

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

冯新华 蒋兴邨 邵启全

(中国科学院遗传研究所,北京)

摘 要

本文利用大豆未成熟子叶作外植体,进行大豆体外培养并诱导体细胞胚胎形成和植株再生的研究.结果表明,高浓度生长素 10mg/l NAA 或 5mg/l 2,4-D 是大豆体细胞胚胎形成的先决条件.附加 10mg/l NAA 的 Murashige 和 Skoog 培养基(简称 MS 培养基)能够直接在子叶表面诱导体细胞胚的形成,其频率可达 85%;附加 5mg/l 2,4-D 的 MS 培养基首先诱导未成熟子叶产生胚性愈伤组织,然后产生大量体细胞胚,频率高达 94%.我们成功地获得再生的大豆完整小植株 15 株,消除了大豆基因工程的障碍之一.

关键词: 大豆,未成熟子叶,体细胞胚胎,植株再生

植物组织培养技术的发展是成功地利用现代遗传工程改良作物的重要保证.人们利用分生组织如茎尖、侧芽等进行体外培养,既可以达到快速繁殖园艺植物的目的,又能应用于难以进行有性繁殖的植物的种质保存.特别值得注意的是,未成熟组织如幼胚进行培养产生大量的胚性愈伤组织,从而通过体细胞胚胎形成途径再生出完整的植株,为植物基因工程的应用开辟了广泛的前景.

大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) 是世界一种重要的农作物.尤其在东北,它在农业中占有特别重要的地位.因此,利用现代生物工程技术定向培育大豆优良品种是人们的最终目的.但是,植物基因工程的主要限制因素之一,就是大豆组织再生成完整植株的困难性.自从 60 年代以来,大豆的组织培养得到了广泛的研究.国外曾报道大豆分生组织的培养可以产生再生的植株^[1,2].但是从诱导的愈伤组织再生出完整的植株仍是十分困难的. Phillips 和 Collins (1981) 曾在大豆的悬浮培养过程中观察到体细胞胚胎的形成,但未能得到完整植株^[3].直到 Christianson 等(1983)利用未成熟的胚的胚轴成功地建立了具有再生能力的培养物之后,大豆的组织培养才取得了突破性的进展^[4].国内外的研究者发现,大豆的未成熟胚或其未成熟子叶在体外培养过程中形成胚性组织,并可见体细胞胚胎的发育^[5],这种培养物能够再生出完整的植株^[6,7]

本文利用大豆未成熟胚和未成熟子叶进行体外培养的研究,结果从子叶部位诱导出来的体细胞胚胎萌发再生完整的植株,从而建立了一套体细胞胚胎形成和大豆植株再生的实验程序,为大豆基因工程和大豆形态建成的研究提供了实验依据。

一、材料与方 法

大豆品种“小黑豆”的种子播种于中国科学院遗传研究所(北京)实验田中。当新的豆荚长至 30—50mm 长时,其中含有大小为 3.0—8.0mm 的未成熟种子。采收的未成熟豆荚在 75% 乙醇溶液中浸泡 10s,然后在 0.1% 升汞中消毒灭菌 20min,无菌蒸馏水冲洗 3 次。取出种子,去掉种皮后即可得到完整的胚,移去胚轴可得子叶。

将取出的完整胚(包括两片子叶)和子叶放在 Murashige-Skoog 基本培养基上^[9],培养基中附加的不同维生素(MS 或 B5 维生素)和不同植物激素(10mg/l NAA 或 5mg/l 2, 4-D) 组成了 4 种不同的诱导培养基(见表 1)。将诱导出来的体细胞胚胎转移到生长培养基上,以促进体细胞胚的萌发(芽再生)和生长发育。具初生叶的小植株被转移到 1/2 MSO 或 1/2 MSI 培养基上,从而诱导根系的形成。

本实验中所用的所有培养基列于表 1 中。实验培养温度控制在 $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$,日光灯光照每天 16h。

