

花药离体培养中若干问题的研究进展

刘国民

(海南大学农学院, 海口 570028)

摘要 本文对花药离体培养中小孢子雄核发育、花粉二型性及异常花粉的胚胎发生潜力、以及变温处理的效果、作用机制等方面的研究进展进行了系统综述, 并就某些问题提出了笔者的看法.

关键词 花药离体培养; 雄核发育; 花粉二型性; 变温处理

中国图书资料分类法分类号 S 336

0 引言

1954年, 美国密执安大学的科学家 C. D. Laker 最初提出了培养高等植物花粉的设想, 以便探索花粉在离体条件下的生长潜力^[1]. 1964年, Guha 和 Maheshwari 最先在被子植物毛叶曼陀罗 (*Datura innoxia*) 的花药培养中获得了胚状体; 1966年, 他们通过细胞学观察进一步证实这些胚状体是起源于花粉细胞的单倍体^[1~7]. 由于大量获得单倍体植株对于育种实践以及对于遗传学、细胞学、细胞生物学以及植物生理学等方面的基础研究均具有重要意义, Guha 等人的发现引起了各国学者的广泛注意. 近30年来, 花药离体培养的研究进展很快, 目前已经由200多种植物通过花药培养获得了单倍体植株, 其中以茄科和禾本科居多. 我国在花药培养这一研究领域, 特别是在应用方面, 目前处于国际领先地位. 在已获得花粉植株的200多种植物中, 有1/4的物种是在我国首先取得成功的.

花药培养涉及到多学科内容. 限于篇幅, 本文不打算对这一领域的研究进展作一全面的文献综述, 只就几个重要问题的进展作适当介绍, 并在讨论某些问题时提出笔者的一些看法.

1 花药离体培养中小孢子的雄核发育

目前, 多数学者习惯把小孢子或花粉沿孢子体途径发育成为花粉植株的过程称为“雄核发育”(androgenesis). 这个定义与雄核发育的原始定义有出入. 在 R. John Little 和 C. Eugene Jones 合编的《A Dictionary of Botany》中, androgenesis 一词是指单雄生殖(或称孤雄生殖), 即在雌雄配子结合前, 卵细胞解体, 由精子发育成新个体. 因此, 这些个体是单倍体, 只有父本的染色体. Maheshwari (1950) 将雄核发育一词定义为“精子在卵细胞质中发育成为单性胚”^[8], 其含义与《A Dictionary of Botany》中的定义相同. 国内有的学者主张用“花粉胚胎发生”(Pollen embryogenesis) 来表示由小孢子或花粉发育成为花粉植株的过程(黄斌, 1988)^[4]. 不过, 鉴于“雄核发育”一词已在花药培养研究领域通用, 本文仍沿用“雄核发育”来表示这一过程.

早期关于小孢子雄核发育的研究工作的主要目的在于摸清由花药培养获得的小植株是花药体细胞起源还是由小孢子起源的问题. 1964年, Guha 和 Maheshwari 由毛叶曼陀罗花药

培养获得单倍体植株后,随即便率先开展了雄核发育的研究工作.1966年,他们观察到由毛叶曼陀罗小孢子形成胚状体的全过程,由此便确定了小植株是起源于花粉.随后,由于花药培养在其他物种上陆续取得了成功^[1~4,6,7,9~13,15~30],人们对小孢子形成花粉植株的形态发生过程进行了比较详细的观察,发现了雄核发育的多种途径,并观察到雄核发育过程中出现一些异常的核行为和有丝分裂,如核融合,核同步分裂,核内有丝分裂等等.这种细胞学上的变异可以解释有时花药培养中产生部分多倍体或混倍体植株的原因,同时,也为人们把出现染色体变异的后代植株应用到作物改良上去提供了细胞学依据^[4].

目前,一般是根据小孢子第一次分裂的情况将雄核发育分为A途径(不均等分裂)和B途径(均等分裂)两大类,其中A途径又可以根据第二次分裂及其以后的情况细分为A-V途径、A-G途径、A-VG途径(又称E途径)及C途径等类型.

