

大豆体细胞胚的诱导及对草甘膦耐性的研究

王萍¹, 钟影^{1,2}, 王罡², 季静², 王恩旭³

(1. 淮海工学院 海洋学院, 江苏 连云港 222005; 2. 天津大学 农业与生物工程学院, 天津 300072; 3. 中国人民解放军 92323 部队农副业基地, 江苏 连云港 222247)

摘要:以大豆未成熟子叶为外植体, 研究合丰 25、吉林 35、吉育 91 对未成熟子叶体细胞胚诱导率的影响, 并探讨 3 种基因型大豆未成熟子叶对草甘膦的耐性。结果表明: 3 种基因型的愈伤组织诱导率均为 100%, 体细胞胚诱导率为 53.95% ~ 72.12%, 平均胚数吉育 91 高于其它 2 种基因型。3 种基因型的体细胞胚诱导率在草甘膦浓度间存在差异, 在大豆以未成熟子叶为受体转基因时, 诱导体细胞胚胎发生的草甘膦筛选浓度为 2.5 ~ 5.0 mg·L⁻¹。

关键词:大豆; 基因型; 体细胞胚; 草甘膦

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9841(2012)01-0152-03

Induction of Soybean Somatic Embryos and Their Tolerance to Glyphosate

WANG Ping¹, ZHONG Ying^{1,2}, WANG Gang², JI Jing², WANG En-xu³

(1. School of Marine Science and Technology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, Jiangsu; 2. School of Agriculture and Biological Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072; 3. Agriculture and Parergon Base, Unit of 92323, PLA, Lianyungang 222247, Jiangsu, China)

Abstract: Immature cotyledons of Hefeng 25, Jilin 35 and Jiyu 91 were used as explants to study the effects of genotypes on the somatic embryogenesis of soybean. Tolerance of soybean immature cotyledons to glyphosate in three genotypes was also investigated. Induction rate of calli in three genotypes raised to 100%. The induction rate of somatic embryogenesis ranged from 53.95% to 72.12% among three genotypes and the average number of somatic embryo in Jiyu 91 was higher than Hefeng 25 and Jilin 35. The induction rate of somatic embryogenesis varied with glyphosate concentrations. The results suggest that somatic embryogenesis should be selected by using 2.5-5.0 mg·L⁻¹ of glyphosate for transformation with immature cotyledons as explants in soybean.

Key words: Soybean; Genotype; Somatic embryo; Glyphosate

大豆 (*Glycine max* L.) 是人类植物蛋白的重要来源, 是我国主要油料作物之一。随着植物组织培养、分子生物学和植物转基因技术的发展, 大豆组织培养和遗传转化相继获得成功, 并且大豆转基因技术在定向培育大豆优良品种方面受到广泛重视。抗除草剂大豆在美国已经商品化, 在 2010 年占美国大豆面积的 93%^[1], 而在中国大豆还没有转抗除草剂基因的品种应用于生产。众所周知, 大豆是较难进行组织培养与再生的植物, 其组织培养受体系统与转化方法匹配具有局限性^[2]。大豆体细胞胚胎发生途径是大豆组织培养植株再生的途径之一, 自从 Ranch 等^[3]和 Lazzeri 等^[4]以未成熟子叶诱导体细胞胚胎发生成功获得再生植株以来, 国内外学者以未成熟子叶为外植体在大豆基因型、培养基、植物激素等方面进行了相关的研究, 因所用试验材料与培养条件的不同, 试验结果不尽相同^[5-12]。以大豆未成熟子叶为受体的遗传转化也有研究报告^[13-14]。该文以大豆未成熟子叶为外植体, 研究 3 个基因型的愈伤组织诱导率、体细胞胚诱导率以及

平均胚数; 同时探讨大豆未成熟子叶在体细胞胚胎发生过程中对草甘膦的耐性, 以期确定大豆转 *EPSPS* 基因用草甘膦作为抗性选择剂的适宜筛选浓度, 为用基因枪法或农杆菌介导法将 *EPSPS* 基因转入大豆过程中的转化体筛选奠定基础。

