

外源生长素对烟草(*Nicotiana tabacum* L.)小孢子 早期胚胎发生的影响

赵婧, 孙蒙祥*

(武汉大学生命科学院, 植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉 430072)

摘要: 烟草(*Nicotiana tabacum* L.)小孢子胚胎发生系统,不仅可以提供大量可供处理的小孢子胚,还由于小孢子胚胎发生的不同步性,可同时提供从2-3细胞原胚到分化胚一系列胚胎以供研究。利用这一便利系统,探讨了外源生长素处理对小孢子胚胎发育的影响。使用3种浓度的IAA:1、3、10 $\mu\text{mol/L}$,分别对不同发育时期烟草小孢子胚进行了处理,结果发现,对不同发育时期的小孢子胚,生长素处理的效果明显不同。外源生长素对胚胎发生有促进作用,表现为2-3细胞比例与非处理组相比升高,而当小孢子发育到小球形胚后,加入外源生长素对小孢子胚的进一步发育却表现出明显抑制作用。这说明在小孢子胚胎发育过程中早期和晚期发育对生长素的需求是不同的,且对生长素的敏感程度亦不同。反映了生长素调控机制在两个不同发育时期的差异。

关键词: 烟草; 小孢子; 雄核发育; 外源生长素

中图分类号: Q945

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2005)06-0519-05

Influence of Exogenous Auxin on Microspore Embryogenesis in Tobacco

ZHAO Jing, SUN Meng-Xiang*

(Key Laboratory of MOE for Plant Developmental Biology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: Microspore embryogenesis system of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) was employed in the experiments, which offered excellent material of embryos at different stages for the test of auxin treatments. When treated with exogenous auxin of diverse concentrations, 1 $\mu\text{mol/L}$, 3 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$ of IAA, embryos at early and later stages showed different responses. Auxin enhanced the formation of 2-3 cell embryos and early globular embryos, but inhibited the formation of later globular embryos and the embryo differentiation. The experiments revealed that two phase, early and later, of embryogenesis showed different sensitivity to auxin treatment, which reflects different mechanism of auxin regulation in those two developmental processes.

Key words: *Nicotiana tabacum*; Microspores; Androgenesis; Exogenous auxin

胚胎发生中的模式建成是发育生物学的核心问题之一,也是近年来的研究热点。关于模式建成的一个基本问题是:未分化的细胞是怎样确定其发育命运的。近年的研究表明胚胎发育中细胞的分化与生长素有密切关系。有关模式建成研究的进展来自于利用生长素及其相关物质对体外发育的合子胚或体细胞胚进行的干扰实验。Fry和Wangermann^[1]第一次提出球形胚中生长素的极性运输启动了细胞的轴向分化。此后的一些工作为这一假说提供了实验依据。Schiavone和Cooke^[2]发现,用生长素处理的

胡萝卜胚胎愈伤组织化,改变了细胞的发育命运。Fischer和Neuhaus^[3]发现,用生长素处理小麦胚胎,亦观察到胚胎的异常发育。这说明,生长素对胚胎发育的影响并不仅限于双子叶植物。Hadfi等^[4]用天然生长素(IAA)和生长素抑制剂(NPA, PCIB)在体外对甘蓝型油菜的合子胚进行处理,引起了明显的形态改变。在球形胚时期进行外源生长素处理可完全抑制形态发生,观察到球形、卵形、黄瓜形的胚胎,仅有下胚轴而没有任何顶端结构。在球形胚到心形胚的过渡阶段处理,导致裂开领状(split-collar)

收稿日期:2005-05-09,修回日期:2005-06-20。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370743,90408002);国家杰出青年基金(30225006)资助。

作者简介:赵婧(1982—),女,博士研究生,从事植物发育生物学研究。

* 通讯作者(E-mail: mxsun@whu.edu.cn)。

或领状(collar)子叶。生长素抑制处理抑制了子叶生长,导致单一子叶或无子叶。说明生长素极性运输在胚胎发育过程中辐射对称向两边对称转变中有着重要作用。然而,对油菜合子胚进行离体实验必须建立在其合子胚离体培养成功的基础上,由于对油菜早期合子胚胎分离及培养尚缺乏有效的技术,目前只对晚期球形胚进行了研究。幼小原胚时期的发育对生长素处理的反应如何,或类似的机制是否也调控胚胎发生早期细胞的分化与发育尚不清楚。

