

试管植物器官微型化及结构特征

赵乐乐^{1,2}, 苏晴¹, 王玉海¹, 李友勇^{1*}

(1. 河南科技学院 河南省高等学校作物分子育种重点学科开放实验室, 中国河南 新乡 453003;
2. 上海交通大学 农业与生物学院, 中国上海 200240)

摘要: 植物组织培养中的试管植物, 其形态比自然形态要小得多, 脱离试管后能恢复原形态大小, 这种微型化和微型化解除是植物与环境相互作用的一个新命题. 以试管马铃薯无性系微型薯为材料, 在试管和花盆两种环境下发芽并长成植株, 显微切片方法观察其组织结构特征, 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)方法分离不同处理植株的差异蛋白. 研究发现, 试管植株器官微型化的主要原因是细胞数量减少, 其次是细胞体积减小, 但试管植株的气孔则较大. 在不同处理的植株中检测出单个和多个蛋白差异. 结果说明, 试管因子, 包括营养和生长空间因子, 能显著胁迫植物正常生长和形态建成, 形态改变过程伴随有较大的生理变化.

关键词: 马铃薯; 器官大小; 空间胁迫; 微型化; 差异蛋白

中图分类号: Q944.3+2

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2011)01-0024-06

Micromation and Structural Characteristics of Plantlets *In vitro*

ZHAO Le-le^{1,2}, SU Qing¹, WANG Yu-hai¹, LI You-yong^{1*}

(1. Key Discipline Open Laboratory on Crop Molecular Breeding of Henan Institutions, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, Henan, China; 2. College of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: It was frequently seen that plant morphogenesis *in vitro* was much smaller than that in the natural environment, and when they were moved out from the test tube, their organs could recover to natural size. This kind of micromation and unmicromation is a new proposition that could be used to research the interaction between plants and environment. The micropotatoes from the clones which was produced *in vitro* was act as the materials for observation of their morphological, structural, and physiologic characteristics as they were planted in both test-tube and flowerpot environment respectively. It was found that organs micromation under the stress *in vitro* was mainly because of the decrease of cell numbers, and also diminishing of cell size. But the stomata on test-tube plantlets were larger than on flowerpot plants. The results from SDS-PAGE were also found that a few differential proteins that were extracted from the plants stressed by nutrient and space factors were hanged on the gels. These results definitely indicated that the nutrition and space factors could significantly change plant growth and morphogenesis, and the process of morphogenesis was coupled with a variety of changes of physiology.

Key words: potato; organ size; space stress; micromation; differential protein

(*Life Science Research*, 2011, 15(1): 024~029)

收稿日期: 2010-09-07; 修回日期: 2010-11-10

基金项目: 河南省自然科学基金资助项目(0511031100)

作者简介: 赵乐乐(1987-), 女, 河南平顶山人, 硕士研究生, 主要从事动物与环境生物学研究; *通讯作者: 李友勇(1955-), 男, 河南济源人, 河南科技学院教授, 主要从事农学与生物技术研究, Tel: 0373-3040937, E-mail: liyouyong@163.com.

在植物组织培养中存在一种普遍现象,即,当把植物组织、器官或种子种植在试管中,可以生长发育成一个完整的个体,但其形态大小比自然生长下的个体要小得多,我们常称这种植株叫微型植株.当把试管微型植株重新栽植到土壤后,其形态又能恢复到原来大小.试管植物的微型化现象实际上是植物与其生长的环境相互适应的结果,即,生物体能够对重复出现的各种生物或非生物胁迫产生响应或适应,从而在形态、生理、功能等方面表现出特异性或多态性.

试管植物生长特异性受试管多因子影响,如矿质元素、糖、激素等营养因子,也有生长空间、光照、光质等环境因子,这些因子中的任何一项都能影响试管植株的形态发育.由于试管植株的微型化是试管多因子综合作用的结果,因此,我们称这些因子为试管胁迫,其中的矿质元素、糖、激素等营养因子的作用称营养胁迫,生长空间、光照等称环境胁迫,尤其是生长空间,在试管胁迫中是一个有典型意义的胁迫现象,我们称空间胁迫.

