

## 蚕豆离体培养繁殖植株对高温及紫外线胁迫的反应

陆瑞菊<sup>1,2</sup> 屈巧玲<sup>3</sup> 王亦菲<sup>1,2</sup> 孙月芳<sup>1,2</sup> 胡润田<sup>3</sup> 康诗腾<sup>3</sup> 许凌波<sup>3</sup> 黄剑华<sup>1,2</sup>

(1. 上海市农业科学院生物技术研究所, 上海 201106; 2. 上海市农业遗传育种重点实验室, 上海 201106; 3. 上海市文来中学, 上海 201101)

**摘要:**将蚕豆种子无菌苗(对照)和离体繁殖3代无菌苗作为供试材料,观察它们在高温和紫外线胁迫下的生长和根尖细胞有丝分裂的情况。试验结果表明,供试植株在高温和紫外线胁迫下在外观上表现叶片枯黄、植株死亡,在染色体水平上发生了畸变,紫外线胁迫造成的畸变程度大于高温胁迫,3代克隆苗的畸变程度大于种子苗。

**关键词:**蚕豆;快繁;高温和紫外线胁迫;染色体畸变

RESPONSE OF *in vitro* PROPAGATED PLANTLETS OF *Vicia faba* TO  
HIGH TEMPERATURE AND ULTRAVIOLET STRESS

LU Rui-ju<sup>1,2</sup> QU Qiao-ling<sup>3</sup> WANG Yi-fei<sup>1,2</sup> SUN Yue-fang<sup>1,2</sup> HU Run-tian<sup>3</sup>  
KANG Shi-teng<sup>3</sup> XU Ling-bo<sup>3</sup> HUANG Jian-hua<sup>1,2</sup>

(1. Biotech Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106; 2. Shanghai Key Lab. of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201106; 3. Shanghai Wenlai Middle School, Shanghai 201101)

**Abstract:** Using propagated-plantlets from the 3<sup>rd</sup> generation of *Vicia faba* as materials, the effects of heat and ultraviolet stress on growth and the mitosis of root-tip cells of plantlets were studied. The results showed that the frequency of the plantlets with yellow leaf and dead plantlets and chromosomal aberrations were increased by use of both stress compared with CK, the effects of ultraviolet stress were stronger than that of heat stress. The frequency of chromosomal aberrations of plantlets from the 3<sup>rd</sup> generation was higher than that of plantlets germinated from seeds.

**Key words:** *Vicia faba*; rapid propagation; heat and ultraviolet stress; chromosomal aberration

快繁技术已在植物上得到广泛应用,研究离体培养繁殖后代的遗传稳定性和对生长逆境的适应性,将有助于对植物克隆后代的抗逆性及遗传稳定性评估,无疑具有重要的学术意义和应用价值。蚕豆是一种敏感植物,外界环境条件的变化对其生长极易造成明显影响<sup>[1-3]</sup>。由于蚕豆染色体大而数量少,细胞分生组织增殖周期短,大部分时间是对诱变剂的敏感时期,易产生微核及染色体畸变<sup>[4,5]</sup>,因而是一种用于监测环境污染及重金属污染的指示植物<sup>[6-8]</sup>。本研究以蚕豆离体培养繁殖群体为供试材料,着重研究了克隆后代在个体和染色体水平上对逆境的反应。

## 1 材料与方法

### 1.1 无菌种子苗的获取

选择饱满、均匀的蚕豆种子,置70%的酒精中1min,再用饱和的漂白粉溶液浸泡10min,然后用无菌水冲洗5~6次。放在铺有无菌纱布的瓷盘中,倒入添加5mg/L GA<sub>3</sub>的无菌水浸泡12h,待种子完全吸胀后,用饱和的漂白粉溶液浸泡10min,再用无菌水冲洗5~6次,接种到无激素的MS培养基上。在23℃±1℃、光强1800lx、日光照12h/黑暗12h的光周期下培养。当芽长出2~3cm时,进行逆境处理。

收稿日期:2006-02-15

作者简介:陆瑞菊(1962-),上海人,研究员,主要从事作物组织/小孢子培养研究。Tel: 021 62208660-3201; Email: cs7@saas.sh.cn。黄剑华为通讯作者;Tel: 021 62201032; Email: sw1@saas.sh.cn

## 1.2 离体繁殖3代群体的构建

种子的消毒及发芽步骤同上。当芽长至2~3cm时,将芽切下转移至增殖培养基上,连续快繁3代。以MS培养基为基本培养基,发芽培养基中添加30g/L蔗糖、6.0g/L琼脂,pH 5.8;增殖培养基则在发芽培养基的基础上添加0.5mg/L 6-BA(6-苄氨基嘌呤)、0.01mg/L NAA(萘乙酸)、0.5mg/L MET(矮壮素)、800mg/L CH(水解干酪素)、0.5g/L AC(活性炭);生根培养基中则添加1.0mg/L NAA、0.5g/L AC。121℃高温高压灭菌。

