

65-68

巴西橡胶树 胚珠培养 愈伤组织 胚状体

维普资讯 http://www.cqvip.com

热带亚热带植物学报 1997, 5(4):65-68
Journal of Tropical and Subtropical Botany

巴西橡胶树未受精胚珠培养时愈伤组织与胚状体的起源(简报)

杨晓泉

(华南理工大学食品与生物工程学院, 广州 510641)

傅家瑞

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

5727-31

Q 941.46

THE ORIGIN OF CALLUS AND EMBRYOID IN CULTURED UNFERTILIZED OVULES OF *HEVEA BRASILIENSIS*

Yang Xiaoquan

(Department of Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510641)

Fu Jiarui

(Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

迄今为止, 利用未受精胚珠离体培养诱导木本植物形成单倍体植株的仅有杨树及巴西橡胶树两例^[1-3], 但均缺乏详细的胚胎学观察资料, 胚状体的起源不甚清楚。在某些草本植物中, 起源问题已有详细的研究。例如向日葵未受精胚珠离体培养时, 胚状体起源于未受精的卵细胞分裂^[4]; 水稻单倍体植株则来自助细胞无配子生殖形成的胚状体^[5]。木本植物未受精胚珠培养诱导单倍体植株大都经过愈伤组织阶段, 但愈伤组织的起源亦未见相应的切片观察资料。本文采用组织化学方法, 研究了巴西橡胶树未受精胚珠离体培养时胚状体及愈伤组织的起源, 以期对该问题有一个较明确的解释。

1 材料与方 法

材料 供试材料为巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis* Muell.-Arg.) 开花前 2-3 d 的雌花, 橡胶树品系为 IAN873。采自广东省湛江市亚热带作物研究所标本园。

方法 无菌条件下剖开子房, 挑选完整无损的胚珠接种在附加 1 mg L^{-1} 2,4-D; 1.2 mg L^{-1} 激动素 (KT); 5%(V/V) 鲜椰乳及 5%(W/V) 蔗糖的改良 MB 脱分化培养基上, 24 h 光照培养 (25 ℃)。改良 MB 培养基采用 MS 培养基的矿质元素及 B₉ 培养基的有机成分^[6], 并加以改进。接种第 2 天起分批取样, 乙酸/甲醇(1:3) 固定, PAS 整体染色^[6], 石蜡连续切片, 厚度 5 μ, 切片再经汞-溴酚蓝复染, 鉴定多糖与蛋白质, 并同时观察愈伤组织与胚状体的生长状态。Olympus BH-2 显微镜观察, 并照相记录。

2 结果与讨论

2.1 配子体

巴西橡胶树的胚珠属双珠被、厚珠心、倒生型, 具较长的珠心喙。珠心喙和内珠被的 PAS 反应强烈(图版 I: 1), 显示珠心喙和内珠被贮存大量淀粉粒。培养 4 d, 在胚囊珠孔端观察到

多个游离核(图版 I: 2)。这种现象与巴西橡胶树核型胚乳核的分裂极为类似^[7]。而在向日葵及水稻未受精胚珠离体培养中, 胚囊内的游离核多由次生核有限分裂而来^[1,2], 因此我们认为橡胶树未受精胚囊内的次生核在培养时发生了分裂。在培养 4 d 的胚囊珠孔端亦观察到具双核仁的卵细胞(图版 I: 3), 但未见卵细胞的横分裂。在培养 8 d 的胚囊珠孔端观察到汞-溴酚蓝深着色的细胞团(图版 I: 4), 但不具胚性结构。从培养 8 d 起, 胚囊中已很难观察到生活的雌配子体, 直至培养 24 d, 胚囊强烈收缩, 未见到配子体起源的细胞结构。

Raghavan 认为, 离体胚珠培养时胚乳的发育对合子胚的发育起先导与促进作用^[7], 对于木本植物尤其如此。巴西橡胶树的受精卵有长达 40 d 的休眠期, 胚乳的发育是其先决条件^[8]。本例观察到胚乳样次生核的分裂, 证明巴西橡胶树未受精胚珠离体培养时, 配子体已有启动, 但在后续培养中未能发育为胚状体或愈伤组织。

