

从大豆幼胚诱导胚胎发生再生植株*

周思君 尹光初 雷勃钧 何志鸿

(黑龙江省农业科学院大豆研究所)

摘 要

采用 MS 基本培养基附加高浓度的生长素 (2,4-D 或 NAA) 成功地诱导了大豆 (*G. max*) 未成熟胚的体细胞胚胎发生。2,4-D 的诱导效果明显优于 NAA。细胞分裂素对体细胞胚胎发生有抑制作用。适宜的维生素 B1 浓度为 0.4ppm。体细胞胚胎发生频率随蔗糖浓度 (1.5—9%) 的提高而降低。体细胞胚胎经历诱导、成熟和发芽三个阶段成功地发育成完整植株。再生植株移入土壤已经获得种子。

关键词: 大豆 组织培养 体细胞胚胎发生 再生植株

自 60 年代以来,人们对大豆的细胞和组织培养进行了广泛的研究,几乎所有器官和组织都进行过培养,但植株再生却一度十分困难。这种局面严重阻碍了植物组织培养及遗传工程技术在大豆品种改良中的应用。近几年来,大豆未成熟胚的培养为高频率地再生植株展现了美好前景。但国内在这方面的研究却很少。国外虽有一些报道,但结论不尽相同,许多方面有待完善。我们自 1985 年开始进行大豆未成熟胚培养的研究,现已确立了通过体细胞胚胎发生和器官发生再生植株的完整体系。本文报道体细胞胚胎发生的部分结果。

材 料 和 方 法

从生长在大田或温室里的大豆植株上摘取含未成熟胚的豆荚,通过观察豆荚里种子的轮廓来确定适宜的时期。摘取的豆荚按下列程序消毒:自来水冲洗 10—30 分钟→75% 酒精浸 0.5—1 分钟→0.2% HgCl₂ 浸 15 分钟→无菌水冲洗 4—5 次。消毒后,在超净工作台上将豆荚剥开取出种子,然后切开种皮剥取幼胚。选取 4±1 mm 长的胚,将两片子叶分开,使子叶的上表皮朝上接种于诱导培养基上。诱导培养 4 周后调查反应频率。

* 卢翠华、王树林、张开旺、钱华、李兴滨、张晓梦参加部分工作, 谨致谢忱。

本文于 1988 年 7 月 18 日收到。

This paper was received on July 18, 1988.

各种培养基的所有成分包括各种植物激素均在高压灭菌前一次加入。整个试验均采用固体培养，琼脂用量为0.8%。pH在高压灭菌前调至6.0。培养基在0.9—1.1 kg/(cm)²压力下热压蒸汽灭菌20分钟。

培养条件：空调培养室。白天补充光照12小时(8.00—20.00)，使室内平均光照强度为1500 Lux，在此期间温度控制在26℃；夜间温度控制在18℃。黑暗培养在同一培养室内的密闭木柜中进行。

为使体细胞胚发育成完整植株，采用了下列培养程序：诱导→成熟→发芽。

结果与讨论

一、体细胞胚胎发生的诱导

诱导培养基采用MS (Murashige and Skoog 1962)基本培养基附加高浓度的生长素(2,4-D或NAA)。未成熟胚接种在诱导培养基上，10—15天后在幼子叶的表皮上长出球形突起，这些球形突起即球形期体细胞胚。以后这些球形体细胞胚继续发育经历心形期、鱼雷形期直至成熟(见图版1—5)。有些体细胞胚则发育成喇叭形、叶形和类似胚轴的形状(图版9)。这些形态不正常的体细胞胚有的能产生根，但都不能形成完整植株。

1. 生长素种类、浓度及光暗处理对体细胞胚胎发生的影响

关于生长素种类对体细胞胚胎发生的影响已有过研究^[1,5,6]，认为2,4-D和NAA的效果最好，且二者各有利弊，2,4-D能诱导高频率的胚胎发生，但诱导产生的体细胞胚往往形态不正常；NAA诱导频率低，但诱导产生的体细胞胚形态上更正常。二者中哪个效果更好，缺乏明确结论。

表1 不同浓度的2,4-D、NAA及光暗处理对体细胞胚胎发生的影响*

Table 1 Effects of 2,4-D and NAA concentrations under light or dark condition on somatic embryogenesis*

