

低温预处理对水稻花药培养中 花药壁褐变的结构影响

姚焱¹, 刘向东², 汪珍春¹, 张桂权², 张平¹

(1. 广州大学生命科学学院, 广州 510006; 2. 华南农业大学植物分子育种研究中心, 广州 510642)

摘要: 药壁褐变是影响花药离体培养效率的因素。研究了粳稻品种台中 65 (*Oryza sativa* L.) 花药培养前低温预处理对药壁褐变的影响, 观察了花药褐变前后药壁各层的变化及褐变对小孢子发育的作用。结果表明: 药壁褐变主要发生在表皮与药室内壁。10℃低温预处理在花药培养前期可有效延缓表皮与药室内壁膜结构的降解速度, 减缓褐变发生; 花药经低温处理后, 药壁中层细胞膨大, 绒毡层降解速度减缓, 有利于花粉脱分化。药壁褐变会影响药腔内小孢子的活力和继续发育, 但不是制约花粉愈伤组织形成的关键因素。

关键词: 水稻; 花药培养; 低温处理; 花药壁褐变; 解剖学

中图分类号: Q944.42

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2006)04-0307-05

Effects of Cold Pretreatment on the Structure of Anther Wall Browning in Japonica Rice during Anther Culture

YAO Yan¹, LIU Xiang-dong², WANG Zhen-chun¹, ZHANG Gui-quan², ZHANG Ping¹

(1. College of Life Science, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China; 2. Plant Molecular Breeding Research Center, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Anther wall browning in variety Taichung 65 of japonica rice (*Oryza sativa* L.) was studied through cold pretreatment of anthers at late uninucleate stage. Some microstructural and ultrastructural changes in the anther wall were found during anther culture. Anatomical observation showed that anther wall browning took place mainly in epidermis and endothecium. Cold pretreatment of anthers at 10℃ could effectively reduce the browning rate during the early culture period and delay degradation of the membrane structures of epidermis and endothecium, and thus postpone browning in anther wall. Meanwhile, cold pretreatment contributed to stimulating cell enlargement in the middle layer and delaying tapetum degradation, which produced positive effects on the microspore dedifferentiation. Although anther wall browning favored microspore in vigor and development, it was not the key factor in reducing the ability of pollen callus induction.

Key words: *Oryza sativa* L.; Anther culture; Cold pretreatment; Anther wall browning; Anatomy

水稻花药培养过程中, 药壁组织对促进花粉愈伤组织的形成有积极作用^[1,2]。但培养时药壁经常发生褐变, 大大影响了花粉愈伤组织的形成。为了提高花药培养效率, 常采用低温预处理花药的方法。

低温可有效抑制花药壁的衰退, 有益于花粉脱分化^[3]。但低温处理是否能抑制药壁褐变, 而且药壁褐变对花粉发育如何产生作用没有相关报道。

植物培养物的褐变是由于多酚氧化酶 (PPO)

收稿日期: 2005-12-29 接受日期: 2006-05-10

基金项目: 国家自然科学基金 (39970048) 和霍英东教育基金 (71021) 资助

催化酚类物质生成褐色醌类物质而造成的。一般多酚氧化酶分布于细胞质体中,酚类物质存在于液泡中,培养过程中细胞结构损伤,会打破 PPO 与酚类物质的区域化分布,造成培养物褐变^[4]。

目前相关褐变研究集中在培养物褐变的理化基础^[5,6]、离体培养条件下如何减少褐变^[7]等方面,果实贮存与加工过程中的褐变现象^[8]也有较多涉及。但针对花药培养过程中药壁褐变发生的细胞学机理研究甚少。为此,我们采用低温预处理水稻花药,研究低温对花药壁褐变的效应,旨在揭示低温对水稻离体培养条件下花药壁组织结构的影响,并对药壁与花粉愈伤组织形成的关系进行探讨。

1 材料和方法

材料 粳稻品种台中 65 (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*)。

花药培养 依据穗的外部特征和镜检核对,在晴天露水干后采取小孢子晚期(又称单核晚期或单核靠边期)稻穗,经过 10 d 低温($10 \pm 1^\circ\text{C}$)预处理后接种(以直接培养作对照)。每处理接种花药 3 000 枚左右。培养基为 $\text{N}_6 + 2,4\text{-D } 2 \text{ mg L}^{-1} + \text{NAA } 3 \text{ mg L}^{-1} + \text{KT } 1 \text{ mg L}^{-1} + \text{麦芽糖 } 5\% + \text{水解乳蛋白 } 500 \text{ mg L}^{-1}$ 。26–28℃ 下暗培养,诱导产生花粉愈伤组织。接种 8 d、18 d 和 28 d 统计花药褐变率。

