

大豆花药培养几个问题的研究*

叶兴国 付玉清 王连铮

(中国农业科学院)

提 要

本文研究了大豆花药培养中的培养基、基因型、激素配比、糖分种类及浓度、取材时期、预处理温度、接种方式、有机添加物等因素对愈伤组织诱导频率的影响。认为大豆花药在培养基上的脱分化启动具有群体效应,合适的取材时期是单核中晚期。高浓度蔗糖能抑制体细胞愈伤组织的产生,而愈伤组织的分化则需要较低的蔗糖浓度。愈伤组织在 $B_5+0.5\text{mg}/\text{INAA}+1.0\text{mg}/\text{IKT}+1\%$ 蔗糖和改良 $MS+0.1\text{mg}/\text{IIBA}+0.1\text{mg}/\text{IGA}_3+0.4\text{mg}/\text{INAA}+0.5\text{mg}/\text{IBA}+0.5\text{mg}/\text{IKT}+0.5\text{mg}/\text{IZT}+0.5\text{mg}/\text{l}$ 生物素+2%蔗糖等培养基上分化出了芽,在改良 $MS+0.5\text{mg}/\text{IIBA}+0.5\text{mg}/\text{IBA}+0.5\text{mg}/\text{IKT}+0.5\text{mg}/\text{IZT}+5\%$ 蔗糖+1%麦芽糖等培养基上产生了胚状体。

关键词 大豆;花药培养;脱分化;胚状体

花药培养作为一种育种手段已在许多作物上取得了成功^[5]。大豆花药培养的研究,如能突破出苗和诱导频率这一关,将会加速大豆新品种的选育,缩短育种年限。1974年 Ivers 首先开展了大豆花药培养研究,仅获得了体细胞愈伤组织及其类苗器官^[8]。1978年母秋华等也获得了愈伤组织,没有证明这些愈伤组织是否来源于花粉^[1]。1979—1982年简玉瑜、尹光初等先后对 B_5 培养基进行了研究改良,相继获得了花粉愈伤组织,并分化出了少量芽状物和花粉幼苗^[2,6]。1986年刘德璞等获得了离体花粉的愈伤组织^[4]。1991年 Kadlec、Zhuang 等分别获得了花药培养愈伤组织、胚状体类似物,没有得到再生植株^[9,10]。

尽管大豆花药培养有上述几例报道,但其方法,技术还不够成熟。出愈率、分化率很低,芽分化和植株再生缺少重复性。尤其近十多年来,关于大豆花药培养方面的研究很少,有必要进行大量工作,使大豆花药培养形成一种成熟的方法应用于大豆育种实践。作者1992—1993年二年间共接种了50多个基因型的二万多个花药,并对愈伤组织进行了分

* 此项研究得到了张贤泽先生的具体指导和尹光初先生的通讯指导,致以谢意。

本文于1993年11月29日收到。

This paper was received on Nov. 29, 1993.

化研究,现简报如下。

材料和 方法

1. **试验材料** 除来自美国的 PI486355、东北地区的黑农 21、铁丰 8 号、江南地区的泗豆 11 号外,其余大豆品种来自于华北地区和本课题组 F_1 、 F_2 代材料。

2. **取材和接种** 开花前分别取不同部位、不同大小的小花,进行 0—1℃、4—5℃、7—8℃ 三种方法的低温预处理 3—5 天。灭菌前先剥去萼片,包在纱布中用 75% 酒精灭菌 30 秒钟,0.1% 升汞灭菌 7—10 分钟,无菌水冲洗 4—5 次。将材料放在灭过菌的培养皿中,加少许无菌水,轻轻拨动材料或挪动位置,花药便可以分离出来。分单个花药和 3—4 个花药二种方式接种,研究其它因素时采用后一接种方式,每瓶中接种 30 个花药或 30 个点。

