

蒜瓣在温度调节下解除休眠前后的 细胞化学观察

邵莉楣 殷蔚蕙 李宪章

(中国科学院植物研究所, 北京 100044)

姜成后

(北京农业大学, 北京100094)

摘 要

恒温 30℃ 贮存大蒜可以延长休眠 10 个月, 短时期的放置在 4℃ 下就能解除休眠。蒜瓣外表皮细胞核的变化可以作为判断休眠解除与否的指标。解除休眠后蒜瓣外表皮细胞核显示出酸性磷酸酶、三磷酸腺苷酶与过氧化物酶的活性; 处于休眠状态的表皮细胞中细胞核一直保持休眠期所特有的圆形, 位于细胞中央, 细胞内没有上述三种酶的活性。在 30℃ 中保存一年以上, 细胞也会发生局部解体与细胞内含物的撤离, 细胞内明显地分布着许多蛋白质颗粒, 细胞间有“核穿壁”现象。

关键词 大蒜; 休眠; 同化物的再分配; 温度的生理作用

大蒜在收获以后不久就进入休眠期, 随着秋季气温下降, 逐渐解除休眠。一旦解除休眠, 即便是在没有光、水等生长所必需的外界条件下, 蒜瓣内的幼芽也会生长, 蒜瓣逐步皱缩。这表明供给幼芽生长的营养物质(包括水分)全部来自蒜瓣。经长时间存放的蒜头, 在衰老干缩的蒜瓣内有一个由幼芽膨大而形成的小独瓣蒜^[5,6]。但是, 收获后立即放入 30℃ 恒温箱的蒜头, 则无小独瓣蒜产生, 保持长期休眠, 直到次年 6 月新蒜上市时, 虽然蒜瓣中幼芽略有生长, 蒜瓣仍然鲜脆可食。收获后立刻放入 4℃ 冰箱内的蒜头, 几乎没有休眠期, 很快就开始发芽。本文系统地比较了室温(变化幅度 10—28℃ 之间, 多在 10—20℃)与 30℃ 相对高温条件下贮存的大蒜, 解除或保持休眠时, 幼芽与蒜瓣间这种新老器官交替过程中, 物质消长的关系, 细胞核与细胞化学的变化。

材 料 与 方 法

试验材料为市售紫皮大蒜。选择其中完整、大小均匀、没有病虫害的蒜头, 分为二份, 一份放在室温下保存; 另一份放入 30℃ 恒温箱内保存。每月取样一次。并以 4℃ 贮藏的作比较。

蒜瓣的上、中、下段进入休眠的时间不一致, 上段最早, 中段次之, 下段各细胞进出休眠的时间差异较大。为便于比较, 用于细胞学观察的材料, 均取自蒜瓣中段的表皮组织和表皮附近的薄壁组织。

材料分别制成徒手切片及石蜡切片。石蜡切片的厚度为 10 μm。

细胞核动态观察采用活体荧光染料 DAPI^[3], 及吖啶橙染色^[4,2], 在荧光显微镜下观

察。以 DNase 消化后的材料作为对照。用吡咯啉-甲基绿和浮尔根染色法验证。

酶定位观察采用细胞化学方法,对酸性磷酸酶(APase)^[14],三磷酸腺苷酶(ATPase)^[9],过氧化物酶(POase)^[11]与细胞色素氧化酶^[9]等四种酶活性进行了比较。

试 验 结 果

(一) 形态变化

北京地区多在6月中下旬收获大蒜。这时室温下的鳞茎处在生理上的后熟时期。7月下旬进入休眠期,9月中旬随着夜间温度下降逐渐解除休眠。解除休眠的标志是幼芽开始生长。从蒜瓣的纵切面上可以看到随着幼芽的伸长,蒜瓣的中央逐渐地形成一条孔道。11月上旬幼芽就能够生长到蒜瓣顶部,露出蒜瓣的部份转为绿色。继续将蒜头存放在室温干燥的条件下时,次年1月份开始,芽的基部迅速膨大,最后蒜瓣干缩成包在芽外的一层皮,而芽则膨大形成一个鲜嫩的小独瓣蒜(图版 I, 1左)。

