中 国 科 学
1986 年 10 月 B 辑 第 10 期

黄花烟草（*Nicotiana rustica*. L）叶肉原生质体花芽的发育

李 文 安
（中国科学院上海植物生理研究所）

摘 要

黄花烟草（*Nicotiana rustica*. L）两个栽培种的叶肉原生质体培养于 Nagata-takebe（NT）培养基上形成愈伤组织．将已形成的愈伤组织移入修改的 MS 分化培养基（MSBI，MSBN）上诱导器官发生．仅有一个品种的愈伤组织形成了绿色突起，将它移植到不加任何生长素的基本培养基上，这些绿色的小突起在不同的光照条件下，均进一步发育成花芽，特别是其中一部分绿色小突起在试管内从愈伤组织直接形成不具叶片的花蕾，并开花结籽．

花芽的形成是植物从营养生长转向生殖生长的明显标志．花芽形成的机理已经成为许多植物生理研究的课题．早在 1946 年，罗士韦发现少数兔丝子顶芽能在试管内形成花芽并且开花[1]．随后，用植物组织培养研究花器官的发生，有了一些报道[2-9]．以烟草茎表皮为外植体培养在修改的 MS 培养基上，能在表皮上直接形成花芽[8]，而且来自花茎上端的外植体形成花芽的频率大于花茎下端的外植体，说明有一个成花梯度．Wardwell 和 skoog（1969 年）[7] 发现只有中性日照烟草的花茎组织能够形成愈伤组织并形成花芽，但是短日照和长日照的烟草并不能表现出这些特性．从菊苣（*Cichorium intybus* L.）根切段和棭花（*Lunaria annua* L.）叶柄切段的离体培养，也观察到花的形成[5,10]．

Gill（1979 年）从 *N. rustica* 叶肉原生质体培养再生的植株中，观察到在培养瓶内开花结籽的植株[11]．但本试验是从烟草叶肉原生质体形成的愈伤组织上直接诱导形成不具叶片的花芽，并开花结籽．这一现象目前尚未见报道．

一、材料和方法

选用黄花烟草（*Nicotiana rustica*. L.）两个栽培种：黑虎（简称 T_3）与牛耳（简称 T_4）作为试验材料．采用以下两种培养方法：

1. 取两个品种（T_3，T_4）的不同发育时期叶片（表 1），用我们实验室自制的 EA_3-867 纤维素酶[12]，分离获得大量有活力的叶肉原生质体．将原生质体悬浮于含有 2,4-D 1—2 mg/l 和激动素 0—0.5 mg/l 的 Nagata-Takebe[13] 修改培养基中，悬浮的原生质体与等量的熔化洋菜培养

本文 1985 年 6 月 13 日收到，1986 年 5 月 24 日收到修改稿．

基均匀混合后，吸取 3—4 ml 迅速倾入 6 cm 培养皿，原生质体的最后密度为 5×10^5/ml. 将此培养皿倒转后放入 9 cm 培养皿内，内放有吸足无菌水的滤纸以保持湿度，最后将 9 cm 培养皿用石蜡封带密封. 15—30 天即形成愈伤组织，随后将愈伤组织移入加有 6-Benzylaminopurine (6-BA) 2 mg/l 和 IAA0.5mg/l 或 NAA 0.1 mg/l (MSBI. MSBN) 的 MS 培养基[14] 上，20—40 天后观察到 T_3 愈伤组织上有绿色的小突起. 再将绿色的小突起转到不加任何生长调节物质的 MS 基本培养基上 (MS_0).

2. 选取不同发育状态的叶片，切成 0.6 cm^2 小块，置于分化培养基上 (MSBI. MSBN). 目的在观察它与上述原生质体培养之间的差别.

所有培养物均在 26°—28℃，光照 12 h，光强 2000 Lux 下培养.

二、试 验 结 果

1. 两个栽培种，盆栽于短日照 (10h) 或长日照 (16h) 条件下均能正常开花. 说明它们对光周期不敏感. 由 T_3 分离的原生质体经过上述培养基培养，不仅形成愈伤组织，而且也分化出各种类型的小植株，带有和不带有叶片的花芽(图版 I). 而由 T_4 分离出的原生质体在与 T_3 相同的培养基上，则只能形成愈伤组织 (表 1).

