

## 茶 (*Camellia sinensis* Kuntze) 离体培养

### 体细胞胚胎发生的组织细胞学研究

王毅军\* 严学成 暨淑仪 魏新姐

(华南农业大学, 广州 510642)

#### 摘要

以茶树叶片为外植体, 以 MS 培养基附加  $4\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA,  $2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA,  $3\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub> 和 0.2—0.3% 活性碳诱导出愈伤组织和胚状体, 进一步形成小植株。切片观察表明, 茶叶愈伤组织胚状体的发生, 起源于愈伤组织表层及其内部的单个细胞和细胞团, 胚状体发育顺序与合子胚大致相似, 经球形胚、心形胚、鱼雷胚和子叶胚阶段, 但发育过程中常有畸形胚出现。

关键词: 茶; 组织培养; 胚状体; 体细胞; 胚胎发生; 愈伤组织

自 1958 年 Reinert<sup>[16]</sup>, Steward<sup>[17]</sup> 在胡萝卜中首次发现胚状体以来, 已经发现植物离体培养普遍具有胚状体发生的现象。关于茶树离体培养胚状体的发生, 曾在子叶<sup>[3,5,8,10,13]</sup>和叶片<sup>[4]</sup>中有过报道, 但有关叶片离体培养的胚胎发育过程, 目前尚没有详细的报道和确切的细胞组织学证据。为此, 我们对茶树叶片培养中愈伤组织通过胚状体发生途径形成小植株这一过程, 进行了细胞组织学观察, 为进一步研究茶树抗性突变育种, 快速繁殖及细胞工程提供一些理论依据。

#### 材料和方法

供试材料为茶树 (*Camellia sinensis* Kuntze) 的“云南大叶”品种, 取自华南农业大学茶园, 采用春季茶蓬冠幅中央, 生长健康的植株芽头下第一、二片叶。愈伤组织诱导培养基为 MS 固体培养基附加  $4\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA,  $2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA,  $3\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  GA<sub>3</sub> 和 0.2—0.3% 活性碳, 在同一培养基上进一步诱导体细胞胚胎发生和小植株形成。对培养物外部形态观察后分批取材, 用卡诺氏液固定, 酒精脱水, 10—15 $\mu\text{m}$  连续切片, 铁矾苏木精染色, 用 Olympus 显微镜观察, 拍照。

#### 观察结果

##### 一、愈伤组织的诱导和胚状体的发生

国家自然科学基金资助课题

\* 现在通讯地址: 华南理工大学食品系, 广州 510641

1993-02-17 收稿; 1993-12-06 修回

叶片外植体接种在诱导培养基上, 5d 后叶组织开始肿胀, 之后肿胀缓慢增加, 50d 后, 诱导出淡黄色光滑的愈伤组织。

愈伤组织形成后不久, 从切片上可观察到愈伤组织的表层细胞或细胞团启动, 脱分化成为胚性细胞(图版 I: 1) 或胚性细胞团(图版 I: 2)。愈伤组织继代多次后, 在其内部也有单个细胞或细胞团启动, 脱分化成为胚性细胞或胚性细胞团(图版 I: 3)。这些起源于愈伤组织的胚性细胞的共同特点是具有大型而显著的细胞核, 并有明显的核仁, 细胞质稠密。

起源于愈伤组织表面的单个胚性细胞, 第一次分裂成为两个子细胞(图版 I: 4): 一个为顶端细胞, 一个为基细胞, 至于进一步的发育我们未观察到。起源于愈伤组织内部的单个胚性细胞, 几次分裂后成为胚性细胞团, 由它们构成原胚结构。起源于愈伤组织内部的胚性细胞团与其周围的薄壁细胞间具有明显的界限(图版 I: 3), 后由于周围细胞解体, 使发育而成的胚状体突出表面。

## 二、胚状体的形成和发育

由愈伤组织表层或内部细胞产生原胚结构后, 原胚表面细胞垂周分裂, 内部细胞多向分裂而形成球形胚, 这些球形胚有的仍紧密地着生在愈伤组织表面, 胚柄不明显, 有的有明显的胚柄(图版 I: 5)。球形胚形成后, 进行纵向伸长且两侧细胞分裂较快, 向外突起形成早心形胚(图版 I: 6), 继而形成晚心形胚(图版 I: 7)。之后两片子叶长大, 胚状体下方伸长, 内部有原形成层出现, 此时进入鱼雷胚期(图版 I: 8)。此后子叶继续伸长, 开始有染色较深的苗端分生组织发生而成为子叶胚(图版 I: 9)。

