

# 低温处理后培养在不同温度下 小麦雄核的初始发育

梁守义 黄守印

(河北省承德农业学校)

把花药培养作为育种手段,我国首先在烟草、水稻、小麦方面应用,并育成了新品种,目前仍处于世界领先地位。近年来,为了提高花粉植株的诱导频率,许多科学工作者<sup>[1-5]</sup>,在雄核发育的途径、外源、激素、变温处理等方面进行了研究,并取得了一定的进展。为了探索目前小麦花粉植株诱导频率低的原因,我们在培养条件的温度因素对小麦雄核初始发育的影响方面进行了研究,为进一步提高诱导频率提供依据。

## 材 料 方 法

供试材料为春小麦白欧柔×云麦五号F<sub>2</sub>,接种的花药为花粉单核中晚期。花药培养分别做了四种不同的处理。即接种后在5—7℃低温下培养48小时后,和对照一起再分别转移到26℃和28℃下培养。以上处理的第三、五、七、九、十一、十五、二十天和对照一起取样。每处理取40枚花药,分别在五个瓶中各取8枚。材料在卡诺氏固定液(95%乙醇:水醋酸=3:1)中固定24小时,用孚尔根染色法染色后,按花药整体制片法<sup>[1]</sup>对每个花药全面进行镜检,并分别计算出花粉单核、二核、三核及多核或多细胞团花粉(以下简称多核花粉)的花药百分率。按雄核发育的途径,凡出现第一次有丝分裂为二核期;凡出现第二次有丝分裂是非同步分裂者为三核期;凡出现四核及四核以上者为多核或多细胞团期;凡雄核已全部解体或正在解体者均计算为死亡退化(以下简称衰亡)的花药数。

部分花药用醋酸洋红或孚尔根染色法染色后,剖开压片,镜检花粉的发育状况,并统计生活花粉发育状况的百分率。

培养基为N<sub>6</sub>+2.4-D 2毫克/升+激动素0.5毫克/升+水解乳蛋白500毫克/升+蔗糖9%+琼脂0.9%。

## 结 果 讨 论

(一) 低温处理及不同培养温度对小麦花药中雄核初始发育的影响:

Nitsch等<sup>[2]</sup>用曼陀罗、王敬驹等<sup>[3]</sup>用水稻、潘景丽等<sup>[4]</sup>及曾君祉等<sup>[5]</sup>用小麦为材料,他们的实验证明,低温处理可以提高曼陀罗的花粉胚状体和水稻花粉愈伤组织乃至影响小麦小孢子早期发育过程中融合的频率,以及花粉植株的诱导频率。他们用-2—+2℃、-5—0℃、3—5℃和10℃的低温处理,都证明有不同程度的提

高愈伤组织频率的作用。为了进一步探明低温处理的作用,我们结合不同温度的培养,观察了对小麦雄核初始发育的影响。

1、对小麦离体花药中花粉启动分裂的影响:在试验中,分别培养在  $26^{\circ}\text{C}$  和  $28^{\circ}\text{C}$  下的小麦离体花药,发现凡经  $5-7^{\circ}\text{C}$  低温处理者,花粉启动分裂显著比对照迟缓,而且呈一致趋势。但培养二十天后,花粉保持不变的花药数却低于对照,而具花粉启动分裂的花药平均数却高于对照,也呈一致趋势。同时培养在  $28^{\circ}\text{C}$  下者,无论低温处理与否,比  $26^{\circ}\text{C}$  下培养者,具花粉启动分裂的花药有明显提高。例如,培养三天后,花粉启动分裂为二核或三核的花药,  $26^{\circ}\text{C}$  下低温处理者为 25%, 对照为 32.5%;  $28^{\circ}\text{C}$  下处理者为 37.5%, 对照为 45%, 说明花粉启动分裂低温处理后确比对照表现迟缓。但培养二十天后,在  $26^{\circ}\text{C}$  下具花粉启动分裂的花药,低温处理者的平均数提高了,而具花粉保持不变的花药平均数却相应降低了,处理与对照分别为 31.78% 和 40.8%。具花粉保持不变的花药平均数,  $28^{\circ}\text{C}$  下比  $26^{\circ}\text{C}$  下培养者,无论低温处理与否都大大降低了,  $28^{\circ}\text{C}$  下平均为 27.26%,  $26^{\circ}\text{C}$  下平均为 36.29%。

