花药培养研究进展

中国科学院北京植物研究所五室细胞组

应用离体培养花药的方法,诱导花粉形成单倍体植物,是近年来实验植物学上的一个引人注目的进展。这项研究开始于六十年代中期。1964年 Guha 和 Maheshwari 在离体培养毛叶曼陀罗 (*Datura innoxia*) 的花药时发现花药的药室中生长出胚状体^[1],他们在1966年进一步确定这些胚状体是起源于花粉的单倍体^[2]。在离体条件下,花粉改变正常的发育进程转向产生植株或愈伤组织这一事实,给植物细胞学与植物胚胎学提出了新的研究课题,也为研究高等植物的突变和细胞遗传开辟了新的途径^[3,4]。然而这一发现的更重要的意义还在于它的应用价值。对花粉单倍体植物进行染色体加倍处理可立即获得纯系,在植物育种上利用这一技术能够很快地使杂种后代稳定或获得自交系。同时对单倍体进行诱变处理可以得到当代表现的突变体^[5]。由于这些原因,花药培养研究受到各国研究者的普遍重视,到目前为止,有关花药培养的论文已有百余篇。根据已发表的资料,花药培养试验已在二十余种植物上取得成功(见表1)。1969年在意大利召开了“用细胞及组织培养方法改良作物的讨论会”,专门讨论了花药培养研究的现状及其在应用上的前景。1970年和1973年先后召开的第一届和第二届国际植物组织培养会议上,花药培养也是一个重要的议题。

我国在文化大革命期间开始这项研究,由于许多科研单位的共同努力和密切配合,研究工作进展很快。我国科研工作者不仅试验成功菸草和水稻的花药培养,而且首次诱导出小麦、小黑麦和辣椒等植物的花粉植株^[6-10]。在应用方面,中国科学院遗传学研究所、山东省菸草研究所、黑龙江省农业科学院和黑龙江省牡丹江地区农业科学研究所等单位已在菸草、水稻和小麦等作物上用花药培养的方法从杂种得到稳定的株系,现正在进行选择鉴定,可望获得新品种。

本文简要介绍和讨论近年来国内外在花药培养技术及花粉离体发育机理等方面取得的进展。

胚状体及花粉愈伤组织的诱导

从花粉产生单倍体植物通过两种方式:一些植物的花粉在离体花药中经过类似合子胚发育的阶段形成胚状体,而后长成单倍体植株;另一些植物的花粉增殖形成愈伤组织,经诱导分化产生植株(详见表1)。

曼陀罗属 (*Datura*)、菸草属 (*Nicotiana*)、颠茄 (*Atropa balladonna*) 和辣椒 (*Capsicum annuum*) 的花粉通过胚状体阶段形成植株,这几种植物均属茄科。不同种的花药培养基的组成是有差异的。曼陀罗的花药培养最初采用改良 Nitsch 培养基,附加椰子乳或李子汁,在这种培养基上花粉发育成胚状体。当附加成分为 IAA (吲哚乙酸)及动力精时,药室中产生愈伤

