

野生大豆 (*Glycine soja*) 细胞 系建立的初步研究

邵启全 蒋兴邨 周泽其 李安生 李金国 牛德水

(中国科学院遗传研究所)

Glycine soja 是原产于我国的一种野生大豆, 具有抗病、抗旱、抗涝及高蛋白等一系列优良性状^[1], 是大豆育种的重要原始材料, 引起国内外大豆育种工作者的重视^[2,3]。分子遗传、细胞遗传和组织培养技术的发展, 给人们在分子和细胞水平上改造生物开拓了广阔的前景。在栽培大豆 (*G. max*) 细胞系方面已进行了不少研究并取得一些进展^[4,5,6]。为了对 *G. soja* 野生大豆在分子及细胞水平进一步的研究, 我们对 *G. soja* 野生种中的 7 个品系建立了细胞株系, 以便利用 *G. soja* 的一些优良特性来提高现有栽培大豆的性状。

试验材料和方法

供试野生大豆品系由东北、北京和江西三地收集, 东北野生大豆由黑龙江省农科院提供的黑龙江野生大豆 (编号 S8017); 吉林省吉林市农科所提供的吉林 9 号、11 号、13 号及 17 号四个品系; 北京收集的北京 1 号以及江西省宜丰县农科所提供的宜丰 1 号等七个野生种大豆品系。

试验采用野生大豆的种子在无菌条件下发芽, 取其下胚轴在固体培养基上诱导愈伤组织, 并将其愈伤组织在液体培养基中, 置于 80 次/分振荡器上悬浮培养。其固体培养基分为诱导愈伤组织培养基 (MS + 2mg/l IAA + 5mg/l BA + 2mg/l KT) 和软化愈伤组织培养基 (MS + 1mg/l GA + 1mg/l NAA + 2mg/l KT)。液体培养采用 R₃ 培养基 (MS + 5mg/l IAA + 0.5mg/l 2,4-D + 0.5mg/l KT) 和 1-B₅C 培养基 (B₅ + 1mg/l 2,4-D + 1g/l CH)。培养温度均为 26—28℃, 光照 3000—5000 lux。

为了进行染色体观察, 将悬浮培养的细胞及其转移到固体培养基上产生的幼嫩小愈伤块, 在 2℃ 条件下冷处理 22—24 小时, 用乙醇、冰醋酸 (3:1v/v) 溶液固定 6 小时以上, 然后转入 70% 乙醇溶液放入冰箱备用。用 1% 醋酸洋红染色, 观察其细胞染色体数目。

为了筛选野生大豆抗盐细胞株系, 将稳定的野生大豆细胞系 S8017 连续培养在附加 NaCl (7.6g/l) 和附加 PEG4000 号 (163g/l) 的 MS 培养基上培养, 然后测定对

高盐的适应情况。用独臂三角瓶测量生长量。

试验结果

1. 野生大豆种子下胚轴愈伤组织的诱导

野生大豆种子的下胚轴在一般的 MS 培养基上不易产生愈伤组织, 只有在高激素的培养基上才能较快地产生愈伤组织。试验开始采用 MS + 0.1mg/l IAA + 2mg/l KT 和 MS + 5mg/l KT 或 BA 的培养基培养从野生大豆种子切下的下胚轴, 二周后只有少量的愈伤组织产生。后来采用 MS + 2mg/l IAA + 5mg/l BA + 2mg/l KT 诱导培养基培养, 接种后 5 天, 下胚轴的切口处就产生愈伤组织(图 1)。再过 3 天愈伤组织有 2—3 毫米大时, 就从下胚轴位置上取下, 并接种于相同的培养基上, 一周后愈伤组织的直径就有 7—8 毫米大小(图 2)。而未经切割的下胚轴, 在培养一周后未见到产生愈伤组织, 仅见到下胚轴膨大, 15 天后有些下胚轴胀破, 开始产生愈伤组织(图 3)。试验结果表明在高激素的诱导培养基和切割的种子下胚轴有利于野生大豆下胚轴的愈伤组织的产生。在接种外植体时, 应使下胚轴切割的伤面向下, 直接接触培养基, 这更有利于愈伤组织的形式。

