

胡萝卜体细胞胚胎发生中的细胞组织化学和蛋白质组成变化

周燕^{1,2} 高述民^{1,*} 李凤兰¹

¹北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; ²中国科学院文献情报中心, 北京 100080

提要 研究胡萝卜体细胞胚不同发育阶段的细胞组织化学和蛋白质组成变化的结果表明: 胚性愈伤组织主要源自维管束周围的细胞。球胚形成前期, 淀粉粒和糊粉粒极性分布已很明显。子叶胚期, 芽开始分化, 有大量糊粉粒累积。在体细胞胚发育过程中, 淀粉粒在胚性愈伤组织形成初期和球胚后期、糊粉粒在胚性愈伤组织形成后期和球胚期各有两次累积高峰。

关键词 胡萝卜; 体细胞胚; 组织化学; 蛋白质组成

Changes in Histochemistry and Protein Pattern During Somatic Embryogenesis of Carrot

ZHOU Yan^{1,2}, GAO Shu-Min^{1,*}, LI Feng-Lan¹

¹College of Biological Science and Technology, Beijing Forest University, Beijing 100083; ²Library of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080

Abstract Changes in histochemistry and protein pattern during somatic embryogenesis of carrot were studied. Embryogenic callus mainly originated from the cells around vascular bundle. The polarity distributions of starch grains and aleurone were extremely evident in the early stage of globular embryo. Shoot began differentiation in cotyledonary embryo and the plenty of starch grains accumulated in it. Two peaks of starch grains appeared in the early stage of embryogenic callus formation and the late stage of globular embryos, while the two peaks of aleurone grains appeared in the late stage of embryogenic callus formation and the whole globular embryo stage during somatic embryogenesis.

Key words carrot; somatic embryo; histochemistry; protein pattern

近20年来植物器官发生和形态建成(pattern formation)的发育分子生物学研究已取得了实质性进展, 相继克隆到一些与之相关的基因, 并对部分基因的结构、功能以及一些重要的蛋白和调控因子亦作了较详细的研究^[1~5]。但迄今人们对植物器官形成和形态建成机制细节的了解还较少。目前, 一些植物体细胞胚胎培养过程中的淀粉粒、ADP-葡萄糖焦磷酸酶活性及亚基组成、核糖体含量变化已有了一些报道^[6,7]。从形态发育来说, 其中的关键是调节基因协同表达, 形成分化的组织、器官^[8]。本文研究胡萝卜体细胞胚形成过程中器官和组织形态的发生、组织化学和可溶性蛋白的变化规律, 初步分析器官发生和形态建成中的细胞和蛋白分子特征。

材料与方法

植物材料为胡萝卜(*Daucus carota*), 购自日本。体细胞胚的诱导培养参照文献9的方法。取10 d左右苗龄的无菌苗, 剪取下胚轴3~4 mm的

切段, 接种在含有2, 4-D 1.0~1.5 mg·L⁻¹的MS琼脂培养基上, 于26℃、17 h·d⁻¹光照(光强为2 000 μmol·m⁻²·s⁻¹)下诱导愈伤组织。在相同的培养基上继代培养, 20 d继代1次。挑选200 mg白色透明、疏松的愈伤组织细胞, 接种在盛有35 mL MS液体培养基(无2, 4-D)的100 mL三角瓶中, 置于26℃、17 h·d⁻¹的光照下, 以100 r·min⁻¹的转速振荡悬浮培养, 每周继代1次诱导体细胞胚。同时以OLYMPUS倒置显微镜镜检悬浮培养细胞以便及时分选所需材料。

显微组织化学观察时, 取各典型时期培养材料, 用FAA固定, 琼脂石蜡包埋。由于愈伤组织细胞及前期体细胞胚较小, 不宜直接进行石蜡包埋切片。因此, 先用6%的琼脂包埋, 包埋温度50℃左右, 并注意将材料搅起, 使其均匀

收稿 2003-07-14 修定 2003-12-01

资助 国家自然科学基金(30070613和39630040)。

* 通讯作者(E-mail:gsm689@sohu.com, Tel:010-62338717)。

分布, 然后进行石蜡包埋切片。切片厚度 $8\sim 10\ \mu\text{m}$, 先用高碘酸-锡夫(Periodic acid-Schiff, PAS)染色、再用萘酚黄S(naphthol yellow S)复染^[10], 观察形态结构及淀粉粒、糊粉粒的变化和含量。

以SDS-PAGE分析可溶性蛋白时, 于球形胚、心形胚、鱼雷形胚、子叶胚期分别取样, 每种样品取3 g, 加6 mL提取液[5%-ME、2 mmol·L⁻¹ 苯甲基磺酰氟(PMSF)、60 mmol·L⁻¹ Tris-HCl(pH 7.5)], 每克样品含0.1 g聚乙烯吡咯烷酮(PVP)及少许石英砂研磨。4℃下以 $24\ 000\times g$ 离心30 min, 取50 μL (约600 μg 蛋白)上清液进行SDS-PAGE垂直平板电泳, 银染, 用岛津双波长色谱扫描仪CS-930在波长590 nm处扫描。