1) B途径 小孢子第一次分裂为均等分裂,形成两个大小相近的细胞(或游离核).以后,由这两个细胞(或游离核)连续分裂产生单一类细胞组成的多细胞花粉或多核花粉.这种分裂方式在水稻、小麦、玉米、曼陀罗、杨树物种中均有存在^[4,7,9~14].

2) A途径 小孢子的第一次有丝分裂仍按配子体方式进行,为不均等分裂,形成营养细胞和生殖细胞(或营养核与生殖核).这种途径又可以细分为以下几种类型:

A-V途径 多细胞花粉(或多核花粉)由营养细胞(或营养核)衍生而成,生殖细胞(或生殖核)有时不分裂,有时分裂1~2次.因此,在这类花粉中往往可以观察到生殖细胞(或生殖核)的存在.这种发育途径在小麦^[6,14]、大麦^[15]、黑麦^[11]、小黑麦^[12]、水稻^[16,17]、玉米^[18]、烟草^[1]、颠茄^[4]、辣椒^[19]、以及苧麻^[20]等物种中存在.

A-G途径 即在具有营养细胞和生殖细胞的花粉中,生殖细胞进行多次分裂形成胚状体,营养细胞不分裂,或者仅分裂数次而形成胚柄结构.由生殖细胞形成的细胞群其核致密,染色后着色较深,容易同营养细胞衍生而来的细胞群区分开来.Raghavan(1977)在天仙子中首先发现了这种途径^[21],在水稻和玉米中只观察到生殖细胞的多次分裂,尚未见到胚状体产生.

A-VG途径 又称E途径,即花粉内的营养细胞和生殖细胞独立分裂,形成两类细胞群,各群的子细胞都类似其母细胞.在水稻和玉米中已观察到这种途径的存在^[4].此外,Sunderland等(1980)在大麦中还发现了所谓“分隔单位”(partitioned unit)花粉.在这种花粉中,生殖细胞和营养细胞的共同发育以一种更为特殊的形式表现出来,不仅可以区分为两种细胞群,而且可观察到营养细胞核的游离核区,核之间还可发生融合.营养细胞的分裂常常发展成为胚柄结构,有时也形成胚状体.通常,胚状体由生殖细胞分裂而成,它们不形成游离核区,也不发生核融合^[22].

C途径 生殖细胞和营养细胞通过核融合后共同形成多细胞花粉,故由此产生非单倍体植株.Sunderland等(1977)曾观察到毛叶曼陀罗的生殖核经核内复制,在分裂中期形成双染色体,并与分裂中期的营养核染色体排列在一个赤道板上.由该材料产生的花粉植株得到了三倍体^[23].曾君祉等(1980)在小麦中观察到分裂中期生殖核与营养核靠近,彼此的染色体交错排列的核融合现象^[4].此外,胡含等在小麦的花粉植株中发现有五倍体和十二倍体等植株,并推断是雄核发育过程中发生核融合的结果^[4,9].

根据现有的报道材料来看,大多数植物的雄核发育是多途径的.例如,在水稻中已观察到A-V、A-G、A-VG和B途径^[4,16,17];在小麦中观察到A、B和C途径^[4,9,24,25],潘景丽等(1983)还观察到,在小麦中除了A、B、C途径外,还存在着D-型分裂途径,即均等的生殖性

细胞型:单核花粉第一次有丝分裂后产生两个大小相似、染色质均匀凝聚状的生殖核,它们继续分裂形成多细胞花粉^[14];在大麦中已观察到 A-V、A-VG 和 B 途径^[15,22,26];在玉米中已观察到 A-V、A-VG、A-G 和 B 途^[4,18];等等.产生雄核发育多途径现象的原因是比较复杂的,目前尚无公认的确切解释.笔者认为,不能用单一原因来解释多途径现象的存在,至少,以下三个方面的原因直接或间接地影响到雄核发育的方式:

首先是物种和基因型的原因,这是内因.为什么有些物种有两条、三条甚至四条途径,而另一些物种(如天仙子、颠茄等)只有一条途径?从内因上分析,只能说是与不同的物种有关.此外,在同一物种中,例如小麦,朱至清等(1988)、曾君祉等(1980)由于实验所用的材料不同,则分别报道小麦的雄核发育是以 A 途径为主和以 B 途径为主^[4,9,24].看来,这种差异是由于小麦花药供体植株的基因型不同而造成的.

