

BA对大麦花药培养中药壁的衰退和 植株再生频率的影响

钟华鑫 周菊华 张飞联 梁海曼

(杭州大学生物系, 杭州 310012)

摘要 用含 20ppm 6-BA 的 0.1% 吐温-80 溶液喷施花粉为单核前期的大麦上部叶片和穗部, 明显影响大麦花药培养效率。实验结果表明: 1) BA处理可明显延缓培养花药的药壁衰退进程。2) BA处理后的花药, 在培养期间, 其死亡的花粉数比对照大大减少, 相反其双核或多核的花粉数比对照明显增加。3) BA处理虽然没有促进大麦花粉愈伤组织的诱导率, 但显著地促进愈伤组织的生长, 提高愈伤组织成长率, 增加可转入分化培养的愈伤组织块数。4) BA处理促进愈伤组织的再分化, 尤其是绿苗的分化。

关键词 大麦; 花药培养; BA预处理; 绒毡层; 愈伤组织诱导和分化

在花药培养中, 药壁组织的发育状况与花药培养的效率紧密相关^[1-2], 大多数禾谷类作物的花药培养效率都比较低, 其中原因之一是由于在花药培养过程中药壁组织的快速衰退所致^[3-4]。考虑到大麦花药培养的效率较低, 白化苗分化的频率相当高; 又考虑到BA具有延缓离体的植物器官或组织衰老的功能, 本文报道BA对大麦花药药壁组织的发育和花粉植株再生的影响。

材料和方法

材料 田间栽培的大麦(*Hordeum vulgare* L.) “沪8712×杭6018”的花药。

BA和低温处理 在花粉为单核前期(约取穗培养前7~10天), 用含 20 ppm 6-BA 0.1%吐温-80溶液喷施田间生长的大麦植株上部叶片和穗部, 并以喷施0.1%吐温-80溶液为对照。7~10天后, 取花粉为单核后期的麦穗, 放在7~10℃冰箱内低温处理30天。

花药培养 经低温处理后的花药, 进行花药培养。诱导培养基为N6, 附加2mg/L 2,4-D、1 mg/L KT 和 9%蔗糖, 25℃暗培养。一个月后, 将花粉愈伤组织转入分化培养, 分化培养基为MS, 附加 1 mg/L IAA、1 mg/L BA和 3%蔗糖, 在1500Lux光下培养。

细胞学观察 取刚离体时、低温处理后和培养十天的花药, 按方国伟等^[4]方法, 将花药于酒精—丙酸(95%酒精3份, 经氢氧化铁饱和的丙酸1份混合)固定液中, 在室温下固定24 hr后逐级转入70%酒精中, 置冰箱保存, 染色液采用“丙酸—铁—洋红—水合氯醛”(PICCH)(河北农大园艺系, 1977), 染色后的花药进行压片观察, 每份样品每次取10个花药, 每个花药观察统计100粒花粉。

花药超薄切片的制作及电镜观察 培养10天后的花药, 经2%戊二醛溶液固定12h, 用pH7.0的磷酸缓冲液漂洗数次后再用1%饿酸后固定12h, 水洗后用系列丙酮脱水, 再过渡到包埋剂——环氧树脂Epon812, 经渗透、包埋、聚合获得包埋块后, 用LKB-8800型超薄切片机切片, 醋酸双氧铀—柠檬酸铅双重染色, 在H-300型电子显微镜下观察摄影。

结果和讨论

一、花药药壁组织的发育

BA处理明显影响大麦花药药壁的发育和衰退,结果如图版 I。从图版 I : 2 可以看出: 经BA处理的刚离体花药药壁的发育状况不同于对照(图版 I : 1), 即BA处理的花药药壁组织表层细胞的细胞核染着较好, 内容物也较充实, 表明BA能促进药壁组织的充实发育, 使药壁组织具有活力; 而图版 I : 1 的对照显然不及处理的。另外, 经培养10天后的对照花药, 其药壁组织已完全衰退, 表层细胞核消失, 已成为空穴(图版 I : 3), 同时从电镜照片看, 标证药壁组织活力的绒毡层已基本消失(图版 I : 5); 而BA处理的花药药壁的衰退较缓慢, 培养10天后, 多数药壁细胞尚有核(图版 I : 4), 绒毡层依然存在(图 I : 6), 这些均表明BA能明显延缓培养过程中花药药壁的衰退进程。

二、培养期间的花粉细胞的发育

BA处理对培养的大麦花粉细胞的发育状况有明显影响, 如图1所示: 培养10天后的大麦花药中, 死亡花粉的百分率, BA处理的为5%; 而对照可高达44%。相反, 花药双核和多核花粉的百分率, BA处理的有22.5%; 而对照只有1.9%。这证明BA处理提高了培养过程中花药内的花粉存活率, 有利于花粉去分化启动。

