

大豆花粉离体培养获得愈伤组织

刘德璞 赵桂兰

(吉林省农业科学院大豆研究所)

摘 要

大豆花穗置低温(7°—8℃)冷处理5、8、10、12天,取花药置培养皿中,用盖玻片压出花粉粒,去掉残渣,加入液体培养基。基本培养基是改良的B₆,参照高国楠原生质体培养基附加糖、椰乳、水解酪蛋白等有机物,0.05—0.2mg/l 2,4-D,0.1—0.5mg/l Zeatin,0.5—1mg/l NAA。20天后见花粉分裂,30天见细胞团。40—50天形成肉眼可见的愈伤组织。分裂的花粉最后达接种时培养皿中花粉的60—70%以上。活体观察花粉分裂大致有多细胞型和游离核型。将直径2mm大小的愈伤组织转至固体培养基继续增殖而获得大量愈伤组织。分化培养获得根,未见芽的分化。

大豆单倍体培养技术的研究,在花药培养方面,国内已取得进展。简玉瑜等^[1]、尹光初等^[2]于一九七九年先后从花药培养获得植株。但由于大豆花药体细胞组织很容易形成愈伤组织,要确定愈伤组织和幼苗的来源是较困难的。培养游离的花粉不仅可以避开这个难点而且对于细胞杂交、基因工程也是一个很好的实验系统。目前,国内外尚未见到这方面的报道。本试验于八三年和八四年进行,得到初步结果:游离的大豆花粉在合适的培养条件下可以分裂并形成愈伤组织。本文将试验情况简报如下。

材 料 与 方 法

供试材料为吉林13号栽培种。春季播种于田间。取单核孢子期的花穗作低温(7°—8℃)5、8、10、12天的预处理,然后再行常规灭菌,接种花粉。接种花粉的方法是:将花药放培养皿中,用盖玻片轻压出花粉,去掉药壁残渣,再加入液体诱导培养基。每皿接种100个花药的花粉。在40—50次/分回旋摇床上培养,温度25℃,无光照。15—20天后添加新鲜培养基。待见花粉分裂后每隔7天添加过渡培养基,同时将已分裂的花粉分皿培养。愈伤组织长至1—2mm大小时,转至固体培养基促其增殖。20—30天后转至分化培养基促进分化。用倒置显微镜活体观察液体培养基中的花粉的发育和生长情况。醋酸洋红染色观察处理中的花粉。

* 此工作简玉瑜老师给予指导。
本文于1985年9月25日收到。

结果与讨论

一、大豆花穗冷处理对花粉发育的影响

低温预处理花药对小孢子发育的影响和对诱导的作用已有文献论述^{〔3〕〔6〕}。我们对大豆花穗做冷处理试验,也收到好的效果。为试验花粉在接种前对激素的反应,对冷处理又分了三组:①取花穗置 7°C — 8°C ,5、8、10、12天;②取花穗用 2mg/l 2,4-D溶液浸湿后再置 7°C — 8°C ,5、8、10、12天处理;③取花穗用 2mg/l 2,4-D+12%蔗糖溶液浸湿后再置 7°C — 8°C ,5、8、10、12天处理。结果,经5天处理即可在培养前观察到有均等分裂的花粉。在单冷5天和2,4-D冷8天的处理组,经培养都获得大量分裂的花粉。从花粉大量分裂出现的时间看,2,4-D冷8天处理的比单冷5天的早15天左右。加糖的由于污染而未见结果,但对较长时间的处理似乎有保鲜作用。

二、花粉粒的游离

摸索过挤压、过滤、离心等程序的游离方法,结果是花粉获取量少,而且很易污染。采用盖玻片挤压法游离花粉,不必离心过滤,可减少污染机会,获得量也较多,且花药的一些对花粉发育有促进作用的活性因子可以释在培养基中,对花粉的分裂有好处。但耽心的是,去掉药壁残渣后遗留下的残渣是否形成愈伤组织而污染花粉愈伤组织。从本试验获得的几皿分裂的花粉看,残留的少量药壁没有形成愈伤组织。是前冷处理的原因还是挤压磨碎的作用还不清楚。

