

大豆花药培养研究进展^{*}

叶兴国 王连铮

(中国农业科学院作物育种栽培研究所, 北京, 100081)

提 要

如何提高接种效率和愈伤组织质量, 通过外源激素来调节内源激素, 使愈伤组织处于适合分化的状态。研制专用培养基, 筛选敏感性基因型等, 是大豆花药培养取得突破性进展的关键。本文从取材、细胞学研究、培养基改进、基因型筛选和植株分化等几个方面, 回顾了20多年来大豆花药培养取得的成绩和存在的问题, 目的在于促进大豆花药培养的深入研究。

关键词 大豆; 花药培养; 胚状体; 再生植株

植物花药培养的研究起始于50年代初期, Tulecke 培养裸子植物的成熟花粉最终形成了愈伤组织, 并观察了花粉粒在培养基上的发育过程。1963年 Yamada 等从被子植物的花药培养中获得了单倍体愈伤组织。Guha 等从曼陀罗的成熟花药培养中获得了胚状体及其再生植株。随后的几年内, 相继获得了烟草、水稻、小麦、玉米等重要农作物的单倍体植株。经过近30年的努力, 利用花药培养技术已经培育了一些小麦、水稻等农作物新品种和玉米自交系。与其它农作物相比, 大豆花药培养的研究远远落后, 还没有取得突破性进展。为促进大豆花药培养的深入研究, 现就这一领域做一回顾和展望。

一、大豆花药培养概况

组织培养大豆各种类型的体细胞外植体, 诱导产生愈伤组织比较容易, 再生植株却十分困难, 花药培养更是如此。大豆花药培养最早由 Ivers 等人(1974)开展起来, 只获得了体细胞愈伤组织。母秋华等(1977)在几种不同培养基上诱导出了花药愈伤组织, 平均出愈率15%左右, 根分化率10%上下, 但没有分化出芽, 也没有证明这些愈伤组织的倍性。最好的进展是70年代末期至80年代初期, 简玉瑜等(1977, 1980)和尹光初等(1980, 1981, 1982)分别对 B₅ 培养基进行了研究改良, 在此基础上愈伤组织诱导率有了较多提高, 并分化出了少量绿芽和几棵再生植株, 绿芽分化率0.5%以下, 愈伤组织及其根尖细胞的染色

* 本文于1995年4月12日收到。

This paper was received on April 12, 1995.

体观察结果表明,愈伤组织大多来源于花粉细胞。大豆花药体细胞容易形成愈伤组织,花粉培养则能避免产生体细胞愈伤组织,诱导的愈伤组织基本上是单倍性培养物。刘德璞等(1986,1987)首次尝试了这一工作,用改良 B_5 、 KM_8P 、 MB 、 MKM_8P 培养基获得了游离花粉的愈伤组织,在分化培养基上仅看到芽点和根的形成,没有再生出绿芽。80 年代中期以来,大豆花药培养进入低谷状态,有关的研究很少,仅有的报道也仅限于基本培养基的改良。Kadlec 等(1991)通过变动培养基的无机盐成分,获得了愈伤组织,没有进行细胞学检查。Zhuang 等(1991)在 B_5 培养基中附加了多种有机成分,最终也只产生了少量胚状体类似物,但多数表现为畸形,没有进一步发育成胚状体。我们从 1992 年开展大豆花药培养研究,通过对多种影响因素的深入探索和培养基改进,愈伤组织诱导率有了明显提高,结合细胞学检查确定了单倍体愈伤组织和二倍体愈伤组织的鉴别标准,提出了诱导愈伤组织的集体效应观点,并于近期产生了胚状体和根、芽齐全的小再生植株(叶兴国等,1994)。

