

几种生长调节物质及有机附加物 对菠萝愈伤组织分化影响的细胞学研究^{*}

肖 兵 梁元冈

(园艺系)

摘要 用菠萝 6—74 冠芽诱导愈伤组织。在愈伤组织分化过程中进行细胞学研究, 观察到菠萝愈伤组织中薄壁细胞随机脱分化形成胚性细胞, 胚性细胞经分裂形成两种分生组织即分生细胞团和分生组织结节, 它们可以进一步形成器官原基, 分化为芽、根。苄氨基嘌呤 (BA) 对愈伤组织芽的分化起决定性作用, 它刺激分生细胞团产生单向极性生长形成芽原基。萘乙酸 (NAA) 则对根的分化起决定作用。玉米素 (ZT) 在有 BA 和 NAA 的存在下加速了细胞型分裂和分生组织向芽原基的分化。水解乳蛋白 (LH) 促进芽的分化, 但却抑制维管组织结节向根的转化。酵母提取液 (YE) 则对两种分生组织的进一步分化都有抑制作用。

关键词 生长调节物质; 菠萝愈伤组织; 脱分化; 分生组织; 胚性细胞

菠萝是热带亚热带 4 大水果之一, 其组织培养研究始于本世纪 70 年代初。关于菠萝愈伤组织分化条件的研究已有不少报导, 但多限于观察外源化学物质和其他处理对其形态发生和组织分化的效应。在细胞学上, 只张海峰^[4]初步观察到 4 个阶段, 他与王凯基^[1]在油橄榄以及烟草^[3]、猕猴桃^[5]、番茄等愈伤组织的分化和器官发生的细胞学研究基本一致。即: 愈伤组织类的薄壁细胞随机脱分化形成胚性细胞; 胚性细胞不断分裂产生分生细胞团和分生组织结节两种分生组织; 它们在接受某种性质和一定方向刺激下, 单向极性生长形成芽或根原基; 进一步分化成芽或根。然而愈伤组织中虽然存在上述两种分生组织, 但不一定都能分化成为两种器官, 这一方面决定于至今还不太清楚的因素, 即某种性质和一定方向的刺激的要求是否得到满足, 另一方面是某些类型的分生组织不一定都能正常分化为器官。本文利用菠萝冠芽诱导的愈伤组织作试验材料, 在不同生长调节物质和有机物的影响下, 通过细胞学研究来了解生长调节物质对菠萝愈伤组织中两种原基产生的影响, 以掌握分化条件, 达到调节和控制器官分化过程以及提高分化频率的目的。同时了解愈伤组织中两种分生组织与器官发生的关系, 为植物器官形态建成的基础研究积累资料。

1 材料与方 法

用菠萝 [*Ananas Comosus* (L.) Merr.] 杂交种 6—74 的冠芽作外植体; 接种于 MS 基本培养基 (含 0.7% 琼脂、3% 蔗糖和 0.5% 活性炭) 附加 2, 4-D 2.0 mg/L、KT 1.0 mg/L、NAA 1.0 mg/L 上诱导愈伤组织。切取大小一致愈伤组织块 (1 cm²) 分别接种于下列培养基上: MS 基本培养基附加 (1) BA_{2.0}+NAA_{2.0}, (2) BA_{2.0}, (3) NAA_{2.0}, (4) BA_{2.0}+NAA_{2.0}+ZT_{2.0}, (5) BA_{2.0}+NAA_{2.0}+LH₅₀₀, (6) BA_{2.0}+NAA_{2.0}+YE₇₅₀, 各 210 管。光照 1 500~2 000 Lx 12~16 h, 温度 25~27℃ 条件下培养。3 天后开始取材固定包埋, 每隔 3 天一次共 13 次, 每次 6 管。50% FAA 固定, 常规石蜡包埋切片, 厚 10 μm, 番红固绿染色。每个处理观察 20

• 第一作者硕士论文的一部分

1990—11—02 收稿

片,选典型片子显微拍照。

2 结果与分析

2.1 几种激素组合对菠萝愈伤组织分化影响的细胞学观察

试验了4种激素组合,它们对愈伤组织分化的影响如下表。

表1 不同激素组合对愈伤组织分化的影响

MS+0.7%琼脂+3%蔗糖+0.5%活性炭				
处理序号	(1)	(2)	(3)	(4)
激素组合	BA _{2.0} +NAA _{1.0}	BA _{2.0}	NAA _{1.0}	BA _{1.0} +NAA _{2.0} +ZT _{2.0}
分化状态	形成芽、根、成苗	只分化出芽	只见少许根	形成芽、根、成苗
统计数(管)	130	120	130	120
分化数(管)	91	72	39	102
分化率	70%	60%	30%	85%
时间(天)	38	38	38	32

