

草甘膦对不同基因型大豆不定芽再生的影响

钟影¹,王罡¹,季静¹,张旭强¹,王萍²,曹越平³,邱丽娟⁴

(1. 天津大学 环境科学与工程学院,天津 300072; 2. 淮海工学院 海洋学院,江苏 连云港 222005; 3. 上海交通大学 农业与生物学院,上海 200436; 4. 中国农业科学院 作物科学研究所,北京 100081)

摘要:以5种大豆基因型的胚尖为外植体,研究了7种草甘膦浓度对大豆不同基因型胚尖不定芽形成的影响。结果表明:5种基因型大豆对草甘膦的耐性表现不同。吉育91耐性较强,草甘膦浓度为 $12.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时不定芽诱导率、芽数、芽长显著低于对照;黑农37在草甘膦浓度为 $5.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时不定芽诱导率、芽数显著低于对照,芽长在 $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时显著低于对照;黑农35、黑农44、合丰35在草甘膦浓度为 $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时胚尖不定芽的形成受到强烈抑制。

关键词:大豆;胚尖;不定芽;草甘膦

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2014)02-0218-05

Effect of Glyphosate on Adventitious Buds Induction from Embryonic Tip of Different Genotype Soybean

ZHONG Ying¹, WANG Gang¹, JI Jing¹, ZHANG Xu-qiang¹, WANG Ping², CAO Yue-ping³, QIU Li-juan⁴

(1. School of Environmental Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. School of Marine Science and Technology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 3. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200436, China; 4. Crop Science Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Embryonic tips from five soybean genotypes were used as the explants to investigate the effects of different concentration of glyphosate on the adventitious bud induction. The results showed that the tolerance from five soybean genotypes were different. In $12.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ glyphosate, the adventitious bud induction rate of Jiyu 91 were significantly lower than the control group; In $5.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ glyphosate, the adventitious bud induction rate and the number of the adventitious buds of Henong 37 were significantly lower than those of the control, who's the length of adventitious buds were lower than control groups in $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. In $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ glyphosate, the adventitious bud of Heinong 37, Heinong44 and Hefeng 35 were restrained strongly.

Key words: Soybean; Embryonic tip; Adventitious shoot; Glyphosate

草甘膦(glyphosate)是一种内吸传导型慢性广谱灭生性除草剂,易被环境微生物降解,是环境友好型除草剂,具有其他除草剂不可比拟的优点。其作用机理是通过茎叶吸收后扩散到植物各部位,竞争性抑制生物体内5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合成酶,阻断莽草酸合成途径,干扰蛋白合成导致植物死亡^[1]。

大豆(*Glycine max* L.)是我国重要的油料作物之一,生产上病、虫、草害降低了大豆产量,增加了种植大豆的成本^[2],利用植物转基因技术培育抗病、抗虫、抗除草剂等优质大豆种质资源已经成为国内外研究的热点。大豆是较难转化的植物之一,其组织培养系统与转化方法匹配困难^[3-4]。大豆胚尖转化体系是近年来研究和应用比较多的再生体系之一,具有生长周期短、出芽较快、伸长容易、生长比较整齐等优点^[5]。在大豆的遗传转化中,草甘膦因具有低毒、高效等特点已为研究者所重视,但

以草甘膦直接作为大豆遗传转化的筛选剂报道较少^[6]。因此,了解受体对筛选剂的敏感性,确定适当的抗性筛选浓度对转基因的成功与否至关重要。目前,大豆以*EPSPS*作为目的基因的研究较多,但在组织培养条件下大豆对草甘膦耐受性的研究报道较少,且大豆不同基因型对筛选剂的耐受性不同^[7-8],大豆同一基因型在不同再生体系下再生率也存在较大差异^[9-10]。

本文以来自不同春大豆主产区的大豆成熟种子胚尖作为外植体,研究草甘膦对大豆胚尖基部愈伤组织和不定芽形成的影响,以期用草甘膦作为筛选剂进行大豆胚尖遗传转化的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆品种黑农35、黑农37、黑农44、合丰35和吉育91,由吉林省农业科学院大豆研究所、东北农

收稿日期:2013-10-20

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX01010-013B,2011ZX08004-001)。

