

大豆子叶节再生影响因素的研究^{*}

刘北东¹ 朱延明² 李海燕² 杨 谦¹

(1. 哈尔滨工业大学生命科学与工程系, 哈尔滨 150001; 2. 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030)

摘要 为了建立一个大豆子叶节高效再生体系用于大豆的遗传转化, 选用 10 个东北主栽大豆品种 (*Glycine max* (L.) Merr.) 的子叶节作为外植体, 研究了基因型、植物激素的浓度、超声波辅助处理时间... 等 6 种影响大豆子叶节再生的因素。结果表明合丰 35、合丰 25、黑农 40 再生效率较高, 平均每个外植体分化出的丛生芽数分别为 6.69、6.32 和 5.98; 确定了丛生芽分化阶段所需的 BA 浓度和生根阶段所需的 IBA 浓度, 发现不同基因型需要不同的 BA 浓度, 合丰 35、合丰 25 为 1.5mg/l, 黑农 40 为 1.2mg/l。适宜的外植体大小为保留全部子叶。作为遗传转化时的除菌剂, 头孢唑啉钠(Cef)在 500mg/l 时对子叶节的再生无显著影响。当遗传转化时使用的超声波辅助处理时间小于 12 秒时, 对子叶节再生无显著影响。

关键词 大豆; 子叶节; 丛生芽; 超声波辅助处理

中图分类号 S 565.035.3 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2002)02-0088-05

关于大豆再生体系的研究有过许多报道, 包括体细胞胚胎发生途径的再生体系^[8,9,11] 原生质体再生体系^[2,3,4,7]、不定芽器官发生途径的再生体系等。其中大豆不定芽器官发生体系所用的外植体分别是无菌苗子叶节^[1,10,13,15]、未成熟种子的子叶和茎尖^[5,12]、无菌苗上胚轴^[16]等。其中以子叶节的效果最好。子叶节不定芽再生体系的优点是: a. 再生时间短, b. 外植体容易获得。c. 再生过程简单。d. 再生频率高。同时子叶节不定芽再生系统也存在外植体较大, 使转化后筛选效果不好, 另外还存在由于不定芽多数为多细胞起源, 转化后一般为嵌合体, 纯化、筛选难度较大等问题。体细胞胚胎发生途径和原生质体再生系统由于再生率低、操作复杂而没有得到普遍应用。大豆子叶节不定芽再生体系, 以其简便易行、高效及实验周期短等优点, 成为目前普遍应用的较为成熟的大豆遗传转化再生体系。影响大豆子叶节再生的因素很多, 选择适宜的基因型、培养基中植物激素浓度、外植体大小... 等因素对提高再生频率以及后期的遗传转化工作十分重要。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

10 个东北主栽大豆品种(系): 合丰 25、合丰 35、黑农 40、绥农 10、东农 42、黑农 35、黑农 37、吉林 35、吉林 30、40567, 由东北农业大学农学院大豆研究所提供。

1.1.2 试剂及仪器

常用试剂均为国产分析纯试剂。

超声波振荡仪: Branson 公司生产的 SB2200 型超声波振荡仪。

1.2 试验方法

1.2.1 培养条件:

基本培养基: MSO; MS 盐 + B5 有机物, 蔗糖 3%, 琼脂 0.8%, pH5.8。

发芽培养基: 1/2MSO + 1.0mg/l BA

丛生芽分化培养基:

MSO + 1.0—2.0mg/l BA + 0.2mg/l IBA

生根培养基: MSO + 0.0—3.0mg/l IBA

* 收稿日期: 2001-12-28

项目来源: 国家转基因植物研究与产业化开发专项(J99-B-013)资助。Supported by National Special Fund of Researching and Industrialization of Transgenic Plant. (J99-B-013)

作者简介: 刘北东(1972-), 男, 博士研究生, 研究方向微生物与植物基因工程。

培养环境: 温度 $25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 光暗培养 16/8h。

1.2.2 外植体获得:

取健康大豆种子洗净, 用 70% 酒精消毒 1 分钟。再用 0.1% 升汞浸泡 8 分钟, 无菌水冲洗 3 次后用无菌水浸泡 1 小时以上。接种于发芽培养基上, 暗培养 2 天后置于光下培养 3—5 天。取出剥去种皮, 保留 2—3mm 下胚轴, 将子叶从下胚轴处切开, 除去顶芽及腋芽。

1.2.3 丛生芽诱导:

以每瓶 5 个外植体接种于含有不同浓度 BA 的丛生芽分化培养基上, 培养 15 天, 3 次重复。

1.2.4 丛生芽生根:

将分化出的丛生芽切下, 以每瓶 10 个外植体接种于含有不同浓度 IBA 的丛生芽生根培养基上, 培养 15 天, 3 次重复。

1.2.5 超声波处理

将外植体放入液体丛生芽分化培养基中, 置于超声波振荡仪中, 处理时间分别为 0、3、6、12、24、48、96 秒, 处理后接种于丛生芽分化培养基中培养 15 天, 3 次重复。

1.2.6 移栽:

丛生芽生根后将瓶口打开炼苗 3—4 天, 然后将再生苗取出, 洗净根部的培养基, 移入(细沙: 草炭土 = 1: 1)盆中, 遮光、保湿, 逐渐降低湿度、增加光照。待小苗成活后, 转入正常栽培。

1.2.7 数据统计分析方法

采用 SAS Institute Inc. 的 SAS 数据分析软件。数据统计分析方法采用 Duncan 多重比较法。

2 结果与讨论

2.1 基因型、BA 浓度对子叶节丛生芽分化的影响

大豆子叶节分化能力存在基因型的特异性, 分化能力较强的基因型依次为合丰 35、合丰 25、黑农 40。(见图 1、图版 1)选择再生能力强的基因型是进行遗传转化实验的重要条件之一。

BA 是大豆子叶节丛生芽分化实验的常用植物激素。在前人实验基础上(1、8)采用了 4 个浓度梯度, 对上述 10 个基因型进行了丛生芽分化实验, 结果表明, 合丰 35、合丰 25 在 BA 浓度为 1.5mg/l 时, 每个外植体分化出丛生芽数量最多, 分别为 6.69 和 6.32; 黑农 40 在 BA 浓度为 1.2mg/l 时, 每个外植体分化出丛生芽数量最多为 5.98。(图 1)BA 浓度对子叶节丛生芽分化的影响很大, 而且不同基因型

需要的 BA 浓度不同, 如果只用一种 BA 浓度的分化培养基来对多个基因型进行诱导, 不能充分发挥各个基因型的分化潜力。

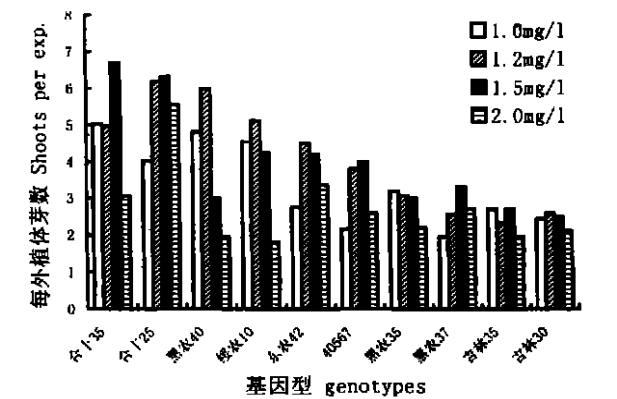


图 1 基因型和 BA 浓度对子叶节丛生芽分化的影响
Fig.1 Effect of genotype and BA on shoot regeneration

2.2 外植体大小对子叶节丛生芽分化的影响

本实验通过不同外植体大小对子叶节丛生芽分化的影响进行了研究。以合丰 35 为例, 当保留 2/3、3/3 子叶时, 每个外植体分化出丛生芽的数量分别为 5.08 和 4.71, 显著高于保留 1/3 子叶时的每个外植体 2.60。从所产生丛生芽高度上看, 保留 2/3、3/3 子叶时芽的高度也明显高于 1/3 时的高度(见表 1)。