其次是花药离体后所经遇的处理条件.Nitsch 等(1973)曾报道,在毛叶曼陀曼中,按配子体发育时,小孢子分裂的纺缍体是纵轴垂直于花粉萌发孔对侧的细胞壁;启动雄核发育的小孢子纺缍体其纵轴则平行于萌发孔对侧的细胞壁.低温或其他条件的影响可使纺缍体平行于萌发孔对侧的小孢子数目增多,即有更多的花粉启动雄核发育(B 途径)^[4].

第三是与接种时小孢子所处的发育阶段有关.不少研究者发现,小孢子间期的 G₁期和二胞花粉间期的 G₁期是启动雄核发育的关键时期^[4,22].例如小麦花药培养中接种的通常是单核中、晚期的小孢子,正处于 G₁期.因此,在小孢子的间期受诱导因素的影响,形成以 B 途径(均等分裂)为主的雄核发育方式;而烟草通常接种即将进行有丝分裂的小孢子,接种后不久第一次有丝分裂即完成,故只有下一个细胞周期的 G₁期才能启动雄核发育,所以,其雄核发育以 A 途径(不均等分裂)占优势.何定纲等(1985)用不同发育时期的小麦花药进行试验,结果表明,在单核中、晚期,单核早期及四分体时期的花药中,二核花粉中均等分裂类型的比例分别为 46.4%,64.6%,72.1%^[7].这证实,小麦的雄核发育方式是以 B 途径为主还是以 A 途径为主,确实与接种时小孢子所处的发育阶段有关.

近年来发现,雄核发育过程具有明显的阶段性,这一发现能使提高诱导频率的工作根据发育阶段分步进行,逐步搞清各个阶段的主要因素,使工作一步步深入.例如,陈之征等(1983)在油菜(*Brassic napus*)花药培养中发现,从小孢子发育成肉眼可见的胚状体的过程,可以分为几个明显不同的阶段,各个阶段对培养条件(特别是激素水平、糖浓度及培养温度)的要求明显不同.他们根据雄核发育过程的阶段性对培养方法和程序作了较大改进,大幅度提高了胚状体的诱导率(达 800%以上)^[27].

小孢子雄核发育的研究到目前为止已有近 30 年历史.总的来看,与花药培养中其他方面诸如培养条件的改进、培养基改良以及培养材料的扩大等相比较,进展是比较缓慢的.曾君祉(1988)认为,主要原因是由于雄核发育研究中存在以下三个难以克服的困难:第一,在连体条件下花药内的小孢子处于同一发育途径(配子体途径)的高度同步状态;在离体条件下则转变为多途径发育(配子体途径、不同孢子体途径及其他形式)的不同步状态.第二,花药个体间对培养的反应差异极大.第三,在大多数物种中,诱导小孢子启动雄核发育的频率都很低.第一个困难使得人们难以用一些先进的现代生物学技术去深入研究某些生化过程;后两个困难则往往造成研究结果不一致而众说纷云^[4].然而,研究雄核发育的启动机理又是很重要的,它不仅有助于了解细胞脱分化和再分化的机理,而且对于将花药培养更有效地用于作物改良具有十分重要的意义.;因此,在这一领域中,仍需科学工作者进行大量艰苦的探索.