第一作者简介:钟影(1988-),女,在读硕士,主要从事植物转基因研究。E-mail:15861297940@163.com。

通讯作者:王罡(1964-),男,博士,教授,主要从事植物基因工程研究。E-mail:wanggangtjdx@126.com。

业大学大豆研究所等单位馈赠。草甘膦为 Sigma 公司产品。

1.2 试验设计

大豆种子选用氯气熏蒸法消毒^[11]之后,用无菌水冲洗 3 次,经无菌水 25℃ 浸泡 24 ~ 48 h 后,取出萌动的种子,于超净工作台中去除种皮、子叶及原叶,取连同胚尖生长点的大豆胚尖直接接种于不定芽诱导培养基($MS + 3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.7\%$ 琼脂 + 3% 蔗糖)中,于 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、16 h 光照下预培养 3 d 后转接于含有不同浓度草甘膦伸长培养基($MS + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IBA} + 0.7\%$ 琼脂 + 3% 蔗糖)中,每 14 d 继代 1 次。采用单因素完全随机设计,草甘膦浓度设 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 7 个浓度,3 次重复。

1.3 测定项目与方法

培养 21, 28, 42 d 时分别调查各处理出现愈伤组织的外植体数、出现不定芽的外植体数、芽数和芽长,计算愈伤组织诱导率、不定芽诱导率、平均芽数和平均芽长^[12]、相对愈伤组织诱导率、相对不定芽诱导率、相对芽数、相对芽长。

相对愈伤诱导率(%) = 各处理愈伤诱导率/对照愈伤组织诱导率 $\times 100$, 相对不定芽诱导率(%) = 各处理出芽外植体数/对照出芽外植体数 $\times 100$, 相对芽数(%) = 各处理平均芽数/对照平均芽数 \times

100, 相对芽长(%) = 各处理平均芽长/对照平均芽长 $\times 100$ 。

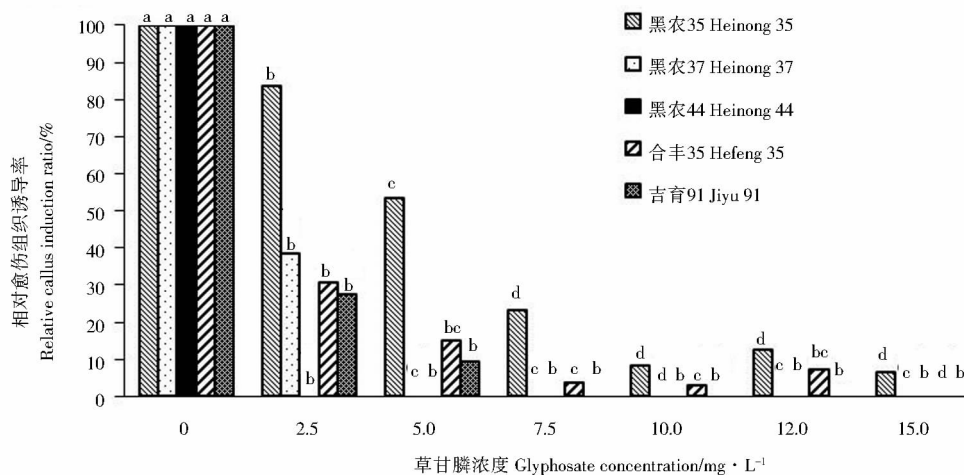
1.4 数据分析

用 Microsoft Excel 2007 做图, SPSS 20.0 进行方差分析及多重比较。

2 结果与分析

2.1 草甘膦对不同基因型大豆胚尖基部愈伤组织诱导率的影响

5 种基因型大豆胚尖在含有不同浓度草甘膦的培养基上培养, 14 d 时外植体与培养基接触部分出现愈伤组织, 培养至 21 d, 产生愈伤组织的外植体数基本稳定不再增加, 后期随培养时间增长, 愈伤组织不断胀大。由图 1 可知, 5 种基因型在草甘膦处理下, 愈伤组织诱导率均显著低于对照, 即草甘膦对胚尖基部愈伤组织的产生有一定的抑制作用; 同一草甘膦浓度下, 不同基因型胚尖基部愈伤组织诱导率受草甘膦影响不同(图 1)。其中, 黑农 35 较其他基因型产生愈伤组织现象严重, 在草甘膦浓度为 0 ~ 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 随着草甘膦浓度的增强, 愈伤组织受抑制情况呈线性关系逐渐降低; 在草甘膦 15 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 胁迫下, 其愈伤组织诱导率为 6.67%。黑农 44、黑农 37、吉育 91、合丰 35 在草甘膦浓度分别为 2.5, 5.0, 7.5 和 15 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时外植体无愈伤组织产生。



不同小写字母表示差异显著, 下同。

Different lowercase letters mean significance at 0.05 level. The same below.