2.1.1 胚性细胞的产生 愈伤组织接种一周后,外部见其迅速生长,不断增生。在这不断增生过程中,通过细胞学观察到培养体内出现以薄壁细胞为主的结构。在培养第6天,可以看到一些薄壁细胞脱分化形成无液泡、细胞质稠密、细胞核大而圆整且移向中央的胚性细胞(图版1,2)。4种组合的切片中都观察到胚性细胞的形成,分布在愈伤组织的内部或表层,有的切片多有的少。

2.1.2 两种分生组织的产生 胚性细胞具有分生细胞的性质,观察到它以细胞型及核型两种分裂方式产生两种分生组织即分生细胞团和分生组织结节,随后进一步分化为芽和根两器官原基。(1)细胞型分裂:核分裂和胞质分裂同时进行产生2个子细胞(图版3,4)。培养的第6天和第9天均可看见,由它继续分裂形成了无一定结构的散生分生细胞团(图版5),这种细胞团进一步分裂形成分化器官的分生细胞团(也叫生长中心)(图版6)。分生细胞团在有ZT_{2.0}的(4)组合中第15天就可观察到(20块片中有17块能看到),而其他无ZT的3个组合则要在第18~21天才能观察到。可见ZT能促进和加速细胞分裂及分生细胞团的产生。(2)核型分裂:胚性细胞先核分裂再胞质分裂(图版7,8),其子细胞进行平周分裂分化为长形的形成层状细胞,进一步分化成维管束状结构即分生组织结节(图版9),4组合中均可见其产生于第15~18天,但进一步发展却有所不同,在含有NAA的所有组合中均见其进一步分化形成具有一定结构的维管组织结节(图版10),而在只有BA无NAA或ZT的(2)组合中分生组织结节只向外增生,其细胞分化为薄壁细胞参加到长成的愈伤组织中去,不见其进一步分化。

观察到两种分生组织的同时,还可看到一些由薄壁细胞分化而来的导管或管胞(图版11),这些导管和管胞没有发生进一步的变化。

2.1.3 器官原基和根、芽的产生 两种分生组织在一定条件刺激影响下具有单向极性而向根和芽分化。

芽的产生:在具有BA的(1)(2)(4)三组合中均观察到愈伤组织近表层或内层的分生细胞团由于产生单向极性生长而进行旺盛的细胞分裂,分生细胞逐步增加并向外扩展形成苗端分生组织(图版12),其进一步分化为芽原基而形成芽和叶(图版13~15)。上述3

组合中均有较高的芽形成率。而只有 NAA 的 (3) 组合中不见芽的形成, 只见其愈伤组织向外生长。因此知没有细胞分裂素 BA, 分生细胞团不产生单向极性生长, BA 对分生细胞团的进一步分化具有重要影响。

根的产生: 观察到维管组织结节也具有单向极性, 由其外围局部形成层状细胞旺盛分裂使维管组织结节在某一方向迅速生长, 进而形成根原基和根 (图版 16~18)。具有 NAA 的 (1) (3) (4) 组合中均见根的形成, 说明 NAA 具有诱导根产生的作用。只有单纯的 BA 的 (2) 组合中因分生组织结节只向外生长没转化为维管组织结节, 也不见根的产生。根的起源与维管组织结节密切相关。

2.2 LH、YE 对愈伤组织分化影响的细胞学研究

在分别具有 LH 及 YE 的 (5) (6) 组合中均观察到胚性细胞的产生, 且都能进一步分裂形成两种分生组织, 但在有 LH 的 (5) 组合中看到 LH 加速了胚性细胞的分裂和分生细胞团的单向极性生长, 第 18 天就产生苗端分生组织, 起到与 ZT 对愈伤组织分化影响的类似作用, 与 ZT 不同的是切片中并不见根原基的形成, 可见 LH 抑制了分生组织结节和根原基的转化。在具 YE 的 (6) 组合中芽、根均未见产生, 也不见愈伤组织的生长。从外部形态来看, 多数变褐枯干, 可见 YE 抑制了愈伤组织生长和分化。

