PKC ζ 亚类在角朊细胞增殖调控中作用的分子机理提供了有效的细胞模型.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号:39388002, 39200024)资助项目.

参 考 文 献

- 1 Lord J M, Pongracz J. Protein kinase C: a family of isoenzymes with distinct roles in pathogenesis. J Clin Pathol, 1995, 48: M57~ M64
- 2 Kiley S C, Jaken S, Whelan R, et al. Intracellular targeting of protein kinase C isoenzymes: functional implications. Biochem Soc Trans, 1995, 23: 601~ 605
- 3 Dekker L V, Parker P J. Protein kinase C α a question of specificity. TBS, 1994, 19: 73~ 77
- 4 Nishizuka Y. Intracellular heterogeneity of protein kinase C and the implications for cellular regulation. Nature, 1988, 334 (25): 661~ 664
- 5 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning_ A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 6 Grana X, Reddy E P. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin dependent kinase inhibitors (CKIs). Oncogene, 1995, 11: 211~ 219
- 7 Singh S S, Chauhan A, Brockerhoff H, et al. Activation of protein kinase C by phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 195: 104~ 112
- 8 Berra E, Diaz-Meco M T, Lozano J, et al. Evidence for a role of MEK and MAPK during signal transduction by protein kinase c ζ . EMBO J, 1995, 14(24): 6157~ 6163

(1998-01-05 收稿, 1998-04-27 收修改稿)

大豆花药培养中胚状体萌发的研究

赵桂兰 刘艳芝 尹爱平 李俊波

(吉林省农业科学院生物技术实验室, 公主岭 136100)

摘要 对大豆花药培养中愈伤组织和胚状体的诱导及萌发成花粉植株进行了大量试验, 研究了供试基因型的筛选、花蕾的低温预处理、培养基中激素的组合及不同培养温度对愈伤组织和胚状体诱导率的影响. 认为细胞分裂素(TDZ)对胚状体的诱导和萌发起到了主导作用, 在供试的110份基因型中有28份栽培大豆对花药培养有反应能力, 愈伤组织诱导率26%~69%, 植株分化率0.5%~2.0%.

关键词 大豆 花药培养 胚状体 萌发

大豆(*Glycine max* L.)是重要的油料作物, 对其品质的改良和产量的提高一直是育种家们追求的目标. 然而, 传统的育种方法已不敷所需. 花药培养辅助育种已在多种作物上取得成功. 大豆花药培养最早由Ivers等人^[1]开始研究, 获得体细胞胚愈伤组织, 简玉瑜等人^[2]进而取得了较好的研究结果. 相继地, 尹光初等人^[3]的实验从愈伤组织上分化出少量的大豆花粉幼龄植株; 刘德璞等人^[4]获得了离体花粉愈伤组织; Kadlec等人^[5]获得了愈伤、胚状体类似物; 叶兴国等人^[6]通过变动氨态氮和硝态氮比例, 增加有机氮等方法分化了一个根、芽齐全的

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1998-43-14-1512>

小植株. 由于大豆花药培养的难度大, 再生植株困难, 20 多年来的进展一直很缓慢, 至今未见有再生单倍体植株的报道. 笔者于 1995~ 1997 年共试验了 110 份基因型, 接种花药近 10 万个, 重点针对影响胚状体发生及萌发有关因素开展了研究.

1 材料与方法

() 材料. 东北三省栽培大豆 64 份, 野生大豆 18 份, 美国栽培大豆 28 份. 供试基因型取材分为温室及田间.

() 低温预处理及不同培养温度试验. 从植株上取下的花芽立即置入低温环境下(冰盒中), 消毒后 4℃预处理 48 h, 然后在解剖镜下剥出花药接种至 M-1 诱导培养基上(基本培养基为 MS salt, 下同), 附加 2, 4-D 2.0 mg/L, NAA 2.0 mg/L, 6-BA 1.0 mg/L, TDZ 0.01 mg/L, 蔗糖 12%), 每皿接种 20 个花药, 置暗处, 于不同温度下(18, 20, 22, 24, 26, 28℃)培养. 离体培养 10 d 后, 在解剖镜下检查, 弃除花药壁及花丝断口长出的愈伤组织. 对离体培养 20~ 80 d 期间的花药, 每 10 d 检查一次. 挑选结构圆形, 质地较硬, 乳白色的愈伤组织进行转移. 将培养物转至 M-2 培养基上(附加 KT 0.5 mg/L, 6-BA 0.5 mg/L, TDZ 0.15 mg/L, 蔗糖 6.0%), 此阶段培养物进入光照条件下培养. 当诱导出不同类型的类胚结构(图 1(a)、(b))时, 再转入萌发培养基 1/2M-3 (附加 IBA 0.025 mg/L, 6-BA 0.01 mg/L, TDZ 0.005 mg/L, GA₃ 0.3 mg/L, AC 0.5%, 蔗糖 2.0%), 胚状体即可发育成苗、成株(图 1(c)、(d)).

