

doi:10.11937/bfyy.20173514

油用萝卜角果发育特征及胚胎超微结构的比较

李世升, 项俊, 方元平, 李竟才

(黄冈师范学院 生命科学学院, 大别山特色资源开发湖北省协同创新中心,
湖北省经济林木种质改良重点实验室, 湖北 黄州 438000)

摘要:以萝卜为试材,采用形态学解剖、细胞微结构观察等方法对萝卜角果、胚珠和胚胎的发育情况进行全程追踪,以期对萝卜种子含油机理研究提供参考依据。结果表明:萝卜胚珠及胚胎在拐杖胚时期质量急剧上升,超微结构观察表明球形时期胚胎最外层细胞开始出现分化,且油体在拐杖形胚胎时期向子叶胚胎时期发育的萝卜胚胎细胞中大量出现。该研究揭示萝卜胚胎发育形态及油体动态变化趋势,为进一步研究萝卜种子发育规律和油体形成过程奠定了基础。

关键词:油用萝卜;角果;胚胎;种子;油体

中图分类号:S 631.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2018)09-0008-06

萝卜(*Raphanus sativus* L.)在我国有着长达2 000多年的种植和栽培史^[1],在我国,每年萝卜播种面积约120万hm²。萝卜食用价值高,同时兼具较高的药用价值。公元1 050年左右,在罗马及埃及人们已从萝卜种子中获取植物性油脂,用作照明或食用^[2]。近年来有学者发现萝卜籽中含大量脂溶物且在萝卜种子抽提物中发现大量活性物质如维生素、黄酮及巢醇等^[3],表明萝卜将成为一种十分有潜力的油料种质资源。另外,萝卜种子含大量脂溶物,出油率在品种间差异较大^[4],各品种含油率在29%~49%。目前尚缺乏可以大面积推广的高含油量的优质萝卜品种,一方面可用于高产油料萝卜育种的种质资源缺乏;另一方面,对萝卜种子发育和油脂合成储藏的规律缺乏深入的研究,使得选种工作缺乏必要的理论基础。新型油用萝卜种质资源的选育和深入研究萝卜

种子含油机理成为目前亟待解决的问题。该研究对萝卜角果及种子发育进行全程追踪观察,研究了从人工授粉至种子成熟全过程的发育进程,揭示萝卜角果从小到大的形态变化过程和角果内胚珠分布情况,明确不同发育时期胚胎形态及油体等超微结构,以期挖掘萝卜种子发育规律和研究油体形成过程提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试萝卜品种“短叶-13”,购自武汉市大东门种子市场。

1.2 试验方法

1.2.1 萝卜胚胎的观察

先利用人工去雄及人工授粉方法确定萝卜授粉及角果发育起点时间,然后取不同时间段的萝卜角果开展萝卜角果及胚胎后续观察和分析试验。在体式显微镜下对萝卜角果进行实体解剖,用镊子将从角果中解剖出来的胚胎转移至盛有13%甘露醇的容器中,利用电子天平对各时期胚珠及胚胎质量进行测量,利用尼康(YS100)显微镜和尼康D800E照相机对连续发育的萝卜角果

第一作者简介:李世升(1983-),男,博士,讲师,现主要从事植物发育与育种等研究工作。E-mail:21581872@qq.com

责任作者:李竟才(1975-),男,博士,讲师,研究方向为蔬菜分子生物学。E-mail:lijingcai@hgnu.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金青年资助项目(31701466);黄冈师范学院博士启动基金资助项目(2015002703)。