三、花粉愈伤组织的诱导、生长和再分化

表1显示BA处理的花药与对照花药的愈伤组织诱导率相近, 但BA处理的花药所诱导产生的愈伤组织的生长却远远比对照的快, 表明BA虽然不影响愈伤组织的诱导率, 却可明显促进愈伤组织的生长。因此, 在相近诱导率的情况下, BA处理的却比对照有更多的愈伤组织可转入分化培养, 从而为增加愈伤组织再分化的数目和提高再分化频率提供了先决条件。

另外从表2可以看出, BA处理不仅可以促进愈伤组织的再分化, 更值得重视的是BA处理可以显著地提高绿苗的再生频率。联系到水稻花药培养的研究结果, 即花药培养效率^[4, 6]

表1 BA对大麦花粉愈伤组织的诱导和生长的影响

	诱导产生的愈伤组织		转入分化培养的愈伤组织	
	块数	诱导率(%)	块数	成长率(%)
对照	78	9.75	13	16.67
BA处理	69	8.63	20	28.98

* 接种花药数每组均为800个

表2 BA对大麦花粉愈伤组织分化的后效应

转入分化培养愈伤组织块数	愈伤组织的分化					绿苗率(%)
	根	芽	绿苗	白苗	分化率(%)	
对照	3	1	1	1	46.1	7.7
BA处理	6		6		60.0	30.0

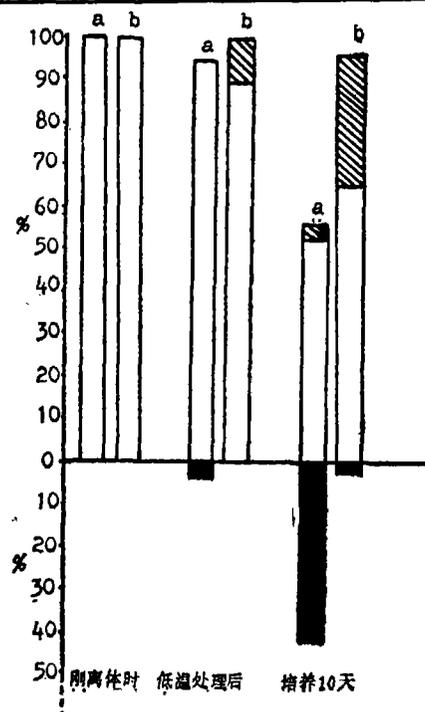


图1. 在培养过程中花粉的发育状况

□ 单核花粉
▨ 双核和多核花粉
■ 死亡花粉
a. 对照 b. BA处理

与花药药壁的发育状况和衰退进程密切相关, 本文结果又表明BA处理可明显延缓大麦花药药壁的衰退进程, 我们认为BA促进花粉愈伤组织再分化的作用是由于BA的处理延缓了药壁组织的衰退进程所致。对于BA能显著促进绿苗分化, 更值得引起重视, 对于其机理, 我们正在进一步探讨。

参 考 文 献

- (1) 梁海曼等, 1980: 花药培养中花粉去分化启动条件及药壁变化的研究。植物生理学报, 6: 19—27
- (2) 钟华鑫、梁海曼, 1981: 药壁对花粉去分化的影响。杭州大学学报(自然科学版), 8: 187—195
- (3) 方国伟、梁海曼, 1984: 不同pH值下预培养水稻花药对花粉愈伤组织分化绿苗的影响, 植物生理学通讯, (3): 36—38
- (4) 方国伟、梁海曼, 1985: 低温预处理影响水稻花药培养效率的机理初探。植物生理学报, 11: 366—380
- (5) 钟华鑫等, 1987: 低温预处理影响籼稻花药培养效率的研究。植物生理学报, 13: 144—153
- (6) 河北农业大学总校园艺系选种教研室, 1977: 在观察蔬菜作物染色体上丙酸—铁—洋红—水合三氯乙醛(PICCH)染色新技术。遗传学报, 4: 82—83

EFFECT OF BENZYLADENINE (BA) ON THE DEGENERATION OF THE ANTHWER WALL TISSUE AND THE FREQUENCY OF SHOOT REGENERATION FROM CULTURED ANTHERS OF HORDEUM VULGARE L.

Zhong Huaxin, Zhou Juhua, Zhang Feilian and Liang Hai man
(Department of Biology, Hangzhou University, Hangzhou 310012)

Abstract The upper leaves of anther donor plants of barley bearing anthers at the early uninucleate stage of pollen were sprayed with 20ppm BA containing 0.1% Tween-80. The effects of BA-spraying on anther cultures were as follows: 1) treated with BA, the degeneration of wall tissue of cultured anthers was delayed. 2) The number of dead pollen grains appeared to decrease and that of binucleate and multinucleate pollen grains increased. 3) Although the percentage of callusing anthers was not influenced by the BA-treatment, 4) the growth of calli and percentage of green shoot differentiation from pollen calli were evidently enhanced.

