

大豆体细胞胚再生体系的研究进展及展望^{*}

张淑珍¹ 徐鹏飞¹ 林世锋¹ 李文滨^{1 * *} 杨传平²

(1. 东北农业大学大豆研究所, 哈尔滨市 150030; 2. 东北林业大学林学院, 150040)

摘要 介绍了植物体细胞胚的来源及其再生特点; 从外植体种类、基因型、激素种类和浓度、取材大小和时间、组织学研究等方面阐述了大豆体细胞胚再生体系的研究进展; 通过其他作物体细胞胚再生体系发生机理及分子基础的研究, 提出了关于大豆体细胞胚再生体系的几点展望。

关键词 体细胞胚; 大豆; 再生体系

中图分类号 S 565. 1 **文献标识码** A **文章编号** 1000—9841(2004)03—0232—04

大豆作为重要的粮食和油料作物, 其再生体系的建立受到了广泛的重视。大豆的再生体系主要包括: 不定芽器官发生途径、体细胞胚胎发生途径、原生质体途径、花粉、花药途径。本文主要从外植体种类、基因型、激素种类和浓度、取材大小和时间、组织学研究等方面阐述了大豆体细胞胚再生体系的研究进展并通过介绍其它作物体细胞胚再生体系发生机理及分子基础, 提出了关于大豆体细胞胚再生体系研究的几点展望。

1 植物体细胞胚的来源及其再生特点

植物体细胞胚的概念源于 Haberlandt 于 1902 年提出植物细胞具有全能性, 即每一个细胞都能不断分裂, 进而分化形成完整的植株。最早研究胚状体发生要属美国的 Steward(1958)和德国的 Reinert(1959)利用胡萝卜贮藏根组织作培养材料, 首先观察到来自体细胞组织的胚的启动和发育过程。此后, 植物学家对体细胞胚的发生机理进行了广泛的研究, 已在 100 多种植物中得到了体细胞胚胎, 并在许多珍稀或重要树种上实现了体细胞工程育苗的产业化^[1]。植物体细胞胚胎发生技术不仅成为植物快速繁殖的最重要的手段, 而且已发展成为植物胚胎发生机理、遗传转化的重要系统。

植物愈伤组织在适宜条件下, 可以进行形态发生, 并再生成完整植株。其形态发生途径有两条, 一

是器官发生, 形成单级性的不定芽或不定根, 然后在芽下方形成不定根或在不定根上方形成不定芽, 在二者之间发育出微管组织, 形成完整植株。另一途径是体细胞胚的发生, 这一过程与有性合子胚的发育相似, 体细胞胚可能来源于单个体细胞, 体细胞胚形成后再分化出胚芽和胚根, 然后在适宜条件下再生植株。对于胚状体再生, 它主要有两个特点: 一是两极性, 即在其发生的最早阶段就具有根端和芽端; 其二是它与外植体的维管束系统无直接联系, 具有完整植株特性, 在适宜条件下可长成一个独立的有苗端和根端的植株。相比于器官发生途径, 体细胞胚胎发生具有数量多, 速度快, 结构完整, 再生率高等优点, 而且为研究植物细胞的分化、发育、全能性表达和遗传转化、突变体筛选提供了良好的基础, 因而受到了研究者的重视。

2 大豆体细胞胚胎发生再生体系的研究进展

作为世界上主要的粮食和油料作物以及重要的植物蛋白质来源的大豆(*Glycine max*)因其愈伤组织难以分化、原生质体再生困难等因素, 其再生体系一直不够完善^[2]。

