

激素对大豆悬浮细胞系愈伤组织诱导的影响

朱学艺¹, 梁晓芳¹, 李红芳²(1. 厦门大学 生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室,
福建 厦门 361005; 2. 兰州大学医学院, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 以大豆无菌苗的子叶和下胚轴为外植体, 通过比较筛选 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)和 6-苄基腺嘌呤(6-BA)的浓度及培养条件, 诱导出相应的愈伤组织, 并成功建立大豆悬浮细胞培养体系。结果表明: 单独使用 2,4-D 即可诱导出适于建立大豆悬浮细胞系的愈伤组织; 加入 6-BA 导致子叶和下胚轴外植体剧烈膨大, 出愈率低, 形成的愈伤组织量明显减少且局部组织坚硬, 难以建立悬浮细胞系。组织切片观察结果显示加入 6-BA 致使外植体和愈伤组织之间的部分组织细胞核消失、细胞壁显著增厚, 是悬浮细胞体系难以建立的主要原因。

关键词: 大豆; 组织培养; 悬浮细胞; 植物激素

中图分类号: Q 813.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2008)04-0562-05

大豆(*Glycine max* L.)中含有丰富的大豆蛋白、大豆油等成分, 是我国重要的经济作物。近年来, 大豆中以大豆素、染料木素等为主的异黄酮成分, 由于其结构和动物雌激素——17 β 雌二醇相似, 并能够和雌激素受体结合而发挥雌激素样作用, 被称为植物雌激素^[1-2], 它们在缓解妇女更年期综合症, 有效预防与激素相关的癌症发生等方面显著而独特的生物学活性更引起了国内外学者的关注^[3-5]。然而, 由于大田植株生长周期长且受自然环境条件的影响较大, 要掌握大豆异黄酮成分代谢途径的调控机理及通过异黄酮代谢工程提高植物雌激素含量的研究, 就必须建立可迅速增殖的细胞悬浮培养体系。

悬浮细胞系建立的重要前提是愈伤组织的诱导。在大豆愈伤组织的诱导过程中, 激素种类和浓度对愈伤组织的诱导具有重要作用。不论是以大豆真叶、子叶还是下胚轴为外植体, 已有的研究多以大豆植株再生为目的进行大豆愈伤组织的诱导, 其添加的激素种类中多含有 6-苄基腺嘌呤(6-BA)^[6], 结果发现形成的愈伤组织结构紧密, 呈小颗粒状; 李大玮^[7]用萘乙酸(NAA)和 6-BA 合用诱导出大豆愈伤组织也呈现出质地坚硬的特点, 其研究结果表明高浓度的 6-BA 单用或与 NAA 等配合使用时, 虽可诱导出愈伤组织, 但出愈率和愈伤组织量明显较少。近年来的研究结果显示, 仅添加 2,4-D 即可诱导出大豆愈伤组织^[8-9]。虽然

这些研究都观察到了 6-BA 加入后不利于大豆愈伤组织的形成, 但都未进行不同浓度 6-BA 对愈伤组织形成影响的进一步对比研究。

本研究在大豆愈伤组织的建立中, 以 MS 培养基只添加 2,4-D 以及同时添加 2,4-D 和不同浓度 6-BA, 研究了 2,4-D 和 6-BA 对京豆 1 号(J1)的子叶及下胚轴愈伤组织诱导的影响, 筛选确定了适于大豆悬浮细胞培养所要求的愈伤组织培养激素条件, 并成功建立了大豆悬浮细胞培养体系。

1 材料与方法

1.1 材料

京豆 1 号大豆种子由黑龙江省哈尔滨市大豆研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗的获得

选择粒大、饱满、无霉病斑的种子, 用水清洗后, 于 70% 的酒精浸泡 30 s, 无菌水冲洗, 再浸泡于有效氯为 1% 的 NaClO 溶液中, 不断振荡, 使种子的表面充分接触溶液, 20 min 后用无菌水冲洗 4~5 次, 接种于 1/2 MS 培养基上, 培养室(25℃)中暗培养, 待种子萌发后, 转至光下培养, 至子叶和下胚轴变绿。