二、培养材料的选取、处理和接种

花粉细胞的发育时期对其分裂启动和产生愈伤组织有至关重要的影响,太早或太晚都不利于愈伤组织的诱导。在大量接种的情况下,仅仅选择花粉粒处于某一发育时期的花药来培养的做法是不现实的。细胞学观察与小花植物学结合确定合适的取材标准则是切实可行的方法。Ivers 等(1974)首次建立了小孢子发育与小花特征相对应的取材标准,认为长度 2.5mm 的小花是分离花药的合适材料,此时 30% 的花药处于四分体后期,70% 的花药处于单核期。生态地区、生长条件和植株健壮程度的不同,取材的标准也应不同。尹光初等(1982)根据花药与苞叶的长度比例来确定取材时期,二者比例 1:1 时,花药处于四分体期,苞叶长度等于花药长度的 $3/4-2/3$ 时,花药处于单核花粉粒期,花药是苞叶的二倍长度时,花粉粒处于双核期,认为东北地区花药培养的合适材料来源于 2.5—3.5mm 长度的小花,花药发育一般处于单核早中期。花药培养效果还与植株的生长环境、生理状态等因素有关,生长于大田中的植株比生长于温室中的植株容易诱导花药愈伤组织。刘德璞等(1986)的观察发现,单核期、双核期的花粉粒都可发生分裂和形成愈伤组织,简玉瑜等(1977,1980)和母秋华等(1977)则用单核中期或后期甚至双核期的花药接种。我们在大豆花药培养工作中,根据细胞学观察、花冠和花药位置以及花药色泽等确定取材时期,认为在北京的田间生长条件下,小花长度 3.0—4.5mm,温室生长条件下,小花长度 2.5—3.5mm,是剥取花药的合适材料,花药鲜黄色,处于花柱的基部至中部,花冠处于花药的 $1/2-3/4$ 位置,花粉粒发育处于单核中期至双核期。对一个花序来说,下位小花露白前的上位 4—5 朵小花都可做为接种的材料(叶兴国等,1994)。大豆属于高温短日型作物,材料的预处理与其它作物有一些差异。据研究,7—8℃ 低温处理小花 5—8 天,能促进花粉细胞的分裂,2.0mg/L 2,4-D 浸泡小花配合 7—8℃ 低温预处理,显著促进花粉细胞的分裂(刘德璞等,1986)。笔者的研究发现,0—1℃、4—5℃、7—8℃ 处理小花 3—5 天,随着温度的升高,愈伤组织诱导率提高,合适的温度处理是 4—8℃,过低温度不利于产生愈伤组织(叶兴国等,1994)。大豆小花比较小,在冰箱中容易失水变干,用叶片包被置于培养皿中再放入冰箱,是较好的做法,但存放和低温处理时间也不应太长,以 3—5 天为宜。也有人认为,低温处理的作用不明显(Kadlec 等,1991)。

大豆花药很小,直径仅 0.3mm 左右,连同柱头被花冠和花药紧紧包被,且萼片上有

一层密实的茸毛,给灭菌和接种带来了巨大困难。70%酒精 30—60 秒和 10—20%次氯酸钠或饱和漂白粉 10 分钟,不能达到灭菌的目的,污染率 90%以上,70%酒精 30—60 秒和 0.1%升汞 7—10 分钟顺序灭菌,能显著降低污染,污染率 30%以下(尹光初等,1982)。在 0.1%升汞中加入几滴吐温,基本上能克服污染。

尽管小花经过了严格的灭菌,接种时还需要十分小心,用无菌的镊子轻轻剥去花萼和花冠,接种针挑出花药,或一只手戴上灭过菌的 PVC 乳胶手套持住小花,另一只手拿无菌工具分离花药。我们的研究表明,单个花药接种时不容易产生愈伤组织,出愈率仅为 6.4%,多个花药接种时容易诱导愈伤组织,出愈率高达 20.5%,认为花药在培养基上的启动分裂具有群体效应(叶兴国等,1994)。

