

# 影响大豆体细胞胚萌发率的因素<sup>\*</sup>

王晓春<sup>1</sup> 刘尚前<sup>1</sup> 季 静<sup>2</sup> 王 萍<sup>2</sup>

(1. 河北北方学院农业科学系, 宣化 075131; 2. 中国人民解放军军需大学, 长春 130062)

**摘要** 研究了影响大豆体细胞胚萌发率的几种因素。结果表明, 基因型间、培养基间大豆体细胞胚的萌发率差异达显著水平; 同一大豆品种, 体细胞胚形态正常以及培养基中添加高浓度的蔗糖和活性炭均可以提高大豆体细胞胚的萌发率。

**关键词** 大豆; 体细胞胚; 萌发率

**中图分类号** S 565. 103. 53 **文献标识码** A **文章编号** 1000—9841(2004)02—0151—04

大豆是世界上重要的油料作物, 也是植物蛋白的主要来源, 随着生物技术的发展, 大豆的基因工程育种也取得了一定的进展, 而高频、高效的大豆再生体系是大豆遗传转化的基础, 大豆再生的途径很多, 所用的外植体也相当多, 而体细胞胚胎发生系统是基因枪和农杆菌转化的最适宜的受体系统, 但是此系统诱导出的体细胞胚, 有的不能萌发, 有的畸形很多, 不能发育成正常植株, 而且体细胞胚多次继代以后胚性可能丧失以及体细胞变异等问题可能造成萌发率和再生率下降, 使大豆的遗传转化受到限制。而大豆体细胞胚萌发率的高低是影响大豆植株再生的关键, 也是制备高质量大豆人工种子(体细胞胚外面包上人工胚乳和人工种皮, 就可以制备人工种子)的关键。以往对大豆体细胞胚的研究大多集中于诱导因素上, 而对其萌发率进行的研究相当少, 关于此方面的研究, 仅见曲桂芹做过类似的报道。

本研究对大豆体细胞胚萌发率的影响因素进行了探讨, 以期确立高效、高频、稳定的大豆体细胞胚胎发生再生体系和遗传转化体系提供实验依据和理论指导, 进而为原生质体培养、人工种子制作、优良无性系的繁殖、基因导入、突变体筛选、常规良种繁育等提供良好的实验体系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为中国人民解放军军需大学植物基因

工程中心提供的主栽大豆品种合丰 25、东农 L13、东农 40、黑农 40、黑农 35、CH 21141、Progress 的体细胞胚。

### 1.2 方法

经过继代增殖 5 代的大豆品种合丰 25、东农 L13、东农 40、CH 21141、Progress 的体细胞胚团块, 分割成直径为 3 mm 左右, 接种于 6 种萌发培养基分别为 P1、P2、P3、P4、P5、P6 成分分别为 MS+0.8% 琼脂+30% 蔗糖+0.05 mg/L IBA+0.05 mg/L KT; MS+0.8% 琼脂+30% 蔗糖+0.1 mg/L IBA+0.1 mg/L KT; MS+0.8% 琼脂+10% 蔗糖+1% 活性碳; MS+0.8% 琼脂+30% 蔗糖+0.05 mg/L IBA+0.05 mg/L KT+0.05 mg/L GA3; MS+0.8% 琼脂+10% 蔗糖+0.5% 活性碳; MS。灭菌前 pH 调为 5.8, 每个处理接种四瓶, 每瓶 15 块, 每天光照 16 小时, 温度 25℃, 3—15 天内调查萌发时间、萌发率、观察体细胞胚的形态。萌发按照 Buchheimd 的定义(初生根出现, 子叶由白变绿, 第一对真叶出现)。体细胞胚的形态按照 Lazzeri 的标准(有明显的苗端和根端, 并至少有一个确定子叶的体细胞胚为正常的体细胞胚; 而对于无明显的苗端, 无子叶或丛生子叶的体细胞胚为不正常的体细胞胚。

## 2 结果与分析

不同基因型不同培养基大豆体细胞胚的萌发率取平均值见表 1、方差分析结果见表 2。结果表明基

\* 收稿日期: 2003—12—21

基金项目: 本研究由“国家植物转基因技术研究开发与中试基地建设”专项课题(J99—B—001)资助

作者简介: 王晓春(1971—), 女, 讲师, 硕士, 现从事作物栽培与遗传育种工作与研究。

因型间、培养基间大豆体细胞胚的萌发率差异达显著水平。

2.1 不同培养基对大豆体细胞胚的萌发率的影响

不同培养基对大豆体细胞胚的萌发率的影响见表1。可以看出,各种基因型都在P3培养基上萌发率最高,而且萌发速度也快,其次为P5。这与活性炭的存在有关,也与蔗糖浓度大有关;而在培养基P1,P2,P4(均为含有激素的培养基)与P6比较萌发率没有太大的差别,并且在这几种培养基上萌发比较晚,速度慢,这一结果与曲桂芹报道的大豆体细胞胚的萌发率与速度受培养基中激素浓度变化影响小。

表1 不同基因型不同培养基大豆体细胞胚的萌发率(%)

