

棉胚珠愈伤组织诱导成纤维实验系统的研究^X

汤清秀 赵旌旌 王隆华

(华东师范大学生物系, 上海, 200062)

提 要 用棉花胚珠切块诱导愈伤组织, 经悬浮振荡培养、漂浮培养、滤纸桥法等方法诱导成纤维细胞。发现漂浮培养和改进的滤纸桥法对纤维的诱导效果比悬浮振荡培养的效果好。微管解聚剂 APM 和核酸抑制剂抑制纤维的生长, 纤维二糖有一定的促进作用。极性对纤维的生长有影响。

关键词 棉胚珠; 愈伤组织; 纤维诱导; 极性

Studies on the Characteristics of the Induction of Cotton Fiber Derived from Cotton Ovule Callus Cells

TANG Qingxiu ZHAO Jingjing WANG Longhua

(East China Normal University, Shanghai, 200062)

Abstract Cotton fibers were induced from cotton ovule callus cells by suspension culture, float culture or filter paper bridge culture. It was found that float culture or filter paper bridge culture was better than suspension culture. APM and actinomycin D inhibit the fiber elongation. Cellobiose promotes its development. Polarity affects its culture.

Key words Cotton ovule; Callus; Cotton fiber induction; Polarity

棉纤维是棉胚珠表皮细胞分化、伸长而成的。它不仅是纺织工业的重要原料, 而且是研究细胞分化、细胞伸长等机理的良好材料。为了更好地研究它的分化和发育, 人们建立了多种研究系统: 离体胚珠培养系统^[1]、胚珠来源的单细胞悬浮培养系统^[2]、胚珠愈伤组织细胞来源的纤维细胞悬浮培养系统^[3, 4]等, 并对这些实验系统的特性, 培养基的配方、激素配比、pH 值、抑制剂或促进剂的影响等进行了较为系统的研究。我们已对胚珠愈伤组织来源的纤维细胞悬浮振荡培养系统进行了初步的研究^[5], 现对其培养方式, 极性影响等再进行进一步的研究。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

栽培于本校实验田中的陆地棉(*Gossypium hirsutum*)岱字棉15, 海岛棉(*G. barbadense*)海新9号(中国农业科学院棉花研究所汪若海先生提供)。

1.2 愈伤组织的诱导

取开花前1天的子房, 用75%乙醇浸泡1秒钟左右, 再用5% NaClO₂液消毒15 min 后以无

X 国家自然科学基金资助项目(编号39670047)

收稿日期: 1998212221, 接受日期: 1999210228

菌水冲洗3~5次, 取出胚珠, 切成小块, 接种于MS+3.0 mg/L GA₃的培养基上, 30±1℃, 暗中培养。

1.3 纤维细胞的诱导

1.3.1 悬浮振荡培养 取1 cm³左右的愈伤组织接种于BT (Beasley & Ting^[1], 简称为BT)+3.0 mg/L GA₃液体培养基中, 30±1℃, 80 rpm 暗中振荡培养, 定期用测微尺测量细胞长度。甲烯蓝+甲基橙染色, 重庆87035倒置显微镜拍照。

1.3.2 漂浮培养 取小块愈伤组织小心接种于BT+3.0 mg/L GA₃液体培养基表面, 30±1℃, 暗中静置培养。

1.3.3 改进的滤纸桥法 滤纸桥中央附加与液体培养基相连的脱脂棉条, 取小块愈伤组织小心接种于脱脂棉上, 使组织块与脱脂棉接触良好, 以便较好地吸收营养成分。30±1℃, 暗中静置或定期颠倒组织块培养。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导

愈伤组织的生长情况如图1所示。长绒棉新海9号愈伤组织比细绒棉岱字棉15的出现早。新海9号约1周左右诱导出愈伤组织, 岱字棉15则需10天左右。20天以后, 岱字棉15的愈伤组织体积开始超过新海9号。一月左右体积可达8 cm³。我们认为这种情况与不同品种棉纤维的分化、发育性质有关。但大部分新海9号的愈伤组织容易逐渐变褐, 而岱字棉15的愈伤组织基本保持乳白色或白色。这可能与分泌的棉酚多有关。细绒棉在稍低一点的培养温度(25~27℃)下, 其愈伤组织生长期可达2~3个月。

