

大豆再生体系的研究进展

孙文丽^{1,2}, 刘昱辉^{2*}, 吴元华¹ (1. 沈阳农业大学植物保护学院, 辽宁沈阳 110161; 2. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要 大豆的再生体系一直是大豆遗传转化发展的主要障碍, 近些年随着研究的深入, 得到了很大的发展。文章对大豆遗传转化体系的各种再生体系优缺点进行了比较和综述, 并对大豆再生体系的前景进行了展望。

关键词 大豆; 组培; 再生体系

中图分类号 S336 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)16-06660-03

Advance in Research on the Regeneration System of Soybean

SUN Wen-li et al (College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract The regeneration system of soybean had always been the main obstacle in the development of its genetic transformation. It got great development along with the research going deeper in recent years. The advantages and disadvantages of various regeneration systems in the genetic transformation system of soybean were compared and summarized and the foreground of the regeneration system of soybean was prospected in this article.

Key words Soybean; Tissue cultivation; Regeneration system

大豆是重要的经济作物, 因此提高和优化大豆品质成为人们关注的热点。人们利用转基因技术提高大豆品质的同时, 大豆的组织培养也得到了广泛的研究, 20世纪60年代人们曾采用过各种不同的外植体, 但植株再生一度十分困难, 即使有再生植株发生, 频率和重演性极低。进入20世纪80年代以来, 大豆的再生体系有了突破性的进展。1980年, Cheng等首先报道用无菌苗的子叶节为外植体, 在含高浓度BA(10~50 μmol/L)的改良B5培养基上诱导丛生芽获得高频率的再生植株^[1]。此后, 各种不同的再生体系逐渐为人们所发现。建立一个良好的组培再生系统, 是大豆遗传转化成功的前提。因此, 笔者对目前研究应用比较多的再生体系的优缺点进行了综述。

1 胚轴再生体系

胚轴作为外植体, 是目前研究应用较多的农杆菌转化受体。有许多成功的转化事例, 早在1983年陈云昭等就以大豆上胚轴和下胚轴为外植体培养出再生植株^[2]。徐香玲等和苏彦等分别将*Bt*基因, *SMV-CP*基因、几丁质酶基因通过农杆菌介导法以胚轴为受体转入吉林29和中黄4等品种中^[3-5]。至今, 人们对影响胚轴再生的各种因素进行了研究, 极大地提高了胚轴的再生频率。1983年Christianson等以幼胚轴为外植体, 在以柠檬酸铵为氮源并含有5 mg/L 2,4-D的改良MS培养基上诱导了体细胞胚胎发生, 获得再生植株^[6]。Kameda等1997年报道, 当用发芽种子的下胚轴外植体时, 2.0 mg/L TDZ诱导不定芽的效率比1.5 mg/L BA要高^[7]。Zhou等1998年认为TDZ具有很强的细胞分裂素活性, 激素组合以1.0 mg/L TDZ + 1.5 mg/L BA + 0.4 mg/L NAA的诱导效率最高, 是适合于多种大豆基因型的高效率诱导培养基^[8]。2000年张晓娟等通过进一步改变TDZ和BA浓度配比, 提高了在相同时间内获得完整再生植株的效率, 在诱导培养基中适当增加NAA, 有助于提高萌动种子胚轴作外植体的植株再生效率^[9]。何恩铭等2005年研究表明, 激素种类及合适的浓度对愈伤组织的诱导是很重要的, 过高或过低都不利于愈伤组织的诱导, 对诱导大豆胚轴愈伤组织, 2.0 mg/L

的2,4-D是比较合适的^[10]。2005年余泽高等以鄂豆6号成熟种子无菌苗下胚轴1/2切段、1/3切段为外植体, 在添加NAA 0.1 mg/L + KT 1.0 mg/L培养基中下胚轴生根率较高, 添加NAA 0.1 mg/L + KT 1.0 mg/L、2,4-D 0.1 mg/L + 6-BA 1.5 mg/L、2,4-D 0.1 mg/L + KT 1.5 mg/L可诱导芽的发生; 1/2切段生根和发芽比1/3切段的好; 反插根的发生较多, 顺插有利于芽的形成^[11]。2006年, 汲逢源在共培养基中加入硫代硫酸钠、L-半胱氨酸以及二硫苏糖醇等抗氧化剂, 可以有效地抑制大豆下胚轴在组培过程中褐化的发生, 并大幅度提高农杆菌在下胚轴的瞬时表达率^[12]。

