

棉花纤维细胞起始及温度、植物生长物质对其影响^①

杨佑明^② 贾君镇² 徐楚年¹ 李海燕³ 郭玉海¹

(1 中国农业大学植物科技学院; 2 中国农业大学基础科技学院; 3 天津市种子公司)

摘 要 利用扫描电镜研究了陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.)品种中棉所 12 号胚珠表面纤维细胞起始的过程。观察到最早在开花前 5 d 纤维细胞即已起始,比前人报道早 5 d;也注意到起始的纤维细胞相对集中分布于胚珠的珠柄附近等部位,并且在开花前未见伸长。温度对纤维细胞起始的时间和数目有明显的影响,25~30℃是纤维细胞起始的适宜温度;开花前 6 d 的胚珠只在添加 NAA 5 μmol·L⁻¹和 GA₃ 5.7 μmol·L⁻¹的培养基中形成了纤维,表明棉纤维原始细胞的起始和进一步发育需要适当的激素条件。还讨论了通过调节纤维细胞分化、起始来增加纤维数目和提高纤维长度整齐度的潜力。

关键词 棉花纤维细胞;起始;温度;植物生长物质;器官培养

分类号 S562.01; Q942.4

Initiation of Cotton Fiber Cells and the Effects of Temperature and Plant Growth Substances on It

Yang Youming¹ Jia Junzhen² Xu Chunian¹ Li Haiyan³ Guo Yuhai¹

(1 College of Plant Science & Technology, CAU

2 College of Basic Sciences & Technology, CAU; 3 Tianjin Seed Company)

Abstract The initiation of fiber cells on the cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. Zhongmian-suo-12) ovules was observed with scanning electron microscopy. It had been observed that fiber initiation occurred as early as 5 days preanthesis, 5 days earlier than that predecessors reported. It had also been observed that initiated fiber cells relatively concentrated on some parts of ovule, e. g. the plot near the funiculus and along the long axis of the funiculus, but it had not been observed that initiated fiber cells elongated before anthesis. As for the effects of temperature and plant growth substances on the initiation of cotton fiber cells, the results showed that the time and the number of fiber initials were significantly influenced by temperature. For the initiation of fiber cells, 25~30℃ is the optimum temperature range. Fibers can be formed from 6-days-preanthesis cotton ovules which cultured in the medium contained NAA 5 μmol·L⁻¹ and GA₃ 5.7 μmol·L⁻¹, indicating that the initiation and the further development of prefiber cells demands appropriate phytohormonal condition. It was also discussed to regulate the differentiation and initiation of cotton fiber cells in order to enhance the number of fibers per seed and the degree of fiber lengths consistency.

Key words cotton fiber cell; initiation; temperature; plant growth substance; organ culture

收稿日期: 1997-05-16

①国家自然科学基金(39370426)和国家攀登计划(9219-2)资助项目

②杨佑明,北京圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094

棉花纤维是由胚珠表面的纤维原始细胞经历起始、伸长、次生壁增厚和脱水成熟4个时期发育而成,而纤维原始细胞是由胚珠的单个表皮细胞分化而成^[1]。徐楚年等^[2]根据多年的研究提出:棉纤维分化、发育的过程也是其产量和品质形成的过程,其中,胚珠表皮细胞分化、形成纤维细胞的强度,直接决定着单粒种子上着生的纤维数目,进而影响着衣指、衣分和产量;纤维细胞分化起始的早晚,则影响着纤维长度的整齐度和短绒率。

然而,由于传统上将纤维发育分为伸长、次生壁增厚和脱水成熟3个时期,导致了长期以来忽视对纤维细胞分化、起始期的研究,加之研究技术和手段的限制,在棉纤维细胞分化及起始的认识上存在诸多疑点和空白点。例如,纤维细胞起始的最早时间,诸因素对纤维细胞起始的影响,等等。为此,我们利用扫描电子显微镜对棉纤维细胞在胚珠表面起始的过程进行了观察,并利用花蕾或胚珠离体培养方法研究了温度、植物生长物质等因素对纤维细胞起始的影响。