1 材料与方法

试验材料为合丰 25 (由东北农业大学大豆研究所馈赠)、吉林 35 和吉育 91 (由吉林省农业科学院大豆研究所馈赠)。取粒大饱满、无病的大豆种子, 4~9 月分期播种于中国人民解放军 92323 部队农副业基地试验田。在大豆开花 20 d 时, 取长约 3~5 mm 的大豆幼荚置 4℃ 处理 2~5 d, 豆荚在 75% 乙醇中浸泡 2 min, 0.1% HgCl₂ 处理 10~15 min, 无菌水冲洗 2~3 次。剥开种皮, 去掉胚轴, 将子叶近轴面向上接种于体细胞胚诱导培养基中 25℃ 暗培养。采用单因素完全随机试验设计, 3 次重复。草甘膦浓度为 0、2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、15.0 mg·L⁻¹。在体细胞胚诱导培养基上诱导培养 14、21 d 时分别调查

收稿日期: 2011-11-30

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项 (2009ZX08010-013B)。

第一作者简介: 王萍 (1957-), 女, 教授, 博士, 主要从事生物技术与植物转基因研究。E-mail: y_pwang@163.com。

各处理的未成熟子叶产生愈伤组织的外植体数和出现体细胞胚的外植体数、每个外植体上的体细胞胚数,计算愈伤组织诱导率(产生愈伤组织的外植体数/接种外植体数 $\times 100\%$)、体细胞胚诱导率(产生体细胞胚的外植体数/接种外植体数 $\times 100\%$)、平均胚数(产生体细胞胚总数/产生体细胞胚的外植体数)。用 Excel 2003 进行数据处理及作图,用 SPSS 17.0 进行 t 测验方差分析与差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 不同基因型对大豆未成熟子叶体细胞胚诱导的影响

大豆未成熟子叶在体细胞胚诱导培养基中培养 21 d 时愈伤组织诱导率、体细胞胚诱导率以及平均胚数见图 1。3 种基因型未成熟子叶的愈伤组织诱导率都为 100%,合丰 25、吉林 35 和吉育 91 的体细胞胚诱导率分别为 53.95%、54.64% 和 72.12%;平均胚数分别为 1.60、1.73 和 2.61 个。将 3 种基因型的体细胞胚诱导率、平均胚数做 t 检验,结果显示,大豆未成熟子叶的体细胞胚诱导率在基因型间

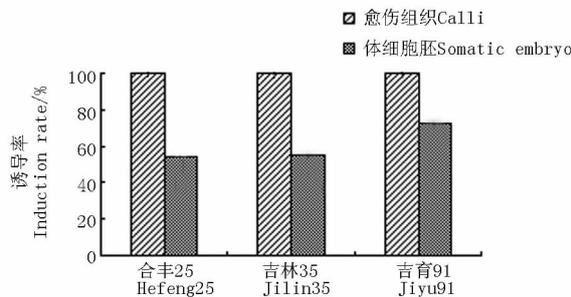


图 1 大豆 3 种基因型愈伤组织和体细胞胚诱导率

Fig. 1 Induction rate of calli and somatic embryo in three genotypes of soybean

表 1 大豆 3 种基因型在不同草甘膦浓度间愈伤组织诱导率、体细胞胚诱导率

Table 1 Induction rate of calli and somatic embryo among different concentrations of glyphosate in three genotypes of soybean

草甘膦浓度 Concentrations of glyphosate / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	愈伤组织诱导率 Induction rate of calli/%			体细胞胚诱导率 Induction rate of somatic embryo genesis/%		
	合丰 25 Hefeng25	吉林 35 Jilin35	吉育 91 Jiyu91	合丰 25 Hefeng25	吉林 35 Jilin35	吉育 91 Jiyu91
0	100.00 \pm 0.0000a	96.67 \pm 3.3333a	100.00 \pm 0.0000a	32.73 \pm 7.2733ab	26.67 \pm 8.81917a	40.00 \pm 15.2752a
2.5	100.00 \pm 0.0000a	80.00 \pm 11.5470a	100.00 \pm 0.0000a	57.50 \pm 14.6487a	27.17 \pm 4.5966a	6.67 \pm 3.3333b
5.0	100.00 \pm 0.0000a	90.61 \pm 5.2569a	100.00 \pm 0.0000a	26.67 \pm 8.8192b	6.67 \pm 3.3333b	6.67 \pm 6.6667b
7.5	93.33 \pm 3.3333a	90.00 \pm 5.7735a	100.00 \pm 0.0000a	10.83 \pm 0.8333b	3.03 \pm 3.0300b	14.65 \pm 7.9369b
10.0	100.00 \pm 0.0000a	83.33 \pm 12.0185a	100.00 \pm 0.0000a	16.67 \pm 8.8192b	6.67 \pm 3.3333b	16.36 \pm 3.6367b
12.5	100.00 \pm 0.0000a	83.20 \pm 3.5945a	93.94 \pm 6.0600a	24.07 \pm 3.0318b	0.00 \pm 0.0000b	0.00 \pm 0.0000b
15.0	75.00 \pm 14.4338b	73.33 \pm 21.8581a	100.00 \pm 0.0000a	0.00 \pm 0.0000c	0.00 \pm 0.0000b	0.00 \pm 0.0000b

