

## 蔗糖诱导拟南芥幼苗胚轴维管束细胞数量增多

刘林\*

临沂大学生命科学学院, 山东临沂276005

**摘要:** 为揭示蔗糖能否引起植物胚轴维管束细胞数量增多, 将拟南芥播种于添加88 mmol·L<sup>-1</sup>蔗糖和不添加糖的MS培养基上, 对生长在不同培养基上的幼苗胚轴横切, 显微镜下统计切片上维管束细胞数量。结果显示, 与不加糖相比, 加糖条件下萌发4 d后幼苗维管束细胞总数增加约70%, 维管薄壁细胞和导管分子都增加100%以上, 筛管分子增加约90%, 中柱鞘细胞数量不变。显然, 蔗糖不仅使维管束薄壁细胞数量增多, 也使筛管分子和导管分子数量增多。因此认为, 添加蔗糖对拟南芥幼苗胚轴维管束具有双重效应, 既引起维管薄壁细胞增殖, 又促进维管薄壁细胞分化, 从而使导管分子和筛管分子数量增多。

**关键词:** 蔗糖; 拟南芥; 胚轴; 维管束

## Sucrose Induction of Increase in Hypocotyl Vascular Cell Number of *Arabidopsis* Seedlings

LIU Lin\*

College of Life Sciences, Linyi University, Linyi, Shandong 276005, China

**Abstract:** In order to understand whether increased sucrose could stimulate cell proliferation and conducting element differentiation in vasculatures, *Arabidopsis* seeds were sowed on sucrose-free and sucrose-added media. Cell numbers in vasculatures of cross sections of hypocotyls from seedlings grown on media with and without addition of sucrose were compared by means of microscopy. Compared to those in seedlings grown on the medium without addition of sugar, the total number of hypocotyl vascular cells in seedlings grown on the sucrose-added medium is increased by around 70%, the numbers of parenchyma cells and vessel elements are increased by over 100%, the number of sieve elements increased by about 90%, while the number of pericycle cells remains unchanged. Obviously, sucrose not only induces proliferation of vascular parenchyma cells, but also promotes differentiation of parenchyma cells into sieve and vessel elements. Based on these observations, it is concluded that the increased sucrose have dual functions in hypocotyl vasculatures in young *Arabidopsis* seedlings, parenchyma cell proliferation and concomitant cell differentiation that leads to increased numbers of vessel and sieve elements.

**Key words:** sucrose; *Arabidopsis thaliana*; hypocotyl; vasculature

蔗糖是光合作用的主要产物, 也是碳同化物长途运输的主要形式(Jang和Sheen 1994; Ward等1998)。蔗糖不仅参与代谢过程, 还作为信号分子参与调节植物生长发育的许多过程(Smeekens 2000; Rognoni等2007; Smith和Stitt 2007), 其中包括蔗糖参与细胞分裂过程的调控(Riou-Khamlichi等1999, 2000; Gaudin等2000)。对细胞分裂过程的调控是通过调节周期蛋白基因表达而实现的(Smeekens等2010)。很多研究表明蔗糖诱导G1期细胞周期蛋白D基因的表达(Masubelele等2005; Menges等2006)以及E2F家族成员基因的表达(Mariconti等2002; Desvoyes等2006; Hirano等2008, 2011)。人们早就注意到蔗糖能够诱导顶端分生组

织和体外培养组织发生细胞分裂(Ballard和Wildman 1964; Van't Hof 1966; Van't Hof和Rost 1972; Riou-Khamlichi等2000; Brouquisse等2007), 但是, 蔗糖能否诱导维管束内发生细胞分裂从而使维管束细胞数量增多, 还鲜有报导。