图 1 草甘膦处理下不同基因型大豆相对愈伤组织诱导率

Fig. 1 Relative induction rate of callus induction ratio from different genotypes soybean treated under glyphosate

2.2 草甘膦对不同基因型大豆胚尖不定芽诱导率的影响

在含有不同浓度草甘膦的伸长培养基中, 大豆胚尖培养 21 d 后不定芽开始出现, 培养 42 d 后在各浓度处理下大豆胚尖不定芽诱导率基本稳定。由

图 2 可知, 在 7 种草甘膦浓度影响下不同基因型的不定芽诱导率各异, 并随着草甘膦浓度增加而逐渐降低。

黑农 35、黑农 44 和合丰 35 在草甘膦浓度为 2.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时不定芽诱导率即显著低于对照组, 且

黑农 35 和黑农 44 均在草甘膦浓度为 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时不再产生不定芽, 合丰 35 在草甘膦浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 不产生不定芽; 黑农 37 在草甘膦浓度为 $7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 相对不定芽诱导率为 0; 吉育 91 在草甘膦浓度为 $7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 不定芽诱导率与对

照呈现显著差异, 在草甘膦浓度为 $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 相对不定芽诱导率仍为 14.6%。由此可知, 5 种基因型中, 吉育 91 对草甘膦抗性最强, 黑农 37 和合丰 35 次之, 黑农 35 和黑农 44 对草甘膦耐性较差。

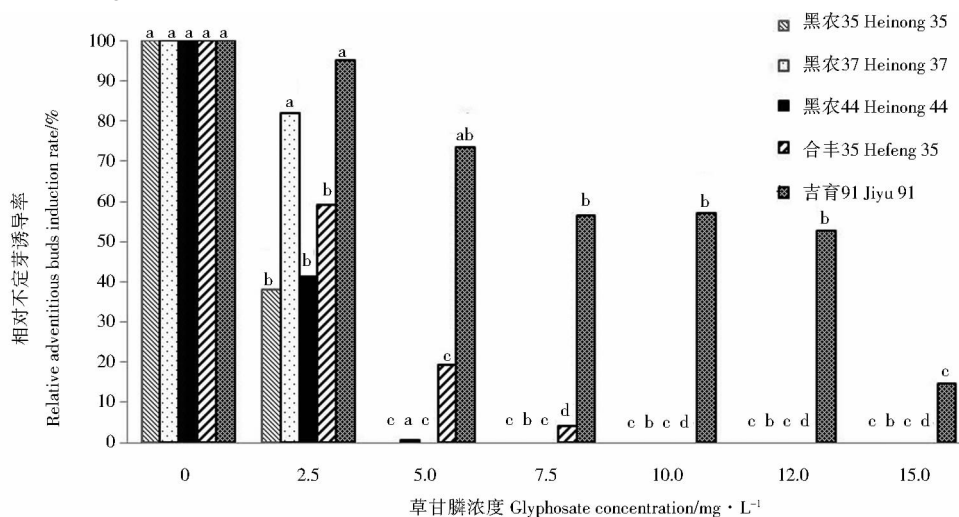


图2 草甘膦处理下不同基因型大豆相对不定芽诱导率

Fig. 2 Relative induction rate of adventitious buds from different genotypes soybean treated under glyphosate

2.3 草甘膦对不同基因型大豆胚尖不定芽芽数的影响

在 7 种浓度草甘膦处理下, 5 种基因型大豆培养 42 d 时相对不定芽芽数见图 3。在草甘膦浓度为 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 黑农 37 和吉育 91 芽数较对照显著增加了 22% 和 26%, 草甘膦一定程度上促进了不定农 35、黑农 44 不定芽数受到强烈抑制, 无不定芽产生; 草甘膦浓度为 $7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 合丰 35 不定芽数为 0。

