

大豆原生质体经体细胞胚再生植株

张贤泽

(东北农业大学生物工程系, 哈尔滨 150030)

小松田 隆夫

(生物资源研究所, 日本国筑波市 305)

摘 要

从栽培大豆 (*Glycine max* L.) 的未成熟子叶游离的原生质体, 以 *Gelrite bead* 法包埋, 培养在大豆根瘤产物 (天冬酰胺、谷氨酰胺、尿囊素、尿囊酸等) 为主要氮源的 ZSP 培养基中, 形成了胚性愈伤组织。该愈伤组织在体细胞胚分化培养基上直接分化出体细胞胚, 并进一步诱导出再生植株, 进入正常发育而开花。

关键词 大豆、原生质体、胚性愈伤组织、体细胞胚、再生植株

无论在大豆细胞工程还是在基因操作研究中, 建立原生质体培养系统一直为国内外学者密切关注。大豆原生质体培养系统的研究不仅具有增大大豆变异幅度进而拓宽遗传资源等方面的理论意义, 而且又期望从中筛选出性状优良而稳定的株系作为大豆育种材料直接应用于农业生产。但是, 由大豆原生质体培养再生植株的确是个难题。近年来国内外一些专家在这方面曾做过很多努力。如, 1985 年 Neweel 等人从 *Glycine Canescens* 培养成再生植株^[1]。1988 年卫志明等人用 *Glycine max* L. 未成熟子叶原生质体培养出再生植株^[2]。不过, 他们均采用了非胚性愈伤组织诱导不定芽的途径。而大量试验表明: 一个再生能力强的基因型和取用分化能力好的起始器官, 若不建立起胚性愈伤组织或胚性细胞系, 也很难使其原生质体形成再生植株的。

本研究为探索大豆经过胚性愈伤组织分化体细胞胚再生植株, 以建立有效而可靠的大豆原生质体培养途径, 由栽培大豆的未成熟子叶游离原生质体培养出胚性愈伤组织, 经体细胞胚再生出了植株。

1 材 料 与 方 法

1.1 供试材料

供试材料为未成熟子叶进行组织培养筛选的体细胞分化能力较强的栽培品种 Bonminor,

Viking (B), American Jollow 和秣食豆公 502 等大豆品种。这些品种的种子分别播于盛土盆里,栽培在温室中,使之正常开花结荚。

1.2 方法

1.2.1 原生质体的游离

取开花后 2—3 周的幼荚,4°C 低温处理 48h。然后用洗洁精洗净豆荚,再以 70% 酒精消毒 15 s,无菌水冲洗 2 次,在无菌条件下取其未成熟种子,剥皮去胚后切碎,悬浮于 0.5% 纤维素酶 Onozuka RS (Yakult), 0.05% 果胶酶 Y-23 (Seishim), 0.7mol/L 甘露醇、0.3mol/L 山梨醇组成的酶液中(0.45 μ 滤过灭菌),在 26°C, 40—50r/min 条件下,振荡处理 4—5h,酶解后用 miracloth (USA CA92037) 过滤,静置 30min,细胞壁完全消失后,以 100 $\times$ g 离心 2min 收集原生质体,再用洗液(0.7mol/L 甘露醇、0.3mol/L 山梨醇组成)在 100 $\times$ g 离心洗净原生质体(图版 I-1),收率约为 4 $\times$ 10⁷cells/g FW。

1.2.2 原生质体培养

洗净的原生质体,密度调整为 3 $\times$ 10⁵cells/ml,加入 3 倍的无 Ca²⁺, Mg²⁺ 和激素,含 0.25% Gelrite 的 ZSP 培养基,混匀后滴入盛有 0.9% MgSO₄·7H₂O, 0.4% CaCl₂·2H₂O 和 0.6mol/L 甘露醇溶液(pH5.8)的培养皿中(ϕ 6cm 培养皿中滴入 30 滴),每滴立即形成 ϕ 3—4mm 的包埋原生质体的珠状体(称 Gelrite bead),静置 1—2min 后除掉珠状体以外的溶液,注入 2—3ml ZSP 培养基,用石蜡膜密封,25°C 黑暗下静置培养。形成肉眼能见到的细胞团后,换新的 ZSP 培养基(渗透压 560 m O SMOL/kg),以 80r/min 振荡培养加速愈伤组织形成。

