

6-BA 对大豆茎尖诱导再生植株的研究^{*}

邱承祥 武天龙^{**}

(上海交通大学 上海 201101)

摘要 以大豆茎尖作为材料,采用 MSB₅ (MS_{无机} + B_{5有机})培养基附加不同浓度的 6-BA 诱导不定芽分化,建立了以茎尖为外植体的大豆组培高效再生植株体系。不同品种研究结果表明:预培养时的 6-BA 浓度对不定芽分化的数量以及芽的伸长有直接影响,低浓度的 6-BA 产生芽数量少,变异系数小,有利于不定芽的伸长,高浓度的 6-BA 产生芽数量多,变异系数也小,不易伸长,在 3.0 mg/L 浓度的 6-BA 处理比较理想,变异系数较大,有效芽多。不同品种对 6-BA 的耐受程度也存在一定差异,合适的 6-BA 浓度有使差异减小的趋势。

关键词 大豆;茎尖;6-BA;植株再生

中图分类号 S 565.035.3 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2003)01-0032-04

大豆是重要的粮食作物之一,其组织培养再生植株一直比较困难^[1,2]。早在上世纪 60 年代人们就对大豆组织培养进行了研究^[3],70 年代, Kimball (1977)、Oswald et al. (1977) 等人利用原生质体培养的方法也只获得了鱼雷胚,未能得到再生植株。直到 Christianson 等(1983)利用未成熟合子胚首次获得再生植株后,大豆组织培养才有了实质性的进展。^[4-8] Winholm and Rick (1983)、Grant (1984) 和 Nawell and Luu (1985) 从 *Glycine canescens* 的组织培养获得了再生植株,但 Barwale et al. (1986) 却未能重复出其结果。陈云召(1983)从大豆下胚轴和小真叶离体培养获得再生植株,卫志明等(1988)培养 6 个品种顶芽组织也形成了完整的植株,随后周思君、薛红镐等也通过幼胚诱导未成熟子叶,子叶节等获得了再生植株。但应用于大豆遗传转化某些方面的操作难度很大,诱导植株的再生频率低,重复性差是大豆基因工程的障碍因素之一,利用大豆茎尖作为外植体的再生体系尚少见^[10-15],本文利用上农 02、合丰 39 等几个主产品种的茎尖作为外植体,研究诱导大豆茎尖再生植株的方法,试图寻找提供高效大豆转化系统的新途径。

1 材料与方法

1.1 供试品种

栽培大豆 上农 02、上农 04、东农 43、申农 951、合丰 35、合丰 39

1.2 培养基配置

1.2.1 生芽培养基设置以下浓度

MSB₅^[2,9] + 6-BA 0.5 mg/L、MSB₅ + 6-BA 1.0 mg/L、MSB₅ + 6-BA 2.0 mg/L

MSB₅ + 6-BA 3.0 mg/L、MSB₅ + 6-BA 4.0 mg/L、MSB₅ + 6-BA 5.0 mg/L

MSB₅ + 6-BA 6.0 mg/L

1.2.2 芽伸长培养基 MSB₅ + 6-BA 0.05 mg/L + 0.1 mg/LIBA

1.2.3 生根培养基 1/2 MSB₅ + 0.1 mg/LIBA

以上各种培养基中,琼脂浓度为 7.4 g/L,蔗糖浓度为 2%,pH 5.8—6.0。

1.3 实验方法

取大豆种子用自来水反复冲洗,放在 70% 的酒精中浸泡 0.5—1 min,转入含有饱和次氯酸钙溶液中浸泡 15 min,用无菌水冲洗 4—5 次,然后将种子置于无菌水中浸泡 18—24 h。剥去种皮,去除子叶,在解剖镜下去除两片原叶,暴露出顶端分生组织区,从中

^{*} 收稿日期:2002-09-10

课题来源:国家 863 项目“油料作物基因工程育种”课题编号 2001AA 212141

作者简介:邱承祥(1975-),男,硕士,研究方向遗传转化。

^{**} 通讯作者: tianlongwu@263.net

取出约0.5cm 的茎尖,置于上述生芽培养基上,预培养24h,转移到芽伸长培养基上约2周,待芽长到2—3cm 切下生根,一般经过2—4周,根系发达的再生苗可移栽到花盆中,移至温室种植。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 6-BA 预培养后出芽数目的变化

$$C.V = \frac{(\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1})^{1/2}}{\bar{x}}$$

