

猕猴桃与向日葵幼叶诱导无器官 分化愈伤组织的细胞学研究*

利容千 匡安秀 曾子申 刘立华

(武汉大学 生物系)

CYTOLOGICAL STUDIES ON CALLUS WITHOOT
ORGAN DIFFERENTIATION INDUCED FROM
YOUNG LEAVES IN *ACTINIDIA MELANAN-*
DRA VAR. *KWANGSIENSIS* AND *HELIANT-*
HUS AUNUS VAR. *LIAONING*

Li Rongqian Kuang Anxiu Zeng Zishen and Liu Lihua

(Department of Biology, Wuhan University)

提 要

本文通过扫描电镜和显微技术方法,观察了猕猴桃与向日葵幼叶诱导无器官分化愈伤组织的细胞结构,结果表明:这些细胞组织的特点,外表面都具凹凸不平,细胞松散,并高度液泡化;愈伤组织内部形成维管结节,外层长方形薄壁细胞向外作切向分裂,中央细胞逐步分化成管胞或导管,随着愈伤组织进一步生长,维管结节外围细胞向内层方向逐步分离解体;淀粉粒分布于结节周围的薄壁细胞,而结节本身的细胞无或很少淀粉积累。

前 言

从植物幼叶诱导愈伤组织再生植株成功,早已有很多报导^[4,5],但植物组织培养中常常有不少植物的外植体通过培养只能诱导愈伤组织而暂不能进一步器官分化^[2,3],这

本文于1983年8月2日收到。

*猕猴桃、向日葵材料,由中国科学院武汉植物研究所和中国农科院油料作物研究所提供,扫描电镜技术,由武汉病毒所、华南农学院协助,仅此一并致谢。张珞珍、陈艺香同志参加部分工作。

给组织培养中带来了很大的困难。因此,观察外植体诱导无器官分化的愈伤组织细胞的特点,对于分析愈伤组织不能再分化的原因,为进一步克服这些障碍,具有重要的理论和实践意义。

本文通过向日葵、猕猴桃幼叶诱导无器官分化的愈伤组织,应用扫描电镜、显微术和组织化学的方法,观察了其组织细胞结构的特点,为进一步解决愈伤组织再分化成器官和植株再生提供依据。

材 料 和 方 法

本实验以中国广西猕猴桃(*Actinidia melanandra* var. *kwangsiensis*)和辽宁向日葵(*Helianthus annuus* var. *liaoning*)为材料,分别培养在 $1/2$ MS+0.2mg/L NAA $1/2$ MS+0.5mg/L KT+2mg/L玉米素和N₆培养基上。接种后30天和20天内的愈伤组织,每天连续固定,经石蜡包埋和铁凡苏木精染色制成永久制片,组织化学方法,则以PAS反应进行淀粉粒积累的观察。

扫描电镜的观察,取无器官分化的愈伤组织(猕猴桃幼叶诱导的取能分化和无分化的愈伤组织两种作比较)经2.5%戊二醛固定,酒精逐级脱水,后用导电胶将材料贴于铜片上制成样品,在JEE-4B型真空旋转涂膜机中喷碳和黄金后在扫描电镜下观察拍摄记载。

以上研究方法,均以未处理前的幼叶作对照。

观 察 结 果

1. 愈伤组织细胞的外部形态

通过扫描电镜的观察,猕猴桃的对照叶片,表皮细胞形状有凹凸不平的皱纹,整个表面显得不规则,并可见明显的气孔(图版VII-1)。当愈伤组织形成时,表面层的细胞表现膨胀,仍然凸出不平(图版VII-2),这些愈伤组织继续生长,其表面由突出不平变成较为紧密的组织,呈现出大小不同的鳞片状,随后这种愈伤组织分化出根或芽(图版VII-3);另一种愈伤组织,生长一个月后仍无器官分化的趋势,外表面的细胞组织结构较为松散,凸起更为严重,有如岩洞般的结构(图版VII-4)。也有的愈伤组织部分介于两者之间。

在向日葵幼叶诱导愈伤组织,通过扫描电镜观察的结果,同样发现对照幼叶表皮细胞排列紧密,气孔较多,并长有多细胞毛;叶片经培养后,细胞组织变为较松散(图版VIII-1,2)随后,无器官分化的愈伤组织,细胞之间的排列特别松散,几乎处于游离的状态,像一个口袋一样(图版VIII-3),而用子叶培养的愈伤组织,尚有一种稍为紧密的愈伤组织,与前者差异不大(图版VIII-4),这些愈伤组织均无分化能力。

