

大豆整个子叶节外植体再生体系的建立及与子叶节、胚尖再生体系的比较

马晓红, 姚陆铭, 武天龙

(上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240)

摘要:大豆再生较为困难, 难以满足基因工程的需要。为建立一种快速高效的再生体系, 大豆整个子叶节作为外植体进行再生。成熟大豆种子在 MSB₃ 添加 BA 0.4 mg · L⁻¹ 的培养基中萌发 5 ~ 7 d 后, 切取子叶节外植体, 含有 BA 或 CPPU 添加一定浓度的 IBA 的培养基用于筛选芽诱导培养基, 确定了芽诱导的最适培养基条件为 MSB₃ 添加 BA 3.0 mg · L⁻¹ 和 IBA 0.2 mg · L⁻¹, 将再生芽放入 MSB₃ 培养基中伸长至 3 cm 左右后, 放入 MSB₃ 添加 IBA 0.5 mg · L⁻¹ 的培养基中生根, 生根的小苗炼苗后移栽。大豆整个子叶节再生体系芽再生频率可以达到 94.7%, 平均每个外植体可以得到 28 个芽。将此再生体系与传统的大豆子叶节再生体系、近几年应用较多的大豆胚尖再生体系在再生频率、出芽数目、芽伸长情况以及再生周期等方面进行比较, 结果表明: 大豆整个子叶节再生体系在外植体再生频率以及出芽数量上优于其它两种体系。

关键词:大豆; 再生系统; 组织培养

中图分类号:S565.101

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2008)03-0373-06

High Frequency Plant Regeneration from Whole Cotyledonary Node Explants and Comparison with Cotyledonary Node and Embryonic Tip Regeneration System in Soybean [*Glycine max*(L.) Merrill]

MA Xiao-hong, YAO Lu-ming, WU Tian-long

(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Soybean [*Glycine max*(L.) Merrill] in vitro regeneration had been proved to be difficult, which limited the application of gene engineering on soybean. A more efficient and successful regeneration system for soybean was reported here using whole cotyledonary node as the explant. Whole cotyledonary node explants were obtained from aseptic seedlings cultured on MSB₃ medium supplemented with N⁶-benzyladenine (BA) at the concentration of 0.4 mg · L⁻¹ for 5-7 d. MSB₃ medium containing different concentration and combinations of BA or N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea (CPPU) with indole-3-butyric acid (IBA) were selected for shoot regeneration in whole cotyledonary node regeneration system and MSB₃ medium containing 3.0 mg · L⁻¹ BA and 0.2 mg · L⁻¹ IBA was proved to be optimum. The regenerated shoots were elongated on the MSB₃ medium to about 3 cm and rooted on MSB₃ medium containing IBA 0.5 mg · L⁻¹. Plantlets with well-developed roots were hardened and planted in greenhouse to maturity. Using of this system, shoot regeneration frequency could reach 94.7% and one explant could regenerate 28 shoots on average. In comparison with traditional cotyledonary node and embryonic tip regeneration system, whole cotyledonary node regeneration system was superior in shoot regeneration frequency and number of shoot.

Key words: Soybean; Regeneration system; In vitro culture

大豆是世界上重要的油料作物和植物蛋白来源之一, 通过基因工程手段改良大豆具有重要的意义。但是, 目前已经建立在其它双子叶植物上的转化体

系, 在大豆上的应用效果不是很理想。这主要是由于大豆外植体再生比较困难, 影响了基于大豆再生体系的转化平台的建立。因此建立一个快速有效的

收稿日期: 2008-03-17

基金项目: 国家高技术研究发展计划“863 计划”资助项目(2004AA212150)。

作者简介: 马晓红(1978-), 女, 博士研究生, 主要从事植物基因工程方面的研究。

通讯作者: 武天龙, 教授。E-mail: tlwu@sjtu.edu.cn。

再生平台对于大豆转化十分重要。

大豆是目前公认的几种再生困难的作物之一。自从 Cheng^[1] 第一次成功报道了利用大豆子叶节外植体在改良的 B₅ 培养基上成功再生以后,很多研究人员利用大豆植株的各个部位为外植体进行再生体系的建立,其中包括无菌苗芽尖^[2],未成熟子叶胚^[3],上胚轴和初生叶^[4-5],幼胚轴^[6],初生叶节^[7]以及下胚轴^[8-9]等。几十年来的研究取得了很大的进展,但是目前仍然存在的关键问题是植株再生芽的数量少,再生周期较长,因而限制了基因工程技术在大豆上的有效应用。