归纳上述菠萝愈伤组织分化过程及几种生长调节物质、有机物 (LH、YE) 对愈伤组织分化的影响, 结果如附图。

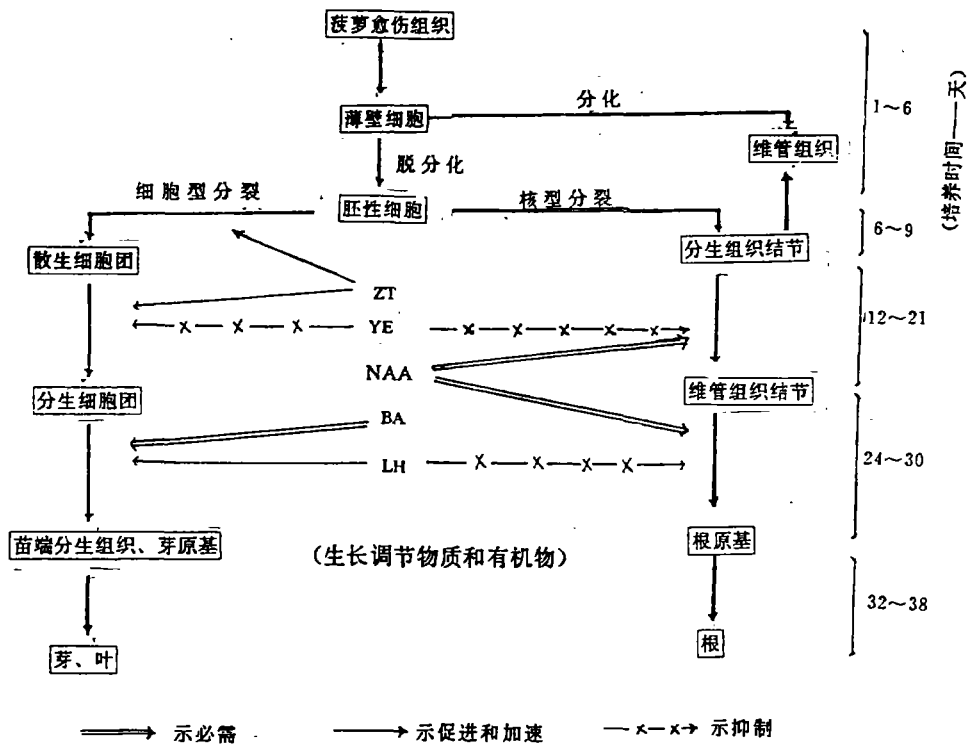


图1 菠萝愈伤组织分化的过程及生长调节物质与有机物的影响

3 讨论

3.1 从愈伤组织到器官分化的进程

有关两种分生组织在愈伤组织中产生和发展已有不少报导^[1,2,3,8],人们对两种分生组织的起源和进一步发育的看法已基本趋于一致。本文通过细胞学手段研究了菠萝愈伤组织到器官形成的系列脱分化和分化过程。证实了它与前人在油橄榄、番茄、烟草上的研究报导大体一致。

3.2 生长调节物质、有机物对愈伤组织分化影响的分析

愈伤组织到器官分化的过程虽基本清楚,但人们对于揭示愈伤组织再分化和分生组织进一步发育及其单向极性生长产生器官原基和器官与内、外条件之关联还缺乏研究。王凯基等指出愈伤组织中虽有两种分生组织存在,却不一定都能继续分化为两种器官,决定的因素是它们继续分化所需的综合条件是否能得到满足。本文在有关生长调节物质、有机物及有关条件影响愈伤组织分化的研究上有着可喜的进展。

3.2.1 由细胞观察结果可知,BA对分生细胞团的进一步分化起决定作用,它刺激分生细胞团的单向极性生长形成芽原基。无BA存在时,尽管愈伤组织中有分生细胞团存在,也不见芽原基的分化。NAA则诱导分生组织结节向维管组织结节转化并刺激其单向极性生长而进一步形成根原基和根。

3.2.2 激素ZT在具有BA和NAA存在下,起着加速细胞分裂和使分生组织向芽原基分化的作用,ZT还提高了绿苗分化率。烟草上也有ZT促进芽形成的报道。

3.2.3 胚性细胞是薄壁细胞随机脱分化而形成的,试验看不到激素对胚性细胞产生的明显影响。只有在有ZT时观察到分生细胞团早于其他组织形成,这可能是ZT加速了胚性细胞的细胞分裂。NAA、BA均不见对胚性细胞分裂的影响。