结果与讨论

1 体细胞胚胎发生的组织化学观察

据观察, 外植体(下胚轴)细胞中淀粉粒和糊粉粒含量极少, 而一旦经过愈伤化培养后, 靠近维管组织的薄壁细胞中则含有大量的糊粉粒和淀粉粒。离体的非胚性愈伤组织与胚性愈伤组织均为薄壁细胞。非胚性愈伤组织主要来源于外植体表皮与外皮层细胞, 细胞较大, 细胞质中淀粉粒及糊粉粒含量极少; 而胚性愈伤组织主要来源于外植体下胚轴中柱及内皮层细胞或子叶维管束周围细胞, 细胞较小, 细胞质浓, 细胞质初始富含淀粉粒及少量的糊粉粒, 随着胚性的建成, 细胞质则含有较多的糊粉粒及少量的淀粉粒。从外表上看, 此时的胚性愈伤组织为浅黄色, 呈较致密的小颗粒状。观察体细胞胚发育过程的结果表明, 能进行有丝分裂形成体细胞胚的细胞往往核大、细胞较小。当细胞经几次分裂形成顶端分生组织细胞和胚柄结构之后, 才具有明显的极性。胚性单细胞富含淀粉粒, 但是, 仅凭光学显微镜尚看不出极性的分布。有关极性分化的更细微差异尚待进一步电镜切片的观察。愈伤组织发生明显的变化可能与合子胚的授粉受精一样, 是由于环境信号(激素等)的刺激, 愈伤组织吸收强度和激素含量增加, 引起胚性愈伤中碳水化合物和蛋白质的增高。可见, 愈伤细胞中累积大量的淀粉粒和糊粉粒, 可作为胚性愈伤细胞分化的标志。

处于不同发育阶段的体细胞胚中淀粉粒和糊粉粒的含量以及分布随形态结构的不同而变化。胡萝卜体细胞胚的发生经历八细胞期(图1-a)。进入球

形胚形成初始阶段, 多细胞原胚始终被一层外被包围, 与周围细胞间有明显界限。随着胚体发育, 形态和组织化学上的极性化非常明显, 即胚体顶部内层细胞含大量的淀粉粒和糊粉粒, 胚柄细胞内含大量游离多糖, 胚柄附近细胞内含大量的淀粉粒, 表明胚柄在胚胎营养中起作用(图1-b); 至球形胚形成时, 近顶部内层细胞逐渐累积大量的糊粉粒, 而淀粉粒很少; 在胚体表皮细胞及基部细胞则富含淀粉粒, 无糊粉粒(图1-c); 至球形胚后期, 近顶部内层细胞富含糊粉粒, 无淀粉粒, 而表皮细胞和基部细胞除富含淀粉粒外, 还含有少量的糊粉粒, 此期为糊粉粒累积高峰期。

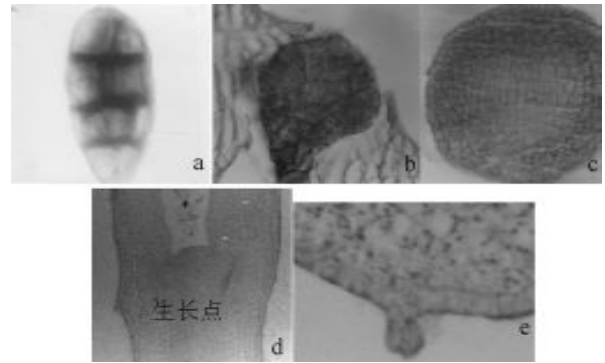


图1 胡萝卜体细胞胚发生的组织化学变化
Fig. 1 Changes in histochemistry during somatic embryogenesis of carrot

a. 八细胞期; b. 球胚形成前期; c. 球胚形成期; d. 子叶胚芽形成期; e. 次生胚形成期。

胡萝卜整个体细胞胚发生过程中, 有两次多糖累积高峰, 表现为淀粉粒增加。第一次是在胚性愈伤组织形成初期, 一方面为胚胎发育提供能量, 另一方面转化为糊粉粒。第二次是在球形胚后期, 为胚体的进一步发育和成熟胚萌发、植株的再生准备能量。这两个过程均属于高能耗过程。以上表明, 淀粉粒的出现与胚胎发生潜能的实现密切相关。

糊粉粒的积累有两次高峰: 第一次在胚性愈伤组织形成后期, 第二次在球形胚期。Sengupta和Raghvan^[11]等用双标记法测定胡萝卜悬浮液细胞中蛋白质和RNA合成时也曾得到类似的结果, 即胚状体形成的细胞中蛋白质和RNA合成速度均高于无胚状体发生的细胞。

胚芽的形成始于子叶胚, 原基处富含大量的糊粉粒(图1-d)。次生胚源于子叶胚的表皮细胞(图1-e)。

2 不同阶段体细胞胚中可溶性蛋白组成的变化

胡萝卜体细胞胚在发育的不同阶段, 其可溶性蛋白种类存在着一定的差异(图2、表1)。

由图2和表1可见, 依各期胚中可溶性蛋白变化可分为4个区。I区: 各期蛋白组分和含量

相同; II区: 球形胚比其它3期主要少II A蛋白, 鱼雷形胚比其它3期含量普遍要高, 子叶胚与心形胚含量相近; III区: 各期含量基本相同; IV区: 由球形胚到子叶胚, 高分子量蛋白的含量依次减少, 而低分子量蛋白的含量却依次增加, 呈

