

# 拟南芥种子至幼苗发育中导管分子的发生与连接

毕冬玲 汪矛\* 孔令安 周树敏

(中国农业大学生物学院, 北京 100094. \*联系人, E-mail: wangmao5402@cau.edu.cn)

**摘要** 拟南芥发育早期导管分子的发生与连接至今并不十分清楚. 应用共聚焦激光扫描显微镜观察了野生型拟南芥种子至幼苗发育中导管分子的启动与连接. 结果表明, 种子萌发后 2 h, 自第 1 个启动位点——子叶节区下部启动导管分子的分化, 然后向下依次形成下胚轴和根的导管分子, 再向上形成了子叶节区中部的导管分子. 种子萌发后 10 h, 自第 2 个启动位点——子叶叶片中部偏下方启动导管分子的分化, 并逐渐完成与子叶节之间的导管分子连接以及子叶叶片羽状环缘脉中导管分子的建成. 种子萌发后 7 d, 由上胚轴-苗区形成的导管分子向下与子叶节区上部形成的导管分子发生连接, 至此形成该幼苗轴向和侧向器官中导管分子的完整连接.

**关键词** 拟南芥 幼苗 导管分子 发生 连接

植物维管系统具有运输物质、传递信息、机械支持和阻碍真菌及其他寄生物侵染等多种功能, 因此研究维管系统的发育已成为一个热点问题<sup>[1]</sup>. 到目前为止, 人们运用生理、生物化学和分子生物学等多种手段来研究维管系统的发育<sup>[2]</sup>. 生理学研究表明, 生长素对于维管系统分化十分重要<sup>[3]</sup>; 生物化学和减数杂交方法的研究也表明, 大量的蛋白质参与了管状分子的形成, 如次生壁的形成和细胞程序性死亡过程<sup>[4]</sup>; 分子生物学的研究进一步证明了某些基因在维管组织分化中的作用<sup>[5]</sup>. 目前, 拟南芥和百日草已成为研究维管系统发育的模式植物<sup>[6,7]</sup>, 尤其对拟南芥突变体的研究已为人们了解不同部位维管系统发育的分子机制开拓了道路, 例如控制维管束的排列<sup>[8,9]</sup>、真叶叶脉网络的形成<sup>[10-13]</sup>、原形成层细胞的分化<sup>[14,15]</sup>、初生木质部和次生木质部的分化<sup>[16,17]</sup>以及叶和茎中维管组织的结构等<sup>[18,19]</sup>. 然而到目前为止, 对野生型拟南芥种子至幼苗发育早期初生维管系统中导管分子发育的时空性研究, 至今尚未见详细报道.

本研究以野生型拟南芥为材料, 首次应用共聚焦激光扫描显微镜对其整体透明材料观察, 追踪种子萌发至幼苗发育过程中, 导管分子在轴向和侧向器官发生的位点、分化过程以及连接方式, 以此揭示拟南芥初生维管系统中导管分子发育的时空性, 同时也可作为拟南芥突变体的维管系统发育及相关生理生化和分子生物学研究提供参考.

## 1 实验材料及方法

( ) 种子及幼苗培养. 选取 Columbia 生态型野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)种子, 用 0.5% 高锰酸钾消毒 5 min, 蒸馏水冲洗 3 遍后, 置于 1% 琼脂培养基上, 在 HPG-400H 人工气候培养箱中培养. 培养箱中的光期温度为 23 , 暗期温度为 17 ; 光照周期为 16 h/8 h. 种子萌发 5 d 后转移到培养土(蛭石 方解土为 1 : 1)中, 在室温 24 进行幼苗培养.

( ) 应用共聚焦激光扫描显微镜观察整体透明材料. 取种子萌发后 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 和 28 h 以及 5, 6 和 7 d 的材料, 在 7% NaOH 溶液中浸泡 24 h(其中裹有种皮的材料先要去掉种皮), 蒸馏水冲洗 3 遍后, 再用 50% 乙醇冲洗 3 遍, 放入 10% 甘油中, 在 50 温箱中挥发至 100% 甘油. 材料用甘油封片.

