

防风体细胞胚发生和发育的组织学研究

乔琦^{1,2}, 肖娅萍^{1*}

(1. 陕西师范大学 生命科学学院, 西安 710062; 2. 河南科技大学 农学院, 河南 洛阳 471000)

摘要: 采用石蜡切片和半薄切片法研究组织培养中防风体细胞胚发生和发育的形态和结构特征, 以了解体细胞再生形成胚胎结构的细胞分化和形态发生特征。结果表明: (1) 胚性细胞内含有丰富的淀粉体, 随细胞分裂和分化逐渐减少; (2) 体细胞胚的发生发育经历了类似合子胚的各阶段; (3) 多细胞原胚形成的分裂方式以平周分裂为主, 并由此表现出有序生长; (4) 在体细胞胚迅速发育过程中, 不同阶段的体细胞胚始终与周围细胞存在明显界限; (5) 胚柄发育不明显; (6) 畸形胚常见, 其中连体胚是胚性细胞发生密度过高造成的, 而次生胚则在原来胚的基础上又产生新的胚的发生中心。

关键词: 防风; 体细胞胚胎; 解剖结构

中图分类号: Q944.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2008)01-0113-04

Histological study on the somatic embryogenesis and development of *Saposhnikovia divaricata*

QIAO Qi^{1,2}, XIAO Ya-Ping^{1*}

(1. College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China; 2. College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, China)

Abstract: Paraffin slice and semithin section are utilized to study the characteristics of morphogenesis and anatomical structure during the occurrence and development of somatic embryo in tissue culture of *Saposhnikovia divaricata*. The results show: (1) there are lots of starch in the embryogenetic cell, and gradually decreased accompanying the cell fission and differentiation; (2) the somatic embryogenesis and development experience all the stages of zygote embryo; (3) the multicellular embryo is developed from periclinal division primarily, and accordantly grows regularly; (4) there is distinct boundary between the different stages of somatic embryo and the cells around; (5) the suspensor isn't obvious; (6) the abnormal joined embryo is caused by the high density of embryonic cells, and the subordinate embryo is caused by the new occurrence center produced by the original embryo.

Key words: *Saposhnikovia divaricata*; somatic embryo; anatomy structure

防风(*Saposhnikovia divaricata*)系伞形科植物, 俗称北防风、关防风。药典以根供药用, 有发汗、祛痰、驱风、镇痛的功效, 为国家重点保护野生药材之一(张贵君等, 1997)。迄今为止, 国内外对防风的研究多集中在化学成分(肖永庆等, 2001), 药用成分提取鉴定(Emi等, 2001)、含量测定(李丽等, 2006)

及药理作用(Wang等, 1999)等方面。防风生长发育的研究较少, 仅对防风体细胞胚发生发育(慈忠玲, 1999), 大、小孢子发生与雌、雄配子体发育情况(袁秋红等, 2005)作了一定研究。

有关药用植物体细胞胚发生的研究部分学者作了一些工作, 如枸杞(魏琴等, 2000), 何首乌(丘奉

收稿日期: 2006-08-25 修回日期: 2007-02-27

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2001BA701A35)[Supported by Key Technologies Research and Development Program of State Tenth Five-Year Plan Project(2001BA701A35)]

作者简介: 乔琦(1971-), 女, 河南洛阳人, 硕士, 讲师, 长期从事植物生物技术研究。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: yapingxiao@snnu.edu.cn)

同,2000),菊叶薯蓣(何惠英等,2000),罗布麻(魏凌基等,2000)等。组织培养中发现防风具有体细胞胚高频发生现象,为原生质体培养、人工种子制作、优良无性系的繁殖、植物基因工程和突变体筛选等提供了良好的实验体系(崔凯荣等,2000)。本试验对防风体细胞胚发生发育的组织学进行了研究,以了解体细胞再生形成胚胎结构的细胞分化和形态发生特征,并比较此过程与合子胚形态发生的异同,以期为胚胎发生的研究提供解剖学依据。

