

### 酶解压片分离沙田柚胚囊与胚胎发育研究

薛妙男

陈腾士

(广西师范大学生物系, 桂林 541004)

(广西柑桔研究所, 桂林 541004)

5666.301

A

摘要 用2.5%纤维素酶与2.5%果胶酶混合液在30℃下对已固定的沙田柚 (*Citrus grandis* var. *shatinyu* Hort.) 胚珠酶解6—10小时, 分离了开花前、授粉至受精间隔期、合子休眠期、胚和胚乳发育各期的胚囊。用Olympas相差显微装置进行观察与摄影, 在胚囊中显示了沙田柚胚胎发育各主要阶段的结构特征。分析了酶解压片技术在柑桔属植物胚胎发育研究的前景

关键词 沙田柚; 酶解压片法; 胚胎发育

### ISOLATION OF EMBRYO SAC WITH ENZYME-SQUASH TECHNIQUE AND RESEARCH OF EMBRYONIC DEVELOPMENT OF SHATINYU

Xue Miaonan

(Department of Biology, Guangxi Normal University, Guilin 541004)

Chen Tangtu

(Guangxi Orange Research Institute, Guilin, 541004)

Abstract The ovules from fixed Shatinyu (*Citrus grandis* var. *shatinyu* Hort.) were enzymically macerated in a mixed solution of 2.5% pectinase and 2.5% cellulase at 30℃ for 6—10 hours. The embryo sacs in the stages before blooming, between pollination and fertilization, and of the zygote dormancy, and in various developmental stages of embryo and endosperm, were isolated. By means of OLYMPAS phase contrast microscope, the embryo sacs were observed and photographs were taken. The structural characteristics of every major stages of the embryonic development were shown in the embryo sacs. The prospects of the enzyme-squash technique for studying the embryonic development of citrus were analysed.

Key words Shatinyu (*Citrus grandis* var. *shatinyu* Hort.); enzyme-squash technique; embryonic development

近年来, 国内外应用酶解技术, 已成功地从多种植物的固定和新鲜的胚珠中分离出受精前胚囊中各成员细胞和显示了受精后发育到相当程度的胚和胚乳<sup>[3, 6, 7]</sup>, 同时进一步从新鲜胚珠中分离出了胚囊的原生质体。因此, 这一技术将为胚囊生理、受精作用的活体观察, 受精生理等问题开辟了新的研究途径。几年来, 我们在研究沙田柚的胚胎发育时, 由于从授粉

至受精间隔期较长,合子休眠期亦长,常需完成大量的石蜡切片工作。因此,深感需要一种简便快速鉴别胚囊结构,研究沙田柚胚胎发育的方法。我们根据已报道的酶解压片法对沙田柚胚胎发育的各个重要阶段的胚囊进行了分离,找到了简捷鉴定沙田柚胚胎发育的途径。

## 1 材料和方法

实验材料均采自广西柑桔研究所沙田柚实验园地的10—12年生结果树,授粉树种为酸柚。于1991年4月1日至23日每天采集一次,每次采花蕾10个,盛花期(4月23日)进行一次性人工授粉1000朵,授粉后一个月内(4月23日—5月23日),每天采集一次,每次5个雌蕊。剥取子房中的胚珠,固定于FPA中。基本上按胡适宜报道的方法<sup>[3]</sup>,用2.5%纤维酶和2.5%果胶酶混合液在30℃下静置酶解6—10小时,pH5.5。经酶解后的胚珠,水洗后放入乳酸酚甘油中透明。制片前,去除内外珠被,剖出珠心,经1:50:100的苏木精:洋红:水的混合液进行淡染,增加反差,也可不染色。加上盖片后,用解剖针尖在盖片上轻轻敲击或敲击与重压相结合,胚囊即可以从珠心中离散,用相差显微镜观察和摄影。

