

屋顶长生草叶的解剖结构及其 离体培养形态发生的研究

张良波¹, 周朴华², 彭晓英², 彭尽辉³, 易霏琴¹

(1. 湖南省林业科学院, 长沙 410004; 2. 湖南农业大学 生命科学院, 长沙 410128; 3. 湖南农业大学 园艺园林学院, 长沙 410128)

摘要: 对屋顶长生草叶的解剖结构及其在离体培养条件下形态发生过程进行了研究。结果表明, 屋顶长生草的叶具有肉质旱生植物叶的特点, 表皮细胞外有角质层, 叶有较密的腺毛分布, 气孔器由两个肾形的保卫细胞和两个镰刀形的护卫细胞组成; 叶肉细胞没有栅栏组织与海绵组织之分, 细胞比较大, 有贮水作用; 维管束平行排列, 导管和筛管分子都很小, 为一圈维管束鞘所包围。屋顶长生草叶片离体培养形态发生途径主要有两种: 一种是由外植体直接产生不定芽(器官型)途径; 另一种是叶肉细胞脱分化成胚性细胞, 经胚性细胞团形成愈伤组织, 再分化产生芽、根等器官(器官发生型), 芽分化为内起源。

关键词: 屋顶长生草; 形态发生; 胚性细胞; 解剖结构

中图分类号: Q944 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2008)03-0324-05

Anatomic structures and morphogenesis *in vitro* of *Sempervivum tectorum* leaf

ZHANG Liang-Bo¹, ZHOU Pu-Hua², PENG Xiao-Ying²,
PENG Jin-Hui³, YI Ai-Qin¹

(1. Hunan Academy of Forestry, Changsha 410004, China; 2. College of Sciences, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 3. College of Horticulture and Gardening, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Anatomic structures and morphogenesis *in vitro* of *Sempervivum tectorum* leaf had been studied. The results show that *S. tectorum* is a typical xerophil. Its leaves are characterized with cutin, density glandular hair, and the stoma is composed with two kidney-shaped safeguard cells and two hook convoy cells, which effectively control the evaporation. The differentiation of palisade and sponge tissue is not visible in mesophyll structure. And the mesophyll cell is large and function as water storage. The vascular bundles distribute parallel; vessel and sieve tube are small and wrapped with vascular sheath. Plantlets formed from the leaves *in vitro* is inner-genetic, including organ-type morphogenesis way (plantlets directly from explants) and organogeny-type morphogenesis way (plantlets from the calli and calli from the fleshy leaves).

Key words: *Sempervivum tectorum*; morphogenesis; embryonic cell; anatomic structures

屋顶长生草(*Sempervivum tectorum*)系景天科长生草属多年生常绿草本植物, 有很高的观赏价值和药用价值(莱斯利, 2000; 张良波等, 2003)。屋顶长生草是一种耐干旱、耐贫瘠的肉质叶植物, 其肉质

叶解剖结构的研究对于了解植物的结构与抗旱能力的关系具有重要的理论意义。植物形态发生研究是实验形态学和发育植物学的一个重要的研究领域, 形态发生是细胞脱分化与分化的综合结果。Stew-

收稿日期: 2006-12-26 修回日期: 2007-03-13

基金项目: 湖南省教育厅项目(02C069)[Supported by Education Department of Hunan Province(02C069)]

作者简介: 张良波(1976-), 男, 汉族, 湖南醴陵人, 硕士, 从事植物细胞工程及能源植物研究。

ard(1958)介绍了由胡萝卜组织培养物再生完整植株的组织学过程,发现组织培养物先形成若干生长中心,然后由此分化芽和根,形成完整再生植株,以后很多研究进一步证实了形态发生中这种分生组织中心的存在(许智宏等,1980)。对于愈伤组织发生部位及根芽起源,很多研究工作者作了较系统的组织学观察和评述,取得了很多共识。许智宏等试验发现最早活化的细胞有两类,这两类分别是外植体切口处细胞及维管组织附近的薄壁细胞(许智宏等,1980;张丕方等,1989)。王凯基等将芽的起源分为内起源与外起源两种形式(王凯基,1981)。另外,Cutter 和 Ballade 将器官的形成划分两个阶段,先是控制器官形成的部位,形成分生细胞团,第二步再决定器官的类型。在形态发生亚显微结构的研究方面,Thorpe 等在烟草中注意到淀粉粒的积累与消耗和形态发生有关,淀粉在愈伤组织形成中积累,而在器官分化中被消耗掉,没有大量淀粉沉积的区域不能形成拟分生组织。Brandao & Salema(1977)在大花紫景天(*Sedum telephium*)叶的培养中观察到细胞增殖时叶绿体结构片层消失。所有这些研究表明植物组织形态结构的变化是植物组织培养中最为丰富的内容之一,它与培养条件有着密切的关系,是发育生物学一个重要的研究领域。