表 1 外植体大小对丛生芽分化的影响
Table 1 Effect of the explant size on shoot regeneration

基因型 Genotypes	外植体大小		每外植体	
	Size of explants	外植体数 a Total explants	芽数 Shoots per explant	芽高 (cm)b Shoot length (cm)
合丰 35	3/3 子叶	32	5.08ac	0.3—4.2
Hefeng 35	2/3 子叶	31	4.71a	0.3—3.5
	1/3 子叶	31	2.60b	0.2—0.9
合丰 25	3/3 子叶	31	4.79a	0.2—3.0
Hefeng 25	2/3 子叶	30	4.97a	0.1—3.1
	1/3 子叶	32	2.30b	0.1—1.2
黑农 40	3/3 子叶	30	4.68a	0.2—3.5
Heinong 40	2/3 子叶	30	4.47a	0.1—3.2
	1/3 子叶	30	2.87b	0.1—0.5

注: 表中数值为 3 次重复的平均数。b 丛生芽的高度范围
标有不同字母数值在 $\alpha=0.05$ 水平上差异显著。
Note: a Values represent the mean of three replicate samples. The length range of regenerated shoots Means followed by the different letters are significantly different $\alpha=0.05$ level

从实验结果可以看出, 不同大小的外植体其再生频率存在差异。当保留 1/3 子叶时, 由于外植体较小, 缺少子叶所提供的营养物质及内源激素, 丛生

芽分化量少且生长速度慢, 从子叶切口处和下胚轴切口处产生大量愈伤组织, 也影响丛生芽分化数量。当保留 2/3 或 3/3 子叶时营养及内源激素较充分, 丛生芽分化数量多、生长速度较快, 但二者之间没有显著差异。从再生频率和实验的简便性方面考虑, 选择保留全部子叶。

2.3 IBA 浓度对大豆子叶节丛生芽生根的影响

大豆丛生芽根的诱导采用的植物生长调节剂为 IBA, 这已被大多数研究者所认同, 本实验通过向生根培养基中添加不同浓度的 IBA, 来研究 IBA 对丛生芽根的分化的影响。结果表明, 以合丰 35 为例, 当生根培养基中 IBA 浓度为 1.0mg/l 时, 外植体的生根率为 50.86% 与对照的 35.78% 无显著差异; 当 IBA 浓度达到 2.0mg/l 时, 外植体生根率为 75.32%, 显著高于对照的生根率。当 IBA 浓度达到 3.0mg/l 时, 外植体的生根率为 70%, 总体上有所降低但与 IBA2.0mg/l 无显著差异, 但根分化部位产生大量愈伤组织, 影响再生苗的正常生长以及移栽。在根分化的启动时间方面添加 IBA 可使生根时间显著缩短, 从原来的 6 天缩短到 4 天(见表 2)。

表 2 IBA 浓度对大豆子叶节丛生芽生根的影响

Table 2 Effect of IBA on the root regeneration

基因型 Genotypes	IBA (mg/l)	外植体数 ^a Total explants	生根率(%) ^b Root reg. rate(%)	启动时间(天) ^c Time of root reg. (d)
合丰 35	0.0	32	35.78bd	6
Hefeng 35	1.0	31	50.86b	4
	2.0	31	75.32a	4
	3.0	30	70.00a	4
合丰 25	0.0	30	38.33b	7
Hefeng 25	1.0	31	49.46b	5
	2.0	33	71.11a	4
	3.0	30	71.67a	4
黑农 40	0.0	31	40.97c	7
Heinong40	1.0	32	52.42bc	4
	2.0	30	81.67a	4
	3.0	30	71.67ab	4

注: 数值为 3 次重复的平均数。^b 生根外植体占外植体总数的百分率。^c 外植体生根的初始时间。^d 标有不同字母的数值在 $\alpha=0.05$ 水平上差异显著。

Note: Values represent the mean of three replicate samples. ^bThe percentage of root regenerated explants ^cTime of first root regenerated from explant Means followed by the different letters are significantly different $\alpha=0.05$ level.