研究植物试管胁迫现象有重要意义.其一,能为全面、深入认识植物与环境的相互关系提供一条新的认识途径;其二,可以揭示和发现生物体正常生存的最小、最优环境空间;其三,可以发现除激素外其它调节植物细胞生长的重要因子.因为激素调节植物生长的功能已为人所知,在无外源激素培养基中,试管植株仍然是微型的.因此,发现这些因子,对于促进植物生长发育,增大器官大小,增加植物产量和品质等,都有重要意义.

一直以来,人们对环境胁迫植物生长,如盐胁迫^[1,2]、水分胁迫^[3,4]、金属胁迫^[5]、光氧化胁迫^[6,7]等各种生物或非生物胁迫给予较多的关注,但对于试管因子怎样影响到植株的生长和发育,使试管植物微型化,其研究还很少.

试管胁迫的直接结果是植物的器官简化,形态变小.器官变小的直接原因不外乎有两个,一是细胞大小变小,二是细胞数目减少.在该方面,过去没有系统的研究和报道,但在一些基因调控方面的研究有重要发现.李云海等在模式植物拟南芥中发现有控制种子和器官大小的基因存在^[8]; Mizukami Y 和 Fischer R L 报道拟南芥中调节基因 *AINTEGUMENTA* (*ANT*) 的功能,是通过调节细胞分裂来调节细胞数目,进一步调节

器官大小^[9].这些研究对我们理解植物器官分化、形成和调控的机理提供了重要线索和方法.植物的试管胁迫和水分胁迫、盐胁迫等胁迫一样,在植物器官正常发育的过程中发生了作用,这个作用也是一个逐级放大过程,器官微型化是这个过程的最后结果.本文通过系统观察试管微型植株和正常植株的形态差异,比较两个类型的器官大小和组织结构,分析细胞大小和数目在微型化中的作用,确定试管条件下植株变小的直接原因;同时,利用 SDS-PAGE 凝胶电泳方法初步分析胁迫和非胁迫植株的差异蛋白,探讨试管各因子导致器官微型化的内在机制.

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为马铃薯试管微型薯植株,该植株在试管中培养超过 10 年,在试管中一个培养周期后可产生气生微型薯.分离单一微型薯株系,在单株系扩繁的试管中选大小一致的微型马铃薯(长×直径约为 1.5×0.5 cm),分别在三角瓶和花盆中发芽培养.在三角瓶中培养时设 2 000、1 000、500、300 mL 容量的试管空间处理.培养基为:MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L+2,4-D 0.2 mg/L+IAA 0.5 mg/L+蔗糖 3%.在花盆中培养时,分别给予 2 000、1 000 mL 的烧杯罩苗处理.微型薯播种约 1 个月后,取茎的顶端材料观察形态和提取总蛋白.

1.2 方法

1.2.1 形态特征组织结构观察

分别取试管植株和花盆植株的同一部位新鲜茎叶,用乙醇:冰乙酸(3:1)固定液固定 24 h,然后用 95%的酒精换洗 1 h 以上,再换 75%的酒精室温下保存.取固定好的材料在 0.5%固绿染液(95%乙醇配制)中染色 12 h,蒸馏水洗去浮色,冰冻切片,显微镜下观察形态和结构.观察了 3 个材料的气孔、表皮、栅栏组织和海绵组织的组织结构,并分析了细胞大小.

1.2.2 蛋白质 SDS-PAGE 电泳

取材 8 个,分别为:花盆 2 000、1000 mL 玻璃罩处理(1号、2号),三角瓶 2 000、1 000、500、300 mL 中生长的新鲜植株茎叶,茎叶粗壮、形态正常,称 A 系(3~6号).在培养中发现有的 A 系植株上出现另一种形态,茎叶细小,与主茎差异明显(见图 1 B),称形态 II(7号),主

茎形态称形态 I；另一种试管植株全部是形态 II 的形态，称 B 系，取材记为 8 号。

蛋白质提取和电泳方法见理查德 J. 辛普森方法^[10]。准确称量上述新鲜实验材料 200 mg，置研钵中，加入少许石英砂，冰浴充分研磨。分 3 次加入样品提取液，每次 400 μL ，充分研磨之后转移到 1.5 mL 离心管中，12 000 r/min 离心 12 min，取上清。上样前样品 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min，12 000 r/min 离心 10 min，取上清，加 0.5% 溴酚蓝 20 μL 上样。

