

割手密茎尖细胞有丝分裂过程中微管骨架的变化

李志刚^{1*}, 李素丽¹, 张荣华¹, 杨丽涛¹, 李杨瑞²

(1. 广西大学农学院, 南宁 530005; 2. 广西农业科学院, 南宁 530007)

摘要: 利用冰冻切片法结合间接免疫荧光标记技术对割手密茎尖细胞有丝分裂过程中微管骨架的变化进行了研究。结果表明: 在割手密茎尖细胞有丝分裂过程中存在4种循序变化的典型微管阵列, 即周质微管、早前期微管带、纺锤体微管及成膜体微管。在割手密初生增粗分生组织细胞中观察到的大多数是周质微管阵列, 很少观察到其它3种典型的微管阵列, 这可能这是割手密茎较小的原因之一。

关键词: 割手密; 初生增粗分生组织; 微管骨架; 有丝分裂

中图分类号: Q945.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)04-0497-05

Change of microtubule cytoskeleton on mitosis in the shoot apex of *Saccharum spontaneum*

LI Zhi-Gang^{1*}, LI Su-Li¹, ZHANG Rong-Hua¹,

YANG Li-Tao¹, LI Yang-Rui²

(1. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China; 2. Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

Abstract: The microtubule cytoskeleton was investigated by using cryosectioning and indirect immunofluorescence staining in the shoot apex of *Saccharum spontaneum*. The results indicated that there were four basic types of microtubule arrays: cortical microtubule, preprophase-band, spindle and phragmoplast microtubule arrays. Cortical microtubule arrays were predominant in the primary thickening meristem of *S. spontaneum*, while other three arrays were rarely observed. It may be one of the reasons why *S. spontaneum* has a narrower stem than other cultivars.

Key words: *Saccharum spontaneum*; primary thickening meristem; microtubule cytoskeleton; mitosis

微管(microtubule)是细胞骨架系统中的主要成员之一,在植物的生长、发育等生命过程中起非常重要的作用(Cyr, 1994; Chafey, 1999; Tian等, 2004)。利用免疫荧光显微技术和各种电镜技术对植物微管进行了广泛的研究,但多集中在花粉管、胚囊、根尖或胚轴等材料上,所采用的主要方法是Wick等(1981)开创的离析单个细胞的方法。在大的组织或器官水平上,对微管的研究相对较少,其中一个重要原因就是缺少方便且稳定可靠的技术(何

群等,2004),至今有关单子叶植物茎尖细胞有丝分裂过程中结合微管骨架研究植物茎增粗机理的报道比较少。

有关植物茎增粗的机理,在双子叶植物中已有较为明确的概念,认为主要是靠维管形成层的不断发生和活动的结果(A. FAHN, 1990; 李扬汉, 1984),但是在单子叶植物中,一般认为没有次生生长的,其茎的增粗是有限的,只是初生生长的结果,对于这类植物茎增粗机理的研究很少(Oladele,

收稿日期: 2009-02-06 修回日期: 2009-05-14

基金项目: 国家自然科学基金(30060038); 国家科技支撑计划项目(2008BADB8B00); 广西科学基金(0991048)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30060038); National Key Technology R & D Program(2008BADB8B00); Provincial Science Foundation of Guangxi(0991048)]

作者简介: 李志刚(1969-),男,广西蒙山人,副教授,从事甘蔗解剖生理及环境生态研究,(E-mail)lizhigangnn@163.com.

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: lizhigangnn@163.com)

1986;Stevenson,1980)。甘蔗是单子叶植物也是重要的经济作物,甘蔗的产量高低与甘蔗茎径的关系极为密切,蔗茎顶端分生组织的区域化和初生增粗分生组织对蔗茎的增粗有重要作用(王俊丽等,2004;李素丽等,2004)。在前期对甘蔗茎尖发育过程微管列阵变化的研究中,笔者对甘蔗茎尖细胞有丝分裂过程中微管骨架变化进行了观察,发现了甘蔗茎尖各种典型微管列阵,并发现其在相互转变过程中各种微管列阵的过渡状态,依此可判断出甘蔗茎尖细胞的分裂方向(李志刚等,2008a),发现细胞在有丝分裂过程中的微管列阵与甘蔗茎增粗的关系较为密切。