目前在大豆上应用较成功的是农杆菌介导的子叶节再生转化方法^[10],但是此转化方法的效率仍然偏低,与基因转化受体系统的要求还有一定的差距。最近,研究人员对于这个平台进行了部分改进以提高 T-DNA 的转移率以及筛选效率^[11-14]。而子叶节再生体系方面的研究较少。高效的转移效率必须依靠于一个高效的再生平台,其主要表现在能够在较短的时间内得到较多的丛生芽。Liu 等^[15]采用大豆胚尖作为外植体进行遗传转化,获得转基因大豆的频率可以达到 15.8%。

利用大豆整个子叶节为外植体,使用不同浓度及配比的激素对大豆整个子叶节外植体再生过程中芽诱导的影响进行考察,筛选最适培养基,并与子叶节、胚尖再生体系相比较,试图利用直接芽再生方式建立一种快速有效的再生体系。

1 材料与方法

1.1 植物材料

采用 3 个大豆品种:合丰 46(黑龙江农科院佳木斯分院),东农 42(东北农业大学),合丰 48(黑龙江农科院佳木斯分院)。

1.2 基本培养基和培养条件

使用的基本培养基为 MSB₅ 培养基[MS^[16] 无机盐和 B5^[17] 维生素]添加不同浓度和组合的植物生长调节剂。培养基添加 2% 蔗糖和 8% 琼脂。用 0.5 mol·L⁻¹ NaOH 调节 pH 至 5.8, 121~123℃ 灭菌 20 min。组织培养室温度保持在(25±3)℃,日光灯每天光照 18 h,光照强度 60 μmol·m⁻²。

1.3 外植体获得及不定芽再生

整个子叶节:大豆种子用自来水冲洗 3 次,70% 的乙醇浸泡 30 s 后,加入 5% 次氯酸钠溶液浸泡 30 min(4℃),用无菌蒸馏水冲洗 3 次。消毒后的种子

接种在添加 BA 0.4 mg·L⁻¹ 的 MSB₅ 培养基中培养 5~7 d。将得到的无菌苗用无菌刀片切除初生叶和上胚轴,去掉胚根,留大约 3~5 cm 的下胚轴,将外植体转到芽诱导培养基中培养 14 d 后转入不添加激素的 MSB₅ 芽伸长培养基中。

子叶节:大豆种子消毒方法如上,消毒后的大豆种子在添加 BA 0.4 mg·L⁻¹ 的 MSB₅ 培养基中培养 5~6 d。用无菌刀片切除部分下胚轴,留 3~5 mm,去除 1/3 的子叶,在两片叶子之间纵切,去除上胚轴,得到两个外植体。将外植体转到附加 BA 1.0 mg·L⁻¹ 和 IBA 0.2 mg·L⁻¹ 的 MSB₅ 培养基中诱导出芽,每隔 14 d 更换相同培养基至丛生芽出现后转入不添加激素的 MSB₅ 芽伸长培养基中。

胚尖:消毒后的大豆种子(方法如上)在无菌蒸馏水中浸泡 24 h(25℃),去掉种皮,解剖镜下去除子叶和原叶,分离得到胚尖外植体,在附加 BA 3.0 mg·L⁻¹ 和 IBA 0.2 mg·L⁻¹ 的 MSB₅ 培养基中培养 24 h,然后转移到附加 BA 0.2 mg·L⁻¹ 和 IBA 0.2 mg·L⁻¹ 的 MSB₅ 培养基中培养诱导出芽,每隔 14 d 更换相同培养基至丛生芽长出。

1.4 大豆不定根的诱导与再生植株的形成

每隔 14 d 更换新的芽伸长培养基至芽伸长到 3 cm 左右,转入附加 IBA 0.5 mg·L⁻¹ 的 MSB₅ 生根培养基中培养至生出 2~3 条根,将瓶盖打开炼苗 2~3 d,小心用镊子取出小苗,温水洗净根部残留琼脂,然后栽于盛有灭菌的土:蛭石:沙子(1:1:1)均匀混合的塑料盆中,保持一定湿度,此时要适当降低培养温度,3 周后移栽到温室中。