很多植物的小孢子可以去分化并经胚胎发生途径形成单倍体植株,这一过程称为雄核发育或花粉胚胎发生。小孢子群体数量大,易于获得大量不同时期的小孢子胚。此外,小孢子宜于培养和观察。因而,我们利用这一便利系统研究了外源生长素对小孢子胚胎发生的影响,用不同浓度的 IAA 对烟草小孢子胚进行了处理,重点比较了小孢子胚胎发生早期与晚期球形胚以后时期对外源生长素处理的反应,观察到一些有意义的结果。

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试材料为烟草(*Nicotiana tabacum* L.)品种 W-38。种植于本实验室温室。

1.2 烟草小孢子胚胎发生

用热激和饥饿处理诱导(B培养基,32℃,黑暗培养5 d),在AT3培养基^[5]中(25℃,黑暗培养10 d以上)诱导小孢子胚胎发生^[6-9]。

1.3 观察及图片收集

使用倒置显微镜(Leica DM IRB)观察,通过Cooled-CCD(MicroMAX Princeton Instruments, Inc)收集图像。

1.4 外源生长素对烟草小孢子胚分化影响的测试

1.4.1 小孢子胚处理前的分组 小孢子培养15~30 d后,对不同发育时期的胚胎进行统计,在光镜下观察,计数。按时期分为2-3细胞胚、小球形胚(8-16细胞胚)、大球形胚(接近分化的胚)和早心形胚等4个组进行观察;设2组:1组对照,1组经生长素处理,以同样方法进行统计。

1.4.2 外源生长素的处理 在低糖AT3培养基中加入IAA,浓度分别为2、6、20 $\mu\text{mol/L}$, pH值为6.2,过滤灭菌备用。上述各组不同发育时期的胚胎置于条件培养基中进行处理。每皿条件培养基含0.75 mL原小孢子培养时的旧培养基和0.75 mL上述含IAA的低糖AT3培养基,使IAA终浓度分别

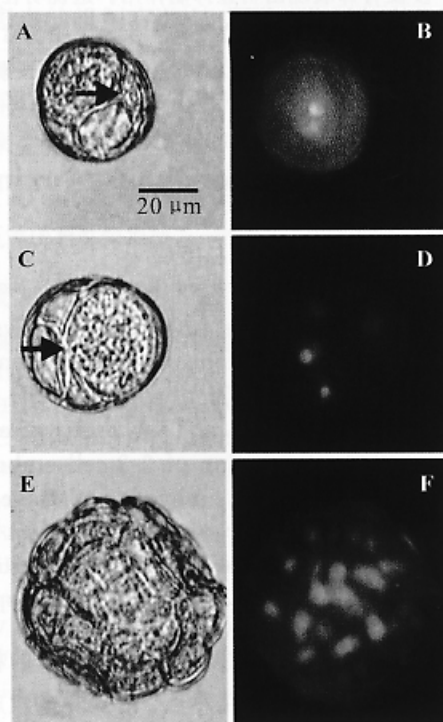
达到1、3、10 $\mu\text{mol/L}$ 。对照组则加无激素低糖AT3培养基0.75 mL。用封口膜封口后,于32℃恒温暗培养,1周后于光镜下观察并统计,每组实验至少重复3次。

2 实验结果

2.1 游离小孢子培养观察

烟草小孢子胚胎发生系统比较成熟,系统稳定性较好,只要保证取材的小孢子发育时期处于单核晚期,胚胎发生频率相当高,可达30%以上。但如果取材的小孢子发育时期较晚,培养后部分细胞膨大呈空泡状,有松散细胞团形成。

