

大豆幼胚子叶胚性悬浮细胞系的建立 与次生胚诱导*

李海燕¹ 朱延明^{1*} 冯莹莹¹ 周长梅¹ 刘北东¹
丁晓东² 张淑珍²

(1. 东北农业大学生命科学学院; 2. 东北农业大学大豆研究所 哈尔滨 150030)

摘要 本研究选用黑龙江省5个大豆品种的幼胚子叶,建立了胚性悬浮培养体系,并由悬浮体系增殖产生次生胚。系统探讨了培养基组成和浓度对体细胞胚诱导和悬浮培养物生长的影响,以及悬浮体系继代时间与胚成熟率和再生率的关系。结果表明,高效体细胞胚诱导培养基为:MSB+40mg/L 2,4-D+6%蔗糖。高效球型胚增殖培养基为10mg/L 2,4-D+1/2MS 氮源+5mM 谷氨酰胺+5mM 天门冬酰胺。培养8周后的次生胚成熟率和再生率显著提高,到第12周分别达63%和35%,之后提高幅度减小。

关键词 大豆; 幼胚子叶; 胚性悬浮培养体系; 次生胚

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2002)02-0123-04

大豆体细胞胚再生已有许多报道。早期Lazzeri^[1]和Ranch^[2]等建立的系统中,由胚性细胞团起源形成的体细胞胚,一般不经过愈伤组织增殖,直接形成单一的球形胚。由于其来源于多细胞且发生频率低,即使被转化也是嵌合体。自从1988年McGranahan提出用胚性组织被转化的部位诱导次生胚以来,由于其可能起源于单细胞,并延长了细胞分裂周期进行胚增殖生长,从而提高了再生率和转化率等优点,成为目前大豆和其它植物转化最适宜的受体材料^[3-5]。由Finer建立的可增殖的胚性悬浮培养系统具有这些优点,已经证明是目前大豆转化最适宜的受体系统^[6]。而国内对大豆幼胚子叶胚性悬浮体系没有过系统的研究报道。本研究在总结前人经验基础上,选用黑龙江省大豆主栽品种的幼胚子叶,建立了较有效的胚性细胞悬浮培养体系,从而为遗传转化提供理想的受体材料。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料选用东北地区5个性状优良的大豆主栽品种合丰25、合丰35、黑农35、东农42和吉林30。由东北农业大学大豆所提供。

1.2 方法

1.2.1 体细胞胚诱导

1.2.1.1 培养基 基本培养基为MSB(MS无机盐+B₅有机成分),添加氮源、生长素和蔗糖,琼脂为0.8%,pH5.8。氮源、生长素和蔗糖均采用3个浓度水平,设计了L₉³正交表(表1)。

1.2.1.2 培养方法 取开花后2-3周的幼嫩豆荚,每株上取最先结的豆荚,每3-4天取样一次,最多取3次。用自来水冲洗10-30分钟,75%酒精表面消毒1分钟,0.1%升汞(加0.1%Tween-20)10-15分钟,无菌水冲洗3次。用镊子取出种子,剥去种皮,挤出子叶。选取4-5mm大小的(半透明绿),切去胚轴及生长点,只取两片叶子,近轴面向上接种到体细胞胚诱导培养基上,暗培养。初次继代要带有子叶,并挑选高度结构化、胞质浓厚的莲座型细胞团。

四周后调查体细胞胚诱导率(有胚胎发生的外

* 收稿日期:2001-08-20

项目来源:国家科技部转基因植物研究与产业化开发项目(J99-B-013)The national item of research and industrial development of transgenic plants

** 通讯作者: Author of correspondence. Phone/Fax: +86-451-5390161. E-mail: ymzhu2001@hotmail.com

作者简介:李海燕(1972-),女,在读博士生,主要研究方向为植物生物工程。

植体数/接种外植体数总数 $\times 100\%$)、正常胚率(正常体细胞胚数/有胚胎发生的外植体数 $\times 100\%$)和诱导效率(胚诱导率 \times 正常胚率)。正常胚的划分,采用 Lazzari 等的标准:有明显苗端和根端,并至少有一个正常子叶的体细胞胚为正常体细胞胚。显著性分析优化出最佳培养基组合,然后重新接种。

