

不同预处理方法对大麦花药-花粉培养的影响

李文泽

(莱阳农学院农学系, 山东莱阳 265200)

胡含

(中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

摘要 研究了甘露醇预处理的适应性以及 pH 值对甘露醇预处理效果的影响; 并首次将山梨醇预处理应用到大麦花药培养中, 获得理想的实验结果。第一, 采用甘露醇预处理, 17 种材料平均愈伤组织诱导率为 20.67 块/花药, 绿苗产量为 2.46 株/花药。第二, 甘露醇预处理溶液的 pH 值不同, 其预处理的效果也不同。其中, 愈伤组织诱导率和绿苗产量均以 pH 5.6 最高。第三, 不同浓度(0.1—0.5mol/L)的山梨醇预处理 3 天绿苗产量差异不显著; 但同一浓度(0.3mol/L)山梨醇预处理不同天数(1—7 天)绿苗产量差异极显著, 以 3 天处理效果最好, 绿苗产量是对照的 51.2 倍。

关键词 大麦, 预处理, 甘露醇, 山梨醇, pH 值

Effects of the Different Pretreatment Methods on Barley (*Hordeum vulgare* L.) Anther Culture

Li Wenzc

(Dept. of Agronomy, Laiyang Agricultural College, Laiyang, Shandong 265200)

Hu Han

(Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing 100101)

如果花药或花粉从植株上取下直接接种进行培养, 愈伤组织诱导率及绿苗产量都非常低⁽⁶⁾。如果花药在接种以前或以后采用适当的方法进行预处理, 能使绿苗产量成百倍至千倍的增加^(1, 2)。在花药培养中被采用的预处理方法很多, 包括高温预处理、低温预处理、离心、射线及甘露醇预处理等方法⁽³⁾。具体采用什么方法因材料而异。在大麦花药培养中, 主要采用低温预处理⁽¹⁾和甘露醇预处理⁽²⁾。李文泽等⁽²⁾报道采用低温预处理可以使大量材料获得较高的绿苗产量。目前, 关于甘露醇预处理的研究只限于单一材料(Igri), 表现作用效果极好, 并且比采用低温预处理可以缩短实验周期 30—45 天⁽²⁾。但是, 甘露醇预处理是否也适合于大麦材料, 至今无研究报道。本文研究了甘露醇预处理的适应性以及预处理溶液的 pH 值对处理效果的影响, 并首次将山梨醇预处理应用到大麦花药培养中, 提高了花药培养效果, 为阐明小孢子脱分化的机理提供依据。

1 材料与方法

甘露醇预处理的适应性实验采用 17 种材料(表 1), 其它所有实验处理均以普通大麦(*Hordeum vulgare* L.)品种 Igri 为材料进行研究。供试材料于 1992 年和 1993 年 3 月上旬播种于中国科学院遗传所实验田。5 月初开始取材。取材的适宜时期为单核中期。山梨醇预处理从大田取适宜时期的材料, 经消毒后, 将花药直接接种到含有 1ml 不同浓度的山梨醇溶液的培养皿(30×15mm)内, 预处理 1—7 天, 花药接种密度为 60 枚/ml。然后吸出山梨醇溶液, 加入 1ml 新鲜诱导培养基进行培养。甘露醇预处理的具体方法和诱导培养基、分化培养基的成份以及实验所采用的参数同李文泽等⁽²⁾报道。

2 结果与讨论

2.1 甘露醇预处理适应性研究

17 种供试材料经过 0.3mol/L 甘露醇预处理 3 天, 其愈伤组织诱导率、绿苗分化率及绿苗产量均存在明显差异(表 1)。愈伤组织诱导率最高的材料为 Igri, 达到 38.00 块/花药; 最低的材料为 [(韭崎 10 号 × 甘木二条) × 韭崎 10 号] × 韭崎 10 号 F₁, 仅能产生 3.94 块/花药。绿苗分化率以 [(甘木二条 × Igri) × Igri] × Igri F₁ 最高, 达到 24.47%; 最低的材料为 [(鬼怒 1 号 × 早熟 3 号) × 鬼怒 1 号] × 鬼怒 1 号 F₁, 仅有 2.00%。而绿苗产量以 Igri 为最高, 达到 7.45 株/花药; 最低的材料为 [(韭崎 10 号 × 甘木二条) × 韭崎 10 号] × 韭崎 10 号 F₁, 仅为 0.13 株/花药。

