

## 离心对蒺藜苜蓿花药愈伤组织生长和分化的影响

谷文英<sup>1</sup>, 祁新梅<sup>1</sup>, 蒋晓云<sup>1</sup>, 魏臻武<sup>1</sup>, 高洪文<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>扬州大学动物科学与技术学院, 江苏扬州 225009; <sup>2</sup>中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

**摘要:**以蒺藜苜蓿杂交F1代花药为材料,检测了离心力、离心时间对不同基因型花药愈伤组织诱导、生长及分化的影响。结果表明:离心能促进花药愈伤组织的形成;对A基因型花药的诱导作用更明显;不同离心力处理的花药愈伤组织诱导率差异极显著( $P<0.01$ ),其中1000×g,2 min的效果最好;离心对愈伤组织的生长无明显影响,但对抗氧化酶的活性强弱有影响;随离心力的增大,过氧化物酶(POD)的活性逐渐增强,其变化趋势与过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)的相反。离心处理可能增强了愈伤组织的分化潜能。

**关键词:**蒺藜苜蓿;离心;愈伤组织;花药;抗氧化酶

中图分类号:X43

文献标志码:A

论文编号:2011-0929

### Effect of Centrifugation on Callus Induction and Differentiation of *Medicago truncatula* Gaertn Anther

Gu Wenying<sup>1</sup>, Qi Xinmei<sup>1</sup>, Jiang Xiaoyun<sup>1</sup>, Wei Zhenwu<sup>1</sup>, Gao Hongwen<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou Jiangsu 225009;

<sup>2</sup>Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193)

**Abstract:** The effects of centrifugal force and centrifugation time on callus induction and growth of anthers of *Medicago truncatula* Gaertn F1 hybrids from different genotypes were detected in this study. The results showed that centrifugation could promote the formation of anther callus, especially for the genotype A anthers. The callus induction rates of anthers were significantly different ( $P<0.01$ ) after given different centrifugal force, the optimum pretreatment was 1000×g for 2 min. Callus growth was not obviously affected by centrifugal force and centrifugation time. However, the strength of peroxidase (POD), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) of callus were affected by centrifugal force. POD activity gradually increased with the increase of centrifugal force, and the trend of it was opposite with SOD and CAT. Centrifugation may enhance the differentiation potential of callus.

**Key words:** *Medicago truncatula* Gaertn; centrifugation; callus; anther; antioxidase

### 0 引言

单倍体(Hs)不存在显、隐性问题的,其加倍后即为纯合的双单倍体(DHs),它们在遗传理论研究和育种工作实践中都具有非常重要的作用。随着现代分子生物技术的飞速发展,Guha等<sup>[4]</sup>首次报道了毛叶蔓陀罗(*Datura innoxia*)的花药培养后,自此,花药培养成为获得单倍体和双单倍体的一条有效途径,并被广泛应用

到28科68属170多种植物上<sup>[5]</sup>。然而,豆科植物的天然抗性使其单倍体研究进展缓慢。目前,成功诱导花药产生单倍体的植物仅限于豆科的一些种,如紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)<sup>[6-7]</sup>。

花蕾或花药预处理可以提高胚或愈伤组织的诱导率<sup>[1,8]</sup>,尤其是高温或低温处理在很多研究中已被证实和应用<sup>[11-12]</sup>,而离心技术的研究则很有限,仅在少数植

基金项目:牧草种质资源苗期抗逆性评价鉴定(Z09090501040902)。

第一作者简介:谷文英,女,1969年出生,河南人,讲师,在读博士,主要从事植物组织培养工作。通信地址:225009 江苏省扬州市文汇东路12号扬州大学动物科学与技术学院, Tel: 0514-3813187576, E-mail: guwy@yzu.edu.cn。

通讯作者:高洪文,男,1958年出生,山西人,研究员,博士,研究方向:牧草种质资源, Tel: 010-62894560, E-mail: gaohongwen@263.net。

收稿日期:2011-04-01,修回日期:2011-05-30。

物中有报道<sup>[11-13]</sup>。

植物形态特征的变化是生理生化变化的外部反映,决定着分化和形态建成的方向,组织培养中过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)等抗氧化酶在器官发生中起重要作用<sup>[14]</sup>,尤其是POD活性被证实可以作为组织分化的一项重要指标<sup>[15-16]</sup>。

本试验以模式植物蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula* Gaertn)为研究对象,检测离心对其冷藏花药愈伤组织诱导及其后期生长和分化的影响,以期为成功建立单倍体再生系和深入研究组织培养中形态建成机理提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