2.4 头孢唑啉钠(Cef)对大豆子叶节丛生芽分化及生根的影响

大豆子叶节经农杆菌侵染后通常用作除菌剂的羧苄青霉素现已停产, 本实验拟改用 Cef 进行除菌。在使用前需先确定其对子叶节再生的影响程度。选择了 0、250、500、750mg/l 的 4 个梯度, 来研究 Cef 对子叶节丛生芽分化及生根的影响(见图 2、3)。

以合丰 35 为例, 当 Cef 浓度为 750mg/l 时, 每个外植体分化的丛生芽数为 5.7, 与对照 6.8 无显著差异, 其他 2 个基因型与合丰 35 类似。Cef 浓度在 750mg/l 时的合丰 35 生根率为 60.19%, 比对照的 81.39% 有所降低, 但差异不显著; 合丰 25、黑农 40 的生根率分别为 48.30% 和 40.39%, 显著低于对照 85.00% 和 87.34%。因此 Cef 使用浓度在小于或等于 500mg/l 时, 对大豆子叶节的整个再生过

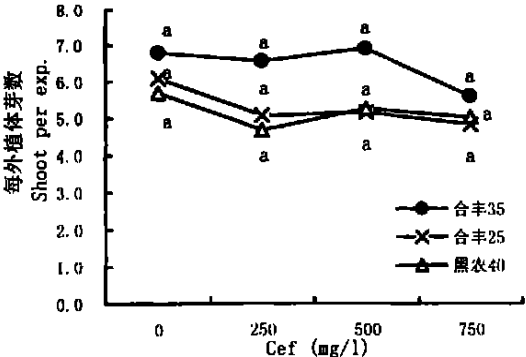


图 2 Cef 对子叶节丛生芽分化的影响

Fig. 2 Effect of Cef on shoot regeneration

注: 标有不同字母的数值在 $\alpha=0.05$ 水平上差异显著。
Note: Means followed by the different letters are significantly different $\alpha=0.05$ level.

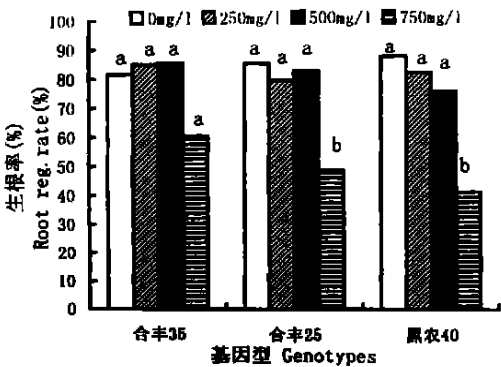


图 3 Cef 对丛生芽生根的影响

Fig. 1 Effect of Cef on root regeneration

注: 标有不同字母的数值在 $\alpha=0.05$ 水平上差异显著。
Note: Means followed by the different letters are significantly different $\alpha=0.05$ level.