1.2.2 愈伤组织的诱导

1) 子叶为外植体的愈伤组织诱导: 以子叶为外植体, MS 为基本培养基, 分别添加 1、1.5、2、2.5、5 mg/L 和 5、10、15、20 mg/L 的 2,4-D, 组成 A0、B0、C0、D0 和 A1、B1、C1、D1 的子叶愈伤组织诱导培养基。将子叶切成两半, 接种于上述培养基上, 用于筛选适于子叶

收稿日期: 2007-07-19

基金项目: 福建省自然科学基金(C0410001), 厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程重点实验室开放基金(2007103)资助

Email: zhuxueyi90@xmu.edu.cn

愈伤组织诱导的 2,4-D 浓度. 并以筛选适宜的 2,4-D 浓度为基础, 分别添加 0.2、0.4、0.8、1.2 和 2.0 mg/L 的 6-BA, 组成 A2、B2、C2、D2 和 E2 培养基, 观察不同浓度的 6-BA 对子叶愈伤组织诱导的影响.

2) 下胚轴作为外植体的愈伤组织诱导: 以 MS 培养基, 分别添加 0.2、0.5、0.8、1.0 mg/L 的 2,4-D 组成 A3、B3、C3 和 D3 的下胚轴愈伤组织诱导培养基. 将下胚轴切成 5~8 mm 长的小段, 接种于上述培养基上, 以筛选适于下胚轴愈伤组织诱导的 2,4-D 浓度. 以筛选的适宜 2,4-D 浓度为基础, 分别添加 0.2、0.4、0.6 和 1.2 mg/L 的 6-BA, 组成 A4、B4、C4 和 D4 培养基, 观察不同浓度的 6-BA 对下胚轴愈伤组织诱导的影响.

3) 对照实验: 将子叶和下胚轴接种于不添加任何激素的 MS 培养基上, 观察是否有愈伤组织形成.

1.2.3 石蜡切片

将附加 2,4-D (0.8 mg/L) 和 6-BA (0.6 mg/L) 的 C4 培养基诱导的下胚轴愈伤及与其相邻的外植体部分, 切成 1×0.5 cm 大小, 卡诺固定液过夜固定, 苏木精染色, 常规石蜡包埋、切片, 显微镜下观察、拍照.

1.2.4 悬浮细胞系的建立

将附加最适 2,4-D 浓度诱导的子叶和下胚轴愈伤组织经继代培养后, 各取 2 g 愈伤组织块, 分别悬浮于 20 mL 不含琼脂的 A1 和 C3 液体培养基中, 旋转式摇床中 25℃ 暗培养, 转速为 110~120 r/min.

2 结果

2.1 无菌苗的获得

25℃ 暗培养于 1/2 MS 培养基上的大豆种子, 3 d 萌发, 当下胚轴长至 1~2 cm 时转入光下培养, 2 d 即可完全变绿, 获得绿色的子叶和下胚轴.