蒺藜苜蓿品种 Caliph 和选系 P5001 的杂交 F1 代,实生苗种植在光照培养室,光周期为 16 h/8 h,光照 3000 lx, (23±2)°C 培养。于开花期取 3 个基因型——A、B、C 的花药为试验材料。2010 年 4—5 月上旬 9:00—11:00,根据小孢子发育时期和花蕾形态的相关性(待发表),选择小孢子处于单核中晚期的花蕾,置于 4°C 冰箱内冷藏 24 h,用于以下试验。

### 1.2 方法

1.2.1 花蕾预处理 按离心力分别为 200×g、600×g、1000×g 处理花蕾,设未离心花蕾为对照(CK1),具体方案如下:

(1) A 型花蕾分为 4 组,分别给予 0、200×g、600×g、1000×g 处理 2 min,并标记为 CK1、L200、L600、L1000。

(2) A 型花蕾分为 5 组,分别标记为 CK2、L200- I、L200- II、L1000- I 和 L1000- II。其中,CK2 为无离心对照组,L200- I 和 L200- II 为 200×g 离心分别处理花蕾 2 min 和 5 min,L1000- I 和 L1000- II 为 1000×g 离心分别处理花蕾 2 min 和 5 min。

(3) A、B、C 型的花蕾均分为 2 组,一组不离心,分别标记为 CKA、CKB、CKC; 一组 1000×g 离心 2 min,分别标记为 L1000-A、L1000-B、L1000-C。

1.2.2 花蕾灭菌和花药接种 离心后的花蕾用无菌水浸泡 20 min,再用 70%~75%酒精处理 30 s,然后以 2%的次氯酸钠溶液处理 20 min,最后用无菌水冲洗干净。在体视镜下剥取各处理花药并接种于愈伤组织诱导培养基上。每皿接种 28~33 个花药,每处理接种 3~6 皿。

1.2.3 愈伤组织的诱导和生长 接种花药置于培养箱进行暗培养。观察花药的变化,50 天后,计算愈伤组织诱导率和褐化率。然后将愈伤组织转入光照培养箱培养,60 天后,称重愈伤组织并转入增殖培养基。待愈伤组织生长 28 天后,依次统计各处理愈伤组织的生长。愈伤组织增长量以增殖培养前后愈伤组织鲜重之差来计算。

1.2.4 愈伤组织的分化 取来自 CK1、L200、L600、L1000 的增殖愈伤组织,继代培养 10 天后,对旺盛生长的愈伤组织进行 POD、CAT 和 SOD 活性检测<sup>[17]</sup>。

1.2.5 培养基和培养条件 愈伤组织诱导培养基: NB + 0.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA + 3.0 mg/L NAA + 3.0 mg/L KT + 8%蔗糖 + 0.7%琼脂;愈伤组织增殖培养基: NB + 0.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA + 3.0 mg/L NAA + 3.0 mg/L KT + 4%蔗糖 + 0.7%琼脂;暗培养: (26±2)°C;光照培养(25±2)°C,2500~3500 lx,光周期为 16 h/8 h(白天/黑夜)。

1.2.6 数据分析 数据采用 Excel 数据分析系统进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 离心对花药愈伤组织诱导的作用

2.1.1 离心对不同基因型花药的愈伤组织诱导 经过 1000×g 离心 2 min 的预处理,各基因型花药的愈伤组织诱导率明显高于其对照组。其中,A 基因型(图 1A、B)的愈伤组织诱导率最高,为 53.57%;B 和 C 之间无明显差异,分别为 10.91%和 7.02%。另外,来自 3 个基因型的愈伤组织均逐渐褐化,在转入光照培养前愈伤组织褐化率均达到 100%(表 1)。

2.1.2 离心对花药愈伤组织形成的影响 经不同离心力处理的花药,暗培养 10 天后可见个别花药开始膨大,

表 1 离心对不同基因型花药愈伤组织的诱导

处理组	接种数/个	出愈数/个	褐化数/个	愈伤组织诱导率/%	褐化率/%
CKA	192	39	39	20.31	100
L1000-A	168	90	90	53.57	100
CKB	110	0	0	0	0
L1000-B	110	12	12	10.91	100
CKC	114	0	0	0	0
L1000-C	114	8	8	7.02	100

然后脱分化花药数目增多,并形成不规则愈伤组织团,呈淡黄色或白色,个别的呈浅褐色。但随着培养时间的延长,愈伤组织均呈现不同程度的褐化,部分未形成愈伤组织的花药也明显褐化。花药经暗培养50天后,愈伤组织诱导率随着离心力的增大而增高,1000×g离心的花药愈伤组织诱导率最高(53.57%),且各处理间愈伤组织诱导率差异极显著( $P<0.01$ )(见表2)。