SDS-PAGE 电泳方法的基本参数为，浓缩胶 4%，分离胶 12%，上样量 15 μL ，DYY-11 型电泳仪和 DYCZ-28A 型电泳槽，恒流，电压浓缩胶 50 V，分离胶 100 V，考马斯亮蓝染色。蛋白质分子质量标准是第四军医大学中分子质量标准。

1.2.3 A 系和 B 系分系繁殖

为了观察遗传性，将 A 系和 B 系的植株分系繁殖，观察后代无性系的植株形态。

2 结果与分析

2.1 不同生长条件下马铃薯植株的形态结构

2.1.1 不同培养条件下马铃薯植株的形态特征

在花盆和三角瓶中发芽生长的马铃薯植株，一个月后，植株形态差异明显。相比较，在花盆中生长的植株，茎秆粗，叶片大(见图 1A)，试管中生长的马铃薯植株比花盆中的植株明显变小，即微型化(见图 1B)，并且还出现有更细小的形态变化(见图 1B 箭头所示，即形态 II，图 1C 左是其放大图)，普通试管植株称为形态 I(见图 1C 右图)。

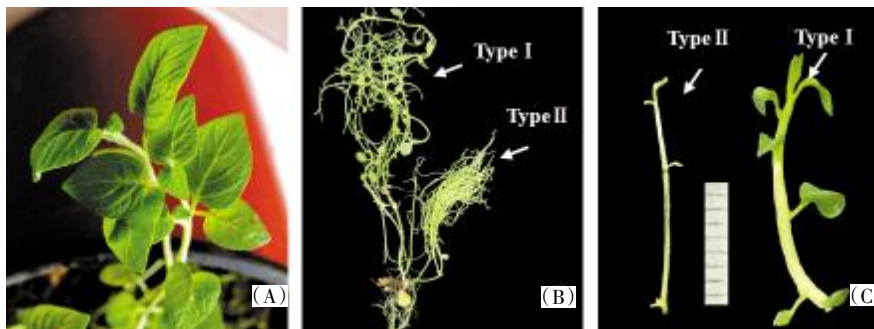


图 1 不同生长环境下的马铃薯植株形态

(A) 花盆马铃薯植株；(B) 试管马铃薯植株。一个植株上生长出两种形态，形态 I 和形态 II(箭头所示)；(C) 试管马铃薯植株形态 I 和形态 II 茎秆粗细和叶片大小的比较(图中标尺 1 个单位代表 1 mm)。

Fig.1 Potato plant morphogenesis under the different environment

(A) The plant grew in flowerpot; (B) The plant grew *in vitro*. There are two types of divarication in one plant, type I and type II (arrows); (C) Comparison of the stem and leaf size between type I and type II (1 unit of length in mark ruler represents 1 mm).

2.1.2 不同营养和空间条件下马铃薯植株的结构特征

图 2 是移栽在花盆和试管形态 I、试管形态 II 的气孔、表皮、栅栏组织细胞、海绵组织细胞的光学显微结构图，选取 20 个典型细胞，测定其长和宽，计算平面截面积，其平均数见表 1。从图 2 和表 1 中可以看出以下几个结果：

1) 气孔细胞。试管植株的气孔，包括形态 I(图 2 C)和形态 II(图 2 B)，都比花盆植株(图 2 A)的气孔面积大，其细胞截面积差异极显著(见图 2 A~C 和表 1)，并且数量多，分布密(见图 2 B 和 C)；形态 I 和形态 II 相比，气孔大小差异也达极显著水平(见表 1)。另外还观察到一种现象，试管植株的气孔一般都在开启状态，而花盆植株

