

# 大豆体细胞胚再生植株的研究<sup>\*</sup>

王晓春<sup>1,2</sup> 刘尚前<sup>2</sup> 王 罡<sup>1</sup> 季 静<sup>1</sup> 王 萍<sup>3</sup>

(1. 天津大学农业与生物工程学院, 天津 300072; 2. 河北北方学院南校区农业科学系, 河北宣化 075131;  
3. 淮海工学院海洋学院, 连云港 222005)

**摘要** 以球形期大豆体细胞胚为材料, 对其进行继代增殖、萌发及再生植株的研究。结果表明, 大豆体细胞胚每隔 15—20 天分割成 3mm 左右的小块在 MS 培养基附加 10—20 mg/L 2, 4-D 的固体培养基以及弱光条件下, 可以继续增殖, 继代增殖能力强, 扩繁系数为 3n (n 为继代培养次数); 大豆体细胞胚性组织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, 1 个月以后转移到无活性碳的培养基, 又能提高其再生速度以及再生率。

**关键词** 大豆; 体细胞胚; 再生植株

中图分类号 S 565. 103. 53 文献标识码 A 文章编号 1000—9841(2006)02—0149—04

大豆是世界上植物油料和植物蛋白的主要来源, 是我国主要农作物和经济作物之一。随着植物组织培养、分子生物学和植物转基因技术发展, 大豆的组织培养和遗传转化也相继获得成功, 如 1988 年 Hinchee 等<sup>[1]</sup> 用农杆菌介导法和 McCabe 等<sup>[2]</sup> 用基因枪法转化大豆, 首次获得大豆转基因植株。而任何成功的转化都依赖于高效的受体系统。大豆的组织培养开始于 1960 年, 由于再生频率低, 重复性差, 是公认的难转化作物<sup>[3]</sup>。大豆体细胞胚胎发生系统是基因枪和农杆菌转化的理想靶组织, 是大豆转化的最适宜的受体系统 (Sato 等<sup>[4]</sup>)。

大豆体细胞胚胎发生再生植株已经有许多报道, 采用了多种外植体, 主要为子叶节、胚轴、成熟胚等, 但是此系统再生频率低, 诱导出的体细胞胚畸形很多, 不能发育成正常植株, 而且体细胞胚团块继代增殖一直是难以解决的重大问题, 如果能够长期繁殖, 不仅避免了取材时间的限制, 而且对于种质的保存有重要的意义。因此, 完善的受体系统是实现基因转化的先决条件, 关系到基因转化的成败。

王萍等以大豆未成熟叶为外植体诱导产生大豆体细胞胚<sup>[5]</sup>, 并首次在固体培养基上多次继代增殖获得再生植株结荚<sup>[6]</sup>。本文在此基础上对东北地区目前生产上主栽的大豆品种体细胞胚的继代增殖与再生进行了研究 (体细胞萌发见另文报道<sup>[7]</sup>), 以期

为确立高效、高频、稳定的大豆体细胞胚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 (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) 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 供试材料

供试材料为以大豆未成熟叶为外植体诱导产生的大豆体细胞胚, 基因型分别为合丰 25、东农 L13、东农 40 和国外两个品种 CH21141、Progress, 由王萍老师和季静老师提供。

### 1.2 实验设计与方法

#### 1.2.1 大豆体细胞胚的继代增殖

诱导 30 ~ 60 天的五种基因型大豆的体细胞胚性组织, 分别接种到培养基 MS + 3% 蔗糖 + 0.8% 琼脂 + 2, 4-D (0, 5, 10, 20, 40, 60mg/L) 上, 重复 4 次, 自然光条件下培养, 比较不同 2, 4-D 浓度对大豆体细胞胚继代增殖的影响。

#### 1.2.2 大豆体细胞胚的萌发

\* 收稿日期: 2005—09—22

项目来源: 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 (1972—), 女, 讲师, 硕士, 主要从事作物栽培与遗传育种工作与研究。

