

卡那霉素和草铵膦对不同基因型大豆胚尖不定芽诱导的影响

张忻爽^{1,2}, 王萍^{1,2}, 宋海星¹, 荣湘民¹

(1. 湖南农业大学 资源环境学院, 湖南 长沙 410218; 2. 淮海工学院 海洋学院, 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005)

摘要:以合丰35、黑农44和吉林35的胚尖为外植体,分别考察了不同浓度的卡那霉素和草铵膦对不同基因型大豆胚尖不定芽诱导的影响。结果表明,不定芽诱导率合丰35和吉林35在卡那霉素 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时与对照差异不显著,黑农44在 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理时显著低于对照;芽数吉林35在卡那霉素 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时显著低于对照并高于其他浓度,而合丰35与黑农44在 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时芽数与对照差异不显著;3种基因型大豆胚尖不定芽伸长均在卡那霉素浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时受到显著抑制。草铵膦浓度在 $0.2\sim1.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对合丰35和吉林35的芽数没有影响,但黑农44在 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时芽数开始显著低于对照;芽长合丰35、黑农44和吉林35分别在 0.6 、 0.2 和 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时显著低于对照。因此,合丰35、黑农44和吉林35的适宜卡那霉素的筛选浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,草铵膦浓度分别为 0.6 、 0.2 和 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

关键词:大豆;胚尖;不定芽;卡那霉素;草铵膦

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2013)01-0136-03

Effect of Knamycin and Glufosinate on Adventitious Buds Induction from Embryonic Tip of Different Genotype Soybean

ZHANG Xin-shuang^{1,2}, WANG Ping^{1,2}, SONG Hai-xing¹, RONG Xiang-min¹

(1. College of Resources and Environment, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan; 2. School of Marine Science and Technology, Huaihai Institute of Technology, Jiangsu Key Laboratory of Marine Technology, Lianyungang 222005, Jiangsu, China)

Abstract: Embryonic tips of Hefeng35, Heinong44 and Jilin35 were used as the explants to investigate the effects of kanamycin and glufosinate on the adventitious bud induction. Under $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ kanamycin, the adventitious bud induction rate of Hefeng35 and Jilin35 were not significantly different compared with control, while Heinong44 was significantly lower than control; bud number of Jilin35 was lower than control and higher than other concentrations, Hefeng35 and Heinong44 were not different compared with control; the shoot length of 3 genotypes were significantly inhibited by $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ kanamycin. Glufosinate at the concentration from 0.2 to $1.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ had no influence on the number of adventitious buds for Hefeng35 and Jilin35, but Heinong44 reduced conspicuously at the concentration of $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Both Heinong44 and Jilin35 were inhibited by $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ glufosinate at length of buds while Hefeng35 was inhibited by $0.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ glufosinate. Results suggest the suitable screening concentration of kanamycin for Hefeng35, Heinong44 and Jilin35 were $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, and glufosinate for three genotypes were 0.6 , 0.2 and $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively.

Key words: Soybean; Embryonic tips; Adventitious bud; Knamycin; Glufosinate

随着分子生物学的发展,利用转基因技术来提高作物产量和品质已经成为重要的作物育种手段。在大豆转基因过程中,由于不同基因型对不同抗性筛选剂的耐受性不同,因此抗性筛选剂是影响大豆遗传转化效率的一个重要因素。Olthoff等^[1]采用潮霉素(Hygromycin)作为筛选剂,并在共培养基中加入抗氧化剂混合物,使转化效率提高至16.4%。Aragao等^[2]和Rech等^[3]利用咪唑酮类除草剂为筛选剂进行大豆遗传转化研究,使转化效率分别达到20.1%和9.0%。Zeng等^[4]利用优化的农杆菌介导法以草铵膦为筛选剂,使Williams82大豆的遗传转化率达到5.9%,但是利用潮霉素为筛选剂却没有取得高的转化效率,表明对同一基因型大豆,不同的筛选剂作

用效果可能存在差异。因此,确定不同基因型的适宜抗性筛选剂及其浓度对提高转化效率至关重要。

本文分别以卡那霉素和草铵膦为抗性筛选剂,研究其对不同基因型大豆胚尖不定芽诱导的影响,旨在为特定的基因型大豆遗传转化时筛选剂及其浓度的选择奠定试验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆基因型为合丰35、黑农44和吉林35,分别由黑龙江省农业科学院佳木斯分院、黑龙江省农业科学院大豆研究所和吉林省农业科学院大豆研究所提供。

