

International Tropical Timber Organization (ITTO)

国际热带木材组织

ITTO PROJECT PD 20 / 95 REV. 2(1)

Technical Report (II)
技术报告 (II)

**Biological Studies on Bamboo Culm
Formation**

**---Histo- and Cytological Studies on the Lignification
of Bamboo Culms**

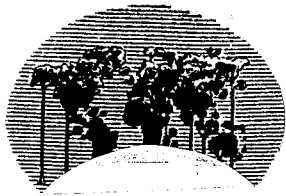
竹材形成的生物学研究

---竹材木质化过程的组织细胞学研究

Institute of Botany,
Chinese Academy of Sciences
Beijing, China

中国科学院植物研究所

1999. 8. 28



International Tropical Timber Organization (ITTO)

国际热带木材组织

ITTO PROJECT PD 20 / 95 REV. 2(1)

Technical Report (II)
技术报告 (II)

**Biological Studies on Bamboo Culm
Formation**

**---Histo- and Cytological Studies on the Lignification
of Bamboo Culms**

竹材形成的生物学研究

---竹材木质化过程的组织细胞学研究

项目主持人 (Project leader):

林金星 Prof. Dr. Lin Jinxing

项目完成人:

胡玉熹(Prof. Hu Yushi) 贺新强(Dr. He Xinqiang)
林月惠(Miss Lin Yuehui) 张莉芝(Miss Zhanglizhi)
魏学智(Mr. Wei Xuezhi)

Institute of Botany,
Chinese Academy of Sciences
Beijing, China

中国科学院植物研究所

1999. 8. 28

②
17

目 录

中文摘要	2
英文摘要	4
一 前言	7
1 竹类植物茎的解剖学研究概况	7
2 细胞壁木质化的研究进展	10
3 本文研究目的	22
二 毛竹茎木质化及其木质素异质性的组织化学研究	23
1 材料和方法	23
2 实验结果	25
3 讨论	29
三 毛竹茎细胞壁自发荧光的显微荧光分光光度分析	32
1 材料和方法	33
2 实验结果	33
3 讨论	34
四 毛竹茎纤维、导管细胞壁木质化的超微结构研究	36
1 材料和方法	37
2 观察结果	37
3 讨论	39
五 毛竹茎过氧化物酶的组织、细胞化学定位及其与木质化的关系	42
1 材料和方法	42
2 观察结果	43
3 讨论	44
六 结论	45
参考文献	47
图版说明	56
发表论文目录	60
致谢	61
图版	

摘 要

应用光学显微镜和透射电子显微镜,并结合组织化学和细胞化学方法,研究了毛竹(*Phyllostachys pubescens* Mazel)茎各组织中细胞壁的木质化过程、木质素异质性、酚酸类成分的分布、木质素在细胞壁中的沉积方式以及过氧化物酶的组织、细胞化学定位等。

研究表明:毛竹茎的原生木质部导管在维管束发育早期就已木质化;后生木质部导管和纤维细胞在维管束分化完成后,自胞间层和细胞角隅处开始木质化;基本薄壁组织细胞木质化的发生较晚,通常在茎的节间完成伸长生长后才开始,但也有少数薄壁组织细胞始终保持非木质化的薄壁状态。根据可见光显微分光光度的分析结果,纤维细胞壁在木质化的早期,主要形成愈创木基木质素(guaiacyl lignin),随着木质化过程的发展,紫丁香基木质素(syringyl lignin)含量不断增加,最后成为纤维细胞壁木质素的主要组成成分。导管分子的木质素主要成分为愈创木基木质素,基本薄壁组织细胞壁为愈创木基与紫丁香基两种。

毛竹茎各组织在紫外光激发下自发荧光的荧光显微分光光度分析表明,氨水处理可以有效地识别阿魏酸的分布,如在竹笋各种幼嫩组织中均分布有阿魏酸;而用过氧化氢/冰醋酸混合液处理,则可以区分木质素与结合于半纤维素中的阿魏酸和对-香豆酸,随着毛竹茎的生长和细胞壁木质化的增加,阿魏酸的含量下降。

通过对毛竹茎纤维细胞壁木质化过程中超微结构的观察表明,高尔基体、高尔基小泡、内质网、壁旁体等细胞器在木质素前体的形成和运输等方面均起着重要作用,而周质微管在细胞壁木质化过程中的具体作用方式尚不明确。木质素在细胞壁中的沉积方式分别为:胞间层的木质素呈分散的颗粒状沉积方式,导管次生壁的木质素为片层状沉积方式,而在纤维细胞次生壁 S1 层中,木质素为团块状的沉积方式。木质素沉积方式与纤维素微纤丝的排列有密切关系。

在毛竹茎各组织的细胞壁尚未木质化之前,过氧化物酶仅分布于细胞角隅处,随着细胞次生壁的增厚和木质化的增强,过氧化物酶可大量出现在次生壁中;在纤维细胞次生壁中,木质素含量较高的 St

各层，过氧化物酶活性也较强，而木质素含量较低的 S1 各层，过氧化物酶活性则较弱。由此表明，过氧化物酶直接参与了细胞壁木质素的合成。另外，在茎的部分基本薄壁组织细胞和韧皮部等未木质化的细胞壁中，过氧化物酶也同样表现出较强的活性，这说明在茎的不同组织中分布的这种酶，可能是几种不同功能的同工酶形式。

关键词：木质化过程 木质素异质性 木质素沉积方式 过氧化物酶定位 毛竹

Histo- and Cytological Studies on the Lignification of Bamboo Stems (*Phyllostachys pubescens* Mazel)

Abstract

The lignification of bamboo stem (*Phyllostachys pubescens* Mazel) were studied by means of light microscope and Transmission electron microscope (TEM) coupled with histochemical and cytochemical methods. The main results were as follows:

The protoxylem vessels initiated lignification in the early stage of vascular bundle differentiation, whereas metaxylem vessels and fiber walls started lignification from the middle lamella and cell corners after completion of vascular bundle differentiation. The walls of most parenchyma cells lignified after the stem reached its full height, while a few parenchyma cells remained non-lignified even the culm is 7 years old. The secondary wall of fibers and parenchyma cells thickened further during the stem growth and formed polylamellate structure. The fiber walls were rich in guaiacyl lignin in the early stage of lignification, in contrast to some lignin rich in syringyl units deposited in the later stage. The vessel walls mainly contained guaiacyl lignin, unlike in the walls of parenchyma cells where both guaiacyl and syringyl lignin were present.

All tissues of bamboo culm showed blue autofluorescence under ultraviolet irradiation. With the treatment of ammonia, the tissues increased their fluorescence intensity, among which those rich in ferulic acid changed their color into green, the peak of fluorescence emission spectra shifted from 470 nm to 510 nm. Nevertheless, the fluorescence intensity of all tissues decreased dramatically after the treatment of NaOH. With H₂O₂/HAC treatment, the lignified tissues remained strong blue autofluorescence, while the fluorescence from unligified tissues

disappeared. The results indicated that protoxylem vessels had already showed lignification before phloem and metaxylem formed in the tissues; ferulic acid was widely distributed in the young tissues of bamboo shoot, the content of which decreased with the progress of the lignification. It was further confirmed that H_2O_2/HAC treatment was an effective method to discriminate phenolic acids bounded to hemicelluloses from phenolics existed in the lignin molecule.

The number of the organelles, such as Golgi bodies together with small vesicles, rough endoplasmic reticulum and lysosomes, increased during the rapid thickening and lignification stages of the secondary walls, indicating that the organelles played the key role in synthesizing and storing lignin precursors and transporting them to the walls. Cortical microtubules were abundantly and orderly localized at the plasmalemma even in the late stages of fiber development. Although their role in formation and deposition of cellulose microfibrils had been proposed, they may also performed a function in the lignification.

Lignin deposition occurred at numerous discrete sites within various cell wall regions, and the carbohydrate matrix would affect the style of lignin deposition. In the middle lamella region, lignin deposition occurred by addition of protolignin monomers to spherical particles of lignin, and lignification was completed by expansion of these spherical particles. In the secondary wall of vessels, lignification occurred by deposition of protolignin monomers to the ends of expanding lignin lamella between cellulose microfibril leading to greatly elongated patches of lignin due to the greater rate of deposition along the microfibril axis compared to that across it. While in the S1 layer of fiber wall, lignin deposition occurred by addition of protolignin monomers to several discrete sites and formed some lignin lumps.

The peroxidase activity changed with the progress of lignification in a bamboo shoot. It was localized at the corner of cell wall before lignification, and then appeared in the secondary wall with the thickening and lignification of secondary wall. The peroxidase signals appeared strong in the cell walls of the annular vessels of protoxylem where lignification was almost completed, and in the cell walls of the metaxylem vessels and the fibers where active lignification occurred. The

results indicated that the peroxidase had participated in the lignin biosynthesis. However, the peroxidase activity was also localized in the phloem and parenchyma cells which still remained non-lignified state. It was therefore suggested that there were several peroxidase isoenzymes with different functions in the different tissues of bamboo culms.

Key words Lignification, Lignin heterogeneity, lignin deposition, Peroxidase localization, *Phyllostachys pubescens* Mazel

一 引言

竹类植物属于禾本科(Gramineae)竹亚科,全世界约有70余属1000种左右,分布于热带、亚热带及一些温带地区。我国是竹类植物最丰富的国家,约有37属500余种,种类之多、分布范围之广、竹林面积之大都居世界首位。同时,我国也是种植、利用竹子最早的国家,竹子广泛应用于建筑业、家具制造业、造纸工业、手工艺品制造及食品工业等。目前,竹产业在我国南方竹产区经济建设中起着十分重要的作用。由于对竹类植物资源利用的认识提高,近年,国内外对竹类植物研究给予了高度重视,从1980年至今,已召开了七届国际竹子学术研讨会,其中有三届是在中国召开的。竹类研究领域十分广泛,包括分类学、形态解剖学、生理学、生态学、栽培学、加工制造等。国内在竹子研究方面也有一定规模,在分类学方面,已经完成了《中国植物志》禾本科竹亚科的编研工作(耿伯介等,1996);形态解剖学方面,主要有李正理等(1960,1962)、熊文愈等(1980)、温太辉等(1984)、丁雨龙等(1993,1995)魏学智等(1998)等;遗传育种方面主要有张光楚等(1998)等;生态学、栽培学方面主要有肖江华等(1994)等;加工制造方面主要有张齐生等(1995)。从整体上来看,我国竹类研究的一些方面处于世界先进行列,但一些基础研究,如解剖学、生理学等则做得不够。木质化是一些特化植物细胞如纤维、导管、管胞等细胞分化的一个重要阶段,对于提高植物机械强度、输导能力和抗病性等方面起着重要作用。同时,木质化又直接影响到竹类植物的利用,对食用竹而言,木质化程度高会影响竹笋的口感,降低其经济价值;对造纸用竹材而言,木质化程度高会增加去除木质素的难度,提高纸浆成本并造成更大的环境污染;而对于建筑用竹材而言,木质化程度高可增加竹材强度。因此,对竹类植物细胞壁木质化的研究在理论上有助于加强我们对植物细胞分化的认识,在实践中有助于我们更好地利用竹类植物资源。本节简要回顾竹类植物茎的解剖学以及细胞壁木质化的研究概况,并简要说明本项研究的目的。

1 竹类植物茎的解剖学研究概况

竹类植物茎的解剖学研究相对于裸子植物和木本双子叶植物来说起步较晚,虽然在本世纪初,有些学者对一些竹类植物进行了一些解剖

学观察,但对竹类植物茎的解剖结构进行详细描述、研究则到了六十年代,比较有影响的工作有李正理等(1960,1962)、Grosser和Liese(1971)、Parameswaran和Liese(1975,1976,1977,1978,1980)等。根据研究内容可将竹材解剖学研究分为以下几个方面:

1.1 竹类植物解剖与分类、系统演化

这部分研究的内容主要集中在维管束类型的划分及其在分类鉴定、系统演化研究中的应用。李正理等(1960,1962)研究了我国产25种竹材的解剖结构,编制出第一个基于解剖学特征进行分类鉴定的分种检索表。Grosser和Liese(1971)研究了亚洲14属52种竹茎的解剖结构,论述了维管束结构在同一竹茎不同高度以及同种不同个体间的差异性,并进一步探讨了维管束类型的分类意义。温太辉等(1984)观察了中国产28属100种竹子的维管束类型,将维管束划分为五种类型,认为它们的演化顺序为双断腰型→断腰型→紧腰型→开放型→半开放型,并依据解剖特征列出了分属检索表。这部分研究的详细评述可参阅魏学智等的综述(1997)。

1.2 竹类植物茎的解剖结构及其细胞壁超微结构研究

在竹类植物茎的解剖结构研究方面,Liese实验室作出了最为突出的贡献。他们从六十年代起,利用多种研究手段,包括透射电镜、扫描电镜、X-射线衍射分析、紫外显微分光光度分析等,对竹纤维细胞壁超微结构进行了深入研究,提出了一个竹纤维细胞壁结构模型(图1.1)。此外,他们还还对导管和基本薄壁组织细胞的细胞壁结构、受伤和年龄老化引起的竹茎的解剖结构变化进行了研究,发表了一系列研究论文(Parameswaran & Liese, 1975, 1976, 1977, 1978, 1980; Liese & Weiner, 1997)。

除了这个研究组外,熊文愈(1980)对毛竹茎的解剖结构、茎居间分生组织进行了研究;Tomoyuki Fujii(1985)利用偏光显微镜和透射电子显微镜研究了Azumanesasa属竹茎纤维细胞壁超微结构,显示了细胞壁的多层结构。Murph和Alvin(1988、1992、1997)研究了竹茎中纤维、基本薄壁细胞大小、壁厚、细胞壁分层的层数等在不同生长时期、茎中的不同位置的变化。腰希申(1993)利用扫描电镜观察了我国产33属

71 种竹材的显微结构；丁雨龙等（1993，1997）研究了竹地下茎、竹节部的解剖结构特征。

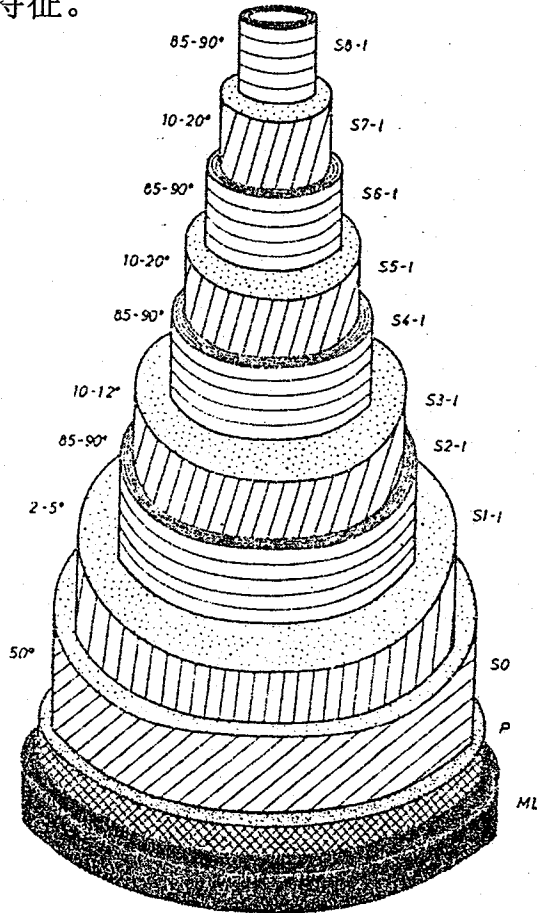


图 1.1 竹纤维细胞壁结构模型 (Parameswaeen & Liese, 1976)

1.3 竹类植物茎的木质化研究

Takayoshi Higuchi(1957)用生物化学方法和组织化学方法 (Maule 反应) 研究了竹笋生长发育过程中的木质素形成, 指出过氧化物酶参与了木质化过程。Yoshizawa 等(1991)应用荧光法研究了过氧化物酶的组织化学定位, 显示出过氧化物酶反应部位与木质素的定位相吻合。Takao Itoh (1990)利用 Wiesner 反应研究了毛竹生长过程中细胞壁木质化过程, 获得一些基本结论: 木质化顺序对于整个植株由基部到顶部; 在一个节间内, 由节上部到节下部; 在横切面上, 由外侧到内侧; 所有细胞木质化均在第一年内完成。Murph 和 Alvin(1997)在研究竹纤维细胞壁加厚的同时, 利用 Wiesner 反应观察了其木质化的变化。但这些组织化学

研究都没有涉及到木质素异质性的问题。细胞壁在木质化的过程中，木质素在不同组织、不同细胞、细胞不同区域等沉积的数量、组成不同。这个问题在裸子植物和双子叶木本植物中已有报道，单子叶植物包括竹类植物，具有十分独特的木质素组成，但对其木质素异质性的研究很少。同时，竹类植物生长十分迅速，在4-6周内就可完成其伸长生长，熊文愈(1980)研究了竹类植物居间分生组织活动与节间生长，但没有涉及到细胞壁的形成、加厚、木质化等问题。Parameswaran 和 Liese 等(1980)在研究竹纤维细胞壁超微结构时也注意到了发育问题，但并没有在这一方面进一步开展工作。与裸子植物、木本双子叶植物木质部细胞次生壁形成研究相比较，竹类植物茎中各类细胞次生壁形成的研究较少，有不少问题有待于进一步研究解决，如次生壁的形成、木质化过程，纤维细胞壁多层结构中不同层间木质素差异的形成原因，纤维素微纤丝排列与木质素沉积间的关系等。

2 细胞壁木质化过程的细胞生物学研究进展

木质素(lignin)是一类在化学结构上密切相关的、高分子量的酚类多聚体，沉积在一些特化细胞的次生壁上。木质素增强细胞壁的机械强度及不透水性，对于提高植物机械强度、液体输导能力和抗病性等方面起着重要作用。从植物演化的观点来看，木质素与植物登陆并在陆地上繁衍有着密切关系，蕨类植物是最早的能够合成真正的木质素的植物，从蕨类植物到裸子植物，最后到被子植物中的禾本科植物，木质素化学结构的复杂程度依次提高，其中禾本科植物是较为进化的类群，它们的木质素具有非常复杂的组成。由于木质素结构及木质化现象的复杂性，尽管近年对于木质化的研究取得了一些进展，但对于木质化的认识还很不全面。在细胞水平木质素前体的合成和木质素的出现至少是在细胞的两个部分：原生质体和细胞壁，这些分子向细胞壁运输及其运输机理仍然不清楚。在生物化学水平上，木质素合成是一系列的生化反应，从中间代谢，通过莽草酸途径、苯丙酸途径到特异的木质素合成途径，中间涉及到许多酶，大多数酶的遗传调控及作用机理还了解得不尽全面。

细胞壁木质化过程的研究涉及到植物学的许多分支学科，如细胞学、生理学、生物化学、分子生物学等，在过去十年中，发表了一些有关木质化研究的综述，如木质素在植物界中的分布、合成、降解(Lewis &

Yamamoto, 1990), 木质素合成过程中的酶(Dean & Eriksson, 1992), 木质素合成的遗传调控(Sederoff et al. 1994; Baucher et al., 1998), 木质化的生物化学及分子生物学研究(Boudet et al. 1995, 1998; Whetten et al. 1998)等。这些综述大多集中于木质素生物合成的生物化学及分子生物学研究, 而对于细胞学研究介绍得很少。这里重点介绍有关木质化过程的细胞学研究进展, 包括木质素的细胞化学定位、木质素的异质性、木质化过程、木质化有关的酶及细胞壁蛋白的细胞化学定位等。

2.1 木质素的组成及在植物界中的分布

2.1.1 木质素的组成及类型

木质素由三种不同的木质素结构单元, 即香豆醇(*p*-coumaryl alcohol)、松柏醇(coniferyl alcohol)和芥子醇(sinapyl alcohol)(图 1.2), 分别经脱氢多聚化衍生为对羟苯基丙烷单元(*p*-hydroxyphenyl, H)、愈创木基丙烷单元(guaiacyl, G)和紫丁香基丙烷单元(syringyl, S)后, 再以多种连接方式形成多聚体。根据木质素结构单元的不同, 将木质素分为两大类: 第一类为愈创木基木质素类(G 型木质素), 存在于蕨类植物、裸子植物中, 愈创木基丙烷单元的含量约在 80%到 90%。第二类为愈创木基—紫丁香基木质素类(GS 型木质素), 存在于所有的被子植物中。愈创木基丙烷与紫丁香基丙烷之间的比率(G/S)在各类植物中变异较大, 即使在同种中也不相同。单子叶植物木质素虽然属于愈创木基—紫丁香基木质素类, 但含有较多的香豆酸和阿魏酸酯键, 有时被另列为第三类, 称作对羟苯基—愈创木基—紫丁香基木质素类(H-G-S 型木质素)(邬义明, 1991; Faix, 1991; 李雄彪, 吴琦, 1993)。

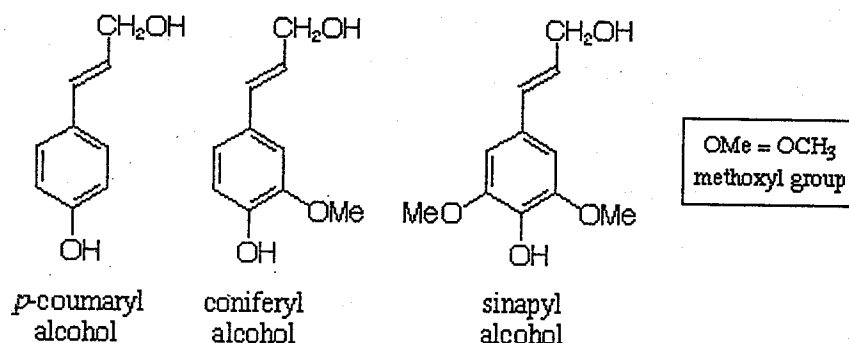


图 1.2 组成木质素的三种结构单元

2.2.2 木质素在植物界中的分布及其功能

木质素的分布仅限于维管植物(蕨类植物、裸子植物和被子植物)。苔藓植物中存在有多酚类物质,具有与木质素类似的功能,但它不是木质素(Wilson et al. 1989)。木质素主要沉积在输导组织(如导管或管胞)、机械组织(如纤维、厚壁组织等)和保护组织(如表皮)细胞次生壁中。木质素具有提高细胞壁强度、增加细胞壁不透水性的功能,同时在细胞的抗病性方面起着重要作用,它是细胞抵抗病原菌的屏障(Baucher, 1998)。最近的研究证实凯氏带中含有大量木质素,而不是过去认为的主要是木栓质,表明木质素在控制离子运输方面起着一定作用(Schreiber, 1996)。此外,在黑暗中生长的玉米胚芽鞘中木质素不仅沉积在次生壁上,也出现在正在伸展的细胞初生壁中。木质素在细胞初生壁上沉积可能具有限制细胞的伸展性、控制细胞伸长的作用(Musel et al. 1997)。

2.3 木质素的异质性

木质素含量和组成在不同分类群、不同个体、不同组织、不同细胞类型及细胞中不同区域均有变化,并且这种变化与发育阶段和环境条件有关。

2.3.1 植物各分类群间的木质素异质性

一般来说,蕨类植物和裸子植物的木质素主要来自于松柏醇的多聚化,为愈创木基型木质素(G型)。双子叶植物木质素由松柏醇和丁香醇多聚化而成,为愈创木基-紫丁香基型木质素(G-S型)。单子叶植物木质素包含有三种单体,为对羟苯基-愈创木基-紫丁香基型木质素(H-G-S型)(Faix, 1991)。表 1.2 列出了不同分类群中木质素单体的比例变化,当然,表中所列数据并不是绝对值。这种比例变化反映出木质素的演化过程,即由愈创木基型向紫丁香基型演化。

2.3.2 不同细胞类型和细胞内不同区域木质素异质性

木质素含量及组成在同一植物体的不同组织及同一组织的不同细胞均有变化。在天门冬(*Asparagus*)中,茎基部木质素含量约为顶部的三倍还高(Hennion et al. 1992)。相同的变化在苜蓿茎中也有报道(Vallet et al. 1996)。

表 1.2 高等植物不同类群的木质素组成

Plant species	H (%)	G (%)	S (%)
Pteridophyta			
<i>Psilotum triquetrum</i>	7	91	2
<i>Lycopodium clavatum</i>	4	94	2
<i>Selaginella martensii</i>	22	34	43
<i>Equisetum sylvaticum</i>	15	75	10
<i>Dryopteris filix-mas</i>	1	98	1
<i>Pteridium aquilinum</i>	11	88	1
Gymnospermae			
<i>Cycas revoluta</i>	2	98	—
<i>Ginkgo biloba</i>	6	93	1
<i>Picea abies</i>	2	98	tr
<i>Metasequoia glyptostroboides</i>	5	94	1
<i>Juniperus communis</i>	3	96	1
<i>Araucaria araucana</i>	3	96	1
<i>Taxus baccata</i>	4	95	1
<i>Pinus sylvestris</i>	2	98	tr
<i>Pinus pinaster</i>	2	98	tr
<i>Pinus pinaster</i> (compression wood)	18	82	tr
<i>Ephedra equisetina</i>	3	66	31
<i>Gnetum gnemon</i>	—	49	51
<i>Podocarpus macrophyllus</i>	9	88	4
Dicotyledonae			
<i>Medicago sativa</i>	—	64	36
<i>Medicago sativa</i>	—	66	34
<i>Acer platanoides</i>	—	42	58
<i>Fagus sylvatica</i>	—	35	65
<i>Populus euramericana</i>	—	39	61
<i>Populus trichocarpa</i>	—	41	59
<i>Populus tremula</i> x <i>P. alba</i>	—	32	68
<i>Populus tremula</i> x <i>P. alba</i>	—	37	63
<i>Betula verucosa</i>	—	24	76
<i>Quercus robur</i>	—	32	68
<i>Cerasium avium</i>	—	23	77
<i>Robinia pseudoacacia</i>	—	37	63
<i>Nothofagus dombey</i>	—	14	86
<i>Laurelia phillipania</i>	—	66	44
<i>Nicotiana tabacum</i>	—	50	50
Monocotyledonae			
<i>Lilium cisitalissimum</i>	—	80	20
<i>Juncus effusus</i>	11	54	35
<i>Eriophorum angustifolium</i>	10	55	35
<i>Triticum aestivum</i>	5	49	46
<i>Zea mays</i>	4	35	61
<i>Oryza sativa</i>	15	45	40
<i>Secalotriticum</i>	3	42	55
<i>Secale cereale</i>	2	44	54

(Baucher M. et al. 1998)

表 1.3 裸子植物、被子植物不同类型木材中木质素的分布

Wood	Morphological region	Species	Cell wall volume (%)	Lignin amount		
				% total	Concentration (g lignin/g cell wall substance)	S/G
Gymnosperms						
<i>Earlywood</i>						
Tracheid						
	S1 ^b	LP	13	12	0.25	—
	S2 ^b	LP	60	44	0.20	—
	S3 ^b	LP	9	9	0.28	—
	ML ^a	BS	9	16	0.50	—
	"	DF	10	18	0.56	—
	"	LP	12	21	0.49	—
	MLcc ^a	BS	4	12	0.85	—
	"	DF	4	11	0.83	—
	"	LP	6	14	0.64	—
	Ray parenchyma					
	SW ^a	DF	8	10	0.40	—
	Ray tracheid					
	SW ^a	DF	4	3	0.28	—
<i>Latewood</i>						
Tracheid						
	S1 ^b	LP	6	6	0.23	—
	S2 ^b	LP	80	63	0.18	—
	S3 ^b	LP	5	6	0.25	—
	ML ^a	BS	4	10	0.60	—
	"	DF	4	10	0.60	—
	"	LP	6	14	0.51	—
	MLcc ^a	BS	2	8	1.00	—
	"	DF	2	6	0.90	—
	"	LP	3	11	0.78	—
	Ray parenchyma					
	SW ^a	DF	3	4	—	—
	Ray tracheid					
	SW ^a	DF	1	2	—	—
Angiosperms (White Birch)						
Fiber						
	S1 ^c		11.4	—	0.14	—
	S2 ^c		58.5	—	0.14	88/12 ^b
	S3 ^c		3.5	—	0.12	—
	Fiber					
	ML ^c	WB	5.2	—	0.34	—
	MLcc ^(F/F) ^c	WB	2.4	—	0.45	9/91 ^b
Vessel						
	S1 ^c	WB	1.6	—	0.26	—
	S2 ^c	WB	4.3	—	0.26	12/88 ^b
	S3 ^c	WB	2.3	—	0.27	—
	ML ^c	WB	0.8	—	0.40	—
	MLcc ^(F/V) ^c	WB	<1	—	0.58	20/80 ^b
Ray parenchyma						
	SW ^c	WB	8.0	—	0.12	51/49 ^b
	ML ^c	WB	2.0	—	0.38	—
	MLcc ^(F/R) ^c	WB	<1	—	0.47	0/100 ^b
	MLcc ^(R/R) ^c	WB	<1	—	0.41	12/88 ^b

注: a: 紫外光显微镜法; b: 溴化 SEM-EDXA 法; c: 紫外光显微镜结合溴化 SEM-EDXA 法. MLcc: 胞间层; F/F: 纤维/纤维; F/V: 纤维/导管; F/R: 纤维/射线; R/R: 射线/射线; BS: 黑云杉; DF: 道格拉斯

以及包括木质素、肉桂酸在内的酚类物质在植物组织中的三维空间分布(Hutzle et al. 1998), 是研究酚类物质代谢十分有用的工具。

在细胞水平上, 用于木质素染色进行电镜观察的方法主要是高锰酸钾法(Hepler 1970; Kutscha and Schwarzmann 1975)。最近, Fineran(1997)对氯水/乙醇胺/硝酸银法进行了改进, 将其应用于双子叶植物木质素的组织化学和细胞化学研究, 结果显示这一方法十分有效。在细胞水平进行木质素分布定量分析的方法主要有紫外光显微分光光度法、溴化扫描电镜 X 射线微分析(Saka et al. 1982)及汞化扫描电镜 X 射线微分析(Eriksson et al. 1988)等。免疫细胞化学电镜技术已用于木质素在细胞中的定位研究, 利用一定木质素或木质素前体作为抗体探针, 显示特异木质素抗原在细胞壁中的分布(Kim and Koh 1997)。免疫细胞化学电镜技术更为广泛地用于与木质化有关的酶或蛋白质的细胞定位(Nakashima et al., 1997; Smith et al 1994; Ryser et al 1997)。快速冷冻、深度蚀刻电镜技术(rapid-freezing and deep-etching electron microscopic techniques)可以观察到初生壁立体结构(Satiat-Jeunemaitre et al. 1992; Itoh and Ogawa 1993), 同时, 还能直接观察到木质素在细胞壁上的沉积过程(Nakashima et al. 1997; Fujino and Itoh 1998)。

2.4.2 木质素在细胞壁上的沉积过程

木质化细胞的分化一般分为四个阶段: 细胞分裂、细胞扩展、细胞壁加厚和细胞壁木质化。按照 Freudenberg(1968)的观点, 木质素前体在形成层区域形成, 然后运输到分化的木质部后聚合。然而, Wardrop(1957,1976)等认为木质素前体在分化的细胞内形成。目前, 多数学者支持后一种观点。

木质素沉积通常发生在细胞初生壁生长完成、细胞壁进行次生加厚的时候。Wardrop(1957,1976)等利用紫外光显微镜、偏光显微镜和透射电镜研究了辐射松木质部的木质化过程, 结果表明木质化过程开始于管胞次生壁形成之初, 木质素最早沉积在细胞角隅处及中层, 首先沿着切向壁方向, 然后沿着径向壁方向扩展。Kutscha 和 Schwarzmann(1975)利用透射电镜研究了冷杉(*Abies balsamea*)木质部的木质化过程, 他们发现木质化最早发生在两个管胞之间纹孔的中层, 随后发生在初生纹孔场, 同时发生在距形成层较远的管胞角隅处, 随着木质化在细胞角隅处

扩展，木质素也出现在 S_1 层的外部，而这时中层和 S_1 层的外部之间的初生壁没有木质化，只有当细胞角隅处的 S_1 层完全木质化后木质化过程才沿着管胞壁扩展。在细胞壁中，距形成层较远的管胞切向壁首先木质化，其次是两个径向壁，最后是接近形成层的切向壁木质化。接近于射线薄壁细胞的管胞靠近薄壁细胞的径向壁最先木质化，距形成层最远的切向壁次之，然后是另一个径向壁，距形成层最近的切向壁最后木质化。Terashima 等(1988)利用显微放射自显影技术研究黑松(*Pinus thunbergii*)管胞木质化过程，将其分为三个阶段：第一阶段，当 S_1 层开始形成时，木质素在细胞初生壁角隅处及中层沉积；第二阶段，伴随纤维素微纤丝、多糖等在 S_2 层的沉积，木质素在细胞次生壁上缓慢沉积；第三阶段，当纤维素微纤丝在 S_3 层开始积累后，木质素迅速在整个次生壁上的沉积，这是最主要的木质化过程。木质素单体成分受空间和时间两方面因素的影响，在松树中，香豆醇在细胞壁木质化早期首先出现在细胞角隅处和中层，然后是松柏醇，先在细胞角隅处和中层出现，后扩展到次生壁中；最后芥子醇在木质化的最后阶段沉积。S 单元是裸子植物木质素很少的成分，出现在次生壁的 S_3 层。细胞中层和细胞角隅处与次生壁相比，含有较多的 H 单元组分，次生壁主要是 G 单元组分(Terashima and Fukushima,1988)。松树应压木的木质素在管胞细胞壁中的沉积顺序与正常木相同，但木质化式样不同：在正常木中，H 单元组分主要沉积在中层，而在应压木中，H 单元组分也沉积在次生壁中，另外，H 单元组分和 G 单元组分在应压木中沉积的时间要比正常木中长(Fukushima and Terashima 1991)。

