

大豆花药培养的研究

第二报：合成培养基的选择

简玉瑜 孙玉华 陈永祥 罗希明 赵桂兰

(吉林省农业科学院大豆所)

在大豆花药培养研究中,国外至今还未见获得大豆花粉植株的报道,美国Ivers.D.R.1974年发表“大豆花药培养”〔1〕一文中也没有发现胚状体或植株,同时认为愈伤组织是由二倍体的组织形成的。

1977年我们在全国第二次花药培养会上〔2〕报导了1976年、1977年大豆花药培养获得了芽状体,从离体的花药中观察到花粉细胞均等分裂以至形成圆球胚一系列变化,也看到了单倍染色体的愈伤组织,初步明确我们改良B₅是大豆花药较适宜的培养基。

1978~1979年我们着重改进培养基,力争获得大豆花粉植株。1978年以改良B₅为基础,选了九个因素,四个水平,做了正交试验,筛选出六号培养基。1979年再作进一步的改进,第一次获得正常的花粉幼龄植株。

材 料 与 方 法

1978年以九个杂种一代,一个杂种二代,三个杂种四代和五个品种为接种材料;1979年以六个杂种一代,三个杂种二代,一个杂种三代,三个杂种五代和三个品种为接种材料;先后共做三十四个材料。接种材料分四期播种(即温室提前播种、4月底、5月中、5月底)。

1978年在改良B₅培养基的基础上,选定了九个因素(NH₄⁺/NO₃⁻、CaCl₂、MgSO₄、NaH₂PO₄、PH、2,4-D、6BA、糖的浓度、材料),四个水平(见表一),按L₃₂(4⁹)正交表设计,筛选大豆花药合适的培养基。NH₄⁺/NO₃⁻是由三个氮素组成,用量见表一,控制在一定总氮量水平;PO₄⁻把KH₂PO₄控制在170毫克/升的水平而变动NaH₂PO₄的用量。

1979年进一步以筛选出来的6号培养基为基础,分别对铵、微量元素、铁盐、肌醇、维生素、6-卞基嘌呤、吲哚乙酸、吲哚丁酸、糖等十四个因素的用量再作单项试验,设计了28种培养基,企图明确十四个因素在花粉植株成苗的作用。

另外,为了了解花药在离体培养后的发育情况,对1978年培养基的正交试验的材料,分14个时期进行细胞学观察,即接种后5、7、9、11、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60天;材料先用0.003M 8-羟基喹啉处理4小时,再用95%酒精与冰醋酸(3:1)固定液固定24小时,保存在70%酒精中,用醋酸洋红染色,用压碎法观察。

花粉植株幼苗根尖染色体观察,也用0.003M 8-羟基喹啉处理4小时,95%酒精与

表 1

L₃₂ (4⁹) 正交试验设计的因素水平

(毫克/升)

因 素	水 平	一	二	三	四
1	NH ₄ ⁺ /NO ₃ ⁻	18/1860	36/1550	72/1240	144/930
2	CaCl ₂	150	250	350	440
3	MgSO ₄	35	185	246	370
4	NaH ₂ PO ₄	50	150	250	350
5	PH	5.8	6.0	6.2	6.5
6	2.4-D	0.01	0.1	1	2
7	6 BA	0	0.5	1	2
8	糖%	3	6	12	24
9	材料	吉林十三号	7508	7511	7512

注:

NH ₄ ⁺ /NO ₃ ⁻	(NH ₄) ₂ SO ₄	67	134	268	536
	KNO ₃	3000	2500	2000	1500
	NH ₄ NO ₃	0	0	0	0
		800	800	800	800

冰醋酸 (3 : 1) 固定液固定24小时, 保存于75%酒精中, 用铁矾苏木精染色, 用压碎法观察。花药一般于花粉处于单核中期接种。

结 果

1978年接种2500瓶, 约5万花药; 1979年接2795瓶, 约6万多花药, 两年共接11~12万花药。接种后20天陆续出现愈伤组织, 把早期 (即一个月内的) 出现的愈伤组织和外形明显是体细胞的愈伤组织 (如花丝断口或药壁隔痕出现的愈伤组织) 全部淘汰, 选留外形紧密, 小的有芽点的愈伤组织转移至第二培养基。1978年转移2145块, 1979年转移6420块; 1978年获得一株小苗和3个芽体, 1979年获得一株正常的, 具有复叶和根的幼龄花粉植株, 一株畸形苗和20多个芽。

一、培养基正交试验:

1、愈伤组织诱导率:

正交试验32种培养基愈伤组织诱导率有很大的差异, 6号培养基诱导率最高, 达36.4%, 其次是3号, 27.5%, 超出20%还有四种培养基11、13、14、20号等, 详见表二。

