

大豆体细胞组织培养再生 植株的研究*

I 培养基、基因型、植物激素对诱导大豆 再生植株的影响

隋德志、王连铮、尹光初、雷勃君

(黑龙江省农业科学院大豆研究所)

提 要

本研究以野生大豆 (*Glycine soja* Sieb et Zucc.)^[1] 10品系、半野生大豆 (*Glycine gracilis* Skv.)^[1] 11品系、栽培大豆 (*Glycine max* (L.) Merrill) 46品种(系)和5个杂种后代为材料,通过组织培养方法,研究了大豆体细胞组织再生植株的主要影响因素。并以器官分化和体细胞胚两种不同方式再生完整大豆植株。

关键词: 体细胞组织培养 再生植株 愈伤组织 器官分化 体细胞无性系变异

前 言

再生植株,一直是大豆组织培养研究中一个非常重要而又未能很好解决的课题,早期研究中, Ivers, Palmer 和 Fehr (1974) 在大豆花药培养研究中获得不完整的“类胚结构”(Embryolike structure)^[9]; 尹光初等(1980)在花药培养研究中,获得具有根、茎、叶的完整大豆花粉植株 ($2n=20$)^[2]。杨振棠等(1984)在栽培大豆离体叶片培养研究中,获两株可通过有性世代的再生植株^[3]。再生植株由器官分化方式获得,但没有报告再生植株的频率。Ranch (1985) 和 Barwale, Widholm 等(1986)通过大豆幼胚培养(野生种和栽培种),以器官分化和体细胞胚两种方式再生植株,后者的再生频率为37%^[6]。但目前在半野生大豆方面还缺乏系统的研究。而且如何建立

* 本文为硕士研究生学位论文的部分结果。蒙本所资源室、原子能所大豆组提供部分材料;王立新同志参加部分工作,一并致谢。

本文于1987年9月22日收到, This paper was received on Sep. 22, 1987.

一个稳定的再生实验系统, 将是大豆细胞悬浮培养, 实现细胞水平大豆遗传操作的关键性问题。本文报导大豆体细胞组织培养经器官分化方式再生植株研究的部分结果。

基本培养基试验

一、材料和方法

野生种大豆龙79—0601, 半野生大豆龙79—3409, 栽培种大豆晋豆一号。分别取无菌苗下胚轴切段(3—4 mm)接种于下列9种培养基中: 1. G (Gautheret 1942) 2. HT (Hildbrandt 1946) 3. HE (Heller 1953) 4. N (Nitsch 1956) 5. MS (Murashige & Skoog 1962) 6. W (White 1963) 7. BL (Blaydes 1966) 8. B₅ (Gamborg 1968) 9. N₆ (N₆ 1974)

激素添加成份均为: “KT_{1.0ppm}+NAA_{0.2ppm}”, 蔗糖2%, 琼脂1%, pH调至5.8。培养基按常规消毒。接种后材料置于昼夜变温18°—25°C, 白天补充光照10小时, 室内平均光强为2500 Lux 条件下培养。

二、结果

1. 对于龙79—0601, 9种培养基中以MS、BL、B₅为佳。表现均有愈伤组织产生, 且未发生褐化、尤其MS, 成愈率最高且盛愈期来得快。详见表1。

表1 不同基本培养基的诱导反应(龙79—0601)

Table 1 The differences between basal media in callus inducing (Long 79—0601)

