

## 几种植物原生质体的扫描电镜观察

何若天 吴丹红

(广西农学院农学系)

李景植

(朝鲜, 沙里院农业大学生物系)

**摘要** 扫描电镜观察表明,分离自马铃薯、萱草、甘蔗、木薯和落花生等不同植物和组织的原生质体表面呈现不同程度的凹凸不平。马铃薯叶肉原生质体表面较粗糙,其余四种植物叶肉、幼茎或子叶原生质体稍光滑。有的原生质体显现不同程度的凹陷现象。有的原生质体表面尚残留有未完全水解的胞壁碎片。在木薯幼茎原生质体制备物中见有呈“裂片”状的球形结构。原生质体表面扫描图象的差异似与不同种植物有关,与组织源不同更有密切关系。

原生质体镀膜前,涂布于已镀膜的盖玻片支持物上的原生质体很少或无凹陷现象,涂布于已镀膜的双面胶支持物上的原生质体凹陷严重。

**关键词** 扫描电镜;原生质体;马铃薯;萱草;甘蔗;木薯;落花生

扫描电子显微镜检在研究游离原生质体培养过程中胞壁再生过程、形态变化、细胞分裂及嗣后的发育过程有重要作用。原生质体由于已脱离了细胞壁,因而非常脆弱,给制片操作带来一定困难,尤其是高度液泡化的原生质体很易发生瓦解<sup>[6]</sup>。一个刚游离出来的、处于高渗介质中的原生质体外表形态到底是怎样的?国内尚罕见有关报道。本文报道我们对萱草、马铃薯、甘蔗、木薯和落花生等五种植物的原生质体的制备和扫描电镜观察结果。

### 材料与amp;方法

**一、原生质体的分离** 选取萱草(*Hemerocallis fulva* L.),甘蔗(*Saccharum officinarum*)等健康幼叶,木薯(*Manihot esculenta* Grantz)幼茎和未成熟的落花生(*Arachis hypogaea* L.)种子幼嫩子叶分别经75%乙醇和0.1% $\text{HgCl}_2$ 溶液作表面灭菌后用手术刀横切成厚约1毫米薄片。马铃薯(*Solanum tuberosum*)幼叶按同法表面灭菌后,用尖头镊子撕去下表皮。分别将上述材料置于由1.5%纤维素酶Onozuka R-10,0.5%果胶酶,以0.5mol/L甘露糖醇为渗透压稳定剂所组成的酶液中,于30℃水浴中保温3~5小时(视不同材料而异)。经200目不锈钢丝网过滤和离心(100×g)2分钟后,反复用0.5mol/L甘露糖醇溶液离心洗涤三遍。最后分别悬浮于0.5mol/L甘露糖醇溶液或含0.5mol/L甘露糖醇的MS培养液中保存备用。

**二、原生质体样品处理** 参照Fowke(1975)<sup>[6]</sup>和严学成(1987)<sup>[1]</sup>的方法稍加修改。

1. 吸取1ml原生质体悬浮液置10ml离心管内(以下固定和脱水等处理均在离心管内进行,更换溶液时用离心法)。加入0.5ml用MS培养液(含0.5mol/L甘露糖醇)配制的3%

蒙我院电镜室钟荣亮、潘淘操、陈巧萍等同志在技术上予以热情指导和拍照,特表谢意。

戊二醛(后改用只含0.5mol/L甘露糖醇的戊二醛溶液亦可),轻摇混匀,使戊二醛最后浓度为1%,室温(约25℃)下静置2小时。手摇离心(100×g)1分钟,弃上清液,再加0.5ml 3%戊二醛溶液,于室温再静置固定2小时以求彻底固定原生质骨架结构。

手摇离心(100×g)1分钟,弃上清液,用MS培养液(或0.05mol/L磷酸盐缓冲液pH6.8)离心洗涤三遍以清除残留的戊二醛。置冰浴上,加入1ml预冷的0.05mol/L磷酸盐缓冲液(pH6.8)换洗4次,每次间隔为20~30分钟。

加入1ml用0.05mol/L磷酸盐缓冲液(pH6.8)配制的1%锇酸,轻轻摇匀后置冰箱中过夜以固定细胞质的细微结构。

最后在冰浴上用蒸馏水离心洗涤二遍。

2. 借助离心法,在冰浴上依次用40%、50%、60%、70%、80%、90%和无水乙醇逐级脱水,每级处理15分钟。

用乙醇:醋酸戊酯(1:1 v/v)混合液更替无水乙醇,处理15分钟。最后用醋酸戊酯替换混合液处理20分钟。

3. 用胶头吸管吸取少量已经过上述处理的原生质体均匀地涂布在已镀白金膜的小片盖玻片上;个别植物原生质体直接涂布在已镀白金膜的双面胶片上以资比较。置HCP-2型干燥器内进行临界点干燥。