2.2 愈伤组织的诱导

2.2.1 不同浓度 2,4-D 和 6-BA 对子叶愈伤组织诱导的影响

以 MS 分别添加不同浓度 2,4-D, 组成 A0~D0 以及 A1~D1 的子叶愈伤组织诱导培养基, 子叶切面朝下竖放于上述固体培养基上. 培养至第 5 天时, A1~D1 培养基上均可产生白色或淡黄色愈伤组织, 在 5~20 mg/L 的浓度范围内, 随浓度升高, 愈伤组织块相对较大, 但诱导率没有明显差异, 出愈率均为 100%; 培养至第 16 天, 4 种培养基上组织块长大到 0.5~1.0 cm 左右, 组织块棉湿, 细胞疏松, 均无褐化现象. 随着培养时间的延长, 至 22 d 时, 愈伤组织块的大小已没有明显差异, 但 B1、C1 和 D1 培养基上的子叶外植体出现大量霜状愈伤组织覆盖在愈伤的最表层 (图 1-B1、C1 和 D1), 并且 2,4-D 浓度较高的 C1 和 D1 培养基上的愈伤组织开始出现褐化 (图 1-C1 和 D1); 而 A1 培养基愈伤组织始终为淡黄色, 仅有极少量白色霜状组织, 但无褐化现象 (图 1-A1). 当以 MS 分别添加 1、1.5、2、2.5、5 mg/L 的 2,4-D 浓度进行培养时, 虽然可以产生愈伤, 但 5 mg/L 以下 2,4-D 浓度培养基上诱导子叶形成愈伤的出愈时间以及形成的愈伤量明显不如 5 mg/L 2,4-D 浓度培养基, 所以, 京豆 1 号大豆子叶愈伤组织诱导培养基以 A1 培养基最佳, 诱导最适的

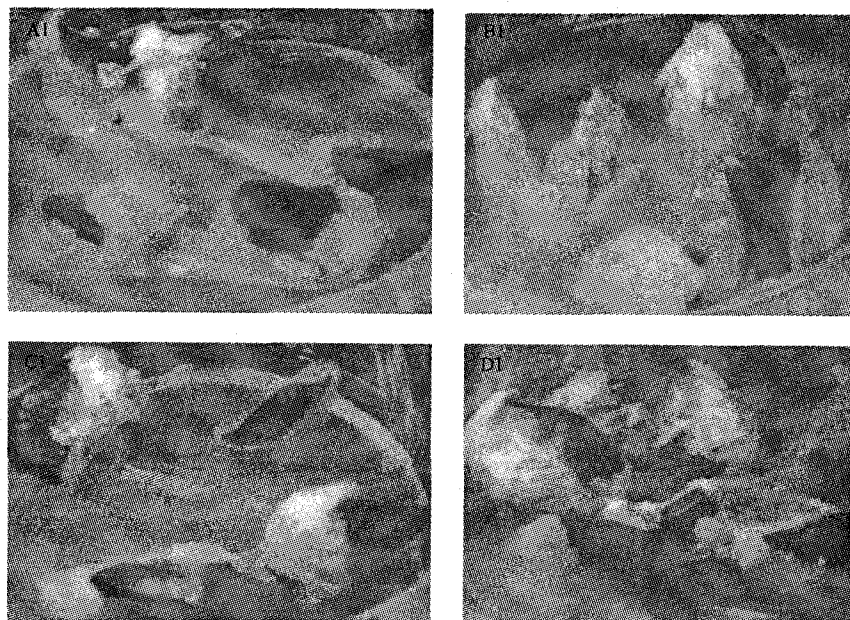


图1 不同 2,4-D 浓度的培养基诱导出的 J1 子叶愈伤组织 (22 d)

Fig. 1 Cotyledon callus induced by MS mediums with different concentrations of 2,4-D (22 days)

