

# 低温预处理对刺梨花药培养小孢子发育的影响

张绿萍<sup>1 2</sup> 陈红<sup>2\*</sup>

(1. 贵州省果树科学研究所, 贵州 贵阳 550006; 2. 贵州大学 喀斯特山地果树资源研究所, 贵州 贵阳 550025)

**摘要:**为明确低温预处理对刺梨花药离体培养过程中小孢子发育及愈伤组织诱导率的影响,进行低温预处理试验,结果表明:离体培养条件下,刺梨雄核存在3条发育途径,即A-V途径、A-G途径和B途径,以A途径为主;随着培养时间的增加,小孢子逐渐退化,低温预处理3d可在一定程度上延缓刺梨小孢子退化,提早雄核发育,并增加参与雄核发育小孢子数量,提高花药愈伤组织诱导率。

**关键词:**刺梨;花药离体培养;低温预处理;小孢子;发育途径

中图分类号:S661.2 文献标识码:A 文章编号:1000-2286(2010)01-0061-06

## The Effect of Cold Pretreatment on the Development of Microspores During in Vitro Culture of *Rose roxburghii* Tratt cv. Anther

ZHANG Lv-ping<sup>1 2</sup>, CHEN Hong<sup>2\*</sup>

(1. Pomology Research Institute of Guizhou Province, Guiyang 550006, China; 2. Research Institute for Fruit Resources of Karst Mountain Region of Guizhou University, Guiyang 550025, China)

**Abstract:** A cold pretreatment experiment was carried out on *Rose roxburghii* Tratt cv. anther culture to study the effect of cold pretreatment on the development of microspores during *Rose roxburghii* Tratt cv. anther culture in vitro. The results indicated that: three division ways existed in androgenesis of *Rose roxburghii* Tratt cv. anther culture, namely pathway A-V, pathway A-G and pathway B. And pathway A was the predominant way. Along with prologation of the culture time, degeneration happened with some microspores. Cold pretreatment for 3 d could delay the degeneration, and enhance the ratio of microspores participated in androgenesis. Cold pretreatment for 3 d increased callus induction frequency of *Rose roxburghii* Tratt cv. anther.

**Key words:** *Rose roxburghii* Tratt cv.; anther culture; cold pretreatment; microspore; developmental pathway

刺梨 (*Rosa roxburghii*) 是蔷薇科新兴水果,富含 Vc,每 100 g 鲜果 Vc 含量高达 2 054 ~ 2 728 mg, 誉为 Vc 之王<sup>[1]</sup>,具有很高的营养和药用价值<sup>[2-3]</sup>。本项目的其他相关实验表明,在刺梨花药培养中,花粉愈伤组织诱导率低,甚至可能由于药壁药隔等体细胞愈伤组织的影响,而使刺梨花粉胚未能直接诱导。自从 Nitsch<sup>[4]</sup>发现,低温预处理可以明显提高毛叶蔓陀萝的花粉胚诱导率。研究者通常对实验材料进行各种预处理,以提高花药培养的诱导率。Seiki Sato 等<sup>[5]</sup>发现,低温预处理后处在单细胞晚期的小孢子百分率下降,具有两个大小相同的核的双细胞小孢子的比例增加,从而促进胚的诱导。本研究

收稿日期:2009-10-16 修回日期:2009-12-09

基金项目:贵州省科学技术基金项目(黔科合J字[2007]2054号)和贵州省省长基金项目(黔省专合字2007-18号)

作者简介:张绿萍(1982-),助理研究员,硕士,主要从事生物技术与果树遗传育种研究, E-mail: zlvping@163.com;

\* 通讯作者:陈红,副教授,博士, E-mail: chen96@yahoo.com.cn.