1 材料与方 法

采用陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.)品种‘中棉所12号’。于1995年4月24日播种于中国农业大学(西校区)科学园区,行距0.7 m,株距0.3 m。常规管理。

开花前花蕾的日龄依据同伸规律确定,开花当天的花则依据花冠的颜色判断,开花后的花铃则采用开花当天挂牌标记的方法。

于8月上旬取开花前21,18,15,12,9,6,5,4,3,2,1 d及开花当天、开花后1,2,3 d的蕾、花或铃,取样时间为每天早晨8:00~8:30,取每日龄的蕾、花、铃各3个,放入冰桶或4℃冰箱内暂存。剥取中部的胚珠,直接在日立S-450扫描电子显微镜下观察、拍照。

花蕾离体培养,盛花期选取相同果枝节位、长势相似的开花前1 d的花蕾,用剪刀于果柄基部剪下,迅速放入盛水的容器内,存入冰筒取回。选用花冠大小和果柄长度相近的花蕾,插入盛有等量培养液的小瓶中。培养液采用Beasley和Ting^[3]的配方。将插有花蕾的培养瓶置于不同温度下培养。培养12,24,48,72 h后取样(取相应的田间花铃为对照),剥取胚珠用FAA固定液固定,石蜡切片后在光学显微镜下观察纤维细胞起始的情况,以纤维细胞在胚珠表面突起作为其起始的标志。

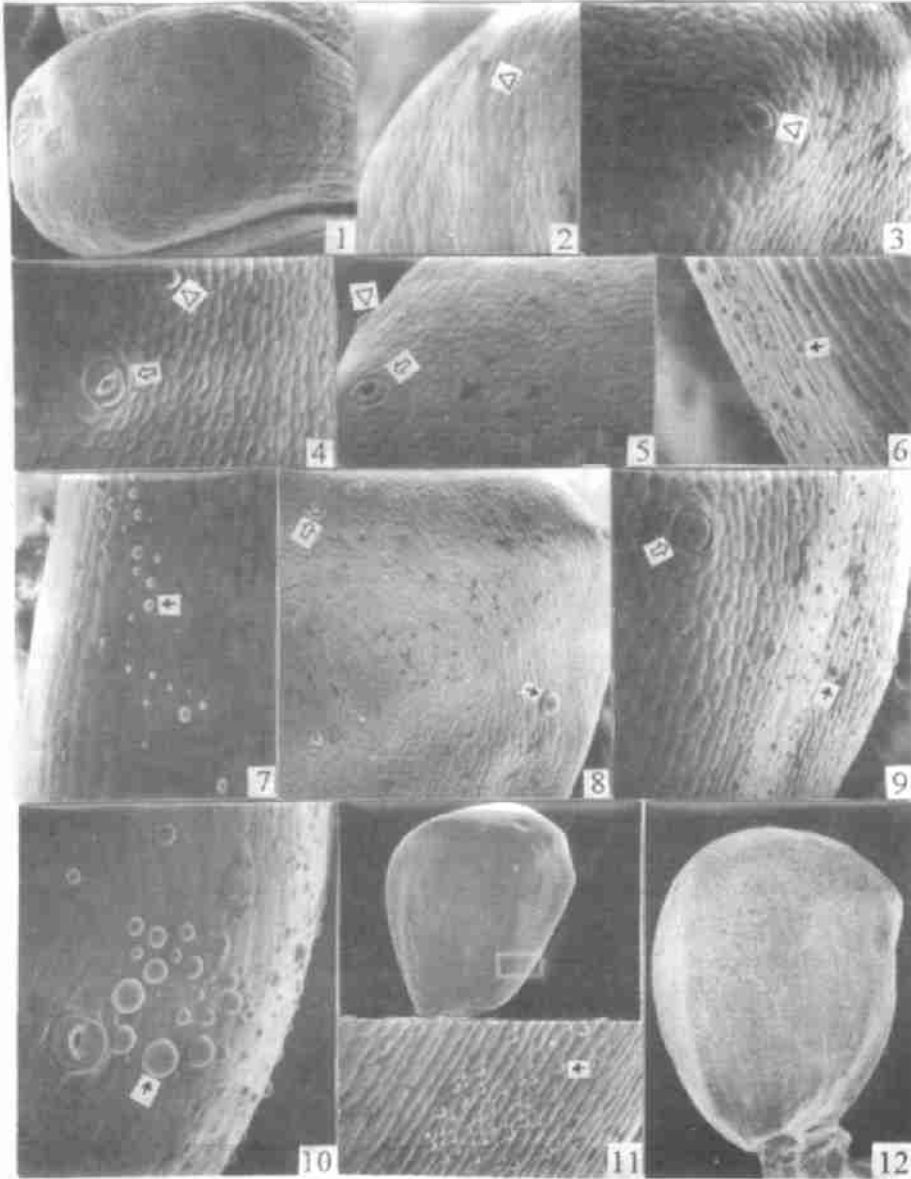
胚珠离体培养,取开花前6 d的花蕾,按Beasley和Ting^[3]的方法剥取胚珠,将胚珠接种到培养基上,在(30±1)℃下暗培养。培养基配方与Beasley和Ting^[3]的配方基本相同,但每升培养基加入6 g琼脂使之固化,并设如下处理:①不加植物生长物质(对照),②加NAA 5 μmol·L⁻¹,③加GA₃ 5.7 μmol·L⁻¹,④加NAA 5 μmol·L⁻¹和GA₃ 5.7 μmol·L⁻¹。定期取样于Olympus体视显微镜下观察胚珠表面纤维发育和愈伤组织发生的情况,并拍照。