则多在闭合状态。分析试管植株气孔大且常开的原因，可能是由于试管空间有限，试管中的氧气或二氧化碳浓度处于胁迫状态，导致试管植株气孔处于常开状态。

2) 栅栏组织。花盆植株的栅栏组织细胞比试管植株明显要大(见图 2G~I)，且达显著水平(见表 1)，说明植株移植土壤后，新生长的叶外层细胞，体积增大了。形态 I 和形态 II 之间栅栏组织细胞大小未达显著水平。

3) 海绵组织。测定的结果是，花盆植株和试管形态 I 的细胞大小差异达显著水平，但未达极显著水平，试管形态 I 和形态 II 之间的细胞大小没有差异(见表 1 和图 2J~L)。

从这些结果看，植物生长在试管中形态变

小,其两大直接原因,细胞大小和细胞数目的改变都是存在的.实验测定的试管植株的栅栏组织细胞和气孔细胞截面积减小了,说明细胞体积变小了,但海绵组织的细胞截面积变化较小.从图

1 的 A 和 B 比较看,试管植株微型化,植株总体积大幅减小,由此可以推断,试管植株细胞数目也减少了,并且减少量远大于细胞大小.

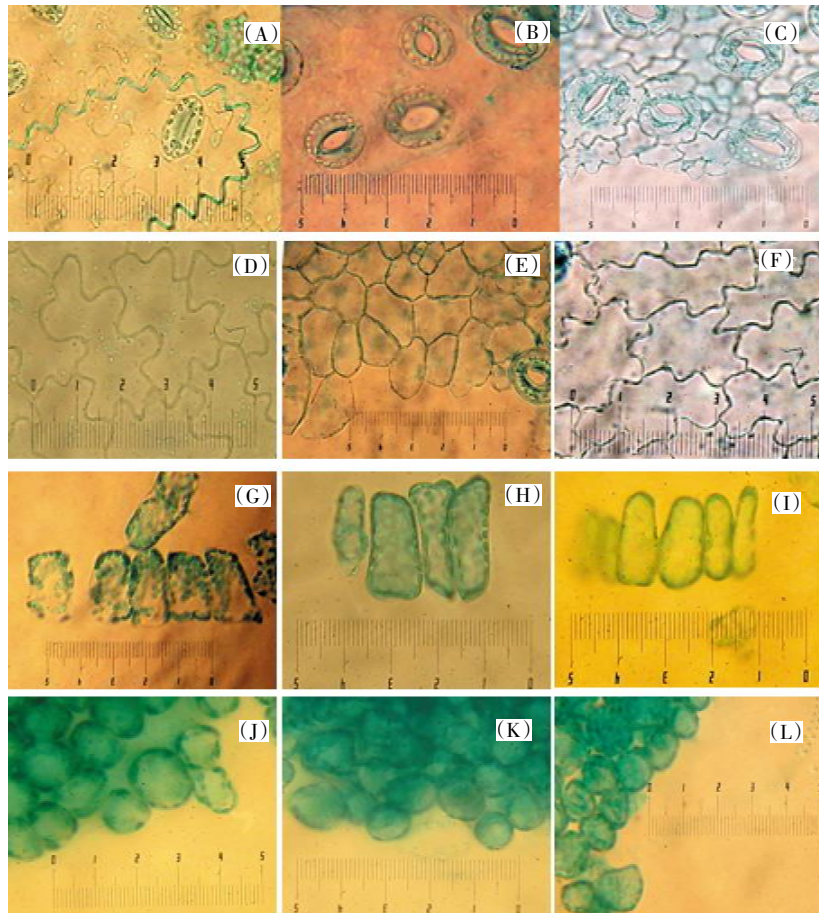


图 2 不同生长环境下马铃薯植株叶片组织的光学显微结构

(A~C) 花盆植株、试管形态 II、试管形态 I 的气孔细胞($\times 400$); (D~F) 花盆植株、试管形态 I、试管形态 II 的表皮细胞($\times 400$); (G~I) 花盆植株、试管形态 I、试管形态 II 的栅栏组织细胞($\times 400$); (J~L) 花盆植株、试管形态 I、试管形态 II 的海绵组织细胞($\times 400$).

