

薄层培养菊苣花梗诱导花芽分化 早期超微结构的变化^①

李颖章^② 韩碧文 赵云云
(生物学院) (首都师范大学生物系)

摘要 菊苣花梗薄层培养花芽分化中细胞超微结构的观察表明,在花芽原基的形成中细胞内线粒体、高尔基体、内质网、核糖体大量增加,且始终可见线粒体的分裂增殖,大量增加的线粒体为内质网、高尔基体的活动提供能量,内质网和高尔基体为花芽分化合成新的结构蛋白和新的功能蛋白。花芽分化是一强烈的代谢过程。此外,壁旁体多处可见,且常与内质网、高尔基体相邻分布,其功能可能与物质运输有关。

关键词 菊苣; 薄层培养; 花芽分化; 超微结构

中图分类号 Q248; Q944-6

Ultrastructural Study of Cells During Floral Bud Differentiation of Thin Cell Layer Culture of *Cichorium intybus*

Li Yingzhang Han Biwen Zhao Yunyun
(College of Biology) (Capital Normal University)

Abstract The ultrastructural research of floral bud differentiation in thin cell layer culture of flower stalk of *Cichorium intybus* revealed that the mitochondria, Golgi bodies, rough endoplasmic reticulum (RER) increased significantly during the floral bud formation. The mitochondria which were dividing into two were observed in various periods of floral buds differentiation. It was probable that the increased mitochondria supplied energies for the RER and Golgi bodies to synthesize the structural and functional proteins for floral bud differentiation. The results indicated that the process of floral buds differentiation was associated with intense metabolism. In addition, the paramural bodies were located near the RER and Golgi bodies, it may be participate the substance transports.

Key words *Cichorium intybus*; thin cell layer culture; floral bud differentiation; ultrastructure

薄层培养器官分化过程中有关核酸、蛋白质、内源激素以及细胞的一些早期变化已有报道^[1~6],但对此过程特别是花芽分化中细胞的超微结构变化的报道并不多。本试验观察了菊苣花梗薄层培养花芽分化中细胞超微结构的变化,以期探讨花芽分化中形态发生和超微结构的相关性。

收稿日期: 1995-10-31

①高等学校博士学科点专项基金资助项目

②李颖章,北京圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094

1 材料与方法

菊苣(*Cichorium intybus* L.)栽培于温室中,取盛花期菊苣的花梗切段,流水冲洗1h,75%乙醇消毒1min,0.1% HgCl_2 消毒10min,最后经无菌水冲洗5~6次后在超净工作台上切取长5~6mm、宽1~2mm的表皮薄层,包括表皮和表皮下5~6层薄壁细胞(简称TCL),切面向下接种于附加不同激素的MS培养基的培养皿中(灭菌前pH为5.8),培养温度为 $(25\text{C}\pm 1)\text{C}$,12h光照(700~1300lx)。

取不同培养时间的TCL,采用戊二醛、锇酸双固定,系列乙醇溶液脱水,Epon812树脂浸透包埋、切片,染色后在JME-100CX型透射电镜下观察并照相。

2 实验结果

2.1 薄层培养诱导的不同分化

TCL培养于附加NAA和BA浓度均为 $10^{-6}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MS培养基中,70%的外植体分化出花芽。在培养4~5d后,TCL一端开始产生愈伤组织,另一端无变化,即表现出极性(图1-1)。继续培养,花芽原基在极性膨大端产生(图1-2)。TCL培养于附加IAA和BA浓度均为 $10^{-6}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MS培养基中,100%的TCL分化为营养芽。在附加2,4-D($10^{-7}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和BA($10^{-6}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的培养基上,TCL始终不分化,只长疏松的愈伤组织(图1.3)。

2.2 诱导培养前TCL细胞的结构特点

未进行培养的TCL细胞有一居中大液泡,细胞质呈薄层紧贴细胞壁分布,细胞核不易观察到,叶绿体体积较大,基粒和基质片层发达,线粒体数量不多,内质网、核糖体、高尔基体相对稀少,细胞之间有细胞间隙(图1-4)。表明培养前的薄层细胞处于代谢合成较低的状态。

2.3 诱导培养后TCL细胞的结构变化

取培养4d的极性膨大端的愈伤组织细胞观察其超微结构:细胞排列紧密无细胞间隙,细胞内细胞质浓密,有多个大小不等的小液泡分散分布于细胞质中;细胞核体积增大,位于细胞中央,核膜不规则,核仁致密;叶绿体的基粒和基质片层消失转变为原质体,体积变小,内含小淀粉粒;线粒体数量明显增加,并有多个哑铃形线粒体(图1-5),线粒体正在以分裂方式增殖。