以上观察到猕猴桃、向日葵幼叶诱导无器官分化的愈伤组织外表面的特点,与王世施观察甘蔗幼叶诱导的松散愈伤组织表面的结果相类似⁽¹⁾。

2. 无器官分化的愈伤组织细胞结构

猕猴桃幼叶经 $\frac{1}{2}$ MS + 0.2mg/L NAA培养基培养后,其中有一种白色松散的愈伤组织无限度地生长,而不进行器官分化,有的形成呈圆形的维管组织结节,周围是排列整齐与形成层相似的近长方形细胞,不断向外作切向分裂,分化成多层薄壁细胞,成为一种呈辐射状排列(图版Ⅸ-1、2)。所有这些细胞,大都是核很小,细胞质稀薄的薄壁细胞组成,在这些细胞中,夹着有被苏木精染色较深的即将解体的细胞层(图版Ⅸ-3)。在维管结节的中央有维管组织的分化。常以导管或管胞出现(图版Ⅸ3、4)。有的从维管结节中的细胞进一步分化,细胞松散逐步解体。

在向日葵幼叶诱导的松散愈伤组织中,内部维管束形成多个细胞团,细胞团长大成球状或胚状,当生长到一定时期,细胞量到达一定的限度时,像猕猴桃幼叶一样形成维管结节(图版Ⅹ-1、2),结节的中央,有的分化为管胞,周围是类似形成层的扁平状细胞,不断向外产生薄壁细胞,形成松散的愈伤组织,有的随后也逐步分离解体(图版Ⅹ-2、3)。

3. 无器官分化愈伤组织的淀粉粒积累动态

猕猴桃幼叶诱导的无器官形成的愈伤组织中,整个维管结节组织的周围薄壁细胞密集着淀粉粒,而维管结节细胞层及中央已分化的细胞则无或很少淀粉粒分布(图版Ⅸ-4分)但在维管结节周围向外层薄壁细胞方向,淀粉粒的积累趋向小到大,由稀到密成梯度分布,分布较多的细胞,常常是聚合状态(图版Ⅸ-4、5、6),推测这是由于靠近维管组织的薄壁细胞的呼吸和代谢较强,向外逐渐减弱,因而淀粉积累逐步增多,颗粒变大的缘故。这是与细胞生理代谢强弱的状态相一致的。

在向日葵幼叶诱导的愈伤组织中,当细胞团块增大到一定的时候,才观察到靠切口部位大的细胞团块外围2—3层细胞,有较多淀粉粒积累;在中央的薄壁细胞,由于生长较旺盛,代谢较强,故无淀粉粒分布;而叶片内的小细胞团及其周围的薄壁细胞,都无淀粉粒的分布,并有部分细胞分离,(图版Ⅹ-4、6);在一些大的维管结节组织中,没有见到淀粉粒的分布,而周围有部分薄壁细胞与PAS反应呈紫红色,可能是胞壁逐步木质化走向解体的状态(图版Ⅹ-5)

讨 论

以上观察结果表明,无器官分化的愈伤组织的主要特点:开始时细胞表面不平展,随着愈伤组织的形成,组织量的增大,表面层的细胞愈来愈不平展,到后期突出地表现凹凸不平,细胞组织松散。向日葵的愈伤组织除以上特点外,细胞之间还表现出严重的分离,细胞本身高度液泡化,据Grant(1968)研究蚕豆两种根的愈伤组织指出,致密的愈伤组织比松散的类型有大量组成细胞壁的多糖,从而增加细胞的硬度,同时有较高的果胶质和半纤维素,有利于细胞粘连^[7]。因此,猕猴桃和向日葵幼叶诱导愈伤组织表现松散的特点,可能是由于愈伤组织细胞壁多糖较少,胞壁不能坚硬。致使细胞连接不紧密,细胞之间的壁失去粘合的能力;细胞也就缺乏必要的联系和物质运输的交流,因而得不到须要的养料供给,导致细胞不能进一步分化成器官的原因之一。

