科 学 通 报
第 42 卷 第 13 期 Chinese Science Bulletin 1997 年 7 月

【研究简报】

# 小麦花药培养初期高温处理对培养反应的影响

梁 辉 欧阳俊闻 贾双娥 张 弛 贾 旭
(中国科学院遗传研究所,北京 100101)

**关键词** 小麦 花药培养 培养温度

培养温度是花药培养的一个重要影响因素. 过去我们曾在这方面做过比较详细的研究[1]. 观察到小麦花药培养对培养温度的反应是比较复杂的,既随基因型的不同而有一些差异[1],也随花药供体植株的生长条件的不同而不同[2]. 对小麦花药培养初期的高温处理的效

---

一步证实.

实验还发现,在初级精母细胞核分裂过程中,部分核物质可以以极体的形成排出卵质,称之为"雄性极体",由于雄性极体可随机地在第一次或第二次或两次分裂过程中排出,所以导致多个原核的卵子形成. 如图 2,在两次分裂过程中均无雄性极体排出,则发育为 5 PN 卵子,其中 4 个原核来自初级精母细胞,1 个来自卵母细胞(图 2(a));在两次分裂过程中各排出一个雄性极体,则发育为双原核卵子,这种类型的卵子可以正常发育(图 2(e)). 另外,还有部分卵子可将整个初级精母细胞或卵母细胞核装配为极体排出卵外,形成 1 个原核的卵子(图 2(f)),或无原核卵子.

可见,细胞周期对初级精母细胞核的变化起重要调控作用,调节卵母细胞的周期,使初级精母细胞的受精卵发育至双原核的比率增加,可能获得正常的后代,这为解决精子形成障碍的男性不育和生产转基因动物及野生珍稀动物遗传资源保护提供了新的思路,同时为受精生物学理论增加了新的内容.

**致谢** 本工作为中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点试验室资助项目.

## 参 考 文 献

1 Ogura A, Yanagimachi R. Round spermatid nuclei injected into hamster oocytes form pronuclei and participate in syngamy. Biol Reprod, 1993, 48: 219~225
2 Ogura A, Yanagimachi R, Usui N. Behavior of hamster and mouse round spermatid nuclei incorporated into mature oocytes by electrofusion. Zygote, 1993, 1: 1~8
3 Ogura A, Matsuda J, Yanagimachi R. Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatids. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 7 460~7 462
4 Kimura Y, Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injected with secondary spermatocytes nuclei. Biol Reprod, 1995, 53: 855~862
5 Edwards R G. Cell cycle factors in the human oocyte and the intracytoplasmic injection of spermatozoa. Reprod Fert Devel, 1995, 7: 143~153

(1996-08-28 收稿,1996-11-06 收修改稿)

果也做过一些初步研究[1]. 梁思信和胡含[1)]、黄斌[3]、李宏潮[4]、胡琳等[5]也在这方面做过一些研究. 但在以上研究中,不是高温处理的温度还不够高(低于 33℃),便是高温处理后的后续培养温度(也是对照温度)太低(25℃或 26℃). 因此近两年来我们又在这方面做了一些进一步的研究,取得了一些有意义的新结果.

## 1　材料与方法

(ⅰ)材料. 所用材料均为 *Triticum aestivum L.*, 包括 4 个春小麦材料:欧柔、京红 5 号和花粉株系晋 18-12、卡 5868;2 个冬小麦材料:丰抗 2 号和品系 15-71.

(ⅱ)花药培养方法. 基本的花药培养方法与前文[1]所述相同. 但所用花药培养基为我们实验室研制的 $W_{14}$培养基[2)]. 分化培养基仍为改良 MS 培养基[1].

(ⅲ)实验处理. 本文报道两次实验的结果. 实验 1 设 33℃培养 1 d 和 36℃培养 1 d 两个高温处理. 高温处理后一律转 28℃培养,以 28℃连续培养为对照. 每处理(包括对照)设两次重复. 每次重复接种花药 350～650 枚. 使用的材料为温室栽培的欧柔、晋 18-12、卡 5868. 实验 2 设 34℃培养 1, 2, 3, 5 d 等 4 个处理. 高温处理后均转 30℃培养,以 30℃连续培养为对照. 每处理设两次重复,每次重复接种花药 320～420 枚. 所用材料为大田栽培的丰抗 2 号、15-71、京红 5 号. 培养温度用上海周浦仪器厂生产的温度计测量. 此种温度计的读数与日本医化仪器公司的培养箱(Biotron)所带温度计的读数相差不超过 0.5℃. 一般同时用 3 至 4 个温度计测量,取其平均值做为准确的读数.

(ⅳ)实验结果的计算与统计. 实验中记录和计算 3 种结果:(1) 花粉愈伤组织(包括胚状体)产量:每 100 个花药产生的花粉愈伤组织数;(2) 绿(白)苗分化率:每 100 块愈伤组织中能分化绿(白)苗的愈伤组织数;(3) 绿苗产量:每 100 个花药产生的能分化绿苗的愈伤组织数. 花粉愈伤组织产量和绿苗产量均用最小显著极差法做统计分析;绿(白)苗分化率用卡平方法做统计分析.

