

红掌愈伤组织和再生团块发育过程中糖和蛋白质的组织化学研究

陈超*, 王桂兰, 邸智勇

(唐山师范学院生命科学系, 河北唐山 063000)

摘要: 以红掌叶片诱导出的 4 类愈伤组织和气生根根段诱导的再生团块为试材, 研究糖和蛋白质在愈伤组织衰老与再生团块发生发育过程中的变化。经石蜡切片 PAS 和汞溴酚蓝组织化学染色观察发现, 糖主要以颗粒状存在于愈伤组织细胞中并有明显围绕核的现象, 蛋白质主要集中于细胞核及其周围。糖和蛋白质含量在黄绿色愈伤组织中有明显的从外向内减少的梯度变化, 在深绿色愈伤组织中的梯度不太明显。糖在金黄色愈伤组织中含量很低, 没有梯度变化; 在褐色愈伤组织中散乱分布。蛋白质含量在金黄色愈伤组织中由外层细胞向内层细胞有一定的梯度变化, 但不明显; 在褐色愈伤组织中没有梯度变化。刚形成的再生团块糖和蛋白质含量, 在由外向内的细胞中有明显的梯度变化, 而在再生团块膨大生长过程中含量少, 没有梯度变化。分化期再生团块中的糖主要集中在分裂旺盛的分生细胞团和维管组织周围, 蛋白质则集中于分生细胞团的细胞中。在各类愈伤组织和再生团块中均出现各种特化细胞。糖含量及其梯度变化是愈伤组织和再生团块分化的重要内在条件, 蛋白质含量以及核形态是否完整是愈伤组织和再生团块分化的关键。

关键词: 红掌; 愈伤组织; 再生团块; 组织化学

中图分类号: S 682.1⁺4 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2008) 10-1484-07

Histochemistry Study on Callus of Leaf and Reproduction Block Mass of Aerial Root in *Anthurium andraeanum*

CHEN Chao*, WANG Gui-lan, and DI Zhi-yong

(Biological Department, Tangshan Teacher's College, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: Four kinds of callus from leaf and reproduction block mass (RBM) of aerial root in *Anthurium andraeanum* 'Arizona' were studied by slicing up and histochemistry coloration. The results showed that the saccharide was mainly grain-like in the callus and RBM. Protein was mainly in or around the nuclei. Saccharide was obviously surrounding the nuclei. In kelly callus from the outer layer of cells to the inner layer of cells saccharide and protein decreased as a visible grads, and in dark green callus the grads was un conspicuous. The saccharide in the golden callus was very little without a grads. The saccharide distributed disperedly in the brown callus. There was a un conspicuous protein grads from the outer layer of cells to the inner layer of cells in the gold callus. However, there wasn't protein grads in the brown callus. There was also a visible grads of saccharide and protein when the RBM occurred, in the expending period of RBM there was not the grad. In the diffeneration stage of RBM the saccharide surrounded the dense small cell groups and the primary vascular tissue. The protein mainly concentrated in the nuclei of the cell groups. There were special cells in all classes of callus and RBM. The content and the grads of the saccharide was the important immanent condition for the diffenertiation of callus and RBM. The content of the protein and the integrality of the nuclei was very important for the diffenertiation of callus and RBM.

Key words: *Anthurium andraeanum*; callus; reproduction block mass; histochemistry

收稿日期: 2008 - 06 - 04; 修回日期: 2008 - 09 - 18

基金项目: 河北省科技厅项目 (052201131); 唐山市生物与化学重点实验室项目 (04360701B-15)

* E-mail: chchao410@sina.com

迄今对红掌 (*Anthurium andraeanum* Linden) 的研究报道多集中于离体培养条件的筛选和优化, 有关其形态发生机理的研究较少 (Pierik et al, 1974; Kuehnle & Sugii, 1991; Kuehnle et al, 1992; 夏春华, 2000)。

