

大豆 (*Glycine max*) 原生质体 培养与分化

罗希明 赵桂兰

(吉林省农业科学院大豆研究所)

安利佳 何孟元 郝 水

(东北师范大学生物系)

摘 要

试验 56 份大豆栽培品种。采用幼荚子叶、无菌苗下胚轴和子叶、幼胚悬浮培养细胞作原生质体游离材料。苗期子叶和下胚轴用酶液: 1% Hemicellulase HP150, 0.4% Cellulase R-10, 0.1% Pectolyase Y-23; 幼荚子叶用 1% Cellulase R-10, 1% Hemicellulase HP150, 0.5% Pectinase; 悬浮培养细胞用 1% Cellulase R-10, 0.2% Pectolyase Y-23, 2% Driselase 游离, 4 种材料均获得大量原生质体。原生质体培养基均为 K8P, 分化培养基为 MS、B5, 培养基中的激素试用了 2,4-D, 2,4,5-T, NAAIAA、ZT、KT、BA、zip 和毒莠定等不同配合和浓度。结果有 12 份品种的幼荚子叶、下胚轴和苗期子叶的原生质体形成愈伤组织、有不同类型的根分化和绿点出现, 分化培养基 F5 + 0.1-0.2mg/l 2,4,5-T + 1-1.5mg/l · BA 较好。

目前, 大豆原生质体培养的研究, 一些学者作了大量工作。已从根、叶、荚、悬浮培养细胞和子叶等游离出大量原生质体, 并获得愈伤组织^[1-10], 但是迄今为止未见国内外有再生植株的正式报道。本文简要报道大豆原生质体培养获得愈伤组织并有根的分化和绿点出现的结果。

试验了 56 份来自吉林省农业科学院大豆研究所的大豆品种。采用幼荚子叶、无菌苗下胚轴(暗处生长)和苗期子叶(光下生长、12小时), 幼胚悬浮培养细胞作原生质体游离材料。将子叶和下胚轴切成小片和小块, 分别放在 CPW 13M^[2]中质壁分离 1 小时, 再换入酶液中游离, 苗期子叶和下胚轴用酶液 EM7^[2]; 幼荚子叶用 1% Cellulase

本文于1988年2月1日收到。

This paper was received on Feb. 1, 1988.

R-10, 1 % Hemicellulase HP 150, 0.5 %, Pectinase 游离; 悬浮培养细胞直接放入 1 %, Cellulase, R-10, 0.2 %, Pectolyase, Y-23, 2 % Driselase 中游离。这 4 种材料均获得大量原生质体, 用 K8P (Kao, 1978) 培养基冲洗离心收集后, 以 $1 \times 10^3 \sim 4$ 个/ml 的密度悬滴培养在培养皿中。每过 7 天加入新鲜培养基, 并逐步降低渗透压。第 3—4 天均见再生细胞第一次分裂 (图 2), 第 7 天第二次分裂 (图 3), 20 天以后均见细胞团, 细胞团中的细胞为圆形和椭圆形 (图 5)。一个月后, 其中有 12 个品种的幼荚子叶、下胚轴和苗期子叶原生质体形成肉眼可见的小块愈伤组织 (图 6), 镜下观察到有密集的分生区, 可能为胚性愈伤组织。将小块愈伤组织转入固体 K627-1 (Kao, 1978), 培养基中, 一个月后形成大块愈伤组织, 然后将这些愈伤组织转入分化培养基中诱导分化。基本培养基用 MS, B5 其中的激素试用了生长素: 2,4-D、2,4,5-T、NAA、IAA; 分裂素: BA、KT、ZT; 还试用了 zip 和毒莠定 (Picloram) 等。分别试验了生长素和分裂素的不同配合和浓度, 选用了 110 余种组合。目前已见根的分化, 根有两种类型: 一种与正常田间植株的根形状相同 (图 8), 另一种为细小、白色带有许多细根毛的类型。形成的愈伤组织各异, 其中有一种由许多小颗粒组成的愈伤组织 (图 7), 类似胚状体, 还有待于作组织切片观察确定, 颜色为浅褐、黄白、浅绿相间。我们认为这种愈伤组织有分化出芽的可能性, 目前正进行分化芽的研究, 试验结果见表 1。

表 1 不同外植体原生质体游离和培养的情况

Table 1 The case on isolation and culture of protoplasts from different explants

外植体 Explants	原生质体产量*% Yield of protoplast* %	多细胞团 The cell colonies	愈伤组织 Callus	分化 Differentiation 根 绿点 Root Green point
下胚轴 Hypocotyl	95	+	+	+
幼子叶 Young cotyledon	95	+	+	+
苗期子叶 Cotyledon of seedling	90	+	+	-
悬浮培养细胞 Suspension culture cell	90	+	-	-
+ 成功 + success - 未成功 - no success * 原生质体/细胞 + 原生质体 × % * protoplasts/cells + protoplasts × %.				