表 1 两个黄花烟草品种的不同生理状态叶片对原生质体培养发育的影响

试验代号	品种	供体植株发育状态	再生植株现蕾开花株%	营养状态株%	愈伤组织%
T257	T_3	幼苗	27.8	69.4	2.8
T9228-5	T_3	抽苔 5—6cm	25.9	64.7	9.4
T9228-1	T_3	现蕾未开花	50.6	37.4	12.0
T931	T_3	现蕾未开花	51.9	43.6	4.5
T9228-4	T_4	抽苔 2cm	全部形成愈伤组织，其上未发现具绿色突起		
T9228-2	T_4	抽苔未现蕾			
T931	T_4	抽苔未现蕾			

2. 叶肉原生质体于 NT 培养基培养 2—3 天，即适当增大，叶绿体有规律的分布在原生质体内，随后原生质体继续增大形成椭圆形，经 5—6 天细胞开始分裂，14—15 天后观察到小细胞团，再经 15—20 天出现肉眼可见的愈伤组织. T_3 愈伤组织移入修改的 MS 分化培养基上，培养 20—40 天后其上形成绿色小突起. 将绿色小突起移入不含任何植物激素的 MS 培养基 (MS_0) 上，约经 60—70 天绿色的突起发育形成短小而无叶的花梗，其上出现正常花蕾和透明的绿色花蕾(图版 I,5—9). 无叶的正常花蕾逐渐发育成一个具有正常形态和色泽的黄花(图版 I,5,6)，当它凋谢时，一朵新的花从其旁侧伸出，也不具有叶片，并能结籽 (试验 T 242，图版 I，7). 无叶的绿色透明的花芽转移到新鲜的 MS_0 培养基上，4—5 个月后大部分仍保持原状，其中仅有少数转变成不正常花，它们的柱头与雄蕊伸出花冠. 花茎很短，一般长 0.5—1.0 cm，个别 3.0 cm (图版 I，8,9). 除无叶花蕾之外，还有由绿色突起分化形成具有叶片的短花茎，其上着生正常的与透明的花蕾(表 2). 它们单生或丛生 (图版 I，10—12). 单生或丛生的透明绿色花蕾均未能开花.

表 2　T_3 叶肉原生质体发育形成的各种现蕾开花植株

试验代号	无叶正常花%	无叶不正常花%	有叶透明花蕾%	正常花蕾%	正常开花株%
T242	5.1	—	36.7	—	58.2
T257	—	—	60.0	40.0	—
T9228-5	—	28.4	8.1	37.8	25.7
T9228-1	—	45.2	14.3	21.4	19.0
T937	—	17.4	62.3	7.2	13.0

为了观察光照条件与培养基组成对形成花芽的影响，将原生质体、愈伤组织及绿色小突起分别置于不同培养基和不同光照长度下培养。培养基为 MS 和 NT，其中加有各种不同比例的生长素和细胞分裂素。试验的结果说明，原生质体、愈伤组织与绿色小突起培养时的光照长度，所用培养基的成分对正常与不正常花蕾形成的频率并无影响。

表 3　原生质体、愈伤组织、绿色突起培养在不同光照长度下与不同培养基成分对形成花芽的影响

培养状态			发育类型				
原生质体	愈伤组织	绿色突起	无叶花芽%	透明花芽%	正常花芽%	开花植株%	营养状态植株
NTD	BNL	24h	18.8	19.8	2.0	9.9	49.5
NTD	BIS	10h	3.7	7.4	3.7	0	85.2
NTD	BIL	10h	16.7	50.0	0	33.0	0
NTS	BNL	24h	51.4	13.5	8.1	10.8	16.2
NTL	BIL	24h	19.3	3.5	56.1	5.3	15.8
NTL	BIL	10h	2.6	0	28.2	5.1	64.1

NT——Nagata-Takebe 培养基 (1971 年)；
愈伤组织分化培养基——MS 培养基＋6BA ＋ NAA 或 IAA；
BI——6BA 2 mg/l，IAA 0.5 mg/l；
BN——6BA 1 mg/l，NAA 0.1 mg/l；
绿色突起培养基——MS 基本培养基 (MS_0)；
D——全黑暗，L——24h 光照，S——10h 光照.

