维普资讯 http://www.cqvip.com

福建大豆主栽品种的组织培养研究

张戊英[1],张韵春[2],张蔚勇[1]
(1.闽西职业技术学院 资源工程系,福建 龙岩 364021;2.前埔中学,福建 厦门 361000)

摘要:利用福建大豆主栽品种的子叶节为外植体,进行组织培养再生研究,探讨不同品种、不同激素和除草剂不同浓度的诱导效果。结果表明不同大豆品种诱导分化能力差别较大,供试品种中"莆豆8008"的诱导能力较强,丛生芽诱导率和平均丛生芽数分别为94.2%和2.69。不同激素种类和浓度对大豆子叶节丛生芽诱导,表明6-BA较适合于丛生芽的诱导,适宜浓度为1.67mg/L。大豆子叶节不定芽分化和伸长的除草剂Glufosinate梯度实验表明除草剂Glufosinate5mg/L可作为不定芽分化和伸长的选择压力,生根培养基上不宜加除草剂Glufosinate。

关键词:大豆;子叶节;组织培养;激素;Glufosinate
中图分类号:S565.103.53 文献标识码:A 文章编号:1673-4823(2006)01-0117-03

Tissue culture of Fujian soybean cultivar

ZHANG Wu-Ying[1] ZHANG Yun-Chun[2] ZHANG Wei-Yong[1]
(1.Minxi Vocational & Technical College,Longyan Fujian 364021;2.Qianpu Middle School,Xiamen,Fujian,361000,China)

Abstract:The regeneration of cotyledon node explants was studied in several varities of soybean(Glycine. Max. L.). Among soybean cultivar suppled, pudou number 8 has comparatively frequency of mltiple shoots initiation with 94.1%. The regeneration of cotyledon node explants was studied in pudou number 8 with different plant hormane and different concentration. The result indicates 6- BA1.67mg/L is the best. Soybean cotylendon node was initiated on shoot initiation medium and shoot elongation medium with different concentration of glufonsinate.The result indicates glufonsinate at 5 mg/L concentration suppressed the shoot initiation and shoot elongation.

Key words:soybean(Glycine. max. L.); cotyledon node;tissue culture; plant hormane; Glufosinate

大豆 *(Glycine. Max. L.)*是一种世界性的主要农作物,尤其在油料、蛋白质生产上具有特别重要的地位。大豆的组织培养,从20世纪60年代以来就开展了广泛的研究,曾采用过各种不同的外植体培养,但植株再生一度曾十分困难,即使有再生植株发生,其频率和重演性都极低。进入20世纪80年代以来,随着生物技术的迅速发展及植物基因工程发展的需要,大豆的组织培养才有了突破性的进展。大豆转基因技术在基础研究和定向培育(如具有抗除草剂、抗病虫害,以及提高和改善蛋白质与油脂含量等优良性状的大豆品种)方面尤其受到了广泛重视[1-6]。尽管抗除草剂转基因大豆已经商品化,但是大豆遗传转化依然受到许多限制,特别是其组织培养再生植株的困难性及组培受体系统与转化方法匹配的局限性。选择推广的主栽品种作为转基因受体是培育具有经济价值的转基因品种的必备条件,但受基因型的影响,不同品种的组织培养反应不同,因此研究推广主栽品种的组培系统仍具有重要意义。本研究通过优化培养条件,对大豆子叶节经器官发生途径诱导丛生芽的几个重要影响因素进行了分析、比较,同时进行了除草剂梯度实验,旨在建立适合福建地区推广的栽培品种的高效受体系统并可用于转化。

1 材料与方法

1.1 供试材料

莆豆8008、泉豆322、泉豆6号、毛豆75和毛豆2808,均为福建省各地区生产上常用的优良品种和品系。

1.2 培养基[7]

萌发培养基:B_5培养基

诱导培养基:基本培养基为B_5培养基,附加不同类型和

[收稿日期]2005—11—11
[作者简介]张戊英(1968-),女,福建永定人,讲师,主要从事园林、生物工程专业教学工作。

维普资讯 http://www.cqvip.com

浓度的激素及其他有机成分，组成一系列 B_5 培养基，其具体成分见表 1。各培养基中均含有蔗糖 30g/L 和琼脂 8g/L，pH 值为 5.8

表 1 诱导培养基成分 (mg/L)