显微和超微结构观察 定期随机取培养中的花药,固定、脱水、渗透、包埋和切片等均参照冯九焕^[9]的方法。先进行半薄切片观察,选定合适观察材料制备超薄切片(每类样本选 3–5 枚花药),醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色, JEM-1010 型透射电子显微镜下观察并拍照。

2 结果

2.1 花药褐变率

花药在离体培养条件下,逐渐由接种时的淡黄色转为深褐色,统计直接培养与处理培养条件下的花药褐变率(表 1)。

培养 8 d, 处理培养花药的褐变率显著低于直接培养的花药;但随着培养时间的延长,花药抗褐变能力下降,培养 18 d 时,与直接培养的差异已不明显。

表 1 直接培养和低温处理培养条件下的花药褐变率

Table 1 Anther browning rates (%) in cold pretreated and untreated rice anthers

培养天数 Days of culture	直接培养褐变率 Untreated (%)	低温处理培养褐变率 Cold pretreated (%)
8	20.1	9
18	36.3	34.4
28	37.7	36.5

2.2 花药壁的显微和超微结构

培养前的正常花药壁结构:表皮、药室内壁、中层、绒毡层等各层明显,小孢子处于小孢子晚期(图版 I:1)。表皮、药室内壁与中层有中央大液泡,将细胞器挤压至靠细胞壁侧;绒毡层细胞质浓(图版 I:2)。

直接培养时的花药壁变化:培养 1 d 后,表皮细胞内膜系统被破坏,胞质异常;药室内壁受破坏程度较轻,液泡基本完整。中层、绒毡层仍存在(图版 I:3);培养 4 d 后,表皮细胞和药室内壁降解严重,集聚大量黑色颗粒物;药室内壁垂直向壁逐渐加厚,有助于花药开裂散粉。中层与绒毡层已降解消失(图版 I:4)。结合显微切片,直接培养 4 d 时小孢子干瘪死亡率为 53.8%。

处理培养时的花药壁变化:在低温处理 10 d 后,小孢子大部分具有正常活力,药壁仍具明显四层结构:表皮细胞存在大液泡,药室内壁细胞质浓,含丰富的细胞器;中层、绒毡层存在(图版 I:5)。处理花药培养 4 d 后,表皮细胞存在大液泡;药室内壁具有丰富细胞器;中层未降解消失反而异常膨大;绒毡层仅存少量残迹(图版 I:6);结合显微切片,已脱分化的多细胞花粉粒出现在中层膨大的药腔内的几率达 83.9%(图版 I:8);此时小孢子干瘪死亡率为 38.2%。培养 6 d 后,表皮细胞膜结构已破坏,胞内聚集黑色颗粒物,药室内壁含丰富的质体,液泡基本完整,还未有黑色物质生成;膨大中层逐渐降解,绒毡层消失(图版 I:7)。培养 8 d 左右,表皮与药室内壁均有黑色物质聚集,中层与绒毡层消失(图版 I:9)。此时小孢子干瘪死亡率为 56.1%。

3 讨论

3.1 低温预处理抑制花药壁褐变的原因

水稻花药经低温预处理后可有效抑制培养早

期的药壁褐变。褐变是由于 PPO 催化酚类物质生成褐色醌类物质而造成的^[4]。通过对药壁结构的观察发现:低温处理延缓了表皮与药室内壁细胞内膜系统的降解速度,有利于多酚氧化酶(分布在细胞质体中)与酚类物质(分布于液泡中)的区域化,推迟了 PPO 催化酚类的速度,因此延缓了花药壁褐变。

对培养物褐变的生理机制有零星报道。Tang 等发现松树培养物褐变时会造成多胺物质含量的下降^[5];褐变发生前后,外植体细胞内的 PPO、抗氧化物酶含量会发生变化^[5,6];褐变外植体总酚含量和苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性会随褐变程度的加重逐渐增加^[10]。Laukkanen 等^[6]、许传俊等^[10]还分析了褐变物质的化学成分,其中含有有毒的鞣质—单宁。至于水稻花药壁褐变的生理生化机制还需进一步研究。