## 2　结果

### 2.1　实验 1

表 1 中的数值是 3 个基因型的数值的平均值,但接种花药数则是 3 个基因型的花药数的总和. 从表 1 可以看出,尽管高温处理的时间只有 1 d,但高温处理的效果还是很明显的. 经处理后,花粉愈伤组织产量均显著下降,而且下降的幅度随温度的提高而明显加大. 但表 2 的结果显示,高温处理后绿苗分化率一般都有大幅度的提高,而白苗分化率一般都有所降低,表明高温处理能提高愈伤组织的质量. 在 33℃ 1 d 的处理中,由于其绿苗分化率提高的幅度远

表 1　不同高温处理后花粉愈伤组织和花粉绿苗的平均产量(实验 1)[a)]

| 处理 | 接种花药数 | 花粉愈伤组织产量 | 绿苗产量 |
|---|---|---|---|
| 28℃ (CK) | 3 033 | 30.2 a | 1.8 a |
| 33℃ 1 d 转 28℃ | 3 193 | 24.5 b | 3.7 b |
| 36℃ 1 d 转 28℃ | 3 193 | 4.7 c | 0.5 a |

a)在每一纵行内的数值中凡带有相同英文字母者表示它们之间无显著差异($p<0.05$)

1) 见中国科学院遗传研究所研究工作年报, 1983, 25

2) 中国科学院遗传研究所研究工作年报, 1987～1988, 91～92

大于其愈伤组织产量下降的幅度,所以最终其绿苗产量比对照明显提高(表 1). 在 36℃ 1 d 的处理中情况就不同了. 由于其愈伤组织产量下降的幅度太大,即使绿苗分化率有所提高,其最终的绿苗产量还是有所降低,尽管其差异尚未达统计学上显著的标准.

表 2 不同高温处理对绿(白)苗分化率的影响(实验 1)[a)]

| 基因型 | 处理 | 愈伤组织数 | 绿苗分化率 | 白苗分化率 |
|---|---|---|---|---|
| 欧柔 | 28℃ (CK) | 510 | 7.5 a | 23.5 a |
| | 33℃ 1 d 转 28℃ | 405 | 18.3 b | 16.3 b |
| | 36℃ 1 d 转 28℃ | 78 | 10.3 ab | 21.8 ab |
| 晋 18-12 | 28℃ (CK) | 327 | 4.9 a | 18.4 a |
| | 33℃ 1 d 转 28℃ | 358 | 10.1 b | 10.3 b |
| | 36℃ 1 d 转 28℃ | 78 | 14.1 b | 10.3 ab |
| 卡 5868 | 28℃ (CK) | 49 | 4.1 a | 16.3 a |
| | 33℃ 1 d 转 28℃ | 43 | 20.9 b | 18.6 a |
| | 36℃ 1 d 转 28℃ | 8 | 0* | 12.5* |

a) 在每一基因型的每一纵行内的数值中凡带有相同英文字母者表示它们之间无显著差异($p<0.05$), * 示未参与统计分析

## 2.2 实验 2

在本实验中,高温处理的温度均为 34℃,但处理时间变动于 1～5 d. 试验结果表明,经高温处理后花粉愈伤组织产量大幅度降低,并且有随处理天数的增加而更加降低的趋势. 绿苗产量也有随高温处理时间的延长而降低的趋势,只是降低的幅度没有愈伤组织产量的降低那么大(表3).这是因为各处理的绿苗分化率都有所提高,而且提高的幅度在各处理间又没有差异的缘故

表 3 不同时间的高温处理后花粉愈伤组织和花粉绿苗的平均产量(实验 2)[a)]

| 处理 | 接种花药数 | 花粉愈伤组织产量 | 绿苗产量 |
|---|---|---|---|
| 30℃ (CK) | 2 201 | 73.2 a | 10.9 a |
| 34℃ 1 d 转 30℃ | 2 201 | 32.0 b | 8.0 ab |
| 34℃ 2 d 转 30℃ | 2 201 | 26.4 bc | 6.5 b |
| 34℃ 3 d 转 30℃ | 2 081 | 24.9 bc | 5.8 b |
| 34℃ 5 d 转 30℃ | 2 201 | 15.7 c | 3.5 b |

a) 在每一纵行内的数值中凡带有相同英文字母者表示它们之间无显著差异($p<0.05$)

