

甘蔗幼叶愈伤组织的诱导 和组织学起源的初步研究*

王世旌 郑玉梅

(基础部)

摘要

在附加有 $2, 4-D 3\text{mg}/\text{l}$ 并将蔗糖用量提高至 $5\text{g}/\text{l}$ 以及 $2, 4-D 5\text{mg}/\text{l}$ 、精氨酸 $5\text{mg}/\text{l}$ 和蔗糖为 $25\text{g}/\text{l}$ 的两种MS培养基上，两个品种的甘蔗幼叶的切段，经4—21天的无菌培养后，有90%以上的外植体产生了愈伤组织。石蜡切片观察表明，愈伤组织是由维管束鞘薄壁细胞分裂而来。用扫描电镜对比观察了密实和松散易碎的两类愈伤组织，后者有大的胞间隙，前者则无。

甘蔗的组织培养始于1961年，L.G.Nickell在1964年报道：在离体的甘蔗茎尖薄壁组织的培养中，获得了首块愈伤组织^[5]。随后，Heinz and Mee以及Barba and Nickell都在1969年分别报道了他们各自从离体培养获得的愈伤组织中诱导出完整的甘蔗小植株^{[2][1]}。1974年，我国台湾糖业研究所Liu Ming-Chin and Chen Wen-Huei报道了甘蔗愈伤组织中小植株分化的起源和过程的组织学研究^[3]。1978年H.M.Nadar等人报道了甘蔗愈伤组织的显微结构和生长素对胚胎发生的作用^[4]。从以上的报导看来，对于愈伤组织是从外植体的哪些组织的细胞产生的？还没有报道过。本文报道我们对此问题的初步研究结果。

材 料 和 方 法

供试品种为本院农场大田生长的台糖134和华南5612等两个品种。取材时择1公尺高的分蘖，剥除外层老叶，留3—4环幼叶，截取15cm长的端部，先用95%乙醇浸没

* 本文承厦门大学汪德耀教授和华南植物研究所俞诚鸿副所长审阅，扫描电镜观察及拍照，由本院电镜室孔宪扬同志协助进行，谨此致谢！

材料3分钟以赶除气泡；然后用无菌水冲洗3次，浸入0.1%升汞液15分钟灭菌；再用无菌水冲洗3次以清除升汞。此后，置材料于培养皿中，用解剖刀横切幼叶为3mm的小段，即可供接种用。在每一50ml培养瓶中，接种两段。以上操作，从升汞灭菌开始，均在无菌条件下进行。

基本培养基依Murashige and Skoog, 1962(简称MS)，作了如下修改：MSI—附加2, 4-D^{0.05}mg/l, 蔗糖提高至5.0g/l; MSII—附加2, 4-D^{0.05}mg/l、精氨酸^{0.5}mg/l、蔗糖为^{2.5}g/l，铁盐较原方提高 $\frac{1}{3}$ 用量。pH调整为5.8，经常规热压灭菌后备用。

组织切片按常规石蜡制片法进行，固定液为FAA或Navashin's两种。于接种后次日开始，定期取材固定。乙醇脱水。切片厚度为8—10微米，除纵、横切外，尚作平皮切(Paradermal section)。海氏苏木精或番红和固绿染色。中性树胶封藏。

扫描电镜观察所用愈伤组织，未经任何处理，直接观察水湿样品，取适当大小的愈伤组织，用导电树胶粘贴于铜样品台上，用JEOL JSM-25S扫描电镜进行观察和摄影。

结 果

(一)、诱导愈伤组织所需时间及频率

根据从1979年12月上旬至1980年8月的3次重复接种材料所见到的情况，综合如下表：

培养基	MS I					MS II				
	品 种	台 糖 134		华 南 5612		台 糖 134	华 南 5612		天 数	频 率 (%)
肉 眼 可 见		天 数	频 率 (%)	天 数	频 率 (%)		天 数	频 率 (%)		
接 种 日期	79.12.10.	7—21	100	7—21	100	7—13	100	/	/	/
	80.4.25.	7—21	90	7—18	100	5—21	100	7—21	71.5	
	80.8.15.	5—7	100	4—6	100	4—6	100	4—6	75.0	

