

# 大豆组织培养再生植株研究<sup>\*</sup>

袁 鹰<sup>1</sup> 刘德璞<sup>1</sup> 郑培和<sup>1</sup> 徐文静<sup>1</sup> 李海龙<sup>2</sup>

( 1. 吉林省农业科学院生物重点开放实验室, 公主岭 136100;

2 吉林省农业机械化学学校, 公主岭 136100 )

**摘要** 不同基因型的大豆子叶节在添加适宜 BA 和 IBA 的 1/2MS 培养基上经过二周的预培养和二周芽诱导培养, 可获得高频率的丛生芽, 及时将丛生芽从高浓度的 BA 转至低浓度 BA 培养时芽可长出植株, 再转至添加 NAA 的生根培养基上形成完整的植株。经过 40–60 天的培养, 每个外植体可得到 20–30 个芽。芽增殖数和植株再生率因基因型、激素、切割位点、诱导时间等不同而有明显差异。初步确立了丛生芽发生和植株再生的适宜条件和程序, 建起了以子叶节为外植体适合用于农杆菌介导和基因枪方法进行遗传转化的高频再生体系。

**关键词** 大豆; 子叶节; 丛生芽; 植株再生

中图分类号 S565.035.3 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2001)01-0009-05

大豆组织培养自 50 年代开始, 至今国内外有许多学者已对大豆的叶片、上胚轴、下胚轴所有外植体类型都有成功报道<sup>[1-11]</sup>, 然而它们与基因转化受体系统的要求还有一定的差距。如何建立一个良好的受体系统是大豆遗传转化的一个重要环节。近年来, 国内外不少学者认为无菌苗子叶节<sup>[10]</sup>、子叶<sup>[11]</sup>是用于遗传转化的较好的外植体。由于它具有取材不受季节限制, 诱导再生快, 转化突变率低等优点, 利用这个外植体获得了多个成功的转化。但也还存在再生频率低、受基因型限制, 特别是转化株的嵌合体等问题, 嵌合体给后来的筛选带来了许多麻烦, 增加了工作量。嵌合体的问题实际上与不定芽再生频率是很有关系的, 根据现有转化成功报道, 获得芽率低, 而且这些苗最大可能是来自原有腋芽的分生组织区即由原来芽的芽原基组织增生而来, 农杆菌侵染转化的就是这些已有锥形的芽组织, 所以, 不可避免会形成嵌合体转化。要使转化开始于可形成芽的单细胞, 就可较早地在感染或枪击之前, 为转化提供较多的这样类似的分生细胞; 另一方面, 通过高 BA 刺激生成的不定芽, 在促其生长及植株再生方面, 也表现出困难, 频率不高。因此, 对这个体系进行改进是十分必要的。我们在以前的工作基础上, 建起了适

合东北地区现推广的栽培品种可高频率丛生芽再生, 重复性较好的子叶节组织培养系统并用于转化。本文将介绍丛生芽形成和植株再生的一些结果, 并对主要影响因素进行了讨论。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

吉林 16 号、吉林 20 号、吉林 21 号、吉林 27 号、吉林 30 号、吉林 34 号、吉林 35 号、吉林 36 号、吉林 38 号、吉林 40 号、吉林 43 号、九农 21 号、长农四号、合丰 25 号、合丰 35 号、东农 42 号等。

### 1.2 再生步骤

#### 1.2.1 无菌苗的获得

将成熟大豆种子表面用 70% 酒精灭菌 1 分钟, 用 0.1% 升汞消毒 8–10 分钟, 再用无菌水洗 4 次, 接种在种子萌发预培养基上, (20±1)°C 下光照培养。

#### 1.2.2 丛生芽的诱导

取培养二周无菌苗的子叶节含上胚轴基部约 0.5–1 mm 和子叶近胚轴的分生组织部分约 0.5–1 mm 的膨大子叶节, 接种在含不同激素的诱导培

\* 收稿日期: 2000-03-10

作者简介: 袁鹰 (1964–), 女, 助理研究员, 从事植物组织培养、分子育种及植物转基因研究。

培养基上。(25± 1)℃光照培养

1. 2. 3 生长刺激和生根

将形成的丛生芽小心用刀切开转移到低浓度BA的 1/2MS并附加 IBA GA3的生长培养基上,让不定芽伸长生长至 3– 4cm时切下,置于生根培养基上生根

1. 2. 4 培养基

以 1/2MS为基本培养基,单位: mg /L  
种子萌发预培养基: 1/2MS分别附加不同浓度的 BA;  
诱导培养基 (刺激丛芽): 1/2MS+ 6BA0. 5+ IBA0. 05;  
芽生长培养基: 1/2MS+ 6BA0. 25+ IBA0. 5+ GA<sub>3</sub> 1;