3. **培养基** 选用了 MS、 B_5 、MSB、 N_6 和二种改良的 MS 培养基 (MS_1 、 MS_2) 共六种培养基。 MS_1 的变动成份为(单位:mg/l): NH_4NO_3 410、 KNO_3 950、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 220、 NaH_2PO_4 50、 KH_2PO_4 125、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 250、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 10、 H_3BO_3 6、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.0、KI0.75; MS_2 的变动成份为: NH_4NO_3 800、 KNO_3 2500、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 220、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 200、 KH_2PO_4 150、 NaH_2PO_4 50、 $(NH_4)_2SO_4$ 134、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 10、 H_3BO_3 5、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 2、KI0.75。添加水解酪蛋白(CH)500mg/l、谷氨酰胺(Glu)800mg/l、天冬酰胺(Asp)100mg/l、 V_{B1} 80mg/l、蔗糖 90g/l、gelrite2.3g/l,pH 值 5.8—6.0。葡萄糖用细菌过滤器过滤灭菌,其它成份高压灭菌。除注明外,一般选择 MS_1 培养基和 9% 的蔗糖浓度,附加 2.4-D2.0mg/l、KT0.5mg/l。

4. **细胞学观察** 卡诺固定液(3 份 95% 酒精:1 份冰醋酸)固定花蕾 24 小时,换入 70% 酒精中保存,1% 醋酸洋红直接染色观察花粉粒发育状况。0℃ 低温冰水处理 24 小时,改良卡诺液(3 份 95% 酒精:1 份冰醋酸:0.5—1 份二甲苯)中固定 4—7 天,1% 醋酸洋红染色 4 小时以上,45% 醋酸压片观察愈伤组织和根尖细胞染色体。

研究结果

1. **培养基** 花药在 MS、 MS_1 、 MS_2 、 B_5 、 N_6 五种培养基上的出愈率分别为 37.1%、42.9%、34.2%、35.2% 和 23.9% (表 1),接种用基因型为丰收黄和 PI486355, N_6 培养基上

表 1 培养基对愈伤组织诱导频率的影响

Table 1 Effect of media on induction frequency of calli

| 培养基 Medium | 接种花药数 No. of anthers | 产生愈伤组织数 No. of calli | 诱导频率(%) Induction frequency |
|---------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| MS | 240 | 89 | 37.1 |
| MS_1 | 340 | 146 | 42.9 |
| MS_2 | 228 | 78 | 34.2 |
| B_5 | 210 | 74 | 35.2 |
| N_6 | 300 | 71 | 23.7 |

出愈率最低,其它四种培养基上的出愈率相近。表明 MS、MS₁、MS₂、B₅ 培养基比较适合于大豆花药培养中愈伤组织的诱导。

2. 激素种类和浓度 2,4-D 用量(单位 mg/l)1.0、2.0、3.0、4.0 时的出愈率分别为 23.9%、36.9%、25.5%和 18.6%,NAA 用量 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 时的出愈率分别为 12.8%、16.7%、23.3%、27.2%和 25.0%,品种是鲁豆 4 号和郑 492,表明 2,4-D_{2.0}mg/l、NAA_{4.0}mg/l 比较适合愈伤组织的产生,同时也表明,2,4-D 的诱导效果好于 NAA(表 2)。

表 2 激素种类和浓度对愈伤组织诱导频率的影响

Table 2 Effect of plant hormones and their concentrations on induction frequency

| 激素用量 Hormone(mg/L) | 接种花药数 No. of anthers | 产生愈伤组织数 No. of calli | 诱导频率(%) Induction frequency |
|-----------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| 2,4-D 1 | 180 | 43 | 23.9 |
| 2,4-D 2 | 450 | 166 | 36.9 |
| 2,4-D 3 | 200 | 51 | 25.5 |
| 2,4-D 4 | 210 | 39 | 18.6 |
| NAA 1 | 180 | 23 | 12.8 |
| NAA 2 | 180 | 30 | 16.7 |
| NAA 3 | 180 | 42 | 23.3 |
| NAA 4 | 360 | 98 | 27.2 |
| NAA 5 | 180 | 45 | 25.0 |

3. 接种方式和预处理温度 单个花药接种时的出愈率仅为 6.4%,3 个以上花药集中一起接种时的出愈率为 28.5%(表 3),表明大豆花药在培养基上的分裂启动具有群体效