(C、V 为变异系数, \bar{x} 为样本平均数)

6-BA 处理对大豆不定芽产生的时间具有影响(表1)。培养8d 芽数量多波动较小,到14d 不定芽的数量增多,而且各处理内差异增大,变异系数大,

随着培养天数增加,芽的增量下降,各处理内差异变小,变异系数较小。说明6-BA 处理对前期作用强烈,但效果持久性不强,后期主要是外植体的内源激素起作用。不同6-BA 浓度对不定芽的数量具有很大影响,6-BA 浓度0.5mg/L 时,平均每个外植体的芽数接近1,虽然萌发有先后,但很少有多个芽生出(变异系数0.070—0.080);6-BA 浓度1.0mg/L 时,有少数侧芽生出(变异系数0.279—0.327);6-BA 浓度2.0—3.0mg/L 时,不定芽数目明显增加(1.47—3.23),变异系数波动也显著(0.281—0.484)。随着6-BA 浓度增加,平均芽数量增加,但变异系数反而有所减小(0.103—0.32),这表明6-BA 能促进不定芽的产生,但高浓度的6-BA 使外植体处理的出芽数趋于平衡。

表1 不同 6-BA 浓度预处理对 6 个大豆品种茎尖平均芽数量与变异系数的影响

Table 1 Effect of different concentration of 6-BA treatment on the average amount of buds and coefferent of variability of tip shoot of six genotype soybean genotypes

6-BA 浓度 6-BA concentration	8d		14d		20d	
	平均芽数量	变异系数(C、V)	平均芽数量	变异系数(C、V)	平均芽数量	变异系数(C、V)
	Mean No. of buds	Coeffecient of variability	Mean No. of buds	Coeffecient of variability	Mean No. of buds	Coeffecient of variability
0.5	1.04	0.070	1.09	0.080	1.09	0.080
1.0	1.28	0.279	1.38	0.326	1.42	0.327
2.0	1.47	0.281	2.23	0.450	2.38	0.480
3.0	2.14	0.292	3.16	0.471	3.23	0.484
4.0	2.37	0.233	4.31	0.266	4.41	0.261
5.0	2.85	0.270	5.09	0.240	5.16	0.232
6.0	3.37	0.32	6.10	0.106	6.24	0.103

2.2 不同浓度 6-BA 预培养后芽的伸长情况

时不同 6-BA 浓度之间芽长度差异很小,生长速度较慢,平均芽长0.17cm—0.23cm,各处理的变异系

6-BA 处理对大豆芽伸长产生影响(表2),8d

表2 不同 6-BA 浓度预处理对 6 个大豆品种茎尖平均芽长与变异系数的影响

Table 2 Effect of different concentration of 6-BA treatment on the average length of buds and coefferent of variability of tip shoot of six soybean genotype

6-BA 浓度 6-BA concentration	8d		14d		20d	
	平均芽长	变异系数(C、V)	平均芽长	变异系数(C、V)	平均芽长	变异系数(C、V)
	Mean length of buds(cm)	Coeffecient of variability	Mean length of buds(cm)	Coeffecient of variability	Mean length of buds(cm)	Coeffecient of variability
0.5	0.23	0.171	1.98	0.195	2.54	0.134
1.0	0.22	0.176	1.81	0.320	2.43	0.145
2.0	0.21	0.182	1.73	0.364	2.38	0.176
3.0	0.22	0.198	1.56	0.470	2.29	0.183
4.0	0.21	0.208	1.23	0.358	1.70	0.137
5.0	0.19	0.183	0.87	0.217	1.01	0.124
6.0	0.17	0.170	0.34	0.105	0.38	0.084

数较小(0.170—0.208);14d时差异明显增大,芽生长速度加快,平均芽长0.34cm—1.98cm,各处理变异系数波动也变大(0.105—0.470),尤其是6—BA浓度2.0mg/L—4.0mg/L芽伸长的变异系数变化最显著,表明这一阶段老芽在伸长的同时不断有新芽的长出;而20d时芽生长速度变慢,变异系数呈减小的趋势(0.084—0.183),说明各处理芽之间的长势趋于均一。不同6—BA浓度间芽伸长具有较大差异;随着6—BA浓度增加,芽平均长度减小,增长也缓慢,6—BA浓度为6.0mg/L时,14d为0.34cm,20d为0.38cm,芽几乎都不能伸长。结合芽的数量及伸长情况综合考虑6—BA浓度在3.0mg/L最合适。

