

大豆花粉植株的诱导及其 雄核发育的研究

尹光初 朱之垠 徐振 陈力 李学湛 毕凤云

(黑龙江省农业科学院作物育种研究所)

摘 要

通过花药离体培养,采用变动的B₅培养基,成功地诱导出大豆花粉愈伤组织,并分化出完整的大豆幼苗。经根尖染色体检查, $2n=20$, 证明是由单倍性花粉发育而来的。

花粉发育时期以单核早、中期较为合适。

离体培养大豆花药,单核花粉可以通过不均等分裂和均等分裂由营养性质的核分裂成两个细胞,它们继续分裂形成多细胞球,多细胞球进一步发育成为外形不规则的花粉愈伤组织块,在适宜的条件下,进而分化出单倍体幼苗。

用培养花药的方法,诱导单倍体植株,已在很多重要粮食作物上获得成功,并通过此法选育出烟草、水稻、小麦等新品种在生产上应用^[8, 9]。但在油料作物方面,成功的报导很少。特别在大豆花药培养方面,至今未见成功的报导。1974年, Ivers, D.R. 等从大豆花药的药隔组织诱导出体细胞愈伤组织,并分化出类苗器官 (Shoot-like organ) ^[10]。国内简玉瑜等^[1]曾诱导出大豆芽状物。大豆是我国重要的油料作物和植物蛋白的重要来源,若能通过花药培养的方法形成花粉植株,加倍后获得纯合二倍体,无疑会加速新品种的选育过程。同时对大豆遗传理论的研究,也提供了一种新的手段。

我们在诱导出大豆花粉植株的基础上^[2, 3],对影响花粉植株形成的诱导因素,离体花药的雄核发育,花粉愈伤组织和体细胞愈伤组织的区分及其产生条件等问题作了进一步的研究,本文报导这些研究的有关结果。

材 料 和 方 法

供试材料为大豆 (*Glycine max* (L) Merr) 杂种 F₁、F₂、F₃ 或品种的花药。在大豆现蕾期,用醋酸洋红或碘——碘化钾压片镜检,以确定花粉发育时期。选用花粉发育时期为单核早、中期的花药 (图2) 进行接种。在大量接种花药的时候,检查每朵花的孢子发生是不可能的。为了选择适宜的花药,我们根据蕾的长度和苞叶长同蕾长的比

*本工作得到王连铮、陈洪文付研究员的指导和帮助,大豆研究所提供实验材料,陈运生同志协助拍照,王润芝同志参加部分工作,一并致谢。

例等,确定了小孢子发育相关联的时期。接种前,选取合适的花蕾(图1,B、C),在我们的实验条件下,花蕾的长度为2.5—3.5毫米,苞叶长度为蕾长的 $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{3}$ 。这些指标因不同材料和栽培条件而有所差异,开花前期和后期也不一样,应及时根据实际观察对指标进行修正。将适宜花蕾用自来水冲洗数分钟,放75%的酒精中浸泡0.5—1分钟;再放在0.1%的昇汞溶液中浸泡12分钟左右,然后用无菌水冲洗四次,在无菌条件下取出花药接种在培养基上。

在对基本培养基筛选实验的基础上,采用变动了的B₅培养基。其变动部分主要是将磷酸盐、硼、钼、蔗糖浓度和维生素作适当调整。琼脂浓度降低为0.4—0.5%。愈伤组织分化的培养基是将诱导愈伤组织的培养基中的2,4-D去掉,添加激动素0.5—4.0mg/l,6-苄基嘌呤0.5—6.0mg/l,吲哚乙酸0.5—2.0mg/l,蔗糖浓度降低一半。pH调至6.0后,在1.0—1.1公斤/厘米²压力下热压灭菌20分钟。

接种后的花药置昼夜温度为20—29℃的培养室;愈伤组织转移后置18—25℃下进行分化。白天用日光灯补充光照10小时左右。

为观察离体花药的雄核发育,我们固定了接种后10, 15, 20, 25, 30天的花药,采用朱至清等^[4]提出的花药整体制片法,稍稍延长染色、漂洗、透明的时间,在制片时用镊子捣碎后再进行封固。愈伤组织和根尖染色体观察用铁矾苏木精和孚尔根染色法。

