

水稻花药培养白化苗的亚显微结构研究

生物系 遗传组、中心实验室

应用水稻花药培养植株,可以在短时间内育成新品种。但在单倍体育种中,白化苗的频率很高,有些甚至全部都是^[10]。由于白化苗缺乏叶绿体而不能进行光合作用,全靠异养生活,不能为生产上应用,严重地影响了单倍体育种的成效。因此,对白化苗产生的原因与控制的措施,就成为当前禾谷类单倍体育种急待解决的问题。

本文研究了绿苗、白化苗的叶片以及分化绿苗与白化苗的愈伤组织细胞亚显微结构和内含物成份的差异。

材料与 方法

实验材料: 籼稻与粳稻(*Oryza sativa*)花药培养出来的植株与愈伤组织。其组合为:

- ① (Pi5 × 红旗12号)F₁,
- ② [(禾兴谷 × 金美)F₄ × 台中65号]F₃,
- ③ [(IR20 × 竹印2号)F₄ × 窄叶青8号]F₂,
- ④ (辐包矮 × IR₂₄)F₂。

花药培养: 去分化培养诱导愈伤组织,是在N6培养基^[1]与籼诱Ⅱ培养基^[2]中(蔗糖为6%)培养,当愈伤组织长至1.5—2mm左右,转移到再分化的培养基中诱导成植株。整个培养过程中,恒温28±1℃,以荧光灯与白炽灯照明,光强度为2000勒克斯左右。

取样与样品的制备: 愈伤组织、叶片与叶鞘均从培养管内取同龄或近似日龄与相同位置部分。

愈伤组织取样的方法:

1. 分别从[(禾兴谷 × 金美)F₄ × 台中65号]F₃、[(IR20 × 竹印2号)F₄ × 窄叶青8号]F₂与(辐包矮 × IR₂₄)F₂的各组合的已长出1—2条幼嫩绿苗及根的洁白密实分

• 本文执笔人梁志成

化的愈伤组织,切取其表面一小块(取样后管内原愈伤组织仍继续再分化3—5条绿苗,而没有白化苗的产生)。

2.从已长出1—2条幼嫩白化苗及根的白色较密实分化的愈伤组织表面,切一小块(取样后管内原愈伤组织再长出4—7条白化苗,而没有绿苗的产生)。

3.从只分化两条幼嫩根而无苗分化的乳白密实分化的愈伤组织表面,切一小块(取样后管内原愈伤组织再分生多条根,但至衰亡仍无苗的分化)。

4.从继代三次转移、生长良好而从没有苗与根的分化的乳白分生的愈伤组织表面,切一小块(取样后对管内原愈伤组织继续观察,始终无苗或根的分化,但愈伤组织生长良好)。

叶片与叶鞘取样的方法:从以上组合,分别取同培养管、同组合不同培养管长出的嫩绿苗与白化苗,剪下近似叶龄距叶尖3cm位置的叶片1cm长与叶耳下1cm的叶鞘进行固定,观察比较形态结构。

样品制备:取下的愈伤组织小块、叶片与叶鞘,放在磷酸缓冲液(PH7.2—7.4)配制的40%戊二醛溶液中,固定4小时,然后用磷酸缓冲液冲洗三次,每次15分钟,即转入巴比妥钠缓冲液配制的1%鞣酸溶液中,抽真空固定2小时,再用缓冲液冲洗三次。以上均在0—4℃中进行,然后将各个材料经各级酒精脱水。用于扫描电镜观察的愈伤组织与叶片、叶鞘,在双筒解剖镜下放置好,观察面固定于涂火棉胶的支架上。随后放进Hitschi Hus-5喷镀机,喷镀薄层黄金,使其形成导电面,即为制备的样品。用于超薄切片的愈伤组织,叶片与叶鞘用PDAP与Epon812包埋,在LKB-9800超薄切片机成800Å薄片,再用醋酸铀与柠檬铅复染。此后各个样品在加速电压75千伏Hu-12A电子显微镜与HSE-2扫描机下观察与照相记录。

亚显微自显影:将同龄、长势良好、同组合的绿苗与白化苗植株的根部,浸于³H-胸腺嘧啶溶液中吸收6小时,然后用上述电子显微镜样品制备的方法进行固定与制片,切片经复染后,喷涂一层Hw-4电镜微粒核乳胶薄膜,曝光显影,观察与照相记录同上。

实 验 结 果

一、愈伤组织比较

将新鲜的分化绿苗白化苗与根、只分化根和无分化的四种愈伤组织,用乳酸—地依红染色压片或显微切片下观察,其细胞形态与着色情况无明显区别。但在电镜下见有显著差异:

(1)分化绿苗与根的分生愈伤组织,结构致密,细胞内含物丰富,表现园形或椭圆形,组织呈葡萄状突起的细胞群(图1、2),细胞轮廓分明,细胞壁表面平滑或具很细致皱纹(图3),只有较老的愈伤组织细胞壁皱褶才较大与细胞较为下陷。从细胞内部结构观察,具双层膜线粒体发育良好,呈园形与长园形等多种形态;双

层膜的内膜内褶成嵴分明,基质稠密(图4)。分化为叶绿体的前质体其周质网小泡相互连接形成同心圆或平行的初始片层,基质稠密,内质网发育良好,核糖体丰富(图5),细胞质与核质浓密。

(2)分化白化苗与根的分生愈伤组织,其结构较疏松,内含物较少,细胞呈不同程度的内陷(图6,箭头所示),细胞壁整列线弯曲度较大,其上有粗细分支明显的皱纹,有些较老的组织成不规则珊瑚花瓣状的形态。线粒体大部分发育正常,双层膜的内膜分化明显,基质也较稠密,但这类线粒体在细胞内较少。前质体形态不规则,呈圆形、长圆形或变形虫状,基质虽稠密,有些周质网小泡也能相互连接发育成初始片层,但发育至后期就受阻而充塞淀粉(图7),未见有发育良好片层的质体,所以细胞内看到较多的淀粉体及嗜碱球体,有些细胞的前质体完全空化,且小液泡较多或并连成大液泡。内质网较稀疏,核糖体较少等。

(3)只分化根而无苗分化的愈伤组织的分生细胞,呈圆形或长圆形,内含物更少,故更呈内陷状态(图8,9),细胞壁整列线表现为显著的不规则弯曲状态。

线粒体有很大部份发育至后期,内膜破坏或自溶,基质稀少与空化(图10)。有些前质体早期发育还好,体积增大及形成周质网或初始片层,不过绝大多数发育至后期受到严重障碍,不能继续发育成片层,并逐渐充塞淀粉(图11,12)或质体变形,质膜发生溶解(图13),基质内核糖体极少,故未见任何发育良好多片层的质体。内质网稀疏,核糖体较少,大小液泡与淀粉体较多等。

(4)继代三次全无分化的愈伤组织,类似分化根的愈伤组织结构,由于细胞内含物少,所以经过脱水制成扫描样品后,其组织表面结构呈特别明显的空瘪蜂窝状(图14),细胞壁很薄,整列线弯曲度大,且有粗细不等的皱纹。正常线粒体最少,很多发育到一定时期就受阻,内膜的内褶发育不全,或线粒体内部空化破坏。部份前质体在发育早期就严重破坏空化,有些前质体的体积虽然很大,但周质网形成的小泡,不能相连成片层,即或能连成不完整的初始片层,随后发育受阻,质体变形,基质及质膜逐渐消退与解体(图15,16),故看不到任何正常发育的质体片层。细胞的内质网稀疏,核糖体的数量稀少。液泡大与细胞质较少,但高尔基氏体与核膜等均正常。

二、叶片比较

扫描电镜下粳稻(Pi5×红旗12号) F_1 与籼稻[(禾兴谷×金美) F_4 ×台中65号] F_3 、[(IR20×竹印2号) F_4 ×窄叶青8号] F_2 的三个组合的绿苗与白化苗的叶片与叶鞘表面形态比较,气孔排列无多大区别,但形态却有明显的差异。白化苗叶片的副卫细胞膨胀,故气孔器呈突起状态(图17),而绿苗叶片的气孔器副卫细胞形态正常,与叶表面呈平面状或半凹陷状态(图18),叶鞘则看不出差别。

我们还用与花药培养组合相同的常规杂交材料的种子进行发芽,一部份在正常光照下长成绿苗,一部份用人工遮光促使其长成黄白苗,然后与花药培养的绿、白

化苗进行扫描电镜比较,见两者绿苗的气孔器结构无差别,而遮光白化苗叶片的气孔器也基本上与叶表面相平或稍有小微突起(图19),但远不如花药白化苗的叶片气孔器突起那样明显。

花药培养的绿苗叶片与叶鞘细胞的各种细胞器是正常的,线粒体数量多,具完整双层膜,内嵴分化完全与基质丰富。细胞具多个叶绿体,叶绿体的双层膜清晰,每个叶绿体均有10多个以上基粒,基粒类囊片层次多,垛叠分明,基质片层等发育都良好,基质中核糖体众多,嗜钨球体很少(图20)。在细胞内还常见有若干个质体,其基质电子透明度小,周质网的小泡连成链状或发育成平行片层,细胞内渗入的 ^3H -胸腺嘧啶分布于叶绿体与质体内的数量较多(图21)。内质网正常,核糖体很多。而白化苗叶片、叶鞘细胞的质体为圆形、椭圆形、杯形与变形虫状等不规则形态(图22, 23),有些早期还能形成片层,但进一步发育就受到障碍,片层溶解及充塞淀粉(图24, 25),所以白化苗的细胞中没有看到正常的叶绿体。还应指出,在白化苗中并不是所有的质体都能发育形成初始片层,有些质体虽然体积增长很大,不过其周质网的小泡膨大与紊乱分散,不能连接成有规则的排列(图26),即或能形成几层同心圆的片层,随后也逐渐解体(图27),这种败育的质体内含物少,空化与萎缩变形。另一种情况是质体在早期即受到严重障碍,空化解体。值得注意的是:白化苗的质体有较多的嗜钨球体,甚至在一个质体内达30多个(图28)。有些细胞内的线粒体与核糖体也较少,这与异常的三种愈伤组织有相同之处。