培养基 Media	总块数 Total of explants	始愈期 ^a Date of callus beginning	盛愈期 ^b Date of callus flourishing	成愈率 Rate of callus forming	褐化程度 ^c Degree of callus browning
W	66	0	0	0	++
HT	70	0	0	0	+
G	66	0	0	0	++
HE	71	0	0	0	++
N	68	0	0	0	0
B ₅	61	14	7	4.9	0
N ₆	73	0	0	0	++
BL	57	14	7	5.3	0
MS	66	14	6	7.6	0
\bar{X}		14	6.7	2.0	

a. “始愈期”为接种开始~出现愈伤组织的日数。

b. “盛愈期”为始愈期~旺盛产生愈伤组织的日数。愈伤组织达4—5 mm大小。

c. “褐化程度”为接种10天调查的结果。“0”为正常无褐化, “+”为轻度褐化, “++”为褐化严重。

2. 龙79—3409, 从成愈率和成愈速度看, BL., MS., B₅较好(见表2), 其余较差甚至无愈伤形成。结合愈伤组织质量, 可以认为MS是较优培养基。

3. 晋豆一号, 在所有培养基上均可成愈, 但不同培养基间差异很大(见表3)。BL培养基虽成愈率高, 但由于过早出现根分化而使整块愈伤变得粗糙而失去光泽, 失去继续分化的潜力。而MS相对较好。

表2 不同基本培养基的诱导反应(龙79—3409)

Table 2 The difference between basal media in callus inducing (Long 79—3409)

培养基 Media	总块数 Total of explants	始愈期 Date of callus begining	盛愈期 Date of callus flourishing	成愈率 Rate of callus forming	褐化程度 Degree of callus browning
W	88	0	0	0	+
HT	81	16	△	1.2	+
G	82	16	△	4.9	++
HE	80	0	0	0	++
N	95	16	3	4.2	0
B _a	81	10	2	33.3	0
N _a	84	10	3	8.3	+
BL	88	10	2	72.7	0
MS	88	6	2	35.2*	0
\bar{X}		12.6	2.4	17.7	

“△”为没有调查数据。

* 为愈伤组织质地致密, 有光泽。

表3 不同基本培养基的诱导反应(龙79—3409)

Table 3 The differences between basal media in callus inducing (Long 79—3409)

培养基 Media	总块数 Total of explants	始愈期 Date of callus begining	成愈率 Rate of callus forming	根分化* Root differentiation
W	71	10	19.7	1
HT	63	8	50.8	3
G	69	22	13.0	0
HE	68	10	27.9	0
N	65	20	13.8	2
B _a	61	8	36.1	2
N _a	59	8	59.3	2
BL	65	9	96.9	52
MS	61	7	44.9**	2
\bar{X}		11.3		

* 分化出根的愈伤块数。

** 愈伤致密, 有光泽。

基因型试验

一、材料和方法

采用野生、半野生大豆各10品系、栽培种45品种(系)共65个基因型(详见表4)。取砂培苗下胚轴切段。诱导愈伤组织的培养基为MS+2.4-D_{1.5ppm}+KT_{1.0ppm}+NAA_{0.5ppm}, 蔗糖3%, 琼脂1%, pH5.8。两周后转入再分化培养基BL+BA_{2.0ppm}+KT_{1.0ppm}+NAA_{0.5ppm}, 蔗糖3%, 琼脂1%, pH5.8。

二、结果

所有材料均产生了愈伤组织, 但不同种(变种)间形成愈伤的能力显然不同, 呈现

表4 不同基因型大豆再生能力差异
Table 4 The difference of regeneration ability among soybean genotypes

