 $AgNO_3$ 的培养基上, 外植体不同培养天数 POD 活性变化见图 3。在 0~5 d 内, 酶活性很低。在不含 $AgNO_3$ 的培养基上培养的外植体 POD 活性在 0~5 d 内没有明显的变化, 5~8 d 内酶活性不断上升, 第 8 d 时出现峰值, 为 $20.41 U \cdot min^{-1} \cdot g^{-1} FW$, 8~12 d 内酶活性呈现下降, 12 d 后趋于稳定。在含有 $AgNO_3$ 的培养基上外植体 POD 活

性在 0~5 d 内无明显变化, 5~8 d 内迅速上升, 第 8 d 时出现峰值, 为 $25.36 U \cdot min^{-1} \cdot g^{-1} FW$ 。8~10 d 内酶活性迅速下降, 第 10 d 后酶活性变化趋于平缓。

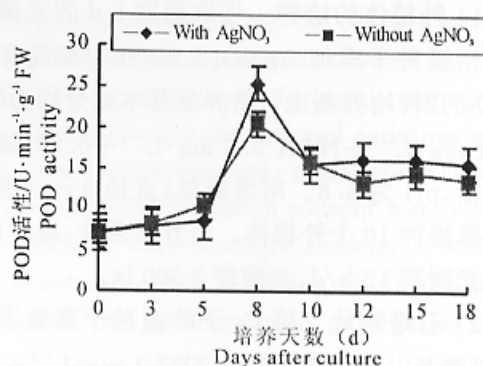


图 3 C_1 子叶不定芽再生过程中 POD 活性的变化

Fig. 3 Changes of POD activity during shoot regeneration from cotyledonary explants of C_1

由 POD 同工酶图谱(图 4)可知, 在培养 3 d 时, 添加和不添加 $AgNO_3$ 的培养基上外植体的酶带相似, 只有 R_f 为 0.026 的 1 条酶带, 酶带较淡, 此时 POD 的活性较低。随培养时间的延长, 酶带数增多, 酶带变宽。第 5 d 时出现 R_f 为 0.349 的酶带, 第 8 d 时 R_f 为 0.349 的酶带变宽, 并出现 R_f 分别为 0.095 和 0.212 的两条带, 可能与切口端细胞分裂增殖产

生芽点有关,此时 POD 活性达峰值。第 10 d 和第 12 d 时,在不含 AgNO_3 培养基上的外植体,其酶谱中的 R_f 为 0.095 和 0.212 的两条酶带消失。第 15 d 和第 18 d 时,在含有 AgNO_3 和不含 AgNO_3 的培养基上的外植体,其酶谱中的酶带相似,都有除 R_f 为 0.095 以外的 3 条带。

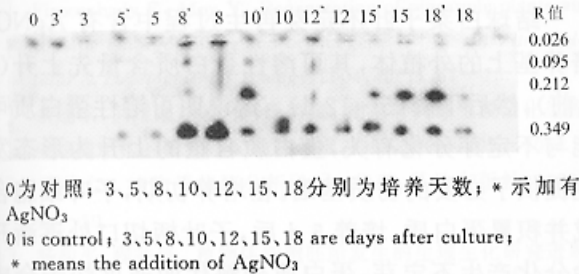


图 4 C_1 子叶不定芽再生过程中 POD 同工酶酶谱变化
Fig. 4 Changes of POD isozyme zymogram during shoot regeneration from cotyledonary explants of C_1

2.3 不定芽再生过程中 SOD 的变化

添加和不添加 AgNO_3 的培养基上的外植体不同培养天数 SOD 活性的变化见图 5。未培养时 (0 d), SOD 活性强,为 $38.54 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$ 。在不含 AgNO_3 培养基上外植体在第 0~5 d 内酶活性有所下降,5~8 d 内又有所上升。在含有 AgNO_3 的培养基上,外植体 SOD 活性从第 3~8 d 呈上升趋势。第 8~12 d 两者都呈下降趋势,第 12 d 时 SOD 活性最低。不含 AgNO_3 的培养基上的外植体 SOD 活性在 12 d 后又逐渐上升,含有 AgNO_3 的培养基上的外植体在 12~15 d 内略有上升,但在 15 d 后迅速下降。

