

文章编号: 1003-8701(2000)06-0012-03

# 浅析大豆组培系统与基因转化受体系统

刘艳芝, 刘莉, 李俊波, 徐宏志, 尹爱平, 赵桂兰

(吉林省农科院农业生物技术重点开放实验室, 吉林 公主岭 136100)

**摘要:**介绍了大豆子叶节组培系统和幼胚子叶组培体细胞胚胎发生系统, 重点阐述了组培系统和受体系统的内在联系和不同点, 同时提出这两个组培系统作为受体系统时存在的问题。

**关键词:**大豆; 组培系统; 受体系统; 基因转化

**中图分类号:**S 565.103.53

**文献标识码:**A

建立良好的受体系统是实现基因转化的先决条件, 关系到基因转化的成败。大豆基因转化受体系统的建立主要依赖于组培技术, 但组培系统并不能等同于受体系统。我们在建立基因转化体系过程中发现, 组培系统要根据基因转化目的和操作方法进行相应的调整, 才能成为一个优良的受体系统。本文就大豆子叶节系统和体细胞胚胎发生系统, 着重阐述组培系统和受体系统的内在联系和不同之处。

## 1 子叶节系统

### 1.1 子叶节组培系统

无菌大豆种子接种于 M<sub>1</sub>A (MS 基本培养基, BA 5 mg/L, NAA 0.05 mg/L, 蔗糖 3%) 培养基中萌发, 10~12 d 取子叶节 (含上胚轴基部约 3 mm, 子叶近胚轴的分生组织部分约 2 mm, 下胚轴约 3 mm, 已长出的腋芽切去) 培养于 M<sub>1</sub>A 培养基中, 2 周后丛生芽生成。切下丛生芽转移到 MS<sub>0</sub> (无激素) 培养基上, 大部分不定芽伸长成枝条。2~3 周后, 分离个体苗转移到 1/2 MS (附加 2 mg/L IBA) 培养基中生根, 成完整植株。

丛生芽 (带愈伤组织) 转移 MS<sub>0</sub> 培养基上, 不断地有个体苗伸长, 同时也不断地在愈伤组织上分化出新的不定芽。经过两次切割后, 愈伤组织褐化, 不再分化出芽。

### 1.2 子叶节组培系统与受体系统的内在联系与不同点

#### 1.2.1 无菌苗的苗龄

组培系统以再生植株为目的。实验结果: 3~45 d 苗龄的子叶节都可以诱导出丛生芽, 且诱导率差别不太大。但以 8~12 d 苗龄的无菌苗子叶节、丛生芽的诱导及不定芽后期生长相对容易一些。将此组培系统做受体系统时, 选择 5~14 d 苗龄的子叶节培养, 则不适宜。原因是这些苗龄的外植体培养时侧芽生长, 而使再分化芽生长受到抑制。如将侧芽切掉, 则切口处生成愈伤组织, 诱导丛生芽更困难。选用小于 5 d 或小于 14 d 苗龄的无菌苗子

**收稿日期:** 2000-06-12

**作者简介:** 刘艳芝 (1964-), 女, 吉林省公主岭市人, 吉林省农科院生物技术开放实验室助研, 主要从事大豆组织培养与基因转化研究。

叶节为外植体,进行农杆菌浸染,不定芽为较深层的叶原基出芽或为再分化芽,虽然这样的外植体再生频率较低,但是获得的转基因植株嵌合体较少。

### 1.2.2 子叶节的切割方法

在组培系统中,切取膨大的子叶节区(含上、下胚轴),整个外植体长度约8 mm左右,获得再生植株频率最高。但作为受体系统,要考虑农杆菌浸染时农杆菌的吸附及T-DNA转移等问题,因此切割子叶节区时,要尽可能将下胚轴切短,才能保证较高的转化率。按这样的切割方法,利用农杆菌浸染进行基因转化,对获得的抗性植株随机取样,用特异引物PCR扩增,结果18株DNA样品中有6个3次重复检测均呈阳性反应。而以组培系统方法切割子叶节,农杆菌浸染获得的抗性植株,18个样品PCR扩增均无阳性反应。

### 1.2.3 丛生芽数的限制

组培系统中丛生芽多,通过不断分割外植体,获得的再生植株也越多,并且还有次生芽的分化,再生频率最高可达90%以上。然而作为受体系统,则不能以最高再生频率为目的,转化的操作方法限制再生频率。基因转化操作中不能连续分割外植体是影响再生频率的首要问题,因为筛选培养基中的抗生素对有切口的外植体伤害非常大,从伤口处褐化到最后死亡。只有保证几个外植体的完整,才能最后获得抗性植株。外植体不能分割,就要限制它的丛生芽数,以每块外植体上1~3个不定芽为宜,丛生芽数多于5个,则不易抽茎长高。随着培养时间的加长,不定芽及外植体就会出现玻璃化现象,几乎得不到再生植株。由于限制丛生芽数,并且由少数的不定芽直接成完整植株,因此也得不到次生芽,这也是影响再生频率的一个方面。