由此可见, 培养 42 d 时草甘膦对大豆不定芽数

芽的分化; 随着草甘膦浓度增加, 二者芽数受抑制程度增强, 分别于草甘膦浓度为 $7.5, 15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 不定芽芽数接近 0。黑农 35、黑农 44、合丰 35 芽数随草甘膦浓度的增加呈显著降低趋势, 在草甘膦浓度为 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 3 种基因型不定芽数均与对照形成显著差异; 在草甘膦浓度为 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 黑的影响与不定芽诱导率较为一致, 吉育 91 较其他 4 种基因型均表现出较强的草甘膦耐受性, 黑农 37 和合丰 35 次之, 黑农 35、黑农 44 耐性较差。

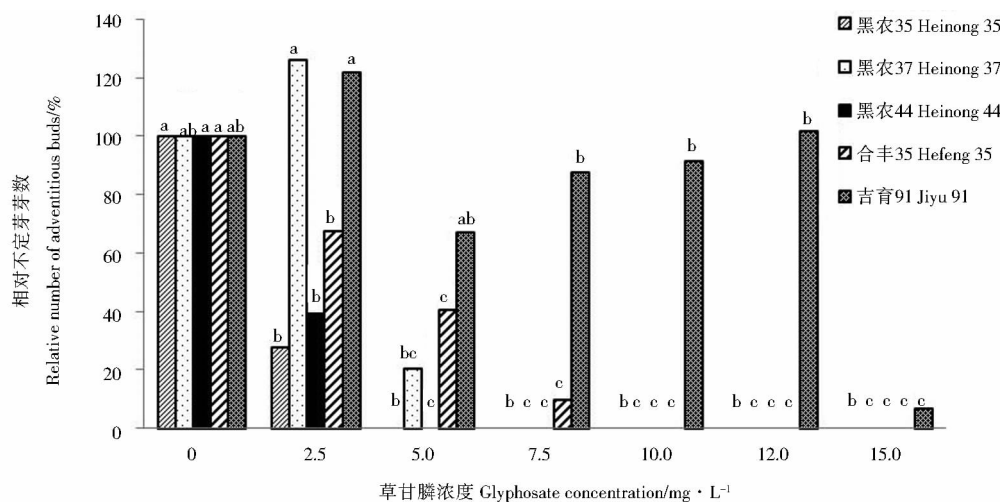


图3 草甘膦处理下不同基因型大豆的相对不定芽芽数

Fig. 3 Relative the number of adventitious buds from different genotypes soybean treated under glyphosate

2.4 草甘膦对不同基因型大豆胚尖不定芽芽长的影响

由图 4 各基因型胚尖不定芽的芽长相对值可看出,在草甘膦浓度为 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,5 种基因型不定芽长度均显著低于对照,但受抑制程度因基因型不同而异。其中吉育 91 受抑制程度较低,在草甘膦浓

度为 $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,不定芽芽长是对照芽长的 45%,与对照形成显著差异;在草甘膦浓度分别为 10.0 和 $7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,合丰 35、黑农 37 不定芽芽长为 0。黑农 44 与黑农 35 变化趋势一致,于 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,不定芽芽长为 0。

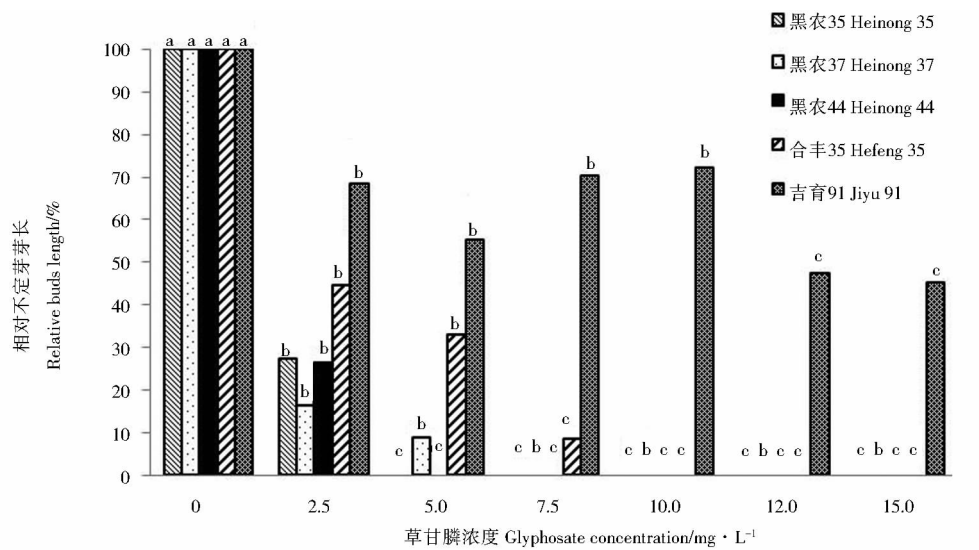


图 4 草甘膦处理下不同基因型大豆的相对不定芽芽长

Fig. 4 Relative length of adventitious buds from different genotypes soybean treated under glyphosate

