

研究简报

马铃薯花粉粒的分离培养 和愈伤组织的形成

左秋仙 李淑媛 林自安 金德敏

(中国科学院遗传所)

1 引言

建立单细胞、单花粉培养为完整植株的实验体系, 对于研究高等植物的遗传变异与作物改良有着重要的意义。1964年印度人^[1]首次通过花药培养获得了单倍体花粉植株。近20年来, 很多研究者又相继将60多种植物诱导出完整的花粉植株, 此后, 单花粉培养的研究更加引起遗传学家和农学家的关心和重视。因为高等植物的小孢子兼有单倍体、单细胞和天然分散性等特点, 遗传学家和植物育种家可以象微生物学家那样, 利用它的特有状态进行遗传研究和品种改良, 诸如外源遗传物质的导入, 高等植物抗病突变体的细胞水平选择等。所以, 单花粉培养的突破不但为高等植物在细胞及分子水平的遗传学研究提供有效的实验体系, 而且还将为植物育种开辟一条新的途径。

离体花粉培养开始于1953年^[2]。近10多年来, 许多学者在单花粉培养方面进行了广泛的研究。在国内, 不仅已从烟草^[3]、茄子^[4]等双子叶植物中, 而且能从水稻^[5]等较难培养的不木科植物中获得再生植株。关于马铃薯的花粉培养研究者甚少, 至今未见成功的报道。近年来, 我们以栽培种四倍体马铃薯为材料进行了试验, 获得愈伤组织, 与此同时, 还对影响花粉启动、发育和愈伤组织

形成的因素进行了研究。现将试验结果报告如下。

2 材料与方法

2.1 材料

京丰1号、科造68—62、D TO—33等10多个四倍体栽培种。

2.2 离体花粉的制备方法

2.2.1 机械提取法

按常规方法将花药接种在固体或液体培养基上, 培养一定天数后取出, 置于表面皿上, 加入与培养液等渗的蔗糖溶液, 用注射器内管轻压花药挤出花粉。将上述液体通过孔径为70微米的不锈钢网流入离心管, 花粉及小块药壁残渣即在离心管的液体中, 500转/分离心3~5分钟, 花粉沉淀, 吸出含有小块药壁残渣的上清液弃去。加入蔗糖液振荡, 使花粉悬浮, 然后离心并吸出上清液弃去。这样重复3~4次, 最后再用培养液清洗1次, 取得纯净花粉粒悬液, 用血球计数器计数后接种在培养瓶中进行培养, 接种密度一般为 5×10^4 粒/毫升。

2.2.2 花药漂浮培养自然释放法

将花药接种在液体培养基中, 置于每分

钟100次的摇床上振荡培养,花药裂开,释放出花粉。定期将花药从培养瓶中取出,转入含有新鲜培养液的培养瓶中,在摇床上继续培养,再释放花粉。过一段时间再将这些花药取出。这样,各培养瓶中即得到不同时期由花药自然释放出来的花粉粒,供单花粉培养用。

2.3 培养基

基本培养基为MS培养基,补加的不同成分组或如下:

- ① MS+2.4-D1mg/l+NAA2mg/l+KT0.5mg/l+蔗糖3%
- ② ①+L-氨基酸100mg/l+谷氨酰胺800mg/l+肌醇5g/l
- ③ ①+水解乳蛋白(LH)200mg/l
- ④ ①+100g/l马铃薯水提取液

液体培养基均以0.45μm孔径的微孔滤纸过滤灭菌。

2.4 花粉粒的培养与观察

均采用液体浅层静止培养花粉粒。培养室温度20~25℃。弱光照射。培养过程中花粉粒的发育动态在倒置显微镜下作活体观察。

3 结 果

3.1 花药预培养的作用

花药经过一定时间的预培养后,用机械提取法制备花粉进行培养,花药与花粉培养均用培养基②,每处理8~12个重复,其结果见表1。

由表1可以看到,花药预培养的时间对花粉发育的强烈影响,从预培养3天的花药中分离出来的花粉产生了极少量的未破壁的多细胞团,而从预培养5天的花药中分离出

表1 花药预培养对花粉粒发育和愈伤组织形成的影响*

花药预培养天数	多细胞团的产量**	愈伤组织的产量
3	+	—
5	++	+
7	+++	++
10	+++	++
0	0	0

* 试材为京丰1号; ** “+”于1~5; “++”示6~10; “+++”示11以上

的花粉则获得较多的多细胞团,预培养7~10天的不仅多细胞团数量高,且愈伤组织的产量明显多于前者。说明离体花粉培养中愈伤组织的诱导率与花药预培养的时间有密切关系,二者呈正相关。

