

## 体细胞胚诱导条件优化及杂交后代再生遗传分析

宋晓慧<sup>1</sup>, 李冬梅<sup>1</sup>, 段莹莹<sup>1</sup>, 韩英鹏<sup>1</sup>, 李春光<sup>2</sup>, 李文滨<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>东北农业大学大豆研究所, 大豆生物学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030; <sup>2</sup>黑龙江省农垦科学院水稻研究所, 黑龙江佳木斯 154025)

**摘 要:**以北京小黑豆未成熟子叶为外植体, 针对影响体细胞胚发生的几个关键因素进行研究。结果表明: pH 等于 7, 外植体大小为 2~3 mm 和暗培养条件最适合体细胞胚的发生。利用优化后的再生系统诱导了北京小黑豆(再生性强)和 Keburi(再生性极低)杂交所衍生的 150 个 F<sub>5,6</sub> 重组自交系, 体细胞胚发生频率明显呈现间断分布, 由此初步推断大豆体细胞发生频率由少数几个基因控制。由体细胞胚发生效率分布偏向 Keburi, 可见 Keburi 对体细胞胚发生效率影响要比北京小黑豆大。

**关键词:**大豆再生; 未成熟子叶; 体细胞胚诱导; 遗传分析

**中图分类号:** S565.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-9841(2008)05-0751-04

## Optimization of Somatic Embryo Induction and Genetic Analysis of Offspring

SONG Xiao-hui<sup>1</sup>, LI Dong-mei<sup>1</sup>, DUAN Ying-ying<sup>1</sup>, HAN Ying-peng<sup>1</sup>, LI Chun-guang<sup>2</sup>, LI Wen-bin<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Soybean Research Institute, Key Laboratory of Soybean Biology of Chinese Education Ministry, Northeast Agricultural University, Harbin 150030; <sup>2</sup>Rice Research Institute of Land Reclamation Academy of Heilongjiang Province, Jiamusi 154025, Heilongjiang, China)

**Abstract:** With Peking immature cotyledon as explants, key factors that affecting somatic embryogenesis were evaluated. The results showed that pH = 7.0, explant size of 2-3 mm and dark culture conditions were beneficial for the occurrence of somatic embryogenesis, which was proved efficient for somatic embryogenesis. One hundred and fifty F<sub>5,6</sub> recombinant inbred lines derived from Peking × Keburi was cultured with inducing medium for embryogenesis. The results showed that frequency distribution was discrete, suggesting that embryogenesis was controlled by few genes. Meanwhile, the impact of Keburi on embryogenesis efficiency was higher than that of Peking.

**Key words:** Soybean regeneration; Immature cotyledon; Somatic embryogenesis induction; Genetic analysis

大豆组织培养始于 1960 年, 因其再生频率低、重复性差, 是公认的难转化作物之一<sup>[1]</sup>。尽管以大豆的真叶、胚轴、子叶等为外植体都获得了植株再生<sup>[2-6]</sup>, 但诱导频率低, 重复性差, 不能满足遗传转化对组织培养的要求。因此, 如何提高大豆的再生率和优化大豆组织培养体系是急需解决的问题。而大豆体细胞胚胎发生系统是基因枪和农杆菌转化的理想外植体, 是大豆转化的最适宜的受体系统。1983 年 Christiansont 等<sup>[7]</sup>以栽培大豆的幼胚胚轴为外植体, 并使其成功诱导出胚性愈伤组织, 首次获得了再生植株。Lazzeri 等<sup>[8]</sup>以子叶为外植体, 以 NAA 为生长素诱导幼嫩子叶产生子叶期体细胞胚, 并获可育植株。

尽管以大豆幼胚为外植体的再生系统取得了一定进展, 但 pH 值、外植体大小和光照等影响再生系统的关键因素却很少被深入研究。另外, 目前国内外学者对于幼胚再生系统主要集中于基因型的筛选, 而对于再生性状的遗传控制却未见报道。

选用再生能力较高的北京小黑豆为试材, 以萘乙酸(NAA)诱导未成熟子叶体细胞胚胎发生, 分别对 pH 值、外植体大小和光照条件对体细胞胚胎发生的影响和这 3 种因素之间的关系进行探讨, 以期寻找较适合北京小黑豆诱导未成熟子叶体细胞胚胎发生的条件。另外, 利用优化后的再生系统诱导了北京小黑豆和 Keburi 杂交所衍生的 150 个 F<sub>5,6</sub> 重组自交系, 以期探索大豆发生性状相关的遗传控制。

