离体培养中胡萝卜细胞脱分化状态下 无丝分裂的活体连续观察

陆 文 樑 (中国科学院植物研究所,北京)

摘 要

本文对离体培养的胡萝卜细胞在脱分化状态下进行的劈裂式无丝分裂,进行了全过程的活体连续观察。观察的细胞取自根的愈伤组织。它们首先在微室中培养成活,进行不断地细胞分裂,然后通过相差显微镜进行活体细胞分裂全过程的观察。观察表明:按细胞学特点,整个分裂过程可以分成前期、中期、后期和末期四个时期。在整个过程中未见到染色体和纺锤体。每个时期所需要的时间已进行了统计。对这种无丝分裂的细胞学特点,以及它在加速细胞分裂过程上的意义也进行了讨论。

在植物细胞培养中,细胞脱分化关系到培养成败及生命时钟的逆转^以,它在实践上和理论上的意义已越来越明显.

在以往的工作中,我们以花药和花粉培养为手段,对花粉脱分化启动的外因^[2] 和内因^[1] 已进行了初步的讨论。进一步研究又发现,花粉脱分化的头几次分裂主要是无丝分裂,有丝分裂极少^[3]。 这个观察与 Nuti-Ronchi 等^[4],Martini 等^[5] 在粉兰菸草髓组织离体培养中的观察; Bennici 等^[6] 在红花菜豆胚培养上的观察; 1979^[7] 在硬粒小麦中胚轴培养上的观察; Cionini 等^[8] 在蚕豆子叶离体培养中的观察以及 D'Amato(1980)评论的观点是基本上一致的。 这表明脱分化状态下主要进行无丝分裂这个观察不仅在体细胞上,同时也在生殖细胞上得到了证实。这引起了我们对这种无丝分裂很大的兴趣,因为它与脱分化有密切关系。为此,我们着手对这次无丝分裂进行研究。

关于无丝分裂的研究,以前苏联人进行过大量的工作,由于当初还不太了解这种分裂的生物学意义,因此没有引起足够的重视.以后文章比较少了,有的细胞学著作在再版时,干脆把无丝分裂从细胞分裂一章中删去.从发表的资料来看,多半是报道观察到的一些现象,对无丝分裂的全过程缺乏全面而详细的研究,更不用说对无丝分裂中核分裂及胞质分裂进行活体连续观察了.这也是无丝分裂所以不能被大家重视的原因之一.我们在着手研究这次无丝分裂时,首先进行了活体连续观察,因为对于研究一种细胞分裂来说,活体连续观察能给予整个分裂过程以全面和完整的认识,它不但可以证实由固定材料观察而推测的连续过程是否正确,还可以了解每一个时期及整个过程所需要的时间,更可以观察到固定材料所观察不到的许多现

象.因此,它对于一种类型细胞分裂的最后确证是必不可少的. 通过观察获得了一些资料并 摄得了核分裂及胞质分裂全过程的照片. 照片和资料表明,这种分裂是典型的无丝分裂,分裂 的类型是劈裂.

一、材料和方法

1. 材料 胡萝卜 (Daucus carota L.) 由北京市农科院蔬菜研究所提供.

2. 方法

(1) 胡萝卜根愈伤组织的诱导 将完整无伤口的胡萝卜根用自来水洗净,接着用 75% 的 乙醇擦洗一遍进行表面消毒.通过无菌操作用解剖刀将根的表层削去,然后切成小块,使每一小块都带有一部分形成层,这些小块被接种到 MS + 2,4-D 2 毫克/升 + CH 500 毫克/升 + 琼脂 0.8%, pH 5.8 的培养基上,在培养室中诱导愈伤组织形成.得到愈伤组织后,在同一培养基上进行继代培养以扩大繁殖.

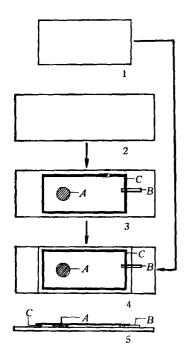


图 1 微室培养的制备

(1-2.盖玻璃和载玻璃. 洗净后用酒精灯火焰消毒备用. 3.在载玻璃消毒后,按盖玻璃的大小涂上一圈四环素眼膏(C),滴上一滴分离细胞悬浮液(A),并在四环素眼膏处放上一小段毛细管(B).4.将消毒后的盖玻璃盖在四环素眼膏的框子上,使其与眼膏紧密接触,在盖玻璃与载玻璃之间造成一密封的小室,这小室通过一段毛细管与外界通气. 盖玻璃盖上后要使它与细胞悬浮液滴相接触.