2.2 愈伤组织

培养第 2 天起即有愈伤组织产生, 最初出现在珠被的创伤面。创伤面下的薄壁细胞同时进入分生状态, 进行迅速平周分裂并形成小而致密的几层细胞, 类似形成层(图版 I: 5)。值得注意的是这组细胞分裂潜势不大, 随培养继续其分裂明显停滞。

第二类愈伤组织由外珠被内部的某些薄壁细胞脱分化而来, 与创伤无关。同周围的薄壁细胞相比, 这类分生细胞体积较小, 质浓, 形成一种独特的花环状结构(图版 I: 6)。切片观察显示这种分生细胞来自维管束附近的薄壁细胞, 多处于外珠被的两端。图版 I: 7 示培养 16 d 的胚珠纵切面, 显示珠被维管束与这类愈伤组织起源的关系。这种愈伤组织起源方式与某些木本植物如红杉营养器官培养时愈伤组织的起源类似^[9]。这类愈伤组织分裂潜势极强, 可持续分裂形成大量愈伤组织。随培养继续这类愈伤组织具有分化的趋势。

第三类愈伤组织启动较晚, 起源于珠被表皮层的单个细胞。这种脱分化的表皮细胞具有明显的核仁且细胞明显增大(图版 I: 8), 可无序分裂形成肿瘤状的愈伤组织, 主要发生在内珠被的内外两侧。PAS-汞溴酚蓝衬染的结果表明其正处在旺盛分裂期(图版 I: 9)。此外, 单个外珠被细胞可不对称分裂形成顶细胞与基细胞, 按胚胎发育形式形成类似胚胎的细胞结构, 随培养继续, 这种由单个或多个外珠被表皮细胞直接形成的细胞结构最终愈伤组织化, 多发生在外珠被外侧(图版 I: 10)。

比较内外珠被的 PAS 反应结果, 可知内珠被富含大量淀粉粒, 纤维化程度较低, 而外珠被纤维化程度较低, 不含淀粉粒。因此我们认为组织的淀粉含量是影响胚性细胞不对称分裂, 产生胚性结构的原因之一。

2.3 胚状体

本文在外珠被外侧观察到单个、两个或多个表皮细胞脱分化, 按类似胚胎发育模式形成的愈伤组织(图版 I: 10)。说明橡胶树未受精胚珠离体培养时, 孢子体组织有可能通过直接途径产生胚状体, 这一结论尚需进一步研究。

培养至 14-24 d, 观察到由内珠被愈伤组织发育而来的细胞结构(图版 I: 11-13)。其与愈伤组织之间有明显的 PAS 反应隔离层(图版 I: 11)。汞溴酚蓝衬染的结果显示其细胞较

小、质浓、分裂较为旺盛(图版 I: 12,13)。与胚状体的结构特征一致。这说明,在巴西橡胶树未受精胚珠在脱分化培养时,孢子体愈伤组织很容易形成类似胚状体的细胞结构。

在巴西橡胶树未受精胚珠或子房培养时,常用子房或胚珠膨大,愈伤组织突破子房壁或外珠被来判定单倍性愈伤组织及胚状体的起源^[1-3]。本实验表明富含淀粉的内珠被极易愈伤组织化,并可突破外珠被;外珠被薄壁细胞的脱分化亦可使胚珠外观膨大。在本实验的培养条件下,巴西橡胶树未受精胚珠离体培养时产生的愈伤组织及胚状体均为孢子体起源。因此,确定愈伤组织及胚状体起源仍需做详细的胚胎学研究。

