

# 拟南芥新疆生态型体细胞胚胎发生的淀粉粒动态研究

鲁国武<sup>1</sup>, 王雪芬<sup>2</sup>, 张霞<sup>1</sup>

(1. 石河子大学 生命科学院 新疆 石河子 832003; 2. 药物植物资源与天然药物化学教育部重点实验室 陕西师范大学 陕西 西安 710062)

**摘要:**以拟南芥新疆生态型无菌苗真叶和叶柄为外植体, MS+6-BA 0.1 mg/mL+NAA 1 mg/mL+2,4-D 1 mg/mL 培养基诱导体细胞胚胎发生, 采用 MS+KT 1 mg/mL+2,4-D 0.2 mg/mL 为分化培养基, 组织切片用 PAS 法研究体细胞胚发育过程中淀粉代谢的动态消长规律, 结果表明: 体细胞胚胎发育过程中出现二次淀粉积累高峰。

**关键词:**愈伤组织; 体细胞胚胎发生; PAS; 淀粉粒

**中图分类号:**S 945.45 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2008)10-0156-03

拟南芥(*Arabidopsis Thaliana*)为十字花科(Cruciferae), 拟南芥(*Arabidopsis*)属植物, 全球范围分布, 由于其形态个体小、形态特征简单、生活史短、种子多、基因组小(2n=10)等独特的生物学特性, 成为遗传学和分子生物学的模式植物<sup>[1]</sup>。国内外对拟南芥的研究 95%以上都是分子水平上的研究, 而对其体细胞胚胎发生的细胞组织学及淀粉动态尚缺乏系统的研究<sup>[2]</sup>, 现对拟南芥体胚发育过程进行细胞学和组织学研究, 发现淀粉粒的消长与胚胎发生有一定的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及体胚发生方法

新疆生态型拟南芥种子采集自新疆阿勒泰地区, 将种子用 70%乙醇表面消毒 30 s, 然后用 10%双氧水溶液充分浸泡 20~30 min 灭菌, 边浸泡边充分振荡, 保持表面充分灭菌, 用无菌水冲洗 3~5 次, 再将种子接种在不含激素的 MS 培养基上进行离体培养, 3 d 后即可产生无菌苗。取生长 1 周后的无菌苗的真叶和叶柄做外植体, 接种于诱导愈伤组织培养基 MS+6-BA 0.1 mg/mL+NAA 1 mg/mL+2,4-D 1 mg/mL。继代培养基 MS+6-BA 0.1 mg/mL+NAA 2 mg/mL+2,4-D 2 mg/mL 继代 2 次, 然后将愈伤组织接种于分化培养基 MS+KT 1 mg/L+2,4-D 0.2 mg/L 上, 分化并产生体细胞胚胎。培养基成分中蔗糖 3%, 琼脂 0.7%, pH 值 5.8。培养温度白天(25±1)℃, 夜晚(22±1)℃, 光照强度为 2 000 lx, 光照时间 14 h/d。

### 1.2 石蜡制片

每天定时切取体细胞胚胎发育过程中的小块愈伤

组织, 用 FAA (50%乙醇配制)固定 24 h 以上, 经过系列酒精脱水, 每级 2 h, 二甲苯梯度透明和渗蜡, 石蜡包埋, AO 切片机切片, 厚度 8 μm, 用 PAS 反应法与淀粉进行组织化学定位, 铁钼-苏木精染色法衬染, 加拿大树胶封片, 观察体胚发生过程中淀粉粒的变化, OLYMPUS 显微镜观察照相。