将已干燥的样品置IB-5型离子溅射镀膜仪中在真空度0.1Torr下镀膜。

用JEM-1200EX型电子显微镜(日本产)扫描附件观察并拍照。

## 观察结果

(一)在所观察的几种植物原生质体中,分离自叶肉细胞的原生质体在光学显微镜下呈球形,表面光滑,叶绿体均匀分布在四周表层处,如马铃薯叶肉原生质体(图版1:1)经固定、脱水和干燥等处理后,在扫描电镜下观察到的叶部原生质体表面不是光滑层,而是略呈凹凸不平(图版1:2、3、4和5)。有的原生质体局部部位有不同程度内陷(图版1:3和4小箭头所指)。其表面突起可能是分布在近质膜的叶绿体所造成。

来自不同植物和不同部位的叶部原生质体表面扫描图象有差异。例如马铃薯叶肉原生质体表面较粗糙(图版1:2),萱草叶肉原生质体表面稍光滑(图版1:3和4)。分离自甘蔗梢部内层幼叶叶鞘部位的原生质体,在光学显微镜下可见原生质体通常有较发达的液泡,缺乏发育完全的叶绿体,在固定、脱水和干燥等处理过程中,质膜容易发生破裂,产生许多大小不一的孔洞(图版1:5)。这在落花生幼嫩子叶原生质体中也有同样现象(图版1:12)。其中甘蔗原生质体由于质膜破裂严重,以致内部胞核也隐约可见(图版1:5箭头所指)。

(二)在萱草叶肉原生质体和木薯幼茎原生质体表面还见有一些稀疏的小囊泡状突起,在木薯幼茎原生质体尤为明显,而且大小和形状各异(图版1:3和8箭头所指)。此种泡状突起多发生在分离自幼嫩薄壁细胞的原生质体。在扫描电镜下可见此种原生质体表面较光滑,但泡状突起较多(图版1:8)。分离自较成熟的薄壁细胞的原生质体泡状突起很少见或不明显。Pojnár等(1967)在番茄果实原生质体的扫描图象中也见有类似的泡状突起<sup>[7]</sup>。

对此种泡状突起有两种不同看法。一种认为是由于质膜有弱区,质膜从弱区外折而形成小泡;另一种看法认为可能是质膜体(plasmalemmasome)(引自夏镇澳,1981,未发表的油印资料)。考虑到原生质体在高渗透介质中由于质膜收缩而折叠的现象<sup>[4]</sup>,此种球状小泡很可能是质膜外折而形成的。Pojnar等(1967)发现分离原生质体时所用酶液的介质不同,对质膜内折和外折的有无和程度影响很大<sup>[7]</sup>。我们用于分离原生质体的酶液介质是相同的,而产生小泡突起仅与供分离原生质体用的植物材料和细胞幼嫩程度不同有关。

(三)分离自木薯幼茎和落花生幼嫩子叶的原生质体在扫描电镜下同样呈现凹凸不平 and 许多凹陷。但在许多突起的区域表面较光滑(图版1:6和12),这与叶肉原生质体不同。图版1:7是一堆已脱壁但彼此尚未分离的木薯幼茎原生质体,这是由于相邻细胞的胞间联丝的牵连而形成的。

值得注意的是在木薯幼茎原生质体制备物中观察到一些“裂片”状的球形图象(图版1:9)。此种图象在其它植物叶肉原生质体中均未发现。在光学显微镜下观察新鲜分离的木薯幼茎原生质体时亦未见此种结构,仅在经过固定、脱水和干燥等处理后才出现。这是一种什么结构?是否来自胞壁严重内折的传导细胞(transfer cell)?尚未能断定。

(四)图版1:4所示的萱草叶肉原生质体表面尚附着有少量胞壁残留物。说明一个细胞的壁不是同时被降解,各部位水解难易程度可能有异。这可能与胞壁中纤维素晶态结构程度和半纤维素存在与否有关<sup>[4]</sup>。此外,与酶液接触的难易程度和水解的时间差异亦有关系。