Vallet et al.(1996)研究了草本双子叶植物苜蓿(*Medicago sativa*)茎韧皮部纤维木质化，发现其过程与木本植物木质化过程不同，其木质化始于次生壁的外侧，而不是初生壁，由外侧向内扩展到细胞腔一侧的次生壁内层，同时向外扩展到初生壁。但是，Engels and Jung(1998)的观察不支持这一结论，他们认为苜蓿茎韧皮部纤维木质化可分为三步，第一步是初生壁加厚；第二步，初生壁靠近细胞腔的一侧有一薄层发生木质化；第三步，加厚的次生壁木质化。因此，木质化始于初生壁靠近细胞腔的一侧类似环状结构的薄层，而不是次生壁，与木本植物木质化过程没有本质的不同。

木质素长期以来一直被认为是随机沉积的多聚体，但最近的研究显示木质素单体在多聚体中有规则地组织在一起，通过拉曼显微探针分光术研究发现木质素的芳香环沿着细胞表面定向排列(Atalle & Agarwal 1985; Agarwal & Atalle 1986)，利用扫描隧道显微镜在由松柏醇合成的多聚体表面也观察到高度有序的结构(Radotic et al. 1994)。

2.4.3 与细胞壁木质化有关的细胞器

参与木质化过程的细胞器主要有高尔基体、内质网等细胞内膜系统。Takabe 等(1985)利用氘标记苯丙氨酸显微放射自显影技术研究日本柳杉(*Cryptomeria japonica*)管胞木质化过程，发现在木质化早期和中期，高尔基体产生许多小泡，被标记的苯丙氨酸出现在高尔基体及高尔基体小泡中，表明苯丙氨酸可以直接渗入到高尔基体中，在这里通过一系列酶促反应形成木质素前体，然后通过高尔基体小泡的胞吐作用分泌到细胞壁中，并进一步多聚化形成木质素。同时，一些不规则膨大的光滑内质网在 S3 层形成时出现，被标记的苯丙氨酸也可以渗入到这些内质网中，通过内质网与质膜的融合将苯丙氨酸的衍生物分泌到细胞壁中。最近，对木质化过程中的几种关键酶，如 PAL(Phenylalanine Ammonia-Lyase)、CAD(Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase)、C4H(Cinnamate 4-Hydroxylase)等的细胞化学定位也说明了这一点(Smith et al. 1994; Nakashima et al. 1997)。Nelmes 等(1973)、Barnett(1977)的研究发现在木质化的细胞中有大量周质微管存在，提出周质微管与细胞壁木质化有密切的关系，但由于其在木质化中的作用不明确，这个观点并没有被广泛接受。

2.4.4 与细胞壁木质化有关其它的的细胞壁组分

木质素的沉积发生在已形成的碳水化合物基质中。通过拉曼显微探针分光术研究发现，木质素的芳香环沿着细胞表面定向排列，这个结果显示出木质素的分子结构顺序可能与多糖物质的定向排列有关(Agarwal & Atalle 1986)。利用 PAL 酶的抑制剂抑制木质化的发生，并不能抑制细胞壁多糖的合成和导管分化(Ingold et al. 1990)。木质化发生在细胞壁分化较晚的时期，木质化受到抑制并不影响到细胞壁分化前期过程。利用抑制剂抑制导管壁纤维素的合成，导管表现出纤维素减少，木质素分散于整个细胞壁中，而在未经处理的导管中，木质素仅分布于加厚的次

生壁中。这个结果说明次生壁加厚过程中纤维素的分布直接或间接地影响着木质素沉积的方式(Taylor et al. 1992)。Donaldson(1994)利用高锰酸钾染色法观察了辐射松管胞木质化细胞壁的超微结构, 结果发现, 在胞间层, 木质素沉积呈现分散的颗粒状, 而在次生壁中, 木质素沉积呈现片层状, 这是由于在胞间层纤维素微纤丝随机排列, 而在次生壁中, 纤维素微纤丝排列呈一定的方向性, 证明纤维素微纤丝的排列影响木质素的沉积方式。

富含甘氨酸蛋白质(GRPs)、富含脯氨酸蛋白质(PRPs)、富含羟基脯氨酸蛋白质(HRGP)是一类细胞壁结构蛋白(Ye et al. 1991)。利用抗大豆 GRP1-8 的抗体, Keller 等(1989)发现 GRP1-8 与维管系统尤其原生木质部导管有密切关系, 同时他们还发现携带 GRP 前体的 GUS 基因在转基因马铃薯中仅在木质化的维管组织中表达, Ye & Varner(1991)得到相同结果, 表明 GRP1-8 与木质化有密切关系。一种可能是 GRP 在细胞壁加厚的早期积累, 可作为木质素沉积和多聚化的框架。然而, Ryser & Keller(1992)的免疫细胞化学结果显示 GRP1-8 主要分布于原生木质部细胞未木质化的初生壁中, 说明 GRP1-8 的积累与木质化可能是两个独立的过程。最近, Ryser 等(1997)利用免疫细胞化学研究了三种细胞壁蛋白在细胞中的定位, 结果表明 GRP 定位在原生木质部细胞的细胞壁上, 而 PRP 出现在木质部导管、韧皮部纤维等木质化的细胞次生壁中以及皮层一些细胞角隅处, 认为 PRP 分布与木质化方式有关。细胞壁结构蛋白在木质化中起着一定作用, 但在木质化过程中何时、以何种方式起作用尚需进一步研究。

2.5 木质素生物合成途径及其一些关键酶的细胞定位

2.5.1 木质素的生物合成途径

木质素生物合成途径可分为三个部分: 第一部分是莽草酸途径(shikimate pathway), 即由葡萄糖经过一系列酶促反应转化为莽草酸, 进一步形成苯丙氨酸、色氨酸等。这一代谢途径在细菌、真菌和植物类群中都存在。第二部分是肉桂酸途径(Phenylpropanoid pathway), 即由苯丙氨酸等经过一系列酶促反应转化为肉桂酸和它们的酯化 CoA 衍生物, 这是植物发育以及植物抵御不良环境反应中许多酚类化合物合成共同的代谢途径。这一代谢途径与木质化有密切关系, 因为它提供了羟基肉

... (faded text) ...

... (faded text) ...

... (faded text) ...

... (faded text) ...

... (faded text) ...

桂酸 CoAs, 而它经过特异的木质素合成途径转化为木质素前体。用化学物质或分子生物学方法抑制或降低 PAL、C₄H 的活性可降低木质化程度(Sewalt et al. 1997)。第三部分是木质素合成的特异途径(lignin branch pathway), 即由羟基肉桂酸 CoAs 经过一系列酶促反应转化为木质素单体, 进而多聚化合成木质素(图 1.3)。这一过程中的关键酶有 CAD、过氧化物酶、漆酶等(Bauchet et al. 1998)。

1.2.5.2 木质素生物合成中的一些关键酶的细胞定位

利用免疫细胞化学电镜技术, Nakashima et al. (1997)研究了百日菊 (*Zinnia elegans*)叶肉细胞分化为管胞的过程中 PAL 和 CAD 的细胞定位, 随着次生壁木质化的开始, PAL 活性迅速升高, 有两种类型的 PAL, 一种分散于细胞质基质中, 另一类则分布于高尔基体、高尔基小泡和加厚的细胞壁次生壁中, 表明 PAL 从高尔基体分泌, 通过高尔基小泡运输到正在木质化的次生壁中。

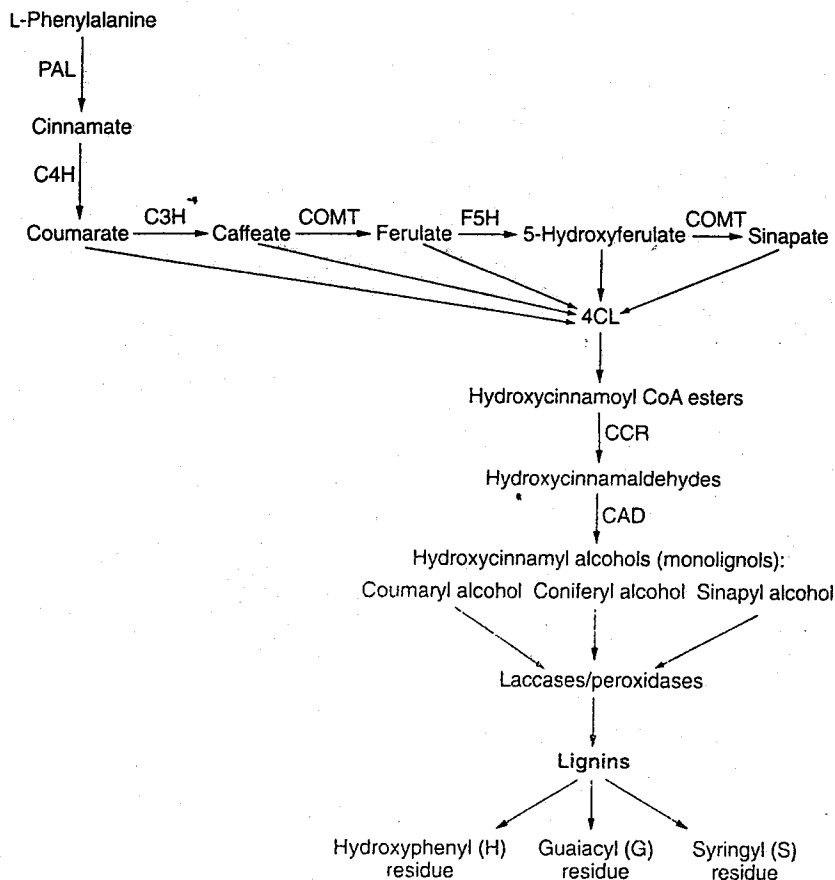


图 1.3 木质素的生物合成途径 (Boudet, 1998)

CAD 在细胞中的定位与 PAL 相似。这个结果与显微放射自显影的实验结果是一致的(Takabe et al.1985)。在菜豆(*Phaseolus vulgaris*)胚轴发育的早期, PAL 分布于原生木质部和原生韧皮部, 随着胚轴发育, PAL 出现在后生木质部及其邻近的木薄壁细胞。另外, PAL 在细胞壁基质中分散分布, 而 C4H 在细胞质中明显定位于内质网、高尔基体等内膜系统上, 这种分布与木质素前体的合成、分泌有密切关系。阳离子过氧化物酶分布在加厚的次生壁和细胞中层, 是木质素多聚化的场所, 木质素前体运输到正在木质化的木质部导管壁上, 由细胞壁上结合的过氧化物酶多聚化合成木质素(Smith et al. 1994)。Northern 杂交实验表明在烟草、苜蓿、杨树等植物茎中, CAD 在茎中尤其正进行活跃木质化的组织(如木质部)中高水平表达(Grima-Pettenat et al. 1993)。过氧化物酶(Peroxidases)过去一直被认为是催化木质素单体多聚化合成木质素的唯一的酶, 但在近几年对于漆酶(Laccases)在木质素单体氧化反应中的作用进行了大量研究和重新评价, 认为漆酶在这个过程中也起着重要作用(Bao et al. 1993; Dean and Eriksson, 1994)。Harkin 和 Obst(1973)通过组织化学观察发现过氧化物酶活性高的组织均是木质化发生的部位。Hepler 等(1972)用电镜研究了鞘蕊花属(*Coleus*)植物过氧化物酶的细胞定位, 发现木质素和过氧化物酶在受伤导管细胞壁中的定位是相同的。Ros Barcelo(1995)认为在羽扇豆属(*Lupinus*)木质部导管次生壁木质化过程中是过氧化物酶起作用。一些研究证明正在木质化的细胞中存在内源过氧化氢(Olson & Varner 1993; Czaninski et al. 1993; Ros Barcelo 1998)。而且, Nose 等(1995)利用火炬松(*Pinus taeda*)细胞悬浮培养证明在培养基中加入过氧化氢清除剂抑制木质化的发生。这些结果均支持过氧化物酶参与木质素单体的氧化过程。漆酶活性在真菌中研究的较多, 并已知其与木质素的生物降解过程有关。在植物中首先在一种漆树(*Rhus vernicifera*)中发现, 以后相继在其他植物中发现(O'Malley et al. 1993)。利用漆酶特异抗体(Drionich et al. 1992)和原位组织杂交方法(Bao et al. 1993)证实在分化的木质部中具有漆酶的分布。Liu 等(1994)的研究发现, 在百日草(*Zinnia elegans*)茎组织中, 一种类似漆酶的酚类氧化酶的细胞学定位与初生木质部导管次生壁木质化在时间和空间上有着极密切的关系。Chabanet et al.(1994)在菜豆中发现一种类似漆酶的酚类氧化酶分布于正在木质化或

已木质化的细胞壁中。目前，对于漆酶和过氧化物酶在木质素单体多聚化中的作用仍不明确。

1.3 本文研究目的

植物细胞壁木质化是研究细胞分化的重要内容之一；同时，木质素作为天然高分子聚合物约占陆地生物量 1/4 强，在碳素循环中起着十分重要的作用。由于木质素广泛存在于植物体中，因此在利用上有时会起负面的影响，例如在造纸工业中，木质素是影响纸张质量的重要因素之一，当去除此种成分时，则不仅需要花费大量人力、物力，而且还会造成周围环境的严重污染。另外，在饲料工业中，木质素是植物饲料可消化性的限制性因素。然而，在木材利用中，木质素则是木材的重要成分，木质素含量高成为有利因素。因此，对植物木质化的深入研究，将有助于选择和培育出更便于人类利用的植物材料来。由于木质素结构的复杂性及其分布上的异质性，从而给研究此种成分带来许多困难。在过去的几十年中，有关裸子植物木质部管胞、木本双子叶植物导管分子的木质化进行了大量研究，积累了丰富资料；但对单子叶植物纤维和导管木质化的研究报道较少。竹类植物作为一种木本单子叶植物，不仅在建筑、造纸和编织等方面具有重要的经济价值，而且由于该类植物生长十分迅速，也是研究植物生长发育较好的材料。近年来，日本学者对竹类植物木质化过程，做了一些植物化学和组织学方面的研究(Itoh, 1990; Yoshizawa, 1991; Fuji, 1993)。德国学者 Liese 等(1980)在研究竹材细胞超微结构时，也涉及到一些木质化的问题，但尚未开展对其木质化过程的深入研究。目前，国内对植物细胞壁木质化的专门研究还未见报道。

本项研究以毛竹为材料，利用多种组织化学、细胞化学方法，对其茎秆中各组织细胞次生壁的形成和木质化过程进行研究，目的在于解决或探讨下列几个问题：

- 1 了解毛竹茎各组织细胞木质化的基本过程。
- 2 利用组织化学方法研究竹茎木质化过程中木质素异质性的问题。
- 3 观察不同化学试剂处理对毛竹茎各组织细胞壁自发荧光的影响，揭示细胞壁中酚酸类成分在木质化过程中的变化。
- 4 利用透射电子显微镜观察毛竹茎各组织细胞次生壁的形成和木质化过程，探讨木质素在次生壁中的沉积方式。

- 5 观察过氧化物酶在竹茎中的组织化学、细胞化学定位, 并探讨其与细胞壁木质化的关系。

二 毛竹茎木质化过程及木质素异质性的组织化学研究

组织化学染色是检测木质素分布的十分简单而有效的方法。Srivastava(1966)利用 Wiesner 反应和 Mäule 反应观察了 22 种裸子植物和 74 种被子植物木质部和韧皮部中木质素的分布, 注意到了这两种反应在不同植物类群中的结果不同, Mäule 反应对被子植物木质素呈正反应, 而对裸子植物为负反应。此后, 这两种反应成为检测木质素分布的最常用的方法。近年, 将 Mäule 反应和 Wiesner 反应与可见光显微分光光度计结合, 不仅可以定性地研究木质素的分布, 而且可以定量地研究木质素的组成(Yoshizawa et al. 1993)。Itoh(1990)利用 Wiesner 反应和紫外光显微镜研究了毛竹茎木质化的基本过程。然而, 毛竹茎中木质素在不同组织中分布的异质性的研究尚未见报道。本文利用多种组织化学方法观察了毛竹茎各组织细胞细胞壁的木质化过程, 并利用显微分光光度分析法研究了木质素在不同组织中的异质性分布。

1 材料和方法

1998 年 4 月, 自南京林业大学竹种园选取株高约为 0.5m、1.0m、2.0m、4m、6m 健康生长的毛竹笋或幼竹, 分别在顶部、中部、基部各选一个节间, 切取 0.5cm^3 小块, 固定于 50%酒精中, 然后保存在 70%酒精中(图 2.1)。1, 3, 5, 7 年龄的毛竹于 1997 年 9 月取自浙江省安吉竹种园, 分别于茎中部选取一个节间, 切取 0.5cm^3 小块, 固定于 70%酒精中。

利用冰冻切片机切取厚度为 $8-20\mu\text{m}$ 的切片。部分切片直接置于偏光显微镜下观察。部分切片经下列化学试剂处理后置于荧光显微镜下用紫外光激发观察细胞壁自发荧光: (1) 0.1N 氨水浸泡 5 分钟后封片观察(Harris & Hartley, 1976); (2) 30%过氧化氢与 97%冰醋酸混合液($\text{H}_2\text{O}_2/\text{HAC}$)1:1 v/v 中在 100 水浴 30 分钟, 蒸馏水漂洗后封片观察(Desphande, 1976); (3) 10%甘油浸泡 30 分钟后封片观察。部分切片

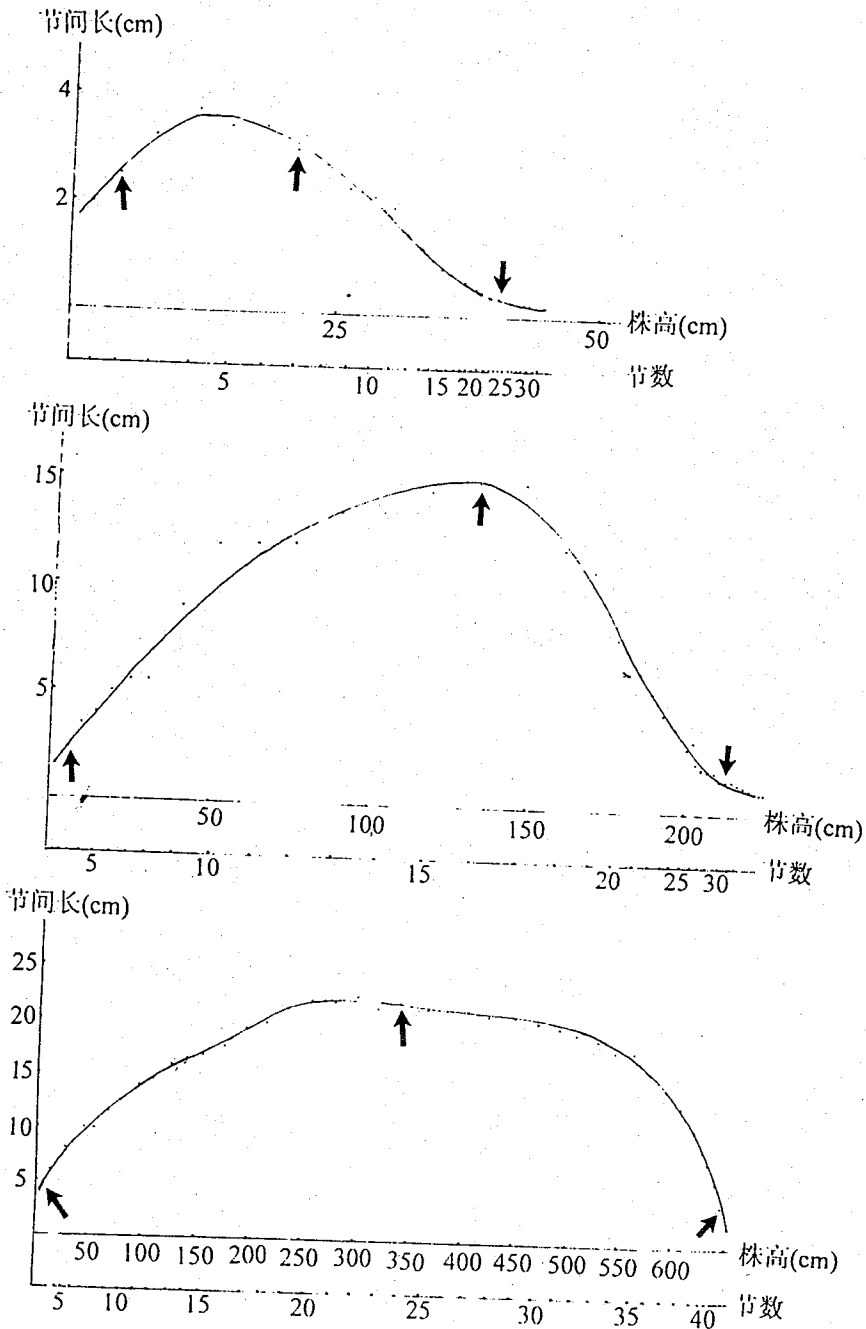


图 2.1 毛竹株高、节数和节间长之间的关系及取样部位
(箭头示取样部位)

经下列组织化学染色后置于普通可见光显微镜下观察：酸性多糖用钌红染色：0.02%钌红水溶液，染色 10 分钟，冲洗后封片观察；结晶性多糖用刚果红染色：1%刚果红水溶液染色 5 分钟，蒸馏水漂洗后封片观察；木质素分别用 Wiesner 试剂和 Mäule 试剂染色；Wiesner 反应：切片浸泡于 2%间苯三酚的酒精溶液（95%酒精配制）5 分钟后，滴加 6NHCl 后直接封片观察。Mäule 反应：切片经 1%高锰酸钾溶液染色 5 分钟后，蒸馏水冲洗，滴加 30%HCl，待其稍稍褪色（约 5 分钟）后，滴加氨水封片观察（Vallet et al. 1996）。番红、固绿对染制成永久制片。

部分经 Wiesner 试剂和 Mäule 试剂分别染色的切片置于可见光显微分光光度仪(Leitz MPVII, 点径 $1.5\ \mu\text{m}$; 谱带宽 10nm)下测量其可见光吸收光谱。因为这两种组化染色很容易退色，所以，一张切片的所有测量须在 10 分钟内测量完毕。

2 实验结果

2.1 竹茎各组织组织化学染色特征

在幼嫩竹笋顶部，维管束处于分化早期，原生木质部导管和韧皮部已经出现，而后生木质部导管和纤维尚未形成。所有组织在紫外光激发下均产生兰色荧光（图版三，1，3）。然而，氨水处理后，只有原生木质部导管保持兰色，其余各组织的自发荧光变为绿色。 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HAC}$ 处理后，只有原生木质部导管保持兰色荧光，其余各组织的荧光消失（图版三，2）。此时，只有原生木质部导管对 Wiesner 试剂呈正反应。用钌红染色后，除原生木质部导管和韧皮部外，其余组织被染成浅红色（图版一，1）。在偏光显微镜下，原生木质部导管和韧皮部显示出强烈的双折射性（图版二，1）。

在竹笋基部，所有组织在紫外光激发下均产生兰色荧光（图版三，3）。然而，氨水处理后，只有韧皮部自发荧光变为绿色，其余各组织的自发荧光保持兰色（图版三，4）。 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HAC}$ 处理后，原生木质部导管、后生木质部导管及纤维保持兰色荧光，韧皮部、基本薄壁组织的荧光消失（图版三，3）。Wiesner 试剂染色后，原生木质部导管和纤维呈现深红色，后生木质部导管呈浅红色。Mäule 试剂染色后，纤维尤其纤维细胞中层被染成深红色，导管则被染成棕色（图

版一，4)。用钉红染色后，薄壁组织细胞及靠近原生木质部导管的部分后生木质部导管壁被染成浅红色。经刚果红染色，韧皮部和基本薄壁组织细胞呈现深红色，原生木质部导管、后生木质部导管及纤维染成黄色（图版一，3）。经番红固绿对染后，原生木质部导管、后生木质部导管及部分纤维的胞间层和细胞角隅处被染成红色，而其余大部分组织细胞壁染成绿色。在偏光显微镜下，所有组织均显示出强烈的双折射性（图版二，3）。

与当年生幼竹不同，一年生竹茎秆中除韧皮部外，其余组织在 H_2O_2/HAC 处理后仍保持兰色自发荧光，这些组织对 Wiesner 试剂和 Mäule 试剂呈正反应（图版一，5）。所有组织对钉红不再有反应，而刚果红使所有组织染成红色。基本薄壁组织细胞壁开始加厚并木质化，但是仍有一些薄壁细胞保持薄壁、非木质化状态（图版一，6）。

七年生竹茎的组织化学特点与一年生竹茎基本相同，但纤维、基本薄壁组织中的长细胞的细胞壁进一步加厚（图版二，5, 6），木质化程度增加。纤维、长薄壁组织细胞壁呈现多层结构。竹茎各组织细胞壁组织化学染色特征见表 2.2。

2.2 可见光吸收光谱

图 2.1a、2.1b 分别显示 4 米高幼竹茎基部及 7 年生竹茎纤维、导管和薄壁组织细胞壁用 Wiesner 试剂染色后的可见光吸收光谱。由图中可以看出，在幼竹茎中，在 560nm 处，纤维细胞壁具有较强的光吸收，导管壁的光吸收较弱，薄壁细胞壁无光吸收。在 7 年生竹茎中，纤维、导管和薄壁组织细胞壁在 560nm 处均具有光吸收峰值。幼竹茎基部及 7 年生竹茎纤维、导管和薄壁组织细胞壁 Wiesner 试剂染色在 560nm 处可见光吸收值见表 2。

表 2.2: 不同生长时期竹茎各组织组织化学染色特征

Table 2.2. Staining traits of cell walls of bamboo stem

Samples		Rutheni-	Congo	Wiesner	Mäule	Autofluorescence		Birefring -ence
		um red	red			Control	H ₂ O ₂ /HAC	
Top of shoot with 0.5m Height	Phleom	—	++	—	—	++	—	++
	Fiber	+	+	—	—	+	—	—
	Protoxylem	—	+	++	—	++	++	++
	Metaxylem	+	+	—	—	+	—	—
	Parenchyma	+	++	—	—	+	—	+
Bottom of shoot with 0.5m Height	Phleom	—	++	—	—	++	—	++
	Fiber	+	+	—	—	+	—	—
	Protoxylem	—	+	++	—	++	++	++
	Metaxylem	+	+	—	—	+	—	—
	Parenchyma	+	++	—	—	+	—	+
Bottom of shoot with 1m Height	Phleom	—	++	—	—	++	—	++
	Fiber	+	+	+	—	+	+	+
	Protoxylem	—	+	++	—	++	++	++
	Metaxylem	+	+	+	—	+	+	+
	Parenchyma	+	++	—	—	+	—	++
Bottom of shoot with 4m Height	Phleom	—	++	—	—	++	—	++
	Fiber	—	+	+	—	+	++	++
	Protoxylem	—	+	++	—	++	++	++
	Metaxylem	—	+	+	—	+	+	++
	Parenchyma	+	++	—	—	+	—	+
Bottom of shoot with 6m Height	Phleom	—	++	—	—	++	—	++
	Fiber	—	+	++	++	++	++	++
	Protoxylem	—	+	++	+	++	++	++
	metaxylem	—	+	++	+	++	++	++
	Parenchyma	—	++	+	—	+	+	++
1 year old culm	Phleom	—	++	—	—	++	—	+
	Fiber	—	++	++	++	++	++	++
	Protoxylem	—	+	++	+	++	++	++
	Metaxylem	—	+	++	+	++	++	++
	Parenchyma	—	++	+	+	++	++	++
7 years old culm	Phleom	—	++	—	—	+	—	+
	Fiber	—	++	++	++	++	++	++
	Protoxylem	—	+	++	+	++	++	++
	Metaxylem	—	+	++	+	++	++	++
	Parenchyma	—	++	++	++	++	++	++

Staining intensity was judged by observation with the light microscopy.

Strong staining: ++; Moderate staining: +; No staining: —

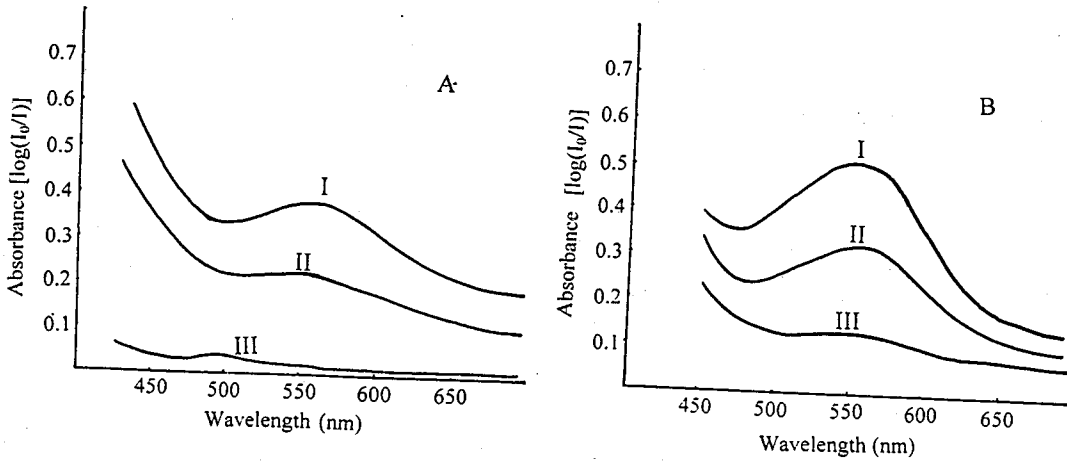


图 2.1 竹茎纤维、导管和薄壁组织经 Wiesner 试剂染色后的可见光吸收光谱
 a 幼竹茎基部 b 7 年生竹茎
 I 纤维 II 导管 III 基本薄壁组织

表 2.2 竹茎纤维、导管和薄壁组织细胞壁 Wiesner 试剂染色后在 560nm 处可见光吸收值

Table 2.2 Absorbance in tissues of bamboo shoot and mature culm after the Wiesner reaction at 560nm

Tissues	Absorbance [$\log(I_0/I)$], 560 nm	
	Bamboo shoot	7 years old culm
Fiber	0.37	0.51
Vessel	0.21	0.33
Parenchyma	0.02	0.13

图 2.2a、2.2b 分别显示 4 米高幼竹茎基部及 7 年生竹茎纤维、导管和薄壁组织细胞壁用 Mäule 试剂染色后的可见光吸收光谱。由图中可以看出，在幼竹茎中，所有组织细胞壁在可见光区域均没有光吸收峰值。而在 7 年生竹茎中，纤维、导管细胞壁在 530nm 处表现出一个较弱的平台样的光吸收峰。

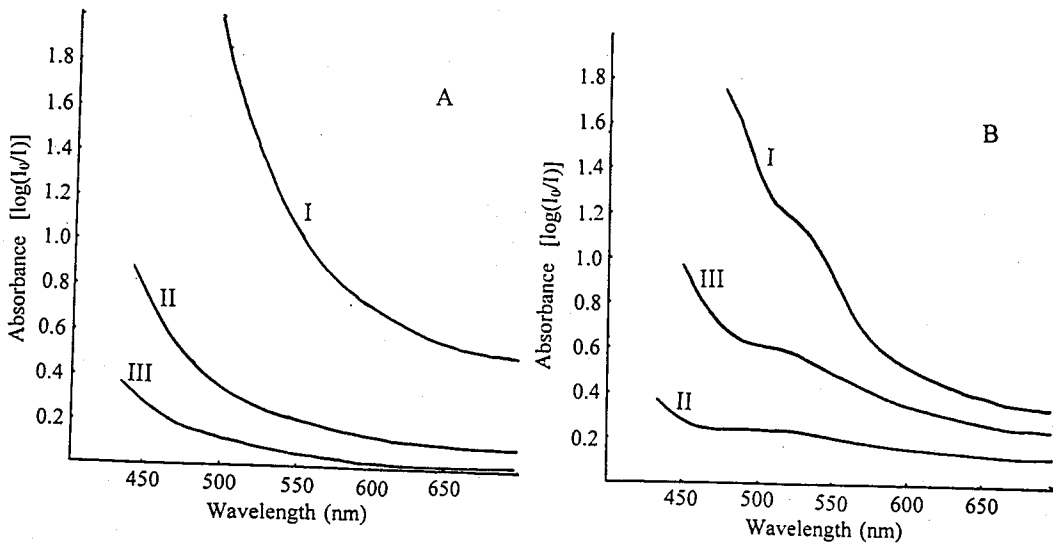


图 2.2 竹茎纤维、导管和薄壁组织经 Mäule 试剂染色后的可见光吸收光谱
 a 幼竹茎基部 b 7 年生竹茎
 I 纤维 II 导管 III 基本薄壁组织

3 讨论:

颜色反应是检测木质素存在的有效方法。Mäule 反应是鉴别裸子植物木材和双子叶植物木材的常用方法，Mäule 试剂能将双子叶植物木材染成红色，而将裸子植物木材染成棕色。对 Mäule 反应机理的研究揭示产生红色的主要原因是由于紫丁香基木质素中游离的