三、培养过程中的细胞学研究

大豆花药在培养基上形成愈伤组织是一个缓慢的过程,在适宜的培养条件下,花粉细胞 5 天后开始均等分裂,10 天左右见多细胞球。在不适宜的培养基上,花粉细胞则长期保持单核靠边状态(简玉瑜,1980)。体细胞愈伤组织出现较早,接种后 10—20 天陆续产生,而且增殖快,转移到第二培养基上无器官分化,30 天后产生的愈伤组织大多数来源于花粉细胞,35 天后产生的愈伤组织有 89%以上是单倍性的,染色体数目 16—24 条,愈伤组织的产生可以持续到接种后的 72 天(尹光初等,1982)。游离花粉细胞的直接培养能克服花丝、药隔、药壁等体细胞形成愈伤组织,由于缺少了药壁的保护作用,花粉粒的分裂启动比较慢。培养 15 天后,少量花粉粒开始膨大,换入新鲜培养基后 3—5 天,花粉细胞开始分裂,紧接着大量分裂,发生分裂的花粉细胞占 70%以上,似乎一定量的花粉分裂对未分裂的花粉具有刺激启动的作用。花粉细胞的最初两次分裂有四种类型,即均等细胞型、均等游离核型、不均等细胞型和不均等游离核型,有的直接形成多细胞团,有的先形成多核细胞,再各自独立发展为多细胞团。最后形成肉眼可见的乳白色愈伤组织(刘德璞等,1986,1987)。作者于接种后的一个月时间内,每隔 3 天从培养基上挑取花药,醋酸洋红染色法直接观察花粉细胞发育状况,发现接种后的 6—12 天花粉细胞开始分裂,能看到二核或三核花粉粒,9—15 天出现四核或四细胞以上花粉粒,同时多数花粉细胞的药壁衰退、内含物分解、细胞质变稀、细胞核消失、形状不规则。15 天以上出现多核或多细胞花粉粒,24 天左右观察到多细胞团,30 天后逐渐出现小愈伤组织,甚至 110 天左右仍有愈伤组织产生。分别用席夫试剂染色法、醋酸洋红染色法观察愈伤组织及其根尖细胞的染色体数目(卡诺固定液中加入 10%的二甲苯,以溶解细胞中的油脂),发现单倍体愈伤组织除了发生较晚以外,其形状似球、乳白色、质地较硬、增殖较慢,染色体数目 $2n=14-26$,而体细胞愈伤组织则相反,形状不规则、淡黄色、质地较松散、增殖较快,且于接种后很快发生,染色体数目 $2n=40$ 。另外,我们还发现高浓度蔗糖抑制花丝、药壁、药隔等体细胞产生愈伤组织,有利于花粉粒分裂和产生单倍体愈伤组织(叶兴国等,1994)。

四、培养基改进

Ivers 等(1974)选用了 Nitsch 和 Miller 基本培养基,附加 20mg/lNAA、1mg/lKT,获得了体细胞愈伤组织及其类苗器官。母秋华等(1977)用对其它植物比较有效的 MS、B₅、Miller 和 N₆ 四种培养基,都诱导出了愈伤组织,但愈伤组织的来源不明确,这些愈伤组织在 MS 和 B₅ 附加 0.5—1.0mg/lBA 或 KT,0.2—0.5mg/lNAA 或 IAA 培养基上仅分化

出根系。上述工作表明,现有培养基不很适合于大豆花药培养。简玉瑜等(1977,1980)在比较了 MS、B₅、Blaydes 效果的基础上,对 B₅ 培养基进行了改良研究,将 5 种大量元素以及 pH、2,4-D、6-BA、蔗糖分 4 个水平进行正交试验,筛选出了 6 号培养基,其组成是 (mg/l): NH₄NO₃ 800, KNO₃ 2500, CaCl₂·2H₂O 250, MgSO₄·7H₂O 85, KH₂PO₄ 170, NaH₂PO₄·2H₂O 50, 甘氨酸 2, 其它组成同 B₅ 培养基,诱导愈伤组织时附加 2,4-D 2,6-BA 0.5, KT 0.5, 蔗糖 120000, pH 值 5.8。分化培养基中去掉 2,4-D, 蔗糖浓度降至 3%。出愈率有了显著提高,并分化出了 20 多个芽、一棵正常苗和一棵畸形苗,根尖染色体数目少于 20 条,绿芽分化率仅为 0.5% 左右,根分化率却高达 3—4%。与此同时,尹光初等(1981)也对 B₅ 培养基进行了改进,变动成分为 (mg/l): NH₄NO₃ 800, KNO₃ 2500, CaCl₂·2H₂O 250, MgSO₄·7H₂O 185, KH₂PO₄ 125, NaH₂PO₄ 50—60, H₃BO₃ 6.0, NaMOO₄·2H₂O 0.375, 诱导愈伤组织时附加 2,4-D 2.0, 蔗糖 120000, 愈伤组织分化时附加 KT 0.5—4.0, 6-BA 0.5—6.0, IAA 0.5—2.0, 蔗糖 60000—90000, 最终分化出了少量芽和个别再生植株,染色体数目 2n=20。刘德璞等(1987)针对花粉培养需要高渗透压的特点,通过对改良 B₅、SL、KM₈P 的相互对比,设计了 MB₅-1 培养基,其特点是将肌醇用量提高到 5000mg/l; 通过对 KM₈P 简化,设计了 MKM₈P, 附加葡萄糖 68400mg/l, 蔗糖、山梨醇糖、甘露醇糖、核糖各 125mg/l。无机盐的变动主要是在改良 B₅ 的基础上,提高了 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 的浓度,诱导了较多愈伤组织,表明葡萄糖、Ca²⁺、Mg²⁺ 在花粉培养中具有良好作用。Kadlec 等(1991)对培养基成分也进行了正交试验,虽然在几种改良培养基上诱导出了不明确的愈伤组织,却没有得到具体的结果。Zhuang 等(1991)在培养基里添加了 16 种有机成分以及 2,4-D 2mg/l、BA 0.5mg/l 和 9% 的蔗糖,一个月后产生了一些胚状体类似物,但多数表现畸形,没有进一步发育成胚状体。笔者充分参考了前人大豆花药培养和原生质体培养的经验,以 MS、B₅、改良 B₅、ZSP 等培养基为基础,通过变动氨态氮与硝态氮的比例和增加有机态氮等,筛选出了适合大豆花药培养的 MB₁ 培养基,其大量元素的组成为 (mg/l): NH₄NO₃ 410, KNO₃ 950, MgSO₄·7H₂O 250, KH₂PO₄ 300, NaH₂PO₄·2H₂O 50, CaCl₂·2H₂O 220, 微量元素中的 H₃PO₃ 增加到 6mg/l, 有机成分中的 VB₁ 提高到 80mg/l, 其它成分同 B₅ 或改良 B₅, pH 值 5.8—6.0, 另外添加谷氨酰胺 800mg/l、天冬酰胺 100mg/l、水解酪蛋白 500mg/l、Gelrite 2250mg/l。诱导愈伤组织时附加 2,4-D 2mg/l、KT 0.5mg/l、蔗糖 120000mg/l, 出愈率显著提高。第二培养基可以采用 SAC₃、B₅、MS 或改良 B₅ 中的任何一种,附加 IBA 0.1mg/l、BA 0.25—0.5mg/l、KT 0.25—0.5mg/l、NAA 0.25mg/l、GA₃ 0.1mg/l、活性炭 300—500mg/l 和 1—3% 的蔗糖,三年来共分化出了 14 个绿芽、8 个胚状体和一株幼苗,分化率 0.4—0.5%。活性炭似乎有利于愈伤组织的分化,用于诱导培养基中,虽然降低了出愈率,但能提高愈伤组织的质量,AgNO₃ 具有相似作用。