程无显著影响, 可用作除菌剂。

2.5 超声波辅助处理对子叶节丛生芽分化的影响

超声波辅助农杆菌介导法(SAAT)是对农杆菌介导法的发展, 可以显著提高大豆的转化率^[14]。本实验通过对 3 个供试基因型在 0—96s 的 7 个不同水平的超声波处理下, 对子叶节丛生芽分化影响进行了研究, 以确定下一步遗传转化实验的超声波辅助处理的时间范围。

以合丰 35 为例(见表 3), 当超声波处理时间等于 12s 时, 合丰 35 的平均每个子叶节丛生芽的数量是 6.4, 外植体的分化率分别是 71.67%, 与对照的 6.6 和 77.50% 无显著差异; 当处理时间高于 12s 时, 3 个供试基因型的每个子叶节丛生芽分化数量和外植体分化率显著降低, 合丰 35 在处理 24s 时, 平均每个子叶节丛生芽的数量是 3.9, 外植体的分化率是 55%, 显著低于对照。。其他 2 个基因型与合丰 35 类似。

表 3 超声波处理对丛生芽分化的影响

Table 3 Effect of sonication treatment on shoot regeneration

基因型 Genotypes	超声处理(秒) Sonication treatment (s)	外植体数 ^a Total explants	每外植体芽数 Shoots per explant	分化率 (%) ^b Rate of dif. (%)
合丰 35	0	36	6.6 ac	77.50 a
Hefeng 35	3	30	6.4 a	76.67 a
	6	33	5.9 ab	77.42 a
	12	30	6.4 a	71.67 a
	24	30	3.9 bc	55.00 ab
	48	30	3.3 c	46.67 b
合丰 25	96	30	2.9 c	43.33 b
	0	31	6.1 a	80.43 a
Hefeng 25	3	35	5.9 a	86.43 a
	6	39	5.7 a	70.77 ab
	12	30	5.5 a	76.67 a
	24	32	3.6 b	51.77 bc
	48	30	1.9 c	43.33 c
黑农 40	96	30	1.9 c	31.67 c
	0	34	5.8 a	78.04 a
Heinong 40	3	36	5.7 a	78.61 a
	6	38	5.5 a	73.51 a
	12	30	5.7 a	73.33 a
	24	31	4.2 b	62.26 ab
	48	30	2.6 c	50.00 bc
	96	30	2.5 c	40.00 c

注: 表中数值为 3 次重复的平均数。^b 分化外植体占外植体总数的百分率。^c 标有不同字母的数值在 $\alpha=0.05$ 水平上差异显著。
Note: ^aValues represent the mean of three replicate samples. ^bThe percentage of shoot differentiated explants Means followed by the different letters are significantly different $\alpha=0.05$ level.

对表 3 的分析看出, 大豆子叶节对超声波处理有一定的忍受能力, 只有在超过一个特定的值时

(24s) 才会对子叶节造成较大的损伤, 从而影响子叶节的丛生芽分化能力。因此, 在进行超声波辅助农杆菌介导遗传转化时, 超声波处理时间应在 12s 之内, 才不会影响再生效率。

以上研究为下一步大豆农杆菌介导遗传转化奠定了一定的基础。

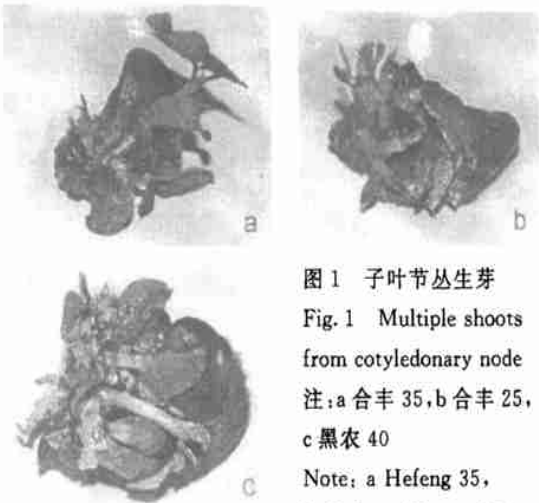


图 1 子叶节丛生芽
Fig. 1 Multiple shoots
from cotyledonary node
注: a 合丰 35, b 合丰 25,
c 黑农 40
Note: a Hefeng 35,
b Hefeng 25 , c Heinong
40