双子叶植物胚轴中央有中柱(维管束), 其最外层是中柱鞘, 包围着里面的木质部和韧皮部。拟南芥有明显下胚轴, 在种子发育时期建立, 位于子

收稿 2012-08-01 修定 2012-08-22

资助 山东省自然科学基金(ZR2011CL002)和临沂大学科研计划项目(HX09104)。

\* 通讯作者(E-mail: liulinlyu163@163.com; Tel: 0539-8766310)。

叶着生点与胚根之间,与胚根明显区别之一在于胚轴的皮层有两层细胞,而胚根的皮层只有一层细胞。种子发育时期,胚轴中柱的导管分子和筛管分子前身已经确定,种子发芽后,导管和筛管分子的前身成熟,成为输导系统的管道(Busse和Evert 1999)。通常,拟南芥幼苗时期胚轴微管束内不发生细胞分裂(Hardtke和Berleth 1998; Busse和Evert 1999; Sibout等2008; Ragni等2011),因为辅助运输的维管薄壁细胞已经脱离细胞周期(Masubelele等2005)。将拟南芥播种到添加蔗糖和不添加蔗糖培养基上,如果培养基中的蔗糖引起胚轴维管薄壁细胞增殖,就容易观察到生长在加蔗糖培养基上的幼苗胚轴维管束细胞数量比生长在不加糖培养基上的幼苗维管束细胞数量多。因此,把拟南芥播种在添加蔗糖和不添加蔗糖培养基上,比较生长在两种培养基上的幼苗胚轴维管束细胞数量,以揭示蔗糖能否引起胚轴维管束细胞数量增多。

## 材料与方法

### 1 材料与培养

实验材料为哥伦比亚野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)。种子用20%漂白液(含0.1% Triton X-100)消毒5 min,用4 °C低温处理3 d,然后播种到两种培养基上,一种是添加有88 mmol·L<sup>-1</sup>蔗糖的MS培养基,另一种是不添加任何糖的MS培养基。环境条件为25 °C,16 h光照/8 h黑暗光照周期。

### 2 光学和电子显微观察

萌发4 d和8 d各取材一次,每次分别从添加蔗糖和不添加糖培养基上任意选幼苗各10株,切取其下胚轴中段,用2%戊二醛(50 mmol磷酸缓冲液配制, pH 6.8)于4 °C温度下固定4 h,再用1%四氧化钨(50 mmol磷酸缓冲液配制, pH 6.8)于4 °C温度下固定4 h,之后用浓度梯度10%的上行系列酒精脱水, Epon812树脂包埋。包埋时再将胚轴切段从中部折断,使断面向着包埋块头部,以确保观察位置的一致性。做厚度1 μm半薄切片和70 nm超薄切片,半薄切片用甲苯胺蓝染色,光镜下观察;超薄切片用醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色,透射电子显微镜下照相,统计维管薄壁细胞、导管分子、筛管分子和中柱鞘细胞数量。

## 实验结果

拟南芥下胚轴包含多层细胞,由外向内依次为一层表皮、两层皮层、一层内皮层和位于中央的中柱,皮层的内层和内皮层每层稳定性地含8个细胞(图1)。中柱细胞比皮层细胞小得多,中柱最外层细胞较内层细胞大,排列较整齐,为中柱鞘。中柱鞘以内有导管分子、筛管分子和维管薄壁细胞。维管薄壁细胞包括木质部薄壁细胞、韧皮部薄壁细胞和伴胞。中柱鞘、导管分子、筛管分子和维管薄壁细胞构成中柱维管束。

