

野生大豆 (*Glycine soja*) 下胚轴和 子叶的愈伤组织获得幼苗*

蒋兴邨

邵启全

Peter S. Carlson

(中国科学院遗传研究所)

(美国密执安州立大学)

提 要

野生大豆 *Glycine soja* 是栽培大豆 *G. max* 的近祖。它具有高蛋白、抗病性强、抗旱、抗涝和抗盐碱等许多优良性状。研究 *G. soja* 的愈伤组织的再生, 对于研究 *Glycine* 属的遗传工程, 改良现有栽培大豆都有重要意义。本文介绍采用 MS 基本培养基附加 2mg/l IAA、5mg/l BA 和 2mg/l KT 培养基, 培养未成熟的 *G. soja* 幼嫩种子的下胚轴和子叶获得愈伤组织并分化出幼苗。

IAA——Indole—Acetic Acid.

BA——6—Benzylaminopurine.

KT——Kinetin.

豆属 (*Glycine*) 是一种重要的经济作物, 吸引着国内外许多科学工作者对其进行研究。我国学者对栽培大豆 (*G. max*) 下胚轴培养获得了愈伤组织植株^[1,2], 对花药培养^[3]也得到植株。美国学者 Kameya 等人对 7 种野生大豆和栽培大豆的种子的下胚轴培养, 仅在 *G. canescens* 和 *G. tumentoua* 二种野生大豆获得再生植株。其它 *G. soja* 等 5 种野生大豆和栽培大豆的材料均未成功^[6]。

野生大豆 *G. soja* 原产我国^[4,5], 是一种重要的大豆品种资源。对它进行组织培养的研究, 对开展豆属的遗传性状的转移的研究有其特殊意义。我们对北京 1 号野生大豆进行组织培养, 并获得再生植株, 现将试验结果发表如下。

* 李金国、李安生、牛德水同志参加部分工作, 深表感谢。

材 料 和 方 法

试验应用的野生大豆是1980年在北京本所农场的杂草丛中发现的,属于 *Glycine soja* 野生大豆,我们称它北京1号野生大豆。试验采用它在田间收获的成熟种子和在温室中生长的未成熟种子的下胚轴和子叶进行组织培养。

G. soja 的成熟种子一般很难发芽,试验时用0.1%升汞溶液消毒10分钟,接着用10%次氯酸钠浸泡10分钟,然后用无菌水冲洗三次,再用无菌刀片将种子切开,放置于培养基上,在室温26—28℃条件下使它发芽。4天后种子能整齐地萌发,再将子叶、上胚轴(顶芽)、下胚轴和根轴分开进行培养。

未成熟种子取自种植在温室中的野生大豆植株,将开花后18天左右的荚果摘下,用80%的酒精浸泡5分钟,随后将幼嫩种子在无菌条件下剥除种皮,切除子叶和下胚轴连接的部位,因为在此部位存在种子的顶芽及子叶基部的休眠芽而影响试验的正确性。以后分别将子叶和下胚轴接种于培养基中,放置在25—28℃条件下培养,12天后检查休眠芽等是否除净并将愈伤组织转移到分化培养基上。

本试验采用MS(7)基本培养基附加2mg/l IAA, 5mg/l BA和2mg/l KT为诱导愈伤组织的培养基。采用MS基本培养基附加0.1% IAA和5mg/l KT作为分化培养基。

试 验 结 果

1. 成熟种子不同部位对产生愈伤组织的影响

将在无菌条件下发芽的种子分成上胚轴、下胚轴、根轴及切除休眠芽的子叶,分别培养于MS诱导愈伤组织培养基中。一周后,上胚轴和下胚轴的试验材料有80%左右产生愈伤组织,其组织鲜嫩、绿色。而根轴只有个别产生了愈伤组织,其色呈乳白色。子叶产生愈伤组织较慢,培养七天后组织块仅变厚、变大,尚未产生愈伤组织(表1、图片1)。

表 1 北京1号野生大豆成熟种子不同部位对产生愈伤组织的影响

培养部位	培养数目	一周后产生愈伤组织		二周后产生愈伤组织	
		数 目	%	数 目	%
上 胚 轴	14	11	78.6	13	92.9
下 胚 轴	41	33	80.5	41	100
根 轴	14	1	7.1	6	42.9
子 叶	190	0	0	20	20.0

