

# 水稻花药低温和2.4—D预处理培养 小孢子发育的细胞学初步研究

邹韻霞 陈婉萌

(生物学系遗传学研究室)

水稻花药培养,一般认为应选择单核晚期(单核靠边期)的花粉,才易诱导小孢子产生愈伤组织<sup>[1,2,3,8,12]</sup>。

籼稻花药培养中,在愈伤组织诱导率不高的情况下,用低温预处理稻穗,接种具有异型双核和单核期小孢子的花药,比较有效地提高了愈伤组织的诱导率,其原理目前尚不够明确<sup>[4,5,11]</sup>。我们于1978年6至10月进行了水稻花药低温和2.4—D预处理后的培养,以及小孢子发育的细胞学研究。

## 材 料 和 方 法

**试验材料:**均采用籼稻(*Oryza sativa* L. sub sp. hsien. Ting)的杂交品种(广二矮×小傢伙)F<sub>2</sub>, (桂朝×“小傢伙×窄叶青”)F<sub>2</sub>;从田间取回稻穗,将一部分花药固定作对照,一部分置低温(7—10℃)下72小时后接种,并取花药固定作细胞学研究;另一部分新鲜稻穗培养在4P.P.M的2.4—D溶液中,24小时(室温)后取花药固定作细胞学观察;其余接种在2.4—D和没有2.4—D的N<sub>6</sub>固体培养基上做诱导愈伤组织的试验。

**花药制片:**使用卡诺爱(Carnoy)固定液(无水乙醇:冰乙酸:氯仿=6:1:3)将花药固定一小时,经过90%和80%乙醇,移入70%乙醇保存。细胞观察主要用醋酸洋红压片,压片前经媒染剂(45%醋酸加FeCl<sub>2</sub>至饱和)媒染5—10分钟,然后用石蜡切片,铁苏木精染色,加拿大胶固封成永久标本片。

## 实 验 结 果

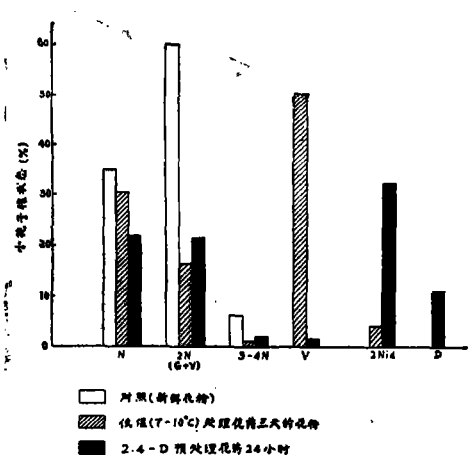
**低温预处理小孢子发育状态:**处理后不均等分裂二核花粉的生殖核退化,营养核仍保持正常状态(图版I·2),且均等分裂为二核;单核花粉也形成均等分裂二核(图版II·12)。正常的不均等分裂二核花粉和单核花粉形成的均等分裂二核,以及生殖核退化、营养核正常花粉,占镜检花粉的50%以上(图一)。

**2.4—D预处理小孢子发育状态:**同样表现在不均等分裂二核花粉中生殖核退化,营养核正常,且均等分裂成二核或二细胞(图版I·9,12)。而较多的是单核花粉均等分

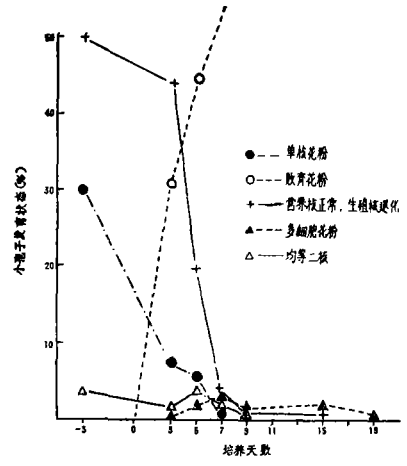
● 本文在于志忱教授指导下进行,林月婵协助镜检,吕雪莲协助制片。

裂成二核或二细胞(图版 I · 10,11)。处理后产生的败育花粉占10%以上(图一)。在有2,4-D和无2,4-D的培养基上培养,都没有产生愈伤组织。

低温预处理后,花药培养三至五天的小孢子发育成多种类型,最显著的是生殖核进一步退化(图版 I · 33),营养核通过有丝分裂,产生形态上相似的两个细胞(图版 I · 3,4,5);单核靠边期的花粉,小孢子也通过有丝分裂产生均等分裂二细胞(图版 II · 3,4,5,6,7),可经数次分裂为多细胞花粉(图版 II · 8),但多数停留在均等分裂二核期和均等二细胞期(图二),部分花粉开始败育,原生质发生质壁分离者达44%以