## 2 结果与分析

植物体胚发生(Somatic embryogenesis)不仅重演了合子胚形态发生的特性, 而且是最完全的细胞全能性表现的一种方式。植物体细胞在离体培养条件下, 通过体胚发生途径形成再生植物株已是极其普遍的现象, 但体胚发生又是植物生长发育的特殊阶段。在诱导拟南芥新疆生态型真叶和叶柄形成愈伤组织的过程中, 培养 3 d 后, 可观察到靠近表皮内层的细胞有淀粉粒的出现(图 1)。在体胚过程中, 淀粉粒的大小和形状并不完全相同, 淀粉粒首先把细胞核仁围成一圈, 或聚集成团分布于细胞质中。培养 5 d 后, 愈伤组织分化产生的胚性细胞内出现淀粉粒积累, 有淀粉粒积累的细胞比没有淀粉粒积累的细胞排列紧密(图 2)。在体胚过程中, 胚性细胞分裂非常旺盛, 培养 8 d 的愈伤胚细胞团继续增大发育为球形胚, 球形胚时期的胚性细胞, 体积小, 核仁明显, 排列紧密。细胞内的淀粉粒也由小变大, 形状也由最初的稍扁平状变为圆形, 分布在球形胚体的外部几层细胞内。淀粉粒在球形胚的积累过程分两个时期, 首先淀粉粒大量积累在球形胚内部的外层胚性细胞(图 3), 然后胚性细胞继续分裂, 淀粉粒在球形胚的所有胚性细胞内都大量积累, 并达到积累顶峰(图 4)。在球形胚的后期及心形胚时候, 淀粉粒的积累开始逐渐减少。随着体胚的继续发育, 鱼雷形胚和成熟的子叶胚时期, 淀粉粒基本消耗殆尽(图 5)。在整个体细胞胚胎发育过程中, 非胚性细胞没有淀粉粒的积累, 或者淀粉粒的积累很少, 随着体胚发育, 无淀粉粒积累的非胚性愈伤组织

第一作者简介: 鲁国武(1977-), 男, 硕士, 主要从事植物遗传研究工作。

通讯作者: 张霞。E-mail: xiazh@shzu.edu.cn。

收稿日期: 2008-04-23

细胞趋向解体(图6)。

从体胚的淀粉积累动态可以发现,非胚性愈伤组织细胞无淀粉粒或含量少,而胚性愈伤组织细胞从转至分化培养基就开始有淀粉粒的积累,淀粉粒的积累有2个高峰期,第一次高峰出现在胚性细胞的分化的阶段,也就是所说的体胚发育早期,第二次出现在形成成熟的球形胚时期,并在这一时期淀粉粒积累达到最高峰<sup>[3]</sup>。在心形胚以后逐渐减少,到体细胞胚胎发育为成熟子叶胚时无淀粉粒或少量淀粉粒积累。当形成器官时,除了在维管束偶尔有少量淀粉粒外,其他器官没有淀粉粒的积累<sup>[4]</sup>。另外,非胚性愈伤组织细胞虽然可以进行分裂,但几乎见不到淀粉粒的积累,而且只产生均一组织,没有器官发生和维管束分化。这说明淀粉粒作为细胞内最普遍的一类能量贮藏物质,其消长动态与组织分化及器官形态建成具有密切关系。在合子胚形成及种子成熟过程中,可溶性糖浓度逐渐降低,而淀粉含量不断升高,而体细胞胚胎发育中淀粉的形成机理不是很清楚,但作为一类储存

物质,淀粉的消长与体细胞胚发生的细胞分裂、生长的能量供应密切相关<sup>[3,5]</sup>,不仅可作为体细胞胚是否成熟的标志,而且为胚的发育奠定了重要的物质基础。

3 讨论

拟南芥新疆生态型的生活环境和生活习性同于哥伦比亚生态型,从新疆生态型无菌苗外植体诱导愈伤组织时,采用的诱导培养基并不适合哥伦比亚生态型拟南芥,当试图采用相同的诱导培养基诱导模式种时,真叶,叶柄,下胚轴,子叶等外植体几乎全部发生玻璃化,无法诱导愈伤组织的发生,可见即使是模式种的拟南芥,也只适应于激素和有机物质一定范围的诱导培养基。在此试验中发现拟南芥新疆生态型体细胞胚起源于胚性愈伤组织的单个细胞,淀粉的在胚性细胞的积累有2次高峰,分别是胚性细胞分化时和球形胚时期,说明淀粉粒的消长与体细胞胚胎发生有密切关系,并为体胚发生提供物质和能量的准备。淀粉粒的形成机理有待进一步的研究。