5.微室的纵剖面)

- (2) 单细胞悬浮液的制备 诱导得到的愈伤组织被接种到 MS + 2, 4-D2 毫克/升 + CH 500 毫克/升的液体培养基中,在 4 转/分的转床上培养10 天,然后用孔径为140×140微米的细胞筛过筛,使密度达到 10^5 个/毫升.
- (3) 微室培养的制备 将洗净的盖玻璃与载玻璃在酒精灯火焰上消毒(图 1,1,2),冷却后按盖玻璃的大小在载玻璃上涂一圈四环素眼膏(图 1,3),将制得的单细胞悬浮液一小滴(约 3 微升)滴在载玻璃上,然后在四环素眼膏上放一小段毛细管(图 1,3),盖上盖玻璃,轻压使密封即成(图 1,4,5)。微室培养的材料被放入培养室中培养.
- (4) 观察与染色 微室培养材料的活体观察和照相在相差显微镜下进行;一般固定染色材料的观察在普通显微镜下进行.一般观察材料先经过15分钟卡诺固定液(纯酒精:冰醋酸=3:1)固定或1小时戊二醛固定,然后分别用醋酸洋红,Foster 鞣酸-三氯化铁及铁矾苏木精染色.
- (5) 培养条件 培养室白天 26 ± 1℃, 黑夜 24 ± 2℃. 1天 10 小时光照, 14 小时黑暗.

二、观察结果

1. 活体细胞学观察

运用上述方法制得的微室培养片子,不但能保持培养物长期存活,而且能在相差显微镜下清楚地观察活体细胞学变化.于是我们在 26±1℃ 的培养室中对整个细胞周期进行了活体连续观察,得到的结果如下:

(1) 间期的活体细胞学变化 由愈伤组织分离的胡萝卜

单细胞,在外部形态上虽然是多种多样的,但按内部的细胞学特点基本上可分两类,第一类:细

胸较大,有明显的大液泡,细胞质由于受到液泡的挤压,大部分紧贴着细胞壁,小部分包围在核 周围(图 2, 1, 图版 I, 1, 2). 在相差显微镜下可清楚地观察到细胞质环流。 紧贴在壁上的细 胞质虽然成一薄层,但由于胞质环流的存在,可以清楚地观察到这一薄层是由许多细胞质股组 合而成,每一股细胞质流动时流量很不均匀,有时一大团细胞质涌来,一股细胞质可以变得很 相,在这一团细胞质流走后又可变得很细.每一股流动的速度随细胞而异,在培养温度为 26 ± 1 °C 的条件下,流得快的达 6 微米/秒,流得慢的仅 2 微米/秒。 每一股流动方向也不一 致,有时紧挨着的两股流动方向正好相反,相邻的两股虽然挨得很近,但不会相互混淆,在每 一股细胞质中又可观察到许多直径在 1—1.5 微米之间的圆球形颗粒物随着细胞质流 动的方 向迅速移动,当细胞质环流停止时,这些颗粒就在它们所在的位置附近作轻微的布朗运动,贴 着壁环流的细胞质,有时有一股或几股会摆脱大液泡的约束,离开细胞壁穿过液泡,形成在液 泡中穿流的细胞质 (图版 I, 1, 2). 随着细胞质环流的不断进行,这些在液泡中穿流的细胞质 又能重新靠到壁上, 因此,穿过大液泡的细胞质时而股数增加,时而股数减少,并有着各种不 同的形态,细胞核可见到明显的核仁,有时还能见到核仁液泡(图版 I, 1, 2)。 核的周围包围 着一层不断运动的细胞质,由于细胞质不断地运动,核在细胞中的位置也不断变化,有时靠近 壁,有时在大液泡正中,第二类: 细胞较小,细胞质较浓看不到液泡,因此也看不到在液泡中穿 流的一股股细胞质,细胞质的环流也看不清楚,细胞质中也看不到圆球状的颗粒物,这类细 胞的细胞核多数位于细胞正中,核与细胞的体积比,要比第一类细胞大得多,核在细胞中位置 的变化也很不明显。