以上可以看出两种结果:第一,  $5-7^{\circ}\text{C}$  48 小时低温处理,虽然花粉启动分裂比对照迟缓,但培养二十天后,具花粉保持不变的花药平均数都低于对照,而且  $26^{\circ}\text{C}$  和  $28^{\circ}\text{C}$  培养者均呈一致趋势,说明低温处理有利于花粉启动分裂。第二,  $28^{\circ}\text{C}$  与  $26^{\circ}\text{C}$  培养相比,  $28^{\circ}\text{C}$  不但花粉启动分裂较快,而且具花粉保持不变的花药数也相应降低,说明  $28^{\circ}\text{C}$  更有利于花药中雄核的初始发育(见表 1)。

2、对多核花粉的出现频率及存活率的影响:一般培养在 5—7 天后,花药中始见多核花粉。但在  $28^{\circ}\text{C}$  培养者,有时三天后就出现了多核花粉,高峰的出现是在培养的 9—11 天。同时,低温处理者,出现具多核花粉的花药数,都较对照为高。例如,培养在  $26^{\circ}\text{C}$  下,低温处理者具多核花粉的花药高峰出现时为 30.7%, 对照仅为 12.5%; 在  $28^{\circ}\text{C}$  下者处理为 50%, 对照为 47.5%。而且处理者具多核花粉花药的存活数,在培养过程中,不但比对照下降缓慢,而且具多核花粉的花药存活数也较对照为高。例如,培养二十天后,  $28^{\circ}\text{C}$  下处理者具多核花粉的花药存活数为 14.2%, 对照为 8%, 处理比对照提高 1.77 倍;  $26^{\circ}\text{C}$  下处理者为 12%, 对照为 7.6%, 处理比对照提高 1.64 倍。同时,从培养二十天的具多核花粉的花药平均数看,处理者也较对照为高。例如  $26^{\circ}\text{C}$  下处理者为 11.95%, 对照仅为 5.58%, 两者的比为 2.14:1;  $28^{\circ}\text{C}$  下低温处理者为 19.61%, 对照为 14.25%, 两者的比为 1.38:1。以上还说明在  $28^{\circ}\text{C}$  培养者,无论低温处理与否,都比  $26^{\circ}\text{C}$  培养者,具多核花粉花药的平均数为高。

由此可见,  $5-7^{\circ}\text{C}$  低温处理,不但有利于提高具多核花粉花药的频率,而且有利于提高具多核花粉花药的存活率,特别要指出的是,  $28^{\circ}\text{C}$  较  $26^{\circ}\text{C}$  培养的效果更为显著。(见表 1)。

3、对花粉粒死亡或退化花药的影响:一般情况下,培养三天出现具衰亡花粉粒的花药,多为花粉粒本来就是败育的;五天后,始见有核解体乃至染色体用孚尔根染色法染色无明显反应而衰亡者。培养至十一天,具衰亡花粉粒的花药数是缓慢递增的,培养十五天至二十天后,衰亡的数量才骤然大增,但衰亡的数量,各处理及对照的变化范围都在 70—76% 之间。从具花粉粒衰亡的花药平均数来看,凡低温处理者都略高于对照。

例如, 培养在26℃下者, 二十天后处理者的平均数30.9%, 对照为23.2%, 培养在28℃下者, 处理为29.25, 对照为28.75%。究其原因, 可能是经低温处理者, 具花粉启动分裂的花药数多于对照之故。试验证明, 恰恰是具二核、三核乃至多核花粉的花药, 在发育过程中, 由于培养条件等种种原因的障碍, 生存的时间, 常常比具花粉粒保持单核的花药寿命要短, 容易引起衰亡。相反, 没有经过低温处理者, 具花粉粒保持不变的花药数, 无论在26℃下或在28℃下培养, 其数量都较多, 因而衰亡的数量相对的较少, 就是显明的对比(见表1)。