2.3 大豆不同基因型茎尖再生的差异

大豆子叶节再生植株很多报道^[3-12]都认为大豆不同基因型之间存在显著差异,我们对6个不同产地的大豆茎尖诱导再生表明(表3),供试的6个基因

型外植体均能较高的诱导不定芽的发生。按6—BA 1.0mg/L~3.0mg/L的浓度平均,经差异显著性分析,各个品种间诱芽率表现可分为三个等级,上农02、申农951为A水平;合丰39、合丰35、东农43为B水平;上农04为C水平。在各基因型的不同6—BA浓度处理中,随着浓度的提高诱芽率上升,其中浓度为1.0mg/L表现诱导率最低,上农04仅30.77%,与最高申农951相差58.12%。按6—BA最佳浓度3.0mg/L相比,各基因型大豆诱导率差异下降,并且分为二个等级,申农951、上农02、合丰39、合丰35、东农43为A水平,上农04为B水平。从芽的伸长来看,各品种的>1cm芽数目也表现相同趋势。在大豆茎尖培养中,6—BA的适合浓度有利于消除大豆不同基因型之间不定芽诱导的数量上差异,并有利于芽的伸长。

表3 不同基因型大豆茎尖的不定芽分化频率

Table 3 The bud differentiation of tip shoot in different soybean genotypes

基因型 Genotype	6—BA 浓度 6—BA concentration	接种外植体数(个) No. of explant	出芽外植体数(个) No. of buding explant	芽数目(个)		诱芽率(%) Rate of bud induced
				≥1cm 芽数目 ≥1cm buds	<1cm 芽数目 <1cm buds	
东农 43	1.0	30	23	18	14	76.67
Dongnong 43	2.0	25	20	21	23	80.00
	3.0	28	24	47	24	85.71
合丰 35	1.0	19	15	11	8	78.95
Hefeng 35	2.0	29	25	40	23	86.20
	3.0	27	24	53	21	88.89
合丰 39	1.0	30	26	23	16	86.67
Hefeng 39	2.0	31	27	39	63	87.10
	3.0	28	25	51	17	89.30
上农 02	1.0	29	26	27	10	89.66
Shangnong 02	2.0	23	21	37	11	91.30
	3.0	30	28	46	39	93.33
上农 04	1.0	13	4	2	4	30.77
Shangnong 04	2.0	29	20	10	12	68.96
	3.0	31	18	13	8	58.06
申农 951	1.0	18	16	14	11	88.89
Shengnong 951	2.0	27	25	47	52	92.60
	3.0	36	34	69	41	94.44

2.4 植株的再生

当不定芽伸长到2—3cm时,切下置于生根培养基1/2MSB5+0.1mg/LIBA诱导生根,8d左右有小根从切割处长出,生根率可达90%以上,3周左右根系发达,可以练苗移栽。

3 讨论

植物转基因能否获得成功的前提是是否具有一

个高效的再生系统^[12], 20 世纪 60 年代以来, 人们就对大豆组织培养进行了广泛的研究, 先后有人选用子叶, 子叶节, 上胚轴下胚轴不同的外植体进行了研究, 但再生植株频率均不是很高^[1-10]。不定芽的诱导在整个再生系统中起关键作用, 不定芽的数量以及质量决定着再生系统的优劣, 从激素调节来看, 茎尖培养中不同浓度 6-BA 处理对不定芽产生的时间、芽的生长量和生长势具有影响, 不定芽的产生主要在中前期, 其中中期变异系数增大, 芽的快速增长也主要在此期。表明培养中期是不定芽产生的关键时期。6-BA 浓度也影响不定芽的数量和芽的伸长, 低浓度的 6-BA 有利于芽的伸长, 但芽的数量少, 各处理间变异系数较小; 过高浓度的 6-BA 诱导芽数量过多, 但芽的生长慢, 各处理间变异系数也较小。6-BA 对大豆不同基因型茎尖再生具有影响, 但合适浓度的 6-BA 能减小不同基因型间的不定芽诱导的差异, 并促进芽的伸长。比较 6-BA 处理不同浓度, 3.0mg/L 的 6-BA 预处理出芽数量较多, 芽的长势较快, 各处理间变异系数也较大。

