

籼稻体细胞胚胎发生形态鉴别的研究

陈远玲¹

简玉瑜¹

徐雪宾²

(1 华南农业大学遗传工程研究室,510642,广州;2 华南农业大学农学系)

摘要 以籼稻品种秋桂矮11发芽种子的幼芽基部为外植体,以N₆培养基附加2,4-D 2 mg/L和脯氨酸0~40 mmol/L诱导愈伤组织,对愈伤组织进行了立体解剖、扫描电镜观察和GMA塑料薄片观察。结果表明,愈伤组织可分为胚性、中间型和非胚性3大类;胚性愈伤组织与非胚性愈伤组织在外观特征和内部结构方面都存在显著差异,前者明显分化成6类细胞,其中包括传递细胞;后者分化程度低,且没有观察到传递细胞;中间型愈伤组织处于不稳定状态,可向胚性与非胚性2个方向转化。体细胞胚胎发生经历了原胚(二细胞、四细胞、多细胞)、梨形胚、盾片分化期胚和成熟胚等时期。讨论了愈伤组织形态鉴别的有效性、传递细胞在体细胞胚胎发生过程中的可能作用和胚性细胞及体细胞胚的特点。

关键词 籼稻;体细胞胚胎发生;形态解剖;组织切片;传递细胞

中图分类号 Q944.6

愈伤组织的形态鉴别对愈伤组织状态的调控和再生率的提高具有重要意义。在小麦(*Triticum aestivum*)上,利用形态鉴别在不同阶段挑选不同状态的愈伤组织,已被认为是原生质体培养成功的关键之一,并且建立了一套明确可靠的形态鉴别指标(王海波等,1991)。籼稻(*Oryza sativa* L. subsp. *indica*)培养物的再生频率普遍较低,因此愈伤组织的挑选和状态的调控就比基因型的筛选更为重要。为了探讨籼稻愈伤组织形态鉴别的可靠依据,我们对愈伤组织进行了肉眼观察分类、立体解剖观察、扫描电镜观察和组织切片等由表及里的观察研究,并进行了分化培养验证。

1 材料与方法

1.1 材料

秋桂矮11的成熟种子由华南农业大学农学系提供。

1.2 方法

1.2.1 愈伤组织的诱导和继代 以5~7日龄无菌苗的幼芽基部为外植体,诱导和继代培养基为N₆(朱至清等,1975)+2,4-D⁽¹⁾ 2 mg/L+脯氨酸0~40 mmol/L+蔗糖30 g/L+琼脂8 g/L(灭菌前pH调至5.8),接种和培养按常规方法进行。愈伤组织可产生于幼叶表面、芽与残留盾片交接处,主要挑取交接处的愈伤组织继代。

1.2.2 立体解剖镜下形态观察 根据愈伤组织的外观、质地等特征,肉眼观察并分类,然后用Olympus立体解剖镜观察及照相,之后分别固定于3%戊二醛中,用于切片。

1993-04-09收稿

(1)2,4-dichlorophenoxyacetic acid,2,4-二氯苯氧乙酸。

1.2.3 冰冻扫描电镜下形态观察 肉眼区分的不同类型的愈伤组织,经液氮快速冷冻直接上镜去霜后观察表面形态结构。此项工作在华南植物研究所电镜室完成。

1.2.4 组织切片 GMA⁽²⁾ 塑料薄切片,厚度2—3 μm ,PAS⁽³⁾—甲苯胺蓝—O 染色,参照徐是雄(1981)的方法。Olympus 显微镜观察并照相。

1.2.5 分化培养验证 各类愈伤组织分别分化培养于 $\text{N}_6 + \text{NAA}^{(4)} 0.5 \text{ mg/L} + \text{KT}^{(5)} 2 \text{ mg/L} + \text{蔗糖} 30 \text{ g/L} + \text{琼脂} 8 \text{ g/L}$ (pH5.8),观察植株分化情况,以验证分类的可靠性。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的外部形态与分类

根据肉眼、立体解剖镜和扫描电镜观察,愈伤组织可分为胚性、中间型和非胚性3大类,现分述如下。

2.1.1 胚性愈伤组织的特点 胚性愈伤组织外观鲜白至乳白色、不透明、结节状或有光滑圆球状突起。立体解剖镜下观察发现这些结节状突起实际上是一个个不同发育阶段的体细胞胚,胚与胚之间彼此独立,与母体愈伤组织联系也不紧密(图版 I 3,4)。早期的胚性愈伤组织没有形成明显的体细胞胚,扫描电镜观察发现,愈伤组织块有明显的隔离现象,即一块愈伤组织被分成许多小团块,小团块彼此联系松散,表面光滑(图版 I 2),进一步放大其局部表面可见由数个圆球状细胞组成的小细胞团正从愈伤组织内部向外突出(图版 I 1),它们很可能是早期的原胚。

