

在分化条件下甜菊愈伤组织分生区细胞超微结构研究

谢绍萍 欧阳学智 汪德耀

(中山大学孙文学院, 中山 528403) (厦门大学生物系, 厦门 361005)

摘要 对甜菊 (*Stevia rebaudiana*) 愈伤组织中尚未发生器官分化的分生细胞团进行了超微结构研究。结果表明, 在器官分化条件下, 愈伤组织中形成的分生区域的细胞体积小, 细胞核大, 核仁明显, 且具核仁泡, 部分细胞核中含有核内含物。大量小液泡分布在细胞的边周或散布于整个细胞中。液泡中通常含有陷入的细胞质成分和膜状物。部分液泡的形成与内质网膨大有密切关系。同时也观察到由内质网形成的多圈膜和双层膜包围细胞质成分的同心环结构。高尔基体及其小泡丰富, 有时聚集分布在细胞某一区域。核糖体密集, 有的聚集成多聚核糖体。因此, 愈伤组织中分生区的细胞与分生组织中的液泡化和分裂的细胞类似。分生区细胞的另一明显特征是出现质膜内陷。推测这些超微结构特征可能反映了甜菊愈伤组织器官分化前的某些形态变化。

关键词 甜菊; 组织培养; 分生区; 器官启动; 超微结构

AN ULTRASTRUCTURAL STUDY ON CELLS WITHIN MERISTEMATIC REGIONS IN CALLUS CULTURES OF *STEVIA REBAUDIANA* ON DIFFERENTIATING MEDIUM

Xie Shaoping Ouyang Xuezhi Wang Deyao

(Sunwen College, Zhongshan University, Zhongshan 528403) (Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract An ultrastructural study of the cellular events during the early stages of organization in the zones of localized active cell division was made in the callus cultures of *Stevia rebaudiana*. The callus cultures undergo marked changes in structure when transferred to a differentiating medium containing benzyladenine, which is known to induce organ differentiation in this system. Cells within meristematic regions formed in the callus have small size, large nucleus, some of which contain intranuclear inclusions, with both prominent and vacuolated nucleolus and numerous small vacuoles distributed around the periphery of the cell or dispersed throughout the cytoplasm. In many cases, the presence of cytoplasmic and membranous protrusions was observed in the vacuoles, some of which is in close association with dilated endoplasmic reticulum. Multiple and double membrane-bound concentric structures derived from endoplasmic reticulum were often observed as well.

Dictyosomes and their associated vesicles are common, sometimes appear in groups. The cytoplasm contains ribosomes, which are occasionally seen as clusters of polysomes. Therefore, cells within meristematic regions are similar to the vacuolating and dividing cells of meristem. Another distinctive feature of these cells is the appearance of plasmalemma invaginations. They increase the surface area of the plasmalemma of the cell and may facilitate the absorption of the digested contents of neighboring crushed callus cells. It is concluded that these ultrastructural events reflect some morphological changes which precede organ differentiation in the cultured callus of *Stevia rebaudiana*.

Key words *Stevia rebaudiana*; Tissue culture; Meristematic region; Organ initiation; Ultrastructure

在植物组织培养中, 器官发生或体胚形成的细胞学过程通常是在形成器官原基或体胚以前, 先形成一活跃分裂的细胞团。这种分生细胞团是对形态发生刺激作出反应的结构^[1], 取决于刺激的性质和方向, 使之形成器官或体胚。但并不是所有的分生细胞团都能形成器官原基或体胚。它们有的继续保持分裂状态, 反复增殖, 形成新的愈伤组织; 有的分化为成熟组织如维管组织。那么, 在何种条件下, 哪种类型的分生细胞团能发育成器官原基? 是什么因素在调节和操纵着从未分化的组织团块中发生有组织的结构并再分化出植株? 其内在机理如何? 为了阐明这些问题, 人们已从不同方面进行了大量研究。已经知道, 对一些植物来说, 调节培养基中生长素和细胞分裂素的比例, 可有效地控制这一过程。对器官发生过程中所发生的细胞学变化和生理生化变化已有许多报道和评述^[2-5]。但对与器官原基形成有密切关系的分生细胞团超微结构的研究则很少^[6-8]。分生细胞团是器官发生的基础^[2]。用广泛的材料研究分生细胞团的超微结构变化的规律, 对于阐明愈伤组织如何从分生状态转换为分化状态是有意义的。本文初步报道甜菊愈伤组织在丛芽分化条件下, 其中的分生细胞团细胞的超微结构特征, 为深入研究其形态发生的规律和机理提供资料。

