

影响大麦花药培养因素的研究

杨晓辉 胡道芬

(北京市植物细胞工程实验室, 北京 100031)

摘 要

40种基因型的大麦花药分别接种在附加 2mg/L 2,4-D和0.5mg/L KT的培养基上, 共有31种基因型的花药形成了愈伤组织, 最高愈伤组织诱导频率达到49%, 绿苗诱导率达到1.4%。

在培养基的筛选试验中, B₅和N₆培养基的效果明显优于MS和C₁₇。增加基本培养基中硝态氮含量或减少铵态氮含量都促进大麦花粉愈伤组织的形成。

大麦花药接种后, 用短期高温或低温处理有明显不同的效果。有些基因型经高温处理后, 花粉愈伤组织诱导率得到很大提高, 但受到低温处理的抑制。而另一些基因型经低温处理后, 花粉愈伤组织诱导频率受到促进, 但受到高温处理的抑制。不同材料对培养温度的反应有明显差异。

本试验证明: 激素 2,4-D是诱导大麦花粉愈伤组织的必要成分。广泛收集和筛选不同的基因型, 选择适宜的培养条件, 可以提高大麦花粉愈伤组织的诱导频率。

关键词 大麦 花药培养 基因型 培养条件

前 言

影响大麦花药培养效果的因素是多种多样的, 既包括由植株本身所决定的基因型差异、花药的发育时期及供体植株的生理状态等内在条件; 也包括基本培养基成分、激素及培养温度等外界因素。尤其是基因型差异, 它是导致大麦花粉愈伤组织产量差异的主要因素之一, 也是今后开展大麦单倍体育种的一大障碍。所以努力减小基因型差异, 改善培养条件是日前大麦花药培养的主要工作。本试验探讨了提高大麦花粉愈伤组织诱导频率的方法和手段, 确定了适宜的大麦花药培养条件。并筛选出一些具有较高愈伤组织诱导率的基因型。以期作为今后大麦单倍体育种的材料和桥梁亲本。与其它基因型杂交, 改善它们的花药培养效果, 以便开展单倍体育种。

材料与方 法

实验选用40种二棱、四棱及六棱三种类型的大麦基因型为材料,接种单核中期的花药。花粉粒的发育时期用醋酸洋红压片法观察鉴定。接种前将幼穗整株放在4℃的低温冰箱中预处理7天,然后用70%的酒精擦拭叶鞘和茎部,将花药接种在基本培养基上,全部接种工作均在超净工作台内进行。

试验使用的培养基分别为MS(Murashige和Skoog)〔3〕,B₅(Gamborg et al)〔4〕,C₁₇(王培等)〔1〕,改良C₁₇,N₆(朱至清等)〔2〕及改良N₆。所有诱导愈伤组织的培养基均附加2mg/L 2,4-D、0.5mg/L KT和9%的蔗糖,用0.5%的琼脂固化,pH值调为5.8后分装于50毫升的三角瓶中。幼苗分化时,去掉2,4-D,增加IAA(0.5mg/L)及KT(2.0mg/L)的含量,并将相应培养基中的蔗糖含量降为3%,分装完毕的培养基在121℃的条件下灭菌20分钟。

将接种好的花药置于24℃的人工气候箱内暗培养,在愈伤组织转移之前统计愈伤组织数量。同一花药不同部位产生的愈伤组织分别计数。幼苗的分化在24±1℃、光强为2000Lux、光照时数为16小时的条件下进行。待幼苗长壮后放入7~8℃的冰箱内越冬,然后移入花盆置于温室中生长。

作为试验结果的几个主要指标是按下式计算的:

$$(1) \quad \text{愈伤组织诱导率}(\%) = \frac{\text{花粉愈伤组织数}}{\text{接种花药总数}} \times 100$$

$$(2) \quad \text{幼(绿)苗分化率}(\%) = \frac{\text{分化幼(绿)苗数}}{\text{转移愈伤组织数}} \times 100$$

$$(3) \quad \text{幼(绿)诱导率}(\%) = \frac{\text{分化幼(绿)苗数}}{\text{接种花药总数}} \times 100$$