生根培养基: 1/2MS+ NAA0. 5  
以上各种培养基中,除生根培养基蔗糖浓度为 2%,其它均为 3%,琼脂浓度为 8g /L, pH5. 8– 6. 0,培养基按常规消毒

2 结果与分析

2. 1 基因型筛选

基因型的差异是非常明显的。供试的 15个基因型的外植体均有绿芽点的出现,但再生芽和植株的效率(频率)最低的与最高的有一个数量级之差。丛生芽最多的是东农 42号,平均 20个左右,最低的是九农 21号平均 3– 4个。

表 1 大豆不同基因型的再生频率

Table 1 Regeneration frequency of soybean in different genotypes

基因型 Gene type	接种数 Total of explant	出芽外植体数 Total of buds	分化芽数/外植体 Bud differentiation/ex plant	再生植株数 Regeneration plants
东农 42	45	40	20– 25	1
合丰 25	20	18	18– 20	12
合丰 35	30	26	16	2
长农四	20	20	8	25
九农 21	15	8	2– 3	0
吉林 20	40	38	18– 20	5
吉林 21	20	16	4	1
吉林 27	20	17	3– 4	18
吉林 34	40	25	4– 5	8
吉林 35	20	20	5– 7	20
吉林 36	25	24	8– 10	40
吉林 38	25	20	6– 8	32
吉林 43	20	20	10– 12	25

2. 2 预培养与丛生芽的频率和再生植株的关系

2. 2. 1 BA被认为可刺激子叶节内源分裂素的产生,促使分生组织分裂并打破顶端优势,促使子叶节膨大及以后不定芽的形成。但在含不同浓度 BA培养基上萌发的种子,在子叶节区诱导形成芽的数量亦不同。BA浓度低于 0. 5mg /L时有利于芽的生长,但不利于芽丛的形成;BA浓度高于 3mg /L时芽的生长受到限制。供试基因型虽然不同,但预培养的结果基本是一致的。在 6BA0– 0. 5mg /L下预培养的子叶节切片,没能形成芽丛,再生植株几乎没有,只有吉林 38号长出 3株小苗但很弱,其它全部愈伤

化。

2. 2. 2 BA0. 5– 1mg /L下预培养的子叶节切片,再生植株效率是较高的,但丛生芽较少平均 2– 3个 / 每个外植体  
2. 2. 3 在 6BA1. 5– 2mg /L下预培养的子叶节切片,再生植株效率一般,但丛生芽较多,平均 20– 30个 / 每个外植体  
2. 2. 4 在 6BA为 4mg /L时预培养的子叶节切片,虽然丛生芽较高,平均 30个 / 每个外植体,但无一正常苗产生,苗多畸形,玻璃化。

表 2 预处理对大豆丛生芽的发生和植株再生的影响

Table 2 Effect of pretreatment on multiple shoot- bud production and plant regeneration of soybean

基因型 Geng type	6BA浓度 6 BA concentration	外植体数 Num. of explants	分化数 Num. of buds differentiation	芽丛数 每个外植体 Num. of shoot buds	成苗数 Plants
吉林 35	0	30	3	0	0
	0.5	30	8	0- 0.2	2
	1	30	28	2- 4	26
	2	30	29	13	23
	4	30	30	31	0
吉林 38	0	25	2	0- 0.1	1
	0.5	25	3	3	3
	1	25	25	6	27
	2	25	25	23	16
	4	25	25	45	1
合丰 25	0	30	9	0.5	2
	0.5	30	11	3- 4	14
	1	30	30	3- 4	32
	2	30	28	21	19
	4	30	30	26	3

表内激素浓度单位为: mg /L

2.3 切割部位对芽诱导的影响

在转化时应考虑感受态细胞在外植体的部位, 有的外植体的分生细胞埋藏于深层, 尽管这些细胞有很强的再生能力, 但在转化时无论是农杆菌还是质粒都难以深入到深层附于这些细胞壁上实现转化。因此切割外植体时应尽量将分生组织细胞暴露于外植体的表面。组织块在一定范围内尽量薄, 如果是农杆菌侵染要尽量增加农杆菌与分生组织的接触面积。基于此, 我们取含上胚轴基部和子叶近胚轴的分生组织膨大处的子叶节为外植体。切割部位不同亦有很大差异:

- 2.3.1 切片过薄小于 1mm,组织块出现上翘或卷曲,培养时间一长,芽丛减少且部分黄化
- 2.3.2 切片为 3mm时,且上胚轴大于下胚轴,原腋芽几天就开始伸长,节周围无其它芽点形成。
- 2.3.3 如果下胚轴较长,上胚轴全部切除,切片厚同样 3mm,接触培养基的切面和边缘长满黄色紧密愈伤组织,像莲花座一样托着上面的分生组织。亦有芽点,但少,培养时间一长愈伤就将组织块上的芽点包住。
- 2.3.4 最后选择切片厚为 2mm,包括上胚轴 0.5mm,下胚轴 0.5mm 这样,组织块既不长愈伤,芽

点较多,又利于农杆菌转化。

2.4 不同激素处理的效应

从激素的单一效果看,分裂素类的 6BA 优于其它激素。6BA 0.5- 1mg/L 能促进芽分化,但高于 1mg/L 以上抑制芽的生长,使节部向横轴方向扩大增粗,促进侧芽发育,使芽点增多。生长素类的 IBA 1- 2mg/L 对芽的分化有利。激素的配合使用明显优于激素的单一使用。BA 与 IBA 的配合使用优于 BA 与 NAA KT 和 2,4-D。最后选用 1/2MS+ 6BA 2mg/L+ IBA 0.1mg/L 作为种子萌发预培养基; 1/2MS+ 6BA 0.5mg/L+ IBA 0.05mg/L 为诱导芽丛培养基; 选用 1/2MS+ IBA 0.5mg/L+ BA 0.25mg/L+ GA 3 1mg/L 刺激芽生长,将长出的 5cm 以上小苗切下移入 1/4B+ NAA 0.5mg/L, 10 天后生根,再生出完整植株。

2.5 植株的再生

如何获得较高频率的再生植株是本研究的最终目的。首先在 BA 为 2mg/L 条件下预培养的无菌苗是诱导芽丛的前提条件; 然后,在 1/2MS+ BA 1.0mg/L+ IBA 0.05mg/L 培养基上定期继代,芽可以继续增殖; 当形成的小芽从高浓度 BA 转至低浓度 BA (1/2MS+ BA 0.25mg/L+ IBA 0.5mg/L) 时,

芽可以长出植株,此时是形成芽丛的旺盛时期,要不断的进行及时分割,减少芽之间的相互抑制。待小植株长至 3– 5cm 高时,切下置于生根培养基上 (1/4MS+ N A A0. 5mg /L+ 2%蔗糖)生根,切割时一定要将植株基部的愈伤切干净,否则,以后长出的根不是植株真正的根,植株的叶片会因营养供应不足而黄花脱落。10天后植株长出 3– 4条健壮的小根,此时要适当的降低培养温度,保持一定湿度不要过大,三周后进行练苗移栽。

表 3 不同植物激素的诱导效应  
Table 3 Inducing effect of different kinds of phytohormone

种类和浓度 Kind and concentration	外植体数 No. of explants	分化数 No. of buds	分化芽数 / 每块外植体 No. of different-iation buds	再生植株数 Regene-ration plants
BA0. 5	30	28	3– 4	25
BA0. 5+ IBA0. 05	30	30	7– 8	56
BA0. 5+ NAA0. 05	30	26	1– 2	0
BA0. 5+ KT0. 0530	9	0	3	
BA0. 5+ 2,4– D0. 05	30	10	0	0

注: 取在预培养基上萌发的合丰 25的子叶节为外植体。表内激素浓度单位为 mg/L。

### 3 讨论

植物基因转化的成功,必须建立于良好的植物受体系统基础之上,而良好的受体系统必须 具有高频的转化率及较强的再生能力作为前提,才能保证转化的外植体进一步发育成正常的植株。贾士荣等<sup>[8]</sup>(1992)认为“用于基因转化的受体系统,应具有 80– 90% 的再生频率,且每块外植体必须能再生出丛生芽,其芽数量越多越好”。我们建起的大豆子叶节高频再生系统,完全满足用于基因转化的受体系统。但我们认为并不是芽越多越好,如试验中预培养的 BA浓度为 4mg /L处理时,芽丛的数量平均 30– 50个 /每个外植体,但无论怎样处理最后亦没能再生一株小苗。从整体看,芽点多利于提高转化频率,但对本研究 结果来说,芽太多,再生频率大幅度下降几乎为零,这就失去意义了。建立一个这样的再生系统虽然再生频率一般,但通过一定的选择压力后,一部分没转化芽失活,一部分可能转化的芽可以正常生长,最后发育成正常植株。本研究结果表明,不同