表 3 接种方式对愈伤组织诱导频率的影响

Table 3 Effect of inoculating ways on induction frequency

| 接种方式 Inoculating way | 接种花药数 No. of anthers | 产生愈伤组织数 No. of calli | 诱导频率(%) Induction frequency |
|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| 一个花药 One anther | 204 | 13 | 6.4 |
| 三个以上花药 More than three anthers | 270 | 77 | 28.5 |

表 4 低温预处理温度对愈伤组织诱导频率的影响

Table 4 Effect of low pre-treatment temperature on induction frequency

| 预处理温度 Pre-treatment temperature | 接种花药数 No. of anthers | 产生愈伤组织数 No. of calli | 诱导频率(%) Induction frequency |
|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| 0-1℃ | 180 | 19 | 10.6 |
| 4-5℃ | 330 | 60 | 18.2 |
| 7-8℃ | 180 | 44 | 24.4 |

应。花药经过3—5天低温预处理后接种,0—1℃低温预处理的出愈率10.6%,4—5℃的为18.2%,7—8℃的为24.4%(表4),说明大豆花药合适的预处理温度为4—8℃,0—1℃低温对产生愈伤组织不利。花药取自中黄4号、PI486355和F₂代材料。

4. 糖分种类和浓度 花药在添加4.5%葡萄糖和其它有机成分、激素的MS₁培养基上,出愈率为20.0%,添加9%蔗糖、3%麦芽糖的出愈率为28.9%,添加6%蔗糖、6%麦芽糖的出愈率为24.4%,蔗糖浓度15%、12%、9%、6%、3%时的出愈率分别为39.5%、46.4%、39.8%、36.3%和33.3%。表明3—15%的蔗糖浓度都能产生高频率的愈伤组织,12%可能更为合适,葡萄糖、麦芽糖的诱导效果不及蔗糖。花药取自中黄4号、丰收黄、泗豆11号、中品661等几个品种(表5)。

表5 糖分种类和浓度对愈伤组织诱导频率的影响

Table 5 Effect of sugars on induction frequency

| 糖分种类和浓度 Sugar | 接种花药数 No. of anthers | 产生愈伤组织数 No. of calli | 诱导频率(%) Induction frequency |
|--|-------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| 4.5%葡萄糖 4.5% glucose | 180 | 36 | 20.0 |
| 9%蔗糖+3%麦芽糖 9% sucrose + 3% maltose | 180 | 52 | 28.9 |
| 6%蔗糖+6%麦芽糖 6% sucrose + 6% maltose | 180 | 44 | 24.4 |
| 12% 蔗糖 12% sucrose | 360 | 167 | 46.4 |
| 9% 蔗糖 9% sucrose | 180 | 68 | 37.8 |
| 6% 蔗糖 6% sucrose | 240 | 87 | 36.3 |
| 3% 蔗糖 3% sucrose | 120 | 40 | 33.3 |
| 15% 蔗糖 15% sucrose | 210 | 83 | 39.5 |

5. 基因型 在MS₂+2.0mg/12,4-D+0.5mg/IKT+500mg/ICH+800mg/IGlu+100mg/IASP+9%蔗糖培养基上,3—4个花药接种方式下,几乎所有基因型都能产生愈伤组织,出愈率14.3%—36.6%(表6),其中鲁豆4号、铁丰8号、丰收黄、中黄4号、PI486355、郑492、郑州135、文丰5号等基因型的诱导率较高。

表6 基因型对愈伤组织诱导频率的影响
Table 6 Effect of genotypes on induction frequency

| 基因型 Genotype | 接种花药数 No. of anthers | 产生愈伤组织数 No. of calli | 诱导频率(%) Induction frequency |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| 文丰5号 | 48 | 12 | 25.0 |
| PI486355 | 228 | 78 | 34.2 |
| 早丰1号 | 226 | 38 | 16.8 |
| 豫豆2号 | 100 | 16 | 16.0 |
| 豫豆6号 | 138 | 32 | 23.2 |
| 郑492 | 148 | 56 | 36.6 |
| 郑州135 | 50 | 16 | 32.0 |
| 中油84-14 | 98 | 15 | 15.3 |
| 铁丰8号 | 132 | 34 | 25.8 |
| 丰收黄 | 180 | 48 | 26.7 |
| 鲁豆4号 | 270 | 71 | 26.3 |
| 中黄4号 | 90 | 27 | 30.0 |