烟草小孢子培养周期较长,转入AT3培养基培养约10 d后可以观察到小部分小孢子启动第一次分裂(图1:A)。培养20~30 d后,可观察到有小球



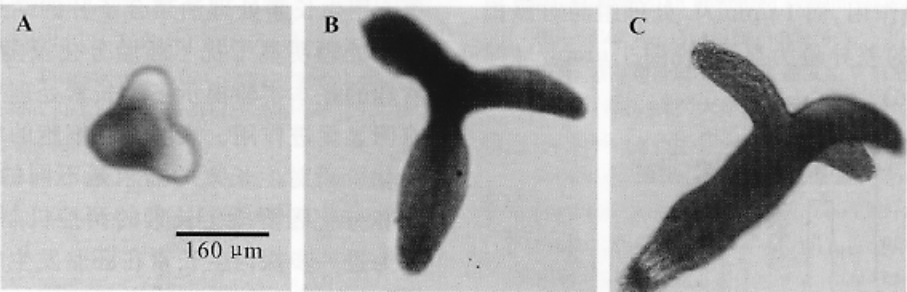
A. 培养约10 d后,小孢子启动第一次分裂,可以看到分裂面(箭头); B. 启动第一次分裂的细胞,DAPI染色,可见2个核; C. 二次分裂的细胞,可以看到分裂面呈“X”形(箭头); D. 二次分裂的细胞,DAPI染色,可见其4个核; E. 球形胚; F. 球形胚,DAPI染色,可见其多核

A. A microspore cultured for 10 days, showing its first division. The arrow indicates the division plane; B. Fluorescence image of the same microspore in A, showing its 2 nuclei stained with DAPI; C. The microspore divided twice, arrow shows its “X”-shaped division plane; D. DAPI fluorescence of the same microspore in C, showing its 4 nuclei; E. A globular embryo; F. DAPI fluorescence of the same embryo in E, showing its multi-nuclei

图1 烟草小孢子的分裂及球形胚的形成
Fig.1 Division of tobacco microspore and formation of globular embryo

形胚形成(图 1:E,F),细胞排列很紧密,继续培养可形成较大球形胚。AT3 中培养约 35 d 后,可观察到有心形胚形成。小孢子胚发育不同步,培养过程中不断会有单细胞启动分裂,一般分化胚(图 2:B)、心形

胚(图 2:A)、球形胚、2-3 细胞在同一皿中同时存在,因而,有利于不同发育时期胚胎的分拣和进一步实验。分化完全的胚中,有形态不正常的胚,如单子叶,三子叶(图 2:C)等,但频率极低。表明在本实验



A. 小孢子胚结构紧密,表皮细胞排列整齐,此为心形胚; B. 心形胚继续分化,有明显的子叶和胚根;
C. 形态不正常的胚,具三子叶
A. A embryo at heart stage; B. A mature embryo showing its two cotyledons and hypocotyl;
C. An abnormal embryo with 3 cotyledons

图 2 分化的小孢子胚

Fig. 2 The differentiation of microspore embryos

条件下,小孢子培养系统是稳定的。

2.2 外源生长素处理对烟草小孢子胚发育的影响

使用 IAA 3 个浓度(1、3、10 $\mu\text{mol/L}$),对烟草小孢子胚进行处理,1 周后观察统计。发现不同浓度的 IAA 处理均有明显作用。但不同时期对 IAA 处理的敏感性不同,反应亦有差异。

2.2.1 外源生长素对 2-3 细胞胚形成的影响 处理组 2-3 细胞胚的比例明显高于对照组,说明 IAA 处理后启动分裂的小孢子比例增加,表明 IAA 对小孢子分裂的启动有促进作用。10 $\mu\text{mol/L}$ 处理组比例升高最多,说明较高浓度的 IAA 促进分裂效果较好(图 3)。

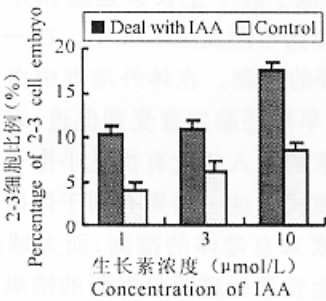


图 3 不同浓度 IAA 处理对 2-3 细胞胚形成的影响
Fig. 3 Influence of diverse concentration of IAA on the formation of 2-3 cell embryos

2.2.2 外源生长素对小球形胚形成的影响 从对小球形胚的比例变化的统计可以看出,处理组小球形胚的比例高于对照组,说明 IAA 促进了 2-3 细胞胚发育为小球形胚。1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度处理组比例变化最为明显,说明较低浓度 IAA 处理效果较好(图 4)。