2 结果和分析

2.1 大豆整个子叶节再生体系的优化

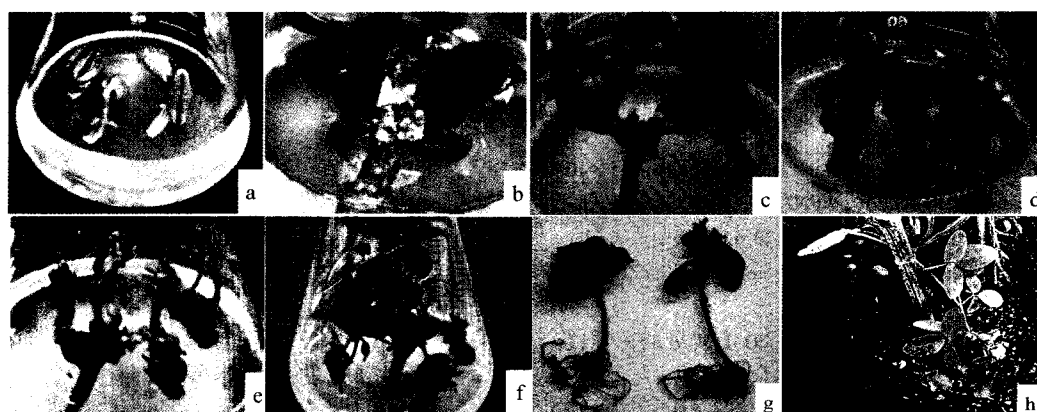
不同浓度及组合的细胞分裂素 CPPU 和 BA 以及生长素 IBA 添加到芽诱导培养基中用于筛选大豆整个子叶节外植体最适出芽培养基成分。从表 1 中可以看出,所试的 14 种培养基中,在出芽率的表现上含 BA 的培养基优于含 CPPU 的培养基,平均值分别为 76.5% 和 54.0%。其中出芽率最高的为 BA 3.0 mg·L⁻¹ + IBA 0.2 mg·L⁻¹,为 94.7%;最低的是 CPPU 0.5 mg·L⁻¹ + IBA 0.2 mg·L⁻¹,为 37.1%。含 BA 的培养基中添加 IBA 对出芽率的影响不大,而含 CPPU 的培养基中添加 IBA 反而降低了出芽率。

培养 3 周后,统计出芽数目,在含 BA 的培养基

表 1 不同培养基对大豆整个子叶节外植体诱导出芽的影响(培养第 3 周统计结果)

Fig. 1 Effect of different plant growth regulators on shoot regeneration in soybean whole cotyledonary node
(Results from the 3rd week in culture)

培养基 Medium/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	再生频率			每个外植体上的芽数		
	Frequency of shoot regeneration/%			Number of shoots/explant		
	合丰 46 Hefeng 46	合丰 48 Hefeng 48	东农 42 Dongnong 42	合丰 46 Hefeng 46	合丰 48 Hefeng 48	东农 42 Dongnong 42
CPPU 0.2	67.3	53.1	39.3	3.3	2.7	3.3
CPPU 0.5	63.5	51.7	60.1	9.2	8.2	9.1
CPPU 1.0	72.3	73.5	69.4	8.9	7.3	7.8
CPPU 3.0	58.6	40.5	42.2	6.3	5	5.3
CPPU 5.0	56.5	42.8	39.7	3.9	4	3.4
CPPU 0.5 + IBA 0.2	38.8	35.3	37.3	11.3	9.7	9.6
CPPU 1.0 + IBA 0.2	62.3	60.9	59.7	6.8	7	6.4
CPPU 3.0 + IBA 0.2	58.1	57.2	55.9	4.9	4	3.5
BA 0.5	60.2	63.8	59.7	8.5	7.7	6.2
BA 1.0	69.6	66.1	61.2	19.3	17.7	15.6
BA 3.0	96.4	89.4	81.9	23.6	19.7	24.8
BA 5.0	83.3	71.2	71.0	16.1	14.1	16.7
BA 1.0 + IBA 0.2	76.4	71.2	70.9	12.5	15.9	11.7
BA 3.0 + IBA 0.2	98.7	93.1	92.3	27.7	29.2	27.8

再生率(%) = 带有 3 个以上芽的外植体数/总的外植体数 $\times 100$ Frequency of shoot regeneration(%) = (No. of explants with above 3 shoots/No. of total explants) $\times 100$ 

(a) 从萌发 5~7 d 的大豆无菌苗得到的外植体放入芽诱导培养基中培养;(b) 在芽诱导培养基中培养 6 d 后,腋芽分生组织区出现大量的不定芽丛;(c) 在芽诱导培养基中培养 10 d 后,大量的不定芽形成;(d) 将两片叶子去除后,外植体转入芽伸长培养基中培养;(e) 转入芽伸长培养基中 7 d 后,不定芽开始伸长;(f) 芽伸长培养基中培养 15 d 后,部分芽伸长至 3 cm 左右;(g) 生根后待移栽的小苗;(h) 再生的小苗结荚成熟。