培养二周后,有20%的子叶伤口处产生了愈伤组织,其愈伤组织为深绿色。同时子叶与胚轴连接处经常长出幼苗(图片2)。根轴也有42.9%产生愈伤组织,色乳黄色,

逐渐变褐。上、下胚轴都有90%以上的组织产生愈伤组织, 这些愈伤组织生长迅速, 颜色鲜嫩。以后将它转移到 MS 分化培养基中或者完全没有激素的 MS 培养基中, 每种愈伤组织都有1000块以上, 但均未分化出幼苗, 有些愈伤组织可分化出根系 (图片 3)。

2. 开花后不同日令的种子产生的愈伤组织对分化幼苗的影响

采用在温室中生长的野生大豆开花后30天的种子和开花后18—20天左右的未成熟的种子作试验。分别用其下胚轴和切除休眠芽的子叶进行培养。试验观察到这些直接从植株上采集来的30天的成熟种子和18天左右的未成熟种子的下胚轴和子叶, 在 MS 诱导培养基上, 12天后都能很好地诱导出愈伤组织, 只有开花后18天左右的下胚轴, 个别在接种时受到机械创伤下胚轴不能产生愈伤外, 其他全都产生了愈伤组织 (表2)。特别是子叶培养, 与完全成熟种子的子叶培养有很大的区别。从植株上直接取下的开花后30天和18天左右的种子的子叶, 不光在伤口很容易产生愈伤组织, 甚至整个子叶的边缘都能产生愈伤组织 (图片 4)。

表 2 北京 1 号野生大豆不同成熟种子培养对形成幼苗的影响

不同日令的种子	培养部位	培养数日	12天后产生愈伤组织		出 苗 数
			数	%	
开花后30天的种子	下胚轴	48	48	100	0
	子 叶	34	31	100	0
开花后18—20天的幼嫩种子	下胚轴	88	78	88.6	1
	子 叶	145	145	100	1

以后这些愈伤组织分别转入含有 0.1mg/l IAA, 5mg/l KT 的 MS 分化培养基中。开花后30天的种子的下胚轴和子叶的愈伤组织都未分化出幼苗。开花后18—20天的幼嫩种子的下胚轴和子叶的愈伤组织, 生长非常迅速, 在培养后40—45天, 愈伤组织的直径有 4—5 厘米。其中下胚轴的一块愈伤组织, 在离原下胚轴位置 8 毫米的愈伤组织上形成了一棵幼小的苗。另一块子叶的愈伤组织, 在离子叶12毫米的地方也形成了一个幼小苗 (图片 5)。这二株幼苗生长很缓慢, 出苗后30多天只有 3 片叶, 没有根系, 以后夭亡了。

在以后的重复试验中, 从开花后18—20天的幼嫩种子的下胚轴的愈伤组织中, 在离原下胚轴10毫米处又获得一棵幼苗, 还是没有根系, 长到 5 片叶子后随着愈伤组织一起夭亡。

讨 论 和 小 结

1. 北京 1 号野生大豆 (*G. soja*) 完全成熟的种子的下胚轴及子叶, 在高激素的 MS 诱导愈伤组织的培养基上是容易产生愈伤组织的, 这些愈伤组织能分化出根系, 但是很难

能再生出幼苗。在这些愈伤组织悬浮培养时,观察到许多像根毛一样特异化了的细胞,再将悬浮细胞转移到固体培养基上时,也能分化出根系。说明了野生大豆 *G. soja* 的愈伤组织是有分化能力的,还有待寻找适合于它再生幼苗的培养基和培养条件。

2. 从温室中栽培的不同日令的北京1号野生大豆种子的下胚轴和子叶,在生产愈伤组织能力上无太大的差别。其新鲜种子的子叶产生愈伤组织的能力很强,超过完全成熟种子的子叶产生愈伤组织的能力。开花后30天种子的下胚轴和子叶虽然都很容易产生愈伤组织,但与完全成熟的种子一样,不易分化出幼苗。开花后18—20天的幼嫩种子的下胚轴和子叶所产生的愈伤组织,生长迅速,具有分化幼苗的能力。但在分化幼苗的愈伤组织上都未分化出幼根,因此小苗很难成活。虽然目前获得的幼苗数量尚少,又未成株,但试验结果表明,利用幼嫩的、未成熟的 *G. soja* 种子的下胚轴和子叶培养,有可能获得分化能力强的愈伤组织。