表1 花药培养试验成功的植物种类

I. 花粉 → 胚状体 → 植株		II. 花粉 → 愈伤组织 → 植株	
<i>Atropa balladonna</i> (颠茄)	[11]	<i>Aegilops caudata</i> (山羊草属的一种) × <i>Ae.</i>	
<i>Capsicum annuum</i> (辣椒)	[6]	<i>umbellulata</i> 双二倍体	[20]
<i>Datura innoxia</i> (毛叶曼陀罗)	[1]	<i>Arabidopsis thaliana</i> (拟南芥菜)	[19]
<i>D. metel</i>	[12]	<i>Asparagus officinalis</i> (石刁柏)	[21]
<i>D. metel</i> var. <i>fastulosa</i>	[13]	<i>Brassica oleracea</i> (甘兰) × <i>B.</i>	
<i>D. meteloides</i>	[13]	<i>alboglabra</i> (芥兰) F_1	[22]
<i>D. muricata</i>	[13]	<i>Hordeum vulgare</i> (大麦)	[23]
<i>D. wrightii</i>	[14]	<i>Lilium longiflorum</i> (百合属的一种)	[25]
<i>Nicotiana tabacum</i> (菸草)	[15,16]	<i>Lolium multiflorum</i> (多花黑麦草)	[23]
<i>N. sylvestris</i>	[15]	<i>L. multiflorum</i> (4x) (多花黑麦草) × <i>Festuca</i>	
<i>N. alata</i>	[13]	<i>arundinacea</i> (羊茅属的一种)	[24]
<i>N. rustica</i>	[13]	<i>Lycopersicon esculentum</i> (番茄)	[26]
<i>N. glutinosa</i> (4x)	[13]	<i>Oryza sativa</i>	[18]
<i>N. otophora</i>	[17]	<i>Petunia axillaris</i> (月夜花矮牵牛) × <i>P.</i>	
<i>Oryza sativa</i> (水稻)	[18]	<i>hybrida</i> (矮牵牛)	[27]
<i>Solanum dulcamara</i> (千年不烂心)	[11]	<i>Setaria italica</i> (粟)	[28]
<i>Triticum aestivum</i> (小麦)	[7,9]	<i>Solanum dulcamara</i>	[11]
		<i>S. nigrum</i> (龙葵)	[29]
		<i>S. verrucosum</i> (马铃薯野生种)	[30]
		Triticale (小黑麦)	[6]
		<i>Triticum aestivum</i>	[9,10]

组织,但 Guha 等认为它们起源于二倍性的药隔组织^[31]。提高培养基中无机盐的浓度对于曼陀罗胚状体的发育是有利的, Braak 发现把曼陀罗的花药从改良 Nitsch 培养基转移到营养较高的 Nitsch H 培养基上能够提高产生小植物的频率^[32]。菸草的花药也要求较高的无机营养,在无机盐浓度较高的 Nitsch H 培养基上,半数以上的花药产生小植物^[15,33]。而在无机盐浓度较低的菸草 C 培养基上培养到 30 天花药未见任何生长,把花药转移到高营养的 RM-1964 培养基后才陆续产生小植物^[16]。铁盐的浓度对于菸草胚状体的发育尤其重要,据 Nitsch 实验,培养基中铁盐的最适浓度为 Fe-EDTA (乙二胺四乙酸铁) 10^{-4} 克分子,高于或低于此浓度时花粉成胚率显著下降,甚至完全不形成胚状体^[33]。颠茄的花粉植株也是在高盐浓度的 MS 培养基上获得的,在低盐浓度的 White 培养基上培养颠茄花药未获得成功^[11]。我们诱导辣椒花粉植株也采用了营养成分较高的培养基,它是由 MS 培养基的大量元素和 Nitsch H 培养基中的有机成分组成并加有 1 毫克/升的 NAA (萘乙酸)、1 毫克/升的动力精及 40 毫克/升的核武酸^[6,34]。一般地说,上述几种植物的花药培养都需要一定浓度的天然活性物质(椰子乳、李子汁等)或提纯的激素 (IAA、NAA 和动力精)。但菸草是一个例外,在完全没有激素的培养基上菸草花粉能够形成植株,甚至在只含有 2% 蔗糖的琼脂上花粉就能发育到球形胚阶段^[33]。

在另一些植物上,离体花药中的花粉发育为愈伤组织。诱导花粉愈伤组织的培养基一般都含有较高浓度的生长素。水稻^[18]、小麦^[7-10]、小黑麦^[6]、粟^[28]、山羊草^[20]和拟南芥菜^[19]的花药培养基中均加有 2,4-D, 浓度一般均不超越 1—5 毫克/升的范围。大麦和黑麦草花药培养基中则分别含有 1 毫克/升或 0.5 毫克/升的 NAA^[23]。甘兰的情况略有不同,为诱导花粉愈伤组织只需向培养基中加入 10% 椰乳而无需另加生长素^[22]。应当指出,在某些植物上,在花粉愈