收稿日期: 2008-04-07

基金项目: 黑龙江省攻关课题资助项目(GA06B103-9)。

作者简介: 宋晓慧(1978-), 女, 硕士研究生, 研究方向大豆生物技术。E-mail: songxiaohui20070508@yahoo.cn。

通讯作者: 李文滨, 教授, 博士生导师。E-mail: wenbinli@yahoo.com。

1 材料与方法

以北京小黑豆的未成熟子叶作为探索 pH 值、外植体和光照对再生系统影响的材料。具体方法为:开花后 14~21 d 取大豆幼荚,置于 4℃ 冰箱中进行 48 h 的低温处理,未成熟胚从豆荚内无菌移出,去掉种皮,切除胚轴,将未成熟子叶作为外植体,远轴面朝下,近轴面朝上接种到诱导培养基上。诱导培养基以 MS 培养基为基础培养基,加 B5 维生素,10 mg·L<sup>-1</sup>NAA,5 g·L<sup>-1</sup>蔗糖和 2.4 g·L<sup>-1</sup>Gelrite,25℃,培养 30 d。

pH 设 5.8、7.0 两个水平,外植体的大小设 1~2 mm、2~3 mm 和 3~4 mm 3 个水平,光照设为光和暗两个水平,其中光处理的光周期为 16 h 光照,8 h 黑暗,光强分别设为强光(光强为 34 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>)和弱光(光强为 0.6 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>),按照 3 因素随机区组设计共设 18 个处理(见表 1),每个处理 3 次重复,每个重复 40 个外植体。

两个参数用于评估不同处理的效果:(1)胚胎发生频率=有胚胎发生的外植体数/接种外植体总数;(2)体细胞胚发生效率=胚胎发生频率×胚的平均数[胚的平均数=产生的体细胞胚总数(正常+不正常)/胚胎发生的外植体数];调查体细胞胚发生频率,发生效率。

表 1 影响体细胞胚诱导因素的试验设计

Table 1 Experiment design of factors influencing the induction for somatic embryos			
A(pH)	B(外植体大小) B(Size of explant)	C(光照处理) C(Light treatment)	处 理 Treatment
A <sub>1</sub> (5.8)	B <sub>1</sub> (1~2 mm)	C <sub>1</sub> (强光,SIL)	T1
		C <sub>2</sub> (弱光,LIL)	T2
		C <sub>3</sub> (暗,Dark)	T3
	B <sub>2</sub> (2~3 mm)	C <sub>1</sub> (强光,SIL)	T4
		C <sub>2</sub> (弱光,LIL)	T5
		C <sub>3</sub> (暗,Dark)	T6
	B <sub>3</sub> (3~4 mm)	C <sub>1</sub> (强光,SIL)	T7
		C <sub>2</sub> (弱光,LIL)	T8
		C <sub>3</sub> (暗,Dark)	T9
	B <sub>1</sub> (1~2 mm)	C <sub>1</sub> (强光,SIL)	T10
		C <sub>2</sub> (弱光,LIL)	T11
		C <sub>3</sub> (暗,Dark)	T12
A <sub>2</sub> (7.0)	B <sub>2</sub> (2~3 mm)	C <sub>1</sub> (强光,SIL)	T13
		C <sub>2</sub> (弱光,LIL)	T14
		C <sub>3</sub> (暗,Dark)	T15
	B <sub>3</sub> (3~4 mm)	C <sub>1</sub> (强光,SIL)	T16
		C <sub>2</sub> (弱光,LIL)	T17
		C <sub>3</sub> (暗,Dark)	T18

SIL:strong intensity light;LIL:low intensity light

优化后的诱导培养条件用于诱导北京小黑豆和 Keburi 杂交所衍生的 150 个 F<sub>5,6</sub>重组自交系,并用上述两个参数评估体细胞胚胎发生情况。

2 结果与分析

2.1 pH 值、外植体大小、光照条件对体细胞胚发生的影响

诱导培养 4 d 后,子叶边缘开始出现褐化,约 15 d 后褐化颜色最深处出现透明球状突起,在培养 20 d 后,可看到不同形态的绿色体细胞胚。进一步分析 pH 值、外植体大小和光照条件对再生系统影响。结果表明:pH 值不同外植体在培养期间颜色不同,pH5.8 时外植体颜色变白,pH 7.0 外植体一直保持绿色;外植体大小对愈伤形成的影响极大,1~2 mm 的外植体在诱导培养基上未能形成愈伤组织,2~3 mm 的外植体在体细胞胚发生过程中形成的愈伤很少或不形成愈伤组织,这与王萍等<sup>[9]</sup>研究结果相同;3~4 mm 的外植体有根状物出现;光照对体细胞胚的颜色影响很大,在光照处理(弱光和强光)条件下体细胞胚的颜色比暗处理培养条件下的体细胞的颜色深,而强光和弱光二者没有显著差异。