植物激素 (ppm)	光 Light			暗 Dark		
	胚胎发生频率(%) Embryogenesis frequency (%)	平均胚数 Mean embryo No.	正常胚率(%) Frequency of normal embryos (%)	胚胎发生频率(%) Embryogenesis frequency (%)	平均胚数 Mean embryo No.	正常胚率(%) Frequency of normal embryos (%)
2,4-D 10	53.5	8.7	19.7	19.1	6.6	18.2
20	80.0	12.0	25.9	30.2	7.2	26.9
40	6.3	6.9	11.1	6.7	5.4	12.2
NAA 10	21.3	1.8	4.3	41.3	2.1	16.7
20	26.8	2.1	13.0	24.4	2.3	8.7
40	27.4	1.9	14.8	14.6	2.5	5.0

* 基因型材料为黑农34。

* Genotype was Heinong-24.

光在植物组织培养中,也是控制形态发生的重要因素之一。Barwale 等(1986)报道 NAA 在黑暗条件下能诱导产生形态正常的体细胞胚。考虑到光暗处理与生长素种类和浓度之间可能存在交互作用,所以进行了复因子试验,分别在光照和黑暗条件下,比较了不同浓度的 2,4-D 和 NAA 的诱导效果(表 1)。

结果表明,2,4-D 浓度的变化对胚胎发生频率影响很大。最适 2,4-D 浓度为 20 ppm,其胚胎发生频率高达 80.0%。光暗处理趋势一致。不同浓度的 NAA 对胚胎发生频率的影响在光照和黑暗条件下表现不同。在光照条件下,不同浓度 NAA 的胚胎发生频率差异不大,适宜浓度在 20—40 ppm 之间。在黑暗条件下,情况相反,胚胎发生频率随 NAA 浓度提高而显著下降,适宜浓度在 10 ppm 以下。这表明黑暗条件使 NAA 的适宜浓度降低。

2,4-D 的诱导反应频率光照处理高于黑暗处理;NAA 的诱导反应频率黑暗处理高于光照处理。这表明光照条件有利于提高 2,4-D 的诱导反应频率,黑暗条件有利于提高 NAA 的诱导反应频率,光、暗处理与生长素种类之间存在交互作用。

比较地看来,在光照条件下 2,4-D 诱导体细胞胚胎发生的反应频率高于 NAA;在黑暗条件下,NAA 的诱导反应频率高于 2,4-D。但 2,4-D 在光照条件下的最高诱导反应频率(80.0%)远高于 NAA 在黑暗条件下的最高诱导反应频率(41.3%)。从体细胞胚的发育和外部形态看,NAA 诱导的体细胞胚发育快,在诱导培养基上很快发育成各种形态,包括叶形、喇叭形、类似胚轴形等。最高正常胚率为 16.7%。2,4-D 诱导的体细胞胚要在去掉 2,4-D 的成熟培养基上才能进一步发育,最高正常胚率为 26.9%。在含 2,4-D 的诱导培养基上,体细胞胚的进一步发育受到抑制,诱导培养 4 周后,多数体细胞胚仍停留在球形期。这表明 2,4-D 对体细胞的发育有抑制作用。无论 2,4-D 或 NAA,体细胞胚形态的正常性与诱导频率都是一致的。即有利于提高诱导频率的条件,也有利于提高正常胚率。2,4-D 诱导的平均胚数,即平均每个发生反应的幼子叶上体细胞胚的数量显著多于 NAA。2,4-D 的最高诱导效率值(胚发生率 \times 平均胚数)为 10.32,平均每个子叶上可得 2.7 个正常体细胞胚;NAA 的最高诱导效率值为 0.87,平均每个子叶上正常体细胞胚数为 0.14。可见 2,4-D 的诱导效果明显优于 NAA。

2. 细胞分裂素对体细胞胚胎发生频率的影响

在含 2,4-D 20 ppm 和含 NAA 8 ppm 的两种诱导培养基中分别加入 6-苄氨基嘌呤(6-BA)和激动素(KT),其浓度均为 0.1 和 1.0 ppm。结果不管哪种配合方式,细胞分裂素都对生长素的诱导作用产生强烈抑制(表 2)。KT 的抑制作用更强,0.1 ppm 的 KT 即完全抑制了 2,4-D 的诱导作用。这表明诱导大豆未成熟胚的体细胞胚胎发生不需要外源细胞分裂素。

