

小麦游离小孢子培养的研究

李光威¹, 兰素缺¹, 孙宝启²,

(1 河北省农林科学院粮油作物研究所, 河北 石家庄 050031;

2 中国农业大学 种子科学系, 北京 100094;)

摘要: 在游离小孢子培养过程中认为子房共培养可显著提高游离小孢子胚状体愈伤率和再生率, 子房共培养以 20 个子房为宜。低温子房共培养胚状体发生和愈伤率低, 但绿苗分化率较高, 施加 PAA、谷氨酰胺对游离小孢子形成的胚状体有促进作用。麦芽糖是游离小孢子培养最好的碳源, 以蔗糖、葡萄糖以及葡萄糖和果糖搭配作碳源均未获得胚状体。检查培养 3 d 后的小孢子活力发现, 唯有麦芽糖作碳源培养的小孢子有活力; 认为高浓度的蔗糖、葡萄糖以及葡萄糖加果糖对小孢子有毒害作用。当葡萄糖浓度达到 2.0 mmol/L 时 just 对小孢子有毒害作用且致死。当在麦芽糖培养基中培养 1 d 后加入高浓度的葡萄糖发现小孢子存有活力, 而且随着起始培养天数的增加活力也增加。对 Y77 品系来讲, 适宜小孢子培养的麦芽糖浓度为 0.12 mol/L。饥饿和热激(33℃)预处理对游离小孢子培养有促进胚状体和愈伤形成的作用。

关键词: 小麦; 游离小孢子培养; 诱导率

中图分类号: S512.103 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2001)01-0083-05

游离小孢子培养是在单细胞水平上获得纯系的培养方法, 较花药培养具有除去细胞壁及其他组织的干扰; 更有利于调节控制雄核发育的各种因子, 建立最佳培养体系, 大幅度的提高花粉植株的产量, 为遗传基础研究和育种工作提供丰富的材料。每个花药内含有成千上万小孢子, 易在短时间内获得大量群体, 并且该群体能匀质地接受多种物理或化学因子处理, 所以游离小孢子培养是研究基因突变和基因转移最有效的体系之一。游离小孢子培养技术仅在油菜和大白菜育种中得到应用, 而在麦类作物上仅大麦游离小孢子培养研究较深入。小麦游离小孢子培养是 1993 年 Tuveesson 等首次成功的进行了报道^[1], 近几年来取得了较大的进展, 但在许多技术环节上有待于进一步研究, Hu 等认为, 小麦小孢游离之前采用饥饿预处理有助于胚形成^[2]; Kyo 等在游离小孢子培养中采用高温预处理效果明显^[3]; Kohler 等(1985)采用子房共培养对大麦小孢子培养有促进作用; Scott 等发现麦芽糖能维持大麦小孢子培养, 其他糖则不能^[4]。本研究对小麦游离小孢子培养中的几种影响因素进行了研究, 以期建立小麦游离小孢子培养高频率的诱导体系奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

参试材料取自于中国农大昌平实验站, 170, Y77, 京双 16, 285 等为中国农业大学种子科

收稿日期: 1999-05-18

作者简介: 李光威(1965-), 男, 副研究员, 农学硕士, 主要从事组织培养和育种工作。

学系提供。

1.2 小孢子培养

取小麦花粉处于单核期的小麦穗子,用 10% 的次氯酸钠液消毒 10 min 后,取花药在培养基 A 中进行不同的预培养,然后将花药及其处理液用磁力棒搅拌,经 300 目网过筛,去除残片,然后再用搅拌器搅拌 4 次,离心后过滤(100 μm),直到悬液澄清为止,取出上清液。用或不用经过子房培养的培养基 B 稀释小孢子,血球计数板(XB—K—25)计数调整小孢子密度,用 FAD 检测活细胞数目及比例。将调整好浓度的小孢子在 50 mL 三角瓶中暗培养 30 d 观察胚状体数目。

1.3 培养基

培养基 A: 1.49 mg/mL KCl+ 0.12 mg/mL MgSO_4 + 0.11 mg/mL CaCl_2 + 0.14 mg/mL KH_2PO_4 + 54.7 mg/mL 甘露醇, pH 值 7.0; 培养基 B: A 培养基中碳源分别用蔗糖、葡萄糖以及葡萄糖加果糖替代。