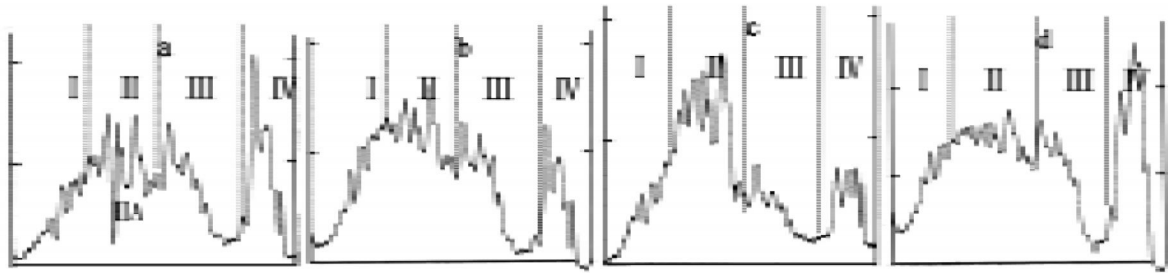


图2 不同阶段胡萝卜体细胞胚中可溶性蛋白单向电泳后的扫描图

Fig. 2 Scanning pattern of soluble protein identified by SDS-PAGE at different stages of carrot somatic embryo

a. 球形胚; b. 心形胚; c. 鱼雷形胚; d. 子叶胚。

表1 不同阶段胡萝卜体细胞胚中可溶性蛋白的变化

Table 1 Changes in soluble proteins of carrot somatic embryo at different stages

阶段	峰数/条	蛋白条带分子量/kD
球形胚	20	—
心形胚	18	+17.7、-25.3、-41.7、-77.6
鱼雷形胚	17	+16.0、+17.3、+20.7、+48.0、+54.1、 -16.6、-19.1、-20.7、-29.1、-40.9、 -50.0、-70.2、-80.7
子叶胚	19	-26.9

“+”表示有此条带, “-”表示无此条带。

规律性的递变(图2)。总之, 从球形胚发育到子叶胚, 峰数呈现先下降再回升的变化趋势。可溶性蛋白种类有减少也有增加。与球形胚相比, 心形胚减少3种而增加1种; 鱼雷胚减少8种而增加5种, 变化最大; 子叶胚仅减少1种, 与球形胚相似程度最高(表1)。另外, 从球形胚到鱼雷胚多肽种类的差异有一个过渡过程, 表明采用SDS-PAGE分析技术可以看出可溶性多肽的变化规律。这与上述形态学的结果(即球形胚期有糊粉粒累积高峰)相吻合。

参考文献

1 Passarinho PA, Hengel AJ-van, Fransz PF et al. Expression

pattern of the *Arabidopsis thaliana* AtEP3/AtchitIV endochitinase gene. *Planta*, 2001, 212(4):556~567

2 Geri C, Turrini A, Giorgetti L et al. Genome plasticity during the acquisition of embryogenic competence. *Genome*, 1999, 42(6):1134~1143

3 Di Cola A, Poma A, Spano L et al. rolB expression pattern in the early stages of carrot somatic embryogenesis. *Cell Biol Int*, 1997, 21(9):595~600

4 Blackman SA, Miedema M, Yeung EC et al. Effect of the tetrapeptide RGDS on somatic embryogenesis in *Daucus carota*. *Physiol Plant*, 2001, 112(4):567~571

5 Pitto L, Cernilogar F, Evangelista M et al. Characterization of carrot nuclear proteins that exhibit specific binding affinity towards conventional and non-conventional DNA methylation. *Plant Mol Biol*, 2000, 44(5):659~673

6 Wartele ES, Keller GL, Nikolau BJ et al. Quantitation of starch and ADP-glucose pyrophosphorylase in non-embryogenic cells and embryogenic cell clusters from carrot suspension cultures. *J Plant Physiol*, 1988, 132:683~689

7 张伟成, 严文梅, 单双健. 野芹菜体细胞胚胎发生早期变化的细胞学研究. *植物学报*, 1993, 35(2):85~90

8 王亚辉. 近两年细胞生物学的进展(1991~1992). 见: 中国国家自然科学基金委员会生命科学部、中国科学院上海文献情报中心编. *细胞生物学动态*. 上海: 上海科学技术出版社, 1994. 5~11

9 高述民. ABA和PEG对胡萝卜体细胞胚诱导和调控的影响. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2001, 29(2):13~16

10 胡适宜. 植物胚胎学实验方法(七)——同时显示胚中贮藏的淀粉粒、蛋白质和脂类的永久制片法. *植物学通报*, 1994, 11(4):49~51

11 Sengupta C, Raghvan V. Somatic embryogenesis in carrot cell suspension: I. Pattern of protein and nucleic acid synthesis. *J Exp Bot*, 1980, 31(120):247~258