收稿日期:2012-10-13

基金项目:国家转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08010-013B);中央财政支持地方高校发展专项资金(CXTD07)。

第一作者简介:张忻爽(1987-),女,在读硕士,研究方向为植物营养生理与遗传学。E-mail:zhangxinshuang3@163.com。

通讯作者:王萍(1957-),女,教授,主要从事生物技术和植物转基因研究。E-mail:y_pwang@163.com。

1.2 试验方法

大豆种子用氯气熏蒸法^[5]消毒之后,用无菌水冲洗4次,经无菌水25℃浸泡48 h后,取出萌动的种子,在无菌条件下去掉种皮、原叶及2片子叶,取下胚轴连同胚尖生长点垂直接种在不定芽诱导培养基(MS+6-BA 3.0 mg·L⁻¹)上,培养3 d后转接于含有不同浓度筛选剂的伸长培养基(MS+6-BA 0.05 mg·L⁻¹+IBA 0.1 mg·L⁻¹)中,卡那霉素设0、100、200、300、400和500 mg·L⁻¹共6个浓度,草铵膦设0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0和1.2 mg·L⁻¹共7个浓度。采用完全随机设计,3~4次重复。培养6周时调查出现不定芽的外植体数、芽数和芽长,计算不定芽诱导率、平均芽数和平均芽长^[6]。不定芽诱导率(%)=出芽外植体数/接种外植体数;芽数=总芽数(芽高>0.5 cm)/出芽外植体数。

1.3 数据分析

采用SPSS 17.0软件进行方差分析及差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 卡那霉素对不同基因型大豆不定芽诱导的影响

从表1可知,在未添加卡那霉素的情况下,3种基

因型的胚尖不定芽诱导率相似(95.00%~97.50%);芽数吉林35最多(3.39个),黑农44最少(2.48个);芽长黑农44最长(3.69 cm),合丰35最短(1.90 cm)。随着卡那霉素浓度的增加,3个基因型的不定芽诱导率、芽数和芽长均逐渐降低。

合丰35在100 mg·L⁻¹处理下,不定芽诱导率和芽数与对照差异不显著,在200 mg·L⁻¹处理时显著低于对照与其他浓度处理无显著差异;芽长100 mg·L⁻¹处理显著低于对照但显著高于其他浓度处理。综合比较,100 mg·L⁻¹卡那霉素为合丰35胚尖不定芽诱导的适宜筛选浓度。

在100 mg·L⁻¹卡那霉素处理条件下,黑农44的不定芽诱导率显著低于对照,但显著高于其他浓度处理;芽数与对照差异不显著,但显著高于其他浓度处理;芽长显著低于对照,而与其他处理间差异不显著。因此,确定黑农44的适宜卡那霉素筛选浓度为100 mg·L⁻¹。

在100 mg·L⁻¹卡那霉素处理条件下,吉林35不定芽诱导率与对照间差异不显著,但显著高于其他浓度处理;芽数显著低于对照,但高于其他浓度处理;芽长显著低于对照,与其他浓度间差异不显著。吉林35的适宜卡那霉素筛选浓度为100 mg·L⁻¹。

表1 卡那霉素对不同基因型大豆不定芽诱导的影响

Table 1 The effect of kanamycin on adventitious buds from different genotypes soybean

卡那霉素浓度 Concentration of kanamycin/mg·L ⁻¹	不定芽诱导率			芽数			芽长		
	Induction rate of adventitious buds/%			Number of adventitious buds			Length of adventitious buds/cm		
	合丰35 HF 35	黑农44 HN 44	吉林35 JL35	合丰35 HF 35	黑农44 HN 44	吉林35 JL35	合丰35 HF 35	黑农44 HN 44	吉林35 JL35
0	97.50a	95.00a	96.67a	2.51a	2.48a	3.39a	1.90a	3.69a	2.71a
100	90.00ab	87.50b	96.67a	2.08ab	2.43a	2.55b	0.72b	0.79b	0.65b
200	82.50bc	67.50c	87.50b	1.97b	1.78b	1.97c	0.62c	0.63b	0.56b
300	80.00bc	65.00c	77.50b	1.96b	1.70b	2.07c	0.59c	0.72b	0.55b
400	75.00bc	52.50c	75.00b	1.91b	1.25c	2.03c	0.56c	0.56b	0.54b
500	70.00c	50.00c	70.00b	1.76b	1.15c	1.76c	0.52c	0.50b	0.52b