2.2 影响胚胎发生频率、胚的平均数和胚胎发生效率的因素分析

各处理的胚胎发生频率、胚的平均数和胚胎发生效率情况见表 2。

表 2 各处理的胚胎发生频率、胚的平均数和胚胎发生效率

Table 2 Frequency of embryogenesis,mean of embryos and efficiency of embryogenesis			
处理 Treatment	胚胎发生频率 Frequency of embryogenesis/%	胚的平均数 Mean of embryos	胚胎发生效率 Efficiency of embryogenesis/%
T1	6.7	2.0	0.13
T2	10.4	3.0	0.31
T3	11.3	3.0	0.33
T4	33.5	4.5	1.50
T5	48.9	7.0	3.42
T6	50.7	7.9	4.00
T7	3.3	3.1	0.10
T8	7.2	5.0	0.36
T9	10.1	6.5	0.66
T10	8.4	3.3	0.28
T11	20.3	5.4	1.09
T12	25.7	6.2	1.59
T13	58.8	5.7	3.35
T14	69.7	12.9	8.99
T15	70.1	14.9	10.44
T16	5.4	3.7	0.20
T17	23.6	5.9	1.39
T18	24.1	7.3	1.76

表中各数值为各处理的平均值。  
Data is mean of different treatment in the table.

2.2.1 影响胚胎发生频率的因素分析 对 pH 值、外植体大小、光照条件进行方差分析,结果表明,pH 值之间,外植体大小之间,光照条件这 3 种因素的不同处理之间存在显著差异,而这 3 种因素之间也存在加性效应,见表 3。

表 3 影响体细胞胚发生频率的因素的方差分析

Table 3 The variance analysis of factors affecting the frequency of embryogenesis

变异来源 Source	自由度 DF	平方和 Sum of squares	均方 Mean square	F 值 F value
区组 Block	2	0.33	0.16	0.41
处理组合 Treatment combination	17	26539.69	1561.16	3903.64 **
A	1	2572.32	2572.32	6432.03 **
B	2	21469.47	10734.73	26841.96 **
C	2	452.91	226.45	566.25 **
A × B	2	1673.82	836.91	2092.68 **
A × C	2	113.26	56.63	141.60 **
B × C	4	44.43	11.10	27.78 **
A × B × C	4	213.45	53.36	133.43 **
误差 Error	34	13.59	0.39	
总变异 Total variation	53	26553.61		

A 指 pH;B 指外植体大小;C 指光照处理;\*,\*\* 分别代表 0.05 和 0.01 水平显著。  
A, B, C indicate pH value, size of explants and light treatments; \*, \*\* indicated significance at 0.05 and 0.01 level, respectively.

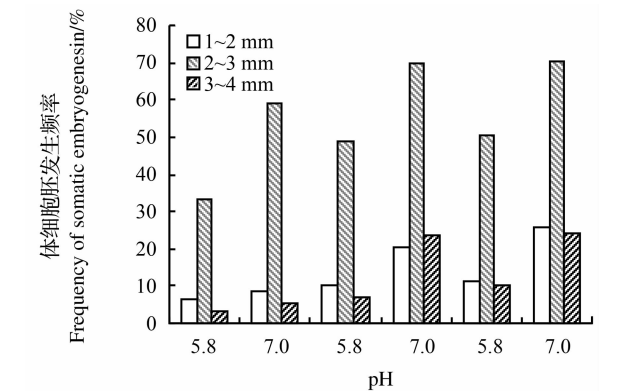


图 1 不同发育时期未成熟子叶在不同培养条件下的体细胞胚发生频率  
Fig.1 Effects of pH,size of explants and light treatments on frequency of somatic embryogenesis

在其它条件相同时,pH7.0 比 pH5.8 时的外植体的体细胞胚发生频率高。外植体大小为 2~3 mm 的体细胞胚的发生频率最高,其次是 1~2 mm 的外植体,最少的为 3~4 mm 外植体。在 3 种光照处理