上述材料(每一时间点取 2 或 3 个样本)在整体透明前用体视显微镜观察. 整体透明后材料不经染色, 直接用 ZEISS LSM META-5 共聚焦激光扫描显微镜观察并拍照, 其中激发光是 488 nm, 每张图片有 25 张光切片, 光切片厚度为 0.9  $\mu\text{m}$ .

以上实验重复 2 次.

( ) 石蜡切片. 取拟南芥种子萌发后 5 d 的材料(每次取 5 个样本, 重复 2 次), 用 50% FAA 溶液固定, 经乙醇系列脱水和二甲苯透明, 浸蜡并包埋, 用旋转切片机制成纵切连续切片, 切片厚度为 8  $\mu\text{m}$ , 经番红-固绿对染后制成永久切片, 在 Olympus 光学显微镜下观察并拍照.

## 2 结果

### 2.1 拟南芥种子萌发后 1~6 h 观察

拟南芥种子萌发后 1~6 h, 在体视显微镜下观察: 胚为曲生胚, 子叶包于种皮内. 初期子叶弯曲并与胚根成一定角度, 后期由于子叶叶柄的伸长, 使子叶与胚根所呈的弯曲度逐渐变小.

经整体透明处理材料在共聚焦激光扫描显微镜下观察, 结果表明, 种子萌发后 1 h, 未见导管分子的分化, 此时子叶的原形成层已经形成, 由于原形成层细胞处于待分化状态, 细胞质较浓厚, 细胞壁未有木质素沉积, 因此原形成层细胞未见自发荧光; 而叶肉细胞含有内含物, 故有自发荧光, 但细胞壁中未有木质素沉积, 故细胞壁未见自发荧光(图 1(a)). 下胚轴和根中原形成层也已经形成, 未见自发荧光; 由于薄壁细胞含有内含物, 故细胞质中有自发荧光(图 1(b)).

种子萌发后 2 h, 子叶节区下部出现微弱的自发荧光, 可见该处首先启动导管分子的分化, 为环纹导管分子(图 1(c)). 种子萌发后 4 h, 下胚轴和根中出现自发荧光, 可见导管分子分化的方向是由子叶节区下部向下发育, 形成了下胚轴和根的导管分子(根据

先分化形成的导管分子较后形成的导管分子的细胞壁沉积有较多的木质素, 因此可根据荧光强弱分辨出导管分子分化的部位、方向和时间)(图 1(d)). 种子萌发后 6 h, 子叶节区中部出现自发荧光, 表明分化方向是由子叶节区下部再向上分化形成该区的环纹导管分子(图 1(e)), 但此时子叶叶片中未见导管分子的分化.

### 2.2 拟南芥种子萌发后 10~28 h 观察

拟南芥种子萌发后 10~28 h 在体视显微镜下观察, 结果显示, 子叶逐渐脱离种皮, 且由于子叶叶柄的明显伸长而与下胚轴-根的弯曲度继续减小, 致使子叶与胚根近乎成一直线.

经整体透明处理材料在共聚焦激光扫描显微镜下观察, 种子萌发后 10 h, 根据材料自发荧光, 可见自第 2 个启动位点——子叶叶片中部偏下方开始启动导管分子的分化, 同时由于子叶节区中部分化形成的导管分子进入至子叶叶柄, 再进入至子叶叶片基部形成新的导管分子, 但是子叶叶片中部偏下方和子叶叶片基部之间仍未见导管分子的连接, 出现了导管分子的不连接区域(图 2(a)). 种子萌发后 12 h, 一