3. 维生素 B₁ 浓度对体细胞胚胎发生频率的影响

对于维生素的使用,大多数研究者都用 B₅ 培养基的维生素浓度代替 MS 培养基的维生素浓度。这种替换,维生素 B₅、B₆ 的用量变化不大,但维生素 B₁ 的浓度从 0.1 ppm 猛增至 10 ppm,提高了 100 倍。如此剧烈的浓度变化是否对胚胎发生的诱导有

表 2 细胞分裂素对体细胞胚胎发生频率的影响*

Table 2 Effects of cytokimins on frequency of somatic embryogenesis*

细胞分裂素 (ppm)	胚胎发生频率(%)	
	Embryogenesis frequency (%)	
Cytokinin (ppm)	2, 4-D 20ppm	NAA 8 ppm
0	60.0	23.7
BA 0.1	6.6	8.1
BA 1.0	0	0
KT 0.1	0	1.7
KT 1.0	0	0

* 基因型材料为黑农 32。

* Genotype was Heinong-32.

利? 缺乏试验证据。我们对维生素 B₁ 浓度的试验结果(表 3)表明, 维生素 B₁ 的适宜浓度为 0.4 ppm。浓度继续提高, 胚胎发生频率下降。当维生素 B₁ 浓度提高到 10 ppm (B5 培养基的浓度) 时, 极显著地降低了胚胎发生的频率。从表 3 还可看出, 高的维生素 B₁ 浓度对根的诱导和生长是有利的。B₅ 培养基当初是为大豆根细胞的生长而设计的, 高浓度的维生素 B₁ 对根细胞生长有利, 正是 B₅ 培养基采用高浓度维生素 B₁ 的根据。

表 3 VB₁ 浓度对体细胞胚胎发生和根诱导频率的影响*Table 3 Effect of VB₁ concentration on somatic embryogenesis and root production*

培养基 Medium	VB ₁ 浓度 (ppm) VB ₁ Concentration (ppm)	胚胎发生频率 (%)	根诱导频率 (%)
		Embryogenesis frequency (%)	Frequency of induced roots (%)
MS + NAA 8 ppm	0.1	20.4	68.9
	0.4	24.3	76.2
	2.0	13.0	72.9
	10.0	9.3	84.2
MS + 2, 4-D 20ppm	0.1	33.0	0
	0.4	79.4	0
	5.0	56.7	0
	10.0	18.1	0

* 基因型材料为黑农 34。

* Genotype was Heinong-34.

4. 蔗糖浓度对体细胞胚胎发生频率的影响

蔗糖浓度对幼胚的体细胞胚胎发生频率的影响已有过报道。例如, 高的蔗糖浓度能提高玉米幼胚的胚胎发生频率(Lu 等 1983); 高于 3% 的蔗糖浓度对大豆幼胚的胚胎发生有利(Ranch 等 1986)。我们对蔗糖浓度的试验结果(表 4)表明, 随着蔗糖浓度(1.5—9%) 的增加, 胚胎发生频率下降。

表 4 蔗糖浓度对体细胞胚胎发生频率的影响*

Table 4 Effect of sucrose concentration on frequency of somatic embryogenesis*

培养基 Medium	蔗糖浓度 (%) Sucrose concentration (%)	胚胎发生频率 (%) Embryogenesis frequency (%)
MS + 2, 4-D 20ppm	1.5	81.3
	3	79.4
	6	57.8
	9	29.6

* 基因型材料为合中 25。

* Genotype was Hefeng 25.

