

利用激光扫描共聚焦显微镜研究拟南芥气孔发生与发育

汪 暖, 陈志雄, 刘向东*

(华南农业大学广东省植物分子育种重点实验室, 广州 510642)

摘 要: 通过激光扫描共聚焦显微镜, 利用不同种类(波长)的激光研究拟南芥叶片气孔发生与发育。结果表明, 利用紫外激光(351 nm)扫描可以清楚观察到拟南芥表皮各种细胞及其发生发育的形态变化, 包括表皮毛细胞、副卫细胞、保卫细胞、铺垫表皮细胞等。气孔发生过程中, 首先原表皮细胞不对称分裂产生拟分生组织和副卫细胞, 接着分化出保卫细胞母细胞, 进一步发育形成保卫细胞, 最终形成气孔器。气孔分化完成后, 保卫细胞在紫外激光下不产生荧光, 但利用蓝光激发(488 nm)辅助荧光素染色, 可清晰地看到保卫细胞。结果表明, 激光扫描共聚焦显微镜在拟南芥叶表皮细胞形态研究上有独特的功能。

关键词: 拟南芥; 气孔; 激光扫描共聚焦显微镜

中图分类号: Q942.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2007)02-0109-03

Studies on Morphogenesis and Development of *Arabidopsis thaliana* Stomata Using Confocal Laser Scanning Microscope

WANG Nuan, CHEN Zhi-Xiong, LIU Xiang-Dong*

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Molecular Breeding, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The morphogenesis and development of lamina stomata in *Arabidopsis thaliana* was studied, using confocal laser scanning microscope. The results showed that all types of cells, such as trichomes, subsidiary, guard and epidermal pavement cells, and their morphogenesis variation were observed clearly under UV laser (351 nm). During the formation of stomata, one protodermal cell produced a meristemoid and subsidiary cells by asymmetric division, followed by the formation of guard mother cell, which became two guard cells. Stomata were terminally differentiated. After the formation of stomata, guard cells could not emit fluorescence under UV laser (351 nm). So blue laser (488 nm) with staining by fluorescein was adopted and guard cells were seen clearly. It indicated that CLSM was a very novel tool to study the morphogenesis and development of lamina stomata.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; Stomata; Confocal laser scanning microscope (CLSM)

气孔是植物进行气体与水分交换的门户, 对植物生长具有重要的作用。气孔的发生决定气孔的结构, 而气孔的结构是其功能的基础。所以, 研究气孔的发生过程对于进一步开展其调控的分子机理具有重要的意义^[1]。

拟南芥是双子叶的模式植物, 已有对其气孔发生发育的研究主要是采用固定的叶片通过光学显微镜^[2]和电子显微镜^[3,4]进行的。目前, 尚未见到直接利用活体材料通过激光扫描共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscope, 简称 CLSM, 下同)观察拟南芥叶表皮形态和气孔发生发育的报道。我们拟利用拟南芥的活体叶片, 通过 CLSM 采用紫外和蓝光两种波长的激光研究气孔的发生发

育, 目的是弄清其发生发育的真实形态变化, 为进一步开展分子生物学研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选取拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)“Columbia”生态型种子在 4℃ 条件下春化 5 d 后, 先后用次氯酸钠溶液和 70% 乙醇分别消毒 5 min 和 2 min, 无菌蒸馏水冲洗 2 次, 将消毒后的种子接种到 1/2 MS 培养基上, 在 28℃ 光照培养箱中培养并萌发种子。取真叶为 6~9 片幼苗的叶片用于 CLSM 观察。

1.2 方法

选取拟南芥叶片, 上表皮朝上(以获取上表皮

收稿日期: 2006-10-05, 修回日期: 2006-11-30。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30270814); 教育部“高校青年教师奖”(2002383)资助。