3 讨论

3.1 大豆基因型对逆境筛选的耐受性

多数研究表明大豆植株再生能力具有基因型依赖性,早期 Komatsuda 等^[13]曾提出相关报道。闫帆等^[14]以 5 个大豆品种的胚尖外植体为材料,研究基因型对胚尖诱导丛生芽的影响,发现吉林 35 更适合于大豆胚尖再生系统。

鉴于大豆基因型对植株再生能力的影响,在大豆胚尖伸长过程中,添加不同浓度的筛选剂,其筛选效果也会随着基因型的不同而有所变化。李亮等^[15]在研究 4 种大豆品种耐盐性时,发现抗线 3 号在短时间内盐胁迫下的生长情况优于另 3 个品种;王萍等^[5]在研究草铵膦对大豆 3 种基因型不定芽再生的影响时,结果表明吉育 91 耐性较强,淮豆 4 号耐性较差。张忻爽等^[6]在研究抗生素、草铵膦对大豆胚尖不定芽再生的影响时,发现合丰 35 对卡那霉素、草铵膦的耐受性较黑农 44、吉林 35 强。本研究表明 5 种大豆基因型对草甘膦的耐受性不同,吉育 91 对草甘膦耐受性较强,黑农 37、合丰 35 表现比较敏感,黑农 35、黑农 44 对草甘膦耐受性较差。综合分析发现,大豆以胚尖为外植体时,诱导能力较强的吉育 91 对除草剂有着较强的耐性,合丰 35

对抗生素^[6]、除草剂均有着较强的耐性,推测可能具有较强再生能力的大豆基因型对逆境胁迫也有着较强的耐性。

3.2 大豆胚尖遗传转化草甘膦筛选的适宜浓度

在转基因过程中,筛选剂的种类及适宜筛选浓度对试验成败至关重要,是研究者们一直关注的问题。Zeng 等^[16]对 Williams 82 的遗传转化研究中,草铵膦与半胱氨酸共同作用,在不定芽第一伸长阶段草铵膦筛选浓度为 $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,第二伸长阶段筛选浓度为 $3 \sim 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本试验中,在大豆胚尖不定芽诱导过程中,以不定芽诱导率、芽长、芽数多指标综合分析,吉育 91 对草甘膦适宜筛选浓度为 $15.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;黑农 37、合丰 35 草甘膦适宜筛选浓度为 $7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,黑农 35、黑农 44 对草甘膦较为敏感,适宜浓度为 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此结果为以草甘膦作为筛选剂时,适宜浓度的确定奠定了基础。

参考文献

- [1] 苏少泉. 草甘膦述评[J]. 农药, 2005, 44(4): 145-149. (Su S Q. Glyphosate review [J]. Chinese Journal of Pesticides, 2005, 44(4): 145-149.)
- [2] 苏少泉. 世界抗草甘膦大豆的新进展[J]. 农药, 2007, 46(2): 73-76. (Su S Q. Current development of glyphosate-resistant soybean [J]. Chinese Journal of Pesticides, 2007, 46(2): 73-76.)