(a) Explants obtained from soybean seedlings aged 5-7 d were inoculated on shoot induction medium;(b) After culturing for 6 d on shoot induction medium,the seedlings sprouted shoot buds;(c) 10 d later,the shoot buds formed;(d) Explants with shoot buds were cultured on shoot elongation medium;(e) Shoots elongated after culturing for 7 d on shoot elongation medium;(f) After culturing for 15 d on shoot elongation medium,some shoots elongated to 3 cm;(g) Plantlets with well-developed roots;(h) Mature plantlets in greenhouse.

图 1 大豆整个子叶节再生体系

Fig. 1 Whole cotyledonary node regeneration system of soybean [*Glycine max*(L.) Merrill]

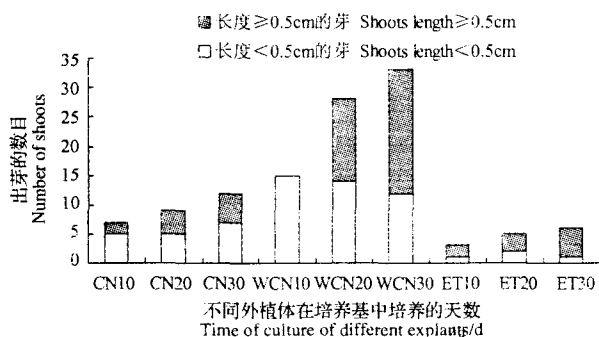
中,随着 BA 浓度的增大,出芽数目增多,在 BA 3.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IBA 0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基中,平均可以得到 28 个不定芽。在含 CPPU 的培养基中,当 CPPU 浓度为 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 且添加 IBA 0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,出芽数目最高,为 10 个,随着 CPPU 浓度的增加,出芽数目下降。3 个大豆品种表现趋势一致。

因此,将大豆种子在添加 BA 0.4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MSB₃ 萌发培养基中培养得到无菌苗,切取整个子叶节外植体后放入添加 BA 3.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 IBA 0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的芽诱导培养基中培养至出现大量不定芽后,转入不添加植物激素的 MSB₃ 伸长培养基中培养,待芽伸长至 3 cm 左右,转入添加 IBA 0.5

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基中诱导生根后移栽(图1)。

2.2 三种不同外植体不同培养时间出芽以及芽伸长情况的比较

以合丰46为材料,采用大豆器官发生途径中较常用的大豆子叶节外植体,最近几年应用较为成功的大豆胚尖外植体以及试验中发展的大豆整个子叶节外植体进行大豆再生体系的比较。其中3种外植体各自采用最适的培养条件,试验分别对3种外植体出芽数目、芽伸长情况进行统计。



CN10, CN20, CN30: 子叶节外植体, 得到外植体后培养 10 d, 20 d, 30 d; WCN10, WCN20, WCN30: 整个子叶节外植体, 得到外植体后培养 10 d, 20 d, 30 d; ET10, ET20, ET30: 胚尖外植体, 得到外植体后培养 10 d, 20 d, 30 d。

CN10, CN20, CN30: cotyledonary node explants were cultured for 10 d, 20 d, 30 d, respectively; WCN10, WCN20, WCN30: whole cotyledonary node explants were cultured for 10 d, 20 d, 30 d, respectively; ET10, ET20, ET30: embryonic tip explants were cultured for 10 d, 20 d, 30 d, respectively.

图2 3种外植体分别培养 10 d、20 d、30 d 时出芽以及芽伸长的情况

Fig. 2 Comparison of shoot number and shoot elongation of the soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] cotyledonary node (CN), whole cotyledonary node (WCN) and embryonic tip (ET) systems after culturing for 10, 20, 30 d

从图2中可以看出,3种外植体均可以在较短的时间内(10 d)在各自的最适培养条件下诱导出芽,但出芽的数目有所不同,其中整个子叶节外植体出芽数目最多,平均可以达到15个芽,但是芽均未开始伸长;子叶节外植体其次,平均可以得到7个芽,其中2个芽开始伸长;最少为胚尖外植体,平均为3个芽,其中2个芽长度大于等于0.5 cm。继续培养至20 d时,出芽数目均较之前有大幅度增加,其中整个子叶节外植体出芽数目最多,平均可以达到28个芽,其中50%的芽开始伸长;子叶节外植体其次,平均可以得到9个芽,其中4个芽开始伸长;最少为胚尖外植体,平均为5个芽,其中60%