白化苗对 ^3H -胸腺嘧啶的吸收,渗入到质体内较少(图29), P^{32} 、 C^{14} -甘氨酸示踪观察,绿苗比白化苗吸收都较多,说明白化苗在物质合成上产生障碍。

讨 论

扫描电子显微镜因具有很大的焦深及立体成像,所以在分类学与形态学上应用于观察植物的原生质膜、化石细胞⁽⁸⁾、气孔⁽⁹⁾与孢子形态结构⁽¹⁰⁾等。水稻花药培养的各种分化类型的愈伤组织与叶片、叶鞘的结构,在光学显微镜下是不能辨认的。通过亚显微结构观察,使我们进一步了解了各种分化的愈伤组织表面形态及其细胞内部结构的特征,从而获得新的认识。

研究结果表明,表面白色、不透明和结实的分化绿苗与根的愈伤组织,经脱水制成样品,在电镜下看到,其细胞具有发育良好的内部结构,旺盛的新陈代谢及物质合成的机能。而分化白化苗或只分化根或完全不分化的三种愈伤组织,外观乳白色,虽然组织分生较快,但经脱水制成样品时,细胞不同程度内陷,细胞壁皱纹较粗,其内部的质体与线粒体的分化不同程度地受阻或破坏,内含物稀薄。说明这些细胞内部结构与机能发生障碍,从而导至质体发育和物质合成异常。线粒体是具有多样功能的细胞器,含有DNA、RNA与各种酶系统,有催化三羧酸循环、脂肪酸氧化、氨基酸分解等功能。其内膜的基粒,能进行电子传递和偶联磷酸化,有把

各类物质氧化代谢释放出能量转化成ATP,供细胞各种生命活动的功能。若破坏内膜两侧质子梯差的因素,就会导致氧化磷酸化的解偶联,缺乏光合成中能量的提供。从小麦叶片分析看到,叶绿体发育良好,基质与基粒片层愈发连,线粒体也相应愈多愈完整,说明其结构与功能存在着极密切的关系。

从花药培养的绿色苗与白化苗的叶片比较,细胞的形态与内部结构^[3,4]有所不同。绿苗叶片的细胞有很多叶绿体与线粒体,KI检验淀粉丰富,气孔器的副卫细胞与叶面呈平面或半凹陷型,说明其含水量少,似阳生植物类型。而白化苗叶片的细胞没有正常叶绿体,线粒体较少,气孔器的副卫细胞呈突起型,说明含水量较多,似阴生植物类型。叶绿体内有多种酶与叶绿素等,正常叶绿体基质与基粒片层上都分布有光化磷酸化偶联因子与羧基歧化酶等,光化系统I、II的电子传递都在类囊体垛叠之间进行,若质体发育受阻与破坏,就失去其功能,不能合成各种酶与形成叶绿素的多肽^[6],这与我们另一些旦白质凝胶电泳的分析相一致,同时,白化苗的质体常成不规则的形状,内有为数众多对铀有亲和性的嗜铀球体,Toyama^[13]在研究番茄黄白化叶时指出,嗜铀球体多的,质体发育不好与变形。看来似与白化苗的形成有密切相关。因为这些亲脂性酚类物质,通常在片层膜形成时便结合到膜中,所以发育良好的叶绿体,这类酚颗粒很少,只有在黑暗中发育不全的质体或衰老叶片的叶绿体片层解体时,才游离积聚在基质中,而显出较多的嗜铀球体^[7]。

还应指出,花药培养白化苗与种子发芽遮光形成的黄白化苗其内在机理是不相同的。后者只是反应规范范围内的一种表现型变化而已,满足了光照条件,很快就恢复绿苗特征。但花药培养白化苗却不是这样,我们用正常光照以及在良好营养砂培条件下,也不能使它转变为绿苗,可能在遗传结构或调节方面有不同的特点。此外,绿苗与白化苗的叶片细胞虽然都有质体,但白化苗的质体发育受阻,只形成周质网或不完全的片层,有些质体早期就空化与解体,以³H—胸腺嘧啶渗入质体内极少,很可能与质体的DNA复制或酶的合成异常有关。

