

# 离体培养细胞表面的扫描电镜观察

郭晓才 蒋 辉 吴伯骥 郑国锴

(中国科学院成都生物研究所, 成都 610041) (兰州大学细胞生物学研究室, 兰州)

**摘 要** 对离体培养植物细胞(胡萝卜细胞和烟草细胞)的表面进行了扫描电镜观察。结果表明, 愈伤组织表面细胞的表面上分布有颗粒和纤丝。颗粒的形状、大小及分布有各种各样, 有些颗粒顶部凹陷成小坑。纤丝大多与颗粒相连, 在有些细胞表面上纤丝交织成网络。对这些颗粒和纤丝的分泌活动及调节, 以及颗粒和纤丝在细胞之间粘连中的作用, 进行了讨论。

**关键词** 离体培养 细胞表面 壁物质分泌 细胞间粘连

植物嫁接时, 砧木与接穗的切削面接触后有一深着色带形成, 构成一个界面把砧木和接穗二者的细胞分隔开, 此带即为隔离层<sup>[1~3]</sup>, 又称接触层<sup>[1]</sup>或坏死层<sup>[1,4,5]</sup>。随着嫁接天数的推移, 隔离层或解体消失或木质化、木栓化<sup>[4~6]</sup>。一般认为隔离层来源于嫁接面切伤细胞的碎片如膜和壁的碎片<sup>[1~5]</sup>, 因此认为隔离层的形成对嫁接成功与否并非是必不可少的<sup>[7]</sup>。我们在用科间植物细胞离体共培养研究科间细胞共质联系形成时, 发现了隔离层的存在<sup>[17]</sup>; Moore 和 Walker 也曾观察到同样的现象, 但只是看作界面, 而未与隔离层相联系<sup>[8]</sup>。离体细胞共培养时, 仅仅把两小块愈伤组织的表面靠在一起, 并未涉及到细胞的损伤, 因而关于隔离层的起源及其在细胞接触后建立次生联系中的作用有待深入研究。为解决这一问题, 我们对离体培养细胞的表面进行了扫描电镜观察。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料及其离体培养

所用材料为普通烟草(*Nicotiana tabacum*)和胡萝卜(*Daucus carota*)。离体培养如前文<sup>[17]</sup>。

### 1.2 扫描电镜制样及观察

取在固体培养基上继代培养 15 天左右的新鲜愈伤组织, 切取带有上表面(朝向空气的表面)的小块, 2%戊二醛(用 0.1M 磷酸钠盐缓冲液配制, pH7.2)固定, 4℃, 3h 或过夜。乙醇系列脱水, 冰冻干燥或临界点干燥, 喷金, 扫描电镜观察。

## 2 结果与分析

## 2.1 胡萝卜细胞表面

2.1.1 表面的颗粒(小珠) 离体培养的胡萝卜愈伤组织,其表面细胞的表面上有很多球型隆起,或疣状突起呈颗粒或小珠状(附图 1~3,9~16)。颗粒的大小各不相同,大的约为 $2\sim 5\mu\text{m}$ 。颗粒的形态也呈各种各样:有些球形颗粒,在接近细胞表面处缢缩变细(附图 11,13);有些则为大的扁平隆起,似为细胞表面本身隆起(附图 9,10);有些小颗粒贴在细胞表面,或为小的半球形或不规则形状的突起(附图 1~3,9~16,17~19);有些颗粒与其下方的细胞表面有短丝连着(附图 10,14),而很多颗粒则有呈不规则突起的“基座”,有些这样的基座为几个融合所成(附图 2,3,11~14)。相邻的颗粒也可融合(附图 2,3,14,15),这种融合也可在相邻的细胞之间看到(附图 11~13,15,16),构成了细胞之间的桥。颗粒表面一般为光滑的,但在较高放大倍数下( $\times 7000\sim 10000$ )可见到有些颗粒表面粗糙,密布微细的颗粒,并非光滑的。很多颗粒顶部凹陷成小坑,这些凹陷有单个的较大的坑,有些则为多个小坑(附图 11~16,18)。从这些顶部凹陷小坑的颗粒来看,颗粒表面似有一层薄膜覆盖,尤其是多个小坑状的凹陷,似为这层膜皱折。在一部分颗粒表面可看到界限分明的两部分,颗粒的顶部似有一个帽子状的“盖子”(附图 1,2,11~13),盖子的边沿略为皱折。