表1 体细胞胚诱导影响因素

Table 1 Factors influencing the induction of somatic embryos

| 培养基 Medium | 氮源 Nitrogen | 生长素(mg/L) Auxin(mg/L) | 蔗糖(%) Sucrose(%) |
|---------------|----------------|--------------------------|---------------------|
| 1 | a | N10* | 1.5 |
| 2 | a | D20 | 3 |
| 3 | a | D40 | 6 |
| 4 | b | N10 | 3 |
| 5 | b | D20 | 6 |
| 6 | b | D40 | 1.5 |
| 7 | c | N10 | 6 |
| 8 | c | N20 | 1.5 |
| 9 | c | D40 | 3 |

注: a 指 MS 氮源; b 指 1/2MS 氮源+5mM 谷氨酰胺+5mM 天门冬酰胺; c 指 1/2MS 氮源+10mM 谷氨酰胺+10mM 天门冬酰胺; * 指生长素的种类和浓度, N 指 NAA, D 指 2, 4-D。

Note: a means MS nitrogen; b means 1/2MS nitrogen+5mM Glutamine+5mM Asparagine; c means 1/2MS nitrogen+10mM Glutamine+10mM Asparagine; * means the kind and concentration of auxin. N indicates NAA, D indicates 2, 4-D.

1.2.2 胚性悬浮培养体系的建立

1.2.2.1 培养基 首先筛选适宜 2, 4-D 浓度。以 MSB 为基本培养基, 分别添加 1、5、10、20mg/L 2, 4-D, 探讨出最适 2, 4-D 浓度。在此基础上, 筛选适宜的氮源组合。共设计 5 种组合, 即 MS 氮素+10mM 谷氨酰胺、MS 氮素+10mM 天门冬酰胺、MS 氮素+10mM 谷氨酰胺+10mM 天门冬酰胺、1/2MS 氮素+5mM 谷氨酰胺+5mM 天门冬酰胺、1/2MS 氮素+10mM 谷氨酰胺+10mM 天门冬酰胺。培养一个月后, 根据胚性细胞团鲜重增长率和胚成熟率筛选最佳培养基。胚成熟率=子叶形胚发生的外植体数/体细胞胚发生的外植体数 $\times 100\%$ 。

1.2.2.2 培养方法 取约 1 g 胚性细胞团悬浮于 25mL 液体培养基中, 120-150rpm, 26 $^{\circ}$ C 振荡培养。每周继代一次。为使体细胞胚发育阶段同步化, 隔代选取结构致密、有光滑表面的细胞团用孔径为 2 mm 的尼龙网过筛处理, 保留大小均一、直径约 2-3mm 的细胞团。选取黄棕色、有光滑表面, 较致密

的组织继代。通过过筛和调节培养基组成使培养物同步化。

1.2.2.3 继代时间与胚成熟率和再生率的关系 用优化出的最佳培养基, 每两周取一定量跟踪测定胚成熟率和再生率。再生率=有植株再生的外植体数/有体细胞胚发生的外植体数 $\times 100\%$ 。

用 SPSS Data Processor 软件对试验数据进行显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 体细胞胚诱导

2.1.1 培养基组成及浓度对体细胞胚诱导的影响

表2 氮源、生长素和蔗糖对大豆幼胚子叶体细胞胚诱导的影响

Table 2 Influence of nitrogen, auxin and sucrose on induction of somatic embryos from immature cotyledons of soybean

| 培养基 Medium | 接种数 No. of cotyledons | 胚诱导率(%) Percentage of somatic embryos induction(%) | 正常胚率(%) Percentage of normal somatic embryos(%) | 诱导效率(%) Induction efficiency (%) |
|---------------|--------------------------|---|--|-------------------------------------|
| 1 | 200 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 180 | 21 | 5 | 1.05D |
| 3 | 200 | 49 | 6 | 2.94A |
| 4 | 200 | 4 | 10 | 0.40F |
| 5 | 200 | 36 | 4 | 1.44C |
| 6 | 190 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 150 | 6 | 9 | 0.54E |
| 8 | 200 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | 200 | 38 | 5 | 1.90B |

注: * 采用 1% 差异显著标准; 表中数据为各个品种的平均值。
Note: * means 1% significant level; Dates in this table are mean value of all varieties.