材 料 Material	总块数 Total of explants	始愈期 Date of callus beginning	成愈率 Rate of callus forming	分化愈伤数 Number of callus differentiation		
				芽 Bud	根 Root	苗 Shoot
野 生 种 <i>G. soja</i>	龙79-0602-1 Long 79-0602-1	84	8	54.8		
	龙79-0601 Long 79-0616	84	8	67.9		
	龙79-0616 Long 79-0616	82	5	64.6		
	龙79-3311 Long 793311	157	9	56.7		4
	龙79-0606-1 Long 79-0606-1	45	9	100		
	龙79-5404 Long 79-5404	149	8	91.9		7
	龙79-5403 Long 79-5403	111	8	68.5		
	龙79-4502 Long 79-4502	130	5	100		14
龙81-5401 Long 81-5401	94	9	77.7			
逊克野生豆 Xunke <i>G. soja</i>	153	5(7.4) ^b	100(78.2)	1		
野 生 变 种 <i>G. gracilis</i>	龙79-1802 Long 79-1802	88	4	80.7		
	龙79-0701 Long 79-0701	114	4	95.6		
	龙79-3409 Long 79-3409	73	8	87.7		
	龙79-4204 Long 79-4204	125	7	86.4		1
	龙79-3433-4 Long 79-3433-4	178	5	79.2		
	龙79-1401 Long 79-1401	85	10	83.5		1
	龙79-3433 Long 79-3433	77	9	100	3	
	龙79-3407-1 Long 79-3407-1	70	5	90.0		
龙80-4703 Long 80-4703	63	3	68.3			
龙80-2706 Long 80-2706	220	9(6.4)	91.8(86.3)			
裁 培 种 <i>G. max</i>	黑农10 Heinong 10	94	6	84.0		
	黑农16 Heinong 16	73	6	84.0		
	黑农17 Heinong 17	100	7	87.0		
	黑农19 Heinong 19	74	6	97.3		
	黑农21 Heinong 21	92	7	87.0		
	黑农26 Heinong 26	94	5	100		
	龙辐80-8431 Longfu 80-3431	85	5	98.8		
79-9440	68	5	98.5			
6296-3	49	5	91.8			
6502	72	5	75.0			

Table 4 continue

	材 料 Material		总块数 Total of explants	始愈期 Date of callus beginning	成愈率 Rate of callus forming	分化愈伤数 ^a Number of callus differentiation		
						芽 Bud	根 Root	苗 Shoot
栽 培 种 G. max	东农4号	Dongnong 4	69	6	95.7			
	东农36	Dongnong 36	149	8	94.6			
	赫尔松	Halsou	53	6	94.3			
	塞凯	Saikai	61	6	100			
	北满217	Beiman 217	69	6	92.8			
	四粒黄	Silihuang	35	7	37.1			
	国育	Guoyu	58	5	98.6			
	吉林3号	Jilin 3	70	5	84.3			
	吉林15	Jilin 15	60	7	70.0			
	九农7号	Jiunong 7	42	6	81.0			
	九农9号	Jiunong 9	69	5	94.2			
	九农11号	Jiunong 11	76	4	86.8			
	晋豆1号	Jindou 1	87	5	65.5			
	绥农3号	Suinong 3	110	5	82.7			
	嫩丰7号	Nenfeng 7	91	7	92.3			
	合丰15	Hefeng 15	63	7	98.4			
	合丰22	Hefeng 22	62	7	85.5			
	合丰23	Hefeng 23	80	6	96.3			
	合丰77—1235	Hefeng 77—1235	69	5	98.6			
	哈尔滨小黑豆	Harbin xiaohaidou	118	7	84.5			
	应县小黑豆	Yingxianxiaohaidou	87	4	98.9			
	丰收13	Fengshou 13	62	7	98.4			
	黑农18	Heinong 18	—	—	— ^c			
	水里站	Shuilizhang	69	5	89.9			
	小粒黄	Xiaolihuang	69	4	100			
	小金黄	Xiaojinhuang	70	5	85.7			
	青豆	Qingdou	63	7	100			
	绥农4号	Suinong 4	63	7 (5.9)	77.8 (89.9)			

- a. “芽、根”指愈伤组织通过再分化过程而发育成的芽和根; “苗”则指兼具芽和根的完整植株。上述结构出现任何一种, 就称之分化。以分化所在愈伤为单位计数。
- b. 指括号内数据为种(变种)的平均数。
- c. 为黑农18号因污染严重而无数据。

由野生种(78.2)→半野生种(86.3)→栽培种(89.9)的上升趋势。平均始愈速度也在加快:野生种(7.4天)→半野生种(6.4天)→栽培种(5.9天)。种(变种)内不同基因型间也表现出一定差异(表4)。