ZSP 培养基为无机盐减半的 MS(但 NH₄NO₃ 40mg/L),其余部分以天冬酰胺、谷氨酰胺、尿囊素和尿囊酸等有机态氮代之,微量元素同 MS,有机成分是在 MS 基础上添加一些维生素 B₁ 和 Casamino acid,附加 2.4-D 0.1mg/L, BA 1.0mg/L,蔗糖 15000mg/L,甘露醇 80000mg/L。培养基的渗透压调整为 560—580mOSMOL/kg。

1.2.3 体细胞胚的诱导

将愈伤组织移植在无激素的 ZSP 培养基中,以 80r/min 振荡 3 日洗掉愈伤组织上的激素后,移植于含有 0.5% 或 1.0% 蔗糖、10mg/L NAA 的 MSB 固体培养基^[4]上,在 25°C、弱光(50lx)下培养,诱导体细胞胚。

1.2.4 植株的再生

体细胞胚移植在含 3% 蔗糖、1mg/L NAA 的 MSB 固体培养基^[4]上,使其黄化成熟。成熟的体细胞胚移植于含有 1% 蔗糖、0.001mg/L GA₃ 的 1/2 MSB 固体培养基^[4]上,诱导根和芽形成幼小植株。幼小植株移植在含 1% 蔗糖的 1/2 MSB 无激素固体培养基^[4]中,继续培养成正常植株。

根系发育不良者,切下其真叶上部的茎,插入含有 0.05mg/L IBA、1% 蔗糖的 1/2 MSB 固体培养基^[4]中,诱导发达的根系,将其移栽到花盆土壤中培养。

2 结 果

2.1 大豆原生质体培养成胚性愈伤组织

由不同基因型以及它们不同生育期的大豆未成熟子叶游离的原生质体,用 ZSP 培养基进行培养,2 日后形成了细胞壁,4—6 日后开始分裂(图版 I-2),12—20 日后形成了肉眼能见到

的细胞团(图版 I-3), 30—40 日后形成了完整的胚性愈伤组织(图版 I-4). 这种愈伤组织是小形、球状、表面光滑、由细胞质浓厚的相同细胞组成, 其结构松脆、质地致密, 色泽鲜艳.

大豆未成熟种子大小为 $4-5 \times 3-3.5\text{mm}$ (约为该品种成熟种子的 $\frac{1}{4}$) 的子叶原生质体形成胚性愈伤组织的能力最高(表 1).

表 1 由大豆未成熟子叶游离原生质体及其培养结果

品 种	未成熟种子的大小 (mm)	原生质体的收率 ($\times 10^5/\text{g} \cdot \text{FW}$)	随培养日数分裂率(%)				胚性愈伤组织 形成率(%)
			4	5	9	21(日)	
秣食豆公 502	4—35. $\times$ 3—2	50	8.25	19.45	45.52	47.25	0.25
	3—2 $\times$ 1.5—1	30	6.00	18.22	19.25	20.25	0.04
Bonminori	5—4 $\times$ 3.5—3	40	0	9.00	35.54	38.67	0.12
	3—2.5 $\times$ 2—1.5	10	0	0	8.25	15.10	0.02
Viking (B)	5—4 $\times$ 3.5—3	40	0	10.29	30.65	35.30	0.15
	3—2.5 $\times$ 2—1.5	20	0	0	5.45	13.33	0.02
American-Jollow	5—4 $\times$ 3.5—3	40	0	12.56	31.63	36.17	0.17
	3—2.5 $\times$ 2—1.5	15	0	0	9.35	17.36	0.01

2.2 体细胞胚的分化

当愈伤组织发展成 0.5—1.0mm 大小时, 分别移植于 MSB 不定芽分化培养基^[2, 7]和体细胞分化培养基^[4]上, 探讨了其分化状况, 其结果如表 2 所示.