综上所述,培养基的改进是有效的,诱导培养基中加入 2mg/l 2,4-D、12% 的蔗糖,其积极作用可以肯定。

五、基因型筛选和植株再生

农作物花药培养中的基因型差异十分明显,一些基因型比较容易诱导愈伤组织和分化成苗,另一些基因型却很难诱导愈伤组织或很难再生植株,另有少数基因型只出白苗而

不出绿苗。大豆花药培养也有相似情况。Ivers 等(1974)选择 Hark 品种开展花药培养,仅获得了体细胞愈伤组织及其类苗器官。简玉瑜等(1980)以吉林 13 号、7508、7511、7512 等 8 个基因型和 15 个 F_1 代、4 个 F_2 代、一个 F_3 代、3 个 F_4 代、3 个 F_5 代为材料,诱导出了单倍体愈伤组织,出愈率 0—36.4%,转移 8565 块愈伤组织到分化培养基上,共获得了 23 个芽体、一棵正常苗和一棵畸形苗,吉林 13 号的培养效果最好。尹光初等(1982)用吉林 13 号、黑农 21 号等品种和 2 个 F_2 代、2 个 F_3 代等杂种后代做为花药的供体植株,愈伤组织诱导率 25.03—42.38%,几乎所有材料都能产生愈伤组织,但不同材料之间形成愈伤组织的能力差异很大,杂种花药比品种花药更容易诱导愈伤组织,黑农 21 号品种产生了幼小花粉植株。刘德璞等(1986)从吉林 13 号品种的花药中压出花粉细胞进行单花粉粒培养,大部分花粉细胞都能分裂和产生愈伤组织,也证明吉林 13 号是大豆单倍体培养的良好材料。Kadlec 等(1991)用 L-20、L-21、L-23、L-25、L-45、L-61、L-16K 七个品系的花药进行培养,认为不同的基因型适合于不同的培养基。Zhuang 等(1991)用 Williams、A1929 二个基因型诱导出了胚状体类似物。我们选用来自黄淮海地区的丰收黄、早丰 1 号、郑州 135、郑 482、豫豆 2 号、豫豆 8 号、鲁豆 2 号、鲁豆 4 号、鲁豆 7 号、鲁豆 10 号、中黄 4 号、中黄 6 号、冀豆 4 号、冀豆 7 号、晋豆 4 号、晋豆 9 号、中品 661 和来自东北地区的吉林 21、吉林 23、黑农 21、黑农 26、铁丰 8 号、小粒黄、赛凯以及 PI486355 加上 7 个 F_1 代共 30 多个基因型,愈伤组织诱导率 2.8—38.6%,郑 482 最容易诱导愈伤组织,冀豆 7 号最不容易诱导愈伤组织。在 SAC_3 、 MS 、 B_5 附加 $KT 0.25-1.0mg/l$ 、 $BA 0.25-1.0mg/l$ 、 $NAA 0.25-0.5mg/l$ 、 $IBA 0.1-0.5mg/l$ 、 $GA 0.1-0.5mg/l$ 的分化培养基上,丰收黄产生了 3 个胚状体和一棵花粉幼苗,PI486355 产生 2 个胚状体,中黄 4 号产生了 3 个胚状体,鲁豆 10 号产生了 3 个芽,中品 661 产生了 5 个芽,黑农 21 产生了 2 个芽。前人的工作和我们的工作可以表明,吉林 13、黑农 21、丰收黄、中品 661、中黄 4 号、鲁豆 10 号、PI486355 等基因型是大豆花药培养的较好材料。