以再分化培养基 $BL + BA_{2.0_{ppm}} + KT_{1.0_{ppm}} + NAA_{0.5_{ppm}}$ 继代后,部分基因型出现了器官分化,产生了少量的芽和根(见图版 I-1)。从不同基因型的分化能力来看,以野生变种大豆的龙79-3433最强(主要从分化芽着眼)。

植物激素试验

一、材料和方法

采用8种植物激素各5水平,在MS基本培养基上,培养野生变种大豆龙79-3433下胚轴切段。

二、结果

从激素的单一效果来看,生长素类的 $2.4-D_{0.5-10.0_{ppm}}$ 对愈伤组织的诱导效果较好。 $IAA_{2.0-10.0_{ppm}}$ 和 $IBA_{0.2-2.0_{ppm}}$ 对诱导根分化效果较好。分裂素类的KT1.0和 $BA_{1.0_{ppm}}$ 对芽分化有利。其他种类和浓度均一般。

凡出现芽分化者,均转入 $MS + IAA_{2.0} + V_{015.0} + V_{P55.0} + V_{T65.0} + 丝氨酸_{5.0_{ppm}}$ 培养基中生根。结果只有来自 $BA_{1.0}$ 和 $KT_{1.0}$ 两个处理的芽能够进一步生根成苗(见表5)。

最后,选用 $MS + 2.4-D_{5.0} + KT_{1.0_{ppm}}$ 的激素配比,做为诱导愈伤组织的培养基,得到了较满意的结果。表现为愈伤组织致密,有光泽(见图版 I-3)。然后去掉2.4-D,转移到 $MS + KT_{1.0} + NAA_{0.2_{ppm}}$ 培养基上再分化,两周以后愈伤组织通过再分化,产生芽的突起(见图版 I-4)。并进一步发育出叶,抽茎(见图版 I-5)。最后转至 $BL + IBA_{0.6_{ppm}}$ 培养基上,两周后生根,再生出完整再生植株(见图版 I-6)。自接种培养不到两个月时间,再生植株即在试管内孕蕾并开花(见图版 I-7)。

在 $MS + 2.4-D_{5.0} + KT_{1.0_{ppm}}$ 及以后的培养程序中,根分化达30%,芽分化达11.4%,有75%的芽进一步生根而形成完整植株。

讨 论

1. 从诱导愈伤组织的快慢、质量和成愈率来看,MS在所有9种基本培养基中居首,说明基本培养基的选择是个值得注意的问题。

2. Barwale等(1986)在培养大豆子叶节切段研究中认为,具有相似遗传背景的大豆基因型,具有相似的再生能力^[5],形成丛生苗(Multiple shoot formation)的再生反应受遗传控制。我们从基因型试验可以得到另一结论,就是不同遗传背景的大豆基因型产生愈伤组织的能力不同。遗传进化程度高的种(变种)容易诱导产生愈伤组织,