一般认为通过重新诱导培养和延长愈伤组织继代周期提高红掌再生芽生长势与提高其可溶性糖含量和维持有利的激素平衡直接有关 (郭维明 等, 2004)。

红掌离体形态发生存在多条途径, 具体发生途径与基因型及培养条件有关 (郭维明 等, 2004; 赵云鹏 等, 2005)。王桂兰等 (2005) 提出了红掌气生根根段诱导再生团块 (气生根切割后的根段经培养, 两端切口处形成哑铃状的团块组织, 称为再生团块, 呈绿色、块状、质地较硬) 进行植株再生的快繁途径, 克服了愈伤组织多次继代后的衰老问题, 且再生速度快, 繁殖倍数高。此后对快繁途径中叶片诱导产生的愈伤组织、愈伤组织分化的气生根、气生根根段诱导形成再生团块和再生团块分化出不定芽的分化发育过程进行了细胞学研究 (王桂兰 等, 2006)。

本研究中对此快繁途径中叶片诱导产生的 4 类愈伤组织和气生根根段再生团块形成以及不定芽的分化发育过程进行组织化学研究, 以了解糖类和蛋白质在红掌愈伤组织衰老与再生团块发生发育过程中的变化及对这些变化过程的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以红掌 *Anthurium andraeanum* Linden 'Arizona' 叶片诱导出的 4 类愈伤组织和气生根根段诱导的不同发育时期的再生团块为材料。