结果和讨论

一、大麦花粉愈伤组织形成中的基因型差异和对基因型的筛选

大麦花药在离体培养时形成愈伤组织的时间因基因型不同而异。从表1可知,除没有形成愈伤组织的基因型外,大部分的花药在接种后的20天左右即出现肉眼可见的愈伤组织,仅少数例外。最短的只需16天,如基因型807,最长也只需26天,如基因型鉴66。虽然各基因型最初出现愈伤组织所需的时间差异不大,但其花药对离体培养反应的其他效果是存在很大差异的,它首先表现在愈伤组织的增殖和产量上。最初破壁而出的愈伤组织是一些乳白色小点,在以后的增殖过程中,差异逐渐表现出来,有些基因型花粉愈伤组织的增殖表现出较旺的趋势,在最初的10天左右就达到很大的体积,此时愈伤组织直径在3~5mm左右;而另一些基因型愈伤组织的生长则表现出停滞状态,当直径达到1~2mm时便逐渐停止增殖,2~3

星期后便褐化变黑死亡。这两种现象中,前者多出现在那些愈伤组织诱导率较高的基因型中,而后者常出现在诱导频率较低的基因型中。其次,各基因型形成愈伤组织的能力也表现出了一定的差异,即一般基因型的持续时间仅在20天左右,而有些基因型的这种能力可持续很长时间。如基因型Klages形成愈伤组织的能力就非常强,当将三角瓶中的愈伤组织转移一批后,另一批又很快增殖,这种能力持续了40天以上。所以它在各处理中的愈伤组织诱导率最高,而且绿苗诱导率也最高,在接种的4140枚Klages的花药中,诱导产生了2029块愈伤组织,平均诱导率为49.0%。其中664块愈伤组织转移到分化培养基上,共得到84株幼苗,其中绿苗7株,幼苗诱导率达2.0%。因此,这是很好的大麦花药培养材料。

表1 不同基因型在MS培养基上的愈伤组织和幼苗诱导率*

基因型	出愈天数	愈伤组织产量**	转愈数(块)	绿苗数/白苗数	幼苗分化率(%)	幼苗诱导率(%)	
二	Klages	20	2029/4140(49.0)	664	7/77	12.7	2.0
	807	16	62/228(27.2)	44	1/3	9.1	1.8
	B ₂	22	76/360(21.1)	28	1/6	25.0	1.9
	Anthos	17	104/374(27.8)	84	1/5	7.1	1.6
	鉴66	26	4/225(1.8)				
棧	Elose	17	33/253(13.0)				
	IFFI-8	20	46/280(15.7)				
	S-019	23	4/154(2.6)				
	付8		(0.0)				
型	S-285	25	64/260(24.6)				
	Q-29	20	10/175(5.7)				
	8-29						
	B ₁	20	92/236(39.0)	23	1/6	25.0	3.0
	Gjza-21	20	9/152(5.9)				
四	蒙克尔	21	28/312(9.0)	20	0/4	20.0	1.3
	博兰扎	21	10/207(4.8)				
棧	哈密大麦	20	2/210(1.0)				
	斯提卜克		(0.0)				
型	IFFI-5	20	8/163(4.8)				
	城城-17	24	6/268(2.2)				
	HOR8899×Anthos	21	41/174(23.6)				
杂	NS-292×S-207	21	38/326(11.7)				
	803×S-285	25	20/292(6.8)				
交	B ₁ ×昭苏六棧	20	30/200(15.0)				
	IFFI-1×B ₂	25	2/290(0.7)				
组	昭苏六棧×斯提卜克		(0.0)				
	NS-296×付8	24	16/323(5.0)				
合	S-285×付8	24	3/335(0.9)				