2 子叶节再生体系

由于子叶节具有取材不受季节限制、诱导再生快、转化突变率低等优点, 获得了多个成功的转化。Zhou等用子叶节为受体分别将几丁质酶基因、*Bt*基因, 玉米转座子*AC*基因, *SMV-CP*基因等转入Peking等大豆品种中, 另外李海燕等用农杆菌转化大豆子叶节获得同时整合*chi*和*rip*基因的转基因大豆^[3-5, 13-15]。但其也存在再生频率低、受基因型限制, 转化株的嵌合体等问题。Meurer等摸索了农杆菌转化大豆子叶节的影响因素, 发现经超声处理过的子叶节较对照容易转化, 而且由野生农杆菌Chry5改造而得的农杆菌菌株KYRT11的转化效果明显优于过去常用的EHA105和LBA4404^[16]。王关林等和刘艳芝等研究表明大豆苗龄同时影响子叶节不定芽的再生能力和对农杆菌的感受能力, 大豆子叶节以苗龄4 d的转化效率最高, 随着苗龄的延长转化率降低^[17-18]。不同的培养基对大豆子叶节的丛生芽率也有明显的影响, 基本培养基MSB诱导丛生芽的效果好于B5, 在基本培养基中附加1.1或1.7 mg/L的6-苄氨基嘌呤对诱导子叶节丛生芽有显著的促进作用, 子叶节丛生芽诱导率在大豆不同基因型间存在差异^[19]。李海燕等2006年研究表明, 在大豆萌发时, 加入1.0 mg/L 6-BA和2.0 mg/L 2,4-D子叶节分化的芽数较高^[20]。2006年, 潘川芝等为获得大豆子叶节高效离体再生体系的优化方案, 选用5个大豆品种的子叶节作为外植体, 研究了种子萌发天数、外植体大小、不同激素浓度对大豆子叶节再生的影响。结果显示, 大豆苗龄以5~7 d最佳; 外植体以保留全部子叶为宜; 外植体的萌发和诱导均存在基因型差异, 292黄豆的最佳萌发培养基为1/2 MS + 1

作者简介 孙文丽(1980-), 女, 辽宁沈阳人, 博士研究生, 研究方向: 大豆抗病基因工程。*通讯作者。

收稿日期 2008-04-21

mg/L 6-BA, 而鄂 8157、湘春豆 18 号、湘春豆 13 号、湘春豆 15 号的最佳萌发培养基为 1/2 MS + 2 mg/L 6-BA, 292 黄豆、鄂 8157、湘春豆 18 号、湘春豆 13 号、湘春豆 15 号的最佳诱导培养基组合分别为 MS + 2 mg/L 6-BA、MS + 2 mg/L 6-BA、MS + 1 mg/L 6-BA、1/2 MS + 2 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L IBA、MS + 2 mg/L 6-BA, 丛生芽诱导率分别为 60.00%、62.50%、81.25%、77.27% 和 47.5%。子叶节丛生芽生根时 IBA 浓度以 2 mg/L 为宜^[21]。2007 年李文霞等试验结果表明, 大豆基因型对子叶节丛生芽诱导及对农杆菌的易感性均有较大影响, 她们筛选出了 11 个丛生芽分化率在 70% 以上的大豆基因型, 筛选出最易感的大豆品种为黑农 35, 其次为绥农 14 和合丰 35^[22]。