Miller^[11]、Herrman等许多学者分别在玉米、金鱼草白化突变质体、大麦黄白化质体研究中指出,白化的细胞比具叶绿体细胞的质体少2种旦白质。近来对水稻白化苗质体的核糖体分析,也证明23SRNA与16SRNA不存在或含量很少,这与我们在亚显微结构观察到质体内核糖体磷素较少,以及丙烯酰胺电泳分析也缺二条旦白带的结果是相一致的。又植物的合成与代谢,需二磷酸核酮糖羧化酶来催化CO₂与磷酸核酮糖形成磷酸葡萄糖,是光合作用中碳素固定的关键,Hall证明二磷酸核酮糖羧化酶是在质体核糖体上进行合成的,因此白化苗体质缺乏核糖体也就缺乏这种酶而不能进行正常光合作用。以上的实验说明,白化苗可能由于遗传信息的复制与调节系统异常,从而造成细胞缺乏某些特定功能的RNA与旦白质的机能。所以白化苗的成因,我们认为遗传因素可能是主要的。

细胞核与叶绿体各有自己的DNA与RNA系统,但彼此又互相协调与制约。有人证明核的DNA变化,会引起质体DNA与rRNA的变化。我们认为,白化苗的成

因与核糖的合成有关,但要深入了解白化苗的原因,除探索引起遗传结构与调节变化的因素外,还应从生理方面去分析,结合培养基成份的调整,酶的活动与温度等各种因素进行综合研究,才能更好地解决白化苗的问题。

图 片 说 明

- | | | | |
|---------|---------|-------------|---------|
| M: 线粒体 | Ct: 细胞质 | C: 细胞外观(扫描) | Cw: 细胞壁 |
| ER: 内质网 | G: 嗜银球体 | PL: 叶绿体 | L: 片层 |
| N: 细胞核 | Nu: 核仁 | P: 质体 | S: 淀粉体 |
| V: 液泡 | r: 核糖体 | | |