1.4 统计方法

小孢子活力(%) = 活细胞数/总细胞数 \times 100

2 结果与分析

2.1 子房共培养及培养基中的糖源对培养效果的影响

由表 1 可知,子房共培养对胚状体发生率和分化率有促进作用。没有子房共培养的处理没有形成愈伤或胚状体,常温下加入 20 个子房的处理较加 10 个子房处理的胚状体数有所增加,低温处理子房虽然出愈和胚胎发生率低,但再生率较高,而且白化苗减少。A 培养基中无子房共培养的情况下加入 PAA 4 mg/L 有胚状体出现,在增加谷氨酰胺 500 mg/L,胚状体又有所提高。PAA 和谷氨酰胺有替代子房共培养的作用,推测子房共培养时,子房可能分泌出 PAA 或其类似物及某些氨基酸等一些营养物质和生长素,使小孢子有利于向胚胎发生的途径转化。低温预处理子房使胚状体发生率减少,但分化率有所增加。胚状体减少的原因可能与低温下子房分泌物减少有关。低温预处理子房以加入 20 个子房的处理胚状体最多。当子房共培养中加入 4 mg/L PAA 和谷氨酰胺后发现胚状体减少。当降低 PAA 至 2 mg/L 时,胚状体有所增加。说明在子房共培养的情况下,适当加入 PAA 有促进胚状体形成的作用。在 A 培养基中加上 2 mg/L PAA 和谷氨酰胺 500 mg/L 的培养方式下,我们分别以蔗糖、葡萄糖以及葡萄糖加果糖替代麦芽糖进行培养,结果都没有胚状体出现。因此初步认为麦芽糖为小孢子培养的唯一碳源。由图 1 研究发现,不同糖源处理 3 d 后唯有麦芽糖和甘露醇的处理小孢子有活力。当用麦芽糖处理不同天数后再加入葡萄糖(图 2)发现,麦芽糖处理 1 d 后加入高浓度的葡萄糖,小孢子有活力,而且随着麦芽糖处理天数的增加,活力也增加。表 2 研究发现,随着葡萄糖浓度增加小孢子活力降低,当浓度增加到 2.0 mmol/L 时小孢子无活力。这说明葡萄糖浓度大于 2.0 mmol/L 时,不仅可对游离小孢子产生毒害作用而且可以完全致死。由于葡萄糖浓度低于 2.0 mmol/L 时营养供应不足而使游离小孢子不能获得胚状体。

2.2 饥饿处理对出愈率的影响

表 1 不同的培养基以及子房共培养对出愈及分化的影响

| 培养基 | 子房共培养 | 处理 | 出愈(胚) 数 (> 0. 5 cm) | 再生株(绿/ 白) |
|------------------------------|-------|-------|--------------------------|------------|
| A | 0 | | 0 | 0 |
| | 10 | 常温 | 3 | 1/ 0 |
| | 20 | 常温 | 7 | 3/ 2 |
| A+ 4 mg/L PAA | 0 | | 3 | 2/ 1 |
| A+ 4 mg/L PAA+ 500 mg/L 谷氨酰胺 | 0 | | 6 | 3/ 0 |
| A | 10 | 4℃ 7d | 2 | 2/ 0 |
| | 20 | 4℃ 7d | 5 | 4/ 1 |
| A+ 4 mg/L PAA+ 500 mg/L 谷氨酰胺 | 20 | 4℃ 7d | 4 | 2/ 1 |
| A+ 2 mg/L PAA+ 500 mg/L 谷氨酰胺 | 20 | 4℃ 7d | 8 | 5/ 2 |
| B+ 2 mg/L PAA+ 500 mg/L 谷氨酰胺 | 20 | 4℃ 7d | 0 | 0 |

注: 2. 实验材料为农大 170。密度 1×10^5 , 5 mL 静止液体培养, 1 mL 小孢子液。

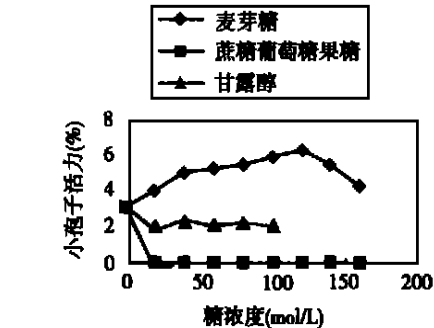


图 1 不同糖浓度的培养基培养 3 d 后小孢子活力(Y77)