1 材料与方 法

1.1 材料

(1)植物材料:屋顶长生草肉质叶。(2)仪器设备、用具:立式染色缸、卧式染色缸、恒温干燥箱、切片机、展片台、显微成像系统。(3)试剂:无水乙醇、甲醛、冰醋酸、二甲苯、石蜡、三氯甲烷、铁矾、阿拉伯糖、苏木精、中性树脂胶。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基和培养条件 器官型诱导培养基为 MS+6-BA(2 mg/L)+NAA(0.2 mg/L);器官发生型的诱导培养基为 MS+6-BA(1 mg/L)+NAA(1 mg/L)+IAA(1 mg/L)。培养基 pH 为 5.8~6.2,灭菌压力为 0.12 MPa,时间为 20 min 左右。灭菌后放置 2 d 左右后备用。温度 21 ± 1 °C,每天光照 14 h,光照强度为 $54 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,保持培养室较干燥。

1.2.2 培养方法 将肉质叶外植体创伤面接触培养基进行诱导培养 7~25 d,使其产生芽或愈伤组织;

将愈伤组织转入分化培养基,使其分化出不定芽。

1.2.3 形态学和解剖学观察 从外植体接入诱导培养基开始,定期(间隔 1~2 d)取数块外植体,观察形态发生,并用 FAA 液固定。常规石蜡制片,切片厚 $10 \mu\text{m}$ 。铁矾-苏木精染色,光学显微镜下作组织细胞学观察,分析组织发育过程,并显微摄影。