1.2 试验方法

试验于 2003—2006 年在唐山师范学院生命科学系实验室进行。

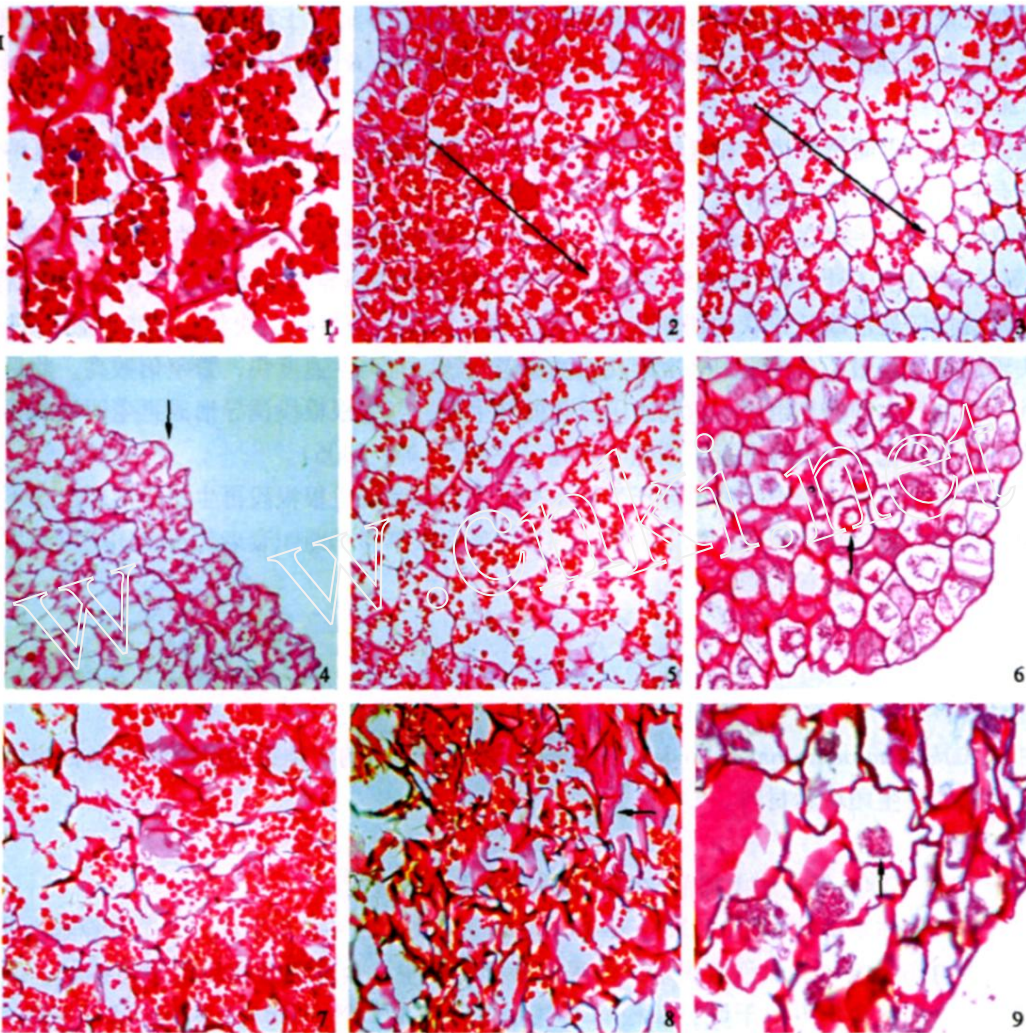
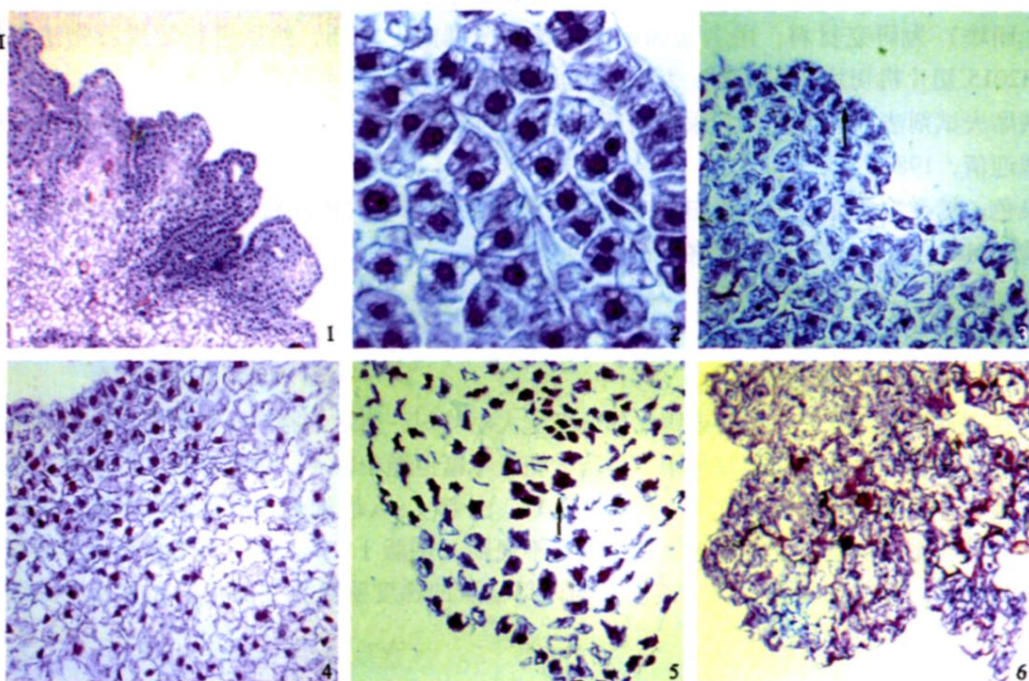
选取红掌快繁体系中叶片在 $1/2MS + 6-BA\ 0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} + 2, 4-D\ 0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上诱导的 4 种不同颜色的愈伤组织 (黄绿色愈伤组织外观疏密程度适中, 金黄色愈伤组织呈蓬松状, 深绿色愈伤组织较致密, 褐色愈伤组织干燥且蓬松) 和气生根段在 $1/2MS + 6-BA\ 1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} + 2, 4-D\ 0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上诱导的不同时期的再生团块 (刚形成的再生团块、膨大生长期的再生团块和分化出芽的再生团块) 为研究材料, 用卡诺固定液对材料分别固定 24 h, 然后进行常规石蜡法包埋。用 Leica RM2015 切片机切片, 切片厚度为 $5\ \mu\text{m}$, 用郝普特明胶粘片剂粘片、展片。脱蜡后所有材料均用高碘酸席夫试剂法 (PAS 法) 和汞溴酚蓝染色法进行糖类和蛋白质的分染及两种染色法对染 (孙敬三和钱迎倩, 1987)。

经染色, 糖类物质显红色, 蛋白质显蓝色。脱水后用加拿大树胶封片。用 MotiDMB5-223 F5 数码显微镜 (Motic Pro 3.0 软件) 观察照相。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的组织化学观察