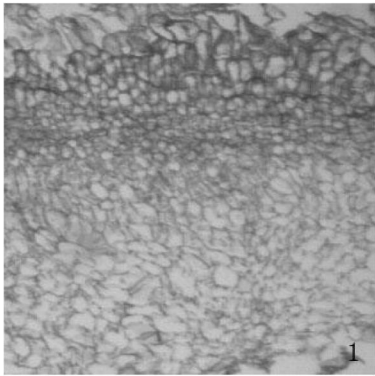


图1 培养4 d淀粉粒出现 ×100

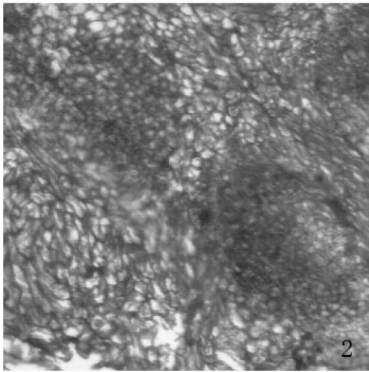


图2 培养5 d淀粉粒的积累 ×100

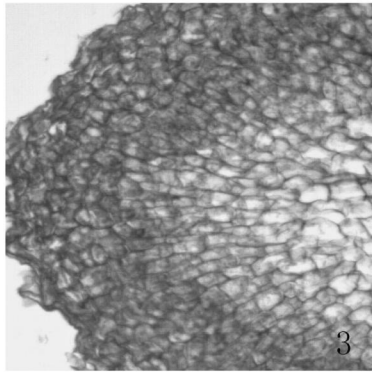


图3 球形胚内部细胞淀粉粒积累 ×100

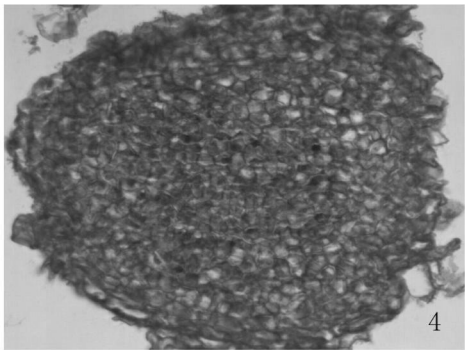


图4 球形胚内部细胞淀粉粒积累 ×100

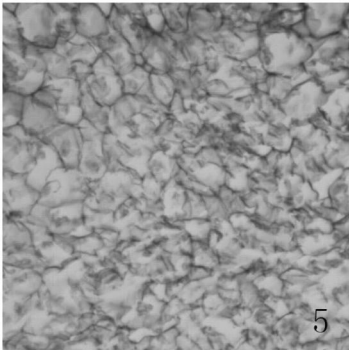


图5 鱼雷形胚细胞淀粉粒消耗殆尽 ×100

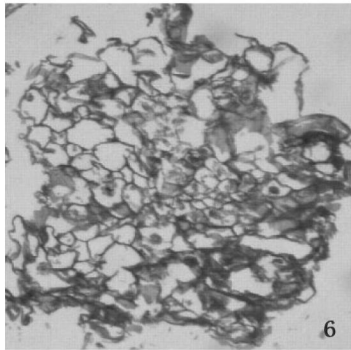


图6 非胚细胞胚体趋向解体 ×100

参考文献

[1] 祝沛平.用于基因组分析的模式植物拟南芥[J].植物杂志,2000(6): 35-35.  
[2] 崔凯荣,戴若兰.植物体细胞胚发生的分子生物学[M].北京:科学出版社,2000:1-11.  
[3] 何丽君,齐冰杰.四合木体细胞胚胎发生中细胞组织学的淀粉积累

动态的研究[J].内蒙古草业,2002,14(3):39-41.  
[4] 乔琦,肖娅萍.防风体细胞胚发生发育中的淀粉体和多糖动态[J].西北植物学报,2007,27(2):0388-0391.  
[5] 杨金玲.白杆体细胞胚胎发生的细胞组织学和淀粉积累动态的研究[J].西北植物学报,1998,18(3):335-338.