3. 在培养过程中,经常出现一些由子叶的基部的休眠芽及下胚轴顶部未切尽的顶芽产生的幼苗。其特点:(1)紧贴在子叶基部和下胚轴上部。(2)幼苗生长迅速。一般在培养后10—15天内即可产生,20天左右就能成为小植株。(3)这种幼苗的基部能生长粗壮的根系。

从愈伤组织上再生的幼苗生长很缓慢,一般在培养40天以后才出现,出苗后30多天仍然只有3—5片叶子,不易生根。我们在试验中获得的三株幼苗都是在离开原来的下胚轴和子叶位置8—12毫米的地方产生的。

参 考 文 献

- (1) 中国科学院植物研究所等, 1974, 植物学报 16: 335
- (2) 吉林省农科院作物所大豆组织培养组, 1976, 植物学报, 19: 250—262
- (3) 尹光初等, 1980, 科学通报25 (18): P84
- (4) 孙翟东《大豆》, P. 1, 科学出版社 1956
- (5) 王金陵《大豆的遗传与育种》P. 76—77, 科学出版社 1958
- (6) Kameya, T. et al., 1981 Plant science letters 21: 283—294
- (7) Murashige, T., F. skoog, 1962, Physiol Plant 15: 473—497

PLANT REGENERATION FROM HYPOCOTYL AND
COTYLEDON OF GLYCINA SOJA

Liang Xingcun Shao Qiquan

(*Institute of Genetics, Academia Sinica*)