酚羟基的存在，表明 Mäule 反应可以有效地鉴别紫丁香基木质素 (Meshitsuka & Nakano, 1979)。Wiesner 反应是另一种鉴别木质素存在的常用方法，当木质素中存在愈创木基团和紫丁香基团时，其就会被染成红色。虽然 Wiesner 试剂对和紫丁香基木质素都会产生颜色反应，但是，当木质素中含有大量紫丁香基成分时，颜色反应十分微弱甚至消失。目前，对于 Wiesner 反应机理尚未彻底研究清楚。利用 Wiesner 反应和紫外光显微镜，Itoh (1990 报道了毛竹表皮、纤维、薄壁基本组织细胞和厚壁基本薄壁组织的木质化过程，然而，在他的论文中没有涉及到原生木质部导管和后生木质部导管的木质化。根据我们的观察结果来看，原生木质部导管的木质化发生得很早，在竹笋顶部维管束发育早期，后生木质部导管和纤维尚未形成时，其木质化就已经开始，这可以通过 Wiesner 反应以及 H_2O_2/HAC 处理后细胞壁的自发荧光反映出来。钉红染色表明这一阶段细胞壁伴随着酸性多糖的积累。在幼竹基部，Wiesner 反应显示出原生木质部导管、纤维、后生木质部导管具有木质素沉积，而纤维细胞壁，尤其胞间层可与 Mäule 试剂产生强烈的颜色反应。在 7 年生竹茎中，Wiesner 反应和 Mäule 反应显示出除韧皮部之外的所有组织均已木质化，不同组织对 Mäule 试剂和 Wiesner 试剂的反应不同，例如，纤维、导管对 Wiesner 试剂产生强烈的颜色反应，基本组织反应较弱；而在 Mäule 反应中，纤维，尤其纤维细胞壁胞间层和基本薄壁组织细胞壁反应较强，而导管反应较弱。这个结果表明在老龄竹茎中，导管壁木质素主要由愈创木基木质素组成，纤维和基本薄壁组织细胞壁含有愈创木基木质素和紫丁香基木质素两种成分。我们的观察结果支持 Itoh 关于竹茎木质化的一些结论，如竹茎中木质化在水平方向上由外向内进行，在垂直方向上由基部向顶部发展；纤维、导管的木质化早于基本薄壁组织等。然而，我们观察到在一到七年生的老龄竹茎中，纤维、长基本薄壁组织细胞的细胞壁不断加厚，木质化程度也在不断提高，并形成一种典型的多层结构，因此，我们不支持他根据化学分离测定方法提出的竹茎木质化在一个生长季节内完成并在以后若干年内各类细胞不再进一步木质化的结论。Liese 和 Weiner (1997) 在研究年龄老化对竹茎解剖结构的影响时也曾指出，在竹子生长的十几年内，纤

维和基本薄壁组织细胞壁厚度、木质化程度不断增加。

Higuchi(1957)曾用 Mäule 试剂处理经乙醇-苯抽提的 10 种双子叶植物木材、5 种裸子植物木材和 3 种竹材, 将获得的反应液迅速用分光光度计测定吸收光谱。他发现这些植物的吸收光谱有差异, 裸子植物在 390nm 左右有一个最大吸收峰; 双子叶植物有两个最大吸收峰, 一个在 380-400nm 左右, 另一个在 470-530nm; 竹茎的光吸收曲线与双子叶植物近似。他认为 385nm 左右的吸收峰是由木质素中的愈创木基成分引起的, 而 508nm 左右的吸收峰是由木质素中的紫丁香基成分引起的。Yoshizawa(1993)利用 Mäule 反应结合可见光显微分光光度计对黄杨(*Buxus microphylla*)和桦木(*Betula ermain*)的研究显示, 由于紫丁香基木质素的存在, 两者的吸收曲线分别在 515nm 和 500nm 左右出现最大吸收峰。He 和 Terashima (1991)利用紫外光显微镜研究了甘蔗、水稻木质素的化学组成, 指出原生木质部导管次生壁木质素主要是愈创木基木质素, 纤维细胞角隅、纤维和后生木质部导管次生壁木质素主要有愈创木基和紫丁香基木质素。Yoshinaga 等(1997)对蒙古栎(*Quercus mongolica*)晚材木质素分布异质性的研究表明, 导管和环纹管胞细胞壁在木质化早期沉积富含愈创木基的木质素, 木纤维次生壁在木质化早期富含愈创木基木质素, 随着木质化的发展紫丁香基木质素含量不断增加, 在次生壁的外部虽富含愈创木基木质素, 但由外至内, 紫丁香基木质素比例增加, 并成为其主要成分, 并且, 他们还指出木质素组成上的差异反映出细胞功能上的差异, 次生壁中愈创木基木质素比例高表明细胞主要执行输导功能, 紫丁香基木质素比高表明细胞主要执行机械支持功能, 木质素组成上的变化能够反映出细胞功能上的变化。在我们的实验中, 利用 Mäule 反应, 幼竹顶部所有组织的可见光吸收曲线均没有吸收峰, 在 7 年生老龄竹茎中, 纤维和薄壁组织细胞的细胞壁的可见光吸收曲线在 530nm 左右出现一个平台样的吸收峰。利用 Wiesner 反应, 幼竹中纤维和导管壁的可见光吸收曲线在 560nm 处有一个弱的吸收峰, 在 7 年生老龄竹茎中, 纤维、导管和薄壁组织细胞的细胞壁的可见光吸收曲线在 560nm 处具有一个很高的吸收峰。在已报道的桦木、黄杨中, 570nm 左右的吸收峰被认为是由于愈创木基木质素引起的。我们的实验结果

表明,在木质化的早期阶段主要积累愈创木基木质素,随着木质化的发展,紫丁香基木质素含量增加,尤其是在纤维和基本薄壁组织细胞细胞壁;导管壁中含有大量的愈创木基木质素。这个结果支持细胞壁木质素的组成能够反映出细胞的功能的观点。

目前已知在单子叶植物木质素中还存在少量对羟苯基木质素成分(Higuchi, 1957; He & Terashima, 1991),但对于这一成分尚没有有效的组织化学检测方法。木质化是一个十分复杂的问题,只有通过多种研究方法相互配合,如组织化学、细胞化学以及固态核磁共振、热裂解质谱分析等化学方法,才能对木质素异质性有更深入的了解。

三 毛竹茎各组织细胞壁自发荧光的显微荧光分光光度分析

细胞壁由于酚类物质的存在而在紫外光激发下产生蓝色自发荧光。植物种类不同,细胞壁中的酚类物质成分不同。对于裸子植物及多数双子叶植物,细胞壁中的酚类物质为木质素,这类植物细胞壁自发荧光主要是由于木质素的存在。但对于多数单子叶植物尤其是禾本科植物及少数双子叶植物来说,细胞壁中的酚类物质成分较为复杂,除了木质素之外,还有结合于半纤维素中的酚酸,如阿魏酸(ferulic acid)、对-香豆酸(*p*-coumaric acid)等,这类植物细胞壁自发荧光则是由木质素及结合于半纤维素中的酚酸共同产生的。自发荧光能够反映出植物发育过程中细胞壁酚类物质成分的变化(Willemse, 1988)。Harris 和 Hartley(1976)的研究结果表明,利用氨水可以将结合于半纤维素中的阿魏酸与木质素区别开。0.1mol/L 氨水处理后,半纤维素中的阿魏酸自发荧光由蓝色变为绿色,而木质素仍保持蓝色。然而结合于半纤维素中的对-香豆酸与木质素一样在氨水处理前后均产生蓝色荧光(Fujii,1991)。由于这些结合于半纤维素中的酚酸存在,使许多研究细胞壁木质化及木质素分布的方法,如荧光法、溴化法及汞化法(Eriksson,1988)等,在裸子植物和双子叶植物中十分有效,但用于禾本科植物中则出现偏差。

毛竹由于生长迅速,在短短的几个月内就完成其伸长生长,成为研究植物生长机制的好材料。植物化学研究结果表明,竹子细胞壁中的酚类成分除木质素外,主要有两种酚酸结合于半纤维素中,即阿魏

酸和对-香豆酸，其中对-香豆酸含量随木质素含量的升高而升高，相反地阿魏酸含量则随木质素含量的升高而降低(Shimada, 1970; Fujii, 1993)。虽然对毛竹茎木质化过程已做过研究(Itoh, 1990)，但在木质化过程中酚酸在各组织细胞中的分布仍不清楚。本实验利用荧光显微镜、显微荧光分光光度计及组织化学方法，对毛竹笋不同组织在3种溶液处理前后细胞壁自发荧光的变化进行了观察分析，试图寻求一种有效方法区分木质素与结合于半纤维素中的酚类物质，进而揭示毛竹木质化过程中酚酸在各组织细胞中的分布。

1 材料和方法

1998年4月，自南京林业大学竹种园选取一株高约为4米的健康生长的毛竹(*Phyllostachys pubescens* Mazel)植株，自顶部、中部和基部各选取一节间，切成 0.5 cm^3 小块，50%酒精固定，保存在70%酒精中。7年龄毛竹于1997年9月取自浙江省安吉竹种园，在茎中部选取一节间，切成 0.5 cm^3 小块，固定在70%酒精中。在冰冻切片机上切取 $8\text{ }\mu\text{m}$ 厚的横切面切片，分别用下列3种方法处理：(1) 0.1 mol/L 氨水浸泡5 min后封片(Harris & Hartley, 1976)；(2) 1 mol/L NaOH $60\text{ }^\circ\text{C}$ 处理30 min，然后用 1 mol/L HCl中和，蒸馏水冲洗后封片(Willemse, 1991)；(3) 30%过氧化氢及97%冰醋酸1:1体积比混合液($\text{H}_2\text{O}_2/\text{HAC}$) $100\text{ }^\circ\text{C}$ 处理30 min，蒸馏水冲洗后封片(Desphande, 1976)。10%甘油浸泡30 min后封片作为对照。木质素染色用盐酸-间苯三酚法。切片用荧光显微镜(BX-50型, Olympus)观察、照相，荧光发射光谱由显微荧光分光光度计(MPVII, Leitz)和函数记录仪完成。

2 实验结果

毛竹茎所有组织在紫外光激发下均产生蓝色荧光(图版三, 1、3)，自发荧光发射峰值在470 nm处(图3.1, A)。用氨水处理后，所有组织的荧光强度均有所增加(图版三, 4)。在竹笋顶端的幼嫩组织中，除原生木质部导管外，其余组织细胞壁荧光均由蓝色变为绿色。在竹笋的中部及基部，只有韧皮部荧光由蓝色变为绿色，荧光发射峰值由470 nm处移至510 nm处。而导管、纤维及薄壁组织细胞壁荧光均无明显的颜色变化(图版三, 4; 图3.1, B)。HCl-间苯三酚染色结果

表明导管和纤维呈正反应，而薄壁组织细胞为负反应。在7年生竹茎中，氨水处理后，只有韧皮部荧光由蓝色变为绿色，导管、纤维及薄壁组织细胞壁荧光均无明显的颜色变化（图版四，3）。

NaOH 处理使幼嫩竹茎中的所有组织荧光强度降低，其中韧皮部和薄壁组织细胞的荧光强度降低幅度较导管和纤维明显(图版三，6；图 3.1, C)。在7年竹茎中，NaOH 处理对薄壁组织、导管影响不大，韧皮部荧光显著降低，纤维的自发荧光由兰色变为黄褐色(图版四，4)。

经 H_2O_2/HAC 处理后，竹笋顶端幼嫩组织中仅导管保持蓝色荧光，其余组织荧光完全消失(图版三，2)。在竹笋中部和基部，韧皮部荧光完全消失，薄壁组织细胞壁荧光显著降低，而纤维和导管仍保持较强的荧光强度(图版三，5；图 3.1, D)。HCl-间苯三酚染色结果表明纤维和导管为木质化组织而韧皮部及薄壁组织细胞没有木质化。在7年竹茎中， H_2O_2/HAC 处理使韧皮部荧光完全消失，而对其它各组织的荧光影响不大。

3 讨论

用氨水处理后，所有组织的荧光强度均有所增加。在竹笋顶端的幼嫩组织中，除原生木质部导管外，其余组织细胞壁荧光均由蓝色变为绿色，这表明阿魏酸广布于毛竹笋幼嫩组织中，而导管木质化始于维管束发育的很早时期。在竹笋的中部及基部，只有韧皮部荧光由蓝色变为绿色，荧光发射峰值由 470 nm 处移至 510 nm 处。而导管、纤维及薄壁组织细胞壁荧光均无明显的颜色变化，表明这时阿魏酸已不是导管、纤维及薄壁组织细胞壁中的主要成分。HCl-间苯三酚染色结果表明导管和纤维呈正反应，而薄壁组织细胞为负反应，这一结果说明导管、纤维的自发荧光主要是由于木质素的分布，薄壁细胞壁的自发荧光则主要是由于对-香豆酸的存在。Fujii 等(1991)对香豆酸在紫外光激发下的自发荧光光谱进行分析，发现其荧光发射高峰在 390 nm，氨水处理后移至 436 nm，处理前后均表现为蓝色荧光。Shimada 等(1970)应用植物化学方法研究，认为对-香豆酸在竹笋中自顶端至基部其含量显著升高，而阿魏酸含量很少，他们研究的 3.6 m 高的竹笋从中部到基部对-香豆酸含量与阿魏酸含量的比值高于 55:1。Fujii 等

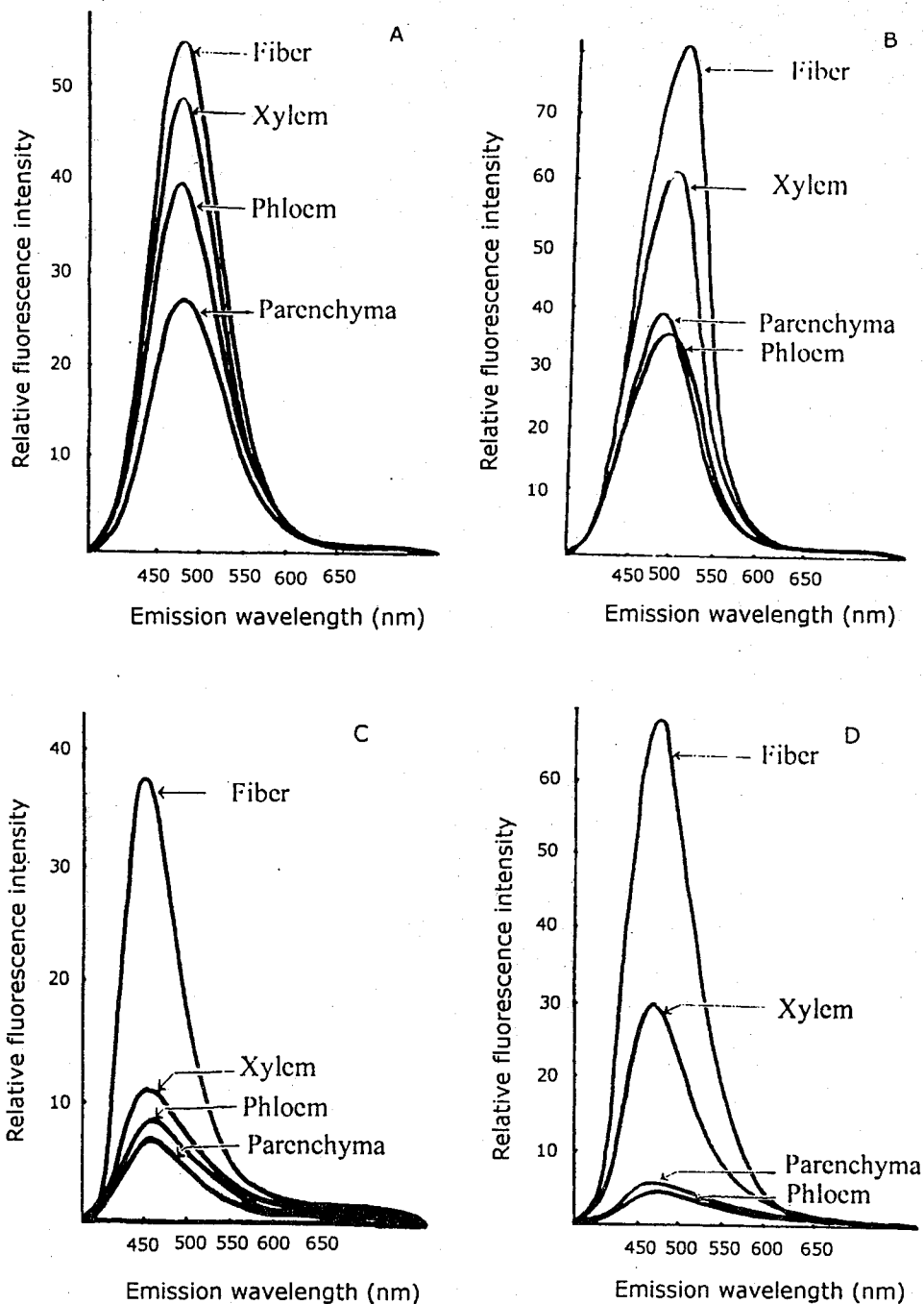


图 3.1 毛竹笋茎中部纤维、导管、薄壁细胞及韧皮部细胞壁自发荧光发射光谱
 Fig. 3.1 Fluorescence emission spectra of cell walls of fiber, xylem, parenchyma and phloem in the middle part of the shoot of *Phyllostachys pubescens*

A. Before treatment B. Treatment with 0.1 mol/L ammonium hydroxide
 C. Treatment with 1 mol/L NaOH D. Treatment with H₂O₂/HAC

(1993)也得到类似结果。He 和 Terashima(1989)利用放射自显影技术研究了水稻茎木质素的形成,结果表明阿魏酸在细胞壁形成早期积累,但在纤维的次生壁中,阿魏酸几乎没有,在导管和薄壁细胞中,对-香豆酸与阿魏酸的比例随木质化程度的不同有一定变化,木质化程度高则对-香豆酸含量就高。我们的观察结果也表明阿魏酸广泛分布于竹笋各种幼嫩组织中,随着木质化程度的提高其含量下降。

NaOH 处理使幼嫩竹茎中的所有组织荧光强度降低,其中韧皮部和薄壁组织细胞的荧光强度降低幅度较导管和纤维明显,表明 NaOH 处理可以去除结合于半纤维素中的酚酸,引起韧皮部和薄壁组织细胞荧光强度明显降低,同时,它也能去除一些碱溶性木质素成分,引起导管和纤维荧光强度降低。类似的结果在玉米茎秆组织细胞壁中也有报道(Willemsse, 1991)。NaOH 处理使 7 年竹茎纤维自发荧光由兰色变为黄褐色,其原因尚不明确,但可以肯定,纤维细胞壁在老化过程中除了沉积大量木质素外,还有其它物质积累,具体何种物质产生这种黄褐色的荧光需做进一步研究确定。

H_2O_2/HAC 是植物细胞壁中半纤维素和果胶质的抽提剂,而对木质素和纤维素没有影响(Desphande,1976)。这种方法曾被用于观察未木质化细胞壁中纤维素微纤丝的排列(Emons, 1988)。我们的实验结果表明 H_2O_2/HAC 在抽提半纤维素的同时,也抽提出结合于半纤维素中的酚酸,包括对-香豆酸和阿魏酸等,但对木质素成分没有影响。因此,这种方法可以将木质素与结合于半纤维素中的酚酸有效地区分开来。

四 毛竹茎纤维、导管细胞壁木质化的超微结构研究

在以往的研究中,利用紫外光显微镜、荧光显微镜、电子显微镜及放射自显影等技术对裸子植物管胞木质化过程进行了较为详细的研究,揭示了管胞木质化过程中木质素在不同细胞(早、晚材管胞)、细胞不同区域(切向壁、径向壁)、细胞壁不同层次(胞间层、S1、S2 层)中沉积的过程(Hepler, 1970; Wardrop, 1976; Kutscha & Schwarzmann, 1975; Terashima et al. 1988; Fukushima & Terashima, 1991),以及木质化过程中有关细胞器的变化(Takabe, 1985)等。与裸

子植物相比,被子植物尤其是对单子叶植物细胞壁木质化过程研究的较少。由于单子叶植物是主要农作物和饲料植物的来源,而竹类植物在我国和东南亚广泛应用于食品、建筑业、家具制造业等,因此,对单子叶植物细胞壁木质化的研究受到越来越多的重视,如 He 和 Terashima(1991)利用放射自显影技术、紫外光显微镜、核磁共振等方法研究了水稻、甘蔗等植物木质素的组成、结构及木质化过程; Itoh(1990)利用组织化学方法研究了毛竹茎各组织的木质化过程。在超微结构方面,Parameswaran 和 Liese(1976)对成熟竹材纤维细胞壁超微结构进行了较为深入的研究,提出了一个竹纤维细胞壁结构的多层模型,但有关竹茎纤维、导管细胞壁木质化过程、木质素沉积方式等的研究尚未见报道。本实验以不同生长阶段的毛竹茎为材料,观察了不同发育时期纤维、导管的超微结构,试图揭示竹纤维、导管细胞壁木质化过程以及其中的细胞器变化、木质素沉积方式等。

1 材料和方法

1998年4月,自南京林业大学竹种园选取三株高分别为0.5m、2m、6m,健康生长的毛竹,自顶部、中部和基部各选取一节间,切成 1mm^3 小块,用0.1Mol/L磷酸缓冲液(pH7.3)配制的2.5%戊二醛和1%锇酸进行双重固定,然后用系列酒精逐级脱水,Spurr's树脂渗透、包埋和聚合。LKB-V型超薄切片机切取半薄和超薄切片。半薄切片经亚甲基蓝和天青II染色后,置于光学显微镜下观察(母锡金,1987)。超薄切片用铜网捞片,部分铜网经醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色,另一部分铜网经1% KMnO_4 溶液(0.1%柠檬酸钠配制)染色(Donaldson,1994)。染色后的铜网置于Hitachi H-600型和JEM-100CX型投射电子显微镜下观察、照相。

2 观察结果

2.1 纤维

发育早期:纤维细胞具有一个很大的、位于细胞中央的细胞核,核仁较大;细胞质浓厚,液泡较小,可观察到线粒体、高尔基体、核糖体和内质网等细胞器(图版五,1)。周质微管排列在质膜内侧,单列或双列,多以垂直于细胞长轴方向排列,但有时在一个细胞中既可

看到垂直于细胞长轴方向的(图版五, 2, 3), 又可以看到平行于细胞长轴方向的。细胞之间有胞间连丝(图版五, 3)存在。

细胞伸长时期: 细胞显著伸长, 小液泡融合扩大成为 1 到 2 个大液泡, 占据了细胞绝大部分空间, 细胞质为一薄层, 贴在细胞壁内侧。

细胞壁加厚时期: 线粒体数量增加并且体积增大; 高尔基体数量也明显增加, 在向着细胞质膜一侧, 在高尔基体上和细胞质中, 可以见到两类高尔基体小泡, 一类体积较大, 电子密度低, 另一类体积小而电子密度高, 许多高尔基小泡靠近质膜或附着在质膜上(图版五, 4)。内质网明显增多, 核糖体聚集在粗面内质网上, 游离核糖体减少(图版六, 1)。微管单行, 整齐地排列在质膜内侧, 其方向与细胞长轴方向平行(图版六, 3, 4)。

细胞壁木质化时期: 对用高锰酸钾染色的超薄切片的观察显示, 细胞壁木质化发生在初生壁形成之后, 次生壁开始形成之时。木质化最早出现在细胞角隅及胞间层, 然后是次生壁 St 各层, 最后是次生壁 S1 各层。木质化并不是由胞间层依次向次生壁各层扩展。在胞间层, 木质素沉积呈现均匀的颗粒状(图版七, 4; 图版八, 2), 在 St 各层, 木质素沉积密集成层, 而在 S1 各层, 木质素沉积呈现团块状(图版八, 1)。在细胞壁加厚、木质化的同时, 细胞内部也发生着变化, 细胞质变得稀薄, 细胞器明显减少, 有少量的线粒体、内质网、脂质体等(图版七, 1), 在质膜和细胞壁之间有大量的壁旁体存在(图版七, 2, 3), 微管在质膜内侧排列整齐(图版七, 1, 2)。虽然在纤维发育后期, 细胞出现衰退表现, 如细胞质、细胞核电子密度明显降低, 细胞器数量减少并且形状不规则, 但是, 纤维细胞可在许多年内保存着少量细胞质。

2.2 原生木质部导管

原生木质部导管次生壁呈环纹加厚, 在维管束发育早期就开始木质化(图版九, 1), 其木质化由中层开始, 依次逐渐向内扩展, 木质素沉积呈现典型的片状沉积式样(图版九, 3, 4; 图版十一, 1, 2)。

2.3 后生木质部导管

后生木质部导管在发育早期有一个大的细胞核和核仁, 具有一个大液泡, 细胞质贴靠在细胞壁上(图版九, 1; 图版十)。次生壁呈网纹

加厚,由导管靠维管束的外侧部分开始,木质素沉积也呈现典型的片状沉积式样(图版十一,3,4)。与纤维不同的是,导管在细胞壁加厚、木质化的过程中,细胞内原生质逐渐解体,成为死亡细胞。

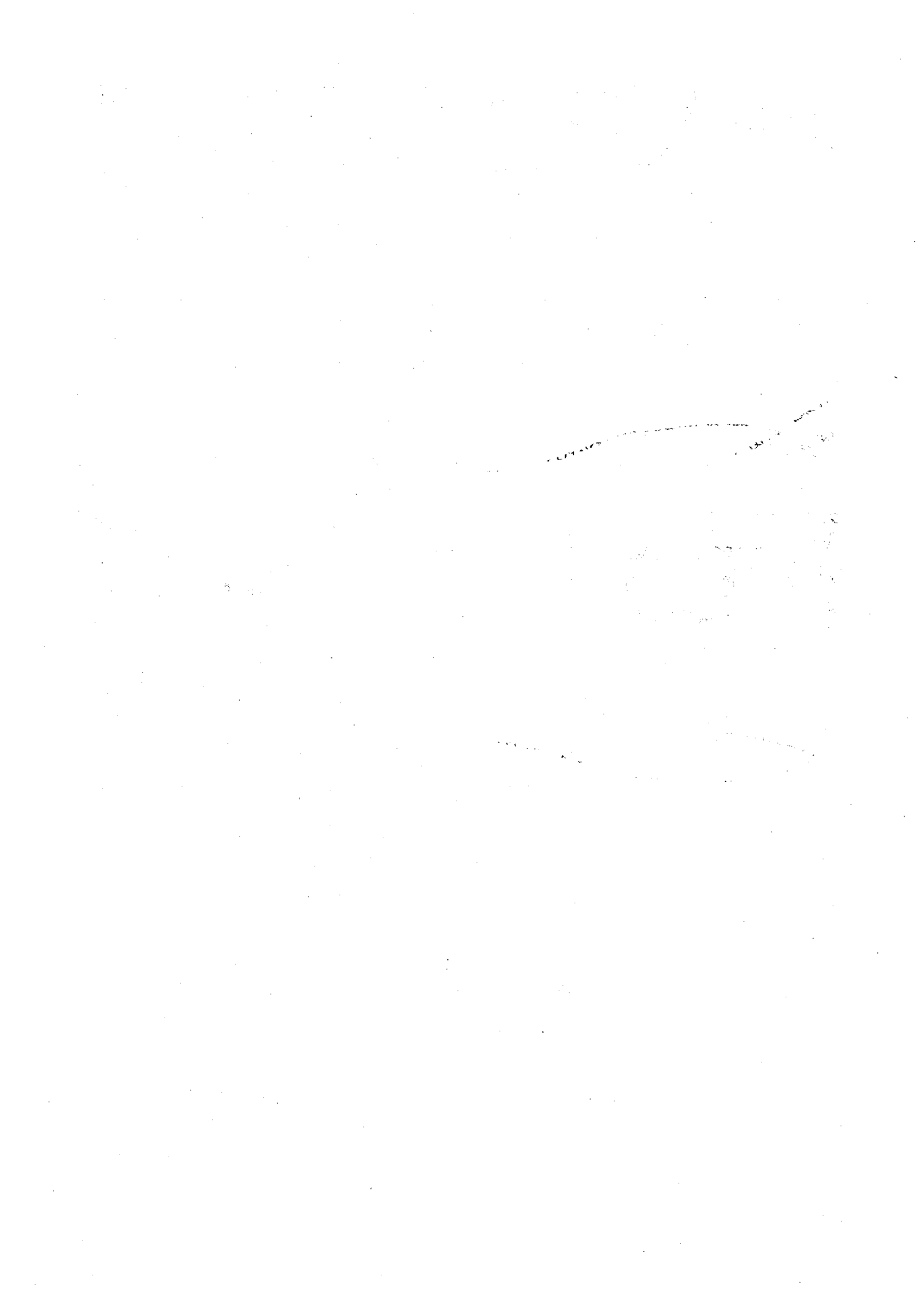
韧皮部筛管细胞壁虽然加厚形成厚壁细胞,但却不发生木质化,纤维素微纤丝排列垂直于细胞长轴方向(图版十二,1,2,3,4)。

3 讨论

竹茎纤维细胞发育早期的主要特点是具有大的细胞核和核仁,液泡小、数量多,细胞质浓厚,具有线粒体和核糖体及少量高尔基体,微管在质膜内侧多垂直于细胞长轴方向排列。此时,细胞生长主要体现在纤维细胞的伸长,随着细胞伸长,小液泡不断融合、扩大形成一个或几个大液泡,细胞质贴靠在细胞壁上成为一薄层。细胞器数量增加,最明显的是内质网、高尔基体和线粒体的增加,由高尔基体产生低电子密度、高电子密度两种小泡,向质膜靠近,与质膜融合,将细胞壁组成物质如多糖、蛋白质、木质素前体等从细胞质运输到细胞壁中,内质网也可能参与了运输小泡的形成。随着细胞壁加厚、木质化程度的不断提高,细胞质、细胞核电子密度明显降低,细胞器数量减少,而在质膜和细胞壁间却有大量的壁旁体存在,表明细胞壁组分仍在不断地从细胞质运输到细胞壁上。壁旁体可被 KMnO_4 染色,其内容物极可能是木质素前体。微管的变化十分显著,在纤维发育早期,微管数量较少,在质膜内侧多垂直于细胞长轴方向排列,随着细胞伸长,其方向逐渐变为与细胞长轴方向平行,数量也逐渐增加,即使在纤维发育后期,细胞出现衰退表现,一些细胞器变形解体,仍有大量微管整齐地排列在质膜内侧,此时,纤维细胞的主要活动是细胞壁木质化,表明微管与细胞壁木质化有着密切关系。由上述结果可知,在竹茎纤维和导管细胞壁木质化过程中,高尔基体、高尔基小泡、内质网、壁旁体、微管等细胞器起着重要作用。对裸子植物管胞木质化的大量研究表明参与木质化过程的细胞器主要有高尔基体、内质网等细胞内膜系统。Takabe 等(1985)利用氚标记苯丙氨酸显微放射自显影技术研究日本柳杉(*Cryptomeria japonica*)管胞木质化过程,发现在木质化早期和中期,高尔基体产生许多小泡,被标记的苯丙氨酸出现在高尔基体及高尔基体小泡中,表明苯丙氨酸可以直接渗入到高尔基体

中，在这里通过一系列酶促反应形成木质素前体，然后通过高尔基体小泡的胞吐作用分泌到细胞壁中，并进一步多聚化形成木质素。同时，一些不规则膨大的光滑内质网在 S₃ 层形成时出现，被标记的苯丙氨酸也可以渗入到这些内质网中，通过内质网与质膜的融合将苯丙氨酸的衍生物分泌到细胞壁中。最近，对木质化过程中的几种关键酶，如 PAL(Phenylalanine Ammonia-Lyase)、CAD(Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase)、C4H(Cinnamate 4-Hydroxylase)等的细胞化学定位也说明了这一点(Smith et al. 1994; Nakashima et al. 1997)。周质微管的主要功能被认为是与细胞壁中纤维素微纤丝的排列方向有关，当一个细胞表面的纤维素微纤丝排列方向改变时，可以看到微管的排列方向首先发生变化。采用抑制微管合成的抑制剂，如秋水仙碱等，证明微管解聚后，纤维素微纤丝的排列方向发生混乱，但纤维素微纤丝的组装并不停止，因此微管只起到指导纤维素微纤丝沉积方向的作用(朱澂 1996)。然而，Nelmes 等(1973)在一种橡胶木中发现，在细胞壁未木质化的细胞中，周质微管几乎没有，而在细胞壁已经木质化的细胞中分布有大量的周质微管，因此，他们认为周质微管与细胞壁木质化有密切的关系。Barnett(1977)在研究辐射松(*Pinus radiata*)管胞分化时注意到周质微管出现在管胞增大及次生壁形成并且发生木质化的时候，这个结果支持 Nelmes 等(1973)的结论。在我们的观察中，周质微管虽然在细胞壁加厚过程中出现，但在纤维发育后期，细胞出现衰退表现并且一些细胞器变形解体后，仍有大量微管整齐地排列在质膜内侧，此时，纤维细胞的主要活动是细胞壁木质化，表明微管与细胞壁木质化有着密切关系。然而，周质微管在木质化过程中的具体作用并不了解，仍需要做进一步的工作予以证实。

KMnO₄ 染色可以用来在超微结构上观察木质素在细胞壁上的分布，其原理是 KMnO₄ 与木质素成分反应，形成高电子密度的 MnO₂ 和 Mn₂O₃ 颗粒，从而能在透射电子显微镜下观察木质素的分布(Bland et al. 1971)。利用这个方法，Wardrop 等(1976)研究了辐射松木质部管胞的木质化过程，结果表明木质化过程开始于管胞次生壁形成之初，木质素最早沉积在细胞角隅处及中层。Kutscha 和 Schwarzmanna(1975)研究了冷杉(*Abies balsamea*)木质部管胞的木质化过程，他们发现木质



