

美洲黑杨次生木质部导管分化进程的超微结构分析

尹增芳, 樊汝汶

(南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 利用常规电镜技术, 观察研究了美洲黑杨 *Populus deltoides* 次生木质部导管分化过程的超微结构变化。结果表明: 美洲黑杨导管形态的建成可划分为初生壁的延展、次生壁的构建与穿孔板的形成等3个时期。初生壁的延展是导管分化的初始阶段, 导管细胞高度液泡化, 细胞质及其细胞器贴壁分布。次生壁的构建是导管分化的关键阶段, 次生壁物质的沉积在导管液泡膜破裂之前即已开始, 此时导管分子内细胞器结构清晰, 其中高尔基体及其分泌小泡最为丰富, 说明高尔基体与次生壁物质的合成及运输密切相关; 导管分子液泡膜裂解后, 次生壁物质沉积极为迅速, 伴随次生壁物质的合成, 导管分子细胞质解体, 细胞核染色质凝聚并边缘化, 表现出程序化细胞死亡(PCD)的典型特征。穿孔板的形成是导管分化的终极阶段, 在导管次生壁形成时, 相邻导管分子的端壁上不发生壁物质的积累, 而且在次生壁构建后期, 端壁上的壁物质降解, 最后残余的端壁断裂形成穿孔板。美洲黑杨次生木质部导管的分化阶段彼此相继有序地进行, 其中次生壁构建的启动是导管分子不可逆分化的临界期, 随后的分化阶段是一种典型的PCD过程。图2参13

关键词: 植物学; 美洲黑杨; 导管; 超微结构; 临界期; 细胞程序性死亡

中图分类号: S718.3 文献标志码: A 文章编号: 1000-5692(2008)04-0431-06

Differentiation in a secondary xylem vessel element of *Populus deltoides* using ultrastructural analysis

YIN Zeng-fang, FAN Ru-wen

(College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: Using electronic microscopy, ultrastructural changes were observed during differentiation in a secondary xylem vessel element (VE) of *Populus deltoides*. Results showed that morphological development of VE differentiation was successively divided into three stages. First was prolongation of the primary cell wall (the initial stage), where the VE was highly vacuolated and the protoplasm was distributed along the cell wall. Second was establishment of the secondary cell wall (the pivotal stage) where substances accumulated before the tonoplast broke, and VE organelle structure was distinct. Golgi bodies and vesicles, which were associated closely with synthesis and transportation of secondary cell wall substances, were also abundant. After the tonoplast broke, these substances accumulated faster. Simultaneously, the protoplasm disaggregated, and the conglomerate chromatin was distributed over the margin of the nucleus showing typical characteristics of programmed cell death (PCD). During secondary cell wall formation, no cell wall substances accumulated between terminal cell walls of neighboring VEs. In addition, terminal cell wall substances were disaggregated in the post secondary cell wall formation. Later, when the remnant terminal cell wall broke the third stage, perforation, occurred. Thus, for these successive stages of VE differentiation, the critical stage, when differentiation was not reversible, was at the start of secondary cell wall formation with succeeding VE differentiation similar to a typical PCD process. [Ch, 2 fig. 13 ref.]

Key words: botany; *Populus deltoides*; vessel; ultrastructure; critical stage; programmed cell death

收稿日期: 2007-08-21; 修回日期: 2007-11-07

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(39730350); 江苏省自然科学基金资助项目(BK2005132); 国家自然科学基金资助项目(30671657)