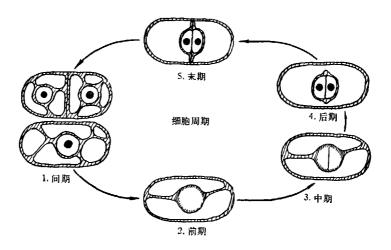


图 2 劈裂式无丝分裂细胞周期模式图

(2)分裂期的细胞学变化 活体的细胞分裂在每张片子上都能看到,但要从头至尾观察一个细胞分裂的全过程却不十分容易.因为要判断一个间期的细胞在什么时候开始分裂是困难的.经过长期的观察,我们仅累积了上述两种类型的 62 个细胞在脱分化状态下第一次分裂活体连续观察的资料.观察表明,这 62 次分裂都是无丝分裂.及至目前,还没有观察到1次有次分裂.分裂的全过程基本上都相似,在分裂过程中都没有观察到染色体,核分裂纺锤体和胞质分裂纺锤体.下面我们从观察过的细胞中,选择一个细胞来说明这次分裂的细胞学特点.为了便于描述,我们根据主要的细胞学特点将这次分裂分成前期、中期、后期和末期 4 个时期

(图2,图版I,3-7). 前期(图版I,3): 核膜和核仁消失,核区出现一些小的颗粒物,有一部 分细胞质逐渐向核周围集中,穿过大液泡的细胞质逐渐减少,核周围的细胞质运动迅速而激 烈,但胞质的环流已很不明显,本来在胞质中迅速移动的圆球状颗粒物现在已停止移动,在原 来的位置上作轻微的布朗运动. 中期(图版 I, 4,5): 在核区正中形成分裂面. 分裂面的出 现极为迅速,在 26±1℃ 的条件下,一般是 10 几秒钟,最多不超过 1 分钟. 分裂面的形成有两 种情况,一种是在核正中先出现分裂面然后向两边扩展将核分裂成为两部分;另一种是分裂面 在核正中的一端先形成,然后向另一端扩展,最终将核分裂成为两部分. 分裂面开始形成时基 本上是平直的,但随着分裂时核周围胞质不断运动,分裂核的形状、位置以及分裂面的形状都 会不断地发生变化, 这样, 分裂面有时可以弯曲成弧形. 穿过大液泡的细胞质这时进一步减 少,流向核周围的细胞质进一步增加. 后期(图版 I,6); 子核逐渐形成,核膜和核仁又重新出 现. 这时核周围的细胞质开始向核分裂面边缘集中. 末期(图版 I,7): 胞质分裂. 在核分裂 面边缘进一步集中细胞质, 然后沿核的分裂面向四周呈平面扩展. 如果分裂核的位置正好在 细胞中央,那么这种扩展分两种情况:一种是以分裂核为中心向四周扩展;另一种是先向分裂 核的一侧扩展,在扩展的细胞质与壁相遇后,在分裂核的另一侧才出现这种细胞质的扩展。如 果分裂核的位置正好靠近壁,那么这种细胞质的扩展主要是沿核的一侧进行。 在细胞质沿核 分裂面逐渐向四周扩展的同时,新细胞壁逐渐在它中间形成,当扩展的细胞质与四周的细胞壁 接触后,新细胞壁也就逐渐与母细胞壁连接。这样,母细胞质就被分裂成为两部分。这种沿核 的分裂面向四周的细胞质扩展,有时呈一平面进行;有时在分裂过程中核分裂面的位置和形状 发生变化,这时,这种细胞质的扩展就沿一弧形面进行。 这样,形成的新细胞壁在方向和形状 上具有多样性,两个子细胞的形状也就可以多种多样。 分裂结束后两个子细胞核紧靠在新形 成的细胞壁的两边,细胞质环流又重新开始,在大液泡中穿流的一股股细胞质又重新出现, 胞 质中的圆球状颗粒物又重新按细胞质流动的方向迅速移动. 随着子细胞的进一步发育,本来 靠在一起的两个子核相互分开,并由于胞质环流而不断地改变着相互的位置(图版 I, 8)。 在 第一次分裂后约38 小时,子细胞又开始分裂(图版II,1-3),由母细胞第一次分裂形成的两 个子细胞,其分裂不是同步的.