接种 20 天左右在子叶边缘或表面长出球形胚(图版 A)。表 2 可见, 3 号培养基最适于体细胞胚诱导, 即 MSB 培养基添加 40mg/L 2, 4-D、6% 蔗糖其胚诱导率和诱导效率最高, 分别达 49% 和 2.94%。有机态氮源不是体细胞胚发生所必需的, 而生长素和蔗糖的组成对比对体细胞胚诱导有显著影响。大豆基因型、幼胚长度、接种方式、继代时选择的组织类型和培养基组成等是影响诱导的组织是否胚性以及诱导频率的关键因素^[7]。本研究在一些已公认的研究结论基础上, 用 5 个大豆品种证明高浓度的生长素和蔗糖能显著提高体细胞胚诱导率。

2.1.2 体细胞胚胎发生的基因型差异

各种培养基对不同基因型体细胞胚的诱导效果是一致的, 都是 3 号培养基的诱导效果最佳。因此以 3 号培养基为例, 探讨体细胞胚诱导率、正常胚率和诱导效率的基因型差异(表 3)。其中黑农 35、东农 42 和合丰 35 的体细胞胚诱导率较高, 为 50% 左右, 差异不显著。黑农 35 的正常胚率为 6%, 稍高于另两者。但黑农 35 的诱导效率明显高于合丰 35 和东农 42, 是从体细胞胚途径再生植株较好的试验材料。

2.2 胚性细胞悬浮培养体系的建立和次生胚诱导

2.2.1 2, 4-D 和氮源对胚性细胞团鲜重增长率和胚成熟率的影响

选用黑农 35、东农 42 和合丰 35 诱导的结构致密的组织建立悬浮体系。新生的次生胚源于旧胚表面, 表面增殖产生多层胚(图版 B)。2, 4-D 和有机态氮的不同组合对胚性细胞团鲜重增长率和胚成熟率有很大影响(表 4)。在 MS 氮源情况下, 培养一个月后, 10mg/L 2, 4-D 培养的细胞团鲜重增长最大, 胚成熟率最高; 浓度过低团块不增殖, 直接发育成熟; 而过高根本不生长, 一段时间即褐化死亡。在 10mg/L 2, 4-D 基础上, 1/2MS 氮源, 加 5mM 谷氨酰胺、5mM 天门冬酰胺时胚成熟率最高, 与其它处理差异显著。虽然团块鲜重不是最高, 但组织团小、数目多, 质量最好, 利于选择和转化, 本试验得出的最佳 2, 4-D 和有机氮素浓度与 Finer 的结果不一致, 很可能是基因型不同的原因。同时可见, 添加谷氨酰胺、天门冬酰胺等大豆根瘤产物对液体增殖胚性组织及胚成熟起重要作用。这是因为大豆是酰尿植物^[8], 在籽实充实初期, 由茎基部供给子粒和荚的氮源主要是尿囊素、尿囊酸、天门冬酰胺和谷氨酰胺, 培养基中直接添加这些有机氮素可以调节无机氮的代谢。

表 3 基因型对大豆幼胚子叶体细胞胚诱导的影响

Table 3 Influence of genotype on induction of somatic embryos from immature cotyledons of soybean

| 基因型 Genotype | 胚诱导率(%) Induction percentage of somatic embryos (%) | 正常胚率(%) Percentage of normal somatic embryos (%) | 诱导效率(%) * Induction efficiency (%) |
|-----------------|--|---|---------------------------------------|
| 黑农 35 | 49A | 6 | 2.94A |
| 东农 42 | 51A | 4 | 2.04B |
| 合丰 35 | 38A | 4 | 1.52B |
| 合丰 25 | 11B | 5 | 0.55C |
| 吉林 30 | 6B | 4 | 0.24C |