17 种材料平均愈伤组织诱导率为 20.76 块/花药, 绿苗分化率为 10.56%, 绿苗产量为 2.46 株/花药。

表 1 甘露醇预处理的适应性

材 料	接 种 花药数	愈伤组织 诱导率	绿 苗 分化率(%)	白 苗 分化率(%)	绿 苗 产 量	白 苗 产 量
Igri	300	38.00	19.60	13.07	7.45	5.00
Igri × Harrington F ₁	300	28.20	13.33	5.00	3.76	1.41
Harrington × Igri F ₁	240	34.78	4.35	2.17	1.51	0.76
Igri × 甘木二条 F ₁	300	31.58	16.00	9.33	5.05	2.95
甘木二条 × Igri F ₁	300	21.64	9.78	3.26	2.12	0.71
Igri × 韭崎 10 号 F ₁	240	13.55	13.73	3.92	1.86	0.53
韭崎 10 号 × Igri F ₁	300	22.66	10.31	1.03	2.34	0.23
早熟 3 号 × Igri F ₁	300	17.99	14.58	1.04	2.62	0.19
[(Harrington × Atias) × Atias] × Atias F ₁	300	21.05	2.07	7.59	0.25	0.91
[(Harrington × Atias) × Harrington] × Harrington F ₁	300	19.87	6.56	4.92	1.30	0.98
[(韭崎 10 号 × Igri) × Igri] × Igri F ₁	300	25.49	12.77	2.13	3.25	0.54
[(韭崎 10 号 × Igri) × 韭崎 10 号] × 韭崎 10 号 F ₁	300	8.04	19.04	3.17	1.53	0.25
[(鬼怒 1 号 × 早熟 3 号) × 鬼怒 1 号] × 鬼怒 1 号 F ₁	300	16.23	2.00	4.00	0.32	0.65
[(鬼怒 1 号 × 早熟 3 号) × 早熟 3 号] × 早熟 3 号 F ₁	240	14.78	4.35	2.17	0.64	0.32
[(韭崎 10 号 × 甘木二条) × 韭崎 10 号] × 韭崎 10 号 F ₁	300	3.94	3.33	0	0.13	0
[(甘木二条 × Igri) × Igri] × Igri F ₁	300	29.65	24.47	2.13	7.25	0.63
[(早熟 3 号 × Igri) × 早熟 3 号] × 早熟 3 号 F ₁	300	14.41	3.25	4.07	0.47	0.59
平 均	—	20.76	10.56	4.06	2.46	0.98

2.2 pH 值对甘露醇预处理效果的影响

愈伤组织诱导率以 pH 5.6 最高, 达到 26.40 块/花药, 显著高于其它处理。绿苗产量也以 pH 5.6 最高, 达到 5.59 株/花药, 但同其它处理差异不显著。而绿苗分化率以 pH 6.1 最高, 达到 41.67%, 显著高于其它处理。值得注意的是随着 pH 值增加, 白苗分化率逐渐减小, 其中 pH 5.6 和 pH 6.1 显著低于其它二个处理。与此同时, G/A 值呈上升趋势, pH 6.1 和 pH 5.6 显著高于其它二个处理(表 2)。

2.3 山梨醇预处理对大麦花药-花粉培养的影响

2.3.1 不同浓度的山梨醇预处理对培养效果的影响

不同浓度的山梨醇预处理 3 天, 其愈伤组织诱导率和绿苗产量都极显著地高于对照, 但是, 3 种浓度之间的差异不显著。愈伤组织诱导率为 53.48—39.47 块/花药, 绿苗产量达到 7.85—6.58 株/花药。但是, 绿苗分化率、白苗分化率及 G/A 值与对照差异不显著。其中绿苗产量最高的处理为 0.3mol/L, 是对照的 60.4 倍(表 3)。