若将收获后的大蒜鳞茎,在蒜瓣鞘干硬后放入30℃恒温箱内,在无光无水供应条件下贮存。次年夏天,芽虽略有生长,但不能形成小独瓣蒜,水分与干重虽然有所下降,但蒜瓣仍保持鲜嫩(图版 I, 2)。

将收获的大蒜,放入4℃冰箱内贮存时,低温促进休眠的解除,大蒜几乎没有休眠期,当年8月下旬就开始发芽。长期存在4℃下的蒜头由于温度低,幼芽生长缓慢,到次年1月也会形成小独瓣蒜。

(二) 干重变化

随着贮存时间的加长,蒜瓣的干重逐渐降低;而芽的干重则逐月增加。室温下贮存的大蒜,这一变化极为明显。次年4月,蒜瓣的干重为收获当年9月份的26%;而30℃恒

表 1 贮存在室温与恒温 30℃下大蒜蒜瓣与芽的干重的变化

Table 1 Changes in dry weight between garlic clove and bud stored at room and 30°C constant temperature

日期 Date	室温(克/14瓣) Room temperature (g/14cloves)			恒温 30℃(克/14瓣) 30°C constant temperature (g/14cloves)		
	蒜瓣 Clove	芽 Bud	芽占% Bud/Clove × 100	蒜瓣 Clove	芽 bud	芽占% Bud/Clove × 100
9月9日 Sept. 9th	20.25	0.09	0.44	14.11	0.04	0.27
10月9日 Oct. 9th	12.20 ¹⁾	0.24	1.90	14.70	0.06	0.40
1月9日 Jan. 9th	11.25	1.12 ²⁾	9.05	14.50	0.20	1.40
3月13日 March 13th	7.90	3.20	40.50	10.20	0.235	2.30
4月10日 Apr. 10th	5.20	5.80	52.70	11.80	0.40	3.39

1) 开始解除休眠

1) Beginning of break dormancy

2) 独瓣蒜开始形成

2) Beginning of formation of bulblet

温下的则为 84%。同期,室温下的芽的干重为解除休眠后的芽的干重的 64 倍;30℃ 下的只是原来芽的 10 倍。从芽在整个蒜瓣中所占的比例来看,室温下的,次年 4 月份芽所占的比例为当年 9 月的 120 倍(干重由 0.44% 增加到 52.7%),30℃ 下的只有 12.5 倍(干重由 0.27% 增到 3.39%)(表 1)。

(三) 含水量

两种温度下存放的大蒜,芽的含水量均较蒜瓣的高。30℃ 中贮存的蒜头含水量比室温下的高,随着存放时间的加长下降少而平稳,一直保持在 64% 左右。室温下的蒜头,芽中含水量下降速度与存放时间呈线性关系;然而蒜瓣含水量在早期相当平稳而后期当独瓣蒜形成后急剧下降。比 30℃ 中贮存的含水量要低 12—15%。

(四) 细胞核的变化

休眠期间及其前后,细胞核经历相当大的变化。休眠前,蒜瓣细胞中细胞核呈椭圆形,在细胞中没有固定的位置。休眠时期细胞核呈圆形,位于细胞中央,但轮廓模糊。用对 DNA 专一的荧光染料 DAPI 染色时,休眠期的核显出均匀的荧光,核仁处呈小圆点无荧光区(图版 I, 3)。解除休眠后,细胞核局部解体,用吡咯啉-甲基绿或吖啶橙染色,可观察到绿色的 DNA 核中释放出大量红色的 RNA,间有细胞核穿壁现象。恒温 30℃ 下贮存的大蒜的细胞核则一直保持圆形。到第二年 5、6 月份才有部份细胞核发生局部解体现象,大部份细胞核的四周有许多油珠状蛋白质颗粒(图版 I, 4),用吡咯啉-甲基绿染色,在绿色核的中央有一个比核仁大得多的红色区;用 DAPI 染色时,在发白色荧光的细胞核中央,有一个无荧光区(图版 I, 4)。这一区域正是 RNA 分布的区域。如将蒜头由 30℃ 移入 4℃ 中,一周后可观察到有大量 RNA 从核中释放出来。在有的切片上可观察到核穿壁现象(图版 I, 5)。