颗粒在细胞表面的分布并不十分均匀。上方(朝向空气一方)的区域要多些。

2.1.2 表面的纤丝 在胡萝卜细胞表面常可见到纤丝。纤丝一般与颗粒相连,可把颗粒串起来,一个颗粒常可有多根纤丝相连(附图 14,15,19,20)。纤丝或长或短,直径可达 $100\sim 200\text{nm}$ 。在有些细胞的表面,可见到细纤丝交织构成的网络和汇集缠绕而成的“绳结”状的结构(附图 21,22)。

2.1.3 细胞间的连系 相邻细胞的邻接处除有颗粒融合形成桥以外,还有一种“绳索”状的结构,把不同的细胞连在一起(附图 23,24)。另外,常可见到细胞之间有一层薄膜状的结构相连(附图 17~19),这一膜状结构可能有细纤丝的参与(附图 17)。

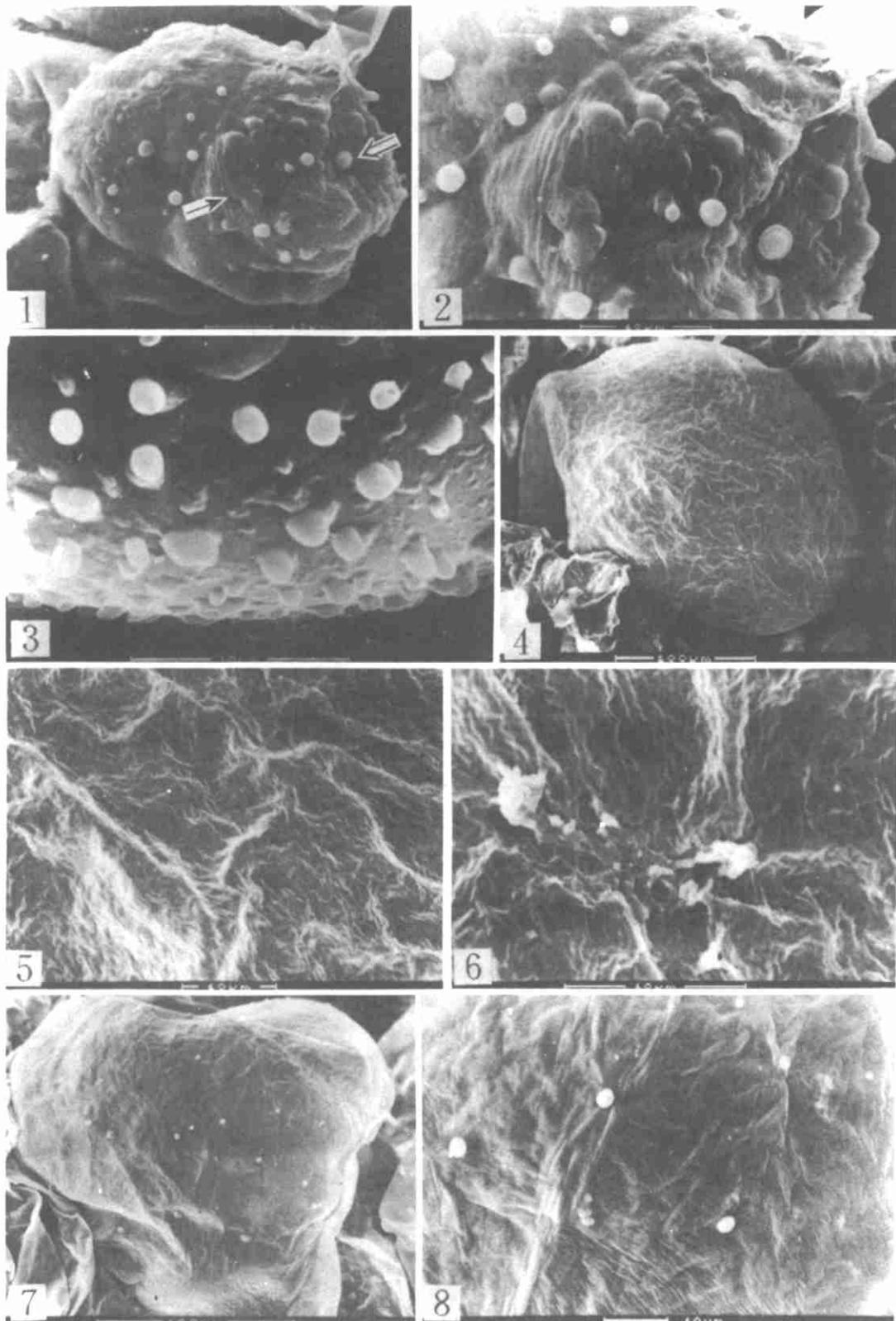
## 2.2 烟草细胞的表面

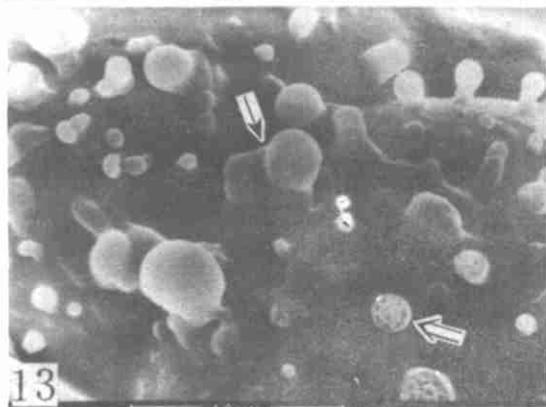