收稿日期:2018-02-23

及胚胎分别进行拍照,有关胚分离方法及发育时期描述可参照文献[5]。

1.2.2 透射电镜样品制备及观察

用牙签取人工授粉后不同时间段的萝卜胚珠,在体式显微镜下解剖出胚胎,随即将其放入前固定液中,真空泵抽气 30 min 使材料下沉。置换新鲜前固定液并在 4℃ 下固定过夜。洗涤液换洗 4 次,每次 30 min。转入后固定液在 4℃ 下固定 4 h,洗涤液换洗 4 次,每次 30 min。10%、30%、50%乙醇脱水,每级 15 min;70%乙醇脱水 20 min(或 4℃ 冰箱中过夜);80%、90%、95%乙醇脱水,每级 20 min;无水乙醇脱水 3 次,每次 30 min。环氧丙烷置换 2 次,每次 30 min。样品依次转入环氧丙烷与环氧树脂 Epon 812 体积比分别为 2:1、1:1、1:2 的混合物中渗透各 12 h。然后加入纯环氧树脂,室温下渗透 24 h(中间换一次新环氧树脂)。将样品放入包埋板,注满纯环氧树脂,室温下放置 12 h 后转入烘箱,经 36℃ 12 h,60℃ 36 h 聚合。用玻璃刀在 LKB8800 型超薄切片机上切片,厚度为 50~70 nm,切片经醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色,用 JEM100CX/II 型透射电镜观察,随机选取 3~5 张切片揭示细胞核、线粒体、质体等亚细胞结构的分布情况。

1.3 数据分析

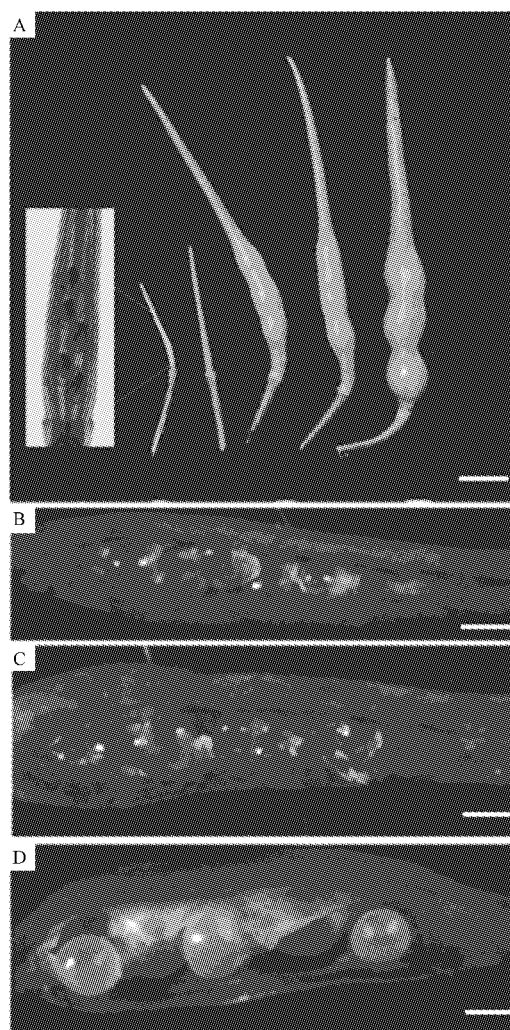
利用 SPSS 13 软件进行数据分析,利用 CoreDraw-13 软件进行图片编辑。

2 结果与分析

2.1 萝卜角果及胚胎连续发育进程及发育特点

由图 1 可知,胚珠在角果内部均为独立排布,且数量平均为 5 个。角果内胚珠数量及大小直接影响着萝卜种子的数量和产量。该研究先进行人工去雄,待花开放后再进行人工授粉,随后对角果的发育进度进行连续追踪和时间进程分析。如图 1A 显示,从最幼小时期还未人工授粉的角果发育至形态饱满、果角较长及成熟度较高的绿色角果平均需要 58.5 d。角果早期发育较为缓慢,在人工授粉后 10 d,角果逐渐形成局部隆突,此时胚胎约处于早前期球形胚时期(图 2A),胚体仅约四细胞大小,且胚柄较长,在胚柄末端会形成一个长且粗大的泡状细胞(图 2A),此泡状细胞充满大液