从愈伤组织内部细胞特点看来,通过维管结节,形成类似形成层细胞向外作切向分裂

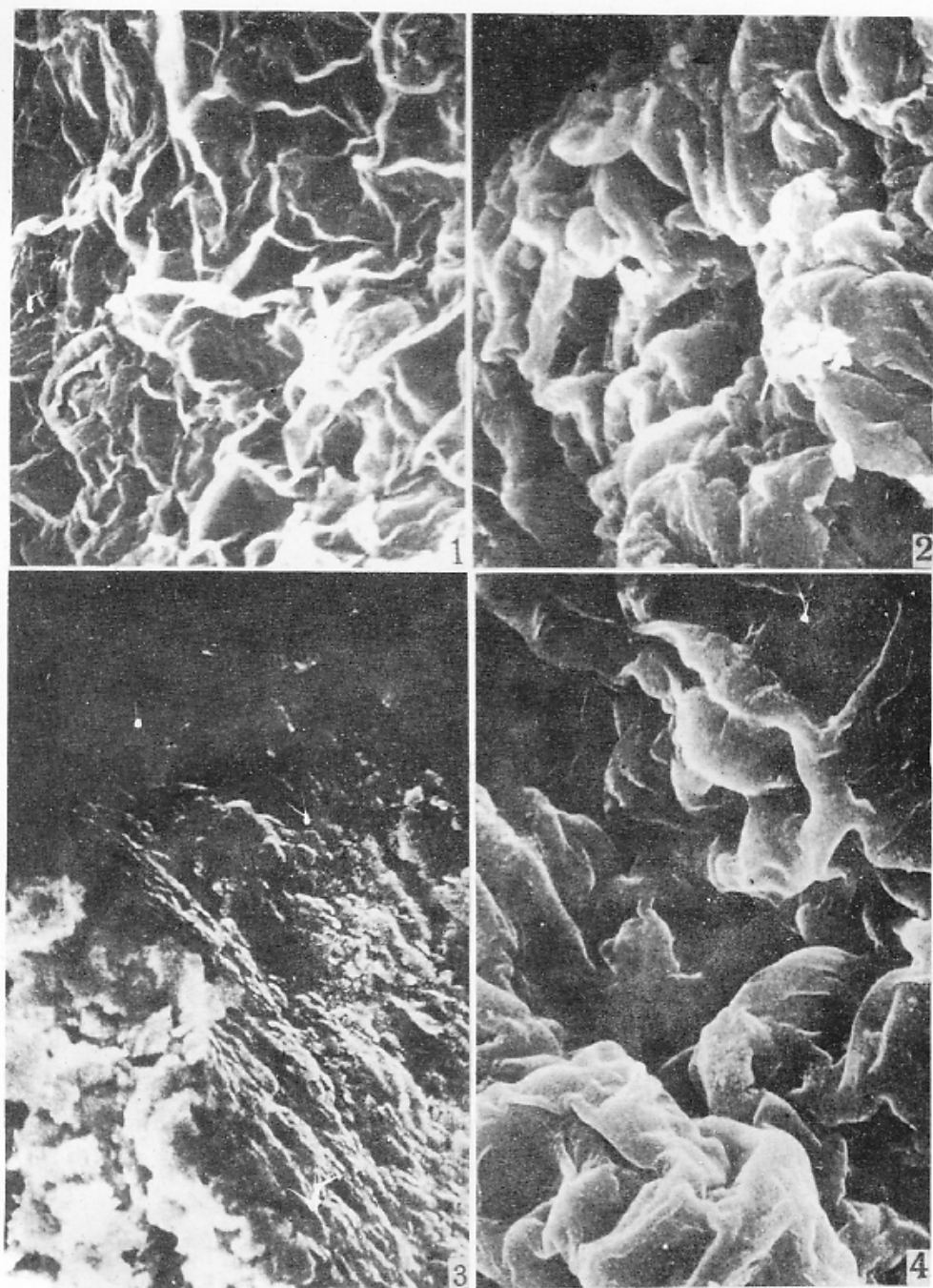
方式增加细胞数量,中央细胞先分化,外围细胞将逐步解体,淀粉的积累只分布于维管结节的外围细胞(有的维管结节不积累淀粉)随着愈伤组织生长和分化,淀粉粒也逐步解体,细胞也随之分离。这种不能进行器官分化的愈伤组织最主要的特点,外层细胞排列不整齐紧密,高度液泡化,无真正维管束结构的分化,后期缺乏淀粉积累(或不积累淀粉)作为能源供给,整个愈伤组织细胞逐步分离解体,这与能进行器官分化愈伤组织比较,在细胞的生长、分裂、分化方向和淀粉积累的特点上都有明显的区别,愈伤组织得不到正常的生长和发育,这也是造成无器官分化的重要原因。