图 1 分化綠苗愈伤組織的單个突起细胞。×3000

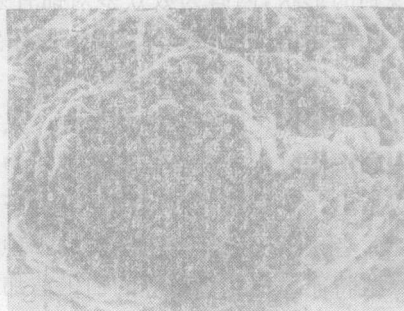


图 2 分化綠苗愈伤組織块,呈葡萄狀的突起细胞团。×500



图 3 分化綠苗愈伤組織的突起细胞,有细纹的条纹。×2500



图 4 分化綠苗愈伤組織细胞的细胞体及内质网正常。×5000

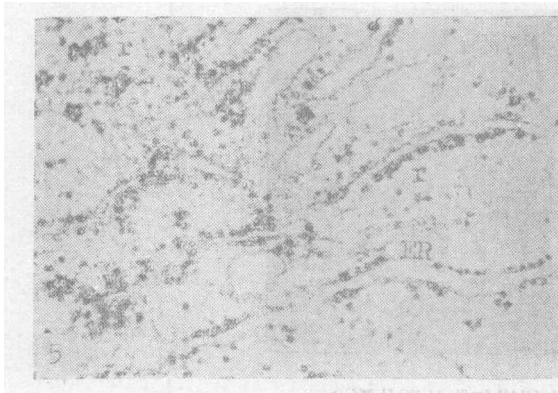


图5 分化绿苗愈伤组织细胞的内质网及核糖体良好。×50000

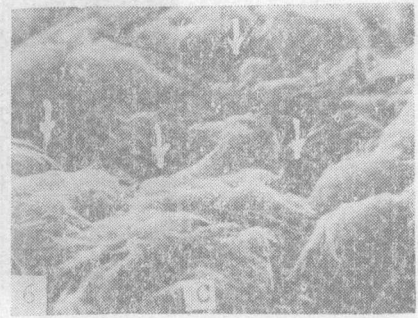


图6 分化白化苗愈伤组织，细胞内陷(箭头所指)，细胞壁具粗细条纹。×2500

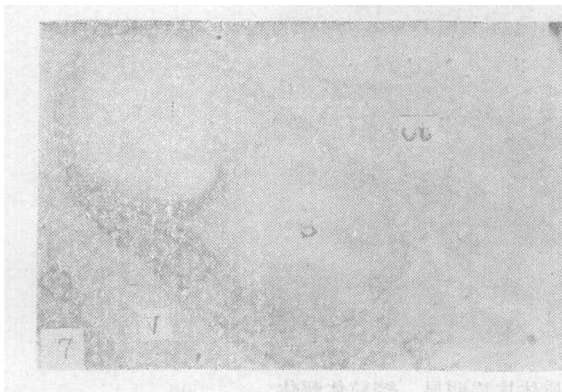


图7 分化白化苗愈伤组织细胞的质体，形成片层但又充塞淀粉。×30000

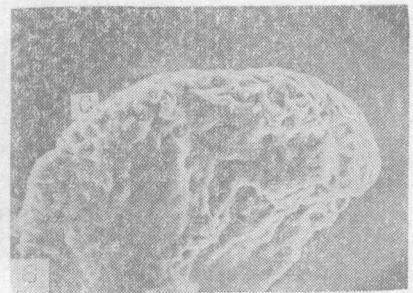


图8 分化根愈伤组织的细胞内陷。×500

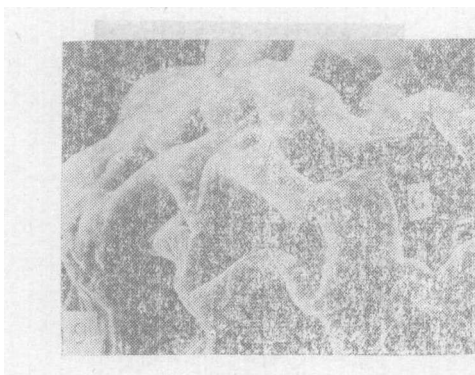


图9 分化根愈伤组织的细胞内陷，细胞壁具粗条纹。×2500

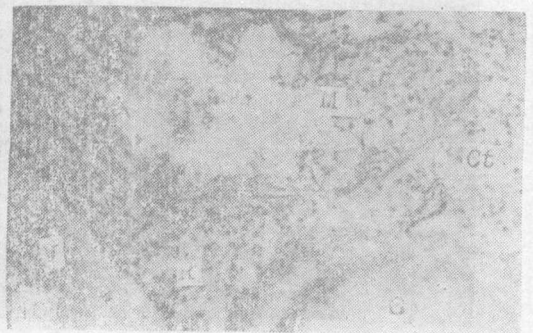


图10 分化根愈伤组织细胞的线粒体解体。×35000

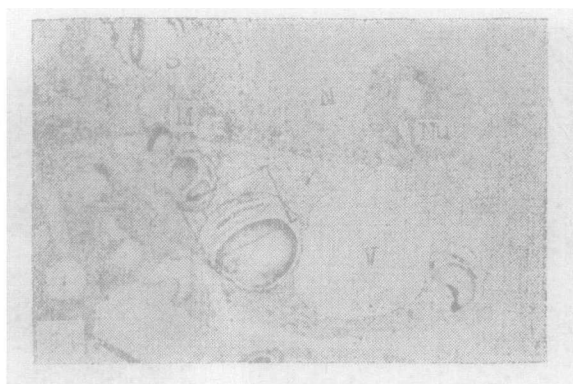


图11 分化根愈伤组织细胞的质体形成片层，又充塞淀粉。×10000



图12 为图(11)框内的放大，质体片层明显，淀粉粒解体。×

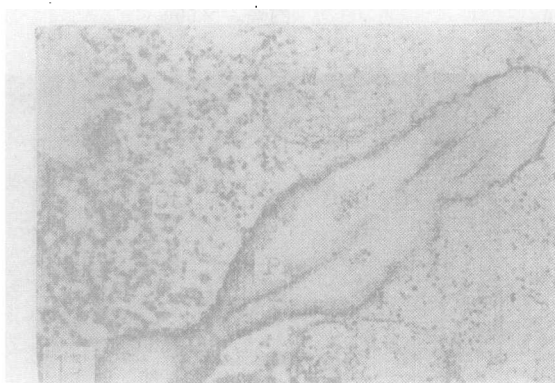


图13 分化根愈伤组织细胞的质体变形与片层溶解。×30000

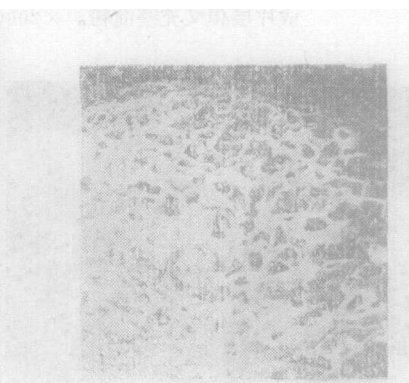


图14 无分化愈伤组织的细胞内陷，呈不规则蜂窝状。×500

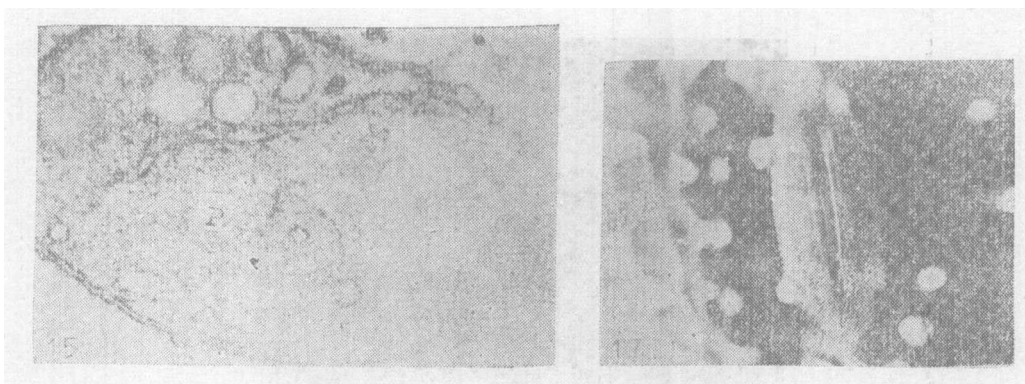


图15 无分化组织伤愈细胞，质体的周质网发育不全，质膜解体。×70000

图17 白化苗叶片的气孔器，副卫细胞表现膨胀状。×2500

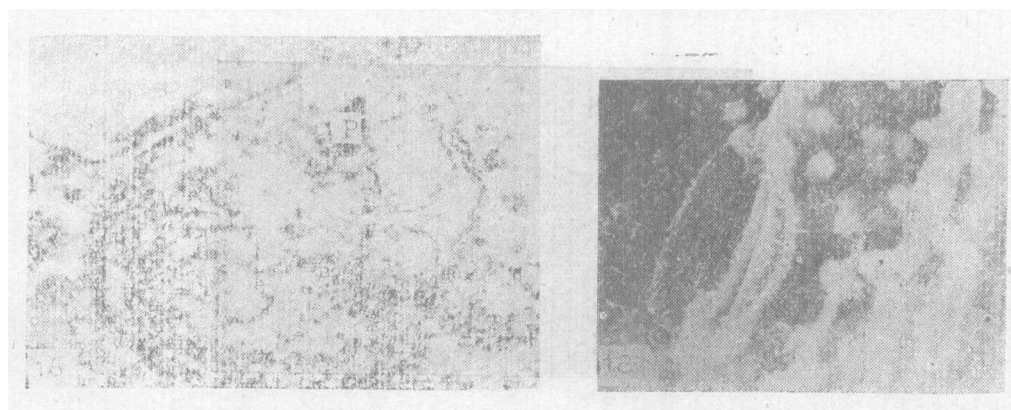


图16 无分化愈伤组织细胞的质体变形与解体，核糖体稀少。×70000

图18 绿苗叶片的气孔器，副卫细胞表现半凹陷状。×2500

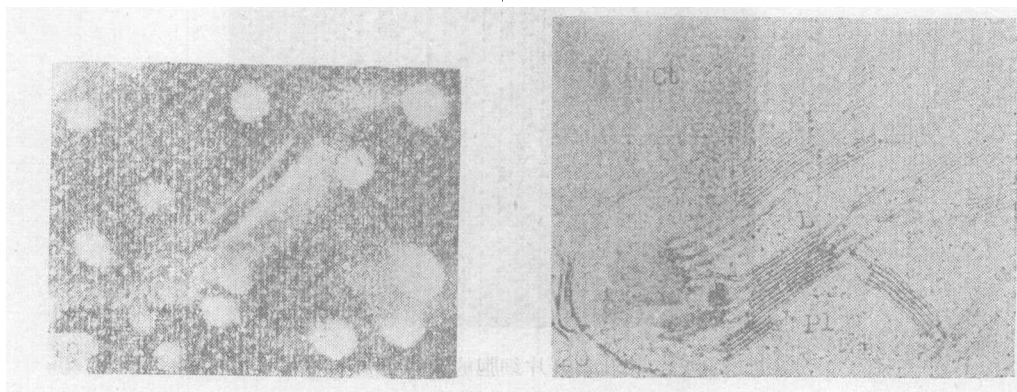


图19 种子发芽，人工遮光的白苗叶片气孔器，稍有点突起。×2500

图20 绿苗叶片的叶绿体，基粒与基质片层分明，核糖体较多。×40000

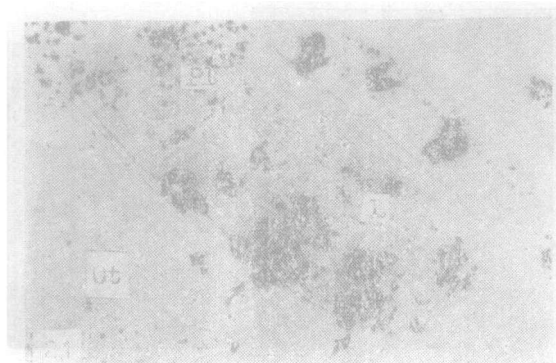