参 考 文 献

- 1 Cheng TY, Saka T, Voqui-Dinh TH. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture[J]. Plant Sci Lett. 1980, 19: 91-99.
- 2 T. Kameya, J. Widholm. Plant regeneration from hypocotyls sections of

Glycine species[J]. Plant Science Lett. 1981, 21:289-294.

- 3 R. A. Miller, K. Ojima. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cell[J]. Exp. Cell Res. 1968, 50: 151-158.
- 4 Kartha KK, Paul K, Leung NL et al. Plant regeneration from meristems of grain legumes: soybean, cowpea, peanut, chickpea and bean.[J]. Can. J. Bot. 1981, 59: 1671-1679.
- 5 Christianson ML, Wamick DA, Carlson PS. A morphogenetically competent soybean suspension culture[J]. Science 1983 222: 632-634.
- 6 M. S. Wright, S. M. Koehler, et al. Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max* [J]. Plant Cell Rep. 1986, 5: 150-154.
- 7 Finer JJ. Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean (*Glycine max* L. Merrill)[J]. Plant Cell Rep 1988, 7: 238-241.
- 8 Wei Zhiming, Xu Zhihong. Plant regeneration from protoplast of soybean (*Glycine max* L.)[J]. Plant Cell Rep. 1988 7: 348-351.
- 9 Bajaj YPS, Kumar P, Labana KS et al. Regeneration of plants from the seedlings-explants and callus culture of *Arachis hypogaea* L.[J]. Indian J. Exp. Bot. 1989, 19: 1026-1029.
- 10 卫志明, 许智宏. 大豆原生质体培养植株再生[J]. 植物生理学通讯, 1988, (2): 53-54.
- 11 陈云昭, 王玉国. 激动素和萘乙酸不同浓度对比对大豆组织培养器官分化的影响[J]. 大豆科学, 1984, 3(4): 339-341.
- 12 袁鹰, 刘德璞, 郑培和, 等. 大豆组织培养再生植株研究[J]. 大豆科学, 2001, 20(1): 9-13.
- 13 李军, 李霞. 大豆茎尖离体培养再生植株[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(2): 134.
- 14 薛仁锦, 刘淑兰. 大豆再生植株的研究[J]. 延边农学院学报, 1994, 16(1): 1-5.
- 15 程林梅, 孙毅, 刘少翔, 等. 大豆不同外植体再生的研究[J]. 中国油料作物学报 1998, 20(2): 21-24.