首次把低温预处理应用于刺梨花药培养,从显微结构入手,观察培养过程中小孢子雄核发育途径,并初步阐明低温预处理对刺梨花药培养过程中小孢子发育的影响,为今后刺梨花药培养诱导单倍体工作提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为 5 年生的贵农 1 号、2 号、5 号、6 号、7 号,定植于贵州大学试验农场,2007 年 5 月取小孢子处于单核期的新鲜花蕾,放于密封的聚乙烯薄膜袋中,直接接种或置于 4 °C 冰箱保存。

### 1.2 试验方法

1.2.1 接种方法 将花蕾用自来水冲洗干净,然后放入 1 g/L 的升汞中灭菌 10 ~ 12 min,用无菌水冲洗 3 ~ 4 次,用无菌纸吸干花蕾表面水分,在无菌条件下剥取花药。

1.2.2 培养条件 接种后的花药置于 (25 ± 2) °C,暗培养 30 d 后日光灯补充光照 12 h 条件下进行培养,诱导培养基是:1.0 mg/L MS + 6-BA + 2.0 mg/L NAA + 30 g/L 蔗糖 + 6 g/kg 琼脂。

1.2.3 低温预处理 剥取 4 °C 预处理 0, 3, 6, 9 d 的花药,接种在诱导培养基上,每三角瓶接种 30 粒花药,贵农 5 号每处理接种 25 瓶,其他基因型每处理接种 5 瓶,重复 3 次。

1.2.4 细胞学方法 接种后第 0, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 15 d 取 30 粒花药经卡诺氏固定液 ( $V_{乙醇}:V_{乙酸}=3:1$ ) 固定 12 ~ 24 h,转入体积分数  $\varphi$  (酒精) = 70% 置于 4 °C 保存,每个处理选取 20 枚花药,采用常规番红-固绿染色,石蜡切片,厚度 8  $\mu\text{m}$ ,Olympus 显微观察照相。

表 1 低温预处理对花药愈伤组织诱导的影响

Tab. 1 Effect of cold pretreatment on anther callus induction

| 基因型<br>Genotype         | 低温预处理/d<br>Cold pretreatment time | 愈伤组织诱导率 Callus induction frequency |                       |                       |                   |
|-------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|
|                         |                                   | 诱导率 1<br>Repetition 1              | 诱导率 2<br>Repetition 2 | 诱导率 3<br>Repetition 3 | 平均<br>Average     |
| 贵农 1 号<br>Guinong No. 1 | 0                                 | 46.11                              | 41.11                 | 36.67                 | 41.30 ± 4.72aAB   |
|                         | 3                                 | 63.33                              | 51.11                 | 44.44                 | 52.96 ± 9.60aA    |
|                         | 6                                 | 51.11                              | 27.78                 | 26.67                 | 35.19 ± 13.80abAB |
|                         | 9                                 | 32.22                              | 15.56                 | 13.33                 | 20.37 ± 10.32bB   |
| 贵农 2 号<br>Guinong No. 2 | 0                                 | 13.33                              | 11.11                 | 13.33                 | 12.59 ± 1.28bAB   |
|                         | 3                                 | 27.78                              | 16.67                 | 15.56                 | 20.00 ± 6.76aA    |
|                         | 6                                 | 6.67                               | 10.00                 | 7.78                  | 8.15 ± 1.70bcBC   |
|                         | 9                                 | 1.11                               | 2.22                  | 3.33                  | 2.22 ± 1.11cC     |
| 贵农 5 号<br>Guinong No. 5 | 0                                 | 44.44                              | 31.11                 | 28.89                 | 34.81 ± 8.41abAB  |
|                         | 3                                 | 54.44                              | 46.67                 | 41.11                 | 47.41 ± 6.70aA    |
|                         | 6                                 | 41.11                              | 24.44                 | 22.22                 | 29.26 ± 10.33bcAB |
|                         | 9                                 | 16.67                              | 16.67                 | 12.22                 | 15.19 ± 2.60cB    |
| 贵农 6 号<br>Guinong No. 6 | 0                                 | 22.78                              | 32.22                 | 34.44                 | 29.81 ± 2.79abAB  |
|                         | 3                                 | 35.56                              | 37.78                 | 41.11                 | 38.15 ± 6.19aA    |
|                         | 6                                 | 38.89                              | 22.22                 | 24.44                 | 28.52 ± 9.05abAB  |
|                         | 9                                 | 26.67                              | 17.78                 | 15.56                 | 20.00 ± 5.88bB    |
| 贵农 7 号<br>Guinong No. 7 | 0                                 | 35.56                              | 27.78                 | 23.33                 | 28.89 ± 6.19abAB  |
|                         | 3                                 | 42.22                              | 41.11                 | 35.56                 | 39.63 ± 3.57aA    |
|                         | 6                                 | 35.56                              | 18.89                 | 17.78                 | 25.56 ± 9.10bcAB  |
|                         | 9                                 | 18.89                              | 16.67                 | 11.11                 | 15.56 ± 4.01cB    |

