

大豆未成熟子叶体细胞再生及相关农艺性状影响因子的分析^{*}

吴超 武天龙

(上海交通大学农业与生物学院, 上海 201101)

摘要 选取东北三省和长江流域广泛种植的十个主栽春夏大豆品种, 在含有 2, 4-D (40mg/L) 的 MSB 培养基上培养四周后, 转至含有 2, 4-D (20mg/L) 的 MSB 培养基上再培养四周, 调查出愈率和出胚率, 分析百粒重和生育期等农艺性状对体细胞再生的影响。结果发现百粒重和取材大小对幼胚外植体再生有极显著的影响, 二者呈极显著的正相关 ($r=0.989593$); 生育期和取材时间对幼胚外植体再生也有极显著的影响, 二者呈极显著的正相关 ($r=0.964764$)。因而对于不同基因型的大豆, 最适取材范围应视其各个性状的不同而有一定的变化, 并且可以通过品种的百粒重和生育期来预期幼胚的最适取材大小和取材时间。

关键词 体细胞再生; 百粒重; 生育期; 取材

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841 (2004)01-0021-05

良好的组织培养和再生系统的建立是作物基因转化的关键, 大豆一直是公认的难转化作物, 近年来, Cheng 等 (1980) 用无菌苗的子叶节^[1]、Kartha 等 (1981) 用无菌苗茎尖^[2]、Barwale 等 (1986) 用未成熟胚子叶^[3]、Wright 等 (1987) 用上胚轴和初生叶^[4]、McCabe 等 (1988) 用幼胚轴^[5]、Kim 等 (1990) 用出生叶节^[6], 通过器官发生获得再生植株。器官再生取材不受季节限制, 诱导再生快, 但存在着再生频率低, 受基因型限制, 特别是转化过程中易出现嵌合体等问题, 而以大豆未成熟子叶外植体诱导体细胞胚胎发生则可以较好的解决这些问题, 因而成为最近

研究的一大热点 (Finer^[7,8]、Samoylov^[9,10]、David^[11]、Lazzeri^[12])。目前的研究多集中在对大豆基因型、激素及切割方法等方面, 本文选取了各地广泛种植的几个大豆品种, 进行体细胞诱导, 并对其相关的农艺性状与大豆幼胚出胚率之间的关系进行分析, 为大豆的遗传转化提供依据。

1 材料与方法

以东农小粒豆一号、东农 8109、合丰 39、北四、吉林 11、辽选一号、上农 02-396、夏大豆牛踏扁、夏

表 1 供试品种类型
Table 1 The varieties used in the experiment

品种	类型	百粒重	生育期	说明	品种	类型	百粒重	生育期	说明
Variety	Type	100 seed wt.	Growth stage	Note	Variety	Type	100 seed wt.	Growth stage	Note
东农小粒一号	北方春大豆	8.8	115	东北农业大学	吉林 A-11 号	北方春大豆	38.7	125	吉林省农科院
东农 8109	北方春大豆	17.2	110	东北农业大学	上农 04	南方春大豆	26.5	105	上海交通大学
合丰 39	北方春大豆	18	115	黑龙江合江地区农科所	上农 02-396	南方春大豆	33	105	上海交通大学
北四	北方春大豆	25	105	黑龙江北安地区农科所	牛踏扁	南方夏大豆	39.9	140	地方品种
辽选一号	北方春大豆	38.5	130	辽宁铁岭	内外青	南方夏大豆	40.1	140	地方品种

大豆内外青上农 04 等在东北和长江流域广泛种植的 10 个主栽大豆品种 (见表 1), 各品种均选取 3mm, 5mm, 7mm, 9mm 四种不同大小未成熟子叶为外植体, 经饱和的乙醇消毒 1min, 饱和的 NaClO 溶

^{*} 收稿日期: 2003-07-18
项目来源: 国家 863 课题油料作物转基因专项 2001AA212141
作者简介: 吴超 (1979-), 女, 硕士, 研究方向植物遗传育种。

液消毒 10min, 切去胚轴, 离轴面接种于附加 2, 4-D (40mg/L) 的 MsB 培养基上培养 4 周后, 转至含有 2, 4-D (20mg/L) 的 MsB 培养基上再培养四周, 培养温度为 28℃, 光照条件为 10umol m⁻²s⁻¹。调查各基因型大豆的出愈数和出胚数, 计算出愈率和出胚率, 并进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 基因型对大豆体细胞再生的影响