室温下存放的大蒜,在休眠时,其细胞核上没有 APase 的活性(图版 I, 7),解除休眠后才有(图版 I, 6),如将处于休眠的蒜头放在 4℃ 下一周,在细胞核尚未发生位移与局部解体前就能观察到有 APase 的活性定位于核上。30℃ 下贮存的大蒜,除维管束周围细胞外,细胞核上始终没有 APase 活性反应(核仁上除外)。(图版 I, 8 左)。无论是贮存在 4℃ 低温下的,还是室温下的大蒜,当幼芽开始生长时,APase 活性增高,主要定位在细胞核与质膜上(图版 I, 8 右)。

室温下的大蒜解除休眠后,细胞核膜上、细胞核与原生质膜间的原生质连丝上的颗粒上,有棕色的 ATPase 反应。保存在 30℃ 的大蒜除质膜上少数颗粒中有 ATPase 反应外,胞核则无。

当大蒜幼芽开始生长时,在衰老蒜瓣的细胞中除 ATPase 外,还有 POase 定位在细胞核、核仁与细胞壁的纹孔上。保存在 30℃ 下的大蒜一直没有这些酶的活性。只是一年后当细胞核周围出现大量油珠状颗粒时,颗粒上有明显的细胞色素氧化酶活性。

讨 论

高等植物发育过程中,新老器官的交替必然产生衰老器官细胞的内含物向新生器官的再分配。大蒜的无性繁殖过程中,营养上的自给自足已有过不少报道^[1,7,8,10]。如蒜瓣鞘衰老过程中,由肥厚转向坚韧的蒜皮时,蒜瓣鞘中原有的有机物大量向蒜瓣中转移^[9]。又

如在衰老的蒜瓣中可以直接产生出下一代的小独瓣蒜。在无根、叶同化物的参与下,子代蒜瓣的形成尽管很小,却完全来自母蒜瓣细胞内含物的再分配与再利用^[9]。

通过系统地观察室温与恒温 30℃ 贮藏的大蒜,30℃ 可以延长蒜瓣休眠期,从而延缓蒜瓣衰老,抑制发芽。在 30℃ 下保存一年后的蒜瓣内没有小独瓣蒜的形成,芽只占蒜瓣总鲜重的 6%。而低温 4℃ 可以促使大蒜解除休眠,并且形成小独瓣蒜。当独瓣蒜急剧生长时,经测定在母蒜瓣中可溶性糖的含量明显下降,而可溶性蛋白质含量显著上升。在 30℃ 下处于休眠的蒜瓣中可溶性糖与蛋白质含量则始终保持恒定,没有明显的升降趋势。蒜瓣中可溶性蛋白质的含量仅为室温下的 1/4 左右。这说明,独瓣蒜形成时必需依靠母体中营养物质的再利用,蒜瓣中大量的高分子物质需要经过局部解体才能进行再分配。因此比较不同温度下存放的大蒜鳞茎中水分、干重与糖的含量,室温下的蒜瓣解除休眠后,当独瓣蒜形成时,它们的含量都明显地下降。同时,大分子物质的局部降解引起可溶性蛋白质含量升高。此外,在衰老的蒜瓣中还存在着细胞核转移现象。这些结果进一步支持了已经提出的原生质胞间运动是有机物运输的一种方式假说^[7,8],植物体中由衰老器官向幼嫩组织输送的物质不仅限于高度分解的物质,并且包括局部解体的原生质。