3 子叶再生体系

以子叶作为外植体, 主要用于基因枪法的转化, 叶片面积小, 较为经济, 同时它还可以克服以子叶节诱导丛生芽转化所产生的嵌合体。Cheng 等首先报道用无菌苗的子叶节为外植体, 在含高浓度 BA (10 ~ 50 μ mol/L) 的改良 B5 培养基上诱导丛生芽获得高频率的再生植株^[23]。1988 年 Hinchee 首先以农杆菌和子叶共培养, 将 nptII 基因和草甘膦抗性基因导入了大豆获得大豆转基因植株^[24]。Lazzeri 等 1985 年用 10 mg/L NAA 诱导了大豆幼胚子叶的体细胞胚胎发生^[25]。1987 年 Lazzeri 等从一对未成熟子叶外植体, 用 MSN10 培养基能产生多至 25 个体细胞胚, 并可用于多种基因型。Hildebrand、Lazzeri、Lee 和苏彦辉等以未成熟子叶为材料对大豆基因型、激素、子叶切割方法进行了研究, 并证明了未成熟子叶组织培养时芽增殖数和植株再生率因基因型、激素、切割位点等不同而有明显差异^[26-29]。王萍等 2002 年研究表明大豆未成熟子叶诱导体细胞胚胎发生主要与未成熟子叶长度有关, 取材最佳时间与大豆品种的生育期有关^[30]。同年他们又进行低温处理对子叶节外植体的影响试验, 选用 3 个栽培大豆品种的未成熟子叶在接种前用 4 $^{\circ}$ C 低温预处理幼荚 0、2、3、4、5、6 d, 研究低温预处理对大豆体细胞胚胎发生的影响。结果表明, 4 $^{\circ}$ C 低温预处理幼荚 3 ~ 4 d, 可刺激大豆体细胞胚胎发生, 提高胚胎发生频率。不同品种对低温预处理的反应基本一致^[31]。LI Hai-Yan 等, 2002 年也对大豆子叶进行了 4 $^{\circ}$ C 低温预处理, 发现基因型与低温预处理的时间存在相互作用, 不同基因型低温预处理的最适时间为 1 ~ 3 d^[32]。李海燕等 2002 年选用黑龙江省 5 个大豆品种的幼胚子叶, 建立了胚性悬浮培养体系, 并由悬浮体系增殖产生次生胚。结果表明, 高效体细胞胚诱导培养基为 MSB + 40 mg/L 2,4-D + 6% 蔗糖。高效球型胚增殖培养基为 10 mg/L 2,4-D + 1/2 MS 氮源 + 5 mmol/L 谷氨酰胺 + 5 mmol/L 天门冬酰胺。培养 8 周后的次生胚成熟率和再生率显著提高, 到第 12 周分别达 63% 和 35%, 之后提高幅度减小^[33]。王萍等 2003 年研究表明大豆不同基因型的未成熟子叶对卡那霉素浓度的反应在出愈率上表现相似, 而在卡那霉素浓度间存在显著差异, 在 25 mg/L 卡那霉素浓度时出愈率明显降低, 在 50 mg/L 卡那霉素时出愈率仅 10% 左右。当培养基中加入不同浓度的头孢霉素时, 大豆不同基因型对其反应是不同的。其中, 辽豆 11 反应较敏感, 而黑农 40 反应不敏感^[34]。王萍等 2004 年将抗虫基因

转化 5 个大豆品种的未成熟子叶, 经卡那霉素筛选得到抗性植株, 进一步用 PCR 检测, 获得 10 株 PCR 阳性植株^[35]。子叶是目前为止研究比较成熟的再生体系, 可以作为大豆遗传转化的受体材料, 实现基因转化。

4 胚芽尖再生体系

胚芽尖作为大豆组培的外植体是由卫志明 2004 年首先研究报道的。卫志明等用大豆的胚芽尖、胚轴、子叶节分别作为外植体进行 GUS 基因的遗传转化。发现胚芽尖的再生效率达到 87.7%, 而子叶节和胚轴分别为 40.3% 和 56.4%。并且胚芽尖利用浓杆菌转化系统可以得到 15% 的转化效率, 是一个新的具有高转化效率的再生体系^[36]。目前还没有其他关于胚芽尖再生系统的报道。