1 材料和方法

甜菊 (*Stevia rebaudiana*) 愈伤组织的诱导与培养同前文^[9]。经多次继代培养后, 将愈伤组织接种于附加 2mg L^{-1} 6-BA 的 MS 培养基上。培养 8-10d 后取材, 用锋利的刀片将愈伤组织块外部形态有变化的部位切成厚约 1mm 的薄片 (置于含少量 2.5% 戊二醛固定液的培养皿中进行)。在双目体视显微镜下切取其中的小细胞团作为电镜样品。以戊二醛-锇酸双重固定, 经系列酒精脱水后, 环氧丙烷过渡, Epon 812 渗透、包埋。包埋块先于 LKB 11800 型锥形切削机修块、切片, 经光镜检查选择需要的部位后, 在 LKB 2088V 型超薄切片机上切片。醋酸铀-柠檬酸铅双染。观察照相用 JEM-100CX II 型透射电镜。

2 观察结果

甜菊愈伤组织在分化培养基上培养 8-10d 后, 在其表层和内部出现一些分生细胞团。这些

分生细胞团细胞与愈伤组织中的其它细胞相比，体积较小，细胞核大，细胞质浓厚，没有中央液泡，只有许多中小液泡(图版 I: 1)。通过对大量分生细胞团的观察，其超微结构特征，大致表现如下：

2.1 细胞核

核大，多呈不规则的裂瓣状，有的核在多处深度内陷。核膜上具明显的核孔。核内以常染色质为主，其中有类核糖体颗粒。核仁大，通常靠细胞核的边缘，由纤维组分和颗粒组分构成，似以颗粒组分居多。现已证明，核仁中的颗粒就是核糖体大亚基的前体。在核膜附近常堆积着大量的这种颗粒。此外，核仁内尚含有一些大小不等的、电子密度与核质相近的区域，即核仁泡。核仁泡内含有松散分布的类核糖体颗粒和纤丝(图版 I: 1-4)。核仁泡以所谓“核仁喷吐”^[10]的方式释出其内含物(图版 I: 2, 箭头)。孙辉等^[10]认为核仁喷吐可能是因核仁泡的扩张、缩小所致。此外，在部分细胞的核内观察到一种与染色质和核仁不同的结构，其电子密度较低，位于核仁附近或核质中。仔细观察可见该结构是由一些重叠的片层状物质构成，无被膜(图版 I: 3,4, 箭头)。Bigazzi^[11]将细胞核内的这种结构统称为核内含物(intranuclear inclusion)。已发现核内含物存在于多种植物细胞中^[11]，但在离体培养的植物细胞中发现核内含物的报道很少^[12]。郑晓峰等^[12]在西洋参胚性细胞和胚状体细胞中看到了核内含物，并推测它们可能与胚性细胞的旺盛合成和代谢有关。尽管核内含物有不同的存在形式，但都由蛋白质组成^[11]，故较普遍的看法是它们可能与蛋白质的积累和分泌有关^[11]。

2.2 细胞质

内质网与液泡 内质网不甚发达，正常的内质网呈伸展状态，其上有核糖体附着，单个存在(图版 I: 6; 图版 II: 3,5,6)。观察到两种特殊形态的内质网，一种是光滑内质网形成同心内质网环或反复缠绕重叠，形成多圈内质网的复合膜状结构，被包围在内的细胞质成分均呈解体状(图版 II: 4)。这种复合膜状结构进一步发展，其中包含的细胞质成分被消化，同时内膜也逐渐解体产生一些小囊泡(图版 II: 2)。这种双层膜和复合膜结构均具溶酶体功能^[13]。另一种特殊形态的内质网是在多处发生局部膨大成念珠状，膨大产生的囊泡外表面大多没有核糖体附着(图版 II: 6)。有的内质网膜间隙充分膨大形成自噬泡(图版 II: 5)。小液泡的自噬活动也是很活跃的，在许多液泡中均见到细胞质成分被消化后的残体(图版 I: 1; 图版 II: 1,3)。

高尔基体 高尔基体非常丰富，分散在细胞质中或数个高尔基体聚集在某一区域(图版 I: 6)。这些高尔基体发育良好，呈活跃的秘密状态，分泌泡中具不定形内含物。

线粒体和质体 线粒体丰富，卵圆形或长棒状，有明显的内嵴，散布在细胞质中，以细胞核和内质网附近略多一些(图版 I: 1; 图版 II: 6)。质体数量较少，呈卵圆形或圆球形，具电子致密的基质，有的可见少量残存的内膜结构，通常没有淀粉粒积累(图版 I: 1,2)。