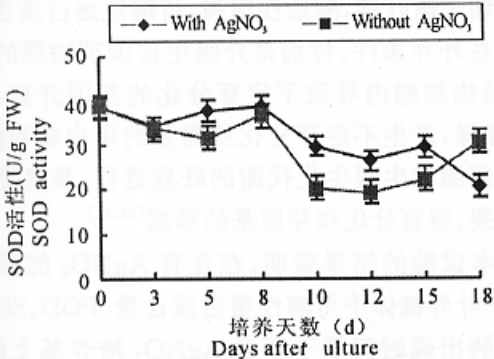
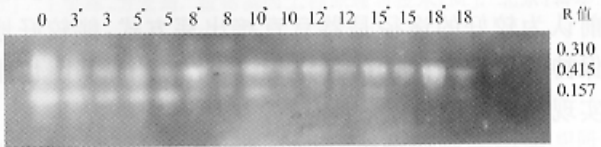


图 5 C_1 子叶不定芽再生过程中 SOD 活性的变化
Fig. 5 Changes of SOD activity during shoot regeneration from cotyledonary explants of C_1

子叶不定芽再生过程中 SOD 同工酶酶谱的变化见图 6。培养 0 d 时外植体的酶带较强,有 R_f 为 0.415 和 0.517 两条带,3~5 d 时添加和不添加 AgNO_3 的培养基上的外植体中,酶带的差异主要表现在强弱上,含有 AgNO_3 的培养基上的外植体,酶带稍强。第 8 d 时添加和不添加 AgNO_3 的培养基上

的外植体中,都有 R_f 为 0.310 的带出现,但在含有 AgNO_3 的培养基上的外植体中, R_f 为 0.415 的带较强。第 10 d 时,不含 AgNO_3 的培养基上的外植体中, R_f 为 0.517 的带消失。第 12 d 时含 AgNO_3 的培养基上的外植体中, R_f 为 0.517 的带也消失。15~18 d 时,在添加和不添加 AgNO_3 的培养基上的外植体中,都仅有 R_f 为 0.415 的一条酶带。



所需注释同图 4
Note refer to Fig. 4

图 6 C_1 子叶不定芽再生过程中 SOD 同工酶酶谱变化
Fig. 6 Changes of SOD isozyme pattern during shoot regeneration from cotyledonary explants of C_1

2.4 不定芽再生过程中可溶性蛋白质含量的变化

添加和不添加 AgNO_3 的培养基上外植体不同培养天数可溶性蛋白质含量的变化见图 7。不含 AgNO_3 的培养基上外植体中可溶性蛋白质的含量在培养 0~8 d 期间平缓上升,8~12 d 时开始下降,12 d 后又略有上升。含有 AgNO_3 的培养基上外植体可溶性蛋白质含量在培养 5 d 内呈上升趋势,5~12 d 期间含量下降,此后略有上升。

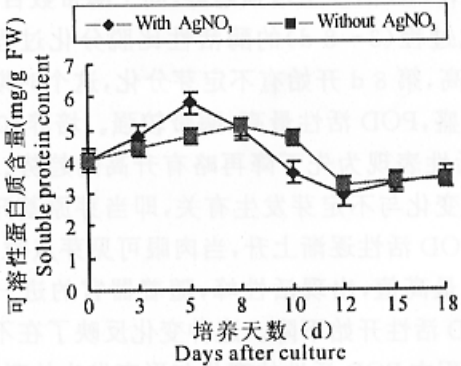


图 7 C_1 子叶不定芽再生过程中可溶性蛋白质含量的变化

Fig. 7 Changes of soluble protein content during shoot regeneration from cotyledonary explants of C_1

3 讨论

组织学观察表明,离体子叶不定芽再生为器官直接发生(direct organogenesis)方式。在培养的第 2 d 细胞启动分裂,此后,分生细胞团继续旺盛分裂、增殖,直接再生形成芽原基,产生不定芽。张鹏等^[16]的组织学研究表明,菜心离体培养植株再生方式为