## 1.3 逆境设置

高温逆境在光照培养箱中进行,45℃ 1h和2h。紫外线逆境在超净工作台上进行,培养瓶的盖子打开,将苗暴露在20W的紫外灯下,高度60cm,照射时间设1h和2h。逆境处理结束后,将无菌苗接种至无激素的恢复培养基培养,21d后统计植株的枯黄率和死亡率,植株上有一片叶子发生枯黄即为枯黄植株。存活的植株转移到生根培养基生根。

## 1.4 根尖细胞染色体观察和畸变率统计

当根长至1.5~2.0cm时,上午11:30—12:30剪根,置于0.1%的秋水仙碱溶液中13℃处理2h,然后用卡诺氏固定液(无水酒精:冰醋酸3:1)固定24h。制片前用1mol/L的盐酸于60℃解离20min,醋酸洋红染色,在45%的冰醋酸中压片,显微镜下观察计数。只统计有丝分裂中期分裂相中出现染色体畸变(染色体断片)的细胞占中期分裂相的百分率。每个处理统计10株植株,每1株至少统计50个染色体分裂相。

## 2 结果

### 2.1 蚕豆离体繁殖3代群体的长势

蚕豆种子发芽后,在增殖培养基上培养,30d继代1次,繁殖系数为2~3。快繁3代后,从表型看克隆苗茎秆粗壮,叶色浓绿,长势良好,与种子苗没有差异。(图1)。

### 2.2 逆境处理对种子苗及离体繁殖苗的生长影响

无论是种子苗还是离体繁殖苗,高温(45℃)和紫外线处理对植株的生长均有很大的影响,表现在叶片枯黄、植株死亡。从表1可以看出,45℃处理1h时,种子苗的死亡率和枯黄率分别为5.0%和1.7%,而克隆苗分别为15.0%和6.7%;紫外线照射处理1h时,种子苗的死亡率和枯黄率分别为14.5%和11.3%,而克隆苗分别达29.0%和32.3%;逆境处理时间的越长,对植株生长的影响越大;但种子苗对逆境的忍耐力明



图1 克隆3代苗(左)和种子苗(右)  
Fig.1 plantlets from 3rd generation of clone (left) and seeds germination (right)

显好于克隆苗,在同等逆境条件下克隆苗的死亡率和枯黄率是种子苗的2~3倍,而处理前克隆苗与种子苗在表型上难于区别(图1)。紫外线照射1~2h对植株造成的伤害大于45℃处理,当紫外线照射达2h时,克隆苗的死亡率达43.1%,枯黄率达到51.7%(图2)。



图2 克隆苗对逆境的反应  
Fig.2 response of clonic plantlets to stress  
左:45℃ 2h;右:紫外线 2h  
left: heat stress (45℃ 2h); right: ultraviolet stress(2h)

### 2.3 逆境处理对种子苗及离体繁殖苗染色体畸变率的影响

逆境处理能使蚕豆染色体出现断裂现象,表现在有丝分裂中期分裂相中有很多断片产生。未经逆境处理的对照中,种子苗的染色体畸变率为3.0%,而克隆苗为7.6%,绝大部分分裂相正常(图3-1);45℃处理1h,种子苗和克隆苗的染色体畸变率分别为9.9%和19.9%,处理2h,为17.6%和26.9%;紫外线照射1h,种子苗和克隆苗的染色体畸变率分别为19.7%和29.4%,照射2h为27.0%和49.3%。表明植株在遇到逆境时不仅在外观上表现出叶片枯黄、植株死亡,更是在染色体水平上发生了畸变,克隆苗的畸变程度远远大于种子苗。另外,在镜检时发现,逆境处理的克隆苗中,有四倍体现象发生(图3-2),且紫外线照射的多

表1 高温和紫外线胁迫对种子苗及克隆苗生长的影响

Table 1 Effects of heat and ultraviolet stress on growth of plantlets from seed germination and clone

材料 material	处理 treatment	处理数 plantlets	死亡数 No. of dead plantlets	死亡率 Freq. of dead plantlets (%)	枯黄植株数 No. of plantlets with yellow leaves	枯黄率 Freq. of plantlets with yellow leaves (%)
种子苗 plantlets from seeds germination	45℃ 1h	60	3	5.0	1	1.7
	45℃ 2h	60	5	8.3	3	5.0
	UV 1h	62	9	14.5	7	11.3
	UV 2h	60	12	20.0	15	25.0
克隆苗 plantlets from 3 <sup>rd</sup> generation of clone	45℃ 1h	60	9	15.0	4	6.7
	45℃ 2h	60	13	21.7	6	10.0
	UV 1h	62	18	29.0	20	32.3
	UV 2h	58	25	43.1	30	51.7