伤组织生长的同时,二倍性的花药组织也可以发展成愈伤组织。小麦的花丝断口处常有愈伤组织增生,根据其着生的位置很容易与花粉愈伤组织相区别。而在番茄等植物上,二倍性的愈伤组织是从药隔发生的,往往与花粉愈伤组织混淆而难以区分^[32]。

花粉发育为胚状体还是形成愈伤组织,在一定程度上取决于培养基中生长素的浓度。Guha 等注意到,在种植于含 2,4-D 的培养基上的水稻花药尚未长出愈伤组织之前,把它们转移到不含生长素的培养基上,花粉不发育成愈伤组织,而经由胚状体直接长成植株^[35]。我们在小麦上观察到,在含有 2 毫克/升 2,4-D 的培养基上花粉发育为愈伤组织,而在含有 20% 椰子乳的培养基上则生长胚状体^[7,8]。辣椒花粉发育的情况比较特殊,同一个花药中既生长胚状体又产生愈伤组织。这些愈伤组织和曼陀罗药隔产生的二倍性愈伤组织不同,它们起源于花粉,是单倍性的^[6,34]。为什么在同一浓度的激素作用下一一些花粉形成胚状体而另一些花粉形成愈伤组织,是一个值得研究的问题。

除培养基外,花粉的发育时期也是一个重要的因素。许多人认为单核而尚未形成淀粉粒的花粉最容易发育成胚状体^[32],而中田和田中则认为四分孢子期是接种的最适时期^[16]。在甘兰^[22]和黑麦草——羊茅杂种^[24]上,则采取含成熟花粉的花药进行培养。Sunderland 根据用菸草为材料进行的试验指出从小孢子进入第一次有丝分裂直到二核形成时期对于培养都是敏感的^[36,37]。我们在菸草、水稻、小麦上的试验得到同样的结果^[7-9,34]。

植株的年龄及培养时的温度也对试验结果有一定的影响。Sunderland 指出在菸草植株进入开花期后的头 10 天中所采取的花药出苗率较高,而开花后期的花药培养成功率较低,这可能是由于开花后期花药中含有较多的败育花粉。菸草花药培养的最适温度为 23—28℃,当温度降低到 15℃ 时培养成功率显著下降,保持昼夜温差对试验并无促进作用^[32]。光照只是在小植物形成之后才是必需的。

试验材料的品种差异性也是一个重要的因素。某些小麦品种(或杂种)形成花药愈伤组织的频率可达 2—6%,而另一些品种在同样条件下即使接种上千的花药也未产生花粉愈伤组织^[9]。在小黑麦、菸草和番茄上也看到类似现象。

目前除菸草外其他作物花药培养的成功率还很低,用于育种实践尚有相当的困难,如何提高花粉形成愈伤组织或胚状体的百分率是当前花药培养中一个急待解决的问题。最近 Nitsch 等^[38]用变温处理曼陀罗花蕾的方法有效地提高了花粉形成胚状体的频率。他们在接种前将花蕾预先在 3℃ 下处理 48 小时。花药接种后三星期检查花粉形成胚状体的百分数。不同时间所做的三次实验结果如表 2。数字表明处理和对照间的差异是显著的。Bennett 等^[39]在减数分

表 2

	实 验 I	实 验 II	实 验 III
对 照	19.7%	1.5%	3.5%
处 理	55.7%	20.0%	23.0%

裂前用乙烯利(2-氯乙基磷酸)喷撒植株,然后取花药接种。显微镜检查发现乙烯利可以促进小麦花粉的核分裂,他们认为这一方法用于花药培养可以使小麦和其他种类的植物产生单倍体。这类工作虽然刚刚开始,但对提高花药培养成功率的研究有一定的启示作用。

花粉愈伤组织的分化

通常是用调节培养基中生长素和动力精的浓度来诱导花粉愈伤组织分化出植株。用椰乳代替动力精有时获得更好的效果^[8]。在分化培养基中 IAA、NAA 的浓度一般为 0.1—2.0 毫克/升,动力精为 0.2—2 毫克/升。由于各种植物对激素的敏感程度以及分化前培养基的激素水平不同,各种植物花粉愈伤组织分化植株所需要的最适激素浓度是有差异的,这需要通过试验来确定。