核糖体 核糖体大多游离于细胞质中，其中有些核糖体聚集成簇，为游离的多核糖体(图版 II: 2,6)。众所周知，游离的核糖体主要是合成细胞的结构蛋白、基质蛋白及细胞本身所需的酶蛋白。细胞内游离核糖体比例大，说明分生细胞在积极地合成上述蛋白分子，以供细胞本身代谢和生长繁殖所需。

2.3 质膜与细胞壁

质膜凹凸不平,呈波浪状,在某些部位向内凹陷成袋状,其中有小泡状、纤丝状或不定形内含物(图版 I: 5; 图版 II: 1,6)。细胞壁薄,具少量胞间连丝(图版 I: 1,2)。

3 讨论

植物愈伤组织的器官发生大致都经历一系列基本相似的过程。即在愈伤组织表层和内部出现局部活跃的细胞分裂区域,形成分生细胞团(也称拟分生组织,分生中心或分生组织结节等),由于其细胞单向极性地旺盛分裂而发育成器官原基^[2]。因此,分生细胞团是器官发生的细胞组织学基础,也即愈伤组织由分生状态向器官分化状态转变的关键过程。在这一过程中,细胞必然经历一个内部调整过程,发生一系列结构与功能的变化,以适应器官再生的需要。

3.1 细胞核的变化

分生细胞的细胞核有以下明显特征:(1)多呈不规则的裂瓣状,这样的细胞核与细胞质保持有较大的接触界面,有利于核质间物质交换和能量交换;(2)具明显的核膜孔,且附近有线粒体、粗面内质网分布;(3)细胞核内部的超微结构特征表明其处于活跃的功能状态,如核中以常染色质为主,核仁边移,且有核仁泡出现,有的核仁泡边移与核质相通,这样有利于核仁内物质向细胞质转运。Deltour 等^[14]认为核仁泡是在核仁内核糖核蛋白输出迅速增加时形成,其功能是增加核仁-核质交换表面。人们早已注意到核仁结构和大小的变化取决于细胞对核糖体的需求,也就反映着细胞蛋白质合成代谢的变化。从本实验观察结果可见,核仁以颗粒组分为主。颗粒区是 rRNA 和蛋白质形成的核糖体前体构成的,颗粒区的比例越大,rRNA 合成活性越高^[15]。由此可见,在甜菊愈伤组织分生细胞团中,有旺盛的 rRNA 合成并迅速向细胞质运输,从而为继后的器官形成和发育奠定物质基础。

3.2 自体吞噬活动与器官启动的关系

细胞分化和组织器官的形成、改建,往往是通过组织细胞的破坏和新生来实现的。尽管这些过程的机制尚不清楚,但自体吞噬对于细胞器的更新和组织分化具有重要作用是肯定的。在过去关于组织培养器官发生的超微结构研究中,一些学者也曾注意到液泡内含物如电子致密物、丝状物增多^[6,8]。虽然没有与自噬联系起来,但实际上可能与液泡的自噬活动增强有关。最近王亚馥等^[16]发现在小麦胚性愈伤组织细胞中存在自噬泡。根据目前的资料所知,自体吞噬在离体形态建成中的作用有:(1)自噬可引起细胞质改组而使细胞获得胚性发生的能力。在花药培养中胞质改组有消除花粉中原有配子体影响而建立孢子体发育程序的作用^[17];(2)自噬过程消化一些已失去功能的细胞器和大分子物质,而消化产物可重新利用,为新生结构提供物质和能量,故可看成是细胞自身的一种生理调整。因此自体吞噬与器官原基启动有关。

3.3 质膜的变化与细胞间的物质交换

在愈伤组织细胞中,分生细胞团是最活跃的新生组织。作为组织分化和形态建成部位,细胞各类大分子物质分解和合成活跃,需要大量的代谢底物和能源供应。显然,在愈伤组织中,分生细胞团在营养摄取上占着绝对优势。但在本实验中,未观察到这些细胞出现大量贮藏物质的积

累,说明运入器官形成部位的营养成分被大量利用,作为蛋白质、核酸等合成的碳架或作为能源被消耗。细胞表现活跃的自噬活动,显示这些细胞具有很强的溶酶体活性,这可能正反映了外源物质在其中的消化、改组。然而,营养物质特别是大分子物质(如附近愈伤组织细胞的解体产物)以何种方式和途径进入分生细胞团,这在离体器官发生研究方面还是一个不甚明确的问题。分生细胞间的胞间连丝往往不多^[7]。显然,仅依赖共质体运输不能满足细胞活跃代谢的物质和能量的需要。在一些胚性细胞中常存在质膜内陷,且其中有内含物^[16,18]。我们在甜菊愈伤组织分生细胞中也观察到这种具内含物的质膜内陷的频繁出现。现认为这种结构在大分子物质运输中特别是在细胞摄取大分子物质方面起重要作用^[19,20]。因此,在甜菊愈伤组织分生细胞中,质膜内陷和自噬结构的形成,正体现了结构变化与物质运输和利用功能加强相适应,为各种物质的加速转运和利用提供了结构基础,从而保证分生细胞团细胞的正常增殖、发育和适时分化。