3.2.4 有机物LH、YE对菠萝愈伤组织分化的影响不同。Kyowakasa等报道过有机物不利于菠萝愈伤组织分化,在烟草上则表明LH对愈伤组织芽的分化起促进作用。本文结果表明,LH能促进并加速菠萝愈伤组织分生细胞团向芽分化,却抑制维管组织结节向根原基转化。YE则不利于菠萝愈伤组织中两种分生组织向器官原基转化。由此知,菠萝愈伤组织分化对有机物有较强的选择性,LH应用于菠萝愈伤组织芽的分化,利于加速其增殖。

目前对根原基起源于维管组织结节,芽起源于分生细胞团的看法基本一致。然而,王凯基从南蛇藤、红杉中观察到芽的再生与维管组织结节有一定关联。本文未见这种联系,当然这与树种及其特性、外界条件、激素的相互作用都有关。总之,尽管我们发现生长调节物质和有机物LH对菠萝愈伤组织分化起着极其重要的作用,但进一步研究生长调节物质和有机物在分化中的相关关系在当前还存在很大困难,因为生长调节物质和有机物的作用机理目前研究还很不够,加上分化过程特别是形态发生过程包括了极其复杂和多样的生理生化变化。本文只在细胞水平上研究了几种生长调节物质(激素)和有机物对菠萝愈伤组织分化过程的影响和提出了一些理论性推导。要全面和具体了解激素和有机物在分化中的作用还有待于我们(结合内源激素及其他因子)在分子水平上进一步深入地研究。

参 考 文 献

- 1 王凯基. 油橄榄组织培养的细胞组织学研究. 1 愈伤组织建成. 植物学报, 1979, 21 (2): 127~133
I. 组织分化和器官发生. 植物学报, 1979, 21 (3): 225~230
- 2 王凯基等. 几种木本植物组织培养的愈伤组织形成和器官再生. 植物学报, 1981, 23 (2): 97~103
- 3 许智宏等. 烟草叶组培中愈伤组织和芽形成的细胞学观察. 植物学报, 1980, 22 (1): 1~5
- 4 张海峰. 菠萝愈伤组织生长分化细胞学研究, [学位论文]. 广州: 华南农业大学园艺系, 1989
- 5 桂耀林等. 猕猴桃离体茎段形态发生的组织学和组织化学的研究. 植物学报, 1982, 24 (4): 301~306
- 6 莫元令. 植物细胞的全能性与细胞分化. 遗传学报, 1978, 5 (2): 167~170
- 7 崔激. 植物激素与细胞分化及形态发生的关系. 细胞生物学杂志, 1983, 5 (2): 1~6
- 8 Kyowakasa, et al. Variation in the plants differentiation from the tissue culture of pine apple. Japan J Breed, 1979, 29 (1): 13~22
- 9 Sterting C. Origin of buds in tobacco stem segments cultured in vitro. Amer J Bot, 1951, 38: 761~767
- 10 Thorpe T A and Murashige T. Some histochemical change underlying shoot initiation in tobacco callus cultures. Can J Bot, 1970, 48: 277~285
- 11 Yeoman M M, et al. Growth and differentiation of plant tissue cultures. Ann. Bot, 1968, 32: 301~313
- 12 Zee S T, et al. Morphogenesis of the hypocotyl explants of Chinenis Kale. Z ptianzenphy siol, 1978, 90: 155~163