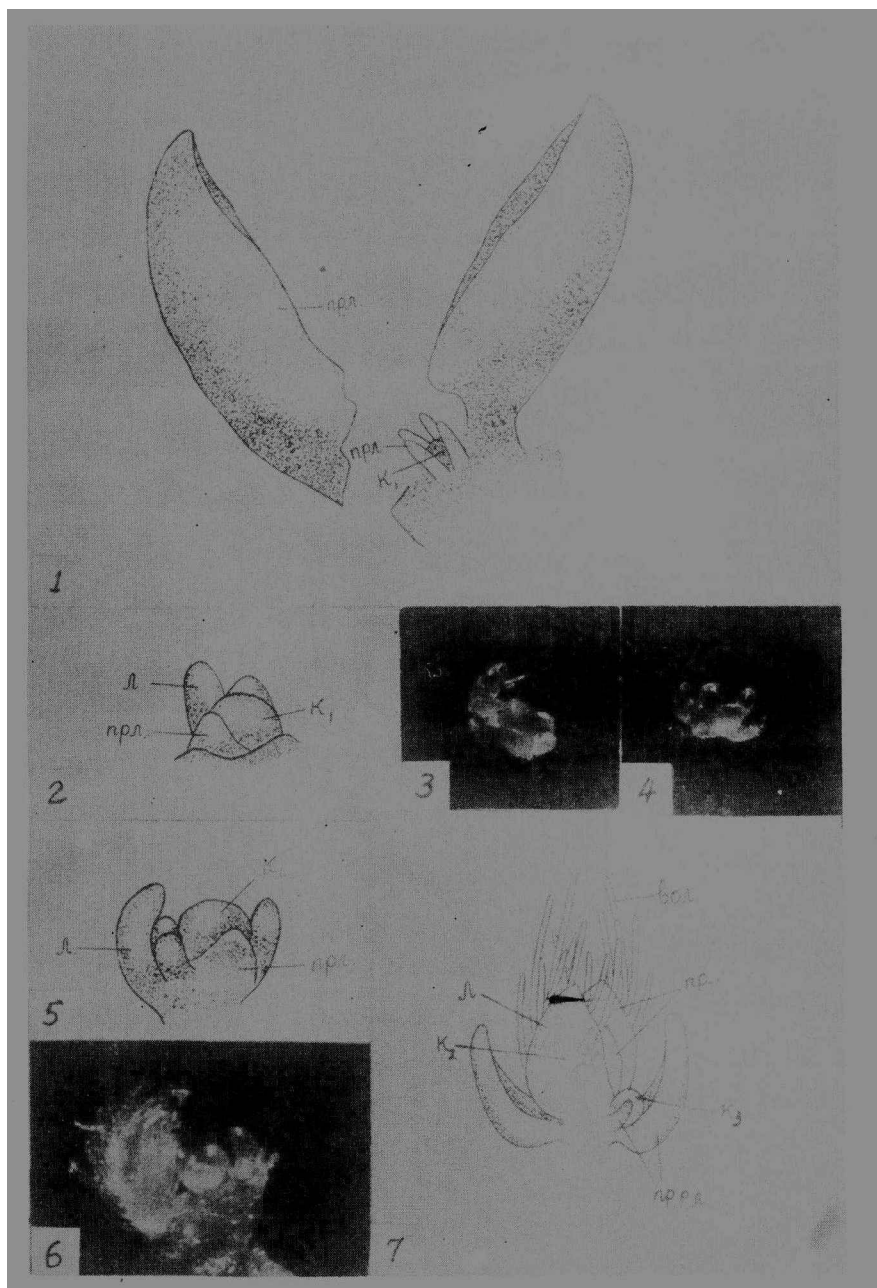
Peter S. Carlson

(*Michigan State University, USA*)

Abstract

Wild soybean *Glycine soja* with his characters of disease resistant, high protein content, tolerant to stress is an important germplasm for soybean improvement. Plant regeneration is first step for application of genetic engineering technique to soybean improvement. Several plantlets were obtained from calluses of hypocotyle and cotyledon of wild soybean. The best medium for this is MS medium with supplements 2mg/l IAA, 5mg/l BA and 2mg/l KT. The immature hypocotyl and cotyledon are best inoculants for callus and plant inducing.