5 原生质体再生体系

原生质体系统是克服转化植株嵌合性的最有效途径之一。20 世纪 80 年代以来, 有许多试验研究已经利用原生质体培养获得再生植株。1985 年 Newell 等, 报道了经子叶分离出原生质体培养获得再生植株^[37]。1988 年卫志明等报道, 大豆 6 个栽培种未成熟种子的子叶分离原生质体经培养得到了再生植株^[38]。黄健秋等用大豆幼胚原生质体经胚途径也获得了再生植株^[39]。Wei 和 Xu 用大豆幼嫩子叶分离原生质体培养获得再生植株后; 罗希明等和 Dhir 以相似的方法获得了不同大豆品种原生质体的再生植株^[40-42]。卫志明等试验表明, 由原生质体起源的再生植株, 其当代生长早熟, 茎秆较矮细, 叶片小, 结荚数小, 其中有部分是空荚, 因而从再生植株中获得的成熟子粒较少, 子粒重量和大小也仅为原采本种子实生株的 1/4 ~ 3/4 不等^[43]。但将再生株当代所产生的种子, 按株系收获并再行种植, 其子代植株的长势生育期及其所结的种子与各自原种相比趋于正常, 因此这是一个需要进一步研究的问题, 并且种子二代的遗传变异情况也需进一步研究。

卫志明等用 PEG 法, 将外源基因导入到大豆的原生质体中获得了 27 棵转基因植株, 其转化效率达到了 0.6%^[44]。这是通过原生质体途径转化大豆外源基因的首例报导。随后, 南相日等通过 PEG 法将 BT 毒蛋白基因导入到大豆主栽品种黑农 35、黑农 37、合丰 25 和合丰 35 的原生质体中, 经潮霉素筛选, 选择有抗性的愈伤组织进行分化, 获得了 3 棵再生植株, 移栽后全部成活, 对移栽后植株的总 DNA 进行 PCR 分析, 均显阳性^[45]。对 PCR 阳性植株进行 Southern 杂交分析, 证明 BT 毒蛋白基因已整合到大豆细胞基因组中。但由于原生质再生频率较低、操作较为复杂、转化方法受到限制, 可重复性较差等缺点, 近几年从事这方面的研究报道较少。但是大豆原生质体获得再生植株的途径是可行的, 为利用大豆原生质体培养进行遗传操作的研究提供了试验系统和一套较为成熟的技术。

6 花粉再生体系

最早将花粉用于大豆组培的是 Ivers 等获得了体细胞愈伤组织^[46]。刘德璞等首次用改良 B5、KM 8P、MB、M KM 8P 培养基获得了游离花粉愈伤组织, 但在分化培养上仅看到芽点和根的形成, 没有再生出绿芽^[47]。直到近些年, 叶兴国等由花粉愈伤组织诱导出胚状体, 并发育成根芽齐全的再生植

株^[48]。赵桂兰等对大豆花药培养中愈伤组织和胚状体的诱导及萌发成花粉植株进行了大量试验,发现细胞分裂素(TDZ)对胚状体的诱导和萌发起到了主导作用,在诱导产生的愈伤组织中只有0.5%~2.0%分化出植株^[49]。大豆花粉培养分化难、分化率低是其存在的主要问题,而且尚未见将此系统用于遗传转化研究的报道。