2 结果与分析

2.1 胚珠表皮细胞的变化

开花前18 d以前,胚珠表面无明显突起的细胞,胚珠表皮细胞大多近似于矩形,也有近似于圆形的(图版I-1)。至开花前15~12 d,胚珠表面出现明显突起的细胞,但尚难以区分突起细胞的性质(图版I-2)。至开花前9 d,胚珠表面出现由2个细胞构成的气孔,还有的细胞明显突起,但不能判定为气孔细胞(图版I-4)。直到开花前6 d亦未见明显突起的纤维细胞(图版I-5)。到开花前5 d,胚珠表面出现光滑的、半球球形突起的纤维细胞(图版I-6,7)。这说

明: 纤维细胞的起始与开花、受精无直接的联系, 同时也表明: 至少在开花前 5 d 已有纤维细胞发育达到了起始期。



图版 I 棉胚珠及其纤维细胞起始的扫描电子显微镜图像

△示不明性质的突起, →示气孔, 一示起始的纤维细胞

1 开花前 18 d 的胚珠, ×135; 2 开花前 15 d 胚珠的合点端, ×270; 3 开花前 12 d 胚珠的合点端, ×270; 4 开花前 9 d 胚珠的合点端, ×270; 5 开花前 6 d 胚珠的合点端, ×247; 6 开花前 5 d 胚珠的脊突, ×279; 7 开花前 5 d 胚珠的中部, ×270; 8 开花前 4 d 胚珠的中部, ×138; 9 开花前 3 d 胚珠的脊突, ×279; 10 开花前 3 d 胚珠的合点端, ×279; 11 上图为开花前 2 d 的胚珠, ×24, 下图为将图中方框部位放大, ×243; 12 开花当天的胚珠, ×27,

2.2 纤维细胞的起始

从开花前 5 d 开始在胚珠表面出现纤维细胞突起,在开花前 4,3,2,1 d 的胚珠表面均观察到明显突起的纤维细胞,但没有观察到纤维细胞明显伸长(图版 I-6~11)。可见,从开花前 5 d 到开花前 1 d,纤维细胞在胚珠表面明显突起,但没有伸长,因而均处于起始阶段。同时也观察到,从开花前 5 d 到开花前 1 d,胚珠表面虽有纤维细胞突起,但只是零星突起,数量较少,并且相对集中于一些区域,如沿着珠柄附近分布(图版 1-10,1-11)或集中分布在脊突处或胚珠中部(图版 1-6,7,9)。