割手密(*Saccharum spontaneum*)是甘蔗野生种,目前的甘蔗栽培种均含有这个种的血缘,其茎非常细,基部茎径只有4~7 mm(王鉴明,1985)。通过了解割手密茎发育过程中的微管列阵变化动态,可以更好了解微管骨架在甘蔗茎增粗中的作用,本研究将利用冰冻切片法结合免疫荧光定位技术对割手密中的茎尖微管骨架进行研究,为甘蔗茎增粗机理在微管动力学方面的研究提供参考。

1 材料与方 法

1.1 研究材料

供试材料为割手密。种植于广西大学教学科研基地甘蔗大棚,栽培管理与一般大田同。

1.2 取样时间

参照李素丽及张新成的方法(李素丽等,2004;张新成等,2008)每天早上10:00取割手密梢部带回实验室进行茎尖固定。

1.3 研究方法

方法参照张新成改进的方法(张新成等,2008)。制备好的片子用荧光显微镜(Olympus BX51型号,Japan)观察,激发光为蓝光,观察茎尖不同区域细胞内的微管骨架,物镜镜头为100倍油浸镜头。标记理想的图片利用OLYMPUS DIGITAL CAMERA DP70采集,图片的后期处理采用Photoshop CS2编辑排版,高分辨率打印机彩色打印。

2 结果与分析

在荧光显微镜下,我们观察到在有丝分裂过程中细胞内存在几种典型的微管周期变化,如周质微

管、早前期微管、纺锤体微管和胞质分裂中的成膜体微管等(图版I:A-R)。

2.1 有丝分裂间期细胞的周质微管

在间期细胞中,微管大致平行地排列在细胞膜下,大多数是集合在一起的微管束。在间期细胞中,可以看到细胞膜下方分布着呈“纤丝”或“束”状的发射荧光,即为周质微管,围绕着细胞长轴成圈排列(图版I:E)。从图象中可以看出茎尖原套原体周质微管大体上是与细胞长轴垂直而平行分布在细胞周围,这与Laskowaki(1990)对豌豆不同节间及节间不同部位细胞微管排列的研究结果,即在快速伸长的细胞中,微管垂直细胞长轴而平行排列的结果基本相同;也与我们前期的研究结果相一致,即甘蔗茎尖幼叶基部的初生增粗分生组织的周质微管有横向、斜向、纵向和随机排列等多种形式(李志刚等,2008a)(图版I:A-D),但是本研究观察到的微管列阵大多数是周质微管列阵(图版II:Q,R),这与栽培种的表现不完全一致,可能是野生种蔗茎较小的原因之一,有待进一步深入研究。