经切片观察发现, 黄绿色愈伤组织大部分细胞大小均匀, 边缘细胞较小且密集, 细胞核明显, 核质比大, 且核多居中, 细胞排列较规则, 细胞含糖量丰富但颗粒较小, 细胞壁有加厚现象, 被染成红色的糖颗粒明显且包围在细胞核周围 (图版 , 1), 外部 4~6 层细胞含糖量极为丰富, 由外向内有一个明显的糖含量减少的梯度, 细胞逐渐变大且不规则 (图版 , 2、3)。内部细胞核不明显, 糖颗粒也不在核周围。外部细胞蛋白质 (蓝色) 向内部减少的梯度明显且主要集中在核及周围细胞质中 (图版 , 1、2)。

图版I
Plate I图版II
Plate II

深绿色愈伤组织边缘细胞出现不规则现象（图版 ， 4），细胞中糖和蛋白质含量变化与黄绿色愈伤组织相似，但由外向内的变化梯度不太明显（图版 ， 4、5），整体较均匀，有细胞质皱缩现象（图版 ， 3）。而糖和蛋白质含量整体上比黄绿色愈伤组织多（染色深）。可能是由于内外细胞中糖和蛋白质含量无明显的梯度变化，而且部分区域的细胞内出现核退化，深绿色愈伤组织分化能力不如黄绿色愈伤组织强。深绿色愈伤组织可能是发育过程中愈伤组织退化的一个过渡阶段。

金黄色愈伤组织整体细胞大小均匀，细胞质稀薄，含糖量少，且由外部向内部没有梯度变化，中部细胞含的少量糖颗粒包围在核周围（图版 ， 6）。外部部分区域常有多个皱缩死亡的细胞，表明其正逐渐衰退死亡。蛋白质集中在核内部，其含量由外向内有减少的梯度变化，但不明显（图版 ， 4）。细胞核已出现明显的变形现象。多数细胞的细胞质皱缩，但是细胞壁形态完整。部分区域细胞原生质皱缩现象严重（图版 ， 5），大多已失去生命力。

褐色愈伤组织细胞形态极不规则，多数细胞无核，有核的细胞核也处于退化状态，细胞质少，细胞壁附近出现薄片状糖类物质，颗粒状较少，蛋白质散乱分布（图版 ， 8、9；图版 ， 6）。某些区域含糖量很高，但糖颗粒不完整，分散存在，有较多的非颗粒状糖类（图版 ， 7）。整个愈伤组织没有糖和蛋白质含量的梯度，并且有较多的特化细胞、破裂细胞和空腔。有许多细胞虽然含有较多的组织化学成分，但从细胞核原生质形态判断，这些细胞已经死亡。

图版 说明：4种愈伤组织中糖分布

1. 黄绿色愈伤组织中的糖类（红色）围核现象（箭头示细胞核） $\times 248$ ；2、3. 黄绿色愈伤组织外部、中部及内部细胞的糖含量（箭头示梯度变化） $\times 171$ ；4. 深绿色愈伤组织的外部细胞不规则现象（箭头所示） $\times 190$ ；5. 深绿色愈伤组织中部细胞的糖含量（示较均匀分布） $\times 172$ ；6. 金黄色愈伤组织的糖含量及糖类围核现象（箭头示围核的糖类） $\times 152$ ；7. 褐色愈伤组织细胞中的糖分分布（示细胞中糖类散乱状态） $\times 170$ ；8. 褐色愈伤组织细胞的皱缩现象（箭头示皱缩的细胞壁及周围的薄片状糖类物质） $\times 172$ ；9. 褐色愈伤组织中细胞核的退化（箭头所示） $\times 163$ 。

1~9均为对染。

Explanation of plate : The distribution of saccharide in four kinds of callus

1. The phenomenon of saccharide surrounding nuclei in kelly callus (arrow showing nuclei) $\times 248$ ；2、3. The content of saccharide from the outer part of cells to the middle part of cells to the inner part of cells (arrow showing grads change) $\times 171$ ；4. The irregular phenomenon of the outer part of cells in dark green callus (arrow showing) $\times 190$ ；5. The content of saccharide in the middle part of cells in dark green callus (showing uniformity distribution) $\times 172$ ；6. The content of saccharide and the phenomenon of surrounding nuclei in golden callus (arrow showing saccharide surrounding nuclei) $\times 152$ ；7. The distribution of saccharide in brown callus (showing saccharide disheveled state in cells) $\times 170$ ；8. The crimple phenomenon of cells in brown callus (arrow showing crimple cell wall and surrounding lamellar saccharide) $\times 172$ ；9. The cell nuclei degradation in brown callus (arrow showing) $\times 163$ 。