表2 高温和紫外线胁迫对幼苗根尖细胞有丝分裂中期分裂相中染色体畸变的影响

Table 2 Effects of heat and ultraviolet stress on chromosomal aberrations in the root-tip cell of plantlets

材料 material	处理 treatment	观察细胞数 cells	出现断片的细胞数 No. of chromosomal aberrations	染色体畸变率(%) Freq. of chromosomal aberrations
种子苗 plants from seeds germination	对照 CK	501	15	3.0
	45℃ 1h	503	50	9.9
	45℃ 2h	510	90	17.6
	UV 1h	507	100	19.7
	UV 2h	504	136	27.0
克隆苗 plants from 3 <sup>rd</sup> generation of clone	对照 CK	512	39	7.6
	45℃ 1h	508	101	19.9
	45℃ 2h	501	135	26.9
	UV 1h	520	153	29.4
	UV 2h	511	252	49.3

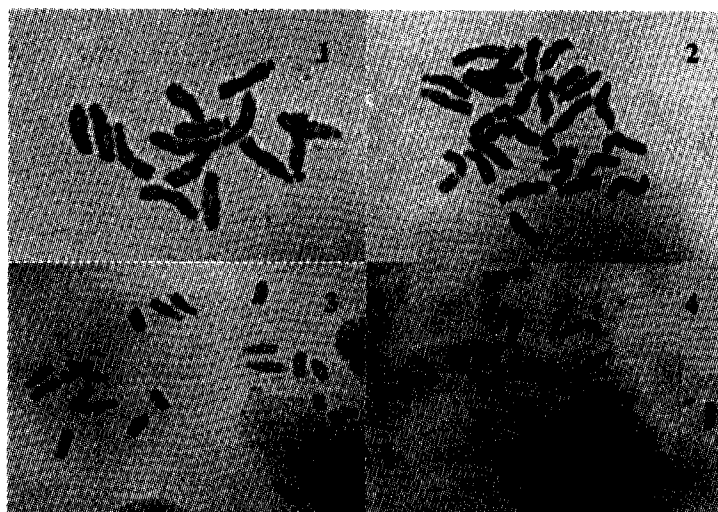


图3 逆境处理对根尖染色体的影响

Fig. 3 Chromosomes response of plantlets to stress

1:染色体正常形态(2n = 12);2:逆境诱发的四倍体;3:逆境诱发的染色体断片;4:逆境诱发的大量染色体断片

1: Normal chromosomes (2n = 12); 2: Chromosomes doubling induced from the stress;

3: Chromosomes breaks and their fragments induced from the stress; 4: Chromosomes pulverization induced from the stress

于高温处理的;无论是克隆苗还是种子苗,在紫外线照射的处理中,同一分裂相中断片的数量要多于 45℃ 高温处理的;随着逆境处理时间的延长,中期分裂相中出现染色体断片的数量也随着增加(图 3-3、4)。

### 3 讨论

在正常培养条件下,蚕豆种子苗在离体繁殖 3 代后,克隆苗与种子苗在表型上长势相当,难于区别,有丝分裂过程中出现染色体断片的频率不高。种子苗对高温、紫外线胁迫的耐受力明显好于克隆苗。在同等条件下,克隆苗的死亡率是种子苗的 2~3 倍。植株在遇到高温、紫外线胁迫时不仅在外观上表现出叶片枯黄、植株死亡,染色体水平也发生了畸变,表现在有丝分裂中期分裂相中有很多断片产生。高温处理和紫外线照射的时间越长,有丝分裂过程中出现染色体断片的频率就越高。紫外线照射胁迫对植株造成的伤害大于高温胁迫,紫外线照射达到 2h 时,克隆苗分裂相中出现断片的频率接近 50%,克隆苗的变异程度要远远大于种子苗。

利用蚕豆(*Vicia faba*)根尖微核技术监测环境污染和检测危险化学品已得到广泛的运用,这种方法灵敏性高、可靠性强、简便易操作,因此在世界范围内被广泛应用<sup>[9, 10]</sup>。将微核技术与快繁技术结合起来,用于检测克隆后代对逆境的适应度,尚未见报道。大量的研究表明,染色体畸变是产生微核的主要来源,微核的产生与染色体畸变有很大的相关性<sup>[11]</sup>,呈直线回归<sup>[4]</sup>。由于微核数量多,有大有小,统计较为困难,而有丝分裂中期分裂相中染色体畸变较为直观,统计时