针对愈伤组织诱导率, 对不同的成分的数值和K值进行分析, 结果见表三。从表三见九个因素对愈伤组织诱导率的影响, 它们的主次顺序是:

主—————→次

六、八、七、二、五、三、四、九、一

(即2.4-D、糖、6 BA、CaCl₂、PH、MgSO₄、NaH₂PO₄、材料、NH₄⁺/NO₃⁻)

表2 不同培养基的诱导率

培养基号	接种花药数	愈伤组织数	愈伤组织诱导率(%)
1	780	0	0
2	820	89	10.8
3	700	193	27.5
4	820	15	1.8
5	10660	1023	9.5
6	700	255	36.4
7	760	5	0.7
8	800	42	5.2
9	860	6	0.7
10	800	3	0.4
11	740	162	21.6
12	780	74	9.4
13	900	225	25.0
14	800	206	25.7
15	700	1	0.1
16	760	19	2.5
17	740	42	5.7
18	940	0	0
19	860	8	0.9
20	800	172	21.5
21	800	67	8.3
22	840	85	10.1
23	780	98	12.6
24	780	8	1.0
25	780	1	0.1
26	780	0	0
27	840	148	17.6
28	760	67	8.8
29	780	31	4.0
30	860	108	12.6
31	780	21	2.7
32	780	0	0

从表中结果分析, 2.4-D对愈伤组织诱导率影响最大。2.4-D用量为0.01毫克/升则诱导率为0~1%之间; 2.4-D为0.1毫克/升则在2~10%之间; 2.4-D为1毫克/升则在10~20%之间; 2.4-D为2毫克/升则一般在20%以上; 这说明2.4-D用量多少直接关系着诱导率的高低。另一方面, 2.4-D与6 BA同时使用时, 当2.4-D用量是1毫克, 6 BA用量也是1毫克, 诱导率比较高, 如6 BA用量为0时, 诱导率显著下降(见28、19号), 同时愈伤组织会大量生根(如28、30号); 而6号培养基, 2.4-D和6 BA的用量均是2毫克时, 诱导率竟达36%, 愈伤组织不产生根, 先分化芽和苗。从这里可以看到有这样的趋势, 2.4-D与6 BA是否同时应用, 用量多少, 似对器官的分化是朝着芽分化有一定的影响。NH₄⁺/NO₃⁻因素由于在设计时控制在一定的总氮量的水平, 四个不同水平对愈伤组织诱导率影响不大; 但随着愈伤组织增殖与生长, N源的多少, 尤其是NH₄⁺态N的多少, 对愈伤组织的生长就有一定的影响, 如1~4号培养基NH₄⁺态N最少, 愈伤组织生长不起来, 12、13、14、20、27、号培养基NH₄⁺态N高, 愈伤组织生长特别旺盛。

从表3各因素的各个水平分析看, 理论上最佳因素水平为2、2、2、1、1、3、3、3、2, 与6号培养基最相近, 其中有三个因素稍有出入, 从最佳水平推测, 即将2.4-D和6 BA降为1毫克/升可能诱导率会进一步提高。