## 1.3 子叶节组培系统作受体系统存在的问题

①丛生芽不抽茎长高,只是叶片生长,生长一段时间后发黄、脱落。

②抗性苗生根难。在含Kan的生根培养基上,非转化苗极难生根,只有转化苗才可能生根。由于大豆子叶节组培再生苗本身就存在生根难的问题,因此不能根据再生苗在筛选培养基上是否生根来判断是否为转化苗。将培养基中Kan去掉,即有少数苗生根,且PCR检测呈阳性反应。

③以此受体系统进行农杆菌浸染转化时,出现系统不稳定,重复性差。组培系统本身稳定性良好,应该是农杆菌浸染及抗性筛选造成的系统不稳定。目前尚未见到分析这一现象机理的文献。

## 2 幼胚子叶体细胞胚胎发生系统

### 2.1 幼胚子叶组培系统

外植体为4~6 mm的幼胚子叶,基本培养基为MS,附加20 mg/L 2,4-D,诱导产生胚状体。胚状体在G<sup>10</sup>(MS基本培养基,附加60~100 g/L蔗糖,1%活性炭)培养基上发育成熟,形成子叶胚。子叶胚在G<sup>70</sup>(MS无机盐,MS有机物,无激素)培养基上萌发成小植株,移栽土壤中形成可育植株。

幼胚子叶组培系统再生植株不存在生根难,移栽成活率很高,可能是体细胞胚类似于有性胚可自然生长发育成完整植株的原因。

### 2.2 幼胚子叶组培系统与受体系统的内在联系与区别

#### 2.2.1 外植体的大小

选择4~6 mm大小的幼胚子叶培养,均有胚胎发生能力,并且同一基因型的幼胚子叶越

小, 胚胎发生率越高。但作为受体系统, 外植体取相对大的为好。因为幼胚子叶培养后, 诱导出愈伤组织, 在愈伤组织的表面产生胚状体。幼胚子叶越小, 愈伤组织越疏松, 农杆菌的附着量越大, 导致共培养后无法抑菌, 外植体最后死亡。如利用基因枪轰击, 愈伤组织呈稀粥状物, 在筛选培养基上不能存活。选择 5 mm 左右的幼胚子叶培养, 利用农杆菌浸染或基因枪轰击, 虽然再生频率低, 但最后可获得抗性植株。

### 2.2.2 活性炭的影响

在胚状体萌发培养基中添加 1% 活性炭, 胚状体胚轴很快伸长并长出叶片。不加活性炭, 一部分胚状体胚轴短粗, 生长点被包裹, 形成棒状畸形胚。因此, 在幼胚子叶组培系统中, 活性炭对胚状体萌发起着重要作用。但做农杆菌浸染时, 共培养后的 G<sub>10</sub> 筛选培养基中却不能加活性炭, 原因是活性炭对农杆菌有很强的吸附作用, 导致抑菌困难。在筛选培养基中先去掉活性炭, 经过一段时间抑菌后再加活性炭, 既能抑菌, 又能促使胚状体萌发。

### 2.3 基因转化时应注意的问题

①大豆幼胚子叶体细胞胚胎发生不象玉米的胚性愈伤组织可不断扩增培养, 因此, 要获得大量的转基因植株, 必需有大量的幼胚子叶作为起始材料。

②利用此受体系统基因转化的最佳时间为胚胎发生的初始阶段, 使具有胚胎发生能力的胚性细胞转化。如不在这一发育阶段导入外源基因, 则会出现大量的嵌合体。

③转基因植株较组培再生植株移栽率大大降低。因此, 大豆基因转化受体系统以组培系统为基础, 但又与组培系统有不同之处。在组培系统中再生频率最高的程序不一定为优良的受体系统。好的组培系统是基因转化的前提, 但作为受体系统时又会出现类似于系统不稳定等许多问题, 这也正是建立基因转化系统需要解决的问题。利用大豆幼胚子叶体细胞胚胎发生系统, 不仅可以建立起稳定的基因转化系统, 同时对转化机理等理论方面的研究也将具有重要的意义。

### 参考文献:

- [1] Cheng T V, et al. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture [J]. Plant Sci. Lett., 1980, 19: 91-99.
- [2] Wirght M S, et al. Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max*. [J]. Plant Cell Rep., 1986(5): 150-154.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [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, 22(1): 107-111.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 刘艳芝, 等. 大豆幼胚子叶体细胞胚胎发生再生植株 [J]. 吉林农业科学, 1999, 24(6): 16-18.
- [9] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.