六、问题讨论

虽然经过 20 多年来两代人的努力,大豆花药培养已能再生幼苗和产生胚状体,但分化频率很低,仅有 0.5% 左右,且重复性很差,能够再生的基因型十分有限,还不能形成一种成熟的方法和理论体系。

从上述回顾中可以看出,花药愈伤组织诱导数量的问题已基本解决,一些基因型具有很好的出愈率。但所诱导的愈伤组织的质量较差,不适合植株再生所要求的状态,这可能有二方面的原因:一是基本培养基成分不合适,二是激素搭配不协调。从大豆其它外植体的组织培养来看,BA、KT 等细胞分裂素对再生具有积极作用,2,4-D 的作用相反。在诱导花药愈伤组织时,可以考虑去掉 2,4-D 或降低其浓度,改用其它植物激素。根据大豆蛋白质含量和脂肪含量高的特点,研制出适合大豆花药培养的专用培养基。在愈伤组织分化时,根据分化对内源激素的要求,通过在培养基中添加外源激素来调节内源激素。从再生的角度考虑,应继续扩大基因型的筛选范围,寻找对再生敏感的基因型。

另外,大豆花药小,容易污染,剥取十分不方便,给大量接种带来了许多困难,这或许是限制大豆花药培养开展的又一个客观因素。如何方便快捷接种大量花药,也是一个值得思考的问题。非常遗憾的是,从事过大豆花药培养工作的几位前人,由于其难度,都相继舍

弃了此项研究,以后的有关报道又很少,这可能是 20 多年来大豆花药培养没有取得重大进展的主观因素。相信,经过越来越多人不懈的努力,与其它作物一样,也能利用花药培养途径培育出大豆新品种,缩短大豆育种年限。

参考文献

- [1] 尹光初等,1980,科学通报,18,864
- [2] 尹光初等,1981,黑龙江农业科学,1,12-14
- [3] 尹光初等,1982,大豆科学,1,69-75
- [4] 母秋华等,1977,花药培养学术讨论会文集,PP,302
- [5] 叶兴国等,1994,大豆科学,3,193-199
- [6] 刘德璞等,1986,大豆科学,1,17-19
- [7] 刘德璞等,1987,植物生理学通讯,2,40-44
- [8] 简玉瑜等,1977,花药培养学术讨论会文集,PP,209-211
- [9] 简玉瑜等,1980,吉林农业科学,2,54-61
- [10] Ivers, D. R. et al., 1974, Crop Science, 14, 891-893
- [11] Kadelic, M. et al., 1991, Soybean Genetics Newsletter, 18, 121-124
- [12] Zhuang X. J. et al., 1991, Soybean Genetics Newsletter, 18, 265

ADVANCES OF ANTHR CULTURE IN SOYBEAN

Ye Xinguo Wang Lianzheng

(*Institute of Crop Breeding and Cultivation, CAAS, Beijing, 100081*)

Abstracts

More researches should be conducted to make much progress for soybean anther culture, such as increasing efficiency of inoculation, leveling hormones of calli by adjusting plant hormone ratio in medium, inventing special medium for soybean and selecting susceptible genotypes for regeneration. Related results in the anther culture of soybean, for examples, choosing of anthers, observation of pollens during culture, improvement of medium, screening of genotypes and regeneration of plantlet were retrospected. Moreover, experiences and questions were also outlined in this review article.

Key words Soybean; Anther culture; Regeneration plantlet; Embryoid