7 不同再生体系的比较

大豆的各种再生体系胚轴、子叶节、子叶、胚芽尖、原生质、花粉等,均有各自的优缺点。胚轴、子叶节、子叶、胚芽尖再生系统用时短,再生频率高,操作简单,不过易形成嵌合体,后期的检测、鉴定、筛选工作量大。原生质、花粉再生体系,用时长,再生频率低,转化困难。目前有些研究,针对不同的外植体进行了比较。1986年Wright等分别用大豆的子叶节、上胚轴和初生叶为外植体,通过器官发生均获得了再生植株^[50]。1998年程林梅等以大豆上胚轴、下胚轴、幼胚和小真叶为外植体,高频率地诱导再生植株。但不同基因型由于遗传和生理差异,诱导植株再生效果不同。汾豆33号不论是上胚轴、下胚轴、小真叶和幼胚诱导植株再生率都很高^[51]。薛仁镐等1994年利用大豆成熟子叶节、未成熟子叶节、幼胚、成熟子叶作为外植体,4种外植体中以成熟子叶节的再生频率最高,达96%。其次为幼胚>未成熟子叶节>成熟子叶^[52]。1999年,王升吉等利用不同大豆品种的顶芽、胚轴、子叶节、子叶、叶片等作为外植体,进行组织培养再生研究,结果表明,不同大豆品种诱导分化芽的能力差别较大,供试品种中,辽豆11号和辽豆10号的再生能力最强,对诱芽率的影响,经L₁₆(4⁵)正交试验可知外植体>品种>培养基。外植体对诱芽率影响依次为子叶节>顶芽>子叶>下胚轴^[53]。程林梅等采用不同大豆品种的下胚轴、上胚轴、小真叶和幼胚作外植体进行植株再生的研究。结果表明,汾豆33号诱导植株再生率最高,诱导频率依次为下胚轴>上胚轴>小真叶>幼胚;下胚轴在B5+NAA 0.3 mg/L+KT1 mg/L培养基上可诱导出愈伤组织并直接分化成苗,植株再生频率为34%,最高达50%。获得大豆高频率再生植株,收到较饱满的种子^[54]。虽然前人的研究结果并非完全一致,这是由于不同的再生体系均有很多不同的影响因素造成的,每个再生体系都还有很大的提高空间。不过前人的研究可以说明子叶节、胚轴、胚芽尖是目前研究应用比较成功的再生体系,当然这3种再生体系的优化均还需要大量深入的研究,进而进一步提高它们的再生频率。

8 大豆再生体系的发展前景

大豆再生体系的优化是大豆遗传转化研究的重点和前提。迄今为止,人们对各种不同的外植体进行了比较深入的研究,也得到了很多成功转化的大豆植株,但诱导再生植株频率低,重复性差,依然是大豆再生体系面临的主要问题,需要进一步深入的研究。

参考文献

- [1] CHENG T Y, SAKA H, VOQUI-DINH T H. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture [J]. Plant Sci Lett, 1980, 19:91-99.
- [2] 陈云昭,王玉国. 大豆外植体培养再生植株的研究[J]. 山西农业大学学报:自然科学版, 1983(1):41-45.
- [3] 徐香玲,李兴华,刘伟华,等. Ri质粒介导的大豆花叶病毒外壳蛋白基

因转化大豆的研究[J]. 大豆科学, 1996, 15(4):279-288.