的芽已经开始伸长生长。培养至30 d时,出芽数目均较培养20 d时稍有增加,其中整个子叶节外植体出芽数目最多,平均可以达到33个芽,其中21个芽长度大于等于0.5 cm;子叶节外植体其次,平均可以得到12个芽,其中5个芽开始伸长;最少为胚尖外植体,平均为6个芽,其中5个芽已经伸长。

由此可以看出,出芽数目最多的为整个子叶节外植体,平均可得到33个芽,最少为胚尖外植体,平均可以得到6个芽。芽伸长情况最好的为胚尖外植体,至培养30 d时,大部分的芽(83.33%)均较易伸长,生长较为整齐;其次为整个子叶节外植体,为63.64%;芽伸长情况最差的为子叶节外植体,只有41.67%的芽可以伸长。

2.3 三种外植体培养30 d后再生频率的比较

再生频率的高低是衡量大豆再生体系是否成功的一个主要因素,也是衡量能否应用到大豆转化中的一个先决条件。以合丰46为材料,对大豆子叶节外植体、整个子叶节外植体、胚尖外植体进行再生培养,3种外植体培养30 d后对其再生频率进行统计,结果表明3种再生体系中整个子叶节再生体系再生率最高,为95.7%,其次为胚尖再生体系,为89.0%,子叶节再生体系再生率为59.4%。

同时对培养30 d后,3种外植体上出芽的数目进行了统计(图3),其中整个子叶节再生体系,诱导出芽的外植体中有94.0%的外植体均可以产生4个及以上的芽;子叶节再生体系中,已经出芽的外植体中有64.1%的外植体可以产生4个及以上的芽;

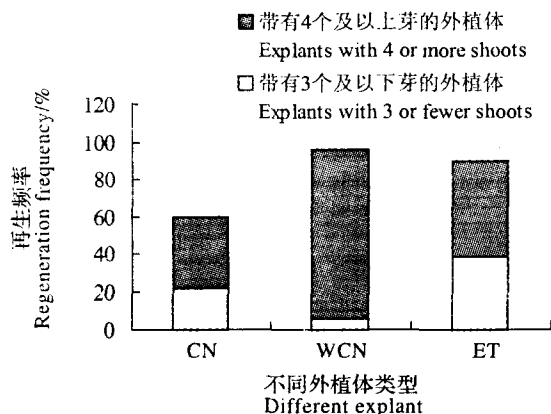


图3 大豆子叶节外植体(CN)、整个子叶节外植体(WCN)和胚尖外植体(ET)培养30 d后再生频率

Fig. 3 Shoot regeneration frequencies of the soybean cotyledonary node (CN), whole cotyledonary node (WCN) and embryonic tip (ET) systems after culturing for 30 d

胚尖再生体系中,诱导出芽的外植体中有 57.6% 的外植体可以产生 4 个及以上的芽。

2.4 三种不同外植体再生周期的比较

一个理想的再生体系需要在较短的时间内得到较多的不定芽,因此实验过程中对大豆子叶节、整个子叶节、胚尖三种再生体系的周期进行了统计(图 4)。其中由于胚尖再生体系不需要经过种子萌发的过程以及芽再生相对较快的原因,再生周期最短,为 50 d;其次为整个子叶节再生体系,整个再生周期,从种子萌发到炼苗之前周期为 58 d;子叶节再生体系再生周期平均为 76 d。

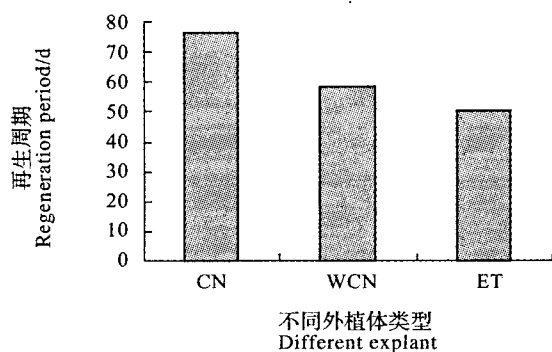


图 4 大豆子叶节外植体(CN)、整个子叶节外植体(WCN)和胚尖外植体(ET)再生周期的比较

Fig. 4 Comparison of the regeneration periods of the soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] cotyledonary node (CN), whole cotyledonary node (WCN) and embryonic tip (ET) systems