3.2 花药壁结构与花粉愈伤组织诱导的关系

药壁组织对花粉愈伤组织的形成有重要影响^[1,2],尤其是绒毡层对小孢子脱分化的作用。其它药壁结构对花粉脱分化的影响和作用却了解不多。通过观察发现,表皮、药室内壁和中层对花粉愈伤组织的形成具有不同程度的作用。首先,位于花药外围的表皮与药室内壁发生褐变后,褐变的有毒物质会对药腔花粉产生毒害,造成小孢子死亡或抑制花粉愈伤组织的形成和发育。但这种影响和抑制是在药壁褐变后产生的,如果采取一定方法延缓或阻止褐变,那么这种抑制作用会降低;其次,我们观察到中层在离体培养早期出现了异常膨大现象,这可能与小孢子脱分化有关。Clément C 和 Audran 认为中层是控制糖类由外围药壁转运至药腔内小孢子的营养输送通道^[11]。本研究也发现中层膨大有助于多细胞花粉粒的形成。

值得注意的是,花药培养的早期是中层与绒毡层发生较大变化的时期,这往往也是小孢子脱分化的关键时期。结合前人研究,我们认为中层和绒毡层是诱导花粉愈伤组织的主要药壁因子,而表皮与药室内壁的褐变,只能对已分化小孢子的继续分裂和发育造成影响,不是制约花粉愈伤组织形成的关键因素。

参考文献

[1] Heberle-Bors E. Isolated pollen culture in tobacco: plant reproductive development in a nutshell [J]. Sex Plant Reprod, 1989, 2:1-10.

- [2] Yao Y(姚焱), Lu Y G(卢永根), Liu X D(刘向东), et al. Cytological studies on the pollen and anther of Taichung 65 (*Oryza sativa* L. subsp. japonica) during the anther culture [J]. Chin J Rice Sci (中国水稻科学), 2004, 18(2):113-118. (in Chinese)
- [3] Zhong H X(钟华鑫), Fang G W(方国伟), Liang H M(梁海曼). Effects of cold pretreatment on the efficiency of indica rice anther culture [J]. Acta Phytophysiol Sin(植物生理学报), 1987, 13(2):144-153. (in Chinese)
- [4] Luo X F(罗晓芳), Tian Y T(田砚亭), Yao H J(姚洪军). Polyphenol oxidase activities and phenol contents in tissue culture [J]. J Beijing For Univ(北京林业大学学报), 1999, 21(1):92-95. (in Chinese)
- [5] Tang W, Newton R J. Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginians* Mill.) [J]. Plant Sci, 2004, (167):621-628.
- [6] Laukkanen H, Rautiainen L, Taulavuori E, et al. Changes in cellular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds [J]. Tree Physiol, 2000, (20):467-475.
- [7] Wu H C, Toit E S. Reducing oxidative browning during *in vitro* establishment of *Protea cynaroides* [J]. Sci Hort, 2004, (100):355-358.
- [8] Duan X W(段学武), Jiang Y M(蒋跃明), Su X G(苏新国), et al. Effects of pure oxygen on browning in Litchi fruit and changes in ultrastructure of peel tissue during storage [J]. J Trop Subtrop Bot (热带亚热带植物学报), 2004, 12(6):565-568. (in Chinese)
- [9] Feng J H(冯九焕), Lu Y G(卢永根), Liu X D(刘向东), et al. Pollen development and its stages in rice (*Oryza sativa*) [J]. Chin J Rice Sci (中国水稻科学), 2001, 15(1):21-28. (in Chinese)
- [10] Xu C J(许传俊), Li L(李玲), Li H(李红), et al. Preliminary studies on the elements of browning and the changes in cellular texture of leaf explant browning in *Phalaenopsis* [J]. Acta Hort Sin (园艺学报), 2005, 32(6):1111-1113. (in Chinese)
- [11] Clément C, Audran J C. Anther wall layers control pollen sugar nutrition in *Lilium* [J]. Protoplasma, 1995, 187:172-181.

