

文章编号: 1003-8701(1999)06-0016-03

大豆幼胚子叶诱导胚胎发生

刘艳芝, 赵桂兰, 刘 莉, 尹爱平, 李俊波

(吉林省农科院生物技术重点开放实验室, 吉林 公主岭 136100)

摘 要: 采用 MS 基本培养基附加高浓度 2,4-D, 较高频率地诱导了大豆幼胚子叶的体细胞胚胎发生, 体细胞胚经历诱导、萌发和生长 3 个阶段, 成功地发育成完整植株。再生植株移入土壤获得种子。

关键词: 大豆; 幼胚子叶; 体细胞胚胎; 诱导技术

中图分类号: S 565.103.53

文献标识码: A

自 60 年代以来, 人们对大豆的组织培养进行了广泛的研究, 几乎所有的器官和组织都进行过培养, 也都有植株再生的报道。随着近年来基因工程的迅速发展, 对组织培养再生频率有了更高的要求。遗传转化的成功有赖于高频率的再生系统, 而大豆的许多基因型和各种外植体的再生频率较低, 难以适应转化的需要。我们自 1996 年开始进行了大豆幼胚子叶培养研究, 现已经有多个基因型从幼胚子叶中诱导胚胎发生, 较高频率再生植株, 建立起一个完善的大豆组织培养再生体系, 为遗传转化提供了受体系统, 同时也开展了体细胞无性系变异研究。

1 材料和方法

1.1 材料来源

供试材料为东北三省共 52 份大豆基因型(表 1)。

1.2 外植体及接种

田间选取最先结的豆荚, 用 75% 乙醇表面消毒后, 小心剥开, 取长径 3~5 mm 的幼胚, 去掉种皮, 切下胚芽, 然后将幼胚子叶近轴面向上, 接种于 G⁹ 诱导培养基上, 温度为(25±2)℃, 黑暗培养。

1.3 胚胎发生

当幼胚子叶接种 20 d 左右时, 子叶边缘长出黄色球状胚状体, 将胚状体转移至 G¹⁰ 培养基上萌发, 此时转至暗光, 12 h 光照条件培养。

1.4 再生植株

将萌发出子叶的胚状体转至 G⁷⁰ 培养基上生长, 同时也有根生长, 光强增至 1 500~2 000 lx, 16 h 光照。

1.5 移栽

一般在 8 月份接种, 约 12 月份再生植株, 将再生苗的三角瓶移至室温(15℃左右), 自然

收稿日期: 1999-04-06

作者简介: 刘艳芝(1964-), 女, 吉林省公主岭市人, 助研, 主要从事大豆生物技术研究。

光散射,定时增加液体 G70 培养基,到 3、4 月份移栽。

表 1 供试基因型及胚胎发生率

编 号	基 因 型	胚 胎 发 生 率 (%)	编 号	基 因 型	胚 胎 发 生 率 (%)
1	S55	21.2	27	吉 29	0
2	S10	18.3	28	G154	0
3	黑农 37	11.7	29	G161	0
4	吉 40	17.9	30	G142	0
5	吉 20	8.9	31	G147	0
6	吉 43	28.9	32	G150	0
7	吉 42	3.5	33	G149	0
8	吉 35	4.7	34	G143	0
9	吉 39	5.2	35	G148	0
10	吉 37	5.7	36	野 9671	0
11	吉 36	19.9	37	野 9672	0
12	吉 30	56.3	38	野 9674	0
13	吉 41	35.3	39	野 9668	0
14	吉 27	12.1	40	野 9666	0
15	合丰 25	14.1	41	野 9669	0
16	吉 38	6.2	42	野 9667	0
17	辉南黑铁荚	30.3	43	野 9670	0
18	灌水铁荚青	1.9	44	G157	0
19	东农 16	12.5	45	G162	0
20	G151	12.5	46	Z60	0
21	G140	6.3	47	Z112	0
22	牡丰 5 号	0	48	Z54	0
23	扁茎大豆	0	49	Z45	0
24	铁丰 19	0	50	Z48	0
25	公交 70203-1	0	51	Z4	0
26	东农 36	0	52	青豆	0

2 结果与讨论

2.1 外植体选择时间

田间栽培大豆品种 6 月中旬左右开花,7 月末、8 月初开始接种,同一植株上选最先结的荚,每隔 3 d 接种 1 次,依次选择,至多选 3 次接种。再继续接种的话,虽然也选择长为 3~5 mm 的幼胚,但胚胎发生能力降低直至接种的幼胚子叶毫无反应。原生质体培养也选用同样的幼胚子叶为起始材料,8 月末以幼胚子叶分离出的原生质体培养后均破裂死亡。以此分析,随着植株的生长,细胞内含物逐渐增加,渗透压等生理环境发生很大的变化,培养所用的培养基与其不相适应。同时也可能由于细胞组织分化过程逐渐增高,分化能力逐渐减弱,无法再诱导胚胎发生。所用的供试材料均如此,因此这一现象与基因型无关,而与植株生理年龄密切相关。