基因型	培养基					
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
东农 40	37.5	40	50	22.5	25	25
东农 L13	50	55	82.5	65	80	67.5
CH21141	32.5	45	75	30	70	45
Progress	37.5	42.5	65	50	60	35
合丰 25	40	40	62.5	47.5	50	45

表2 不同基因型不同培养基大豆体细胞胚的萌发率方差分析

差异源	SS	df	MS	F	F0.05
培养基	3363.33	4	840.83	11.25	2.87
基因型	2823.54	5	564.71	7.56	2.71
误差	1494.18	20	74.71		
总计	7681.04	29			

2.2 活性炭对大豆体细胞胚的萌发率的影响

培养基中添加活性炭,接种5天以后很快萌发。各种基因型都在P3培养基上萌发率最高,而且萌发速度也快,其次为P5。这与活性炭的存在多少有关。培养基中活性炭存在多,则萌发率高,正常胚也多,并且萌发时体细胞胚的胚轴伸长并长出叶片。而没有活性炭的培养基萌发比较晚,速度慢,萌发率低,而且一部分体细胞胚胚轴短粗,生长点被包围,不能生长叶片,成为畸形胚。

活性炭主要起吸附用,既能吸附有害物质,又能吸附有益物质。刘用生等研究表明,1mg/L活性炭大约能吸附100 $\mu$ g左右的生长调节物质。随着体细胞胚的生长,活性炭吸附的营养物质被吸收,活性炭

吸附的营养物质逐渐释放供给大豆生长,因此萌发率较高,而且萌发速度也快,正常胚也多,畸形胚少。而没有活性炭的培养基则营养物质随着体细胞胚的生长,营养物质逐渐减少,造成胚轴开始分裂过快,以后生长成为畸形胚。本研究发 现体细胞胚萌发以后,要适时的将已经发育的苗转到无活性炭的培养基上,才能加快苗的发育,否则已经萌发的苗生长发育迟缓甚至停止生长。

2.3 蔗糖浓度对大豆体细胞胚的萌发率的影响

以在各种培养基上萌发率都高的基因型东农L13为例,比较P3与P6,蔗糖浓度对大豆体细胞胚的萌发率的影响,实验中发现,P6(3%蔗糖)上的大豆体细胞胚成熟以后,颜色多为鲜绿,或者局部仍然保持绿色,体细胞胚大小未变;而P3(10%蔗糖)上的大豆体细胞胚成熟以后与P6比较,相似之处是体积未变,只是大豆体细胞胚成熟以后,颜色明显的由原来的绿色全变为黄白色。比较P3与P6,东农L13在P3上的萌发率(82.5%)明显高于P6(67.5%),这除了受活性炭的影响外,也受蔗糖浓度的影响,蔗糖浓度影响渗透压,提高蔗糖浓度则渗透压提高,从而引起细胞生理生化指标的变化,细胞失水,使细胞的内含物升高,细胞活力增强,而直接影响大豆体细胞胚的萌发率。这一想象在玉米、胡萝卜、松柏中得到证实,这个结果与曲桂芹报道的蔗糖浓度对大豆体细胞胚的萌发率无影响的结果不同。

2.4 基因型对大豆体细胞胚的萌发率的影响

基因型对大豆体细胞胚的萌发率的影响结果见图1。可以看出,基因型东农L13在各种培养基上萌发率最高,东农40(除了P1外)最低。

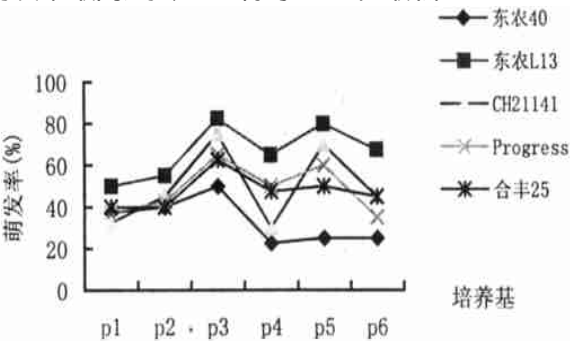


图1 基因型对大豆体细胞胚的萌发率的影响

Fig.1 The effect on different genotypes of soybean to germination frequency of somatic embryo o

在含有活性炭的培养基上P3和P5各种基因型萌发率大小顺序有相同的规律,分别为东农L13、CH21141、Progress、合丰25、东农40。

在培养基P1,P4(含有激素)上萌发率大小顺序

有相同的规律, 萌发率大小顺序分别为东农 L13、Progress、合丰 25、CH21141、东农 40; 而在培养基 P6 上萌发率大小顺序分别为东农 L13、CH21141、合丰 25、Progress、东农 40。