外植体直接出芽,不定芽起源于子叶柄切口端维管组织的薄壁细胞,由此种细胞分裂形成分生细胞团,继而分化成芽。这种由外植体直接产生不定芽的方式,不仅能快速和大量地进行离体繁殖,而且在植物遗传转化中有着重要作用。因为外源基因通过各种转化途径易于进入外植体切口端细胞,并由这种细胞直接发生不定芽,还可避免由于经过愈伤组织而引起的体细胞无性系变异。对于植物的遗传转化,目前认为较好的途径是器官直接出芽方式,能较好地保持受体细胞的遗传稳定性,转化的外源基因也能实现稳定地遗传^[17]。

植物在离体培养过程中会发生一系列生理生化变化。近年来,在组织培养中,有关器官发生与内部生理生化变化之间关系的研究引起了许多学者的重视^[8,18,19]。酶是基因表达的产物,对同工酶进行分析是从基因产物的角度认识基因的功能^[20]。植物在生长发育过程中,同工酶表现出阶段特异性和组织特异性^[21]。本试验研究测定了结球白菜离体子叶不定芽形成过程中外植体的可溶性蛋白质含量、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)及其同工酶的变化规律,探讨了形态发生与生理生化变化间的关系,为建立结球白菜高效再生体系提供了生理生化方面的理论依据。

本研究结果表明,随着子叶柄切口处细胞的不断分化,POD活性呈增强趋势,同工酶带数目增多。再分化过程(3~8 d)的酶活性比脱分化过程(0~3 d)的高,第8 d开始有不定芽分化,这个时期细胞分裂旺盛,POD活性最高,酶带较强。培养10 d后,POD活性表现为先下降再略有升高的趋势。POD活性的变化与不定芽发生有关,即当芽原基开始分化时,POD活性逐渐上升,当肉眼可见芽点时,POD活性达最高值,出现活性峰,随着器官的进一步分化,POD活性开始下降。这种变化反映了在芽分化过程中POD活性的变化与形态发生的联系,并暗示了在芽分化过程中,相关基因在时间和空间上的顺序表达,导致细胞内代谢活动旺盛,最终表现为外部形态发生改变,分化出不定芽。因此,POD可作为不定芽分化过程中的生化指标之一^[22]。

结球白菜子叶不定芽再生过程中,培养3~5 d时,SOD活性呈下降趋势,在芽分化(8 d)时呈上升趋势,分化完成后,其活性下降,这与它在培养过程中防止组织衰老相适应。子叶培养过程中SOD活性总体趋势是先下降后升高然后再降低。酶谱研究表明,不定芽分化时,含有 AgNO_3 的培养基上的

外植体,其SOD同工酶谱带比不含 AgNO_3 的谱带要宽。添加和不添加 AgNO_3 的培养基中虽然外植体中SOD活性的变化趋势基本一致,但其表达强度有一定的差异。子叶不定芽分化过程中SOD活性的研究表明,植物细胞分化和生长与SOD活性变化具有一定的关联性。

结球白菜子叶不定芽再生过程中含有 AgNO_3 培养基上的外植体,其可溶性蛋白质含量先上升(5 d前),然后下降(5~12 d)。这说明可溶性蛋白质可能与不定芽分化有关,蛋白质含量的上升为形态发生提供了必要的物质基础。在培养初期,子叶细胞合成并积累蛋白质,培养5 d后,子叶柄切口处逐渐开始分化产生不定芽,蛋白质分解代谢速度快于合成代谢速度,以供生长分化所需,因此蛋白质含量呈下降趋势。不含 AgNO_3 的培养基上的外植体,其可溶性蛋白质含量在培养0~8 d时子叶细胞合成并积累蛋白质,说明不含 AgNO_3 培养基上的外植体,其不定芽分化比含有 AgNO_3 的要慢。

本试验表明,结球白菜子叶不定芽再生与可溶性蛋白质含量、POD、SOD活性变化有一定关系。在芽形成以前,可溶性蛋白质含量、POD和SOD活性及其同工酶谱带均呈增加趋势,表明生理生化变化先于形态分化,POD和SOD活性及其同工酶、可溶性蛋白质含量变化与细胞脱分化和再分化之间具有明显的关联,说明细胞由分化状态转向脱分化状态进入分裂时,随着细胞脱分化的进行,细胞中代谢活动逐渐旺盛,酶活性增强,可溶性蛋白质含量增加。在外界条件,特别是外源生长调节物质的作用下,植物细胞内导致不定芽分化的基因开启,并转录、翻译,产生不定芽分化所需要的蛋白质和酶,表现出细胞内生理生化代谢的旺盛进行,最终导致细胞分裂、器官分化和芽原基的形成^[19,23]。