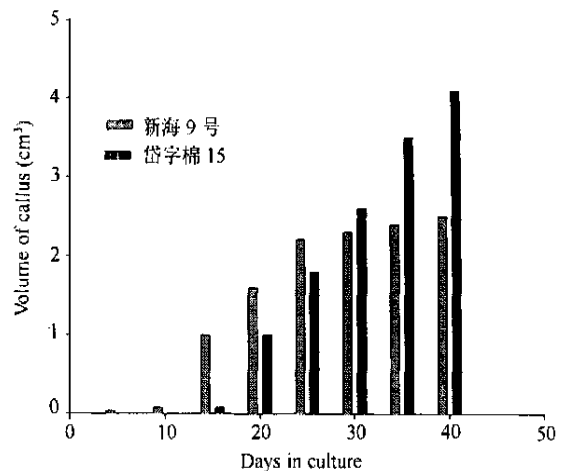


图1 愈伤组织体积随培养时间的变化
(统计每瓶中的愈伤组织块体积, 重复3次)

Fig. 1 Change of the volume of callus derived from cotton ovule
(Counts the volume of callus in a bottle Repeats three times)

2.2 棉纤维的诱导

2.2.1 在BT+GA₃培养基中振荡培养的胚珠愈伤组织细胞显著伸长(图2)。培养20天的诱导纤维长度分布如图3所示。结果表明, 50%的细胞长度在0.4~0.8 mm, 17%的细胞长度大于1.0 mm。长度大于0.4 mm的细胞占75%以上。

(Davidonis^[3]把长度大于0.4 mm的作为纤维细胞), 邱金龙^[6]等以棉胚珠来源的单细胞悬浮培养21天时, 长度超过0.4 mm的细胞占50%以上。我们认为这可能与材料来源不同有关。

2.2.2 在不同培养基上诱导纤维伸长曲线如图4所示。结果表明, 细胞在悬浮振荡培养时, 20天后基本停止伸长, 在漂浮培养时, 25天以后达到最大。细胞在GA₃浓度为6 mg/L的培养基上生长稍好于GA₃浓度为3 mg/L的培养基, 但差异不显著($t < t_{0.05}$)。说明GA₃有促进细胞伸长的作用。但3 mg/L GA₃浓度已经比较适合纤维诱导^[7], 增加GA₃浓度不再显著促进纤维

发育。



图2 棉胚珠愈伤组织来源的纤维细胞的培养

Fig 2 The culture of fiber cells derived from cotton ovule callus cells
A. 培养5天(×100); B. 培养15天(×100); C. 培养25天(×100)
A. 5 days in culture; B. 15 days in culture; C. 25 days in culture

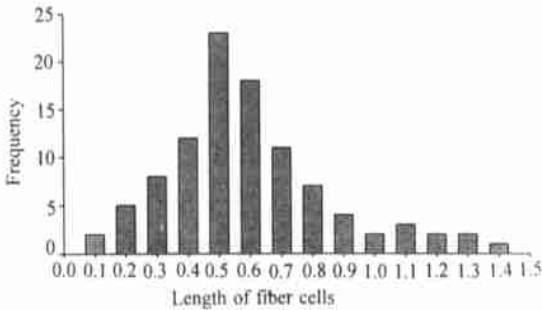


图3 诱导纤维(培养20天)长度分布
(统计100个细胞长度, 重复3次)

Fig 3 Distribution of the length of fiber cells derived from cotton callus (20 days in culture Counts 100 cells length Repeats 3 times)

从图4还可以看到, 漂浮培养的细胞生长比悬浮振荡培养的好。漂浮培养时愈伤组织基本保持原生长方向, 细胞能维持极性, 且漂浮于液面之上, 空气充足; 振荡培养时, 细胞失去原生长方向, 失去极性, 且尽管用振荡方法增加氧气含量, 毕竟是浸没在溶液之中, 空气还不是很充足, 所以漂浮培养的纤维的生长优于悬浮振荡培养的生长。