2. 分裂中各时期所需要的时间

我们对所观察的 62 个细胞中的 14 个细胞,作了分裂各期所需时间的记录,列于表 1. 表 1 表明,在不同的细胞中,分裂各期所需时间有一定差异。 这样,完成一次分裂所需要的时间大约在半小时到 1 小时之间变化(在 26±1℃的条件下)。 表中所列数据表明,这种差异可能与每个细胞的个体差异有关。 在分裂末期,这种差异表现得更为明显。这显然是由细胞大小的差异造成的。较大的细胞,细胞与核的直径比较大,需要形成新细胞壁的面积就较大,末期的时间就较长;细胞较小,细胞与核的直径比较小,需要形成新细胞壁的面积较小,末期所需时间就较少。

3. 染色材料的观察

为了能进一步证实这种分裂不出现染色体与纺锤体,我们在活体观察后应用显微操作器将此细胞从微室培养中取出,分别用醋酸洋红(图版 II,5,6)和 Foster 鞣酸-三氯化铁(图版 II,7,8)染色,同时也对一些材料用铁矾苏木精染色(图版 II,4)。结果表明,这三种不同的染色方法都不能显示在这种分裂过程中存在染色体与纺锤体。

A THE PROPERTY OF THE PROPERTY								
编号	细胞大小 (长×宽) μ	核 直 径 (µ)	细胞 宽度与 核直径的比	前期时间 (分)	中期时间 (秒)	后期时间 (分)	末期时间 (分)	分裂全过程 时间(分)
1	60.0×47.5	17.5	2.7	28	19	9	25	62
2	57.5×45.0	17.0	2.6	27	28	10	27	64
3	45.0×35.0	16.5	2.1	30	34	10	20	60
4	87.5×12.5	12.0	1.0	24	11	8	7	39
5	50.0×37.0	15.0	2.5	21	17	12	22	55
6	42.5×22.5	15.0	1.5	19	33	11	9	39
7	30.0×25.0	10.0	2.5	18	8	9	20	47
8	40.0×26.3	13.0	2.0	19	14	8	14	41
9	40.0×28.8	7.5	3.8	23	5	12	39	74
10	47.5×22.5	10.0	2.3	27	5	13	19	59
11	42.5×25.0	10.0	2.5	19	7	11	24	54
12	40.0×30.0	10.0	3.0	22	10	9 .	31	62
13	42.5×30.0	11.0	2.7	24	21	7	30	61
14	90.0×33.0	9.8	3.4	30	50	14	35	79

表 1 不同的细胞无丝分裂各期所需时间

三、讨 论

我们对胡萝卜单细胞培养中 62 个细胞脱分化状态下第一次无丝分裂的全过程,用相差显微镜进行了活体连续观察,结果在整个分裂过程中都没有观察到染色体与纺锤体. 众所周知,相差显微镜是能够观察到活细胞的染色体与纺锤体的. 我们以前在小麦花粉分化的第一次有丝分裂的研究。中,就用相差显微镜对这次分裂进行过活体连续观察,结果在分裂的前期、中期和后期都清楚地观察到了染色体,在后期清楚地观察到了纺锤体. 现在我们用同一架相差显微镜观察了几十个细胞分裂的全过程都没有观察到染色体和纺锤体,这个事实可能表明,在这种分裂的过程中确实不出现染色体与纺锤体. 为了进一步证明,我们又用显示染色体与纺锤体的各种不同染色方法,对这种分裂的细胞进行染色. 为了使实验更具说服力,我们先进行活体观察,表明这个细胞确实在进行劈裂式无丝分裂,然后迅速将这个细胞固定,用显微操作器将它从微室培养中取出进行染色观察. 结果也未观察到染色体与纺锤体,这就进一步验证了相差显微镜活体观察的结果,表明这种分裂确实不出现在有丝分裂中必然会出现的染色体与纺锤体。再从胞质分裂的特点来看,这种分裂他不像有丝分裂那样,要依赖胞质分裂纺锤体来完成,而是在核分裂面周围骤集细胞质,沿核分裂面的平面向四周扩展,在扩展的细胞质中央逐渐形成壁。这表明,这种分裂的胞质分裂与有丝分裂的也有很大差别。这样,我们认为这种分裂的确是无丝分裂。