STUDY ON 6-BA TO THE REGENERATION OF TIP SHOOT OF SOYBEAN

Qiu Chengxiang Wu Tianlong

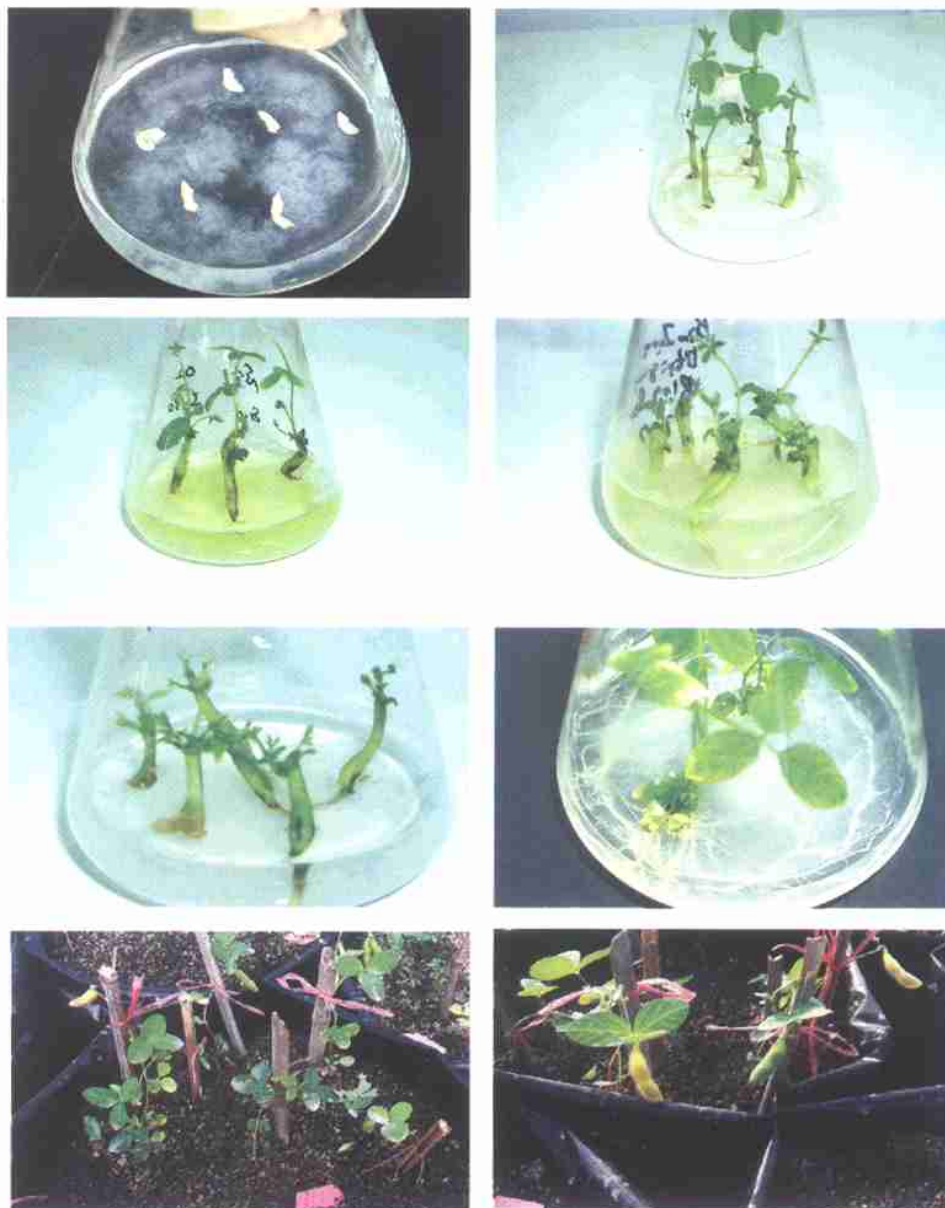
(Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201101)

Abstract Tip shoot of soybean (*Glycin max* L.) were selected as explant and precultured in MSB (inorganic of MS + organic of Bs) medium with different concentration of 6-BA to inducing buds. The high frequency regeneration system of tissue culture of soybean was established. The result indicated that concentration of 6-BA of preculture had a direct influence to the number of buds and elongating of buds. Low concentration of 6-BA produced a few buds, and the coefficient of variability was small, but benefit to buds' elongation; high concentration of 6-BA produced many buds, the coefficient of variability was small too, but not easy elongation. The treatment with 3.0mg/L of 6-BA was better, the coefficient of variability was large, effective buds were more. Different soybean varieties had different responses to the concentration of 6-BA, high concentration of 6-BA tended to reduce the difference.

Key words Soybean; Tipshoot; 6-BA; Regeneration

邱承祥等: 6-BA 对大豆茎尖诱导再生植株的研究

Qiu Chengxiang et al. :Study on 6-BA to the regenration of tip shoots of soybean



1	2
3	4
5	6
7	8

1、茎尖在预培养; 2、经 0.5mg/L 6-BA 处理后的茎尖; 3、经 2.0mg/L 6-BA 处理后的茎尖; 4、经 3.0mg/L 6-BA 处理后的茎尖; 5、经 6.0mg/L 6-BA 处理后的茎尖; 6、生根的茎尖; 7、移栽的组培苗; 8、结荚的组培苗

1.Shoot tip in preculture; 2.Shoot tip treated by 0.5mg/L6-BA;3.Shoot tip treated by 2.0mg/L6-BA; 4.Shoot tip treated by 3.0mg/L6-BA;5.Shoot tip treated by 6.0mg/L6-BA; 6.Shoot rooted; 7.Regeneration plants; 8.Podded regeneration plants.