培养8d,定位观察膨大端愈伤组织细胞的超微结构:细胞内线粒体仍较发达,粗糙型内质网、高尔基体数量明显增多(图1-6),表明此时细胞处于代谢旺盛的分化期。

培养15d后,极性膨大端陆续有花芽原基形成,对花芽原基细胞的超微结构观察:细胞内部质体体积明显增大,基粒和基质片层开始出现;多聚核糖体遍布于细胞质的基质中,有的附着于内质网上;内质网、高尔基体、线粒体数量仍较多,有蛋白体存在;壁旁体多处可见,且与内质网,高尔基体靠近(图2-1~2-4)。表明在花芽原基形成过程中细胞内部代谢活动很强烈。

对培养在2,4-D和BA培养基上始终没有分化的TCL超微结构观察:细胞排列松散,细胞器数量减少,与花芽原基细胞相比,其线粒体、内质网、高尔基体数量少得多(图2-5)。表明此时没有分化的愈伤组织,其内部代谢活动较缓慢。

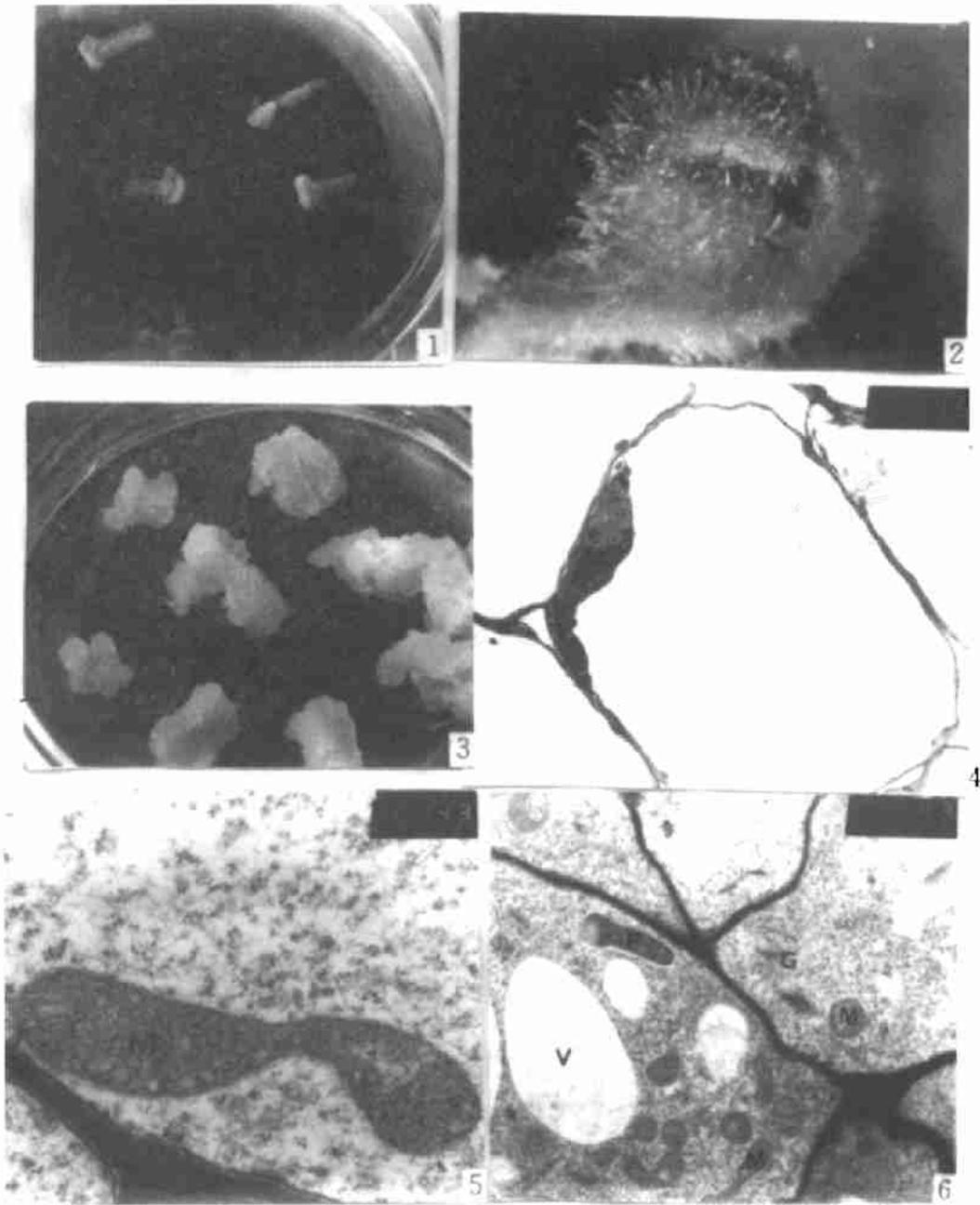


图 1 菊苣花梗薄层培养诱导花芽分化的早期超微结构观察(一)