1 - 9 were all counter coloration

图版 说明：4种愈伤组织的蛋白质分布

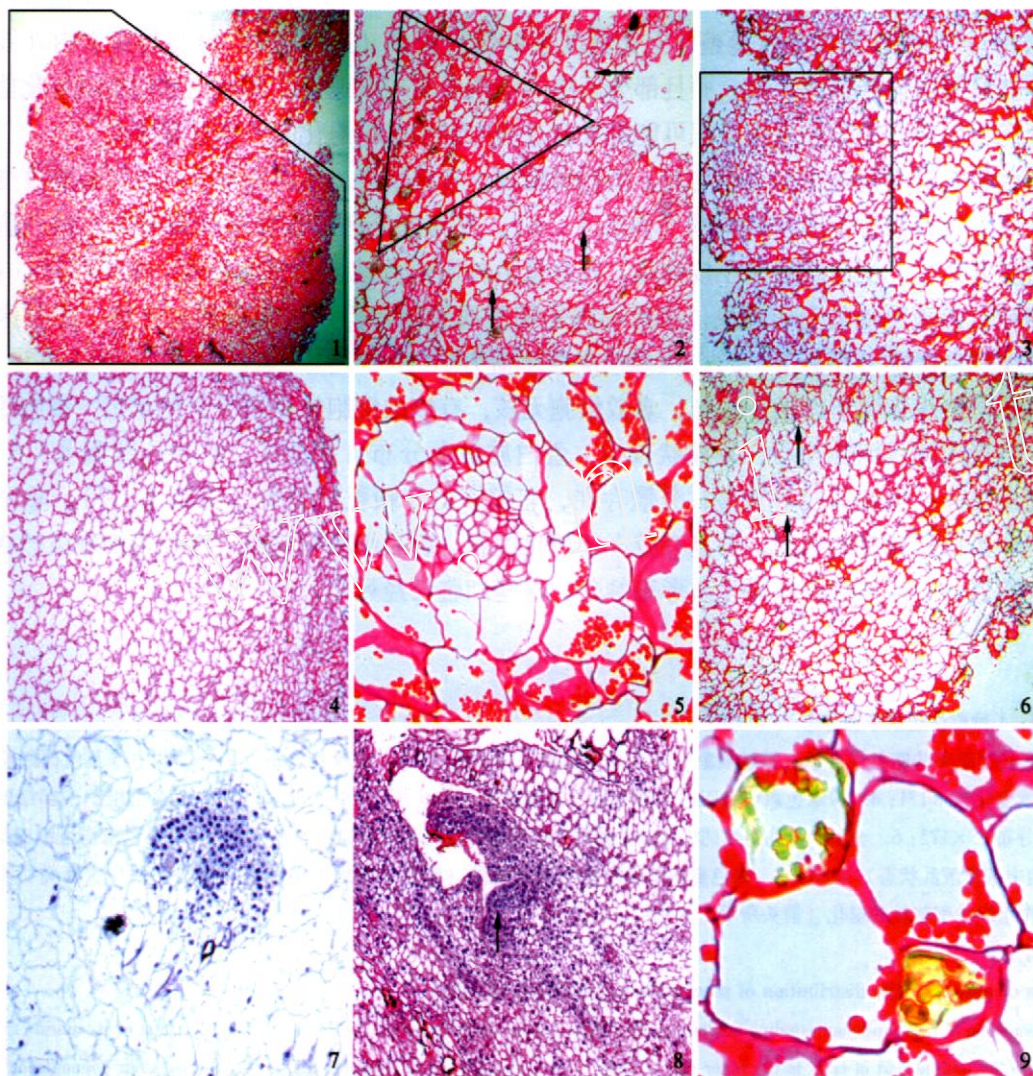
1. 黄绿色愈伤组织蛋白质（蓝色）含量的梯度变化（示整体分布） $\times 36$ ；2. 黄绿色愈伤组织外部细胞的放大（示蛋白质的分布） $\times 166$ ；3. 深绿色愈伤组织外部细胞蛋白质含量（箭头示原生质皱缩） $\times 171$ ；4. 金黄色愈伤组织外部、中部细胞的蛋白质变化 $\times 173$ ；5. 金黄色愈伤的原生质皱缩现象（箭头所示） $\times 171$ ；6. 褐色愈伤组织细胞中的蛋白质分布 $\times 36$ 。