三、花粉分裂的诱导

基本培养基采用改良的 B_5 ^{〔1〕}和高国楠用于培养大豆原生质体的基本培养基^{〔5〕},参照原生质体培养基附加各种糖、维生素,椰乳10%,水解酪蛋白 250mg/l ,丝氨酸 100mg/l ,肌醇 5000mg/l ,谷氨酰胺 800mg/l ,2,4-D $0.05\sim 0.2\text{mg/l}$,Zeatin $0.1\sim 0.5\text{mg/l}$,NAA $0.5\sim 1\text{mg/l}$ 。试验第一步先用粉1、粉2、……等培养15—20天;第二步在原培养皿内补加新培养液,做如下处理:粉1+粉1,粉1+粉3,粉1+粉4,粉2+粉2,粉3+粉3,粉4+粉4。第一步培养时,粉1、粉3、粉4都见到花粉分裂。当加入新培养基后,粉1+粉4,粉4+粉4,见大量花粉开始分裂。说明粉1和粉4对诱导花粉分裂都有作用,而粉4更有效果。

四、继代培养

在粉4和粉1+粉4的培养基中的花粉细胞团,在形成愈伤组织的过程中,需逐步添加改变了渗透压的培养基,每周加一次,直至基本取代原培养基。否则,细胞壁破裂,细胞内含物溢出。经三周过渡培养后,便形成了肉眼可见的乳白色愈伤组织(见图

版)。当长至1—2 mm 大小时,转至固体培养基继代培养增殖。培养基为 B₅, 6BA 0.5mg/l、IBA2mg/l, IAA 1mg/l, K_{0.5}mg/l。从而获得大量愈伤组织。这种愈伤组织表面细腻有光泽。待长至黄豆粒大小时,转至分化培养基。试验了33个分化培养基,只见到有芽点和根的产生,而未获得芽。

五、离体培养的花粉粒的发育情况

对培养在液体培养基中的花粉,用倒置显微镜进行活体观察,照像记载了从单花粉分裂至形成细胞团、愈伤组织的过程(图版)。培养15天后,少量的花粉粒膨大,内有浓密的胞质。当加入新培养基后3—5天花粉开始分裂,紧接着在后来的几天里花粉大量地分裂。分皿培养后,未分裂的花粉陆续还在分裂,最后达原初皿花粉的60—70%以上,没分裂的花粉已很少存在了。似乎一旦一定量的花粉分裂,对其他未分裂的花粉有着一一种很骤效的诱导作用。分裂的花粉均等细胞型和游离核型都存在〔4〕,有的直接形成多细胞团,有的形成多粒细胞,然后再各自独立成为多细胞团。分裂的结果,大部形成愈伤组织,同时也观察到有胚状体的产生。没有染色观察,但根据接种时单核和双核的花粉都存在的情况分析,接种时处于单核和双核的花粉经培养都可分裂。因此,后期获得的花粉培养物是单核和双核花粉的混合分裂产物,形成的细胞团有的也是生殖核、营养核的分裂嵌合体。

本试验是初步的,有待于做大量的工作去完善技术和促进分化。

参 考 文 献

- [1] 简玉瑜等“大豆花药培养的研究”《吉林农业科学》1980年第二期。
- [2] 尹光初等“大豆花药培养研究”《科学通报》Vol. 25 No. 18. P. 864.
- [3] 渠荣达等《植物生理学报》Vol. 9. No. 4 (1983) 375—381.
- [4] 朱至清等“小麦雄核发育的细胞学研究”《花药培养学术讨论会文集》科学出版社, (1977) 113~119.
- [5] K·N·Kao, In L. R. wetter and F. Constabel (eds) Plant Tissue Culture Methods 1982, 52.
- [6] W. R. Sharp, P. O. Larsen, E. F. Paddock, and V. Raghavan. 1979. Plant Cell and Tissue Culture Principles and Applications, 203—219.

CALLUS FORMATION FROM POLLEN CULTURE
INVITRO OF SOYBEAN

Liu Depu Zhao Guilan

(*Soybean Institute, Jilin Academy of Agricultural Science
Gongzhuling China*)

Abstract

The flower buds detached at late unicellular to early bicellular stages were pretreated by chilling for 5, 8, 10, 12 days at 7°C, then pollen grains were liberated by pressing anthers with coverslip in dish, fractions of the anthers were removed away and liquid medium was added in it. Basal medium was modified B₅, referred to K. N. Gao's medium for culturing protoplasts, supplemented with sugar, coconut milk, casein hydrolysate, vitamin, and 0.05~0.2mg/l⁻¹ 2,4-D, 0.1~0.5mg/l⁻¹ zeatin, 0.5~1mg/l⁻¹ NAA. After 20 days of culture, pollen divisions can be observed with inverted microscope; after 30 days of culturing, cell aggregates formed, after 40—50 days, calli which can be seen by eye formed. Finally, divided pollens were 60—70% of pollens inoculated initially in some dishes.

There were two ways of pollen division—multicellular and free-nuclear. Calli at the size of 2mm were transferred to the solid medium to propagate and a lots of calli were gained. The test for inducing differentiation produced roots without buds.