2.2 有丝分裂前期细胞的早前期微管带

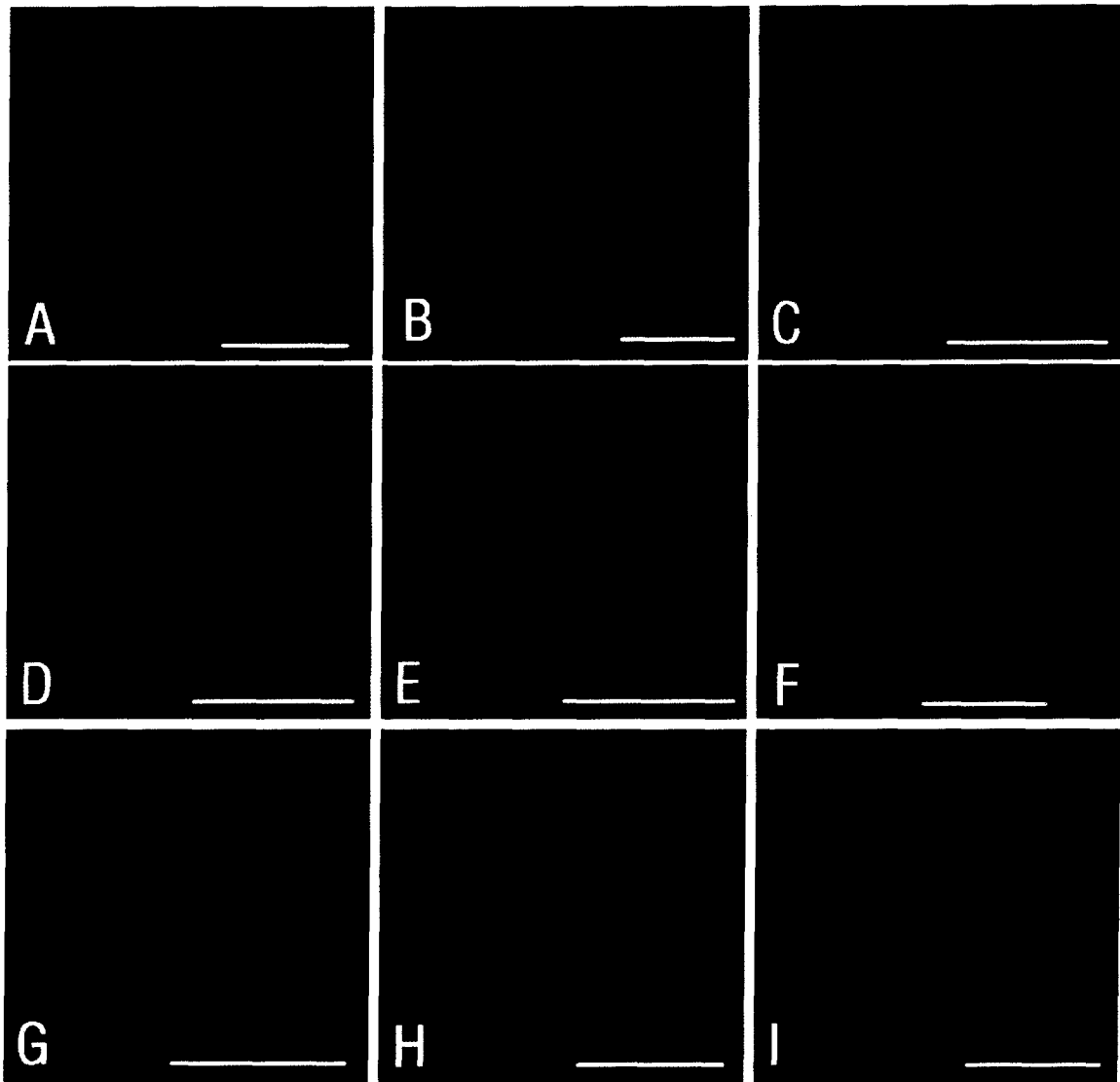
在分裂细胞由间期进入分裂早前期的过程中,间期细胞的丝状或束状周质微管大部分消失,围绕细胞核出现强烈荧光的环带,这就是早前期微管(图版I:G,H)。在荧光显微镜下,进入早前期分裂的细胞,均匀平行分布的周质微管开始出现向细胞中腰部位集中,此时周质微管仍然是均匀的,不过在中腰部位有一个比较宽的更密一些的区域(图版I:F)。当细胞中腰部分的早前期微管进一步集中时,早前期微管两侧以外的微管逐渐消失,最后在细胞质中形成一个极明亮的荧光带(图版I:G)。此后早前期微管趋于成熟,开始呈现纺锤体锥形(图版I:H)。

2.3 有丝分裂中期的纺锤体微管

当分裂细胞进入中后期,核膜破裂后,微管逐步集聚成束并继续向细胞中央延伸,有的微管与着丝粒结合形成着丝微管,没有与着丝粒结合的为非着丝微管,由于染色体本身没有荧光反应,在赤道面形成一个暗区,这就是纺锤体微管(图版I:I,图版II:J-L)。细胞继续分裂,后期的纺锤体微管牵引染色体继续向两极移动,着丝粒微管变短赤道区无荧光的暗区加宽,极区的荧光又加强(图版II:L)。