* MS+2mg/L 2, 4-D+100mg/L肌醇+9%蔗糖

** 愈伤组织数/接种花药数(愈伤组织诱导频率)

和小麦较松软和半透明的花粉愈伤组织相比,大麦花粉愈伤组织多为乳白色,且质地紧密,其增殖是以酵母式的出芽方式进行的,愈伤组织是由众多的直径为1mm左右的球状颗粒

堆集而成，其结构一碰即散，而不象小麦通常只是初始愈伤组织体积的增大。

实验中对40种基因型的筛选中，共有31种基因型的花药形成了不同产量的愈伤组织，占供试材料的78%。其中出愈率高于5%的基因型有20种，占供试材料的50%；高于10%的基因型有11种，占28%。平均诱导率达到8%。愈伤组织诱导频率最高的分别出现在二棱Klages和四棱B₅两种基因型中，分别达到49%和39%。产生愈伤组织的基因型范围很广泛，愈伤组织诱导率普遍较高是本试验的主要特点。

二、基本培养基类型对花粉愈伤组织形成的影响

基本培养基中含有丰富的营养成分，是花药在离体培养时生存的场所，也是造成小孢子异常分裂的一个基本原因。各基因型遗传特性的差异决定了它们对各基本培养基适应性的不同。

试验使用MS、B₅、N₆、改良N₆(IN₆)、C₁₇和改良C₁₇(IC₁₇)六种基本培养基，接种了Klages、Amaginijo和IFFI-8三种基因型的花药。

表2 不同基因型对各种基本培养基的适应性

基本培养基	基因型	接花药数 (个)	愈伤组织数 (块)	出愈率 (%)
N ₆	Klages	272	258	94.9
	Amaginijo	190	4	2.1
C ₁₇	Klages	335	54	16.1
	Amaginijo	175	0	0.0
B ₅	Klages	232	362	156.0
	Amaginijo	330	3	0.9
MS	Klages	166	51	30.7
	Amaginijo	160	0	0.0

从表2的结果可看出，基因型Klages的适应性表现得非常广泛。它在N₆、C₁₇、B₅和MS 4种培养基上的培养效果的差异都十分明显。在B₅培养基上，它的花粉愈伤组织诱导率达到了156%，产生愈伤组织的花药占90%以上；其次，是在N₆培养基上，其花粉愈伤组织诱导率达到94.9%。Klages花粉愈伤组织的最低诱导率出现在MS和C₁₇培养基上，但也分别达到了30.7%和16.1%。

另一基因型 Amaginijo是二棱型大麦，其花药在N₆和B₅两种基本培养基上的出愈率分别为2.1%和0.9%，而在C₁₇和MS两种基本培养基上却没有任何愈伤组织形成，所以它在这4种基本培养基上的反应都很差，这很可能是其遗传因素决定了这种花培特性。但分析这些结果仍可看出：4种培养基中，N₆和B₅的培养效果要优于C₁₇和MS。

比较Klages和Amaginijo在N₆、B₅、C₁₇和MS培养基上的结果，可以发现一个共同的趋势：即N₆和B₅的诱导效果比C₁₇和MS的效果要好。在N₆和B₅培养基上，Klages和Amaginijo的花粉愈伤组织的诱导率分别为94.9%、2.1%和156%、0.9%；而在C₁₇和MS培养基上仅为16.1%、0和30.7%、0。两个基因型的愈伤组织诱导率都表现出了下降趋势，而且下降幅度也很大，这与各基本培养基成分的特点是分不开的。所以我们认为B₅和N₆是很好的大麦花药培

培养基。

培养基中 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 含量对花药愈伤组织形成的影响是很大的,为探讨硝态氮和铵态氮对大麦花粉愈伤组织形成的作用,试验中将基因型 IFFI-8 的花药分别接种在 N_6 、改良 N_6 、 C_{17} 和改良 C_{17} (表 3) 培养基上,结果得到在改良的两种培养基上,IFFI-8 花粉愈伤组织的诱导率都远远高于对照 N_6 和 C_{17} 培养基。在降低了 NH_4^+ 离子含量的 IN_6 培养基上,其愈伤组织诱导率达到 40%,而在对照 N_6 培养基上仅为 14.5%。当将 C_{17} 培养基中的硝态氮含量从 13.9mM 增加到 24.6mM 时,IFFI-8 的花粉愈伤组织诱导率从对照 C_{17} 的 16.3% 提高到 IC_{17} 的 39.1%,提高近 23%。由此可见,降低基本培养基中的铵态氮含量或增加硝态氮含量有利于大麦花粉愈伤组织的形成,这与朱至清、王培等人在小麦和水稻上的研究结果是相近的 [1,2],而且大麦的花药培养对铵离子浓度要求得更低。结合这一结果,我们就可以理解试验中 B_5 和 N_6 的诱导效果始终比 MS 和 C_{17} 的好。