Fig.2 The optical microstructure of leaf tissues of the potato plant under the different environment

(A~C) Stomatal cells of flowerpot plant, test-tube plant II, test-tube plant I ($\times 400$); (D~F) Epidermal cells of flowerpot plant, test-tube plant I, test-tube plant II ($\times 400$); (G~I) Stockade tissue cells of flowerpot plant, test-tube plant I, test-tube plant II ($\times 400$); (J~L) Sponge tissue cells of flowerpot plant, test-tube plant I, test-tube plant II ($\times 400$).

表 1 不同环境下马铃薯植株叶片组织细胞大小测量结果

Table 1 Cells size of leaves tissue of potato plant under the different environment

Tissue type Stress types	Stomatal cells			Epidermal cells			Sponge tissue cells		
	F	I	II	F	I	II	F	I	II
Average($\bar{x} \pm s_x$)	117.9 \pm 18.2	288.8 \pm 22.9	222.0 \pm 24.9	263.2 \pm 20.7	150.1 \pm 39.5	137.7 \pm 20.9	166.5 \pm 27.6	132.9 \pm 39.7	124.3 \pm 22.2
t value (II - F)	22.622 ^{**}	-	-	9.824 ^{**}	-	-	2.667 [*]	-	-
t value (F - I)	-	7.644 ^{**}	-	-	1.081	-	-	0.727	-

注:胁迫类型中 F 指花盆植株; I 指试管形态 I; II 指试管形态 II; $t_{0.05,28}=2.048$; $t_{0.01,28}=2.763$; *: 经 t 测验差异达显著水平 ($P<0.05$), **: 经 t 测验差异达极显著水平 ($P<0.01$).

Notes: In stress types, F indicates flowerpot plant; I represents test-tuber plant I; II represents test-tuber plant II; $t_{0.05,28}=2.048$; $t_{0.01,28}=2.763$; *: The t test differences are significant ($P<0.05$), **: The t test differences are highly significant ($P<0.01$).

2.2 不同营养和空间条件处理的 SDS-PAGE 电泳分析

通过条件优化, 12%分离胶分离效果最好. 经电泳、染色和凝胶成像处理, 得到不同空间和营养条件下 8 个样品的单向差异蛋白电泳图(图 3).

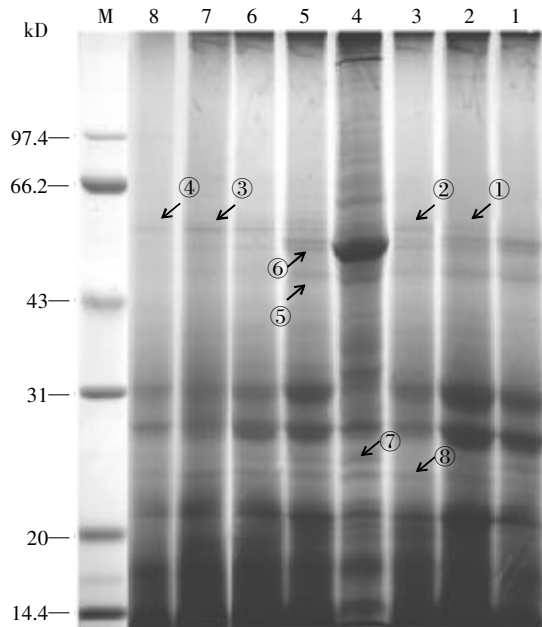


图 3 8 个样品的 SDS-PAGE 差异蛋白电泳图谱
1~8 泳道分别对应 1~8 号样品, M 泳道是 Marker.

Fig.3 SDS-PAGE electrophoresis photograph for different protein of 8 samples

1~8 lanes correspond 1~8 sample each other, M lane is the Marker.