1 材料和方法

1.1 植物材料

供试防风种子购自陕西省神农种子公司。

1.2 方法

1.2.1 防风体细胞胚的诱导 取防风种子置70%酒精浸泡30s,0.1%升汞浸泡6~8min,用无菌水冲洗5~7遍,接种于水琼脂培养基上。30d后获得无菌苗,待苗长至3~4cm时,取根、叶柄及幼叶的0.5~1.5cm的切段为外植体,接种于诱导愈伤组织的培养基上获得愈伤组织,20d后将筛选的呈疏松颗粒状的胚性愈伤组织转入不同的分化培养基,诱导体细胞胚的发生,选择已经发育成熟的胚继续移接于成熟培养基上促进发育成苗。培养条件:培养室温度(25±1)℃,光照时间12h/d,光照强度40~80 μmol·m⁻²·s⁻¹,以上所采用的培养基程序参见防风的组织培养(乔琦等,2005)。

1.2.2 组织学观察 定期对培养物进行形态学观察, Sony F717数码相机照相; XTL-II体视镜下挑取不同发育阶段的正常体细胞胚和畸形胚状体, FAA固定液固定48h,梯度酒精系列脱水,常规石蜡法连续切片,厚度8 μm,苏木精-伊红染色,中性树胶封片。以半薄切片定位,采用常规电镜样品的制备程序处理培养物, Epon812环氧树脂中包埋,普通切片切片机切片,厚度2 μm, PAS染色显示多糖的分布(胡适宜等,1990), Olympus BH-2光学显微镜照相。

2 观察结果

植物体细胞胚发生过程依次经过类似受精卵的胚性细胞、二细胞胚、多细胞原胚、球形胚、心形胚、鱼雷胚、子叶胚等阶段(图版I:1-6)。胚性细胞的分裂是不同步的,在同一切片上可看到单个的胚性

细胞到二细胞,四细胞以至多细胞原胚并存的多样化原胚细胞群体(图版I:1-2)。胚性细胞最先的细胞分裂方式以平周分裂为主,并由此表现出有序生长。在体细胞胚迅速发育过程中,不同阶段的体细胞胚始终与周围细胞存在明显界限,表现在细胞壁有明显加厚,而且部分相邻细胞处于解体状态,以致在体细胞胚发生和发育的后期周围会出现较大的间隙(图版I:1)。有的体细胞胚具有类似胚柄的结构(图版I:3),有的没有胚柄(图版I:2);胚根的进一步发育比胚芽较晚,畸形胚常见到的连体胚是由于胚性细胞发生密度过高造成的(图版I:7),而次生胚则在原来胚的基础上又产生新的胚的发生中心,常见于胚轴部位,甚至形成次生胚链(图版I:8)。

半薄切片的PAS染色结果显示由根、茎、叶等部位诱导的胚性愈伤组织中,胚性细胞和非胚性细胞间有明显区别。随胚性细胞的发育,细胞壁不断加厚,细胞核开始偏移,并出现大量淀粉体的积累,淀粉体沿着细胞壁集中分布(图I:9,11);非胚性细胞的组织内仅发现较大的细胞核或一些小液泡,未见大量的淀粉体(图I:10),随体细胞胚的进一步分裂和分化,细胞内淀粉体含量逐渐减少(图版I:12)。