参考文献

- 1 吴克贤,徐妙珍.杨树未授粉子房离体培养诱导母系单倍体植株.遗传学报,1982,11(1):47
- 2 陈正华,徐续恩等.三叶橡胶未授精子房培养再生植株.陈正华等主编.木本植物组织培养及其应用.北京:高等教育出版社,1986,190
- 3 郭高发,贾学军等.离体胚珠诱导巴西橡胶植株(简报).遗传,1982,4(1):27
- 4 阎华,吴燕等.向日葵未受精胚珠培养时胚状体发生的显微观察.植物学报,1985,27(1):13
- 5 田惠桥,杨弘远.水稻子房培养中的胚状体与愈伤组织的形态发生特点.植物学报,1984,26(3):372
- 6 孙敬三,钱迎倩.植物细胞学研究方法.北京:科学出版社,1987,40
- 7 Raghavan V. Embryogenesis in cultured ovaries, ovules and seeds. In: Raghavan V ed. Experimental Embryogenesis in Vascular Plants. Academic Press, London, 1976, 205
- 8 谢石文,邱德勃.巴西橡胶树大孢子发生与胚囊发育过程的研究.热带作物学报,1991,12(1):4
- 9 王凯基,张丕方.几种木本植物组织培养的愈伤组织及器官再生.植物学报,1981,23(2):97

图版说明

1-11 胚珠纵切, 1-4 示胚囊与配子体发育, 珠孔端朝上, 合点端朝下, c: 卵细胞, f: 游离核, v: 维管束

1. 培养 4 d, 示珠心喙 PAS 深着色的淀粉粒; × 416
2. 培养 4 d, 示胚囊的游离核(↑); × 416
3. 培养 8 d, 示胚囊卵细胞双核仁(↑); × 416
4. 培养 12 d, 示胚囊内汞-溴酚蓝深着色的细胞团(↑); × 416
5. 培养 4 d, 示内珠被创伤面的分生细胞(↑); × 208
6. 培养 8 d, 示外珠被的花环状结构(↑); × 208
7. 培养 16 d, 示外珠被的愈伤组织与维管束(↑)的关系; × 42
8. 培养 12 d, 示内珠被脱分化的表皮细胞(↑); × 416
9. 培养 16 d, 示内珠被富含淀粉粒及由其表皮细胞形成的愈伤组织; × 208
10. 培养 18 d, 示由外珠被表皮细胞(↑)形成的愈伤组织; × 208
11. 培养 20 d, 示内珠被愈伤组织表面形成的类胚状体, 其与愈伤组织之间具呈 PAS 反应的分隔(△); × 208
12. 培养 18 d, 横切面, 示内珠被愈伤组织产生的类胚状体细胞结构(↑); × 208
13. 培养 24 d, 游离的胚状体(↑). × 208

Explanation of plate

- 1-11 L. S. of ovules, 1-4 showing micropylar region of sacs. e=Egg cell, f=Free nucleus, v=Vascular bundle
1. After 4 days of culture, showing starch grains stained by PAS in nucellar beak; $\times 416$
 2. After 4 days of culture, showing free nuclei (\uparrow) in embryo sac; $\times 416$
 3. After 8 days of culture, showing egg cell with two nucleoli (\uparrow) in embryo sac, $\times 416$
 4. After 12 days of culture, showing multicellular structure stained densely by mercuric bromophenol blue; $\times 416$
 5. After 4 days of culture, showing meristematic cells occurred in wounded part of inner integument; $\times 208$
 6. After 8 days of culture, showing floral hoop-like structure (\uparrow) in outer integument; $\times 208$
 7. After 16 days of culture, showing callus and vascular bundle (\uparrow) of the outer integument; $\times 42$
 8. After 12 days of culture, showing a dedifferential epidemic cell (\uparrow) of the inner integument; $\times 416$
 9. After 16 days of culture, showing inner integument abundant in starch grains and the callus originated from its epidemic cells; $\times 208$
 10. After 18 days of culture, showing the callus originated from epidemic cells (\uparrow) of outer integument; $\times 208$
 11. After 20 days of culture, showing embryoid-like structure originated from the callus of inner integument, and the partitions (\uparrow) demonstrating PAS positive reaction, by which embryoid-like structure was separated from the callus; $\times 208$
 12. After 18 days of culture, C. S. of the ovules, showing embryoid-like structure originated from callus of inner integument; $\times 208$
 13. After 24 days of culture, showing free embryoid. $\times 208$