在胚状体发育过程中, 由于各种因素的作用, 每一发育步骤都可能受到阻碍而停滞在某一阶段败育, 从而出现畸形胚, 尤其在子叶期, 两子叶间芽原基常发育受阻, 不再具备分化能力, 从而不能正常发育成苗。这种由于芽原基形成受阻而发育成的特殊结构物称为假珠芽<sup>[13]</sup>。从假珠芽纵切片上可观察到它具有排列整齐的表皮细胞(图版 I: 10), 这些表皮细胞能重新再脱分化, 进而再生胚状体。

在胚状体发生和发育过程中, 从起源时愈伤组织胚性细胞开始, 到心形胚阶段都发现胚状体及其周围的愈伤组织细胞中有明显的淀粉积累。

## 三、胚状体的再生和成熟

将带有不同发育程度的胚状体的愈伤组织转到新鲜培养基上后, 一周左右就在愈伤组织及胚状体上再生许多次级胚状体。将假珠芽转到低浓度激素培养基上后, 多数体积膨大, 不能进一步发育, 但膨大的假珠芽表皮细胞能够发生次级胚状体。具有完整苗端及根端的胚状体转到合适的培养基上后, 即发育成完整植株(图版 I: 11)。

## 讨 论

(一) 有关植物组织培养中胚胎发生的观察, 朱澄<sup>[2]</sup>和周俊彦<sup>[6]</sup>都有过报道: 大多数植物体细胞胚胎发生为外起源的。桂耀林等在猕猴桃胚乳培养<sup>[9]</sup>, 郭仲琛在玉米花粉培养<sup>[7]</sup>中发现胚状体既有愈伤组织表层细胞启动分裂而成, 也有少数来自较深层的某个细胞或细胞团。作

者也观察到这一现象。我们还发现内起源的胚状体周围,有一层细胞构成的“边缘细胞层”,这层细胞可能作为营养供应细胞而退化解体,因此在胚状体与周围组织间形成间隙,这与 Zee 和 Wu<sup>(8)</sup>在芹菜培养中观察到的现象类似,这表明胚状体在刚开始发育时,与周围组织保持相对的独立性,支持了 Steward<sup>(17)</sup>等的观点。他们认为,细胞与周围组织之间的生理隔离是胚状体发生的先决条件。

关于胚状体的单细胞或多细胞起源问题,较为普遍的看法是:从愈伤组织的表层单个细胞发生或细胞聚合体而来<sup>(1)</sup>。但 Halperin<sup>(15)</sup>曾指出,胚性细胞团也可能是由一个单细胞多次连续分裂形成的,只不过在形成胚状体之前经历了一个无秩序分裂形成胚性细胞团的过程,然后才分化出胚状体,因而它可能是单细胞起源的。根据我们的观察,茶叶愈伤组织胚状体发生具有多种途径,同时有从愈伤组织表层单个细胞和细胞团而来,还有从愈伤组织内部单个细胞和细胞团而来。

(二)在茶叶愈伤组织产生的胚状体发育过程中,有多种类型的畸形胚出现,其中较普遍的是假珠芽。关于假珠芽的发生,在柑桔中 J. Button<sup>(14)</sup>报道:假珠芽是处于 16—32 个细胞阶段且极性尚未形成的球形胚发育而来,此类结构难以成苗,除偶尔能出苗外,无器官分化能力,但表皮细胞能进一步分化出胚状体。在我们的实验中,发现假珠芽更多是由于胚状发育后期,芽原基发生受阻,尤其在鱼雷胚期和子叶胚期。这与油茶<sup>(12)</sup>和茶树子叶<sup>(8)</sup>培养产生的假珠芽类似。

近年来,山茶科的一些植物组织培养表明,胚状体发生是山茶科植物离体培养中形成小植株的比较普遍及较有效的途径<sup>(12)</sup>。因此,如何高频率诱导胚状体发生并形成小植株,是山茶科植物育种和原生质体培养研究中的重要课题。