图1 大豆花药培养中胚状体的萌发

(a) 不同类型胚状体, (b) 胚状体(126×), (c) 胚状体萌发, (d) 花粉植株, (e) 花粉植株染色体($n=20$)

() 诱导、分化培养基中 TDZ 的浓度试验. 在诱导花药培养的 M-1, 诱导愈伤组织类胚体发生的 M-2, 及胚状体萌发的 1/2M-3 培养基中, 附加了不同浓度的 TDZ. 试验组与对照组来自同一培养条件.

2 结果与分析

2.1 不同基因型对诱导花药培养的反应效果

在供试的 110 份基因型中, 有 28 份栽培大豆(美国栽培 5 份)对花药培养有反应能力(在花药培养基中能产生愈伤组织), 愈伤组织诱导率最高在 68.1%, 有 14 份可产生胚状体, 有 7 份可获得胚状体萌发并发育成苗、成株(表 1).

表 1 不同基因型对花药培养效果

基因型	接种花药数	产生愈伤数	类胚体数	植株数	愈伤诱导率/%	胚状体诱导率/%	分化率/%	分化结果
LA88_408814	100	60	11	2	60.0	18.3	2.0	小植株
PI_9501	100	51	3	1	51.0	5.8	1.0	苗、小植株
Buckshot 723	100	43	2	0	43.6	4.6	0.0	萌发的胚状体
长农 4	160	84	8	0	52.0	9.5	0.0	苗、胚状体
吉林 20	130	65	3	1	50.0	4.6	0.0	苗
吉林 32	180	47	2	1	26.1	4.2	0.5	小植株
公交 70203-1	160	109	5	0	68.1	4.5	0.0	胚状体(未萌发)
吉林 36	180	49	4	2	27.2	8.1	1.1	苗、萌发的胚状体

实验结果表明, 基因型的差异在大豆花药培养上反应很明显, 不同品种间愈伤组织诱导率和胚状体分化率也不同. 供试基因型为杂交组合后代, 其愈伤组织诱导率及胚状体诱导率也相应提高. 如双亲诱导率都是理想型的, 杂种后代的培养力也较高, 这种现象在水稻、玉米花药培养中有过报道^[7, 8]. 在供试的野生大豆基因型中, 未表现出对花药培养有反应能力的基因型, 这可能是该培养基不适于野生大豆花药培养或是基因型不合适.

2.2 低温预处理及不同培养温度对诱导胚状体、愈伤组织的影响

低温前处理对提高小孢子反应的作用已在大麦、水稻等多种作物上得到证实^[8, 9]. 在大豆^[2, 6]上也同样证实低温预处理可提高花药愈伤组织的诱导率. 但在大豆花药培养过程中, 采用相对低温条件下培养还未见报道. 为此, 花药培养前低温(4℃)预处理 48 h, 离体培养后的花药分别进行了不同培养温度试验, 从 18~ 28℃之间的温度变化观察愈伤组织和胚状体诱导率, 有明显差异(图 2). 设 26℃为对照组.

由图 2 可以看出, 愈伤组织诱导率在一定范围内随着温度的升高呈正效应, 但在产生胚状体的能力上, 培养温度 20~ 24℃时, 诱导率最高为 12.5%~ 20%, 在这一温度范围, 正常胚的诱导率提高相当显著. 低温为何起到提高诱导频率的作用, 各研究者看法不同, Nistch 等人^[10]认为, 在低温预处理时, 小孢子受寒冷刺激, 使有丝分裂由不均等分裂转为均等分裂. 结果使多核细胞增多, 启动了雄核发育. Mahesh 等人^[11]也认为低温预处理是花药和花粉培养中大幅度提高雄核发育频率的手段之一. 低温预处理与较低培养温度综合作用使胚状体的产量明显增加, 且胚状体的诱导率也增加显著, 正常胚状体的诱导率增加更为突出. Li 等人^[9]在大麦花药培养上也是前低温处理, 培养阶段 25℃条件下, 增加了单倍体胚状体的诱导率.

图2 不同温度下的愈伤组织和胚状体诱导率

2.3 低浓度的蔗糖与活性炭(AC)配合使用对胚状体萌发的影响

实验表明,在胚状体萌发培养基中单独使用2%~5%蔗糖时,正常胚的萌发率随着蔗糖浓度的增加而降低,不正常胚的萌发率为0,当2%蔗糖添加0.5%AC时,正常胚的萌发率为61.2%,不正常胚萌发率在17.39%。在大豆花药培养中,类胚体发育不正常胚状体的频率达20%以上,促进不正常胚状体萌发,等于提高了胚状体的分化率。本项实验经重复,结果基本一致。值得提出的是在本研究中,当胚状体萌发之后,要适时地将已发育的苗转至无AC培养基中,方可发育完整植株。否则,已萌发的苗,生长发育迟缓,最后停止生长。同时避免AC吸附培养基中的有益物质。