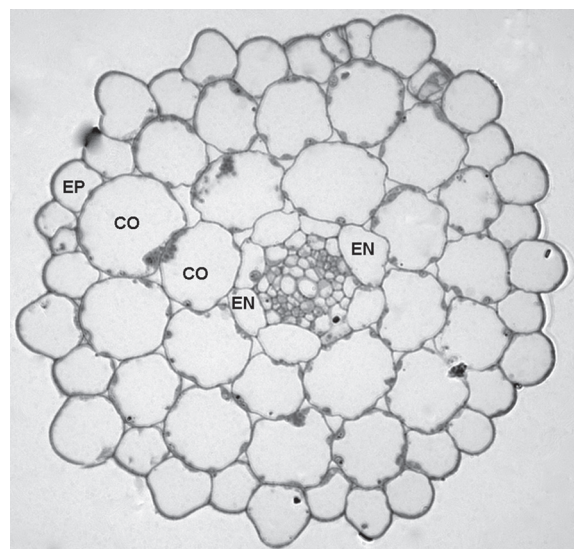


图1 胚轴结构组成

Fig.1 Anatomical structure of hypocotyl

生长在含蔗糖培养基上的4天龄幼苗胚轴横切面,可见表皮、皮层、内皮层和中柱。CO: 皮层; EN: 内皮层; EP: 表皮。

4天龄幼苗胚轴各类型维管组织细胞统计结果如表1。不加糖培养基上的幼苗胚轴维管束细胞总数为43.6个,其中维管薄壁细胞20个,导管分子4个,筛管分子4个(图2),而加糖培养基上的幼苗胚轴维管束细胞总数增加到74.9,维管薄壁细胞数增加到43,导管分子数增加到8.29,筛管分子数增加到7.71(图3),分别增加了71.79%、115%、107.25%和92.75%,均差异极显著。比较生长在不加糖培养基上的8天龄(图略)和4天龄幼苗胚轴,维管束各类细胞数量没有明显变化,显示细胞数量稳定性。图4为生长在加糖培养基上8天龄幼苗胚轴的维管束,与4天龄幼苗相比,胚轴维管束导管

表1 加糖与不加糖培养基上生长的4天龄幼苗胚轴维管束细胞数量比较

Table 1 Comparison of numbers of hypocotyl vascular cells in 4-day-old seedlings grown on media with and without addition of sucrose

	总维管束细胞/个	薄壁细胞/个	导管分子/个	筛管分子/个
无糖培养基上的幼苗	43.6±1.82	20±2.24	4.00±0	4.00±0
加糖培养基上的幼苗	74.9±7.15	43±6.81	8.29±0.756	7.71±0.756

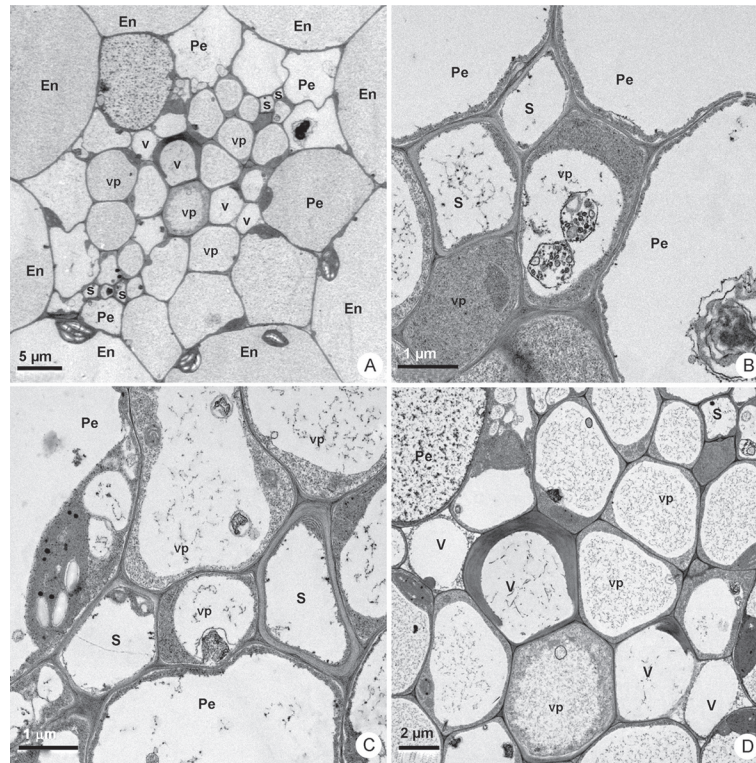


图2 生长在未加糖培养基上的4天龄幼苗胚轴中柱

Fig.2 Hypocotyl stele from a 4-day-old seedling grown on the medium without addition of sucrose