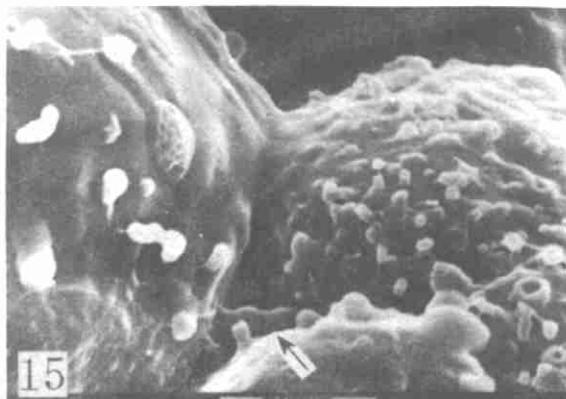
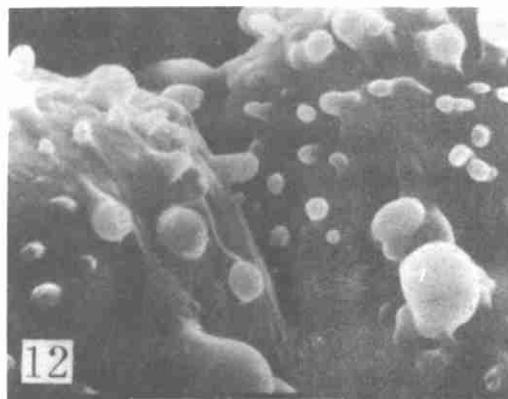
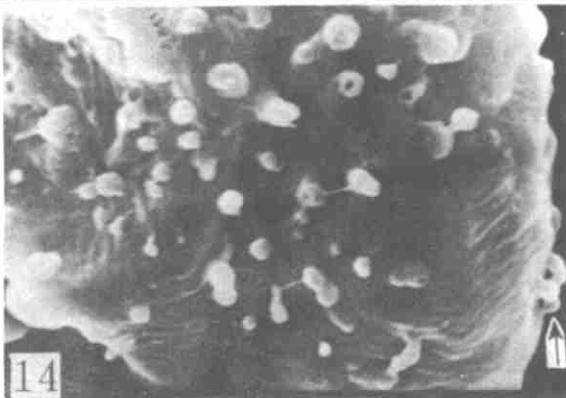
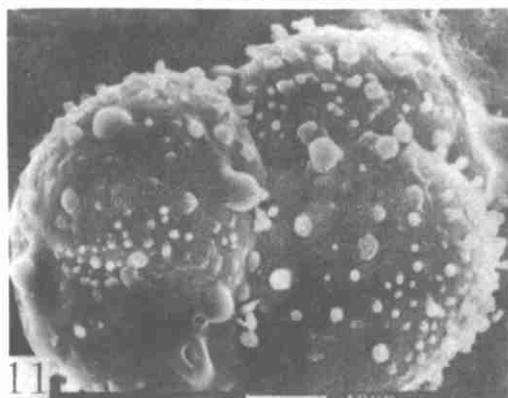
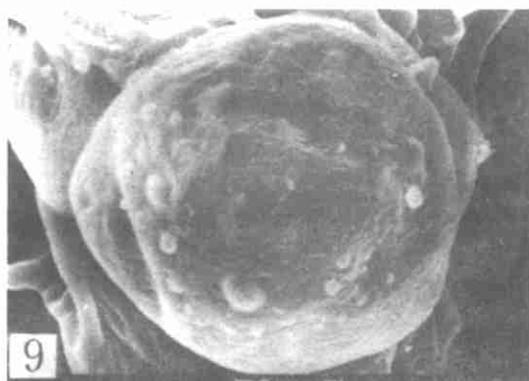
离体培养的烟草愈伤组织细胞直径很大,可达 $200\mu\text{m}$ 以上(附图 4,7);而胡萝卜细胞的直径一般为 $40\sim 80\mu\text{m}$ 左右(附图 1,9,11)。二者在同一培养条件下的这种差别,使得二者很易区分。在非常疏松的烟草愈伤组织细胞表面,颗粒很少,并未见到纤丝。但细胞表面呈“山脉”状的皱折(附图 5,6,8)。在稍紧密的烟草愈伤组织细胞表面,颗粒分布稍多(附图 7,8)。颗粒直径大约为 $2\sim 3\mu\text{m}$ 。有些颗粒也可见到顶部凹陷。