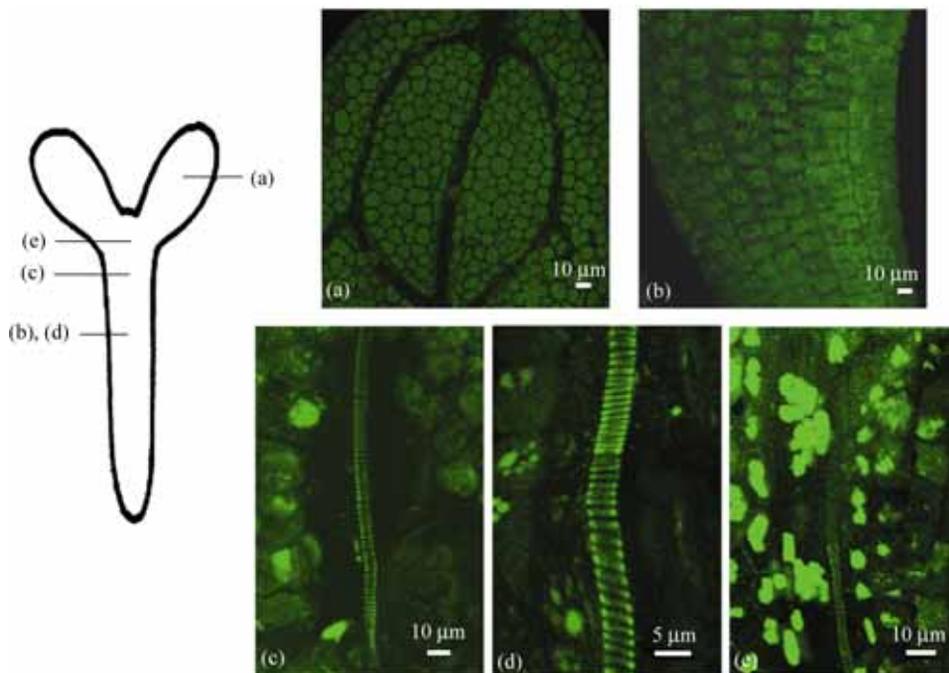


图 1 拟南芥种子萌发后 1~6 h 共聚焦激光扫描显微镜观察

左侧为模式图, 示(a)~(e)图在幼苗的具体部位. (a)和(b)示种子萌发后 1 h, (a)子叶与(b)下胚轴-根区未见导管分子的分化; (c)~(e)示种子萌发后 2, 4 和 6 h, 导管分子分化依次出现在(c)子叶节区下部、(d)下胚轴-根区和(e)子叶节区中部

子叶叶片中部偏下方与子叶叶片基部已出现环纹导管分子连接,并向子叶叶尖分化出新的导管分子,即形成了子叶的主脉(图 2(b)). 种子萌发后 16~28 h,由主脉顶端先向子叶片的一侧边缘分化出导管分子(图 2(c)),接着向另一侧边缘分化出导管分子(图 2(d));至子叶叶片边缘分化的导管分子在向下继续分化到子叶叶片中部时,又转向内侧分化,进而与主脉连接(图 2(d));随后与主脉连接的侧脉又再向外侧和向下分化出导管分子,最终形成了子叶叶片的羽状环缘叶脉. 该脉序特点为:简单,稀疏,仅由主脉和两侧

成双“W”状的侧脉构成(图 2(e)).

### 2.3 拟南芥种子萌发后 5~7 d 观察

石蜡连续纵切片观察:种子萌发后 5 d 的前期,子叶节区上部为薄壁组织细胞填充(图 3(d)).