作者简介: 尹增芳, 副教授, 博士, 从事植物发育生物学研究。E-mail: zfyin@njfu.edu.cn

近年来,木材的重要商用价值大大地促进了树木次生木质部分子分化过程的研究^[1]。由于杨树 *Populus ssp.* 的基因组相对较小,有大量的表达序列标签(expressed sequence tags, ESTs)存在,比较容易转化,并且生长迅速而被林学界作为研究硬材形成的模式植物^[2-4]。作为木材重要组成部分的次生木质部导管是一种高度特化的细胞,执行着水分和无机盐运输、信号传导和机械支持等多种功能,一直是植物发育生物学研究的热点之一,在次生木质部分化程序、分化过程中的细胞程序性死亡特征等方面已经取得了长足的进展^[1,4]。但是,目前关于导管分化过程的知识大多来源于草本植物初生维管组织构建过程的观察^[5]。植物整体系统的研究结果已经证实^[4],植物细胞分化过程中存在典型的位置效应现象,因此,系统地观察次生木质部导管的发育过程尤为重要。由于次生木质部结构上的特殊性,研究过程中取材及制片难度较大,所以有关次生木质部导管分化过程的超微结构观察报道的资料较少,而且不够系统。植物细胞结构是功能的具体体现形式,因此,研究导管分化过程中超微结构的动态变化是研究导管功能基因组表达形式的重要基础。作者以美洲黑杨 *Populus deltoides* 为实验材料,系统地观察了次生木质部导管分子分化过程超微结构特征的变化,旨在为植物发育生物学理论宝库添加基础研究资料。

1 材料与方法

实验材料与电镜样品制作方法参见文献[6]。

2 结果

在美洲黑杨次生木质部导管分化过程中,细胞质和细胞壁发生了显著的变化。成熟导管原生质体完全解体消失,细胞壁显著增厚。在导管分子形态构建过程中,依据细胞壁的变化可将导管分子的分化进程划分为初生壁的延展、次生壁的构建与穿孔板的形成等3个时期。

2.1 初生壁的延展

在维管形成层活动的旺盛期,从茎的横切面上观察,可见靠近维管形成层的1~2层次生木质部母细胞首先发生了细胞的径向扩张,扩张后细胞的体积可达原形成层衍生细胞体积的8~15倍,预示着这些细胞即将分化形成导管分子。此时细胞内充满了大液泡,因此,细胞核和细胞质被挤到靠近细胞壁的部位(图1-1~2)。近壁处的细胞质内含有丰富的线粒体、高尔基体、内质网和微管等细胞器(图1-2~3)。线粒体椭球形,外膜和嵴的结构非常清晰(图1-2);内质网多为粗糙型,一般不呈网络状,通常与壁平行分布,高尔基体由4~6个扁平囊组成,周围密布大量的高尔基小泡(图1-3)。研究中还发现,少量的微管或平行于壁或与壁垂直,处于一种随机的分布状态。

2.2 次生壁的构建

导管次生壁的构建是导管形态建成的关键步骤。电镜观察发现导管次生壁的发育可以分为2个阶段,即完整液泡膜与液泡膜裂解阶段,这2个阶段内导管细胞超微结构特征明显不同。

2.2.1 完整液泡膜阶段 在美洲黑杨维管形成层活动的旺盛期,靠近维管形成层区的第3层细胞基本上停止细胞体积的扩增。扩展到一定体积的导管细胞,早期仍然具有完整液泡膜的结构,这时局部细胞壁开始增厚。质膜与液泡膜均出现内折(图1-4),细胞内质网库槽局部膨大,高尔基体产生大量的小泡,小泡内的物质其电子透明度与壁物质相似(图1-5),表明细胞质与细胞壁间发生了活跃的物质交换。

2.2.2 液泡膜裂解阶段 在美洲黑杨快速生长期,导管分子完整液泡阶段维持的时间很短暂,随即发生了液泡膜的破裂,这时导管分子细胞质组分开始降解。线粒体有2种变化方式:其一为线粒体内部结构紊乱,嵴极不清晰,内部基质浓缩(图1-6);其二为线粒体局部出现一些电子密度低的透明区(图1-7)。内质网在壁增厚的过程中最典型的变化是库槽膨大成泡状,随后逐渐变为短片状,结构模糊不清(图1-6,8)。高尔基体在导管壁增厚的初期扁平囊的结构清晰(图1-5),后期高尔基体扁平囊亦解体,似乎断裂形成小泡(图1-8)。细胞核在导管分化过程中显示了极为复杂的变化。在导管分子分化初期,细胞核为纺锤形,随后可观察到细胞核的形状不规则(图1-8)。随着液泡膜的裂解,细胞核内