参 考 文 献

1 邓向阳, 卫志明. 大豆转化技术[J]. 植物生理学通讯, 1998, 34 (5): 381—387.
2 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.
3 肖文言, 王连铮. 大豆原生质体培养经胚胎发生高频率再生植株 [J]. 大豆科学, 1993, 12: 249—251.
4 张贤泽, 小松田隆夫. 大豆原生质体经体细胞胚再生植株[J]. 中国科学(B 辑), 1993, 23: 154—158.
5 Barwale UB, Kems HR, Widholm JM. Plant regeneration fom callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis[J]. Planta, 1986, 167: 473—481.
6 D. H. Simmonds, P. A. Donaldson. Genotype screening for proliferative embryogenesis and biolistic transformation of short—season soybean genotypes[R]. Plant cell Rep. 2000, 19: 485—490.
7 Dhri SK, Dhri S, Widholm JM. Regeneration of fertile plants from protoplasts of soybean (*Glycine max* L. Merr.) genotypic differences in culture response[R]. Plant Cell Rep., 1992, 11: 285—289.
8 Finer JJ, Nagasawa A. Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill.)[J]. Plant Cell Tissue Organ Cult. 1988, 15: 125—136.
9 Finer JJ. Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean (*Glycine max* L. Merr.)[R]. Plant cell Rep. 1988, 7: 238—241.
10 Hinchey MAW, Connor—Ward DV, Newell CA, et al Production

- of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*—mediated gene transfer[J]. *Bio/Technol*, 1988, 6: 915—922.
- 11 Parrott WA, Williams EG, Hildebrand D. F. et al Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean[J]. *Plant Cell, tissue and Organ Culture*, 1989, 16 (1): 15—21.
 - 12 Sato S, Newell C, Kolacz K. Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems [R]. *Plant Cell Rep*, 1993, 12: 408—413.
 - 13 Trick HN, Dinkins RD, Samtarem ER. Recent advances in soybean transformation[J]. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 1997, 3: 9—26.
 - 14 Trick HN, Finer JJ. Sonication—assisted *Agrobacterium*—mediated transformation of soybean (*Glycine max* [L]. *Merrill*) embryogenic suspension culture tissue. *Plant Cell Rep*, 1998, 17: 482—488.
 - 15 Wright MS, Koehler SM, Hichee MA. Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max* [R]. *Plant Cell Rep*, 1986, 5: 150—154.
 - 16 Wright MS, Williams MH, Pierson RE. Initiation and Propagation of *Glycine Max* L. *Merr.*: Plants from tissue—cultured epicotyls [J]. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 1987, 8: 83—90.

STUDY ON FACTORS AFFECTING THE SOYBEAN COTYLEDONARY NODE REGENERATION

Liu Beidong¹ Zhu Yanming² Li Haiyan² Yang Qian¹

(1. *Department of Life Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001;*

2. *Life Science Collage, Northeast Agriculture University, Harbin 150030*)

Abstract To establish a high frequency regeneration system for the gene transformation of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.), cotyledonary nodes from ten varieties were used as the explants in the regeneration experiments. Six factors such as genotypes, plant growth regulators, sonication assisted treatment and so on were studied. The results show that the high regeneration frequency genotypes are Hefeng 35, Hefeng 25, Heinong 40, the multiple shoots per explant are 6.69, 6.32 and 5.98 respectively. The BA concentrations required in shoot differentiation medium are different among these genotypes, in Hefeng 35, 1.5mg/l Hefeng 25 and in 1.2mg/l Heinong 40. But the IBA concentrations in root regeneration medium are the same. The full cotyledonary is the best explant size for shoot differentiation. As an antibiotic to restrain the propagation of excess *Agrobacterium*, the Cef has no significant influence on regeneration. When the treatment time is shorter than 12s, the sonication assisted treatment has no significant influence on the regeneration of shoots.

Key words Soybean; Cotyledonary node; Multiple shoot; Sonication assisted treatment