2. 花粉的二型性及异常花粉的胚胎发生潜力

所谓花粉二型性 (dimorphism) 是指在花粉成熟过程中,除正常花粉群体外,还有一部分异常花粉,其特征是:发育落后,体积一般较小,细胞质稀薄,染色浅.异常花粉在进行第一次有丝分裂时生殖细胞壁不呈弧形而是平直的,营养细胞再分裂;这次有丝分裂有时也可因纺锤体轴向改变而产生均等细胞或均等核.这两种发育方式类似于花药离体培养时小孢子雄核发育的 A 途径和 B 途径. Sunderland (1978) 认为这类异常花粉是潜能的胚胎发生花粉 (potential embryogenic pollen), 并将其命名为 E 花粉;由于这类花粉体积小,故也有人称之为小花粉 (S 花粉, small pollen);又由于其细胞质稀薄,不积累淀粉,染色浅淡或不着色,故还有人称之为不染色花粉 (NS 花粉, nostain pollen).

异常花粉的发现迄今已有一个世纪的历史^[4],但对其胚胎发育潜力的研究则是 70 年代中期才开始的.目前已在多种植物中发现了异常花粉,包括小麦 (*Triticum aestivum*)、大麦 (*Hordeum vulgare* CV. *sabarlis*)、黑麦 (*Secale cereale*)、萱草属 (*Heimerocallis*)、牡丹属 (*Paeonia*)、瑞香属 (*Thymelaea*)、黄精属 (*Polygonatum*)、紫露草属 (*Tradescantia*),等等.

李懋学(1982)在芍药栽培品种“大富贵”中观察到,异常花粉的发育是极不同步的.及至开花时,在同一个花药中几乎无例外地都包含有处于不同发育阶段的异常花粉.经统计,各类异常花粉所占的比例分别为:单核 9.6%;二核 60.5%;三核 29.2%;4~5 核 0.2%.芍药异常花粉的雄核发育既可按 B 途径进行(均等分裂途径),也可按 A 途径进行(不均等分裂途径,同时存在有 A-V、A-G 和 A-VG 途径).而且还观察到由于核融合现象而产生二倍化的异常花粉^[28].

异常花粉产生的原因目前尚无统一的解释. Sunderland (1974, 1978) 曾推测二型花粉产生的内因可能是与减数分裂末期 I 的轴向改变有关,但李懋学(1982)对芍药花粉后期 I、末期 I 的分裂轴向进行观察,并没有看到多种分裂轴向的存在^[28].周俊彦(1980)认为,在正常的连体花药中,少数的小孢子可能由于所处的局部条件的变化(包括遗传方面的或生理上的变化),改变了它们正常的发育途径,后来在连体条件下即形成不正常发育的花粉.

由于在连体花药的花粉中往往可以观察到超数有丝分裂形成多细胞花粉或多核花粉,这种异常花粉与离体培养过程中形成的早期花粉胚在形态上极为相似;而且,在已得到花粉胚的茄科和禾本科植物中都发现有花粉二型性,故有人认为异常花粉是花粉胚的唯一的或重要的来源.尽管这一观点目前仍有争议,但物种间诱导胚状体频率的高低在一定程度上确实受花粉二型性的影响.认为异常花粉启动雄核发育的主要证据有:1)胚胎发生花粉与异常花粉形态大小相近.例如, Sunderland 等(1980)观察到,烟草品种 Burley 胚胎发生花粉平均直径为 24.3 μ ,异常花粉为 24.4 μ ,二者极为接近;而正常花粉则为 35~40 μ (据曾君祉)^[4]. 2)异常花粉出现的频率与胚胎发生花粉的频率有一定相关性.例如, Dele (1975) 在大麦、Horner 和 Street (1979) 在烟草中都观察到异常花粉比例和花药培养中愈伤组织或胚状体诱导率的相关性. 3)胚胎发生花粉和体内异常花粉一样,都具有细胞质稀薄及染色浅等特点. 4)如采用 Percoll 液密度梯度离心,将烟草异常花粉与正常花粉分离开来,然后培养异常花粉,即可获得胚状体 (Rashid 等, 1980).