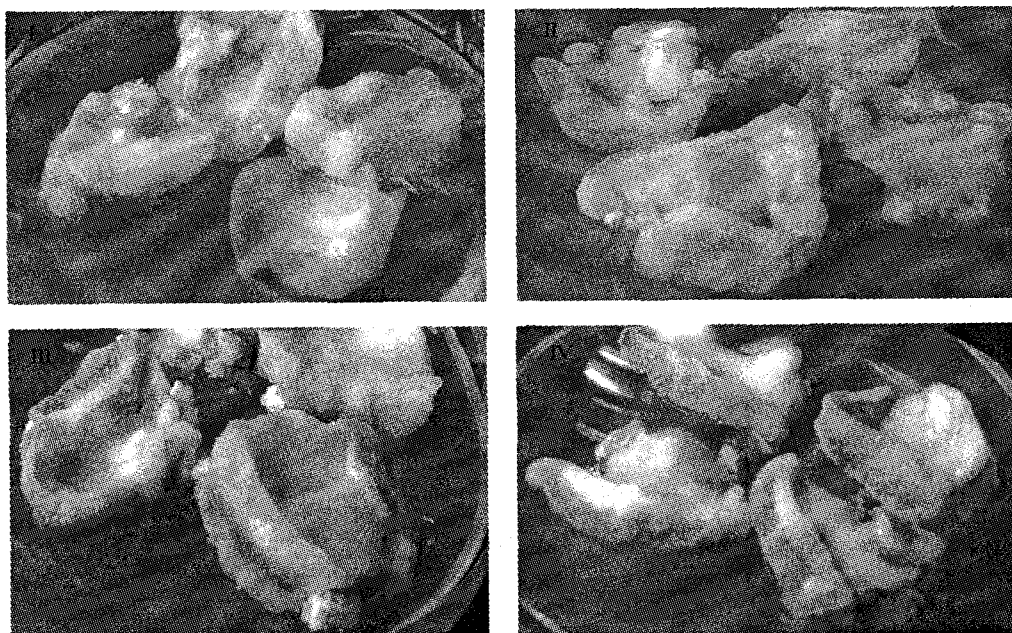


图2 A2培养基中附加6-BA对子叶愈伤组织诱导的影响

I. 6-BA 0.2 mg/L 培养 10 d; II. 6-BA 0.2 mg/L 培养 25 d; III. 6-BA 0.8 mg/L 培养 25 d;
IV. 6-BA 1.2 mg/L 培养 25 d

Fig. 2 Effect of A2 medium added different concentrations of 6-BA on Cotyledon callus induction

2,4-D 浓度为 5 mg/L.

以 A1 培养基添加不同浓度 0.2、0.4、0.8、1.2 和 2.0 mg/L 6-BA, 组成 A2~E2 培养基, 将子叶外植体接种到上述培养基中. 和不加 6-BA 者相比: 3 d 时, 5 种培养基均导致子叶开始膨大; 10 d 时, 子叶膨大明显, 仅在子叶切口和边缘部分形成薄而致密的白色愈伤组织, 就不同 6-BA 浓度的培养基而言, 浓度最低 (0.2 mg/L) 的 A2 培养基中愈伤量稍多 (图 2-I), 6-BA 浓度越高, 诱导出的愈伤组织量越少; 培养至 25 d 时, 外植体呈扁平状膨大, 愈伤组织量没有明显增加, 且局部愈伤组织褐化 (图 2-II), 随着 6-BA 浓度的增加, 褐化程度越明显 (图 2-III 和 IV), 说明 6-BA 容易导致大豆子叶愈伤组织坚硬, 不利于愈伤组织的诱导, 且 6-BA 浓度越高, 这种作用越明显.

2.2.2 不同浓度 2,4-D 和 6-BA 对下胚轴愈伤组织诱导的影响

和子叶作为外植体相比, 接种于 MS 添加不同浓度 2,4-D 组成的下胚轴愈伤组织诱导培养基 A3~D3 上的下胚轴外植体出愈时间晚, 培养至第 5 天时, 外植体开始脱分化, 15 d 左右, 不同 2,4-D 浓度的培养基均能诱导可见的愈伤组织. 但 0.2 mg/L 2,4-D 的 A3 培养基易导致下胚轴外植体产生大量不定根, 形成愈伤组织的量很少; 0.5 mg/L 2,4-D 的 B3 培养基产生的愈伤组织量大于 A3, 但也会产生少量不定根; 2,4-D

浓度分别为 0.8 和 1.0 mg/L 的 C3 和 D3 培养基外植体整体脱分化, 完全形成愈伤 (图 3-I), 培养至 30 d 左右时下胚轴愈伤均可长至 1 cm 大小, 二者之间没有明显的差异, 故选定含有 0.8 mg/L 2,4-D 的 C3 培养基进行培养.