3 讨论

植物生长调节剂在植物再生体系中对细胞分裂、分化过程中起着重要的作用。在以往的大豆再生以及转化体系中,嘌呤型细胞分裂素中的 BA 使用较多^[18-21]。而苯基脲型细胞分裂素中的 CPPU 应用很少。CPPU 又称 KT-30, 是 N-(2-氯-4-吡啶基)-N'-苯基脲[N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea]的简称,具有细胞分裂素活性,可以促进细胞分裂和器官发生。很多研究表明, CPPU 有更强的促进细胞分裂的活性,如 Bruce 和 Zwar (1966)^[22]用烟草茎髓细胞为材料对 500 多种脲衍生物进行活性鉴定, CPPU 活性是玉米素的千倍以上; BA 促进细胞分裂的活性仅为 CPPU 的十分之一。Takahashi 等^[23]以烟草愈伤组织为材料对 4-吡啶脲(4PU)衍生物的活性与结构的关系进行了研究,结果发现 CPPU 的活性比供试的任何一种嘌呤型细胞分裂素

活性更高。这说明 CPPU 诱导细胞分裂和促进器官发生的活性远远高于一般嘌呤类细胞分裂素的活性。目前在很多植物的离体培养中有所应用,如梨^[24], 桑树^[25], 薰衣草^[26], 菠萝^[27]等,但在大豆上未见相关报道。

从结果可以看出,与添加 BA 的培养基相比较,添加 CPPU 的培养基中的外植体无论出芽率还是出芽数目都较前者低。试验中观察发现,添加 CPPU 的培养基中的外植体的两片子叶在较短的时间内迅速膨大,且颜色深绿,而添加 BA 的培养基中的外植体的子叶在培养过程中大小及颜色并无明显的变化,且随着时间的增长,有萎缩的倾向。因此认为,在添加 CPPU 的培养基中,两片子叶可能在营养的竞争能力方面超过分生组织,影响了腋芽部位分生细胞的积极分化,从而影响了出芽率以及出芽的数目。到后期时,外植体去掉两片子叶转入伸长培养基,在含 CPPU 的培养基中诱导出芽的外植体得到的不定芽更易伸长。因此认为,利用 CPPU 作为诱导芽再生的植物生长调节剂时,应尽量选择仅包括分生组织的外植体。

大豆子叶节外植体是目前大豆组织培养器官发生途径中使用较多的一种外植体,以其取材方便,操作相对简单,较易出芽等优点得到广泛的应用^[8,11,28-29];大豆胚尖外植体在近几年的大豆再生及农杆菌介导的大豆遗传转化中有所应用^[15,30],其显著的特点是再生周期短,操作更为简便;大豆整个子叶节外植体是试验在传统的子叶节方法上进行改良的一种外植体,在实验室大豆再生及转化体系中实际应用。对这三种再生体系进行比较,结果表明三种再生体系在不同方面各有其优点。其中再生周期最短的是胚尖外植体,其次是整个子叶节外植体,最后是传统的子叶节外植体。出芽数目最多的是整个子叶节外植体,平均可以达到 33 个芽;其次是传统子叶节外植体;出芽数目最少的是胚尖外植体,一般为 3~6 个芽。

根据观察,子叶节外植体培养过程中芽生长缓慢,大部分的芽较易成为封顶芽,因此子叶节外植体芽伸长的步骤较难控制,伸长需要的过程较长。相对于子叶节和胚尖外植体,整个子叶节外植体具有出芽数目多,伸长相对容易的特点,虽然培养 30 d 时芽伸长率为 63.64%,不及胚尖外植体芽伸长率高,但由于芽总数多,因此仍然可以得到较多可以转入生根培养基中的芽,将其它未伸长的继续继代培

养,可以在适当的条件下继续伸长生长,封顶芽现象很少发生。

根据结果可以看出,操作最为便捷的是胚尖外植体,除了前期剥取胚尖工作量稍大以外,后期的处理较为方便,而且生长周期较短,出芽较快,伸长容易,生长较整齐,不存在封顶芽的情况。但是此外植体存在的明显缺点是出芽数目较少,一般一个外植体最多可以得到6个不定芽。整个子叶节外植体相对于胚尖外植体来说,在不定芽的再生数量上大大的提高,弥补了胚尖外植体出芽数量太少的缺点;而与子叶节系统相比,大大缩短了再生周期,且生长较为整齐。