图21 綠苗叶片吸收 ^3H -胸腺嘧啶在叶綠体内的分布(箭头指处)。×20000

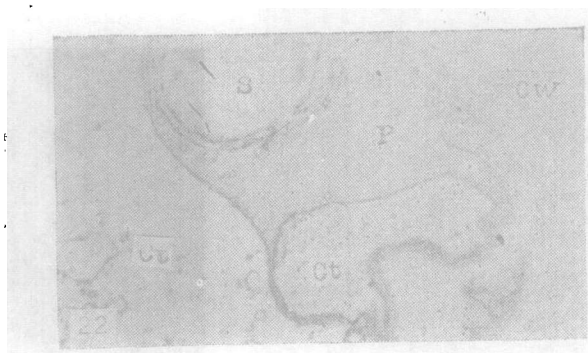


图22 白化苗叶片细胞的杯状質体，已充塞淀粉。×5000

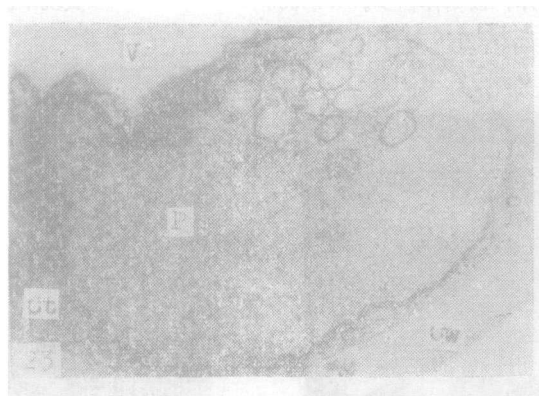


图23 白化苗叶片细胞的質体变形，周質网小泡散乱。×30000

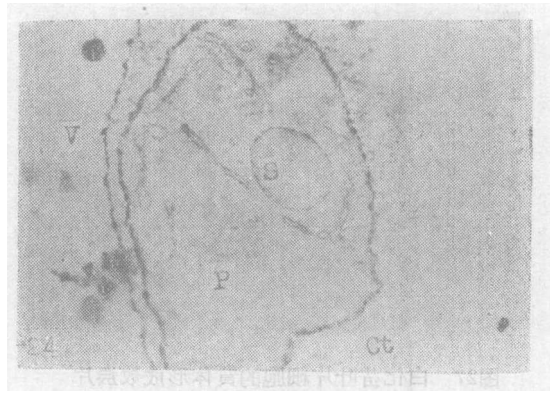


图24 白化苗叶片的细胞，质体在形成一些片层后，基质逐渐消退，并充塞淀粉。×40000

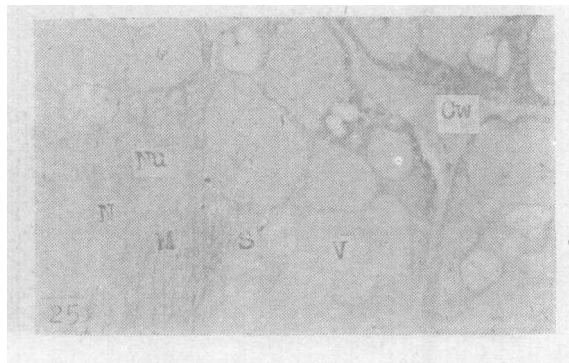


图25 白化苗叶片的细胞，没有叶绿体，线粒体破坏，淀粉体与液泡多。×60000

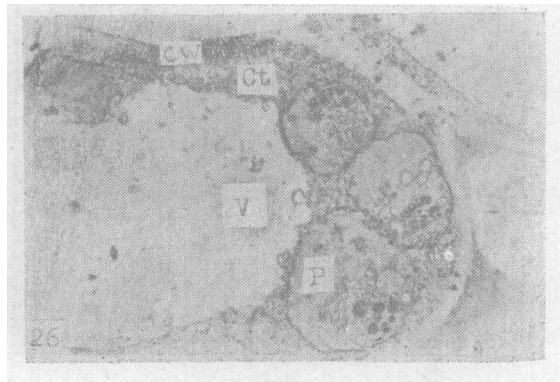


图26 白化苗叶片细胞的质体周质网小泡散乱，嗜铁球体较多。×10000

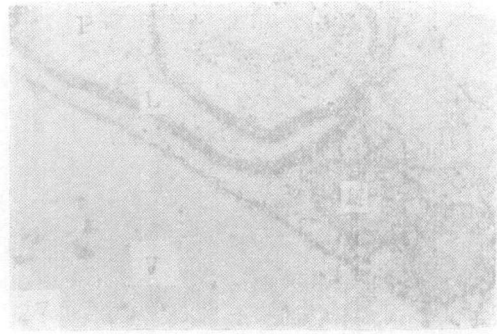


图27 白化苗叶片细胞的质体形成数层片层，又逐渐解体。×25000

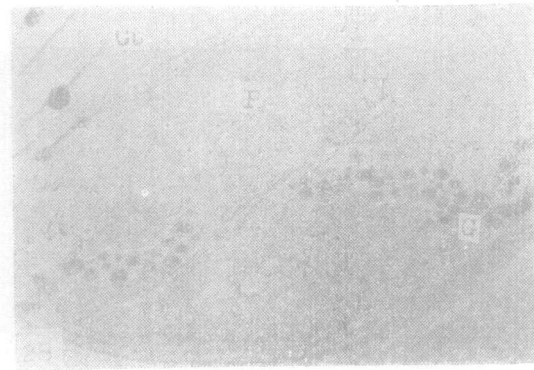


图28 白化苗叶片细胞的质体内周质网发育不好，并有很多嗜银球体，此叶片经 ^3H -胸腺嘧啶吸收，但没有渗入质体内。×30000



图29 白化苗叶片细胞的质体， ^3H -胸腺嘧啶渗入极少，大多在质体外面。×17000

参 考 文 献

- [1] 朱自清等, 通过氮源比较试验建立一种较好的水稻花药培养基, 中国科学, (1975), 5, 484—490.
- [2] 广东省植物研究所遗传室, 籼稻花药培养研究 1, 遗传学报, 2(1977), 1, 81—88.
- [3] 王敬驹等, 从普通小麦和天蓝冰草杂种的花药诱导花粉植株, 遗传学报, 2, (1975), 72—76.
- [4] 王敬驹等, 水稻白化苗质体的亚显微结构, 中国科学, (1974), 6, 627—630.
- [5] 張玉龙等, 几种蕨类植物孢子在扫描电子显微镜下的观察, 植物学报, 16, (1974), 3, 291—292.
- [6] Anderson, J. M. and Levine, R.P., *The relationship between chlorophyll-protein complexes and chloroplast membrane polypeptides*, *Biochimica et Biophysica*, 357(1974), 1, 118—126.
- [7] Barr, R. and Arntzen, C. J., *The occurrence of δ -tocopherylquinone in higher plants and its relation to senescence*, *plant physol.*, 44 (1969), 4, 591—598.