下胚轴接种于 C3 培养基添加不同浓度的 6-BA 组成的 A4~D4 培养基上, 3 d 后外植体轻度膨大, 17 d 多在其两端的切口处及接触培养基的底部外侧形成质地较坚硬的白色小块愈伤组织. 和没有添加 6-BA 的 C3 培养基诱导的愈伤组织相比, 加入 6-BA 致使外植体膨大, 形成的愈伤组量较少, 且组织块明显坚硬 (图 3-II).

鉴于加入 6-BA 可导致子叶和下胚轴, 尤其是后者愈伤组织局部坚硬, 我们对这些愈伤组织块进行了石蜡切片的显微观察. 结果表明: 邻近外植体一侧的细胞较小且排列较紧密, 细胞核较大; 表层疏松部分的愈伤细胞则体积较大, 核较小, 细胞排列整齐; 二者之间质地较硬部分的细胞, 其细胞核消失, 细胞壁显著增厚呈木质化 (图 4).

2.2.3 对照试验

外植体接种到不添加激素的 MS 培养基上, 均无愈伤组织产生.

2.3 悬浮细胞系的建立

于 A1 和 C3 培养基诱导并继代培养 30 d 的子叶

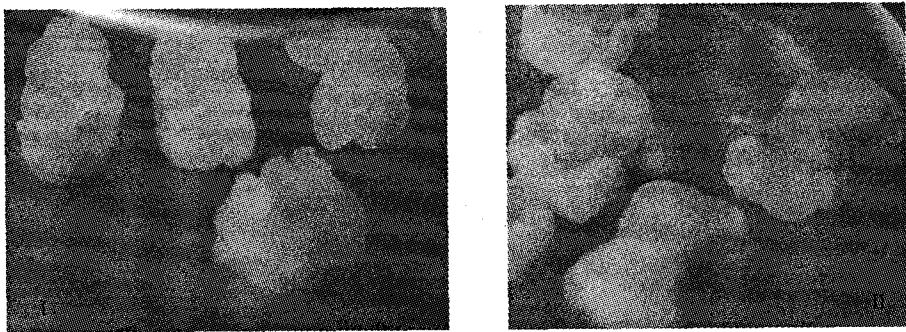


图 3 不同激素成分对下胚轴愈伤组织诱导的影响
 I. 仅含有 2,4-D(0.8 mg/L)的 C3 培养基诱导出的下胚轴愈伤;
 II. 含有 2,4-D(0.8 mg/L)和 6-BA(0.6 mg/L)的 C4 培养基诱导出的下胚轴愈伤组织
 Fig. 3 Effect of different hormone components on induction of Hypocotyl callus