总的说来,使用大豆整个子叶节再生体系可以将离体培养时间缩短至2个月,并得到较多的不定芽。与目前较常用的两种再生体系相比,大豆整个子叶节再生体系是简便有效的新的再生体系,大豆整个子叶节外植体可以作为一种较为理想的大豆再生的途径并有望应用于大豆再生以及农杆菌介导的大豆转化研究。

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 Science Letters, 1980, 19: 91-99.
- [2] Kartha K K, Pahl K, Leung N L, et al. Plant regeneration from meristems of grain legumes: soybean, cowpea, peanut, chickpea, and bean[J]. Canadian Journal of Botany, 1981, 59: 1671-1679.
- [3] Barwale U B, Keans H R, Widholm J M. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis[J]. Planta, 1986, 167: 473-481.
- [4] Wright M S, Ward D V, Hinchee M A, et al. Regeneration of soybean (*Glycine max* L. Merr.) from cultured primary leaf tissue[J]. Plant Cell Reports, 1987, 6: 83-89.
- [5] Wright M S, Williams M H, Pierson P E, et al. Initiation and propagation of *Glycine max* (L.) Merr.: Plants from tissue-cultured epicotyls[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1987, 8: 83-90.
- [6] McCabe D E, Swain W F, Martinell B J, et al. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration[J]. Bio/Technology, 1988, 6: 923-926.
- [7] Kim J, LaMotte C E, Hack E. Plant regeneration in vitro from primary leaf nodes of soybean (*Glycine max*) seedlings[J]. Journal of Plant Physiology, 1990, 136: 664-669.
- [8] Dan Y, Reigheeri N A. Organogenic regeneration of soybean from hypocotyls explants[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant, 1998, 34: 14-21.
- [9] Yoshida T. Adventitious shoot formation from hypocotyls sections of mature soybean seeds[J]. Breeding Science, 2002, 52: 1-8.
- [10] Hinchee M A W, Connor-Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer[J]. Bio/Technology, 1988, 6: 915-922.
- [11] Zhang Z Y, Xiang A Q, Staswick P, et al. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1999, 56: 37-46.
- [12] Ke J, Khan R, Johnson T, et al. High-efficiency gene transfer to recalcitrant plants by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Plant Cell Reports, 2001, 20: 150-156.
- [13] Olhoft P M, Somers D A. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells[J]. Plant Cell Reports, 2001, 20: 706-711.
- [14] Olhoft P M, Flagel L E, Donovan C M, et al. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method[J]. Planta, 2003, 216: 723-735.
- [15] 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.
- [16] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture[J]. Physiologia Plantarum, 1962, 15: 473-497.
- [17] Gamborg O L, Miller R A, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells[J]. Experimental Cell Research, 1968, 50: 151-158.
- [18] Wright M S, Koehler S M, Hinchee M A, et al. Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max*[J]. Plant Cell Reports, 1986, 5: 150-154.
- [19] Kaneda Y, Tabei Y, Nishimura S, et al. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.] [J]. Plant Cell Reports, 1997, 17: 8-12.
- [20] Sairam R V, Franklin G, Hassel R, et al. A study on the effect of genotypes, plant growth regulators and sugars in promoting plant regeneration via organogenesis from soybean cotyledonary node callus[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2003, 75: 79-85.
- [21] Franklin G, Carpenter L, Davis E, et al. Factors influencing regeneration of soybean from mature and immature cotyledons[J]. Plant Growth Regulation, 2004, 43: 73-79.
- [22] Bruce M I, Zwar J A. Cytokinin activity of some substituted urea and thioureas[J]. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, 1966, 165: 245-265.
- [23] Takahashi S, Shudo K, Okamoto T, et al. Cytokinin activity of N-phenyl-N-(4-pyridyl) urea derivatives[J]. Phytochemistry, 1978, 17: 1201-1207.
- [24] Kadota M, Numi Y. Effect of cytokinin types and their concentration on shoot proliferation and hyperhydricity in *in vitro* pear cultivar shoots[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2003, 72: 261-265.