图版 I

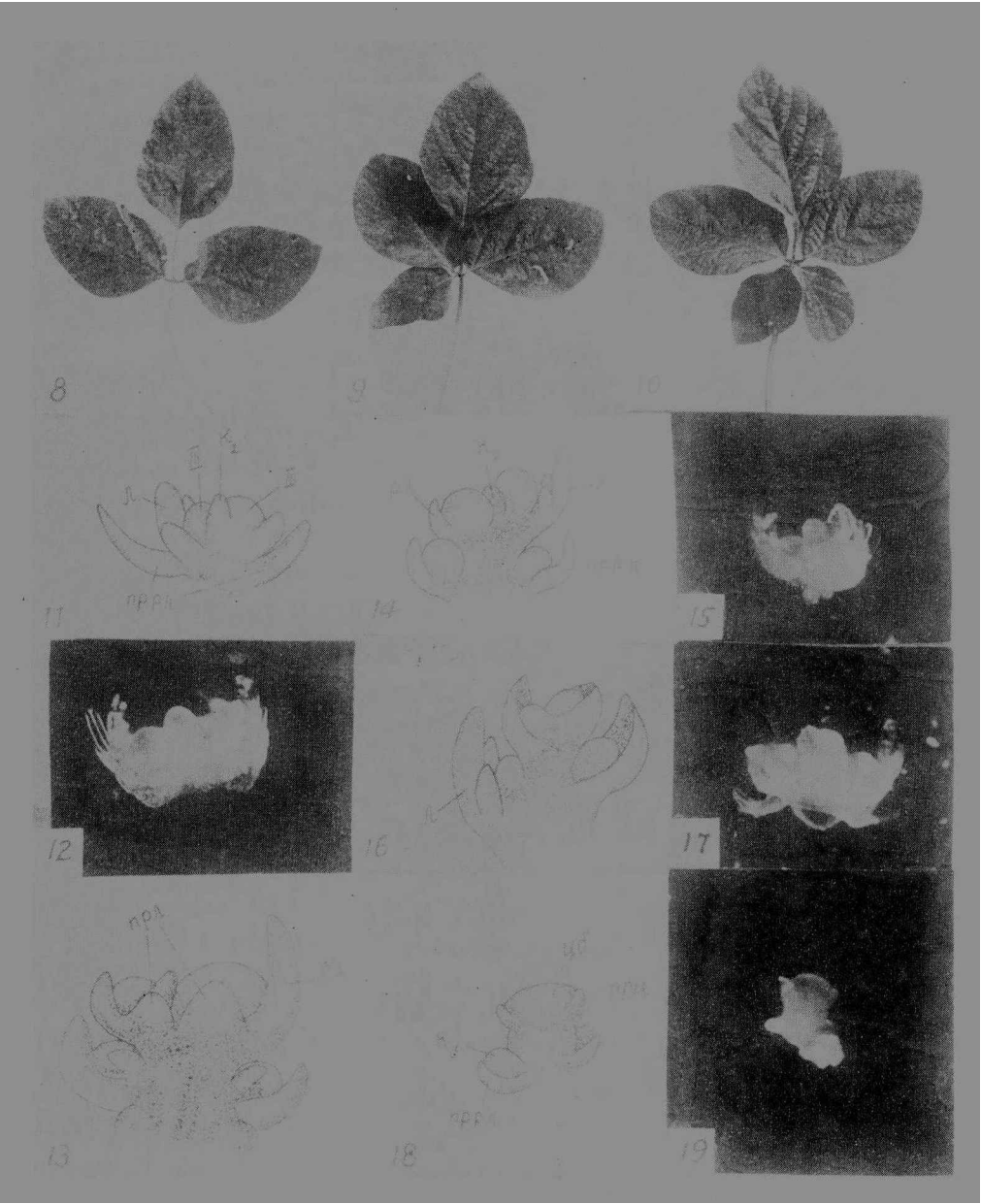


1 时期 I

2—6时期 II

7 腋芽

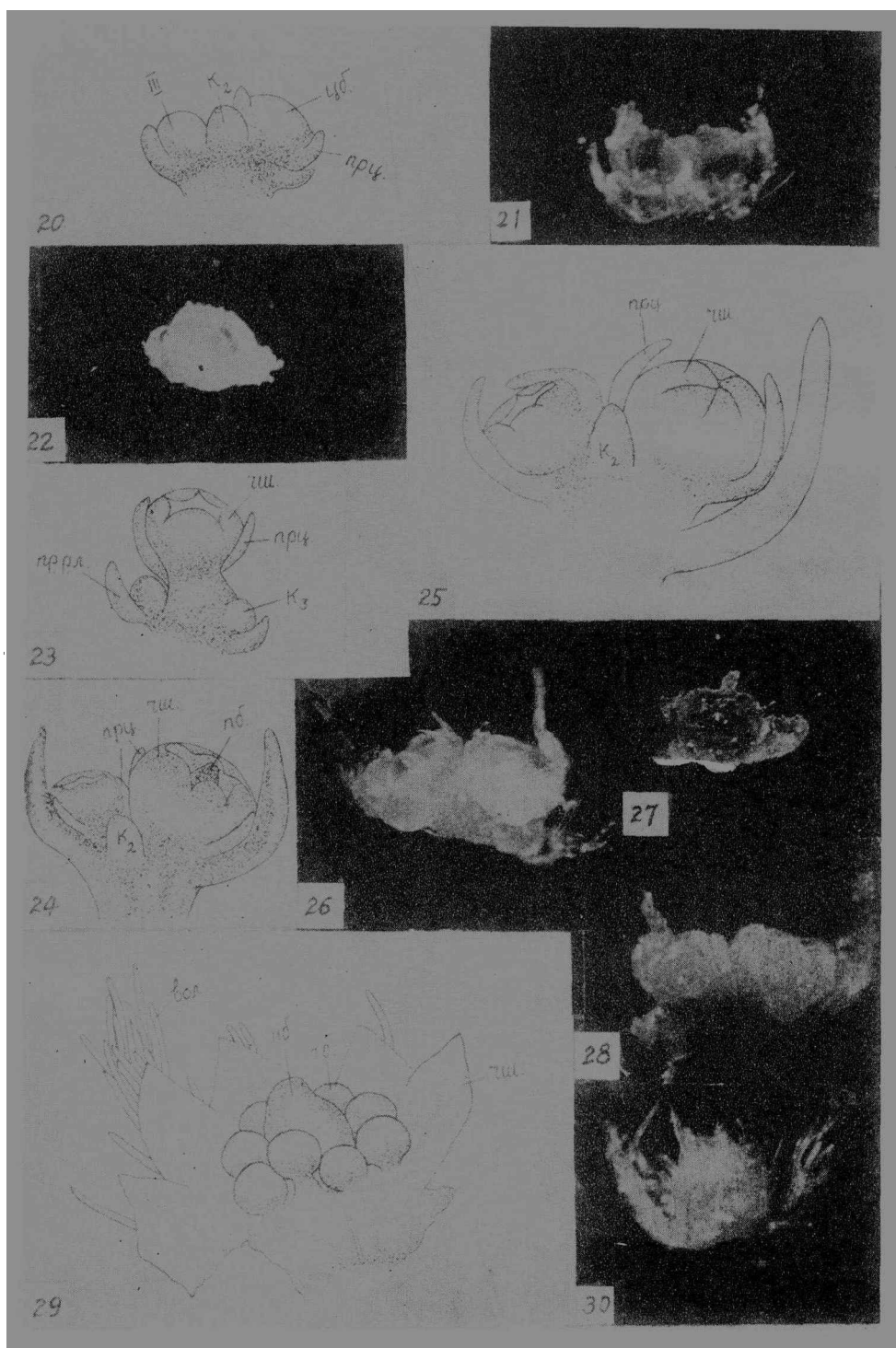
图版 II



8—10 大豆的复叶

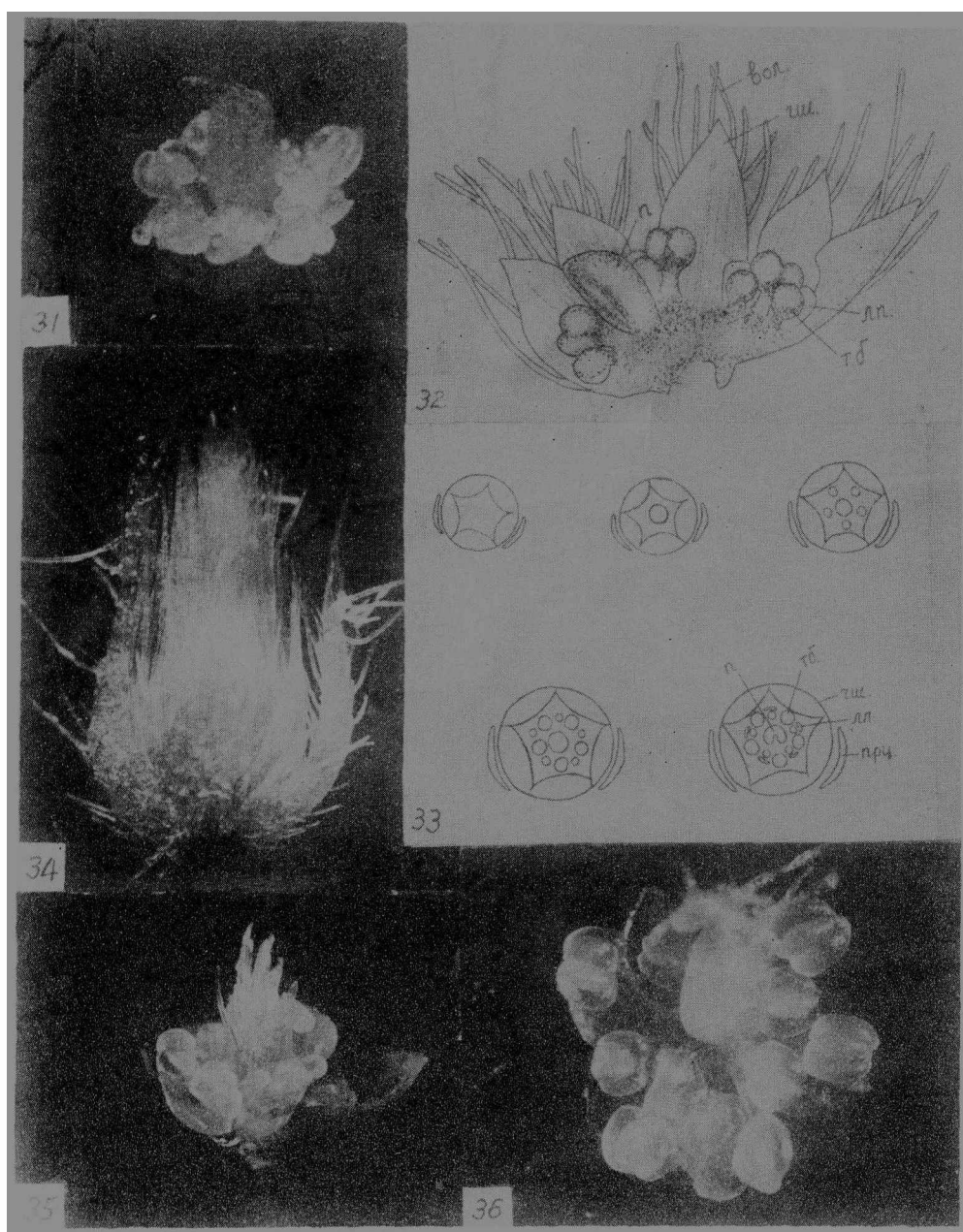