3. 叶片外植体分化产生花芽。以叶片为外植体，在修改 MS 分化培养基上，直接诱导分化成小植株，借以与叶肉原生质体培养形成花芽的试验相比较。T_4 的叶片外植体仅形成愈伤组织，不能进一步发育成花芽或小植株，这与 T_4 叶肉原生质体培养的试验结果相一致。而 T_3 的叶片能再生成具有叶与花的正常植株。进一步的试验说明，花芽的分化与供体的发育阶段无关，也未显示出成花梯度。上部叶片形成开花植株为 14.3%，而下部叶片为 25.0% (表 4)。

表 4　黄花烟草 (T_3) 不同层次叶片培养后对花芽发育的影响

叶片部位	叶长(cm)	培养基	开花株%	透明株%	芽丛%	正常苗%
上层	5	BN	14.3	14.3	28.6	42.8
下层	10—12	BN	25.0	25.0	16.7	33.3

但是，T_3 叶片外植体培养的试验说明，并未出现无叶花。这与 T_3 叶肉原生质体培养试验的结果并不相同。

三、讨 论

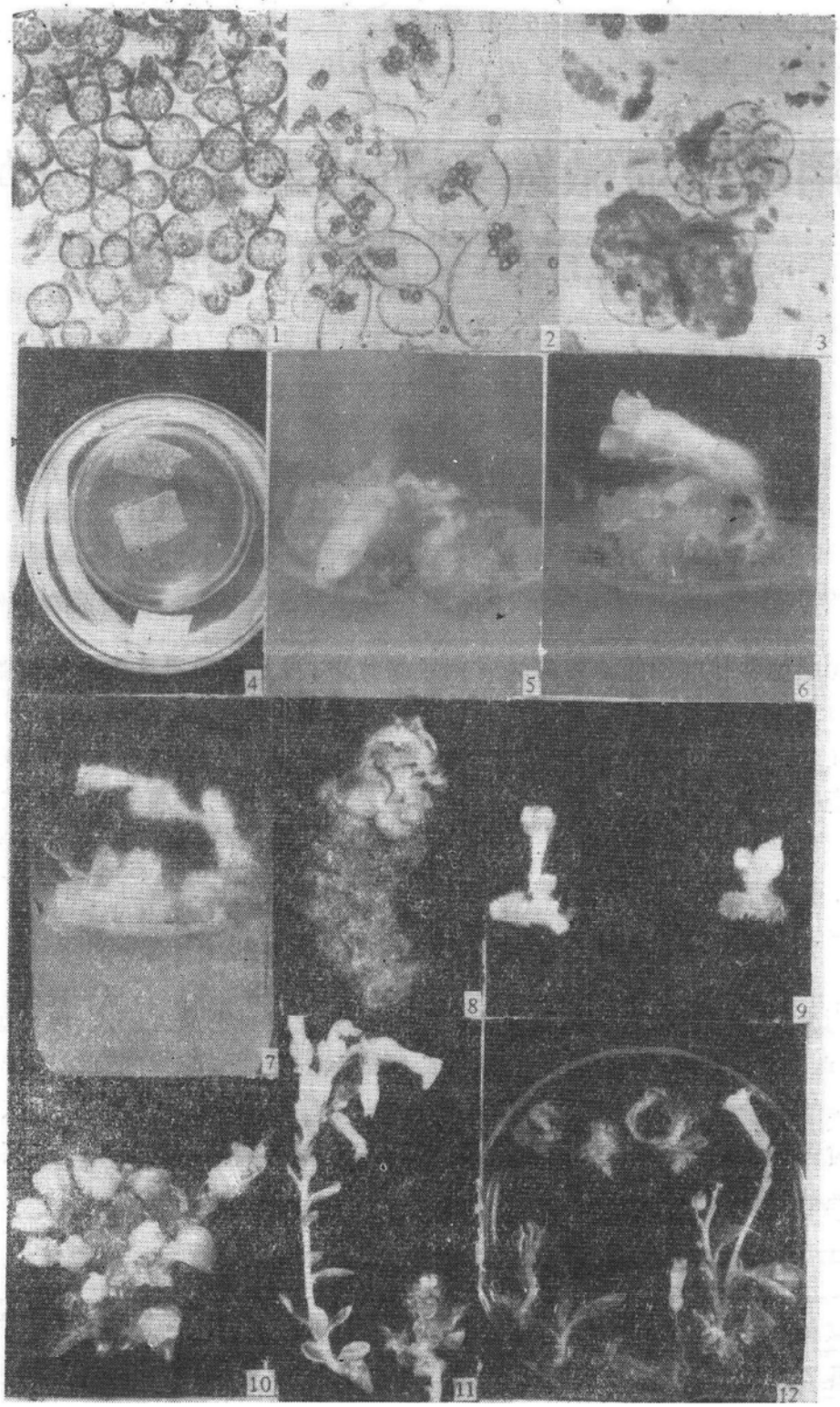
花器官的形成是由许多因素参与的复杂现象. 小麦和水稻需形成叶片后才能有幼穗的分化[4] Balder (1962 年)报道反曲兔丝子 (Cuscuta reflex) 茎尖培养时的光照长短是花茎分化的重要因素[2]. Nitsch 等 (1961 年)认为在紫花茉莉 (*Plumbago indica*. L) 的不具叶片的茎切段培养中, 因茎切段本身含有足够的光敏色素, 可以诱导开花[9]. 在我们用黄花烟草 (*N. rustica*)叶肉原生质体培养中,从愈伤组织直接产生正常的花与花蕾,而不需先形成茎与叶片. 进而,不论在愈伤组织或绿色突起阶段,以不同光周期处理, 对花芽的形成既无促进也无抑制的作用. 从这一试验结果说明,黄花烟草叶肉原生质体培养分化发育形成花器官,似与叶片及光照无关.