迄今也发现有许多证据不支持这一观点.例如,目前已有许多学者报道,一些植物的小孢子发育对于环境条件等因素的变化是十分敏感的.花药培养研究工作中的各种处理因素,诸如

低温、离心,甚至简单地将植株从基部剪断插于水中,均可有效地提高花粉胚状体(或愈伤组织)的诱导频率。潘景丽等(1980)在小麦中观察到,当培养基中加入外源激素时,异常花粉百分率剧增,比连体条件下的比率高出数十倍^[10]。如果说具有胚胎发生潜力的花粉在个体发育早期已经确定,那么,在激素的作用下,为什么异常花粉数目会剧增呢?为什么变温处理等措施能够大幅度提高胚状体诱导频率呢?另外,在大多数禾本科植物中,接种的是含有单核中、晚期的花粉,此时花粉间在形态上和着色深度上看不到明显的差异。甚至在培养以后的胚胎发生花粉中,其细胞体积大小和细胞质染色程度等方面与配子体途径的花粉也没有明显的差异(曾君祉,1988)。因此,Dunwell(1978)认为:“不能把异常花粉当作花粉胚唯一的或主要的来源”^[29]。这是有一定科学根据的。

3 变温处理的效果及其作用机制

本文所指的变温处理包括低温预处理、低温后处理以及热击(heat shock)处理。所谓低温预处理,是指在接种之前将材料用零上低温处理一段时间后再行接种;所谓低温后处理,是指花药材料接种之后,先置于低温条件下培养一段时间,然后再移至正常温度下继续培养;热击处理则是指花药材料接种之后,先在较高温度下(一般为30~35℃)培养数天,然后再移至正常温度下继续培养。近年的研究表明,在多数物种的花药培养中,上述几项变温措施均可在不同程度上提高花粉愈伤组织或花粉胚状体的诱导率,或者可以提高花粉植株的再生频率。就现阶段所报道的资料来看,以低温预处理措施应用得较多,其原因,一方面是由于方法简便,另一方面则是效果普遍较好。下面着重讨论低温预处理的效果及作用机制,对于低温后处理和热击只作一般介绍。

自从Nitsch(1973)首次报道用低温处理毛叶曼陀罗的花药能显著提高花粉胚状体诱导频率以来,不少研究者相继在水稻^[4,30]、小麦^[4,31,32]、大麦^[33]、枸杞^[34]等多种作物的花粉培养中获得了类似的结果。目前,低温预处理已成为一项广为采用的提高诱导率的措施。例如,王敬驹(1974)用10℃处理稻穗48h,使花粉愈伤组织的发生频率由对照的7.8%提高到14.3%^[30]。潘景丽等(1975)用3~5℃低温处理离体麦穗48h,在7个培养基组合中,低温处理对愈伤组织的诱导率及成苗率有明显作用,尤其是附加IAA、激动素和酪蛋白水解物的培养基中效果更加显著,愈伤组织诱导率达12.8%,成苗率达8.5%,而对照则为零^[31]。中国科学院遗传研究所(1977)用两种类型的小麦材料(春麦和冬麦)和两种培养基(MS和土豆培养基)试验,所得出的结果是一致的,即采用1~4℃处理48h的材料,其花粉愈伤组织的诱导频率均比对照提高一倍左右;经低温预处理的春麦材料(MS培养基)其愈伤组织诱导率为20.6%,而对照的则为11.7%;经低温预处理的冬麦(土豆培养基)其愈伤组织诱导率为4.2%,而对照的则为8.9%^[32]。

不同研究者在对材料进行低温预处理时所使用的温度有较大的差异,这主要是由于不同材料对处理所需的适宜温度和时间是不相同的。根据现有的报道材料来看,处理温度一般在1~14℃范围内,处理时间最短的只有几个小时,最长的则达30~40天。就不同物种来说,水稻大体在5~10℃,处理3~12天;小麦在1~5℃,处理2~7天;大麦在3~7℃,处理14~15天;玉米在4~8℃,处理7~14天。另一个值得注意的问题是,同样一个材料,由于处理温度不同,所需的适宜处理时间也是不一样的。一般说来,较低的温度需要较短的处理时间,较高的温度则需要较长的时间。例如,王续衍等(1981)在籼稻的花药培养中发现,用3~5℃处理,以10

天为宜;用 6~8 ℃ 处理,以 10~15 天为宜;用 9~10 ℃ 处理,以 15~20 天为宜. 他们发现温度与处理时间之比与愈伤组织诱导率呈直线回归关系,并由此提出了所谓“温时比”概念(据陈英)^[4].