应用上述方法能够有效地促使许多植物的花粉愈伤组织形成植株。表 1 实验 II 列出了已经成功地由花粉愈伤组织诱导出植株的植物名称。

除培养基中激素浓度外,愈伤组织的分化还受其他因素的影响,例如产生愈伤组织的培养条件,愈伤组织的品系、年龄等。以水稻为例,在高浓度 2,4-D 的培养基上产生的愈伤组织其分化能力较低,而在补加有酵母提取物、水解乳蛋白和水解核酸等的培养基上产生的愈伤组织则有较高的分化能力^[40]。就愈伤组织的品系和年龄而言,在我们的试验中某些水稻品种,如景洪二号,80% 的花粉愈伤组织能够分化成苗,而其他许多品种的愈伤组织分化频率不过 5—20%。甚至来自同一品种的不同花药的愈伤组织的分化能力也是不相同的。愈伤组织的年龄也影响到其分化能力。如将景洪 2 号的花粉愈伤组织进行继代培养,每代约一个月,对每代愈伤组织均进行诱导分化试验,结果是第一代愈伤组织分化成苗率为 80%,第二代约为 20%,第三代则完全不分化。

在诱导愈伤组织分化方面存在的困难表明,我们对于细胞分化和器官建成这类复杂的生命现象还了解得很少,需要加强这方面的基础研究。我们进行的初步观察表明,当愈伤组织开始分化时,其细胞内部经历着一系列深刻的变化,最显著的是核仁的大小和数目,线粒体的形态、数量和分布以及 RNA 含量的变化^[41]。同时多糖的分布也呈现出明显的区域性^[42]。近年来细胞生物学上已积累了若干证据,认为细胞的分化是通过信使 RNA 有秩序地转录 DNA 密码来进行的,因此在研究分化问题时应特别注意密码转录的控制机理。

花粉植株的倍性

在花粉直接发育为胚状体的情况下,绝大多数的花粉植株是单倍体。Bourgin 和 Nitsch 最早得到的 9 株菸草花粉植株,7 株是单倍体,2 株是二倍体^[15]。我们曾经栽培过数百株菸草花粉植株,如不进行染色体加倍处理均不能结实,表明它们几乎全是单倍体。

从愈伤组织诱导出的花粉植株的倍性呈现复杂的情况。Nishi 和 Mitsuoka 发现水稻的花粉植株中除单倍体外,还有二倍体、三倍体和五倍体^[43]。我国科研工作者培养成功的小麦、水稻花粉植株主要是单倍体及二倍体,偶尔也发现有形态异常的植株,经染色体计数证实它们系非整倍体^[40]。我们曾观察到一株小冰草花粉植株非整倍体,它比正常单倍体缺少一个染色体,只有 27 个染色体,并由此引起了形态特征的巨大变化。

花粉植株中出现二倍体植株,使人怀疑它们并非来自花粉,但根据中国科学院遗传学研究所三室二组^[40]及欧阳俊闻等^[10]的观察,从水稻和小麦 F₁ 花药培养得到的二倍体花粉植株的后代,是整齐而不分离的,这就排除了它们是来自体细胞的可能性。过去的研究已经确定植物

愈伤组织内的一些细胞常常会发生核内有丝分裂,从而实现细胞染色体数加倍。很可能二倍体花粉植株是借助于在愈伤组织时期一些细胞进行核内有丝分裂而实现的。已经知道细胞分裂素(Cytokinin)类的物质能够提高核内有丝分裂的频率。可以有目的地利用这种现象使单倍体植株加倍而获得能育植株。Nitsch 等将单倍体菸草的茎及叶柄诱导成愈伤组织,在加有细胞分裂素(动力精、N-3-硝基-N'-苯脲或 N-3-氯苯-苯脲)的培养基上培养 4—6 个月以后,再转移培养诱导分化则只产生二倍体植株^[44]。