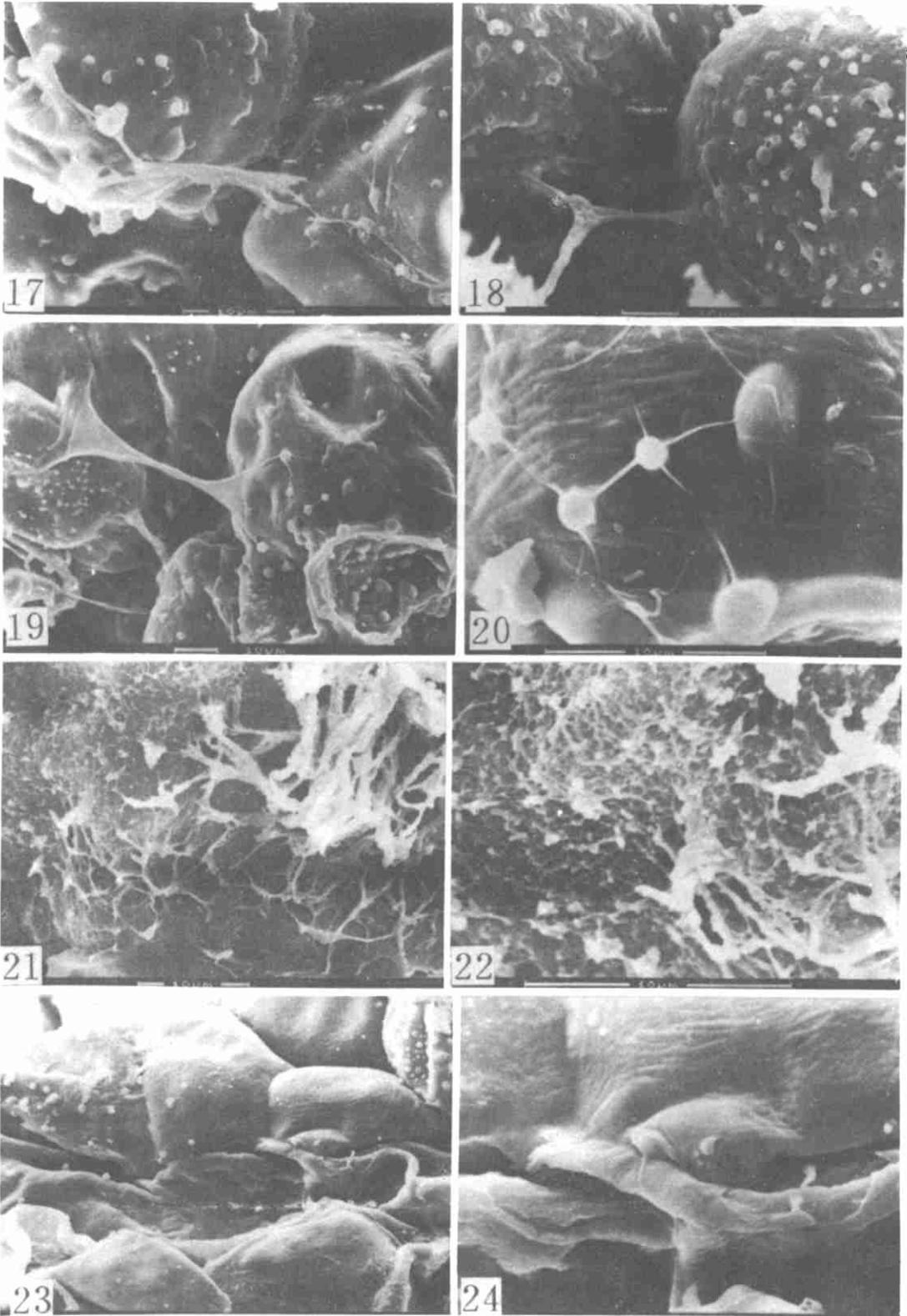
## 3 讨论

### 3.1 离体培养细胞表面的颗粒

离体培养的胡萝卜愈伤组织和烟草愈伤组织,其表面细胞的细胞壁表面均有球形隆起或为疣状(乳头状)的突起形成表面颗粒(小珠)。颗粒的大小、形态和分布,与原生质体细胞壁再生时的情况很类似<sup>[9]</sup>。Jeffree 和 Yeoman 用西红柿研究嫁接时,在嫁接面的愈伤细胞表面也曾观察到这种颗粒<sup>[10]</sup>。







附图 胡萝卜、烟草愈伤组织扫描电镜图

1~3, 9~24. 胡萝卜愈伤组织细胞表面。相邻的颗粒可相互融合(↗);有些颗粒分成界限分明的两部分,其顶部如一个“帽子”(♂)。2. 为1的局部放大。3. 可见大部分颗粒有一不规则基座。4~8. 烟草愈伤组织细胞表面:4. 疏松愈伤组织的细胞,表面呈“山脉”状皱折。5,6. 为4的局部放大。7. 较为紧密(仍不致密)的愈伤组织细胞,表面分布有颗粒。8. 为7的局部放大。9. 细胞表面的颗粒和大的扁平隆起。有些颗粒与细胞表面之间有短的纤丝相连。10. 为9的局部放大。11. 几个相邻的细胞,表面有很多颗粒。相邻颗粒可融合,球形的颗粒下有不规则的基座。有些基座为几个融合而成,其上方有一个大的球形颗粒(♂)。有些颗粒的顶部凹陷成小坑(♂)。12~13. 为11的局部放大。14. 