染色质高度凝聚, 凝聚的染色质分布在核的周缘(图 2-1)。在导管分子分化末期, 其他细胞器均已基本解体, 仍然可观察到核膜较完整的细胞核(图 2-2)。最后核膜消失, 核崩解成碎片状。

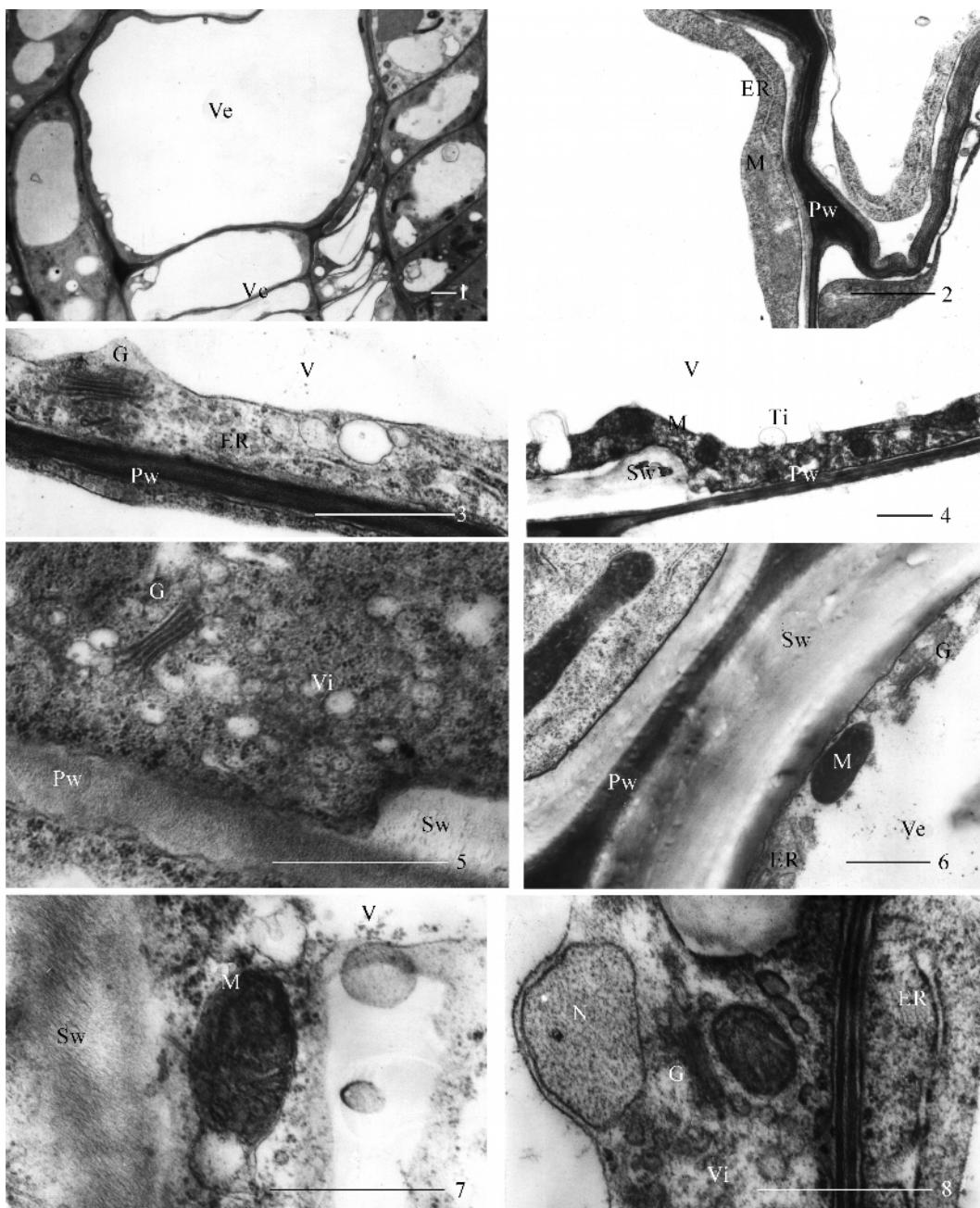


图 1 次生木质部导管分子初生壁的延展与次生壁的构建(比例尺为 1 μm)

Figure 1 Prolongation of primary cell wall and the establishment of secondary cell wall of vessel element in secondary xylem (bar = 1 μm)

1. The cross section of stem, showing the vascular cambium and the vessel element (Ve) which was getting on primary cell wall prolongation.
2. Another Ve, the plasma distributed along the cell wall.
3. The organelle in earlier development stage of Ve, showing dictyosome and endoplasmic reticulum.
4. The secondary cell wall substances accumulated partly in Ve with intact tonoplast, showing the tonoplast inflexed.
5. The dictyosome and vesicles during the formation of secondary wall in Ve.
6. The disaggregated mitochondrion, endoplasmic reticulum and dictyosome in Ve.
7. Another Ve, showing the mitochondrion with transparent area.
8. The later stage of secondary cell wall formation of Ve, showing tonoplast membrane broken and organelle disaggregated.

2.3 穿孔板的形成

相邻2个导管分子的端壁可形成穿孔。美洲黑杨次生木质部导管分子的穿孔板呈倾斜状，通常与导管分子长轴约呈60°角（图2-3）。在导管分化初期，相邻2个导管分子的端壁大部分区域未发生壁的次生加厚（图2-4）。不仅如此，随着导管分子次生壁的加厚，导管端壁处质膜出现大量内折（图2-5），