为了获得能育植株,常常也采用秋水仙素处理的方法。Tanaka 和 Nakata 在切除单倍体植株的顶芽后,用 0.4% 秋水仙素羊毛脂涂抹腋芽,结果使 60% 的植株结实^[45]。这种方法也可用于禾谷类作物,我们用 0.01% 的秋水仙素溶液在早春浸泡小麦分蘖节,成功地诱导染色体加倍。在水稻、小麦等植物上在开花之前要确定得到的每一株花粉植株的倍性是很费事的。为了保证多数花粉植株都能结实,一个稳妥的办法是将所得到的植株切取一半分蘖用秋水仙素处理,其中的单倍体可由此而二倍化,而如果植株原来已经是二倍体,那末没有处理的一半将正常开花结出种子。

花粉植株中的白化体

在禾本科植物的花粉植株中,白化苗和黄化苗的出现是极为普遍的现象。迄今所得到的所有禾谷类的花粉植株中都出现过白(黄)化体,且一般都达到相当高的比率^[8,9,24,40,42],有的甚至全部是白化苗^[20,23]。白化苗不能进行光合作用,完全靠异养生活,虽然在人工培养基上可以生长到开花^[20],但在育种上毫无价值。因此花粉植株中大量白化体的出现对育种工作是一个很大的浪费。目前对白化体还缺乏深入系统的研究,其发生原因尚很少了解。Sharp 等^[46]的实验指出在菸草中白化体的形成和培养基中蔗糖浓度有明显的相关性。蔗糖浓度为 68 克/升时产生正常绿色的胚状体,而蔗糖浓度提高到 106 克/升时则形成白化的胚状体。另一些实验指出,除蔗糖外水解乳蛋白和培养温度也能影响白化苗的出现频率^[40]。我们在水稻上观察到产生白苗的愈伤组织继代培养总是分化出白苗,产生绿苗的愈伤组织继代培养总是分化出绿苗,但也有极个别的产生绿苗的愈伤组织系在继代培养中出现过白苗(未发表的资料)。在小麦上同一块愈伤组织可以既产生白苗又产生绿苗^[7]。白绿嵌合苗的出现也有不少报道^[7,28,42]。显然影响白化体生成的因素是复杂的、多方面的。一般认为下列因素都可造成白化体的出现:

1. 细胞中缺少质体。这可由两方面的原因所造成:(1)愈伤组织起源于生殖细胞,而生殖细胞的细胞质很少,细胞器都集中在营养细胞的细胞质中。对一种网球花属(*Haemanthus*)植物花粉细胞的电子显微镜研究曾证明了这一点^[47]。(2)可能是由于愈伤组织的细胞的旺盛分裂及生理上的障碍使一部分细胞失去质体^[40]。

2. 虽然有前质体存在,但在其发育或分化过程中发生了障碍^[48]。

3. 质体虽然可以较为正常发育,但细胞中缺少合成叶绿素所需要的酶致使叶绿素不能正常合成^[49]。

总的来说,白化苗的成因不外乎生理上和遗传上两个方面。但由于目前这方面的实验研究做得很少,还不能作出定论。近来 Clapham^[49] 对大麦花粉植株的白化苗进行了电子显微镜观察,发现叶片细胞中存在前质体和近乎正常的叶绿体,显然白化的发生是和叶绿素的合成受到障碍有关,我们对水稻花粉植株的白化苗进行了电子显微镜观察,同样发现有前质体存在,

但其进一步的发育受到阻碍,基粒和基质的片层结构不能形成。看来,情况并不完全一样,因而进一步研究花粉植株中白化苗的成因并有效地加以控制,不但具有明显的实践价值而且有助于阐明叶绿体的发育和遗传等基础学科问题。

离体花药中雄核发育* 的机理

在正常状况下,花药中的四分孢子发育成二核或三核的成熟花粉;而在离体培养的花药中,一些未成熟的花粉进行连续的有丝分裂发育成植物体。花粉植株起源于营养细胞还是起源于生殖细胞,为什么在离体条件下雄性细胞停止了正常的分化而转向形成植物体,在离体雄核发育过程中细胞核和细胞质经历了怎样的变化,这些理论性问题日益引起人们的注意。