表3 培养基中 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 含量对花粉愈伤组织形成的影响

培养基	KNO_3 mg (mM)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mg (mM)	NH_4NO_3 mg (mM)	接花药数 (个)	出愈数 (块)	出愈率 (%)
N_6	2830 (28.0) *	463 (7.0)	0	155	24	14.5
改良 N_6	2830 (28.0)	134 (2.2)	0	200	80	40.0
C_{17}	1400 (13.9)	0	300 (3.8)	184	30	16.3
改良 C_{17}	2500 (24.6)	134 (2.2)	0	169	66	39.1

* 括号内数值为相应培养基中 NH_4^+ 离子和 NO_2^- 离子浓度

三、培养温度及其变化对不同大麦花药离体培养的影响

温度是影响花粉愈伤组织形成和幼苗分化的一个重要因素。大麦花药的离体培养对培养温度变化的反应尤其敏感。

在 Klages、IFFI-8、807 及 Anthos 4 种基因型的花药接种后,分别用 15℃、30℃ 的温度处理 5 天后再移至 25℃ 的正常温度下培养 (表 4),观察不同处理下各基因型的反应。

从实验结果发现:在供试的 4 种基因型中,按花药对各温度处理的反应,大致可分为两种类型。第一类是短期低温处理能促进某些基因型花粉愈伤组织的形成,而高温处理则降低其诱导率;第二类则是短期高温处理可促进另一些基因型花粉愈伤组织的诱导率,但同时又受到低温处理的抑制。

从表 4 的结果可看出:Klages 和 IFFI-8 属于第一类型,在 25℃ 培养条件下,愈伤组织诱导率分别为 49% 和 13.9%,当用 15℃ 的低温将它们分别处理 5 天后,再移至 25℃ 下培养时,这两种基因型愈伤组织的诱导率得到了不同程度的提高,Klages 从 49% 提高到 55.8%;IFFI-8 从 13.9% 增至 15.1%。虽然前一基因型经低温处理后其诱导率增加的幅度不及前一基因型,但也说明低温至少对它是没有抑制作用的。但当它们经 30℃ 的高温处理 5 天后,出现相反的结果,Klages 的诱导率降为 21.1%,IFFI-8 则降到 2.4%,降低幅度均在 10% 以上,可见短期的高温处理对这两种基因型花粉愈伤组织的形成很不利。另外两个基因型

表4 大麦花药对培养温度变化反应的基因型差异

基因型	处 理	接花药数(个)	出愈数(朵)	出愈率(%)
Klages	15~25℃	369	206	55.8
	25℃	188	92	49.0
	30~25℃	369	78	21.1
	15~30~25℃	472	264	55.9
IFFI-8	15~25℃	332	50	15.1
	25℃	330	46	13.9
	30~25℃	415	10	2.4
	30℃	350	4	1.1
807	15~25℃	269	38	14.1
	25℃	225	39	17.3
	30~25℃	228	62	27.2
	30℃	272	74	27.2
Anthos	15~25℃	311	30	9.3
	25℃	415	84	21.0
	30~25℃	415	126	30.0
	27℃	374	95	25.4

807和Anthos属于第二种类型,其花药接种并经短期低温处理后,使二者的诱导率反而比对照降低了许多,其中Anthos从21%降为9.5%;而当用30℃高温处理5天后,其愈伤组织诱导率提高到30%。品种807经高温处理后的出愈率也大大高于低温处理的结果。可见,不同的温度处理对不同品种的作用效果是不一致的。由于各基因型的遗传特性不同,有些材料在25℃的恒温培养下,并不能发挥形成愈伤组织的最大潜力。本试验结果表明:对于一些基因型的花药培养中变温处理比恒温培养的效果要好。