对七种不同基因型的大豆体细胞再生的出愈率与出胚率进行统计看出大豆体细胞再生过程中, 出愈率与出胚率在基因型上均有一定的差异, 方差分

表 2 大豆出愈率方差分析

Table 2 Variance analysis of frequency of callus formation among varieties of soybean

品种	平均值	显著性
Varieties	Avarege	
合丰 39	80.7	A
牛踏扁	79	A
东农 8109	68.6	B
上农 04	68.24	B
内外青	66	B
上农 02-396	65.45	B
辽选一号	63.945	B
北四	63.43	B
吉林 11 号	63.037	B
东农小粒一号	62.6	B

析表明, 不同大豆品种出愈率差异显著, 分为两个等级, 其中合丰 39、牛踏扁为 A 水平, 其余品种皆为 B 水平, 不同基因型的大豆出愈率均较高, 为 62.6%—80.7%; 而不同大豆品种间出胚率的差异则为极显著, 分为五个等级, 其中牛踏扁为 A 水平, 极显著的高于其他品种, 最差为吉林 11 和内外青。不同品种间出胚率差异也较大, 为 16.269%—34.811%。对出愈率和出胚率进行回归分析, 发现二者之间相关性不显著, 回归系数为 r=0.459883, 没有明显的线性关系, 但在一定范围内, 出愈率高的品种出胚率也相应较高。来源不同的春夏大豆间出愈率与出胚率差异均不明显, 结果见表 2、3。

表 3 大豆出胚率方差分析

Table 3 Variance analysis of frequency of embryogenesis formation among varieties of soybean

品种	平均值	显著性
Varieties	Avarege	
牛踏扁	34.811	A
东农小粒一号	30.263	AB
合丰 39	26.688	C
辽选一号	26.644	C
上农 02-396	24.293	CD
北四	23.824	CD
东农 8109	21.604	DE
上农 04	19.252	EF
内外青	17.333	F
吉林 11 号	16.269	F

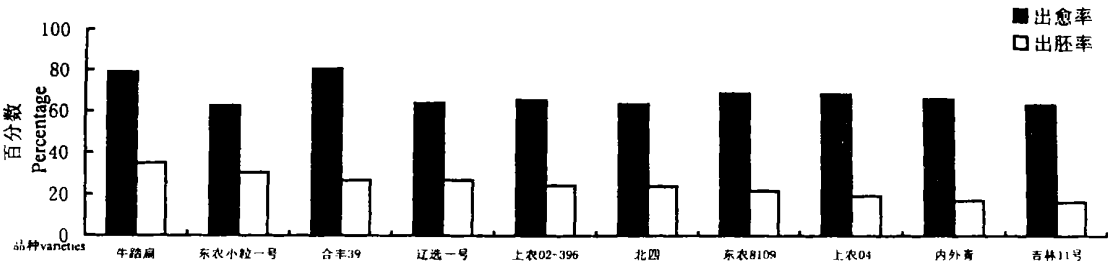


图 1 不同大豆品种出愈率与出胚率的比较

Fig. 1 The frequency of callus and embryogenesis among the varieties of soybean

2.2 百粒重与幼胚外植体培养取材大小对出胚率的影响

文献报道大豆体细胞再生过程中最适的取材大小一般在 3—6mm。在本实验中, 选取了在百粒重上存在显著差异的七个大豆品种, 分别在幼胚大小为 3mm, 5mm, 7mm, 9mm 时取材。方差分析表明百粒重、取材大小对体细胞再生均有极显著的影响, 对二者相关分析表明不同百粒重品种幼胚外植体培

养取材大小和出胚率存在极显著的正相关 (r=0.989593), 小粒品种幼胚外植体培养取材小, 随着百粒重的提高幼胚外植体培养取材也相应增大, 其变化范围在 3—9. mm。在本试验中东小一号百粒重 8.8g, 幼胚外植体培养最适取材在 3mm, 吉林 11 号和夏大豆牛踏扁百粒重 40g, 幼胚外植体培养最适用取材在 9mm, 根据百粒重大小可以预测外植体培养的最适取材大小, 回归方程为 y = 1.6437 +

0.1923x (如图 2)。

表 4 百粒重与幼胚外植体培养取材大小影响体细胞再生方差分析

Table 4 Variance analysis of the effect of 100-seed weight and immature embryo size to the embryogenesis frequency