本试验的结果表明,在含有 AgNO_3 的培养基上,子叶外植体中可溶性蛋白质含量、POD、SOD活性峰的出现时间早于不含 AgNO_3 培养基上的,表现在形态上能促进不定芽的分化。两种培养基上培养的子叶外植体,它们的可溶性蛋白质组成、POD和SOD同工酶谱带却基本一致,说明在培养基里添加 AgNO_3 可能主要是提高酶的活性或表达量,而不是促使外植体产生新的同工酶^[22]。

参考文献:

- [1] 周一兵,冯云,尤瑞麟.百合鳞片离体形态发生过程中几种同工酶的变化[J].北京大学学报(自然科学版),1995,31(4):

499-507.

- [2] 孙敬三, 陈维伦. 植物生物技术和作物改良[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1990. 8-23.
- [3] 成小飞, 李文钊. 秃杉苗端离体培养的形态组织学研究[J]. 植物学报, 1992, 34(2): 919-924.
- [4] 赵洁, 程井辰. 石刁柏愈伤组织形态发生能力及器官发生的研究[J]. 武汉植物学研究, 1992, 10(4): 328-332.
- [5] Firoozabady E, Moy Y. Regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis and organogenesis [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 2004, 40(1): 67-75.
- [6] 余迪求, 洪维廉, 陈睦传, 汪德耀. 甜菊叶肉细胞脱分化过程中超微结构的研究[J]. 植物学报, 1993, 35(7): 499-505.
- [7] 王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科学出版社, 1996. 44-50.
- [8] 杨和平, 程井辰. 植物体细胞胚胎发生的生理生化研究进展[J]. 植物学通报, 1991, 8(2): 1-8.
- [9] 岑益群, 蒋如敏, 邓志龙, 倪德祥. 安祖花离体繁殖的形态发生与理化因子效应[J]. 园艺学报, 1993, 20(2): 187-192.
- [10] Lim H T, You Y S, Park E J, et al. High plant regeneration, genetic stability of regeneration, and genetic transformation of herbicide resistance gene (bar) in Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*) [J]. *Acta Hort*, 1998, 459: 199-208.
- [11] 樊明琴, 朱月林, 朱丽华. 结球白菜高效离体子叶不定芽再生的研究[J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(1): 20-23.
- [12] 李正理. 植物组织制片学[M]. 北京: 北京大学出版社, 1996. 1-6.
- [13] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000. 164-169.
- [14] 何忠效, 张树政. 电泳[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1999. 33-46.
- [15] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [16] 张鹏, 凌定厚. 提高菜心离体植株再生频率的研究[J]. 植物学报, 1995, 37(11): 902-908.
- [17] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 182-223.
- [18] 吴文瑜. 植物同工酶的研究和应用[J]. 武汉植物学研究, 1990, 8(20): 183-188.
- [19] 周吉源, 梅星元, 袁均林. 油菜花序轴组织培养中愈伤组织同工酶和可溶性蛋白质变化的研究[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 1990, 24(1): 71-74.
- [20] Huang H W, Fenny D, Jiang Z W. Inheritance and diversity of PGI in chestnut (*Castanea*) [J]. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), 1999, 17(1): 1-4.
- [21] 薛俊杰, 张震云, 弓春瑞, 乔文平, 邵晓军. 几种木本豆科植物的过氧化物酶和多酚氧化酶同工酶研究[J]. 山西农业大学学报, 2000, 20(1): 55-58.
- [22] 庄东红, 杜虹. 大白菜子叶培养过程中 POD 同工酶和可溶性蛋白质含量的变化 [J]. 汕头大学学报, 2002, 17(1): 64-68.
- [23] 谭保才, 文江祁, 梁厚果. 绿豆子叶切段形成愈伤组织过程中蛋白质代谢的变化[J]. 实验生物学报, 1993, 7(1): 151-154.