据表可见，在我们的试验条件下，这两个品种的幼叶，在接种后4—21天内即可诱导出愈伤组织，诱导频率总平均达92%。

(二)愈伤组织的起源

根据石蜡切片，愈伤组织不仅出现于外植体切段的两个横切面的切口处(图2、3、6)，也可在外植体切段的表面上发生(图4、5、7)。

幼叶接种后2—3天，凡能产生愈伤组织者，其切口表面呈液状，横切面的面积逐日变宽，约一星期后，已有50%的外植体，用肉眼可见淡黄—无色的愈伤组织，突出于切面外表。在有些外植体中，于切口处产生愈伤组织的同时，其整个叶表面，可见若干星散分布的无色或紫色隆起，逐渐增大而向外突破外植体的表皮。

从石蜡制片(图7—9)判断，不论是叶片或叶鞘，愈伤组织的发生，都和维管束鞘

密切相关。由图11可见，经培养3—5天后的外植体，部分维管束鞘薄壁细胞，即恢复分裂潜能，开始进行分裂，产生愈伤组织。其分裂方式，或为无丝分裂（图8），或为有丝分裂（图9），两种分裂方式都可见。由图7可见，刚产生的愈伤组织，其细胞体积小、排列紧密，细胞核大，细胞质浓而着色深。分裂继续进行，愈伤组织团块的细胞数目增多，突破其外方的外植体的其它组织的细胞，成为肉眼可见的愈伤组织块。

（三）愈伤组织的形态

甘蔗幼叶的愈伤组织，和多种经过研究的植物愈伤组织一样，按其物理性状，可分为密实的和松散易碎的两类。对这两类愈伤组织的外表，我们用扫描电镜进行了观察。从图13和14对比，明显可见，密实的愈伤组织，细胞排列紧密；而松散易碎的愈伤组织，细胞排列疏松，有多而大的胞间隙。

讨 论 和 结 论

（一）甘蔗离体幼叶的切段经无菌培养4—21天后，其愈伤组织的诱导频率达90%以上。因此我们认为取其愈伤组织的细胞进行单细胞培养，供研究细胞分化用，从取材上讲是可行的。此外，由于其诱导频率高，故可作为我国南方的高等农业院校开设植物组织培养课程的实验材料。

（二）明确了愈伤组织是由维管束鞘薄壁细胞经有丝分裂或无丝分裂而来，在甘蔗这种作物中，国内、外尚未见报道。这些细胞的脱分化和分裂过程的变化，有待进一步研究。

（三）采用MS基本培养基时，附加 $2,4-\text{D}^{\text{mg}}/l$ ，并将蔗糖用量提高至 $5.0\text{g}/l$ 即可。对诱导愈伤组织而言，精氨酸并非不可少的。

参 考 文 献

- [1] Barba,R.and L.G.Nickell,1969: Nutrition and organ differentiation in tissue cultures of sugarcane, a monocotyledon. *Planta(Berlin)*. 89:299-302.
- [2] Heinz,D.J.and G.W.P.Mee,1969: Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. *Crop Sci.*9: 346-348.
- [3] Liu Ming-Chin and Chen Wen-Huei,1974: Histological studies on the origin and process of plantlet differentiation in sugarcane callus mass. *Proc ISSCT* 15: 118-129.
- [4] Nardar,H.M.et al.,1978: Fine structure of sugarcane(*Saccharum* sp.)callus and the role of auxine in embryogenesis. *Crop sci.*18: 210-216.
- [5] Nickell,L.G.,1964: Tissue and cell cultures of sugarcane another research tool. *Hawaii Planters' Rec.*57: 223-229.