HF 35、HN 44、JL35 分别代表合丰35、黑农44、吉林35;同列小写字母表示在0.05水平上差异显著,下同。

HF 35, HN 44 and JL 35 represent Hefeng 35, Heinong 44 and Jilin35, respectively; Values in the same column followed by different lowercase letters are significant different at 0.05 probability level, the same as below.

2.2 草铵膦对不同基因型大豆不定芽诱导的影响

如表2所示,未经草铵膦处理时,3种基因型的胚尖不定芽诱导率合丰35最高(97.50%),黑农44最低(92.50%);芽数吉林35最多(3.12个),黑农44最少(2.36个);芽长黑农44最长(2.79 cm),合丰35最短(1.38 cm)。在加入草铵膦后,3个基因型的不定芽诱导率、芽数和芽长随着浓度的升高均有不同程度的降低。

合丰35在0.2~0.8 mg·L⁻¹处理时不定芽诱导率与对照差异不显著,1.0 mg·L⁻¹时显著低于对照;

芽数在所有浓度间均无显著差异;芽长0.4 mg·L⁻¹处理与对照及0.2 mg·L⁻¹处理差异不显著,但显著高于其他浓度处理。综合分析确定0.6 mg·L⁻¹为合丰35胚尖不定芽诱导适宜的草铵膦筛选浓度。

黑农44在0.2和0.4 mg·L⁻¹草铵膦处理时,不定芽诱导率与对照差异不显著,0.6 mg·L⁻¹处理显著低于对照;芽数在0.2~0.8 mg·L⁻¹处理与对照无显著差异,但显著高于1.0和1.2 mg·L⁻¹处理;芽长0.2 mg·L⁻¹处理显著低于对照,并显著高于其他处理。因此,确定0.2 mg·L⁻¹草铵膦为黑农44

的适宜筛选浓度。

吉林 35 在 0.2 ~0.6 mg·L⁻¹ 草铵膦处理时,不定芽诱导率与对照差异不显著;芽数各浓度处理间

无显著差异;芽长在 0.2 mg·L⁻¹ 时显著低于对照,而显著高于其他处理。相比较而言,0.2 mg·L⁻¹ 草铵膦为吉林 35 胚尖不定芽诱导的适宜筛选浓度。

表 2 草铵膦对不同基因型大豆胚尖不定芽诱导的影响

Table 2 The effect of glufosinate on adventitious buds from different genotypes soybean

草铵膦浓度 Concentration of Glufosinate /mg·L ⁻¹	不定芽诱导率			芽数			芽长		
	Induction rate of adventitious buds/%			Number of adventitious buds			Length of adventitious buds/cm		
	合丰 35 HF 35	黑农 44 HN 44	吉林 35 JL35	合丰 35 HF 35	黑农 44 HN 44	吉林 35 JL35	合丰 35 HF 35	黑农 44 HN 44	吉林 35 JL35
0.0	97.50a	92.50a	94.50a	2.72a	2.36a	3.12a	1.38a	2.79a	1.78a
0.2	95.00a	87.50ab	92.50ab	2.69a	2.38a	2.98a	1.41a	2.26b	1.15b
0.4	97.50a	87.50ab	90.00ab	2.85a	2.24a	2.79a	1.20a	1.01c	0.90c
0.6	95.00a	60.00b	88.50ab	2.76a	2.20a	2.49a	0.91b	0.90c	0.85c
0.8	95.00a	22.50c	87.50b	2.50a	1.77a	2.89a	0.80bc	0.45d	0.82cd
1.0	52.50b	2.50c	35.00c	2.62a	0.25b	2.62a	0.69bc	0.13d	0.75cd
1.2	40.00b	5.00c	42.50c	2.04a	0.38b	2.31a	0.52c	0.13d	0.67d