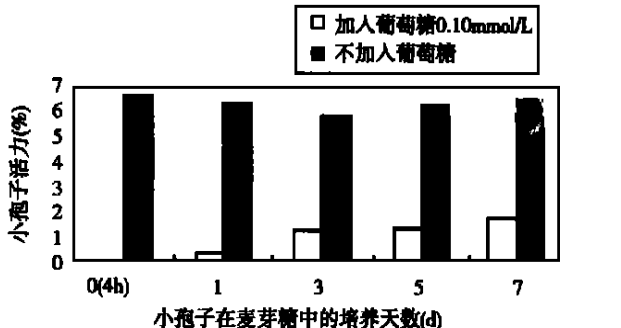


图 2 小孢子在麦芽糖中的培养天数(d) 麦芽糖(100mmol/ L) 培养基培养不同天数后 加入和不加入葡萄糖 1 d 后的小孢子活力 (Y77)

表 2 在不同浓度葡萄糖培养基中培养 3 d 后小孢子的活力(Y77)

| 葡萄糖浓度(mmol/ L) | 0 | 0. 01 | 0. 1 | 1. 0 | 2. 0 |
|-----------------|------|-------|------|------|------|
| 小孢子活力(%) | 2. 1 | 2. 0 | 1. 9 | 1. 4 | 0 |

表 3 饥饿处理对小孢子出愈率的影响(C17)

| 基因型 | 小孢子数/ 花药 | 饥饿处理 | 形成愈伤数(胚状体) (> 5mm) |
|-------|----------|------|---------------------|
| 京双 16 | 1680 | ck | 3 |
| | | 4℃ | 4 |
| | | 25℃ | 11 |
| | | 33℃ | 14 |
| 285 | 1730 | ck | 2 |
| | | 4℃ | 4 |
| | | 25℃ | 13 |
| | | 33℃ | 17 |

注: 密度 1×10^5 。

在许多报道中均有热激和饥饿处理对小孢子培养有促进作用。我们对此进行了试验(表 3)。由表 3 可看出, 无论是低温处理小孢子还是高温处理所形成的胚状体均较对照高, 而且随着培养温度的升高胚状体发生率也在提高。当温度达到 33℃时所形成的胚状体数最多。说明高温、饥饿处理对出愈率有明显的促进作用。

2. 3 不同接种密度对培养效果的影响

由表 4 可知, 小孢子密度大小对胚状体发生也有影响, 2×10^5 最高, 其次为 1×10^5 。当小孢子密度达到 3×10^5 时, 胚状体数有所下降。

表 4 小孢子不同的接种密度对出愈率的影响(170 C17)

| 小孢子密度 | 形成的愈伤数> 5mm(285/170) |
|-----------------|----------------------|
| 3×10^5 | 2/3 |
| 2×10^5 | 7/8 |
| 1×10^5 | 4/5 |

综上所述, 培养基中加入谷氨酰胺、PAA、低温预处理子房、饥饿高温胁迫处理均对出愈(胚胎)率和再生率有明显的促进作用。

3 讨论

小麦游离小孢子培养的研究国内报道很少。邢小黑等(1995)认为, 经过子房共培养可显著提高游离小孢子的胚状体发生率, 其原因是子房共培养期间, 子房分泌诸如 PAA 或其类似物等, 促使小孢子向着胚胎方向发育。本实验结果也表明, 子房共培养有类似于 PAA 的作用。PAA 是一种激素, 在基本盐溶液中稳定不分解, 可以忍受高压灭菌(Leuba, 1989), 其作用机理目前尚不清楚。Cho 等认为, PAA 在大麦花药中可使易培养的基因型在短期(少于 12 h)内产生乙烯, 而使整个培养过程乙烯总量下降。而 Morris 等则认为, PAA 具有调整细胞内 IAA 的运输和积累作用^[5]。Xu 等(1981)也认为, PAA 具有调节功能。总之, PAA 具有刺激胚状体及绿株形成的功能。另外, 在培养基中加入谷氨酰胺在小孢子培养过程中释放出高的有机氮, 也促使胚胎发育。

