

大豆原生质体培养经胚胎发生 高频率再生植株*

肖文言 王连铮

(中国农业科学院)

大豆原生质体培养诱导再生植株一直为国内外学者所关注。如 Kao(1970)^[1]和 Miller等(1971)^[2]从悬浮培养的大豆细胞分离出原生质体,经培养获得了愈伤组织。但在以后的多年中进展不够大。据报道,已从幼荚子叶^[3,4,5]、幼苗根^[6,11]、叶肉组织^[9,9,10,11]和悬浮培养细胞^[2]等外植体游离出原生质体,经培养获得愈伤组织,并进行了大量的分化研究,但最终都未能得到再生植株。卫志明和许智宏^[12,13,14,15]于1988年首次由大豆幼荚子叶分离出原生质体,经培养形成再生植株。罗希明等(1990)^[16]由大豆幼荚子叶原生质体培养也得到了再生植株。张贤泽(1990)^[17]由大豆原生质体培养获得了胚状体和再生植株。Sarwan K. Dhir(1991)^[18]以品种 Clark63 为材料分离幼荚子叶原生质体,经培养得到再生植株,1992年又由其它5个基因型的原生质体培养获得再生植株^[18]。以上成功地得到再生植株的报道大都是经器官发生途径产生的。本文将报道用大豆(*Glycine max* L.)栽培品种泗豆11号幼荚子叶分离出原生质体,经培养由胚胎发生途径高频率再生植株。

一、植物材料

在北京将大豆品种泗豆11号和铁丰8号等夏播于田间,植株在自然条件下开花结荚。

二、原生质体的分离

从田间生长的大豆植株上摘下幼荚子叶大小为 $2 \times 3\text{mm}$ 的豆荚带回室内,在 4°C 的冰箱内处理48小时。用75%的酒精进行表面消毒,然后从幼荚中分离出子叶,将其纵切成 $0.5-1\text{mm}$ 厚的薄片,放入含 Cellulase Onozuka RS1.0%, Pectolyase Y-23 0.1%, 0.6M 甘露醇和 0.3M 山梨醇的改良 CPW 酶液中,在摇床(50r/min, 26°C)上,黑暗条件下酶解4-6小时,用 Miracloth (Calbiochem, Corporation) 过滤,除去组织碎片,将过滤后的原生质体酶液静止30分钟,通过离心($100 \times g$, 10min)洗涤三次以纯化原生质体,每克子叶可得原生质体 $2-3 \times 10^7$ 。

* 在筹建试验室和工作中得到东北农学院张贤泽先生的指导,叶兴国、傅玉清等参加部分工作,一并致谢。

本文于1993年2月13日收到。

This paper was received on Feb. 13, 1993.

三、原生质体的培养

纯化后的原生质体用 Gellan Gum 进行珠状包埋,培养密度调整为 $2-5 \times 10^5/\text{ml}$,悬浮于 $60 \times 15\text{mm}$ 的培养皿中,每培养皿加入 3ml 培养基,培养基的基本成分为 MS 培养基,只是在氮源的种类和含量、维生素 B_1 的含量等作了调整,另外附加天冬酰胺 40mg/l ,谷氨酰胺 40mg/l 2.4-D $0.1-0.2\text{mg/l}$,BA $0.5-1.0\text{mg/l}$ 。在 25°C 黑暗条件下静止培养,10 天统计植板率可达 57—65%。10 天后移至弱光(500Lux)下培养,每隔半个月换一次培养基,并逐渐降低渗透压。50—60 天后形成 1—2mm 大小的黄色愈伤组织。

四、再生植株的诱导

当愈伤组织长到 1—2mm 时,移入含 2.4-D 0.3mg/l ,BA 0.5mg/l ,1%蔗糖的 MSB 固体培养基(含有 MS 无机成分和 B_5 有机成分)进一步生长,培养二至三周后形成结构紧密、松脆光滑的愈伤组织。再转入 MSB 培养基,并附加 NAA 5.0mg/l ,KT 0.5mg/l ,BA 0.5mg/l ,3%蔗糖,在 25°C ,弱光下培养,在脆硬的愈伤组织上形成浅褐色胚状体。把上述愈伤组织再转入含 NAA 1.0mg/l ,KT 0.5mg/l ,1%蔗糖的 MSB 培养基上,促使胚状体进一步成熟长大。待胚状体长出肉眼可见的根和芽时,再转入含 0.1—0.5mg/IGA₃,1%蔗糖的 $\frac{1}{2}$ MSB 培养基上促使小再生植株长大。泗豆 11 号和铁丰 8 号的再生植株的频率分别为 16%和 2%。