泡,推测其为胚胎的生长发育提供重要营养物质并起到一起的物理支撑作用。在接下来的 20 d 内萝卜角果会陆续形成多个隆突,在该时期内萝卜胚胎主要处于晚期球形胚及早期心形胚时期(图 2B,C),萝卜角果内部胚珠大小持续发育增大(图 1B,C),且含丰富胚乳。在最后 30 d 内萝卜角果所有隆突全部形成,角果颜色变深且角果硬

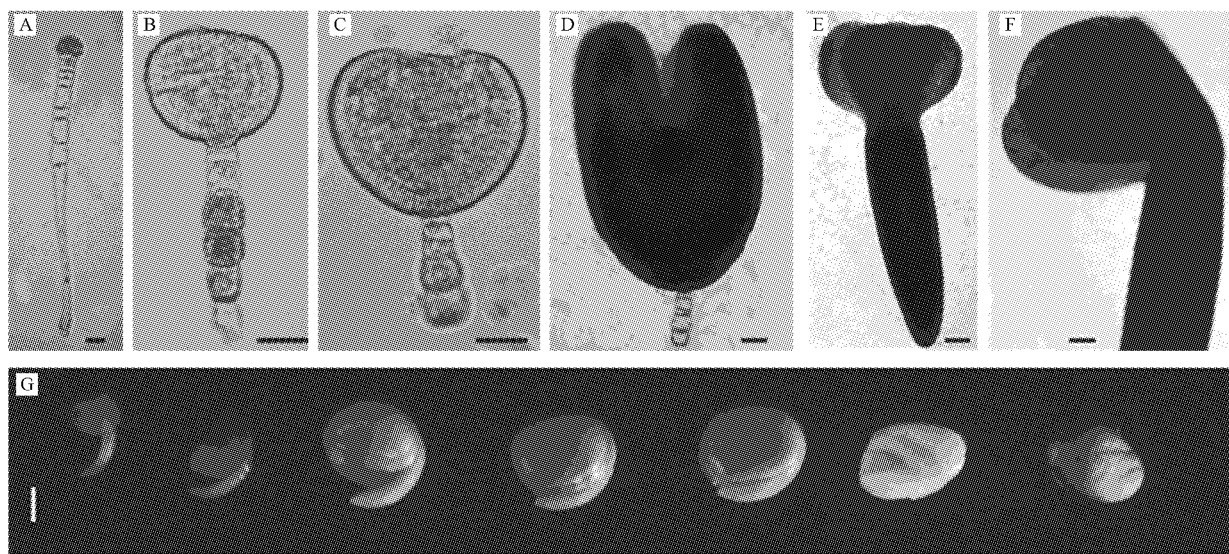


注:A.授粉前及授粉后角果形态;B.授粉前萝卜子房内胚珠分布情况;C~D.授粉后萝卜角果内胚珠分布情况。标尺 0.5 cm。

Note: A. Morphology of silique at different developmental stages; B. Distribution of ovule in silique before pollination; C~D. Distribution of ovule in silique after pollination, Bar=0.5 cm.

图1 萝卜各时期角果及胚珠

Fig. 1 Silique and ovule of radish at different stages



注: A. 早期球形胚; B. 球形胚; C. 三角胚; D. 带有明显子叶原基和根原基的心形胚; E. 鱼雷形胚; F. 拐杖形胚; G. 成熟时期胚。A~F中的标尺为 10 μm , G 中标尺为 300 μm 。

Note: A. Preglobular embryo; B. Globular embryo; C. Tri-angular embryo; D. Heart-shaped embryo, with visible cotyledon and root primordia; E. Torpedo shaped embryo; F. Bent embryo; G. Mature embryo. Bar=10 μm in A-F; Bar=300 μm in G.