2.4 细胞分裂素(TDZ)对胚状体诱导、发育的调节作用

在大豆花药诱导培养基(M-1)中,分别比较了加与不加TDZ的诱导效果,未加TDZ的为对照,胚状体诱导率3%~4.7%。添加TDZ 0.01 mg/L胚状体诱导率为8.5%~10.2%。增加TDZ至0.05 mg/L,诱导率是3.0%,TDZ的浓度达0.2 mg/L,胚状体诱导率为0。实验表明,使用低浓度的TDZ使胚状体的诱导率达到了最佳效果。这可能是TDZ与IAA,6-BA在培养基中的配比达到了一个平衡点的效果,也可能是TDZ的添加,提高了细胞内源激素2ip和玉米素的活性。Thomas等人^[12]在大豆愈伤组织中发现TDZ处理可大大提高细胞内源CTK,如玉米素,2ip等的活性。至于TDZ的作用强度远远超出2ip和6-BA。Mok等人^[13]在花椰菜中,用0.3 μmol/L的TDZ可使芽繁殖达到10 μmol/L 2ip的水平。Chalupa^[14]在果树中也证明了TDZ在0.002~0.05 mg/L时即可形成大量的芽,而6-BA则要求0.2~1.0 mg/L。两者浓度相差20~100倍。在使用TDZ时,一定要充分试验使用浓度范围,方可起到最佳的效果。

3 讨论

通过上述培养程序,我们已从7份基因型中获得大豆花粉幼苗、植株。据目前已了解的有

关报道,国内外尚无成功的报道. 本文无论是从诱导率方面,还是供试基因型方面都超过国内外同类报道水平.

在大豆花蕾消毒剂及使用方法上,我们采用饱和漂白粉上清液二次消毒法,不但大大降低了大豆花蕾消毒不彻底、污染率高,同时增强了离体小孢子培养的活力,使诱导率得以提高. 关于AC在培养基中吸附生长调节物质,每毫克AC大约能吸附100 μg 左右的生长调节物质. 我们在诱导胚状体萌发培养基中使用植物生长调节物质浓度很低,按AC对生长调节物质的吸附能力,该培养基中的激素是不能发挥作用的,但在本项实验中只加入微量细胞分裂素,胚状体便可萌发. 这可能是由于TDZ不像6-BA易被AC吸附,也可能因为TDZ的作用强度大(近100倍). 尽管一部分激素被AC吸附了,但仍有一部分潜在的能力发挥作用. 总之,AC在大豆胚状体萌发上是有积极作用的,值得进一步推广使用.

关于胚状体的产生方式,经组织研究表明,胚状体来源于花粉细胞,分化的植株是单倍体植株(图1(e)). 由于再生的苗、植株只有一套染色体组,胚状体萌发后产生的苗、植株大多发育很慢、生长极弱、移栽难于成活. 这是今后本研究需要进一步研究、完善的重要方面.

参 考 文 献

- 1 Ivers D R, Palmer P G, Fehr W R. Anther culture in soybean. *Crop Science*, 1974, 14: 891~ 894
- 2 简玉瑜、孙玉华、陈永祥,等. 大豆花药培养的研究. *吉林农业科学*, 1980, 2: 54~ 61
- 3 尹光初,李学湛,朱之垠,等. 大豆花粉育株的研究. *黑龙江农业科学*, 1981, 1: 12~ 14
- 4 刘德璞,赵桂兰. 大豆花粉离体培养获得愈伤组织. *大豆科学*, 1986, 1: 17~ 19
- 5 Kadlec M, Suchomelova J, Smirnov V A. Anther culture in soybean. *Soybean Genetics Newsletter*, 1991, 18: 121~ 124
- 6 叶兴国,王连铮. 大豆花药培养研究进展, *大豆科学*, 1995, 14(4): 349~ 354
- 7 Wakasa Kyo. Application of tissue culture to plant breeding. *Inst of Agri Sci. Series D*, 1982, 33: 121~ 200
- 8 颜昌敬. 农作物组织培养. 上海: 上海科学技术出版社, 1991. 283~ 299
- 9 Li M H, Steven E U, Andris K, et al. Improvement of anther culture methods or doubled haploid production in barley breeding. *Plant Cell Reports*, 1993, 12: 328~ 334
- 10 Nitsch C, Norreel B. Effect d'un choc thermique sur le pouvoir embryogene du pollen *Datura innoxia* cultive dans l'anthere ou isole de l'anthere. *C R Acad Sci Paris*, 1973, 276D: 303~ 306
- 11 Mahesh Wari S C, Tyagi A K, Malhotra K. Induction of haploidy from pollen grains in angiosperms the current status. *Theor Appl Genet*, 1980, 58: 193~ 206
- 12 Thomas J C, Katterman F R. Cytokinin activity induced by thidiazuron. *Plant Physiology*, 1986, 81: 681~ 683
- 13 Mok M C, Mok D W S, Turner J E, et al. Biological and biochemical effects of cytokinin active phenylurea derivatives in tissue culture systems. *Hort Science*, 1987, 22: 1 194~ 1 197
- 14 周俊彦,郭扶兴. 苯基目尿衍生物的细胞分裂素活性. *植物生理学通报*, 1990, 4: 7~ 13

(1997-12-01 收稿, 1998-03-04 收修稿稿)