

物属性,我们认为PAP法是有高度专一性和灵敏性,同时染色的切片标本能长期保存,但用免疫荧光技术定位酶,已染色的叶切片标本只能作短期保存;PAP法所用的三种抗体均不需纯化,还可稀释后使用,可节省抗体;免疫荧光技术只能在细胞水平上定位酶,免疫铁蛋白方法仅能在分子水平定位酶。而PAP法,HPO经DAB和 H_2O_2 染色后形成稳定的沉淀物,它能与钼酸形成螯合物,可在电镜下进行观测,因此PAP法不仅可借助光学显微镜观察,在细胞水平上定位酶,还可通过超薄切片在电镜下观察,在细胞亚显微结构水平上作酶的定位。

PAP法在叶片内定位酶有广阔的应用前景,也是深入研究叶绿体类囊体膜上及膜内酶系分布的有效手段。

参 考 文 献

[1] Hattersley, P. W., 1977. *Australian Jour-*

nal of Plant Physiology; 4(4):523-539.

[2] 王美琪, 1980. *实验生物学报*, 13(3):249-255.

[3] 王维光, 李立人, 1980. *植物生理学报*, 6: 257-261.

[4] Sternberger, L. A. & Petrali, J. P., 1977. *J. H. Cytochem*; 25(9):1036-1042.

[5] Vacca, L. L., Rosario, S. L., Hsu, K. C. et al, 1975. *J. H. Cytochem.*, 23(3):208-214.

[6] Johnson, G. D., Holborow & Dorling, J. 1978. in "Handbook of Experimental Immunology" ed. Weir, D. M., Blackwell Scientific publications. (15):22-28.

[7] 陈佛痴, 朱秀雄. 1964. "组织学方法", 吉林人民出版社, 88-89.

*承中国科学院上海细胞生物所肿瘤室许河生同志提供羊抗兔 γ 球蛋白抗血清;中国科学院生理所五室神经化学组提供显微镜观察和拍照设备;本所陈乃先、谢勤东两位同志冲印和放大照片,特此致谢。

脱落酸和二硫苏糖醇对水稻花药培养的影响(简报)

梁海曼 方国伟*

(杭州大学生物系植物生理教研室)

Imamura & Harada(1980)^[1]报告,脱落酸(ABA)能促进烟草花药培养效率。Johansson et al.(1982)^[2]的报告则指出,降低内源ABA水平有利于提高加拿大银莲花(*Anemone canadensis*)花药培养效率。两者不一致。为此我们进行外源ABA的添加试验。

Pannbacker & Bravard(1972)^[3]报告,二硫苏糖醇(DTT)为cAMP(环腺苷酸)磷酸二酯酶的抑制剂。Hamada et al.(1982)^[4]报告,DTT能防止膜ATP酶的失活等等。看来,DTT有可能抑制分裂而促进分化。考虑到ABA和cAMP之间也存在一定的联系^[1]同时进行ABA和DTT的添加试验可能是有益的。因此,本文中合并报告了ABA和DTT的添加试验。

材 料 和 方 法

材料为糯稻测²⁴含单核后期花粉的花药。接种时取第1—4个一次枝梗上第2—4朵花。

灭菌按常规,用0.1%升汞灭菌8分钟。基本培养基为N₆。蔗糖3%。诱导培养时,激素为2,4-D 2毫克/升和NAA 2毫克/升。诱导培养8周。愈伤组织转入分化培养时,激素为NAA 0.1毫克/升和激动素(KT)或6-苄基腺嘌呤(BA) 1毫升/升。

ABA和DTT均只在诱导愈伤组织的培养基中添加。添加量,ABA为2毫克/升,DTT为0.5毫克/分子/升。

培养温度 $25 \pm 1^\circ C$ 。诱导培养在暗中进行。分化培养在荧光灯连续光照下进行,照度800米烛光左右。

*81级研究生。

结果和讨论

表1 ABA对花粉发育的影响

处 理	统计花粉总数(粒)	退化死亡花粉(%)	正常花粉(%)	大核花粉(%)	多核花粉(%)
对 照	265	21.9	44.5	25.7	7.9
ABA	826	50.8	33.5	10.7	6.0

*在培养第20天时镜检,多核花粉含多细胞花粉。

表2 DTT对花粉发育的影响

处 理	统计花粉总数(粒)	退化死亡花粉(%)	正常花粉(%)	大核花粉(%)	多核花粉(%)
对 照	457	58.7	26.0	5.5	10.1
DTT	683	67.8	21.8	7.3	3.1

*在培养第21天时镜检。

表3 ABA对愈伤组织诱导率的影响

处 理	接种花药数 (个)	产生愈伤组织>1毫米的花药		产生愈伤组织<1毫米的花药		总愈伤组织 诱导率(%)
		(个)	(%)	(个)	(%)	
对 照	685	67	9.8	18	2.6	12.4
ABA	851	59	6.9	8	0.9	7.9