A: 中柱横切面, 中柱鞘细胞变形是由取材时切割产生, 不影响细胞数量统计; B: A图上部放大的两个筛管分子; C: A图下部放大的两个筛管分子; D: A图中部放大的4个导管分子。En: 内皮层; Pe: 中柱鞘; S: 筛管分子; V: 导管分子; VP: 维管薄壁细胞。

分子数基本没有变化, 但筛管分子数量有所增加。生长在不加蔗糖培养基上的幼苗胚轴中柱鞘每周有14~15个细胞, 生长在加蔗糖培养基上的幼苗胚轴中柱鞘每周也有14~15个细胞, 显示蔗糖没有造成胚轴中柱鞘细胞数量变化。同样, 两种培养基上生长的幼苗胚轴中柱的横切面大小也没有明显变化。

比较图2和图3、4, 生长在加蔗糖培养基上的幼苗胚轴维管薄壁细胞在数量增多的同时, 体积显著缩小。生长在不加蔗糖培养基上的幼苗胚轴中, 维管薄壁细胞与直径最大的导管分子大小接近(图2), 而生长在加蔗糖培养基上的幼苗胚轴中,

大部分维管薄壁细胞比直径最大的导管分子小得多(图3、4)。体积缩小的维管薄壁细胞主要分布在韧皮部, 木质部薄壁细胞体积较大(图3、4), 与对照(图2)中相似。

在不加糖培养基上生长的幼苗下胚轴中, 导管分子排成一行(图2), 在加糖培养基上生长的幼苗胚轴中, 导管分子在维管束中央部位形成一团(图3、4), 表明导管分子数量增多。导管分子在维管束中央部位聚集成团, 这一现象说明, 只有维管束中部靠着预先存在的导管分子的那些薄壁细胞才有机会分化成导管分子, 而边缘部位的薄壁细胞和离导管分子较远的薄壁细胞不会分化成导管



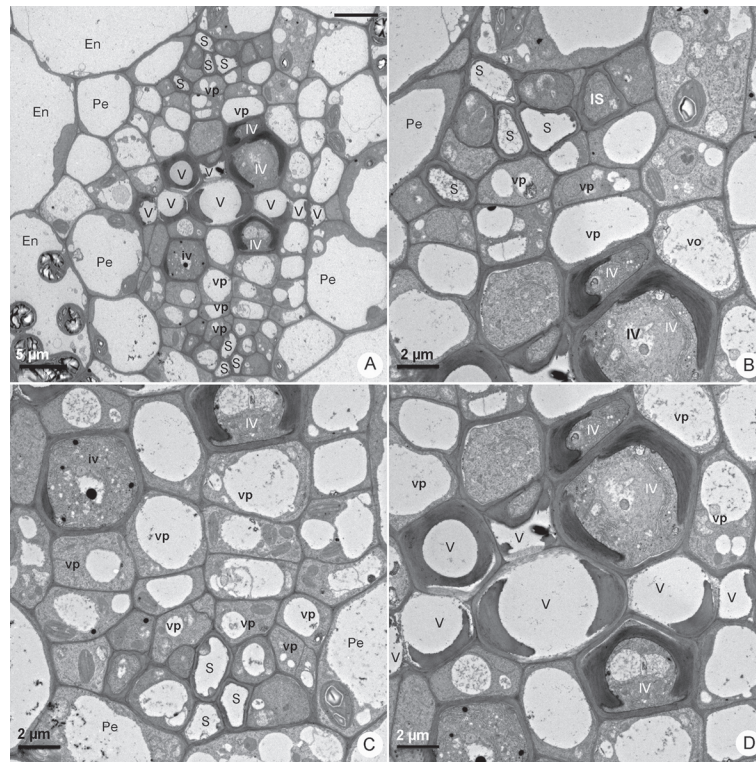


图3 生长在加糖培养基上的4天龄幼苗胚轴中柱

Fig.3 Hypocotyl stele from a 4-day-old seedling grown on the medium added with sucrose