表 4 不同时间的高温处理对绿(白)苗分化率的影响(实验 2)[a)]

| 基因型 | 处理 | 愈伤组织数 | 绿苗分化率 | 白苗分化率 |
|---|---|---|---|---|
| 丰抗 2 号 | 30℃ (CK) | 273 | 23.4 a | 5.5 a |
| | 34℃ 1 d 转 30℃ | 202 | 37.1 b | 4.5 a |
| | 34℃ 2 d 转 30℃ | 193 | 29.5 ab | 8.8 a |
| | 34℃ 3 d 转 30℃ | 119 | 31.1 ab | 7.6 a |
| | 34℃ 5 d 转 30℃ | 85 | 20.0 a | 5.9 a |
| 15—71 | 30℃ (CK) | 300 | 5.2 a | 37.3 a |
| | 34℃ 1 d 转 30℃ | 187 | 20.3 b | 27.3 b |
| | 34℃ 2 d 转 30℃ | 123 | 18.7 b | 24.4 b |
| | 34℃ 3 d 转 30℃ | 43 | 11.6 b | 20.9 b |
| | 34℃ 5 d 转 30℃ | 75 | 13.3 b | 25.3 ab |
| 京红 5 号 | 30℃ (CK) | 404 | 17.1 a | 30.2 ab |
| | 34℃ 1 d 转 30℃ | 308 | 21.1 ab | 37.0 a |
| | 34℃ 2 d 转 30℃ | 257 | 24.5 b | 35.8 a |
| | 34℃ 3 d 转 30℃ | 307 | 25.4 b | 33.6 ab |
| | 34℃ 5 d 转 30℃ | 172 | 28.5 b | 25.0 b |

a) 在每一基因型的每一纵行内的数值中凡带有相同英文字母者表示它们之间无显著差异($p<0.05$)

(表 4). 在本实验中高温处理导致的白苗分化率的变化在多数情况下都不甚规律. 只在 15-71 这个材料中表现高温处理后的白苗化分率有明显的降低,与实验 1 的结果类似.

## 3 讨论

在本研究中的一个鲜明的结果是经高温处理后花粉愈伤组织的产量均大幅度降低. 这与过去报道中经高温处理后花粉愈伤组织产量一般都有所提高或至少不会降低的结果是不相同的[1,4,5]. 这可能与本研究所用的高温温度较高(大于 33℃)有关,或与本研究所用的对照温度(28℃或 30℃)比过去使用的对照温度(25℃或 26℃)较为合理有关(因为 28～30℃比 25～26℃有较高的花粉愈伤组织产量[1]).

本研究的另一个值得注意的结果是几乎所有的高温处理都有提高绿苗分化率的作用. 只在 36℃ 1 d 和 34℃ 5 d 这两个处理中有个别基因型表现绿苗分化率有所降低,(虽其差异尚未达统计学上显著的标准). 在以 28℃为对照的试验中绿苗分化率的提高几乎都是成倍的. 在黄斌的实验资料中也可看到类似现象[3]. 但在黄斌的实验中高温处理的时间均为 8 d. 我们使用了 1 至 5 d 的多种时间处理,并且观察到在用 34℃做高温处理时,不论是处理 1 d, 2 d 或 3 d, 5 d 其绿苗分化率提高的水平都大致相同,这说明对提高绿苗分化率来说只要在花药培养的最初 1 d 给予高温处理就够了. 很可能小麦花药培养的最初 1 d 是接受高温处理的敏感期. Pechan 等[6]在研究 *Brassica napus* 的游离小孢子培养时观察到,培养的最初 8 h 是接受高温处理的关键时期. 刘公社等[7]在研究大白菜(*Brassica campestris* ssp, *pekinensis*)游离小孢子培养的工作中也看到,小孢子培养的最初 24 h 是接受高温处理的敏感期. 关于小麦花药培养的高温处理是如何影响到所形成的愈伤组织的绿苗分化率的机制以及其中是否有热激蛋白的形成和参与的问题都是值得深入研究的理论问题.

在本试验中只有 33℃ 1 d 这个处理提高了绿苗产量. 还有必要进一步探索能提高绿苗产量的高温处理方式.

**致谢**　感谢郝水先生推荐本文. 本工作为北京市自然科学基金(批准号:5932010)资助项目.

## 参　考　文　献

1 Ouyang J W, Zhou S M, Jia S E. The response of anther culture to culture temperature in *Triticum aestivum*, Theor Appl Genet, 1983, 66: 101～109

2 Ouyang J W, He D G, Feng G H, et al. The response of anther culture to culture temperature varies with growth conditions of anther-donor plants, Plant Science, 1987, 49: 145～148

3 Huang B. Effects of incubation temperature on microspore callus production and plant regeneration in wheat anther culture. Plant Cell, Tiss, Org Culture, 1987, 9: 45～48

4 Li H C, Qureshi J A, Kartha K K. The influence of different temperature treatment on anther culture response of spring wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Science, 1988, 57: 55～61

5 胡琳,许为纲,赵向科. 提高小麦花粉植株诱导频率的研究. 西北农业大学学报,1990,18(4):23～27

6 Pechan P M, Bartels D, Brown D C W, et al. Messenger-RNA and protein changes associated with induction of *Brassica* microspore embryogenesis, Planta, 1991, 184: 161～165

7 刘公社,李 岩,刘 凡,等. 高温对大白菜小孢子培养的影响. 植物学报,1995,37(2):140～146

(1996-09-10 收稿,1997-01-06 收修改稿)