转入分化培养后,这类愈伤组织全部可以再生出绿色完整植株。

2.1.2 非胚性愈伤组织的特点 这类愈伤组织根据外形差异还可分为3个亚类。第一亚类(Ⅲa)为淡黄色、半透明、粗糙、湿润团块。扫描电镜观察发现也有一定程度的隔离,但小团块的表面极为粗糙(图版 II 4,5)。它们在早期继代时分裂旺盛、增殖极快,后期则停止生长,逐渐变褐死亡。分化培养时不能形成植株,有时可见少量绿点或芽,但它们很快褐化、死亡。第二亚类(Ⅲb)为色泽暗淡、半透明、粘糊状的愈伤组织。电镜下观察其表面粗糙,表面细胞呈长管状。它们完全没有分化能力,有时能形成一些毛状物(图版 II 1,2)。

第三亚类(Ⅲc)是白色、干燥、珊瑚石状的愈伤组织,常形成于愈伤块的顶部,培养时间过长以致培养基水分蒸发过多时也易形成这类愈伤组织。它们也完全没有分化能力。

2.1.3 中间型愈伤组织的特点 这类愈伤组织可分为2个亚类:Ⅱa和Ⅱb。Ⅱa为淡黄、光滑、松散颗粒,出现于诱导培养和早期继代培养中。分化培养时有些能形成鲜白的胚性区域,有些则形成毛状物。

Ⅱb是淡黄、松脆团块,表面有光滑球形突起。分化培养时可形成少量胚性区域,但多次继代后会逐渐变成Ⅲa型,从而不能形成胚性组织。

2.2 胚性与非胚性愈伤组织的内部结构

2.2.1 胚性愈伤组织的内部结构 切片结果表明,胚性愈伤组织从总体来说富含淀粉粒,细胞排列紧密,细胞大小相近。但它不是均质的,而是细胞明显分化的组织,这是胚性

(2):Glycol methacrylate,乙二醇甲基丙烯酸酯;(3):Periodic acid/Schiff's,高碘酸/锡夫氏试剂;
(4):Naphthalene acetic acid,萘乙酸;(5):Kinetin,激动素。

与非胚性愈伤组织的显著差异之处。胚性愈伤组织内部的细胞大致可分为6类:1、贮藏细胞;2、分生细胞;3、胚性细胞;4、表皮细胞;5、传递细胞;6、维管束细胞。

贮藏细胞是富含淀粉粒的薄壁细胞,比分生细胞稍大,排列不规则但细胞间隙小,是胚性愈伤组织内部最大量的细胞(图版Ⅲ5)。

分生细胞存在于拟形成层和分裂中心,极少淀粉粒,细胞小、核大,细胞质浓,排列紧密有规律(分裂中心的呈辐射状排列,拟形成层的呈带状排列)(图版Ⅲ4)。

胚性细胞与分生细胞相似,但排列不规则。原胚细胞团内部的细胞,其细胞壁未明显加厚;而团与团之间相邻的细胞,壁加厚,使得团与团之间有明显界限。此外,胚性细胞的分裂有极性,即分裂成大小两个细胞,大的纵裂,小的横裂,形成四细胞的原胚(图版Ⅲ6)。

表皮细胞是体细胞胚的原表皮层细胞。梨形胚时期就已形成明显的原表皮层(图版Ⅳ2),从而使体细胞胚大部分与母体隔开,只留少部分相联。表皮细胞进行垂周分裂,排列很规则,因而胚性愈伤团块的表面相当光滑。

几乎所有的胚性愈伤块内部都观察到传递细胞的存在。传递细胞的特点是细胞次生壁及紧贴其上的细胞膜向细胞腔内生长,形成“壁—膜器”突起(Gunning et al, 1969)(图版Ⅲ1,2);并且它们是活的细胞,有明显的细胞核和细胞质;甲苯胺蓝—O染色细胞壁呈蓝(带红)色,与纵切面的螺纹或环纹导管分子(甲苯胺蓝—O染色呈绿色)不同。

胚性愈伤组织内部有时可见丰富的维管组织,主要是导管分子(图版Ⅲ3)。

2.2.2 非胚性愈伤组织的内部结构 Ⅲa型的非胚性愈伤组织也有一些分裂中心和少量胚性细胞团,但它们周围则是大量较均一的细胞,它们很少淀粉粒,分化程度明显低于胚性愈伤组织(图版Ⅱ6)。