从图 3 中可以看出, 8 个样品的单向电泳差异蛋白有多种类型, 有的差异蛋白数量多, 覆盖面大, 如 4 泳道的 1 000 mL 三角瓶的 4 号样品, 差异蛋白谱带数量多且清晰, 差异明显, 有的差异不明显. 主要差异蛋白带及特征有:

1) 花盆植株与试管植株的比较, 实际上是土壤营养和人工试管营养的差异. 1、2 号和 3、4、5、6 号比较, 出现的差异蛋白较多, 并且相互交错. 这说明两种营养方式对个体生长有较大影响;

2) 1 号和 2 号是在土壤营养条件下, 不同空间对马铃薯生长的影响, 2 000 mL 与 1 000 mL 空间胁迫的比较, 蛋白图谱基本一致, 仅 1 000 mL 处理中有一个 60 kD 的①号差异蛋白, 对应 2 000 mL 处理显示较弱;

3) 在 3~6 号泳道, 4 个试管植株的差异是离体下不同试管空间的影响. 从图 3 可看出, 差异

蛋白数量多, 无规律(见②、⑤、⑥、⑦、⑧), 尤其 1 000 mL 空间生长的 4 号植株, 带数量多, 分布范围大, 也有亚基位置差异. 2 000 mL 空间生长的马铃薯植株在试管中观察到没有显示出生长优势, 蛋白质表达总量也较小;

4) 3~6 号和 7、8 号的比较, 实际上是试管植株中形态 I 和形态 II 的差异比较. 形态 I 生长较正常, 形态 II 是细弱型, 在一维电泳中没有能够显示出十分明显的差异, 但⑤号蛋白和⑦号(26 kD 蛋白)在形态 II 中表达量减少了, 58 kD 蛋白③和 50 kD 蛋白⑥在形态 I 中是两个, 在形态 II 中变成 1 个;

5) 7 号和 8 号是两种形态 II 植株的比较, 7 号是试管植株形态 I 上产生的形态 II, 8 号是 B 系的形态 II. 7 号与 8 号相比, 总蛋白浓度偏低, 多处带颜色较弱(例③和④), 但没有差异蛋白出现.

综上所述可以看出, 在差异蛋白方面, 试管营养和土壤营养植株的蛋白差异类型较多, 显示出环境的综合作用. 试管营养保证植物生长的必需性, 但土壤营养则更丰富、更全面, 这些营养和大气环境共同作用使植株生长达到正常水平. 不同空间处理显示了多个差异蛋白, 这是生长空间引起基因差异性表达的直接结果, 虽然这些结果规律性不强, 但这些差异给我们提供了深入研究的重要信息和线索. 同一基因型微型薯在试管中常出现形态 I 和形态 II 的分化, 二者在生理生化上检测到有代谢差异, 但两个不同来源的形态 II 内则没有检测到差异, 这些现象的出现都为将来的深入研究提供新的方向和内容.

2.3 形态 I、形态 II 的无性后代表现

观察表明, 形态 II 植株的后代仍表现植株较粗壮, 有叶片形成, 而形态 II 的后代, 继代第一代仍表现茎细小, 几乎无叶片形成, 在继代第二代植株生长接近形态 I, 第三代时和形态 I 已无差异.

3 讨论

3.1 试管植株微型化的主要原因是细胞数目减少

植物在不同环境下生长, 植株形态会产生多态性, 在试管中也会出现这种多态性. 试管植物相对于土壤中生长植物, 最大形态特征是个体微型化, 器官变小, 形态简化. 比较试管微型化植

株和土壤中正常植株的组织结构,其差异是细胞数目减少,其次是细胞大小减小.细胞数目减少的结果还说明,在不同营养和空间条件下生长的马铃薯植株,胁迫作用主要是通过影响细胞分裂实现的.这与 Mizukami 等认为细胞大小的发育调控更保守的研究结论相一致^[9].

3.2 不同形态植株存在代谢蛋白差异

试管胁迫导致植株形态改变,事实上是生理改变的结果,而生理改变是基因表达改变的结果,基因表达改变又是环境影响和调控的结果.在该方面,电泳结果发现了数目较多的差异蛋白,如1和2泳道60 kD 差异蛋白是土壤营养下两个空间胁迫的差异;5、6和7泳道之间的28 kD和58 kD 差异蛋白是I、II两形态植株的差异;4个试管空间处理,4号材料有更丰富的蛋白表达等等这些信息是不同试管因子影响个体发育的直接结果.对这些结果的进一步分析,可揭示培养因子与个体发育之间的调控联系.