未经预培养而从新鲜花药中提取出的花粉经过培养,于7~10天即陆续死亡,未看到花粉细胞分裂。看来花粉细胞的启动和早期分裂可能还脱离不开花药的作用

3.2 不同培养基成分的作用

花蕾在10℃的冰箱中低温处理4~5天后进行花药接种。花药培养5天后用机械提取法制备花粉,并分别接种在前述的4种培养基上进行培养,结果见表2。

表2 不同培养基成分对愈伤组织形成的影响*

培养基	多细胞团产量**	愈伤组织产量
①	—	—
②	++	+
③	—	—
④	++	—

* 试验材料为科选68—62; ** 与表1相同

表2 所列试验结果表明,丝氨酸和谷氨酰胺,尤其是高浓度的肌醇有利于花粉细胞

的分裂(培养基②),而在补加马铃薯提取液的培养基④中的花粉,能形成多细胞团,但却不能破壁并进一步增殖从而成为愈伤组织。马铃薯花药在加有适当比例的MS培养基上即可产生大量愈伤组织,并分化出绿色小植株。但培养花粉粒时,则细胞不能分裂,说明单细胞分裂过程中有更高的营养要求,这些补加物可能是有促进花粉增殖的作用。

3.3 低温前处理的作用

国内外许多学者的研究结果表明,单细胞花粉培养前花药是否经过低温前处理对花粉的发育有强烈影响。我们将马铃薯花蕾用双层湿纱布包好置于10℃的冰箱中处理7~10天后分离花粉进行培养。在坝薯7号和科选87—1两个材料的花粉粒在培养过程中能持续分裂,并获得多细胞团。而从未经低温处理的新鲜花药中分离出的花粉粒,经培养则不能进行分裂,在10天左右即先后死亡。试验结果表明,低温前处理可能在花粉的启动和早期细胞分裂中起重要作用。

4 讨论

4.1 关于药壁组织的作用

离体花粉培养中影响花粉去分化启动的因素目前还不十分清楚。然而许多研究结果证明药壁组织起着最为重要的作用。迄今为止,除曼陀罗[6]、矮牵牛[7]等极少数几个种可直接培养诱导出小植株外,其它研究者从新鲜花粉中直接提取花粉进行培养均未获得成功。陆文梁报道[3],烟草花粉只有在花药中培养3天后,进行离体花粉粒培养时才能产生脱分化启动。Wenzel等[8]报道,黑麦只有从花药培养5~6天中分离出来的花粉才能启动分裂并进一步发育为多细胞团。陈英等[9]的研究结果证明,水稻离体花粉培养

时,只有已经启动的花粉才可能进一步发育,而小孢子的启动必须在花药中进行。我们从新鲜花药中分离马铃薯花粉进行培养也未获得进展,而从经过预培养5天的花药中分离出的花粉培养中诱导出愈伤组织,这些均表明,花粉粒的去分化启动必须由离体培养的花药提供必要的物质,它们脱离不了对药壁组织的依赖。

低温前处理在植物花药和花粉培养中的作用已有很多报道。关于其作用机制与方式目前观点尚不统一,但具有延缓花粉退化、提高花粉细胞同步性等作用则是比较一致的看法。Dienel等[10]报道,一定时间的低温前处理可以代替烟草花粉培养所需的4天左右的花药预培养。陈英等[9]从不经过花药预培养而只经低温前处理的花药中分离出的花粉经培养诱导出绿色植株。我们从经过7天以上的低温前处理而不经预培养的花药中分离的马铃薯花粉经培养获得了多细胞团。