关于离体花药中花粉植株的起源已经作了不少研究。Sunderland^[32]观察到在离体的菸草花药中,花粉仍分化出营养细胞和生殖细胞。在培养后的第6天营养细胞开始分裂,多次分裂后形成具有大核的多细胞球形胚状体,而生殖细胞的分裂很少多于一次,分裂后的细胞核仍然保持小而浓缩的状态。因此他认为,在多数情况下是由营养细胞发育为胚状体,而生殖细胞一般不参与胚状体的形成。同时Sunderland也观察到在一些较幼的花药中单核花粉进行均等分裂产生两个核大小相等的细胞,两者都参与胚状体的形成。但是他认为这种情况不一定是诱导的结果,因为在正常的花药中偶尔也能见到均等分裂。Bernard^[50]观察到菸草花粉胚状体分为三种类型,一些胚状体由大的营养核型细胞组成,另一些由较小的生殖核型细胞组成(细胞数目不超过15个),而更多的胚状体显示有上述两种类型的细胞,其中营养核型细胞占多数,生殖核型细胞占少数,而后者又往往集中在胚的茎端极。因此Bernard认为生殖细胞有时也参与胚状体的形成。同时我们还观察了小黑麦^[41]和小麦^[7]的雄核发育过程。在小黑麦上,多数情况下营养核占据花粉的中央位置并进行多次分裂形成多细胞团,而生殖核经过2—3次分裂形成几个纺锤形的游离核围绕在多细胞团的四周。由此可见在小黑麦上花粉愈伤组织主要来源于营养细胞。然而在小黑麦和小麦上我们也看到单核花粉分裂成两个大小均等的细胞,两者均参加愈伤组织的形成。综上所述,可以认为花粉植株主要起源于二核花粉中的营养细胞,但还不能完全排除生殖细胞参与花粉植株的形成或 directly 由单核花粉进行均等分裂形成植株的可能性。

在菸草、颠茄和辣椒等植物上花粉胚状体的发育过程和合子胚类似,都经过球形、心形和子叶分化(所谓“鱼雷形”)等时期。另外一些种的花粉虽然最终形成形状不规则的愈伤组织,但在雄核发育的早期一直保持规则的分裂,形成圆球状的多细胞团,其细胞原生质浓厚,排列紧密,具有胚性细胞的特点,只是在培养后期细胞才转向不规则分裂形成愈伤组织。

花粉胚状体或花粉愈伤组织在发育的早期阶段常发生败育。Sunderland指出菸草花粉胚状体的死亡率是相当高的。一个菸草花药中大约有40,000个花粉,在最好的培养条件下大约有10,000个花粉能发育成球形的胚状体,但只有少数胚状体最终发育成植株^[37]。我们在一个小麦杂种上看到,大约有40%的花药中发育出花粉多细胞团,但是最终只有1%的花药生长出愈伤组织,这表明多数的花粉多细胞团在早期败育了^[7]。在小黑麦上这种情况更加明显,曾

* 在植物胚胎学上雄核发育(Androgenesis)一语是指雄配子进入胚囊后不与卵结合而单独发育为植株。近年来已查明雄配子体中无论营养核或生殖核及由它生成的雄配子都具有自己的细胞质。因此无论是自然的或是由花药培养所得的单倍体植株均起源于雄性细胞而非雌核。由于习惯的原因,这里仍沿用雄核发育一词。

看到一个从未长出花粉愈伤组织的品系的 72 个花药中, 有 35 个花药中有花粉多细胞团, 有时一个药室的切面上就看到十几个多细胞团, 但大都处于解体衰亡状态而不能发育成愈伤组织^[42]。Sunderland 曾经提出过几种可能引起花粉胚状体败育的原因^[37], 但有待于实验的证实。查明引起花粉多细胞团败育的原因并设法加以克服就能够进一步提高花药培养的成功率, 这对于花药培养的实际应用将是 valuable 的。