A: 中柱横切面, 可见8个成熟导管分子和4个未成熟导管分子, 7个成熟筛管分子; B: 4个成熟筛管分子和1个未成熟筛管分子; C: 3个成熟筛管分子; D: 6个成熟导管分子和3个未成熟导管分子。B、C、D图为A图的局部放大。En: 内皮层; IV: 未成熟导管分子; IS: 未成熟筛管分子; Pe: 中柱鞘; S: 筛管分子; V: 导管分子; VP: 维管薄壁细胞。

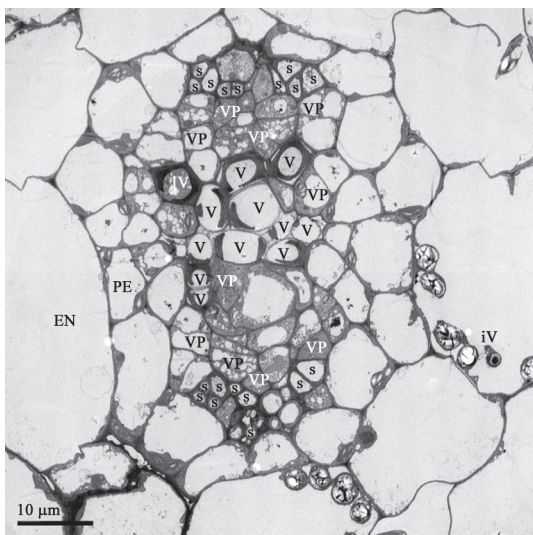


图4 生长于加糖培养基上8天龄幼苗胚轴中柱

Fig.4 Hypocotyl stele from a 8-day-old seedling grown on medium added with sucrose

导管分子在中央排列成团, 筛管分子在相对的两侧亦集中成团。EN: 内皮层; IV: 未成熟导管分子; PE: 中柱鞘; S: 筛管分子; V: 导管分子; VP: 维管薄壁细胞。

分子。同样, 筛管分子数量增多, 但新增加的筛管分子也不是随机分布, 而是相互靠近, 彼此排列成团(图3、4)。

## 讨 论

在加糖培养基上生长的幼苗与在不加糖培养基上生长的幼苗相比, 胚轴中的维管薄壁细胞显著增多, 表明增加外源蔗糖能引起维管薄壁细胞数量增多。维管薄壁细胞在数量增加的同时, 细胞体积减小, 意味着维管薄壁细胞发生分裂后子细胞没有发生体积增长, 这与合子的最初几次细胞分裂后体积减小类似。维管薄壁细胞数量增加和伴随的体积缩小表明, 培养基中的蔗糖引起拟南芥胚轴维管薄壁细胞发生细胞分裂, 即蔗糖具有促进维管束细胞增殖的效应。蔗糖引起拟南芥胚轴维管薄壁细胞数量增加的时期, 有两种可能性: 一种可能是种子萌发过程中蔗糖促进了新维管束细胞的产生, 另一种可能是幼苗时期蔗糖诱

导已分化的维管束细胞去分化后增加维管束细胞数量, 然而, 要明确属于哪种情况, 还需要进一步深入研究。蔗糖能够诱导顶端分生组织细胞分裂已有报导(Ballard和Wildman 1964; Van't Hof 1966; Van't Hof和Rost 1972; Riou-Khamlichi等2000; Brouquisse等2007)。本研究表明, 蔗糖也能诱导胚轴维管束内发生细胞分裂。