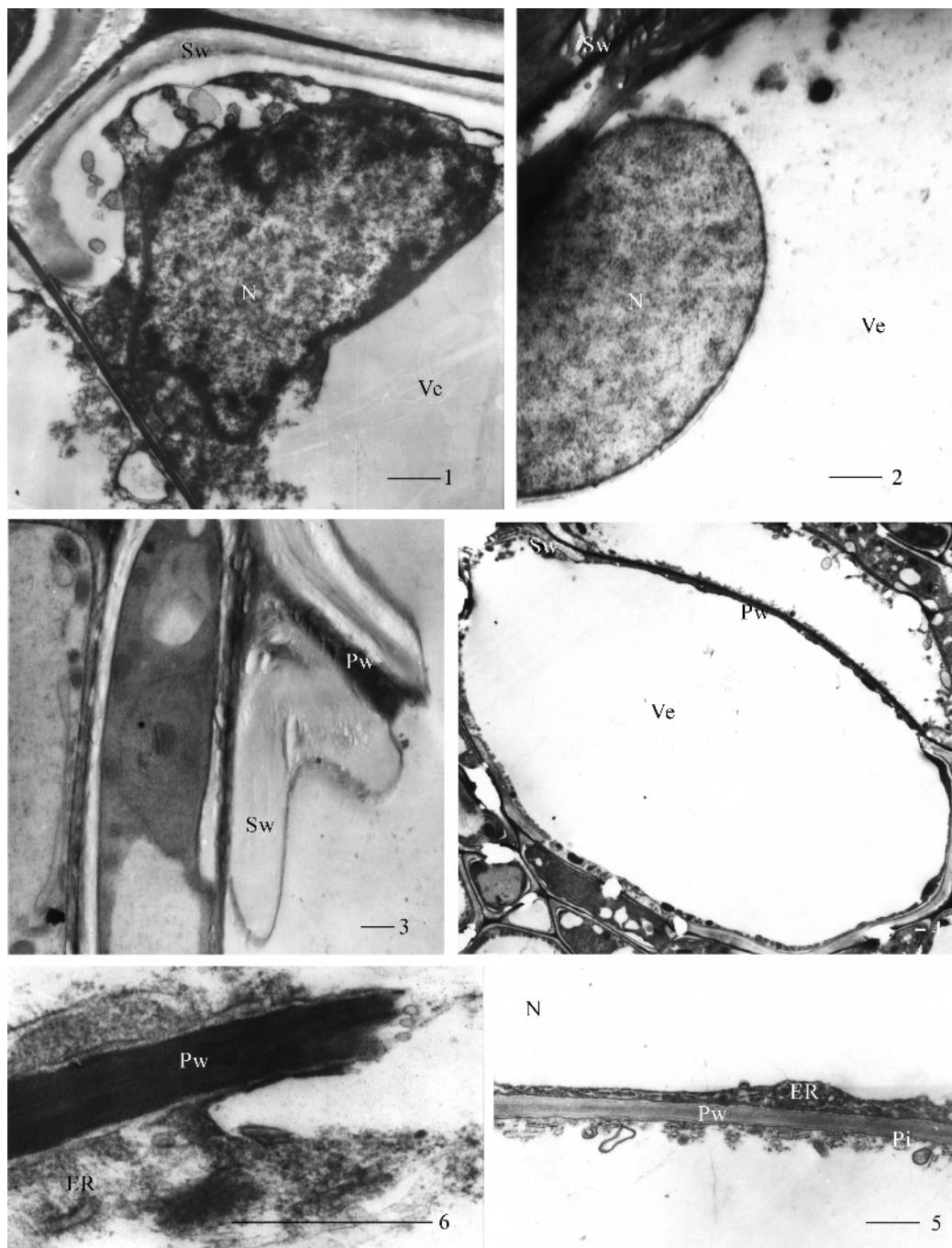


图2 次生木质部导管分子核的降解与穿孔板的形成(比例尺为1 μm)

Figure 2 Disaggregation of nuclear and formation of perforation of secondary xylem vessel element (bar = 1 μm)

1. The disaggregation of vessel element (Ve) nuclear, showing aggregated chromatin distributed in the margin of nuclear.
2. The later differentiation stage of Ve, the plasma disaggregated mostly, but the structure of nuclear is clear.
3. The longitudinal section of Ve, showing the perforation developed.
4. The skew section of Ve, showing the developing perforation.
5. Enlarged partly, showing organelle, and plasma membrane inflexed near the terminal cell wall of Ve.
6. The terminal cell wall between the neighbor Ves were broken.

似乎与初生壁物质的解体有关。最后, 整个端壁发生弯曲, 在一些导管分子中还可观察到弯曲的端壁发生断裂(图 2-6), 因而推测美洲黑杨导管分子中端壁的消失可能是在蒸腾流的协助下才得以完成^[5]。