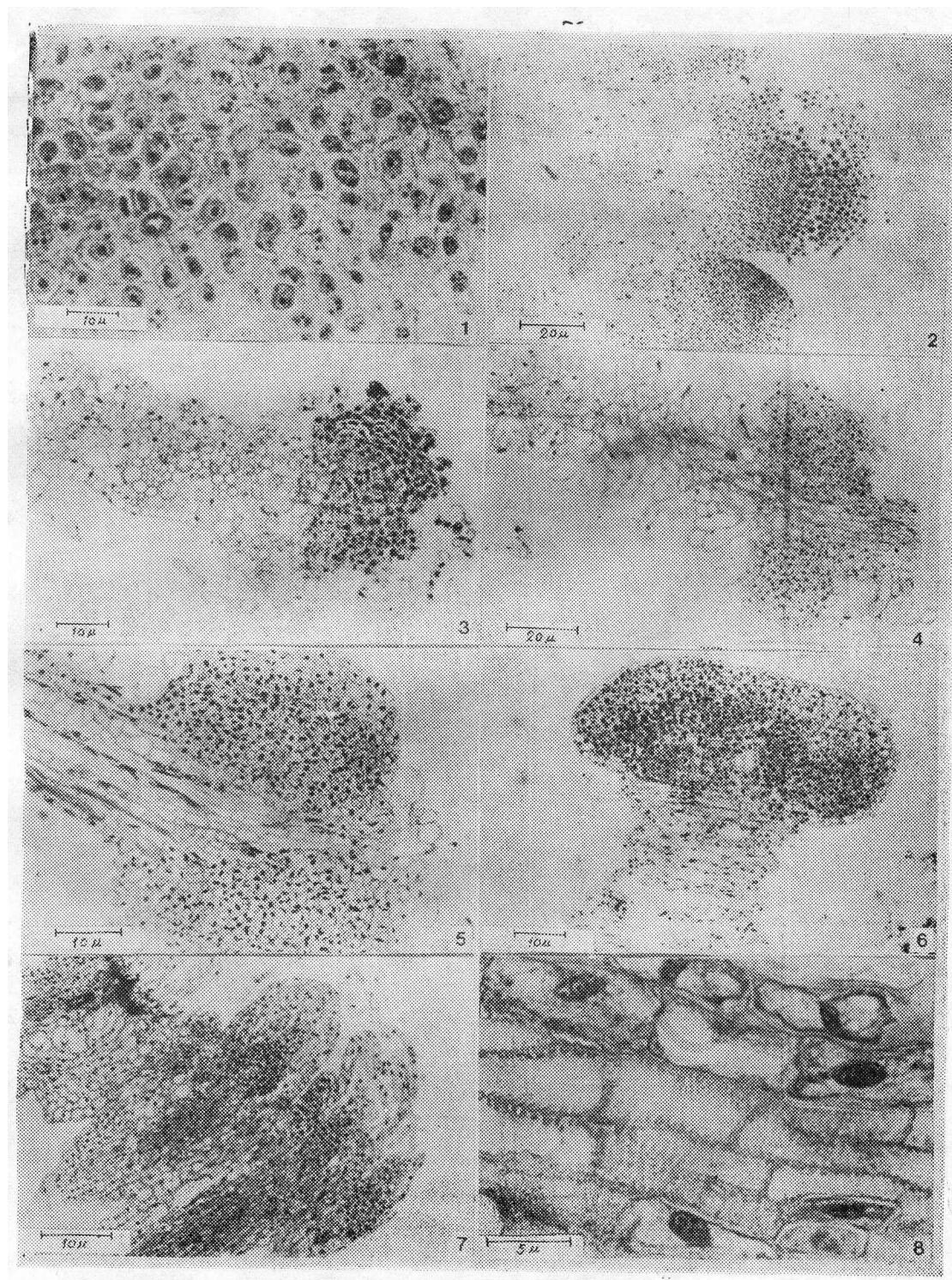
PRELIMINARY STUDY ON THE INDUCTION AND HISTOLOGICAL ORIGIN OF CALLUS IN THE YOUNG LEAF OF SUGARCANE