- [8] Heywood V. H. and M. C. Boulter, *scanning electron microscopy*, 1971, 211—235.
- [9] Huckerby, E., *The new phytologist*, 71 (1972), 2, 387—392.
- [10] Kimata M. and Sakamoto, *Production of haploid albino plants of *Aegilops* by anther culture*, *Japan J. Genet.*, 47 (1972), 61—63.
- [11] Millerd, A. and Goodchild, D. J., *Studies on a Maize mutant sensitive to low temperature I Chloroplast structure, development, and physiology*, *plant physiol.*, 44 (1969), 4, 567—583.
- [12] Thorner, J. P., *Studies on the nature of chloroplast lamellae, I Chemical composition and further physical properties of low chlorophyll-protein complexes*, *Biochemistry*, 6 (1967), 7, 2006—2013.
- [13] Toyama, S., *Electron microscope studies on the morphogenesis of plastids VI plastid development and fine structure in variegated leaves of tomato*, *The Botanical magazine* 85 (1972), 997; 1—10.

The Investigation of the Submicroscopic Structures
of the Albino Sprouts in the Tissue
Culture of Rice Anthers

Research Group of Genetics, and Central Laboratory
Department of Biology

Abstract

In the normal green sprouts differentiated, as well as the callus and the meristomatic tissues, the cells groups are round or elliptical with globular protuberances. Mitochondria are well developed and abundant. Matrix in the proplastids dense, with concurrent or parallel primary lamellae.

In the differentiated albino sprouts as well as roots and all kinds of callus only with roots differentiated and callus completely remained undifferentiated the cells are deeply depressed inward to various extents. Mitochondria less and poorly developed or destructed, the proplastids destructed to different degree and disintegrated without normally developed lamellae and many of the proplastids gradually fulfilled with starch. Endoplasmic reticulum sparsely distributed with lesser ribosomes, the vacuoles large and abundant.

In the green leaves, the stomatal apparatus are on the same level of the epithelium or slightly depressed, mitochondria perfectly developed and abundant. Numerous chloroplasts in the mesophyll cells, the plastids with well developed lamellae. ^3H -thymine infiltrated much into the cell with certain amount get into the plastids and chloroplasts. But in the albino sprouts the stomatal apparatus protrude, with lesser amount mitochondria.

The majority of the ^3H -thymine are infiltrated into the cytoplasmic and rarely into the plastids.