2.4 有丝分裂末期的成膜体微管

有丝分裂进入末期,子染色体完成分离后,纺锤



图版 I 割手密茎尖细胞有丝分裂周期的微管骨架 A-D. 横向、纵向、斜向及随机或网络状排列的周质微管；E-G. 周质微管逐渐向早前期带形成的过渡时期；G. 典型的早前期带，两极荧光增强，并向中间汇集；H, I. 纺锤体微管的雏形，极点发出的荧光逐渐增强，并伸向染色体排列的细胞中央。Bar=5 μm 。

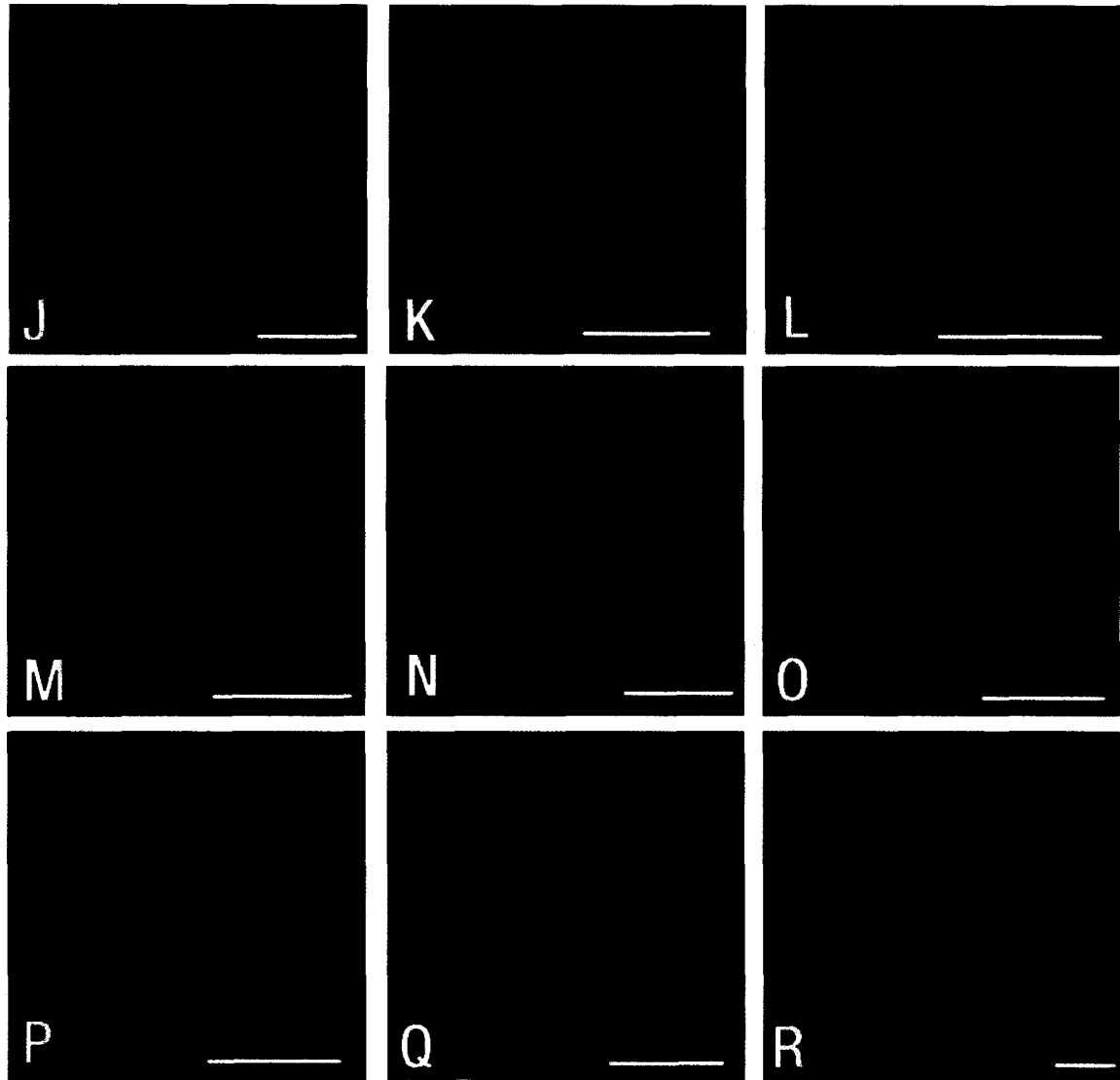
Plate I Mitotic cycle cytoskeleton in shoot apex microtubule cytoskeleton of *Saccharum spontaneum* A-D. Horizontal, vertical, diagonal and random or network-like arrangement of the cortical microtubules; E-G. Gradual formation towards the preprophase-band on transition period of cortical microtubules; G. A typical preprophase-band, bipolar fluorescence was enhanced and collected in the middle side; H, I. Spindle microtubule array shape, polar fluorescence gradually increased and arranged towards chromosomes of the cell centre. Bar=5 μm .