1.2.5 统计方法 计算培养第 1 2 3 5 7 9 d 单核期小孢子的比率(单核期小孢子比率 = 单核期小孢子数目/视野中小孢子数 × 100%);统计第 1 2 3 5 7 9 11 15 d 小孢子退化率(小孢子退化率 = 退化小孢子数/视野中小孢子数 × 100%);统计培养第 5 7 d 小孢子雄核发育的途径及各途径所占比率,每枚花药观察 5~10 张切片,每张切片观察 5~8 个视野;接种 40 d 后统计愈伤组织诱导率(愈伤组织诱导率 = 产生愈伤组织的花药数/接种花药数 × 100%)。

## 2 结果与分析

### 2.1 低温预处理对刺梨花药愈伤组织诱导率的影响

由表 1 可知:低温预处理可提高愈伤组织诱导率,参试的 5 种基因型随着低温预处理的天数增加,出愈率均呈现先升后降的趋势,且最佳低温预处理时间一致,均在预处理 3 d 时诱导率达到最高值,各基因型分别为 52.96% 20.00% 47.41% 29.81% 39.63%。但各基因型随低温预处理天数的变化,愈伤组织诱导率增加或减少的幅度有一定的差异。因此,低温预处理可以提高愈伤组织诱导率,但存在基因型差异。

### 2.2 雄核发育途径

雄核发育途径见图 1(图 1-A~图 1-R)。接种前的花药内少数小孢子处于四分体时期[图 1-A],大多数处于单核期,有的处于单核中期[图 1-B],有的处于单核晚期[图 1-C]。花药离体培养 3 d 后,少数小孢子开始第一次分裂,二核花粉形成;7 d 后一部分小孢子处于多核或多细胞状态,9 d 后启动分裂的多数小孢子处于多核或多细胞状态。刺梨小孢子启动分裂的方式有以下几种:

2.2.1 A 途径 小孢子第一次分裂为不均等分裂,形成 1 个营养核和 1 个生殖核[图 1-D],营养核体积较大,而生殖核体积偏小,且靠近小孢子内壁,随后进行第二次分裂,出现以下两种途径:

A-V 途径。营养核连续分裂,形成三核花粉[图 1-E],有的细胞核分裂后,伴随着形成新的细胞壁,进一步分裂形成多核花粉[图 1-F]。A-V 途径的细胞核均匀地分布在小孢子内,体积较大,排列不紧密,呈游离状。

A-G 途径。生殖核连续分裂,形成三核花粉[图 1-H],也有部分小孢子随之产生新的细胞壁[图 1-G],形成多细胞团[图 1-I],进一步分裂形成多核花粉[图 1-J]。A-G 途径的细胞核小,数量多,排列紧密,并紧贴小孢子内壁,一般由小孢子内壁一段向中心发展,以至达到一定数目的细胞核后,小孢子另一端仍可见空隙存在。

2.2.2 B 途径 小孢子第一次分裂为均等分裂,形成两个大小相近的细胞核[图 1-K],有的细胞核分裂后,伴随着新细胞壁形成 2 个细胞[图 1-L],再次分裂形成四核花粉[图 1-M],继续分裂,形成多核花粉[图 1-N]或多细胞团[图 1-O]。