1~6均为蛋白质分染。

Explanation of plate : The distribution of protein in four kinds of callus

1. The protein grads change in kelly callus (showing whole distribution) $\times 36$ ；2. Enlarge of outer part of cells (showing protein distribution) $\times 166$ ；3. The content of protein in the outer of cells in dark green callus (arrow showing crimple protoplasm) $\times 171$ ；4. The content of protein in the outer of cells and the middle of cells in golden callus $\times 173$ ；5. The crimple phenomenon of the protoplasm in golden callus (arrow showing) $\times 171$ ；6. The distribution of protein in cells of brown callus $\times 36$ 。

1 - 6 were all separate cobration of protein



图版 说明：再生团块内糖和蛋白质的分布

1. 再生团块的起源（五边形框内为再生团块） $\times 17$ ；2. 再生团块起源部位的局部放大，上部箭头为皮层起源部分细胞，中部箭头为气生根与再生团块之间的细胞，下部箭头为再生团块的细胞（三角部分内为气生根段维管组织生长深入再生团块部分） $\times 37$ ；3. 再生团块起源时的分区现象（方框内部分所示） $\times 42$ ；4. 正在膨大生长的再生团块 $\times 43$ ；5. 分生细胞团（示分生细胞团外围绕细胞的糖类分布） $\times 167$ ；6. 分生细胞团距 RBM（再生团块）边缘位置（箭头示分生细胞团） $\times 41$ ；7. 有芽点再生团块中分生细胞团的蛋白质分布 $\times 38$ ；8. 糖类及蛋白质在芽中的分布情况（箭头示对染的生长锥） $\times 40$ ；9. 再生团块中的特化细胞 $\times 156$ 。
- 1 ~ 6、8、9 为对染，7 为蛋白质分染。

Explanation of plate : The distribution of saccharide and protein in RBM

1. The genesis of RBM (RBM was in frame of pentagon) $\times 17$ ；2. The saccharide distribution of RBM in the part of genesis, upside arrow showing cells of genesis part of cortex, middle part arrow showing cells between aerial root and RBM, downside arrow showing cells in RBM (triangle showing part of vascular tissue in aerial root growing into RBM) $\times 37$ ；3. The subarea phenomenon during the genesis of RBM (showing in part of quadrangle) $\times 42$ ；4. RBM in growing $\times 43$ ；5. Meristematic cell group (showing saccharide distribution in cells surrounding meristematic cell group) $\times 167$ ；6. The position of meristematic cell group to the margin of RBM (arrow showing meristematic cell group) $\times 41$ ；7. The protein distribution of meristematic cell group in RBM with bud origin $\times 38$ ；8. The distribution of saccharide and protein in bud (arrow showing increment borer with counter coloration) $\times 40$ ；9. Special cells in RBM $\times 156$ 。

1 - 6、8、9 were all counter coloration, 7 was separate coloration of protein

2.2 再生团块发生和发育过程中的组织化学观察

2.2.1 刚形成的再生团块

再生团块来自于气生根的皮层细胞。由根段切口处膨大形成。起源处细胞较大且规则,糖和蛋白质含量较低,细胞核明显。再生团块细胞比根的细胞小而紧密,核明显,糖和蛋白质含量很高。部分气生根根段的维管组织细胞随生长深入到再生团块内部(图版,1),气生根与再生团块之间细胞大小处于两者之间(图版,2),其糖和蛋白质含量也处于两者之间。再生团块内有新生的导管,且再生团块起源时有明显的分区现象(图版,3)。维管组织和分生细胞团处于富含糖颗粒的细胞区域之中,且两者位置靠近。刚形成的再生团块内部细胞很大,许多是空腔。糖和蛋白质含量由外层细胞向内层细胞均呈现较明显的先增多后减少的梯度变化,细胞大小也呈现由外层向内层先减小后增大的变化。并出现大量的特化细胞,表面有1~2层细胞退化,这些都是分裂期再生团块的显著特征。