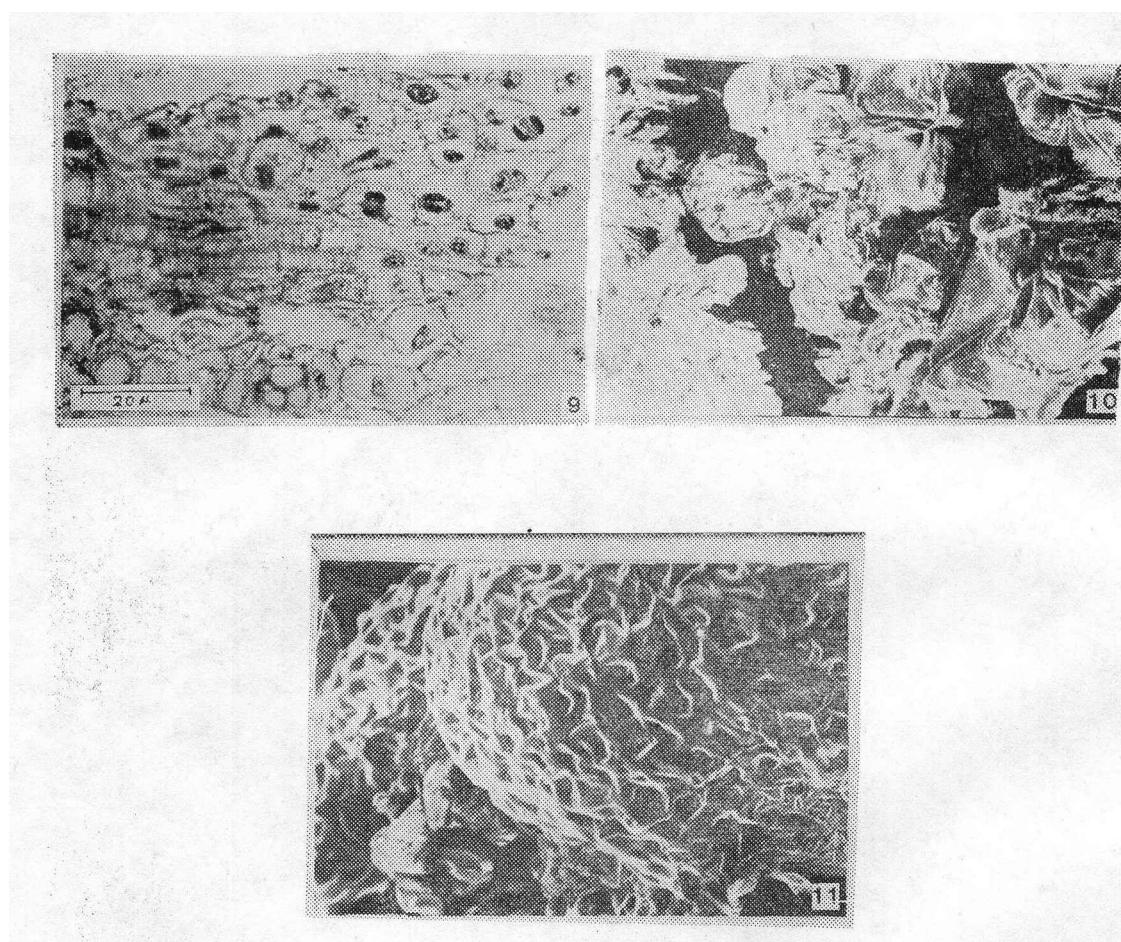
Wang Shih-mao and Zheng Yu-mei

(South China Agriculture of College)

SUMMARY

The young leaf-segment of two cultivar of sugarcane were cultured on MS-medium supplemented with 3mg/l 2,4-D and the sucrose were increased to 50g/l, or supplemented with 5mg/l 2,4-D, 5mg/l arginine and 25g/l sucrose, over 90% explants were produced callus, after 4-21 days incubation. According to the observations of the paraffin section indicated that the callus were originates from the parenchyma cells of the vascular bundle sheath. Using the scanning electron microscope JSM-25, to compare the two kinds of calli, that the friable callus has many great intercellular spaces, and the compact callus has not.





附图说明

- 图1 愈伤组织的一部分，示细胞分裂。
- 图2 培养14天后，幼叶切段的切口处产生的三个愈伤组织。
- 图3 培养7天后的幼叶叶片横切面，示愈伤组织从切口处的维管束鞘产生。
- 图4 培养7天后的幼叶平皮切面，示愈伤组织由维管束鞘分裂而来。
- 图5 培养14天后的幼叶平皮切面，示愈伤组织由维管束鞘分裂而来。
- 图6 培养14天后的叶鞘切段，在切口处形成的一个愈伤组织。
- 图7 培养5天后的幼叶叶鞘平皮切，示愈伤组织自维管束鞘发生。
- 图8 培养3—5天的幼叶的纵切，可见其维管束鞘薄壁细胞以无丝分裂方式进行分裂。
- 图9 培养3—5天的幼叶的纵切，可见其维管束鞘薄壁细胞以有丝分裂方式进行分裂。
- 图10 “松散型”愈伤组织的扫描电镜图，可见大型的胞间隙。
- 图11 “密实型”愈伤组织的扫描电镜图，与图10对比，无大型的胞间隙。