体微管逐渐向赤道板方向缩短(图版II:M), 荧光开始增强, 同时赤道板位置出现一条暗的无荧光的狭区, 这就是细胞成膜体微管。在割手密茎尖细胞分裂进行到胞质分离时, 微管逐渐向赤道板方向缩短, 荧光开始增强, 同时形成一个中间无荧光的细胞板和上下两排纵向密集的成膜体微管群(图版II:N-P)。随着子染色体群的染色体逐渐解聚, 成为松散的染色丝, 开始出现新的核被膜。此时, 成膜体微管开始沉积细胞板, 荧光从中间开始消失, 核周开始出现扩

散的荧光区(图版II:P), 最后形成周质微管, 完成一个微管周期。

3 讨论

甘蔗茎尖生长锥的微管列阵与甘蔗茎径的关系极为密切(李志刚, 2008a), 在有丝分裂的不同时期, 不同的微管列阵有不同的功能, 周质微管参与细胞壁中纤维素微纤丝的排列, 早前期微管带预示着细



图版 II J. 典型的纺锤体微管列阵,微管聚合成大的“纤丝”; K,L. 纺锤体微管开始从赤道板移向两极,纺锤体微管变短,荧光强度变暗; M. 纺锤体微管缩短的同时,赤道板位置出现早期的成膜体微管; N. 典型的成膜体微管列阵,中间荧光弱的位置形成细胞板; O,P. 成膜体微管荧光从中间开始逐渐变弱,两个子细胞开始形成周质微管; Q,R. 初生增粗分生组织细胞的周质微管列阵。Bar=5 μm 。

Plate II J. Typical spindle microtubule array, microtubule polymerization of thick fibrils; K, L. Beginning of spindle microtubule moved from the equator plate to the poles, spindle microtubule became shorter, the fluorescence became darker; M. Spindle microtubules became shorter, at the same time, inchoately phragmoplast microtubules appeared at the equatorial plate; N. Typical phragmoplast microtubule array, formation of cell plate at the place where the middle fluorescence was weak; O, P. Gradual weakening of the phragmoplast microtubule fluorescence from the middle, two daughter cells began to form to cortical microtubules; Q, R. Array of primary thickening meristem cells on the cortical microtubules. Bar=5 μm .

胞分裂板的位置,成膜体微管参与细胞板的形成(Abe等,1995; Holdaway等,1995),纺锤体微管参与染色体的正常排布和均等分离活动等(顾月华等,1997)。本研究中,野生甘蔗种割手密茎尖端分生组织细胞有丝分裂时的微管列阵与我们对栽培种(粤糖86/368,美国CP80/1827)的研究结果基本一致(李志刚等,2008a, b; 张新成,2007),但在初生增粗分生组织中有较大的差异,在栽培种中,初生增粗