图一 低温和2,4-D预处理后小孢子发育情况 ●



图二 水稻花药培养小孢子的发育状态

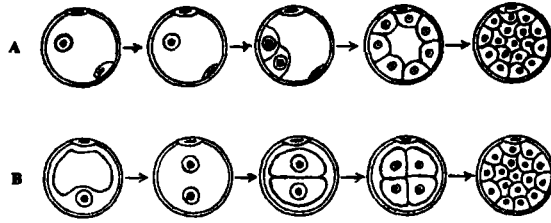
N = 单核  
 2N(G+V) = 正常的不均等分裂二核  
 3-4N = 3-4个核  
 V = 营养细胞正常生殖细胞退化  
 2Nid = 均等分裂二核 D = 败育花粉

每一点表示1000粒以上花粉平均值  
 -3 = 低温(7-10°C)处理三天  
 O = 离体培养开始

上。培养七至九天的花粉,从单核花粉和营养核发育成的多细胞花粉达到最高值,双细胞花粉继续出现。培养十一至十九天的花粉,除一部分多细胞花粉继续发育,少数具营养细胞的花粉能形成均等二细胞外,其它花粉全部败育;培养至十九天个别多细胞花粉形成花粉内愈伤组织(图版 I · 8;图版 II · 9)。

试验结果表明,水稻花药培养过程,小孢子具有两条发育途径,即A.不均等细胞型:第一次有丝分裂形成的形态上不同的生殖细胞与营养细胞,在低温处理后生殖细胞退化,营养细胞的核仁变大,染色质铺散,“去分化”后经培养沿花粉内壁多次分裂形成愈伤组织;B.均等细胞型:低温处理后培养的单核中期或靠边期花粉,第一次有丝分裂形成两个形态上相似的与萌发孔相平行或园周分裂的二细胞,经多次分裂形成愈伤组织。水稻小孢子发育的途径,也相当于 Sunderlard 等在烟草花药培养中所观察到的A,B类型<sup>[11,12]</sup>。(图版附后)