(五)样品台承载物对原生质体形态有明显影响。例如镀膜前,涂布于已镀膜的盖玻片上的萱草叶肉原生质体易聚集成堆,但所见原生质体局部内陷较轻(图版1:3和4)或无凹陷现象(如图版1:2马铃薯叶肉原生质体)。而涂布于已镀膜的双面胶上的萱草叶肉原生质体分布较均匀,但凹陷较重,有的几乎完全失真(图版1:10和11)。细胞愈幼嫩,凹陷愈严重(图版1:11)。

## 讨 论

(一)我们所采用的细胞处理方法乃一般具壁细胞或组织所沿用的。但植物细胞在除壁后所得游离原生质体的质膜极为脆弱,很易遭受不合适的渗透冲击而破裂。尤其是在低温下固定时易使质膜瓦解<sup>[8]</sup>,我们亦见有此种现象。为预防此种现象产生,我们除在戊二醛固定液中含有高渗透浓度(0.5mol/L)的甘露糖醇以维持质膜的稳定性外,并在开始时采用常温(25℃左右)静置固定,仅有嗣后的洗涤、再固定、脱水等步骤才在低温下进行。此种处理,经光学显微镜检,很少见到破损原生质体,基本保持原有完整球形状。我们认为第一步的固定步骤是个关键,加固定液时尽可能温和处理,采用在室温下静置固定并避免过强地搅动原生质体,以减少原生质体质膜的破裂。原生质体质膜被固定后,在嗣后各步处理中便很少出现再破裂现象,甚至可以经受较强烈的摇动。在清洗残存的戊二醛固定液时,可不用MS培养液,而且没有必要改用磷酸盐缓冲液,效果是相同的。有的步骤例如用各级酒精脱水时,每级所需时间还可缩短至15分钟以下。经过固定和脱水等系列处理的原生质体是相当稳定的,在醋酸戊酯溶液中置冰箱内保存近三个月仍保持原有完整球状结构,并无瓦解或皱缩。对所试五种来自不同植物种和不同组织的原生质体来说均有相同效果。因此本试验所用

处理方法可适用于各种来源的原生质体。

(二)迄今对植物原生质体表面进行扫描电镜观察的工作多集中在研究新壁的再生<sup>[2]</sup>,对新鲜分离的原生质体表面进行扫描观察很少,对来自不同植物种和不同组织的原生质体表面作比较扫描观察更未见有关报道。本观察结果表明来自不同植物的同类型植物(如叶肉细胞)和不同组织(如叶肉、叶鞘、子叶和幼茎)的原生质体表面扫描图象均有不同程度的差异。有的较粗糙(如马铃薯叶肉原生质体),有的较光滑(如萱草叶肉原生质体),有的呈现不同程度的凹陷(如木薯幼茎原生质体),甚至在分离自同一植物器官的原生质体,经同样处理后,其原生质体表面竟呈现完全不同的扫描图象。如木薯幼茎原生质体有的虽有凹陷现象但较光滑(图版1:6),有的呈现明显的泡状突起(图版1:8),有的居然呈现“裂片”状结构。这些外表各异的原生质体很可能是来自茎段的不同组织。因此,原生质体表面扫描图象的差异似与来自不同植物种类有关,但与组织源的不同更有密切关系。当然,不能排除对原生质体所作的固定、脱水、干燥等一系列处理也有可能对其表面形态的改变有一定影响。至于这些表面差异对原生质体培养期间胞壁再生和嗣后的细胞分裂有无影响,目前尚毫无所知,有待进一步研究。

#### 参 考 文 献

- [1] 严学成, 1987: 扫描电子显微镜标本制备法。植物细胞学研究方法(孙敬三、钱迎倩主编), 科学出版社, P. 97—106.
- [2] Burgess, J. 1983: Wall regeneration around isolated protoplasts In: Plant Protoplasts (Ed. by K:Giles), P. 55—77, Academic Press, New York
- [3] Cocking, E.C. 1966: An electron microscopic study of the initial stages of infection of isolated tomato fruit protoplasts by tobacco mosaic virus. *Planta (Berl.)*, 68: 206—214
- [4] Cocking, E.C. 1972: Plant cell protoplast-isolation and development. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 23: 29—50
- [5] Fowke, L.C. 1973: Electron microscopic observations of cultured cells and protoplasts of *Ammi visnaga*. *Amer. J. Bot.* 60: 304—312
- [6] Fowke, L.C. 1975: 原生质体的电子显微镜检。植物组织培养方法(Gamborg, O.L.& Wetter, L.R. 编。钱迎倩等译, 1980), 科学出版社, P. 78—84
- [7] Pojnar, E. et al, 1967: Cell-wall regeneration by isolated tomato-fruit protoplasts, *Protoplasma* 64: 460—480