大家知道,无丝分裂有几种不同的类型,以前报道得较多的是缢缩分裂与碎裂.我们在低温处理的小麦穗子中,观察到植物细胞无丝分裂的一种新类型——劈裂式无丝分裂^[10].这种分裂完全不同于缢缩分裂与碎裂,它是依靠在核中间形成一道平整的裂缝(即分裂面)实现核分裂的.本实验中观察到的无丝分裂,也是在核中间形成一道平整的分裂面来实现核分裂的.这就表明,这种无丝分裂的类型也是劈裂.鉴于本观察中细胞脱分化分裂都是这种形式,这就进一步证明了劈裂式无丝分裂类型的客观存在以及它的重要性.由于本观察是活体全过程的连续观察,它必然会充实和完善人们对这种类型分裂过程的认识.

劈裂式无丝分裂确实看不到染色体与染色体均等分配的过程,但是否就没有这种过程呢?我们认为目前的研究还有待于进一步深入,要作出结论还为时过早。根据已掌握的资料,大概存在着以下两种可能性:一种是确实不出现染色体与染色体均等分配的过程。按 D'Amato 等人的意见,这是造成以后进行有丝分裂时染色体倍性混乱的主要原因。另一种是本过程明显地出现核仁消失和核仁重现的过程,可见核内经历了极其复杂的变化,这与核简单地裂为几部分有区别,如果在整个分裂过程中缺少有丝分裂中常见的染色体缩短过程,这就会造成光学显微镜不能发现它,因此也就不能发现染色体均等分配的过程。但是这不等于说在光学显微镜分辨率以外就没有这个过程。这两种可能究竟哪一种正确需要作进一步的研究。

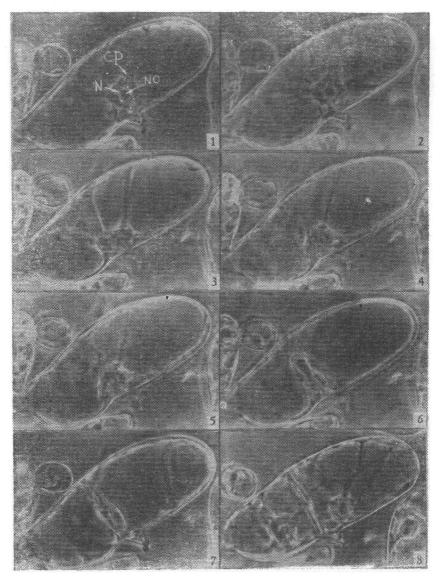
本观察表明,在一次劈裂式无丝分裂中,核分裂的速度是极快的,从核膜和核仁消失到子核再现所需时间在 30 分钟左右. 这种核分裂的速度在使整个细胞分裂速度加快上有着极其重要的意义. 观察表明,在迅速分裂的情况下,细胞体积将逐渐变小,这样,核与整个细胞的体积比将逐渐上升. 在一些较小的细胞中,核与壁(宽度上的壁)之间的空间是极小的,这样,核分裂的速度实际上十分接近细胞分裂的速度. 这种细胞分裂速度比有丝分裂要快得多. 我们认为,造成脱分化分裂中出现的种种细胞学特点,除了我们以前讨论过的极性原因以外¹¹,可能与脱分化状态下细胞需要极其迅速的分裂有关。

本观察对于了解脱分化状态下的细胞学变化大概有所帮助,然而研究是初步的. 脱分化 状态下细胞分裂的方式肯定不止这一种. 那么它究竟有多少种? 每一种的细胞学特点又怎样? 细胞经历脱分化无丝分裂后的命运又如何? 这些我们正在继续研究中.