经整体透明处理材料在共聚焦激光扫描显微镜下观察,种子萌发后 5 d 的后期,子叶节区上部出现薄壁细胞转分化,开始形成螺旋导管分子,并向上胚轴-苗区发育(图 3(a));此时上胚轴-苗区已出现第 1 对真叶原基,但未见导管分子的分化(图 3(a)). 种子萌发后 6 d,上胚轴-苗区原形成层开始分化形成导管

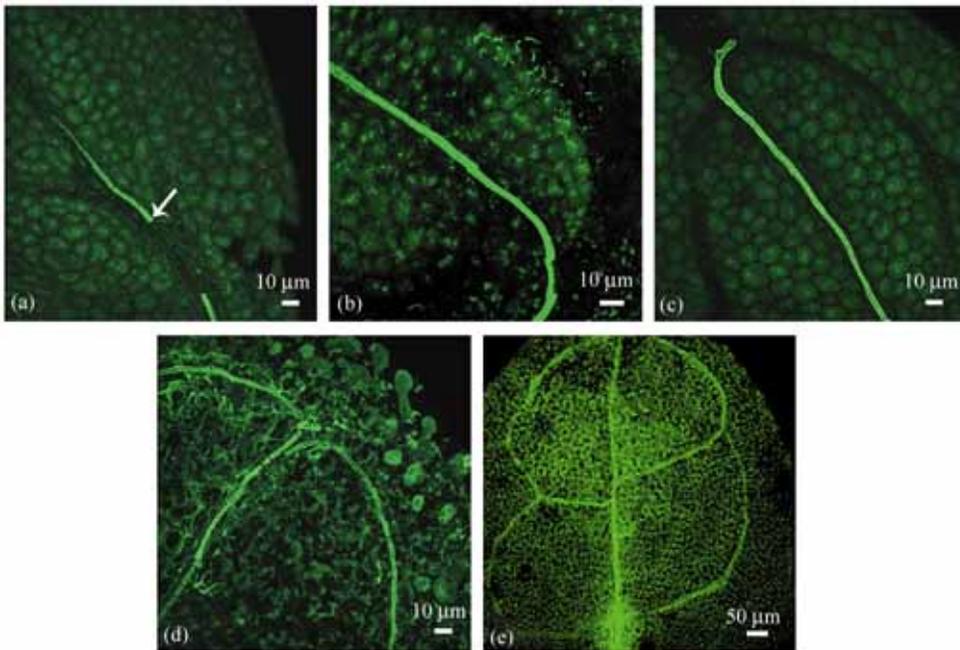


图 2 拟南芥种子萌发后 10~28 h 共聚焦激光扫描显微镜观察

(a) 子叶叶片中部偏下方启动导管分子的分化(箭头所示),且未与子叶叶片基部的导管分子连接;(b) 子叶叶片中部偏下方和子叶叶片基部的导管分子已完成连接;(c)和(d)子叶主脉发育至叶片尖端后,先后向两侧边缘分化出导管分子;(e) 子叶的羽状环缘脉