2.2.2 膨大生长与开始分化的再生团块

膨大生长的再生团块内部细胞排列规则紧密,糖和蛋白质含量均低,细胞核也不明显,边缘细胞扁平,皱缩变形,整个再生团块内细胞的糖和蛋白质的含量没有梯度变化(图版,4)。

开始分化的再生团块内部有大量的分生细胞团,细胞分裂旺盛,为分化的原始组织,以后分化出芽。在分生细胞团内细胞核明显,但糖含量很低,围绕分生细胞团的一层细胞含有少量的糖,但再向外则细胞糖含量较多(图版,5)。再生团块的各个部位出现大量晶体或黄色小颗粒(图版,9)的特化细胞,尤其是刚形成的再生团块和有芽点的再生团块,分生细胞团附近常出现多个特化细胞。

开始分化的再生团块中糖和蛋白质含量很低,但比未分化正在膨大的再生团块含量高。分生细胞团位于团块内部距边缘10~30层细胞处(图版,6),多与环纹导管相邻,其周围细胞往往含较多的糖,在分生细胞团发育过程中周围细胞糖供给分生细胞团后凋亡。分生细胞团分裂膨大并逐渐靠近表层,最终分化出芽突出团块外。这些芽是再生团块中蛋白质含量较多的部位(图版,7)。芽的生长锥处细胞规则,核明显,由生长锥向外的幼叶细胞中的糖和蛋白质含量均降低(图版,8),说明芽的生长过程中吸收利用了附近细胞的糖作为能量来源。

3 讨论

王桂兰等(2006)认为愈伤组织外部形态和内部结构的不同是分化差异的原因。愈伤组织细胞大小均匀,细胞质浓厚,细胞核质比大,产生的分生细胞团多,组织分化率高,反之则低。本试验结果表明糖、蛋白质的含量与梯度变化可能是影响分化差异的又一重要原因,糖和蛋白质为愈伤组织的分化提供了能源和所需的化学梯度。

在植物离体发育的研究中发现,细胞脱分化与淀粉的积累和消失有一定关系(许萍和张丕方,1996),但在组织中淀粉的梯度分布与分化的关系尚未见报道。本研究中红掌愈伤组织有两种退化方式,一是经过糖和蛋白质含量较少的金黄色愈伤组织;二是经过细胞质收缩但糖、蛋白质含量很多的深绿色愈伤组织。前者的退化原因可能是多次继代后叶绿体减少导致产生糖的能力严重下降,后者的可能是长期继代培养后糖的均匀积累,缺乏分化所必需的明显的糖变化梯度,从而导致分化能力下降。说明红掌愈伤组织衰亡的内部机理可能有两种,但两种方式中不正常细胞核的出现是共同特征。

红掌愈伤组织和再生团块中常发现特化细胞。一类是大量细胞“空腔”,其形成原因似乎都是主动的能量耗尽或自动凋亡,为分生细胞团提供营养和空间。此类细胞学变化与其他植物中一些活细胞编程性死亡和溶解,分离和分化形成具空腔的通气组织相似(樊明寿和张福锁,2002)。另一类是含有晶体的细胞,其在刚起源团块和分化出芽的团块中尤其常见,而这两类再生团块分生能力最强。由此推测,再生团块中含有晶体的细胞的出现与细胞分化有关,含晶体细胞越多,分化能力越强。

对红掌愈伤组织和再生团块的观察,都发现有糖颗粒围绕细胞核的现象。这可能是糖类物质即将

被利用的现象。黄绿色愈伤组织具有明显的糖颗粒围绕核的现象,特别是在由外向内的 4~6 层细胞虽然糖含量极高,但其围核现象也十分明显。这几层细胞营养积累丰富,分化力最强。深绿色愈伤组织也有较明显的围核现象,但不紧密。在金黄色愈伤组织中绝大多数细胞没有糖颗粒或含有很小的极不规则的糖颗粒,有围核现象但很不明显。在褐色愈伤组织中,一些不规则的糖颗粒松散的围绕在退化的细胞核周围,不含糖颗粒的细胞则明显的表现出退化甚至破裂的现象。由此看来细胞核形态和功能的完整性是使糖类物质围绕细胞核的保证。