# 迷迭香茎尖培养

邓明华<sup>1</sup>, 文锦芬<sup>2</sup>, 赵 凯<sup>1</sup>

(1. 云南农业大学 园林园艺学院 云南 昆明 650201; 2. 昆明理工大学 现代农业工程学院 云南 昆明 650224)

**摘 要:**以迷迭香茎尖为试验材料,研究了不同浓度的 6-BA、NAA 对迷迭香茎尖培养植株再生的影响。结果表明:MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.02 mg/L 有利于茎尖培养。1/2 MS+IAA 0.3~0.4 mg/L 有利于不定根的诱导。

**关键词:**迷迭香;茎尖培养;植株再生

**中图分类号:**S 685.99 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2008)10-0158-03

迷迭香(*Rosmarinus officinalis*)系唇形科,多年生矮灌木型或匍匐型木本植物,原产于地中海沿岸,其叶片绿色披针形,花具有蓝色、粉红色、淡紫色及白色等<sup>[1]</sup>。植株的枝叶中含有精油和天然抗氧化剂,均能散发出浓郁的香味,已经被国际上许多发达国家,特别是日本、美国 and 法国列为重要的开发经济植物,且投入大量的人力、物力和财力进行研究和开发,其产品已经被广泛用于香水、浴液、化妆品、香皂和空气清洁剂。在医药方面,迷迭香提取物具有催经活血、利胆降压、抗菌定神、抗癌等药理作用。同时,迷迭香枝叶萃取物含有天然抗氧化剂,可以有效的防止油脂等氧化,并且在高温下不容易分解,适合于油炸和焙烤食品的保存<sup>[1-3]</sup>。近年来,

我国许多研究单位已经对迷迭香进行了引种、栽培、加工等方面的研究,取得了一定的成绩。但是由于迷迭香的种子发育不良,萌芽率极低,常采用的扦插繁殖也因为多代扦插,病毒积累及种性退化,导致精油和天然抗氧化剂含量下降,而影响迷迭香的推广与应用<sup>[6,8]</sup>。利用植物组织培养的方式生产迷迭香种苗是解决优质种苗供应的有效手段之一。目前关于迷迭香组织培养的研究鲜有报道<sup>[9,11]</sup>。茎尖培养因再生苗变异极小,而倍受关注。研究以迷迭香茎尖为试验材料,研究影响迷迭香茎尖培养的一些因素,以期对迷迭香茎尖培养提供理论和实践借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料消毒

取温室盆栽迷迭香顶芽,放在自来水中冲洗 30 min,后用 75% 的酒精浸泡 10 s,用无菌水冲洗 3 遍后,加入 0.1% HgCl<sub>2</sub> 溶液浸泡 5 min(每升溶液加吐温 2 滴),再用无菌水冲洗 5~6 遍(整个过程要不断搅拌)。最后将灭菌的材料在无菌的情况下放入无菌烧杯中备用。

**第一作者简介:**邓明华(1974),男,湖南临湘人,硕士,讲师,主要从事园艺植物相关方面的研究工作。E-mail: dengminghua1974@yahoo.com.cn.

**基金项目:**云南省自然科学基金资助项目(2005C0023Q);云南省教育厅青年研究基金资助项目(04Y59B, 07Y11682)。

**收稿日期:**2008-04-23

## Starch Metabolism of Somatic Embryogenesis of Xinjiang Ecotype of *Arabidopsis thaliana*

LU Guo-wu<sup>1</sup>, WANG Xue-fen<sup>2</sup>, ZHANG Xia<sup>1</sup>

(1. Life Science College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China; 2. Key Laboratory of Ministry of Education for Medicinal Plant Resource and Natural Pharmaceutical Chemistry, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062, China)

**Abstract:** Somatic embryos were induced from tender leaf and leafstalk of seedling of Xinjiang ecotype of *Arabidopsis thaliana*. The culture medium was MS+6-BA 0.1 mg/mL+NAA 1 mg/mL+2,4-D 1 mg/mL, and the differentiation medium was MS+KT 1 mg/mL+2,4-D 0.2 mg/mL, starch metabolism was studied by PAS during the somatic embryogenesis. Results indicated that there were two peaks starch accumulation in the somatic embryogenesis of *Arabidopsis thaliana*.

**Key words:** Callus; Somatic embryogenesis; PAS; Starch