差异源 Source	Anova SS	df	Mean Square	F Value	P> F
百粒重	2793.44022601	6	465.57337100	134.25	0.0001
取材大小	793.12349520	3	264.37449840	76.24	0.0001
百粒重 *取材大小	3617.06128622	18	200.94784923	57.95	0.0001

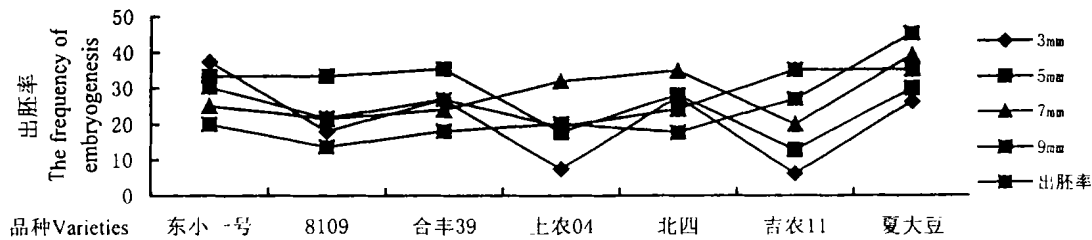


图 2 不同百粒重大豆不同取材大小出胚率比较

Fig. 2 The frequency of embryogenesis in soybeans with different 100-seed weight at different size

2.3 生育期与幼胚外植体生长时间对体细胞再生的影响

为了研究生育期与幼胚外植体生长时间的关系, 根据前面研究的结果, 我们选取了百粒重没有明显差异, 但在生育期上存在显著差异的 4 个大豆品种, 分别在开花后 24d、26d、28d、30d 取材, 对结果进行分析看出, 生育期, 取材时间及二者的互作均对出胚率有显著的影响, 并由图示可以看出二者间存在

着明显的正相关。上农 02-396 生育期 105 天、最适取材幼胚外植体生长时间为 24 天, 夏大豆牛踏扁生育期 140 天、最适取材幼胚外植体生长时间为 30 天, 随着生育期的增长, 幼胚外植体最适取材时间延长。相关系数为 $r=0.964764$, 达到了极显著的水平, 根据生育期可以预测外植体培养的最适取材时间, 归方程为 $y=18.6154+1.3846x$ 。

表 5 生育期与幼胚外植体生长时间影响体细胞再生方差分析

Table 5 Variance analysis of the effect of growth stage and the time of fetching material to the embryogenesis frequency

差异源 Source	Anova SS	df	方差	F Value	P> F
			Mean Square		
生育期	2129.94518006	3	709.98172669	187.99	0.0001
取材时间	499.35054706	3	166.45018235	44.07	0.0001
生育期 *取材时间	2294.65774719	9	254.96197191	67.51	0.0001

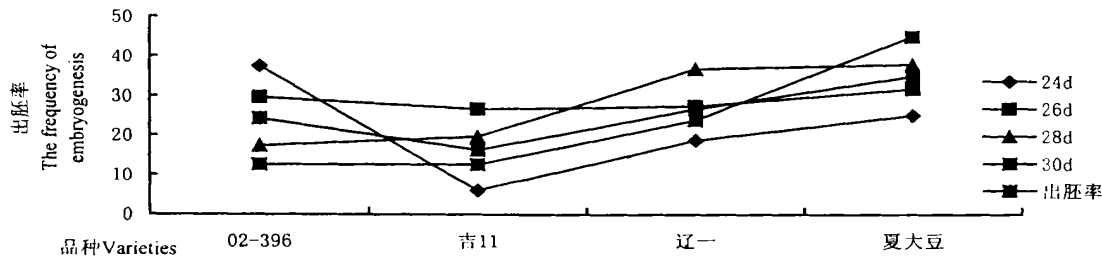


图 3 不同生育期大豆不同取材时间出胚率比较

Fig. 3 The frequency of embryogenesis in soybeans with different growth stage at different time

3 讨论

大豆体细胞再生过程中出胚率在基因型间存在着极显著的差异, 但这种差异对不同生态类型大豆

规律不明显。

大豆的体细胞的出愈率通常较高, 本实验中最高品种达到了 80.5%, 出愈率与体细胞发生率关系不大, 胚胎发生频率较低, 在本实验中最高为夏大豆 34.811%。

影响大豆体细胞再生的因素很多, 本实验主要对大豆的生育期和百粒重这两个比较重要的农艺性状进行了统计分析, 结果看出, 大豆体细胞再生最适取材时间主要是取决于植株的相对发育时期, 也就是从开花到鼓粒这段生殖生长的时期, 这段时期对出胚率有显著的影响, 随着生育期的增长, 幼胚外植体最适取材时间延长($r=0.964764$)。而取材大小主要取决于子叶的相对发育时期。