实验结果

一、花粉愈伤组织的形成

接种在培养基上的花药,在外部形态上逐步显出不同的变化。处于四分孢子期的花药,接种后颜色逐渐变白,而且一直保持乳白色,始终不产生愈伤组织。处于单核晚期或双核期的花药,接种后颜色逐渐变褐,然后呈黑色,花粉细胞的内含物逐渐解体、消失,变成空瘪花粉。只有处于单核早、中期的花药,接种后10天左右,颜色逐渐变褐,以后一直保持暗褐色,并开始出现愈伤组织。这些早期出现的愈伤组织,基本上都是体细胞愈伤组织,有些可以明显看出是从花丝断口产生的。愈伤组织出现的高潮是在20—30天之间,但出现愈伤组织持续的时间很长,70天以后还有愈伤组织产生。我们曾对35天以后产生的愈伤组织作过染色体数目的检查,结果约有40%是单倍性的, $2n=20$ (图16); 11%是双倍性的, $2n=40$ (图23); 其余为异倍体,染色体数目为20—40不等(图17—22)。据我们初步观察,体细胞愈伤组织一般出现较早,接种后10天左右即陆续产生;这种愈伤组织增殖速度快,继代培养时易于老化,很难有器官分化(图11, A—C)。而花粉愈伤组织一般出现较晚,增殖速度慢(图11, D、E);继代培养时不易老化,在适宜条件下,可以分化出根、芽(图12—14),乃至完整的幼小植株(图24)。

基本培养基对大豆愈伤组织形成的影响很大。我们曾对Ms、Nitsch、Miller、N₆、B₅等基本培养基作过对比试验,结果以B₅培养基效果最好。

蔗糖浓度对愈伤组织的诱导频率影响很大。我们曾对不同蔗糖浓度作过比较实验(表1),蔗糖浓度为12%时,诱导频率达25.66%,低于9%、高于12%时,诱导频率都显著下降。

表 1. 蔗糖浓度对愈伤组织产生频率的影响 (采用变动的培养基)

| 蔗糖浓度 % | 吉 林 13 | | | 黑 农 21 | | | 九 农 2 号 | | | F ₂ -7703-24 | | | 平 均 | | |
|-----------|-----------|-----------|-------|-----------|-----------|-------|-----------|-----------|-------|-------------------------|-----------|-------|-----------|-----------|-------|
| | 接种 花药数 | 愈伤 组织数 | % | 接种 花药数 | 愈伤 组织数 | % | 接种 花药数 | 愈伤 组织数 | % | 接种 花药数 | 愈伤 组织数 | % | 接种 花药数 | 愈伤 组织数 | % |
| 6 | 225 | 6 | 2.66 | 250 | 13 | 5.20 | 100 | 1 | 1.00 | 50 | 0 | 0 | 625 | 20 | 3.20 |
| 9 | 250 | 20 | 8.00 | 175 | 17 | 9.71 | 25 | 4 | 16.00 | 125 | 32 | 25.60 | 575 | 73 | 12.69 |
| 12 | 350 | 78 | 22.28 | 225 | 51 | 22.66 | 225 | 51 | 22.66 | 100 | 51 | 51.00 | 900 | 231 | 25.66 |
| 18 | 125 | 2 | 1.60 | 100 | 2 | 2.00 | 75 | 2 | 2.66 | 200 | 2 | 1.00 | 500 | 8 | 1.60 |
| 24 | 325 | 5 | 1.53 | 175 | 2 | 1.14 | 275 | 5 | 1.81 | 100 | 2 | 2.00 | 875 | 14 | 1.60 |

生长素对离体花药中花粉发育的影响很大。我们进行了吲哚乙酸、萘乙酸、2,4—D 等不同种类的生长素和不同浓度的 2,4—D 实验, 结果以 2,4—D 的诱导效果最好。就

表 2. 2,4-D 对大豆花粉愈伤组织产生的影响*

| 2,4—D 浓度 mg/l | 接 种 花 药 数 | 愈 伤 组 织 数 | % |
|---------------|-----------|-----------|-------|
| 1 | 500 | 7 | 1.40 |
| 2 | 575 | 129 | 22.43 |
| 4 | 475 | 5 | 1.05 |