## 2 实验结果

### 2.1 开花前的沙田柚胚囊发育和结构观察

从开花前10天的胚珠中分离了核居正中,核的两端出现液泡的单核胚囊(图版I:1),单核胚囊迅速伸长进行一次分裂形成二核胚囊,二核很快分别移向两极(图版I:2)二核胚囊分裂形成四核胚囊的同时,胚囊伸长和加宽生长,四核分布在胚囊的珠孔端和合点端,每端两核,刚分裂的四核,每两核是很靠近的(图版I:3),随着胚囊加宽生长,两核分开(图版I:4),四核分裂形成八核胚囊,八核胚囊分化成形七胞八核胚囊,卵器和极核明显可见,在胚囊合点端有3个反足细胞(图版I:5),沙田柚由单核胚囊发育形成成熟胚囊历时10天左右,与我们从石蜡切片所得的观察结果是一致的<sup>[1]</sup>。

### 2.2 沙田柚授粉至受精间隔期和合子休眠期分离的胚囊结构观察

**2.2.1 授粉至受精间隔期** 用酶解压片技术分离了授粉后1—25天胚囊,在分离授粉后1—10天的胚囊中,没有见到花粉管进入胚囊、两个精核分别与卵核和次生核融合的过程。只是从授粉后10天至25天这段时间分离的胚囊中,在胚囊珠孔端可见到合子的精卵核仁(图版I:6),25天以后的胚囊中,合子中的雌雄核仁才融合(图版I:7)。可见,沙田柚在授粉后8—10天完成雌雄核融合,而合子中的雌雄核仁融合直到授粉后25天左右完成,沙田柚授粉至受精间隔期为25天左右。

**2.2.2 合子休眠期** 分离25—45天的胚囊中未见合子分裂,直至授粉后45天左右,合子分裂形成二细胞或三细胞胚(图版I:8)。沙田柚合子休眠期在20天左右,酶解压片观察结果与石蜡切片观察结果是一致的<sup>[2]</sup>。

### 2.3 沙田柚胚和胚乳发育过程中分离胚囊的结构观察

**2.3.1 胚的发育** 授粉后50—75天内,沙田柚从球胚依次发育形成心形胚和子叶胚(图版I:9—12),在桂林地区气候条件下,沙田柚从球胚到子叶胚的发育一般在5月下旬至7月上旬,随着果实长大,子叶逐渐长大至种子成熟(10月上旬)。

2.3.2 胚乳的发育 沙田柚次生核受精后, 没有休眠期, 立即分裂, 授粉后第 9 天, 可见胚囊中形成游离核, 游离核不断分裂一直维持到合子分裂 (图版 I: 13), 合子分裂开始后, 核型胚乳由珠孔端向合点端, 由胚囊边缘向中央逐渐形成细胞型胚乳 (图版 I: 14), 球胚阶段, 胚乳细胞化完成 (图版 I: 10), 心形胚期, 胚乳细胞逐渐解体。

### 3 讨 论

3.1 实验结果表明: 酶解压片法分离的开花前胚囊和球形胚以后的胚囊, 胚囊中的结构都比较容易显示和辨认。分离双受精阶段的胚囊后, 由于花粉管进入胚囊时, 破坏了一个助细胞, 另一助细胞解体, 胚乳不断分裂, 胚囊中有机物积累, 使胚囊的珠孔端物质沉积, 不论是用石蜡切片和酶解技术都很难观察到双受精过程。至今只有吴燕和周端在 1988 年用酶解振荡法研究杏叶沙参的受精过程的报道<sup>[6]</sup>。我们也曾采用酶解振荡法和酶解后结合整体解剖法, 但是由于沙田柚为厚珠心, 又有胼胝质化的珠心冠, 效果都不理想。只有在酶解分离胚囊后, 采取敲击和重压相结合的方法, 才能达到预期目的。我们认为, 用酶解分离后的胚囊, 采用敲击与重压相结合方法研究授粉至受精间隔期长和合子休眠期长的沙田柚的受精过程, 有操作简便快速, 能保持胚囊完整性及显微观察良好的优点, 具有较好的应用前景。