- [4] 徐香玲,邹联沛,刘伟华. 向大豆导入几丁质酶的初步研究[J]. 大豆科学, 1999, 18(2):101-108.
- [5] 苏彦辉,王慧丽,俞梅敏,等. 苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白基因导入大豆的研究[J]. 植物学报, 1999, 41(10):1046-1051.
- [6] CHRISTIANSON M L, WARNICK D A, CARLSON P S. A morpho genetically competent soybean suspension culture [J]. Science, 1983, 222:6322-6341.
- [7] KANEDA Y, Tabei Y, NISHIMURA S, et al. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concent rat ions increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr] [J]. Plant Cell Rep, 1997, 17:8-12.
- [8] ZHOU X A. Effects of plant growth regulators and genotypes on plant regeneration in soybean[M]. Master of Science Thesis of Agricultural University of Poznan, 1998.
- [9] 张晓娟,方小平,罗丽霞,等. TDZ和BA对诱导大豆胚轴植株再生的影响[J]. 中国油料作物学报, 2000, 22(1):24-26.
- [10] 何恩铭,齐香君,陈秀清,等. 大豆愈伤组织的诱导与离体培养[J]. 陕西科技大学学报, 2005(10):29-31.
- [11] 余泽高,梁球. 大豆下胚轴不同切段离体培养器官发生的研究[J]. 湖北农业科学, 2005(4):15-19.
- [12] 汲逢源,王戈亮,许亦农. 抗氧化剂对农杆菌介导的大豆下胚轴 GUS 基因瞬时表达的影响[J]. 植物生态学报, 2006, 30(2):330-334.
- [13] ZHOU J H, AITHERLY A G. In situ detection of transposition of the maize controlling element (Ac) in transgenic soybean tissues[J]. Plant Cell Reports, 1990, 8:542-545.
- [14] 徐香玲,高晶. Ti质粒介导的B.t.k- δ 内毒素蛋白基因转化大豆的初步研究[J]. 大豆科学, 1997, 16(1):6-11.
- [15] 周思军,李希臣,刘昭军,等. 通过农杆菌介导法将Bt(cryIA)基因导入大豆[J]. 大豆科学, 2001, 20(3):157-162.
- [16] MEURER C A, DINKINS R D, COLLINS G B. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation[J]. Plant Cell Rep, 1998, 18:180-186.
- [17] 刘艳芝,刘莉,李俊波,等. Analysis of tissue culture system and gene transformation receptor system of soybean [J]. Jilin Agriculture Science, 2000, 25(6):12-14.
- [18] WANG D L, FANG H J. Plant gene engineering principle and technique [M]. Beijing: Science Press, 1998:221-227.
- [19] 王萍,王军军,高德虎,等. 影响大豆子叶节丛生芽形成的诱导因子研究[J]. 吉林农业科学, 2001, 26(6):20-23.
- [20] 李海燕,武小霞,刘淼,等. 大豆子叶节、胚尖再生植株的研究[J]. 大豆科学, 2007(5):42-46.
- [21] 潘川芝,李凤,戴良英. 大豆子叶节离体再生体系优化研究[J]. 湖南农业科学, 2006(5):31-36.
- [22] 李文霞,吕文河,李文滨,等. 基因型对大豆子叶节系统再生和转化的影响[J]. 作物杂志, 2007(3):71-73.
- [23] CHENG T Y, SAKA H, VOQUI-DINH T H. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture [J]. Plant Sci Lett, 1980, 19:91-99.
- [24] HINCHEE M A, CONNER-WARD D V, NEWELL C A, et al. Production of transgenic soybean plants using AGROBACTERIUM mediated DNA transfer [J]. Biotechnology, 1988, 6:915-922.
- [25] LAZZERI P A, HILDEBRAND D F, COLLINS G B. A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean [J]. Plant Mol Biol Rep, 1985, 3:160-167.
- [26] LAZZERI P A, HILDEBRAND D F, COLLINS G B. Soybean somatic embryogenesis: Effects of hormones and culture manipulations [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1987, 10:197-208.
- [27] LAZZERI P A, HILDEBRAND D F, SUNECA J, et al. Soybean somatic embryogenesis interactions between sucrose and auxin [J]. Plant Cell Reports, 1988, 7:517-520.
- [28] LEE W, KOMATSUDA T, OKA S. Comparison of embryogenesis efficiency on eight portions immature embryos in *Glycine gracilis* [J]. Soybean Genetics Newsletter, 1990, 17:59-61.
- [29] 苏彦辉,王慧丽,俞梅敏,等. 苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白基因导入大豆的研究[J]. 植物学报, 1999, 41(10):1046-1051.
- [30] 王萍,吴颖,杨武杰,等. 大豆未成熟子叶体细胞胚胎发生及其相关因子的分析[J]. 中国油料作物学报, 2002, 24(1):29-32.
- [31] 王萍,卫居香,李宜程,等. 低温预处理对大豆未成熟子叶胚胎发生影响的研究[J]. 吉林农业大学学报, 2002, 24(3):27-29.
- [32] LI H Y, ZHU Y M, LIU B D, et al. Study on main factors influencing somatic embryo inducing from immature cotyledon of soybean (*Glycine max* L.) [J]. ACTA AGRONOMICA SINICA, 2002, 28(6):852-856.
- [33] 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, 21(2):123-126.
- [34] 王萍,王罡,吴颖,等. 抗生素对大豆未成熟子叶愈伤形成和体细胞胚胎发生的影响[J]. 中国油料作物学报, 2003, 25(1):14-17.