大豆体细胞胚胎发生再生系统是目前大豆再生系统研究的另一个重要部分。国内早在 70 年代吉

* 收稿日期: 2004—05—08

基金项目: 本研究得到黑龙江省博士后基金(LBR0092)资助

* * 通讯作者

作者简介: 张淑珍(1972—), 博士, 现在东北林业大学博士后流动站工作, 从事大豆遗传育种工作。

林省农科院等^[3]对大豆子叶、叶、茎和胚轴做了组织培养,发现在大豆不同组织离体培养中,子叶和下胚轴的愈伤组织产生较快。Kimball (1973)^[4], Beveresdorf (1977)^[5], Gamborg et al (1983)^[6] 和 Lippmann (1984)^[7] 获得了鱼雷期胚状体而未进一步再生植株。第一个真正的经大豆体细胞胚胎发生途径获得再生植株的是 1983 年 Christian^[8] 的研究,他们以未成熟胚的胚轴为材料,用改良的 MS 培养基附加 2,4-D 诱导出体细胞胚胎的发生。1986 年 Barwale^[9] 等报道了通过体细胞胚获得植株再生。大豆体细胞胚胎再生体系获得了初步成功,此后,有研究对影响大豆体细胞胚胎发生的主要因素如外植体种类、基因型、取材大小及时间、激素种类和浓度等因素进行了探讨。

2.1 外植体种类

在大豆中经体细胞胚胎发生再生植株常用的外植体有:未成熟子叶、未成熟胚和下胚轴等。Yue—Sheng Yang (1990)^[10] 研究适宜体细胞胚胎发生的外植体。结果表明未成熟胚是理想的试材,并获得了再生植株。王萍 (2002)^[11] 选取吉林 35 大豆无菌苗的真叶、子叶节和下胚轴以及未成熟子叶为外植体诱导体细胞胚胎发生,结果表明以无菌苗的真叶、子叶节和下胚轴为外植体在诱导培养基上产生了体细胞球形胚的结构,但这些球形胚均未进一步萌发。而以未成熟子叶为外植体获得了体细胞胚胎途径再生植株。

2.2 基因型

不同基因型体细胞胚胎发生频率不同,这在许多研究中都有表现。Ranch et al (1985)^[12], Komatsuda et al (1988)^[13], Parrott et al (1989)^[14], Komatsuda et al (1990)^[15], Komatsuda et al (1991)^[16], 周思君等 (1992)^[17], LN Tian et al (1994)^[18], Jia Li et al (1996)^[19], 刘艳芝等 (1999)^[20] 进行了大豆体细胞发生途径再生的基因型筛选工作,大部分获得了再生植株。笔者于 2003—2004 年以黑龙江省 30 个主栽大豆品种的未成熟胚为试材进行体细胞胚发生途径的基因型筛选,初步确定了东农 46、东农 47 和东农 42 以及黑农 42 为较理想的大豆基因型。

2.3 激素种类和浓度

通常诱导胚胎发生的植物激素为 2,4-D, 5mg—10mg/l (Ranch, 1985^[21])。在诱导出体细胞胚后,体细胞胚可以被保持在一种持续扩增状态,因此可以获得大量外植体,当外源生长素降低到一定水平

时,初生胚和次生胚将开始组织分化达到子叶型胚阶段,而后开始一段胚的成熟期,由体细胞胚发育成植株是通过体细胞胚胎发生途径再生的最后一个阶段,这一阶段是以体细胞胚分化出顶芽和根为特征,而后芽和根开始生长,进而发育成完整的植株。体细胞胚胎的萌发和形态的转化通常不需要添加外源生长调节剂 (Parrott, 1988^[22]),但是体细胞胚在萌发之前必须经过一段时间的生理成熟期,因此,在体细胞胚胎发生再生系统中就需要有一系列的不同的培养基,用以满足体细胞胚不同发育阶段的需要。周思君等 (1989)^[23] 利用 MS 附加高浓度 2,4-D 或 NAA 也成功地获得了再生植株,将体细胞胚转向发芽培养基时,用 1MS+蔗糖 1%, 2MS+2BA (0.1 ppm)+GA (0.1 ppm),两种培养基都能使成熟体细胞胚发芽。周思君等 (1992)^[17]、刘艳芝等 (1999)^[20]、王萍 (2002)^[24] 研究结果表明在诱导大豆未成熟子叶体细胞胚胎发生时,在 MS 培养基上附加高浓度的 2,4-D 可大大提高诱导率。