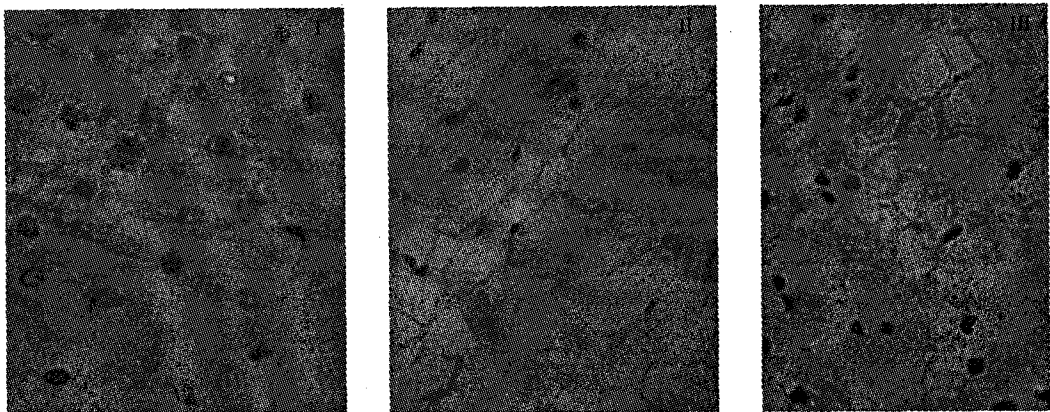


图 4 附加 6-BA 诱导下胚轴愈伤形成过程中的组织细胞石蜡切片(10×40)
 I. 邻近膨大外植体部分细胞;II. 愈伤组织细胞;III. 壁增厚的无核细胞
 Fig. 4 Paraffin sections of different parts of hypocotyl callus induced by C4 medium containing 0.2 mg/L 6-BA (10×40)

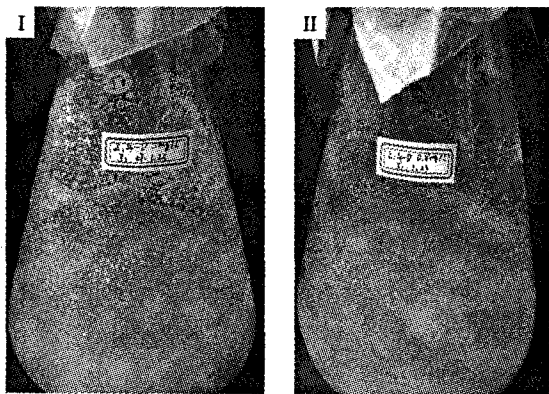


图 5 子叶(I)和下胚轴(II)悬浮细胞
 Fig. 5 Cotyledon suspension cells (I) and hypocotyl suspension cells (II)

织,旋转式摇床中暗培养(25℃),转速为 110~120 r/min. 7 d 时细胞生长进入稳定期,每 8 天继代一次,容易获得淡黄色、生长旺盛的悬浮培养细胞. 而附加不同浓度 6-BA 的培养基,因其子叶和下胚轴形成的愈伤组织量少且质地坚硬,最终都无法成功建立悬浮细胞系. 图 5- I 和 5- II 分别为 J1 子叶和下胚轴愈伤组织悬浮继代后培养 8 d 的悬浮细胞.

3 讨 论

目前,大豆组培的研究仍以大豆植株再生为主要目的,在相关的研究报道中,尽管外植体不同,但愈伤组织的诱导多以一定浓度的 2,4-D 和 6-BA 配合使用^[6-7],虽然诱导出的愈伤组织可以用于植株再生,但 这些研究者也发现附加 6-BA 后,愈伤组织出愈率低,愈伤组织量也相对较少,呈小颗粒状^[7]. 本研究通过不同浓度 2,4-D 对大豆子叶和下胚轴愈伤组织诱导的筛选研究表明无论以子叶还是下胚轴为外植体,单独使

和下胚轴愈伤组织中选择质地松散、淡黄色的愈伤组织,转移到液体培养基中进行悬浮培养,分别建立其相应的悬浮细胞体系. 每 20 mL 培养基添加 2 g 愈伤组

用一定浓度的 2,4-D 均可诱导出其相应的愈伤组织,出愈时间短,且出愈率高,愈伤组织疏松、易碎,这与前人的研究结果一致^[8-11]。

在筛选出适宜诱导子叶和下胚轴愈伤组织的 2,4-D 浓度基础上,附加不同浓度的 6-BA 使得子叶和下胚轴、尤其是后者形成的愈伤组织结构紧密,质地坚硬。我们以筛选的最适 2,4-D 浓度附加不同浓度 6-BA 对其它大豆品种(京豆 2 号,垦丰,抗线)进行的实验也出现了类似结果,说明附加 6-BA 对不同大豆品种愈伤组织诱导具有相同的致坚作用(结果未显示)。有实验以附加 6-BA 的培养基诱导出的愈伤组织最终没能建立起大豆悬浮培养体系(私人交流),通过比较附加不同浓度 6-BA 对大豆子叶和下胚轴愈伤组织诱导的影响,并结合对诱导形成的愈伤组织的显微切片观察,我们认为加入 6-BA 导致愈伤组织局部细胞核消失、壁增厚、趋向木质化可能是这些质地坚硬的愈伤组织难以建立相应的悬浮细胞系的主要原因所在。