3.2 Bacchi (1943) 报道<sup>[8]</sup>, 福斯特葡萄柚授粉至受精平均为 4 天, 合子休眠期为 50 天。Geraci 等 (1987) 发现<sup>[10]</sup> 邓肯葡萄柚授粉至受精为 6—15 天。Lange 等 (1977) 报道<sup>[11]</sup> 明尼奥拉桔柚授粉至受精需 7—14 天, 合子休眠期为 49—56 天。白志川 (1989) 提出<sup>[9]</sup> 梁平柚双受精作用发生在授粉后 10 天左右, 合子中的雌雄核仁在授粉后 18 天左右融合, 合子休眠期为 27 天。我们用酶解压片和石蜡切片相结合的方式研究表明, 沙田柚双受精发生在授粉后 8—10 天, 合子中雌雄核仁融合在授粉后 25 天左右, 合子休眠期为 15—20 天。为什么同是柚类, 授粉至受精间隔期和合子休眠期, 所经历的时间差异如此之大? 排除地区和气候的影响, 我们认为一方面是由于各作者对受精作用的终结标志有不同的理解; 另一方面是由于柑桔类植物授粉至受精时间间隔和合子休眠期较长, 子房中胚珠多, 发育不一致等的影响所致, 仅仅依靠石蜡切片有一定的局限性, 我们的研究认为, 用酶解压片技术对柑桔类受精作用和胚胎发育研究是可行的。只要我们统一对柑桔类受精作用终结标志的认识, 进一步改进和完善酶解技术, 柚类授粉至受精间隔时间和合子休眠时间等问题, 将会获得统一的认识。

3.3 在生产中, 沙田柚第一次生理落果发生在授粉后 7—10 天, 而第二次生理落果发生在授粉后 25—30 天, 两次生理落果时间刚好和沙田柚雌雄核融合和雌雄核仁融合时间相吻合。因此, 沙田柚生理落果与受精作用之间有必然的联系。

### 参 考 文 献

- 1 薛妙男等. 沙田柚雌雄蕊发育及其相关性研究. 广西植物, 1933, 13(2): 170—173
- 2 薛妙男等. 不同柚类品种花粉萌发及授粉对沙田柚着果的影响. 广西柑桔, 1993, 第二期
- 3 李乐工. 胡适宜. 酶解压片法分离胚囊. 植物学报, 1985, 27(6): 561—568
- 4 胡适宜、朱 灏. 高等植物受精作用中雄性核和雌性核融合. 植物学报, 1979, 21(1): 1—10

- 5 白志川。梁平柚的胚胎研究。西南农业大学学报, 1989, 11(2), 288—291
- 6 吴燕。周熾。杏叶沙参胚囊的酶法分离: 受精合子生长与胚乳发育。植物学报, 1988, 30(2), 210—212
- 7 周熾。杨弘远。金鱼草胚囊人工分离研究。实验生物学报, 1984, 17, 141—147
- 8 Bacchi, O. Cytological observations in Citrus. III. megasporogenesis, fertilization and polyembryony. Bot. Gaz. 1943, 105, 221—225
- 9 Frost, H. B. and Soost, R. K. Seedreproduction: development of gametes and embryos. The Citrus Industry. Vol. II. Rev. ed., 1968, 290—324. University of California Press, Berkeley.
- 10 Geraci, G., Raforgiato, G. and Pasquale, F. K. Proc. Int. Soc. Citriculture. 1987, 58—59
- 11 Lange, J. H. and Vincent, A. P. Citrus breeding: new techniques in stimulation of hybrid production and indentification of zygotic embryos and seedling. Proc. Int. Soc. Citriculture. 1977
- 12 Jobri, B. M. Jr. Embryology of Angiosperms, Springer-Verlag, Berlin, 1984, PP 4—5