3 讨论

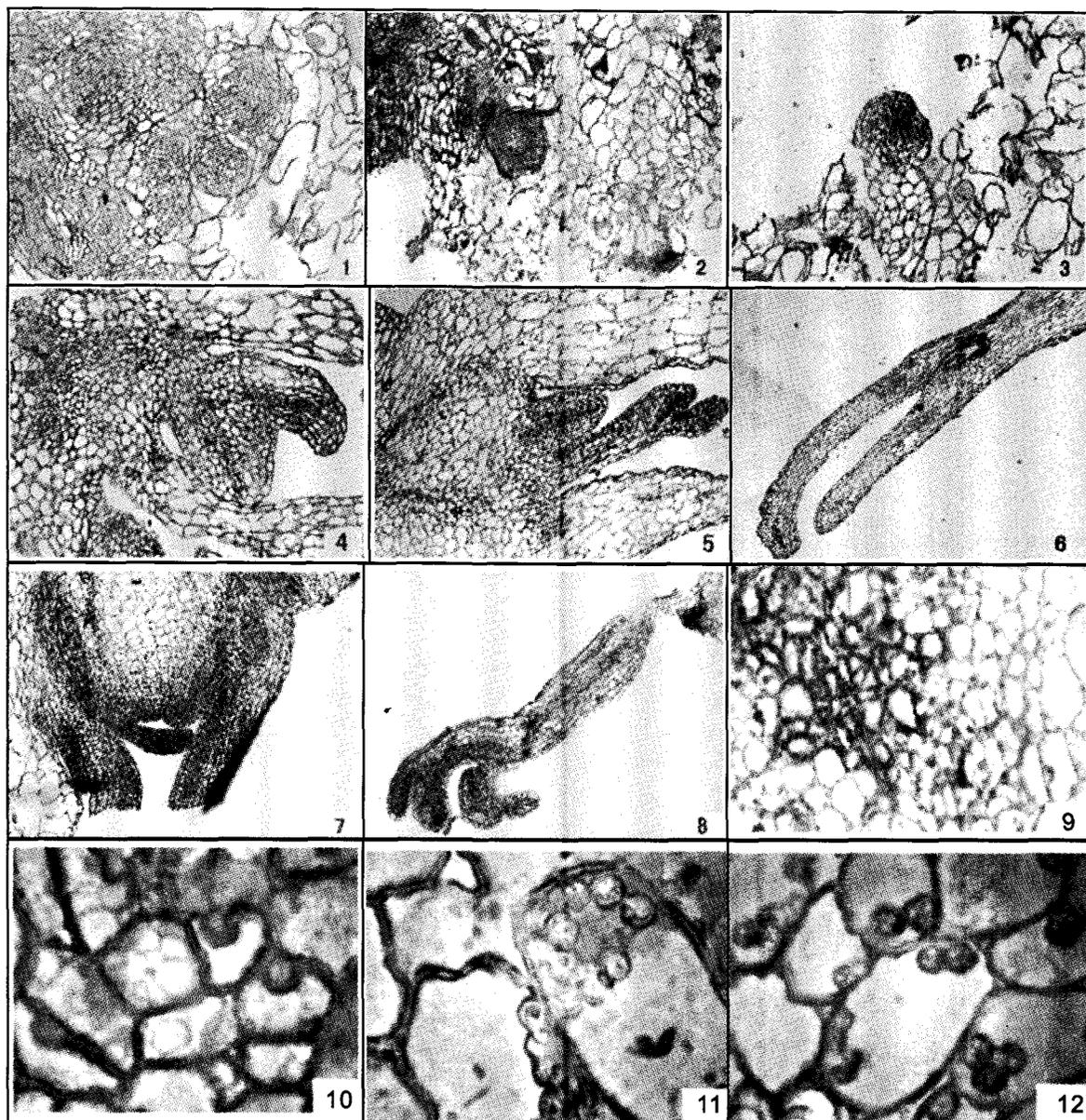
3.1 重演合子胚形态发生的过程

植物体细胞胚的发生过程依次经过类似受精卵到成熟胚等阶段(图版I:1-6),这表明了绝大多数植物体细胞胚能够重演合子胚形态发生的进程(肖显华等,1996)。

3.2 与合子胚形态发生的不同

3.2.1 胚性细胞的后含物 半薄切片结果显示在防风体细胞胚发生过程中,胚性细胞与非胚性细胞的显著不同是存在着大量淀粉体的积累(图I:10-11)。淀粉体的出现是胚性细胞分化和开始发育的标记,经几次分裂和进一步分化后其内的多糖被利用降解,含量逐渐减少。由于在胚性细胞内淀粉体呈现活跃的糖类代谢特征,因此其结构和功能不同于常见的贮藏淀粉粒。

3.2.2 起源 从发生部位看,少量在愈伤组织的内部发生(图版I:2),绝大部分是从靠近表面或者表面的愈伤组织形成的(图版I:3)。胚性细胞多由愈伤组织表层或近表层的薄壁细胞分化而来。胚性细



图版 I 1. 胚性愈伤组织 $\times 400$; 2. 多细胞原胚 $\times 600$; 3. 球形胚 $\times 600$; 4. 心形胚 $\times 800$; 5. 鱼雷胚 $\times 400$; 6. 子叶胚 $\times 600$; 7. 不同阶段的胚连接在一块 $\times 400$; 8. 下胚轴上形成次生胚 $\times 600$; 9. 胚性愈伤组织, 示胚性细胞和非胚性细胞间的明显区别 $\times 600$; 10. 非胚性细胞, 示细胞核和小液泡 $\times 2400$; 11. 胚性细胞, 示大量的淀粉体 $\times 3600$; 12. 胚性细胞进一步分裂分化后, 示减少的淀粉体 $\times 3600$ 。EC: 胚性细胞; NEC: 非胚性细胞; S: 淀粉粒。