表 2 大豆未成熟子叶原生质体愈伤组织分化试验结果^{a)}

培养基种类	移植愈伤组织数	体细胞胚数
体细胞胚分化培养基		
MSB+0.5% 蔗糖+10mg/L NAA	150	8
MSB+1.0% 蔗糖+10mg/L NAA	150	4
不定芽分化培养基		
MSB+0.15mg/L NAA+0.5mg/L IBA+0.5mg/L KT +0.5mg/L ZT+500mg/L CH+2% 蔗糖	50	0
MSB+3.0% 蔗糖+0.11mg/L ZT	50	0
MSB+3.0% 蔗糖+0.2mg/L BA+20mg/L IBA+0.5mg/L GA ₃	50	0

a) 0.22% Gelrite 固体培养基, 品种: Bonminori.

该愈伤组织只在体细胞胚分化培养基上一个月后分化出体细胞胚, 而在其它不定芽分化培养基上只增殖了愈伤组织或者长出根, 均未观察到不定芽的分化.

移植于体细胞胚分化培养基上的胚性愈伤组织, 缓慢地增殖至 $\phi 1.5-2.0\text{mm}$ (2 周左右) 后, 变成黄褐色、硬而脆的球状体, 其表面出现褐色斑点, 经镜检发现, 愈伤组织内部的胚性细胞群逐渐分化成胚状体(图版 I-5, 6). 这种胚状体进一步生长钻出愈伤组织表面, 再生长到一定大小从愈伤组织脱落. 体细胞胚有球形、心形、鱼雷形、棒形、喇叭形和子叶形(图版 I-7). 胚性愈伤组织的胚性细胞群的分化形成体细胞胚, 类似于接合子胚的发育^[13]. 这对大豆细胞的分化、器官形成等理论研究具有一定意义.

2.3 植株的再生

上述体细胞胚分别移植在含 3% 蔗糖、1mg/L NAA 的 MSB 固体培养基上^[4], 在弱光 (100lx) 下 2 周后黄化成熟。将成熟的体细胞胚移植于含有 1% 蔗糖、0.001mg/L GA₃ 的 $\frac{1}{2}$ MSB 固体培养基^[4] 中, 在 3000lx(12h 光期) 光照下一周后长根、发芽逐渐形成了幼小植株(图版 I-8)。此幼小植株又移入含 1% 蔗糖的 $\frac{1}{2}$ MSB 无激素固体培养基上, 继续培养 2 周后形成正常植株(图版 I-9)。有的植株根系发育不良, 一个月后逐渐发生营养不良症, 切掉其真叶上部的茎, 诱导了根系和侧芽的发育, 正常发育而开花, 花为白色与亲本(Bonminori) 相同(图版 I-10)。切下来的茎部插入含有 0.05mg/L IBA、1% 蔗糖的 $\frac{1}{2}$ MSB 固体培养基^[4] 中, 1 周后诱导出发达根系(图版 I-11), 将培养基用自来水冲掉, 在盛有自来水的培养瓶里诱发出根毛后, 移植在花盆土壤中培养(图版 I-12)。

上述体细胞胚除喇叭形以外均诱导出再生植株。初步观察结果, 由不同类型体细胞胚诱导的再生植株, 其植株形态有所差异, 可能有遗传变异, 有待进一步做深入研究。

3 讨 论

试验证明, 在诱发或保持胚性状态中, 选择适宜的培养基是十分必要的。

在大豆原生质体培养中, 国内外多采用 K₈P 培养基^[1, 2, 5] 和 MS 培养基^[4] 为基本培养基。Gamborg 等人为培养大豆根细胞而设计的 B₅ 培养基^[6], 以及用 MS 培养基无机成分加 B₅ 培养基有机成分为基本培养基的 MSB 培养基^[4] 等。

本文曾以上述各种培养基, 进行大豆未成熟子叶原生质体培养成胚性愈伤组织的研究, 均未得到满意效果。根据大豆氮代谢的特点, 以及大豆未成熟子叶的细胞分裂与生长期代谢机理^[9, 12], 调整 MS 培养基成分组成, 研制了 ZSP 培养基, 发现大豆根瘤固氮形成并运转给大豆未成熟子叶利用的酰尿等特异有机态氮, 对大豆未成熟子叶原生质体再生细胞的成活、分裂频率、保持胚性和最终分化成正常植株起着重要作用(见表 3)。