2.2.3 不同的促进剂、抑制剂对诱导纤维的生长的影响如图5、6、7所示。纤维二糖被认为是有利于纤维的发育^[8], 我们的实验结果(图5)表明纤维二糖对纤维生长作用不大($t < t_{0.05}$), 这可能与品种有关。甲胺磷

是植物微管特效解聚剂^[9, 10], 我们的实验结果(图6)表明, 经甲胺磷处理后的纤维细胞的生长不如对照组好($t > t_{0.05}$)。甲胺磷的这种抑制作用显然与微管解聚有关。放线菌素是核酸抑制剂, 它对细胞发育的影响较大, 我们的实验结果(图7)表明, 它能抑制纤维生长($t > t_{0.05}$)。

2.2.4 极性对诱导纤维的生长的影响如表1所示。

极性是细胞分化的先决条件^[11], 它是指细胞或器官的两个极端在生理上的差异。

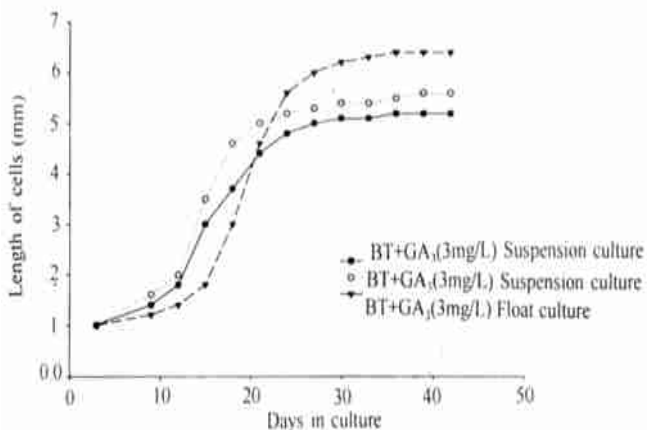


图4 诱导纤维长度随时间的变化
(统计100个细胞长度, 重复3次)

Fig 4 Change of the length of fiber cells
(Counts 100 cells length Repeats 3 times)

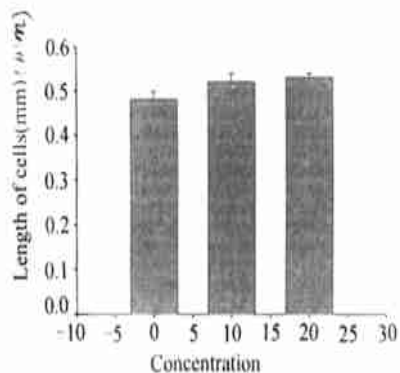


图5 纤维二糖对纤维诱导的影响
(统计100个细胞长度, 重复3次)

Fig 5 The effect of cellobiose on
the induction of fiber cells
(Counts 100 cells length Repeats 3 times)

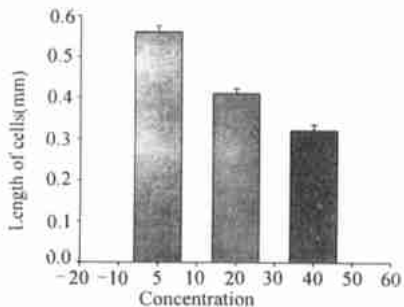


图6 甲胺磷对纤维诱导的影响
(统计100个细胞长度, 重复3次)

Fig 6 The effect of anpropophosmethyl
on the induction of fiber cells
(Counts 100 cells length Repeats 3 times)

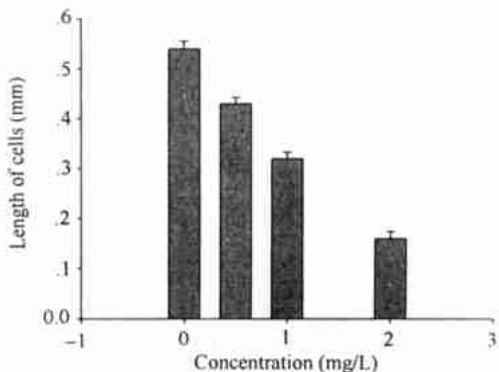


图7 放线菌素对纤维诱导的影响
(统计100个细胞长度, 重复3次)

Fig 7 The effect of actinomycin D
on the induction of fiber cells
(Counts 100 cells length Repeats 3 times)