注:此表只列出了部分基因型愈伤组织的诱导结果。

6. 愈伤组织的鉴别 花药接种后25天左右开始产生愈伤组织,100天以后仍有愈伤组织产生。经过染色体观察,开始产生的愈伤组织大多为体细胞愈伤组织,染色体数40条,淡黄色、结构松散、形状不规则、增殖较快;30天后产生的愈伤组织大多为单倍体愈伤组织,染色体数14-26条,乳白色、结构致密、形状似球、增殖较慢。根据上述标准,蔗糖浓度15%、12%、9%、6%、3%时,单倍体愈伤组织分别占84.3%、64.7%、66.2%、60.9%和30.0%(表7),表明高浓度蔗糖抑制体细胞愈伤组织的产生,而有利于单倍体愈伤组织的产生。

表7 蔗糖浓度对单倍体愈伤组织和二倍体愈伤组织诱导频率的影响

Table 7 Effect of sucrose concentrations on inoculation frequency of haploid calli and somatic calli

| 蔗糖浓度 (%) Sucrose concentration | 愈伤组织数 No. of calli | 单倍体愈伤组织 Haploid calli | | 体细胞愈伤组织 Somatic calli | |
|-----------------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|--------------------|
| | | 数量 No. | 频率(%) Frequency | 数量 No. | 频率(%) Frequency |
| 3 | 40 | 12 | 30.0 | 28 | 70.0 |
| 6 | 87 | 53 | 60.9 | 34 | 39.1 |
| 9 | 68 | 45 | 66.2 | 23 | 33.8 |
| 12 | 167 | 108 | 64.7 | 59 | 35.3 |
| 15 | 83 | 70 | 84.3 | 13 | 15.7 |

7. 愈伤组织的分化 大豆花药培养产生的单倍体愈伤组织在各种分化培养基上,分化根比较容易,分化芽却十分困难。在 $B_5 + 0.5\text{mg}/\text{INAA} + 1.0\text{mg}/\text{IKT} + 1\%$ 蔗糖(GM14)、

MS₁ + 0.1IBA + 0.1GA₃ + 0.4NAA + 0.5KT + 0.5BA + 0.5ZT + 0.5生物素 + 2%蔗糖 (GM₉ 单位 mg/l, 以下同) 和 $\frac{1}{2}$ MSB + 0.2IBA + 0.4NAA + 0.5KT + 0.5BA + 0.5ZT + 200CH + 200YE + 200LH + 200Glu + 100Asp + 80Lys + 3%蔗糖 (GM₁₁) 等培养基上分化出了少量芽和芽状体, 芽分化频率为 0.46%, 芽状体为 0.34%。在 MS₁ + 0.5IBA + 0.5BA + 1.0KT + 0.5ZT + 250CH + 250YE + 250Glu + 100Asp + 5%蔗糖 + 1%麦芽糖 (GM₁₈) 和 GM₉ 等培养基上, 产生了 7 个胚状体, 频率为 0.40%。

结 论

在前人研究的基础上, 对培养基进行了改良, 同时改变了接种方式, 认为基本培养基的变动和培养基中添加 800mg/lGlu、100mg/lAsp、80mg/lV_{B1} 和 500mg/lCH 等有机成份, 对诱导愈伤组织是有效的。多个花药接种情况下容易产生愈伤组织, 表明大豆花药的脱分化具有群体效应。愈伤组织分化的蔗糖浓度为 1—3%, 高浓度蔗糖不利于芽分化和产生胚状体, 但高浓度蔗糖用于诱导培养基上, 能抑制体细胞愈伤组织的产生, 有利于单倍体愈伤组织的产生。

合适的取材时期是单核中晚期的小花, 标准是下一花露白前的上面 3—4 朵小花, 长度 0.4—0.5cm, 这与前人的观点不尽一致^[2]。灭菌前剥去萼片, 然后用 75%酒精、0.1%升汞灭菌, 在加少许无菌水的培养皿中分离花药的方法能提高接种效率和避免污染。多个花药集中接种表现出群体效应, 比单个花药接种容易产生愈伤组织, 可能是花药间相互分泌物质和有利于保持湿度等。进行愈伤组织及其根尖细胞的染色体检查时, 在固定液中加入 20%左右的二甲苯, 能溶解细胞中的油脂。