- 1 培养 6 d 时 TCL 示极性膨大
- 2 培养 20 d 时 TCL 所形成的花蕾
- 3 在 2,4-D 和 BA 培养基上 TCL 形成的愈伤组织
- 4 培养开始时 TCL 的细胞切片, ×190
- 5 培养 4 d 时的 TCL 细胞, 示哑铃型线粒体, ×29 700
- 6 培养 8 d 的 TCL 细胞, 示线粒体、内质网、高尔基体, ×5 940

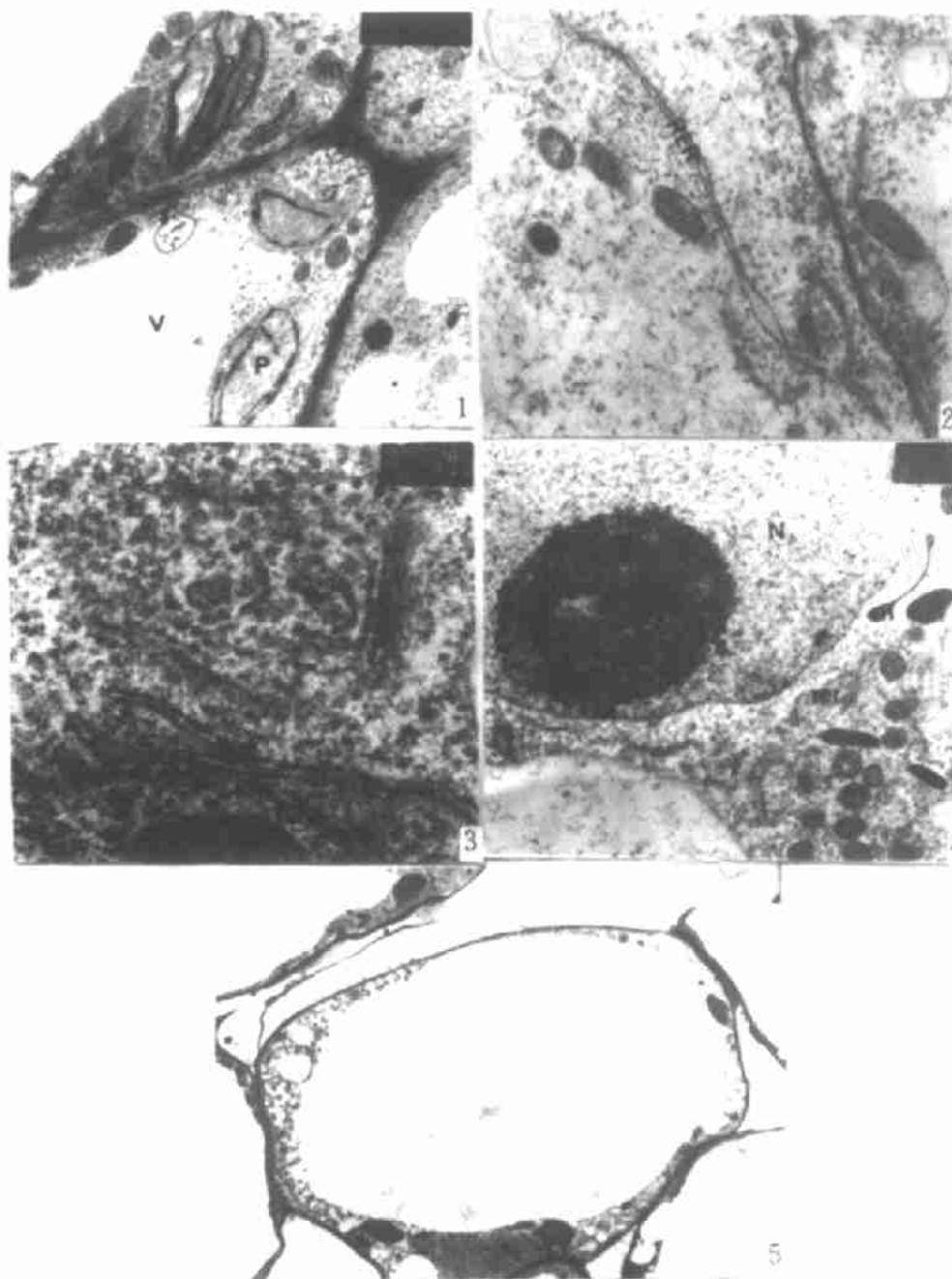


图2 葡萄花梗薄层培养诱导花芽分化的早期超微结构观察(二)