相邻颗粒可融合(↗),有些颗粒有短纤丝相连,有些颗粒顶部凹陷。15. 除有与短纤丝相连的颗粒、相互融合的颗粒、顶部凹陷的颗粒之外,相邻细胞之间的颗粒相互融合成“桥”(↗)。16. 细胞间颗粒融合形成“桥”。17~19. 细胞间有一薄膜状的结构相连,这些薄膜状结构可能有细纤丝参与。18. 很多颗粒顶部凹陷。19. 颗粒之间有纤丝串起来,每个颗粒可有4根纤丝相连。20. 为19的局部放大。21. 纤丝在细胞表面构成网络,多条纤丝拧成一种“绳结”状的结构。22. 为21的局部放大,示“绳结”状结构的细节。23. 有一种“绳索”状的结构出现在细胞的外表面,把相邻的细胞连接在一起。24. 为23的局部放大,“绳索”状结构与细胞相连。

烟草原生质体细胞壁再生时,培养24h的原生质体表面有大量的小突起(颗粒)出现,培养48h后这些颗粒则看不到了<sup>[9]</sup>。在植物嫁接中发现,嫁接48h时即可观察到颗粒,并且发现颗粒的形成与砧木—接穗间的细胞接触与否无关<sup>[10]</sup>。我们的观察也表明,颗粒的出现与相对的两个细胞之间是否接触无关。而且,在愈伤组织表面细胞——无论是离体培养的还是嫁接面上形成的<sup>[10]</sup>,其表面上的颗粒在较长的时间段里均可见到,前者为继代培养20天以上的愈伤组织块,后者在嫁接144h的嫁接面<sup>[10]</sup>。这一时间关系不同于原生质体细胞壁再生时的情况。