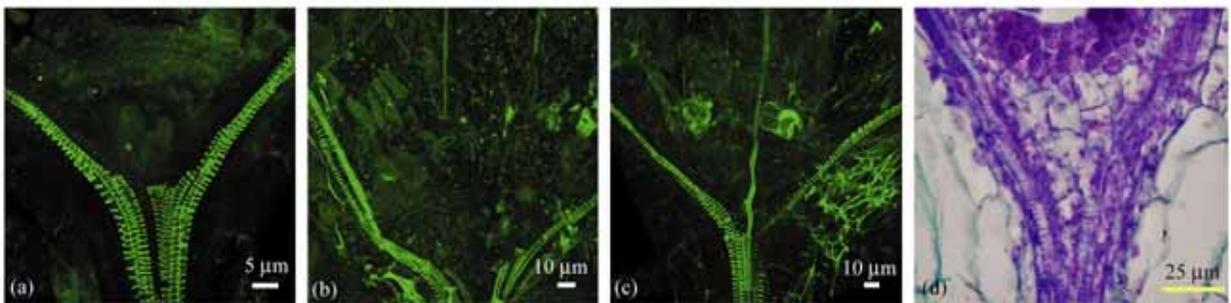


图 3 拟南芥种子萌发后 5~7 d 观察

(a)~(c) 共聚焦激光扫描显微镜观察:(a) 种子萌发后 5 d 的后期,子叶节区上部由薄壁细胞转分化,开始形成导管分子;(b) 种子萌发后 6 d,上胚轴-苗区由原形成层分化形成导管分子,但与子叶节区上部的导管分子未发生连接;(c) 种子萌发后 7 d,子叶节区上部与上胚轴-苗区的导管分子发生连接.(d) 明场显微镜观察,种子萌发后 5 d 的前期,子叶节区上部为薄壁细胞

分子, 根据荧光强弱可见分化方向是向着真叶尖端, 但上胚轴-苗区与子叶节区上部之间并未见自发荧光, 说明这 2 个位点之间未发生导管分子连接(图 3(b)). 种子萌发后 7 d, 子叶节区上部与上胚轴-苗区的导管分子发生连接(图 3(c)). 至此形成了该幼苗轴向和侧向器官中导管分子的完整连接.

### 3 讨论

#### 3.1 拟南芥种子至幼苗发育中导管分子发生与连接的时空性

被子植物幼苗初生维管系统中导管分子的发育与连接长期存在 2 种不同的观点, Eames 和 MacDaniels<sup>[20]</sup>主张由根向茎进行研究, 而 Esau<sup>[21]</sup>主张由根向子叶进行研究, 茎则为一种游离的形式. 20 世纪 90 年代, 我国植物学者谷安根在对原始被子植物毛茛科幼苗初生维管系统发育研究的基础上提出将幼苗分为子叶节区、上胚轴-苗区和下胚轴-根区, 并认为子叶节区是被子植物幼苗原始轴性器官的子遗部分, 从系统发育来看, 上胚轴-苗区和下胚轴-根区皆由此产生<sup>[22]</sup>.

本研究结果表明, 拟南芥种子萌发后 1~6 h, 自第 1 个启动位点——子叶节区下部启动导管分子的分化, 然后向下依次形成下胚轴和根的导管分子, 再向上形成了子叶节区中部的导管分子; 种子萌发后 10 h, 自第 2 个启动位点——子叶叶片中部偏下方启动导管分子的分化, 并逐渐完成与子叶节之间导管分子的连接以及子叶叶片的羽状环缘脉中导管分子的建成; 种子萌发后 7 d, 上胚轴-苗区的原形成层分化出的导管分子向下与子叶节区上部形成的导管分子发生连接(图 4). 从植物的个体发育可重复系统发育的角度分析, 拟南芥发育早期导管分子发生的 2 个启动位点皆在子叶节区, 可说明子叶节区的原始性. 从上述拟南芥导管分子发育的时空性分析, 又可说明幼苗的子叶节区、下胚轴-根区和上胚轴-苗区的客观存在; 同时也否定了以往人们从单一方向研究导管分子发育的途径, 而代之以子叶节区为中心, 先向轴向下胚轴-根区发育, 进而向侧向子叶叶片发育, 最后再向轴向上胚轴-苗区发育的新途径.

#### 3.2 拟南芥种子萌发后导管分子发生的启动位点

关于种子萌发后导管分子发生的启动位点报道罕见, 目前对拟南芥这方面的研究存在 2 种观点: 一种认为导管分子发育一开始就是连续的<sup>[23]</sup>; 另一种