1978年冬温室的材料, 重复对5号、6号培养效果进行比较, 其结果见表4。6号培养基在接种1320花药中, 获得800

多块愈伤组织, 诱导率高达60%以上, 说明6号培养基诱导花药愈伤组织有作用。

表3

L₃₂(4⁹) 正交试验结果分析计算表

因素 培养基号	一	二	三	四	五	六	七	八	九	愈伤组织 诱导率 (%)
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	10.8
3	1	3	3	3	3	3	3	3	3	27.5
4	1	4	4	4	4	4	4	4	4	1.8
5	2	1	1	2	2	3	3	4	4	9.5
6	2	2	2	1	1	4	4	3	3	36.4
7	2	3	3	4	4	1	1	2	2	0.7
8	2	4	4	3	3	2	2	1	1	5.2
9	3	1	2	3	4	1	2	3	4	0.7
10	3	2	1	4	3	2	1	4	3	0.4
11	3	3	4	1	2	3	4	1	2	21.6
12	3	4	3	2	1	4	3	2	1	9.4
13	4	1	2	4	3	1	2	4	3	25.0
14	4	2	1	3	4	2	1	3	4	25.7
15	4	3	4	2	1	3	4	2	1	0.1
16	4	4	3	1	2	4	3	1	2	2.5
17	1	1	4	1	4	2	3	2	3	5.7
18	1	2	3	2	3	1	4	1	4	0
19	1	3	2	3	2	4	1	4	1	0.9
20	1	4	1	4	1	3	2	3	2	21.5
21	2	1	4	2	3	4	1	3	2	8.3
22	2	2	3	1	4	3	2	4	1	10.1
23	2	3	2	4	1	2	3	1	4	12.6
24	2	4	1	3	2	1	4	2	3	1.0
25	3	1	3	3	1	2	4	4	2	0.1
26	3	2	4	4	2	1	3	3	1	0
27	3	3	1	1	3	4	2	2	4	17.6
28	3	4	2	2	4	3	1	1	3	8.8
29	4	1	3	4	2	4	2	1	3	4.0
30	4	2	4	3	1	3	1	2	4	12.6
31	4	3	1	2	4	2	4	3	1	2.7
32	4	4	2	1	3	1	3	4	2	0
K ₁	68.2	53.3	78.4	88.2	92.7	2.5	34.2	77.9	53.3	
K ₂	83.8	96.0	95.2	49.6	50.3	40.0	70.0	82.8	88.7	
K ₃	58.6	83.7	54.3	73.7	89.0	136.6	90.4	99.6	83.9	
K ₄	72.6	50.2	55.3	66.0	56.2	104.1	86.8	22.9	57.3	
k ₁	8.5	6.6	9.8	11.0	11.5	0.3	4.3	9.7	6.6	
k ₂	10.5	12.0	11.9	6.2	6.2	5.0	8.7	10.3	11.0	
k ₃	7.3	10.4	6.7	9.2	11.1	17.1	11.3	12.4	10.5	
k ₄	9.1	6.2	6.9	8.2	7.0	13.0	10.8	2.8	7.1	
R ₁	3.15	5.7	5.1	4.8	5.3	16.7	7.0	9.5	4.4	

表4 1978年冬5、6号培养基对比

培养基号	接种花药数	愈伤组织数	愈伤组织诱导率(%)
5	825	156	18.9
6	1320	803	60.8

底已长出二片小叶、9月底转移至加“920”的第三培养基中去，企图促进抽茎，后在上部又长出一小叶，10月中旬又转至第四培养基，由于地上部生长缓慢，不敢促进小苗生根，从过去组织培养的经验，地上部生长慢，如过早分化出根，地上部容易受抑制。直至十一月份才促进小苗分化根，但因愈伤组织老化而无效果。6号培养基除得一小苗外，于9月中旬和10月中旬先后发现二小芽，芽的分化率为愈伤组织的0.4%。

温室接种材料也获得一个芽状体，也有许多小芽苞。

除6号以外许多培养基发现小芽苞，其中以5号培养基较多，转至带“920”的第三培养基，由于“920”高压消毒没有见效果。

3、细胞学观察：

我们对三十二种培养基的离体花药进行了细胞学的观察。发现离体培养的花粉细胞，在适宜的培养条件下，花粉细胞在五天后开始均等分裂，十天左右就开始见多细胞球。如果在不适宜的培养基，一、二个月花粉仍保留在单核靠边期的状态。在三十二种培养基中有十九种培养基见到花粉细胞有均等分裂成三核、四核、多核，仅在四种培养基（即6、16、19、29号）见到花粉细胞分裂成多细胞球，其中包括6号培养基。而这四种培养基中，以6号培养基诱导率最高。

因此，从正交设计分析、绿苗的分化、细胞学的观察三个方面综合考虑，初步可以肯定6号培养基是目前大豆花药培养中较好的培养基。愈伤组织外形不很茂盛，但很绿，基本上控制长根，并初步获得了绿苗。



图1 大豆花粉细胞在6号培养基发育成多核和圆球胚

2、绿苗诱导率：

在32种培养基4500块愈伤组织中，仅6号培养基获得了有绿叶的苗。6号培养基共转移255块愈伤组织，9月12日获得第一株小苗。小苗地上部分清晰，叶脉清楚可见。9月

二、最佳培养基对比

1979年我们对6号培养基,改良B₅和1978年正交试验的最佳因素再进一步对比,结果6号培养基诱导率最高,达54%,转移至第二培养基1500块愈伤组织,获得了9个芽,绿芽诱导率为0.52%;最佳因素的培养基诱导率占第三位,34%,转移至第二培养基的700多块愈伤组织,获得4个芽,绿芽诱导率为0.55%;改良B₅培养基,诱导率为38%,转移1300多块,也获得4个芽,绿芽诱导率低于前二者,为0.29%。说明这三种培养基对比,仍以6号培养基诱导率最高。



图2 1978年6号培养基诱导的绿苗

6号培养基既然是大豆目前较好的基本培养基,芽的分化率可达0.4~0.5%之间,但是芽出现后,生长一个阶段容易停滞不前,以致于干枯死亡,这说明对成株还缺乏某些未知的东西。因此,1979年我们对6号培养基十四种主要成分的用量再作一次单项试验,共设计了28种培养基。