References

- Fan Ming-shou, Zhang Fu-suo. 2002. Aerenchyma formation in plant and its physiological and ecological significance. *Plant Physiology Communications*, 38 (6): 615 - 618. (in Chinese)
- 樊明寿, 张福锁. 2002. 植物通气组织的形成过程和生理生态学意义. *植物生理学通讯*, 38 (6): 615 - 618.
- Guo Weiming, Zhao Yun-peng, Wen Fang-de. 2004. Relative physiological and biochemical features of redifferentiation difference in three types of calli subculture in *Anthurium andraeanum*. *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (1): 69 - 72. (in Chinese)
- 郭维明, 赵云鹏, 文方德. 2004. 花烛愈伤组织不同继代培养的再分化差异. *园艺学报*, 31 (1): 69 - 72.
- Kuehnle A R, Sugii N. 1991. Callus induction and plantlet regeneration in tissue cultures of *Hawaiian anthuriums*. *HortScience*, 26 (7): 919 - 921.
- Kuehnle A R, Chen F C, Sugii N. 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium andraeanum* hybrids. *Plant Cell Reports*, 11 (9): 438 - 442.
- Pierik R L M, Steegmans H H M, Meys J A J. 1974. Plantlet formation in callus tissues of *Anthurium andraeanum* Lind. *Scientia Horticulturae*, 2: 193 - 198.
- Sun Jing-san, Qian Ying-qian. 1987. *Plant cell research method*. Beijing: Science Press: 134 - 137, 149 - 151. (in Chinese)
- 孙敬三, 钱迎倩. 1987. *植物细胞学研究方法*. 北京: 北京科学出版社: 134 - 137, 149 - 151.
- Wang Gui-lan, Chen Chao, Li Zhao-xia, Li Wei, Lin Xiao-jing. 2005. Establishment of rapid propagation system of aerial root segments of *Anthurium andraeanum* Linden *in vitro*. *Plant Physiology Communications*, 41 (3): 297 - 301. (in Chinese)
- 王桂兰, 陈超, 李朝霞, 李伟, 林小静. 2005. 红掌气生根再生快繁体系的建立. *植物生理学通讯*, 41 (3): 297 - 301.
- Wang Gui-lan, Chen Chao, Li Wei, Li Yan-mei. 2006. Cytological study on callus of leaf and reproduction block mass of aerial root in *Anthurium andraeanum*. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (3): 587 - 591. (in Chinese)
- 王桂兰, 陈超, 李伟, 李艳梅. 2006. 红掌叶片愈伤组织和气生根再生团块的细胞学研究. *园艺学报*, 33 (3): 587 - 591.
- Xia Chun-hua. 2000. The research advancement on *Anthurium andraeanum* Lind. *Journal of Jiangsu Forestry Science & Technology*, (3): 49 - 53. (in Chinese)
- 夏春华. 2000. 安祖花研究进展. *热带农业科学*, (3): 49 - 53.
- Xu Ping, Zhang Pi-fang. 1996. General account of studies on dedifferentiation of plant cells. *Chinese Bulletin of Botany*, 13 (1): 20 - 24. (in Chinese)
- 许萍, 张丕方. 1996. 关于植物细胞脱分化的研究概况. *植物学通报*, 13 (1): 20 - 24.
- Zhao Yun-peng, Guo Weiming, Wang Guang-dong. 2005. Observation on anatomic structure of eight kinds of calli in *Anthurium andraeanum*. *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (1): 60 - 64. (in Chinese)
- 赵云鹏, 郭维明, 王广东. 2005. 花烛不同愈伤组织解剖结构的观察. *园艺学报*, 32 (1): 60 - 64.

《中国园林》学刊
CHINESE
LANDSCAPE
ARCHITECTURE

1985年创刊
“中国科技核心期刊”
.....1985-2009

期待中的2009年

内文96 + 8 = 104页特大16开本
每期定价28元, 全年12期336元

全国各地邮局订购, 国内邮发代号: 82-217;
国际发行由中国国际图书贸易总公司承办, 代号: N4577
也可直接汇款到本社订购
电话: 010-68325020 (兼传真)
邮箱: korelease@china.com
网址: <http://www.jchla.com>
联系地址: 北京市海淀区百万庄建设部北配楼337号《中国园林》杂志社
邮编: 100835