到开花当天,胚珠表面出现大量的纤维细胞突起,几乎遍布胚珠表面(图版 I-12)。

2.3 温度对纤维细胞起始的影响

温度影响纤维细胞起始的时间(表 1)。开花前 24 h 的花蕾在各温度下处理 12 h,胚珠表面均未见纤维细胞突起。25℃,30℃,35℃各处理至 24 h,胚珠表面出现纤维细胞突起。20℃下处理 48 h,胚珠表面才出现纤维细胞突起。而 15℃下处理 72 h,胚珠表面才出现纤维细胞突起。在 5℃,10℃,40℃条件下,在处理期间未见纤维细胞突起。以上结果表明,温度明显影响纤维细胞起始的时间,最适温度为 25~35℃,低于 25℃或高于 35℃则使纤维细胞起始推迟,甚至完全抑制纤维细胞的起始。

温度还对纤维细胞起始的数目有明显的影响(表 1)。花蕾在 30℃下处理 24 h,其 F/E 值为 22%。而在 35℃条件下处理 24 h,其 F/E 值仅 6%,处理到 48 h 其 F/E 值变化不大。在 25℃下处理 24 h 后,其 F/E 值仅为 9%,但处理 48 h 后增至 20%。在 20℃条件下处理 72 h,其 F/E 值为 15%。在 15℃条件下处理 72 h,其 F/E 值仅为 3%。在 5,10,40℃条件下,在处理期间其 F/E 值均为 0。

综上所述,温度对纤维细胞突起的时间和数目有明显的影响,25~30℃是纤维细胞突起的适宜温度范围,15~35℃是纤维细胞可突起的温度范围。

表 1 温度对纤维细胞起始的时间和数目的影响

$\varphi_{F/E}^*/\%$

处理时间 <i>t/d</i>	处理温度 $\theta/^\circ\text{C}$							
	5	10	15	20	25	30	35	40
12	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	9	22	6	0
48	0	0	0	11	20	23	9	0
72	0	0	3	15	21	—	—	—

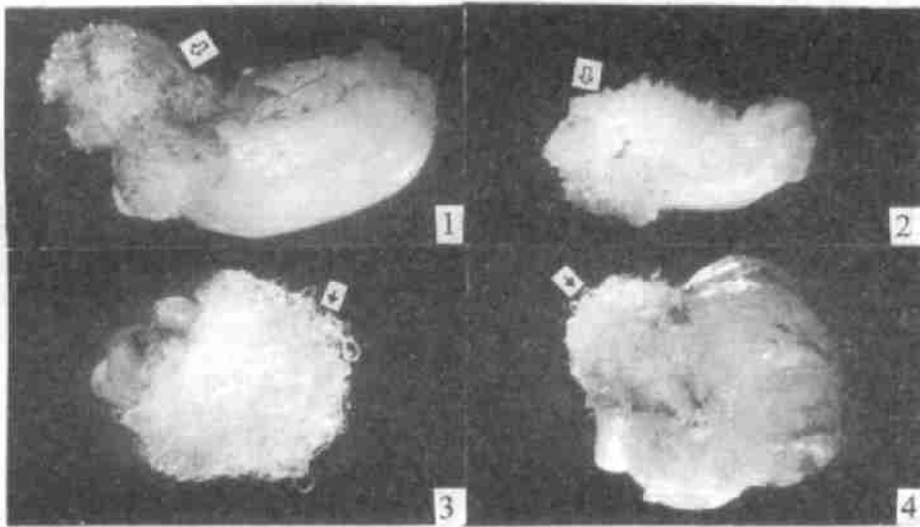
* F/E : 棉花胚珠表面突起的纤维细胞数目与表皮细胞总数目的比值,以%表示。

为了进一步研究温度对纤维细胞突起的作用,将花蕾在 5℃和 40℃的条件下分别处理 72 h 和 24 h,然后转入 30℃下培养。结果表明:处理 72 h 后转入 30℃下培养 24 h,即可见纤维细胞突起;转入 30℃下培养至 48 h,其 $\varphi_{F/E}=20\%$,与 30℃处理的 $\varphi_{F/E}$ 值接近一致。这说明 5℃的低温处理后,转移到合适的温度下培养,即可出现纤维细胞突起。考虑到表 1 所列结果:15℃下仍有纤维细胞突起,而且从 15~25℃随着温度降低,纤维细胞突起时间推迟,数目减少。可以推测:5℃低温延缓纤维细胞起始,但这种作用是可逆的。40℃处理 24 h,然后转入 30℃下培养,未见纤维细胞突起。可见,40℃高温对纤维细胞起始起着破坏性作用,并且是不可