中,暗培养体细胞胚发生频率最高,其次是弱光培养,发生频率最低的为强光培养。体细胞胚发生频率变幅在 3.3%~70.1% 之间,其中,15 号处理体细胞胚发生频率(pH 值 7.0,外植体大小为 2~3 mm,暗培养)最高,为 70.1%。5 号处理体细胞胚发生频率最低(pH 值 5.8,外植体大小为 3~4 mm,强光培养),为 3.3%。

2.2.2 影响体细胞胚发生效率的因素分析 对 pH 值、外植体大小、光照条件也进行方差分析,结果表明,pH 值之间,外植体大小之间,光照条件这 3 种因素不同处理之间差异达到显著水平,而这 3 种因素之间也存在加性效应,见表 4。

表 4 影响体细胞胚发生效率的因素的方差分析

Table 4 The variance analysis of factors affecting the efficiency of embryogenesis

变异来源 Source	自由度 DF	平方和 Sum of squares	均方 Mean square	F 值 F value
区组 Block	2	68.33	34.16	0.09
处理组合 Treatment combination	17	2056596.52	120976.3	331.23 **
A	1	557617.39	557617.39	4123.85 **
B	2	2547774.85	1273887.4	9421.00 **
C	2	453958.86	226979.43	1678.62 **
A × B	2	477645.16	238822.58	1766.12 *
A × C	2	125986.78	62993.39	465.87 **
B × C	4	345284.01	86321	638.38 **
A × B × C	4	73128.47	18282.12	135.20 **
误差 Error	34	18.89	9.45	0.07
总变异 Total variation	53	365.23		

A 指 pH;B 指外植体大小;C 指光照处理;\*,\*\* 分别代表 0.05 和 0.01 水平显著。  
A, B, C indicate pH value, size of explants and light treatments; \*, \*\* indicated significance at 0.05 and 0.01 level, respectively.

体细胞胚发生效率的结果见图 2。体细胞胚发生效率最高的是 15 号处理(pH 值 7.0,外植体大小为 2~3 mm,暗培养),为 10.6,最少的为 1 号处理(pH5.8、外植体大小为 1~2 mm、强光照培养),为 0.13, pH7.0 情况下的体细胞胚发生效率都比 pH5.0 发生效率高;2~3 mm 的外植体胚胎发生效率最高;其次是 1~2 mm 的外植体,每一外植体胚胎发生效率最低的为 3~4 mm 的外植体。暗培养体细胞胚发生效率最高,其次是弱光培养,体细胞胚发生效率最低的为强光培养,这一结果与体细胞胚发生频率趋势相同。

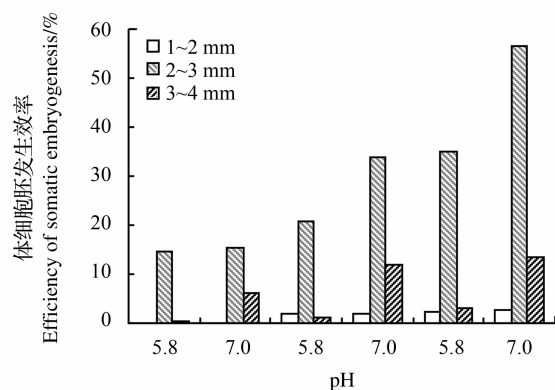


图2 不同发育时期未成熟子叶在不同培养条件下的体细胞胚发生效率

Fig. 2 Effects of pH, size of explants and light treatments on efficiency of somatic embryogenesis

综上所述,不同的培养条件对体细胞胚发生频率和发生效率影响很大,其中15号处理,即pH值为7.0,外植体大小2~3 mm,暗培养条件更有利于体细胞胚的发生。故15号处理被用于诱导北京小黑豆和Keburi杂交所衍生的150个F<sub>5,6</sub>重组自交系的体细胞胚的发生。

### 2.3 杂交后代遗传分析

由图3可知,供试的150个重组自交系中,体细胞胚发生频率差异较大,可明显分为0~30、30~60、60~90三个类群,即呈现多峰分布,由此初步推断大豆体细胞胚发生频率由少数几个基因控制。

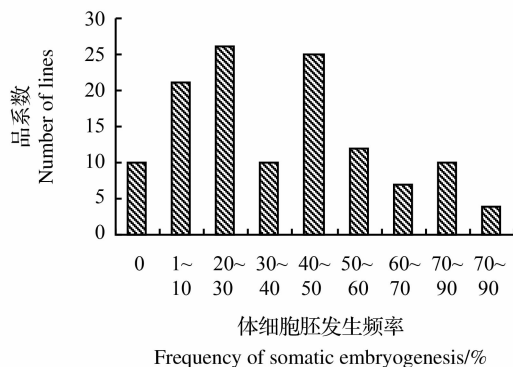


图3 体细胞胚发生频率的分布

Fig. 3 Distribution of frequency of somatic embryogenesis

由图4可知,体细胞胚发生效率为0的占12%,0~2占86%,整个F<sub>5,6</sub>后代群体分布偏向Keburi。可见Keburi对体细胞胚发生效率的影响比北京小黑豆大。