* 采用变动的培养基, 接种材料为吉林13和黑农21。

表 3. 不同材料形成愈伤组织能力的差异

| 材 料 名 | 接 种 花 药 数 | 愈 伤 组 织 数 | % |
|---------------|-----------|-----------|-------|
| 吉林13 | 5010 | 1254 | 25.02 |
| 黑龙21 | 1710 | 536 | 30.80 |
| 7705—12(F3) | 2310 | 718 | 30.68 |
| 7703—24(F3) | 1630 | 581 | 34.58 |
| 7822—混—3(F3) | 1110 | 219 | 19.72 |
| 7833—混—5(F3) | 1620 | 367 | 22.65 |
| 7835—混—3(F3) | 960 | 213 | 25.31 |
| 7836—混—10(F3) | 180 | 36 | 20.00 |
| 7925—混 (F2) | 2100 | 271 | 12.90 |
| 7943 (F1) | 120 | 10 | 10.00 |
| 7946 (F1) | 240 | 39 | 16.25 |
| 7947 (F1) | 180 | 35 | 19.44 |
| 7949 (F1) | 330 | 38 | 11.51 |
| 7919 (F1) | 180 | 27 | 20.55 |
| 7923 (F1) | 120 | 22 | 18.33 |
| 7927 (F1) | 90 | 29 | 32.22 |
| 7938 (F1) | 720 | 142 | 19.72 |
| 7915 (F1) | 330 | 67 | 20.30 |
| 7916 (F1) | 180 | 15 | 8.33 |
| 7917 (F1) | 150 | 18 | 12.00 |
| 7710—8 (F3) | 720 | 165 | 22.91 |
| 7833—混—4(F3) | 1470 | 382 | 25.98 |
| 7826—混—6(F2) | 780 | 218 | 27.94 |
| 7811—混—25(F2) | 480 | 160 | 33.33 |
| 7822—混—2(F2) | 1140 | 418 | 36.66 |

| 材 料 名 | 接 种 花 药 数 | 愈 伤 组 织 数 | % |
|---------------|-----------|-----------|-------|
| 7822—混—1(F2) | 210 | 89 | 42.38 |
| 7833—混—3(F2) | 600 | 87 | 14.50 |
| 7834—混—14(F2) | 1170 | 193 | 16.49 |
| 7836—混—2(F2) | 720 | 128 | 17.77 |

2,4-D 而言,从表2可以看出,2,4-D 浓度为 2mg/l 时,诱导频率达 22.43%,高于或低于这个浓度,诱导频率都大幅度下降。

对大豆来说,几乎所有材料都能诱导形成愈伤组织。但不同材料之间形成愈伤组织的能力是有差异的(表3)。

为了抑制花药药壁和药隔组织产生体细胞愈伤组织,我们进行了活性炭和对氟苯丙氨酸(PFP)的不同浓度实验。结果表明,0.5—1.0%的活性炭和 1—5 mg/l 的 PFP,可以不同程度地抑制体细胞愈伤组织的产生。在这些物质高浓度的情况下,几乎抑制了所有愈伤组织的产生。因此,寻求适宜的抑制剂和有效浓度,有着重要的实用价值。

二、花粉愈伤组织分化形成幼苗

花粉愈伤组织分化成苗是非常困难的,但诱导根的产生是容易的。我们曾对细胞分裂素和生长素的不同浓度配比进行过大量的实验,都未得到预期的效果,只能诱导出根来。我们也采用了大豆籽粒的信使核糖核酸(mRNA),同样没有效果。1979年,我们把出现7天以后的花粉愈伤组织转移到变动的 B₅ 分化培养基上,置温度为 18—25℃ 的培养室培养,一星期后逐渐分化出绿芽来(图13、14)。将绿芽转移到降低细胞分裂素浓度,再添加 NAA 0.5—2.0mg/l, 促根剂(Amanica) 10—100mg/l 的促根培养基上,几天后长出根来,形成完整的花粉植株(图24)。根尖染色体检查结果, $2n=20$ (图15),证明是由花粉发育而来的单倍体植株。

三、离体花药的花粉发育

我们对培养过程中大豆花粉的发育变化进行了细胞学观察。发现培养后的花药内的花粉发育状况有以下几种情况: 1) 空瘪花粉; 2) 单核花粉; 3) 不均等游离核花粉; 4) 均等游离核花粉; 5) 均等和不均等细胞花粉; 6) 多核花粉; 7) 多细胞花粉; 8) 破壁多细胞球。

离体花药培养10天以后,花药中约有一半以上的花粉是空瘪的,其余大部分是单、双核花粉。约有10%的花粉开始或已完成了第一次有丝分裂。第一次分裂时,多数采取不均等分裂的方式(图3);少数采取均等分裂的方式(图6)。无论是不均等还是均等分裂方式所产生的子核都可以继续分裂,结果产生具异型核的多核花粉粒(图4、5)。一般来说,不均等分裂之后具营养核性质的子核的分裂能力可以保持,具生殖核性质的子核的分裂次数是有限的,甚至处于静止状态(图4)。随着营养核性质子核的增殖,生殖核被推向花粉壁。看来多核花粉和多细胞花粉主要是由具营养核性质的子核不断分裂而形成的。