3 讨论

3.1 次生木质部导管分化过程中细胞器的动态变化

在美洲黑杨次生木质部导管形态建成过程中, 细胞内细胞器的动态变化贯穿了导管分化过程的始终, 对导管的分化起到决定性的作用。随着次生壁物质的积累, 内质网库槽发生膨大断裂, 在近壁处呈短片状, 膜结构逐渐模糊消失, 最终完全解体。高尔基体在导管次生壁的构建中作用巨大, 丰富的高尔基小泡携带与壁物质电子密度相似的成分分布在增厚细胞壁处。一些细胞学研究结果也证实高尔基体与细胞壁形成关系密切, 如细胞壁中的非纤维素多糖己被证实是由高尔基体合成和运输的, 在植物细胞胞质分裂过程中, 发现包裹细胞壁前体物质的高尔基小泡沿成膜体微管运动到细胞板附近^[5]。许珊等^[7]在南瓜 *Cucurbita moschata* 幼茎螺纹导管次生壁构建过程中观察到高尔基体小泡的数量明显增加, 认为高尔基体与次生壁形成密切相关。线粒体是美洲黑杨次生木质部导管分化过程中降解较迟的细胞器之一, 与杜仲 *Eucommia ulmoides*^[8] 木质部导管细胞分化过程中线粒体的表现相似。美洲黑杨导管发育过程中线粒体可有 2 种结构变化, 一种是线粒体内部基质浓缩, 形成电子密度很深的物质, 这种情况在导管分化后期较常见; 另一种是线粒体局部出现透明区, 这种情况多发生在导管分化早中期, 王雅清等^[8]把线粒体的这种变化当作线粒体解体的另一种方式。笔者认为, 线粒体这种变化并非解体, 而是处于代谢活跃时期一种不稳定的状态。

液泡在导管形态建成中的变化极为突出。在导管次生壁物质沉积初期, 液泡膜保持完整, 导管细胞内原生质组分结构清晰, 后期液泡膜裂解, 细胞内的细胞器开始降解。Fukuda 等^[9]观察正在分化的百日草 *Zinnia elegans* 管状分子中, 次生壁加厚几个小时后, 液泡膜裂解, 随后细胞器才开始降解。管状分子细胞质在液泡膜破裂后才完全解体消失, 表明液泡膜破裂可能是管状分子死亡的关键步骤。王雅清等^[8]在杜仲次生木质部的导管分子分化过程中发现液泡执行溶酶体的功能, 吞噬各种细胞器残体。美洲黑杨导管液泡在分化后期发生膜裂解, 可能其释放的水解酶引起了各种细胞结构的进一步解体, 形成壁物质参与次生壁的构建。

细胞核是美洲黑杨次生木质部导管分化过程中最后解体的细胞器, 与杜仲等树木导管细胞核一样^[8], 美洲黑杨导管细胞核在次生壁加厚以后, 细胞核仍然未出现解体的特征, 在导管分化的后期, 随着液泡膜的降解, 细胞核内染色质出现凝聚, 分布于核的周缘。王雅清等^[8]利用原位杂交技术检测到杜仲次生木质部导管分子核出现 DNA 断裂, 推测次生木质部导管分化存在类似于动物细胞的凋亡小体, 并以此说明杜仲导管核的程序化细胞死亡(PCD)过程。在其他的细胞组分基本解体后, 还可在美洲黑杨次生木质部导管内观察到核膜完整的细胞核, 因此, 笔者推测导管分子细胞质的降解是有序进行的, 这种有序性似乎受到核内某些信息的影响。在次生壁发育形成后, 可见细胞核在导管内降解形成核碎片, 最后完全消失。

3.2 次生木质部导管不可逆分化的临界期

资料表明^[9, 10], 植物细胞的分化过程可分为不同的阶段, 这些阶段彼此相继有序地展开, 分化的最后阶段可能就是编程性死亡。崔克明^[11]指出, 在管状分子分化过程中存在一个分化的临界期, 在临界期之前细胞的分化是可逆的, 即可脱分化, 一旦过了临界期, 分化就成为不可逆的了。使用 caspas-3 抑制剂或 DNase 抑制剂的毛白杨 *Populus tomentosa* 维管形成层细胞继续分裂, 其衍生细胞也继续扩大, 但却不能形成次生细胞壁, 说明次生壁的构建至少不发生在核 DNA 断裂前^[4]。近年来在百日草离体实验系统研究中报道了木质素的沉积发生在管状分子死亡之后, 而且木质素单体 (monolignol) 及其二聚体 (dilignol) 可由周围的细胞所提供^[1, 12, 13], 但是, 在美洲黑杨导管分化过程中, 次生壁物质开始沉积时导管细胞液泡膜并未破裂, 此时导管细胞内细胞器结构清晰, 细胞内高尔基体及其产生的小泡非常丰富, 表明次生壁物质的合成最初是由导管细胞本身所提供。笔者认为, 次生壁的形成是导管分化的关键时期, 推测在导管细胞液泡膜破裂前, 木质素即已开始沉积, 而且木质素的沉积启动了导管