关于低温后处理的研究目前报道不多. 胡忠等(1978)将发育适时的水稻花药接种到培养基上后,先用 8 ℃ 低温处理 4~8 天(后处理),然后再转移到 26 ℃ 培养,结果显著提高了愈伤组织诱导率. 并观察到,对于经过了预处理的材料再进行后处理也同样有效^[9]. 赵成章(1983)在水稻花药培养中发现,用 6~8 ℃ 低温后处理 3~12 天,愈伤组织诱导率和绿苗分化率较对照有所提高;但若用同样的温度和处理时间进行低温预处理,前处理各组的效果明显地高于后处理各组的效果. 这可能是由于花药接种后在处理过程中已有大量花粉死亡(55%),而低温预处理的花药中绝大部分花粉保持存活的缘故^[4].

低温处理能够提高花药培养效率的作用目前已为大家所公认,但对其作用机制,则至今尚无统一解释. 不同研究者往往基于自己的实验结果,强调在某一方面的作用. 笔者认为,低温处理可能是同时在以下几个方面综合影响小孢子的雄核发育过程:

首先,低温处理改变了花药中某些物质代谢过程,使之朝着有利于孢子体发育的方向转变. 例如, H. Krogaard 等(1983)发现,烟草花粉第一次有丝分裂时出现游离氨基酸含量高峰,低温处理时游离氨基酸含量有所增加,这有利于花粉胚的形成(据梁海曼)^[2]. 顾淑荣(1984)观察到,正常的枸杞花药,从四分体中期到单核中期,花药内壁均积累有大量淀粉,而经过低温处理的花药,其壁内的淀粉粒则完全消失^[34]. 物质代谢的改变是通过酶活性和作用方向的改变来实现的. 因为细胞内的物质代谢过程是在酶的催化下进行的,而酶的活性强弱明显地受温度的影响,不同的酶其最适温度范围有所不同,例如,催化淀粉水解为可溶性糖的淀粉磷酸化酶在较高温度下(10 ℃ 以上)活性较弱,而在较低温度下(0~9 ℃)则表现出较强的水解活性,故可促使较多的淀粉水解为可溶性糖,从而为花粉脱分化提供丰富的营养物质. 在常温下,枸杞的花药内壁细胞及花粉内的细胞质分布和蛋白质染色都比较均匀,结构清晰;而经过低温处理后,则其细胞质凝聚、蛋白质染色不均匀,结构亦不清晰^[34]. 所有这些变化,可能均与低温改变了酶的催化活性或作用方向有关.

其次,低温导致花药内源激素水平发生变化. Sunderland (1980)观察到,烟草花药在低温处理过程中内源 ABA 浓度明显上升. 黄斌(1985)在大麦中观察到,经 4 ℃ 低温处理 28 天或 35 天后再接种的花药,培养 42 天后花丝几乎完全不可见;而未经低温处理的花药则具有较长的花丝(>3 mm). 但经高压液相色谱分析,新鲜花药和经过低温处理的花药其 ABA 含量并无明显区别. 据此他推测可能是由于低温处理导致 ABA 以外的其他内源激素的含量发生了变化,进而影响花粉愈伤组织的形成. Guye (1978)观察到,低温可诱导乙烯产生,乙烯产生的迟早和幅度则因品种而异. Cho (1989)认为,大麦的花粉胚胎发生需要适量的乙烯存在^[2]. 低温究竟是导致哪一种或哪一些内源激素的含量发生变化,看来与物种和基因型有关. 这个问题尚需进一步研究.