作者简介: 汪暖(1982-), 女, 浙江金华人, 在读硕士生, 从事种质创新及细胞学研究; 刘向东(1965-), 男, 教授, 博导。

* 通讯作者(E-mail: xdlu@scau.edu.cn)。

细胞图像)放在载玻片上,用2%琼脂糖封片,在Leica SP2 CLSM下利用紫外激光(波长351 nm)对叶片上表皮细胞进行扫描并录取图像。

选用拟南芥幼苗作为材料,经过变温渗透法,将荧光素装载到幼苗的叶片中,通过CLSM用488 nm的蓝色激光对叶片上表皮进行扫描并录取图像。

2 结果与分析

利用不同发育阶段的拟南芥叶片进行紫外激光扫描,观察到拟南芥不同大小叶片表面上出现各种形态的细胞类型及其发育过程。

当叶片长度在1~2 mm时,其表面上可以清楚看到表皮毛原始细胞(trichomes initial cells, IT)、副卫细胞(subsidiary cells, SS)、保卫细胞母细胞(guard mother cell, GMC)、气孔保卫细胞(guard cell, GC)、拟分生组织(meristemoid, M)。表皮毛原始细胞在紫外光激发下,其细胞形态与周围细胞差别很大;副卫细胞与周围其他表皮细胞也有明显的差别。保卫细胞母细胞呈圆或椭圆形,保卫细胞形状较为规则,但在紫外光激发下不产生荧光。拟分生组织较小,通常是三角形,拟分生组织周围有一个副卫细胞或两个副卫细胞,保卫母细胞旁有一个副卫细胞(图1:A)。

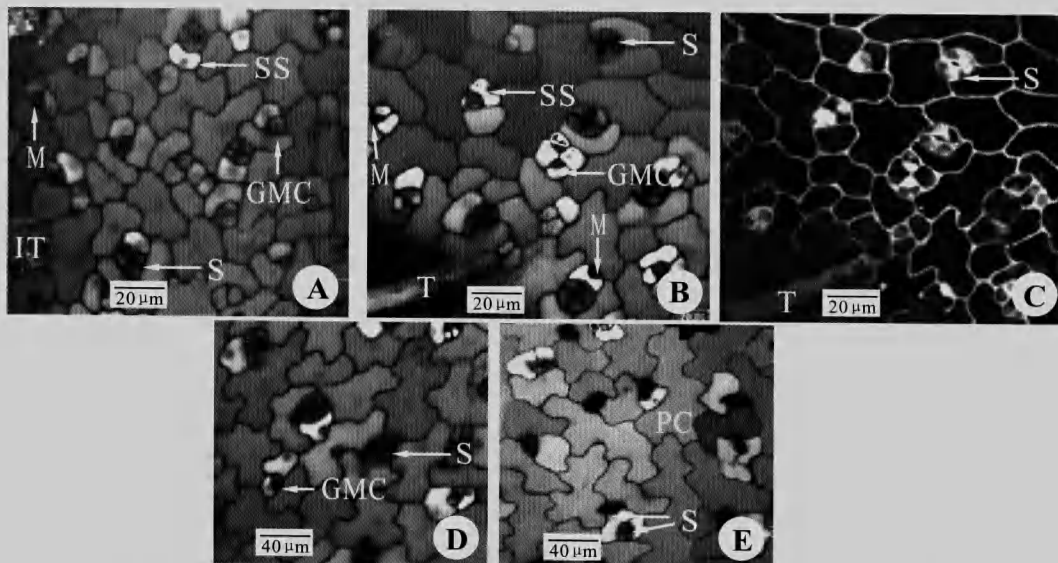
当叶片长度为3~4 mm时,叶片中脉附近的表皮细胞形状较为规则,呈长方形。叶上表皮可以看到表皮毛细胞(trichomes, T)、副卫细胞、保卫细胞母细胞、气孔保卫细胞、拟分生组织,表皮毛在其尖端有两个小分叉。拟分生组织周围有2个副卫细胞和3个副卫细胞,已形成气孔的一侧又出现拟分生组织的情况(图1:B)。由于保卫细胞在紫外光激发下不发出荧光,所以采用了荧光素染色结合蓝光激发的方法,观察到清晰的保卫细胞(图1:C),两者结合能够更清楚地观察气孔结构。

当叶片长度在4 mm左右时,叶片表皮细胞壁呈波浪状。由于气孔保卫细胞在紫外光激发下不显示荧光,气孔呈暗黑色,所以只观察到气孔伴胞、保卫母细胞、保卫细胞和铺垫表皮细胞(epidermal pavement cells, PC),铺垫表皮细胞形状不太规则,以镶嵌的方式紧密排列生长,保卫细胞旁有两个副卫细胞(图1:D)。

