

油茶子叶体细胞胚形成的细胞学观察

张智俊^{1,*} 金晓玲² 罗淑萍³ 李亚玲³ 田兴军¹

¹南京大学生命科学学院, 南京 210093; ²浙江师范大学生命科学学院, 金华 312006; ³新疆农业大学农学院, 乌鲁木齐 830052

摘要 以油茶子叶块为外植体, 在附加 2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D 和 1.0 mg·L⁻¹ KT 的 MS 培养基上进行培养, 观察诱导产生的体细胞胚性愈伤组织细胞学结构。结果表明: 油茶体细胞胚可直接起源于表皮或近表皮的单细胞原胚或者多细胞团。其中, 单细胞原胚先分裂形成二细胞原胚, 二细胞原胚再进一步分裂后聚集形成多细胞团, 最终经过球形胚、梨形胚、心形胚发育形成一个完整的体细胞胚。

关键词 油茶; 子叶; 体细胞胚; 细胞学观察

Cytological Observation On Somatic Embryogenesis Derived from Cotyledons of Oil Tea (*Camellia oleifera*)

ZHANG Zhi-Jun^{1,*}, JIN Xiao-Ling², LUO Shu-Ping³, LI Ya-Ling³, TIAN Xing-Jun¹

¹School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093; ²College of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 312006; ³College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052

Abstract The cotyledon cubes as explants of oil tea (*Camellia oleifera*) were cultured on MS medium added with 2,4-D 2.0 mg·L⁻¹ and KT 1.0 mg·L⁻¹ to form embryogenetic callus. Experiment results showed that the somatic embryo directly developed from single embryogenetic cell or cell aggregate under the surface of embryogenetic callus. The embryogenetic cell first divided into two-cell pro-embryo, followed with clustering into multiple cell pro-embryo, then developed into globular embryo, pear-shape embryo, heart-shape embryo and lastly into a whole somatic embryo.

Key words *Camellia oleifera*; cotyledons; somatic embryogenesis; cytological observation

油茶是原产我国南方的木本油料树种。虽然油茶在我国栽培历史长达 2 300 多年, 但有关油茶的组织培养工作还处于起步阶段。目前, 国内外相关油茶组织培养的报道很少。尚未见到国外有任何相关的报道。在国内, 最早关于油茶组织培养的研究是颜慕勤^[1]于 1980 年报道的, 主要通过组织培养诱导出了体细胞胚, 通过体细胞胚形成了再生植株, 其后隆振雄^[2]和卢天玲^[3]也分别采用油茶未成熟子叶和幼胚离体培养, 成功地获得了再生植株, 但他们都未对油茶体细胞胚的起源和形成过程做深入研究。本文则旨在对诱导产生的体细胞胚形成过程进行细胞学结构观察, 初步揭示油茶体细胞胚的起源和大致的发生过程, 现报道如下。

材料与amp;方法

材料为油茶 (*Camellia oleifera*) 优良无性系湘林 4 号的未成熟果实, 采自湖南林业科学院长沙油

茶优良无性系种质资源圃。去皮后培养在 MS 培养基上, 待子叶萌发膨大后, 切成 0.6 cm×0.6 cm 小块置于愈伤组织诱导培养基 (MS+2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+1.0 mg·L⁻¹ KT), 培养 20 d 后转移到分化培养基 (MS+2.5 mg·L⁻¹ 6-BA+1.5 mg·L⁻¹ IAA) 上继续培养。从转入愈伤组织诱导培养基开始, 每隔 5 d 取一次样, 用 FAA (2.5% 戊二醛和 1% 锇酸固定) 固定 24 h, 爱氏苏木精整染 3 d。按常规石蜡切片程序处理和切片, 切片厚度 7~8 μm, 脱蜡封片后在 Leica 光学显微镜下观察, Sony 数码相机拍照。