参 考 文 献

- [1] Kao, K. M., W. A. Keller and R. A. Miller, 1970, Cell division in newly formed cells from protoplasts of soybean, *Exp. Cell Res.* 62:338-340
- [2] Miller, R. A., O. L. Gamborg, W. A. Keller and K. N. Kao, 1971, Fusion and division of nuclei in multinucleate soybean protoplasts, *Can. J. Genet. Cytol.* 13:347-353
- [3] 吕德扬, 1985, 大豆子叶原生质体游离和培养因子的研究, *遗传*, 7(4), 9—11
- [4] 简玉瑜, 1983, 大豆原生质体的游离, 培养和愈伤组织的形成, *大豆科学*, 2(2), 101—103
- [5] Lu, D. Y., S. Cooper-bland, D. Fental, E. C. cooking and M. R. Davey, 1983, Isolation and suspended division of protoplasts from cotyledons of seedling and immature seeds of *Glycine max*, *Z. Pflanzenphysiol.* 111, 389-394
- [6] 许智宏, 1984, 高等植物根原生质体的分离和培养, *中国科学(B辑)*, 11, 1012—1017
- [7] Xu, Z. H., M. R. Davey and E. C. Cooking, 1982, Plant regeneration from root protoplasts of *Brassica*, *Plant Sci. Lett.* 24, 111-115
- [8] 罗希明, 简玉瑜, 1984, 大豆叶肉细胞原生质体的游离和培养, *吉林农业科学*, 2:20—23
- [9] Gamborg, O. L., B. P. Davis and K. W. Stabihut, 1983, Cell division and differentiation in protoplasts from cell culture of *Glycine* species and leaf tissue of soybean, *Plant Cell Reports* 2, 213-215
- [10] Geick, M. M., P. S. Rao, P. Ozias-Aking and O. Schieder, 1983, In: "Protoplasts" (I. Potrykus et al. eds.) *Poster Proc.*, 50-51
- [11] Schwenk, W. A., C. A. Pearson and M. R. Roth, 1981, Soybean mesophyll protoplasts, *Plant Sci. Lett.* 23, 153-155
- [12] 卫志明, 许智宏, 1988, 大豆原生质体培养再生植株, *植物生理学通讯*, 2: 53—54
- [13] 卫志明, 许智宏, 1990, 大豆原生质体培养和植株再生, *植物学通报*, 32(6), 582—588
- [14] Wei, Z. M. and Z. H. Xu, 1990, Plant regeneration from protoplasts of immature cotyledons of *Glycine soja* Sieb. et Zucc., *Plant Sci.* 70, 101-104
- [15] Wei, Z. M. and Z. H. Xu, 1988, Plant regeneration from protoplasts of soybean (*Glycine max* L.) *Plant Cell Reports*

7,348-351

- [16] 罗希明,赵桂兰,简玉瑜,1990,大豆原生质体的植株再生,植物学报,32(8),616-621
- [17] 张贤泽,1990,大豆原生质体培养,东北农学院学报,21(3),303-304.
- [18] Sarwan K. Dhir, Seema Dhir, and Jack M. Widholm, 1991, Plantlet regeneration from immature cotyledon Protoplasts of soybean (*Glycine max* L.), Plant Cell Reports 10:39-43
- [19] Sarwan K. Dhir, Seema Dhir, and Jack M. Widholm, 1992, Regeneration of fertile plants from protoplasts of soybean (*Glycine max* L. Merr.), genotypic differences in culture response, Plant Cell Reports 11:285-289

PLANTLET REGENERATION FROM PROTOPLASTS OF SOYBEAN (*GLYCINE MAX* L.) THROUGH EMBRYOGENESIS

Xiao Wenyan Wang Lianzheng

(Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100081)

Abstract

Protoplasts were isolated from immature cotyledons of *Glycine max* L. cultivars Sidou No. 11 and Tiefeng No. 8 and cultured in Gellan Gum-solidified beads modified MS medium (Murashige and Skoog, 1962) with 0.1-0.2mg/l 2, 4-D, 0.5-1.0mg/l BA, 40 mg/l asparagine, 40 mg/l glutamine. Plating efficiencies of 57-65% were obtained at 10 days. Upon regular dilution microcalli of 1-2 mm in size were obtained in 50-60 days, which were transferred to MSB medium (MS salts; Murashige & Skoog, 1962 + B₅ organics; Gamborg et al., 1968) with 0.5mg/l 2, 4-D, 0.5mg/l BA, 1% sucrose for further proliferation. After subculture on MSB medium containing 5.0 mg/l NAA, 0.5 mg/l KT, 0.5 mg/l BA, 3% sucrose, embryoids were formed. Embryoids were matured on MSB medium with 0.5 mg/l NAA, 0.5mg/l KT, 1% sucrose, then developed into plantlets. Plantlets were transferred into $\frac{1}{2}$ MBS medium with 0.1-0.5mg/l GA₃, 1% sucrose for further growth. The regeneration frequency of Sidou No. 11 and Tiefeng No. 8 were 16% and 2%.

欢迎订阅 1994 年《安徽农业科学》

《安徽农业科学》系安徽省农业科学院主办的农业学术性期刊。主要报道安徽省农业科研新成果、新技术、新经验。刊登有关农、牧、副、渔等学术论文,研究报告和专题综述等。本刊为季刊,季末月 25 日出版。16 开,96 页,激光照排胶印。每期定价 3.00 元。全年定价 12.00 元。国内统一刊号:CN34-1076/S,国际标准连续出版物号,ISSN:0517-6611,邮发代号 26-20,全国各地邮局均可订阅。

本刊地址:合肥市四里河安徽省农科院内。

邮 编:230031。