图2 萝卜不同时期胚胎发育情况

Fig. 2 Development of embryo at different developed stages of radish

度增强,内部胚珠外形大小变化不大(图 1D),但胚乳含量减少直至最终被胚全部吸收。此时期内萝卜胚胎历经晚期心形胚、鱼雷形胚、拐杖胚及成熟胚时期(图 2D, E, F, G)。

2.2 萝卜种子及胚发育过程中质量变化规律

通过对不同发育时期角果内部的胚珠质量变化及胚胎质量变化进行了追踪分析,图 3 显示胚珠的质量从心形胚时期胚珠历经鱼雷形胚时期胚胎、拐杖胚时期、成熟胚时期及后熟时期种子(图 2)等时期的变化情况,结果表明胚珠质量在早期发育过程如心形胚胎时期至鱼雷胚时期、拐杖胚时期是缓慢上升,而从拐杖胚时期至子叶胚时期是急剧上升的(图 3),相反,从成熟胚时期的胚珠至休眠时期胚珠(成熟种子)时期是下降的。这与种子发育过程是对应的,因为在前期胚珠大小也一直在增大,而后期大小没有变化且胚珠缓慢后熟而变干燥。

此外,对萝卜各时期胚胎质量大小变化也十分明显,图 4 结果表明在胚胎历经鱼雷胚时期、拐杖胚时期、成熟胚等过程中,其质量从鱼雷胚时期到早期拐杖胚时期是缓慢上升的(更早时期胚胎

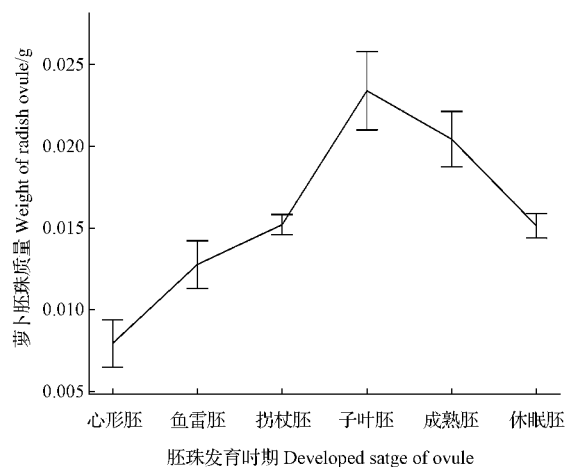
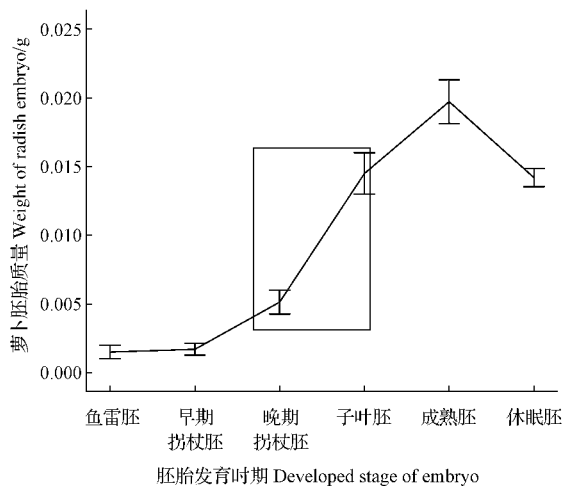


图3 萝卜不同时期胚珠质量动态变化

Fig. 3 Dynamic change of radish ovule weight at different developed stages

因无法称量没有获取到相应数据),从晚期拐杖胚至子叶胚时期是急剧上升的(如图 4 中方框显示),而从成熟胚至休眠胚胎时期胚胎质量却是下降的,胚胎质量变化趋势表明胚胎与胚乳的消长情况及后期胚胎休眠现象关系密切。



注:方框表示急剧增长期。

Note: Square indicates sharp increasing period.