2.4 取材大小和时间

Barwale (1986)^[25] 研究表明幼胚 4mm—7mm 的长度诱导体细胞发生效果最好。其中一个栽培种 William82 可达 65%,其他可达 30%—65%。刘艳芝等 (1999)^[20] 认为以未成熟幼胚为外植体进行体细胞胚胎发生时,应选择同一植株上最先结的荚,幼胚长度长径在 3mm—5mm,最多选 3 次接种。否则,既使幼胚长度符合要求但胚胎发生能力降低而无法诱导萌发。

2.5 组织学研究

Barwale (1986)^[25] 研究表明幼胚在鱼雷胚期容易被从其它组织中分离出来,经组织学研究表明这些体细胞胚都不具合子胚所具有的顶端分生组织,但当转移到无激素的培养基上时,这些胚状体确实能产生芽体并形成完整植株。

2.6 其它因素的探讨

Wenbin Lee et al (1992)^[26] 将培养基的 pH 值调至 7.0 诱导大豆体细胞胚胎发生获得成功。随后, Bailey et al (1993)^[27], Jia Li et al (1996)^[19] 也以 pH 值 7.0 的培养基成功获得了再生植株。Santos et al (1997)^[28] 研究了乙炔抑制剂对大豆体细胞胚胎再生的影响;还有学者对光照、切割方法以及接种方式进行了研究。

3 大豆体细胞胚研究展望

大豆的组织培养和再生体系的建立经历了艰难的历程。目前,大豆未成熟子叶体细胞胚胎发生途径这个再生体系基本建立起来,这为大豆转基因工作的开展奠定了良好的基础。但该再生体系与其它作物的体细胞胚胎再生的研究还有一定的距离,主要表现在以下 2 个方面。

3.1 大豆体细胞胚再生体系发生机理还需探讨

与一些作物相比,大豆体细胞胚再生体系发生机理还不甚明了。而其它作物体细胞胚再生体系发生机理已经取得了一定进展。

植物体细胞胚发生过程中的细胞生物学研究是了解体胚发生的重要研究方法。在细胞生物学方面:体胚发生的细胞生物学研究主要通过石蜡切片技术、超微切片技术和组织化学研究方法研究体细胞胚胎发生过程中的形态学建成,观察体细胞胚的发育过程,分析胚胎发生过程中的细胞化学变化^[29]。石蜡切片技术、超微切片技术和组织化学在以小麦^[30]、党参^[31]、石刁柏^[31]等为材料,证明了胚状体的单细胞起源学说,揭示了愈伤组织向体胚发生转化时细胞内部结构的变化以及胚性细胞发育过程中糖类、蛋白质和核酸等大分子的代谢情况。水稻^[32]体胚发生过程中主要生化代谢物质的变化也有一些报道。揭示了体细胞胚与合子胚的某些相似生化特性以及诱导愈伤组织生长状态变化的生化基础。

3.2 大豆体细胞胚再生体系分子基础还需研究

植物通过体细胞胚胎发生途径形成再生植株已是及其普遍的现象,这一发育途径为研究植物细胞的分化、发育、全能性表达和作物品种改良、突变体筛选等提供了良好的实验体系,在理论上和应用中都具重大意义^[33,34]。体细胞分化为胚性细胞是受细胞内外多种因子所调控,其中最重要的是受特定基因的调控,在胚性细胞的分化过程中伴随着特定的遗传信息表达,其分化过程的实质是基因按顺序表达调控,是相应基因产物作为胚性细胞形成的分子基础。

在体胚发生的分子生物学研究方面,国内外学者也做了大量的工作。在玉米、枸杞、胡萝卜、苜蓿、烟草等作物上取得了较大进展。通过比较体细胞胚胎和愈伤组织的基因和蛋白质表达情况,已经从发育中的胚状体中得到一些基因,其中部分基因正被用来研究体胚发生中的基因调控机制。研究的比较清楚的有以下几种基因:编码晚期胚胎发生丰富蛋白基因、体细胞胚胎分泌蛋白基因、脂体跨膜蛋白基