培养基种类	生长素 6-BA	细胞分裂素 IBA
1	0.835	-
2	1.67	-
3	3.34	-
4	-	0.05
5	-	0.1
6	-	0.2

芽生长培养基：B_5+BA1.67mg/L +$GA_3$0.5mg/L+ZR1mg/L+IAA0.1mg/L+ asparagine50mg/L+L-pyroglutamic acid 100mg/L

生根培养基：B_5+asparagine500mg/L+NAA0.5mg/L+L-pyroglutamic acid 100mg/L

1.3 试剂

除草剂 Glufosinate 购自 Sigma 公司。其它各种试剂为国产分析纯。

1.4 实验方法

1.4.1 大豆子叶节外植体的获得

取粒大饱满的大豆种子，用 70%的酒精表面消毒 1min，再用 1mg/L 氯化汞消毒 7min，然后再用无菌水冲洗 5 次，最后倒入 60ml 无菌水浸泡过夜。将浸泡过夜的种子接种到 B_5 培养基（B_5无机+B_5有机+30mg/L 蔗糖+7mg/L 琼脂，pH 值为 6.0），28℃，光照培养基 5~7d。将已萌发的种子取出，剥去种皮，切下长出的下胚轴，再从子叶中间纵切，切除已经萌发的侧芽和顶芽，并在生长点区轻轻划 3-5 刀，如此可获得两片子叶节外植体。

1.4.2 大豆子叶节丛生芽的诱导

大豆子叶节外植体接种于诱导培养基上，每个培养皿约5个外植体，在26℃、14h光照条件下培养，待子叶节长出 0.3~1cm 长的不定芽时，统计形成愈伤和不定芽的数量。将不定芽切下转入生长培养基中培养，待不定芽抽出小苗长至 2~3cm 高时，转入生根培养基中生根培养，筛选出再生频率较高的大豆品种。

1.4.3 数据统计分析方法

丛生芽诱导率=出芽外植体数/外植体总数×100%；

平均丛生芽数=丛生芽数/出芽外植体数

1.4.4 除草剂梯度实验[9]

将大豆子叶节外植体分别接种在含有不同浓度除草剂 Glufosinate 的固体诱导培养基上，浓度分别为 0、1、3、5、7mg/L，根据它们的生长情况，筛选除草剂 Glufosinate 适合转化植株的最佳浓度。

2 结果与分析

2.1 不同大豆品种子叶节丛生芽诱导率的比较

供试的 5 个大豆品种均能从子叶节外植体诱导出丛生芽，但不同品种间的差异很大。由表 2 可知“莆豆 8008”的丛生芽诱导率最高达到 94.2%，平均丛生芽数最多，丛生芽也较健壮，所以“莆豆 8008”较适合做大豆再生植株的供体材料。

2.2 不同激素种类和浓度对大豆子叶节丛生芽诱导的影响

6 种不同的诱导培养基对大豆品种“莆豆 8008”子叶节丛生芽的诱导情况见表 3。由表 3 可知，6 种培养基均能诱导出芽，说明在此条件下 6-BA 和 IBA 均能诱导出芽的分化，但生长素 6-BA 优于 IBA，并且 6-BA 的最适浓度为 1.67mg/L，

表 2 不同大豆品种丛生芽的诱导率

品 种	外植体总数	出芽外植体数	丛生芽诱导率(%)	丛生芽数	平均丛生芽数
莆豆 8008	70	66	94.2	178	2.69
泉豆 6 号	45	38	84.4	87	2.28
泉豆 322	41	34	82.9	60	1.76
毛豆 75	41	35	85.4	60	1.71
毛豆 2808	55	50	90.9	103	2.06

表 3 不同诱导培养基对大豆品种“莆豆 8008”的诱导效果

诱导培养基	外植体数(个)	出芽外植体数(个)	丛生芽诱导率(%)	丛生芽数(个)	平均丛生芽数(个)
1	78	65	83.3	121	1.86
2	85	80	94.1	214	2.67
3	94	79	84.0	152	1.92
4	82	44	53.6	41	0.93
5	87	54	62.0	84	1.56
6	73	61	83.5	120	1.97