含有激素的培养基如 P1、P2、P4 与 P6(Ms) 比较, 激素对大豆体细胞胚的萌发率的影响不大。这一点与 Barley 研究的结果相同。

### 2.5 体细胞胚的形态对萌发率的影响

体细胞胚分为正常与不正常两类, 正常的体细胞胚萌发率平均为 54%, 明显高于不正常的体细胞胚的萌发率 3.8%。正常的体细胞胚单子叶或双子叶, 再生频率明显高于不正常体细胞胚, 萌发成熟以后体细胞胚的子叶由黄白灰复为绿色, 10 天以后可以看见胚轴和胚根, 以后真叶逐渐长出, 真叶的形成分为两种方式: 体细胞胚上胚轴生长很快, 顶端为未展开两片真叶, 随着生长, 在腋芽处长出叶片; 体细胞胚上胚轴不明显, 几片真叶簇生在一起, 或节间很短, 每个节间处都有腋芽, 这种再生是小植株很快衰老变黄脱落。不正常的体细胞胚萌发以后胚根出现, 胚轴伸长, 但是多数无芽端生长点, 不能萌发为正常植株, 只有少数可以长出苗端, 形成植株。

## 3 讨论

大豆体细胞胚萌发率和再生率低, 是限制大豆植株再生的关键。大豆植株再生一方面受到基因型的影响, 刘博林认为大豆种质中存在着植株容易再生的相关基因或基因群, 这类基因的分离以及作用机理的阐明, 有利于提高植株再生率; 另一方面, 与体细胞胚的状态有关, 体细胞胚正常则萌发率高, 再生频率高。所以经过改变条件, 提高正常胚数, 从而提高萌发率和再生率。大豆体细胞胚萌发后的成熟胚畸形较多, 很难发育成小植株, 进行改良后能否转换成正常胚, 从而提高萌发率及再生率有待研究。

很多人认为组织培养中, 基因型的影响比培养基更为重要。本研究表明, 基因型和培养基同样重要。培养基中活性碳的存在对大豆体细胞胚的萌发

起重要作用, 各种基因型萌发速度快, 萌发率高, 正常胚率高, 但是在后期体细胞胚成熟以后, 再生小植株生长速度明显减慢。因此, 作者认为, 1 个月以前, 大豆体细胞胚先在含有活性碳的培养基上培养, 能提高其萌发率以及正常胚率, 萌发成小苗后然后转移到无活性碳的培养基, 又能提高其再生速度。这与很多人的研究结果不同。这一点对于通过转基因技术选育新品种来说, 可以大大缩短育种进程。

提高蔗糖浓度能够提高渗透压, 从而提高大豆体细胞胚的萌发、再生率, 是否其它的渗透调节物质也能够提高萌发率, 需进一步研究。

本实验所用的大豆体细胞胚是经过继代增殖的, 继代次数越多, 细胞是否会发生变异, 以及是否影响萌发率和再生率有待于进一步研究。

## 参考文献

- 1 曲桂芹, 张贤泽. 大豆体细胞胚的成熟处理及植株再生[J]. 东北农业大学学报, 2002, 33(1): 82—89.
- 2 刘用生. 植物组织培养中活性炭的使用[J]. 植物生理学通讯, 1994, 30(3): 214—217.
- 3 刘艳芝, 赵桂兰. 大豆幼胚子叶诱导胚胎发生[J]. 吉林农业科学, 1999, 24(6): 16—18.
- 4 周思军, 李希臣, 刘昭军, 等. 大豆农杆菌介导转化系统的优化研究[J]. 东北农业大学学报, 2001, 32(4): 313—319.
- 5 吴颖, 王萍, 王军军, 等. 农杆菌介导法进行大豆转基因的培养基研究[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(3): 20—21.
- 6 张贤泽. 大豆原生质体经体细胞胚再生植株[J]. 中国科学(B 辑), 1993, 23(1): 154—158.
- 7 程林梅. 基因型和激素浓度对大豆植株再生的影响[J]. 植物学通报, 2001, 18(3): 367—370.
- 8 王傲雪. 植物胚状体的诱导研究及应用[J]. 黑龙江农业科学, 1999, 2: 39—42.
- 9 白淑霞, 刘立秋, 陈文龙. 植物人工种子高质量体细胞胚胎发生的研究[J]. 河北农业大学学报, 1998, 21(1): 20—23.
- 10 Sato S, C Newell, K Kolacz et al Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems[J]. Plant Cell Rep. 1993, 12: 408—413.
- 11 Cheng TY, H Saka, TH Voqui—Dinh. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture[J]. Plant Sci. Lett. 1980, 19: 91—99.

## THE AFFECT FACTORS ON THE GERMINATION FREQUENCY OF SOMATIC EMBRYOS OF SOYBEAN

Wang Xiaochun<sup>1</sup> Liu Shangqian<sup>1</sup> Ji Jing<sup>2</sup> Wang Ping<sup>2</sup>

(1. *Department of Agronomy, Hebei North University, Xuanhua 075131;*  
2. *Changchun University of Agricultural and Animal Science, Changchun 100062*)

**Abstract** The affect factor on the germination frequency of somatic embryos of soybean was syudied. The result showed that there were significant difference on different genotypes of soybean and different media of germination; among Normal somatic embryos of soybean, active carbon and cane sugar with high concentration in the media mijht in crease the germination prequency.

**Key words** Soybean; Somatic embryos; The germination frequency