拟南芥种子萌发后, 脂类贮藏物质经过包括乙醛酸循环和糖异生在内的一系列过程转化形成碳水化合物(Canvin和Beever 1961; Eastmond和Graham 2001), 这些碳水化合物成为生长在不加糖培养基上早期幼苗的碳源。这种情况下, 胚轴维管束内的蔗糖可用性水平没有引起胚轴维管薄壁细胞大量增殖。相比之下, 生长在添加蔗糖培养基上的幼苗, 蔗糖的可用性水平提高, 结果引起胚轴维管薄壁细胞大量增殖。蔗糖既能作为底物参与代谢过程, 也能作为信号分子参与调节植物生长发育的许多过程(Smeekens 2000; Rognoni等2007; Smith和Stitt 2007), 包括对细胞分裂过程的调控(Riou-Khamlichi等1999, 2000; Gaudin等2000)。蔗糖通过调节周期蛋白基因表达而实现对细胞分裂过程的调控(Masubelele等2005; Menges等2006; Smeekens等2010)。Riou-Khamlichi等(2000)将拟南芥幼苗从不加蔗糖的培养基转移到添加88 mmol·L<sup>-1</sup>蔗糖的培养基上, 结果发现周期蛋白D基因的mRNA水平急剧上升, 意味着从细胞周期G1期向S期过渡(Nakagami等2002; Koroleva等2004)。不过, 这些作者没有做细胞数目统计。

通常情况下, 蔗糖促进顶端分生组织、侧生分生组织和体外培养组织中新维管束的分化(Demaggio 1972; Wilson 1978; Ye 2002), 本实验结果表明蔗糖也能促进胚轴维管束中的薄壁细胞分化成新的导管分子和筛管分子。新增加的导管分子总是靠着业已存在的导管分子, 显示一定的位置特异性。本实验中蔗糖既促进拟南芥胚轴维管薄壁细胞分裂, 又促进维管薄壁细胞向导管分子和筛管分子分化, 显然, 蔗糖对拟南芥胚轴维管束具有双重效应。

### 参考文献

- Ballard LAT, Wildman SG (1964). Induction of mitosis by sucrose in excised and attached dormant buds of sunflower (*Helianthus an-*