## 参 考 文 献

- 1 王凯基,张丕方,倪德祥等. 油橄榄组织培养的组织细胞学研究 I. 组织分化和器官发生. 植物学报, 1979; 21 (3): 224—228
- 2 朱澄. 植物组织培养中的胚状体. 遗传学报, 1978; 5: 78—88
- 3 刘德华. 茶籽子叶柄培养直接分化芽. 中国茶叶, 1987; 6: 15
- 4 刘德华,廖利民. 茶树叶片组织培养的初步研究. 福建茶叶, 1989; 2: 13—16
- 5 陈平,颜慕勤. 大叶茶的组织培养. 植物生理通讯, 1985; 2: 45
- 6 周俊彦. 植物体细胞在组织培养中产生的胚状体 I. 植物体细胞胚胎的发生. 植物生理学报, 1981; 7 (4): 388—397
- 7 郭仲琛,陆文禄. 玉米花粉愈伤组织产生胚状体的细胞形态学观察. 植物学报, 1984; 26 (1): 13—19
- 8 莫典义. 茶树胚状体的诱导和植株再生. 中国茶叶, 1981; 4: 45
- 9 桂耀林,母锡金,徐廷玉. 猕猴桃胚乳植株形态分化的研究. 植物学报, 1982; 24 (3): 216—219
- 10 蒋祖丰. 茶树子叶柄组织培养诱导完整植株的研究. 贵州茶叶, 1988; 17—20
- 11 韩碧文. 胚状体发生的细胞学和生理学研究. 植物学通讯, 1989; 6 (1): 4
- 12 颜慕勤,陈平. 油茶体细胞胚状体的发生. 实验生物学报, 1980; 13 (3): 343—345
- 13 颜慕勤,陈平. 茶树子叶离体培养形成胚状体的研究. 林业科学, 1983; 19 (1): 25—29
- 14 Button J, Botha C E. Enzymic maceration of citrus callus and the regeneration of plant from single cells. Journal of Experimental Botany, 1975; 94: 723—730
- 15 Halperin W. Embryos from somatic plant cells. In: Paklykula ed. Control Mechanisms in the Express of Cellular Phenotypes.

- Symp Int Soc Cell Biol, 1970; 9: 169—191
- 16 Reinert J. Morphogenes and ihre kontrolle an Gewebekulturen aus karotten. Naturwissenschaften, 1958; 45: 344—345
- 17 Steward F C, Mapes M O, Mears K. Growth and organized developments of cultured cells. II. Organization in cultures growth from suspension cells. Amer Bot, 1958; 45: 705—708
- 18 Zee S Y, Wu S C. Embryogenesis in the petiole explants of Chinese celery. Zeitschrift fur Pflanzen-physiologie, 1979; 98: 325—334

## HISTO-CYTOLOGICAL STUDY ON SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM THE LEAF OF *CAMELLIA SINENSIS* KUNTZE

Wang Yijun Yan Xuecheng Ji Shuyi Wei Xinjie

(South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

### Abstract

Leaf-derived callus of *Camellia sinensis* Kuntze was obtained on MS medium supplemented with 6-BA ( $1$  or  $4\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + IAA ( $2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + GA<sub>3</sub> ( $3\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + activated carbon ( $0.2$ — $0.3\%$ ). On the same medium, embryogenesis was induced and finally formed plantlets. It was observed from the sections that the embryoids derived either from the cell or the cell mass on the surface of the callus, or from the cell or the cell mass in the deep inner part of the callus. The developing order of embryoids was approximately the same as that of zygote embryos. They developed into plantlets via the stage of globular embryo, heart-shaped embryo, torpedo-shaped embryo and cotyledon embryo. Many abnormal embryoids appeared in the developing process.

**Key words:** *Camellia sinensis*; Callus; Embryoid; Somatic embryogenesis; Tissue culture

### 图版说明

#### 图版 I

1. 起源于愈伤组织表层的胚性细胞;  $\times 500$
2. 起源于愈伤组织表层的胚性细胞团;  $\times 200$
3. 起源于愈伤组织内部的胚性细胞团;  $\times 200$
4. 胚性细胞第一次分裂形成基细胞和顶端细胞;  $\times 200$
5. 球形胚;  $\times 200$
6. 早心形胚;  $\times 100$

图版 I

7. 晚心形胚；×100
8. 鱼雷胚；×50
9. 子叶胚；×20
10. 假珠芽纵切面；×20
11. 再生小植株。

Explanation of Plates

Plate I

1. Embryogenic cell (arrow) derived from the surface of the callus; ×500
2. An embryogenic cell cluster (arrow) derived from the surface of the callus; ×200
3. An embryogenic cell cluster derived from the inner part of the callus; ×200
4. First division of embryogenic cell for basal cell and terminal cell; ×200
5. Global embryoid; ×200
6. Early heart-shaped embryoid; ×100

Plate I

7. Later heart-shaped embryoid; ×100
8. Torpedo-shaped embryoid; ×50
9. Cotyledon embryoid; ×20
10. Pseudo-bulbil longitudinal section; ×20
11. Regeneration plantlets.