分生组织细胞分裂中期的纺锤体微管列阵最多,成膜体、早前期微管带也有分布,但在甘蔗野生种割手密的初生增粗分生组织中,大多数是周质微管列阵,其他列阵如早前期微管带列阵、纺锤体微管列阵和成膜体微管列阵等的分布较少,这可能是割手密茎径较小的原因之一,同时也预示初生增粗分生组织有丝分裂过程中,周质微管列阵对甘蔗茎增粗起着较为重要的作用。说明在长期的育种过程中,栽培

甘蔗种茎尖生长锥的微管阵列已经发生了很大的变化,更加利于甘蔗茎的增粗。

参考文献:

- A. FAHN. 1990. 植物解剖学[M]. 天津:南开大学出版社
- 李扬汉. 1984. 植物学[M]. 上海:上海科学技术出版社
- 王黎明. 1985. 中国甘蔗栽培学[M]. 北京:农业出版社
- 张泽林. 1999. 细胞分裂相的决定因素——取材时间[J]. 生物学通报, **34**(8):22
- 张新成. 2007. 甘蔗茎尖微管骨架的初步研究[D]. 硕士学位论文
- 徐是雄,朱徽. 1996. 植物细胞骨架[M]. 北京:科学出版社
- Abe H, Funada R, Imaizumi H, et al. 1995. Dynamic changes in the arrangement of cortical microtubules in conifer tracheids during differentiation[J]. *Planta*, **197**:418—421
- Chafey N. 1999. Cambium; old challenges-new opportunities[J]. *Trees*, **13**:138—151
- Cyr RJ. 1994. Microtubules in plant morphogenesis; role of the cortical array[J]. *Annu Rev Cell Biol*, **10**:153—180
- Gu YH(顾月华), Cheng YH(程颖红), Lu JH(罗江虹). 1997. Study on the pattern of developmental change of the microtubule cytoskeleton during mitosis in phaseolus aureus root-tip cells(绿豆根尖细胞微管骨架有丝分裂时相发育变化的研究)[J]. *Acta Laser Biol Sin*(激光生物学报), **6**(4):1 241—1 246
- He Q(何群), You RL(尤瑞麟). 2004. Steedman's wax sectioning for observation of the microtubule cytoskeleton in plant cells(应用 Steedman's wax 切片法观察植物细胞微管骨架)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报), **21**(5):547—555
- Holdaway NJ, White RG, Overall RL. 1995. Is the recovery of microtubule orientation in pea roots depend on the cell wall[J]. *Cell Biol*, **19**:913—919
- Kerstetter RA, Hake S. 1997. Shoot meristem formation in vegetative development[J]. *Plant Cell*, **9**:1 001—1 010
- Li SL(李素丽), Lin JZ(林鉴钊), Wang JL(王俊丽). 2004. Study on the cell division rhythm of different sugarcane varieties[J]. *Guihaia*(广西植物), **24**(2):188—192
- Li ZG(李志刚), Zhang XC(张新成), Lin L(林丽), et al. 2008a. Microtubule cytoskeleton change during mitosis in the shoot apex of sugarcane(甘蔗茎尖细胞有丝分裂过程中微管骨架的变化)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报), **25**(3):276—283
- Li ZG(李志刚), Zhao HB(赵洪波), Li SL(李素丽), et al. 2008b. The change of microtubule cytoskeleton in the stem-tip cells of sugarcane during mitosis(甘蔗茎尖细胞有丝分裂过程中微管骨架的变化)[J]. *J Anhui Agri Sci*(安徽农业科学), **36**(16):6 805—6 808
- Laskowski, MJ. 1990. Microtubule orientation in pea stem cells; a change in orientation follows the initiation of growth rate decline[J]. *Planta*, **181**:44—52
- Oladele FA. 1986. Secondary thickening of the stem in *Amaranthus hybridus* ssp *crentus*[J]. *Korean J Bot*, **29**(2):129—134
- Stevenson DW. 1980. Fisher JB. The development relationship between primary and secondary thickening growth in cordyline(Agavaceae)[J]. *Bot Gaz*, **141**(3):264—268
- Tian GW, Smith D, Gluck S, et al. 2004. Higher plant cortical microtubule array analyzed *in vitro* in the presence of the cell wall[J]. *Cell Motil Cytoskeleton* **57**:26—36
- WANG Junli(王俊丽), LIN Jianzhao(林鉴钊), LI Suli(李素丽), et al. 2004. Studies on the cell division of primary thickening meristem and apical meristem for the shoot apex in sugarcane[J]. *J Guangxi Agric Biol Sci*(广西农业生物科学), **23**(1):11—14
