

从大豆幼胚诱导器官发生再生植株*

周思君 尹光初 雷勃钧
何志鸿 卢翠华 张开旺 钱 华

(黑龙江省农业科学院大豆研究所)

摘 要

采用MSO培养基诱导了大豆(*G. max* L.)幼胚的器官(不定芽)发生,最高诱导频率达90%。再生植株移入土壤已经获得种子。诱导器官发生的适宜幼胚长度为5~6mm。提高培养基中微量元素的浓度能大幅度地提高诱导频率,但并非所有微量元素都需要高浓度。被试的所有基因型表现了基本相似的反应。再生培养物可保持一年以上而不丧失植株再生能力。

关键词 大豆;组织培养;再生植株

近年来,大豆体细胞再生的研究获得了突破性进展^[1-7],但研究多集中于从大豆幼胚诱导体细胞胚胎发生,对于器官发生的研究较少。胚胎发生的诱导频率虽然很高,但对体细胞胚发育中的一些问题尚未能很好解决。我们在成功地诱导大豆幼胚的体细胞胚胎发生^[1]后,又对器官发生进行了研究。皆能使大豆体细胞无性系变异与利用、及突变体筛选和遗传转化有较理想的再生体系,应用于大豆育种实践。

材 料 和 方 法

从生长的大豆植株上摘取含适宜长度幼胚的豆荚,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。将整个幼胚接种于诱

* 王树林、李兴滨、张晓梦等参加部分工作,谨此致谢。

本文于1989年6月22日收到。

This paper was received on June 22, 1989.

导培养基上。诱导培养 4 周后调查反应频率。

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 $0.9-1.1\text{ kg/cm}^2$ 压力下热压蒸气灭菌 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 1500Lux,在此期间温度控制在 26°C 。夜间温度控制在 18°C 。黑暗培养在同一培养室的密闭木柜中进行。

培养程序:诱导产生不定芽→分化抽茎→诱导生根。

结果与讨论

一、诱导培养

诱导器官发生的培养基为:MS 大量元素+4 倍的 MS 微量元素+6BA3ppm + NAA 0.05ppm。代号为 MSO。其它诱导培养基都是在此基础上作变动。MSO 培养基诱导器官发生的效果很好,不定芽主要发生于上胚轴和子叶基部,有时也在子叶的另一端或中部发生

(图版 1)。将有分化能力的组织在降低 6BA 和微量元素浓度的培养基上继代繁殖,其再生能力可保持一年以上。

1. 幼胚长度对器官发生频率的影响

与胚胎发生一样,器官发生也有一个最适宜的幼胚长度(图 1)。

从图 1 可见,诱导器官发生的适宜幼胚长度为 5—6mm,比诱导胚胎发生的适宜幼胚长度(4mm)略大一些。

2. 6BA 浓度对器官发生频率的影响

将 MSO 培养基中的 6BA 浓度变动在 1—5ppm 之间,以黑河 3 号为基因型材料,研究了从大豆未成熟胚诱导器官发生的适宜 6BA 浓度(表 1)。

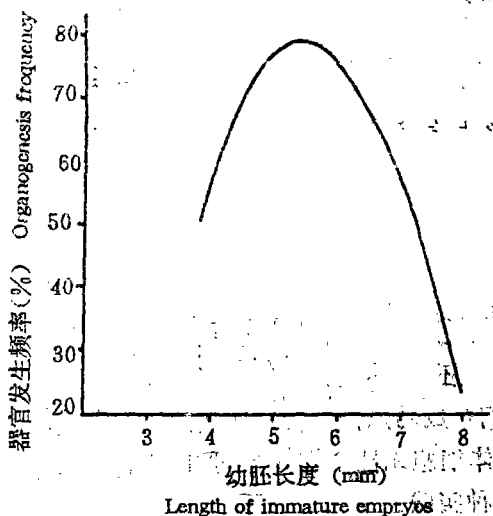


图 1 幼胚长度对器官发生频率的影响

Fig. 1 Effect of length of immature embryo on organogenesis

结果表明,诱导器官发生的适宜 6BA 浓度为 3ppm。6BA 浓度降低或升高都使反应频率大幅度下降。从愈伤组织的表型看,随 6BA 浓度的增加,愈伤组织生长加快,颜色逐渐变黑。

3. 微量元素倍数对器官发生频率的影响

Barwaie 等(1986)将 MS 培养基中的所有微量元素的浓度提高到 4—5 倍,使器官发生频率明显提高。为了明确适宜的微量元素倍数,我们将 MSO 培养基中的微量元素倍数变动在 1—5 之间,比较了它们的诱导反应频率(表 2)。

表 1 6BA 浓度对器官发生频率的影响*

Table 1 Effect of 6BA concentrations on organogenesis *

6BA 浓度(ppm) BA(ppm)	外植体总数 Number of explants	器官发生频率(%) Organogenesis(%)
1	64	14.1
3	58	68.8
5	55	10.9

* 基本培养基为 MSO, 基因型为黑河 3 号。

* Basic medium was MSO. Genotype was Heihe 3.