已报道了衰老的蒜瓣鞘表皮细胞中,酸性磷酸酶的大量增加与细胞内含物的降解和撤退有关^[4]。同样地在衰老蒜瓣中 APase, ATPase, POase 和细胞色素氧化酶活性的定位观察结果表明,在大蒜新老器官交替过程中,室温下存放的蒜瓣解除休眠后,细胞正处于活跃的生理状态下,因此酶活性高,大多定位于局部解体的细胞核以及核膜与质膜上。而细胞色素氧化酶则定位于局部解体细胞核的周围的油珠状颗粒上。在恒温 30℃ 下保持休眠的蒜瓣除了维管束附近薄壁细胞中有较强的 APase 活性外,其他细胞仍处于静止状态,没有各种酶的活性。只是在保存一年后的蒜瓣细胞核周围的颗粒上有明显的细胞色素氧化酶活性,这意味着休眠期的细胞一直保持着低水平的呼吸作用与最低的物质代谢。Sauter (1966)^[13] 报道休眠的柏树射线薄壁组织细胞中 APase 活性低,出休眠后活性增高,提出 APase 的活性与碳水化合物在细胞间的运输有关,在磷酸化与去磷酸化反应中 ATP/ADP 系统可能起着重要作用。由此看来,贮存的大蒜蒜瓣出休眠后,幼芽开始萌发,独瓣蒜形成时所需要的营养与结构物质,必需来自衰老蒜瓣的供应,这样的自给自足需要靠一些水解酶,如 APase 等酶促使细胞内含物的降解与转移。其中 ATP 是原生质运动的能量来源。酶活性的定位进一步支持了早先提出的“运输的原动力不只是靠着渗透浓度的差别,也可以通过原生质自身的运动向新生组织转移”^[7,8]的假说。从以上几种酶活性的比较说明,酶活性的高低与大蒜的生理状况与代谢活动密切相关。

温度可调节大蒜鳞茎的休眠进程^[2]。通过对两种不同温度下贮存的大蒜蒜瓣细胞核的形态变化以及 APase 等比较观察,利用恒温 30℃ 延长大蒜休眠期,可为大蒜贮存保鲜提供参考根据。

参 考 文 献

- [1] 张伟成、严文梅、陈梓卿、娄成后,1981: 蒜苔中大分子物质的细胞间迁移及其与细胞内含物再分配、再利用的关系。植物学报,23(3): 169—175。
- [2] 张伟成、严文梅,1988: 温度对大蒜鳞茎休眠的影响及其在贮藏保鲜上的应用。植物生理通讯,(1): 25—29。

- [3] 李宪章、邵莉楣、殷蔚蕙、娄成后, 1985: 利用 DAPI 荧光染料对核穿壁在高等植物中分布的初步检查。植物学报, 27(6): 614—617。
- [4] 李宪章、殷蔚蕙、邵莉楣、娄成后, 1986: 蒜薹鞘成熟过程中两类表皮细胞间酶活性的差异。植物学报, 28(2): 175—178。
- [5] 娄成后, 1981: 大蒜植株中细胞内含物由衰退叶片向顶端生长部位的循序转移。北京农业大学学报, 7(2): 1—6。
- [6] 娄成后, 1955: 植物体中原生质的连续性。植物学报, 4: 183—222。
- [7] 娄成后、吴素萱、张伟成、邵莉楣, 1956: 大蒜中原生质的细胞间运动与有机物的运输。植物学报, 5: 345—362。
- [8] 娄成后、邵莉楣、段静霞, 1973: 高等植物衰老叶片中原生质的撤退现象以及原生质运动在有机物运输中可能具有的作用。植物学报, 15: 204—216。
- [9] 郭季芳, 1964: 介绍植物组织中几种酶的定位测定法。植物生理学通讯, (2): 53—56。
- [10] 黄承祥、花宝光、王学臣、娄成后、蔡可, 1982: 贮藏蒜苔中细胞内含物由衰退茎组织向顶端珠蒜的再分配。北京农业大学学报, 8(2): 19—26。
- [11] 蒋大明、谭承项、张瓦利、张黔英, 1982: 肝组织内乙型肝炎表面抗原的免疫组织化学研究 1. 双桥 PAP 法检测 HBsAg 的探讨。北京医学院学报, 14(4): 311—315。
- [12] Kapil, R. N., and S. C. Tiwari, 1978: Plant embryological investigations and fluorescence microscopy: an assessment of integrations. *Internat. Rev. Cytol.*, 53: 291—313.
- [13] Sauter, J. J., 1966: Untersuchungen zur Physiologie der Pappelholzstrahlen. II. Jahresperiodische Änderungen der Phosphataseaktivität in Holzstrahlparenchym und ihre mögliche Bedeutung für den Kohlenhydratstoffwechsel und aktiven Assimilattransport. *Z. Pflanzenphysiol.*, 55: 349—362.
- [14] Vital Staining of Plant Cell, Stadelmann. E. J., and H. Kinzel, 1972, in "Methods in Cell Physiology" (D. M. Prescott eds), Academic Press. New York and London, Vol. 5: 366.