2. 野生大豆细胞株系的建立

野生大豆下胚轴愈伤组织产生以后, 还不能直接将愈伤组织进行液体悬浮培养, 因为在这种培养基中产生的愈伤组织块的细胞比较紧密, 只有在培养较长时间以后, 在绿色的愈伤组织块的周围产生少量乳白色或浅绿色的松散的愈伤组织(图 4)才能进行悬浮培养, 但有时由于适合培养的愈伤组织数量较少, 往往在悬浮培养时生长很慢或根本不生长。为此我们进行试验, 选择能使愈伤组织松散、软化的培养基。试验结果表明使用 MS + 1mg/l GA + 1mg/l NAA + 2mg/l KT 培养基培养北京 1 号野生大豆的愈伤组织块, 有利于愈伤组织的松散(表 1, 图 5)。用这种培养基培养出来的愈伤组织, 放在

表 1 北京 1 号野生大豆愈伤组织对不同培养基的反应

培养基	接种时的愈伤组织块的大小 (mm)	培养一个月后愈伤组织的情况			
		大小 (mm)	颜色	结构	分化能力
MS + 1mg/l GA + 1mg/l NAA + 2mg/l KT	5.0 左右	31.4	乳白	松散	无
R ₃	5.0 左右	26.2	深绿	紧密	分化根系

液体培养基中, 在 80 次/分往复式振荡器上培养 24 小时后, 愈伤组织基本上都已破碎成小愈伤块或单细胞。5 天后在液体培养基中已成倍增长。当在玻璃器皿的壁上挂着许多单细胞, 这个时候进行分瓶培养比较合适。过早分瓶细胞浓度不够不易生长, 过晚分瓶一部份细胞开始分化也影响细胞系的培养(图 6)。

液体悬浮培养时, 采用 1—B₅C, 1—B₅C + CM 及 R₃ 三种培养基。试验结果证明

1—B₅C 培养基有利于野生大豆细胞系的悬浮培养 (表 2), 细胞生长迅速, 细胞松散不易结团或产生小愈伤组织块。在显微镜下观察细胞都是圆形未见到分化现象。而附加 100ml/l 椰子乳 (CM) 的 1—B₅C + CM 的培养基中培养的细胞株, 虽然细胞生长

表 2 北京 1 号野生大豆细胞株对不同液体培养基的反应

代号	培养基成份	培养瓶数	细胞生长情况	细胞结团情况	细胞分化情况
1—B ₅ C	B ₅ + 1mg/l 2,4-D + 1g/l CH	10	快	少	无
1+B ₅ C +CM	B ₅ + 1mg/l 2,4-D + 1g/l CH + 100ml/l CM	3	最快	少	分化出长形细胞
R ₃	MS + 5mg/l IAA + 0.5mg/l 2,4-D + 0.5mg/l KT	10	慢	多	无

速度很快, 细胞也很松散, 产生小愈伤组织块也很少, 但细胞容易分化, 出现很多长形的细胞, 使细胞器老化。而在 R₃ 液体培养基中, 细胞生长速度较慢, 也不易老化, 但细胞容易聚集而形成许多小愈伤块。

我们采用上述类似的方法和培养基已将黑龙江野生大豆 (S8017)、吉林 9 号、11 号、13 号、17 号、北京 1 号和宜丰 1 号等 7 个野生大豆品系的细胞株悬浮培养了 25 个无性世代以上, 其中北京 1 号野生大豆培养了 37 个无性世代, 黑龙江野生大豆培养了 100 个无性世代以上, 都还保存良好的分生能力。部份材料已开始抗盐性筛选实验, 黑龙江野生大豆 (S8017) 对高盐的适应性很强。

3. 野生大豆细胞系的再生能力

我们对细胞系在培养很多无性世代以后还有没有再生和分化能力进行了研究。我们将培养 25 个世代的北京 1 号野生大豆的细胞系接种到 R₃ 固体培养基上, 10 天后接种的细胞系材料都长出整齐一致的小愈伤组织块, 选择大小一致的愈伤组织块作分化试检材料, 其结果见表 3。另外还保存一部份北京 1 号野生大豆细胞系材料的固体培养基, 在 20 天后培养基中的一部份愈伤组织分化出根系 (照片 7)。

试验证明北京 1 号野生大豆细胞系的愈伤组织在 MS 不附加激素的培养基中, 每升增加 1 克干酪素 (CH) 的 I 培养基中, 愈伤组织生长较慢, 颜色呈乳黄色, 未见到分化现象。在显微镜下观察, 愈伤组织的细胞很整齐, 无分化细胞出现, 在 R₃ 培养基中的愈伤组织块, 生长较快, 色深绿, 能分化出少量的根系, 并观察到愈伤组织块中的细胞有分化出长形的细胞团。在 R₃ 培养基中增加 100ml/l 椰子乳 (CM) 的 III 培养基上, 其愈伤组织生长速度最快, 颜色为黄绿色, 有 35% 的愈伤组织块能分化出根系 (图 8), 但是这种分化能力强的培养基上培养的愈伤组织也容易老化, 在培养一个月后愈伤组织发褐色而渐渐死亡。