糖在游离小孢子培养中起着重要的作用。与花药培养不同的是, 只有麦芽糖才能形成胚状体。而在花药培养中蔗糖、麦芽糖、葡萄糖以及果糖作为糖源的培养基都能使花药培养形成愈伤, 只是多少而已。我们将游离出的小孢子分别培养在含有相同浓度的蔗糖、麦芽糖、果糖、葡萄糖以及甘露醇的培养基中培养, 3 d 后检测小孢子活力发现只有麦芽糖和甘露醇培养的小孢子具有活力, 说明蔗糖、葡萄糖和果糖对游离小孢子有毒害作用, 而不是由于渗透压造成的。进一步研究认为葡萄糖浓度超过 2.0 mmol/L 时, 就对小孢子产生致死, 而低于 2 mmol/L 由于营养不足而不能使小孢子进一步进行发育。但在白菜小孢子培养中, 高睦枪等用蔗糖作为碳源成功的培养出胚状体和绿株^[6]。有趣的是先在麦芽糖培养基中培养一段时间后再补加蔗糖、葡萄糖或果糖培养 3 d 后检查小孢子, 发现仍有活力, 说明小孢子对初始的碳源要求十分严格。也就是说, 起始培养时, 小孢子对外界环境很敏感。这可能是小孢子培养难以成功的关键所在。在花药培养中之所以能用蔗糖、葡萄糖以及果糖作为碳源, 可能是由于花药壁具有缓冲和屏障的作用, 使这些小孢子开始培养时没有直接与糖源接触而免受毒害。当培养一段时间后小孢子进一步发育可以忍受高浓度糖, 而存有活力并沿着一定的方向进一步发育。

饥饿处理和热激处理也明显的提高胚胎发生的频率, 这与 Carrido 等(1991)在烟草中, Hoekstra 等(1992), Hu 等(1995)在大麦和小麦上的研究结果是一致的^[2], 认为这两种胁迫是能促使小孢子向孢子体发育的重要转变环节。游离小孢子培养虽然能诱导出植株, 但胚胎发生率较低, 而国外有些报道在 35 mm 的培养皿中能诱导出上千个胚胎, 因此在小孢子培养的培养方法上仍需要进一步研究探索。在作物的小孢子培养中, 目前仅在烟草和油菜等作物上

成功的应用于实际育种中。

参考文献:

- [1] Tuveesson I K D, Ohlund R C V. Plant regeneration through culture of isolated microspores of *triticum aestivum* L[J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 1993, 34: 163– 167.
- [2] Hu T, Kasha K J. Improvement of isolated microspore culture of wheat through ovary co culture[J]. Plant Cell Reports, 1997, 520– 525.
- [3] Kyo M, Harada H. Studies on conditions for cell division and embryogenesis in isolated pollen culture of *Nicotiana rustica*[J]. Plant physiol, 1985, 79: 90– 94.
- [4] Scott P, Lyne R L. The effect of different carbohydrate sources upon the initiation of embryogenesis from barley microspores[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1994, 36: 129– 133.
- [5] Morris D A, Johnson C F. Planta, 1990, 172: 408– 410.
- [6] 高睦枪, 栗根义, 杨建平, 等. 大白菜游离小孢子培养基在育种上的应用[A]. 中国农业青年科学学术年报 B 卷[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997. 732– 737.

Study on Isolated Microspore Culture in Wheat(*Triticum aestivum* L)

LI Guang wei¹, LAN Su qi¹ SUN Bao qi²

(1 Institute of Cereal and Oil Crops, Hebei Academy of Agricultural and
Forestry Sciences, Shijiazhuang Hebei 050031, China;

2 Department of Seed Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: The rate of callus and regeneration can be lifted dramatically by ovary co culture during isolated microspore incubation. The optimum number of ovaries in co culture is 20. Low temperature in ovary co culture can result in low callus rate and induce high green plant rate. By adding PAA and glutamine into C17A, the callus derived from microspores can be improved. Maltose is the best carbohydrate source in isolated microspore culture. No calli was induced on the medium of sucrose, glucose and the mixture of glucose and fructose as carbohydrate source. Some of the microspores incubated for 3 days existed only in the maltose medium. Therefore, we conclude that sucrose, glucose and fructose are toxic to microspores. When the glucose concentration is up to 2.0 mmol/L, it causes microspore death when adding high-concentration-glucose into maltose medium, some of microspores incubated for 1 day have viability, and the viability is increased as the incubation time is prolonged. The optimum maltose concentration in microspores culture is 0.12 mol/L for Y77. Pre-treatment by starvation and heat shock(33 ℃) have beneficial effects on callus formation.

Key words: Wheat; Isolated microspore culture; Induced rate