在不同离心时间处理后,暗培养50天后发现,花药愈伤组织诱导率均在20%以上,明显高于对照组的15.31%。但离心与否、离心力大小和离心时间的长短

均不能改善愈伤组织的褐化状况,褐化率均为100%。

## 2.2 离心对花药愈伤组织生长的影响

在暗培养时间50天后,将培养物转入光照培养箱继续培养,结果发现原来褐化的愈伤组织团上又长出新的翠绿色愈伤组织(图1C);60天后,将新鲜翠绿的愈伤组织转入增殖培养基内,28天后统计各处理愈伤组织生长量。从表3可见,与对照组相比,花药接种前给予不同离心力、离心时间处理对愈伤组织鲜重增长量的影响不大,各处理间无显著性差异。但值得注意的是,新鲜愈伤组织增殖培养中未出现褐化现象(图1D)。

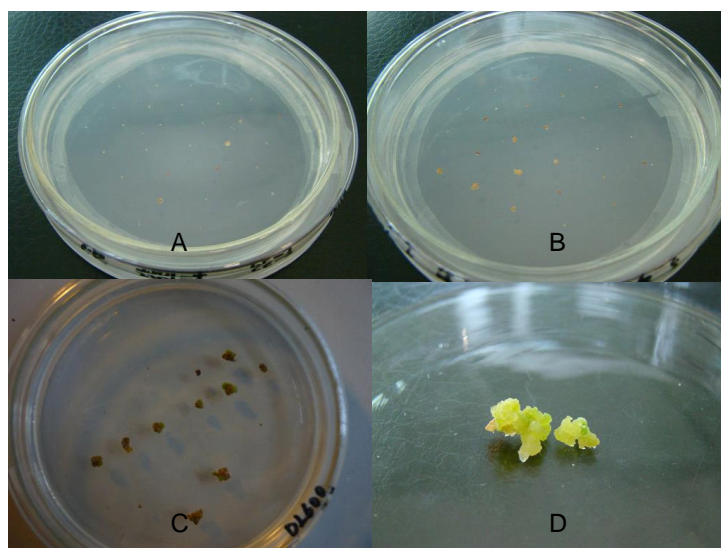
表2 离心力、离心时间对花药愈伤组织诱导的影响

处理组	接种数/个	出愈数/个	褐化数/个	愈伤组织诱导率/%
CK1	192	39	39	20.31d
L200	192	72	72	37.50c
L600	168	66	66	39.29b
L1000	168	90	90	53.57a
CK2	98	15	15	15.31a
L200- I	98	24	24	24.50a
L200- II	98	26	26	26.53a
L1000- I	96	25	25	26.04a
L1000- II	96	21	21	21.88a

注:同列数据带有不同小写字母(a~d)者表示差异极显著( $P<0.01$ )。L200表示离心力为200×g, L1000表示离心力为1000×g; I为2 min, II为5 min。下同。

表3 离心力、离心时间与花药愈伤组织增长量的关系

CK1	L200	L600	L1000	CK2	L200- I	L200- II
1.39±0.37a	1.04±0.01a	1.27±0.01a	1.41±0.07a	1.72±0.06a	1.42±0.09a	2.03±0.07a



A: A基因型未离心花药愈伤组织诱导情况; B: A基因型离心花药愈伤组织诱导情况; C: 褐变愈伤组织上新的愈伤组织; D: 增殖的愈伤组织

图1 花药愈伤组织的诱导、褐化和新愈伤组织的形成及增殖

### 2.3 离心对花药愈伤组织分化的影响

增殖愈伤组织经继代培养15天后,测定不同离心力对花药愈伤组织内POD、CAT和SOD 3种抗氧化酶的影响,其结果如图2所示。

随着离心力的增加,POD酶活性逐渐增强(图2),但都低于对照组CK1。在L200的花药愈伤组织中,CAT酶活性最强;其次是L600处理组的,L1000的最低,即随着离心力的增大,CAT酶活性逐渐降低(图3)。SOD酶活性的变化趋势与CAT相似,在L200处理组出现最大值,随着离心力的增加,酶活力降低(图3)。统计分析表明,3种酶活性在各处理组之间无显著性差异( $P>0.05$ )