最后, 应当讨论一下雄核发育研究中一个重要的而目前还研究得很不够的问题, 这就是为什么在培养条件下花粉停止正常的细胞分化而转向连续的细胞分裂。已经知道, 在自然状况下小孢子第一次有丝分裂形成一个小的生殖细胞和一个大的营养细胞, 生殖细胞的核处于前期状态, 体积不再增大, 但立即开始 DNA 复制准备进行第二次分裂; 而营养细胞的细胞质中 RNA 及蛋白质含量迅速增加, 核的体积增大但其中 DNA 的含量并不增加^[51]。这表明在生殖细胞中进行 DNA 复制, 在营养细胞中进行 DNA 转录。而在离体花粉中, 情况发生了变化, 营养细胞中 DNA 的转录被抑制, 相反却开始 DNA 复制, 结果导致营养细胞连续分裂形成机体。发生这种变化的原因还不清楚。Bernard 根据在离体花药胚状体发育的同时有一部分花粉萌发生长花粉管的现象推测, 花粉管的分泌物能够诱导那些尚未萌发的花粉的营养细胞进行分裂, 就象在孤雌生殖情况下花粉管分泌物作用于卵一样^[50]。Sharp 等^[52]指出, 离体培养的番茄游离花粉粒不能进行分裂, 但如果用花药作“资助者”则能诱导游离花粉粒分裂形成无性系, 似乎花粉的离体发育需要花药提供某些物质。然而最近用琼脂培养基成功地使矮牵牛的游离花粉粒发育为多细胞团^[53], 从而证明了花药组织分泌物对于离体花粉早期的发育并非必需。Nitsch^[33]曾提出一种看法, 认为离体培养消除了机体内抑制花粉分裂的因素而引起营养细胞的连续分裂。总之, 关于离体雄核发育的动因虽然提出了一些假设, 但尚未用严密的实验来验证, 而且不同人提出的假设往往是互相矛盾的。因而今后有必要对于雄核发育的机理作更深入的研究, 以期完全控制这一过程, 建立更完善的花药培养方法, 使之用于育种实践。

参 考 文 献

- [1] Guha, S., Maheshwari, S. C., *Nature* (Lond.), **204** (1964), 497.
- [2] Guha, S., Maheshwari, S. C., *Nature* (Lond.), **212** (1966), 97—98.
- [3] Carlson, P. S., *Science*, **168** (1970), 487—489.
- [4] Nillson-Tillgren, T., von Wettstein-Knowles, P. von, *Nature*, **227** (1970), 1265—1266.
- [5] Nitsch, J. P., Nitsch, C., Péreau-Leroy, P., *C. R. Acad. Sci., Paris*, **269D** (1969), 1650—1652.
- [6] 王玉英、孙敬三、王敬驹、钱南芬, 中国科学, 1973, 1, 104—107.
- [7] 王敬驹、朱至清、孙敬三、吴素萱、尹光初、徐 振, 中国科学, 1973, 2, 162—167.
- [8] 中国科学院植物研究所, 单倍体育种资料集 (第一集), 1972, 科学出版社, 1—18.
- [9] 朱至清、王敬驹、孙敬三、钱南芬、尹光初、徐 振, 植物学报, **15** (1973), 1—11.
- [10] 欧阳俊闻、胡 含、庄家骏、曾尹祉, 中国科学, 1973, 1, 72—82.
- [11] Zenkteler, M., *Experientia*, **27** (1971), 1087.
- [12] Narayanaswamy, S., Chandy, L. P., *Ann. Bot.*, **35** (1971), 535—542.
- [13] Nitsch, J. P., *Z. Pflanzenzüchtg.*, **67** (1972), 3—18.
- [14] Kohlenbach, H. W., Geier, T., *Z. Pflanzenphysiol.*, **67** (1972), 161—165.
- [15] Bourgin, J. P., Nitsch, J. P., *Annls Physiol. Vég.*, (Paris), **9** (1967), 377—382.
- [16] Nakata, K., Tanaka, M., *Jap. J. Genet.*, **43** (1968), 65—71.
- [17] Collins, G. B., Legg, P. D., Kasperbauer, M. J., *J. Heredity*, **63** (1972), 113—118.
- [18] Niizeki, H., Oono, K., *Proc. Japan Acad.*, **44** (1968), 554—557.
- [19] Gresshoff, P. M., Doy, C. H., *Aust. J. Biol. Sci.*, **25** (1972), 259—264.
- [20] Kimata, M., Sakamoto, S., *Japan. J. Genet.*, **47** (1972), 61—63.
- [21] Pelletier, G., Raquin, C., Simon, G., *C. R. Acad. Sci.*, **274D** (1972), 848—851.
- [22] Kameya, T., Hinata, K., *Japan. J. Breeding*, **20** (1970), 82—87.