逆的。

2.4 植物生长物质对纤维细胞起始的影响

开花前6d的胚珠在不同植物生长物质条件下培养,对胚珠的发育及纤维和愈伤组织的形成均有明显差异。在不添加植物生长物质的条件下,始终未见胚珠膨大,其表面也未见突起。在添加NAA $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的条件下培养3d,胚珠明显膨大、呈白色,并且在体视显微镜下可观察到56%的胚珠表面出现小突起;以后观察到这些小突起形成为愈伤组织;培养至28d,胚珠表面亦未见形成纤维(图版I-1)。在添加GA₃ $5.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的条件下培养1d有的胚珠表面出现突起,培养3d则87%的胚珠表面出现突起,5d则100%的胚珠表面出现突起,其中有的突起为脱分化的愈伤组织,培养28d则100%的胚珠上形成了愈伤组织,未见形成纤维,但可观察到胚珠膨大,只是膨大程度不如在添加NAA $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的条件下培养的胚珠(图版I-2)。在添加NAA $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和GA₃ $5.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的条件下,培养1d也可观察到有的胚珠表面出现突起,培养3d则100%的胚珠表面均出现明显的突起,培养5d则可判定多数突起为脱分化的愈伤组织,培养28d统计有7%的胚珠形成了纤维(图版I-3),其中有个别的胚珠还在愈伤组织上形成了纤维(图版I-4)。这表明棉纤维细胞在开花前6d已分化,其起始和进一步发育需要适当的激素条件。



图版II 开花前6d的棉胚珠在不同激素条件下
培养28d后发育状况的比较

—示纤维,→示愈伤组织

1 NAA $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\times 3.6$; 2 GA₃ $5.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\times 3.6$; 3 NAA $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +GA₃ $5.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 示胚珠表面形成了纤维, $\times 2.9$; 4 NAA $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +GA₃ $5.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 示纤维在胚珠产生的愈伤组织上形成, $\times 2.9$ 。

3 讨论

3.1 棉纤维原始细胞分化和纤维细胞起始的最早时间

本研究用扫描电镜观察到,最早在开花前15d,胚珠表面出现明显突起的细胞。由于在胚珠发育过程中难以确定突起的细胞究竟是气孔还是纤维细胞,二者分化的最早时间难以准确

判定。鉴于开花前 9 d 可以看出在胚珠表面出现十分明显的、由两个突起细胞所构成的气孔，可以断言，至少在开花前 9 d 气孔已经分化形成。开花前 5 d 则可观察到胚珠表面出现十分明显的纤维细胞突起。这说明，至少在开花前 5 d 纤维细胞已经起始。这一认识不同于前人对棉胚珠表皮细胞分化形成纤维原始细胞以及纤维细胞起始最早时间的看法。

先前,Stewart^[4]和徐楚年等^[5]用扫描电镜观察了纤维细胞起始过程的外部形态变化,提出纤维细胞的起始始于开花当天。从超微结构的变化上看,在开花前 16 h 胚珠表皮细胞已分化形成了预纤维细胞与非预纤维细胞^[6]。Graves 和 Stewart^[7]从胚珠和纤维发育过程中蛋白质组分的变化上进行研究,提出预纤维细胞是在开花前 3 d 开始分化形成的。Beasley^[8],Dugger 和 Sachs^[9]通过离体培养开花前的棉花胚珠得出结论:早在开花前 4 d 已完成了棉纤维细胞的化学分化,即“决定”。

John^[10]报道了在纤维细胞分化过程中确有特异的基因表达。现代生物学知识使我们易于理解,由棉胚珠表皮细胞分化形成纤维细胞过程中,特异的基因表达导致蛋白质组分发生变化,进而使细胞的超微结构发生变化,然后是细胞形态的变化。因此,上述研究者分别从蛋白质组分、超微结构和细胞外部形态上进行研究,观察到纤维细胞分化、起始的时间有差异。