对于幼胚的最适合取材大小, 国内外的文献报道多为 35mm 或 46mm, 我们对百粒重与幼胚外植体取材分析发现, 百粒重和取材大小对幼胚外植体再生均有极显著的影响, 二者呈极显著的正相关, 其范围在 39mm。根据百粒重的大小可以预测最适幼胚外植体培养的取材大小。

对于生育期及取材时间对体细胞再生的影响, 国内王萍^[13]曾经报道过生育期与取材大小有一定的相关性。在本实验对生育期与取材时间分析结果证明, 生育期和取材时间对幼胚外植体再生均有极显著的影响, 二者呈极显著的正相关, 根据生育期可以预测最适幼胚外植体培养的取材时间。

参 考 文 献

- 1 Cheng T Y, Hitoshi S, Thanh H V. plant rengennation from soybean cotyledonary node segments in culture[J]. Plant Science Letters, 1980, 19: 91—99.
- 2 Kartha KK, K Pahl NL Leung et al. Plant regeneration from meristems of grain legumes: soybean, cowpea, peanut, chickpea and bean[J]. Can J. Bot. . 1981. 59: 1671—1679.

- 3 Barwale UB, HR Kems, JM Widholm. Pant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis[J]. Planta. 1986. 167: 473—481
- 4 Wnght MS, DV Ward, MA Hinchee, et al. Regeneration of soybean (*Glycine max* L. Merr.) from cultured primary leaf tissue[J]. Plant Cell Rep. 1987. 6: 83—89.
- 5 McCabe DE, WF Swain, BJ Martinell, et al. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration[J]. BIO/TECHNOL. 1988. 6: 923—926.
- 6 Kim J, CE LaMotte, E Hack. Plant regeneration In Vitro from primary leaf nodes of soybean (*Glycine max*) seedlings. [J]. Plant Physiol. 1990, 136: 664—669.
- 7 Finer JJ, A Nagasawa. Development of an embryogenic suspension culture of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] [J]. Plant Cell Tissue Organ. Cult. 1988. 15: 125—136.
- 8 Finer JJ, G B Collins Embryogenic response of multiple soybean cultivars across three locations[J]. In Vitro Cell Dev Biol—Plant . 2001. 37: 62—67.
- 9 M. Samoylov., D. M. Tucker. A Liquid—medium—based protocol for rapid regeneration from embryogenic soybean cultures[J]. Plant Cell Rep. 1998 18: 49—54.
- 10 M. Samoylov., D. M. Tucker. Soybean embryogenic cultures; the role of sucrose and total nitrogen content on proliferation[J]. In Vitro Cell Dev Biol—Plant . 1998 34: 8—13.
- 11 David R A. Parrot Effect of polyethylene glycol and sugar alcohols on soybean somatic Plant Cell, Tissue and Organ culture[J]. 2001. 64 (1): 55—62.
- 12 Lazzari P A, Hidebrand D F. A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean[J]. Plant Molec Biol Reporter. 1987, 10: 197—208.
- 13 王萍. 大豆未成熟子叶体细胞胚胎发生及其相关因子的分析[J]. 中国油料作物学报, 2002, 4: 29—31.