筛选确定利于建立大豆悬浮细胞系的愈伤组织培养激素条件,为大豆悬浮细胞系的快速繁殖及大豆细胞工程、代谢工程、遗传转化研究奠定了基础;6-BA 对大豆愈伤组织诱导的抑制及致坚作用可为大豆再生苗愈伤组织培养激素浓度筛选的研究提供参考。

参考文献:

- [1] Wang H J, Murphy P A. Isoflavone content in commercial soybean foods[J]. J Agric Food Chem, 1994, 42: 1666—1673.
- [2] Scharbo-Dehaan M. Hormone replacement therapy[J]. Nurse Pract, 1996, 21: 1—13.
- [3] Zava D T, Duwe G. Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells in vitro[J]. Nutr Cancer, 1997, 27 (1): 31—40.
- [4] 刘志胜,李里特,辰己英三. 大豆异黄酮及其生理功能研究进展[J]. 食品工业科技, 2002, 21(1): 78—80.
- [5] Baker L, Meldrum K K, Wang M, et al. The role of estrogen in cardiovascular disease[J]. J Surg Res, 2003, 115 (2): 325—344.
- [6] 王升吉,吴元华,王洪岩,等. 大豆不同外植体组织培养及再生研究[J]. 沈阳农业大学学报, 1999, 30(3): 255—259.
- [7] 李大玮. 植物生长调节剂的使用和大豆愈伤组织的诱导及保持[J]. 遗传, 1989, 11(2): 1—4.
- [8] 李海燕,朱延明,冯莹莹,等. 大豆幼胚子叶胚性悬浮细胞系的建立与次生胚诱导[J]. 大豆科学, 2002, 31(2): 123—126.
- [9] Wang P, Wang G, Jing J I, et al. A novel system for proliferation, maintenance and plantlet germination from somatic embryo of soybean[J]. Acta Botanica Sinica, 2004, 46 (2): 154—158.
- [10] 刘博林,徐民新. 两个栽培大豆品种的体细胞胚胎发生和植株再生研究[J]. 中国油料作物学报, 1999, 21(2): 11—13.
- [11] Ghazi T D, Cheema H V, Nabors M W. Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryogenic callus of soybean, *Glycine max* L[J]. Plant Cell Reports, 1986, 5: 452—456.

Effect of Hormones on the Induction of Soybean Callus Suitable for Establishment of Suspension Cell Lines

ZHU Xue-yi¹, LIANG Xiao-fang¹, Li Hong-fang²

(1. Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,

School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. College of Basic Medicine, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: The effects of 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) and 6-Benzylaminopurine (6-BA) on induction of soybean callus were studied. The results indicated that 5 mg/L and 0.8 mg/L 2,4-D were suitable concentrations for the induction of soybean cotyledon callus and hypocotyl callus, respectively. Plenty of incompact and rapid growing suspension cells were obtained with these two kinds of calluses. Compared to the callus induced by culture medium only containing 2,4-D, calluses induced by mediums supplemented with different concentrations of 6-BA were significantly fewer in quantity and harder in quality. Microscope observation of hypocotyl callus induced by medium containing 6-BA showed that part of callus cells' nucleus disappeared, and their cell wall markedly thickened. This might be the main reason for explaining why calluses induced by mediums supplemented with 6-BA were not suitable for establishment of suspension cell lines.

Key words: soybean(*Glycine max* L.); callus tissue culture; suspension cells; hormone