3 讨 论

Komatsuda 等^[7] 在 1988 年就曾有过关于大豆植株再生依赖基因型的报道。王萍等^[6] 在 MS + 1.30 mg·L⁻¹ 6-BA 上培养诱导 8 个基因型产生不定芽的再生,发现吉林 40 和黑农 37 不定芽的诱导率明显高于其它基因型。本研究在未加筛选剂时,合丰 35、吉林 35 和黑农 44 的不定芽诱导率均高于 90%,可作为理想的大豆胚尖遗传转化受体。

同一筛选剂对大豆胚尖不定芽的影响也依赖于基因型。王萍等^[8] 研究表明,黑农 37、吉育 91、淮豆 3 号和淮豆 4 号胚尖不定芽的形成对草铵膦的耐性表现出差异,其中吉育 91 耐性最强,淮豆 4 号最差。Hakeem 等^[9] 研究了 10 个基因型大豆对氯化钠的敏感性,发现 Pusa-3 具有比其它基因型更强的耐性。本研究的 3 个基因型中,黑农 44 不定芽诱导率较其他 2 个基因型对卡那霉素和草铵膦敏感,在卡那霉素 100 mg·L⁻¹ 处理以及草铵膦 0.6 mg·L⁻¹ 处理时与对照存在显著差异。

适宜的筛选剂及其浓度的选择也是大豆的遗传转化效率影响因素之一,筛选过严或过松影响着转化体的筛选效果^[10]。本研究结果表明,不同基因型大豆胚尖不定芽的芽长对筛选剂的响应比不定芽诱导率和芽数更为敏感,而不定芽是否能够伸长直接影响植株再生,进而影响整个遗传转化率。因此,针对特定的基因型进行遗传转化实验时,选择特定的筛选剂及其浓度是非常必要的,应该从对外植体不定芽的诱导率、芽数及芽长等多方面因素综合考虑后加以确定。

参考文献

[1] Olhoft P M, Lex E, Lagel F, et al. Efficient soybean transformation

using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method[J]. Planta, 2003, 216(5): 723-735.

[2] Aragao F J L, Sarokin L, Vianna G R, et al. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean plants at high frequency[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 101: 1-6.

[3] Rech E L, Vianna G R, Aragao F J L. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants[J]. Nature Protocols, 2008, 3(3): 410-418.

[4] Zeng P, Vадnais D A, Zhang Z, et al. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill][J]. Plant Cell Reports, 2004, 22: 478-482.

[5] 王伟, 王翌, 季静, 等. 大豆胚尖再生体系的优化及与子叶节再生体系的比较[J]. 大豆科学, 2012, 31(3): 353-357. (Wang W, Wang G, Ji J, et al. Optimization of embryonic tip regeneration system and comparison with cotyledonary node regeneration system in soybean[J]. Soybean Science, 2012, 31(3): 353-357.)

[6] 王萍, 张淑珍, 李文滨, 等. 大豆不同基因型胚尖不定芽的诱导及对抗生素的敏感性[J]. 作物杂志, 2010(2): 50-53. (Wang P, Zhang S Z, Li W B, et al. Induction of adventitious shoots from embryonic tip of different soybean genotypes and their sensibility to antibiotics[J]. Crops, 2010(2): 50-53.)

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

[8] 王萍, 管娟娟, 冯远航, 等. 草铵膦对大豆胚尖不定芽形成的影响[J]. 作物杂志, 2011(6): 60-62. (Wang P, Guan J J, Feng Y H, et al. Effects of glufosinate on formation of adventitious buds from embryonic tip of soybean[J]. Crops, 2011(6): 60-62.)

[9] Hakeem K R, Khan F, Chandna R, et al. Genotypic variability among soybean genotypes under NaCl stress and proteome analysis of salt-tolerant genotype[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 168(8): 2309-2329.

[10] 王萍, 吴颖, 季静, 等. 抗生素对大豆愈伤组织的诱导和生长的影响[J]. 遗传, 2001, 23(4): 321-324. (Wang P, Wu Y, Ji J, et al. Effect of antibiotics on induction of callus and callus growth in soybean[J]. Hereditas, 2001, 23(4): 321-324.)