表 2 微量元素倍数对器官发生频率的影响

Table 2 Effect of relative concentrations of microelements on organogenesis

微量元素倍数 Relative concentration of microelements	8215		伊利诺斯 Illinois		平均 Mean
	外植体总数 Number of explants	器官发生(%) Organogenesis (%)	外植体总数 Number of explants	器官发生(%) Organogenesis (%)	器官发生(%) Organogenesis (%)
1	40	7.5	20	10.0	8.8
2	50	36.0	20	50.0	40.3
3	50	54.0	20	80.0	65.0
4	40	62.5	20	65.0	63.8
5	50	32.0	20	35.0	33.5

从表中看出,适宜的微量元素倍数在 3—4 之间。在试验中观察到高倍数的微量元素使愈伤组织变成黑褐色,生长速度降低。至于高浓度微量元素提高器官发生频率的机制尚待研究。

4. 单一微量元素及光、暗处理对器官发生频率的影响

高浓度的微量元素大幅度地提高大豆幼胚器官发生的频率,但是否所有微量元素都需要高浓度? 那些元素作用最大? 为此,进行了如下试验:分别将 MSO 培养基中的某一种微量元素的浓度降至正常水平,其它微量元素的浓度仍保持 4 倍浓度。以 MSO 为对照,共 9 个处理。以黑河 3 号大豆品种为材料,分别在光照和黑暗条件下比较了 9 个处理的器官发生频率(表 3)。

从表 3 可归纳出以下几点:

(1)光照条件下的器官发生频率高于黑暗处理。黑暗处理不定芽可发生于子叶基部和上胚轴,也在子叶末端和中部发生;光照条件下,不定芽只发生于子叶基部和上胚轴。

(2)光照条件下 Fe 和 Zn 浓度降低使器官发生频率急剧下降;Co 浓度降至正常反而使诱导频率略有升高;Mn 浓度降低对诱导频率无影响;其它元素的影响较小。

(3)黑暗处理中,Mn、Co、Zn 三个元素浓度降低对诱导频率影响最大;I、Cu、B 次之。可以看出,在黑暗条件下要求高浓度微量元素的范围较广。Fe 和 Mn 浓度降至正常诱导频率上升。

表3 单一微量元素及光暗处理对器官发生频率的影响

Table 3 Effect of single microelement under light or dark condition on organogenesis

降至正常浓度的 微量元素 ^a Microelement lowered to normal concentration	光 Light		暗 Dark	
	外植体总数 Number of explants	器官发生(%) Organogenesis (%)	外植体总数 Number of explants	器官发生(%) Organogenesis (%)
CK ^b	26	80.8	28	53.6
Fe	28	7.1	28	67.9 ^c
Mn	26	80.8	27	11.1 ^c
I	25	72.0	25	24.0 ^c
Co	20	90.0	26	11.5
Zn	25	20.0	26	11.5
Cu	27	77.8	27	33.3 ^c
B	29	75.9	23	31.8
Mo	26	37.1	28	57.9
平均		64.2		33.6

a. 其它微量元素保持4倍浓度。

Other micro elements maintained of fold concentration.

b. 所有微量元素保持4倍浓度。

All micro elements maintained at 4-fold concentration.

c. 在子叶末端或中部有不定芽发生。

Organogenesis was observed at end or middle part of cotyledons

(4) Fe 和 Co 在光、暗两个处理中表现正好相反:在光下要求高浓度的 Fe、低浓度的 Co;而在黑暗下要求高浓度的 Co、低浓度的 Fe。Zn 在光、暗两个处理中表现一致:浓度降低诱导频率下降。

这些结果表明,诱导大豆幼胚器官发生,并非要求所有的微量元素浓度都提高。个别微量元素浓度提高反而使诱导频率下降,有的微量元素浓度变化对诱导频率影响不大,没有必要增加浓度。至于光、暗处理中微量元素反应的差异,可能是由于光、暗条件下细胞和组织在代谢、生理、生化等方面的差异所致。