- nuus* L). Aust J Biol Sci, 17: 36~43
- Brouquisse R, Rolin D, Cortès S, Gaudillère M, Evraud A, Roby C (2007). A metabolic study of the regulation of proteolysis by sugars in maize root tips: effects of glycerol and dihydroxyacetone. *Planta*, 225 (3): 693~709
- Busse JS, Evert RF (1999). Pattern of differentiation of the first vascular elements in the embryo and seedling of *Arabidopsis thaliana*. *Int J Plant Sci*, 160 (1): 1~13
- Canvin DT, Beevers H (1961). Sucrose synthesis from acetate in the germinating castor bean: kinetics and pathway. *J Biol Chem*, 236: 988~995
- Demaggio AE (1972). Induced vascular tissue differentiation in fern gametophytes. *Bot Gaz*, 133 (3): 311~317
- Desvoyes B, Ramirez-Parra E, Xie Q, Chua NH, Gutierrez C (2006). Cell type-specific role of the retinoblastoma/E2F pathway during *Arabidopsis* leaf development. *Plant Physiol*, 140 (1): 67~80
- Eastmond PJ, Graham IA (2001). Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends Plant Sci*, 6: 72~78
- Gaudin V, Lunness PA, Fobert PR, Towers M, Riou-Khamlichi C, Murray JAH, Coen E, Doonan JH (2000). The expression of *D-cyclin* genes defines distinct developmental zones in *Snapdragon* apical meristems and is locally regulated by the *Cycloidea* gene. *Plant Physiol*, 122: 1137~1148
- Hardtke CS, Berleth T (1998). The *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J*, 17: 1405~1411
- Hirano H, Harashima H, Shinmyo A, Sekine M (2008). *Arabidopsis* RETINOBLASTOMA-RELATED PROTEIN 1 is involved in G1 phase cell cycle arrest caused by sucrose starvation. *Plant Mol Biol*, 66 (3): 259~275
- Hirano H, Shinmyo A, Sekine M (2011). *Arabidopsis* G1 cell cycle proteins undergo proteasome-dependent degradation during sucrose starvation. *Plant Physiol Biochem*, 49 (6): 687~691
- Jang JC, Sheen J (1994). Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell*, 6: 1665~1679
- Koroleva OA, Tomlinson M, Parinyapong P, Sakvarelidze L, Leader D, Shaw P, Doonan JH (2004). *CycD1*, a putative G1 cyclin from *Antirrhinum majus*, accelerates the cell cycle in cultured tobacco BY-2 cells by enhancing both G1/S entry and progression through S and G2 Phases. *Plant Cell*, 16: 2364~2379
- Mariconti L, Pellegrini B, Cantoni R, Stevens R, Bergounioux C, Cella R, Albani D (2002). The E2F family of transcription factors from *Arabidopsis thaliana*. Novel and conserved components of the retinoblastoma/E2F pathway in plants. *J Biol Chem*, 277 (12): 9911~9919
- Masubelele NH, Dewitte W, Menges M, Maughan S, Collins C, Huntley R, Nieuwland J, Scofield S, Murray JAH (2005). D-type cyclins activate division in the root apex to promote seed germination in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 15694~15699
- Menges M, Samland AK, Planchais S, Murray JAH (2006). The D-type cyclin CYCD3;1 is limiting for the G1-to-S-phase transition in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18 (4): 893~906
- Nakagami H, Kawamura K, Sugisaka K, Sekine M, Shinmyo A (2002). Phosphorylation of retinoblastoma-related protein by the cyclin

- D/cyclin-dependent kinase complex is activated at the G1/S-phase transition in tobacco. *Plant Cell*, 14: 1847~1857
- Ragni L, Nieminen K, Pacheco-Villalobos D, Sibout R, Schwechheimer C, Hardtke CS (2011). Mobile gibberellin directly stimulates *Arabidopsis* hypocotyl xylem expansion. *Plant Cell*, 23: 1322~1336
- Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacqumard A, Murray JAH (1999). Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science*, 283: 1541~1544
- Riou-Khamlichi C, Menges M, Healy JMS, Murray JAH (2000). Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Mol Cell Biol*, 20 (13): 4513~4521
- Rognoni S, Teng S, Arru L, Smeekens SCM, Perata P (2007). Sugar effects on early seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regul*, 52 (3): 217~228
- Sibout R, Plantegenet S, Hardtke CS (2008). Flowering as a condition for xylem expansion in *Arabidopsis* hypocotyl and root. *Curr Biol*, 18: 458~463
- Smeekens S (2000). Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 51: 49~81
- Smeekens S, Ma J, Hanson J, Rolland F (2010). Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Curr Opin Plant Biol*, 13: 274~279
- Smith AM, Stitt M (2007). Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell Environ*, 30: 1126~1149
- Van't Hof J (1966). Experimental control of DNA synthesizing and dividing cells in excised root tips of *Pisum*. *Am J Bot*, 53: 970~976
- Van't Hof J, Rost TL (1972). Cell proliferation in complex tissues: the control of the mitotic cycle of cell populations in the cultured root meristem of sunflower (*Helianthus*). *Am J Bot*, 59: 769~774
- Ward JM, Kühn C, Tegeder M, Frommer WB (1998). Sucrose transport in higher plants. *Int Rev Cytol*, 178: 41~71
- Wilson JW (1978). The position of generating cambia: auxin/sucrose ratio and the gradient induction hypothesis. *Proc R Soc Land B*, 203: 153~176
- Ye ZH (2002). Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 53: 183~202