Plate I 1. embryonic callus $\times 400$; 2. normal multicellular original stage $\times 600$; 3. globular stage $\times 600$; 4. heart stage $\times 800$; 5. torpedo embryo $\times 400$; 6. cotyledon stage $\times 600$; 7. too high density of embryos in different stages joined together $\times 400$; 8. secondary embryo on the hypocotyls $\times 600$; 9. embryogenic callus, showing the difference between EC and NEC $\times 600$; 10. NEC, showing the nucleus and little vacuole $\times 2400$; 11. EC showing abundant starch $\times 3600$; 12. EC after fission and differentiation, showing the decreasing starch $\times 3600$. EC: embryogenic cell; NEC: non embryogenic cell; S: starch grain.

胞核大,位于细胞中央,细胞质浓厚。未分化的细胞呈不规则状态,细胞体积大,核小,胞质稀少,具有中央大液泡,二者有明显区别(图版 I :2-3)。尽管慈中玲等(1996)建立了防风体细胞胚发生的悬浮培养体系,但仍发现当单细胞聚集成片时引发胚胎形成效应。聚集现象是否为胚胎发生提供必须的条件尚未明确,本实验在固体培养基诱导的胚胎发生体系仅从石蜡切片上无法确定防风体细胞胚是否是单细胞起源,经常发现胚性细胞聚集在一起,进行有规律的分裂活动,以形成多细胞原胚。推测有两种可能:一是由于取材原因,没有观察到单个的胚性细胞;二是不排除多细胞共同起源的可能性。因此有待于用同位素脉冲标记实验等技术来确切地验证起源。

3.2.3 胚柄、胚乳的有无 在体细胞胚发生早期,胚柄发育程度有很大差异,防风体细胞胚有的具类似胚柄的结构(图版 I :3),有的没有胚柄(图版 I :2);此外体细胞胚发育的全过程也没有胚乳的形成。说明这两种结构在体细胞胚发育中并非起着不可替代的作用,或者推测离体培养条件与细胞的相互作用代替了胚柄与胚间以及胚和胚乳间的相互作用。体细胞胚可通过根端或类似胚柄的结构从外植体或愈伤组织吸取营养,在适宜条件下长成独立植株。

3.2.4 畸形胚的发生 体细胞胚发生中畸形胚的发生率远高于合子胚,原因有外在培养条件的影响,特别是激素的平衡、继代的次数有重要影响外,可能还与发育过程中没有明显的胚柄和胚乳等结构有关。畸形胚常见的连体胚是由于胚发生密度过高造成的(图版 I :7),而次生胚则在原来胚的基础上又产生新胚的发生中心,常见于胚轴部位(图版 I :8),这些现象在合子胚中很少见,推测连体胚、次生胚发生的原因是从体细胞脱分化形成愈伤组织后,再转移至诱导分化胚性细胞时,细胞的状态和启动分裂的先后不一致,从而存在多样化的原胚细胞群。在某些条件下,体细胞胚发生是有先后或反复进行的,新的胚胎发生中心有可能从原胚细胞群中或从胚体中产生。还有些胚则是胚根发育不良,与胚性愈伤的疏松程度有一定的相关性。而且发生的先后与培养基的均匀接触有关。说明离体培养产生的体细胞胚可能由于培养条件与真正的合子胚发生过程不同,基因表达和调节不正常,导致畸形胚的发生。

3.3 生理隔离

在体细胞胚迅速发育过程中,体细胞胚的各个发育阶段和周围细胞存在明显界限,表现在发育前

期细胞壁的明显加厚,与周围组织或细胞形成明显的界限;在发育后期相邻细胞处于解体状态,以致在体细胞发生和发育的后期周围会出现较大的缝隙(图版 I :1-6),推测体细胞胚周围的解体细胞是程序性的细胞凋亡过程,以使体细胞胚的发生和发育处于相对独立状态,有利于胚胎后期的脱落和发育成苗。但是生理隔离只是相对的,并不意味着体细胞胚的各阶段与周围组织在生理上完全隔离。因为体细胞胚发生发育过程中,还要从周围细胞取得营养、能量和激素等。

参考文献:

- 崔凯荣,戴若兰. 2000. 植物体细胞胚发生的分子生物学[M]. 北京:科学出版社:1-11
- Ci ZL(慈忠玲),Chen HM(陈惠民). 1996. Somatic embryogenesis in cell suspension culture of *Saposhnikovia divaricata* (防风悬浮培养中的胚状体发生)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), **38**(5):379-383
- Ci ZL(慈忠玲). 1999. The effect of magnetic field on somatic embryogenesis and embryoid growth as well as changes of sub-microscopic structure of *Saposhnikovia divaricata* (磁场对防风体细胞胚发生发育和亚显微的影响)[J]. *Acta Phytophysiol Sin*(植物生理学报), **25**(3):309-312
- Emi O, Tetsuya H, Takamitsu M, et al. 2001. Analgesic components of *Saposhnikovia* root (*Saposhnikovia divaricata*) [J]. *Chem Pharm Bull*, **49**(2):154-160
- He HY(何惠英), Lan QY(兰芹英), Zhang YJ(张艳军). 2000. Tissue culture of *Dioscorea camposita* (菊叶薯蓣的组织培养)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), **36**(4):337-338
- Hu SY(胡适宜), Xu LY(徐丽云). 1990. A cytochemical technique for demonstration of lipids, polysaccharides and protein bodies in thick resin sections(显示环氧树脂厚切片中多糖、蛋白质和脂类的细胞化学方法)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), **32**:841-846
- Li L(李丽), Liu YY(刘元艳), Geng LD(耿立冬), et al. 2006. Determination of four components in root of *Saposhnikovia divaricata* by HPLC gradient elution (HPLC 梯度洗脱法测定防风中 4 种主要成分含量)[J]. *China J Chin Mat Med*(中国中药杂志), **31**(3):194-196
- Qiu FT(丘奉同). 2000. Cullus induction and plantlet regeneration of *Polygonum multiflorum* (何首乌愈伤组织诱导和植物再生)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), **36**(4):335-336
- Qiao Q(乔琦), Xiao YP(肖娅萍), Wang ZZ(王喆之). 2005. The effect of plant external hormones on the somatic embryogenesis and embryoid growth of *Saposhnikovia divaricata* (植物外源激素对防风体细胞胚发生和发育的影响)[J]. *J Northwest Univ (Nat Sci Edi)*(西北大学学报·自然科学版), **35**(3):316-319
- Wang CC, Chen LG, Yang LL. 1999. Inducible nitric oxide synthase inhibitor of the Chinese herb *I. Saposhnikovia divaricata* [J]. *Cancer Letters*, **145**(1-20):151-157

(下转第 32 页 Continue on page 32)

种,我们在《津巴布韦植物志》网页上查到 *B. punctata* 应是 *B. galpinii* 的异名,通过实验结果证明这两个样品的种子表皮微形态几乎完全吻合。

当然,以种子表面性状评价种子进化程度有待于种子解剖、生理、萌发与分布机制等有关方面的证实。但从另一个方面看,一个进化程度低的种子不可能不对其植株的生长、分布和居群的兴衰、甚至对其它器官,如花的进化程度产生影响。换言之,种子进化的机制与其它来源的性状应在一定程度上相关。寻找相关性后,从相关性状的发展变化可侧面评价种子形态的进化类型。种子表面形态在系统学与分类学上的意义因不同的分类群而异(鲁迎青等,1991)。因此,对于羊蹄甲属这个种类繁多的大属,本文对种子的形态的研究仅是管窥,还需要对种子形态更多的认识从而丰富和完善人们对该植物类群的了解与判别,探讨该属之间的系统位置与亲缘关系。

衷心感谢所有为本实验收集种子材料的老师和国际友人们!感谢华南植物园公共实验室胡晓颖高级工程师协助扫描电镜实验。

参考文献:

- 陈德昭. 1988a. 羊蹄甲属. 中国植物志 39 卷[M]. 北京: 科学出版社, 145—203
- 刘长江, 林祁, 贺建秀. 2004. 中国植物种子形态学研究方法和术语[J]. 西北植物学报, 24(1): 178—188
- 鲁迎青, 陈艺林. 1991. 凤仙花属种子形态及其在分类学上的意义[J]. 植物分类学报, 29(3): 252—257
- 张莫湘. 1999. 紫荆属种子表皮纹饰扫描电镜观察[J]. 热带亚热带植物学报, 7(1): 34—36
- Chen DZ(陈德昭). 1988b. New taxa of the genus *Bauhinia* from China(中国羊蹄甲属新分类群)[J]. *Guihaia*(广西植物), 8(1): 43—51
- Baker E G. 1926. The Leguminosae of Tropical Africa[M]. Ghent; Erasmus Press
- Bragg L H, T L Bridges. 1984. Testa characterization of selected Caesalpinoideae(Leguminosae) genera[J]. *Scan Elec Micro*, 4: 1751—1758
- Corner E J H. 1951. The leguminous seed[J]. *Phytomorphology*, 1: 117—150
- Corner E J H. 1976. The seeds of dicotyledons[M]. Cambridge Press, 1: 161—166
- Gunn C R. 1981. Seeds of Leguminosae[M]//Polhill R M, Raven P H(ed). Advances in Legume systematics. Kew; Royal Botanic Gardens, 2: 913—925
- Gunn C R. 1991. Fruits and seeds of genera in the subfamily Caesalpinoideae(Fabaceae)[C]. U. S. Department of Agriculture, Technical Bulletin, 1755, 1—18, 200—205
- Lersten N R, Gunn C R, Brubaker C L. 1992. Comparative morphology of the lens on *Legume*(Fabaceae) seeds, with emphasis on species in subfamilies Caesalpinoideae and Mimosoideae[C]. U. S. Department of Agriculture, Technical Bulletin, 1791, 1—44
- Manning J C, Van Staden J. 1987. The role of the lens in seed imbibition and seedling vigour of *Sesbania punicea* (Cav.) Benth. (Leguminosae; Papilionoideae)[J]. *Ann Bot*, 59: 705—713
- Newell C A, Hymowitz T. 1978. Seed coat variation in *Glycine* Willd. Subgenus *Glycine*(Leguminosae) by SEM[J]. *Brittonia*, 30: 76—88
- Rugenstein S R, Lersten N R. 1981. Stomata on seeds and fruits of *Bauhinia* (Leguminosae; Caesalpinoideae)[J]. *J Amer Bot*, 68(6): 873—876
- Trivedi B S, Bagchi G D, Bajpai Usha. 1980. Studies on seeds and spermoderm structure of *Bauhinia*[J]. *Phytomorphology*, 30: 11—16
- Wunderlin R, Larsen K, Larsen S S. 1987. Reorganization of the Cercideae(Fabaceae; Caesalpinoideae)[J]. *Dani Biol Skri*, 28: 1—40
- Wei Q(魏琴), Cao YL(曹有龙), Chen F(陈放), et al. 2000. Observation of somatic embryogenesis and analyses of peroxidase isozymes in culture of the pith of *Lyium barbarum*(枸杞髓组织培养中体细胞胚胎发生与过氧化物酶同工酶分析)[J]. *Guihaia*(广西植物), 20(2): 168—171
- Wei LJ(魏凌基), Wang YX(王泳星), Xu HX(徐海霞), et al. 2000. Tissue culture of stem segments of *Apocynum venetum*(罗布麻茎段的组织培养)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), 36(5): 434
- Xiao YQ(肖永庆), Li L(李丽), Yang B(杨滨), et al. 2001. Studies on chemical constituents from root of *Saposhnikovia divaricata*(防风化学成分研究)[J]. *China J Chin Mat Med*(中国中药杂志), 26(2): 117—119
- Xiao XH(肖显华), Lin RS(林荣双), Wang QH(王庆华), et al. 1996. A histological study on somatic embryogenesis of embryonic leaflets of peanut(*Arachis hypogaea*) induced by 2,4-D(2,4-D诱导的花生体细胞胚发生的组织学研究)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报), 16(6): 691—695
- Yuan QH(袁秋红), Shen JH(申家恒). 2005. Megasporogenesis and gametophyte microsporogenesis as well as male and female gametophyte development of *Saposhnikovia divaricata*(防风大、小孢子发生与雌、雄配子体发育的研究)[J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*(西北植物学报), 25(6): 1 065—1 071
- Zhang GJ(张贵君), Zhang YB(张艳波), Li Y(李影). 1997. The survey of *Saposhnikovia divaricata* in recent 10 years(我国生药防风近 10 年的研究概况)[J]. *Chin Med Res*(时珍国医国药), 8(1): 73—75

(上接第 116 页 Continue from page 116)