同一列数值后不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

Values within a column followed by different lowercase letters are significantly different at 0.05 probability level.

未达显著差异。平均胚数在基因型间存在差异显著,其中,吉育 91 显著高于合丰 25 和吉林 35。这说明吉育 91 体细胞胚胎发生能力最强。

2.2 草甘膦对大豆未成熟子叶体细胞胚诱导的影响

培养 14 d 时,各基因型的愈伤组织诱导率、体细胞胚诱导率见表 1。不同浓度草甘膦对大豆未成熟子叶愈伤组织诱导率影响较小,不同基因型间略有差异。其中,吉育 91 的愈伤组织诱导率受草甘膦浓度影响最小,未呈现出明显的抑制作用;而合丰 25 和吉林 35 未成熟子叶的愈伤组织诱导率不同程度地受到草甘膦浓度的抑制而降低。3 种基因型在草甘膦浓度低于 $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时均有体细胞胚胎发生,但体细胞胚诱导率依基因型而异。吉育 91 受草甘膦的影响较大,对照(培养基中未添加草甘膦)的体细胞胚诱导率为 40.00%,添加 $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦时体细胞胚诱导率下降到 6.67%。相比之下,合丰 25 受草甘膦的抑制作用较小。

方差分析表明,合丰 25 的愈伤组织诱导率在不同草甘膦浓度间差异显著,并且在草甘膦浓度为 $15.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时愈伤组织诱导率显著低于其它浓度处理;吉林 35 和吉育 91 的愈伤组织诱导率在草甘膦浓度间没有显著差异。3 种基因型的体细胞诱导率在不同草甘膦浓度间的差异均达极显著水平,合丰 25、吉林 35 和吉育 91 的 F 值分别为 6.76、7.58 和 4.47。合丰 25、吉林 35 和吉育 91 分别在草甘膦浓度为 15.0 、 5.0 和 $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,体细胞胚诱导率显著低于对照。依大豆基因型的不同,草甘膦浓度在 12.5 或 $15.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时未成熟子叶没有诱导出体细胞胚产生。由此可见,不同浓度草甘膦处理大豆未成熟子叶时,对大豆愈伤组织诱导和体细胞胚胎发生的影响因基因型而异。

3 讨论

3.1 大豆不同基因型未成熟子叶诱导体细胞胚胎发生的能力

在大豆组织培养中,以各种外植体诱导大豆植株再生时都表现出明显的基因型依赖性。在以往未成熟子叶为外植体的研究中,因选用大豆基因型与培养条件不同,体细胞胚诱导率也有较大的差异^[5,8,10-11,13]。从当地大豆主栽品种中筛选易于诱导体细胞胚胎发生的基因型,对于经体细胞胚胎发生途径应用转基因技术改良大豆的遗传性状至关重要。合丰 25、吉林 35 和吉育 91 是东北地区种植面积较大的大豆品种,在该试验中诱导培养 21 d 时体细胞胚诱导率为 53.95% ~ 72.12%,平均胚数 1.60 ~ 2.61 个,均表现出较好的体细胞胚胎发生能力,适合于作为大豆转基因的受体进行进一步的遗传转化研究。

3.2 大豆未成熟子叶对草甘膦的耐性

草甘膦是一种广谱灭生性、内吸传导型、非选择性的有机磷类除草剂,它对植物体内 5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合成酶(5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase, EPSPS)具有专一抑制作用,阻断芳香族氨基酸和一些芳香化合物的生物合成,从而扰乱了生物体正常的氮代谢而使其死亡。应用转基因技术将 EPSPS 基因导入大豆,可提高大豆体内 EPSPS 合成酶表达量,使转基因大豆草甘膦的致死剂量提高而耐受除草剂。