第三,低温能够在一定程度上抑制花药离体后小孢子的衰败,使小孢子存活的时间延长,从而有较多的小孢子启动雄核发育. 赵成章(1983)研究了低温处理对花药的生理效应,发现在处理的最初 4 天,花药在 6~8 ℃ 低温下的呼吸强度缓慢下降,直到第 15 天基本稳定在 50 $\mu\text{l}/\text{h}/\text{花药}$ 的水平上;而常温下花药的呼吸强度则直线下降,第 15 天降至 17 $\mu\text{l}/\text{h}/\text{花药}$. 这表明,低温预处理可降低花药的呼吸强度,减少物质消耗,延长花药寿命. 黄斌(1982,1985)观察到,

大麦幼穗在适宜的低温处理条件下,绝大多数小孢子保持其活力.例如,经 4℃处理 28 天后,仍有 90%以上的成活小孢子或花粉.在 Sabarlis 大麦品种中,新鲜花药在培养第 7 天已有 90%以上的退化或空瘪花粉,而经过预处理的花药在第 7 天退化空瘪花粉低于 30%^[33].经过预处理的水稻花药在培养过程中花粉退化亦较新鲜花药缓慢.有人甚至发现,水稻的花药在低温处理过程中其重量仍有所增加,并认为所增加的物质是来自其他组织或器官.总的来看,这些反应均有利于抑制花粉的衰败,有利于启动雄核发育.

第四,低温造成小孢子孤立化. Sunderland 等(1984)发现,在低温处理过程中,药壁细胞和绒毡层逐渐溶解解体,经处理后的花药中小孢子与药壁组织和绒毡层极容易分开,而新鲜花药中的小孢子则与绒毡层紧密相连^[35].黄斌(1985)认为,在连体条件下,绒毡层的作用不仅在于给发育中的小孢子提供养料,而且很可能提供指导小孢子沿配子体途径发育的信息.通过低温等手段打破小孢子与绒毡层的密切联系,使小孢子孤立化,很可能对小孢子由配子体发育途径转向孢子体发育途径起着重要作用.

热击处理最初于 60 年代用于动物材料.在高等植物方面,热击处理的研究是 80 年代才逐渐开展的,目前已取得了引人注目的效果. Zapata (1986)发现,用 35℃处理水稻 IR42 的离体小穗 15 min,可以明显提高花药愈伤组织诱导率. Pasa (1987)观察到,用 35℃处理 5 min 后,再在 10℃下进行 7 天低温处理,可以明显提高水稻花药培养的效率,其中高温处理主要是提高了愈伤组织诱导率. Huang (1987) 在小麦花药培养中观察到,如果接种后先在 35℃下培养 8 天,再转入 25℃下继续培养,可以明显提高愈伤组织诱导率和绿苗分化率,尤其是后者;但若最初在 40℃下培养,则导致花药损伤.热击处理对于花药所产生的生理生化效应是多方面的,难以具体认定.目前一般认为,热击是起着抑制原有表达程序,有利于新表达程序启动的作用.因此,应该注意热击后续步骤的配合(据梁海曼).