CYTOCHEMICAL OBSERVATION ON GARLIC CLOVE BEFORE AND AFTER TEMPERATURE-MODULATED BREAK OF DORMANCY

Shao Li-mei, Yin Wei-yi and Li Xian-zhang

(*Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing, Beijing 100044*)

Lou Cheng-hou

(*Beijing Agricultural University, 100094*)

Abstract

Usually, garlic clove keeps itself in dormancy during summer months and tends to break their dormancy as the climate becomes cooler toward autumn. Prolonged storage of garlic clove under relatively high temperature is a good measure taken in practice to retain its dormancy and refrain from sprouting. In fact, if garlic is stored around 30°C, its dormancy can be extended to more than six months while its exposure to low temperature (4°C) for a short duration will eventually break its dormancy. The Dormant release can be diagnosed in the upper epidermis by signs of nuclear disintegration and appearance of APase, ATPase and POase activities. The nuclei in dormant epidermal cells keep their characteristic round shape and in the central position of the cells which are devoid of the enzyme activities mentioned. In case the clove is kept in 30°C over a year, partial disintegration of the cells evacuation of the consti-

tuents also take place, as clearly shown by numerous proteinaceous granules suspended in the interior and by "nuclear extrusion" across the intercellular boundary.

Key words Garlic; Dormancy; Redistribution of assimilates; Physiological effect of temperature

图 版 说 明

1. 保存 7 个月的大蒜头。室温下(10—20℃)形成小独瓣蒜的大蒜(左),恒温(30℃)下的蒜瓣(右)。×1 2. 保存 12 个月的大蒜。恒温下的(左),室温下的(右)。上图外形,下图横切面。×1 3. 经 DAPI 染色后大蒜蒜瓣表皮细胞的细胞核。解除休眠后(左)、正在休眠期(右)。×1200 4. 保存在恒温下 16 个月的大蒜蒜瓣表皮细胞的细胞核。经 DAPI 染色后,在紫外光加普通光下观察,细胞核中央有一圆形无荧光区。×480 5. 保存在恒温下 16 个月的大蒜蒜瓣表皮细胞中的核穿壁。×480 6. 解除休眠后的细胞核上有 APase 反应(石蜡切片)。×840 7. 休眠期蒜瓣的胞核无 APase 反应(石蜡切片)。×840 8. 保存 7 个月后的大蒜蒜瓣表皮细胞。恒温下胞核除核仁外无 APase 活性(左),室温下胞核有 APase 反应(右)。×480

Explanation of Plate

Fig. 1 Garlic clove after 7 month storage. Formation of bulblet under room temperature (10—20℃) (left). Under constant temperature (30℃) (right). Fig. 2 Garlic clove stored for 12 months. × 0.9 Under 30℃ (left), Under room temperature (right). Upper: outer appearance, Lower: transverse section. ×1. Fig. 3 Nuclei of garlic epidermal cells, stained with DAPI, after break of dormancy (left), during dormancy (right) ×1200 Fig. 4 Nuclei of garlic epidermal cells after 16 month storage under constant temperature, stained with DAPI. There is a round non-fluorescent area in the center of the nucleus. Photo taken under both UV and normal light. ×480 Fig. 5 "Nuclear extrusion" occurred in epidermal cell of garlic, stored under 30℃ for 16 months. ×480 Fig. 6 APase reaction in the nucleus of non-dormant garlic. Paraffin section. ×840 Fig. 7 No APase activity in the nucleus of dormant garlic. Paraffin section. ×840 Fig. 8 Nucleus of garlic epidermal cells after 7 month storage. Stored under 30℃, no APase activity in the nucleus (except the nucleolus) (left), Stored under room temperature APase activity in the whole nucleus (right). ×480