在 EPSPS 基因转化大豆的过程中,一方面它作为抗草甘膦的目的基因,另一方面也可以作为筛选标记基因,即在转化筛选过程中不使用抗生素,而用草甘膦进行抗性筛选^[15]。在进行大豆遗传转化之前,了解受体对草甘膦的耐性,以确定较适的筛选浓度是十分必要的。该试验中合丰 25、吉林 35 和吉育 91 的未成熟子叶对草甘膦的耐性存在差异,主要表现在体细胞胚诱导率上。在进行大豆未成熟子叶遗传转化时,这 3 种基因型草甘膦筛选较适合浓度为 2.5 ~ 5.0 mg·L⁻¹。

参考文献

[1] 刘定富. 美国主要作物转基因商业化进展及启示[J]. 中国种业, 2010(12): 22-25. (Liu D F. Progress and implications for major commercial crops modified genetically in USA[J]. China Seed Industry, 2010(12): 22-25.)

[2] Hinchee M A W, Conner-Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA

transfer[J]. Nature Biotechnology, 1988, 6: 915-922.

[3] Ranch J P, Oglesby L, Zielinski A C. Plant regeneration from embryo-derived tissue cultures of soybeans[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 1985, 21(11): 653-658.

[4] Lazzeri P A, Hildebrand D F, Collins G B. Soybean somatic embryogenesis; effect of hormones and culture manipulations[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1987, 10: 197-208.

[5] Komatsuda T, Ohyama K. Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean *Glycine max* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1988, 75: 695-700.

[6] 冯新华, 蒋兴邨, 邵启全. 大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.] 未成熟子叶组织的体细胞胚胎诱导和植株再生的研究[J]. 中国科学(B 辑), 1988(9): 939-943. (Feng X H, Jiang X C, Shao Q Q. Induce of somatic embryo and plant regeneration from immature cotyledons of soybean[J]. Science in China(Series B), 1988(9): 939-943.)

[7] 周思君, 尹光初, 雷勃钧, 等. 从大豆幼胚诱导胚胎发生再生植株[J]. 大豆科学, 1989, 8(1): 39-45. (Zhou S J, Yin G C, Lei B J, et al. Plant regeneration from immature embryo culture of soybean via somatic embryogenesis[J]. Soybean Science, 1989, 8(1): 39-45.)

[8] 隋德志, 王连铮, 尹光初, 等. 大豆体细胞组织培养再生植株的研究 I 培养基、基因型、植物激素对诱导大豆再生植株的影响[J]. 大豆科学, 1989, 8(2): 145-152. (Sui D Z, Wang L Z, Yin G C, et al. A study of soybean plant regeneration via somatic tissue cultures I[J]. Soybean Science, 1989, 8(2): 145-152.)

[9] Komatsuda T, Kaneko K, Oka S. Cell biology and molecular genetics genotype × sucrose interactions for somatic embryogenesis in soybean[J]. Crop Science, 1991, 31(2): 333-337.

[10] 周思君, 尹光初, 雷勃钧, 等. 大豆体细胞胚胎发生影响因素的研究[J]. 植物学通报, 1992, 9(2): 38-43. (Zhou S J, Yin G C, Lei B J, et al. Study on the influential factors of the somatic embryogenesis of soybean[J]. Chinese Bulletin of Botany, 1992, 9(2): 38-43.)

[11] Jia L, Elizabeth A G. Comparison of somatic embryogenesis and embryo conversion in commercial soybean cultivars[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1996, 44: 87-89.

[12] Ranjitha K B D, Settu A, Sujatha G. Somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] [J]. Indian Journal of Biotechnology, 2006, 5: 243-245.

[13] 王萍, 王罡, 季静, 等. 大豆体细胞胚胎发生与农杆菌介导的遗传转化[J]. 遗传, 2004, 26(5): 695-700. (Wang P, Wang G, Ji J, et al. Studies of somatic embryogenesis and genetic transformation by *Agrobacterium*-mediated in soybean[J]. Hereditas, 2004, 26(5): 695-700.)

[14] Ko T S, Nelson R L, Korban S S. Screening multiple soybean cultivars (MG 00 to MG VIII) for somatic embryogenesis following *Agrobacterium*-mediated transformation of immature cotyledons[J]. Crop Science, 2004, 44(5): 1825-1831.

[15] Clemente T E, LaVallee B J, Howe A R, et al. Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. Crop Science, 2000, 40(3): 797-803.