表5 不同植物激素的诱导效果
Table 5 Inducing effect of different kinds of phytohormone

种类和浓度*	总块数	成愈率	分化愈伤数			种类和浓度	总块数	成愈率	分化愈伤数						
			Num. of callus differentiation						Num. of callus differentiation						
			芽	根	苗				芽	根	苗				
Kind and concentration	Total of explants	Rate of callus forming	Bud	Root	Shoot	Kind and concentration	Total of explants	Rate of callus forming	Bud	Root	Shoot				
分	KT	0.1	70	54.3	1	生	2.4-D	0.01	77	100		14			
		0.5	63	70.6	1			1	0.1	77	90.9		11		
		1.0	69	60.9	4			6	4	0.5	56	100			
		5.0	77	54.5						1.0	63	100			
		10.0	69	26.1						10.0	70	100			
裂	BA	0.1	76	68.4		长	IAA	0.02	77	54.5		2			
		0.5	77	68.8	1				0.1	63	50.8				
		1.0	97	94.8	1			2	1	0.2	84	75.0	2	3	
		5.0	77	72.7	1					2.0	77	62.3		15	
		10.0	77	81.8						10.0	77	87.0		31	
素	ZT	0.1	70	95.7		素	IBA	0.02	70	81.4		2			
		0.5	63	100					0.1	77	84.4		20		
		1.0	77	100				1		0.2	77	93.5		19	
		5.0	63	100						2.0	56	91.1		36	
		10.0	49	100						10.0	63	100		14	
类	Ad	0.1	70	90.0		类	NAA	0.02	77	40.3					
		1.0	70	92.9					0.1	77	57.1		1		
		10	70	91.4					0.2	105	53.3	1			
		100	70	74.3					2.0	92	50.0	1			
		1000	70	0						10.0	85	80.0		2	
Cytokinin	Ad	0.1	70	90.0		Auxin	2.4-D _{5.0} +KT _{1.0}	配比	170	100	8	21	6		
		1.0	70	92.9											
		10	70	91.4											
		100	70	74.3											
		1000	70	0											
空白	71	0													

* 表中激素单位均为 ppm

3. 不同种类植物激素配比明显优于单一使用，从愈伤质量和分化潜力看更是如此。以前曾有一次培养直接成苗的报导，但从我们的试验看，一次培养不做继代，很难经愈伤组织分化出完整再生植株，因此及时改变培养基配方，多次继代是必要的。

结 语

本文研究了不同基本培养基和不同基因型对大豆亚属愈伤组织的诱导和再分化的影响，并研究了不同植物激素在大豆经器官分化方式再生植株过程中的单独作用和配合作

用。

建立了较适于大豆再生植株的培养基，并获得野生变种大豆的再生植株。野生变种大豆再生植株，国内外尚未见报导。这对充分利用大豆野生资源，开展大豆体细胞无性系变异等研究，是很有意义的。

参 考 文 献

- [1] 王连铮等：1983，黑龙江省野生大豆的考察和研究，植物研究，3(3)，116—130。
- [2] 尹光初等：1980，大豆花药培养的研究；科学通报，18：864。
- [3] 杨振棠等：1984，大豆叶片的离体培养及再生植株的诱导；科学通报，16：1012—1016。
- [4] 隋德志、王连铮、尹光初：1987，大豆幼胚培养经体细胞胚再生植株；科学通报，21：1679。
- [5] Barwale, U. B., Meyer, M. Lr. and L. M. Widholm, 1986, Screening of *Glycine max* and *Glycine soja* genotypes for multiple shoot formation at the cotyledonary node; Theor. Appl. Genet., 72: 423—428.
- [6] Barwale, U. S., H. R. Kerns, and J. M. Widholm, 1986, Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis; Planta, 167: 473—481.
- [7] Beverstorf, W. D. and E. T. Binham, 1977, Degrees of differentiation obtained in tissue cultures of *Glycine* species; Crop Science; Vol. 17, March-April, 307—311.
- [8] Gamborg, O. L.; Miller, R. A.; Ojima, K.; 1968, Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells; Exp. Cell Res., 50: 151—158.
- [9] Ivers, D. R.; R. G. Palmer, and W. R. Fehr; 1974, Anther culture in soybeans; Crop Science, Vol. 14, November-December, 891—893.