当叶片长度5~6 mm,叶片表皮细胞拉长,波浪状更加明显。气孔数量增多,气孔和铺垫表皮细胞等清晰可见(图1:E)。

3 讨论

Laura^[2,3]先后通过光学显微镜和电子显微镜



S: 气孔; SS: 副卫细胞; GMC: 保卫细胞母细胞; IT: 表皮毛原始细胞; T: 表皮毛细胞; M: 拟分生组织; PC: 铺垫表皮细胞。除特别说明外,均为紫外激光下观察图像

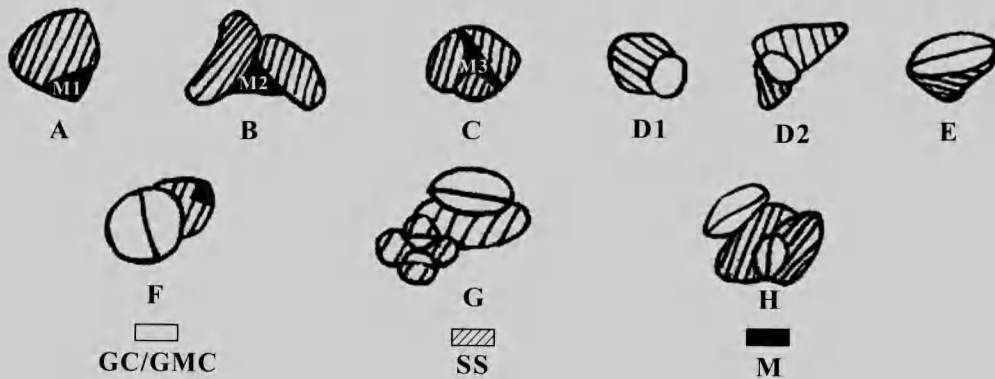
A. 早期叶片表皮细胞, 示拟分生组织、表皮毛原始细胞、副卫细胞、保卫细胞母细胞、气孔; B, C. 叶柄表皮细胞, B 示表皮毛细胞、副卫细胞、气孔, C 为蓝光激光观察图像, 示气孔; D. 叶片表皮细胞气孔, 示保卫细胞母细胞和气孔; E. 叶片表皮细胞, 示铺垫表皮细胞和气孔

S: stomata; SS: subsidiary cell; GMC: guard mother cell; IT: trichomes initial cells; T: trichomes; M: meristemoid; PC: epidermal pavement cells. Except noted, images were observed under UV lasers

A. Young epidermis cells in leaves, showing meristemoid, trichomes initial cells, guard mother cell and stomata; B, C. Epidermis cells in petiole, B showed trichomes, subsidiary cells and stomata, C images observed under blue laser, showing stomata; D. Epidermis cells in leaves, showing guard mother cell and stomata; E. Epidermis cells in leaves, showing epidermal pavement cells and stomata

图1 拟南芥叶表面细胞形态

Fig. 1 The cell morphology of *Arabidopsis* leaves



A~E 为不等细胞的气孔器发生模式图;F~H 为气孔共享副卫细胞的气孔器发生模式图。GC:保卫细胞;GMC:保卫细胞母细胞;SS:副卫细胞;M:拟分生组织(M1、M2、M3 是指发育不同阶段产生的拟分生组织,图中三者均用黑色表示)。

A. 原表皮细胞经过不对称分裂,形成最初的拟分生组织 M1 和副卫细胞;B. 拟分生组织 M1 不对称分裂形成新的副卫细胞和新的拟分生组织 M2;C. 拟分生组织 M2 经过第三次不对称分裂形成一个新的副卫细胞和新的拟分生组织 M3;D1. 拟分生组织分化成保卫细胞母细胞,保卫细胞母细胞一侧有一个副卫细胞;D2. 拟分生组织分化成保卫细胞母细胞,保卫细胞母细胞旁两个副卫细胞;E. 保卫细胞母细胞经过均等分裂形成两个保卫细胞,气孔器形成;F. 已发育完成的气孔器,其副卫细胞进入气孔发生途径,经过不对称分裂产生拟分生组织;G. 拟分生组织进一步分化形成保卫细胞母细胞;H. 保卫细胞母细胞均等分裂形成两个保卫细胞。

A~E was asymmetric stomata generation mode; F~H was stomata generation mode sharing subsidiary cells. GC: guard cell; GMC: guard mother cell; SS: subsidiary cell; M: meristemoid (M1, M2, M3 refer to the meristemoid in different developmental stage. The meristemoid is showed by black).