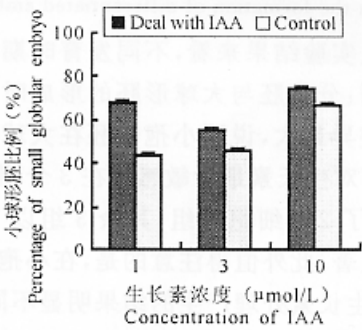


图 4 不同浓度 IAA 处理对小球形胚形成的影响
Fig. 4 Influence of diverse concentration of IAA on the formation of young globular embryos

2.2.3 外源生长素对大球形胚形成的影响 对照组大球形胚比例要明显高于处理组,说明 IAA 对小球形胚发育到大球形胚有抑制作用。3 种浓度 IAA 处理效果都较为明显,但并没有明显的剂量效应(图 5)。

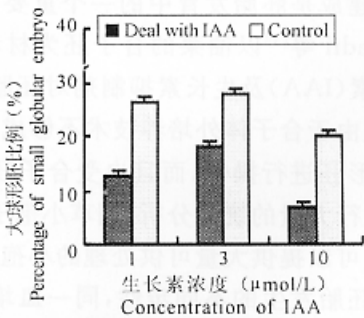


图 5 不同浓度 IAA 处理对大球形胚形成的影响
Fig. 5 Influence of diverse concentration of IAA on the formation of globular embryos

2.2.4 外源生长素对分化胚(早心形胚)形成的影响 通过对分化胚比例变化的统计显示,对照组分化胚比例高于处理组,分化胚由球形胚发育而来,处理组培养后分化胚比例升高,说明 IAA 对球形胚的分化有明显抑制作用。而 $1 \mu\text{mol/L}$ 处理组与对照相比,分化胚比例的差异最为显著,说明 $1 \mu\text{mol/L}$ 抑制效果明显(图 6)。

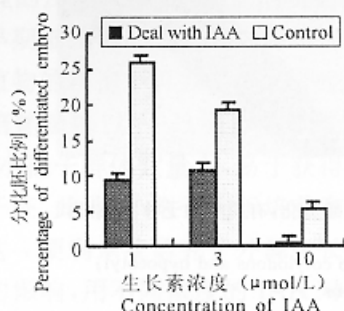


图 6 不同浓度 IAA 处理对分化胚形成的影响

Fig. 6 Influence of diverse concentration of IAA on the formation of differentiated embryos

从以上实验结果来看,不同发育时期处理效果的比较表明:分化胚与大球形胚的形成时期处理组与对照组差异最大,说明小孢子胚在大球形胚及小球形胚时期对生长素最为敏感。在 3 个测试生长素浓度中,除了 2-3 细胞胚组,其余 3 组以 $1 \mu\text{mol/L}$ 处理效果显著。此外值得注意的是,在小孢子胚不同发育时期,生长素处理产生的结果明显不同,在启动分裂起至 2-3 细胞时期加入外源生长素对细胞分裂起促进作用,而当小孢子发育到小球形胚后生长素对小孢子胚的进一步发育却表现出抑制作用。

培养过程中观察到处理组有一定比例胚表面长出很多透明的根毛状结构,还有部分球形胚向细胞团转化,也有低频率的单子叶和三子叶胚存在。

3 讨论

模式建成是胚胎发育中的一个重要事件。Liu 等^[10]和 Hadfi 等^[4]以油菜的合子胚为材料,研究了外源生长素(IAA)及生长素抑制剂对胚胎形态发育的影响,但由于合子体外培养技术不够成熟,只能对较大的球形胚进行操作,而且也受合子胚数量的限制,无法进行大量的统计分析。烟草小孢子胚胎发生系统,不仅可以提供大量可供处理的小孢子胚,还由于小孢子胚胎发生的不同步性,同一皿培养物可以同时提供从 2-3 细胞原胚到分化胚一系列胚胎,方便进一步的处理。因而是研究胚胎发生的便利系统。

本实验中用 IAA 对烟草小孢子胚进行处理,观察到外源 IAA 对烟草小孢子胚发育有明显影响,小孢子胚在小球形胚以前时期对生长素最为敏感。对晚期大球形胚和分化胚则有明显抑制作用,这与 Hadfi 等^[4]用生长素处理油菜合子胚的结果相似。表明生长素处理明显干扰了胚胎分化及随后的极性生长。有趣的是本实验揭示了生长素处理对早期胚胎发生有明显促进作用。表明在胚细胞的增殖阶段和胚的分化阶段对生长素的需求是不同的,反映了原胚阶段和分化胚阶段生长素的调控机制可能是不同的。这为进一步探讨生长素在胚胎发生中的作用提供了新的思路。