因、与翻译有关的延伸因子 EF 1 的基因和 ATP 合成酶亚基的基因、另外还有体胚发生中的“非胚性基因”等^[35]。

大豆体细胞胚再生体系虽然取得了一定进展,但与其它作物尤其是模式作物相比,其发生机理及分子基础还需探讨,由于大豆体细胞胚的发生、发育过程是受细胞内外多种因子所调控,各种因子的影响最终都是从转录、转译、转译后加工等水平上调节胚胎发生,因此对调控因子和调控分子机理等有待深入的研究,最终揭示大豆体细胞胚发生这一特定细胞分化过程的本质。

参 考 文 献

- 1 施季森. 迎接 21 世纪现代林木生物技术育种的挑战[J]. 南京林业大学学报, 2000, 24(1): 1—6
- 2 周思君. 大豆抗虫基因转移及其转化系统优化研究[D]. 东北农业大学博士论文, 2000, 1
- 3 吉林省农业科学院作物育种所大豆组织培养组. 从大豆下胚轴愈伤组织诱导植株成功[J]. 植物学报, 1976, 18(3): 258—262
- 4 Kimball SL., E. T. Bingham. Adventitious bud development of soybean hypocotyl sections in culture[J]. Crop Science, 1973, 13: 758—760
- 5 Beversdorf WD, Bingham ET. Degrees of differentiation obtained in tissue cultures of *Glycine* species[J]. Crop Science, 1977, 17(3—4): 307—311
- 6 Gamborg OL, Davis BP, Stashlhut RW. Cell division and differentiation in protoplasts from cell cultures of *Glycine* species and leaf tissue of soybean[J]. Plant Cell Reports, 1983, 2: 213—215
- 7 Lippmann Barbel, Lippmann Gunter. Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean, *Glycine max* L. merri[J]. Plant Cell Reports, 1984, 3: 215—218
- 8 Christianson ML, DA Warnick, PS Carlson. A morpho—genetically competent soybean suspension culture[J]. Science, 1983, 222: 632—634
- 9 Barwale UB Kems Hr, Widholm JM. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis[J]. Planta, 1986, 167: 473—481
- 10 Yue—Sheng Yang, Kiyomi Wada, Yuzo Futsuhara. Comparative studies of organogenesis and plant regeneration in various soybean explants[J]. Plant Science, 1990, 72: 101—108
- 11 王萍. 大豆组织培养体系优化与双价抗虫基因遗传转化研究[D]. 东北农业大学博士论文, 2002, 23
- 12 Ranch JP, Oglesby L, Zielinski AC. Plant regeneration from embryo—derived tissue cultures of soybeans[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 1985, 21(11): 653—658
- 13 Komatsuda T, Ohyama. Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean *Glycine max* [J]. Theor Appl Genet, 1988, 75: 695—700
- 14 Parrott WA, William EG, Hildebrand DF, et al Recovery of primary transformants of soybean[J]. Plant Cell Reports, 1989, 7: 615—

15 Komatsuda Takao, Ko Su—Wan. Screening of soybean (*Glycine max* (L.) Merril.) genotypes for somatic embryo production from immature embryo[J]. Japan. J. breed. 1990 40(2): 249—251

16 Komatsuda Takao, Kaneko Kazuhimko, Oka Seibi. Cell biology and molecular genetics genotype× sucrose interactions for somatic embryogenesis in soybean[J]. Crop Sci., 1991, 31: 333—337

17 周思君, 尹光初, 雷勃钧, 等. 大豆体细胞胚胎发生影响因素的研究[J]. 植物学通报, 1992, 9(2): 38—43

18 LN Tian, Brown DCW, Voldeng H et al J. In vitro response and pedigree analysis for somatic embryogenesis of long—day photoperiod adapted soybean[J]. Plant Cell. Tissue and Organ Culture 1994, 36: 269—273