试验证明 II、III 两种培养基均能使液体培养 25 个无性世代的北京 1 号野生大豆的

细胞系的愈伤组织分化出根系, 尤其是附加 100ml/1 椰子乳的Ⅲ培养基, 其根系的分化

表 3 北京 1 号细胞系的愈伤组织在不同培养基上分化情况

培 养 基		接种愈伤组织块		16天后愈伤组织情况			
编号	成 份	平均大小 (mm)	数/口	平均大小 (mm)	颜色	分化根 系数	%
I	MS+1g/1 CH	5.1	20	6.3	乳黄	0	0
II	R _s	5.1	20	9.3	深绿	1	5
III	R _s +100ml/1 CM	5.1	20	10.8	黄绿	7	35

能力更强, 但是上述两种培养基均不能使细胞株系的愈伤组织分化出幼苗。因此找寻适合野生大豆细胞系愈伤组织分化出幼苗的培养基, 是今后研究的重要内容。

4. S8017 野生大豆细胞株系抗盐筛选的初步结果

为了对野生大豆细胞株系进行抗盐筛选, 将稳定的野生大豆 S8017 细胞系在 NaCl (7.6g/l) 和 PEG4000 号 (163g/l, 使用不含金属的 Bakerr's 产品) 及不外加任何物质的 MS 培养基上预培养 18 天以后, 然后同时转移到含有 NaCl 的 MS 培养基上培养, 所得结果列入表 4。

表 4 S8017 细胞系在含高盐的 MS 培养基的生长量

预处理条件	PEG		NaCl		CK	
	A	B	A	B	A	B
12月28日起始 (cm)	2.7	3.2	3.5	2.5	2.3	1.4
1月5日生长量 (cm)	4.3	2.7	7.0	5.3	1.8	1.7
8天生长量 (%)	+70.4	-15.6	+100	+112	-21.7	+21.4
8天平均生长量 (%)	+27.4		+108		-0.15	

从表 4 的初步实验结果, 可见 S8017 野生大豆的细胞株系在经过 18 天高盐和 PEG 的预培养以后, 较没有经过预培养的 CK 表现了高的适应能力。经过预培养的材料在 8 天之内细胞有较大生长量, 而对照则不能生长。

5. 野生大豆细胞系的稳定性

观察了北京 1 号野生大豆等细胞株系, 所观察的 610 个细胞中 58 个细胞具有清楚的分裂相。其中分为两种类型: 一种为具有正常的染色体数目的细胞 ($2n=40$) 占分裂相的 84%, 其余的为非正常细胞, 有 36 至 60 条染色体不等的细胞。由此可见, 这些细胞系基本上稳定的。

6. 野生大豆细胞株系的保存

在野生大豆的细胞液体培养几十个无性世代后, 细胞株的细胞比较均匀一致, 并保

持很强的分生能力就成为细胞系。为了保存材料并减少工作量,我们将液体悬浮培养的细胞系的细胞接种到固体培养基上保存。我们在试验中经常使用 R₃ 固体培养基,在固体培养基容积较大的条件下愈伤组织保持的时间就长。采用果浆瓶作容器保存愈伤组织块时,只需 45—50 天转移一次,还能保持旺盛的生活力。一旦需要开展试验时,再进行液体培养就能应用。

参 考 文 献

1. 王金陵: 1958,《大豆的遗传与选种》P76—77,科学出版社.
2. 邵启全, Carlson, S. P.: 1982 年,《1981 年中国科学院遗传研究所年报》,P209 科学出版社
3. 蒋兴邨, 邵启全, Carlson, S. P.: 1983,《大豆科学》,2(1): 25—29.
4. Yaw-en Chu and Karl. G. Lark: 1976, *Planta (Berl)* 132: 259—268
5. Weber, G and Karl. G. Lark: 1979, *Theor. Appl. Genet.* 55: 81—86
6. Weber, G and Karl. G. Lark: 1980, *Genetics* 96: 213—222.