有报道指出,在拟南芥合子胚中,PIN 家族蛋白(PIN1 和 PIN7)的定位在球形胚时期如发生了改变,会导致生长素分布发生反转,由早期在顶部区域积累变为在基部区域积累^[11,12]。拟南芥合子胚发育早期在胚体中 PIN1 分布没有极性,而 PIN7 分布在胚柄细胞顶部细胞膜上;到球形胚时 PIN1 分布于胚体细胞基部细胞膜上,而 PIN7 分布则发生反转^[11,12]。PIN 家族蛋白与生长素极性运输有关,因此其分布的改变表明生长素流向的变化,暗示着早期和球形胚后期生长素来源有可能不同,Frml1 等^[11]推测早期生长素可能来源于母体组织,而当胚胎发育到球形胚时胚体开始合成生长素,这时 PIN 蛋白分布改变而引起生长素极性运输和分布的改变。在本实验中,外源生长素的加入提高了小孢子启动分裂的比例,而在小球形胚时期外源生长素表现出对胚胎进一步发育的抑制作用(图 4),说明在球形胚时期,小孢子胚中生长素运输和分布模式与分裂启动时期相比可能发生了改变。在一定程度上支持了 Frml1 等的推测。在体外培养中由于外源生长素的加入,使早期胚胎发育受到促进,表明胚胎发生早期外源激素的加入并没有扰乱小孢子胚生长素的运输和分布模式。这一结果有利于体内早期胚胎发育所需生长素来自母体的推测;而大球形胚与分化胚发育受到生长素处理明显抑制的结果可能是由于在球形胚时期生长素极性运输和固有的分布模式受外源激素干扰而改变,因而其进一步的发育必然受到阻碍。尤其是球形胚向分化胚发育过程中辐射对称向两边对称的转变是依赖生长素极性运输的过程,与发育初期细胞增殖对生长素的需求明显不同。这可能是同样的外源生长素处理对原胚和分化胚有不同效应的原因。这一发现对探讨合子胚胎发生与

生长素的关系提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Fry S C, Wangermann E. Polar transport of auxin through embryos[J]. *New Phytol*, 1976, **77**: 313 - 317.
- [2] Schiavone F M, Cooke T J. Unusual patterns of somatic embryogenesis in the domesticated carrot, developmental effects of exogenous auxin and auxin transport inhibitors[J]. *Cell Diff*, 1987, **21**: 53 - 62.
- [3] Fischer C, Neuhaus G. Influence of auxin on establishment of bilateral symmetry in monocots[J]. *Plant J*, 1996, **10**: 659 - 669.
- [4] Hadfi K, Speth V, Neuhaus G. Auxin-induced developmental patterns in *Brassica juncea* embryos[J]. *Development*, 1998, **125**: 879 - 887.
- [5] Touraev A. Plant biotechnology, microspore embryogenesis and *in vitro* pollen maturation in tobacco[A]. *Experimentelle Genetik III*[C]. University of Vienna, 2001.
- [6] Harada H. Control of the developmental pathway of tobacco pollen *in vitro*[J]. *Planta*, 1986, **168**: 427 - 432.
- [7] Reynolds T L. Pollen embryogenesis[J]. *Plant Molecular Biol*, 1997, **33**: 1 - 10.
- [8] Touraev A, Ilham A. Stress-induced microspore embryogenesis in tobacco; an optimized system for molecular studies[J]. *Plant Cell Rep*, 1996, **15**: 561 - 565.
- [9] 田辉. 油菜裂外壁小孢子胚胎发生早期的发育轴向与细胞命运[D]. 武汉: 武汉大学, 2002.
- [10] Liu C M, Xu Z H, Chua N H. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis[J]. *The Plant Cell*, 1993, **5**: 621 - 630.
- [11] Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R, Jürgens G. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 2003, **426**: 147 - 153.
- [12] Weijers D, Jürgens G. Auxin and embryo axis formation; the ends in sight?[J]. *Current Opinion in Plant Biol*, 2005, **8**: 32 - 37.