11—17 时期Ⅲ

18—19 时期Ⅳ



20—21 时期 IV

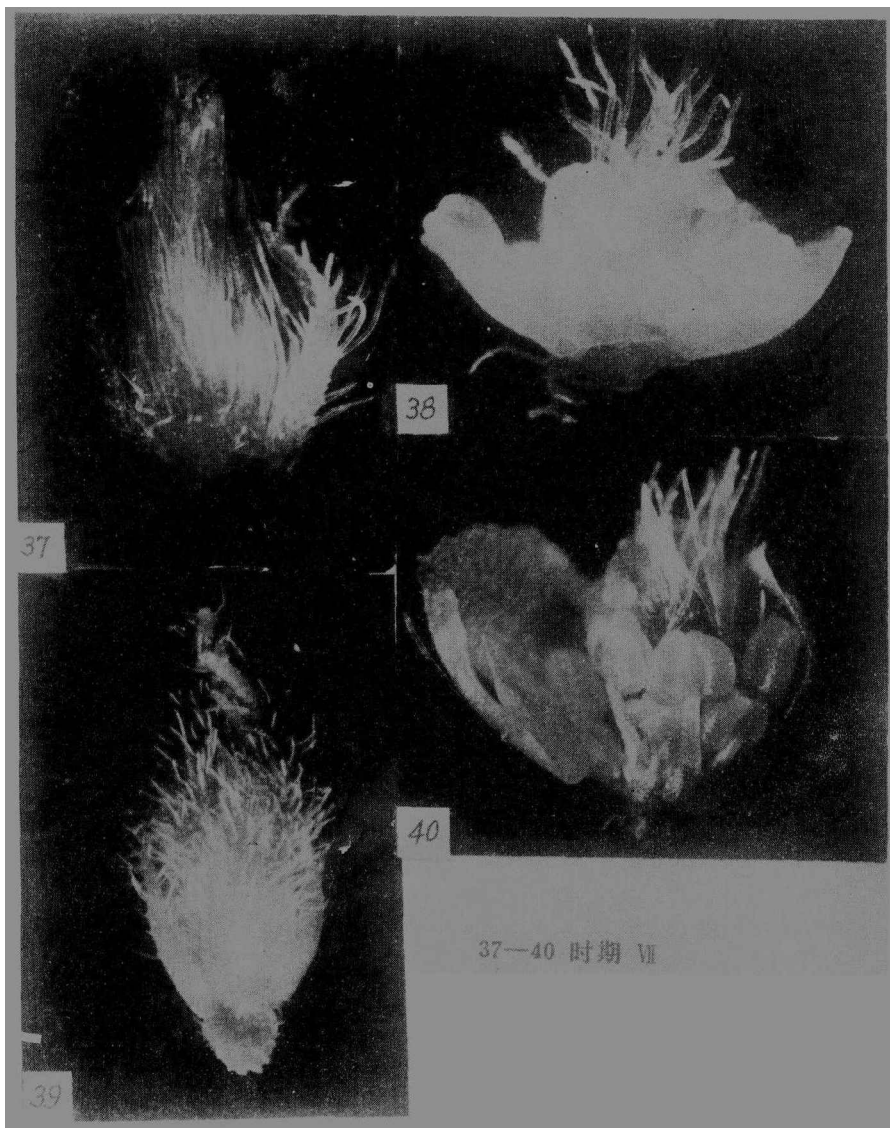
22—30 时期 V



31—32时期V

33 花器形成模式图

34—36时期VI



K₁ 主茎生长点

л 叶原基

р.л 退化叶

цб 花原基

п. 雌蕊

вол 茸毛