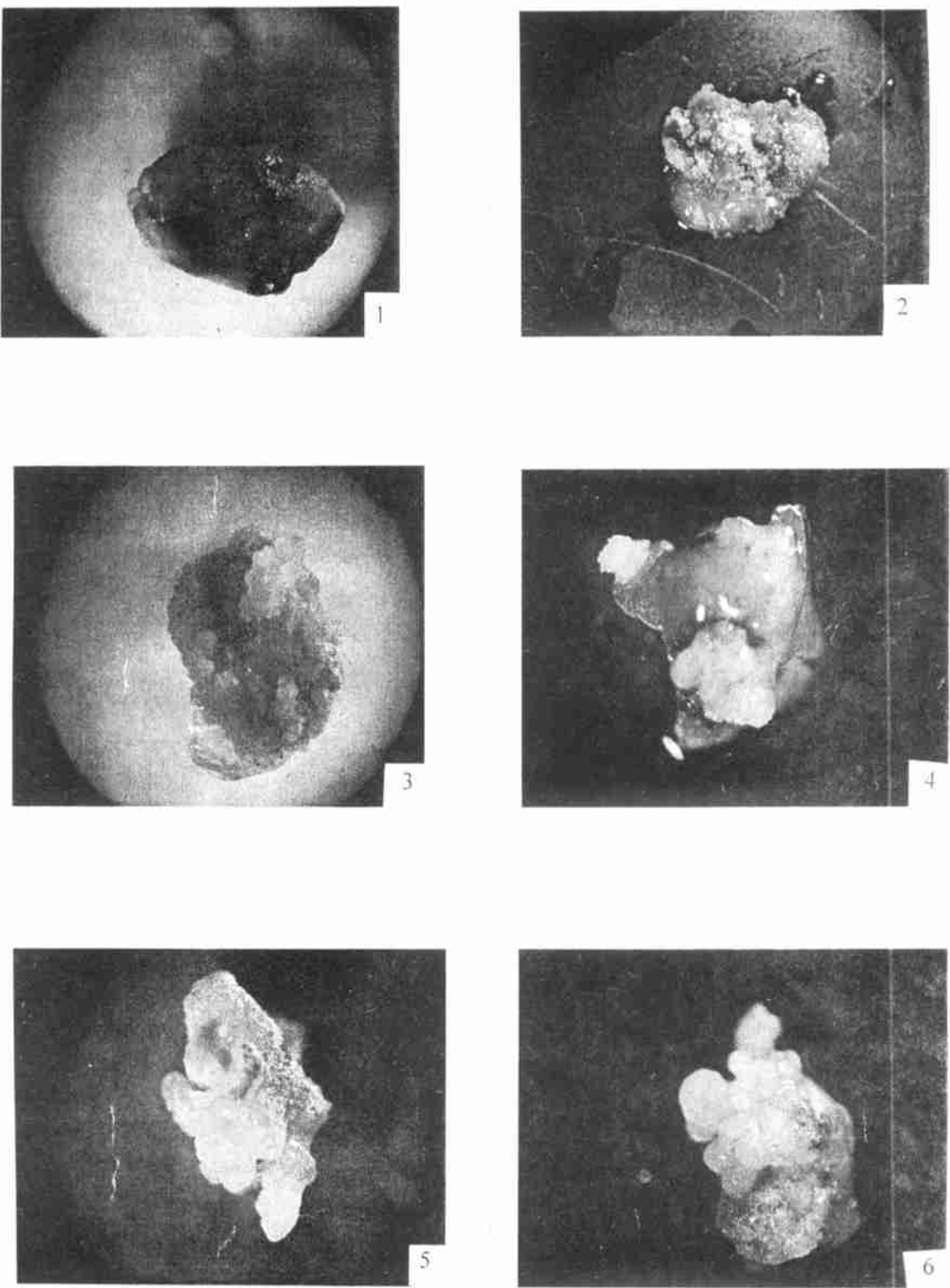
SOMATIC EMBTYOGENESIS FROM IMMATURE COTYLEDONS AND ANALYSIS OF CORRELATIVE FARONOMIC CHARACTERS

Wu Chao Wu Tianlong

(Shanghai Jiaotong University Shanghai 201101)

Abstract In this article, much work has been done for studying the strain of soybean, totally including 10 varieties from the three provinces of north—east China and Yangtze river area. Somatic embryogenesis was induced by immature cotyledons in Ms medium containing 2, 4—D(40mg/L) for four weeks and then transferred to the Ms medium containing 2, 4—D(20mg/L) for another four weeks. The relationship of agronomic characters and frequency of callus and somatic embtyogenesis was studied. The result showed that the 100—seed weight is significant positively correlated with the size of the explant ($r=0.989593$), and the effect of them to the embryogenesis are all significant. The effect of growing stage and the time of the choice of explant is significant also, and the correlation between them is significant positively ($r=0.964764$). The scope in the choice of explant can be decided according to the agronomic characters of different genotype soybeans.

Key word Somatic Embryogenesis; 100—seed weight; Growing stage; Choice of explant



1 未出愈伤的子叶外植体; 2 不易形成体细胞的愈伤组织; 3. 较易形成体细胞的愈伤组织; 4 未形成细胞团的体细胞;
5. 6 体细胞形成较多的外植体

1 Non-callus explant; 2 Callus which difficult to get somatic embryo; 3 Highly-embryogenic callus; 4 Moderately-embryogenic with few somatic cells; 5. 6 Highly embryogenic explant