不易发生重复或遗漏。本研究表明以有丝分裂中期分裂相中染色体的畸变率来评估植株受到伤害的程度是可行的。染色体水平上的畸变又将引发基因水平上的变化,而这种变化将会导致相关性状发生变异。

蚕豆克隆后代经有性繁殖后对逆境的反应以及其他植物克隆后代对逆境的反应值得进一步研究。

### 参考文献:

(上接第 530 页)

- [15] 唐 桦,姜文胜,等.光肩星天牛受辐雌成虫的不育性初步研究.中国森林病虫,2001,(2):10~11
- [16] Lu Daguang, Kang Wen, et al. The feasibility of control of *Anoplophora glabripennis* with sterile insect technique. 核农学报, 2001, 15(5): 302~307
- [17] 张宏世,刘占海.光肩星天牛重要生物学特性及防治适期研究.内蒙古林业科技,2002:15~20
- [18] 贺 萍,黄竟芳.光肩星天牛的人工饲养.北京林业大学学报,1992,21(2):61~67
- [19] 赵 军,小仓信夫,矶也昌弘.光肩星天牛的人工饲养(I).北京林业大学学报,1999,21(4):58~61
- [20] 赵 军,小仓信夫,矶也昌弘.光肩星天牛的人工饲养(II).北京林业大学学报,1999,21(4):62~66
- [21] Melody A. Keena, et al. Synthesis Report on Rearing Asian Longhorned Beetle. <http://www.uvm.edu/albeetle/research/RearingALB.pdf>
- [1] Tosserams M, A Visser, M Groen, et al. Combined effects of CO<sub>2</sub> concentration and enhanced UV-B radiation on faba bean. Plant Ecology, 2001, 154: 195~210
- [2] Gadallah M A A. Effects of proline and glycinebetaine on *Vicia faba* responses to salt stress. Biologia Plantarum, 1999, 42(2): 249~257
- [3] 蒋梅兰.用蚕豆根尖细胞微核技术研究发芽马铃薯的遗传毒理作用.浙江师大学报(自然科学版),2001,24(3):284~287
- [4] 沈光平.微核与染色体畸变的相关性.遗传,1985,7(1):15~17
- [5] 胡振东.蚕豆微核测定技术及其应用.淮北煤师院学报,2000,21(4):65~69
- [6] 钱晓薇.硫酸铝对蚕豆根尖细胞毒性效应的研究.浙江大学学报(农业与生命科学版),2003,29(4):413~418
- [7] 段昌群,王焕校.重金属对蚕豆遗传学毒理作用和对蚕豆根尖微核技术的探讨.植物学报,1995,37(1):14~24
- [8] Shahin S A, K H EI-Amoodi, Induction of numerical chromosome aberrations during DNA synthesis using the fungicides nimrod and rubigan-4 in root tips of *Vicia faba* L. Mutat Res, 1991, 261: 169~176
- [9] 王焕校,祖艳群.利用蚕豆根尖细胞微核监测滇池水质污染的研究.云南大学学报,1993,15:139~145
- [10] Degrassi F, M Rizzoni, Micronucleus test in *Vicia faba* root-tips to detect mutagen damage in fresh-water pollution. Mutat Res, 1982, 97: 19~33
- [11] 李 宏.亚硫酸氢钠诱发蚕豆根尖细胞有丝分裂异常性的研究.渝州大学学报(自然科学版)1997,14(4):1~7
- [22] Elvin W. Tilton and John H. Brower. Radiation Effects of Arthropods. in Preservation of Food by Ionizing Radiation, Edward S. Josephson and Martin S. Peterson Ed. Volume II, 1983, 7
- [23] Guy J. Hallman. Expanding Radiation Quarantine Treatments beyond Fruit Flies. Agricultural and Forest Entomology, 2000, 2: 85~95
- [24] Tilton E W, Burkholder W E, Cogburn R R. Effects of gamma radiation on *Trogoderma glabrum* and *Attagenus piceus*. J Econ Entomolo, 1966, 59: 944~948
- [25] Proverbs M D, Newton J R. Influence of gamma radiation on the development and fertility and fertility of conding moth, *Carpocapsa pomonella* (L.) (Lepodoptera: Olethreutidae). Canadian Journal of Zoology, 1962, 40: 401~420
- [26] Lester G E, Wolfenbarger D A. Comparisons of cobalt-60 gamma irradiation dose rates on grapefruit flavedo tissue and on Mexican fruit fly mortality. Journal of Food Protection, 1990, 53: 329~331