表1 低温处理对小麦花药中雄核发育的影响

培养温度	培养天数	5—7℃ 48小时						对 照					
		镜检花药数	具花粉粒保持不变的 花药数%	具二核及三核花 粉粒的花药数	具生活多核或多 细胞团的花药数	具花粉粒死亡或 退化的花药数		镜检花药数	具花粉粒保持不 变的 花药数	具二核及三核花 粉粒的花药数	具生活多核或多 细胞团的花药数	具花粉粒死亡或 退化的花药数	
26℃	3	40	72.5	25.0	0	2.5		43	67.5	32.5	0	0	
	5	41	44.0	46.0	2.0	7.3		—	—	—	—	—	
	7	—	—	—	—	—		40	42.5	45.0	5.0	7.5	
	9	39	28.3	23.0	30.7	18.0		35	51.4	31.4	2.8	14.3	
	11	48	22.9	33.3	14.5	29.1		40	32.5	32.5	12.5	22.5	
	15	40	15.0	20.0	12.5	52.5		—	—	—	—	—	
	20	50	8.0	4.0	12.0	76.0		39	20.5	0	7.6	71.7	
平 均		43	31.78	25.2	11.95	30.9		39.4	40.8	30.32	5.58	23.2	
28℃	3	40	57.5	37.5	0	5.0		40	50.0	45.0	2.5	2.5	
	5	40	45.0	42.5	0	12.5		40	42.5	50.0	0	7.5	
	7	35	31.4	32.9	13.5	22.0		—	—	—	—	—	
	9	—	—	—	—	—		40	40.0	27.5	15.0	17.5	
	11	40	10.0	15.0	50.0	25.0		40	12.5	20.0	47.0	20.5	
	15	40	7.5	15.0	40.0	37.5		40	12.5	20.0	12.5	55.5	
	20	49	6.0	6.1	14.2	73.5		40	12.0	10.0	8.0	70.5	
平 均		40.7	27.06	24.0	19.61	29.25		40	28.25	28.75	14.25	28.75	

(二)、低温处理及不同培养温度对小麦雄核异常分裂及多核花粉存活率的影响:

分别培养在26℃及28℃下的小麦花药, 经5—7℃48小时低温处理者与对照相比, 花粉启动分裂、异常分裂乃至多核花粉的数量, 都有不同程度的提高。例如在26℃下培养十五天的花药, 从镜检生活花粉总数看, 低温处理者花粉启动分裂平均为55.9%, 而对照

仅为23.06%，处理为对照的2.42倍；相反，仍处于单核状态的花粉数量，低温处理者相应地大幅度减少，培养十五天后平均为38.56%，对照则为80.83%，处理比对照等于1比2.9。再以第一次有丝分裂看，在26℃下培养十五天后，分裂为均等双核者，处理者平均为46.7%，对照仅为10.16%，处理为对照的4.6倍；分裂为不均等双核者，处理者平均为8%，对照为4.42%，处理为对照的1.8倍。按第二次有丝分裂，属于营养核异常分裂型的，处理者平均为4.53%，对照为2.13%；属于生殖核分裂型的，处理者1.04%，对照为1.8%，处理比对照等于1比1.73。可以看出，26℃下低温处理者花粉异常分裂型的数量大大提高了，平均为51.23%，而对照只有12.46%，处理为对照的4.1倍（见表2）。由此说明，5—7℃48小时低温处理，对培养在26℃下的小麦生活