图4 萝卜不同时期胚胎质量动态变化

Fig. 4 Dynamic change of radish embryo weight at different developed stages

2.3 萝卜胚胎超微结构观察

图5A~D显示了上述各时期萝卜球形胚、心形胚、鱼雷胚及成熟胚内部细胞形态及其分布情况,胚胎细胞的分化从球形胚已初具雏形,如图5A所示,最外一圈细胞为表皮原细胞,在形态上基本上形成了较为整齐的一列细胞,呈现出分化状态,如图5B、C、D中所示胚胎外层细胞排列较整齐,且细胞质较浓,十分致密。

透射电镜观察结果显示,在早期球形胚时期的胚胎细胞内部分布较多的线粒体(图5A1),表明此时期胚胎细胞十分活跃,能量较为充足,另外存在一些前质体结构,为后期叶绿体及其它质体的出现打下基础;在心形胚及鱼雷胚时期的胚胎细胞里也存在一些前质体结构(图5B1, C1),但此时仍未出现成熟质体如叶绿体等结构,表明相关功能质体会在更晚的时期里出现;在成熟胚时期发现大量叶绿体及油体等质体结构出现(图5D1),表明此时胚胎细胞可以进行光合作用及储备大量油脂等代谢产物。从不同时期胚胎细胞超微结构比较来看,认为在从鱼雷胚时期发育到成熟胚时期的过程中细胞功能逐步健全,胚胎也渐渐成熟,奠定了萝卜种子形成的重要结构和物质基础,为日后筛选萝卜种子形成调控基因,尤其为