化最早发生在两个管胞之间的纹孔的中层，随后发生在初生纹孔场，同时发生在距形成层较远的管胞角隅处，随着木质化在细胞角隅处扩展，木质素也出现在 S₁ 层的外部，而这时中层和 S₁ 层的外部之间的初生壁没有木质化，只有当细胞角隅处的 S₁ 层完全木质化后木质化过程才沿着管胞壁扩展。Terashima 等(1988)利用显微放射自显影技术研究黑松(*Pinus thunbergii*)管胞木质化过程，将其分为三个阶段：第一阶段，当 S₁ 层开始形成时，木质素在细胞初生壁角隅处及中层沉积；第二阶段，伴随纤维素微纤丝、多糖等在 S₂ 层的沉积，木质素在细胞次生壁上缓慢沉积；第三阶段，当纤维素微纤丝在 S₃ 层开始积累后，木质素迅速在整个次生壁上的沉积，这是最主要的木质化过程。我们的观察结果表明，在毛竹茎纤维中，木质化最早出现在细胞角隅及胞间层，然后是次生壁 St 各层，最后是次生壁 Si 各层。木质化并不是由胞间层依次向次生壁各层扩展的。原生木质部导管和后生木质部导管壁由于不存在多层结构，木质化由胞间层向次生壁加厚部分依次扩展。

木质素沉积在细胞壁复杂的碳水化合物基质中，不同的细胞区域具有不同的碳水化合物组成，而这种碳水化合物基质又影响着在其中沉积的木质素的化学、物理性质及其沉积方式。在细胞中层，纤维素微纤丝随机排列，没有一定的方向性，木质素渗入纤维素微纤丝间的空隙，可能与半纤维素、果胶质等成分等形成化学键，形成一种无定型的结构，木质素沉积表现为分散的颗粒状沉积方式，随着木质化程度的发展，木质素颗粒密集联合形成一种致密结构。在裸子植物管胞胞间层木质素沉积为这种方式(Donaldson, 1994)。我们的观察结果显示，毛竹茎纤维胞间层木质素沉积也是这种方式。在次生壁中，纤维素微纤丝排列呈一定的方向性，木质素在与纤维素微纤丝平行方向上的沉积速度远远大于与其垂直方向上的沉积速度，并填充纤维素微纤丝间的空间，形成片层状结构，在木质素和相邻的半纤维素之间可形成化学键。然而，在木质素和纤维素之间是否形成化学键尚不能确定。在辐射松管胞次生壁 S1 层，可明显观察到这种片层结构，片层宽约 4-5nm。在毛竹茎的原生木质部导管和后生木质部导管这种片层结构十分明显。在竹纤维细胞壁 S1 各层，木质素沉积方式不同于上

述两种方式，而呈现团块状沉积，木质素先在 S1 层的若干区域沉积形成一些团块，然后扩展。竹纤维微纤丝在 S1 各层中的排列虽然也有一定的方向性，但并不是平直的，而呈现一定的弯曲，这样，木质素小片层就易在一定的区域内聚集形成团块。

五 毛竹茎过氧化物酶的组织、细胞化学定位及其与木质化的关系

在植物细胞中，过氧化物酶执行着多种功能，如：参与木质素的生物合成、机械损伤后的愈合、生长素的分解代谢、抵御病原体的侵染等(Lagrimini et al. 1987)，其中在细胞壁中催化形成过氧化氢、参与木质素的生物合成是它的一个重要功能(Mader, 1980)。组织化学和细胞化学研究显示过氧化物酶反应高的区域正是细胞壁木质化的区域，表明过氧化物酶与木质化有着密切的关系(Helper, 1972; Harkin & Obst, 1973; Fielding & Hall, 1978; Goldberg, 1985)。但是，也有一些不同的观察结果，如 Minocha 和 Halperin(1976)研究 *Helianthus tuberosus* 的管胞分化时发现过氧化物酶与其木质化无相关性，相同的结果也出现在菜豆(*Phaseolus vulgaris*)愈伤组织分化的研究中(Haddon & North 1976)。Grosser 和 Liese(1971)在研究竹茎的解剖结构时发现，在竹茎基本薄壁组织中，有一些短圆柱状细胞的细胞壁表现出很高的过氧化物酶活性，但其在竹子生长的许多年中保持非木质化的状态。由此可见，过氧化物酶反应与木质化之间并不是简单的一一对应的关系。竹茎纤维细胞壁为一种多层结构，不同层次间木质素含量不同，St 各层木质素含量高，S1 各层木质素含量低，形成这种有规律地间隔排列的原因并不清楚。本实验利用组织化学和细胞化学方法观察了毛竹茎木质化过程中过氧化物酶的组织、细胞定位，为进一步揭示过氧化物酶与木质化的关系提供资料。

1 材料和方法

1998 年 4 月，自南京林业大学竹种园选取一株高约为 4m，健康生长的毛竹，自顶部、中部和基部各选取一节间，分别按照下列方法进行组织化学和细胞化学观察。

组织化学观察方法：取新鲜材料，徒手切片，厚度约为 15-20 μ

m, 将切片放入 pH5.8、0.1M 磷酸缓冲液中, 4℃ 冰箱放置 5 分钟, 在 0.1% 钼酸铵水溶液中处理 5 分钟, 然后, 放入联苯胺反应液中 (反应液配方: 50mg DAB 溶于 50ml 50mM Tris-HCl 缓冲液中, pH7.0; 使用之前, 取上述 DAB 溶液 8ml, 加入 0.1% H₂O₂ 2ml), 室温下孵育 15 分钟, 蒸馏水冲洗三次, 甘油-明胶封片。对照: (1) 切片在进入反应液之前煮沸 10 分钟; (2) 反应液中不加 0.1% H₂O₂, 而加入 0.01% 过氧化氢酶。

细胞化学观察方法: 取新鲜材料, 切取 0.5mm³ 的组织块投入 2.5% 戊二醛中, 0℃ 固定 1 小时, 用预冷的 Tris-HCl 缓冲液中 (PH7.0) 洗涤 4 次, 历时 3 小时; 23℃ 下在反应液中孵育 15 分钟, 用 pH7.0 磷酸缓冲液洗涤 4-5 次, 每次 20 分钟; 用 1% 钼酸进行第二次固定, 0-4℃ 下过夜; 用磷酸缓冲液冲洗 3 次, 酒精系列脱水, Spurr's 树脂包埋, 超薄切片, 透射电镜观察、照相 (简令成, 1987)。

2 观察结果:

在竹笋顶部, 维管组织处于发育早期, 过氧化物酶几乎出现在所有组织中, 其中在原生木质部导管壁中酶反应最为明显。由 Wiesner 反应可知此时原生木质部导管已经木质化, 其余各组织均未木质化。在后生木质部导管及纤维细胞壁加厚尚未开始时, 过氧化物酶反应仅出现在细胞角隅处 (图版十三, 3, 4)。韧皮部细胞, 尤其伴胞细胞壁表现出很强的过氧化物酶活性 (图版十四, 3, 4; 图版十五, 1, 2)。在纵切面上, 可以看到在导管的端壁、傍管薄壁细胞角隅处等均表现出较强的酶活性 (图版十三, 1)。

在竹笋中部, 原生木质部导管、后生木质部导管以及部分纤维细胞壁已经木质化。此时, 过氧化物酶主要分布于原生木质部导管、后生木质部导管、纤维及韧皮部细胞壁; 其中, 靠近韧皮部、后生木质部导管的纤维表现出最强的过氧化物酶活性 (图版十三, 5)。

在竹笋基部, 过氧化物酶主要分布于后生木质部导管、纤维及韧皮部细胞壁 (图版十三, 6)。与竹笋中部过氧化物酶分布相比较, 竹笋基部过氧化物酶分布的最突出的特点是原生木质部导管、靠近韧皮部、后生木质部导管的部分纤维细胞壁酶活性明显降低, 而正在进行或将要进行木质化的纤维表现出较强的酶活性, 后生木质部导管始终

保持较强的酶活性。基本薄壁组织中，可以观察到两类薄壁细胞，一类表现出较强过氧化物酶活性，这类细胞在纵切面为短圆柱形，称为短薄壁细胞；另一类细胞过氧化物酶反应较弱，在纵切面中为长圆柱形，称为长薄壁细胞(图版十三，2)。这两类基本薄壁细胞在本次实验取材时均未木质化。长薄壁细胞在竹茎完成其伸长生长后，细胞壁开始加厚并且木质化，而短薄壁细胞的细胞壁在竹子生长的许多年内保持其非木质化状态。

在电子显微镜下，过氧化物酶在纤维发育早期主要分布于细胞角隅处(图版十四，1, 2; 图版十五，2)。随着次生壁的形成、加厚，过氧化物酶反应出现在次生壁加厚之处(图版十五，1)，胞间连丝常常表现出较强的过氧化物酶活性。在纤维发育后期，细胞壁呈现多层结构，St层和S1层相间排列。过氧化物酶反应在各层表现不同，其中，胞间层酶反应最强烈，其次是St各层，S1各层酶反应最弱(图版十五，3, 4)。原生木质部导管、后生木质部导管具有较强的过氧化物酶活性(图版十四，4)。

3 讨论:

目前，一般认为在木质化的最后一步，即由木质素单体(p-hydroxycinnamyl alcohols)多聚化形成木质素是由过氧化物酶催化的(Fukuda & Komamine, 1982; Stich & Ebermann, 1988)。在竹茎中，木质素的生物合成需要过氧化物酶的参与(Higuchi, 1957)。Scurfield 和 Wardrop (1963)报道木质部分子次生壁加厚过程早于其木质化过程，过氧化物酶活性的分布与木质素迅速沉积的部位十分一致。Hepler(1970, 1972)基于对 *Coleus* 受伤导管的木质素与过氧化物酶细胞定位的一致性，认为过氧化物酶参与了木质化过程。Yoshizawa 等(1991)利用若丹明B荧光法对毛竹过氧化物酶的组织学定位进行了观察，结果显示过氧化物酶反应部位与木质素的定位相吻合。虽然过氧化物酶活性几乎在所有组织中都存在，但在已木质化或者正在木质化的组织中酶反应最强烈。在韧皮部和基本薄壁组织细胞也有明显的酶反应，虽然这两种组织均没有木质化，表明分布于这两种组织细胞壁上的过氧化物酶与木质化没有直接的关系。

在我们的观察中，靠近韧皮部和后生木质部导管的纤维细胞壁及

后生木质部导管壁具有较强的过氧化物酶反应,这些组织细胞壁正在活跃地进行木质素合成,同时外围的纤维细胞壁也表现出较强的酶活性,这些纤维细胞壁即将开始木质化过程。纤维细胞壁中过氧化物酶活性随其木质化程度不同而有变化,在木质化发生之前,过氧化物酶仅分布于细胞角隅处,随着次生壁的加厚、木质化的进行,过氧化物酶出现在次生壁中,木质化最活跃的时期也是酶活性最高的时期,当纤维细胞壁木质化完成时,过氧化物酶活性下降。

在纤维细胞壁超微结构中,细胞壁呈现多层结构,木质素在复合胞间层中含量最高,其次是St各层,最后是SI各层,St层与SI层相间排列。过氧化物酶活性表现与木质素分布十分吻合,过氧化物酶活性也是在复合胞间层中含量最高,St各层次之,SI各层最低,过氧化物酶的这种分布较好地解释了纤维细胞壁各层结构中木质素含量高、低相间分布的规律。

过氧化物酶的分布与木质素沉积出现在细胞壁的不同区域,但在韧皮部和基本薄壁组织细胞(尤其短薄壁细胞)中,也表现出很强的过氧化物酶反应,虽然这两种组织均没有木质化,表明分布于这两种组织细胞壁上的过氧化物酶与木质化没有直接的关系。植物细胞中含有多种过氧化物酶同工酶,其活性的表达具有组织特异性,或由发育程序来控制,或受环境条件的影响(李雄彪和吴琦,1993)。Mader等(1980)在烟草(*Nicotiana tabacum*)中发现了3种过氧化物酶同工酶,第一组仅分布于细胞壁中,第二组、第三组不仅分布于细胞壁中,而且也存在于原生质体中。其中,第一组催化木质素生物合成的活性最高。由此推测,在竹茎不同组织中分布的过氧化物酶是不同的同工酶形式,功能上是有差异的,不能简单地把过氧化物酶活性高的区域与木质化发生的区域连接起来。

六 结论

根据本文研究结果,主要得到以下几点结论:

1. 毛竹茎的原生木质部导管在维管束发育早期就已木质化;后生木质部导管和纤维细胞在维管束分化完成后,自胞间层和细胞角隅处开始木质化;基本薄壁组织细胞木质化的发生较晚,通常在茎的节

间完成伸长生长后才开始,但也有少数薄壁组织细胞始终保持非木质化的薄壁状态。根据可见光显微分光光度的分析结果,纤维细胞壁在木质化的早期,主要形成愈创木基木质素(guaiacyl lignin),随着木质化过程的发展,紫丁香基木质素(syringyl lignin)含量不断增加,最后成为纤维细胞壁木质素的主要组成成分。导管分子的木质素主要成分为愈创木基木质素,基本薄壁组织细胞壁为愈创木基与紫丁香基两种。

2. 毛竹茎各组织在紫外光激发下自发荧光的荧光显微分光光度分析表明,氨水处理可以有效地识别阿魏酸的分布,如在竹笋各种幼嫩组织中均分布有阿魏酸;而用过氧化氢/冰醋酸混合液处理,则可以区分木质素与结合于半纤维素中的阿魏酸和对-香豆酸,随着毛竹茎的生长和细胞壁木质化的增加,阿魏酸的含量下降。

3. 通过对毛竹茎纤维细胞壁木质化过程中超微结构的观察表明,高尔基体、高尔基小泡、内质网、壁旁体等细胞器在木质素前体的形成和运输等方面均起着重要作用,周质微管在细胞壁木质化过程中也起着一定作用。木质素在细胞壁中的沉积方式分别为:胞间层的木质素呈分散的颗粒状沉积方式,导管次生壁的木质素为片层状沉积方式,而在纤维细胞次生壁 S1 层中,木质素为团块状的沉积方式。木质素沉积方式与纤维素微纤丝的排列有密切关系。

4. 在毛竹茎各组织的细胞壁尚未木质化之前,过氧化物酶仅分布于细胞角隅处,随着细胞次生壁的增厚和木质化的增强,过氧化物酶可大量出现在次生壁中;在纤维细胞次生壁中,木质素含量较高的 St 各层,过氧化物酶活性也较强,而木质素含量较低的 S1 各层,过氧化物酶活性则较弱。由此表明,过氧化物酶直接参与了细胞壁木质素的合成。另外,在茎的部分基本薄壁组织细胞和韧皮部等未木质化的细胞壁中,过氧化物酶也同样表现出较强的活性,这说明在茎的不同组织中分布的这种酶,可能是几种不同功能的同工酶形式。

参 考 文 献

1. 丁雨龙, Liese W. 竹节解剖构造的研究. 竹子研究汇刊 1995, 14(1): 24-32
2. 耿伯介, 王正平等. 中国植物志(第九卷, 第一分册), 禾本科·竹亚科. 科学出版社 1996
3. 简令成. 细胞化学方法. 孙敬三, 钱迎倩主编, 植物细胞学研究方法. 科学出版社, 1987, 133-217
4. 李雄彪, 吴琦. 植物细胞壁. 北京大学出版社, 1993
5. 李正理等. 几种国产竹材的比较解剖观察. 植物学报 1960, 9(1): 76-95
6. 李正理等. 国产竹材的比较解剖观察续报. 植物学报 1962, 10(1): 15-28
7. 母锡金. 薄切片技术. 孙敬三, 钱迎倩主编, 植物细胞学研究方法. 科学出版社, 1987, 1-39
8. 魏学智等. 广西产四种竹材的比较解剖研究. 竹子研究汇刊 1998, 17(1): 18-23
9. 魏学智等. 竹秆的结构与变性. 植物学通报 1997, 14(4): 30-37
10. 温太辉, 周文伟. 中国竹类维管束解剖形态的研究初报. 竹子研究汇刊 1984, 3(1): 1-21
11. 邬义明. 植物纤维化学(第二版). 中国轻工业出版社, 1991
12. 肖江华等. 10万亩笋材两用毛竹丰产林基地建设技术报告. 竹类研究 1994, 13(1): 32-37
13. 熊文愈等. 毛竹秆茎的解剖构造. 植物学报 1980, 22(4): 343-348
14. 熊文愈等. 竹类植物的居间分生组织和节间生长. 林业科学 1980, 16(2): 81-89
15. 腰希申等. 中国主要竹材微观构造. 大连出版社, 1993
16. 张光楚等. 竹子育种工作现状及前景. 竹子研究汇刊 1998, 17(1): 6-9
17. 张齐生等. 中国竹材工业化利用. 中国林业出版社, 1995
18. 朱澂. 植物体细胞的微管周期及微丝周期. 徐是雄, 朱澂主编, 植物细胞骨架. 1996, 科学出版社, 60-83
19. Agarwal U P; Atalla R H. In situ Raman microprobe studies of plant cell walls: Macromolecular organization and compositional variability in the secondary wall of *Picea mariana*. *Planta*, 1986, 169: 325-332
20. Alvin K, Murphy R. Variation in fibre and parenchyma wall

- thickness in culms of the bamboo *Sinobambusa tootsik*. *IAWA Bull*, 1988, 9: 353-361
21. Atalla R H, Agarwal U P. Raman microprobe evidence for lignin orientation in the cell walls of native woody tissue. *Science*, 1985, 227: 636-638
 22. Bao W et al. A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. *Science*, 1993, 260: 672-674.
 23. Barnett J R. Tracheid differentiation in *Pinus radiata*. *Wood Sci. Technol.* 1977, 11: 83-92.
 24. Baucher M et al. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Critical Review in Plant Science*, 1998, 17:125-197
 25. Bland D E et al. The mechanism of permanganate and osmium tetroxide fixation and the distribution of lignin in the cell wall of *Pinus radiata*. *Holzforschung*, 1971, 25, 137-143.
 26. Boudet A M. A new view of lignification. *Trends in plant science*, 1998, 3: 67-71
 27. Boudet A M et al. Biochemistry and molecular biology of lignification. *New phytol*, 1995, 129: 203-236
 28. Chabanet A et al. Characterization and localization of a phenoloxidase in mung bean hypocotyl cell walls. *Plant Physiol*, 1994, 106: 1095-1102
 29. Czaninski Y et al. Cytochemical localization of hydrogen peroxide in lignifying cell walls. *Ann Bot*, 1993, 72: 547-550
 30. Dean J F D, Eriksson K E. Biotechnological modification of lignin structure and composition in forest trees. *Holzforschung*, 1992, 46: 135-147
 31. Dean J F D, Eriksson K E. Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. *Holzforschung*, 1994, 48: 21-33
 32. Desphande B P. Observations on the fine structure of plant cell walls. 1. Use of permanganate staining. *Ann Bot*, 1976, 40: 433-437
 33. Dharmawardhana D P. Characterization of vascular lignification in *Arabidopsis thaliana*. *Can J Bot*, 1992, 70: 2238-2244
 34. Ding Y et al. Anatomical studies on the rhizome of some monopodial bamboos. *Chinese J Bot*, 1993, 5(2): 122-129
 35. Donaldson L A. Mechanical constraints on lignin deposition during lignification. *Wood Sci Technol*, 1994, 28: 111-118.
 36. Driouich A et al. Characterization and localization of laccase forms

- in stem and cell cultures of sycamore. *Plant J*, 1992, 2(1): 13-24
37. Emons A M C. Methods for visualizing cell wall texture. *Acta Bot Neerl*, 1988, 37: 31~38
 38. Engels F M, Jung H G. Alfalfa stem tissues: cell wall development and lignification. *Ann Bot*, 1998, 82: 561-568
 39. Eriksson I et al. Lignin distribution in birch (*Betula verrucosa*) as determined by mercurization with SEM- and TEM-EDXA. *Wood Sci Technl*, 1988, 22: 251~257
 40. Faix O. Classification of lignins from different botanical origins by FI-IR spectroscopy. *Holzforschung*, 1991, 45: suppl. 21-27
 41. Fergus B J, Goring D A I. The distribution of lignin in birch wood as determined by ultraviolet microscopy. *Holzforschung*, 1970, 24: 118-124
 42. Ferrer M A et al. Oxidation of coniferyl alcohol by cell wall peroxidases at the expense of indole-3-acetic acid and O₂. *FEBS Letters*, 1990, 276: 127-130.
 43. Fineran B A. Cyto-and histochemical demonstration of lignins in plant cell walls: an evaluation of the chlorine water/ethanolamine-silver nitrate method of Coppick and Fowler. *Protoplasma*, 1997, 198: 186-201
 44. Freudenberg K. The constitute and biosynthesis of lignin. In: Freudenberg K. Neish A C. The constitute and biosynthesis of lignin. Springer, New York, 45-122, 1968
 45. Fujii Y et al. Chemical composition change of bamboo accompanying its growth. *Holzforschung*, 1993, 47: 109~115
 46. Fujii Y et al. Distribution of esterified phenolic acids in cell walls of immature bamboo. *Bull Kyoto Univ For*, 1991, 63: 272~282
 47. Fujii T. Cell wall structure of the culm of *Azumanezasa* (*Pleioblastus chino*). *Mokuzai Gakkaishi*, 1985, 31: 865-872
 48. Fujino T, Itoh T. Changes in the three dimensional architecture of the cell wall during lignification of xylem cells in *Eucalyptus tereticornis*. *Holzforschung*, 1998, 52: 111-116
 49. Fukuda H, Komamine A. Lignin synthesis and its related enzymes as markers of tracheary-element differentiation in single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Planta*, 1982, 155: 423-430
 50. Fukushima K, Terashima N. Heterogeneity in formation of lignin.

- XV. Formation and structure of lignin in compression wood of *Pinus thunbergii* studied by microautoradiography. *Wood Sci Technol*, 1991, 25: 371-381
51. Goldberg R et al. Localization and properties of cell wall enzyme activities related to the final stages of lignin biosynthesis. *J Exp Bot*, 1985, 36: 503-510
 52. Grima-Pettenati J et al. Molecular cloning and expression of a *Eucalyptus gunnii* cDNA clone encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Plant Mol Biol*, 1993, 21: 1085-1095
 53. Grosser D, Liese W. On the anatomy of Asian bamboos with special reference to their vascular bundles. *Wood Sci Technol*, 1971, 5: 290-312
 54. Haddon L, Northcote D. Correlation of the induction of various enzymes concerned with phenylpropanoid and lignin synthesis during differentiation of bean callus (*Phaseolus vulgaris* L.). *Planta*, 1976, 128: 155-162
 55. Harkin J M, Obst J R. Lignification in trees: indication of exclusive peroxidase participation. *Science*, 1973, 180:296-297
 56. Harris P J, Hartley R D. Detection of bound ferulic acid in cell walls of the Gramineae by ultraviolet fluorescence microscopy. *Nature*, 1976, 259: 508-510
 57. He L, Terashima N. Formation and structure of lignin in monocotyledons. II. *Mokuzai Gakkaishi*, 1989, 35: 123~129
 58. He L, Terashima N. Formation and structure of lignin in monocotyledons. IV. Deposition process and structural diversity of the lignin in the cell wall of sugarcane and rice plants studied by ultraviolet microscopic spectroscopy. *Holzforschung*, 1991, 45: 191-198
 59. Hennion S et al. Activities of enzymes involved in lignification during the postharvest storage of etiolated asparagus spears. *Physiol Plant*, 1992, 86: 474-478
 60. Hepler P K et al. Cytochemical localization of peroxidase activity in wound vessel members of *Coleus*. *Can J Bot*, 1972, 50: 977-983
 61. Hepler P K et al. Lignification during secondary wall formation in *Coleus*: an electron microscopic study. *Amer J Bot*, 1970, 57: 85-96
 62. Higuchi T. Biochemical studies of lignin formation. *Physiol Plant*, 1957, 10: 356-372

63. Hutzler P et al. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *J Exp Bot*, 1998, 49: 953-965
64. Ingold E et al. L- α -Aminoxy- β -phenylpropionic acid inhibits lignification but not the differentiation to tracheary elements of isolated mesophyll cells of *Zinnia elegans*. *Physiol Plant*, 1990, 78: 67-74
65. Itoh T. Lignification of bamboo (*Phyllostachys heterocycla* Mitf.) during its growth. *Holzforschung*, 1990, 44: 191~200
66. Itoh T, Ogawa T. Molecular architecture of cell wall of poplar suspension-culture cells revealed by rapid-freezing and deep-etching techniques. *Plant Cell Physiol*, 1993, 34: 1187-1196
67. Keller B et al. Specific localization of a plant cell wall glycine-rich protein in protoxylem cells of the vascular system. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1989,86: 1529-1533
68. Kim Y S, Koh H B. Immuno electron microscopic study on the origin of middle wood lignin. *Holzforschung*, 1997, 51: 411-413
69. Kutscha N P, Schwarzmann J M. The lignification sequence in normal wood of balsam fir(*Abies balsamea*). *Holzforschung*, 1975: 29: 79-84
70. Lagrimini L et al. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissue specific expresion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84: 7542-7546
71. Lewis N G, Yamamoto E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol*, 1990, 41: 455-496
72. Liese W, Weiner G. Ageing of bamboo culms: A review. *Wood Sci Technol*, 1997, 30: 67- 89
73. Liu L et al. A laccase-like phenoloxidase is correlate with lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* stem tissues. *Plant J*, 1994, 6: 213-224
74. Mader M et al. The role of peroxidase isozyme groups of *Nicotiana tobacum* in hydrogen peroxide formation. *Planta*, 1980, 147: 467-470
75. Meshitsuka G, Nakano J. Studies on the mechanism of lignin color reaction (XIII). *Mokuzai Gakkaishi*, 1979, 25: 588-594

76. Minocha S, Halperin W. Enzymatic changes and lignification in relation to tracheid differentiation in cultured tuber tissue of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Can J Bot*, 1976, 54: 79-89
77. Murphy R, Alvin K. Fibre maturation in the bamboo *Gigantochloa scortechinii*. *IAWA J*, 1997, 18(2): 147-156
78. Murphy R, Alvin K. Variation in fibre wall structure of bamboo. *IAWA Bull*, 1992, 13: 403-410.
79. Musel G et al. Structure and distribution of lignin in primary and secondary cell walls of maize coleoptiles analyzed by chemical and immunological probes. *Planta*, 1997, 201: 146-159
80. Nakashima J et al. Direct visualization of lignifying secondary wall thickenings in *Zinnia elegans* cells in culture. *Plant Cell Physiol*, 1997, 38(7): 818-827
81. Nakashima J et al. Immunocytochemical localization of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamyl alcohol dehydrogenase in differentiating tracheary elements derived from *Zinnia mesophyll* cells. *Plant Cell Physiol*, 1997, 38(2): 113-123
82. Nelmes B J et al. A possible function of microtubules suggested by their abnormal distribution in rubbery wood. *J Cell Sci*, 1973, 13: 741-751.
83. Niemann G J et al. Differentiation between tissues from carnation (*Dianthus caryophyllus*) stems by pyrolysis-mass spectrometry. *Ann Bot*, 1990, 65: 461-472
84. Nose M et al. Evidence for sequential biosynthetic steps during lignin polymerisation. *Phytochemistry*, 1995, 39: 71-79
85. O'Malley D M et al. The role of laccase in lignification. *Plant J*, 1993, 4(5): 751-751
86. Olson P D, J E. Varner Hydrogen peroxide and lignification. *Plant J*, 1993, 4(5): 887-892
87. Parameswaran N, Liese W. A note on the fine structure of protoxylem elements in bamboo. *IAWA Bull*, 1978, 2-3: 29-32
88. Parameswaran N, Liese W. Occurrence of warts in bamboo species. *Wood Sci Technol*, 1977, 11: 313-318
89. Parameswaran N, Liese W. On the fine structure of bamboo fibres. *Wood Sci Technol*, 1976, 10: 231-246
90. Parameswaran N, Liese W. On the polylamellate structure of

- parenchyma wall in *Phyllostachys edulis*. *IAWA Bul*, 1975, 4:57-58
91. Parameswaran N, Liese W. Ultrastructural aspects of bamboo cells. *Cellulose Chem Technol*, 1980, 14(5): 587-609.
 92. Pickett-Heaps J D. Xylem wall deposition: Radiographic investigations using lignin precursors. *Protoplasma*, 1968, 65: 181-205
 93. Radotic K et al. A study of lignin formation at the molecular level by scanning tunneling microscopy. *Biophys J*, 1994, 66: 1763-1767 .
 94. Ros Barcelo A. Hydrogen peroxide production is a general property of the lignifying xylem from vascular plants. *Ann Bot*, 1998, 82: 97-103
 95. Ros Barcelo A. Peroxidase and not laccase is the enzyme responsible for cell wall lignification in the secondary thickening of xylem vessels in *Lupinus*. *Protoplasma*, 1995, 186: 41-44
 96. Ryser U et al. Structural cell wall proteins in protoxylem development: evidence for a repair process mediated by a glycine-rich protein. *Plant J*, 1997, 12(1): 97-111
 97. Ryser U, Keller B. Ultrastructural localization of a bean glycine-rich protein in unligified primary walls of protoxylem cells. *Plant cell*, 1992, 4: 773-783
 98. Saka S et al. Comparative studies on lignin distribution by UV microscopy and bromination combined with EDXA. *Wood Sci Technol*, 1982, 16: 269-277
 99. Satiat-Jeunemaitre B et al. Plant cell wall architecture is revealed by rapid-freezing and deep-etching. *Protoplasma*, 1992, 167: 33-42
 100. Schreiber L. Chemical composition of casparian strips isolated from *Clivia miniata* Reg. Roots: evidence for lignin. *Planta*, 1996, 199: 596-601
 101. Scurfield G, Wardrop A. The nature of reaction wood. VII. Lignification in reaction wood. *Aust J Bot*, 1963, 11: 107-116
 102. Sederoff R et al. Genetic regulation of lignin biosynthesis and the potential modification of wood by genetic engineering in loblolly pine. In: Ellis B E et al., eds. Genetic engineering of plant secondary metabolism. New York: Plenum Press. 1994
 103. Sewalt V J H et al. Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of L-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase. *Plant*

- Physiol*, 1997, 115: 41-50
104. Shimada M et al. Metabolism of *p*-coumaric acid during lignification of a bamboo. *Phytochemistry*, 1970, 9: 1-4
 105. Smith C G et al. Tissue and subcellular immunolocalisation of enzymes of lignin synthesis in differentiating and wounded hypocotyl tissue of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Planta*, 1994, 192: 155-164
 106. Srivastava L M. Histochemical studies on lignin. *Tappi*, 1966, 49: 173-183
 107. Stich K, Ebermann R. Investigation of the substrate specificity of peroxidase isoenzymes occurring in wood of different species. *Holzforschung*, 1988, 42: 221-224
 108. Takabe K et al. Autoradiographic investigation of lignification in the cell wall of cryptomeria (*Cryptomeria japonica*). *Mokuzai Gakkaishi*, 1985, 31: 613-619
 109. Takabe K et al. Distribution of guaiacyl and syringyl lignins in Japanese beech (*Fagus crenata*): variation within an annual ring. *IAWA Bull*, 1992, 13(1): 105-112
 110. Taylor J G et al. Dispersed lignin in tracheary elements treated with cellulose synthesis inhibitors proves evidence that molecules of the secondary cell wall mediate wall patterning. *Plant J*, 1992, 2: 959-970
 111. Terashima N et al. Heterogeneity in formation of lignin. XI. An autoradiographic study of the heterogeneous formation and structure of pine lignin. *Wood Sci Technol*, 1988, 22: 259-270
 112. Terashima N, Fukushima K. Heterogeneity in formation of lignin. X. Visualization of lignification process in differentiating xylem of pine by microautoradiography. *Holzforchung*, 1988, 42: 347-350
 113. Vallet C et al. Histochemistry of lignin deposition during sclerenchyma differentiation in alfalfa stems. *Ann Bot*, 1996, 78: 625-632
 114. Wardrop A B. Lignification of the plant cell wall. *Appl Polym Symp*, 1976, 28: 1041-1063
 115. Wardrop A B. The phase of lignification in the differentiation of wood fibers. *Tappi*, 1957, 40: 225-243
 116. Whetten R et al. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol*, 1998, 49: 585-609

117. Willemse M T M, Den Outer R W. Stem anatomy and cell wall autofluorescence during growth of three maize (*Zea mays* L.) cultivars. *Acta Bot Neerl*, 1988, 37: 39~47
118. Willemse M T M, Emons A M C. Autofluorescence and HPLC analyses of phenolics in *Zea mays* L. stem cell walls. *Acta Bot Neerl*, 1991, 40:115~124
119. Wilson M A et al. 1,3,5,-Hydroxybenzene structures in mosses. *Phytochemistry*, 1989, 28: 1395-1400
120. Ye Z H et al. Comparative localization of three classes of cell wall proteins. *Plant J*. 1991, 1: 175-183
121. Ye Z H, Varner J E. Tissue specific expression of cell wall proteins in developing soybean tissues. *Plant cell*, 1991, 3: 23-27
122. Yoshinaga A et al. Secondary wall thickening and lignification of oak xylem components during latewood formation. *Mokuzai Gakkaishi*, 1997, 43: 377-383
123. Yoshizawa N et al. Distribution of guaiacyl and syringyl lignins in normal and compression wood of *Buxus microphylla* var. *insularis* Nakai. *IAWA J*, 1993, 14: 139-151
124. Yoshozawa, N et al. Lignification and Peroxidase activity in bamboo shoots (*Phyllostachys edulis*). *Holzforschung*, 1991, 45: 169-174

图版说明

缩写符号:

Er: 内质网 F: 纤维 G: 高尔基体 Gv: 高尔基小泡 Li: 脂质体 Lo: 壁旁体 Me: 质膜 Mi: 线粒体 MI: 胞间层 Mt: 微管 MV: 后生木质部导管 N: 细胞核 Pa: 基本薄壁组织 PH: 韧皮部 Pl: 质体 Pm: 胞间连丝 Pr: 筛分子蛋白体 Pt: 纹孔 PV: 原生木质部导管 Sl: 次生壁 Sl 层 St: 次生壁 St 层 SW: 次生壁 V: 液泡 W: 细胞壁