K₂ 分枝生长点

пр.л 单叶

пр.р.л 退化单叶

чш 萼片原基

пб 雌蕊突起

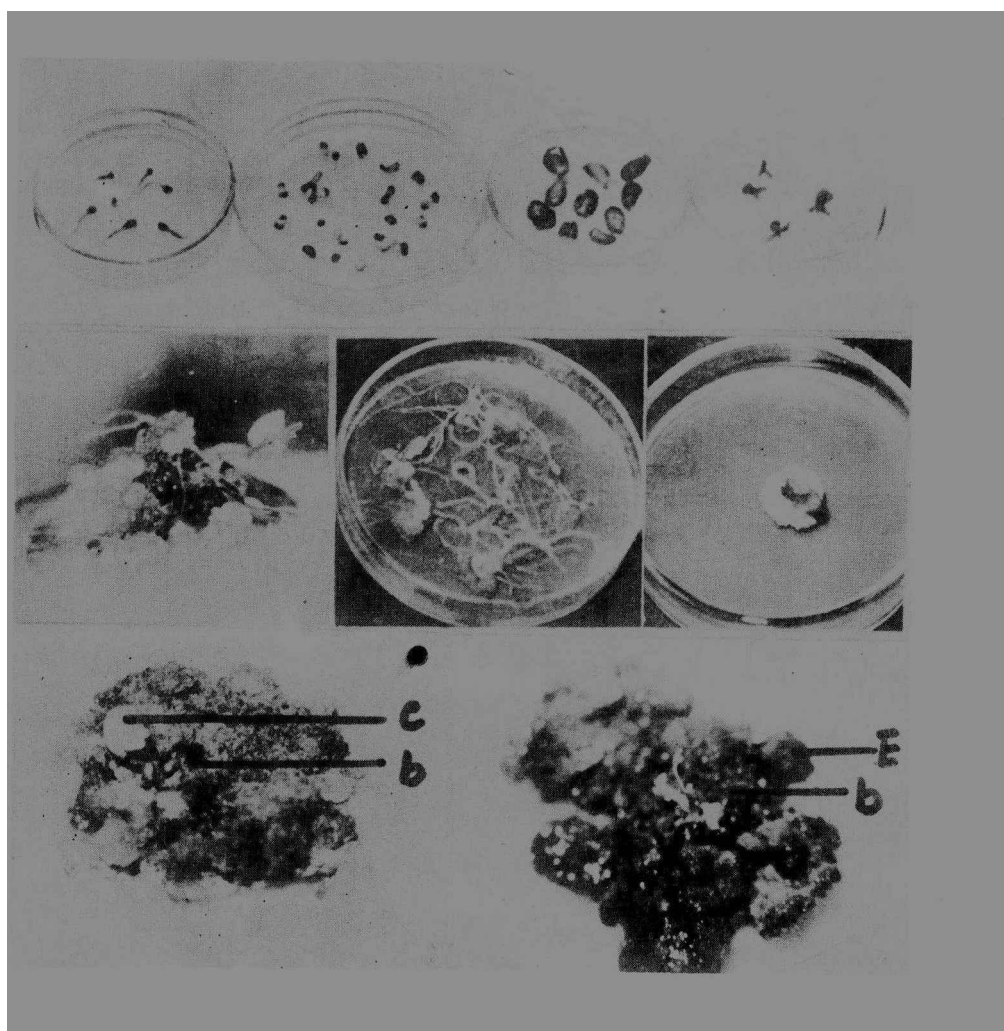
K₃ 次级分枝生长点

апрл 托叶

прц 苞叶

т.б 雄蕊突起

лп 花冠原基



照片说明

- 〔1〕北京1号野生大豆完全成熟种子不同部位产生愈伤组织的情况。1. 根轴, 2. 下胚轴, 3. 子叶, 4. 上胚轴(顶芽)。
- 〔2〕由子叶休眠芽产生的幼苗。
- 〔3〕由下胚轴愈伤组织上长出根系。
- 〔4〕幼嫩种子的子叶培养10天后子叶四周生长的愈伤组织。
- 〔5〕由幼嫩种子的子叶愈伤组织产生的幼苗。b—幼苗, C—子叶。
- 〔6〕由幼嫩种子的下胚轴愈伤组织产生的幼苗。b—幼苗, E—下胚轴。