维普资讯 http://www.cqvip.com

丛生芽诱导率达 94.1%。

2.3 大豆子叶节不定芽分化和伸长的除草剂 Glufosinate 梯度实验

在含有不同浓度除草剂 Glufosinate 的固体诱导培养基上，溶度分别为 0、1、3、5、7mg/L，结果由图 1 可知，在不加除草剂 Glufosinate 的 CK 培养皿中，子叶节均能分化出不定芽，并长成苗；在除草剂 Glufosinate 浓度为 1mg/L 时，子叶节也能分化出不定芽，并长成苗但不定芽相对较 CK 弱，不定芽的数量也较少；在除草剂 Glufosinate 浓度为 3mg/L 条件下，少量子叶节能分化出不定芽，但不定芽在生长过程中顶芽会逐渐枯萎；当加入的除草剂 Glufosinate 浓度为 5mg/L 时，子叶节基本不能分化出不定芽，分化出的少量不定芽在生长过程中很快变黄枯萎；在除草剂 Glufosinate 浓度为 7mg/L 时，子叶节不分化并且逐渐变黄枯死。因此，可选择 5mg/L 的除草剂 Glufosinate 浓度作为不定芽分化和伸长的选择压力比较适宜。

在含有除草剂 Glufosinate0、1、3、5、7mg/L 的生根培养基上，当除草剂 Glufosinate 浓度为 1mg/L 时，大豆不定芽就基本不长根，这与大豆不定芽加入除草剂 Glufosinate 不易生根的报道一致[10]，因此在生根培养基上可不加除草剂 Glufosinate。

图 1 大豆子叶节不定芽分化除草剂 glufosinate 梯度试验结果

1. CK 0mg/L 2. 1mg/L 3. 3mg/L 4. 5mg/L 5. 7mg/L

3 讨论

植物基因转化的成功，必须建立于良好的植物受体系统基础上，而良好的受体系统必须具有高频的转化率及较强的再生能力为前提，才能保证转化的外植体进一步发育成正常的植株。由于遗传和生理差异，大豆不同品种子叶节分化能力存在基因型的特异性[2]，供试的不同品种分化能力大小依次为莆豆 8008、泉豆 6 号、毛豆 2808、泉豆 322、毛豆 75。

6-BA 和 IBA 是大豆子叶节丛生芽分化实验的常用植物激素。本研究采用了 3 个浓度梯度，对上述激素进行了丛生芽分化实验。结果表明，6-BA 和 IBA 均能诱导莆豆 8008 出芽分化，但生长素 6-BA 优于 IBA，并且 6-BA 浓度对子叶节丛生芽分化的影响也很大。在 6-BA 浓度为 1.67mg/L，平均丛生芽数为 2.69 个，丛生芽诱导率达 94.2%。以上研究为下一步大豆遗传转化奠定了一定的基础。

参考文献：

[1] 卜云萍，王广科，胡国武，等. 深黄被孢霉 Δ6-脂肪酸脱氢酶基因导入大豆[J]. 生物技术,2003,13(3):6-8.

[2]程林梅，孙毅，刘少翔，等. 大豆不同外植体植株再生的研究[J]. 植物学通报，2001，18(3):367-370.

[3]李明春，卜云萍，王广科，等. 深黄被孢霉 Δ6-脂肪酸脱氢酶基因在大豆中的表达[J]. 遗传学报,2004,31(8):858-863.

[4]AiQiu Xing, ZhangYuan Zhang, Shirley Sato. The use of the two T-DNA binary system to derive marker-free transgenic so ybeans[J]. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant, 2000, (36):456-463.

[5]Finer KR, and JJ Finer. Use of Agrobacterium expressing green fluorescent protein to evaluate colonization of sonication-assisted Agrobacterium -mediated transformation -treated soybean cotyledons[J]. Lett Appl Microbiol ,2000,(30):406-410.

[6]Ko TS, Lee S, Krasnyanski S, and Korban SS. Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: Agrobacterium strain and orientation of immature cotyledonary explant[J].Theor Appl Genet. 2003,107 (3):439-447.

[7] Olhoft P.M., Lin K., Galbraith J. The role of thiol compounds in increasing Agrobacterium -mediated transformation of soyb ean cotyledonary-nod cells[J]. Plant Cell Report, 2001, (20): 731-737.

[8] 张新梅，徐惠君，杜丽璞，等. 共转化法剔除转基因小麦中的 bar 基因[J]. 作物学报,2004,30(1):26-30.

责任编辑：潘伟彬