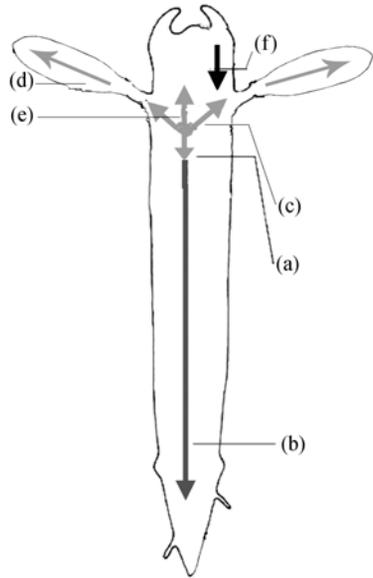


图 4 拟南芥幼苗初生维管系统中导管分子发育的时空性 (a)~(f)示导管分子发育的位点、顺序和方向. (a)子叶节区下部启动导管分子的分化; (b)向下形成下胚轴-根区的导管分子; (c)向上形成子叶节区中部的导管分子; (d)子叶叶片中部偏下方启动导管分子的分化并逐步完成与子叶节的连接以及形成子叶的羽状环缘脉; (e)子叶节区上部薄壁细胞转分化形成导管分子; (f)上胚轴-苗区原形成层分化形成导管分子并与子叶节区上部连接

认为种子吸涨后导管分子是在子叶偏下方以及下胚轴偏上方 2 个位点同时启动分化, 此时子叶中木质部的导管分子并未与下胚轴的导管分子连接, 说明子叶和下胚轴木质部的导管分子分化之初是不连续的<sup>[24]</sup>. 本研究结果支持第 2 种观点, 即初生木质部导管分化之初是 2 个位点启动, 且 2 个启动位点之初导管分子是不连续的; 但不同的是这 2 个位点并不是同时启动导管分子的分化, 而是子叶节区下部(非下胚轴偏上方)首先启动导管分子的分化, 然后才是子叶叶片中部偏下方启动导管分子的分化, 这 2 个位点的启动时间相差约 8 h.

#### 3.3 拟南芥幼苗子叶节区与上胚轴-苗区导管分子的连接方式

研究发现, 在幼苗初期上胚轴-苗区的初生维管系统与子叶节区以及下胚轴的初生维管系统并不是连接的<sup>[25]</sup>. Marshall<sup>[26]</sup>认为上胚轴的维管系统是着生在子叶维管束之上的第 2 系统. 本研究结果显示, 拟南芥幼苗子叶节区与上胚轴-苗区的导管分子在发育初期也是未连接的, 只是在种子萌发后 7 d, 上胚轴-苗区和子叶节区的导管分子才发生连接.

关于子叶节区与上胚轴-苗区导管分子的连接方

式,有报道毛茛、辽藁本等幼苗的子叶节区与上胚轴-苗区初生维管系统的连接是通过子叶节区中、上部分生组织性组织的分化形成的<sup>[27,28]</sup>,而本研究在拟南芥幼苗的子叶节区中、上部并未发现存在一团分生组织性组织,并且该区早期为薄壁细胞填充.至此我们认为幼苗子叶节区和上胚轴-苗区初生维管系统导管分子的连接可能存在2种情况:一种是通过子叶节区中、上部分生组织性组织的分化,另一种则是通过子叶节区中、上部的薄壁细胞的转分化.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号:30370084)、教育部博士点基金(批准号:20020019034)和中国科学院植物研究所系统与进化植物学重点实验室资助项目.