● 每组合观察50个花药,计算1000个以上花粉百分数



图三 水稻小孢子发育途径

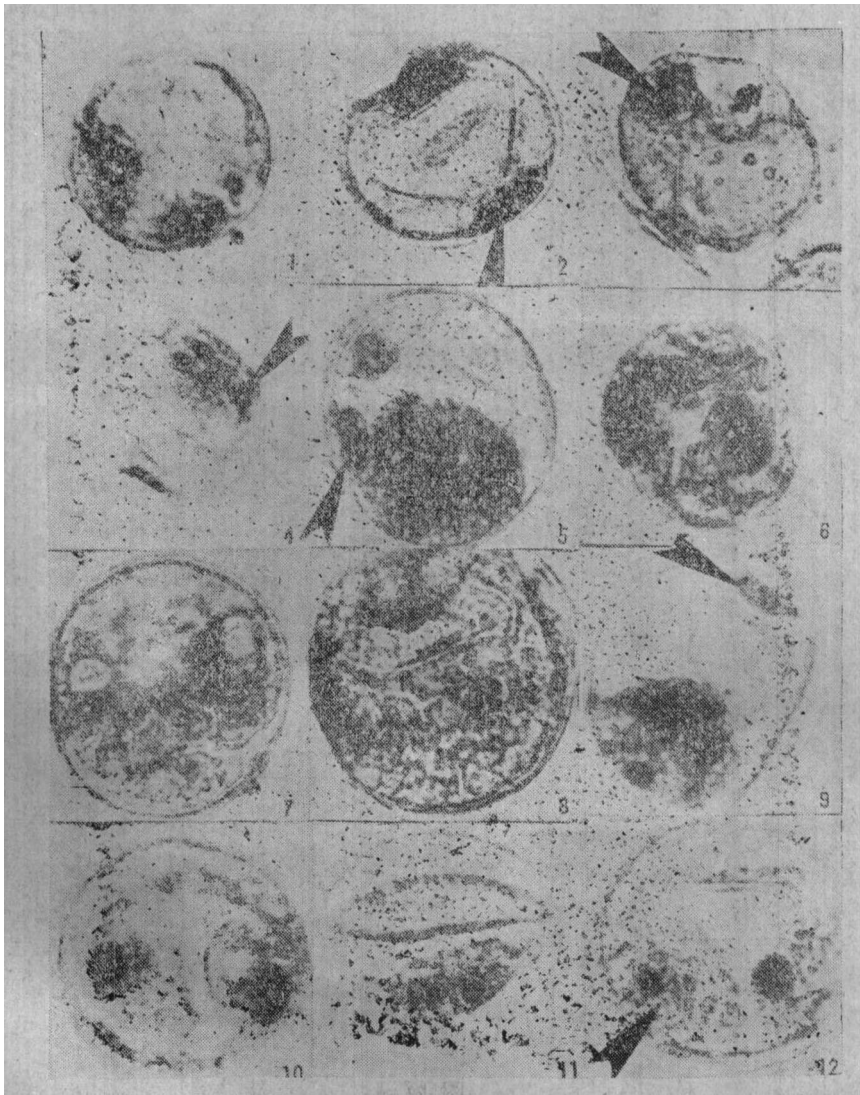
A.不均等细胞型 B.均等细胞型

## 讨 论

水稻花粉植株的起源,目前主要的看法是,从单核晚期(单核靠边期)的小孢子进行第一次有丝分裂,产生均等的两个细胞,经多次分裂形成愈伤组织而成<sup>(1,2,3,7)</sup>,即B.途径;另一种看法认为,水稻小孢子形成愈伤组织,是从营养细胞进行均等分裂发育而成<sup>(8)</sup>,即A.途径。我们通过较长时期的观察,认为上述两种途径都是存在的,主要取决于各自选择的小孢子发育期有所不同。如接种的是单核期花粉,则看到的是单核花粉的发育;如接种的是不均等二核期花粉,则看到的是营养细胞的发育。通过本试验观察,能证实单核期和不均等二核期发育为多细胞花粉的过程。因为我们在水稻花药培养时接种的是单核中期至不均等二核期花粉,因而并不难证实两条途径的存在。

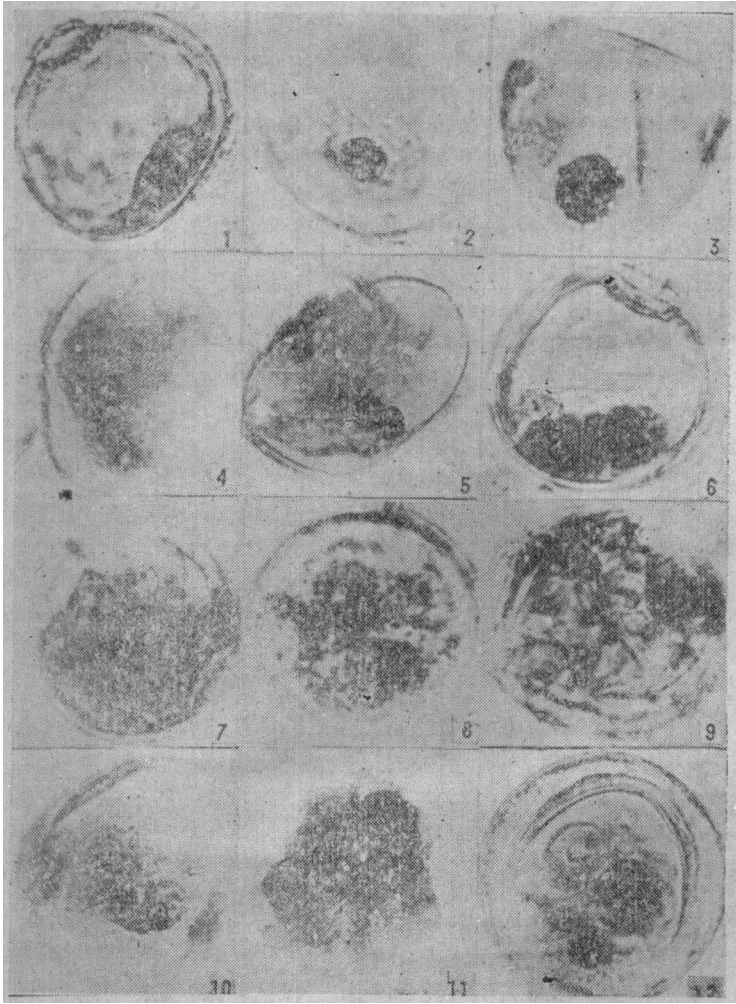
水稻花药培养低温处理的效应已有报导<sup>(5,6)</sup>。Nitsch等在毛叶曼陀罗(*Datura innoxia*)花药的培养表明,变温处理能提高花粉粒胚胎发生的能力,能改变第一次有丝分裂纺锤体轴的取向<sup>(6)</sup>。也有人认为低温可以减少培养中花粉的败育和提高均等分裂的花粉数<sup>(4,5)</sup>。我们的试验表明,低温处理后明显地阻碍了单核花粉和不均等二细胞花粉的正常发育,表现在生殖细胞的败育,单核花粉和营养细胞发育方向的逆转。因为特化了生殖细胞,对低温极为敏感,因而急剧败育(图一),单核花粉减少,其中有一部分可能在低温初期仍朝向不均等分裂,所以增加了不均等分裂的花粉数。低温促进了生殖细胞的败育和营养细胞发育方向的逆转,即从“分化”方向转向“去分化”方向,这就有利于愈伤组织的形成。单核晚期花粉,也能受低温影响,表现在停止正常发育转向“去分化”,产生均等分裂,经培养形成多细胞花粉,从细胞学研究证明了这两条发育途径的存在。