3.3 空间胁迫是试管胁迫的一个重要因子

从实验结果看,空间因子的作用是肯定的.不同试管空间发现有差异蛋白存在,这种生理差异的扩大必然导致形态差异.虽然试管植株微型化还有营养因子的作用,但植物的水培方式其营养因子大体同试管营养因子,植物个体发育达正常水平,甚至超过土壤生长水平,这些事实间接说明空间在植物发育中有重要作用,狭小空间限制个体发育.试管空间也是一个综合因子,有温度、光照、气体等因素,我们更关注的是体积空间,植物在一定体积空间下,其个体发育会受该空间调节.

3.4 形态I和形态II发育是表观差异

在马铃薯的试管培养过程中,同一空间条件下,甚至在同一植株上出现了形态的分化,该现象令人费解.形态I和形态II二者相比,在气孔大小、栅栏组织细胞、海绵组织细胞和表皮细胞大小等方面,其差异都不显著,继代培养能恢复正常,说明是一种暂时的表观变异.电泳分析检测出二者之间有两个差异蛋白,该蛋白应与

两种形态分化有重要联系.关于该方面的机理,包括两个差异蛋白的作用方式等,有待进一步深入研究.

参考文献(References):

- [1] 杨少辉,季静,王罡,等.盐胁迫对植物影响的研究进展[J].分子植物育种(YANG Shao-hui, JI Jing, WANG Gang, et al. Effects of salt stress on plants[J]. Molecular Plant Breeding), 2006, 4(3): 139-142.
- [2] 刘春卿,杨劲松,陈德明,等.不同耐盐性作物对盐胁迫的响应研究[J].土壤学报(LIU Chun-qing, YANG Jin-song, CHEN De-ming, et al. Response to salt stress of crops different in salt tolerance[J]. Acta Pedologica Sinica), 2005, 42(6): 993-997.
- [3] 石进校,刘应迪,陈军,等.土壤涝渍胁迫对淫羊藿叶片膜脂过氧化和SOD活性的影响[J].生命科学研究(SHI Jin-xiao, LIU Ying-di, CHEN Jun, et al. Activity of POD, SOD and content of MDA of *Epimedium sagittatum maxim* under temperature stress[J]. Life Science Research), 2002, 6(4): 29-31.
- [4] 宋松泉,王彦荣.植物对干旱胁迫的分子反应[J].应用生态学报(SONG Song-quan, WANG Yan-rong. Molecular response of plant to drought stress[J]. Chinese Journal of Applied Ecology), 2002, 13(8): 1037-1044.
- [5] 王育花,肖国樱.烟酰胺合成酶基因在植物铁胁迫应答反应中的功能[J].生命科学研究(WANG Yu-hua, XIAO Guo-ying. Function of nicotianamine synthase gene in plant iron stress[J]. Life Science Research), 2009, 13(4): 354-359.
- [6] 吴长艾,孟庆伟,邹琦.小麦不同品种叶片对光氧化胁迫响应的比较研究[J].作物学报(WU Chang-ai, MENG Qing-wei, ZOU Qi. Comparative study on the photooxidative response in different wheat cultivar leaves[J]. Acta Agronomica Sinica), 2003, 29(3): 339-344.
- [7] 阎成士,李德全,张建华.植物叶片衰老与氧化胁迫[J].植物学通报(YAN Cheng-shi, LI De-quan, ZHANG Jian-hua. Plant leaf senescence and oxidative stress[J]. Chinese Bulletin of Botany), 1999, 16(4): 398-404.
- [8] LI Y, ZHENG L, CORKE F, et al. Control of final seed and organ size by the DA1 gene family in *Arabidopsis thaliana*[J]. Genes and Development, 2008, 22(10): 1331-1336.
- [9] MIZUKAMI Y, FISCHER R L. Plant organ size control: *AINTEGUMENTA* regulates growth and cell numbers during organogenesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(2): 942-947.
- [10] 理查德J辛普森.何大澄(译).蛋白质与蛋白质组学试验指南[M].北京:化学工业出版社(RICHARD J Simpson. HE Da-cheng (translation). Protein and Proteomics: A Laboratory Manual[M]. Beijing: Chemical Industry Press), 2006.47-62.