表2

低温处理对小麦雄核发育的影响

培养温度	处理	培养天数	观察花药数	镜检生活花粉数	单核花粉%	第一次有丝分裂		第二次有丝分裂		多核花粉%	花粉启动分裂%	花粉异常分裂%
						均等双核%	不均等双核%	营养核%	生殖核%			
26±0.5℃	对照	3	2	77	86.5	7.9	1.4	4.2	0	0.6 1.4	14.58	12.29
		5	10	149	75.0	15.6	2.77	0.7	5.4			
		15	10	68	81.0	7.0	9.1	1.5	0			
		平均			80.83	10.16	4.42	2.13	1.8			
26±0.5℃	5—7℃ 48小时	3	10	446	46.7	25.3	24.0	0.9	3.13	2.5	54.70	51.23
		5	10	375	69.0	29.9	0	0.2	0			
		15	10	78	0	85.0	0	12.5	0			
		平均			38.56	46.7	8.0	4.53	1.04			
28±0.5℃	对照	5	10	43	83.7	7	9.3	0	0	2.7 21.8 16.7	41.13	38.30
		7	10	30	64.1	22.2	8.3	0	2.7			
		11	10	32	37.5	34.4	0	6.3	0			
		15	10	27	0	83.3	0	0	0			
		平均			56.08	36.73	4.4	1.57	0.68			
28±0.5℃	5—7℃ 48小时	3	10	493	31.0	31.2	28.4	3.2	0.6	0.2 1.9 25.6	46.70	34.64
		5	10	104	41.3	34.6	20.2	0	1.9			
		15	10	43	39.5	25.6	0	9.3	0			
		平均			37.27	30.40	16.2	4.17	2.63			

花粉,确有提高花粉启动分裂和花粉异常分裂频率的作用。

再看培养在28℃下的小麦生活花粉,经5—7℃48小时低温处理者,单核花粉平均为37.27%,对照为56.08%,处理比对照等于1比1.5。特别应该指出的是,多核花粉的出现频率及存活数,变化更为明显,在28℃培养十五天后,多核花粉的存活数,经低温处理者为25.6%,而对照为16.7%,处理为对照的1.5倍,而且为同样处理培养在26℃下者多核花粉的10倍多,比26℃培养下未处理者的1.4%提高的更多,达18.28倍。由此说明,5—7℃48小时低温处理,对培养在28℃下的小麦花粉,有明显提高多核花粉频率及存活率的作用。

### (三) 细胞融合的途径及自然加倍:

研究雄核发育的过程中,我们也曾观察到具有约84条染色体的花粉粒,当它有丝分裂完成后,就可如形成两个正常的加倍了的细胞,这种现象已曾有过报道<sup>[1]</sup>。一般认为花粉植株的自然加倍,主要是核内的染色体复制的结果。实验证明,细胞核融合(Cytomixis、也有人称这种现象为细胞并合Cell fusion),在小麦雄核发育过程中具有相当的普遍性。曾君祉等<sup>[5]</sup>观察到间期核融合的现象,在营养核之间、营养核与生殖核之间、生殖核与生殖核之间均有发生。我们观察到除间期核融合外,分裂时的核也可发生融合,因此,我们认为细胞核的融合有两条途径,第一、间期核融合,第二,分裂时的核融合。同时,还可看到具三个营养核的花粉,其中的二营养核正在进行融合,一营养核单独存在,这种现象可能是日常见到的同一块愈伤组织产生的绿苗中,既有二倍体植株,又有单倍体植株,是由于发生融合后的二倍体核与曾是单独存在的单倍体核同时发育成为一块愈伤组织的结果。由此说明了不同方式的细胞核融合,可能是花粉植株自然加倍的途径之一。

## 参 考 文 献

- (1) 朱至清等,1978,小麦雄核发育的细胞学研究《植物学报》20(1): 6—12。
- (2) N:tsch 等1977《单倍体育种资料集》第三集:178—182。科学出版社。
- (3) 王敬驹等,1974,水稻花粉植株的诱导条件及影响诱导频率的某些因素《植物学报》16(1): 43—53。
- (4) 潘景丽等,1980,再谈激素对小麦花药培养中花粉细胞早期发育的影响《植物学报》22(4) 305—310。
- (5) 曾君祉等,1980,在常温和低温条件下离体培养的小麦花药中小苞子的早期发育《遗传学报》7(2) 165—172。

## 更 正

本刊8卷1期第21页《坝亚三号亚麻选育报告》作者工作单位“坝下农科所”,应为“张家口地区坝上农科所”。