细胞表面颗粒形成的这一特点表明,颗粒的出现可能只与细胞本身的生长状况有关。我们认为,颗粒的出现及形态变化反映了细胞壁(初生壁)沉积加厚的过程。由相邻细胞各自的初生壁和一层中胶层构成的三层夹板式的细胞壁(称之为结合壁),其厚度达到一定时(一般为0.1~1.0 $\mu\text{m}$ ),壁物质的沉积速度与细胞生长速度相匹配,从而以该厚度保持;而当细胞壁面积增加停止时,壁物质的净合成即停止<sup>[11]</sup>。在我们的培养条件下,愈伤组织细胞分裂速度和细胞体积增大均很快,因此壁物质分泌活跃;在暴露于空气的细胞表面(因未与别的细胞壁结合,称之为自由壁)真实地表现了这种分泌活动,即隆起和颗粒的出现。颗粒的大小、形态、数量和分布反映了分泌的过程。相邻颗粒可融合,最终可能会在细胞表面形成较平坦的一层。而像角质化、木栓化、木质化等进行时,有关物质的分泌是否也通过类似方式,有待研究。

壁物质分泌时,细胞内膜系统正进行活跃的合成和分泌活动<sup>[11]</sup>。这种分泌活动本身也可能通过很薄的细胞壁体现出来,如那些大的扁平隆起,其下面可能有壁旁体<sup>[10,12]</sup>。同时,脂质、蛋白质和水解酶类也可能以颗粒(小珠)或小泡的形式分泌出来,脂质被有机溶剂抽提后<sup>[10]</sup>,或水解酶小泡的内容物渗漏后,形成颗粒顶部的凹陷;这种凹陷的颗粒,早期阶段是否就是成明显两部分、顶部为帽子状盖子或顶膜的颗粒(图1,2,11~13)?有待进一步研究。

### 3.2 离体培养细胞表面的纤丝

培养细胞表面常可见到纤丝,纤丝常与颗粒相连,并可形成纤丝网络。在原生质体细胞壁再生时,也常见到类似现象<sup>[9,13]</sup>,培养24h时的烟草原生质体表面可见到纤丝,48h时则成连续的纤丝网络。在植物嫁接时,嫁接面愈伤细胞表面也见到纤丝网络,但未见与颗粒相连的纤丝<sup>[10]</sup>。这种网络出现在嫁接后24h的愈伤细胞表面,后来则消失。我们的观察则表明,纤丝网络在不同继代培养天数的细胞表面均可看到。原生质体再生壁早期的细胞表面看到的纤丝及纤丝网络,与愈伤细胞表面看到的是否在化学成分上一致?形成过程是否相同?尚待进一步研究。

在原生质壁再生研究中,认为纤丝可能是纤维素<sup>[14,15]</sup>,从纤丝的两端或一端生长伸长<sup>[9]</sup>。Burgess 和 Linstead 提出,突起的颗粒可能构成纤丝生长中心<sup>[9]</sup>。而 Grout<sup>[15]</sup>则认为纤维素微丝沉积或结晶在细胞表面形成纤丝。这种纤丝可能构成初生壁中的纤丝层<sup>[13]</sup>。愈伤细胞表面的纤丝形成过程尚待研究。

### 3.3 壁物质分泌活动与细胞间的粘连

我们的观察表明,疏松的愈伤组织其细胞表面的颗粒少,而较为紧密的愈伤组织的细胞表面颗粒较多。这一现象可能正好反映了细胞间粘连与细胞表面壁物质分泌的关系。原生质体研究中,也发现细胞壁再生与原生质体间的粘连有关<sup>[16]</sup>。细胞接触后,借助于表面的颗粒而粘连,纤丝则可能交联成细胞之间的网络而加强粘连。原生质体粘连中也观察到纤维的交织<sup>[16]</sup>。颗粒和纤丝的不断分泌和沉积就可能构成了隔离层。颗粒和纤丝的化学性质,初步证明是由多糖分子组成,这与原生质体再生壁相一致<sup>[16]</sup>,进一步的细胞化学工作正在进行。