A. Protodermal cell produced M1 (M, meristemoid) and a subsidiary cell through asymmetric division; B. M1 produced a new subsidiary cell and a new meristemoid M2 through asymmetric division; C. M2 produced a new subsidiary cell and a new meristemoid through asymmetric division; D1. Meristemoid differentiated to be guard mother cells, there was one subsidiary cell besides guard mother cells; D2. Meristemoid differentiated to be guard mother cells, there were two subsidiary cells besides guard mother cells; E. Guard mother cell produced two guard cells through symmetric division, the stomata was differentiated; F. The subsidiary cells of stomata entered to stomata generation path, producing meristemoid through asymmetric division; G. Meristemoid differentiated guard mother cell; H. Guard mother cell produce two guard cells through symmetric division.

图2 气孔发生模式图

Fig. 2 The mode of stomata development

观察拟南芥气孔的发生与发育,发现气孔发生是自上往下的,彼此存在间隔,不同气孔器的副卫细胞间存在最小距离。Geisler^[4]利用电子显微镜观察发现,叶片上大多数气孔是通过毗邻细胞(neighboring cell, NC)经过三次不对称分裂和一次对称分裂产生的。应该指出,利用电子显微镜观察所得到的气孔图像虽然清晰,但观察视野内的气孔数量有限,要获得不同发育过程的图像难度较大。此外,不管是利用电子显微镜还是光学显微镜观察,材料需要预先固定,难以保持细胞原来的形态,所以结果可能存在一些不足。

作者首次通过紫外激光直接在 CLSM 下利用活体叶片进行观察,不但较好地保持细胞原来的形态,而且还可以进行大量的观察,并获得气孔不同发育时期清晰的图像,包括气孔发生发育的详细过程:首先是原表皮细胞不对称分裂产生拟分生组织和一个大的姐妹细胞,随后分化形成保卫细胞母细胞,保卫母细胞发育形成保卫细胞,最后气孔器发育完成(图2)。

值得一提的是,利用 CLSM 观察,气孔分化完成时,保卫细胞在紫外光激发下不产生荧光,采用荧光

素染色与蓝色激光配合,能清楚地观测到保卫细胞发出明亮的荧光。通过这两种方法配合,能很好地对气孔进行直观的观察。此外,一些发育早期的细胞,由于细胞很小,在紫外激光下也不产生荧光,其形态不甚清晰,难以判断其属性,配合蓝色激光激发就可以进行观察和判断。本实验结果表明,紫外和蓝色两种激光的配合是研究拟南芥叶表皮细胞形态发育理想又简便的方法。

致谢:本文的大部分工作是作者于2004年在丹麦皇家农业与兽医大学植物生物系完成的,期间得到该系的 Alexander Schulz 教授的指导以及 Helle Martens 和 Hansen Michael 博士的协助。在此一并表示感谢。

参考文献:

- [1] 郑玉龙,姜春玲,冯玉龙.植物的气孔发生[J].植物生理学通讯,2005,41(6):847-850.
- [2] Serna L, Fenoll C. Stomatal development and patterning in *Arabidopsis* leaves[J]. *Physiology Planta*, 2000, 109:351-358.
- [3] Serna L, Fenoll C. Stomatal development in *Arabidopsis*: how to make a functional pattern[J]. *Trends Plant Sci*, 2000, 5(11):458-460.
- [4] Geisler M, Nadeau J A, Sack F D. Oriented asymmetric divisions that generate the stomatal spacing pattern in *Arabidopsis* are disrupted by the too many mouths mutation[J]. *Plant Cell*, 2000, 12(11):2075-2086.