表7 皖麦41成熟胚愈伤组织平均鲜重直观分析

Table 7 Intuitionistic analysis on the average fresh weight of calli of mature embryos in Wanmai 41

因素 Factor	K_1	K_2	K_3	\bar{K}_1	\bar{K}_2	\bar{K}_3	R
A	0.604	0.591	0.327	0.201	0.197	0.109	0.092
B	0.558	0.486	0.478	0.186	0.162	0.159	0.027
C	0.463	0.544	0.515	0.154	0.181	0.172	0.027
D	0.464	0.530	0.528	0.155	0.177	0.176	0.022

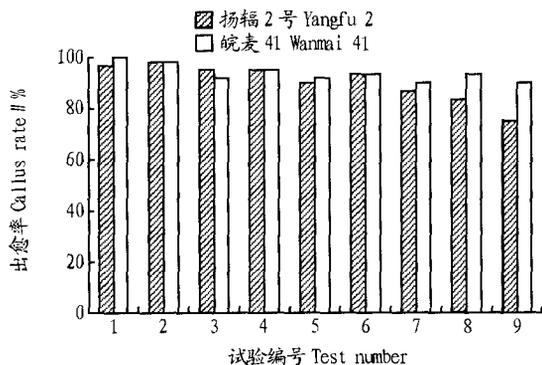


图1 不同培养条件对扬辐2号和皖麦41出愈率的影响

Fig.1 Effects of different culture conditions on the calli rate of Yangfu 2 and Wanmai 41

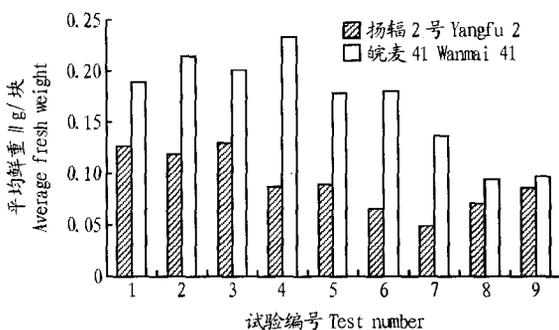


图2 不同培养条件对扬辐2号和皖麦41愈伤组织平均鲜重的影响

Fig.2 Effects of different culture conditions on the average fresh weight of calli in Yangfu 2 and Wanmai 41

处理中皖麦41愈伤组织鲜重都明显高于扬辐2号。由所观察的愈伤组织颜色和组织的组织质量可知,2个小麦品种在1/2 MS + 2,4-D 4.0 mg/L培养条件下愈伤组织质量较好,颜色呈乳黄色。

3 结论与讨论

(1)小麦成熟胚愈伤组织的诱导受多种因素的影响。基本培养基是最重要的影响因素,而激素类型和对比对诱导效果也有一定的影响。试验结果表明,基本培养基对2个小麦品种成熟胚愈伤组织诱导影响最大,在所采用的3种基本培养基中1/2 MS培养效果最好。对于激素类型和配比,不同小麦品种有不同的要求。该试验中,IAA对扬辐2号成熟胚愈伤组织的诱导有一定的影响,KT对皖麦41的作用明显。

(2)不同培养条件对小麦成熟胚愈伤组织质量有很大的影响。在不同基本培养基和不同激素水平下,小麦成熟胚愈伤组织质量存在明显差异。其中,以1/2 MS为基础培养基、4.0 mg/L 2,4-D时,诱导的愈伤组织质量最好。

(3)综合2个小麦品种成熟胚愈伤组织诱导率和愈伤组织质量的试验结果,初步认为适合2个品种的基本培养条件为1/2 MS + 2,4-D 4.0 mg/L。在此基础上,可依据不同品种对不同激素的反应,适当调节其他激素水平。

(4)不同小麦品种成熟胚离体培养力存在着差异,皖麦41成熟胚离体培养力优于扬辐2号。因此,筛选适合小麦成熟胚组织培养的品种对愈伤组织的成功诱导非常重要。

参考文献

(上接第6662页)