不可逆分化的临界期。次生壁的形成意味着导管不可逆分化过程的开始，导管细胞 PCD 的全面开展。液泡膜破裂后，导管的 PCD 形态特征明显，而细胞核的完全降解则标志着 PCD 过程的结束。

参考文献：

- [1] TURNER S, GALLOISP, BROWN D. Tracheary element differentiation[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2007, 58: 407 - 433.
- [2] DU J, XIE H L, ZHANG D Q, et al. Regeneration of the secondary vascular system in poplar as a novel system to investigate gene expression by a proteomic approach[J]. *Proteomics*, 2006, 6: 881 - 895.
- [3] 尹增芳, 樊汝汶. 杨树维管组织细胞生物学研究进展[J]. 南京林业大学学报, 2000, 24(6): 83 - 88.
- [4] 崔克明. 木质部细胞分化程序[J]. 西北植物学报, 2006, 26(8): 1735 - 1748.
- [5] 伊稍 K. 种子植物解剖学[M]. 李正理, 译. 上海: 上海科学技术出版社, 1982.
- [6] 尹增芳, 樊汝汶. 美洲黑杨次生韧皮部筛管发育过程中原生质选择性自溶现象[J]. 北京林业大学学报, 2007, 29(3): 1 - 7.
- [7] 许珊, 祝建, 钱洁. 南瓜幼茎中螺纹导管次生壁的发育[J]. 同济大学学报: 医学版, 2006, 27(6): 12 - 15.
- [8] 王雅清, 崔克明. 杜仲次生木质部导管分子分化中的程序性死亡[J]. 植物学报, 1998, 40(12): 1102 - 1107.
- [9] FUKUDA H. Xylogenesis: initiation, progression and cell death[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, 47(1): 299 - 325.
- [10] 樊汝汶, 尹增芳, 周坚. 植物木质部发育生物学研究[J]. 植物学通报, 1999, 16(4): 387 - 397.
- [11] 崔克明. 植物细胞分化的启动控制和分化过程的阶段性[J]. 生命科学, 1997, 9(4): 49 - 54.
- [12] HOSOKAWA M, SUZUKI S, UMEZAWA T, et al. Progress of lignification mediated by intercellular transportation of monolignols during tracheary element differentiation of isolated *Zinnia mesophyll* cells[J]. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42: 959 - 968.
- [13] TOKUNAGA N, SAKAKIBARA N, UMEZAWA T, et al. Involvement of extracellular diliignols in lignification during tracheary element differentiation of isolated *Zinnia mesophyll* cells[J]. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46(1): 224 - 232.

《华东鸟类物种和亚种分类名录与分布》出版

浙江林学院朱曦教授著的《华东鸟类物种和亚种分类名录与分布》一书 2008 年 6 月由科学出版社出版。这是一部我国华东鸟类分类系统以及种和种下分类与分布的专著。全书共收录华东鸟类 661 种 498 亚种，隶属 22 目 84 科 293 属。书中给出了每个种的中文名、英文名以及种和亚种的拉丁学名，分布区(省、市、县)。书末附有华东鸟类研究文献 900 余篇，以及华东鸟类拉丁学名、英文名和中文名索引，方便读者检索。

该书可供从事农业、林业、环境保护、航空鸟击防治、卫生防疫、野生动物管理、进出口贸易、商检、司法、海关、工商行政管理等领域的专业人员使用，也可供大专院校有关专业的师生参考。

朱