通讯作者: 王罡, 男, 教授, 博士生导师。Wgtt2003@yahoo.com.cn

经过继代增殖 5 代的五种基因型大豆的体细胞胚团块,分割成直径为 3mm 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+0.05Mg/LIBA+0.05Mg/LKT; MS+0.8%琼脂+3%蔗糖+0.1mg/LIBA+0.1mg/LKT; MS+0.8%琼脂+10%蔗糖+1%活性碳; MS+0.8%琼脂+0.05Mg/LIBA+0.05Mg/LKT+3%蔗糖; MS+0.8%琼脂+10%蔗糖+0.5%活性碳; MS。灭菌前 pH 调为 5.8 重复 4 次,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。

1.2.3 大豆体细胞胚植株再生及移栽

由于体细胞胚具有两极性的优点,在萌发培养基上可以直接得到再生植株。得到的再生大豆再生小植株 2 个半月以后调查再生频率。然后以苗高 2cm 为衡量标准,调查植株在各种培养基上的生长速度。待小植株生长到 5cm 以上,根系充分发达,须根较多,在真叶生长健壮时,将瓶口敞开,注入浅层无菌水,练苗 3~5 天以后移出,冲洗干净根部的培养基,移栽入花盆中,上面再罩上透气的塑料罩,直到适应外界培养条件。

2 结果与分析

表 1 不同 2,4-D 浓度对大豆体细胞胚性组织增殖的影响(直径及状态)

Table 1 Proliferation of embryogenic tissue induced by different concentrations of 2,4-D

基因型 Genotype	2,4-D 浓度 (mg/L)					
	0	5	10	20	40	60
合丰 25 Hefeng 25	7 有愈伤白或绿已萌发	5.4 有愈伤,白或绿萌发率 10%	5.5 颜色鲜绿	5.1 颜色黄绿	4.4 颜色黄	4.0 黄褐色
东农 L13 Dongnong L13	11.3 大量愈伤少数萌发	6.7 无愈伤绿色萌发率 15%	6.2 鲜绿	5.3 黄绿	4.1 黄绿色	3.7 黄褐色
东农 40 Dongnong 40	7.5 大量愈伤少数萌发	6.4 无愈伤,绿色萌发率 15%	6.0 鲜绿	5.4 嫩绿	4.0 颜色黄	3.2 黄褐色
CH21141	7.6 大量愈伤大量萌发	6 愈伤占 85%鲜绿,不萌发	5.1 鲜绿	4.3 淡绿	3.9 黄绿	3.1 黄褐色
Progress	8.0 大量愈伤大量萌发	7.0 愈伤 85%,鲜绿,不萌发	6.7 鲜绿	6.3 鲜绿	4.5 黄绿	3.5 褐化严重

2.2 大豆体细胞胚的萌发

结果详见王晓春另文<sup>[7]</sup>报道。

2.3 大豆体细胞胚再生植株

2.1 大豆体细胞胚的继代增殖

大豆体细胞胚接种在含有不同浓度 2,4-D 的 MS 培养基继代 15 天的结果见表 1。在不加 2,4-D 的情况下,几种基因型的体细胞胚都能够萌发,并且都出现愈伤。基因型合丰 25、东农 40 和东农 L13 在 2,4-D 浓度 5mg/L 时,体细胞胚团均有 10%~15%左右萌发,而 CH21141 和 Progress 出现大量愈伤,但不萌发;10~20mg/L 2,4-D 的情况下几种基因型的体细胞胚团块增殖 2~3.5mm 左右,且体细胞胚状态好,颜色鲜绿;在加 20~60mg/L 2,4-D 的情况下,随着 2,4-D 浓度的增大,体细胞胚团块增殖体积与 10~20mg/L 2,4-D 相比,分别减少且体细胞胚逐渐变褐色,已经失去继代增殖和保存价值。因此,10~20mg/L 2,4-D 的浓度为体细胞胚团块能够增殖的最佳浓度。

大豆体细胞胚接种 60 天的结果与接种 15 天的结果比较,10~20mg/L 2,4-D 即体细胞胚团块能够增殖的最佳浓度对几种基因型的体细胞胚体积增殖不大,仅仅增加 1mm 左右。而将体细胞胚团每隔 15~20 天分割成 3mm 左右的小块进行继代培养,可以继续增殖,而且形成的体细胞胚团仍保持新鲜绿色的良好状态,继代增殖能力强,扩繁系数为 3n (n 为继代培养次数)。因此它是基因转化的良好受体。