A STUDY OF SOYBEAN PLANT REGENERATION VIA SOMATIC TISSUE CULTURES

Sui Dezhi Wang Lianzheng Yin Guangchu Lie Bojun
(Soybean Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Science)

Abstract

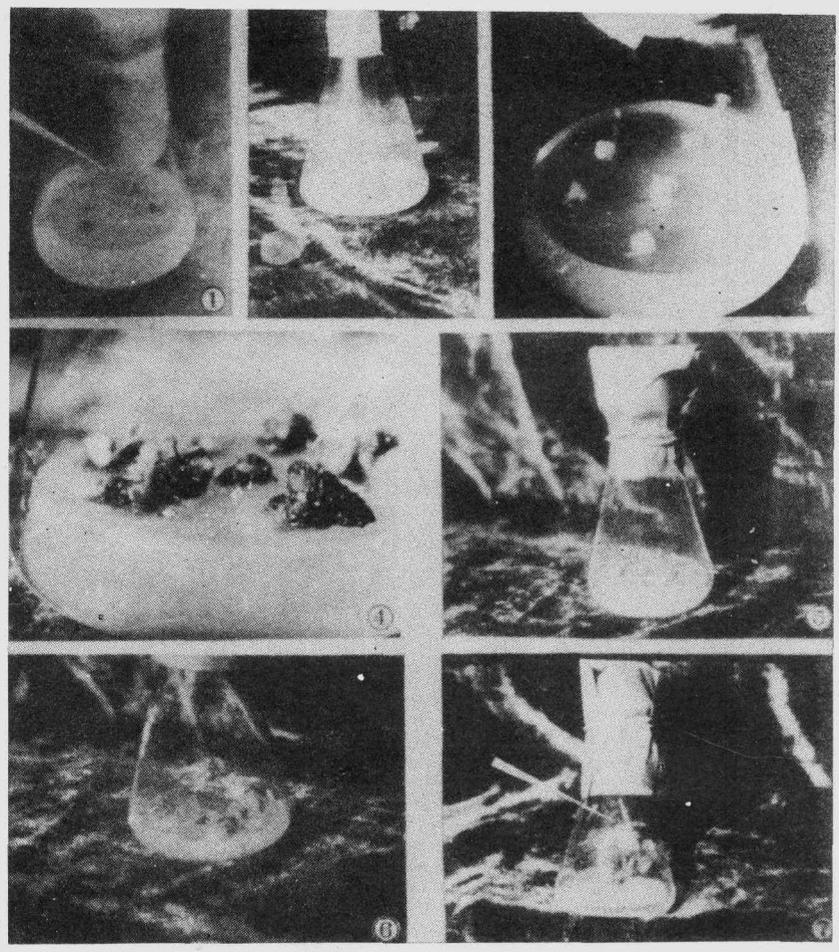
The studies of soybean regeneration plant via callus cultures from a wild variety (*Glycine gracilis* Skv.) is reported here. The main factors which influence organogenesis are also discussed in this paper. They are the basal media, genotypes and phytohormone. The regeneration plants could be produced from this wild sub-variety through organogenesis by culturing on a series of appropriate media. MS+2,4-D 5.0 ppm+kinetin 1.0 ppm was an effective medium in inducing qualified calluses.

A series of appropriate media in plant regeneration were founded and the regeneration plants were obtained. According to the information available now, the study of soybean regeneration plants from *G. gracilis* Skv. has not yet been reported before this.

Key words: Somatic tissue culture Regeneration plants Callus
Organ differentiation Somatic clonal variation

隋德志等：器官分化方式再生大豆植株

Soybean regeneration plants through organogenesis



1. 野生变种大豆龙79-3133, 下胚轴愈伤组织上分化芽的突起
2. 先分化根的愈伤, 没有再分化出芽
3. 龙79-3133, 下胚轴愈伤组织始愈期
4. 愈伤通过再分化, 产生芽的突起
5. 幼芽进一步发育, 出叶, 抽茎
6. 小植株生根, 长高
7. 再生植株在试管中孕蕾

Fig. 1 Long 79-3133, bud formation of callus from hypocotyl tissue cultures

Fig. 2 Callus with roots formed without bud

Fig. 3 Long 79-3133, status of callus beginning from hypocotyl tissue

Fig. 4 Bud regeneration through redifferentiation

Fig. 5 Young shoots developing, leaving out, stemming

Fig. 6 Young plant is developing root and growing high

Fig. 7 Blooming in the tube of regeneration plant