图版I:

① 竹笋顶端, 番红固绿染色, 发育早期的维管束, 韧皮部和原生木质部导管已经形成, 后生木质部导管和纤维尚未分化完全。×160 ② 竹笋顶端, 钉红染色, 原生木质部导管和韧皮部之外的组织染成浅红色。×160 ③ 竹笋基部, 刚果红染色, 韧皮部和薄壁组织细胞被染成红色, 纤维和导管染成黄色。×160 ④ 竹笋基部, Maule 反应, 纤维, 尤其纤维胞间层呈红色, 导管为棕色。×160 ⑤ 一年生竹茎, Weisner 反应, 纤维呈现深红色, 基本薄壁组织为浅红色。×63 ⑥ 七年生竹茎, 番红固绿染色, 大部分基本薄壁组织细胞已经木质化, 仍有少数细胞保持非木质化状态(箭头所示)。×250

图版II:

毛竹不同生长时期茎的横切面在偏光显微镜下, 显示细胞壁双折射性。①竹笋顶部, 维管束处于分化早期, 示韧皮部、原生木质部导管和淀粉粒具有强烈的双折射性。×100 ②竹笋中部, 示后生木质部导管、纤维、基本薄壁组织细胞壁双折射性增加。×100 ③竹笋基部, 示茎中所有组织均具有强烈的双折射性。×100 ④七年生竹茎。×40 ⑤七年生竹茎, 示纤维细胞壁多层结构。×400 ⑥七年生竹茎, 示基本薄壁组织细胞壁多层结构。×200

图版III:

毛竹不同生长时期茎的横切面经氨水、氢氧化钠、过氧化氢/冰醋酸处理后在紫外光激发下的自发荧光。①竹笋顶部, 所有组织均产生

兰色荧光，其中韧皮部和原生木质部导管最强。×380 ②竹笋顶部，过氧化氢/冰醋酸处理后，仅原生木质部导管保持自发荧光。×380 ③竹笋基部，所有组织均产生兰色荧光。④竹笋基部，经氨水处理后，韧皮部的荧光颜色变为绿色。×190 ⑤竹笋基部，过氧化氢/冰醋酸处理后，纤维和导管保持较强荧光，韧皮部和基本薄壁组织细胞壁荧光消失或明显降低。×190 ⑥竹笋基部，氢氧化钠处理后，所有组织荧光减弱。×190

图版IV:

七年生毛竹茎的横切面经氨水、氢氧化钠、过氧化氢/冰醋酸处理后在紫外光激发下的自发荧光。①未处理竹茎所有组织均产生兰色荧光。×63 ②过氧化氢/冰醋酸处理后，韧皮部自发荧光消失。×63 ③经氨水处理后，韧皮部的荧光颜色变为绿色。×63 ④氢氧化钠处理后，所有组织荧光减弱，纤维细胞壁荧光颜色变为黄色。×63

图版V---图版VIII 纤维细胞不同发育阶段细胞超微结构。

图版V:

①纤维发育早期，具有较大的细胞核和核仁，多个小液泡。×25500 ②示周质微管沿质膜内侧平行排列。×56000 ③示周质微管呈不同方向的排列。×28900 ④高尔基体向着细胞壁的一侧产生大量高尔基小泡。内质网也产生一些小泡，向细胞壁靠近。×30000

图版VI:

①示大量的内质网。×49500 ②示纹孔和胞间连丝。×36700 ③示周质微管沿质膜内侧平行排列和胞间连丝。×90000 ④示周质微管在质膜内侧的排列。×120000

图版VII:

①纤维发育后期，示内质网、线粒体、微管等细胞器。×18400 ②示微管排列在质膜内侧，质膜与细胞壁之间具有壁旁体，次生壁 S1 层木质素沉积呈现团块状。×17200 ③示纤维细胞壁不同层次及大量壁旁体。×35700 ④示纤维细胞壁不同层次及次生壁 S1 层木质素沉积

呈现团块状。×5600

图版VIII:

①示纤维细胞壁不同层次及次生壁 S1 层木质素沉积呈现团块状沉积方式。×37400 ②示导管次生壁木质素沉积呈现片层状沉积方式，胞间层呈现分散的颗粒状沉积方式。×54000

图版IX---图版XI原生木质部导管和后生木质部导管超微结构。

图版IX:

①竹笋中部维管束形态。×1900 ②发育早期的后生木质部导管。×3000 ③原生木质部导管的次生壁加厚。×4500 ④原生木质部导管的次生壁加厚。×11800

图版X: 发育早期的后生木质部导管。×29700

图版XI:

①原生木质部导管的次生壁。×6600 ②原生木质部导管的次生壁，示纤维素微纤丝平行排列，以及壁旁体和内质网。×50000 ③后生木质部导管和傍管细胞。×5250 ④后生木质部导管细胞壁，示片层状结构。×18000

图版XII:

韧皮部细胞超微结构。①竹笋中部维管束韧皮部的整体形态。×2400 ②筛管加厚的细胞壁，筛分子质体中的蛋白体。×33300 ③筛管具有纹孔的加厚的细胞壁及蛋白体。×20800 ④纹孔及胞间连丝。×20800

图版XIII---图版XV: 过氧化物酶的组织化学和细胞化学定位。

图版XIII:

①竹笋顶部，维管束发育早期。×160 ②竹笋基部，示短细胞和后生木质部导管具有较强的酶活性。×160 ③竹笋中上部，韧皮部和原生木质部导管具有较强的酶活性。×160 ④竹笋中下部，韧皮部和

后生木质部导管及纤维细胞角隅具有较强的酶活性。×160 ⑤竹笋基部，韧皮部、导管、纤维具有较强的酶活性。×160 ⑥完全伸长的当年生竹茎基部，韧皮部、导管、纤维和部分基本薄壁组织细胞具有较强的酶活性，靠近后生木质部导管的纤维酶活性降低。×160

图版XIV:

①竹笋中上部，韧皮部和原生木质部导管具有较强的酶活性，后生木质部导管、纤维、基本薄壁组织细胞角隅具有较高的酶活性。×1900 ②示基本薄壁组织细胞角隅具有较高的酶活性。×3000 ③示基本薄壁组织细胞角隅具有较高的酶活性。×7700 ④示原生木质部导管次生壁具有较高的酶活性。×24300

图版XV:

①次生壁形成后，纹孔和次生壁具有较高的酶活性。×38500 ②示基本薄壁组织细胞角隅具有较高的酶活性。×37500 ③纤维次生壁不同层次具有不同的酶活性，胞间层和 St 层具有较高的酶活性，S1层酶活性较低。×32000 ④胞间层和 St 层具有较高的酶活性。×77500

毛竹细胞壁自发荧光的显微荧光分光光度分析*

¹贺新强 ²李素文 ¹胡玉熹 ¹林金星**

¹(中国科学院植物研究所 北京 100093)

²(北京师范大学生物系 北京 100875)

摘要 利用冰冻切片、荧光显微镜、显微荧光分光光度计、组织化学等方法,观察分析了毛竹(*Phyllostachys pubescens* Mazel)茎不同组织在0.1 mol/L氨水、1 mol/L NaOH及过氧化氢/冰醋酸混合液处理前后细胞壁自发荧光变化。毛竹茎所有组织在紫外光激发下均产生蓝色荧光;氨水处理后,所有组织荧光强度增加,富含阿魏酸的组织,荧光颜色由蓝色转变为绿色,荧光发射光谱峰值由470 nm移至510 nm;NaOH处理使所有组织荧光强度降低;过氧化氢/冰醋酸混合液处理后,木质化组织仍保持较强的蓝色荧光,而未木质化的组织荧光消失。结果表明,原生木质部导管在维管束分化早期就已木质化;阿魏酸广泛分布于竹笋各种幼嫩组织中,随着毛竹生长、细胞壁木质化的发展其含量下降。此外,过氧化氢/冰醋酸混合液处理可以有效地区分木质素与结合于半纤维素中的酚酸成分。

关键词 自发荧光, 荧光发射光谱, 酚酸, 木质素, 毛竹

Microspectrofluorometric Analysis of Autofluorescence in the Cell Walls of *Phyllostachys pubescens* Culm*

¹HE Xin-Qiang ²LI Su-Wen ¹HU Yu-Xi (HU Yu-Shi) ¹LIN Jin-Xing**

¹(Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093)

²(Department of Biology, Beijing Normal University, Beijing 100875)

Abstract Autofluorescence in the cell walls of *Phyllostachys pubescens* Mazel culms was analyzed by ultraviolet fluorescence microscopy, microspectrofluorometer and histochemical staining before and after respective treatment with ammonia, NaOH and H₂O₂/HAC. All tissues of the bamboo culm showed blue autofluorescence under ultraviolet irradiation. With the treatment of ammonia, the tissues increased their fluorescence intensity, among which those rich in ferulic acid changed their color into green, the peak of fluorescence emission spectra shifted from 470 nm to 510 nm. Nevertheless, the fluorescence intensity of all tissues decreased dramatically after the treatment of NaOH. With H₂O₂/HAC treatment, the lignified tissues remained strong blue autofluorescence, while the fluorescence from unligified tissues disappeared. The results indicated that protoxylem vessels had already showed lignification before phloem and metaxylem formed in the tissues; ferulic acid was widely distributed in the young tissues of bamboo shoot, the content of which decreased with the progress of the lignification. It is further confirmed that H₂O₂/HAC treatment is an effective method to discriminate the phenolic acids bound to hemicelluloses from the phenolics existed in the lignin molecules.

Key words Autofluorescence, Fluorescence emission spectra, Phenolic acids, Lignin, *Phyllostachys pubescens*

细胞壁由于酚类物质的存在而在紫外光激发下产生蓝色自发荧光。植物种类不同,细胞壁中的酚类物质成分不同。对于裸子植物及多数双子叶植物,细胞壁中的酚类物质为木质素,这类植物细胞壁自发荧光主要是由于木质素的存在。但对于多数单

子叶植物尤其是禾本科植物及少数双子叶植物来说,细胞壁中的酚类物质成分较为复杂,除了木质素之外,还有结合于半纤维素中的酚酸,如阿魏酸(ferulic acid)、对-香豆酸(*p*-coumaric acid)等,这类植物细胞壁自发荧光则是由木质素及结合于半纤维素

* 国际热带木材组织和教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(No. PD 20/95 REV.2(1))。Supported by grants from the International Tropical Timber Organization (ITTO) and State Education Ministry of China (No. PD 20/95 REV.2(1))。

的酚酸共同产生的。自发荧光能够反映出植物发育过程中细胞壁酚类物质成分的变化^[1]。Harris 和 Artley^[2]的研究结果表明,利用氨水可以将结合于纤维素中的阿魏酸与木质素区别开。0.1 mol/L 氨水处理后,半纤维素中的阿魏酸自发荧光由蓝色变为绿色,而木质素仍保持蓝色^[2]。然而结合于半纤维素中的对-香豆酸与木质素一样在氨水处理前均产生蓝色荧光^[3]。由于这些结合于半纤维素中酚酸存在,使许多研究细胞壁木质化及木质素分化的方法,如荧光法、溴化法及汞化法^[4]等,在裸子植物和双子叶植物中十分有效,但用于禾本科植物则出现偏差。毛竹由于生长迅速,在短短的几个月内就完成其伸长生长,成为研究植物生长机制的材料。植物化学研究结果表明,竹子细胞壁中的类成分除木质素外,主要有两种酚酸结合于半纤维素中,即阿魏酸和对-香豆酸,其中对-香豆酸含量随木质素含量的升高而升高,而阿魏酸含量随木质素含量的升高而降低^[5,6]。虽然对毛竹茎秆木质化程度已做过研究^[7],但在木质化过程中酚酸在各组织细胞中的分布仍不清楚。本文利用荧光显微镜、微荧光分光光度计及组织化学方法,观察分析了竹笋不同组织在 3 种溶液处理前后细胞壁自发荧光的变化,试图寻求一种有效方法区分木质素与结合于半纤维素中的酚类物质,进而揭示毛竹木质化过程中酚酸在各组织细胞中的分布。

材料和方法

1998 年 4 月,自南京林业大学竹种园选取一株 1.5 m 高、健康生长的毛竹 (*Phyllostachys pubescens* (Zel)),自顶部、中部和基部各选取一节间,切成 0.5 cm³ 小块,50%酒精固定,保存在 70%酒精中。在冰切片机上切取 8 μm 厚的横切面切片,分别用下列方法处理:(1) 0.1 mol/L 氨水浸泡 5 min 后封片^[2];(2) 1 mol/L NaOH 60 °C 处理 30 min,然后用 1 L/L HCl 中和,蒸馏水冲洗后封片^[8];(3) 30%过氧化氢及 97%冰醋酸 1:1 体积比混合液 (H₂O₂/VAC) 100 °C 处理 30 min,蒸馏水冲洗后封片^[9]。切片用 50%甘油浸泡 30 min 后封片作为对照。木质素染色用盐酸-间苯三酚法^[10]。切片用荧光显微镜 (BX-50, Olympus) 观察、照相,荧光发射光谱由显微荧光光度计 (MPVII, Leitz) 和函数记录仪完成。

结果和讨论

自发荧光(图版 I, 1,3),自发荧光发射峰值在 470 nm 处(图 1,A)。用氨水处理后,所有组织的荧光强度均有所增加。在竹笋顶端的幼嫩组织中,除原生木质部导管外,其余组织细胞壁荧光均由蓝色变为绿色,表明阿魏酸广布于毛竹笋幼嫩组织中,而导管木质化始于维管束发育的很早时期。在竹笋的中部及基部,只有韧皮部荧光由蓝色变为绿色,荧光发射峰值由 470 nm 处移至 510 nm 处。而导管、纤维及薄壁组织细胞壁荧光均无明显的颜色变化(图版 I, 4; 图 1,B),表明这时阿魏酸已不是导管、纤维及薄壁组织细胞壁中的主要酚酸成分。HCl-间苯三酚染色结果表明导管和纤维呈正反应,而薄壁组织细胞为负反应,这一结果说明导管、纤维的自发荧光主要是由于木质素的分布,薄壁细胞壁的自发荧光则主要是由于对-香豆酸的存在。Fujii 等^[3]对香豆酸在紫外光激发下的自发荧光光谱进行分析,发现其荧光发射高峰在 390 nm,氨水处理后移至 436 nm,处理前后均表现为蓝色荧光。Shimada 等^[5]应用植物化学方法研究,认为对-香豆酸在竹笋中自顶端至基部其含量显著升高,而阿魏酸含量很少,他们研究的 3.6 m 高的竹笋从中部到基部对-香豆酸含量与阿魏酸含量的比值高于 55:1。Fujii 等^[6]也得到类似结果。He 和 Terashima^[11]利用放射自显影技术研究了水稻茎木质素的形成,结果表明阿魏酸在细胞壁形成早期积累,但在纤维的次生壁中,阿魏酸几乎没有,在导管和薄壁细胞中,对-香豆酸与阿魏酸的比例随木质化程度的不同有一定变化,木质化程度高则对-香豆酸含量就高。我们的观察结果与这些结论基本一致。

NaOH 处理使所有组织荧光强度降低,其中韧皮部和薄壁组织细胞的荧光强度降低幅度较导管和纤维明显(图版 I, 6; 图 1,C)。表明 NaOH 处理可以去除结合于半纤维素中的酚酸,引起韧皮部和薄壁组织细胞荧光强度降低,同时,它也能去除一些碱性木质素成分,引起导管和纤维荧光强度降低。类似的结果在玉米茎秆细胞壁中也有报道^[8]。

经 H₂O₂/HAC 处理后,竹笋顶端幼嫩组织中仅导管保持蓝色荧光,其余组织荧光完全消失(图版 I, 2)。在竹笋中部和基部,韧皮部荧光完全消失,薄壁组织细胞壁荧光显著降低,而纤维和导管仍保持较强的荧光强度(图版 I, 5; 图 1,D)。HCl-间苯三酚染色结果表明纤维和导管为木质化组织而韧皮部及薄壁组织细胞壁未木质化。

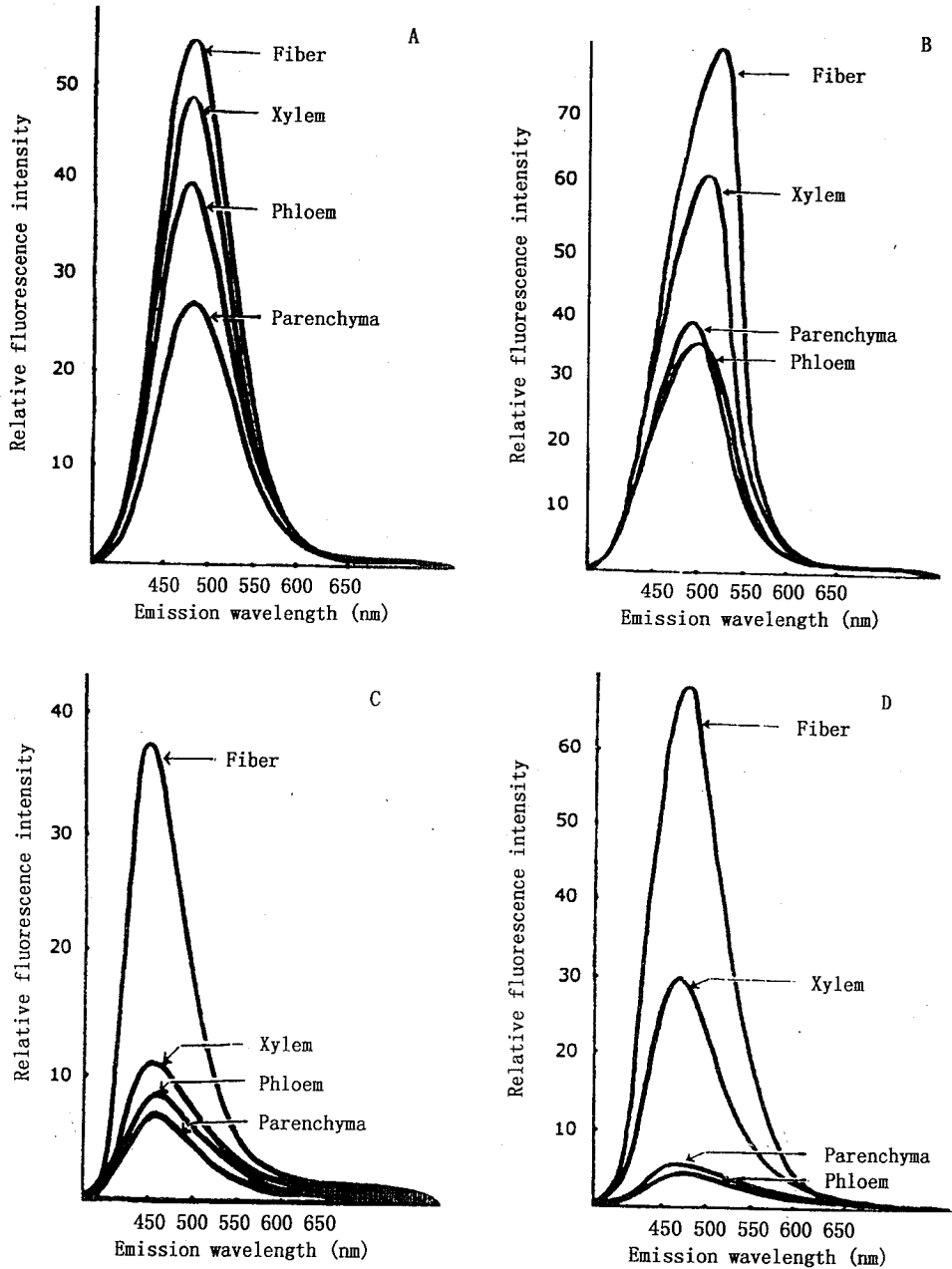


图1 毛竹茎中部纤维、导管、薄壁细胞及韧皮部细胞壁自发荧光发射光谱

Fig.1 Fluorescence emission spectra of cell walls of fiber, xylem, parenchyma and phloem in the middle portion of the shoot of *Phyllostachys pubescens*

A. Before treatment; B. Treatment with 0.1 mol/L ammonium hydroxide; C. Treatment with 1 mol/L NaOH; D. Treatment with H_2O_2/HAC .

和纤维素没有影响^[9]。这种方法曾被用于观察未木质化细胞壁中纤维素微纤丝的排列^[12]。我们的实验结果表明, H_2O_2/HAC 在抽提半纤维素的同时, 也抽提出结合于半纤维素中的酚酸, 包括对-香豆酸和阿魏酸等, 但对木质素成分没有影响。因此, 这种方法可以将木质素与结合于半纤维素中的酚酸有效地区分开来。为研究禾本科植物细胞壁木质化及木质

致谢 研究工作中得到北京师范大学生物系张鸿卿教授、南京林业大学丁雨龙教授的帮助, 特此感谢!

参 考 文 献

- 1 Willemse M T M, Den Outer R W. Stem anatomy and cell wall autofluorescence during growth of three maize (*Zea mays* L.) cultivars. *Acta Bot Neerl*, 1988, 37:39~47

microscopy. *Nature*, 1976, **259**:508 ~ 510

- 3 Fujii Y, Azuma J, Takabe K, Okamura K. Distribution of esterified phenolic acids in cell walls of immature bamboo. *Bull Kyoto Univ For*, 1991, **63**:272 ~ 282
- 4 Eriksson I, Lidbrandt O, Westermark U. Lignin distribution in birch (*Betula verrucosa*) as determined by mercurization with SEM- and TEM-EDXA. *Wood Sci Tech*, 1988, **22**:251 ~ 257
- 5 Shimada M, Yamazaki T, Higuchi T. Metabolism of *p*-coumaric acid during lignification of a bamboo. *Phytochemistry*, 1970, **9**:1 ~ 4
- 6 Fujii Y, Azuma J, Marchessault R H, Morin F G, Aibara S. Chemical composition change of bamboo accompanying its growth. *Holzforschung*, 1993, **47**:109 ~ 115
- 7 Itoh T. Lignification of bamboo (*Phyllostachys heterocycla* Miif.) during its growth. *Holzforschung*, 1990, **44**:191 ~ 200
- 8 Willemse M T M, Emons A M C. Autofluorescence and HPLC analyses of phenolics in *Zea mays* L. stem cell walls. *Acta Bot Neerl*, 1991, **40**:115 ~ 124
- 9 Desphande B P. Observations on the fine structure of plant cell walls. I. Use of permanganate staining. *Ann Bot*, 1976, **40**:433 ~ 437
- 0 Vallet C, Chabbert B, Czarninski Y, Monties B. Histochemistry of lignin deposition during sclerenchyma differentiation in alfalfa stems. *Ann Bot*, 1996, **78**:625 ~ 632
- 1 He L, Terashima N. Formation and structure of lignin in monocotyledons. II. Deposition and distribution of phenolic acids and their association with cell wall polymers in rice plants (*Oryza sativa*). *Mokuzai Gakkaishi*, 1989, **35**:123 ~ 129
- 2 Emons A M C. Methods for visualizing cell wall texture. *Acta Bot Neerl*, 1988, **37**:31 ~ 38

图 版 说 明

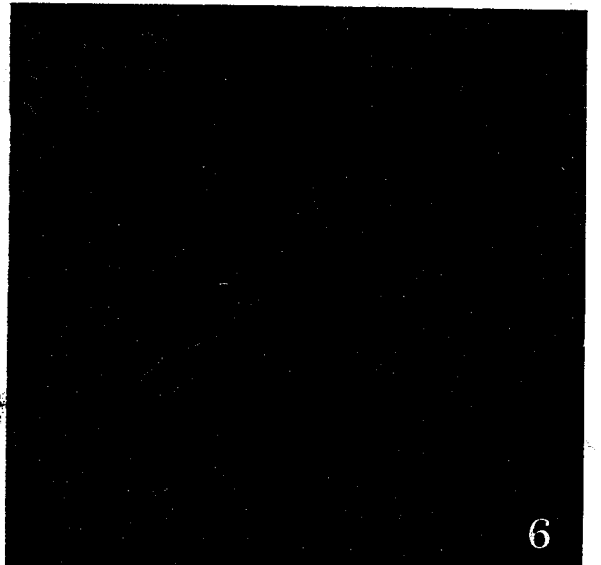
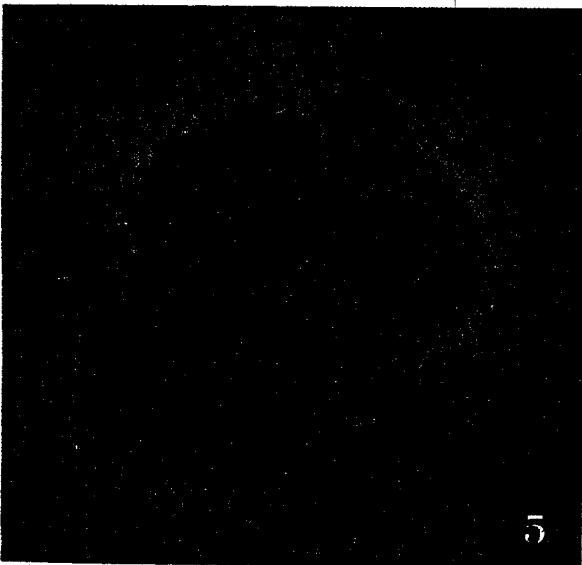
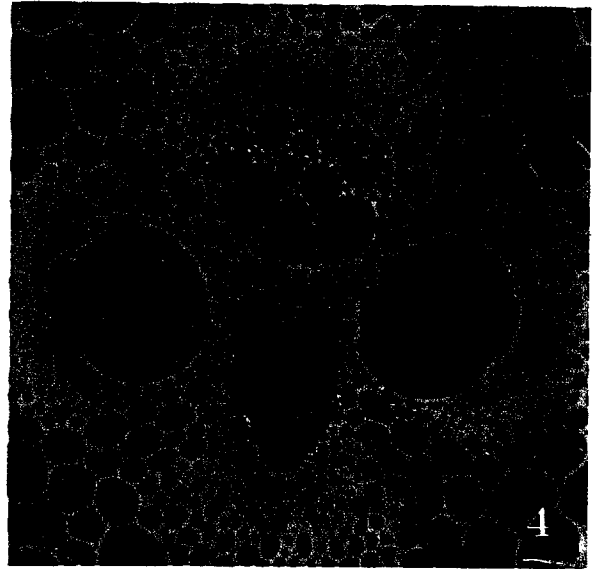
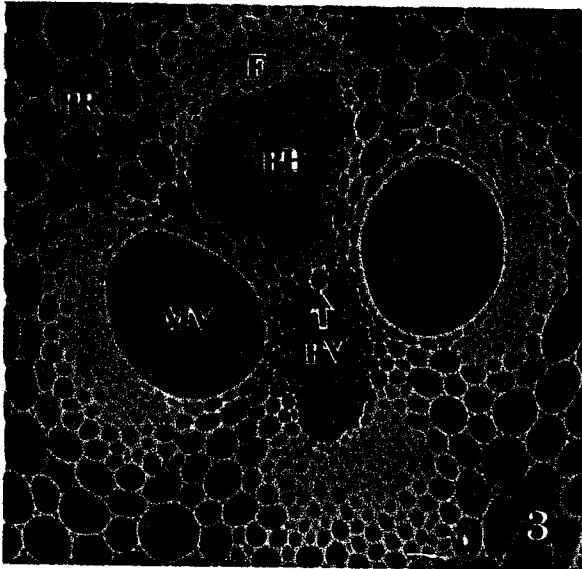
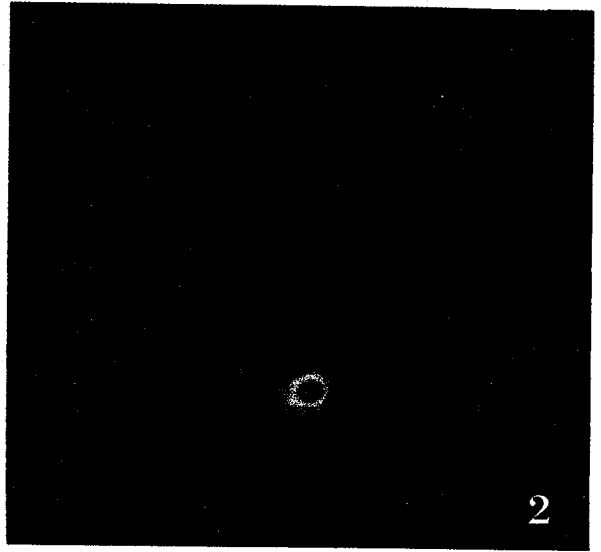
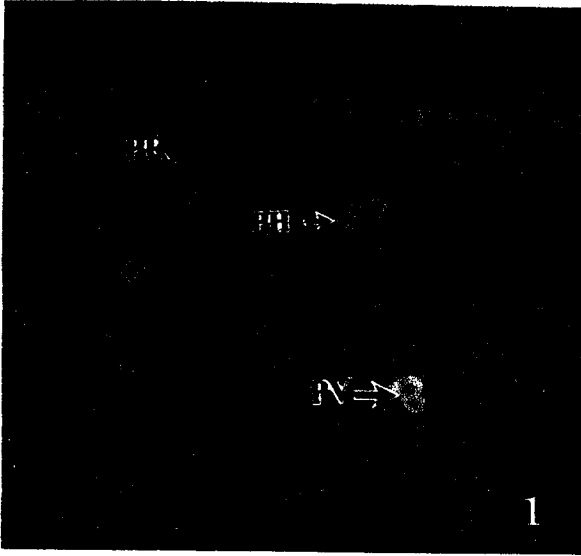
F. 纤维 MV. 后生木质部导管 PH. 韧皮部 PR. 薄壁组织 PV. 原生木质部导管

图版 I 1. 茎顶端幼嫩组织, 示处理前维管束发育早期各组织细胞壁自发荧光。×380 2. 茎顶端幼嫩组织, 示 H₂O₂/HAC 处理后仅导管产生自发荧光, 其余组织细胞壁自发荧光消失。×380 3. 茎中部, 示处理前各组织细胞壁自发荧光。×190 4. 茎中部, 示 0.1 mol/L 氨水处理后韧皮部自发荧光变为绿色。×190 5. 茎中部, 示 H₂O₂/HAC 处理后纤维和导管的自发荧光。×190 6. 茎中部, 示 NaOH 处理后所有组织的自发荧光减弱。×190

Explanation of Plate

F. Fiber MV. Metaxylem vessel PH. Phloem PR. Parenchyma PV. Protoxylem vessel

Plate I Fig. 1. Young tissues at the top of bamboo shoot, showing cell wall autofluorescence of various tissues at early stage of vascular bundle development before treatment. ×380 Fig. 2. Young tissues at the top of bamboo shoot. Note that only the protoxylem vessels show blue autofluorescence after H₂O₂/HAC treatment. ×380 Fig. 3. Middle portion of the bamboo shoot, the presence of autofluorescence in various tissues before treatment. ×190 Fig. 4. Middle portion of the bamboo shoot. Note that autofluorescence of phloem cells changes into green after treatment with ammonia. ×190 Fig. 5. Middle portion of the bamboo shoot. Note that autofluorescence of fiber and vessels remains blue after treatment with H₂O₂/HAC treatment. ×190 Fig. 6. Middle portion of the bamboo shoot, showing decrease in autofluorescence intensity after NaOH treatment. ×190



广西产四种竹材的比较解剖研究

魏学智¹ 贺新强² 胡玉熹² 林金星²

(1 山西师范大学 临汾 041000; 2 中国科学院植物研究所 北京 100093)

摘要 本文利用光学显微镜及计算机图像分析系统研究了广西产4种竹材马蹄竹、撑篙竹、车筒竹、越南巨竹的解剖性质,其中包括表皮层、副表皮层、皮层、维管束、纤维、基本薄壁组织以及髓环等组织的结构特征。结果表明:4种竹秆的表皮细胞均为一层,副表皮细胞1-2层,竹秆横切面上维管束在单位面积内的数目以撑篙竹最多,平均为4.08个/mm²,车筒竹最少为2.61个/mm²。导管直径由竹秆壁外侧向内逐渐增大,导管长度以竹秆壁中部最大,导管壁厚由竹秆壁外侧向内逐渐增大。纤维平均长度以越南巨竹最长,平均为2.72mm;纤维直径和壁厚最大,分别是撑篙竹(平均为15.68μm)和马蹄竹(平均为6.72μm)。竹秆壁中输导组织所占比例以中部最多,如撑篙竹高达12.1%;纤维组织在竹秆壁外侧最多,撑篙竹为64.39%。薄壁组织则以竹秆壁的中部和内侧较多,其中越南巨竹的薄壁组织以中部和内侧最多,分别占59.7%和74.7%,撑篙竹髓环细胞不特化为石细胞,马蹄竹髓环特化不明显,其余两种髓环细胞则高度特化。上述4种竹材的解剖特征与其物理机械特性及加工性质等均有密切关系,可为其开发利用提供重要依据。

关键词 竹材结构;马蹄竹;撑篙竹;车筒竹;越南巨竹;广西

1 前言

随着社会经济的发展,对木材的需求量不断增加,导致全球林木锐减。竹子生长快、产量高、用途广,因此许多国家都竞相研究竹材的基本特性、竹类资源的培育及其开发利用等。竹材的结构与竹材性质有着密切关系,了解竹材的结构对改进竹材性质、开发竹材的新用途等均可提供重要的参考依据。我国素有“竹子王国”之称,全世界有竹种70属1000余种,我国就有39属500余种。近年来,李正理、熊文愈、温太辉、江心、林万涛和吴顺昭等先后对国产竹材结构进行过研究。本文详细地比较研究了我国广西产4种竹材的解剖结构,并与已报道的部分国产竹材结