试验还研究了基因型、幼胚长度、供体植株发育阶段，基本培养基、接种方式等因素对胚胎发生频率的影响，试验结果将另文报道。

二、体细胞胚成熟

在诱导培养基上产生的体细胞胚，需要转移到成熟培养基上，使其发育成熟。Ranch 等 1985 年指出，要使 90% 以上的体细胞胚转向成熟，培养基里需要加入脱落酸 (ABA)。我们采用了两种成熟培养基：① MS + IBA 0.1 ppm + ABA 0.3 ppm；② MS + 10 mM 脯氨酸 + 10% 蔗糖 + 1% 活性炭。结果培养基②优于培养基①。90% 以上的体细胞胚都能在培养基②上发育至成熟。表明 ABA 对于体细胞胚的成熟不是必需的。

三、体细胞胚发芽与完整植株的形成

体细胞胚在成熟培养基上发育成熟后 (约一个月左右)，转移到发芽培养基上，使其发芽。我们采用了两种发芽培养基：① MS + 蔗糖 1%；② MS + IBA 0.1 ppm + GA 0.1 ppm。两种培养基都能使成熟的体细胞胚发芽。培养基①由于蔗糖浓度低，渗透压小，体细胞胚膨大的程度大，根系发育较好。培养基②由于含有生长素 (IBA) 和赤霉素 (GA)，体细胞胚发芽后抽茎快。

成熟的体细胞胚在发芽培养基上先长出根 (5—7 天)，然后长出芽。体细胞胚形态越正常 (接近授精胚)，形成完整植株的能力越强。成熟的形态正常的体细胞胚 90% 以上都能发芽并形成完整植株。

再生植株移入土壤，已经获得种子。

结 语

本文报道的方法，对于供试的 23 个大豆 (*G. max*) 基因型都是成功的，胚胎发生的最高诱导反应频率达 80.0% 以上。可以说它是目前大豆组织培养中再生频率最高的方案。但这并不等于说该方案已经尽善尽美，至少在以下两个方面还有待继续完善。第一是提高胚性组织的生长速率。将胚性组织在诱导培养基上继代繁殖，其生长速率极其缓慢。如果能在不影响胚胎发生的前提下，提高胚性组织的生长速率，将又是一个重大进

展。第二是提高正常体细胞胚的比率。文中已经提到,诱导产生的多数体细胞胚形态不正常,而这些形态不正常的体细胞胚不能形成完整植株。本试验最高正常胚率为25.9%,平均每个幼子叶产生的正常体细胞胚数已达2.7个。可见,继续大幅度提高植株再生频率的关键在于提高正常胚率。

参 考 文 献

- [1] Barwale, U. B., H. R. Kerns and J. M. Widholm, 1980. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. *Planta* 167: 473—481
- [2] Gamborg, O. L., B. P. Davis and R. W. Stanlihut, 1983. Somatic embryogenesis in cell cultures of *Glycine* species. *Plant Cell Rep.* 2: 209—212
- [3] Ghazi, T. D., H. V. Cheema and M. W. Nabors, 1986. Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryogenic callus of soybean, *Glycine max* L. *Plant Cell Rep.* 5: 452—456
- [4] Grant, J., 1984. Plant regeneration from cotyledonary tissue of *Glycine canescens*, a perennial wild relative of soybean. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 3: 161—173
- [5] Lazzeri, P. A., D. F. Hildebrand, and G. B. Collins, 1985. A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. *Plant Molecular Biology Rep.* 3(4): 160—167
- [6] Liopmann, B. and G. Lippmann, 1984. Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean *Glycine max* L. *Merr. Plant Cell Rep.* 3: 215—218
- [7] Phillips, G. C. and G. B. Collins, 1981. Induction and development of somatic embryos from suspension cultures of soybean. *Plant Cell Tissue organ Culture.* 1: 123—129
- [8] Ranch, J. P., L. Oglesby and A. G. Zielinski, 1985. Plant regeneration from embryo-derived tissue cultures of soybean. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 21: 653—658
- [9] Tilton, V. R. and S. H. Russell, 1934. In vitro culture of immature soybean embryos. *J. Plant Physiol.* 115: 191—200

PLANT REGENERATION FROM IMMATURE EMBRYO CULTURE OF SOYBEAN VIA SOMATIC EMBRYOGENESIS

Zhou Sijun Yin Guangchu Lei Bojun He Zhihong

(*Soybean Research Institute, Heilongjiang Academy of Agr. Sci. Harbin*)