- [1] 陆伟忠,程顺和,沈晓蓉,等.细胞工程在小麦抗赤育种中的利用[J].江苏农业学报,1998,14(1):9-14.
- [2] 吴丽芳,李红,宋道君,等.建立低能离子束介导小麦转基因方法并获得GUS基因植株[J].遗传学报,2000,27(11):982-991.
- [3] 徐涛,赵保存,葛荣朝,等.利用基因枪法将Tagak1基因导入小麦敏感成熟胚愈伤组织提高其耐盐性的研究[J].生物工程学报,2006,22(2):211-214.
- [4] 乔亚科,李桂兰,高书国,等.小麦幼胚愈伤组织诱导及植株再生[J].河北职业技术师范学院学报,2002,16(2):1-5.
- [5] 宋国琦,王成社,何培茹.小麦幼胚培养技术及其应用的研究进展[J].西安联合大学学报,2003,6(2):22-26.
- [6] 覃建兵,汪越胜,何光源.激素对小麦幼穗组织培养效果的影响研究[J].华中师范大学学报:自然科学版,2005,39(3):380-382.
- [7] 杨德.试验设计与分析[M].北京:中国农业出版社,2002:171-201.
- [8] 1996:36-37.
- [9] 南相日,刘文萍,刘丽艳,等. PEG介导Bt基因转化大豆原生质体转基因植株[J].大豆科学,1998,17(4):326-330.
- [10] IVER D R, PALMER R C, FEHR W R. Anther culture in soybean[J]. Crop Science, 1974, 14: 891-893.
- [11] 刘德璞,赵桂兰.大豆花粉离体培养获得愈伤组织[J].大豆科学,1986(1):49-55.
- [12] 叶兴国,王连铮.大豆花粉培养研究进展[J].大豆科学,1995(14):350-354.
- [13] 赵桂兰,刘艳芝,尹爱平.大豆花粉培养中胚状体萌发的研究[J].科学通报,1998(43):1512-1516.
- [14] KUDIRKA D T, COLBURN S M, HINCHEE M A, et al. Interactions of *Agrobacterium tumefaciens* with soybean leaf explants in tissue culture[J]. Can J Genet Cytol, 1986, 28: 808-817.
- [15] 程林梅,孙毅,岳焕荣.大豆生物工程研究进展[J].大豆科学,2001,20(1):66-70.
- [16] 薛仁锦,刘淑兰,韩碧文.大豆再生植株研究[J].延边农学院学报,1994(16):1-5.
- [17] 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.
- [18] 程林梅,孙毅,刘少翔,等.大豆不同外植体植株再生的研究[J].中国油料作物学报,1998,20(2):21-24.
- [19] 王萍,王翌,季静,等.农杆菌介导大豆未成熟子叶的遗传转化[J].大豆科学,2004,23(2):86-90.
- [20] LIU H K, YANG C, WEI Z M. Efficient *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system[J]. Planta, 2004, 219: 1042-1049.
- [21] NEWELL C A, LUU H T. Protoplast culture and plant regeneration in *Glycine canescens* F. J. Herm[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1985, 4: 145-149.
- [22] 卫志明.大豆原生质体培养再生植株[J].植物生理学通讯,1988(2):53-54.
- [23] 黄健秋,卫志明,许智宏.GUS基因在大豆未成熟子叶原生质体中的表达[J].植物学报,1992(34):26-30.
- [24] WEI Z M, XU Z H. Plant regeneration from protoplast of soybean (*Glycine max* L.)[J]. Plant Cell Rep, 1988, 7: 348-351.
- [25] 罗希明,赵桂兰,简玉瑜.大豆原生质体的植株再生[J].植物学报,1990,32:616-621.
- [26] DHIR S K. Cotransformation frequencies of foreign genes in soybean a cell cultures[J]. Plant Cell Reports, 1991, 10: 97-101.
- [27] 卫志明,许智宏.大豆原生质培养和再生植株[J].植物学报,1990,32(8):582-588.
- [28] 卫志明,黄健秋,徐淑萍,等.植物遗传国家重点实验室年报[R].