*9月11日接种,花药培养第51天时统计。

表4 DTT对愈伤组织诱导率的影响

处 理	接种花药数 (个)	产生愈伤组织>1毫米的花药		产生愈伤组织<1毫米的花药		总愈伤组织 诱导率(%)
		(个)	(%)	(个)	(%)	
对 照	762	23	3.0	14	1.8	4.9
DTT	812	25	3.1	22	2.7	5.8

*9月14日接种,花药培养第49天时统计。

表5 ABA对愈伤组织分化的后效应

处 理	NAA + KT				NAA + BA			
	接种管数	分化根	分化绿点	分化绿芽	接种管数	分化根	分化绿点	分化绿芽
对 照	10	1	2	0	10	1	0	0
ABA	10	1	4	1	10	2	4	1

*均指管数,分化培养30天时统计,每管接种3块愈伤组织。

表6 DTT对愈伤组织分化的后效应

处 理	NAA + KT				NAA + BA			
	接种管数	分化根	分化绿点	分化绿芽	接种管数	分化根	分化绿点	分化绿芽
对 照	10	1	1	0	10	1	1	0
DTT	10	1	3	0	10	0	6	2

*均指管数,每管接种3块愈伤组织,分化培养30天时统计。

从表1和表2所示结果可以看出,在诱导愈伤组织的培养基中添加 ABA 或 DTT,都导致退化死亡花粉不同程度的增加和多核花粉不同程度的减少。显示了两者的启动,对花粉的额外有丝分裂,存在不同程度的抑制作用。但是,这种抑制作用有随着时间而减弱的迹象。因为,如表3、表4所示,培养50天左右时的统计,产生大愈伤组织的花药的百分率,ABA处理的仅比对照少30%左右,DTT处理的则与对照已无区别,而总愈伤组织诱导率反而超过对照。

本试验中使人感兴趣的是,在诱导愈伤组织的培养基中添加 ABA 或 DTT,都具有明显的分化后效应。从表5和表6可以看出,对照的愈伤组织只有个别能分化绿点,完全没有绿芽。诱导培养基中添加 ABA 或 DTT 的,则所得愈伤组织的分化能力明显提高,有不少能分化绿点,还有绿芽。

在分化培养中还观察到,ABA和DTT两者虽然都有促进分化的后效应,两者的具体表现还是有区别的。来自添加 ABA 的愈伤组织,转入分化培养后,第13天起出现绿点,直到第30天才出现绿芽;来自添加 DTT 的,则从开始出现绿点到形成绿芽的过程是在第19—24天内进行的,显示出分化过程比较挪后而集中。又,如图所示,由 ABA 所得绿芽,以后始终没能长大,而由 DTT 所得绿芽则生长良好。因此,在本试验剂量水平下,看来,DTT 的效果优于 ABA。



ABA 是内源生长抑制剂,和休眠、衰老密切相关 (Moore, 1979^[5]; Noodén & Leopold, 1978^[6])。关颖谦等(1981)^[7]报告了外源 ABA 对离体水稻叶片衰老的促进。显然,本试验中 ABA 所导致的花粉衰退增加,绿芽生长停滞,可以理解为是 ABA 抑制效应的反映。

关于 ABA 对芽分化的影响,山口和中岛(1972)^[8]报告过 ABA 可以促进甘薯块根组织培养物形成不定芽。Shephard(1980)^[9]报告 ABA 可以促进马铃薯原生质体愈伤组织的枝发端。Inoue & Maeda (1981)^[10]报告,先用 ABA 预培养再用激动素后继培养水稻种子愈伤组织,可以显著促进芽的分化和植株的形成;指出,水稻器官发育初期可能需要 ABA。因此,ABA 促进芽分化的可能性是存在的。其中,Inoue & Maeda 二步培养法的试验结果更是和本试验结果很相似。可是都没有能够说明 ABA 促进分化芽的原因。

关于 DTT 在植物组织培养中的外源应用还未见报道。如果 DTT 确能提高内源 cAMP 水平,则参照张述祖等(1980)^[12]报告外源 cAMP 能抑制白菜花药愈伤组织率, Mizuno & Komamihe(1978)^[13]报告外源 cAMP 能促进胡萝卜根韧皮组织分化的管胞分子的实验事实等,可以设想本试验中 DTT 是通过影响内源 cAMP 水平而延缓脱分化促进分化芽的。但是, Brown & Newton(1981)^[11]的综述中表明,在多数例子中,ABA 和 cAMP 的影响是相对抗的。联系到本试验中,ABA 和 DTT 对脱分化和分化的影响,尽管存在明显差别,却是基本相似的事实,DTT 影响培养效率的原因,就不一定是,或不可能仅仅是由于影响了内源 cAMP 的水平。

因此,关于 ABA 和 DTT 的影响原理,特别是 DTT 促进分化后效应的机理,还有待于探索。当然,作为两个有希望应用于调控植物培养物分化的因素,还需要进一步研究和确定 ABA 和 DTT 两者在促进分化上的适宜处理方式,处理时间和剂量范围。