图版说明

图版 I

EP: 表皮; EN: 药室内壁; ML: 中层; TA: 绒毡层; V: 液泡; P: 质体; M: 线粒体。

1. 培养前正常花药壁结构及单核小孢子; ×400
2. 培养前正常花药壁超微结构; ×3 000
3. 直接培养 1 d 的药壁结构: 表皮细胞膜结构破坏; ×3 000
4. 直接培养 4 d 的药壁结构: 表皮、药室内壁贮存黑色物质, 中层、绒毡层消失; ×3 000
5. 低温预处理 10 d 的花药; ×3 000
6. 处理后培养 4 d 的药壁结构: 膨大的中层; ×4 000
7. 处理后培养 6 d 的药壁结构; ×4 000
8. 处理后培养 4 d 的药壁及小孢子的显微结构: 膨大的中层及多细

胞花粉粒; $\times 1\ 000$

9. 处理后培养 8 d 的药壁及小孢子的显微结构。 $\times 1\ 000$

Explanation of plates

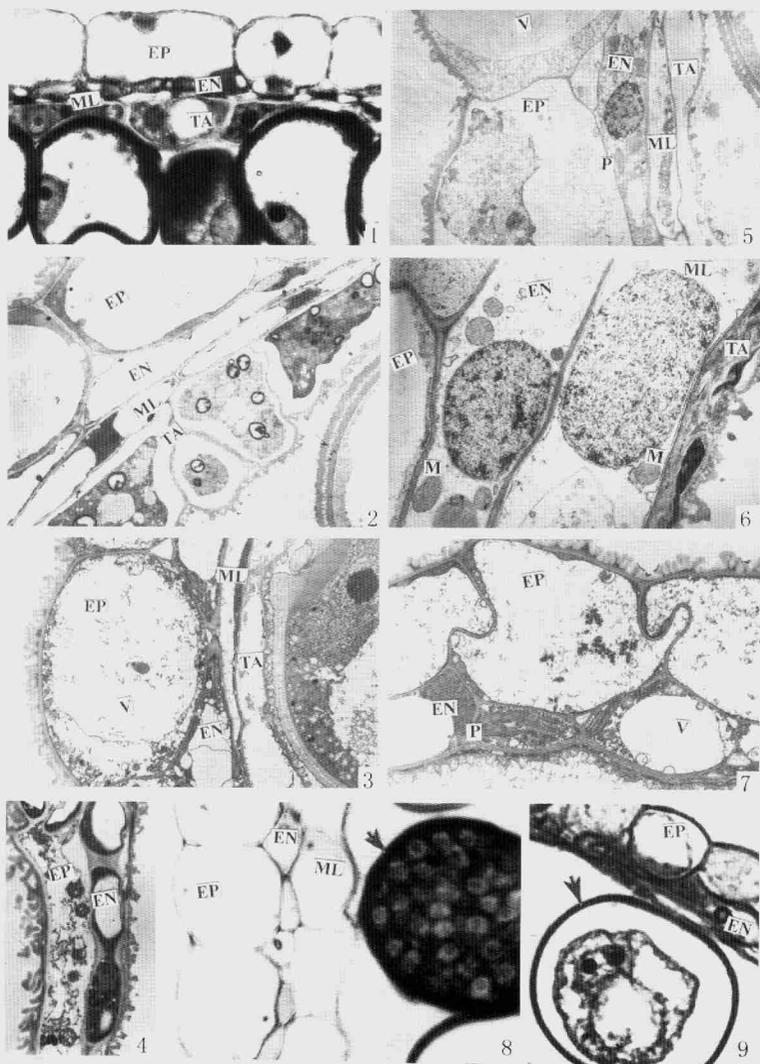
Plate I

EP: Epidermis; EN: Endothecium; ML: Middle layer; TA: Tapetum;
V: Vacuole; P: Plastid; M: Mitochondria.

1. Normal structure of anther wall and microspores before anther culture; $\times 400$
2. Normal ultrastructure of anther wall before anther culture; $\times 3\ 000$
3. Anther wall after untreated culture for 1 d: showing the membrane

structure of epidermis being destroyed; $\times 3\ 000$

4. Anther wall after untreated culture for 4 d: showing black substances gathering in epidermis and endothecium, middle layer and tapetum absent; $\times 3\ 000$
5. Anther wall cold pretreatment for 10 d; $\times 3\ 000$
6. Anther wall after pretreated culture for 4 d: showing the middle layer being enlarged; $\times 4\ 000$
7. Anther wall after pretreated culture for 6 d; $\times 4\ 000$
8. Anther wall and microspores after pretreated culture for 4 d: showing the enlarged middle layer and multicellular pollen; $\times 1\ 000$
9. Anther wall and microspores after pretreated culture for 6 d. $\times 1\ 000$



姚焱等:图版 I

YAO Yan et al.: Plate I