此外,在我们的试验中并未发现 Wardell 和 Skoog(1969 年)以及 Tran Van Thanh (1973 年)所报道的成花梯度 (floral gsadient) 现象. 这很可能是试验品种或由于我们采用的试验材料是叶肉原生质体的原因所致.

本文经罗士韦教授、许智宏副教授审阅,王玉琴同志参加部分工作,陈乃先、王六发同志协助摄影,特此致谢.

参 考 文 献

[1] Loo, S. W., *Amer. J. Bot.*, **33**(1946), 295—300.
[2] Bslder, B., *Ann. Bot.*, **26**(1962), 173.
[3] Choward, P., Aghion, D. C. R., *Acad. Sci.*, **252**(1961), 3864—3866.
[4] Kawata, S., *Proc. Japan Acad.*, **33**(1957), 474—476.
[5] Pierik, L. M., *Naturwiss*, **53**(1966), 45.
[6] Skoog, F., *Ann. Biol.*, **31**(1955), 1—11.
[7] Wardell, W. L. and Skoog. F., *Plant Physiology*, 44(1969), 1402—1406.
[8] Tran, Van Thanh. M., *Planta (Berl)*, **115**(1973), 87—96.
[9] Nitsch, C., Nitsch, J. P., *Planta*, **73**(1967), 355—370; **72**(1967), 371—384.
[10] Pierik, R. L. M., *Naturwiss*, **53**(1966), 387.
[11] Gill, A. R. et al., *Physiol. Plant*, 47(1979), 4—10.
[12] Li wem-an, et al., *Proceeding of Symposium on Plant Tissue Culture*, Peking, 1978, 32—334.
[13] Nagata, T. and Takebe, I., *Planta*, 99(1971), 12—20.
[14] Murashige, T. and Skoog, V., *Physiol Plant*, **15**(1962), 473—497.



1．黄花烟草（*N. rustica* L.）T_3 叶片游离产生的叶肉原生质体，2．叶肉原生质体培养 5—6 天后细胞分裂的状态，3．叶肉原生质体培养 14 天后形成细胞小团，4．叶肉原生质体衍生的细胞团在 NT 培养基上形成肉眼可见的愈伤组织，5．直接产生在愈伤组织上的无叶花蕾，6．从图 5 无叶正常花蕾生长形成的花朵，7．从图 6 显示无叶正常花朵凋萎后，旁侧又长出新的花蕾，8．无叶不正常花，雄蕊伸出花冠，花冠厚而短小，9．无叶不正常花蕾，未能在试管内开花，10．具有叶片的透明花蕾，11．在试管内生长的具有正常叶片和花茎的小植株，12．愈伤组织，芽丛和各种类型的小植株．