表2 pH值对甘露醇预处理效果的影响¹⁾

pH 值	接种花药数	愈伤组织诱导率	绿苗分化率 (%)	白苗分化率 (%)	绿苗产量	白苗产量	G/A 值
4.6	480	16.72	30.43	17.39	5.09	2.91	1.7
5.1	480	10.63 ^{ns}	30.77 ^{ns}	11.54 ^{ns}	3.27 ^{ns}	1.23 ^{ns}	2.7 ^{ns}
5.6	480	26.40 ^a	21.17 ^{ns}	4.38 ^a	5.59 ^{ns}	1.16 ^{ns}	4.8 ^a
6.1	480	12.01 ^{ns}	41.67 ^a	8.33 ^a	5.00 ^{ns}	1.00 ^{ns}	5.0 ^a

1) ns: 不显著; a: $P < 0.05$.

表3 不同浓度山梨醇预处理对绿苗产量的影响¹⁾

处理方法	接种花药数	愈伤组织诱导率	绿苗分化率 (%)	白苗分化率 (%)	绿苗产量	白苗产量	G/A 值
CK	360	0.68	19.05	14.29	0.13	0.10	1.3
0.1mol/L	300	53.48 ^b	14.17 ^{ns}	10.83 ^{ns}	7.58 ^b	5.79 ^b	1.3 ^{ns}
0.3mol/L	480	46.69 ^b	16.81 ^{ns}	13.27 ^{ns}	7.85 ^b	6.20 ^b	1.3 ^{ns}
0.5mol/L	300	39.47 ^b	16.67 ^{ns}	8.33 ^{ns}	6.58 ^b	3.29 ^b	2.0 ^{ns}

1) ns: 不显著; b: $P < 0.005$.

2.3.2 山梨醇预处理不同天数对培养效果的影响

愈伤组织诱导率以3天最高, 达到39.95块/花药, 是对照的58.8倍。预处理1天只能得到很少的愈伤组织(0.04块/花药)。绿苗产量仍以3天处理最高, 达到6.66株/花药; 次之为5天处理, 达到4.92株/花药, 分别是对照的51.2倍和37.8倍(表4)。

表4 0.3mol/l山梨醇预处理不同天数对培养效果的影响

处理天数	接种花药数	愈伤组织诱导率	绿苗分化率 (%)	白苗分化率 (%)	绿苗产量	白苗产量	G/A 值
CK	360	0.68	19.05	14.29	0.13	0.10	1.3
1天	300	0.04 ^{ns}	0 ^b	0 ^b	0 ^{ns}	0 ^{ns}	—
3天	420	39.95 ^b	16.67 ^{ns}	6.06 ^b	6.66 ^b	2.42 ^b	2.9
5天	360	30.24 ^b	16.28 ^{ns}	16.28 ^{ns}	4.92 ^b	4.92 ^b	1.0
7天	360	2.23 ^{ns}	0 ^b	0 ^b	0 ^{ns}	0 ^{ns}	—

同低温预处理一样⁽²⁾, 甘露醇预处理也没有消除基因型之间的差异。实验结果为17种材料绿苗产量达到0.13—7.45株/花药, 平均达到2.46株/花药。这表明, 甘露醇预处理也可以使大量材料获得较高的绿苗产量, 该培养技术已达到实用标准。由于甘露醇预处理比低温预处理能缩短实验周期30—45天, 所以, 它对育种工作更有利。因为培养基的pH值能影响培养物对营养的吸收⁽⁵⁾, 从而影响花药培养的效果⁽⁴⁾。本实验发现, 预处理溶液中的pH值也能影响预处理的效果。当pH 5.6时, 愈伤组织诱导率及绿苗产量都不同程度地高于其它3个处理; 并且G/A值也显著地提高。这表明, 预处理溶液的pH值适当能促进小孢子的分裂启动和进一步发育, 提高愈伤组织的质量。

不同浓度的山梨醇预处理3天对花药-花粉培养最有利, 表现在愈伤组织诱导率及绿苗产量上都显著高于其它处理。但是不同浓度之间的差异不显著, 都显著高于对照。同甘露醇预处理的结果一致⁽²⁾。山梨醇同甘露醇一样, 都不能作为花药培养的碳源, 二者在花药培养中可以维持培养液的渗透压, 同时, 造成花粉细胞的“碳饥饿”, 后者很可能在诱导花粉雄核发育上起着极为重要的作用。