无器官分化愈伤组织的异常形态结构,必然与其内部生理生化特殊的影响有关,根据Ross(1973)认为:器官发育是由于各种物质、包括生长调节剂和代谢物在特别部位的平衡^[9]。Thorpe(1973,1980)发现芽的形成期间,过氧化物酶和戊糖磷酸支路酶增加;在根形成期间,也有过氧化物酶增加,水解酶如 α -淀粉酶,酸性磷酸酶,过氧化氢酶等,形成芽的愈伤组织比没有芽形成区的更为丰富^[6]。也有人研究了外源激素不同的成分对器官分化起决定性作用^[10],不同种植物器官分化的能力不同与其遗传特性有关^[8],因此,无器官分化的愈伤组织细胞的特殊结构,与其内外因素环境条件、淀粉积累、呼吸代谢、各种酶类催化细胞内的物质合成和分解都有密切的关系,特别是激素的补充,使细胞内物质平衡尤为重要,所以,在诱导愈伤组织进一步促进器官分化时,内外因素和条件不能得到满足和协调,是导致无器官分化愈伤组织的细胞形态结构形成的根本原因。

至於对某些植物不能进行器官分化的具体途径和步骤及关键性问题,尚须从各方面包括生理生化、超微结构和分子水平上去探讨,才能从本质上得到比较完整的认识,进一步应用到实际中去。