ESTABLISHMENT OF CELL LINES OF WILD SOYBEAN

(Glycine soja)

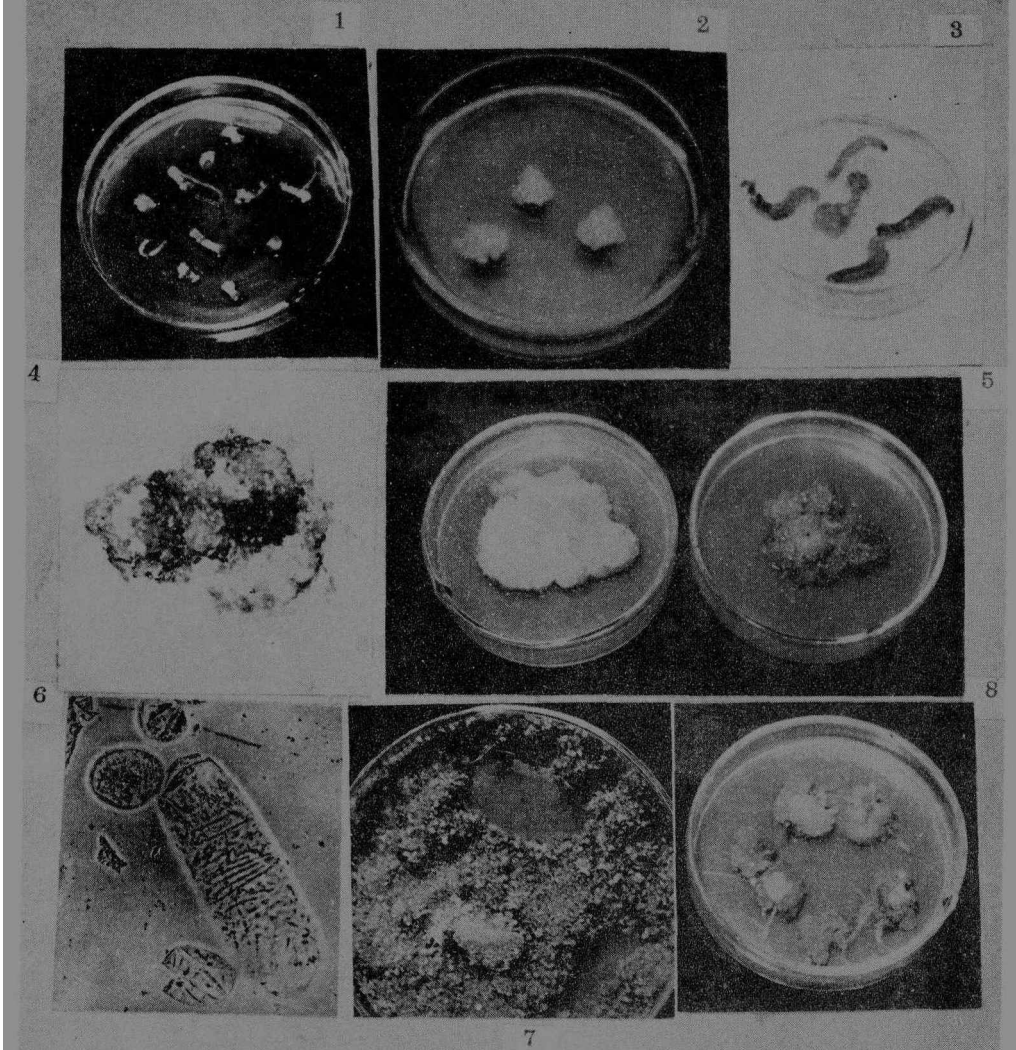
Shao Qiquan Jiang Xingchun Zhou Jeqi

Lee Anshen Nuo Deshui Lee Jingo

(Institute of Genetics, Academia Sinica)

Abstract

Cell lines of six genotypes of wild soybean from South, Middle and North China were established. Data of cytogenetical observations verified that these cell lines are genetically stable. These cell lines have regeneration ability at high level through 35 and more vegetative generations. MS and 1-B₅C media are best ones for keeping these lines.



1. 培养5天后切开的下胚轴产生愈伤组织；
2. 培养一周的愈伤组织；
3. 培养15天完整下胚轴开始产生愈伤组织；
4. 培养一个月的愈伤组织下部形成松散的愈伤细胞；
5. 软化培养基的培养效果，左边为软化培养基；
6. 培养过程中产生分化的细胞；
7. 由悬浮培养的细胞系在固体培养时分化出根系；
8. 有椰子乳的培养基较多的愈伤组织分化出根系。