继代 5 次的不同基因型不同培养基大豆体细胞胚,随机取子叶期体细胞胚(包括正常的和不正常的),每种基因型 200 个,我们调查了各种基因型在

萌发培养基上的再生情况见表 4。可见各种基因型在 P3 培养基上再生率最高平均为 52.1%~68%，大小依次为东农 L13、Progress、合丰 25、CH21141 和东农 40。实验中得到了正常的再生植株以及绿色的畸形苗和一些叶丛生结构体。李大伟曾报道实验中得到一些叶丛生结构体，但是顶端不伸长，仅仅有少数能够发育成植株，并认为解除培养物对顶端的抑制是获得大量植株的关键。我们在培养基中添加了活性炭能够解决这一问题，这与刘博林<sup>[8]</sup>报道的结果符合。在不含活性炭的培养基上(P1、P2、P4、P6)，正常植株率为 36.4%~57%；而在含活性炭<sup>[9]</sup>的培养基 P3 上正常株率为 53%~68%，但是生长速度慢，有的不正常植株在生长过程中逐渐变黄死亡。

表 2 不同基因型不同培养基再生植株

Table 2 Reproduce and normal frequency of different genotypes of soybean in different medium

基因型 Genotype	培养基 Media	再生植株 Regenerated plantlets	再生率(%) Regenerated Rate	正常植株率(%) Normal plantlets frequency
东农 40 Dongnong40	P1	72	36	37.7
	P2	83	41.5	36.4
	P4	76	38	58
	P6	95	42.5	39
	P3	102	51	59.3
东农 L13 Dongnong L13	P1	71	35.5	43.7
	P2	67	33.5	49
	P4	77	35.7	44
	P6	74	34.7	54.9
	P3	136	68	53
CH21141	P1	62	31	40.5
	P2	74	34.7	57
	P4	67	33.5	53
	P6	80	40	46.7
	P3	108	54	63
Progress	P1	74	34.7	38.6
	P2	94	47	44.7
	P4	110	55	53.3
	P6	99	49.5	55.6
	P3	120	60	52.1
合丰 25 Hefeng 25	P1	112	56	53.5
	P2	99	49.5	48
	P4	76	35.5	44.7
	P6	106	53	46
	P3	112	56	68

而在不含活性炭的培养基上则再生苗生长速度加快，在小苗生长期间，赶上甚至超过了含有活性炭的培养基。活性碳的存在对大豆体细胞胚的萌发起重要作用，多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（比其他的培养基慢 2 个月）。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，然后转移到无活性碳的培养基，既能提高其萌发率以及正常胚率，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。

2.4 再生小植株生长及移栽

再生的小植株需 15~30 天更换新鲜培养基培养，否则养分缺乏，有的植株真叶会逐渐缺绿变黄，最后发白枯死。待小植株生长到 5cm 以上，根系充分发达，须根较多，并且真叶生长健壮时，将瓶口敞开，注入浅层无菌水，练苗 3~5 天以后移出，冲洗干净根部的培养基，移栽入花盆中。移栽时的土壤基质以通气保湿为主，要避免病菌感染。移栽后最初的 10~15 天要罩上透明塑料罩，保持 90%~100% 的湿度，并在塑料罩上打些小孔以利于气体交换，直到适应外界培养条件。

3 讨论

大豆体细胞胚胎发生与否以及发生率的高低对大豆基因型有很大的依赖性<sup>[10~12]</sup>。因此，在大豆的组织培养中，应该注意基因型间的差异。大豆体细胞胚继代增殖一直是各国难以解决的重大问题，本研究以 10~20mg/L 较高的 2,4-D 浓度使大豆体细胞胚可以在固体培养基中长期继代增殖和保存，并可以萌发并再生植株，而 Finer 等(1988)<sup>[13]</sup>用大豆一个品种 Fayette 诱导体细胞胚胎发生后，用悬浮培养使胚性组织增殖，这一操作过程复杂，影响了该技术的应用，而在固体培养基中继代增殖和保存操作简单，非常容易，这一问题的解决为大豆的遗传转化提供了良好的受体材料，可以不受季节限制，大大缩短了育种进程。但是大豆体细胞胚多次继代增殖以后，细胞是否会发生变异以及萌发率和再生率是否会下降等问题有待于进一步的研究。