构进行比较,从而为合理开发和持续利用这4种竹材提供重要参考。

2 材料和方法

2.1 试验材料

本次试验选用4种广西产经济价值较高的合轴丛生型竹种。材料来自广西壮族自治区林业科学研究院竹类标本圃,竹龄均在3-4年,基本资料详见表1。

2.2 试验方法

每种选取竹秆3-4m处的一个节间,从此节间中部取长1cm、宽0.5cm的竹块10个。在沸水中煮至竹块下沉,将竹块移至20%的己二胺中软化。然后将竹块放入碳蜡中浸蜡包埋。用滑走切片机制片,切片厚度为20-25μm。细胞的离析采用铬酸-硝酸离析法。

表 1 试验用竹材基本资料

Table 1 Fundamental data of experimental bamboo species

种 名 Species	地 下 茎 Type of rhizome	竹 高 Height of culm(m)	秆 径 Diameter of culm(cm)	节 间 长 Length of internode(cm)	秆 壁 厚 Thickness of culm wall(mm)
马蹄竹 <i>Bambusa lapidea</i>	合轴	12	9	270	11
车筒竹 <i>B. sinospinosa</i>	Sympodial	20	10	300	13.2
撑篙竹 <i>B. pervariabilis</i>		12	6	400	6.5
越南巨竹 <i>Dendrocalamus yunnanensis</i>		12	12	400	11

在光学显微镜下结合康强图像分析系统,分别测量竹秆各种组织的比例和细胞大小等特征。

3 结果与讨论

3.1 表皮层

表皮是竹秆壁最外面的一层初生保护组织。4种竹材均仅有一层表皮细胞。在竹秆横切面上,表皮细胞均为长方形,垂周直径大于平周直径1.6(车筒竹)—2.4(撑篙竹)倍,细胞平周方向排列紧密。表面细胞的外壁厚于内壁,如越南巨竹和车筒竹的表皮细胞外壁厚度分别为12.90 μm 和1.65 μm ,而内壁分别仅为3.59 μm 和0.95 μm 。撑篙竹内外壁的比值最大为4.60,马蹄竹最小为2.45。4种竹材表皮细胞侧壁厚度不均匀,由外壁向内壁逐渐变薄。见表2。

3.2 副表皮层

竹材的副表皮细胞紧接表皮层。马蹄竹为1—2层,其余3种均为1层细胞。在横切面上,越南巨竹的副皮层细胞近于方形,其余3种均为长方形,长为宽的1.4(撑篙竹)—1.9(马蹄竹)倍。越南巨竹的副表皮层细胞壁为最厚(2.99 μm),而车筒竹最薄(1.06 μm),其余两种介于二者之间。李正理的研究认为“撑篙竹皮下层(即副表皮层)与皮层不易区分”,但事实上撑篙竹的副表皮层细胞比较特殊,即细胞内壁较薄为2.03 μm ,外壁较厚为3.35 μm ,二者相差1.32 μm ,这种特征似在其他竹种中尚未见报道。因此撑篙竹的副表皮层与皮层二者应极易区分。另外,根据吴顺昭的研究报道,复轴型竹材的副表皮细胞壁厚(4.43 μm)比单轴型竹材的薄(3.80 μm)。现就本文的观察表明,4种合轴型竹种的副表皮细胞壁平均壁厚为2.23 μm ,它们均比复轴型竹种和单轴型的细胞壁要薄。见表2。

表 2 四种竹材表皮、副表皮和皮层细胞特征的比较

Table 2 A comparison of cell characters of the epidermis, subepidermis and cortex in 4 bamboo species

竹 种 Species	表皮 Epidermis						副表皮 Subepidermis				皮层 Cortex			
	平周径 μm TD	垂周径 μm RD	平/垂 TD/RD	内壁厚 μm IT	外壁厚 μm OT	内壁/ 外壁 I/O	平周径 μm TD	垂周径 μm RD	平/垂 TD/RD	壁厚 μm WT	层数 Ly	形状 Shape	层数 Ly	壁厚 μm WT
马蹄竹	8.29	17.23	1:2.1	1.96	4.80	1:2.5	10.58	19.85	1:1.9	1.7	1-2	圆形	4-5	0.88
车筒竹	9.53	15.29	1:1.6	0.95	2.34	1:2.5	9.99	14.26	1:1.4	1.06	1	圆形	8-10	1.23
撑篙竹	8.82	21.27	1:2.4	2.96	9.51	1:4.6	9.70	13.8	1:1.4	外3.35 内2.03	1	圆形	2-4	2.03
越南巨竹	12.06	20.47	1:1.7	3.59	12.9	1:3.6	近乎等径直径为11.47	2.99	1	2.99	1	椭圆形	4	1.57
平均	9.68	18.57	1:1.9	2.14	7.39	1:3.5	10.09	15.97	1:1.6	2.23				1.43

TD: Tangential diameter; RD: Radial diameter; IT: Inner Cell Wall Thickness; OT: Outer Cell Wall Thickness; WT: Cell Wall Thickness; Ly: Layer

3.3 皮层

皮层是副表皮至维管束之间的各层细胞,在形状及细胞壁的厚度上很容易与副表皮细胞相区别,具体差异详见表2。根据吴顺昭(1976)的研究指出,竹子皮层细胞的层数可因竹种不同而异,多数介于3—7层,也有多达12—14层,此一结果与本文较为一致。皮层细胞壁的厚度除车筒竹近似于副表皮外,其余3种皮层细胞的壁厚均比副表皮层细胞薄。在不同竹种间以撑篙竹的皮层细胞壁最厚,并与副表皮细胞的内壁厚度相近,壁上的纹孔数目明显多于其它竹种。越南巨竹的皮层细胞由于受内外组织的挤压呈椭圆形,其余3竹种细胞均为圆形。

3.4 维管束

3.4.1 维管束形态变异

4种竹材维管束的类型都属于断腰型。在竹秆壁横切面上,从外到内维管束的形态变异十分明显,例如在竹秆外侧,维管束分化不完全,向内逐渐分化出韧皮部和木质部,在维管束内方和两侧的维管束鞘相连极为发达,而外侧的维管束鞘则比内方小。车筒竹和马蹄竹的第5—7层维管束,其内方维管束鞘中出现薄壁纤维群。在竹秆壁的中部,即7—8层维管束处分化出内纤维帽,形成典型的断腰型维管束,在10—14层维管束处内纤维帽细胞的直径逐渐增大,细胞壁逐渐变薄。在靠近髓腔的两层维管束则变得宽短,且内纤

维帽消失。越南巨竹内纤维帽的纤维细胞不如上述两种发达,厚壁纤维少、细胞腔比较大。撑篙竹维管束内纤维帽的纤维极为发达,细胞壁比较厚,木质化程度很高。

3.4.2 维管束大小

在4种竹材中,除车筒竹秆壁内侧的维管束径向长度最大以外,其余3种均是竹秆壁中部的最大。切向长度均以竹秆壁内侧最大。维管束的切向长度和径向长度均以车筒竹最大,撑篙竹最小,马蹄竹和越南巨竹介于二者之间。吴顺昭认为竹秆壁厚度与维管束切向宽度呈正相关关系,即竹秆壁越厚,维管束的切向宽度也越大。同样,在我们的观察中也发现,撑篙竹的秆壁厚度最小(平均6.5cm),其维管束的切向宽度平均为443.91 μ m;而车筒竹秆壁最厚(平均13cm),维管束的切向宽度竟平均达741.57 μ m。

3.4.3 维管束数目

位于竹秆壁横切面的不同部位上,维管束的形态和大小各不相同,故单位面积内维管束的个数也差异较大,如外侧最多平均为6.22个,中部次之为1.46个,内侧最少为1.14个。4种竹种间以撑篙竹的维管束最多,平均为4.08个,其中外侧为8.12个,中部为2.37个,内侧1.77个。车筒竹最少,平均2.1个,其中外侧为4.6个,中部为0.93个,内侧为0.78个,详见表3。

表3 4种竹种维管束大小的比较(单位:微米)

Table 3 The size of vascular bundles of four bamboo species (Unit: μ m)

	外侧 Outer			中部 Middle			内侧 Inner			平均 Average		
	弦向长度 TL	径向长度 RL	弦/径 T/R	弦向长度 TL	径向长度 RL	弦/径 T/R	弦向长度 TL	径向长度 RL	弦/径 T/R	弦向长度 TL	径向长度 RL	弦/径 T/R
马蹄竹	287.47	538.81	1:1.87	595.75	928.04	1:1.6	841.83	792.19	1:0.94	575.02	753.02	1:1.31
车筒竹	449.08	599.98	1:1.3	695.11	924.81	1:1.4	999.52	957.90	1:0.96	714.57	827.57	1:1.16
撑篙竹	258.42	459.17	1:1.78	455.30	818.48	1:1.8	618.02	641.23	1:1.04	443.91	641.06	1:1.44
越南巨竹	343.10	576.7	1:1.68	639.77	843.80	1:1.3	915.48	689.12	1:0.75	632.78	703.21	1:1.11
平均	334.52	543.34	1:1.62	596.78	878.60	1:1.5	843.71	770.11	1:0.92	591.57	731.21	1:1.24

TL: Tangential Length; RL: Radial Length; T/R: Tangential Length/Radial Length

3.4.4 导管

导管直径由竹秆壁外侧向内逐渐增大,这种变化趋势与维管束切向宽度的变化趋势是一致的。在 4 种竹材中,以越南巨竹的秆壁外侧与中部导管直径最大,分别为 $56.52\mu\text{m}$ 和 $158.18\mu\text{m}$,撑篙竹秆壁外侧与马蹄竹秆壁中部的导管直径最小,仅为 $35.28\mu\text{m}$ 和 $107.60\mu\text{m}$ 。内侧则以车筒竹的导管直径最大为 $215.13\mu\text{m}$,马蹄竹的导管直径最小为 $175.64\mu\text{m}$,越南巨竹和撑篙竹位于二者之间。

导管分子为长圆筒形,侧壁上有许多梯状纹孔。导管分子长度除车筒竹秆壁中部比内侧稍短外,其余 3 种均以中部最长,平均为 $687.55\mu\text{m}$ 。另外,越南巨竹的导管分子最长,平均为 $682.79\mu\text{m}$,其中内侧为 $571.01\mu\text{m}$,中部为 $810.3\mu\text{m}$,内侧为 $667.1\mu\text{m}$ 。马蹄竹

最短,平均为 $498.39\mu\text{m}$,其中外侧为 $400.19\mu\text{m}$,中部为 $565.09\mu\text{m}$,内侧为 $529.91\mu\text{m}$ 。其余两种介于二者之间。导管分子的壁厚由竹秆壁外侧向内逐渐增厚,并以越南巨竹的导管壁最厚,其中外侧为 $1.8\mu\text{m}$,中部为 $1.96\mu\text{m}$,内侧为 $2.42\mu\text{m}$,平均为 $2.06\mu\text{m}$ 。马蹄竹的导管壁最薄,外侧为 $1.16\mu\text{m}$,中部为 $1.64\mu\text{m}$,内侧为 $1.99\mu\text{m}$,平均为 $1.59\mu\text{m}$ 。

3.5 纤维

纤维是竹秆的机械组织,对输导组织起着保护作用,直接影响了竹秆的机械强度。4 种竹材纤维的平均长度,均以外侧最短(2.33mm),中部最大(2.51mm),内侧次之(2.38mm)。其中越南巨竹的纤维最长,平均为 2.72mm ,撑篙竹最短,平均为 2.38mm 。纤维直径和壁厚在 4 种竹材中差别不大,详见表 4。

表 4 四种竹材纤维的长度、直径和壁厚
Table 4 The fiber size of four bamboo species

竹种 Species	长度(mm)Length				直径(μm) Diameter	长/宽 Length/Width	壁厚(μm) Wall Thickness
	外 Outer	中 Middle	内 Inner	平均 Average			
马蹄竹	2.36	2.57	2.41	2.45	15.74	161	5.72
车筒竹	1.98	2.24	2.05	2.09	12.22	171	5.24
撑篙竹	2.23	2.41	2.37	2.38	15.68	151	5.78
越南巨竹	2.64	2.82	2.69	2.72	15.48	175	5.78
平均	2.33	2.51	2.38	2.41	15.26	159	5.68

3.6 薄壁组织细胞

薄壁组织细胞位于维管束之间。竹秆壁外侧薄壁组织细胞的直径仅有几个微米,并受维管束的挤压在横切面上呈椭圆形。从竹秆壁的外侧向内,此等细胞的直径逐渐增大。在整个竹秆壁中,以内侧薄壁组织所占比例最大。四种竹材薄壁组织细胞的平均直径为 $40.85\mu\text{m}$,其中越南巨竹的直径为 $44.10\mu\text{m}$,而马蹄竹的直径仅为 $37.55\mu\text{m}$,其余两种介于其间。

通常,薄壁组织细胞有长形细胞和短形细胞两种类型,前者呈圆柱形,后者为扁圆

形;短形细胞数量很少,并散生于长形细胞之间。长形细胞的长度在竹秆壁的不同部位或不同竹种间均差别不大($61.47\mu\text{m} - 64.49\mu\text{m}$);其细胞壁的厚度以越南巨竹最厚,平均为 $2.82\mu\text{m}$,马蹄竹细胞壁最薄,平均 $1.93\mu\text{m}$ 。短形细胞在 4 种竹材中的长度以马蹄竹最长($16.89\mu\text{m}$),越南巨竹最短($11.95\mu\text{m}$),两者相差 $4.94\mu\text{m}$ 。

3.7 各类组织的比例

在竹秆中各类组织所占比例差异较大,其中由于表皮、副表皮、皮层及髓环所占的比例极小,故在本文中只讨论输导组织、纤维组

织和基本薄壁组织的比例。

输导组织包括韧皮部和木质部,4种竹材输导组织的总平均为8.82%,其中外侧最少为5.75%,中部增加为11.3%,内侧减少为9.75%。不同竹种间差别不明显,如撑篙竹(9.81%)和越南巨竹(8.26%)之间仅相差1.55%。输导组织由竹秆壁外侧向内侧的变化趋势与吴顺昭的研究结果一致。

纤维组织包括维管束鞘和纤维帽,纤维组织的比例由外向内逐渐减少,4种竹材中以撑篙竹所占比例最大(48.5%),其中外侧为64.39%,中部为47.59%,内侧为33.54%。越南巨竹所占比例最小(35.64%),其中外侧为49.84%,中部为29.97%,内侧为27.13%。其余两种介于二者之间。由于本文所选4种竹种均为高大用材种类,其纤维

组织比例总的平均值(42.56%)则高于吴顺昭33种竹材的平均值(35.0%)。通常认为纤维组织所占的比例越大,竹材的强度就越高,如毛竹纤维组织的比例为32%,顺纹抗拉强度为202.9Mpa,抗弯弹性模量为12.54Gpa;撑篙竹纤维组织的比例为48.5%,顺纹抗拉强度为269.8Mpa,抗弯弹性模量为17.6Gpa。

薄壁组织在4种竹材中的比例总平均为50.13%。从竹秆壁外侧向内薄壁组织所占比例逐渐增加,其中外侧为38.36%、中部50.91%、内侧比例高达61.14%。不同竹种间以越南巨竹的薄壁组织比例最大(56.09%),撑篙竹最小(41.68%)。在竹秆壁中,薄壁组织比例由外向内的增减趋势恰好与纤维组织相反。

表5 四种竹材输导组织、纤维组织和薄壁组织的比例

Table 5 The proportion of conducting tissue, fiber tissue and parenchyma tissue in four bamboo species (%)

竹种 Species	外 Outer			中 Middle			内 Inner			平均 Average		
	C	F	P	C	F	P	C	F	P	C	F	P
马蹄竹	5.15	55.27	39.13	11.07	38.71	50.22	10.07	30.47	59.47	8.76	41.63	49.60
车筒竹	5.27	53.63	41.10	11.01	35.58	53.41	90.19	26.01	64.58	8.43	38.40	53.16
撑篙竹	5.23	64.39	29.37	12.10	47.59	40.31	11.09	33.54	55.37	9.81	48.51	41.68
越南巨竹	6.35	49.84	43.82	10.33	29.97	59.70	8.17	27.13	74.71	8.26	35.64	56.09
平均	5.75	55.90	38.36	11.13	37.76	51.91	9.57	29.29	61.14	8.82	42.56	50.13

C:输导组织(Conducting tissue);F:纤维组织(Fiber tissue);P:薄壁组织(Parenchyma tissue)

4种竹材三种组织所占比例的总平均值为输导组织8.82%,纤维组织42.56%,薄壁

组织50.13%。图1表示4种竹材三种组织所占比例示意图、

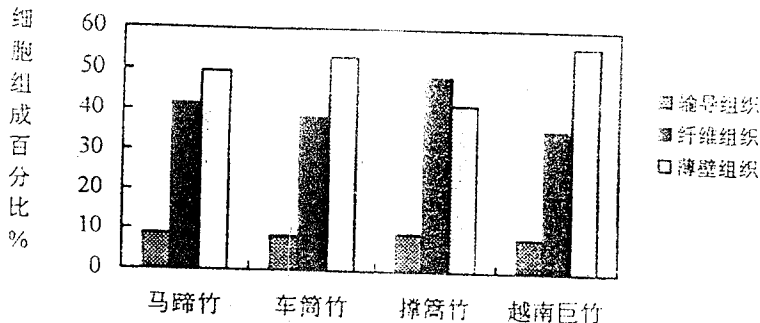


图1 四种竹材三种组织所占比例的百分比

Fig 1 The proportion of three tissues in four bamboo species culm

3.8 髓环

髓环是位于髓腔外围的 6—8 层细胞,细胞排列紧密。车筒竹和越南巨竹的髓环特化为木质化程度很高的长方形石细胞,细胞壁厚分别为 3.53 μm 和 3.25 μm 。马蹄竹的髓环

细胞木质化程度较低,细胞近于等径,直径为 30 μm 。撑篙竹的髓腔细胞未特化为石细胞,细胞壁的厚度与附近薄壁组织细胞相近,为 1.94 μm 。

(参考文献略)

THE COMPARATIVE ANATOMY OF FOUR BAMBOO CULMS IN GUANGXI

Wei Xue-zhi

(Shanxi Normal University, Linfen 04100)

He Xin-qiang Hu Yu-xi Lin Jin-xing

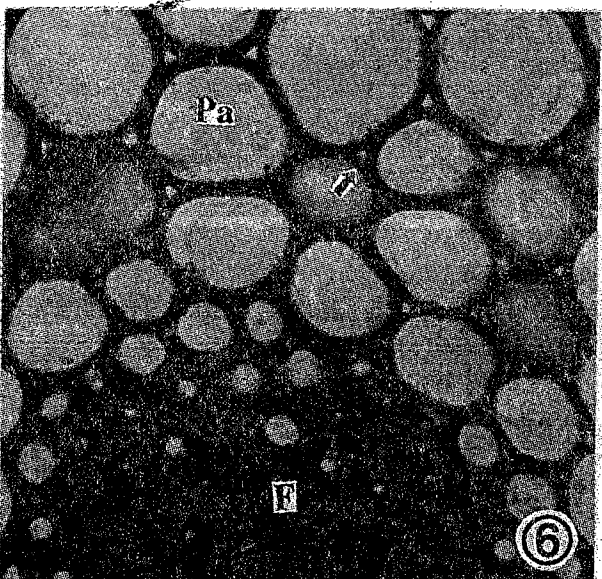
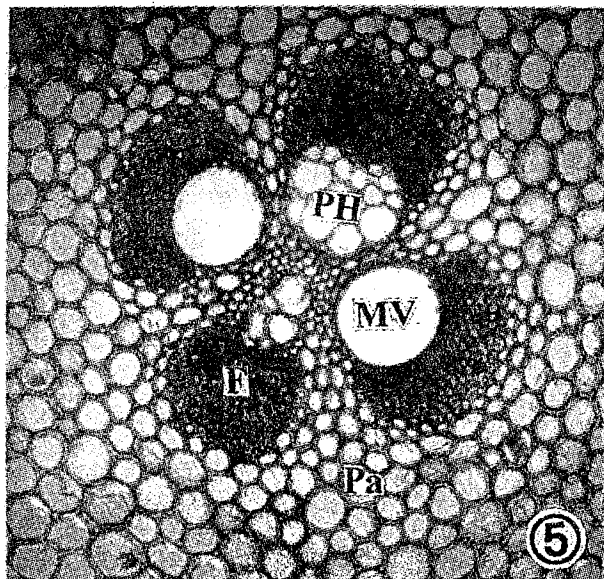
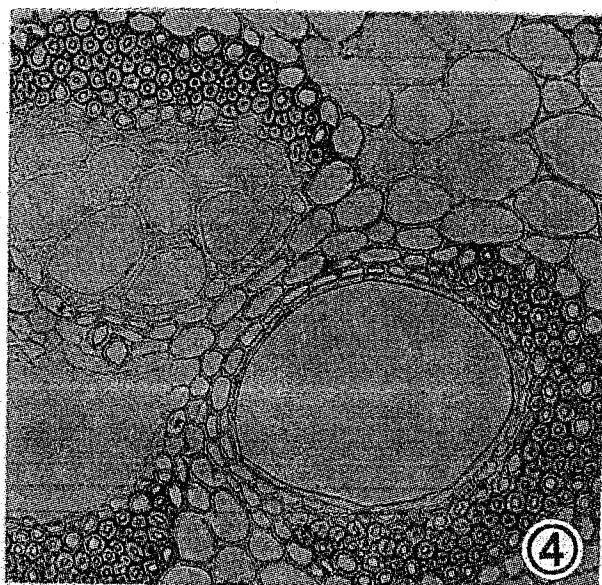
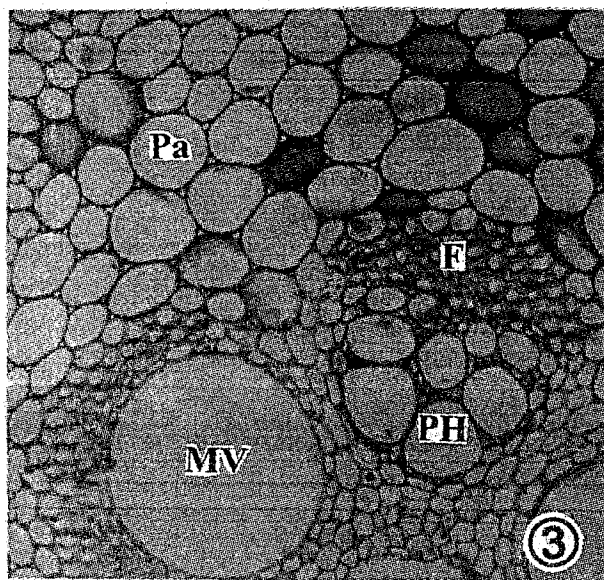
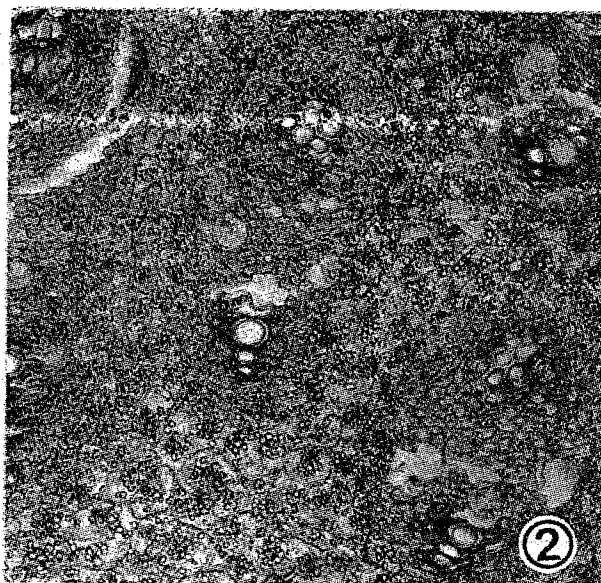
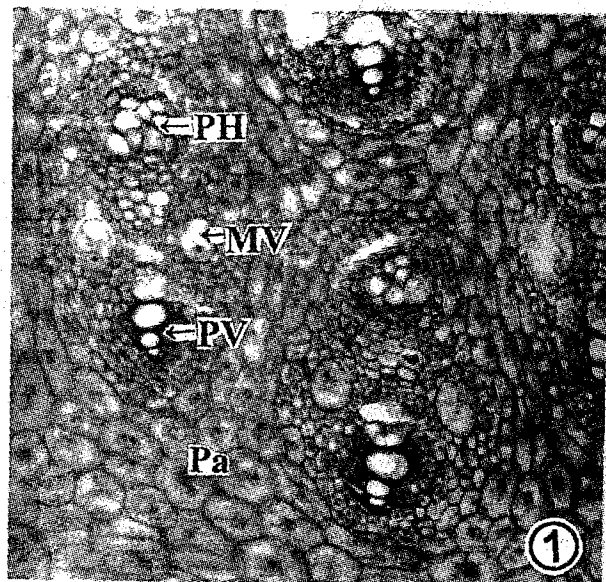
(Institute of Botany, Chinese Academy of Science, Beijing 100093)

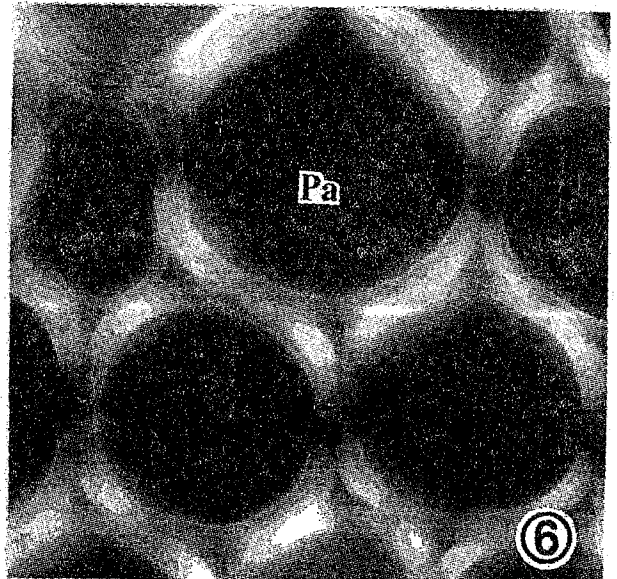
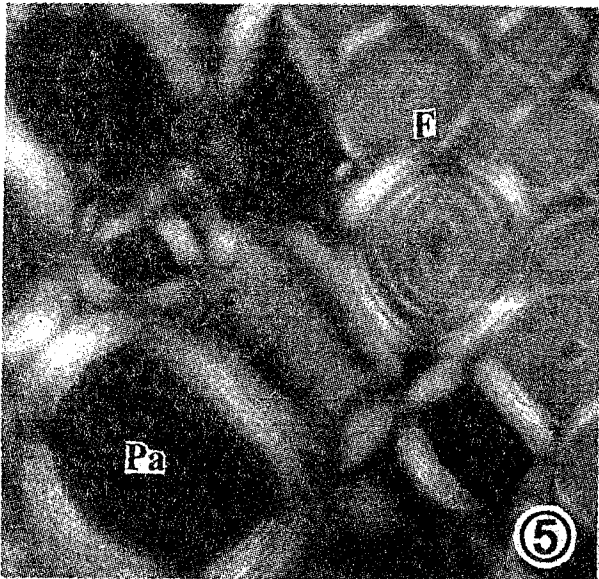
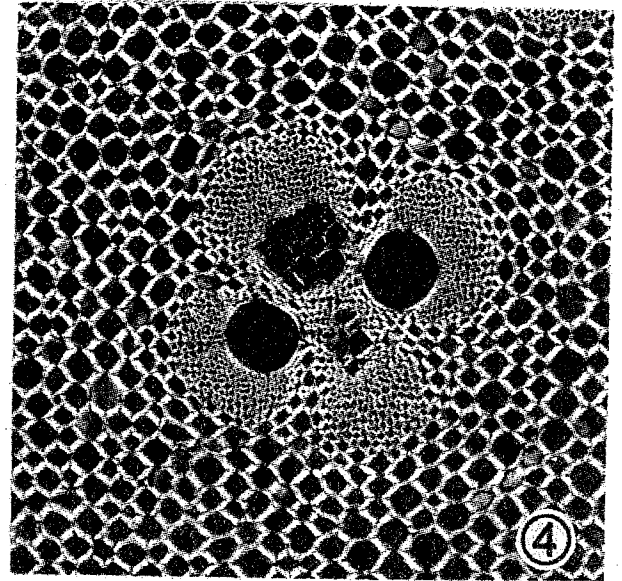
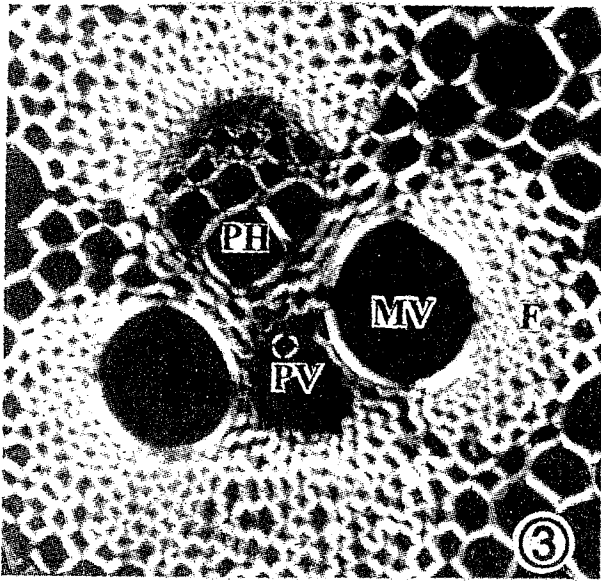
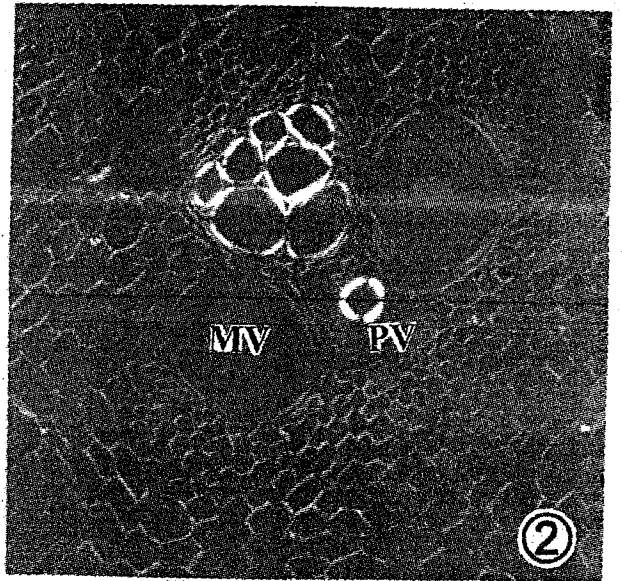
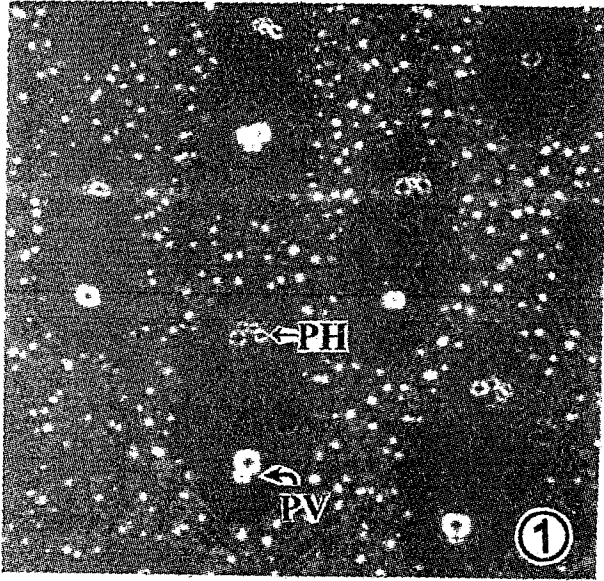
Abstract The middle internode of four bamboo species culms from Guangxi autonomous region named *Bambusa lapidea*, *B. sinospinosa*, *B. pervariabilis* and *Dendrocalamus yunnanensis* were collected and cut. The bamboo section method, maceration technique and light microscope with computer image processing analysis system were used to investigate their anatomical structures, including epidermis, subepidermis, cortex, fiber and vascular bundle. The results showed that the number of vascular bundles per square millimeter across the bamboo culm wall was higher for *B. pervariabilis* (average 4.08), and lower for *B. sinospinosa* (average 2.01). The diameter of vessel elements were larger gradually from the outer part to the inner part of the culm wall. The longest vessel elements were almost located in the middle part. The wall thickness of the vessel increased from the outer part to the inner part. The longest fiber of 2.72 mm for *D. yunnanensis*, the largest cell diameter of 15.68 μm for *B. pervariabilis*, the thickest cell wall of 6.72 μm for *B. lapidea*. There were significant differences in the ratio of various tissue. Conducting tissue was the major element in the middle part of the culm, and *B. Pervariabilis* contained 12.1% for such tissue, was higher than the other species. More fiber tissue was located in the outer culm wall, *B. pervariabilis* had the higher proportion of the fiber, average 64.39%. These anatomical properties provided the basic information for these four bamboos physical, mechanical and industrial utilization.