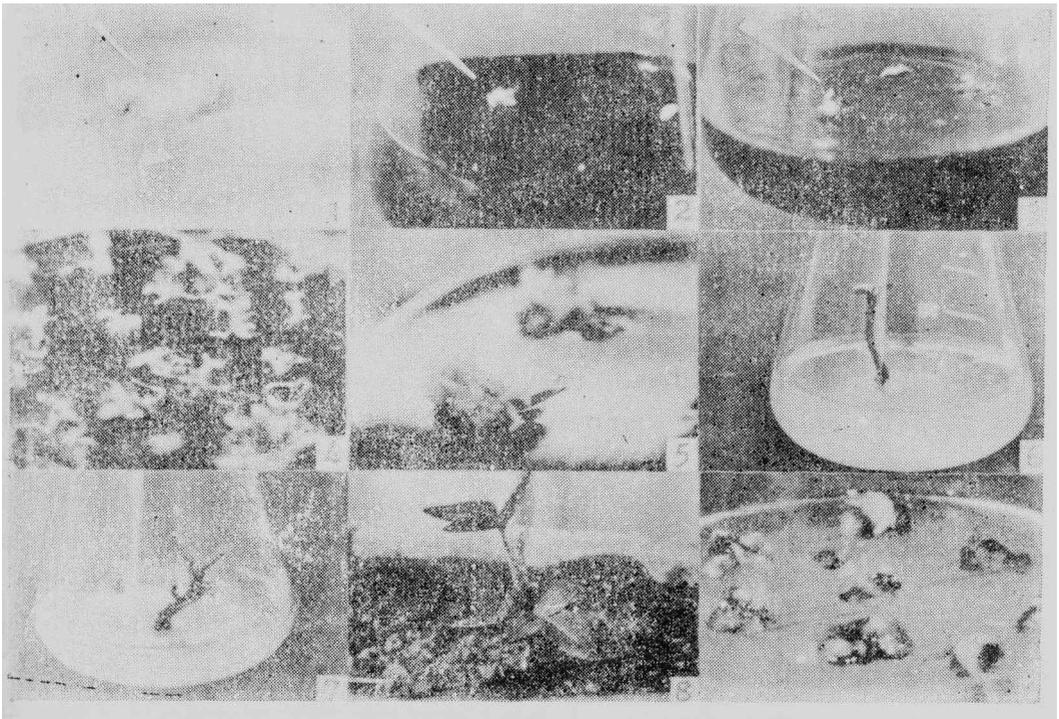
Abstract

Embryogenesis from immature embryo of soybean (*G. max*) was induced successfully by placing about 4 mm long embryos on Murashige and Skoog medium containing high concentration of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) or α -naphthleneacetic acid (NAA). 2, 4-D was significantly superior to NAA in initiation effect. The best concentration of 2, 4-D was 20 ppm. In light, the highest embryogenesis frequency induced by 2, 4-D reached to 80.0%, the largest embryogenesis efficiency was 10.32, and 2.7 normal somatic embryos was obtained on an immatural cotyledon. Dark treatment reduced embryogenesis frequency induced by 2,4-D. The embryogenesis was inhibited by cytokinin even at very low concentration. High concentration of vitamin B1 was unfavorable to the frequency of embryogenesis and its best concentration was about 0.4 ppm. In an examination of the effects of sucrose concentration, the embryogenesis frequency decreased as sucrose concentration increased from 1.5 to 9%. The somatic embryo underwent successfully stages of inducing, maturing and germinating and grew into complete plant. Seeds have been obtained by transplanting regenerated plants to soil.

Key words: Soybean; Somatic embryogenesis; Plant regeneration; Tissue culture.

图版：周思君等：从大豆幼胚诱导胚胎发生再生植株

Plates Zhou Sijun et al; Plant regeneration from immature embryo culture of soybean Via somatic embryogenesis



1. 球形体细胞胚；2. 心形体细胞胚；3. 鱼雷形体细胞胚；4—5. 成熟体细胞胚；6—7. 发芽的体细胞胚；8. 再生植株；9. 形态不正常的体细胞胚。

1. Globular embryo; 2. Heart—stage embryo; 3. Torpedo—stage embryo; 4—5. Matural embryo; 6—7. Germinated embryo; 8. Whole plant; 9. Morphologically abnormal embryo.