植株再生一方面受到基因型的影响，刘博林<sup>[8]</sup>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。大豆再生率的计算以最初的未成熟子叶作为衡量的标准要考虑未成熟子叶数、胚胎发生率、体细胞胚性组织诱导率、体细胞胚继代增殖次数、体胚萌发

率,还要考虑实验的不同阶段污染造成的损失等等。本文再生率以继代5次以后得到的子叶期大豆体细胞胚作为衡量的标准,再生率较低。因此标准不同,再生率不同。

## 参 考 文 献

- 1 Hinchey Maw, DVConner Ward, Ca Newell, et al. Production of transgenic soybean Plants using Agrobacterium-mediated DNA transfer[ J]. Bio/ Technol. 1988, 6(91): 2—5
- 2 McCabe DE, WF Swain, BJ Martinell et al. Stable transformation of soybean ( *Glycine max* ) by Particle acceleration[ J]. Bio/ Technol. 1988, 6(92): 3—6
- 3 周思军,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
- 4 Sato S, C Newell, K Kolacz, LTredo J Finer et al. Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems[ J]. Plant Cell Rep. 1993, 12: 408—413
- 5 Wang Ping, Wang Gang, Lu Wenhe, et al. Studies on the factors affection on somatic embryogenesis in soybean[ J]. Agricultural Sciences in China, 2002, 1(9): 960—964
- 6 Wang Ping, Wang Gang, Ji Jing, et al. A novel system for proliferation, maintenance and plantlet germination from somatic embryo of soybean[ J]. Acta Botanica Sinica, 2004, 46 (2): 154—158
- 7 王晓春,刘尚前,季静,等.影响大豆体细胞胚萌发率的因素[ J]. 大豆科学, 2004, 2: 151—154
- 8 刘博林.两个栽培大豆品种的体细胞胚胎发生和植株再生研究[ J]. 中国油料作物学报, 1999, 21(2):
- 9 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
- 10 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
- 11 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
- 12 王昱,王萍,吴颖.生长素诱导大豆未成熟子叶胚胎发生效应的研究[ J]. 吉林农业科学, 2002, 27(2): 7—10
- 13 Finer JJ, A Nagasawa. Development of an embryogenic suspension culture of soybean [ *Glycinemax* (L) Merrill] [ J]. Plant Cell Tissue Organ. Cult. 1988, 1(5): 125—136

## A STUDY OF SOYBEAN PLANT REGENERATION VIA SOMATIC TISSUE CULTURES

Wang Xiaochun<sup>1,2</sup> Liu Shangqian<sup>2</sup> Wang Gang<sup>1</sup> Ji Jing<sup>1</sup> Wang Ping<sup>3</sup>

(1. *Tianjin University of Agricultural and Biological Engineering Tianjin 300072;*

2. *Department of Agriculture sciences of Hebei North University, Xuanhua 075131;*

3. *Huahai Institute of Technology, Marine School, Lianyungang, 222005)*

**Abstract** The system of tissue culture were studied about sparsal somatic embryos of soybean, the media about the subculture, germination and regeneration were established. The result showed that the media for somatic embryogenesis proliferation was MS with 10~20mg/L 2, 4-D and weak light when they were divided into part somatic embryos with dismater 3mm every 15~20 day. The subculture efficiency reached 3<sup>n</sup>, ( "n" was the times of proliferation culture ), the germination frequency and normal somatic embryos frequency of soybean increased when active carbon was applied; when they were cultured one month under this condition, again they were transferred into the media without active carbon, the regeneration frequency and the regeneration speed of soybean increased.

**Key words** Soybean; Somatic embryos of soybean; Regeneration plants