表 4 2, 4-D 和氮源对胚性细胞团鲜重增长率和胚成熟率的影响

Table 4 Effect of different 2, 4-D and nitrogen concentrations on percentage of increased fresh weight of embryogenic cell clumps and percentage of mature embryos

| 培养基 Medium | 浓度 Concentration | 鲜重增长率 (%) Percentage of increased fresh weight (%) | 胚成熟率 (%) Percentage of mature embryos (%) |
|--|--------------------------------------|---|--|
| 2, 4-D(mg/L) (MS 氮源) (MS Nitrogen) | 1 | 0 | 1 C |
| | 5 | 21B | 5 B |
| | 10 | 78A | 11A |
| | 20 | 0 | 0 |
| 氮源 (Nitrogen) | MSN+10mMGlu | 87A | 13B |
| | MSN+10mM Asp | 93A | 13B |
| | (10mg/L 2, 4-D) MSN+10mMGlu+10mM Asp | 95A | 17B |
| | 1/2MSN+5mMGlu+5mM Asp | 96A | 33A |
| | 1/2MSN+10mMGlu+10mM Asp | 101A | 34A |

注: MSN 指 MS 氮源; Glu 指谷氨酰胺; Asp 指天门冬酰胺; 表中数据为各个品种的平均值。

Note: MSN represents MS nitrogen; Glu represents Glutamine; Asp represents Asparagine; Dates in this table are mean value of all varieties.

2.2.2 继代时间与胚成熟率和再生率的关系

用优化出的最佳培养基, 每两周取一定量培养物接种到成熟培养基上测定胚成熟率(图版 C), 并跟踪测定再生率(图版 D)。结果见图 1, 图中数据为三个品种的平均值。可见, 悬浮体系培养 8 周后胚的成熟率和再生率明显提高, 超过 12 周后提高幅度减小。有报道说长期增殖的胚性培养物会产生染色体畸形而造成植株不育^[9], 较早转化和筛选提高可育植株比率^[10]。因此用培养 8—12 周的胚性组织作为遗传转化的受体材料可显著提高再生率和转化率。

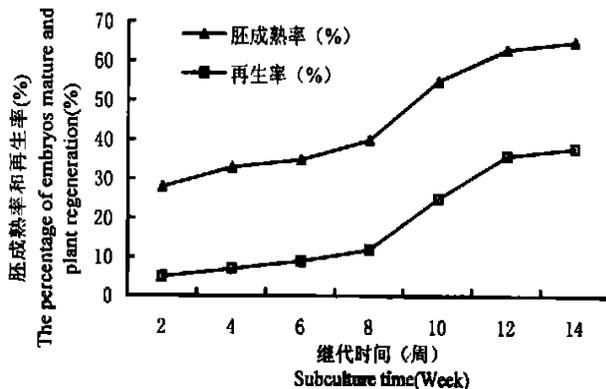
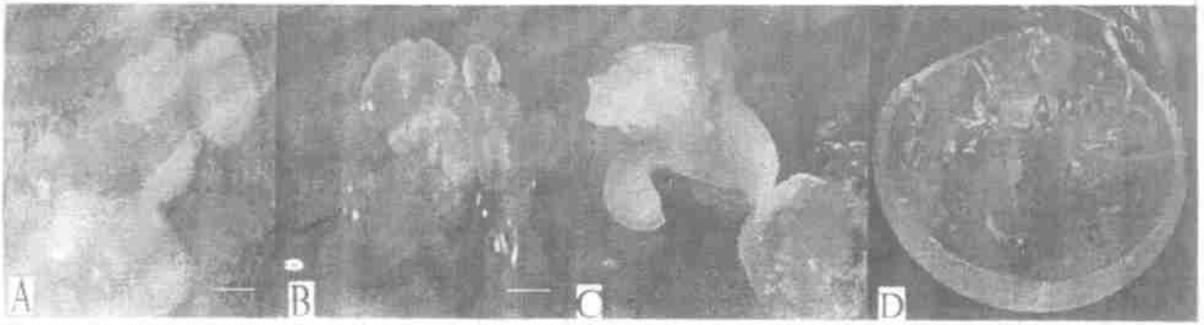