综上所述,在器官原基分化前,分生细胞团细胞内各种结构和成分发生了一系列变化,以适应新的发育状态的来临。主要表现在:(1)细胞核内进行各种RNA的合成并迅速转移到胞质中,为蛋白质合成提供物质基础;(2)线粒体含量丰富,内嵴发达,保证了细胞分裂和继后的器官原基分化发育过程必要的能量供应;(3)丰富的游离核糖体和高尔基体,为各种蛋白质合成、加工和运输提供了结构基础;(4)活跃的自噬活动,可以清除一些不需要的信息物质和非功能组分,以利于分生细胞团向器官分化状态转化。分生细胞团经历上述变化,完成了器官原基的诱导启动过程,开始进入器官原基形成期。

参考文献

- 1 Torrey J G. The initiation of organized development in plants. *Advan Morphogenesis*, 1966, 5:39-91
- 2 王凯基, 张丕方, 倪德祥等. 油橄榄组织培养的细胞组织学研究 II. 组织分化和器官发生. *植物学报*, 1979, 21:225-230
- 3 韩碧文, 李颖章. 植物组织培养中器官建成的生理生化基础. *植物学通报*, 1993, 10(2):1-6
- 4 Patel K R, Berlyn G P. Cytochemical investigations on multiple bud formation in tissue cultures of *Pinus coulteri*. *Can J Bot*, 1983, 575-585
- 5 Thorpe T A. Organogenesis *in vitro*: structural, physiological and biochemical aspects. *International Review of Cytology*, 1980, 11A(suppl): 71-111
- 6 Asbell C W. Ultrastructural modifications during shoot formation *in vitro*. *In Vitro*, 1977, 13:180
- 7 Howarth M J, Peterson R L, Tomes D T. Cellular differentiation in small clumps of *Lotus corniculatus* callus. *Can J Bot*, 1983, 61:507-517
- 8 Ross M K, Thorpe T A, Costerton J W. Ultrastructural aspects of shoot initiation in tobacco callus cultures. *Amer J Bot*, 1973, 60:788-795
- 9 欧阳学智, 洪维康, 陈睦传等. 甜菊叶愈伤组织诱导过程中叶绿体的超微结构变化. *武汉植物学研究*, 1993, 11:61-66
- 10 孙辉, 陆敏, 徐爱菊. 沙打旺组织培养中脱分化细胞的超微结构及细胞核的动态变化. *武汉植物学研究*, 1994, 12:53-57
- 11 Bigazzi M. Ultrastructural and cytochemical observations on fibrillar intranuclear inclusions in the family Campanulaceae. *Caryologia*, 1986, 39:199-210

- 12 郑晓峰, 黄百渠. 西洋参胚性细胞和胚状体细胞中的核内含体与细胞质内含体. 植物学报, 1994, 36:73-74
- 13 Schulz P, Jensen W A. Prefertilization ovule development in *Capsella*: the dyad, tetrad, development megaspore, and two-nucleate gametophyte. *Can J Bot*, 1986, 64:875-884
- 14 Deltour R, De Bary T. Nucleolar activation and vacuolation in embryo radicle cells during early germination. *J Cell Sci*, 1985, 76:67-83
- 15 Rose R J. Changes in nucleolar activity during the growth and development of the wheat coleoptile. *Protoplasma*, 1974, 79:127-143
- 16 王亚薇, 崔凯荣, 汪丽虹等. 小麦体细胞胚发生的超微结构研究. 植物学报, 1994, 36:418-422
- 17 Rashid A, Siddiqui A W, Reinert J. Subcellular aspects of origin and structure of pollen embryos of *Nicotiana*. *Protoplasma*, 1982, 113:202-208
- 18 Verdu M C, Dubois T, Dubois J et al. Ultrastructural changes in leaves of *Cichorium* during somatic embryogenesis. *Ann Bot*, 1993, 72:375-383
- 19 Low P S, Chandra S. Endocytosis in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1994, 45:609-631
- 20 Nishizawa N, Mori S. Invagination of plasmalemma: its role in the absorption of macromolecules in rice roots. *Plant Cell Physiol*, 1977, 18:767-782