确定萝卜胚胎发育时期及研究种子内部脂类物质发生过程的调控机制提供重要参考。

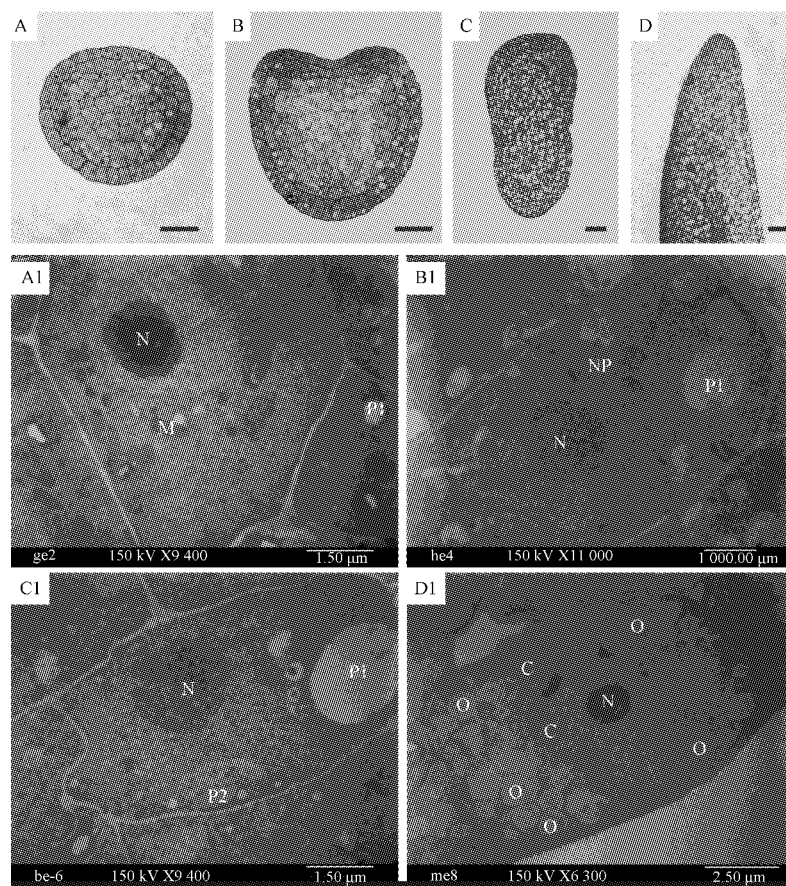
3 讨论

3.1 萝卜种子成熟关键时期的确定

萝卜角果发育及胚珠在角果内的分布情况从人工授粉至果实过程中已被成功追踪,萝卜角果及胚珠发育特点同十字花科其它作物如油菜及模式植物拟南芥相似^[6]。萝卜角果为侧膜胎座类型(图1),胚珠依次纵向排列于仅有一心室子房的胎座上。胚珠由胚胎和胚乳组成,胚胎发育遵循双子叶植物胚胎生长发育模式,包括胚体分化和胚柄伸长。胚体逐渐发育成早期球形胚胎、心形胚胎、鱼雷形胚胎、拐杖形胚胎和成熟胚等,而胚柄伸长至足够长后逐步退化直至消失(图2)。胚珠发育成熟后形成种子,胚珠能否形成、胚珠数量如何以及胚珠在角果内的着生方式直接影响萝卜种子最终形成的数量和质量。图3和图4结果反映萝卜胚珠及胚胎在拐杖胚时期质量急剧上升,表明此时期胚珠及胚胎生物物质含量明显积累,为成熟种子奠定物质基础,这一发现同DIGGLE等^[7]的试验结果一致。成熟胚时期胚珠质量有所下降,主要原因是胚乳被吸收完毕而消退,另外为种子休眠做准备,水分也开始减少。无论如何,上述物质积累重要时期的发现为日后研究萝卜种子发育调控机理和改良萝卜种子性状提供参考基础。物质积累关键时期在萝卜种子发育过程中的发现,为研究萝卜种子内含物组分如萝卜硫素、脂肪酸及重要蛋白等带来极大便利。

3.2 胚胎细胞超微结构反映萝卜种子油脂积累规律

为进一步弄清种子成熟关键时期物质积累情况,胚胎细胞分化和细胞超微结构得到详细的观察比较。该研究结果表明球形时期胚胎最外层细胞开始出现分化现象,最外层细胞明显分化为表皮原细胞(图5A),进一步形成表皮。超微结构观察结果表明质体在球形胚胎、心形胚胎中均存在(图5A1、B1),但油体这种特殊的质体分化结构并未出现。早期成熟胚时期的萝卜胚胎细胞中开始出现大量油体结构(图5D1),当然这一时期胚胎细胞中已经出现叶绿体等另一种质体分化结构



注: A. 球形胚胎的半薄切片; B. 心形胚胎的半薄切片; C. 鱼雷形胚胎的半薄切片; D. 成熟胚胎的半薄切片; A1. 球形胚胎的超微结构; B1. 心形胚胎的超微结构; C1. 鱼雷形胚胎的超微结构; D1. 成熟胚胎的超微结构。A~D 中的标尺为 20 μm , A1 标尺为 1.5 μm , B1 标尺为 1 μm , C1 标尺为 1.5 μm , D1 标尺为 2.5 μm , C 为叶绿体, M 为线粒体, N 为细胞核, NP 为核空, O 为油体, P1 和 P2 为前质体。

Note: A. Semithin section of globular embryo; B. Semithin section of heart-shaped embryo; C. Semithin section of torpedo shaped embryo; D. Semithin section of mature embryo; A1. Ultrastructure of globular embryo; B1. Ultrastructure of heart-shaped embryo; C1. Ultrastructure of torpedo shaped embryo; D1. Ultrastructure of mature embryo. Bar = 20 μm in A—D, Bar = 1.5 μm in A1, Bar = 1.0 μm in B1, Bar = 1.5 μm in C1, Bar = 2.5 μm in D1. C. Chloroplast, M. Mitochondria, N. Nuclear, NP. Nuclear pore, O. Oil body, P1, P2. Preplastid.

图 5 萝卜不同时期胚胎半薄切片及超微结构

Fig. 5 Semithin section and ultrastructure of radish embryo at different developed stages

(图 5D1)。表明在这时期的萝卜种子中开始大量积累油脂物质,同时也已经进行光合作用,开始碳水化合物化合物的形成。油体在萝卜拐杖形胚胎时期向成熟胚时期发育过程中大量分化并形成,可以认为萝卜种子内油脂是在此时期内大量积累,为研究萝卜种子内含物中脂肪酸形成提供重要理论参考。萝卜子含大量脂溶物,出油率在品种间差异较大^[4],各品种含油率在 29%~49%。也有学者发现在萝卜种子抽提物中含大量活性物质^[3],如