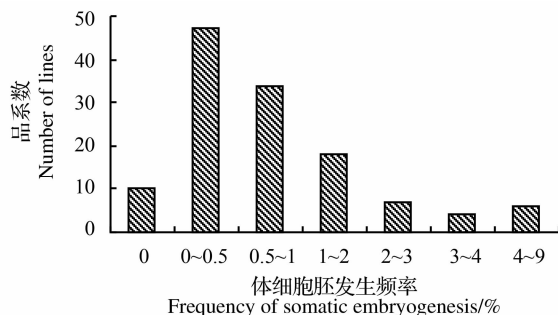


图4 体细胞胚发生效率的分布

Fig. 4 Distribution of efficiency of somatic embryogenesis

## 3 讨论

系统的探索了影响体细胞胚发生的三个重要的因素,即:pH、外植体大小和光照条件,为体细胞胚发生系统的进一步完善和为再生相关基因的克隆奠定了基础。

以萘乙酸为生长素,在暗处理条件下有利于体细胞胚的发生。这与周思君<sup>[10]</sup>的研究结果相似。pH7.0要比pH5.8更适合体细胞胚的发生。很多报道都认为外植体大小在4 mm左右为宜,但北京小黑豆的最适外植体大小为2~3 mm为最佳,这一方面可能是由于北京小黑豆是半野生种,而不是栽培种的原因;另一方面可能是由于采用的植物激素是NAA,而非2,4-D。研究发现pH、外植体大小与光照条件对大豆体细胞胚的诱导有加性效应,即三者之间具有明显的互作效应。

## 参考文献

- [1] 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. (Zhou S J, Yin G C, Lei B J, et al. Study on the influential factors of the somatic embryogenesis of soybean [J]. Chinese Bulletin of Botany, 1992, 9 (2): 38-43. )
- [2] Barwale U B, Kerns H R, Widholm J M. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis [J]. Planta, 1986, 167: 473-481.
- [3] Bailey M A, Boerma H R, Parrott W A. Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 1993, 29: 102-108.
- [4] Anna N O, Waclaw O. New aspects of soybean somatic embryogenesis [J]. Euphytica, 1994, 80: 137-143.
- [5] 邓向阳,卫志明,许智宏.大豆主栽品种体细胞胚胎发生的影响因素及再生植株[J].实验生物学报,2000,33(1):69-79. (Deng X Y, Wei Z M, Xu Z H. Factors on somatic embryogenesis of soybean elite cultivars and plant regeneration [J]. Acta Biologica Experimentalis Sinica, 2000, 33 (1): 69-79. )

难度。很多研究表明油份中亚麻酸的遗传是受多基因控制的数量遗传,杨柳等<sup>[8]</sup>利用杂交后代  $F_2$  群体亚麻酸含量的概率密度分布图也证明了这一结论。所以要想培育出不饱和脂肪酸含量高且亚麻酸含量低的大豆品种可以采用常规育种与生物技术相结合的方法。

随着人们研究的深入开展,大豆分子育种、大豆转基因育种、大豆分子设计育种都取得了阶段性成果<sup>[9]</sup>。近期,人们对大豆品质的要求越来越高,所以在品质改良上的研究增多,鉴定出的与品质相关的基因逐渐增加,油料作物脂肪酸代谢过程也基本清晰,这为品质改良的转基因研究奠定了基础,例如,Buhr 等<sup>[10]</sup>通过抑制大豆  $\Delta^{12}$  脂肪酸脱氢酶基因和 ACP-棕榈酸硫激酶基因的表达,获得了油酸含量高达 85% 的大豆新品种。这一研究的成功经验,为下一步培育适合人们食用的高亚麻酸含量的大豆品种以及适合食用油生产加工的低亚麻酸含量的大豆品种提供了新的思路。