2.4-D具有启动水稻小孢子形成同型二核或二细胞的能力,但又为什么对进一步的分化又有不利影响,其原因可以进一步研究。但可以认为,2.4-D及低温作为预处理因子对小孢子发育的影响各有不同,经2.4-D预处理的小孢子后期败育的较多(图一),可能经2.4-D预处理的花粉同时也导致一定的生理障碍,不利于小孢子进一步发育。



图版 I

1. 不均等分裂二核花粉(对照); 2. 低温处理三天的不均等二核花粉; 3—5. 培养三天花粉, 营养核进行有丝分裂, 形成二细胞; 6. 培养九天呈圆周分裂的多细胞花粉; 7—8. 培养十九天花粉内愈伤组织形成; 9—12. 2,4-D 预处理花药: 9. 为均等分裂二核, 10. 营养核分裂为二核, 生殖核退化, 11. 均等分裂二细胞, 12. 生殖核退化, 营养核正常。箭头所示退化生殖核, 3,4 为石蜡切片, 其它为醋酸洋红染色压片。



图版 I

1. 正常花粉(对照)单核靠边; 2. 低温处理三天单核花粉; 3-7. 培养三天花粉: 3. 有丝分裂前期, 4. 有丝分裂中期, 5. 有丝分裂后期, 6. 均等分裂二核(沿花粉内壁), 7. 均等分裂二细胞; 8. 培养九天多细胞花粉; 9. 培养十九天花粉内愈伤组织; 10. 培养三天均等分裂二核(在花粉中央); 11. 肉眼可见愈伤组织( $\times 104$ ); 12. 低温预处理形成的均等分裂二核。3.4.5. 为石蜡切片, 其它为醋酸洋红染色压片。

## 参 考 文 献

- [1] 张新英等, 水稻花药培养中小孢子形成植株和器官建成的初步观察, *植物学报*, 20(1978), 3, 197—202.
- [2] 占庚茂等, 从水稻的花药培养看花粉和胚的对立统一, *北京大学学报(自然科学版专 辑)*, 1974, 43—49.
- [8] 程井辰, 水稻花粉愈伤组织器官形成的初步研究, 花药培养学术讨论会文集(1977), 科学出版社, 1978, 126—132.
- [4] 胡忠等, 水稻花药培养技术的改进, 花药培养学术讨论会文集(1977), 科学出版社, 1978, 93—98.
- [5] 王敬驹等, 水稻花粉植株的诱导条件及影响诱导频率的某些因素, *植物学报*, 16(1974), 1, 43—54.
- [6] 尼施(C. Nitsch)等, 变温对于在花药中或从花药分离的毛叶曼陀罗 *Datura innoxia* 培养的花粉胚胎发生能力的影响, 单倍体育种资料集, 第三集, 科学出版社, 1977, 178—182.
- [7] 潘景丽等, 影响小麦(*Triticum Vulgare*)花粉植株诱导频率的几种因素, *植物学报*, 17(1975), 2, 161—166.
- [8] Niizki H. & Oono K., Rice Plants Obtained by Anther Culture, 1971, 251—257, in *Les Culture de Tissue de Plant Colloques Internationaux du C. N. R. S., Paris-VI*, 1971, 193.
- [9] Sunderland, N. and F. W. Wicks, Embryoid Formation in Pollen Grain of *Nicotiana Tabacum*, *J. Exp. Bot.*, 22 (1971), 213—226.
- [10] Sunderland, N., Pollen and Anther Culture, in: *Plant Tissue and Cell Culture Blackwell Scientific Pub., Oxford*, 1973, 205—239.
- [11] T. Nishi, Y. Yamada and E. Takahashi, The Role of Auxins in Differentiation of Rice Tissue Cultured in Vitro, *Bot Mag.*, 81 (1973), 183—188.
- [12] S. Guha—Mukherjee., Genotypic Differences in the Vitro Formation of Embryoids from Rice Pollen. *J. Exp. Bot.*, 24 (1973), 78, 139—144.

Preliminary Cytological Research of Androgenesis in  
Pretreatment of the Rice Anther under Lower  
Temperature and 2.4—D

Zou yunxia      Chen Wanneng

## Abstract

Pretreatment of rice anther under lower temperature effects on the microspore development markedly, and on the unequal di-nucleus, which produced by the first mitosis, varies in degrees, and leads the generative nucleus, which has been specialized, to abortion. However, it does not disturb on the normal development of vegetative nucleus and produces equal di-nucleus after the appearance of the dedifferentiation. The influence of pretreatment of lower temperature and 2.4-D on the microspore at the uninucleus stage and possesses dedifferentiation, has been discussed in this paper. Otherwise, it seems, there are two pathways of androgenetic development arisen from the rice anther cultural.