2 结果与分析

2.1 屋顶长生草叶解剖结构的特征

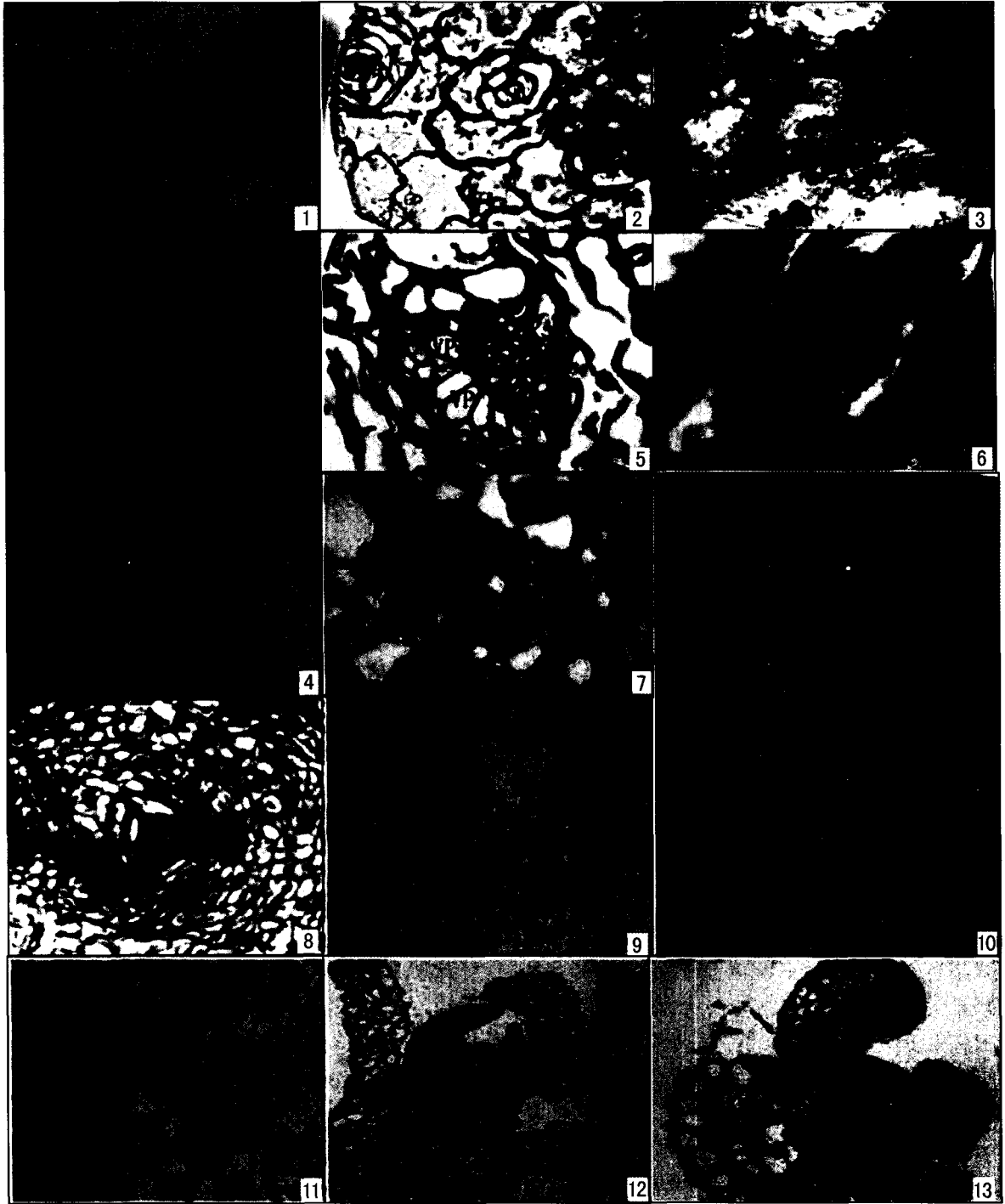
2.1.1 表皮 屋顶长生草叶为肉质叶,绿色,长倒卵形,长 2~3 cm,叶被很多腺毛(图版 I:1)。腺毛有较厚的细胞壁,具有良好的隔水保水功能,很密的腺毛能反射较多的阳光,保护植物免受强光的伤害,加强表皮的保护作用,减少水分的蒸腾,避免叶肉组织过热。其表皮由一层表皮细胞构成,排列整齐,正面观表皮细胞形状不规则,相互嵌合,紧密相连,没有间隙(图版 I:2)。气孔器由两个肾形保卫细胞和两个镰刀形护细胞组成,气孔稍下陷,孔下室较大(图版 I:1)。表皮细胞上有一层较薄的角质层,角质层可以有效防止过度蒸腾失水,是反映植物抗旱能力的一个重要指标,另外坚硬的角质层除有保水作用外,还有机械支撑作用,使植株在水分供应不足时,不会立即萎蔫。

2.1.2 叶肉 叶肉分为两部分,由同化薄壁组织和贮水组织组成,但没有栅栏组织和海绵组织之分。同化薄壁组织紧靠表皮,细胞内具有众多的叶绿体(图版 I:3)。贮水薄壁组织位于叶片的中央,由多层大型薄壁细胞组成(图版 I:4),在叶中部,这类细胞最大的直径可达 $625 \mu\text{m}$,细胞呈不规则多边形,细胞内具少数叶绿体,富含粘液和水分。贮水薄壁组织占据了叶的大部分体积,在叶中部,贮水薄壁组织可占叶横切面面积的 70%以上(图版 I:4)。

2.1.3 维管组织 叶片中维管束平行排列(图版 I:4),每个维管束由一层薄壁细胞组成的维管束鞘所包围(图版 I:5),维管束由木质部和韧皮部组成,但是构成维管束的导管、筛管及伴胞都小。维管束的韧皮部通常大于木质部,木质部的导管分子为较原始的环纹或螺纹加厚,数量少。

2.2 屋顶长生草叶片离体培养形态发生途径的解剖学观察

2.2.1 器官型 近表皮的叶肉薄壁细胞经启动、分裂,形成一团核大、质浓、无液泡的细胞,当这团细胞



图版 I 1. 腺毛和气孔器 ($\times 40$), GH: 腺毛, ST: 气孔器; 2. 表皮和气孔器 ($\times 400$), ST: 气孔器; 3. 叶肉细胞的叶绿体 ($\times 400$), CH: 叶绿体; 4. 没有进行培养的叶片(对照) ($\times 100$), RC: 贮水细胞; 5. 叶片的维管束 ($\times 400$), VP: 维管束鞘细胞; 6. 胚性细胞 ($\times 400$); 7. 分生组织结节 ($\times 200$); 8. 分生细胞发育成维管结节 ($\times 100$); CCA: 愈伤组织形成层; 9. 愈伤组织突破叶表皮 ($\times 40$); 10. 愈伤组织中的许多分化中心 ($\times 100$); DC: 分化中心; 11. 大多数叶肉细胞脱分化形成管胞 ($\times 400$); TR: 管胞分子; 12. 愈伤组织分化的丛芽(器官发生型) ($\times 100$); 13. 叶缘处的叶肉细胞脱分化直接形成不定芽(器官型) ($\times 400$). L. 新叶; B. 芽; LE. 叶缘。