图 1 悬浮培养体系继代时间与胚成熟率和再生率的关系

Fig. 1 The relationship between subculture time of suspension system and percentage

of mature embryos and plant regeneration



图版说明: A 刚诱导出的球型胚(标尺=0.5mm); B 次生胚(标尺=0.5mm); C 成熟的子叶型胚; D 再生苗。

Explanation of Plates: A Global somatic embryos(bar=0.5mm); B Secondary somatic embryos(bar=0.5mm); C Mature cotyledon embryos; D Regeneration plants

参 考 文 献

- 1 Lazzeri PA, Hildbrand DF, Collins GB. A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean[J]. *Plant Mol Biol Rep* 1985, 3: 160-167.
- 2 Ranch JP, Oglesby L, Zielinski AC. Plant regeneration from embryo derived tissue cultures of soybean [J]. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1985, 21: 653-658.
- 3 Finer JJ, McMullen MD. Transformation of soybean via Particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue [J]. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1991, 27P: 175-182.
- 4 Sato S, Newell C, Kolacz K et al. Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems[J]. *Plant Cell Reports*. 1993, 12: 408-413.
- 5 Trick HN, Finer JJ. Sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation of soybean (*Glycine max* Merrill.) embryogenic suspension culture tissue [J]. *Plant Cell Reports*. 1998, 17: 482-488.
- 6 Finer JJ, Nagasawa A. Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill.) [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 1988, 15: 125-136.
- 7 Liu WN, Morre PJ, Collins GB. Somatic embryogenesis in soybean via somatic embryo cycling [J]. *In Vitro Cell. Dev Bio*. 1992, 28P: 153-160.
- 8 Buchheim J, Colbum S, Ranch J. Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth [J]. *Plant Physiol*. 1989, 89: 768-775.
- 9 Cho MJ, Widholm JM, Vodkin LO. Cassettes for seed-specific expression tested in transformed embryogenic cultures of soybean [J]. *Plant Mol Biol Rep*. 1995, 13: 255-269.
- 10 Simmonds DH, Donaldson PA. Genotype screening for proliferative embryogenesis and biolistic transformation of short-season soybean genotypes [J]. *Plant Cell Reports*. 2000, 19: 485-490.

ESTABLISHMENT OF EMBRYOGENIC SUSPENSION WITH IMMATURE COTYLEDONS OF SOYBEAN (*Glycine max* (L.) Merr.) AND INDUCTION OF SECONDARY EMBRYOS

Li Haiyan Zhu Yanming^{**} Feng Yingying Zhou Changmei Liu Beidong
Ding Xiaodng Zhang Shuzhen

(Department of Plant Bioengineering, College of Life Sciences Northeast
Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract With 5 soybean cultivars in Heilongjiang province, somatic embryos were induced with immature cotyledons and secondary embryogenesis systems were established through suspension proliferation of embryogenic cultures. We studied systematically the influence of component and concentration of medium on somatic embryo induction and suspension culture proliferation. The results show, high efficient medium of inducing somatic embryos is MSO + 40mg/L 2, 4-D + 6% sucrose. High efficient medium of global embryos proliferation is 10mg/L 2, 4-D + 1/2 MS nitrogen + 5mM glutamine + 5mM asparagines. The percentage of embryos mature and regeneration of secondary embryos after cultured for 8 weeks were significantly improved, and reached 63% and 35% respectively at the 12 week, after then, the increased rate declined.

Key words Soybean; Immature cotyledons; Embryogenic suspension system; Secondary embryos