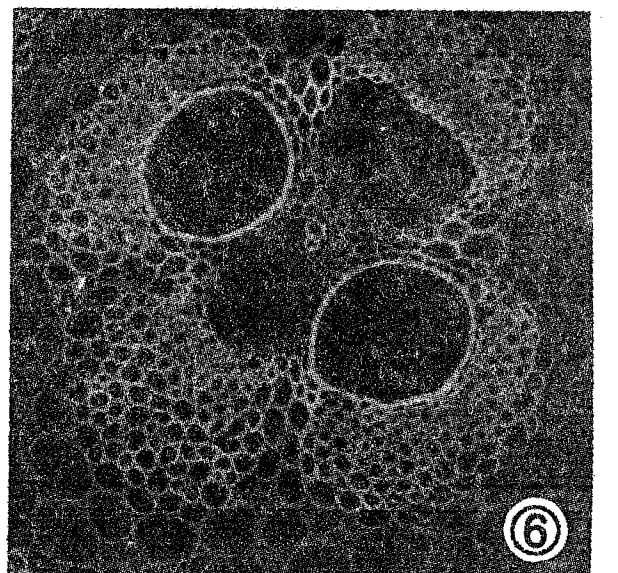
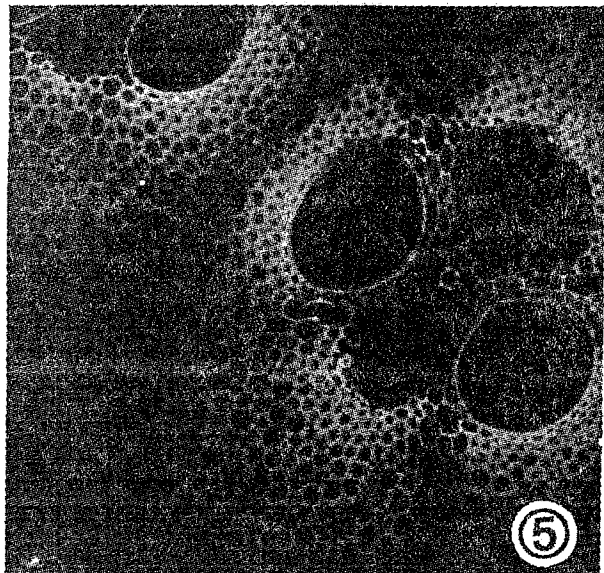
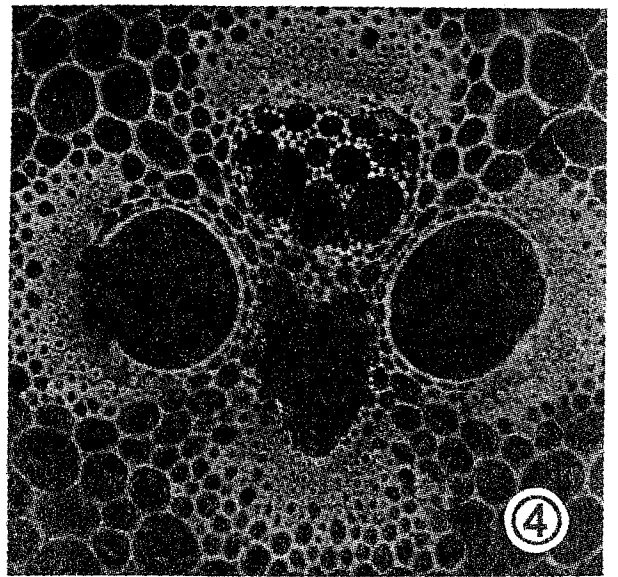
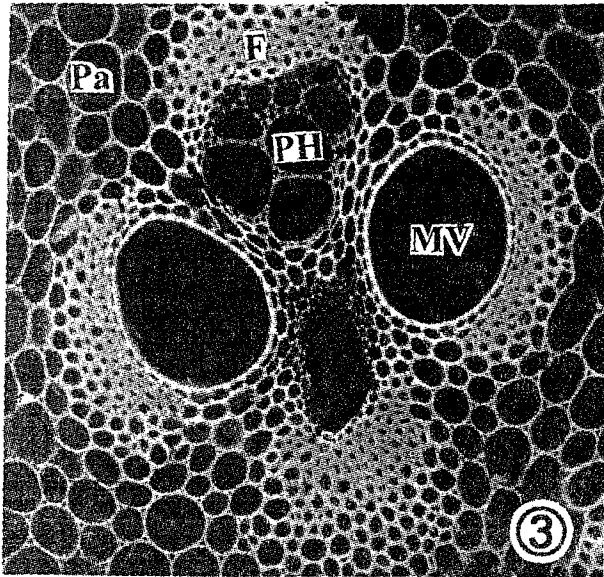
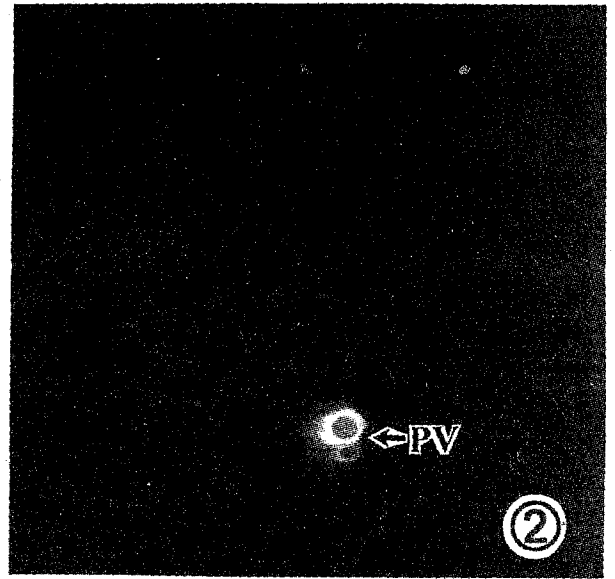
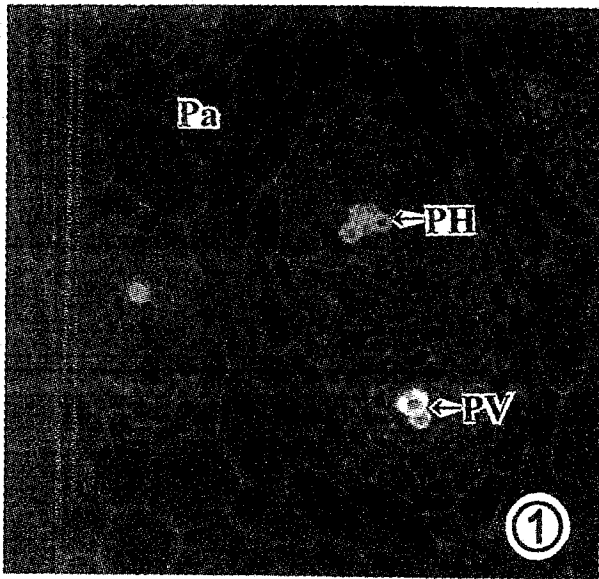
Key words Structure of bamboo culm; *Bambusa lapidea*, *B. sinospinosa*, *B. pervariabilis* *Dendrocalamus yunnanensis*; Guangxi

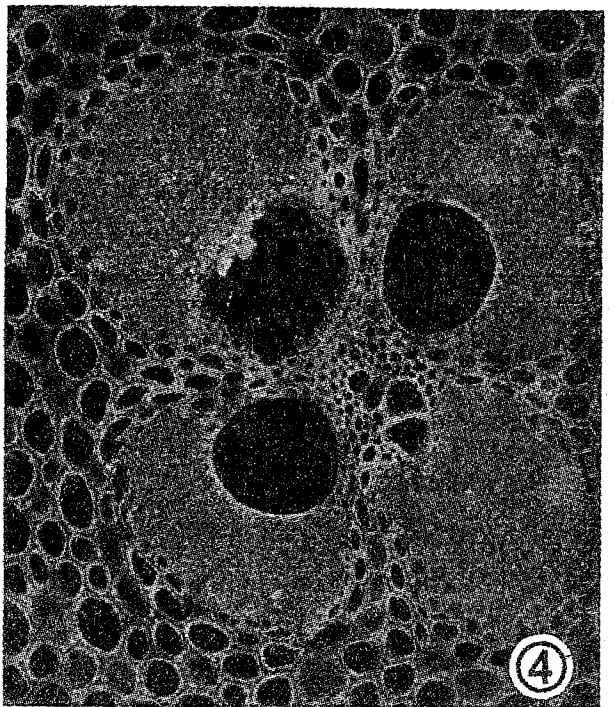
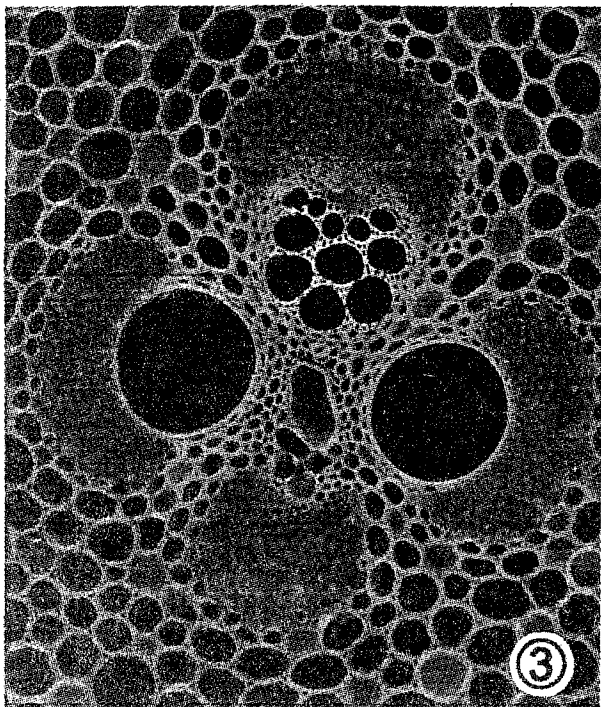
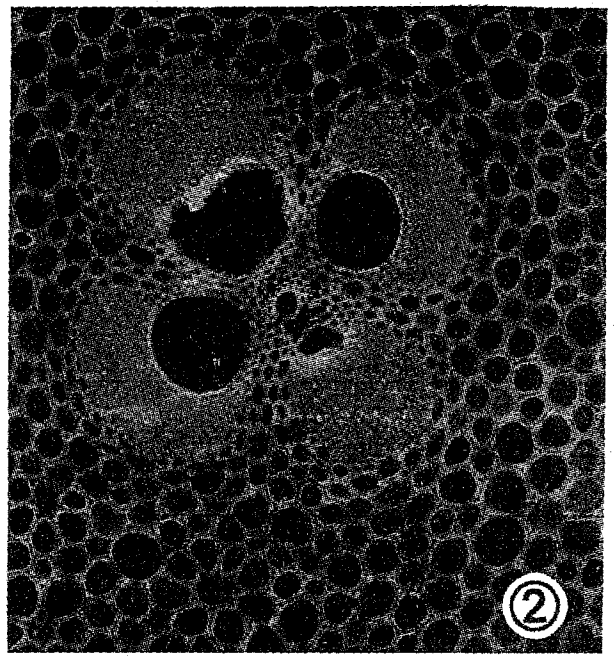
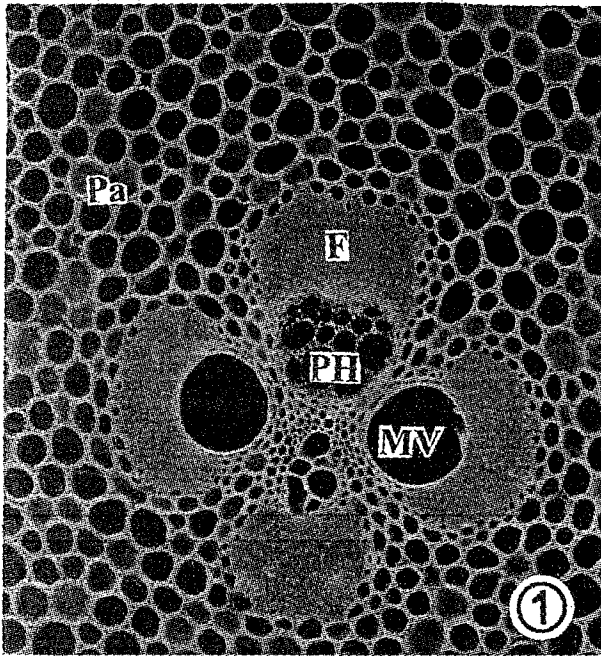
70

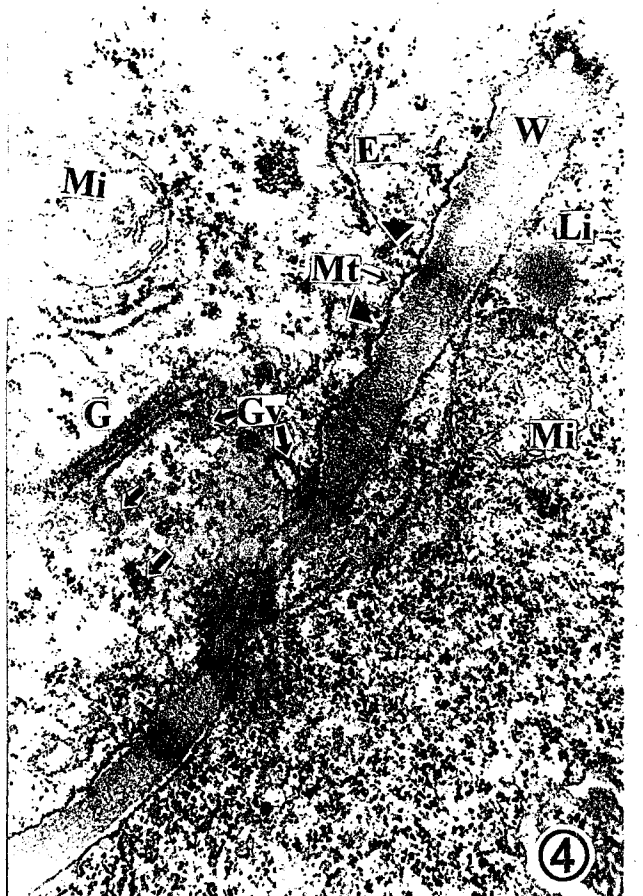
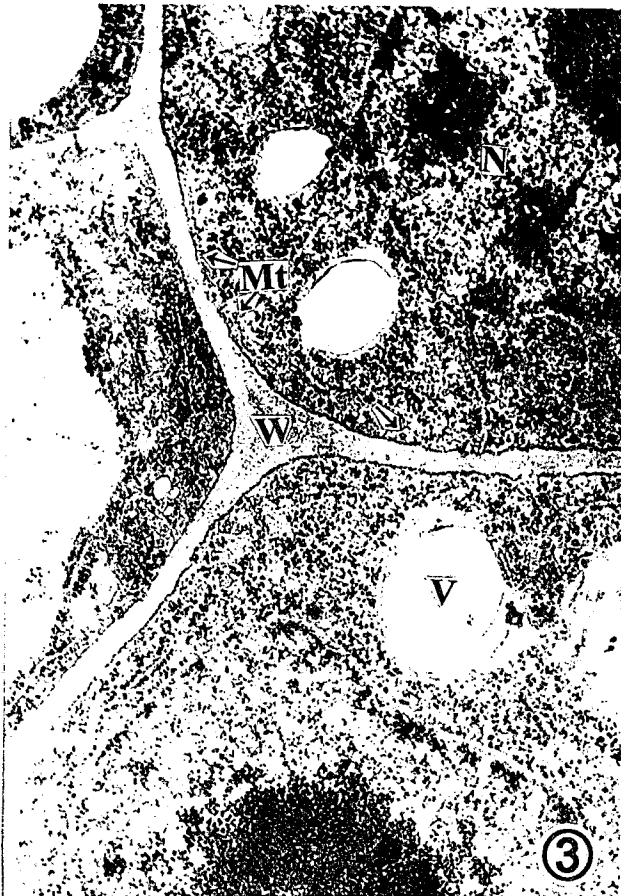
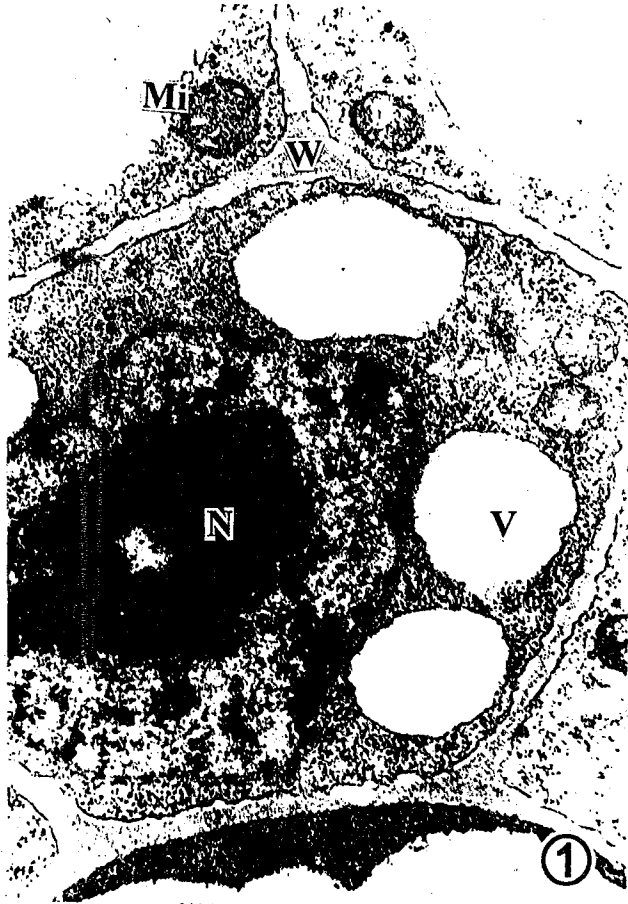
在
西
南
国

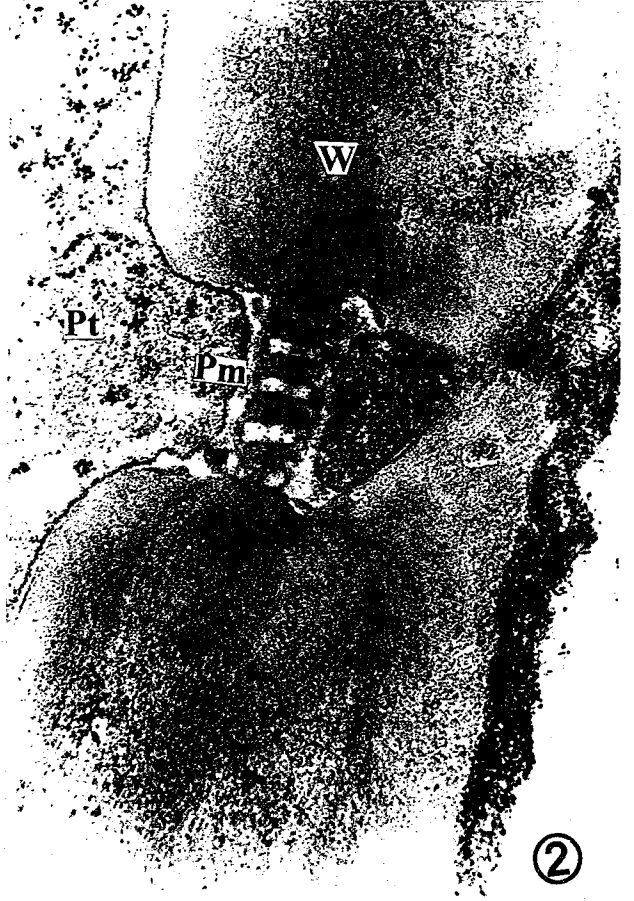
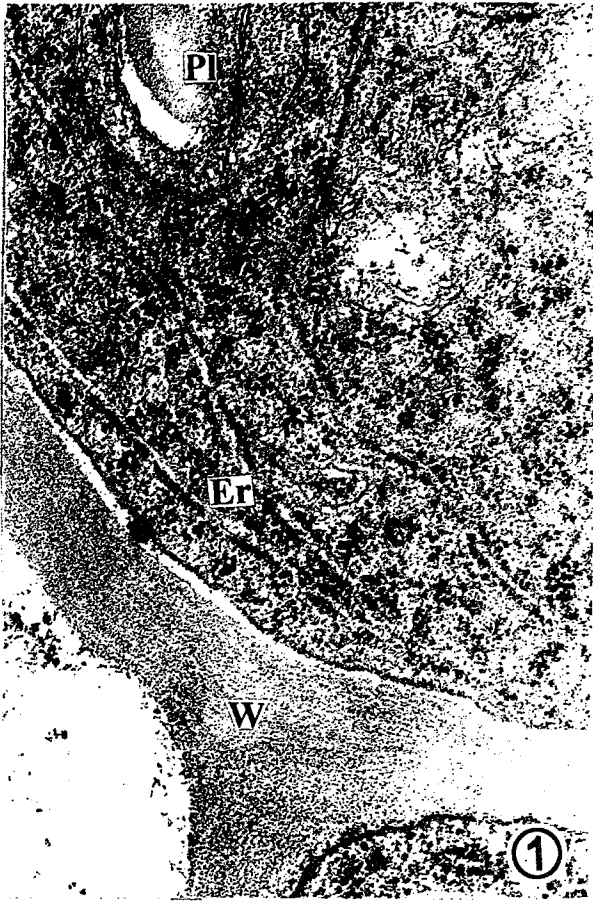




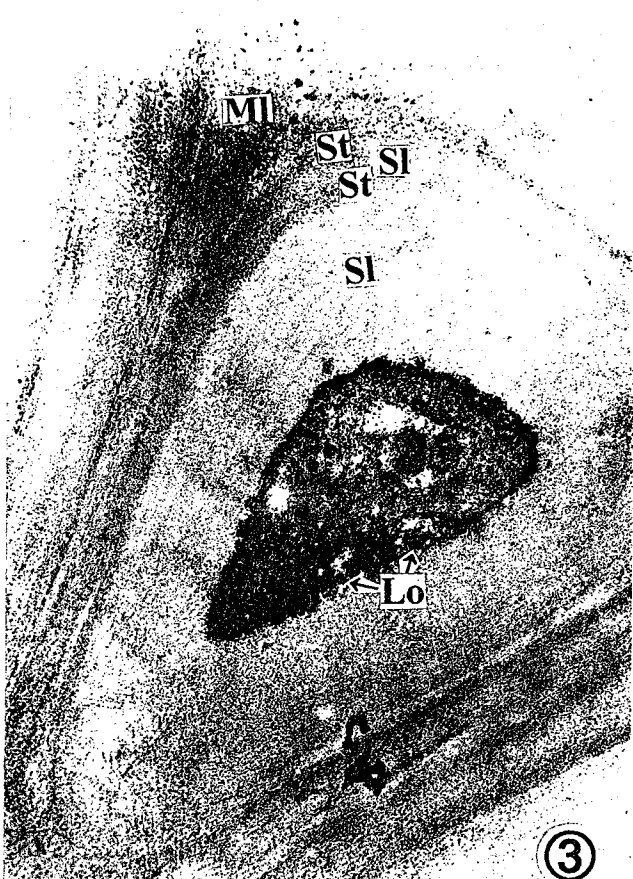
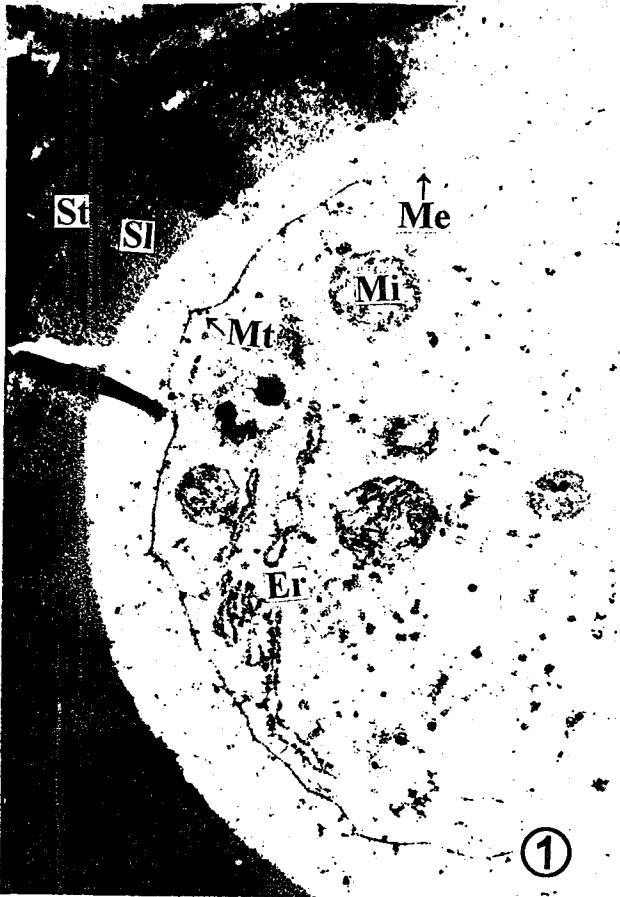




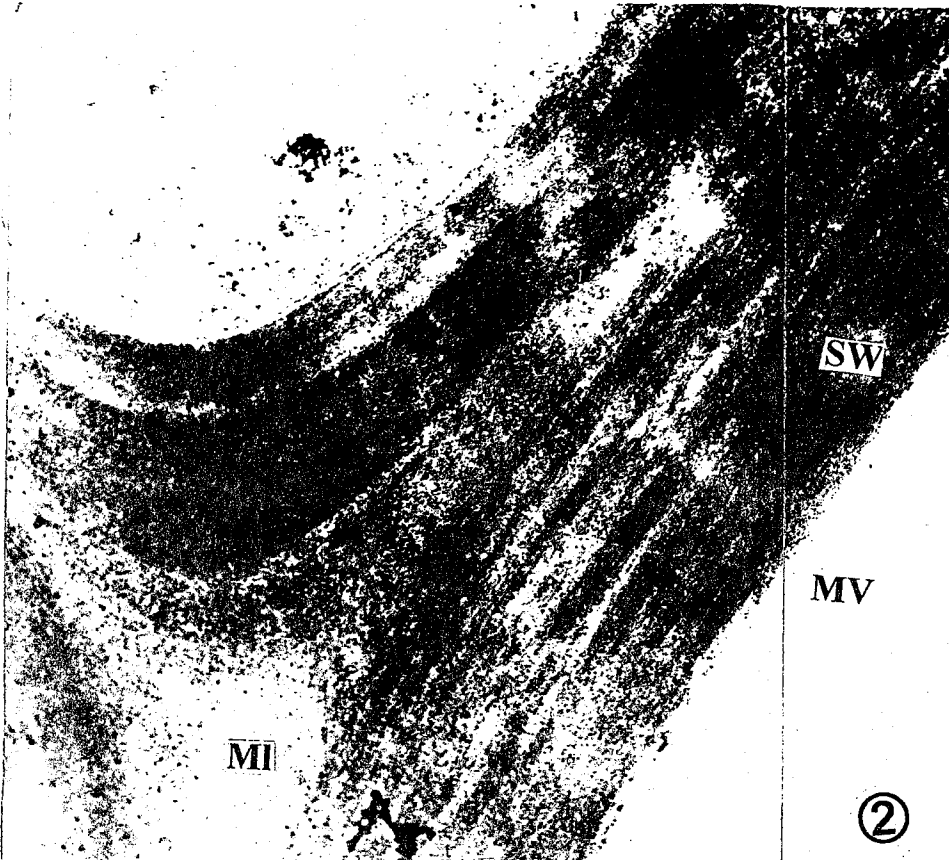
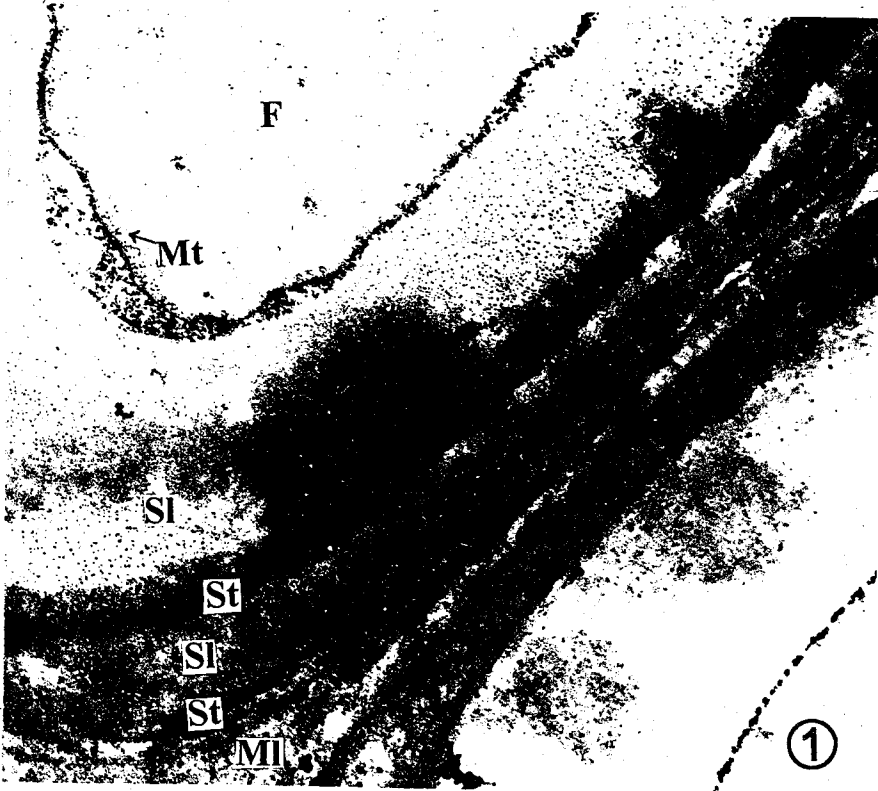




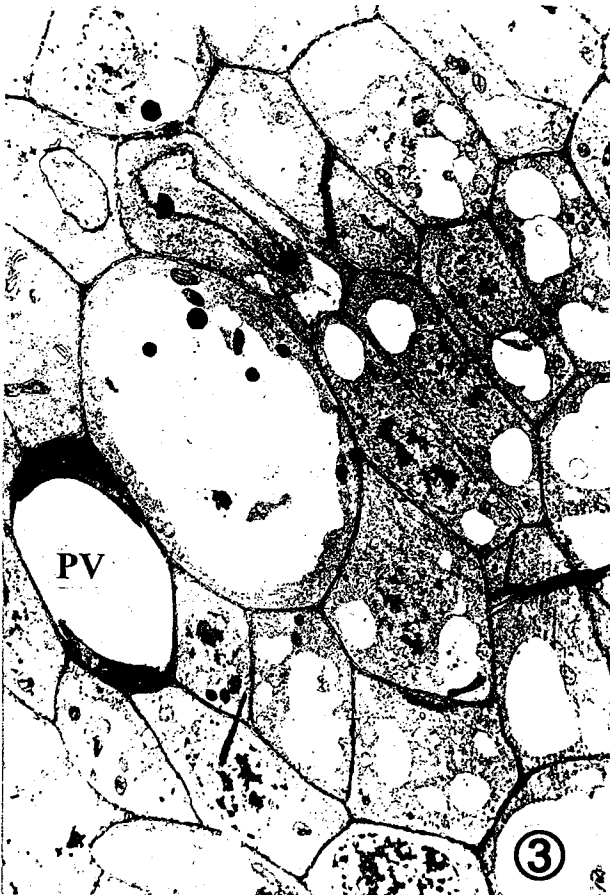
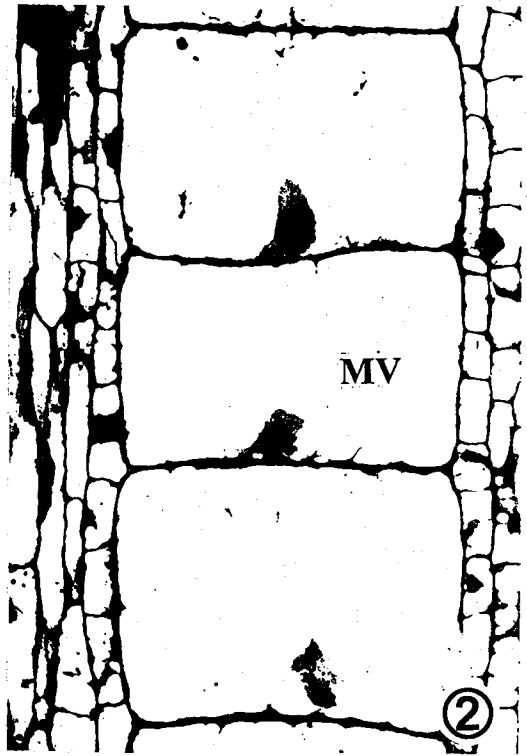
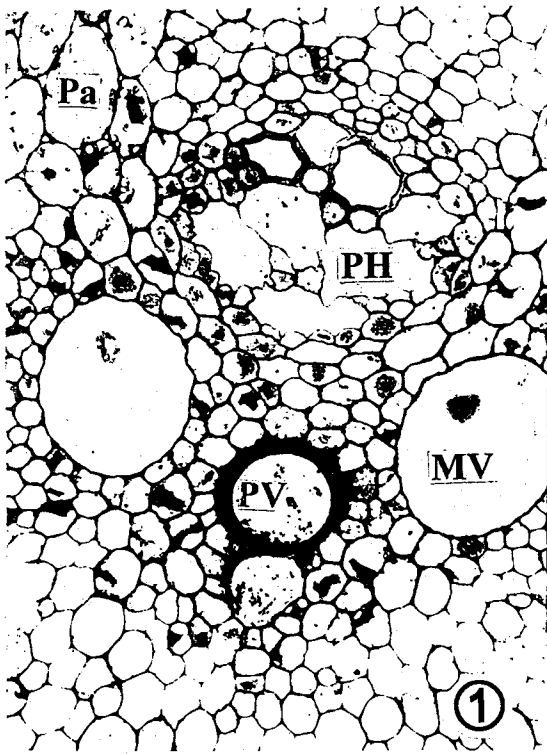
图版VII