表 2 低温预处理对贵农 5 号刺梨雄核发育途径的影响

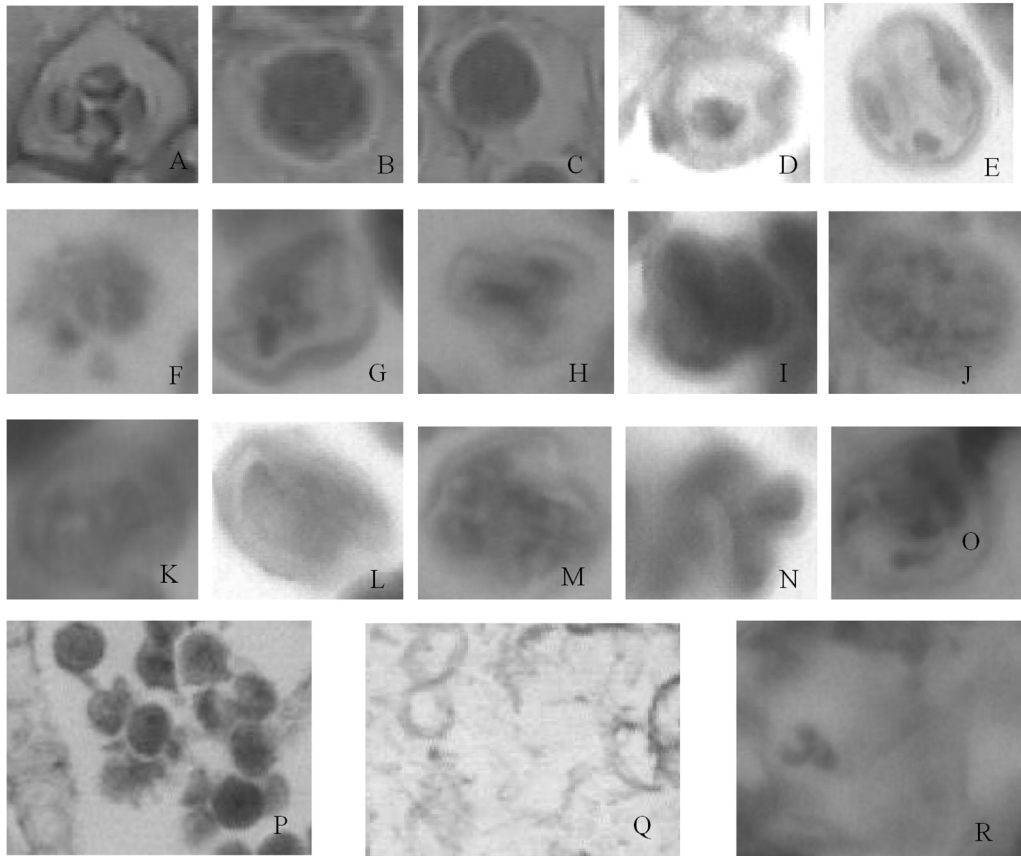
Tab.2 Effect of cold pretreatment on androgenesis pathway of *Rose roxburghii* Tratt cv.

| 处理                                 | A-途径      | B-途径      |
|------------------------------------|-----------|-----------|
| Pretreatment                       | A-pathway | B-pathway |
| 对照 Control                         | 3.84% B   | 2.58% B   |
| 低温预处理 3 d<br>Cold pretreatment 3 d | 5.67% A   | 4.02% A   |

由表 2 可知,刺梨花药培养中雄核发育以 A-途径为主;低温预处理能显著的增加参与 A-途径和 B-途径雄核发育的小孢子比率,但 B-途径启动雄核发育小孢子增加比率高于 A-途径的增加比率,为 55.81%。

### 2.3 低温预处理对刺梨单核期小孢子比率的影响

由图 2 可知,单核期小孢子的比率不断下降,对照随着培养时间的延长,呈直线下降;低温预处理 3 d,预处理期间单核期小孢子比率有所下降;接种培养 0~3 d 单核期小孢子比率变化平缓,而后急剧下降;采用低温预处理的花药 0~3 d 其单核期小孢子比率变化比对照要平缓,而 3~7 d 下降幅度比对照大,这可能是因为低温预处理有利于更多的小孢子启动雄核发育,第 5 7 d 已经有相当一部分开始分裂,形成二核花粉;7~9 d 对照的下降幅度大于低温预处理的下降幅度,这可能由于该时期对照退化的小孢子远大于低温预处理退化的小孢子。