19 Jia Li, Elizabeth A Grabau. Comparison of somatic embryogenesis and embryo conversion in commercial soybean cultivars[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1996, 44: 87—89

20 刘艳芝, 赵桂兰, 刘莉, 等. 大豆幼胚子叶诱导胚胎发生[J]. 吉林农业科学, 1999, 24(6): 16—18

21 Ranch JP, Oglesby L, Zielinski AC. Plant regeneration from embryo—derived tissue cultures of soybeans[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 1985, 21(11): 653—658

22 Parrot WA, Dryden G, Vogt S, et al. Optimization of somatic embryogenesis embryo germination in soybean[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 1988, 24(8): 817—820

23 周思君, 尹光初, 雷勃钧, 等. 从大豆幼胚诱导胚胎发生再生植株[J]. 大豆科学, 1989, 8(1): 39—45

24 王萍. 大豆组织培养体系优化与双价抗虫基因遗传转化研究[D]. 东北农业大学博士论文, 2002, 34

25 Barwale UB, Kerns HR, Widholm JM. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis[J]. Planta 1986, 167: 473—481

26 Wenbin Lee. Impact of plant growth regulators and pH on somatic embryogenesis and efficient plant regeneration in *Glycine tomentella* originated from South China[J]. Soybean Genetics Newsletter, 1992, 19(4): 46—51

27 Bailey MA, Boerna HR, Parrot WA. Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean[J]. In Vitro Cell Development Biology, 1993, 29: 102—108

28 Santos KGB, Mundstock E, Bodanese—Zanettni MH. Genotype—specific normalization of soybean somatic embryogenesis through the use of an ethylene inhibitor[J]. Plant Cell Reports 1997, 16: 859—864

29 陈金慧, 施季森, 诸葛强, 等. 植物体细胞胚胎发生机理的研究进展[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2003, 27(1): 75—80

30 王亚馥, 崔凯荣, 汪丽虹, 等. 小麦体细胞胚胎发生超微结构研究[J]. 植物学报, 1994, 36(6): 418—422

31 汪丽虹, 王星, 崔凯荣, 等. 石刁柏及党参体细胞胚胎发生中的淀粉代谢动态[J]. 植物学通报 1996, 13(1): 41—45

32 徐竹筠, 王彤宇, 何美瑛, 等. 水稻离体体细胞胚与合子胚的某些生化特性的比较[J]. 植物生理学报, 1995, 21(1): 95—102

33 王亚馥. 小麦组织培养中体细胞胚胎发生的细胞胚胎学及淀粉消长动态的研究[J]. 实验生物学报, 1993, 26(3): 259—267

34 崔凯荣. 植物体细胞胚发生研究的一些现状[J]. 植物学通报, 1993, 10(3): 14—20

35 Mau SL. Cloning of facarnot cDNA foramenber of the family of ADP—ribosylation factors and characterization of the binging of nucleotides by its product after expression in E—coli[J]. Plant Journal, 1995, 8: 269—281

RECENT ADVANCES AND PROSPECT ON SOYBEAN SOMATIC EMBRYOGENESIS SYSTEM

Zhang Shuzhen¹ Xu Pengfei¹ Lin Shifeng¹ Li Wenbin^{1*} Yang Chuanping^{2*}

(1. Soybean Institute of Northeast Agricultural University, Harbin 150030;
2. Forestry College of Northeast Forestry University, Harbin 150040)

Abstract In this paper, the origination of plant somatic embryogenesis and its character were introduced; the recent advance of soybean somatic embryogenesis system from the point view of the kinds of explants, genotypes, hormone kinds and concentration, the size of the explants and the time for getting the explants, histology were expatiated; the prospects of soybean somatic embryogenesis was brought forward through the introduction of the formation mechanism and molecular basement of somatic embryogenesis of the other plants.

Key words Somatic embryogenesis; Soybean; Regeneration system