实验结果

1 油茶体细胞胚愈伤组织的形成

经过 2,4-D 附加 KT 的诱导, 在 MS 培养基上

收稿 2004-02-02 修定 2004-06-21

资助 国家博士后基金项目 (0208003034)。

* E-mail: zhangzhi.jun.student@sina.com, Tel: 025-3687725

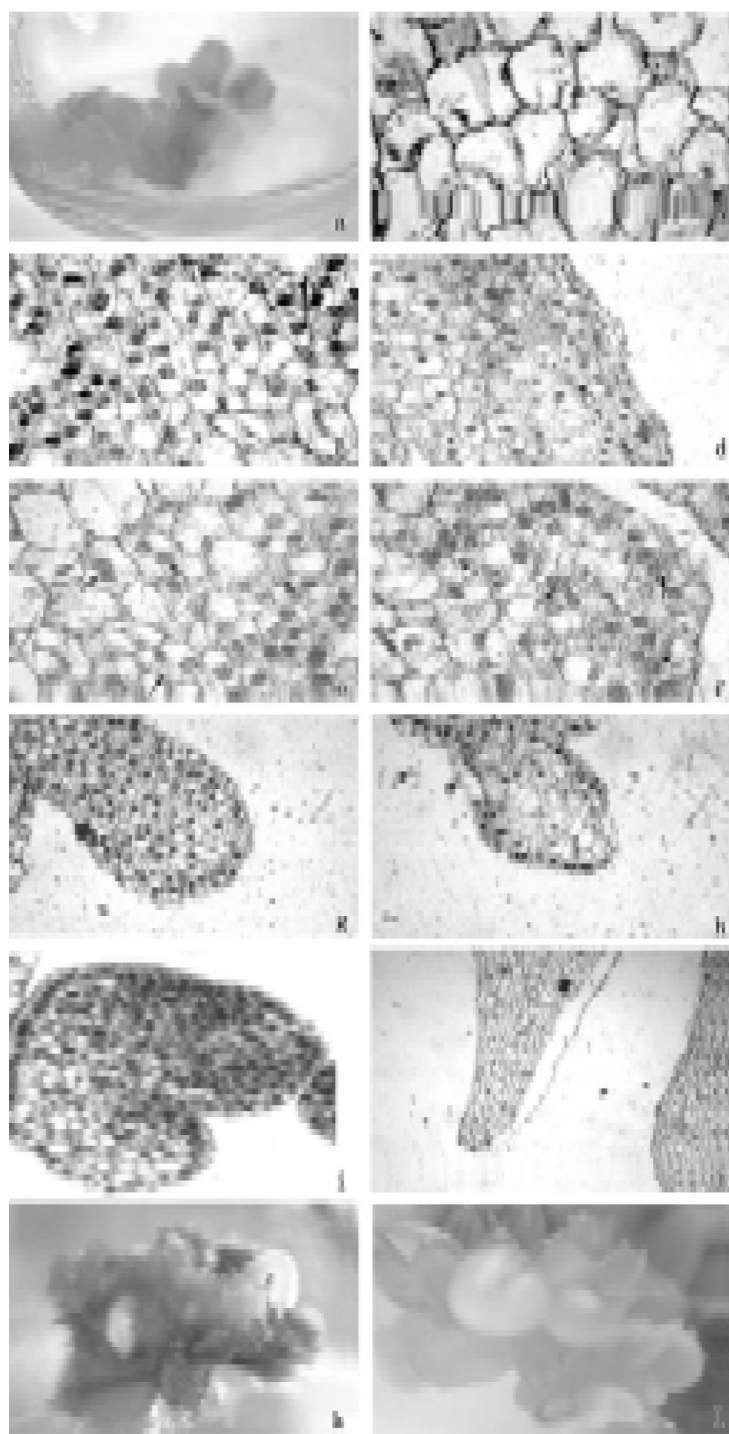


图1 油茶胚性愈伤组织的形成和体细胞胚的发生

Fig. 1 Formation of embryogenic callus and development of somatic embryo of oil tea

a. 油茶胚性愈伤组织; b. 非胚性愈伤组织 ($\times 200$); c. 胚性愈伤组织 ($\times 200$); d. 单细胞原胚 ($\times 200$); e. 二细胞原胚 ($\times 400$); f. 胚性愈伤组织内的多细胞团 ($\times 400$); g. 球形胚 ($\times 100$); h. 梨形胚 ($\times 100$); i. 心形胚 ($\times 100$); j. 不定根 ($\times 40$); k. 不定根; l. 假珠芽。

油茶子叶基部, 靠近叶柄的切口处产生绿色或淡黄色愈伤组织, 并在表皮开始出现凹凸不平的皱起(图1-a)。石蜡切片镜检表明: 在油茶组织培养过程中, 子叶表皮细胞中或近表皮细胞有部分细胞从非胚性细胞(图1-b)转化为胚性细胞(图1-c)。这类胚性细胞同非胚性细胞相比有一些明显的特点: 胚性细胞的细胞核较大, 细胞质浓, 无液泡, 将来可发育成体细胞胚。