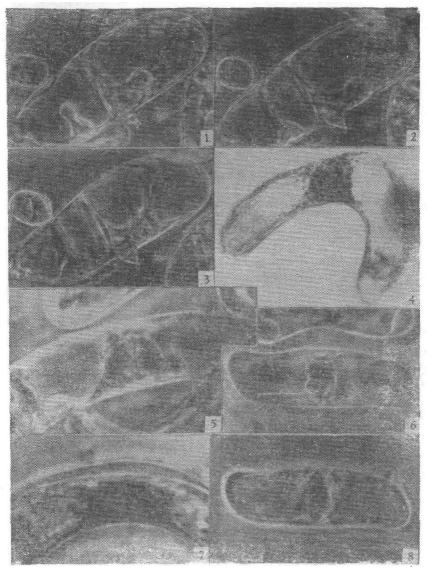
作者对王伏雄教授审阅原稿,钱迎倩副研究员在工作中给予指导和鼓励深表谢意。

参 考 文 献

- [1] 陆文樑,中国科学B辑,1982,1:25-29。
- [2] 陆文樑,中国科学,1978,3:351-355.
- [3] 陆文樑,在植物体细胞遗传学及其在禾谷类作物应用的国际讨论会上的报告,1981。
- [4] Nuti-Ronchi, V., et al., Cell Differentiation, 2 (1973), 77-85.
- [5] Martini, G. & Nuti-Ronchi, V., Cell Differntiation, 1974, 3: 239-247.
- [6] Bennici, A., et al., Protoplasma, 1976, 89: 251-261.
- [7] Bennici, A., et al., a Joint Meeting on Genetics and Breding of Crop Plants, Roma Istituto Sperimentale per la Crealicoltuta 1979, 177—188.
- [8] Cionini, A., et al., Protoplasma, 1978, 96: 101-112.
- [9] D'Amato, F., In Plant Cell Culture: Results and Perspectives (Ed. Sala, F., et al.), Elsevier/North-Holl and Biomedicol, 1980, 67—72.
- [10] 陆文樑,科学通报,25 (1980),12:753-755。



1,2.间期细胞,可见到核(N),核仁(NO)和许多股细胞质(CP)穿过大液泡连接核周围和紧贴壁的细胞质。在1中可见到核仁液泡,在2中核仁液泡出现一个缺口。3-7.分裂期细胞。3.前期。核仁与核膜消失,核区出现一些小的颗粒物,部分细胞质逐渐向核周围集中。在液泡中穿流的细胞质仍然存在但数量减少。4,5.中期。核中部出现分裂面将核基本上等分成两部分。在液泡中穿流的细胞质只剩下一股。6.后期。子核的核仁与核膜已重新形成。从这张照片中还可以看到,在中期时还集中在核周围的细胞质,现在逐渐集中到核分裂面的周缘并沿核分裂面向四周扩展,新细胞壁逐渐在扩展的细胞质中间形成,表示分裂已开始进入末期。此时已看不到在液泡中穿流的细胞质、7.末期。沿核分裂面向四周扩展的细胞质已经与四周的细胞壁完全连接,在其中形成的新细胞壁也与四周的细胞壁相接,一个母细胞分裂为两个子细胞。此时子核还紧靠在新形成的壁的两边。8.间期。细胞质环流又重新开始,在末期时紧靠在新细胞壁两边的子核此时已分开,并随着细胞质的流动不断地改变在细胞中的位置。在液泡中穿流的细胞质又重新出现。



1. 左边的子细胞又进行一次分裂,可观察到新细胞壁正在形成.2. 左边细胞进入分裂末 期. 3. 左边新分裂的两个子细胞进入间期. 4. 劈裂式无丝分裂中期,卡诺固定液固定, 铁矾苏木精染色、能观察到刚刚形成的分裂面,但看不到染色体与纺锤体.5.劈裂式 无丝分裂中期,相差显微镜活体照相. 6-上面这个细胞用卡诺固定液固定后,经醋酸洋 红染色后的照片。 这两张照片都只能观察到核分裂面,看不到染色体与纺锤体. 7. 劈 裂式无丝分裂中期,活体相差显微镜照相,8.上面这个细胞用3%成二醛固定后用 Foster 鞣酸-三氯化铁法染色, 两张照片都看不到染色体与纺锤体。