在以前的植物组织培养研究中,微量元素的浓度及其与形态发生的关系很少有过研究。本研究的结果,为大豆和其它作物的组织培养研究提出了新的课题。

二、分化培养

大豆幼胚在 MSO 培养基上诱导形成丛生的不定芽,要使这些不定芽发育成植株,需要将其转移到分化培养基上进行分化抽茎(图版 2)。对分化培养基的要求是能使芽群中的部分不定芽抽茎,愈伤组织生长不过快,以免“吞食”不定芽。为达此目的,共设计了 7 种分化培养基,其效果如表 4 所示。

从表 4 看出,为了使不定芽生长发育和抽茎,并适当控制愈伤组织的生长速度,培养

基中需要加入赤霉素。不含赤霉素的培养基都不能使不定芽抽茎,而且(除很低的生长素

表4 不同分化培养基的效果比较

Table 4 Comparison of effects of various differentiation mediums

培养基成分(ppm) Composition of media (ppm)	分化效果 Differentiation effects
MS+6BA0.5+IBA0.05	不抽茎,愈伤组织生长慢 No stemming, callus growing slow
MS+6BA1.0+NAA0.5	不抽茎,愈伤组织生长快 No stemming, callus growing fast
MS+6BA0.2+IBA2.0	不抽茎,愈伤组织生长很快 No stemming, callus growing very fast
MS+6BA1.0+IBA2.0+GA0.1	不抽茎,愈伤组织生长快 No stemming, callus growing fast
MS+6BA0.2+IBA2.0+GA0.5	部分抽茎,愈伤组织生长慢 Some stemming, callus growing slow
MS+6BA0.5+IBA1.0+GA1.0	部分抽茎,愈伤组织生长慢 Some stemming, callus growing slow
MS+6BA1.0+IBA2.0+GA1.5	部分抽茎,愈伤组织生长慢,苗发黄 Some stemming, callus growing slow, plants appearing yellowish

浓度外)都使愈伤组织生长过快。赤霉素的适宜浓度是0.5~1.0ppm。低于0.5ppm,达不到抽茎和抑制愈伤组织的目的。高于1.0ppm,使小苗发黄。

三、诱导生根

当小苗在分化培养基上长到2cm高左右时,将其转移到生根培养基上进行诱导生根(图版3)。生根培养基采用蔗糖浓度降低为2%的MS或B₅培养基。为使小苗快速、高频率的生根,培养基中需要加入生长素(IBA)。0.1~5ppm的IBA都能诱导小苗生根,但小植株的基部往往形成愈伤组织,使成活率下降。附加0.1ppm的赤霉素能有效地抑制愈伤组织的形成。

结 语

采用本文报道的方法,欲试的9个大豆基因型都能成功地被诱导产生不定芽并形成完整植株。诱导反应频率高达90%。再生植株移入土壤已经获得种子。该再生体系结果稳定、程序比较简单,在诱导频率和再生能力的保持等方面均已达到实际应用的要求。今后,我们将对其再生植株后代的变异性进行研究,逐步将该技术应用于大豆育种实践,并在实践中继续完善。

参考文献

- [1] 周思君等, 1989, 从大豆幼胚诱导胚胎发生再生植株. 大豆科学, 8(1): 39—45
- [2] Barwale, U. B., 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
- [3] Ghazi, T. D., H. V. Cneema 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] 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
- [5] Lippmann, B. and G. Lippmann, 1984. Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean, *Glycine max* L. Merr. *Plant Cell Rep.* 3: 215—218
- [6] 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
- [7] Tilton, V. R. and S. A. Russell, 1984. *In Vitro* Culture of immature soybean embryos. *J. Plant Physiol.* 115: 191—200

PLANT REGENERATION FROM IMMATURE EMBRYO CULTURE
OF SOYBEAN VIA ORGANOGENESIS

Zhou Sijun Yin Guangchu Lei Bojun He Zhihong Lu Cuihua
Zhang Kaiwang Qian Hua

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

Abstract

Using medium containing 3 ppm 6—benzylaminopurine, 0.05 ppm α —naphthaleneacetic acid and 3—4 times the normal concentration of MS minor salts, organogenesis from immature embryos of soybean (*Glycine max*) was induced successfully. The highest organogenesis frequency reached to 90% and seeds have been obtained by transplanting regenerated plants to soil.

Both increasing and decreasing concentration of 6—benzylaminopurine reduced the frequency obviously. The best length of immature embryo for organogenesis was 5—6 mm. Genotypic variation in the frequency of organogenesis was noted. However, organogenesis was induced from all tested genotypes.

High concentration of minor salts played a great part in enhancing frequency of organogenesis, but not all minor salts were needed in high concentrations. When concentration was in-