而我们在试验中观察到,最早在开花前 5 d 可从细胞外部形态上识别出明显突起的纤维细胞,即最早在开花前 5 d 纤维细胞即已起始,这比前人报道的时间早 5 d。因而可以推论,至少在开花前 5 d 以前即有部分胚珠表皮细胞在超微结构、蛋白质组分以及基因表达上进行了分化,并形成纤维原始细胞。当然,这一点尚需从超微结构和蛋白质组分的变化、以及基因表达上进行验证。

3.2 是否存在棉纤维细胞起始的时间窗

在试验中观察到,虽然在开花前 5 d 纤维细胞即在胚珠表面明显突起,但直到开花当天并未明显伸长,一直处于起始阶段。而前人认为,在开花时棉胚珠表面某些表皮细胞突起就是纤维细胞起始,一个纤维细胞的起始在 2~3 h 内完成,然后开始伸长,因此,纤维细胞的起始标志了其伸长的开始^[7,11]。

为什么在开花前已起始的纤维细胞不立即伸长,Graves 和 Stewart^[11]的观点有助于说明这一现象。他们根据棉胚珠离体培养研究的结果提出,胚珠表皮细胞分化形成纤维存在一个起始的“时间窗”,即已分化的预纤维细胞进入了一种定时状态,也就是具备了发育形成纤维的能力,但其进一步的发育需要适当的刺激;在整株条件下,这种刺激显然与开花有关。

本试验的结果也证实,确实存在一个纤维细胞起始的“时间窗”,当胚珠表皮细胞分化到一定的程度,即进入纤维细胞起始的“时间窗”,处于此时间窗内的纤维细胞具有进一步发育形成纤维的能力,但又不能立即进行下一步发育,而是处于一种等待状态,即等待适当的刺激。因此,在开花前 5 d 即在胚珠表面明显突起的纤维细胞并不马上伸长,而直到开花后才开始伸长。这也说明,同一胚珠上的不同的纤维细胞起始期的长短不同,短的 2~3 h,长的可达 5 d 或更长。

开花前 6 d 的胚珠在添加 NAA 和 GA₃ 的培养基上诱导产生了纤维,而在不添加激素和仅添加 NAA 或 GA₃ 的培养基上则不形成纤维(图版 I-1~4)。这说明,处于起始“时间窗”的纤维细胞并不是唯有开花才能进一步发育,只要有适当的刺激即可进一步发育,不过在整株条件下这种刺激与开花有关,而在离体培养条件下,则培养基提供的植物生长物质也可完成这种刺激。

3.3 起始的纤维细胞在胚珠表面分布的方式

Stewart^[4]和徐楚年等^[5]观察到纤维细胞起始首先发生在胚珠的脊突处,然后发展到合点,最迟在珠孔处。这些结果表明胚珠上纤维细胞的起始在纵向表现出一定的顺序。至于起始的纤维细胞在胚珠的横向上则呈随机分布^[6,9]。近年,Holt和Stewart^[12]报道,起始的纤维细胞在胚珠表面并不是随机分布的,而是呈脊状、平行的卷纹状、圆形、点状等形式相对集中分布。本试验观察到,起始的纤维细胞相对集中地分布在胚珠表面的一些区域,如沿着珠柄下侧分布(图1-10,1-11)、或集中分布在胚珠表面的某些区域(图1-6,1-7,1-9)。起始的纤维细胞沿着胚珠的珠柄下侧等部位相对集中分布,这说明刺激纤维细胞突起的物质不是胚珠内部产生的,而是来自其他部位,起始的纤维细胞集中分布的部位可能接近刺激物质向胚珠运输的通道或卸载位点。

3.4 纤维细胞分化及起始期的调控及潜力

棉花纤维是由胚珠的单个表皮细胞分化、发育而成,但并不是所有的胚珠表皮细胞均能分化形成纤维。每粒种子上着生的纤维数目取决于纤维细胞分化和起始的情况,并在开花后几天内决定。Berlin^[13]曾报道,陆地棉品种Dunn 56C的种子上纤维数与种子的表皮细胞数之比为1:11,若将此比值提高到1:10,则可提高产量10%。可见,对纤维细胞分化及起始期进行调控,具有较大的增产潜力。