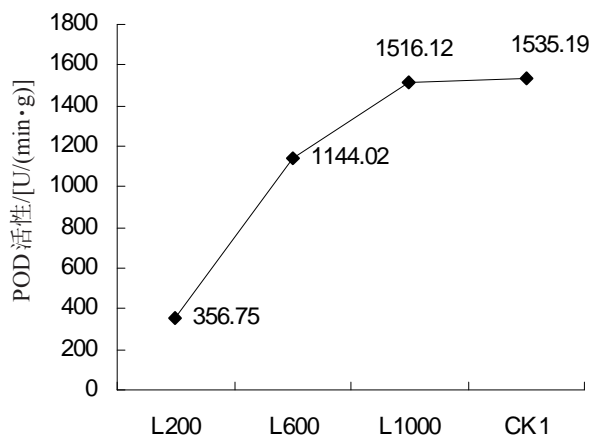


图2 离心对花药愈伤组织POD活性的影响

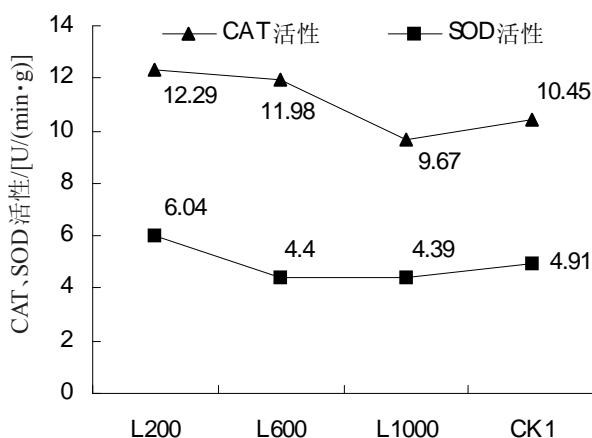


图3 离心对花药愈伤组织CAT和SOD活性的影响

### 3 结论

本试验考察了离心力和离心时间对蒺藜苜蓿花药愈伤组织诱导和分化的影响。从结果可以看出:(1)200×g~1000×g离心预处理可以促进花药愈伤组织的诱导,且随着离心力的增大,愈伤组织诱导率提高,呈现极显著差异( $P<0.01$ );(2)2 min和5 min的离心处理

对花药愈伤组织的诱导没有产生显著性差异( $P>0.05$ );(3)本试验离心处理对愈伤组织鲜重的增长无明显影响( $P>0.05$ );(4)尽管离心可以改变愈伤组织内POD、SOD和CAT酶活性的大小,但是各处理间没有显著性差异( $P>0.05$ );POD酶活性与SOD和CAT的呈相反的变化趋势。

本研究验证了离心预处理对花药愈伤组织诱导的促进作用,完善了前人在这方面的研究<sup>[4,12,14]</sup>,在考察离心力(200×g~1000×g)和离心时间(2 min和5 min)对花药愈伤组织诱导的同时,进一步研究了离心的后续效应,即对花药愈伤组织生长及其内部抗氧化酶活性的影响。为花药培养中普遍存在的愈伤组织诱导率低的问题提供了一个可行的方法,对花药培养尤其是豆科牧草的花药培养具有实际意义。但是,本试验仅考察了200×g~1000×g的离心力,在此范围之外的离心力对花药的作用尚不清楚;延长离心时间对花药的影响仍有待进一步了解。此外,离心影响花药产生愈伤组织的作用机理仍需要进一步阐明。

### 4 讨论

本试验证实了离心对蒺藜苜蓿花药形成愈伤组织形成的促进作用,这与Guha、Golondam等<sup>[4,14]</sup>在脂松雄球花小孢子叶和杨树花药培养方面的研究结果一致。另外,Ravinder等<sup>[12]</sup>在培养鹰嘴豆花药时发现,离心具有基因型效应,这与本试验结果一致。关于离心的作用机理,目前仅有Tanaka对此的推断,他认为离心改变了生长素和细胞分裂素的比例,还可能使花粉孤立化,因而给花粉启动创造了基本前提;离心或许改变了花粉轴方向,使花粉均等分裂数增多,因此刺激了愈伤组织的启动<sup>[3]</sup>。

本试验还考察了离心对愈伤组织生长的影响,结果显示各处理愈伤组织的鲜重增加无显著性差异。目前,关于离心与愈伤组织的生长相关性,仅Ravinder等<sup>[12]</sup>在研究中有所关注,他们发现离心会导致愈伤组织体积减小。

抗氧化酶在形态建成中的作用已被证实<sup>[14-16]</sup>,其中,POD酶活性还被认为是器官分化的指示物质,因为它出现在植物激素不同分子形式的代谢中,调控着植物组织的生长、发育、分化和形态发生<sup>[18]</sup>。本试验发现,离心处理后形成的愈伤组织,其POD、CAT和SOD的活性呈规律性变化,其中CAT和SOD的变化趋势相同,而POD的与之相反,这与Vatankhah等<sup>[19]</sup>在番红花研究中的结果略有不同,他们测得的SOD活性趋势与POD和CAT的相反。另外,试验中测定出来的POD活性明显高于SOD和CAT的,与Meratan等<sup>[20]</sup>在