A. 四分体细胞(×800);B. 单核中期细胞(×800);C. 单核晚期细胞(×800);D. 小孢子不均等分裂形成 1 个营养核和生殖核(×800);E. 不均等分裂形成 2 个营养核和 1 个生殖核(×800);F. 多个营养核和 1 个生殖核的多核花粉(×800);G. 不均等分裂形成 1 个营养核和 2 个生殖核(×800);H. 小孢子分裂形成 3 细胞(×800);I. 不均等分裂形成多细胞团(×800);J. 1 个营养核和多个生殖核的多核花粉(×800);K. 均等分裂形成两个核(×800);L. 小孢子均等分裂形成两个细胞(×800);M. 小孢子均等分裂形成四核花粉(×800);N. 小孢子均等分裂形成多细胞团(×800);O. 均等分裂形成的多核花粉(×800);P. 仍处于单核期的小孢子(×200);Q. 空瘪退化的小孢子细胞(×200);R. 培养后期解体的小孢子(×800)。

A. tetracytes(×800);B - C. uninucleate stage cell(×800);D. one vegetative nucleus and one reproductive nucleus from microspore asymmetric division(×800);E. two vegetative nucleus and one reproductive nucleus from microspore asymmetric division(×800);F. multinucleate pollen with many vegetative nucleus and one reproductive nucleus(×800);G. one vegetative nucleus and two reproductive nucleus from microspore asymmetric division(×800);H. three cells from microspore asymmetric division(×800);I. multi-cellular from asymmetric division(×800);J. multinucleate pollen with one vegetative nucleus and many reproductive nucleus(×800);K. two equal-nucleus from microspore equational division(×800);L. two equal-cells from microspore equational division(×800);M. four-nucleate pollen from microspore equational division(×800);N. multi-cellular from equational division(×800);O. multinucleate pollen from equational division(×800);P. uninucleate stage microspore(×200);Q. degenerate microspore(×200);R. disassembled polynuclear pollen cell(×800).

图 1 刺梨小孢子发育途径

Fig. 1 The developmental pathways of androgenesis

2.4 低温预处理对刺梨小孢子退化的影响

离体培养后,发现有的小孢子细胞质变稀薄,细胞核解体,形成空瘪的花粉[图 1 - P],培养 20 d 后,仍有小孢子处于单核期[图 1 - Q],这些小孢子已经退化,不能进一步发育成愈伤组织或胚状体,同时可以观察到脱分化的多核花粉有些中途停止发育而解体[图 1 - R]。

由图 3 可知,随着培养时间的增加,小孢子逐渐退化,在 0 ~ 7 d 退化比较缓慢,而后退化的比例急剧增加,培养 15 d 对照和低温预处理的小孢子退化率分别为 66.34% 和 48.58%。低温预处理小孢子

的退化趋势和对照基本一致,但比对照低,且平缓很多,尤其是接种后的 0 ~ 3 d 这样就使更多的小孢子有机会参与雄核发育。

### 3 讨论

#### 3.1 刺梨小孢子脱分化和启动发育的特点

在离体条件下,由于外界环境的改变,小孢子的首次分裂出现均等分裂和不均等分裂<sup>[6]</sup>。小麦花药培养中,主要由小孢子的营养核分裂形成胚状体或愈伤组织,少数认为由单核小孢子均等分裂直接产生<sup>[7]</sup>。萝卜小孢子的通过均等分裂形成胚状体<sup>[8]</sup>。茄子<sup>[9]</sup>、番茄<sup>[10]</sup>、棉花<sup>[11]</sup>,甘蓝型油菜<sup>[12]</sup>等小孢子离体培养中,观察到均等分裂和不均等分裂同时存在。刺梨花药离体培养,小孢子也同时存在 A - 途径(A - V 途径、A - G

途径)和 B - 途径的分裂,这说明刺梨小孢子脱分化启动可发生在单核期至双核早期。此外两种分裂方式所占的比例存在一定的差异,以 A - 途径为主。本实验认为愈伤组织由哪一种方式产生,与小孢子接种时的发育时期有关。如单核早期接种,此时的小孢子脱分化将均等分裂形成两个等核细胞;如果在单核晚期接种,正常分裂的物质已储备,不均等分裂产生一个营养核和一个生殖核,外界刺激只能影响到营养核和生殖核是否发生脱分化。小孢子形成多细胞团后继续分裂形成愈伤组织,能否通过直接培养游离小孢子,或如同小麦<sup>[13]</sup>在游离小孢子培养的漂浮培养基中加入未成熟子房直接形成胚状体有待于进一步研究。