典型的非胚性愈伤组织(Ⅲb型)呈内实外松的结构,即团块(或颗粒)中央细胞排列紧密,越到边缘越松散。这种愈伤组织的细胞多呈长管状,它们也有分裂中心,但未见胚性细胞团(图版Ⅱ3)。

非胚性愈伤组织从总体而言含淀粉粒少,没有观察到维管组织和传递细胞。

3 结论与讨论

3.1 愈伤组织的早期形态鉴别和挑选是有效的

多数学者根据体细胞胚胎发生能力和外观特征将愈伤组织分为胚性与非胚性2类(Heyser et al, 1983)。有些学者则认为还存在中间型,一定条件下可诱导其向另两类转化(王海波等, 1991)。本试验的结果支持上述第2种观点。各类愈伤组织的区分是相对的,它们互相联系,一定条件下也可互相转化(见图1示)。

在愈伤组织培养的早期阶段(即诱导出愈伤组织后继代1~2次)挑选出Ⅰ型和Ⅱa型愈伤组织进行培养,而除去Ⅲ型,可有效提高分化率。但由于Ⅱ型愈伤组织是不稳定的,所以在挑选的同时还应注意愈伤组织状态的调控。我们发现培养基中加入脯氨酸可促使Ⅱ型向Ⅰ型转化。

3.2 传递细胞的可能作用

胚性愈伤组织内广泛存在传递细胞这一现象以往未见报道。但是关于整体植株内传递细胞的特征、发生、分布、功能乃至超微结构却早已有详尽综述。Gunning 和 Pate 指出,传递细胞的“壁—膜器”不仅增加了原生质体的面积/体积比率,而且与内膜系统及细胞器

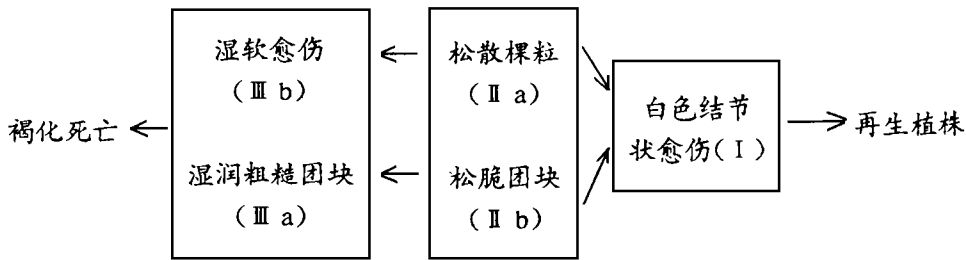


图1 各类愈伤组织之间的关系

关系密切,因而它们是短途装卸溶质的有效形式。事实上传递细胞也正是多发生于表面积/体积比率不利于运输或运送溶质的溶剂流太小的情形(Gunning et al, 1969)。体细胞胚与母体连接面积小,而它的分化发育则需大量养分,愈伤组织内部、体细胞胚附近和内部的传递细胞很可能起到了集中、专向、高效的养分(或其他生理活性物)调配作用。

3.3 胚性细胞与体细胞胚

许多报道指出,胚性细胞富含淀粉粒(王大元, 1984; 陈东方等, 1986; Pritilata et al, 1989), Vasil(1990)还指出当胚性愈伤组织变为非胚性时,胚性细胞的淀粉粒消失。本试验的结果则表明胚性细胞不含淀粉粒或含极少淀粉粒(图版Ⅲ6),体细胞胚也只有到了梨形胚后期才可见明显的淀粉粒(图版Ⅳ2,淀粉粒经PAS染色呈紫红色,黑白照片上呈黑点状)。判断细胞是否胚性最主要的特征是分裂是否有极性。

关于水稻体细胞胚的结构,凌定厚等(1988)和 Jones 等(1989)通过组织切片观察到原胚、盾片分化期胚和带有胚芽、胚根、盾片的成熟胚。在其他禾本科植物上,如紫狼尾草(*Pennisetum purpureum* Schum.) (Wang D Y et al, 1982)和稗草(*Echinochloa crusgalli* L.) (王大元等, 1984)还有典型的体细胞胚的扫描电镜照片,可见盾片、胚芽、胚根、胚芽鞘和胚根鞘等结构。这说明体细胞胚与合子胚在结构上是极为相似的。但从前人的报道和我们的观察来看,水稻的体细胞胚又似乎比其合子胚结构简单,它们成熟后即可萌发,并未观察到象合子胚那样的侧鳞,外胚叶等精细的保护性结构。这些结构是水稻系统发育过程中适应其生态环境的产物,组织培养时生态环境变了,它们是否不再形成了?这还须通过扫描电镜大量观察体细胞胚的结构才能找到充分的证据。