再生的完整小植株移栽于盛有花卉土的花盆中。

表 1 本实验所使用的各种培养基

培 养 基		成 分*
诱 导 基 基	MSN	MS 基本培养基 + MS 维生素 + 10mg/l NAA
	MSD	MS 基本培养基 + MS 维生素 + 5mg/l 2, 4-D
	MBN	MS 基本培养基 + B5 维生素 + 10mg/l NAA
	MBD	MS 基本培养基 + B5 维生素 + 5mg/l 2, 4-D
生 长 基 基	MSG	MS 基本培养基 + MS 维生素 + 0.15mg/l NAA + 0.033mg/l BA + 0.033mg/l KT + 0.033mg/l ZT
	MSZ	MS 基本培养基 + MS 维生素 + 0.12mg/l ZT
生 培 基 基	1/2 MSO	1/2 MS 大量 + MS 微量元素 + MS 维生素 + 2% 蔗糖
	1/2 MSI	1/2 MS 大量 + MS 微量元素 + MS 维生素 + 2% 蔗糖 + 0.005 mg/l IBA

* 所有诱导培养基和生长培养基均含有 3% 的蔗糖。

所有培养基均添加 0.7% 的琼脂。

MS 基本培养基(包括大量和微量元素)以及维生素参见文献^[9]。

B5 维生素参见文献^[10]。

植物激素缩写: NAA—— α -萘乙酸, IBA——吲哚丁酸, BA——6-苄基嘌呤; KT——激动素, ZT——玉米素。

二、结果和讨论

1. 体细胞胚胎的形成、维持及其影响因素

实验结果表明,外植体(未成熟的胚或子叶)在诱导培养基上培养 5—8d 后,在子叶部位表

面或由其形成的愈伤组织上可以观察到一种微小突起, 这些突起大约 10d 后发育形成球形胚和鱼雷胚。再经过大约 14—17d 后, 进一步发育成具有子叶的体细胞胚(图 1)。这个过程与合子胚的发育过程完全一致。

在实验过程中, 我们观察到体细胞胚胎和胚性愈伤组织都直接在未成熟子叶部位形成。同时发现未成熟胚的胚轴不能被诱导产生胚性组织。尽管它们在培养过程中会伸长至 8mm, 但这种变长的胚轴似乎对于体细胞胚胎形成没有产生明显的影响。因此, 对于外植体, 无论是未成熟的胚还是无胚的未成熟子叶, 它们在诱导培养基上显示完全相同的模式。

我们还研究了不同幼胚成熟期和诱导培养基成分(包括激素、维生素)对体细胞胚形成的影响。以未成熟胚的大小作为判断幼胚成熟期的依据, 首先发现, 不同大小的未成熟胚(3.0—8.0mm)的体细胞胚形成频率是显然不同的。4.0—6.0mm 大小的幼胚或其子叶在诱导



图 1 在诱导培养基上形成的子叶胚和喇叭状胚

表 2 大豆幼胚或其子叶的体细胞胚诱导频率

幼胚长度 (mm)	诱导培养基			
	MSN	MBN	MSD	MBD
3.0	42.1	45.0	52.2	51.9
4.0—6.0	81.0	84.9	93.3	94.1
6.1—7.0	35.8	35.5	32.7	38.3
7.0 以上	15.3	18.6	16.5	15.9