浓度的 BA预处理对大豆子叶节刺激形成芽丛的多少是有影响的。我们选择了在 BA为 2mg /L培养基上萌发的子叶节为外植体,然后在相同培养基上继代 10天方能达到以上要求。

芽形成之后,如何形成一株正常健壮的植株,每个环节都是很重要的。外植体的基因型、高浓度 BA条件下的预培养、从高浓度向低浓度的转移、激素的配合使用等都是影响大豆子叶节再生植株的重要因素。Lazzeri<sup>[13]</sup>等报道,其方法可用于多种基因型<sup>[10]</sup>而 Barwale等介绍他们的方法在所试验的 51份美国大豆基因型之间只有小的差异。而我们的试验还没有克服基因型的差异,而且差异是很显著的。

BA和 IBA是大豆子叶节产生芽丛和正常植株必不可少的外源激素,BA 0. 5 mg /L和 IBA 0. 05mg /L的激素配合使用对诱导多芽丛形成的影响是很大的,虽然没有 IBA, 0. 5mg /LBA单独使用对芽丛的形成是足够的,但当低浓度的 IBA存在时外植体表现出非常旺盛的反应。及时的将芽丛从高浓度 BA向低浓度 BA培养基转移,定期的移动生长的组织块,及时的分割也是必不可少的,只有这样才能产生更多的芽丛,否则,产生的芽将下降;同时也做了基本培养基 MS和 B<sub>6</sub>的比較的试验,但结果并不明显;在诱导丛芽继代时用果糖代替蔗糖作为碳源,芽的数量明显增多且芽的颜色较绿。

### 参 考 文 献

- 1 尹光初, [J]黑龙江农业科学, 1981, (1): 12– 14
- 2 尹光初, [J]科学通报, 1980, (18): 864
- 3 尹光初,朱之垠,徐振等, [J]大豆科学, 1982, 1(1): 69– 76
- 4 扬振棠, [J]科学通报, 1984, (16): 1012– 1016
- 5 陈云昭,王玉国, [J]山西农业大学学报, 1983, 3(1): 41– 45
- 6 陈云昭,王玉国 [J],大豆科学, 1984, (4) 339– 343
- 7 吕慧能,盖钧镒,马育华等 [J],大豆科学 1993, 12(4): : 330
- 8 王关林,方宏筠 [M ],植物基因工程原理与技术, 180
- 9 HstoshiSaka [J], Plant Sience Letters, 1980, 19 (3): 193– 195
- 10 M S Wright [R], Plant Cell Reports, 1987, 6 83– 89
- 11 Lazzeri, PA, DF, Hildebrand, GBCollins, Aprocedure for plant re-generation from immature cotyledon , tissue of soybean, plant Molec. [R]Biol. Reporter, 1985, 3 160– 167
- 12 Hnchee M A et al. [J]Bio/Technology, 1988, 6 915
- 13 Barwale, U. B., H. R. Kerns, Widholm, Plant regeneration from callus culturs of several soybean genotypes Via embryoge-nesis and organogenesis. [J] Planta 1986, 167 473– 481

STUDY ON PLANT REGENERATION FROM SOYBEAN CULTURE

Yuan Ying<sup>1</sup>   Liu Depu<sup>1</sup>   Zheng Peihe<sup>1</sup>   Xu Wenjing<sup>1</sup>   Li Hailong<sup>2</sup>

( 1. *Jilin Province Key Open Labor On Agro- Biotechnology*;  
2. *JiLin Mechanization in Agriculture School, Jilin Province*)

**Abstract**   High frequency multiple shoot- bud formation from different genotype of soybean cotyledon node for the two- week pre- culture and two- week shoot- inducing culture on a 1/2MS- medium supplemented with BA and IBA was obtained. Plant can be obtained from multiple shoot- bud when transferred to low concentration of BA, and afterwards to fresh rooting medium supplement N AA. 20- 30 buds were obtained from per explant for 40- 60 days culture. It was found that the plant regeneration frequency varies obviously from genotypes, hormones , different excision cite and inducing time . Suitable condition and procedure were established for the clump buds formation and plant regeneration, and this high frequency regeneration system can be applied to the soybean genetic transformation by agora- bacterium and particle bombardment.

**Key words**   Soybean; Cotyledon; Multiple shoot; Plant regeneration