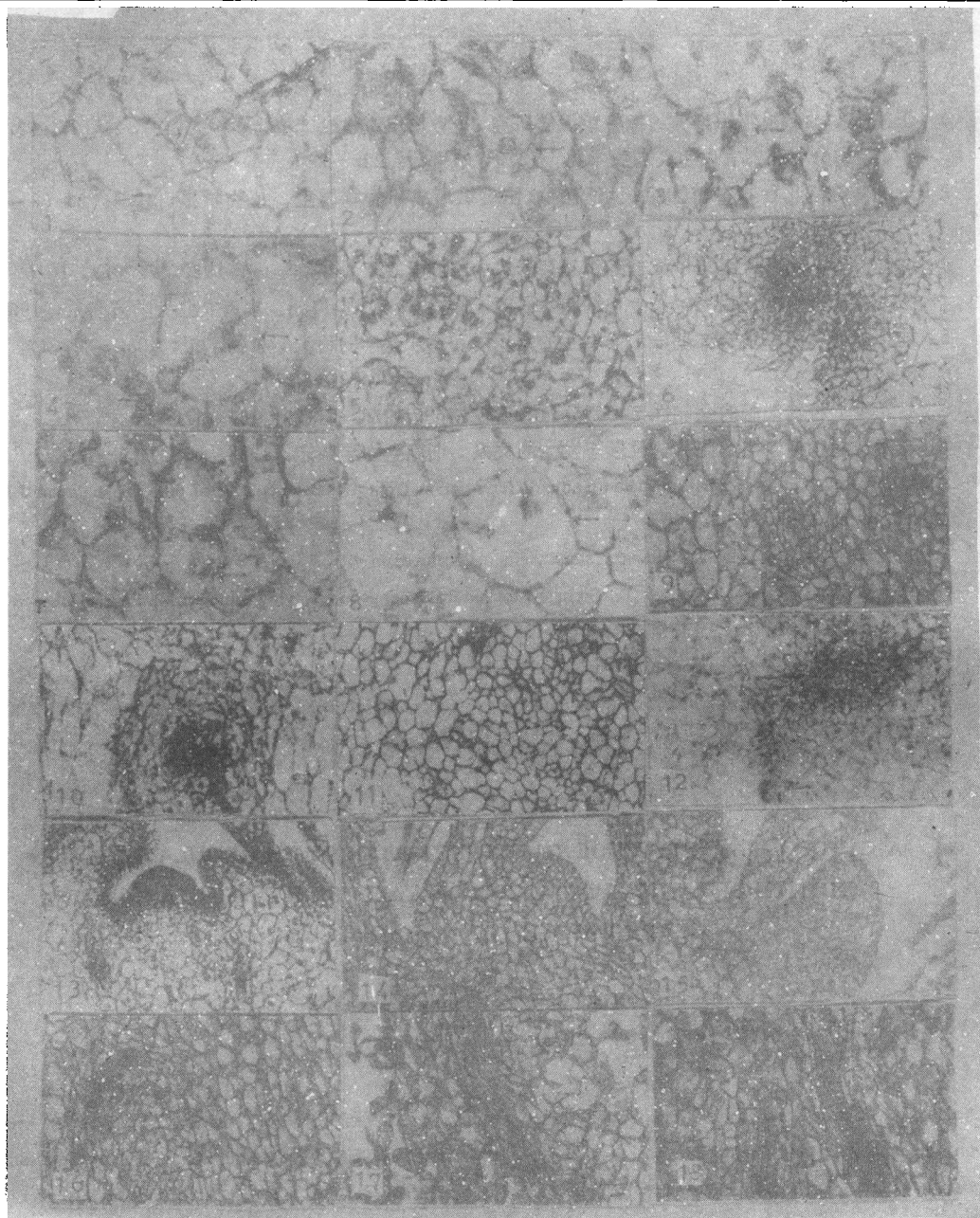
**A CYTOLOGICAL STUDY OF THE EFFECT OF GROWTH REGULATORS AND
ADDITIVE ORGANIC SUBSTANCES ON CALLUS DIFFERENTIATION OF
THE PINEAPPLE (*Ananas comosus* Merr.)**

Xiao Bing Liang Yuangang

(Department of Horticulture)

Abstract Cytological observations showed that random dedifferentiation of parenchymatous cells produced embryogenic cells and then gave rise to two types of meristems. They were meristematic cell aggregations and meristematic nodules, which might further form organs primordia. BA had a determinative effect on bud differentiation of the callus, initiating growth showing meristematic monopolarity leading to bud primordium formation. NAA had a important effect on root differentiation. With NAA and BA, ZT accelerated cell division and organ primordium rormation. LH accelerated bud differentiation but inhibited root formation from vascular nodules. And YE restrained further differentiation of both meristems.

Key words Growth regulator; Pineapple callus; Dedifferentiation; Meristem; Embryogenic cell



图版 1, 2 示胚性细胞 (5×40 放大) ($\rightarrow$ 示胚性细胞); 3, 4 示胚性细胞的细胞型分裂 (5×40 放大) ($\rightarrow$ 示分裂细胞); 5 示散生分生细胞团 (5×20 放大); 6 示分生细胞团 (又叫生长中心) (5×20 放大); 7, 8 示胚性细胞的核型分裂 (5×40 放大), ($\rightarrow$ 示分裂细胞); 9 示分生组织结节 (5×20 放大); 10 示维管组织结节 (5×20 放大); 11 示薄壁细胞分化的导管和管胞 (5×20 放大); 12 示苗端分生组织 (5×10 放大); 13, 14, 15 示芽原基、芽、叶 (5×10 放大); 16, 17, 18 示根原基、根 (5×10 放大)