参 考 文 献

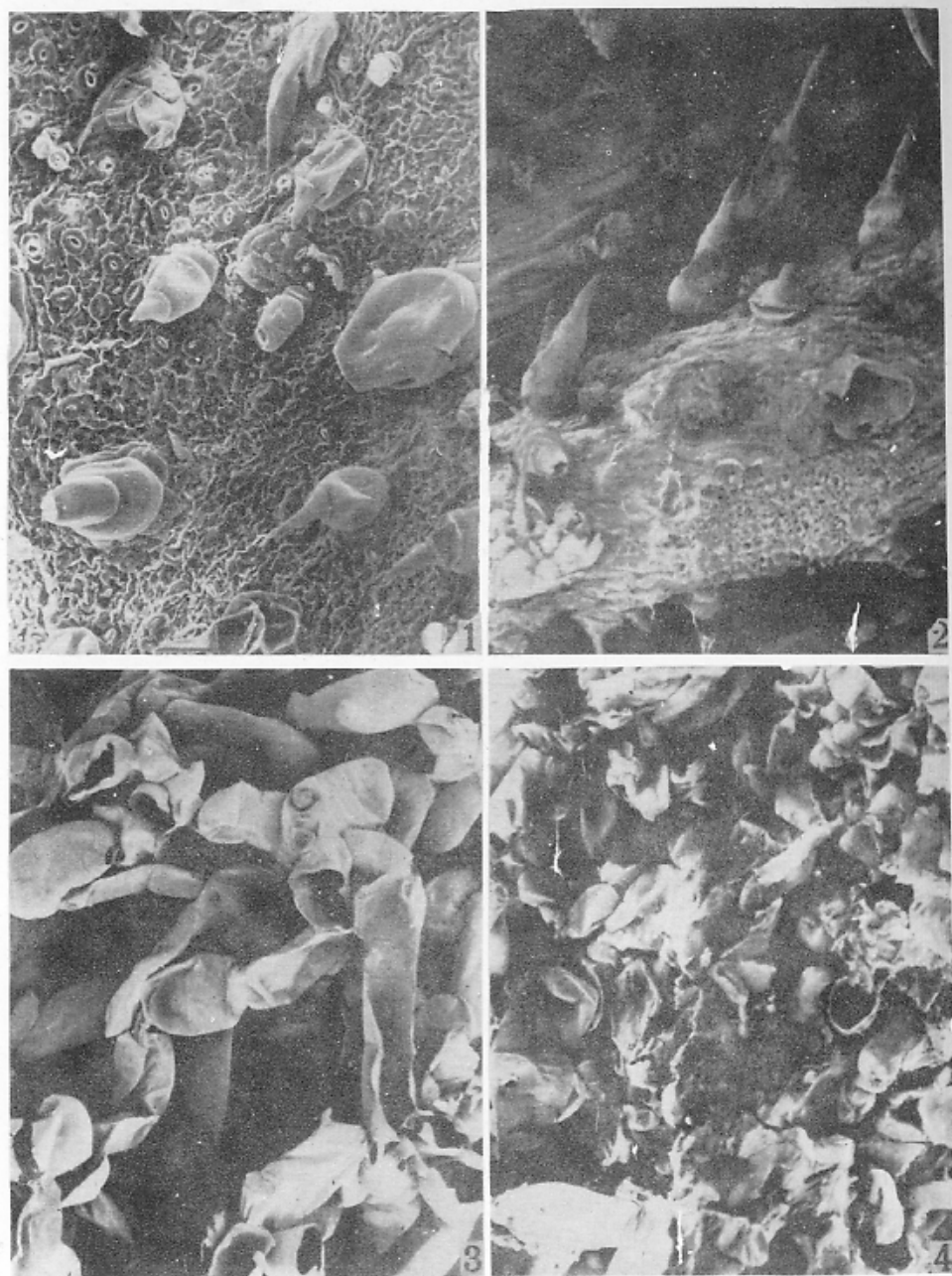
- (1) 王世施、郑玉梅, 1981: 甘蔗幼叶愈伤组织的诱导和组织学起源的初步研究. 华南农学院学报, 2(3), 33-35.
- (2) 利客千、刘立华、曾子申, 1981: 大麦叶鞘诱导愈伤组织的细胞学动态研究. 武汉大学学报(自然科学版), 4, 89-92.
- (3) 利客千、曾子申、刘立华, 1983: 向日葵幼叶诱导愈伤组织的细胞学研究(中国植物学会50周年年会论文摘要汇编).
- (4) 匡安秀、利客千, 1983: 猕猴桃幼叶再生植株的细胞组织学研究. 武汉大学学报(自然科学版), 3.
- (5) 罗士韦, 1978: 植物组织细胞培养研究工作进展. 植物生理学报, 4(1), 91-112.
- (6) Bonga, J. M. 1980: Plant propagation through tissue, emphasizing woody species. In "plant cell cultures, Results and perspectives" 253-261 Elsevier North holl and Biomedical press.
- (7) Grant, M. E. and K. W. Fuller, 1968: Tissue culture of root cells of *Vicia faba*. J. Exp. Bot., 19, 667-680.
- (8) Ohki, S., Bigot, C. and Mousseau, J., 1978: Analysis of shoot-forming capacity in vitro in two lines of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) and their hybrids. Plant and cell physiol., 19(1), 27-42.
- (9) Ross, Malcom K., Trevor, A. Thorpe and J. willian, 1973: Ultrastructural aspects of shoot initiation in tobacco callus cultres. Amer. J. Bot., 60(8), 788-795.
- (10) Sangwan, F. C. et al., 1975: Chemical regulation of callus growth, organogenesis, plant regeneration and somatic embryogenesis in *Artirrhinum majus* tissue and cell cultures. J. Exp. Bot., 26(5) 868-882.