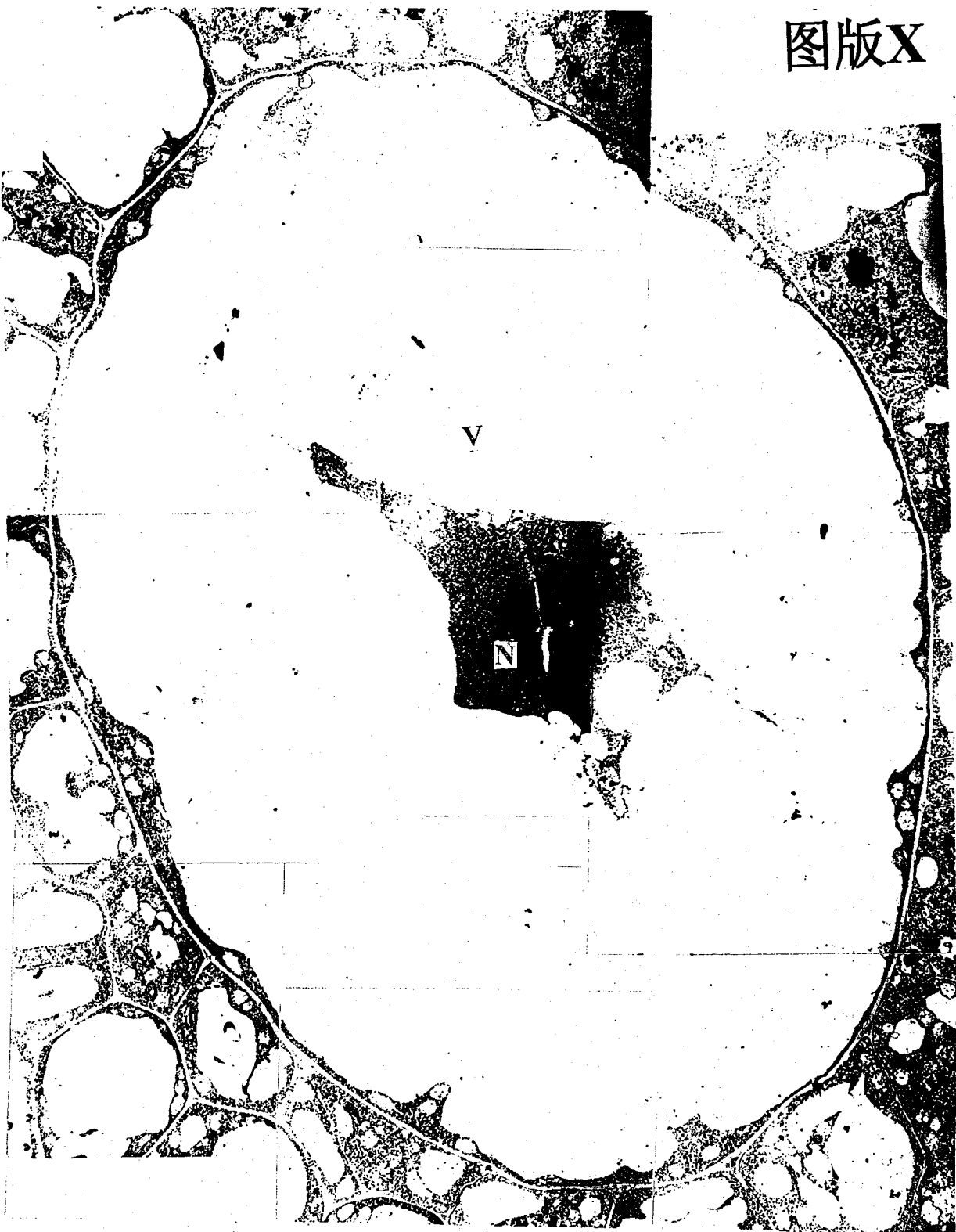
图版VIII

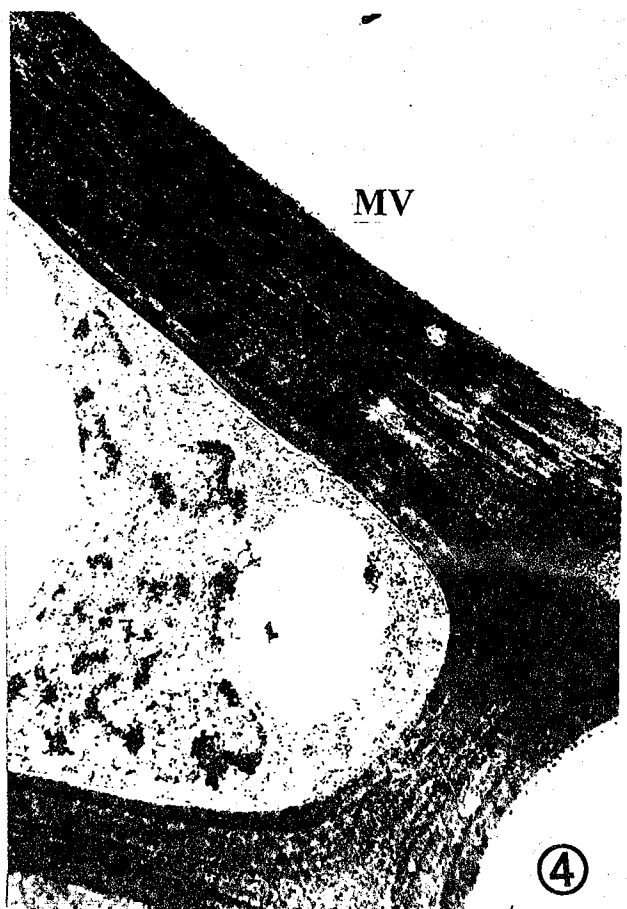
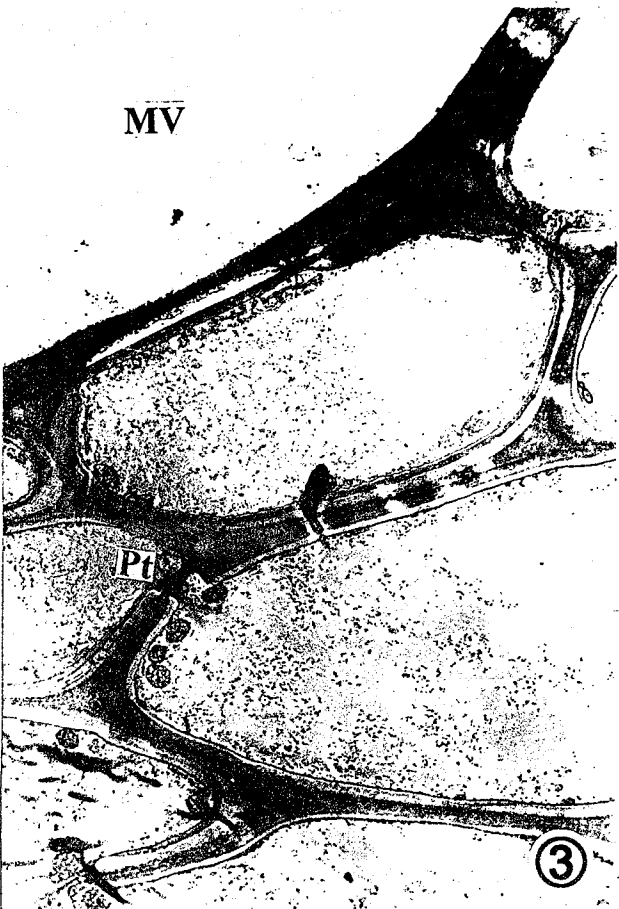
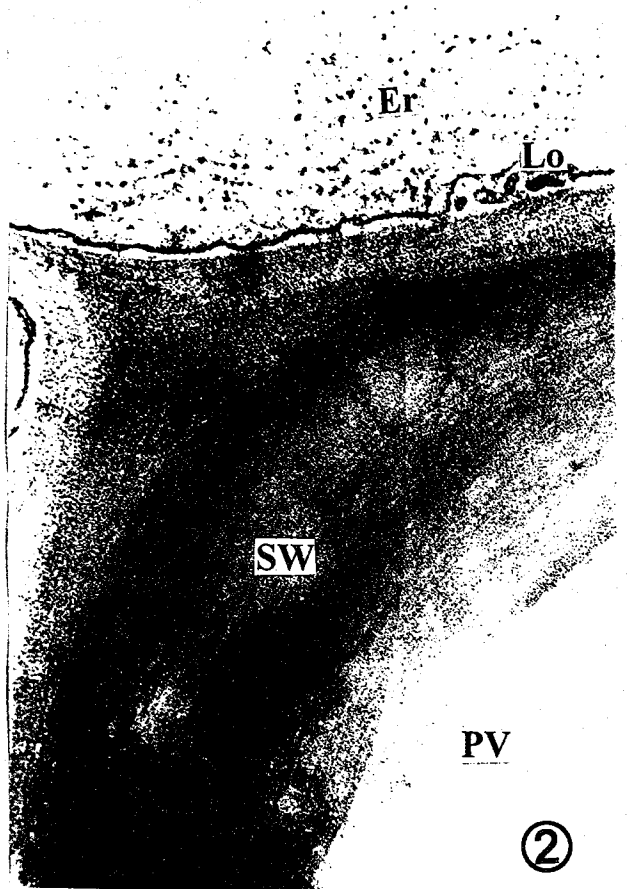
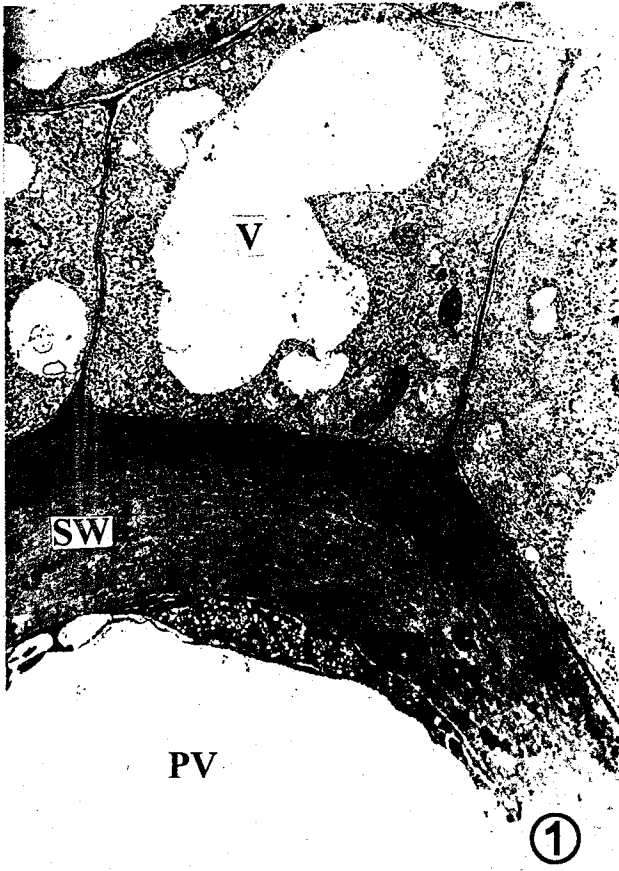


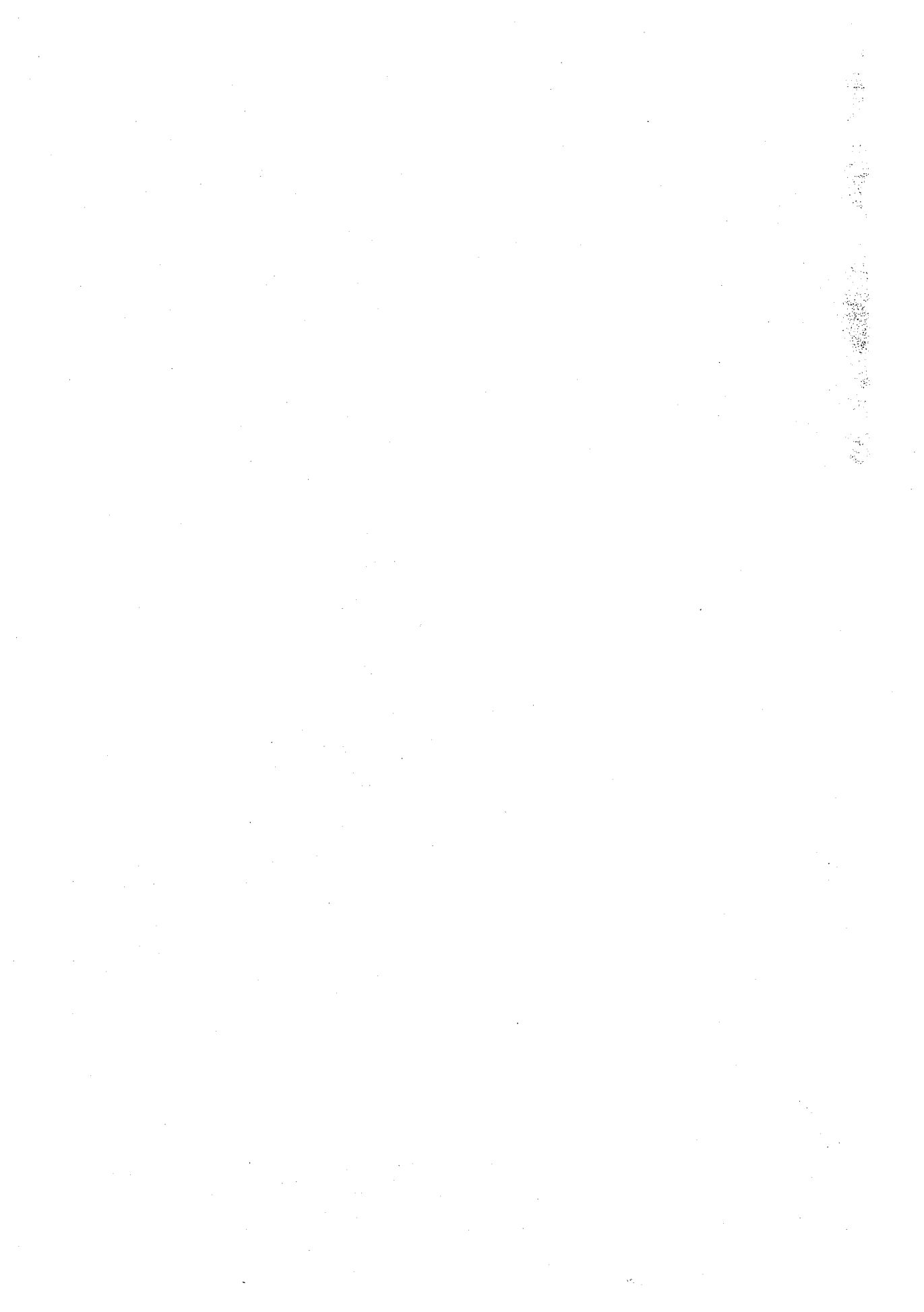
图版IX



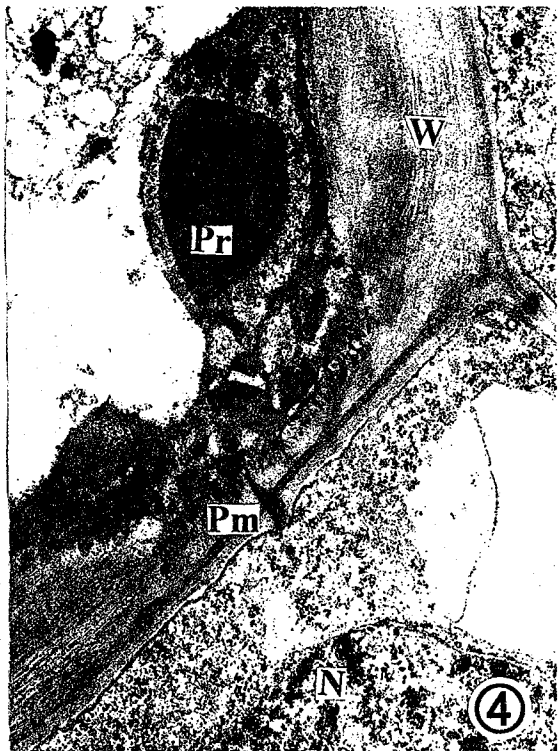
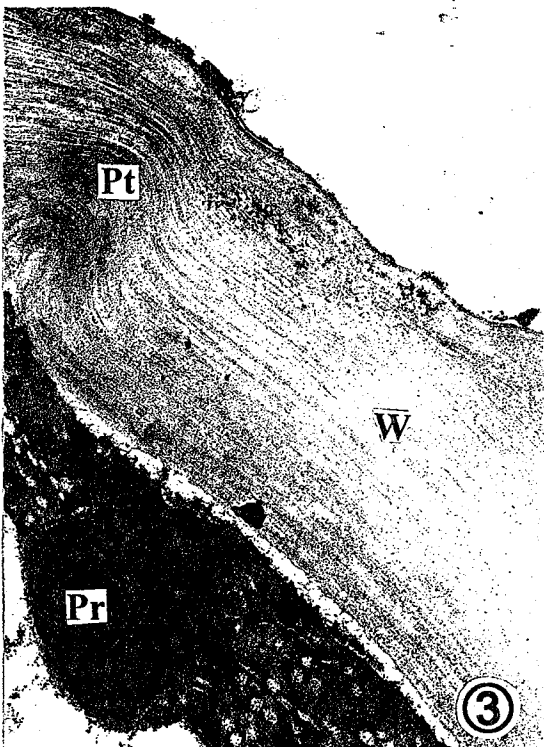
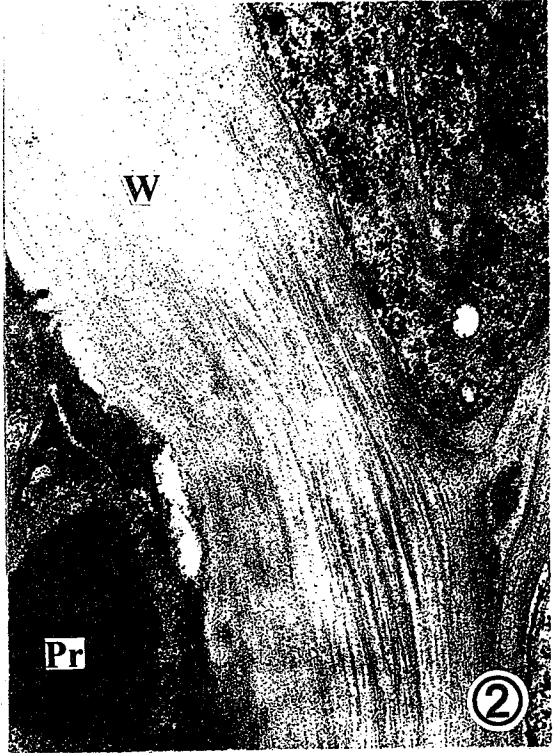
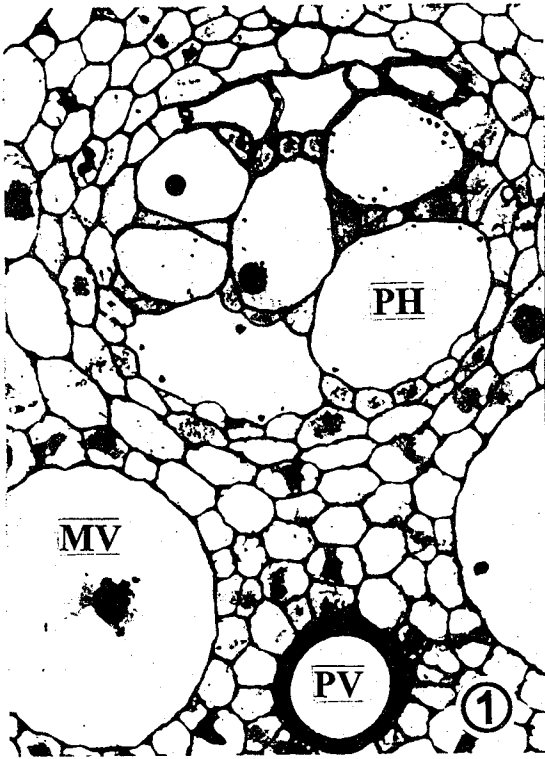
图版X

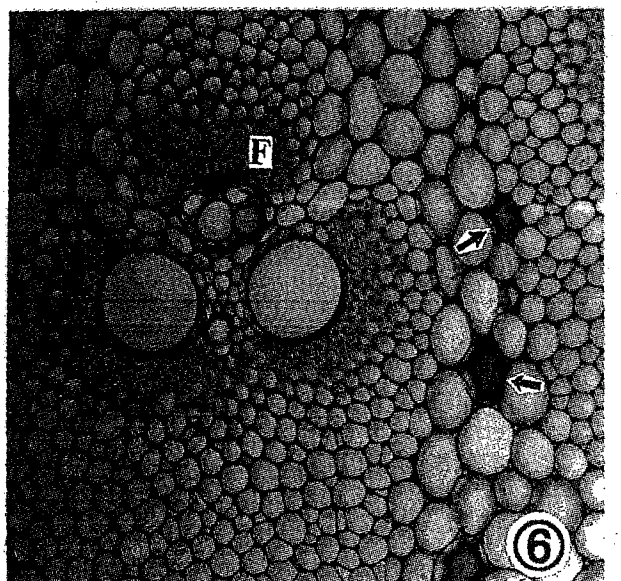
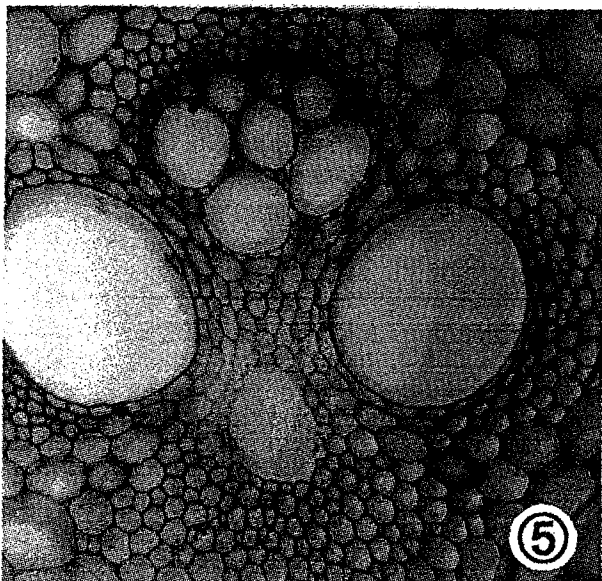
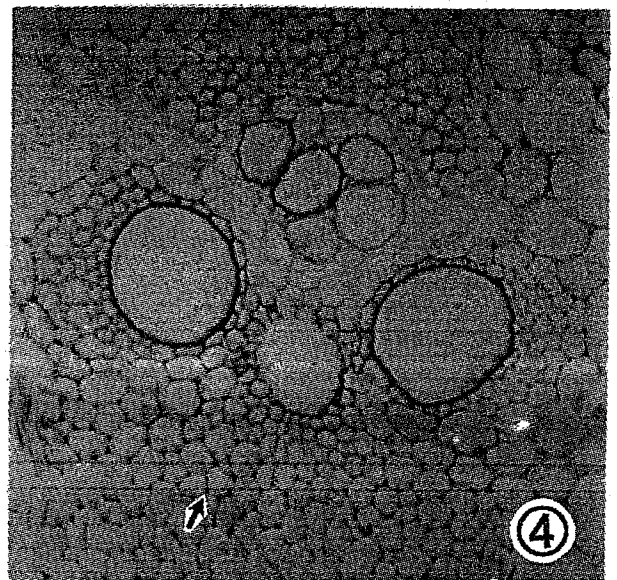
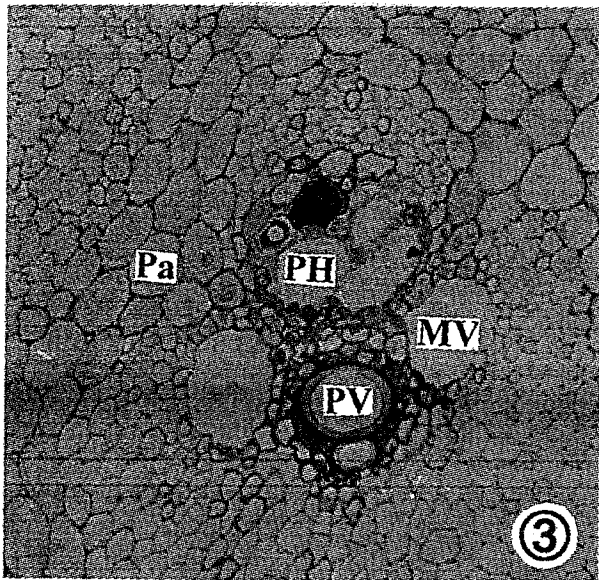
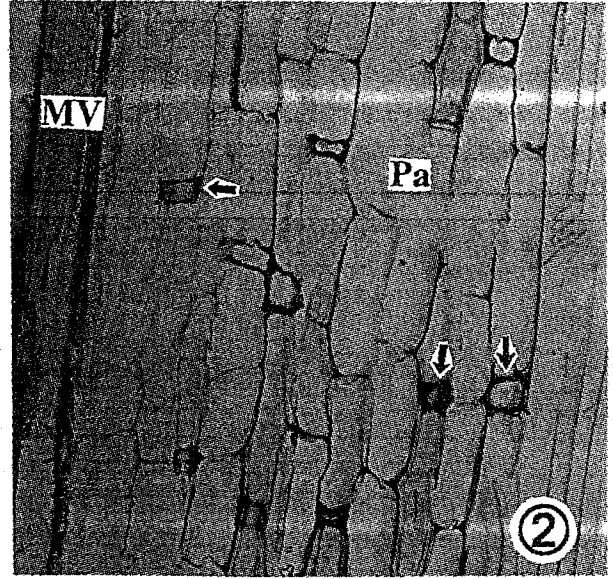
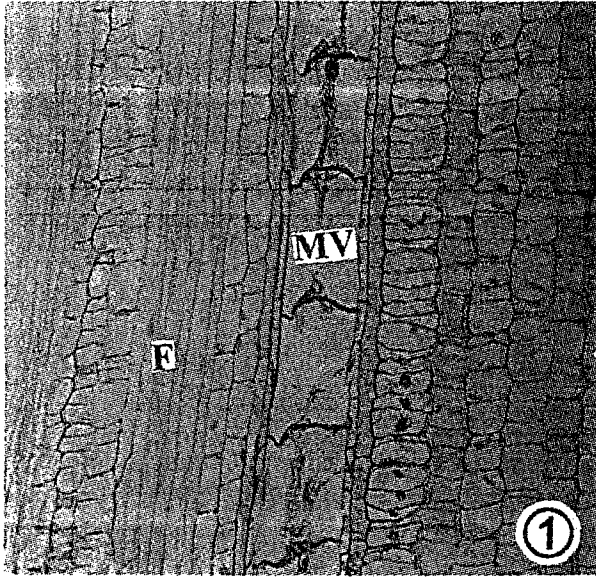


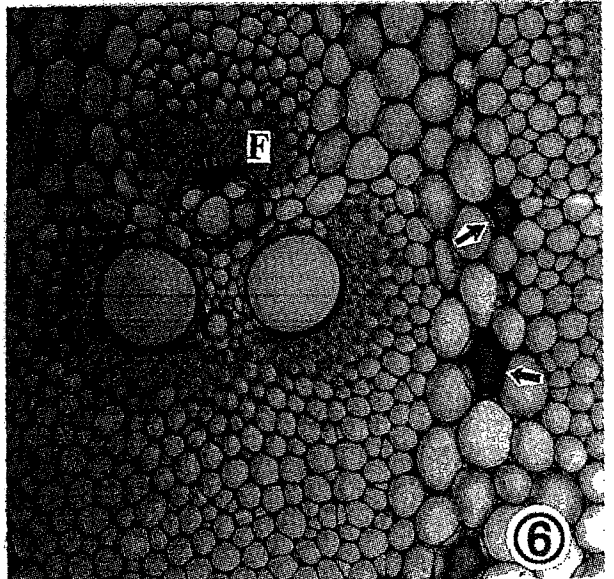
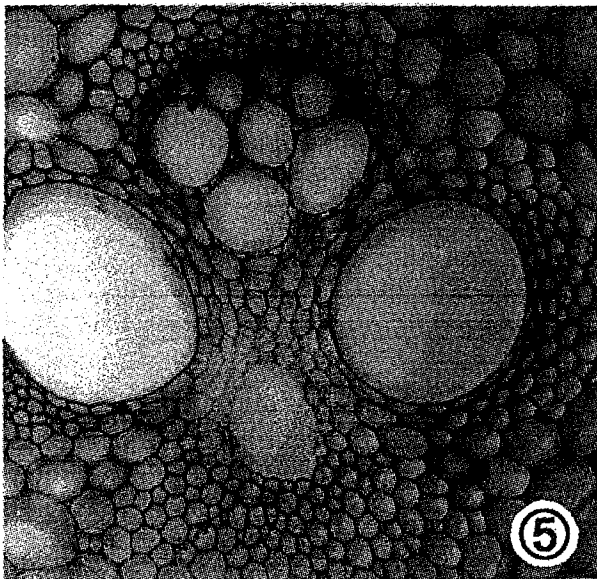
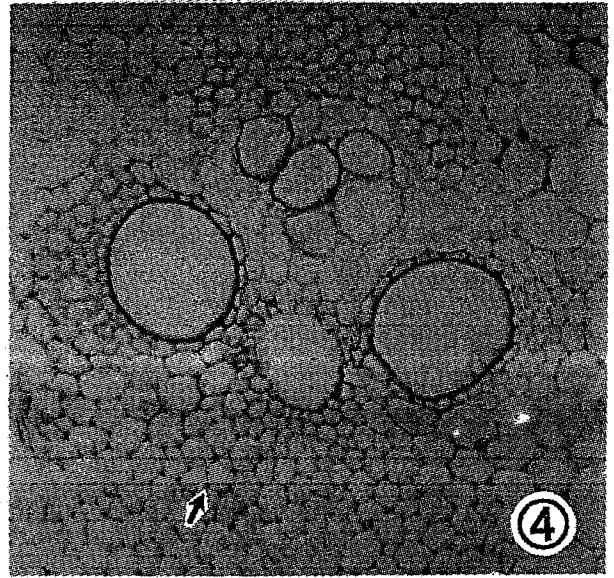
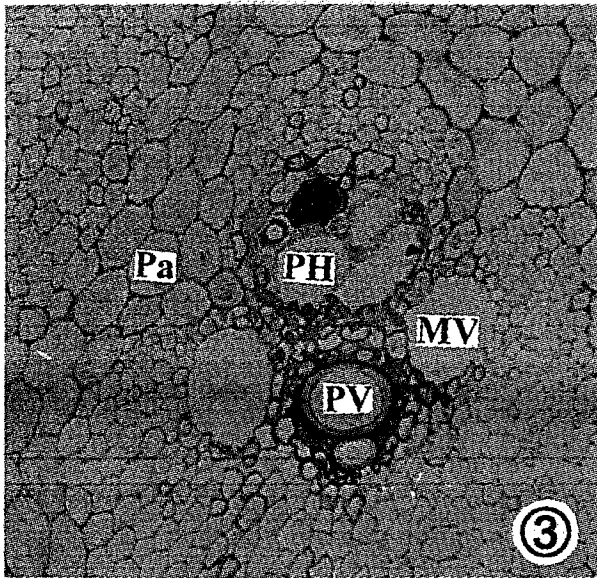
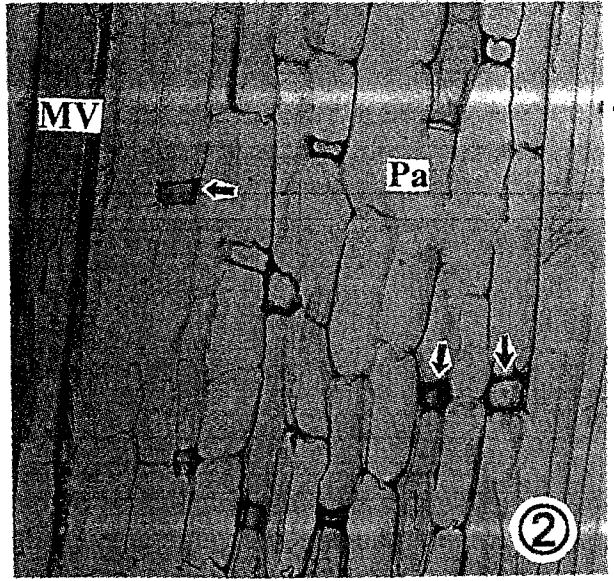
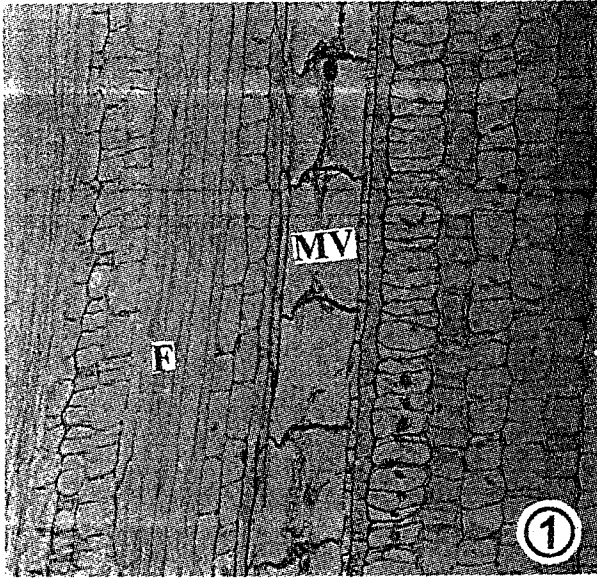




图版XII







图版XIV