致谢 承香港大学徐是雄博士赠送 GMA, 本校农学系顾信媛教师提供种子, 并得到何远康、韩惠珍、郑玉梅等副教授的热情帮助。谨此致谢。

参 考 文 献

- 王大元. 1984. 禾谷类植物的细胞培养和体细胞胚胎发生, 细胞生物学杂志, 6(1):16~20
- 王大元, 孔 焱. 1984. 从稗草花序培养诱导的体细胞胚胎发生和植株再生. 实验生物学报, 17(3): 271~279
- 王海波, 方仁, 王培. 1991. 小麦原生质体培养. 见颜昌敬主编. 农作物组织培养. 上海: 上海科学技术出版社: 191~204
- 朱至清, 王敬驹, 孙敬三. 1975. 通过氮源比较试验建立一种比较好的水稻花药培养基. 中国科学, (5): 484~490
- 陈东方, 夏镇澳. 1986. 从棒头草幼穗培养获得体细胞胚和再生植株, 植物生理学报, 12(4): 333~

341

- 凌定厚, Brar D S, Zapata F J. 1988. 水稻体细胞胚胎发生的组织学及细胞学研究. 植物学报, 30(5): 485~489
- 徐是雄. 1981. 植物材料的薄切片超薄切片技术. 北京: 北京大学出版社, 37~64
- Vasil I K. 1990. 改良禾谷类农作物的细胞和组织培养系统的发展. 国外作物组织培养. 邵宏波, 初立业译. (26): 62~84.
- Gunning BES, Pate J S. 1969. "Transfer cells" Plant cells with wall ingrowths, specialized in relation to short distance transport of solutes — their occurrence, structure, and development. *Protoplasma*, 68: 107~133
- Heyser J W, Dykes T A, DeMott K J, et al. 1983. High frequency, long term regeneration of rice from callus cultures. *Plant Sci Lett* 29: 175~182
- Jones T J, Rost T L. 1989. The developmental anatomy and ultrastructure of somatic embryos from rice (*Oryza sativa* L.) scutellum epithelial cells. *Bot Gaz*, 150(1): 41~49
- Pritilata Nayak, Sen SK. 1989. Plant regeneration through somatic embryogenesis from suspension cultures of a minor millet, *Paspalum scrobiculatum*. *Plant Cell Rep*, 8: 296~299
- Wang D Y, Vasil I k. 1982. Somatic embryogenesis and plant regeneration from inflorescence segments of *Pennisetum purpureum* Schum (Napier or elephant grass). *Plant Sci Lett*, 25: 147~154

STUDIES ON MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS OF *Indica* RICE (*Oryza sativa* L.)

Chen Yuanling¹⁾ Jian Yuyu¹⁾ Xu Xuebin²⁾

(1 Genetic engineering lab, 2 Dept. of Agronomy, South China Agr. Univ., 510642, Guangzhou)

Abstract Calli of *indica* rice Qiu Gui Ai No. 11 were induced from segments of seedling base (5~7 days old) cultured on $N_6 + 2, 4 - D_2$ mg/L + proline 0~40 m mol/L to make morphological observations by dissection, scanning electron microscopy and GMA embedded thin section. The results showed that the calli consisted of three types: the embryogenic (E), the mediate (M) and the non-embryogenic (NE). There were great differences between E and NE callus in appearance and histological structure. The E callus differentiated into six kinds of cells including transfer cells, while the NE was in lower differentiation where transfer cells had not been observed. The M callus was in an unstable state and could change into E and NE callus. The process of somatic embryogenesis underwent proembryonic, pear-shaped, scutellum differentiated and mature embryonic stage. Several discussions were made on the feasibility of callus morphological characterization, the possible function of transfer cells on somatic embryogenesis and the characteristics of embryogenic cells and somatic embryos.

Key words *Oryza sativa* L. subsp. *indica*; Somatic embryogenesis; Morphological dissection; Histological section; Transfer cell

生的形态过程(如轴部)发
生。细胞在轴部增殖并
向两端分化。轴部细胞
的分裂使轴部细胞不断
增殖。轴部细胞的增殖
使轴部细胞不断增殖。轴
部细胞的增殖使轴部细胞
不断增殖。轴部细胞的增
殖使轴部细胞不断增殖。