## 参 考 文 献

- 1 卢善发, 杨世杰. 砧木与接穗间的电波传递. 植物生理学报, 1995, 21: 386~392
- 2 Zhen H Y. Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants. *Plant Biol*, 2002, 53: 183~202
- 3 Sachs T. Cell polarity and tissue patterning in plants. *Development*, 1991, S1: 83~93
- 4 Fukuda H. Tracheary element differentiation. *Plant Cell*, 1997, 9: 1147~1156[DOI]
- 5 Sterky F, Regan S, Karlsson J, et al. Gene discovery in the wood-forming tissue of poplar: Analysis of 5692 expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 13330~13335[DOI]
- 6 Aloni R. Differentiation of vascular tissues. *Annu Rev Plant Physiol*, 1987, 38: 179~204
- 7 Milioni D, Sado P E, Stacey N J, et al. Differential expression of cell-wall-related genes during the formation of tracheary elements in the *zinnia* mesophyll cell system. *Plant Mol Biol*, 2001, 47: 221~238[DOI]
- 8 Przemek G K H, Mattsson J, Hardtke C S, et al. Studies on the role of the *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* in vascular development and plant cell axialization. *Planta*, 1996, 200: 229~237
- 9 Cano-Delgado AI, Metzclaff K, Bevan M W. The *eli1* mutation reveals a link between cell expansion and secondary cell wall formation in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 2000, 127: 3395~3405
- 10 Carland F M, Berg B, FitzGerald J N, et al. Genetic regulation of vascular tissue patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1999, 11: 123~137
- 11 Deyholos M K, Cordner G, Beebe D, et al. The *SCARFACE* gene is required for cotyledon and leaf vein patterning. *Development*, 2000, 127: 3206~3213
- 12 Koizumi K, Sugiyama M, Fukuda H. A series of novel mutants of *Arabidopsis thaliana* that are defective in the formation of continuous vascular network: Calling the auxin signal flow canalization hypothesis into question. *Development*, 2000, 127: 197~204
- 13 Dengler N, Kang J. Vascular patterning and leaf shape. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4: 50~56[DOI]
- 14 Scheres B, Laurenzio L D, Willemsen V, et al. Mutations affecting the radial organization of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development*, 1995, 121: 53~62
- 15 Mahonen A P, Bonke M, Kauppinen L, et al. A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes Dev*, 2000, 14: 2938~2943[DOI]
- 16 Galweiler L, Guan C, Muller A, et al. Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science*, 1998, 282: 2226~2230[DOI]
- 17 Zhong R, Taylor J J, Ye Z H. Transformation of the collateral vascular bundles into amphivasal vascular bundles in an *Arabidopsis* mutant. *Plant Physiol*, 1999, 120: 53~64[DOI]
- 18 Waites R, Hudson A. *Phantastica*: A gene required for dorsiventrality of leaves in *Antirrhinum majus*. *Development*, 1995, 121: 2143~2154
- 19 McConnell J R, Emery J, Eshed Y, et al. Role of *PHABULOSA* and *PHAVOLUTA* in determining radial patterning in shoots. *Nature*, 2001, 411: 709~713[DOI]
- 20 Eames A J, Macdaiels L H. An introduction to plant anatomy. New York: 2nd McGraw-Hill Book Company, 1947
- 21 Esau K. Anatomy of seed plants, New York: John Wiley, 1977
- 22 谷安根, 王立军. 子叶节区理论与被子植物演化形态学的进展. 长春: 吉林科技出版社, 2000
- 23 Mansfield S G, Briarty G. The dynamics of seedling and cotyledon cell development in *Arabidopsis thaliana* during reserve mobilization. *Int J Plant Sci*, 1996, 157: 280~295[DOI]
- 24 Busse J S, Evert R f. Pattern of differentiation of the first vascular element and seedling of *Arabidopsis thaliana*. *Int J Plant Sci*, 1999, 160: 1~13[DOI]
- 25 Dangeard P A. Observation sur la structure des plantules chez les phanerogames dans ses rapports avec l' evolution vascular. *Soc Bot Fr Bul*, 1913, 60: 113~120
- 26 Sunberg M D. Vascular development in the transition region of *Populus deltoids* Bartr. ex marsh seedling. *Amer J Bot*, 1983, 70(5): 735~743
- 27 Wang M, Wang L J, Jia L P, et al. Morphological and anatomical studies on seedlings of *Aconitum coreauum*. *Cathaya*, 1992(4): 151~160
- 28 毕冬玲, 汪矛, 苏新华, 等. 辽藁本(*Ligusticum jeholense*)幼苗初生维管系统的研究. *西北植物学报*, 2004, 24(8): 1373~1377

(2005-02-05 收稿, 2005-07-06 收修改稿)