- [23] Clapham, D., *Z. Pflanzenzüchtg*, **65** (1971), 285—292.
- [24] Nitzsche, W., *Naturwissenschaften*, **57** (1970), 199—200.
- [25] Sharp, W. R., Raskin, R. S., Sommer, H. E., *Phytomorphology*, **21** (1971), 331—336.
- [26] Gresshoff, P. M., Doy, C. H., *Planta*, **107** (1972), 166—170.
- [27] Sopory, S. K., Maheshwari, S. C., *Curr. Sci.*, **42** (1973), 247—248.
- [28] 伴義之、国分祯二、宫司佑三, 鹿兒島大学農学部學術報告, **21** (1971), 77—81.
- [29] Harn, C., *SABRAO Newsletter*, **3** (1971), 39—42.
- [30] Irikura, Y., Sakaguchi, S., *Solanum Potato Research*, **15** (1972), 170—173.
- [31] Guha, S., Maheshwari, S. C., *Phytomorphology*, **17** (1967), 454—461.
- [32] Sunderland, N., *Sci. Progr. Oxf.*, **59** (1971), 527—549.
- [33] Nitsch, J. P., *Phytomorphology*, **10** (1969), 389—404.
- [34] 郭仲琛、王玉英、钱南芬、顾淑荣、龚明良、徐惠君, 植物学报, **15** (1973), 37—52.
- [35] Guha, S., Iyer, R. D., Gupta, N., Swaminathan, M. S., *Curr. Sci.*, **39** (1970), 174—176.
- [36] Sunderland, N., Wicks, F. M., *Nature (Lond.)*, **224** (1969), 1227—1229.
- [37] Sunderland, N., Wicks, F. M., *J. Exp. Bot.*, **22** (1971), 213—221.
- [38] Nitsch, C., Noreel, B., *C. R. Acad. Sci.*, **276D** (1973), 303—306.
- [39] Bennett, M. D., Hughes, W. G., *Nature*, **240** (1972), 566—568.
- [40] 中国科学院遗传研究所三室二组, 遗传学通讯, **2** (1973), 13—23.
- [41] 孙敬三、王敬驹、朱至清, 中国科学, 1974, 2, 163—168.
- [42] 孙敬三、王敬驹、朱至清, 植物学报, **15** (1973), 163—173.
- [43] Nishi, T., Mitsuoka, S., *Jap. J. Genet.*, **44** (1969), 341—346.
- [44] Nitsch, J. P., Nitsch, C., Hamon, S., *C. R. Acad. Sci., Paris*, **269D** (1969), 1275—1278.
- [45] Tanaka, M., Nakata, K., *Japan Jour. Genetics*, **44** (1969), 47—54.
- [46] Sharp, W. R., Dougall, D. K., Paddock, E. F., *Bull. Torrey Bot. Club*, **98** (1971), 219—222.
- [47] Sanger, J. M., Jackson, W. T., *J. Cell. Sci.*, **8** (1971), 289—301.
- [48] Gamborg, O. L., Constabel, F., Miller, R. A., *Planta*, **95** (1970), 355—358.
- [49] Clapham, D., *Z. Pflanzenzüchtg.*, **69** (1973), 142—155.
- [50] Bernard, S., *Rev. Cyto. et Biol. Vég.*, **34** (1971), 165—188.
- [51] La Cour, L. F., *Heredity*, **3** (1949), 319.
- [52] Sharp, W. R., Raskin, R. S., Sommer, H. E., *Planta*, **104** (1972), 357—361.
- [53] Binding, H., *Nature, New Biology*, **237** (1972), 283—285.