培养15—20天的花药中,空瘪花粉粒增多,其余大多为多核花粉粒,也有少数两个或三个以上细胞的花粉粒(图7、8)。培养25天以后,许多多核花粉粒逐渐解体,出现了约2%的具100多个细胞的多细胞花粉粒(图9),有些多细胞花粉粒已破壁形成多细胞球(图10)。这似乎表明,后期出现的愈伤组织,来自单倍性花粉的可能性大。

为了解愈伤组织的倍性情况,我们把后期出现的愈伤组织分成两半,一半作分化培养,另一半作染色体数目的检查。结果表明,约有40%为单倍性的,其余为双倍或非整倍体的。

讨 论

1.大豆花蕾的灭菌 由于大豆花蕾表面茸毛较多,一般不易彻底灭菌,接种花药容易污染。一开始我们采用饱和的漂白粉溶液浸泡10分钟,然后用无菌水冲洗。这样处理后接种的花药,污染率达30%左右。后来我们改用自来水冲洗——酒精浸泡——升汞浸泡——无菌水冲洗的灭菌步骤,这样处理后接种的花药,基本上控制了污染。但在花药培养三周以后,还逐渐出现红色污斑。不过,这样的污斑蔓延很慢。我们采用的方法同 Ivers, D.R.等^[10]所描述的灭菌方法相比较,污染率要低一些。

2.选择适宜花粉发育的花蕾 大豆不象小麦、玉米、水稻那样,只要鉴别一个花序的不同部位的发育时期后,就可大量接种。大豆是选择一个花蕾,逐个检查是不实际的。因此,有必要找出和花粉发育时期相适应的花蕾外部形态指标。在大量观察和多年经验的基础上,我们选择了花蕾长度和苞叶与花蕾长度的比例作为主要指标,来选择适期花蕾。这样做,在一定试验条件下是比较实用而可靠的。这同 Ivers 等^[10]所描述的方法大体一致,但较之简单易行。

3.体细胞愈伤组织对花粉启动和发育的影响,大豆离体花药培养10天以后,即开始产生愈伤组织,随后大量出现。经检查,这些愈伤组织大部分是起源于花丝、药壁和药隔的体细胞愈伤组织。如果不加处理,这些愈伤组织很快布满了整个培养基的表面。我们曾采用PFP和活性炭企图抑制这种愈伤组织的形成,但没有达到预期的目的,几乎抑制了所有愈伤组织的产生。这是否同三叶橡胶的花药培养^[7]一样,只有体细胞愈伤组织化的花药才有利于花粉的发育,尚需进一步研究。

4.花粉植株的起源 关于这个问题已有过许多的研究^[4,5,6,11,12]。证明烟草、毛叶蔓陀罗、小麦、黑麦、小黑麦的花粉植株主要起源于A类型花粉,由均等分裂成的B类花粉粒也能产生花粉胚,但占比例较少。我们在大豆上的观察也属于这种情况。

5.关于愈伤组织的染色体倍数性问题 我们对愈伤组织的倍性进行了检查,观察到单倍性、二倍性和异倍性现象(即染色体数在20—40不等)。这些倍性的形成可能是C类型的花粉粒中,由于游离核在同步分裂时,发生核物质的交换、转移、融合所形成的。各种倍性的愈伤组织的产生,说明起源于花粉的单倍植株的自然加倍和变异类型出现的可能性。

6.愈伤组织的再分化 为了诱导愈伤组织产生具根、茎、叶的幼苗,我们曾对各种愈伤组织,并采用了许多基本培养基和不同浓度的激素配比以及有机和无机的附加物进行过试验。在大量试验的基础上,于1979年终于分化出具根、茎、叶的完整花粉植株。在诱导愈伤组织分化幼苗时应注意以下几点:

①愈伤组织的转移要及时。太小时转移愈伤组织增殖慢,不易分化;太大时转移,愈伤组织容易老化。我们是在愈伤组织产生后7天,大小如火柴头、乳白色,略带淡绿。

②调整激素浓度的配比。

③出芽后要及时转移到促根培养基中。

结 语

本研究通过花药培养,成功地诱导出大豆花粉植株。但诱导频率很低。今后应进一步研究离体条件下花粉细胞的分裂分化,继续改进培养技术,提高诱导频率,特别是愈伤组织分化成苗的频率,加速大豆花药培养在大豆育种中的应用。