- Wick SM, Seagull RW, Osborn M, et al. 1981. Immunofluorescence microscopy of organized microtubule arrays in structurally stabilized meristem plant cells[J]. *J Cell Biol*, **89**:685—690
- Zhang XC(张新成), Li ZG(李志刚), Li SL(李素丽), et al. 2008. Cryosectioning method for the observation of microtubule cytoskeleton in plant cells(冰冻切片法在植物微管骨架研究中的应用)[J]. *Guihaia*(广西植物), **28**(2):164—166
- ling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation[J]. *Plant Cell*, **8**:489—503
- Knight H, Trewavas AJ, Knight MR. 1997. Calcium signaling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity[J]. *Plant J*, **12**:1 067—1 078
- Knight MR, Campbell AK, Smith SM, et al. 1991. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium[J]. *Nature*, **352**:524—526
- Knight MR, Read ND, Campbell AK, et al. 1993. Imaging calcium dynamics in living plants using semi-synthetic recombinant aequorins[J]. *J Cell Biol*, **121**(1):83—90
- Montero M, Barrero MJ, Alvarez J. 1997. [Ca²⁺] microdomains control agonist-induced Ca²⁺ release in intact HeLa cells[J]. *FASEB J*, **11**:881—885
- Nelson G, Kozlova-Zwinderman O, et al. 2004. Calcium measurement in living filamentous fungi expressing codon-optimized aequorin[J]. *Mole Microbiol*, **52**(5):1 437—1 450
- Pouly N, Knight MR, Thuleau P, et al. 2001. The nucleus together with the cytosol generates patterns of specific cellular calcium signatures in tobacco suspension-cultured cells[J]. *Cell Calcium*, **30**:413—421
- Prasher DC, McCann RO, Cormier MJ. 1985. Cloning and expression of the cDNA cloning for aequorin, a bioluminescence calcium-binding protein[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **126**:1 259—1 268
- Ridgeway EB, Ashley CC. 1967. Calcium transients in single muscle fibers[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, **29**:229—234
- Rizzuto R, Simpson AWM, Brini M, et al. 1992. Rapid changes in mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin[J]. *Nature*, **358**:325—328
- Sai J, Johnson CH. 2002. Dark-stimulated calcium ion fluxes in the chloroplast stroma and cytosol[J]. *Plant Cell*, **14**:1 279—1 291
- Sanders D, Brownlee C, Harper JF. 1999. Communicating with Calcium[J]. *Plant Cell*, **11**:691—706
- Shimomura O. 1997. Membrane permeability of coelenterazine analogues measured with fish eggs[J]. *Biochem J*, **326**:297—298
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. 1962. Extraction purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa aequorea[J]. *J Cell Comp Physiol*, **59**:223—240
- Shimomura O, Musicki B, Kishi Y, et al. 1993. Light-emitting properties of recombinant semi-synthetic aequorins and recombinant fluorescein-conjugated aequorin for measuring cellular calcium[J]. *Cell Calcium*, **14**:373—378
- Shu BH(舒柏华), Wang SL(王胜利), He LY(何丽芸). 2007. Development of a method for quantitative determining PCR products by bioluminescent assay(PCR产物生物发光分析技术研究)[J]. *Chin J Public Health*(中国公共卫生), **22**(7):820—821
- Stephen G Cessna1, Philip S Low. 2001. An apoplastic Ca²⁺ sensor regulates internal Ca²⁺ release in aequorin transformed tobacco cells[J]. *The J Biol Chem*, **276**(14):10 655—10 662

(上接第 540 页 Continue from page 540)