## 参考文献

- [1] 王颢. 甘肃省大豆种质资源脂肪酸组成及评价[J]. 甘肃科技, 2007, 23(7): 211-212. (Wang H. Estimate for the fatty acid composition content of soybean resources in Gansu province[J]. Gansu Science and Technology, 2007, 23(7): 211-212. )
- [2] 徐冉, 张礼凤, 王彩洁, 等. 山东夏大豆品种的脂肪品质及其遗传改良途径分析[J]. 大豆科学, 2006, 25(4): 385-388. (Xu R, Zhang L F, Wang C J, et al. Analysis on the quality and genetic improvement of fat in summer soybean cultivars of Shandong province[J]. Soybean Science, 2006, 25(4): 385-388. )
- [3] 王晓燕, 张彩英, 贾晓艳. 河北省大豆品种脂肪酸组成与含量分

析[J]. 河北农业大学学报, 2007, 30(2): 15-18. (Wang X Y, Zhang C Y, Jia X Y. Analysis of fatty acids composition and content in soybean varieties in Hebei province[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2007, 30(2): 15-18. )

- [4] 陈霞. 黑龙江省主栽大豆品种脂肪、脂肪酸组分的测定及其相关性的分析[J]. 大豆科学, 1996, 15(1): 91-95. (Chen X. Test of content of fat and fatty acid and correlation analysis among them of the main cultivars of soybean in Heilongjiang province[J]. Soybean Science, 1996, 15(1): 91-95. )
- [5] 吕景良, 邵荣春, 吴百灵, 等. 东北地区大豆品种资源脂肪酸组成的分析研究[J]. 作物学报, 1990, 16(4): 349-355. (Lü J L, Shao R C, Wu B L, et al. Studies on the fatty acid composition of soybean germplasm resources in northeast China[J]. Acta Agronomica Sinica, 1990, 16(4): 349-355. )
- [6] 宋俊梅, 鞠洪荣. 新编大豆食品加工技术[M]. 济南: 山东大学出版社, 2002: 4-7. (Song J M, Ju H R. The new compilation of soybean food processing techniques[M]. Jinan: Shandong University Press, 2002: 4-7. )
- [7] 年海, 王金陵, 杨庆凯, 等. 生态环境对大豆籽粒脂肪酸含量的影响[J]. 大豆科学, 1996, 15(1): 35-41. (Nian H, Wang J L, Yang Q K, et al. Effect of ecological environments on fat acids contents in seeds of various soybean cultivars[J]. Soybean Science, 1996, 15(1): 35-41. )
- [8] 杨柳, 张彬彬, 韩英鹏, 等. 大豆亚麻酸含量的 QTL 分析[J]. 大豆科学, 2006, 25(4): 270-274. (Yang L, Zhang B B, Han Y P, et al. QTL analysis of linolenic acid content in soybean[J]. Soybean Science, 2006, 25(4): 270-274. )
- [9] 邱丽娟, 王昌陵, 周国安, 等. 大豆分子育种研究进展[J]. 中国农业科学, 2007, 40(11): 2418-2436. (Qiu L J, Wang C L, Zhou G A, et al. Soybean molecular breeding[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(11): 2418-2436. )
- [10] Buhr T, Sato S, Ebrahim F. Ribozyme termination of RNA transcripts down-regulate seed fatty acid genes in transgenic soybean[J]. The Plant Journal, 2002, 30(2): 155-163.

(上接第 754 页)

- [6] 冯新华, 蒋兴邨, 邵启全. 大豆[*Glycine max*(L.) Merr.] 未成熟子叶组织的体细胞胚胎诱导和植株再生的研究[J]. 中国科学(B 辑), 1988, 9: 939 - 943. (Feng X H, Jiang X C, Shao Q Q. Soybean [*Glycine max*(L.) Merr.] Somatic embryogenesis induction and plant regeneration from the immature cotyledon organizations of soybean[J]. China Science (Series B), 1988, 9: 939-943. )
- [7] Christianson M L, Warnick D A, Carlson P S. Amorphogenetically competent soybean suspension culture[J]. Science, 1983, 222: 632-634.
- [8] Lazzeri P A, Hidebrand D F, Collons G B, et al. A procedure for

plant regeneration from immature cotyledone tissue of soybean[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1985, 3: 160-167.

- [9] 王萍, 吴颖, 杨武杰, 等. 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, 24(1): 29-32. (Wang P, Wu Y, Yang W J, et al. Somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean and analysis of correlative factors[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2002, 24(1): 29-32. )
- [10] 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. (Zhou S J, Yin G C, Lei B J, et al. Study on the influential factors of the somatic embryogenesis of soybean[J]. Chinese Bulletin of Botany, 1992, 9(2): 38-43. )