- 1 培养 15 d 时的细胞, 质体体积增大, 内部出现片层结构, $\times 630$
- 2 培养 15 d 的细胞, 内质网发达, 与高尔基体、壁旁体相邻, $\times 900$
- 3 培养 15 d 的细胞, 示高尔基体和内质网, $\times 29\ 700$
- 4 培养 15 d 的细胞, 线粒体分裂仍然可见, $\times 5\ 940$
- 5 在 2,4-D 和 BA 培养基上培养 15 d 的愈伤组织的细胞, 细胞质稀疏, $\times 190$

图版说明 M 线粒体, Ch 叶绿体, G 高尔基体, N 细胞核, Nu 核仁, P 质体, RER 粗糙型内质网, V 液泡, Pr 壁旁体。

3 讨 论

对菊苣花梗的薄层细胞外植体在诱导花芽分化期间的超微结构观察,揭示了薄层细胞离体培养下脱分化和再分化过程的一些变化。脱分化前细胞质稀少,细胞器较少,细胞排列疏松,处于代谢活动相对静止状态。细胞脱分化后再分化形成花芽,细胞内部代谢活动非常剧烈,蛋白质代谢旺盛,表现为粗糙型内质网、高尔基体数量较多。Brachet 认为^[7]从分子水平看细胞分化实质上是细胞发育过程中特异蛋白质的合成,分化的过程就是产生新的、专一的结构蛋白与新的功能蛋白的过程。另有报道在细胞分化过程中伴随有蛋白质含量的增加^[8,9],形成芽的愈伤组织中蛋白质含量是没有器官分化的愈伤组织的 5.7 倍^[10]。多聚核糖体相对含量的增加标志着蛋白质合成速率的提高^[11]。本观察结果进一步从超微结构方面证实了这些观点。可能正是大量增加的粗糙型内质网、多聚核糖体和高尔基体合成、加工形成了与花芽分化有关的各种蛋白质。此外,从本结果还可以看出花芽分化是一需高能量的过程。在花芽原基的形成中,线粒体始终有分裂增殖,大量增殖的线粒体为花芽分化的各种代谢活动提供必需的能量保证,这也与 Thorpe“分化的细胞有较高的呼吸作用”的结论一致^[12]。

从外植体开始培养到花芽出现均未观察到胞间连丝的存在,而壁旁体多处可见,且常与内质网、高尔基体相邻,可能壁旁体承担了细胞间的物质运输。

参 考 文 献

- 1 李文安,徐瑞娟,陈永宁. 烟草的不同器官薄层培养形成花芽的研究. 实验生物学报,1989,22(4):385~391
- 2 李颖章,韩碧文. 薄层培养菊苣不定根分化中内源 IAA 和细胞分裂素的动态变化. 植物生理学通讯,1995,31:97~99
- 3 张丕方,王琦. 烟草薄层培养中细胞早期动态的研究. 植物学报,1989;31(6):422~426
- 4 曹国仪,唐锡华. 烟草茎薄层培养直接形成花芽及其极性现象(简报). 植物生理学通讯,1988,3:47~49
- 5 Pihakaski-maunsbach K, Brauner Nygaard K, Jensen K H, et al. Cellular changes in early development of regenerating thin cell layer-explants of rapeseed analyzed by light and electron microscopy. *Physiol Plant*, 1993,87:167~176
- 6 Mangat B S, Pelekis M K, Cassells A C. Changes in the starch content during organogenesis in in vitro cultured *Begonia rex* stem explants. *Physiol Plant*, 1990,79:267~274
- 7 翟中和. 细胞生物学基础. 北京:北京大学出版社,1987,162~171
- 8 李勤报,谭保才,梁厚果等. 烟草愈伤组织继代培养和分化期间蛋白质代谢的比较研究. 植物学报,1993,35(3):179~186
- 9 Katoh Y, Hasegawa T, Suzuki T, et al. Changes in the contents of free protein and amino acids in hiproly barley callus during differentiation. *Agric Biol Chem*, 1984,48:1 405~1 410
- 10 Renaudin J P, Tournaire C. Teyssendier de la Sereve B. Quantitative analysis of protein changes during meristem initiation and bud development in protoplast-derived *Petunia hybrida* callus. *Physiol Plant*, 1991,82:48~56
- 11 Tan B C, Liang H G. Changes in polyribosome population during the growth and senescence of tobacco callus. *Acta Phytophysiol Sinica*, 1989,15:199~204
- 12 Thorpe T A, Biondi S. Regulation of plant organogenesis. In: Karl Maramorosch ed. *Advances in cell culture*. Vol 1. New York:Academic Press, 1981,213~239