Plate I 1. Glandular hair and stomates ($\times 40$), GH: Glandular hair, ST: stomates; 2. Epidermis and stomates ($\times 400$), ST: stomates; 3. Chloroplast ($\times 400$), CH: chloroplast; 4. Leaf of contrast ($\times 100$), RC: revior cell; 5. Vascular bundles ($\times 400$), VP: vascular pericycle cell; 6. Embryonic cell ($\times 400$); 7. Meristematic nodule ($\times 200$); 8. Vascular nodule ($\times 100$), CCA: callus cambium; 9. Callus break through epidermis ($\times 40$); 10. Differentiation center of callus ($\times 100$), DC: differentiation center; 11. Tracheids from dedifferentiation of mesophyll cell, TR: tracheids ($\times 400$); 12. Cluster buds from callus ($\times 100$); 13. Buds through organ-type from leaf ($\times 400$). L. new leaf; B. bud; LE. leaf edge.

突出叶面后直接分化为芽(图版 I:13)。这种芽直接由细胞分裂、生长、分化而成,未经明显的愈伤组织过程。这是屋顶长生草肉质叶离体培养中由外植体直接产生不定芽——器官型途径的一个重要特征。这种出芽方式,芽发生快,生长迅速。

2.2.2 器官发生型

2.2.2.1 叶肉细胞和维管束鞘细胞脱分化形成愈伤组织 屋顶长生草叶片培养 6~12 d 后,其叶肉同化薄壁细胞和维管束鞘细胞的叶绿体逐渐解体消失,细胞膨大,逐渐变成不规则的巨大细胞,细胞间隙加大,其中一小部分的液泡膜内凹,连接形成小液泡,渗透压减小,细胞质变浓,内质网、高尔基体、核糖体等细胞器增多,核移向中央并恢复分裂能力,细胞脱分化形成胚性细胞(图版 I:6),它的细胞质稠密、无液泡、细胞核大。胚性细胞分裂形成分生细胞团,也称作胚性细胞团。胚性细胞或胚性细胞团,进一步分裂,有的形成许多鸟巢状的结构,这就是维管结节(图版 I:8)。这些维管结节对愈伤组织中物质能量的运输有重要作用。另外,胚性细胞或胚性细胞团,经进一步分裂还能形成很多分生组织结节(图版 I:7),进而形成许多分化中心(图版 I:10)。

由于胚性细胞或胚性细胞团不断地进行分裂,产生新的细胞,这样愈伤组织就不断增大。在愈伤组织增大的过程中,具有分裂能力的细胞逐渐被挤压到某一个或多个区域形成一层或几层具有很强的分裂能力的细胞群,这就是愈伤组织形成层(图版 I:8)。愈伤组织形成层形成后,进一步分裂产生新的细胞,新的细胞推动老的细胞向外扩展,使得愈伤组织进一步增大并最终突破外植体叶的表皮(图版 I:9)。愈伤组织形成层类似木栓形成层的结构,向外分化木栓层,向内分化栓内层,因此在愈伤组织外围形成了一些木栓化的区域,其形成方式类似于周皮。这些木栓化细胞所在区域的愈伤组织中,细胞分裂不再占优势,内部开始分化,外层愈伤组织的增殖主要从木栓化薄弱的区域向外扩展。

另外 70%左右的叶肉细胞,在细胞壁上形成环纹或螺旋纹,条纹增厚成为管胞(图版 I:11)。与其它具有栅栏组织和海绵组织之分的叶外植体培养相比较,屋顶长生草肉质叶的叶肉细胞原生质体易解体,大量形成管胞分子。这是否是肉质叶薄壁细胞脱分化中的一个重要特征,还需要进一步比较观察。此外在离体培养中出现的这种现象是否属细胞凋亡也值得研究。