## SCANNING ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATION ON PROTOPLASTS OF FIVE SPECIES

He, Ruo Tian and Wu, Dan Hong

(Department of Agronomy, Guangxi Agricultural College)

Li, Jing Zhi

(Department of Biology, Sha Li Yuan Agricultural University, Korean  
People's Democratic Republic)

**Abstract** The scanning electron microscopic observation on protoplasts which were isolated from mesophyll of potato (*Solanum tuberosum*), orange daylily (*Hemerocallis fulva* L.) and sugar cane (*Saccharum officinarum*), from young stemlet of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and young cotyledon of peanut (*Arachis hypogaea* L.) are indicated that the surfaces of protoplasts were full of bumps and holes in varying degrees. Among them the surfaces of potato mesophyll protoplasts were rougher, but the mesophyll protoplast surfaces of orange daylily and sugar cane, the young stemlet protoplast surface of cassava and the young cotyledon protoplast surface of peanut were all relatively smooth. Some protoplast surface showed partial and slight sunk. Partial broken surface could be easily occurred in the preparing process of young protoplast isolated from peanut young cotyledon, thereby the protoplast showed many small holes. Some protoplast surface had still the remainder of cell wall. The "labate form" spheroidal structure was observed in the cassava stemlet protoplasts preparation. The difference of scanning electron microscopic pattern of protoplasts surfaces seems bearing relation to the different plant species, but in close relationship with the difference of tissues

The protoplasts could easily aggregate each other, but slightly, when the protoplasts were smeared on the sheet glass before vacuum coating. Contrary, the protoplasts were well distributed but sunk seriously, when the protoplasts were smeared on the double-edged film before vacuum coating.

**Key words** Scanning electron microscope; protoplast; *Solanum tuberosum*; *Hemerocallis fulva*.; *Saccharum officinarum*; *Manihot esculenta*; *Arachis hypogaea*

## 图 版 说 明

### Explanation of Plates

1. 新鲜分离的马铃薯叶肉原生质体。×500  
Fig. 1. Fresh isolated mesophyll protoplasts of potato. ×500
2. 马铃薯叶肉原生质体扫描图像。  
Fig. 2. Scanning photograph of potato mesophyll protoplast.
3. 萱草叶肉原生质体扫描图像, 示泡状突起(大箭头)和局部凹陷(小箭头)。  
Fig. 3. Scanning photograph of orange daylily mesophyll protoplast, indicating bubble protuberance (large arrow) and partial and slight sunk (small arrow).
4. 萱草叶肉原生质体扫描图像, 示残存胞壁碎片(大箭头)和局部轻度凹陷(小箭头)。  
Fig. 4. Scanning photograph of orange daylily mesophyll protoplast, indicating remainder of cell wall (large arrow) and partial and slight sunk (small arrow).
5. 甘蔗幼嫩叶鞘原生质体扫描图像, 示局部严重破裂, 内部胞核隐约可见(箭头所指)。  
Fig. 5. Scanning photograph of sugar cane young leaf sheath protoplast, indicated partial broken surface and nucleus which could be seen faintly (arrow).
6. 木薯幼茎原生质体扫描图像之一, 示轻度凹陷(箭头所指)。  
Fig. 6. Scanning photograph of cassava young stemlet protoplast indicatding slight sunk (arrow)
7. 一群尚未彼此分离的木薯幼茎原生质体扫描图像。  
Fig. 7. Scanning photograph of a group cassava young stemlet protoplasts which are not separated.
8. 木薯幼茎原生质体扫描图像之二, 示表面出现大小和形状各异的泡状突起(箭头所指)。  
Fig. 8. Scanning photograph of cassava young stemlet protoplast indicating appearance of various bubble protuberance at the surface (arrow).
9. 木薯幼茎制备物中观察到的“裂片”状球形结构。  
Fig. 9. Scanning photograph of the “lobate form” spheroidal structure was observed in cassava stemlet protoplasts prepration.
10. 、 11. 涂布在已镀膜的双面胶承载物上严重凹陷的萱草叶肉原生质体的扫描图像。  
Fig. 10 、 11. Scanning photographs of orange daylily mesophyll protoplasts which was smeared on the double-edged film before vacuum coating indicating sunk seriously.
12. 落花生幼嫩子叶原生质体扫描图像。  
Fig. 12. scanning photograph of protoplast isolated from peanut young cotyledon.