图版 VII

在扫描电镜下猕猴桃愈伤组织的观察

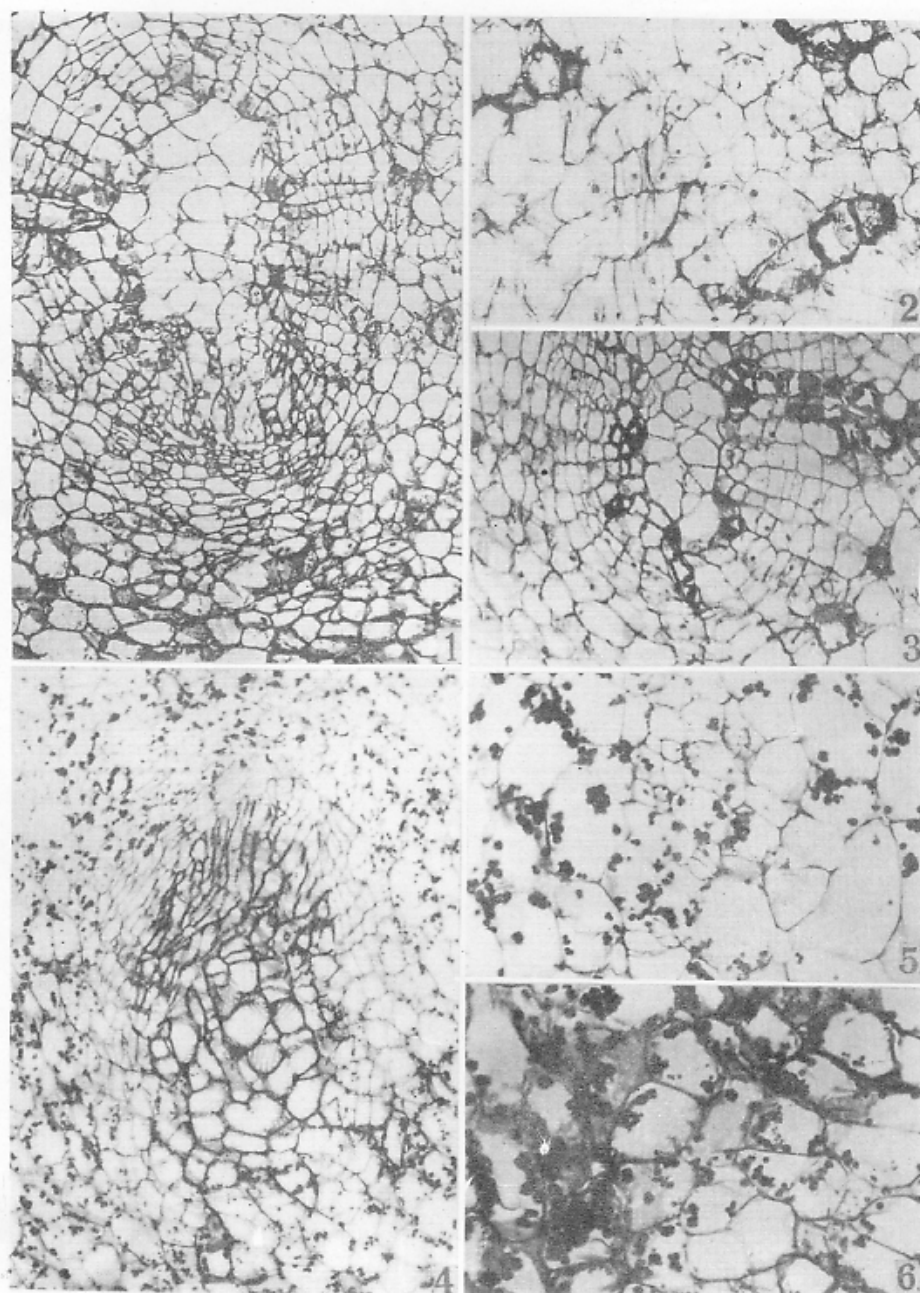
- | | |
|-------------------|--------|
| 1. 幼叶表皮细胞的表面观. | × 2000 |
| 2. 从幼叶诱导初期的愈伤组织. | × 2000 |
| 3. 能够进行器官分化的愈伤组织. | × 2000 |
| 4. 无器官分化的愈伤组织. | × 2000 |