Duckett^[12]认为苔藓植物产生外源芽胞分化与释放过程中, 双细胞芽胞分离是向基性。芽胞形成的光合细胞和胶质乳状突比较, 乳状突显示极性发育。我们的实验结果表明, 在不同培养基上, 静置培养的都比振荡培养的要好, 可能与振荡培养时细胞失去极性有关。为了验证此想法, 我们设计了改进的滤纸桥法, 即其它条件相同, 静置或定期将组织块上下颠倒。结果表明, 静置培养的比每四天将组织块上下颠倒一次的要好, 每四天将组织块上下颠倒一次的又比每两天将组织块上下颠倒一次的要好。这说明极性确实对纤维的发育有影响。极性影响生长的原因说法不一。正常下胚轴形态学下端内源IAA显著高于形态学上端, 表现为极性生根, 即激素是影响生长的原因^[13]。Hepler认为Ca²⁺调节各种细胞过程, 即极性生长、有丝分裂、胞质流动。胞内离子流动对于极性生长重要, Ca²⁺启动和保持极性生长^[14]。我们观察到的极性影响棉纤维发育的现象是否与Ca²⁺或IAA浓度梯度有关尚有待进一步证明。

表1 极性对诱导纤维的生长影响

Table 1 The effect of polarity on fiber induction

培养基及品种 Medium and varieties	培养方式 Culture method	长度 Length (mm)	增加% 比 (滤纸—振荡) ÷ 振荡% Increment (filter paper 2 suspension) ÷ suspension %
BT	振荡培养	0.4 ± 0.12	25.75 ^{3 3}
岱字 15 Daizi 15	滤纸桥法	0.5 ± 0.1	
BT+ C ³	振荡培养	0.31 ± 0.07	24.67 ^{3 3}
岱字 15 Daizi 15	滤纸桥法	0.39 ± 0.1	
BT+ C ³	振荡培养	0.42 ± 0.01	21.32 ^{3 3}
新海 9 Haixin 9	滤纸桥法	0.51 ± 0.03	
BT+ C ³	静置	0.55 ± 0.12	
新海 9 Haixin 9	滤纸桥法 每2天颠倒一次	0.41 ± 0.08	35.4 ^{3 3}
	每4天颠倒一次	0.42 ± 0.079	30.22 ^{3 3}

3 纤维二糖 3 3 t> t0 05

对于棉胚珠愈伤组织诱导纤维的实验系统的特性本室已有较多的研究,但仍存在不少问题,如虽改进了纤维诱导的方法,纤维的长度仍不理想,既然极性对纤维的生长有影响,那么如何由此改进此系统?控制纤维分化与发育的分子机理等问题也有待进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 Beasley C A, IP Ting *Am J Bot*, 1974, 61(2): 188~ 194
- 2 Trolinder N L, J Berlin, J Goodin *In vitro Cell Dev Bio*, 1987, 23: 789~ 794
- 3 Davidonis, G H. *Physiol Plant*, 1989, 75(2): 290~ 294
- 4 Tripplett B A, W H Busch, J Goodin *In vitro Cell Dev Bio*, 1989, 25: 197~ 200
- 5 汤清秀, 张恒木, 倪兵等 *华东师范大学学报*, 1997, (8): 14~ 20
- 6 邱金龙, 王隆华, 颜季琼 *作物学报*, 1997, 23(5): 562~ 566
- 7 王雨华, 王隆华 *植物生理学通讯*, 1996, (3): 186~ 188
- 8 Delmer D P, P Ohana, L Gonen et al *Plant Physiol*, 1993, 103: 307~ 308
- 9 Fakoner M M, R W Seagull *Protoplasma*, 1987, 136: 118~ 124
- 10 刘箭, 王秀珍, 陈大东 *植物生理学报*, 1992, 18: 348~ 354
- 11 曹宗巽, 呈相钰合编 *植物生理学* 北京: 人民教育出版社, 1980 339
- 12 Duckett J D, R L Igrone *Ann Bot*, 1995, 76: 405~ 419
- 13 番德柱, 管和 *华东师范大学学报*, 1993, (3): 83~ 87
- 14 Hepler P K, R O Wayne *Ann Rev Plant Physiol*, 1985, 36: 397~ 439