表5

三种培养基诱导率对比

培养基号	接种花药数	愈伤组织数	愈伤组织诱导率(%)	绿芽诱导率(%)
6	7620	4132	54.09	0.52
最佳因素	3240	1120	34.56	0.55
改良B ₅	7360	2814	38.23	0.29

这28种培养基的诱导率(见表6)均没有超过6号培养基,但在成苗上有二种处理出现了小苗6—33号培养基变动了6-卞基嘌呤的用量,获得一株畸形苗,茎部肥大,不抽茎,有根。6—22号培养基变动了微量元素,9月下旬出现一株正常植株,这株植株6月30日接种,8月23日转移,9月下旬出现绿芽,10月上旬发育出三片叶子,复叶平展,10月19日转至有IAA改良怀特的培养基,一周后出现了根,从根尖观察染色体,染色体数目少于20个,证明是单倍,第一次获得了正常的花粉幼龄植株。

通过两年的试验,我们认为6号培养基是目前大豆花药培养产生花粉愈伤组织和诱导愈伤组织分化绿苗的较好培养基。

表6

二十八种培养基诱导率比较

培养基号	接种花药数	愈伤组织数	愈伤组织诱导率(%)	绿芽诱导率(%)
6-10	700	165	23.57	
6-11	580	201	34.65	
6-12	440	177	40.22	
6-13	500	141	38.2	
6-14	520	219	42.1	
6-15	600	161	26.8	
6-16	400	166	41.5	
6-17	460	178	38.6	
6-18	440	178	40.4	
6-19	360	109	30.2	
6-20	320	153	47.8	
6-21	440	102	23.1	
6-22	320	128	40.0	2.3
6-23	360	114	28.6	
6-24	400	153	36.5	
6-25	320	26	8.1	
6-26	460	142	30.8	
6-27	420	125	29.7	
6-28	340	157	46.1	
6-29	340	101	29.7	
6-30	340	97	28.5	
6-31	360	98	30.6	
6-32	1080	440	40.7	
6-33	1180	497	42.1	0.4
6-34	920	472	51.3	
6-35	480	125	26.04	0.8
6-36	480	148	30.8	
6-37	520	154	29.6	
6	7620	4122	54.09	0.52

6号培养基的成份如下(毫克/升):

NH_4NO_3 800, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 134, KNO_3 2500, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 250,
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 185, KH_2PO_4 170, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50, H_3BO_3 3,
 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025, KI 0.75,
 $\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.025, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27.85,

Na₂·EDTA 37.35, 肌醇100, 盐酸硫胺素10, 盐酸吡哆辛1, 烟酸1, 甘氨酸2, 琼脂10000, PH5.8, 诱导花药愈伤组织附加2.4-D 2, 激动素0.5, 6-卞基嘌呤 2, 蔗糖120000。

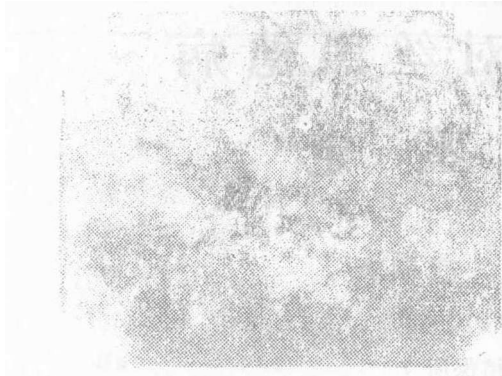


图3 1979年6号培养基诱导出的绿芽



图4 1979年6—22号培养基诱导正常花粉幼龄植株

参 考 文 献

- 〔1〕 Ivers, D.R., 1974. *Crop Science* Vol 14. No. 6.
- 〔2〕 简玉瑜等, 1978, “大豆花药培养的初报”〔大豆花药培养(第一报)〕, 花药培养学术讨论会文集(1977), 209—210页。
- 〔3〕 黄鸿柜等, 1978, “应用数学解析方法研究水稻培养基的组成”, 花药培养学术讨论会文集(1977), 29—39页。
- 〔4〕 陈英等, 1978, “应用正交试验法筛选籼粳稻杂种花药培养基”, 花药培养学术讨论会文集(1977), 40—49页。
- 〔5〕 Gamburg, O.L. 1976. *In vitro* 12(7): 473—475.
- 〔6〕 陈正华等, 1978, “三叶橡胶花粉植株的诱导” 花药培养学术讨论会文集(1977), 3—8页。