Key words *Hordeum vulgare*; anther culture; BA pretreatment; tapetum layer; androgenesis

图版说明

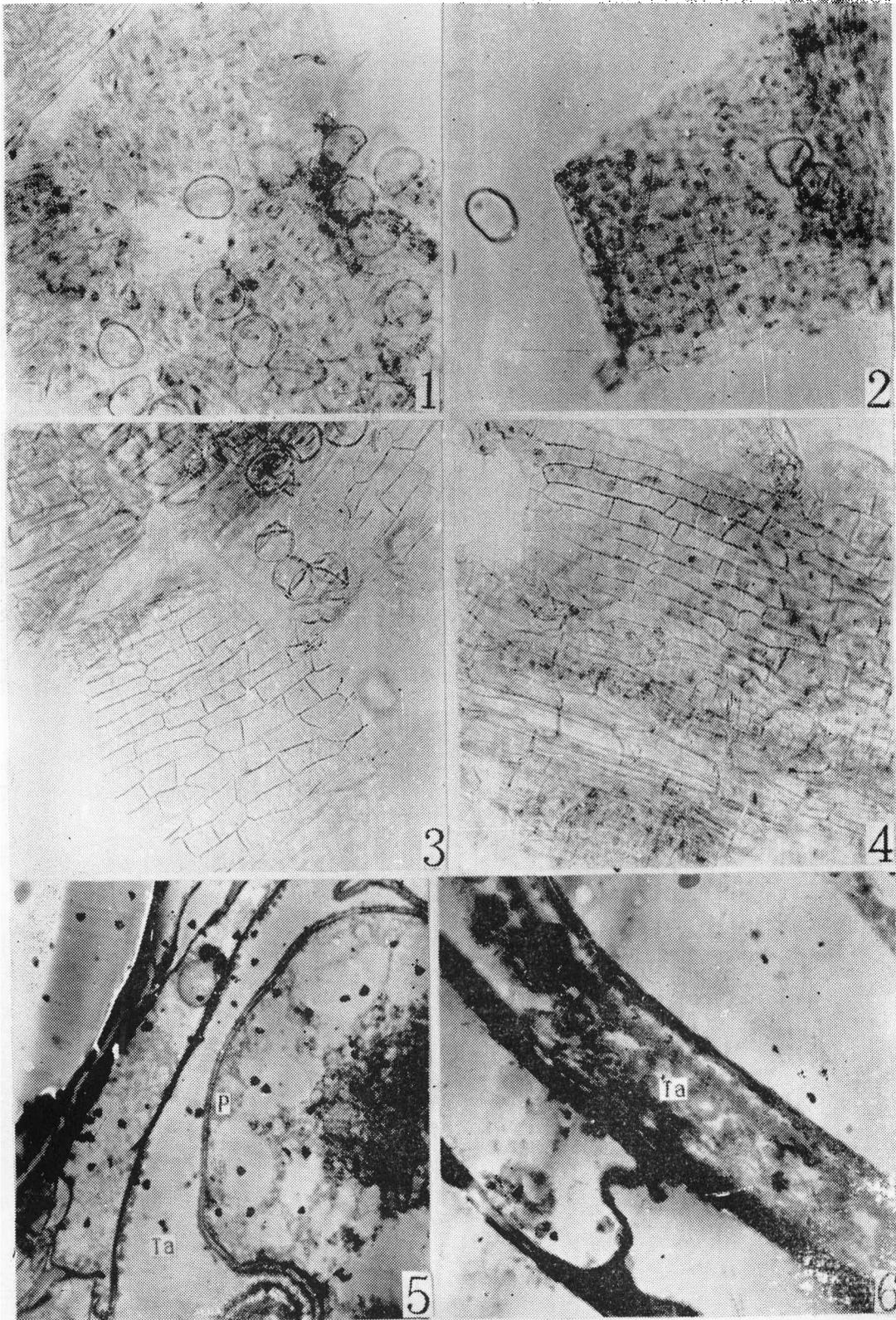
1. 对照花药的药壁构造(×50)。
2. BA处理花药的药壁构造。(×50)。
3. 培养10天后的对照花药药壁构造(×50)。
4. 培养10天后的处理花药药壁构造。
5. 培养10天后的对照花药药壁的超微结构(×2000)。
6. 培养10天后的BA处理花药药壁的超微结构(×2000)。(Ta表示绒毡层; p表示花粉细胞)

钟华鑫等: BA对大麦花药培养中药壁的衰退和植株再生频率的影响

图版 I

Zhong Huaxin et al.: Effect of benzyladenine (BA) on the degeneration of the anther wall tissue and the frequency of shoot regeneration from cultured anthers of *Hordeum vulgare* L.

Plate I



See explanation at the end of text