从试用的激素来看, 2,4,5-T (0.1—0.25mg/l) 与 BA (1—1.5mg/l) 的配合较

好, 能形成上述形态较好的颗粒状结构的愈伤组织, 有根的分化和绿点出现。在 K627—1 (加1000mg/l肌醇) 培养基中(固体)有细根分化。

从所试用的基因型来看, 56份中有12份获得愈伤组织, 基因型间的差异较大, 初步的试验结果表明, 能很快得到大量形态较好的愈伤组织的品种大多是抗病虫害的品种。

从选用外植体的试验结果看, 幼荚子叶、苗期子叶和下胚轴的原生质体得到愈伤组织, 而幼胚悬浮培养细胞原生质体, 目前只得到细胞团。

本研究试验了大量的大豆基型, 在诱导愈伤组织分化的过程中, 筛选了大量不同激素配合和浓度的培养基, 结果未见芽的分化, 只有根和绿点出现, 我们正在探索分化芽的条件。

参 考 文 献

- [1] 许智宏等, 1984, 中国科学 (B辑), (11): 1012—1018.
- [2] 吕德杨, 1985, 遗传 (7): 9—11.
- [3] 简玉瑜, 1983, 大豆科学, 2 (2): 9—11.
- [4] Bharal S. et al., 1979, Z. Pflanzenphysiol 92: 443—448.
- [5] Chowhury V. K. et al., 1985, Plant Cell Reports, 4: 289—292
- [6] David M. T. et al., 1986, Plant Cell Reports. 5: 334—337.
- [7] Gamborg O. L. et al., 1983, Plant Cell Reports, 2: 213—215.
- [8] Kao K. N. et al., 1981, In Vitro. 17: 645—648.
- [9] Xu Z. H. et al., Pl. Sci. Lett. 24: 111—115.
- [10] Zieg R. G. et al., 1980, Pl. Sci Lett. 18: 105—114.

CULTURE AND DIFFERENTIATION OF PROTOPLASTS IN SOYBEAN (*GLYCINE MAX*)

Luo Ximing Zhao Guilan

(Institute of Soybean, Jilin Academy of Agricultural Sciences)

An Lijia He Mengyuan Hao Shui

(Department of Biology, Northeast Normal University)

Abstract

56 soybean (*Glycine max*) cultivars were tested. Cotyledon of young pod, hypocotyl and cotyledon of aseptic seedlings, and suspension culture cells from young embryo were taken for materials of protoplast isola-

tion. The enzyme solutions isolated hypocotyls and cotyledons of aseptic seedlings were 1% Hemicellulase HP 150, 0.4% cellulase Onozuka R-10, 0.1% Pectolyase Y-23; the enzyme solution isolated cotyledons of young pods was 1% Cellulase Onozuka R-10, 1% Hemicellulase HP 150, 0.5% Pectinase; the enzyme solution isolated suspension culture cells from young embryos was 1% Cellulase Onozuka R-10, 0.2% Pectolyase Y-23, 2% Driselase. The protoplast medium was K8P. The differentiation medium were MS and B5, in which hormones 2,4-D, 2,4,5-T, NAA, IAA, ZT, KT, BA, zip and picloram were tested. Protoplasts from young pod cotyledons and hypocotyls in 12 soybean cultivars formed calli, and different type roots were differentiated and green points were appeared on some calli. The differentiation media B5+0.1-0.2mg/l 2,4,5-T+1-1.5mg/l BA were the best.

图版说明

- 图1. 游离的大豆子叶原生质体。×400
图2. 再生细胞的第一次分裂。×400
图3. 再生细胞的第二次分裂。×400
图4. 再生细胞的第三次分裂。×400
图5. 多细胞团。×200
图6. 培养皿中的小块愈伤组织。
图7. 大块愈伤组织, 上面有绿点和颗粒状结构。
图8. 根的分化。

Explanation of Plates

- Fig. 1. Protoplasts from cotyledon of soybean. ×400.
Fig. 2. The first division of regenerated cells. ×400.
Fig. 3. The second division of regenerated cells. ×400.
Fig. 4. The third division of regenerated cells. ×400.
Fig. 5. The cell colony. ×200.
Fig. 6. The calli of small size in the cultural dish.
Fig. 7. The callus of big size, there were green points and particulate structure on it.
Fig. 8. Differentiation of roots.

罗希明等：大豆 (*Glycine max*) 原生质体培养与分化

Luo Ximing et al.: Culture and differentiation of protoplasts in
soybean (*Glycine max*)

图版 I

Plate I