那么即使检测到特异性条带和杂交条带,也无法判断外源基因已经整合阳性植株基因组中。此研究在阳性植株 PCR 检测时引物是用 SPS 基因的一段序列(20bp)及 35S 内部的一段序列(20bp)设计的。Southern 杂交探针选择的是阳性对照的 PCR 产物(约 500bp)纯化后,用限制性内切酶 Xba I 处理后,进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳。有两条带,其中一条带是 SPS 基因 3'侧领域约 320 bp,一条带是 35S 领域约 180bp,从胶上回收 180bp 条带。这一改进,解决了上述无法判断外源基因是否已经整合到植株基因组中的问题。

4 结论

研究建立了大豆胚尖的再生体系,和子叶节系统及基因枪系统相比较,这个系统具有高效和快速的再生特点。利用根癌农杆菌对大豆成熟种子的胚尖外植体进行遗传转化,获得了整合 SPS 基因的转基因大豆植株。农杆菌介导胚尖 800 个外植体,获得 6 株 PCR 阳性植株和 3 株 Southern 杂交检测的阳性植株。转化频率以 Southern 杂交阳性为指标计算,转化频率为 0.375%。

参考文献

- [1] Cheng T Y, Saka T, Voqui-Dinh T H. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture[J]. Plant Science Letters, 1980, 19: 91-99.
- [2] Donaldson P A, Simmonds D H. Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean[J]. Plant Cell Reports, 19: 478-484.
- [3] Hinchey M A, Conner Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA Transfer[J]. Bio-technology, 1988, 6: 915-922.
- [4] McCabe D E, Swain W F, Martinell B J, et al. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. Bio/Technology, 1988, 6: 923-926.
- [5] 刘海坤, 卫志明. 大豆遗传转化研究进展[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2005, 31(2): 126-134. (Liu H K, Wei Z M. Recent advances in soybean genetic transformation[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2005, 31(2): 126-134.)
- [6] 李文霞, 宁海龙, 李文滨. 大豆遗传转化的研究进展[J]. 中国农学通报, 2005, 12(31): 67-71. (Li W X, Ning H L, Li W B. Research on progress of transgene system in soybean[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 12(31): 67-71.)
- [7] Trick H N, Dinkins R D, Santam E R, et al. Recent advances in soybean transformation[J]. Plant Tiss Cult Biotechnol, 1997, 3: 9-26.
- [8] 杨荣仲, 谭裕模, 陈如凯. 大豆遗传转化研究进展[J]. 广西农业科学, 2003, 6: 11-14. (Yang R Z, Tan Y M, Cheng R K. Recent advances in soybean genetic transformation[J]. Guangxi Agricultural Sciences, 2003, 6: 11-14.)
- [9] 刘海坤, 卫志明. 利用根癌农杆菌介导转化大豆成熟种子胚尖获得转基因植株[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2004, 30(6): 631-636. (Liu H K, Wei Z M. Transgenic soybean obtained with *agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryonic tip of soybean mature seeds[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2004, 30(6): 631-636.)
- [10] 周平, 叶冰莹, 陈由强, 等. 蔗糖磷酸合成酶研究的新进展[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(6): 1001-1003. (Zhou P, Ye B Y, Cheng Y Q, et al. The recent advances on sucrose phosphate synthase [J]. Letters in Biotechnology, 2006, 17(6): 1001-1003.)
- [11] 李雯, 邵远志, 庄军平, 等. 蔗糖磷酸合成酶与香蕉果实成熟、衰老的关系[J]. 园艺学报, 2006, 33(5): 1087-1089. (Li W, Shao Y Z, Zhuang J P, et al. Relationships between the Sucrose phosphate synthase and ripening, senescence of banana fruits[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2006, 33(5): 1087-1089.)
- [12] 2004, 100: 7-14.
- [13] Di R, Purcell V, Collins G B, et al. Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene[J]. Plant Cell Reports, 1996, 15: 746-750.
- [14] Meurer C A, Dinkins R D, Collins G B. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation[J]. Plant Cell Reports, 1998, 18: 180-186.
- [15] Dang W, Wei Z M. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation for soybean for expression of binary insect resistance genes[J]. Plant Science, 2007, 173: 381-389.
- [16] (上接第 378 页)
- [17] Tewary P K, Oka S. Simplified clonal multiplication of mulberry using liquid shake culture[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1999, 59: 223-226.
- [18] Tsuru M, Koda M, Inoue M. Comparative effect of different types of cytokinin for shoot formation and plant regeneration in leaf-derived callus of lavender (*Lavandula vera* DC)[J]. Scientia Horticulturae, 1999, 81: 331-336.
- [19] Adaniya S, Minemoto K, Moromizato Z, et al. The use of CPPU for efficient propagation of pineapple[J]. Scientia Horticulturae, 2004, 100: 7-14.