图版说明

Cw — 细胞壁 Cell wall; D — 高尔基体 Dictyosome; M — 线粒体 Mitochondrion; N — 细胞核 Nucleus;
 Nu — 核仁 Nucleolus; P — 质体 Plastid; Pd — 胞间连丝 Plasmodesma; Rer — 粗面内质网 Rough
 endoplasmic reticulum; Ser — 滑面内质网 Smooth endoplasmic reticulum; V — 液泡 Vacuole

图版 I

1. 愈伤组织边缘分生细胞, 细胞核位于细胞中央, 核仁明显, 细胞质浓厚, 许多小液泡分布在边缘细胞质, 其中含有膜状和细胞质伸出物, 细胞壁薄, 具胞间连丝; ×5110
2. 裂瓣状细胞核的一部分, 示核仁泡将其内含物释放到核质中(箭头); ×16220
3. 许多核糖体样颗粒聚集在核被膜附近, 注意核仁泡和核内含物(箭头); ×23380
4. 核内含物(箭头)与核仁紧靠在一起. 一个大的核仁泡含有许多核糖体样颗粒和纤维; ×15800
5. 示细胞核的裂瓣部分和质膜内陷, 内陷中含有小泡和其它细胞成分包括核糖体; ×30000
6. 呈活跃分泌状态的高尔基体, 其分泌泡与高尔基液泡相连或游离于细胞质中. 粗面内质网以单个液泡形式存在; ×43500

图版 II

1. 质膜呈波浪状, 在某些地方显示明显的内陷. 箭头示杯状液泡包围部分细胞质包括一个线粒体; ×19000
2. 多圈同心内质网液泡中的一些内膜转化为一些小泡; ×27930
3. 示线粒体、自噬泡和内质网. 箭头示核孔; ×29000
4. 滑面内质网反复折叠形成多圈同心液泡, 并分隔一部分细胞质进行降解, 邻近的双层膜小泡含细胞残渣或电子透明的内含物; ×35960

5. 内质网大范围膨大形成自噬泡，仍可见与之相连的未膨大内质网潴泡(箭头)。注意自噬泡正以其界膜内陷的方式吞噬细胞成分；×24430
6. 粗面内质网多处膨大形成一些不规则的、仍与粗面内质网相连的小泡。注意膨大的区域是光滑的或只有少量核糖体附着，而并列的区域是粗糙的，即有核糖体附着。×24000

Explanation of plates

Plate I

1. Peripheral meristematic cells of callus contain a central nucleus with prominent nucleolus, a high cytoplasmic density and numerous small vacuoles distributed peripherally in the cytoplasm, often with membranous and cytoplasmic protrusions. Cell walls are thin with some plasmodesmata; ×5110
2. Part of a lobed nucleus with the deep invaginations of the nuclear envelope, showing nucleolar vacuole releasing its contents into the nucleoplasm (arrow); ×16220
3. Numerous ribosome-like granules aggregate near the nuclear envelope. Note nucleolar vacuole and intranuclear inclusion (arrow); ×23380
4. Intranuclear inclusion (arrow) in close proximity to the nucleolus. A large nucleolar vacuole contains loosely dispersed ribosomal-like particles and fibrils; ×15800
5. Showing lobed part of a nucleus and the plasmalemma invagination with vesicles and other cellular component including ribosomes; ×30000
6. Showing dictyosomes in active secretion and their secretory vesicles, either associated with the cisternae or free in the cytoplasm. Rer is present as individual cisternae; ×43500

Plate II

1. Plasmalemma has a very undulated appearance and in some places appears conspicuous invaginations that project into the peripheral cytoplasm. Arrow indicates cupuliform vacuole surrounding a protrusion of cytoplasm containing a mitochondrion; ×19000
2. Transformation of some internal membranes into vesicles in a multiple concentric ER (endoplasmic reticulum) cisternae; ×27930
3. Showing mitochondria, autophagic vacuole and ER. Arrow shows a nuclear pore; ×29000
4. Smooth endoplasmic reticulum fold repeatedly to form multiple concentric cisternae and sequester a portion of the cytoplasm for destruction. Neighbouring double-membraned vesicles contain cellular debris or electron transparent contents; ×35960
5. Dilatation of large areas of ER leading to formation of autophagic vacuole associated with still-visible undilated ER cisternae (arrow). Note that the autophagic vacuole is engulfing cellular components by invagination of the limiting membrane; ×24430
6. The Rer cisternae swell at several points to form some irregularly shaped vesicles still being connected with Rer. Note the dilated regions are smooth or carry only few ribosomes while the juxtaposed regions are rough; ×24000