*Acanthophyllum sordidum* 愈伤组织中测得的结果一致。由此,推断可能各处理愈伤组织处于较为强烈的分化状态。

总之,离心可以促进蒺藜苜蓿愈伤组织的诱导并改变其愈伤组织内抗氧化酶的活性。此外,离心处理操作简便,可以在除蒺藜苜蓿以外的其他植物组织培养中广泛使用。但是,酶活性变化是动态的,会随着愈伤组织的生长、生理状态而变化,本试验测定了各处理愈伤组织继代培养后15天抗氧化酶的活性,但是在愈伤组织的继代培养开始到下一个继代周期来临,期间抗氧化酶的变化情况并不清楚,所以仍需进一步研究,为阐明愈伤组织的分化与抗氧化酶活性的关系提供理论依据。

### 参考文献

- [1] Alisher T, Brian P, Forster S, Mohan Jain. Advances in Haploid Production in Higher Plants[M]. Springer science+Business Media B.V., 2009.
- [2] 孙美红,刘霞.植物单倍体诱导育种研究进展[J].陕西农业科学, 2006(3):69-71.
- [3] 张冰玉,苏晓华,周祥明.林木花药培养研究进展及展望[J].植物学通报,2003, 20(6):656-663.
- [4] Guha S, Maheshwari SC. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*[J]. Nature,1964,204:497.
- [5] Maheshwari S.C. Induction of haploidy from pollen grains in angiosperms-The current status[J]. Theor Appl Genet., 1980,58: 193-206.
- [6] Nedialka Z, Bojan D. Induced androgenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L.)[J]. Plant Cell Reports,1995,14:249-252.
- [7] Nedialka Z, Bojan D, Polina G. Regeneration and characterization of plants obtained from anther cultures in *Medicago sativa* L[J]. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 1997, 33: 107-110.
- [8] 白小娟,张丽,许明. 预处理对萝卜离体小孢子发育的影响[J]. 西北农业学报,2008,17 (3):254-2257.
- [9] 张绿萍,陈红.低温预处理对刺梨花药培养小孢子发育的影响[J]. 江西农业大学学报,2010 (32)1:61-66.
- [10] 李华,孙振英,连勇. 茄子小孢子热激效应和发育潜能的细胞学分析[J]. 种子,2008,27:1-5.
- [11] Bonga J M, Mcinnnis A H. Stimulation of callus development from immature pollen of *pinus resinosa* by centrifugation[J]. Plant Science Letters, 1975 (4):199-203.
- [12] Ravinder K G, Monika L, Janine C. Doubled-haploid production in chickpea (*Cicer arietinum* L.): role of stress treatments[J]. Plant Cell Rep ,2009, 28:1289-1299.
- [13] 杨一平,王述礼,曾士余,等. 杨树花粉发育途径及某些因素的影响[J]. 林业科学,1980,16(4):257-263.
- [14] Golandam S, Ebrahimzadeh H. Changes of antioxidant enzyme activities and isoenzyme profiles in vitro shoot formation in saffron (*Crocus sativus* L.)[J].Acta Biologica Hungarica, 2010, 61(1):73-89.
- [15] 张朝军,李付广,张玲.植物体细胞胚胎发生机理的研究进展[J]. 棉花学报,2008,20(2):141-147.
- [16] 祁金涛,曹君迈.植物组织培养过程中细胞生理变化与形态建成的关系[J]. 安徽农业科学, 2009,37(11):4905-4907.
- [17] 张志良,瞿伟菁,李小方.植物生理学实验指导(第4版)[M]. 北京:高等教育出版社,2010:1.
- [18] Sharifi G, Ebrahimzadeh H. Changes of antioxidant enzyme activities and isoenzyme profiles *in vitro* shoot formation in saffron (*Crocus sativus* L.)[J]. Acta Biol Hung, 2010,61(1):73-89.
- [19] Vatankhah E, Niknam V, Ebrahimzadeh H. Activity of antioxidant enzyme during *in vitro* organogenesis in *Crocus sativus*[J]. Biol Plantarum, 2010, 54: 509-514.
- [20] Meratan A A, Ghaffari S M, Niknam V. *In vitro* organogenesis and antioxidant enzymes activity in *Acanthophyllum sordidum*[J]. Biol Plantarum,2009,53:5-10.