(参考文献下转第10页)

国内报道的少数民族中的较高值。 $p > q$, 符合我国南方民族特点。本文结果与骆毅等⁽¹⁾报道的德昂族 ABO 系统分布相比(O 型 36.46%, A 型 23.09%, B 型 32.48%, AB 型 7.96%, $r = 0.6024$, $p = 0.1695$, $q = 0.2281$), 二者表型分布在统计学上并无显著性差异($P > 0.1$)。

2.2 MNSs 系统

德昂族的基因频率 $m > n$, $s > S$, 这与全国绝大多数少数民族的结果是一致的。但基因频率 $m(0.6500)$ 低于云南所有其它少数民族, 如怒族(0.7720)、独龙族(0.7150)⁽⁴⁾、傣族(0.7594)、景颇族(0.8084)和佤族(0.8304)⁽⁵⁾。德昂族的基因频率 $S(0.02)$ 在云南省已调查的民族中是最低的, 在全国其它民族中是较低的。在各单倍型频率中, M_s 最高, N_s 次之, MS 第三, NS 为零。造成 NS 连锁率为零的原因可能是基因频率 S 太低, 加之调查样本不大, 以致没有发现 $NNSS$ 、 $NNSs$ 和 $MNSS$ 型。

2.3 Rh 系统

100 例受检者中无一例是 Rh(-D) 阴性, 说明德昂族的 Rh(-D) 阴性率是很低的, 符合我国南方人群特点。Rh 系统在德昂族中分布的又一特点就是未查到 $ccDcc$ 型, 而有 69 人是 $CCDcc$ 型, 其 CDe 频率高达 0.8250, 仅次于台湾高山族中的阿美(0.870)和阿泰雅(0.843)两族⁽⁷⁾ 以及广西仡佬族(0.8303)⁽³⁾。这与我国 Rh 系统分布特点南方民族 CDe 频率高而北方民族低相一致。

2.4 P 系统

在所调查的 100 人群中, 发现 $P_1(+)$ 型 25 人, $P_1(-)$ 型 75 人。 P_1 基因频率为 0.1340, P_2 基因频率为 0.8660。文献资料表明, 我国南方民族的 P_1 基因频率普遍较低, 德昂族也符合这特征。

从上分析可看出, 德昂族的 ABO、MNSs、Rh 和 P 系统的分布特点是 r 、 m 和 CDe 频率较高, 而 S 、 P_1 和 Rh(-D) 频率却较低, 具有南方民族红细胞血型分布的典型特征。

参 考 文 献

- (1) 骆毅等, 1990. 云南德宏傣、景颇、阿昌、德昂族先天性遗传性疾病及健康情况调查研究, 云南德宏州: 德宏民族出版社, 39—43.
- (2) 赵桐茂, 1987. 人类血型遗传学, 北京: 科学出版社, 231—234.
- (3) 袁义达等, 1985. 中华血液学杂志, 6: 93.
- (4) 金锋等, 1988. 遗传与疾病, 5(4): 236.
- (5) 血型调查组, 1980. 中华血液学杂志, 2: 352.
- (6) Mourant A E, *et al*, 1976. The Distribution of the Human Blood Groups and Other Polymorphisms, 2ed. Oxford: Oxford University Press, 49—56.
- (7) Nakajima H, *et al*, 1971. Jap. J. Hum. Genet., 16: 57.

本文于 1994 年 6 月 16 日收到。

* * * * *

(上接第 7 页)

参 考 文 献

- (1) 黄斌, 1985. 植物学报, 27(3): 439—443.
- (2) 李文泽等, 1992. 科学通报, 37(10): 935—938.
- (3) 李文泽等, 1995. 遗传, (增刊): 9—12.
- (4) Barrow J R, 1986. Plant Cell Reports, 5: 405—408.
- (5) Minocha S C, 1987. Cell and Tissue Culture in Forestry Voll (Bonga J M, *et al* eds), Martinus Nijhoff, Dordrecht, pp. 125—141.
- (6) Sunderland N, 1978. Proc. Symp. Plant Tissue Culture, Beijing, Sci. Press, pp. 65—85.

本文于 1995 年 1 月 9 日收到。