产生这两种不同反应的原因,从细胞学水平上分析,很可能是因为培养温度在花药离体培养时能决定花粉粒的发育方向。从对各变温处理5天后花粉粒的观察中,发现前一类型基因型Anthos的花粉粒经15℃低温处理后,大部分花粉粒的内含物消失,成为空瘪状,其空瘪率在三种处理中最高,达到了64%;这自然要影响到后期愈伤组织的产量,结果也正是如此,与对照和30℃下培养相比,15℃下这类基因型花药愈伤组织的诱导率最低(表5)。对后一类基因型IFFI-8来说,情况正好相反。短期低温处理有利于花粉粒的继续存活和发育。高温处理则导致花粉粒退化。因此可以推测:在大麦花药离体后小孢子对继续发育所要求的最适温度发生了变化,终因基因型不同而产生了差异,某些基因型的花药小孢子适合在低温下继续发育,在高温下部分却因不适而死亡;但另一些基因型的小孢子适合于高温下继续

表5 变温处理5天后基因型花粉粒的发育状况

基因型	处 理	观察花粉粒数(个)	空瘪花粉粒数(个)	空瘪率(%)	出愈率(%)
IFFI-8	15~25℃	90	10	11.1	15.1
	25℃	63	14	22.2	13.9
	30~25℃	75	40	53.3	2.4
Anthos	15~25℃	195	125	64.0	9.6
	25℃	107	32	29.0	20.2
	30~25℃	143	17	11.0	30.4

注:各处理观察5枚花药,每枝花药中观察100个花粉粒,取平均数

发育, 低温则由于不能满足它对温度的要求, 部分花粉粒逐渐停止发育而退化。这是造成后期花粉愈伤组织产量上升或下降的直接原因。这两种结果在宏观上反映出来就是以上所讨论的基因型对温度变化反应的两种不同类型。

本试验还发现, 这种温度效应在花药接种后的最初 3 天内就可决定小孢子的发育状况, 而且这种效果是不可逆的。

四、培养基激素及其它附加成分对愈伤组织诱导率的影响

激素是引起小孢子在离体条件下发生异常分裂的重要外界条件。各种激素及不同含量水平和组合在花药培养效果上存在很大的差异, 为确定诱导大麦花粉愈伤组织的最佳组合, 以 MS 为基本培养基, 在实验中对 2, 4-D、IAA、6-BA 及其它有机附加成分之间和各不同配比之间的效果作了比较, 所得结果列入表 6。

大麦花药的培养对 2, 4-D 的反应是非常敏感的, 这可从各处理的愈伤组织诱导率中反映出来, 从表 6 可以看出: 在不含 2, 4-D 的 1、5 两种处理中基因型 Klages 的花粉愈伤组织诱导率最低, 仅分别为 4.2% 和 3.1%。虽然在这两种处理分别附加了 0.5mg/L 和 1.0mg/L 的 IAA 及 6-BA, 但并未获得理想的效果。当把 0.5mg/L 的 2, 4-D 加入处理 2 的培养基中时, 花粉愈伤组织的诱导率立即由原来的 3.1% 增加到 12.1%, 其它含有 0.5 和 1.5mg/L 2, 4-D 处理的愈伤组织诱导率也都表现出了上升的趋势, 但诱导率之间的差异不大, 说明 2, 4-D 是诱导大麦花粉愈伤组织的必要成分, 是花粉粒重新启动分裂的重要条件。而低浓度的 IAA 和 6-BA 无明显作用。

表 6 激素类型、水平及附加成分的不同组合对出愈率的影响

培养基 代号	激素类型及水平 (mg/L)			其它附加成分 (mg/L)					接花 药数 (个)	愈伤组 织数量 (块)	出愈率 (%)	
	2, 4-D	IAA	6-BA	LH	YE	InO.	L-Glu	Dr-Ser				
1		1.0	1.0		1000	100				307	13	4.2
2	0.5		1.0		1000	100				410	50	12.1
3	1.5		0.5	500		100				240	27	11.3
4	1.5	0.5				100				285	26	9.1
5		0.5	0.5	500		100				229	7	3.1
6	1.5		0.5		1000	160				394	124	31.5
7	1.5		0.5		1000			160		372	88	23.3
8	1.5		0.5		1000	160		160		150	45	30.0