参 考 文 献

- [印度] B. M. 约赫里主编,张圣章,等译. 维管植物实验胚胎学. 华东师范大学出版社,1986
- 颜昌敬主编. 农作物组织培养. 上海科学技术出版社,1991
- 颜昌敬. 植物组织培养手册. 上海科学技术出版社,1990
- 胡 含,陈 英主编. 植物体细胞遗传与作物改良. 北京大学出版社,1988
- 刘大钧,翁益群. 生物技术与作物育种——现状与潜力. 载《南京农业大学农业生物技术研究进展(1981)》. 1~8
- 曾君 社,欧阳俊闻. 在常温和低温条件下培养的小麦中小孢子的早期发育. 遗传学报,1980,27(5):469~475
- 何定纲,欧阳俊闻. 小麦不同发育时期花药雄核发育的细胞学观察. 植物学报,1985,27(5):469~475
- Maheshwari, P. Introduction to embryology of angiosperms. McGraw Hill, 1950, 317
- 《花药培养学术讨论会文集》编辑小组主编. 花药培养学术讨论会文集(1977). 科学出版社,1978
- 潘景丽,高公私. 再谈激素对小麦花粉细胞早期发育的影响. 植物学报,1980,22(4):305~310
- 孙敬三,朱至清,等. 黑麦 (*Secale cereale* L.) 花药培养及其雄核发育. 植物学报,1978,20(3):210~214
- 孙敬三,王敬驹,等. 小黑麦 (*Triticale*) 雄核发育的细胞学研究. 植物学报,1973,15(2):163~173
- Guha, S. and Maheshwari, S. C. . Cell division and differentiation of embryos in the pollen of *Datura in vitro*, *Nature*, 1966, 212:2057, 97~98
- 潘景丽,高公私,等. 小麦花粉细胞启动分裂的类型及其发育. 植物学报,1983,22(3):211~215
- 周 熾,杨弘远. 大麦花药培养与雄核发育. 植物学报,1980,22(3):212~215
- 渠荣达,陈 英. 水稻雄核发育途径及游离花粉粒培养的活体观察. 植物学报,1984,26(6):580~587
- 杨弘远,周 熾. 水稻花粉两条发育途径的研究. 植物学报,1979,24(4):345~351
- 郭仲琛,孙安慈,等. 玉米花粉植株的诱导和雄核发育的研究. 植物学报,1978,20(3):204~209

- 19 郭仲琛,王玉英,等.烟草(*Nicotiana tabacum*)和辣椒(*Capsicum annum*)花药离体培养的研究.植物学报,1973,15(1):37~48
- 20 刘国民,郑思乡,等.苧麻(*Boehmeria nivea* L.)花药离体培养的研究.I雄核发育的细胞学观察.海南大学学报(自然科学版),1994,12(2):121~128
- 21 Raghavan, V.. Patterns of DNA synthesis during pollen embryogenesis in Henbane. *J. Cell Boil*, 1977,73:521~526
- 22 Sunderland, N. and Vans, L. J.. Multicellular pollen formation in cultured barley anthers. *J. Exp. Bot*, 1980,31(21):501~514
- 23 Sunderland, N. and Dunwell J. M.. Anther and pollen culture. In: *Plant tissue and cell culture*. (Ed. Street, second), 1977,223~226
- 24 朱至清,孙敬三,等.小麦(*Triticum aestivum*)雄核发育的细胞学研究.植物学报,1978,20(1):6~12
- 25 孙敬三,朱至清,等.小麦离体花药中小孢子分裂的电子显微镜观察.植物学报,1983,25(4):295~300
- 26 中国科学院北京植物研究所,黑龙江省农业科学院.植物单倍体育种.科学出版社,1977
- 27 陈之征,陈正华.高频率诱导油菜花粉胚状体的研究.科学通报,1983,(5):300~303
- 28 李懋学.芍药花粉二型性和雄核在体内的发育.植物学报,1982,24(1):17~20
- 29 Dunwell, J. W.. Division and differentiation in cultured pollen. In "*Frontiers of plant tissue culture*". Ed. by T. A. Thorpe Calgary,1978,103~112
- 30 王敬驹,孙敬三,等.水稻花粉植株的诱导及影响诱导频率的某些因素.植物学报,1974,16(1):43~53
- 31 潘景丽,白守信,等.影响小麦(*Triticum Vulgare*)花粉植株诱导频率的几种因素.植物学报,1973,17(2):161~166
- 32 中国科学院遗传研究所 301 组.低温预处理对小麦花药培养的效应.遗传与育种,1977,(4):24~25
- 33 黄斌.大麦花药培养中低温预处理对花粉愈伤组织形成的影响.植物学报,1985,27(3):439~443
- 34 顾淑荣,桂耀林,等.理化因子对枸杞花粉植株诱导频率和花药内淀粉动态的影响.植物学报,1984,26(2):156~162
- 35 Sunderland, N., Huang, B. and Hills, G. J.. Disposition of pollen *in situ* and its relevance to anther/pollen culture. *J. Exp. Bot.*, 1984,35:521~530