图版VIII

在扫描电镜下向日葵伤愈组织的观察

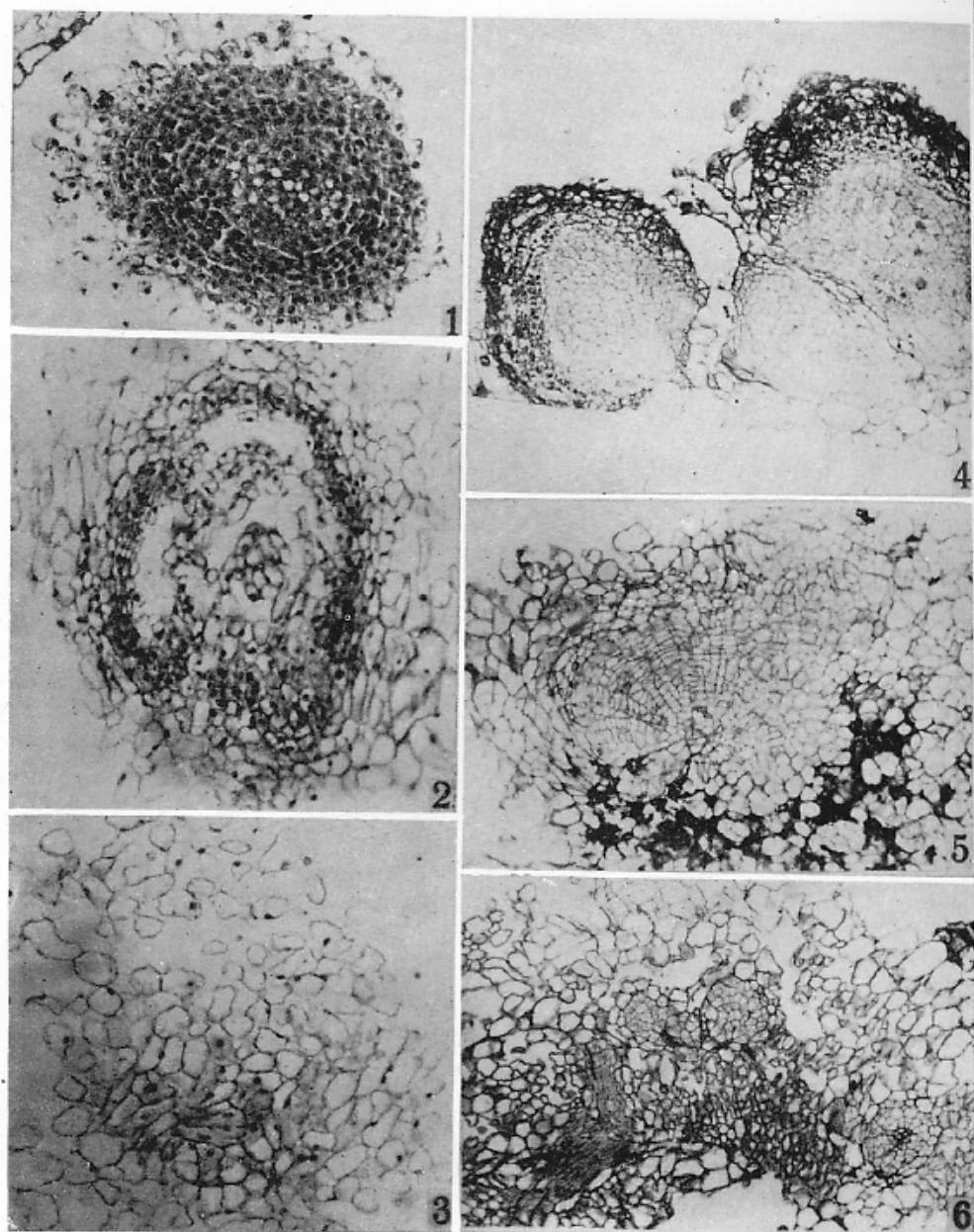
- | | |
|--------------------|-------|
| 1. 幼叶表皮细胞的表面观 | × 800 |
| 2. 培养 7 天的外植体 | × 600 |
| 3. 从幼叶诱导无器官分化的愈伤组织 | × 600 |
| 4. 从子叶诱导无器官分化的愈伤组织 | × 600 |



图版IX

在光学显微镜下猕猴桃愈伤组织结构的观察

- | | |
|-----------------------|--------|
| 1. 愈伤组织内部的维管组织结节 | × 460 |
| 2. 类似于形成层区的细胞分裂 | × 920 |
| 3. 维管组织结节一部分细胞解体 | × 460 |
| 4. 维管组织结节周围的薄壁细胞淀粉粒积累 | × 460 |
| 5. 6. 薄壁细胞中淀粉粒的聚集状态 | × 1480 |



图版X

在光学显微镜下向日葵愈伤组织结构观察

- | | |
|-------------------------|------|
| 1. 愈伤组织内部的维管组织结节 | ×230 |
| 2. 维管组织结节许多细胞分离 | ×230 |
| 3. 维管组织结节许多细胞分离 | ×230 |
| 4. 多细胞团外层淀粉粒积累 | ×230 |
| 5. 多细胞团无淀粉粒积累 | ×230 |
| 6. 维管组织结节一部分细胞解体 and 分离 | ×230 |