愈伤组织出现后的适当大小及时分化(5—7 天为宜), 继代后的愈伤组织将失去分化能力, 很难再调回适合分化的状态。愈伤组织的质量, 状态和培养基中的激素搭配是大豆花药愈伤组织分化的关键性因素。尽管大豆花药培养能产生频率很低的芽和胚状体, 但芽, 胚状体的进一步生长、成熟、萌发又是一个有待解决的问题。大豆花药培养的难度同其意义一样的重大。

参 考 文 献

- [1] 王连铮, 王金陵主编, 1992, 大豆遗传育种学, 科学出版社, 95—119
- [2] 尹光初等, 1981, 大豆花粉育株的研究, 黑龙江农业科学, 1:12—14
- [3] 吉林省农业科学院作物研究所大豆组培室, 1976, 从大豆下胚轴诱导植株成功, 植物学报, 3:258—262
- [4] 刘德璞等, 1986, 大豆花粉离体培养获得愈伤组织, 大豆科学, 1:17—19
- [5] 胡含主编, 1988, 植物体细胞遗传与作物改良, 北京大学出版社
- [6] 简玉瑜等, 1980, 大豆花药培养的研究, 吉林农业科学, 2:54—61
- [7] 颜昌敬主编, 1991, 植物组织培养, 上海科学技术出版社
- [8] Ivers, D. R. et al., 1974, Anther culture in soybean, Crop Sci., 14:891-893
- [9] Kadlec, M. et al., 1991, Anther culture in soybean, Soybean Genetics Newsletter, 18:121-124
- [10] Zhang X. J. et al., 1991, Embryoids from soybean anther culture, Soybean Genetics Newsletter, 18:265

STUDY ON SEVERAL PROBLEMS OF SOYBEAN ANTHER CULTURE

Ye Xinguo Fu Yuqing Wang Lianzheng

(*Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081*)

Abstract

Various factors such as medium, genotype, hormone, sugar, inoculating way and organic supplement were studied in this study, these factors influence the formation on the callus in anther culture of soybean. Population effect occurred in the course of the anther's degeneration. The anthers during the uninucleate middle-late stage produce the calli easier than during the uninucleate early-middle stage. The higher concentration of sucrose suppressed somatic calli and was favourable to the haploid calli in the process of the anther's culture. Modified MS mediums and B₅ Medium were suitable for the anther culture. Buds and bud-like tissue were obtained after the calli were transferred to B₅ medium with 0.5mg/l NAA, 1.0mg/l KT, 1% sucrose or with 0.1mg/l IBA, 0.1mg/l GA₃, 0.4mg/l NAA, 0.5mg/l KT, 0.5mg/l BA, 0.5 mg/l ZT, 2% sucrose. Cultureing the calli on the modified MS medium containing 0.5mg/l BA, 1.0mg/l KT, 0.5mg/l ZT, 0.5mg/l IBA, 5% sucrose, 1% maltose or containing 0.5mg/l BA, 0.5mg/l KT, 0.5mg/l ZT, 0.4mg/l NAA, 0.1mg/l IBA, 0.1mg/l GA₃ and 2% sucrose, embryoids were formed. The lower concentration of sucrose was advantageous to the emergence of the bud and embryoid. However, it the buds or embryoids was very difficult to develop furtherly on mediums.

Key words Cultivated soybean; Anther culture; Regeneration; Embryoids

《作物育种研究与进展》出版

(华中农业大学刘后利教授 主编)

本书是国内作物育种各学科著名专家教授的权威性综述论文集,内容丰富新颖,是作物育种教学科研必备的高水平书籍,共三册,农业出版社出版,印刷精良。第一册(15篇论文)定价27元,二、三册各25元,共77元,外加邮费10%,共84.70元。也可分册购买。购者可将款汇往“湖北武汉狮子山华中农业大学农学系刘贵宪收(邮编430070)”。

ISSN 1000-9841

大豆科学

SOYBEAN SCIENCE

第 13 卷 第 3 期

Vol. 13 No. 3

1994

ISSN 1000-9841