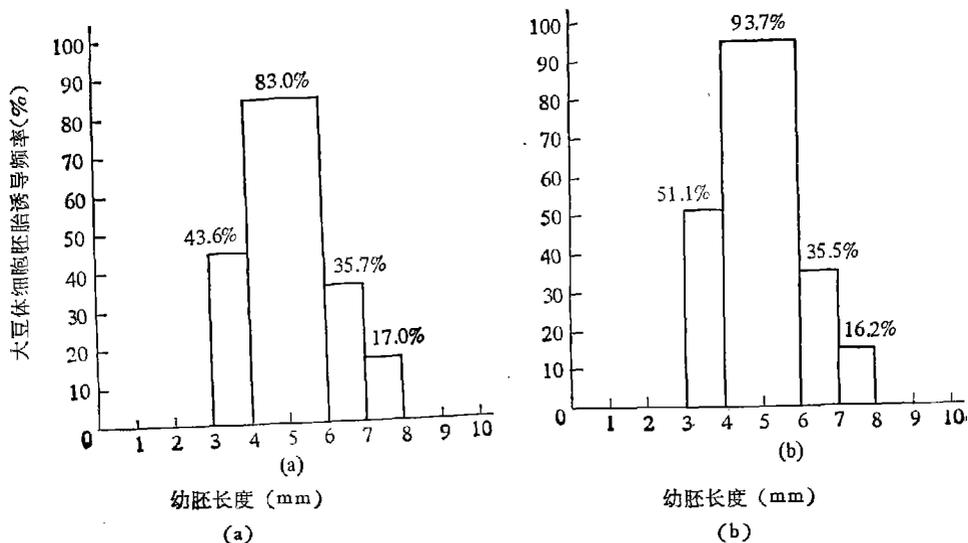


图 2 大豆体细胞胚胎诱导频率与接种幼胚大小的关系

(a) NAA 诱导的频率, (b) 2,4-D 诱导的频率

培养基上的效果最好(表 2 和图 2)。

实验以 MS 大量和微量元素为基本成分,并在诱导培养基中附加 10mg/lNAA 或 5mg/l 2,4-D 以及 MS 维生素或 B5 维生素(表 1)。从表 2 中不难看出,当使用同种同浓度的植物激素时,维生素的替代并不能对体细胞胚胎的形成频率产生明显的影响。

但是,植物激素的类型和浓度却直接影响着体细胞胚胎的形成频率,同时亦决定着体细胞胚胎的形态。国外的研究者发现,高浓度的生长素能够诱导较高的体细胞胚胎形成率^[6]。因此,我们选定 10mg/l NAA 和 5mg/l 2,4-D 作为诱导培养基的激素成分。在同样的条件下,对诱导本身来说,2,4-D 比 NAA 具有更强的效果。也就是说,在合适的条件下,2,4-D 能产生相当高的体细胞胚胎形成频率,最高可达 94.1%。2,4-D 作为诱导因素具有另一个明显的特点,就是它诱导的畸形胚亦比 NAA 为多,其中尤以喇叭状胚胎为多。而且这些畸形的体细胞胚状体不能够象合子胚一样完成正常的发育步骤。然而 NAA 诱导的体细胞胚胎,大多数在形态上正常,通常具有两个明显的子叶;少数的变异者也多具有单个子叶,这些只有单个子叶的体细胞胚却具有正常的萌发育能力。从图 3 中可以看出,10mg/l NAA 和 5mg/l 2,4-D 诱导的体细胞胚在形态上的确不相一致。我们的实验结果继续证实了国外的一些研究者过去的工作,Lippmann 和 Lippmann (1984) 以及 Lazzeri 等人(1985)对于 2,4-D 在大豆未成熟胚胎和未成熟子叶在培养过程中体细胞胚胎的高诱导率和畸形变态都作了详细的报道^[5,7,8]。近期的工作亦表明,NAA 对于体外诱导形态上正常的体细胞胚十分有益^[6,7]。

我们还发现,高水平的植物激素不但影响着体细胞胚胎的形成频率和形态变化,而且还决定着体细胞胚胎的形成途径。大豆未成熟胚和未成熟子叶的体细胞胚胎形成具有两种途径:一种是直接的胚胎形成,也就是体细胞胚胎直接产生于未成熟子叶的表面;另一种途径是间接胚胎形成,即未成熟子叶组织首先形成光滑松散的胚性愈伤组织,然后才产生大量的体细胞胚。就我们实验所使用的两种植物激素来说,高浓度的 NAA 诱导的体细胞胚胎形成属于直接途径。尽管 5 mg/l 的 2,4-D 也可以在子叶表面上诱导出极少数的体细胞胚,但是我们认为 2,4-D 诱导的体细胞胚胎主要是通过间接途径而形成的。因为在 2,4-D 存在下,未成熟子叶的绝大部分组织愈伤化,形成的胚性愈伤组织能够产生大量的体细胞胚。

为了继续维持培养物的胚胎形成能力,我们将移走体细胞胚后剩下的外植体和愈伤组织部分转到新鲜的、同类型的诱导培养基上,隔 4 周转移 1 次,可以见到新的体细胞胚的产生。但