#### 3.2 低温预处理的作用及其机理

对适时取材的离体外植体进行低温处理,可以有效地打断小孢子预定的配子体发育途径,启动小孢子的孢子体发育途径,大大提高了小孢子愈伤或胚胎的发生频率<sup>[5,8,10,16-17]</sup>。王亦菲<sup>[18]</sup>报道,油菜花药以 4 °C 预处理 1 ~ 2 d 对脱分化启动最有利,时间过长小孢子活力降低;花蕾采集后马上进行培养,小孢子活力虽高,但脱分化频率很低,其可能的作用机理,目前认为主要表现在四个方面:①引起花药内激素、mRNA、糖类、蛋白质含量发生变化,如 ABA 含量升高、糖类降解、特异蛋白质产生等,从而阻断了花粉原来的发育方向,使其由配子体的发育途径转向孢子体的发育途径,从而在培养过程中表现为花药反应频率升高。②引起小孢子的孤立化,药壁细胞核绒毡层细胞在预处理过程中逐渐退化解体。③改变纺锤丝的轴向,破坏纺锤丝的微管蛋白从而阻止纺锤丝的形成,改变花粉第一次有丝分裂的轴向,正常不对称的有丝分裂被破坏而进行对称分裂,形成两个均等的细胞,导致脱分化过程的发生<sup>[19]</sup>;Hu T C<sup>[20]</sup>发现低温预处理使营养核处于 G<sub>1</sub> 期直到去掉诱导培养基,该研究观察到低温预处理使参与雄核发育的小孢子增加,其中 B - 途径增加比率高于 A - 途径。④在一定程度上抑制花药离体后小孢子的衰败,使小孢子存活的时间延长,从而有较多的小孢子启动雄核发育,因此可认为低温预处理对小孢子雄

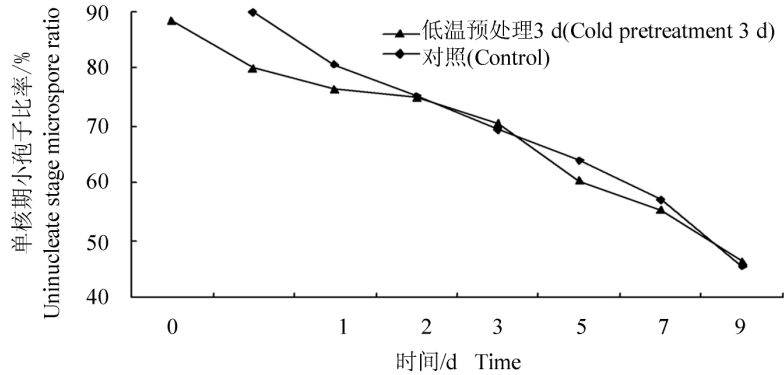


图 2 低温预处理对刺梨单核期小孢子比率的影响

Fig. 2 Effect of cold pretreatment on uninucleate stage microspore ratio of *Rose roxburghil* Tratt cv.

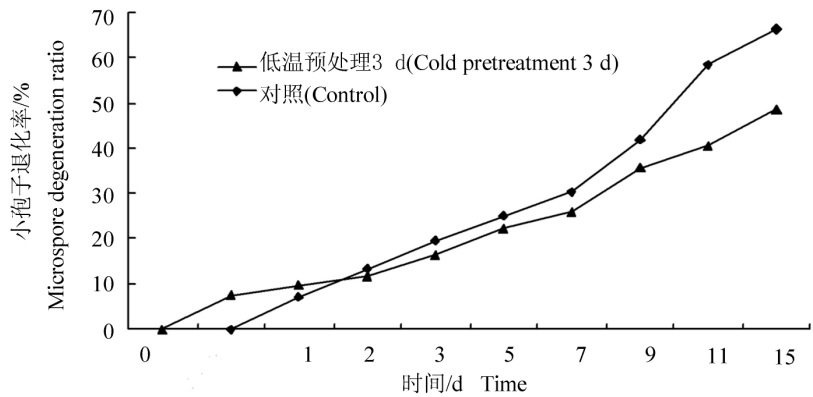


图 3 低温预处理对刺梨小孢子退化的影响

Fig. 3 Effect of cold pretreatment on microspore degeneration of *Rose roxburghil* Tratt cv.