注 LH: 水解乳蛋白 YE: 酵母提取物 InO.: 肌醇 L-Glu: L-谷氨酰胺 Dr-Ser: Dr-丝氨酸

水解乳蛋白和酵母提取液可在愈伤组织的生长时提供养分, 它们对花粉愈伤组织的诱导并不起很大作用, 这一点可以分别从加有 500mg/l 的水解乳蛋白和 1000mg/l 的酵母提取液的处理 1 和 5 的结果中反应出来, 其诱导率为 4.2% 和 3.1%, 差异不大。在不加 2, 4-D 而仅加水解乳蛋白和酵母提取液及 IAA、6-BA 的这两种培养基上, 愈伤组织的诱导率最低, 分别为 4.2% 和 3.1%。另外, 在含有 1.5mg/L 2, 4-D、1000mg/L 肌醇的培养基中分

别附加160mg/L的谷氨酰胺和丝氨酸的处理6和7上,愈伤组织诱导率分别达到了31.5%和23.8%,在同一肌醇水平上比较谷氨酰胺和丝氨酸的效应时,可发现前者的效果要优于后者。如在加入160mg/L谷氨酰胺的处理6培养基上的诱导率比含有160mg/L丝氨酸的培养基上的诱导率高8%。当二者结合使用时,出愈率与仅加谷氨酰胺的结果并无多大区别,达到30%,所以丝氨酸的作用不大,单一的谷氨酰胺即可发挥这类氨基酸的效应。许智宏、Sunderland〔5〕的研究发现160mg/L或800mg/L的谷氨酰胺本身在大麦花药培养中对诱导多细胞花粉粒没有作用,但它和肌醇等附加成分一起可以部分地取代花药培养中条件因子的作用,促进花粉粒中多细胞团形成愈伤组织。所以,以MS为基本培养基时,附加1.5mg/L 2,4-D + 1000mg/肌醇 + 160mg/L L-谷氨酰胺的效果最好,愈伤组织诱导率最高。

考 参 文 献

- 〔1〕 王培等: C₁₇培养基在花药培养中应用的研究,《植物学报》,28(1)1986: 211—214
- 〔2〕 朱至清等: 通过氮源比较试验建立一种较好的水稻花药培养基,《中国科学》,1975(5): 453—490
- 〔3〕 Murashige T. et al: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physi. Plant*, 1962(15): 437—497
- 〔4〕 Gamborg. O. et al: Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, *Exp. Cell. Res.* 1968(50): 148—151
- 〔5〕 Z. H. Xu, and N. Sunderland: Glutamine, Inositol and Conditioning factor in the Production of barley pollen callus in vitro. *Plant Science Letters*, 23(181) 1981: 161—168

Studies on Factors Influencing Anther Culture in Barley

Yang Xiaohui Hu Daofen

(*Beijing Plant Cell Bioengineering Laboratory, Beijing*)

Abstract

Anthers of 40 barley varieties were inoculated on MS Medium Supplemented with 2mg/L 2,4-D and 0.5mg/L KT to examine genotypical difference and select genotypes with better ability of producing calli. There were thirty one varieties showed calli. The highest callus inducing frequency got to 49%. The green plantlet inducing frequency was as high as 1.4%.

Different varieties had various responses on MS, B₅ and C₁₇, N₆ Media. Our results indicated that B₅ and N₆ Media were more effective for barley pollen callus formation than MS and C₁₇ Media. It was found that reducing NH₃⁺ contents or increasing NO₃⁻ contents could promote pollen callus production.

Culture temperature could influence the development of microspores in vitro. For some genotypes, the callus production could be promoted when inoculated anthers were treated with high temperature (30°C) for five days, but for others, the callus formation frequency could be enhanced when treated with low temperature (15°C).

2,4-D was an essential factor in inducing pollen callus formation in barley as showed in our experiment.

Key words: Barley; Anther culture; Genotypes; Culture condition