2 油茶体细胞胚主要的形成过程

在胚性愈伤组织细胞中, 常见到的是胚性细胞以胚性细胞团的形式存在。除此之外, 还有两类细胞很特别, 一类是少数单个细胞核很大, 细胞壁厚, 此类细胞同其他细胞界限明显(图1-d); 另一类是细胞有很清晰的垂周分裂的现象: 单个细胞内存在两个细胞核, 核大小相等或一大一小(图1-e)。前者为单细胞原胚, 后者为二细胞原胚。单细胞原胚和二细胞原胚的出现可能是在特定的内外因素相互作用的条件下形成的, 其形态发生并不一定比胚性多细胞团早, 因为在发现单细胞原胚和二细胞原胚的同时, 周围的细胞也存在着大量胚性多细胞团(图1-f)。这些胚性多细胞团的起源究竟是否起源于单个的原胚细胞, 还有待进一步的研究。但有一点是非常清楚的, 那就是油茶体细胞胚在其早期形成过程中, 从其细胞组成和数量上来看, 一个体细胞胚是由多个胚性细胞组成的。及时将这些胚性愈伤组织转移到含有6-BA的分化培养基上, 表皮处的胚性细胞数量随即剧增, 总体积不断膨大, 突起后逐渐形成一个球形的胚(图1-g), 后经过不断的分化形成梨形胚(图1-h)。在梨形胚与表皮细胞的交界处, 胚性细胞与表皮的细胞分界明显, 并有逐渐脱离母体的趋势。后经过子叶形胚(图1-i)发育形成一个体细胞胚。待体细胞胚形成后, 在适当的生长激素及外界环境条件的作用下, 可形成不定根(图1-j), 这类不定根在空气中可形成许多细小的侧根(图1-k)。

讨 论

迄今, 已在数百种植物中观察到体细胞胚的发生, 几乎所有活的组织和器官都可能被诱导形成体细胞胚^[4]。但不同植物以及同一植物的不同

品种、不同类型、不同组织或器官诱导体细胞胚形成的条件差异很大。一般认为, 体细胞胚只起源于一个细胞, 由体细胞胚长成的植株各部分的遗传组成应当是一致的, 不存在嵌合现象^[5]。

由于油茶体细胞胚胎发育过程中的形态建成和细胞分化发生在很早时期, 这一时期的胚胎体积很小, 收集足够多的材料进行生理生化分析难度较大, 尤其是在油茶体细胞胚胎发生方面的研究, 很多机制还不清楚。因此, 在油茶体细胞胚形成过程中未观察到明显的子叶形胚。另外, 颜慕勤^[6]曾报道在油茶组织培养体细胞胚形成过程中衍生的一种表皮光滑、黄色或黄绿色半透明的、近似球型或不规则呈瘤状的结构物——假珠芽(pseudobulbils), 假珠芽经过培养可分化产生大量丛生芽, 并布满假珠芽表面, 在芽的基部不断分化成芽。在本文中也观察到类似的情况(图1-1), 且由此类“假珠芽”分化成芽率很高。至于这些类似物是“假珠芽”, 还是次生的体细胞胚待进一步验证。另外, 油茶体细胞胚起源于单细胞还是胚性多细胞团, 目前尚无定论。但从本文的结果来看, 这两种情况都可能存在。总体来说, 油茶从胚性愈伤组织发育成一个完整的体细胞胚, 大致经历以下过程: (1) 由单细胞原胚形成二细胞原胚; (2) 由二细胞原胚分裂形成胚性细胞; (3) 胚性细胞聚集成胚性多细胞团, 然后先发育形成球形胚, 并逐渐形成梨形胚, 最终脱离母体后, 经过子叶形胚发育形成一个体细胞胚, 并可形成完整的再生植株。此种再生途径增殖速度快, 繁殖系数高, 可用于油茶人工种子和遗传转化研究。

参考文献

- 1 颜慕勤. 油茶体细胞胚状体的发生. 实验生物学报, 1980, 3(3): 343~347
- 2 隆振雄. 油茶幼胚离体培养初获完整植株. 林业科技通讯, 1981, (1): 12~16
- 3 卢天玲. 油茶未成熟子叶幼胚离体培养成苗的研究. 实验生物学报, 1982, 5(4): 393~403
- 4 王傲雪, 李景富. 植物体细胞胚状体的诱导研究及应用. 黑龙江农业科学, 1999, (2): 39~42
- 5 陈金慧, 施季森. 植物体细胞胚胎发生机理的研究进展. 南京林业大学学报, 2003, 27(1): 75~81
- 6 颜慕勤. 茶树子叶离体培养形成胚状体的研究. 林业科学, 1983, 9(1): 25~29