表 3 培养基比较试验^{a)}

培养基	分裂前细胞大小 (φ μ m)	开始分裂日数 (日)	分裂率 (%)	形成的愈伤组织数	
				胚性愈伤组织	非胚性愈伤组织
$\frac{1}{2}$ MS	27.5	7	20.20	—	—
ZSP	40.0	5	38.67	22	—
K ₈ P	30.0	7	29.40	—	11

a) 大豆品种: Bonminori; 激素配比相同。

培养基主要成分中含大量氮源, 多数培养基中, 尤其 MS 和 K₈P 培养基, 含有硝酸盐和铵盐。氮源除供应培养物氮素营养外, 还原态氮还具有促进细胞分裂的作用, 而硝酸态氮作用相反, 但只用铵盐多数植物不易生长, 两者同时存在时有促进生长的效果。所以培养基中氮源类型、用量及 NH₄⁺、NO₃⁻ 的调节, 对细胞状态有明显的调节作用。

培养基成分又应根据培养物的植物种、组织、器官和培养目的而决定,大豆的氮素营养主要是由根瘤固氮形成的酰尿和土壤中吸收的硝酸态氮、天冬酰胺分配到地上部而被利用^[10, 12]。Yoneyama 的试验证实,大豆籽实充实初期,由茎基部供给籽粒和荚的氮源类型主要是尿囊素和天冬酰胺(他当时未能分析尿囊酸)^[10]。

大豆根瘤固定的氮素先形成天冬酰胺和谷氨酰胺,进而形成尿囊素和尿囊酸。所形成的尿囊素和尿囊酸(主要是后者)运输到豆荚和生长中的籽粒细胞,大部分由氨基酸代谢形成蛋白质,所以大豆也称为酰尿植物^[10, 12]。酰尿的 C/N 比低,可高效率地使碳水化合物释放出大量的还原态氮^[12]。

ZSP 培养基是无机盐减半的 MS(含 NH_4NO_3 40mg/L)培养基,添加大豆根瘤产物(天冬酰胺、谷氨酰胺、尿囊素和尿囊酸等)为主要氮源后,能用以调节培养基的 NH_4^+ , NO_3^- 。培养基比较试验(表 3)直接证实,大豆根瘤形成的酰尿等特异有机态氮化合物,对大豆未成熟子叶原生质体培养及再生细胞保持胚性起重要作用。

参 考 文 献

- [1] Newell, C. A., Luu, H. T., *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1985, 4: 145—149.
- [2] Wei Zhiming, Xu Zhihong, *Plant Cell Reports*, 1988, 7: 348—351.
- [3] Ranch, J. P., Oglesby, L., Zielinski A. C., in *Vitro Cell Dev.*, 1985, 21: 653—658.
- [4] Komatsuda, T., Ohyama, K., *Theor. Appl. Gent.* 1988, 75: 695—700.
- [5] Kao, K. N., *Mol. Gen. Gent.* 1977, 150: 225—230.
- [6] Zhou Sijun, Yin Guangchu, Lei Bojun et al., *Soybean Science*, 1989, 2: 39—40.
- [7] Luo Ximing, Zhao Suilen, *Acta Botanica Sinica*, 1989, 3: 231—234.
- [8] Jia Shirong, Kao, K. N. Knott, D. R., *Scientia Agriculture Sinica*, 1982, 4: 20—25.
- [9] Yoneyama, T., *Agriculture and Horticulture*, 1988, 10: 97—103.
- [10] Yoneyama, T., *Soil Sci. Plant Nutr.*, 1984, 30: 333—343.
- [11] Zeng Junzhi, *Acta Botanica Sinica*, 1988, 2: 140—150.
- [12] Tajima, S., *Agriculture and Horticulture*, 1988, 8: 87—94.
- [13] Satoh, S., *Plant Cell Technology*, 1989, 2: 99—107.