壁物质的分泌和沉积可能是一自发过程;壁物质中可能含有某些信息分子来反馈有关信息,以使壁物质分泌活动减慢或停止。

**鸣谢** 本课题得到中国科学院成都生物研究所所长基金资助;孙桃珍参加离体培养、扫描电镜制样等工作,谨致谢意。

### 参 考 文 献

- 1 Kollmann R, Glockmann C. Studies on graft unions. I. Plasmodesmata between cells of plants belonging to different unrelated taxa. *Protoplasma*, 1985, 124: 224—235
- 2 Yang S, Xiang G, Zhang S, Lou C. Electrical resistance as a measure of graft union. *J Plant Physiol*, 1992, 141: 98—104
- 3 杨世杰. 高等植物嫁接过程的组织学和细胞学研究. *植物学通报*, 1985, 3(3): 1~7
- 4 Moore R, Walker DB. Studies of vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. I. A structural study of a compatible autograft in *Sedum telephoides* (Crassulaceae). *Amer J Bot*, 1981, 68: 820—830
- 5 Moore R, Walker DB. Studies of vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. II. A structural study of an incompatible heterograft between *Sedum telephoides* (Crassulaceae) and *Solanum Pennellii* (Solanaceae). *Amer J Bot*, 1981, 68: 831—842
- 6 Deloire A, Hebant C. Peroxidase activity and lignification at the interface between stock and scion of compatible and incompatible grafts of *Capsicum* on *Lycopersicum*. *Ann Bot*, 1982, 49: 887—891
- 7 杨世杰. *Impatiens walleriana*/*Impatiens olivieri* 嫁接过程的组织学和细胞学观察. *北京农业大学学报*, 1987, 13: 359~366
- 8 Moore R, Walker DB. Studies of vegetative compatibility-incompatibility in higher plants. VI. Grafting of *Sedum* and *Solanum* callus tissue *in vitro*. *Protoplasma*, 1983, 115: 114—121
- 9 Burgess J, Linstead PJ. Scanning electron microscopy of cell wall formation around isolated plant protoplasts. *Planta*, 1976, 131: 173—178
- 10 Jeffree CE, Yeoman MM. Development of intercellular connections between opposing cells in a graft union. *New Phytol*, 1983, 93: 491—509
- 11 Brett C, Waldron K. *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*. London: Unwin Hyman, 1990, 58

- 12 杨世杰, 娄成后. 嫁接隔离层两侧愈伤组织中的壁疣体. 植物学报, 1988, 30: 480~484
- 13 吴燕, 周嫦. 唐菖蒲花粉原生质体及其萌发花粉管的超微结构研究. 植物学报, 1990, 32: 493~498
- 14 Burgess J, Fleming EN. Ultrastructural observations of cell wall regeneration around isolated tobacco protoplasts. J Cell Sci, 1974, 14: 439-449
- 15 Grout BWW. Cellulose microfibril deposition at the plasmalemma surface of regenerating tobacco mesophyll protoplasts; a deep-etch study. Planta, 1975, 123: 275-282
- 16 李喜文, 安利佳, 佟德娟等. 细叶黄芪叶肉原生质体发育早期细胞壁再生的研究. 植物学报, 1994, 36: 24
- 17 郭晓方, 吴伯骥, 蒋辉等. 离体细胞共培养中科间细胞共质体的形成. 植物学报, 1995, 37: 339~345.

## Observations on Surface of Plant Cell Cultured *in vitro* by Scanning Electron Microscopy

Guo Xiaocai Jiang Hui Wu Boji

(Chengdu Institute of Biology, Academia Sinica, Chengdu 610041)

Zheng Guocheng

(Laboratory of Cyto biology, Lanzhou University)

**Abstract** The surfaces of plant callus cells cultured *in vitro* from two species, *Daucus carota* and *Nicotiana tabacum*, were studied using scanning electron microscopy. A number of spherical-hemispherical protuberances or beads (papillary projections) in various sizes shapes occurred on the outer surfaces of the callus cell walls. Most of the protuberances appeared with a spherical bead on an irregular base projected on the cell wall surfaces and some of the larger bases were fused from two or more smaller ones. And adjacent projections could fuse also. Some of the spherical beads exhibited two clearly distinct regions, an upper region was distinct from the basal region by a granular appearance of margin, and a lot of the spherical beads or more flattened projections collapsed as a hollow at its top part might developed from these two part projections.

A number of fibrils were seen to be associated with one or more of the projections on the surfaces of the carrot callus cell walls, and some of the cells coated with a fibrillar mat, but not all of the projections were associated with fibrils. And the fibrils or fibrillar mats were not seen on the surfaces of the more loosely packed tobacco callus cells.

The projections could fuse to form bridges between adjacent cells, and the fibrils could interlace intercellularly. Those observations might be taken as some evidence of initial adhesion between opposing cells from two unrelated calli after contact. The process of wall material secretion and its control were discussed.

**Key words:** *In vitro* culture; Cell surface; Wall material secretion; Cell adhesion