2.2 基因型与胚胎发生率

供试品种之间胚胎发生率有很大差异。十几个杂交种均有胚胎发生,但有几份野生大豆基因型无反应。栽培大豆大部分都有胚胎发生。胚胎发生率计算方法:

$$\text{胚胎发生率}(\%) = \frac{\text{产生胚状体的子叶个数}}{\text{接种子叶个数}} \times 100\%$$

发生率最高品种是吉林 30,为 56.3%。子叶节组织培养再生能力强的品种几乎都不同程度地有胚胎发生。吉林 30 有胚胎发生的一片子叶上最多有十几个胚状体,幼胚子叶上胚状体多少也与植株生理年龄有关,同一基因型不同天数接种,则胚状体个数也明显不同。

2.3 胚状体诱导及萌发

适合的幼胚子叶接种于高激素的 MS 培养基上, 2, 4-D 及 NAA 均能诱导出胚状体。20 mg/L 的 2, 4-D 能诱导出大量胚状体, 但畸形胚比例很大; 10 mg/L 的 NAA 也能诱导出胚状体, 并且大部分是正常胚状体, 但胚胎发生率极低, 也只有少数基因型有反应。从利用的角度来看, 2, 4-D 诱导系统虽然畸形胚比例大, 但胚胎发生率高且基因型范围宽, 因此还是以这一系统进行遗传转化为好。

诱导出的胚状体, 在球形胚发育到子叶胚之间的任何阶段, 都可转入 G¹⁰ 萌发培养基上萌发, 但还是以子叶胚前期萌发为好, 此时萌发可减少畸形胚的数量。同时也可使胚状体萌发后正常生长成苗, 不然胚状体虽然萌发, 但后期生长缓慢, 不长高, 只长叶, 最后叶片枯黄, 仅少数可存活。

萌发培养基中添加 5 mg/L 活性炭, 胚状体很快地萌发, 萌发时胚状体胚轴伸长, 长出叶片。不加活性炭, 胚状体胚轴短粗, 致使生长点被包裹, 不能生长叶片。将这样的畸形胚再转至加活性炭的 G¹⁰ 上, 则一部分胚状体短粗的胚轴上又重新长出新的茎叶, 但茎叶都很细弱。将这样弱苗切下, 置于 G⁷⁰ 生长培养基上, 可再生植株。我们分析: 活性炭主要是吸附作用, 既能吸附有害物质, 也能吸附有益成分, 随着培养物的生长, 营养物质逐渐被吸收, 活性炭吸附的营养物质逐渐释放供植物生长。而不加活性炭则营养物质对于培养物开始处于过多或恰好平衡状态, 随着培养物生长, 营养成分逐渐减少, 造成胚轴开始生长分裂过快, 而后停止生长成为棒畸形胚。

2.4 再生植株及移栽

胚状体在 G¹⁰ 培养基上萌发长出初叶, 即可转至 G⁷⁰ 培养基继续生长, 同时有根长出, 并能形成发达的根系。大豆组培芽一般难以长成强壮的苗, 特别是子叶节组培芽, 只有极少数长成细弱苗, 其余芽逐渐玻璃化至最后死亡。而幼胚子叶胚胎发生的苗一旦正常萌发, 即可获得完整植株。其原因可能是胚状体与种子胚发育相似的缘故。

由于植株再生是在 12 月份左右, 此时移栽成活率非常低, 主要是保温、保湿和污染问题难以很好解决。因此, 将试管苗置于 15℃ 左右, 自然散射光照射, 定期加新鲜液体 G⁷⁰ 培养基, 目的是延缓其生长, 在培养瓶过冬, 等 3、4 月份春暖花开季节移栽, 大大提高了成活率, 共获得 330 粒种子。

本研究系统已应用于基因转化, 获得了不育及抗盐工程植株, 同时也进行了体细胞变异筛选工作, 在生理性状和农艺性状方面都有变异。两项工作都正在进行之中, 初步证明本研究系统是实用的。当然这一再生系统尚需进一步完善, 特别是畸形胚发生率比较高, 如能很好地解决这一问题, 将为大豆生物技术研究工作奠定良好的基础。

参 考 文 献

- [1] 周思君, 尹光初. 从大豆幼胚诱导胚胎发生再生植株[J]. 大豆科学, 1989, 8(1): 39-45.
- [2] 周俊彦. 植物体细胞在组织培养中产生的胚状体 I [J]. 植物生理学报, 1981, 7(4): 389-397.
- [3] 周俊彦. 植物体细胞在组织培养中产生的胚状体 II [J]. 植物生理学报, 1982, 8(1): 91-99.
- [4] 张宝红, 李秀兰. 棉花组织培养中畸形胚的发生和转化[J]. 作物学报, 1996, 22(1): 107-111.
- [5] 朱海山. 活性炭对玉米花药培养的影响[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(1): 16-18.
- [6] 刘用生, 李友勇. 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.
- [7] 颜秋生, 张雪琴. 水稻原生质体培养技术体系的建立[J]. 农业科学集刊, 1995(2): 20-25.