上述事实表明,花粉的启动不仅可以在离体花药培养条件下进行,也可以发生在低温前处理的过程中。在这两种情况下,起关键作用的均为药壁组织。

4.2 花粉粒培养过程中的营养需要

近年来,许多研究者在单花粉培养方面进行了大量研究。Sharp等[11]用番茄培养法,即将接种了番茄离体花粉的滤纸放在番茄花药的上部培养,则滤纸上的离体花粉能启动分裂,并获得无性系。Nitsch等[12]通过对培养若干天的烟草花药提取液的分析,在培养基中补加了丝氨酸、谷氨酰胺和肌醇等营养物质,明显提高了离体花粉培养再生为植株的诱导率,陈英等在MS培养基上补加10~20%马铃薯提取液培养水稻离体花粉[9],再生植株的诱导频率可提高3~6倍。本试验结果也证实了马铃薯提取液和Nitsch等提出的3种补加物对提高诱导频率方面具有一定效果。但就目前的报道来看,培养基的

成分还不是影响花粉去分化启动的直接因素。是否是离体培养过程中培养物吸收培养基中的营养成分而合成的物质, 以及这些物质与培养基成分存在什么关系等, 均有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Guha S and Manashwari S C. *Nature*, 1964, 204: 497~502
- 2 Tulecke W. *Science N Y*, 1953, 117: 559~560
- 3 陆文梁. *中国科学B辑*, 1982, (1): 25~31
- 4 顾淑荣. *植物学报*, 1979, 21(1): 30~35
- 5 王瑞丰等. *遗传学报*, 1979, 6(1): 7
- 6 Nitsch C and Norreell B. *CRA and Sci*, 1973, 267D: 303~306
- 7 Sangwan R S et al. *Nature*, 1975, 257: 222~223
- 8 Wenzell R S et al. *Molec Gen Gent*, 1975, 138: 93~297
- 9 陈英等. *遗传学报*, 1981, 8(2): 158~163
- 10 Brettell RIS et al. *The Plant Geneone*, 1979, 252
- 11 Sharp WR. Raskin R S and Sommer. *HE plant* 1972, 104: 357~361
- 12 Nitsch C. J Kacha, 1974, 123~134

(上接35页)

淀粉与产量呈负相关, 所以要育成产量和淀粉均高(超过16%)的品种是比较困难的, 一般来说, 淀粉含量高的品种在产量上要低于淀粉含量低的品种, 而产量高的品种在淀粉含量上大都偏低, 在育种上宜兼顾这两个性状。若1个品种的产量较高, 但淀粉含量低, 就不能适于马铃薯加工业的需要, 且由于含水量大, 不耐贮运、加工损耗大, 经济效益低。真正有营养价值的是干物质。因此, 育种上经抗病性淘汰后宜以单位面积的干物质收获量作为选择优良无性系的指标。

4 结 语

马铃薯经济性状及抗病性均受微效多基因控制, 属数量性状, 而且又是四倍体遗传, 所以杂种后代的分离范围大, 极易受环境影响。马铃薯育种现在仍是从种植同一组合的大量实生苗成为品种的机率为万分之一, 种间杂交仅为十万分之一。因此, 丰富亲本资源, 扩大变异范围并探讨马铃薯产

量、淀粉含量及抗病性间的关系, 以寻找正确的选择方法、提高入选率是非常必要的。

本试验是结合育种工作进行的, 试验中难免有人为选择的影响, 如材料是在无性世代经过2~3次病毒淘汰, 淀粉含量则选择大于16%的杂种后代等。

我们建议, 在马铃薯高产、质佳、抗病新品种选育工作中, 宜选用T×Ns组合。针对优良性状选择时, 首先要淘汰不抗病的单株, 然后以单位面积干物质质量为选择优良无性系的标准, 注重单位面积干物质质量而不是片面强调产量或淀粉含量的高低。

参 考 文 献

- 1 新型栽培种作为育种原始材料的应用价值. *国外农业科技(马铃薯专刊)*, 1977, 6
- 2 Landco J A 靳德永译自《*Potato Research*》1982, 25: 227~237
- 3 戴万亚、张结峰. *马铃薯*, 1985, 2: 22~23
- 4 *马铃薯科学*, 1984, 2: 63~69
- 5 姜兴亚有关马铃薯育种的几个问题. *马铃薯*, 1980, 2