核发育的影响是至关重要的。这表明低温预处理对小孢子脱分化形成愈伤组织或胚状体过程中起重要作用。但这种作用对刺梨游离小孢子的影响有多大,能否与其他预处理有效的结合,能与什么样的培养条件互相作用而促进小孢子脱分化形成胚状体,尚待于进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 涂国云, 刘利花. 刺梨的营养成分及保健药用[J]. 中国农副特产, 2006(1):68-70.
- [2] 戴支凯, 余丽梅, 杨小生. 刺梨提取物 (CL) 抗肿瘤作用[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(14):1453-1457.
- [3] 戴支凯, 余丽梅. 刺梨的药理作用[J]. 中国药房, 2007, 21:1668-1669.
- [4] Nitsch C, Norreel B. Effect d'um choc technique sur pepouvoir embrygnose du pollen de *Dature innoxia* cultivate dansl' isole del' anthere [J]. C R Acad Scid Pairs, 1973, 27(6):303-306.
- [5] Seiki Sato, Norio Katoh. Effect of low temperature pretreatment buds (*Brassica campestris*) on isolated microspore culture [J]. Breeding Science, 2002, 52(1):23-26.
- [6] Pechan Paul M, Smykal Petr. Affecting the fate of the male gametophyte [J]. Physiologia Plantarum, 2001, 111(1):1-8.
- [6] 周广栋, 王秀峰. 番茄花药离体培养中低温预处理对小孢子发育的影响[J]. 中国农学通报, 2005, 21(2):192-195.
- [7] Maraschin S F, Priester W, Spaink H P, et al. An example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective [J]. J Exp Bot, 2005, 56(417):1711-1726.
- [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):254-257.
- [9] 佟曦然, 顾淑荣, 朱至清, 等. 茄子游离小孢子培养中小孢子发育的细胞学观察[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(5):861-866.
- [10] 周广栋, 王秀峰. 番茄花药离体培养中低温预处理对小孢子发育的影响[J]. 中国农学通报, 2005, 21(2):192-195.
- [11] 李秀兰. 棉花花药培养小孢子发育的细胞学观察[J]. 作物学报, 1987, 4(1):87-88.
- [12] 余凤群, 傅爱汝, 刘后利. 甘蓝型油菜小孢子胚状体发生的细胞学观察[J]. 武汉植物学研究, 1998, 16(3):197-201.
- [13] 王宏芝. 小麦游离小孢子培养研究进展[J]. 麦类作物学报, 2002, 22(1):91-94.
- [14] 李春红, 胡道芬. 低温处理对玉米花药培养的影响[J]. 植物学通报, 1992, 9(4):43-45.
- [15] 王春霞, 廖玉才, 张杰. 低温和诱导时间对小麦小孢子培养的影响[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(2):167-170.
- [16] Touraev A, Stoeger E, Vicente O, et al. Stress induce microspore embryogenesis from tobacco microspores: An optimized system for molecular studies [J]. Plant Cell Rep, 1996, 15:561-565.
- [17] Touraev A, Vicente O, Heberle Bors E. Initiation of microspore embryogenesis by stress [J]. Trends Plant Sci, 1997, 8:297-302.
- [18] 王亦菲, 陆瑞菊, 孙月方. 大田油菜游离小孢子培养高频率胚状体诱导及植株再生[J]. 中国农业通报, 2002, 18(1):20-23.
- [19] Nitta T, Takahata Y, Kaizuma N. Scanning electron microscopy of microspore embryogenesis in *Brassica* spp. [J]. Plant Cell Reports, 1997, 16(6):406-410.
- [20] Hu T C, Kasha K J. A cytological study of pretreatments used to improve isolated microspore cultures of wheat (*Triticum awstivum* L.) cv. Chris [J]. Ottawa, 1999, 42(30):432-411.