维生素、黄酮及巢醇等。黄酮、维生素 E 及甾醇的大量存在会大大提高萝卜子油的食用价值,最终也将使萝卜成为一种十分有潜力的油料种质资源。

4 结论

该研究揭示了油用萝卜从人工授粉至种子成熟全过程的果实发育进程,揭示萝卜角果从小到大的形态变化过程和角果内胚珠分布情况,认清

不同发育时期胚胎形态及油体等超微结构,挖掘出油体发生的变化趋势,主要表现为:1)在萝卜种子形成过程中,各时期胚胎质量变化明显,尤其是在从拐杖胚时期至成熟胚时期胚胎质量急剧上升,此时对应种子质量同样也是急剧上升,表明该过程对种子形成非常重要;2)油体在萝卜胚胎发育过程中也表现出从无到有,从少到多的变化规律,心形胚及鱼雷胚时期的胚胎细胞里也存在一些前质体结构,但此时仍未出现成熟质体如油体、叶绿体等结构,表明相关功能质体会在更晚的时期里出现;3)研究发现萝卜成熟胚胎中出现大量油体及叶绿体等成熟质体结构,表明此时胚胎细胞可以进行光合作用及储备大量油脂等代谢产物,胚胎正为日后种子的形成积蓄能量和物质,上述结论为进一步挖掘萝卜种子发育规律和油体形成过程奠定坚实基础。

参考文献

[1] 吴嘉瑞,张冰,常章富. 中药莱菔子的研究进展[J]. 美中医

学,2007(6):13-15.

[2] ROMANUS K, NEER W V, MARINOVA E, et al. Brassicaceae seed oil identified as illuminant in Nilotic shells from a first millennium AD Coptic church in Bawit, Egypt[J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2008, 390(2): 783-793.

[3] KIM K H, MOON E, KIM S Y, et al. 4-Methylthio-butanyl derivatives from the seeds of *Raphanus sativus* and their biological evaluation on anti-inflammatory and antitumor activities[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2014, 151(1): 503-508.

[4] 李丽,郁建平,陈菊. 萝卜籽油含量及脂肪酸成分研究[J]. 贵州农业科学, 2008, 36(2): 53-54.

[5] 邹颢,李世升. 烟草早期胚胎细胞观察方法研究[J]. 南方农业学报, 2013, 44(12): 1963-1966.

[6] UYTTEWAAL M, ARNAL N, QUADRADO M, et al. Characterization of *Raphanus sativus* pentatricopeptide repeat proteins encoded by the fertility restorer locus for Ogura cytoplasmic male sterility[J]. Plant Cell, 2008, 20(12): 3331-3345.

[7] DIGGLE P K, ABRAHAMSON N J, BAKER R L, et al. Dynamics of maternal and paternal effects on embryo and seed development in wild radish (*Raphanus sativus*) [J]. Annals of Botany, 2010, 106(2): 309-319.

Developmental Characteristics of Silique and Structural Comparision of Embryo From Oil Radish

LI Shisheng, XIANG Jun, FANG Yuanping, LI Jingcai

(College of Life Science, Huanggang Normal University/Collaborative Innovation Center for the Characteristic Resources Exploitation of Dabie Mountains/Key Laboratories of Economic Forest Germplasm Improvement and Comprehensive Resources Utilization of Hubei Province, Huangzhou, Hubei 438000)

Abstract: Radish was used as test material, the dynamic process of silique ovule and embryo in radish was traced via morphology and comparative embryology, in order to excavate the radish seed oil formation mechanism. The results showed that the weight of radish ovule and embryo increased sharply at bent-embryo stage. Ultrastructure observation indicated that peripheral cell around globular embryo began to differentiate and oil body started to appear at bent-embryo stage. The study revealed dynamic process of oil body formation in embryo development and provided an important theoretical reference for the formation of fatty acids in radish seeds.

Keywords: oil radish; silique; embryo; seed; oil body