参 考 文 献

- 1 简玉瑜、罗希明、赵桂兰、孙玉华、陈永祥,大豆花药培养的初步研究,1978,花药培养学术论文集,科学出版社, P209—210。
- 2 尹光初、李学湛、徐振、陈力、朱之垠、毕风云,大豆花药培养研究,1980,科学通报,18期。
- 3 尹光初、李学湛、朱之垠、徐振、陈力、毕风云,1981,黑龙江农业科学,第一期。
- 4 朱至清、孙敬三、王敬驹,小麦 (*Triticum aestivum*) 雄核发育的细胞学研究,1978,植物学报,20卷1期。
- 5 孙敬三、王敬驹、朱至清,小黑麦离体花药中细胞的分裂分化,1974,中国科学, (2): 168—173
- 6 孙敬三、王敬驹、朱至清,黑麦 (*Secale cereale* L.) 花药培养及其雄核发育,1977,花药培养学术讨论会文集,科学出版社, P121—125。
- 7 陈正华、陈发祖、钱长发、王传华、张世杰、许绪恩、区晓慧、何永陶、卢俊民,三叶橡胶花粉植株的诱导,1977,花药培养学术讨论会文集,科学出版社, P8—8。
- 8 Hu Han, Advances in Anther Culture Investigations in China, Proceedings of Symposium on plant tissue culture, 1978, Peking.
- 9 Hu Han et al., The Present status of Investigations of Plant tissue and cell culture in China, 1980, Elsevier/North-Holland Biomedical Press Plant Cell Cultures: Results and Perspectives.
- 10 Ivers, D. R., Palmer R. R. and Fehr, W. R., Anther culture in soybeans, 1974, Crop Science, 14:891-893.
- 11 Sunderland, N. and E. W. Wicks, 1971: Embryoid in pollen grain of *Nicotiana glauca*, J. Exp. Bot., 22:213-226
- 12 Sunderland, N. and J. M. Dunwell, 1974: Pathways in pollen embryogenesis. in: tissue culture and plant science, PP. 141-161 (H.E street ed.)

STUDIES ON INDUCTION OF POLLEN PLANT AND THEIR
ANDROGENESIS IN *GLYCINE MAX* (L.) MERR

Yin Guang-chu Zhu Zhi-yin Xu zhen

Chen Li Li Xue-zhen Bi Feng-yun

(Institute of Crop Breeding, Heilongjing Academy of
Agricultural Sciences)

Abstract

Glycine max(L.)Merr. anther cultured in vitro on the modified B₅ medium has been produced successfully pollen calli, from which pollen plants were differentiated. Cytological examinations showed that the chromosome set was $2n=20$, indicating that these plants were developed from haploid pollen.

Anthers containing early and mid-uninucleate pollen were found to be the optimal stage for culture.

The nuclear vegetative in nature derived from unequal or equal division of the uninucleate pollen in soybean anther cultured in vitro develops into two-celled pollen grain, from which multicellular pollen grain was produced, and calli derived from the multicellular. Under the optimal condition, the green haploid plantlets were differentiated successfully.

《大豆科学》第一卷第一期因印刷不及时而拖期，特此
向读者致歉。

图版说明

1. 不同发育时期的大豆花药。

A 为四分孢子期，B、C 的花粉粒为单核早、中期，D、E 的花粉粒为单核晚期或双核期，为成熟花粉粒。

2. 单核中期花粉粒。

3. 单核花粉不均分裂，形成一大而松散的核（营养核性质）和一小而紧密的核（生殖核性质）。

4. 具营养核性质的核继续进行分裂，具生殖核性质的核被挤到边缘，保持静止。

5. 两种核继续分裂形成具异型核的多核花粉粒。

6. 单核花粉均等分裂，形成大小和染色特性相似的两个子核。

7. 具两个细胞的花粉粒。

8. 具三个以上细胞的花粉粒。

9. 示多细胞花粉粒。

10. 示冲破花粉壁的多细胞团。

11. 各种类型的愈伤组织：A—C 出现早，增殖快，不分化，多为体细胞愈伤组织；D、E 出现晚，增殖慢，能分化器官，多为花粉愈伤组织。

12. 正在进行的器官分化的愈伤组织。

13—14 由花粉愈伤组织分化出的绿芽。

15. 花粉植株根尖染色体， $2n=20$ 。

16. 花粉愈伤组织的染色体， $2n=20$ 。

17—22. 异倍体愈伤组织的染色体（ $2n$ 为 20 以上 40 以下）。

23. 双倍体愈伤组织的染色体， $2n=40$ 。

24. 大豆花粉植株。