2.2.2.2 愈伤组织分化不定芽 维管组织结节细胞的分裂方式常表现出单极性的分裂倾向。维管组织结节进一步的发展可能出现两种情况:一种是分生组织迅速单极性分裂形成根原基;另一种是维管组织结节细胞出现分化,其外围的分生组织进行平周分裂呈层状,径向伸长,形成形似维管形成层状的细胞;内部的细胞停止分裂活动,细胞壁不均匀加厚,失去细胞内含物,形成管胞。因为形状像鸟巢(图版 I:8),因此有的报道中称它为鸟巢状维管组织团,有的称为维管组织结节、管胞集团等(许智宏等,1980;王凯基,1981)。形成管胞在组织培养中是一种常见的现象,我们观察到的数量也较多。维管组织结节外围的层状分生细胞如果呈多向分裂分化,则不形成根原基,而在愈伤组织中扩展形成不规则的拳卷状维管组织系统,这在老化的愈伤组织中尤其多。维管组织结节常发生在愈伤组织内部,有时在木栓化愈伤组织近表面处也有发生。愈伤组织内部分裂旺盛部位的细胞中,常有淀粉类内含物出现,随细胞的分裂和分化而逐渐被消耗掉。

在离体培养 20 d 左右的愈伤组织中,愈伤组织近表面局部区域的薄壁细胞核变大,细胞质变浓,分裂加快,进而形成苗端分生组织,在愈伤组织外围形成染色较深的小突起。苗端分生组织进一步分化出叶原基,形成芽(图版:12)。观察发现培养时间较长的愈伤组织再生芽都远离木栓化表皮的一侧,而愈伤组织周缘有木栓化的地方没有芽的形成。这说明木栓化细胞的形成抑制了不定芽的分化,这与 Lu 等(1993)的结论相同。

3 讨论

通过对屋顶长生草肉质叶的解剖结构观察研究,发现其叶片的表皮具有腺毛、气孔器下沉及角质层的结构;叶肉由同化薄壁组织和贮水组织组成,没有栅栏组织和海绵组织之分;叶片中维管束平行排列,每个维管束由一层薄壁细胞组成的维管束鞘所包围等。屋顶长生草肉质叶耐干旱、耐贫瘠特征,为今后把屋顶长生草作为荒漠地区绿化植物之一提供了理论基础。

在屋顶长生草离体培养过程中激素出现两条途径,即器官发生型和器官型。通过组织切片,观察到器官型中不定芽起源于近表皮的叶肉同化薄壁细胞,属内起源,而器官发生型愈伤组织主要是起源于

叶肉同化薄壁细胞,少数起源于维管束的维管束鞘细胞,愈伤组织的起源也属于内起源。关于愈伤组织脱分化的起源问题,我们观察的结果与张丕方(1989),余迪求(1996),胡继金(1990)等报道的结果不同。我们认为这主要是材料不同引起,事实上愈伤组织的起源位置并不是所有的植物都是同一的。屋顶长生草是早生肉质植物,表皮外面有一层角质层,所以愈伤组织难以从表皮发生,同时其叶肉同化薄壁细胞还有较发达的贮水结构,细胞比较大,其伤口附近的细胞很容易受伤,因此,受伤处的薄壁细胞也不能成为愈伤组织的起源位置。叶脉维管束的薄壁细胞或维管束附近的叶肉同化薄壁细胞有较强的启动、脱分化、分裂能力,且分化芽、形成器官的能力比其它部位的细胞强,因而,愈伤组织能较容易从此处发生。由外植体直接产生不定芽要求起源处的细胞有较强的分化能力,还要较高的营养条件和阻力较小或阻力较容易被突破,屋顶长生草肉质叶的薄壁细胞没有栅栏组织和海绵组织的分化,脱分化的能力比较强,因此容易启动,直接发生不定芽。

屋顶长生草离体培养的愈伤组织早期有很多叶肉细胞脱分化形成管胞,而后期数量减少。这是因为早期叶片从植物体剥离,切断了其原有的物质交换系统,细胞要成活,必须建立新的物质交换的渠道,为了建立新的物质交换系统,很多细胞都转化形成管胞,以便为胚性细胞提供营养。随着愈伤组织中新的维管系统的建成,胚性细胞或胚性细胞团不再需要大量的管胞为其提供营养,所以不再有大量的细胞分化成为管胞。

参考文献:

- 王凯基. 1981. 植物激素对驳骨丹茎愈伤组织生长和器官再生的作用[J]. 实验生物学报, 14(4): 332-341
- 张良波, 彭晓英, 周朴华. 2003. 观赏、药用植物——屋顶长生草[J]. 植物杂志, 6(29)
- 莱斯利·布伦尼斯. 2000. 《药用植物》[M]. 中国友谊出版公司: 216-217
- Brandao I, Salema R. 1997. Callus and plantlets development from cultured leaf explants of *Sedum telephium*[J]. *L Z Pflanzenphysiol*, 85: 1-8
- Hu JJ(胡继金), Kong ZL(孔振兰). 1990. The organogenesis bud of entire lamina of citrus sinensis in tissue culture and its anatomical observation(甜橙完整叶片培养芽直接发生与解剖观察)[J]. *J Fruit Sci(果树科学)*, 7(2): 81-84
- Huang T(黄涛), Dong GF(董高峰), Zhang LY(张兰英), et al. 2003. Roles of auxin and ethylene in direct bud regeneration from epicotyl of *Citrus grandis* cv. Shatian Yu(生长素与乙烯在沙田柚上胚轴不定芽再生中的作用)[J]. *Guihaia(广西植物)*, 23(2): 169-174
- Liu XM(刘选明). 1995. Study on autotetraploid nongya baihe inducing and its morphogenesis and biochemical properties(同源四倍体龙芽百合诱导及其形态发生的细胞学与生理生化特性的研究)[D]. 博士学位论文
- Lou YL(娄远来), Wang QY(王庆亚), Deng YJ(邓渊钰), et al. 2004. The developmental anatomical study on anomalous in the root and adventitious buds of *Altemanthera philoxeroides*(空心连子草根中异常结构及不定芽的发育解剖学研究)[J]. *Guihaia(广西植物)*, 24(2): 125-127
- Lu Minfu, Taizo Hogetsu, Yuji Ide, et al. 1993. Effects of α -aminoxy- β -pHenylpropionic acid and α -aminoxyacetic acid on differentiation of adventitious buds in the callus derived from stem segments of *Betula platyphylla* Sukatchev var. *japonica* Hara [J]. *J Jpn For Soc*, 75(4): 331-337
- Xu ZH(许智宏), Liu GY(刘桂云). 1980. Histo-cytological observations on callus and bud formation cultures of *Nicotiana tabacum*(烟草叶组织培养中愈伤组织和芽形成的细胞学观察)[J]. *J Integrative Plant Bio(植物学报·英文版)*, 22(1): 1-5
- Yu DQ(余迪求), Deng QL(邓庆丽), Shen YN(沈亚楠), et al. 1996. Generation and cytological observation of adventitious buds from hypocotyl explants of *Antirrhinum majus*(金鱼草下胚轴不定芽发生及细胞学观察)[J]. *Acta Sci Nat Univ Sun(中山大学学报·自然科学版)*, 35(4): 75-79
- Zhang PF(张丕方), Wang Q(王崎). 1989. Studies on early events in thin cell layer culture of *Nicotiana tabacum*(烟草薄层培养中细胞早期动态的研究)[J]. *J Integrative Plant Bio(植物学报·英文版)*, 31(6): 422-426
- Smith C C, Fretwell S D. 1974. The optimal balance between the size and number of offspring[J]. *Am Nat*, 108: 499-506
- Tomimatsu H, Ohara M. 2006. Evolution of Hierarchical floral resource allocation associated with mating system in an animal-pollinated hermaphroditic herb, *Trillium camschatcense* (Trilliaceae)[J]. *Am J Bot*, 93: 134-141
- Van Noordwijk A J, de Jong G. 1986. Acquisition and allocation of resources; their influence on variation in life history tactics[J]. *Am Nat*, 128: 137-142
- Vonhof M J, Harder L D. 1995. Size-number trade-offs and pollen production by papilionaceous legumes[J]. *Am J Bot*, 82: 230-238
- Worley A C, Baker A M, Thompson J D, et al. 2000a. Floral display in *Narcissus*; variation in flower size and number at the species, population, and individual levels[J]. *Int J Plant Sci*, 161: 69-79
- Worley A C, Barrett S C H. 2000b. Evolution of floral display in *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae); Direct and correlated responses to selection on flower size and number[J]. *Evolution*, 54: 1533-1545
- Worley A C, Barrett S C H. 2001. Evolution of floral display in *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae); genetic correlations between flower size and number[J]. *J Evol Biol*, 14: 469-481

(上接第310页 Continue from page 310)