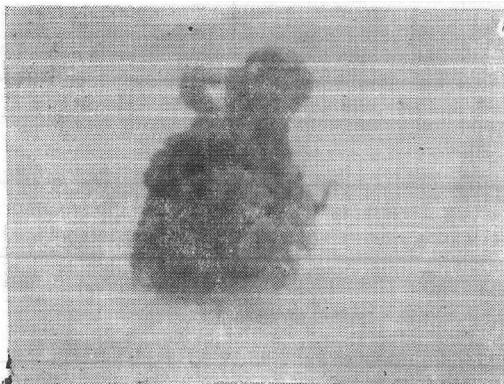


图 3 NAA 诱导的正常胚和单子叶胚

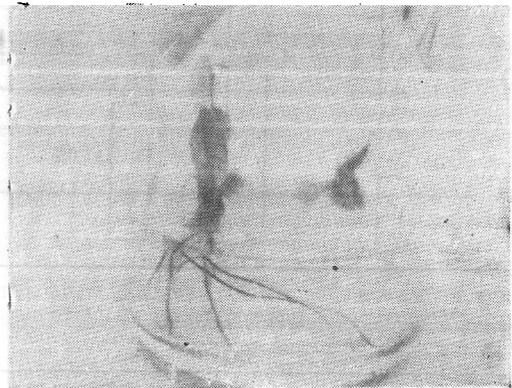


图 4 从胚状体发育来的再生植株

是随着时间的推移,形成的体细胞胚的数量逐渐减少,而分化的根系却逐渐增多。根据我们的实验结果和国外的有关报道,植物激素对于培养物的胚胎形成能力的维持显然起着十分重要的作用。Barwale 等人(1986)在黑暗条件下以 4mg/l NAA 作为维持培养基的激素成分,他们将移走体细胞胚后剩下的未成熟子叶部分从诱导培养基(含 8mg/l NAA)上转移到维持培养基上,其结果是培养物的体细胞胚形成能力没有明显的降低^[6]。我们也曾作过同样的处理,但是未能诱导出大量新的体细胞胚的产生,多见根系的产生和生长。我们认为,这种差异可能是由于品种的基因型起着一定的作用的缘故。

2. 小植株的再生和生长

当在 4 种诱导培养基中诱导出来的体细胞胚具有一定大小(通常长于 2mm)时,将它们转移到生长培养基 MSG 上,可以观察到较正常的体细胞胚尽管生长缓慢,但都能够“萌发”产生茎尖分生组织,而异常的胚(如喇叭状的子叶胚)只能增大一定体积或形成少量愈伤或根系。一般情况下,体细胞胚的“萌发”过程时间长短不一。在一个月內,大约 66.7% 的体细胞胚能够“萌发”产生茎尖,并长出第一片真叶,少数也能产生根系。

含 2, 4-D 诱导培养基 (MSD 和 MBD) 形成的胚性愈伤组织, 93.6% 可以形成体细胞胚, 其余的一部分愈伤组织转移到生长培养基 MSZ 上。这些胚性愈伤组织在该培养基上即能够迅速再生出幼芽,少数还能直接同时分化出芽和根。

将在上述两种生长培养基上再生出的具有初生叶幼苗转移到 1/2MSO 或 1/2MSI 上, 无根芽在 1/2 MSO 上生长并诱导出根系, 而原已具有少数根系的小植株在 1/2MSI 上正常生长,长出更多的根(图 4)。

三、结 论

1. 高浓度的生长素 NAA 或 2, 4-D 是诱导大豆未成熟子叶形成体细胞胚胎和再生植株的先决条件。而且这两种生长素表现出不同的优越性。

2. 大豆的体细胞胚胎形成具有两种途径: 直接胚胎形成和间接胚胎形成。实验结果表明, NAA 诱导的体细胞胚胎形成属于直接途径; 而 2, 4-D 诱导的体细胞胚胎形成多经过间接途径。

3. 大豆未成熟子叶组织在体外培养条件下, 无论是通过直接体细胞胚胎形成还是间接胚胎形成, 都可以再生出完整的小植株。

参 考 文 献

- [1] Cheng, T. Y. et al., *Plant Sci. Lett.*, 19(1980), 91—99.
- [2] Kartha, K. K. et al., *Can J. Bot.*, 59(1981), 1671—1679.
- [3] Phillips, G. C. and Collins, G. B., *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, 1981, 1: 123—129.
- [4] Christianson, M. L. et al., *Science*, 222(1983), 632—634.
- [5] Lippmann, B. and Lippmann, G., *Plant Cell Rep.*, 3(1984), 215—218.
- [6] Barwale, U. B. et al., *Planta*, 167(1986), 473—481.
- [7] Lazzeri, P. A. et al., *Plant Mol. Bio. Rep.*, 3(1985), 160—167.
- [8] Ranch, J. P. et al., *In Vitro*, 21(1985), 653—658.
- [9] Murashige, T. and Skoog, F., *Physiol. Plant.*, 15(1962), 473—497.
- [10] Gamborg, O. L. et al., *Exp. Cell Res.*, 50(1968), 151—158.
- [11] Research Group of Soybean Tissue Culture, Institute of Crop Breeding, Kirin Academy of Agriculture, *Acta Botanica Sinica*, 17(1976), 258—262.