本试验的结果说明,温度不仅影响纤维细胞起始的早晚,而且影响纤维细胞起始的数目。在适宜的植物生长物质条件下,开花前6d的胚珠上有纤维细胞起始并进而发育形成纤维;相对地,植物生长物质条件不适当,则没有纤维形成。这预示着可以通过调节有关因素来调节纤维细胞的起始,增加种子上的纤维数目,进而提高衣指、衣分和产量;同样地,也可通过调控纤维细胞起始的时间来提高纤维长度的整齐度。

试验中还观察到,最早在开花前5d就有纤维细胞起始。这一结果不仅有助于对纤维原始细胞分化形成机理的研究,而且也预示着采用调节因素以调节纤维细胞起始的时间提前、时间范围更大,为人为调节提供了更大的可能。

3.5 综合分析和讨论

①将棉纤维细胞起始阶段作为一个时期是必需的,也是应该的。因为棉纤维细胞起始并不意味着纤维细胞开始伸长,一个棉纤维细胞处于起始阶段的时间可以持续几小时至5d,处于起始状态的纤维细胞,其形态、结构(包括超微结构)、生理生化等方面的变化以及生产意义均不同于伸长期的纤维细胞。

②棉纤维细胞最早在开花前5d即已起始。因此,有部分胚珠表皮细胞至少在开花前5d即已分化形成了纤维原始细胞。

③起始的纤维原始细胞在胚珠表面表现出有相对集中分布的区域,可能是由于该区域接近刺激纤维细胞起始的外来物质的运输通道或卸载位点。

④纤维细胞起始存在‘时间窗’。进入此时间窗的纤维细胞虽具有发育成为纤维的潜力,但必须给予“刺激”才能进入纤维伸长期。

⑤纤维细胞的起始是可以调节的。因为纤维细胞起始期的长短变化较大,从几小时到5d。这就为人为调节纤维细胞起始提供了可能;试验表明,纤维细胞的起始受温度、植物生长物质等因素的明显影响。

参 考 文 献

- 1 Basra A S, Malik C P. Development of cotton fibers. *Int Rev Cytol*, 1984, 98: 65~113
- 2 徐楚年, 柏长青, 贾君镇等. 棉花纤维发育进程与产量、品质形成. 见: 全国第五次作物栽培生理学术讨论会论文集, 1995, 76
- 3 Beasley C P, Ting I P. The effects of plant growth substances on *in vitro* fiber development from fertilized cotton ovules. *Am J Bot*, 1973, 60: 130~139
- 4 Stewart J M. Fiber initiation on the cotton ovule (*Gossypium hirsutum* L.). *Am J Bot*, 1975, 62: 723~730
- 5 徐楚年, 张仪, 余炳生等. 棉花四个栽培种纤维发育早期扫描电镜的比较研究. *北京农业大学学报*, 1987, 13(3): 255~262
- 6 Ramsey J C, Berlin J D. Ultrastructure of early stages of cotton fiber differentiation. *Bot Gaz*, 1976, 137: 11~19
- 7 Graves D A, Stewart J M. Analysis of the protein constituency of developing cotton fibres. *J Exp Bot*, 1988, 39(198): 59~69
- 8 Beasley C A. Culture of cotton ovules. In: Vasil I K ed. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. New York: Academic Press, 1984, (1): 232~239
- 9 Dugger W N, Sachs T. Control of fiber differentiation from cotton ovule epidermis; An *in vitro* study. BARD Research Project No. US697~683
- 10 John M E, Crow L J. Gene expression in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fiber; Cloning of the mRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 5769~5773
- 11 Graves D A, Stewart J M. Chronology of the differentiation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fiber cells. *Planta*, 1988, 175: 254~258
- 12 Holt S J, Stewart J M. A model for cotton fiber initiation. *Proc Beltwide Cotton Conferences*, 1994, 1320~1323
- 13 Berlin J D. The outer epidermis of the cotton seed. In: Mauney J R, Stewart J M eds. *Cotton Physiology*, Memphis: The Cotton Foundation, 1986, 375~413