- [3] 王萍,钟影,王昱,等.大豆体细胞胚的诱导及对草甘膦耐性的研究[J].大豆科学,2012,31(1):152-154. (Wang P,Zhong Y,Wang G,et al. Induction of soybean somatic embryos and their tolerance to glyphosate [J]. Soybean Science, 2012, 31 (1): 152-154.)
- [4] Hinchey M A,Connor-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.
- [5] 郑丽红,季静,王昱,等.适于子叶节和胚尖再生体系的大豆基因型筛选[J].大豆科学,2012,31(1):213-216. (Zheng L H,Ji J,Wang G,et al. Selection of suitable soybean genotype based on cotyledon node and embryonic tip regeneration systems[J]. Soybean Science,2012,31(1):213-216.)
- [6] 岳岩磊. *EPSPS* 基因直接作为大豆遗传转化筛选标记的研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨师范大学,2012. (Yue Y L. Study on *EPSPS* gene as the selection marker of soybean genetic transformation system[D]. Harbin:Harbin Normal University,2012.)
- [7] 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.)
- [8] 张忻爽,王萍,宋海星,等.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[J].大豆科学,2013,32(1):136-138. (Zhang X S,Wang P,Song H X,et al. Effect of knamycin and glufosinate on adventitious buds induction from embryonic tip of different genotype soybean[J]. Soybean Science, 2013, 32 (1): 136-138.)
- [9] 姚丙晨,沈艳茹,韩雪,等.大豆子叶节和胚尖再生体系的比较及大豆 *SR1* 基因的遗传转化[J].大豆科学,2012,31(3):364-367. (Yao B C,Shen Y R,Han X,et al. Comparison with cotyledonary node and embryonic tip regeneration system in soybean [*Glycine max* (L.)Merrill] and genetic transformation of *SR1* [J]. Soybean Science,2012,31(3):364-367.)
- [10] 刘翠,李喜焕,常文锁,等.农杆菌介导大豆不同外植体遗传转化研究[J].华北农学报,2012,27(3):35-40. (Liu C,Li X H,Chang W S,et al. Studies of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation by different explants in soybean (*Glycine max*. L) [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica,2012,27(3):35-40.)
- [11] 刘海坤,卫志明.一种大豆成熟种子的消毒方法[J].植物生理学通讯,2002,38(3):260-261. (Liu H K,Wei Z M. A method for sterilizing mature seeds of soybean[J]. Plant Physiology Communications,2002,38(3):260-261.)
- [12] 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[J].作物杂志,2010(1):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.)
- [13] 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.
- [14] 闫帆,孙昕,翟莹,等.6-BA 浓度及基因型对大豆胚尖诱导丛生芽的影响[J].大豆科学,2011,30(1):29-32. (Yan F,Sun X,Zhai Y,et al. Effect of different 6-BA concentration and genotypes on shoots induced from embryonic tips[J]. Soybean Science, 2011, 30 (1): 29-32.)
- [15] 李亮,李泽宇,王丽娜,等.不同大豆品种耐盐性表现分析[J].黑龙江农业科学,2013(2):17-20. (Li L,Li Z Y,Wang L N,et al. Analysis of Salt Tolerance in soybean *Glycine max* [J]. Heilongjiang Agricultural Sciences,2013(2):17-20.)
- [16] Zeng P,Vadnais D,Zhang Z,et al. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* L. Merrill] [J]. Plant Cell Reports,2004,22(7):478-482.

(上接第 217 页)

- [2] Hartwig U A. The regulation of symbiotic N_2 fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level[J]. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, 1998, 1: 92-120.
- [3] Herridge D F, Peoples M B, Boddey R M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems[J]. Plant and Soil, 2008, 311: 1-18.
- [4] Peoples M B, Brockwell J, Herridge D F, et al. The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems[J]. Symbiosis, 2009, 48: 1-17.
- [5] Schachtman D P, Reid R J, Ayling S M. Phosphorus uptake by plants: From soil to cell[J]. Plant Physiology, 1998, 116: 447-453.
- [6] 齐敏兴,刘晓静,张晓磊,等.不同磷水平对紫花苜蓿光合作用和根瘤固氮特性的影响[J].草地学报,2013,22(3):512-516. (Qi M X,Liu X J,Zhang X L,et al. Effects of different phosphorus levels on photosynthesis and root nodule nitrogen-fixing characteristic of alfalfa[J]. Acta Agrestia Sinica,2013,22(3):512-516.)
- [7] Abasi M K,Manzoor M,Tahir M M. Efficiency of rhizobium inoculation and P fertilization in enhancing nodulation, seed yield, and phosphorus use efficiency by field grown soybean under hilly region of Rawalakot Azad Jammu and Kashmir, Pakistan [J]. Journal of Plant Nutrition, 2010, 33: 1080-1102.
- [8] Schipanski M E, Drinkwater L E, Russelle M P. Understanding the variability in soybean nitrogen fixation across agroecosystems[J]. Plant and Soil, 2010, 329: 379-397.
- [9] Hirel B, Tetu T, Lea P J, et al. Improving nitrogen use efficiency in crops for sustainable agriculture [J]. Sustainability, 2011, 3: 1452-1485.
- [10] Matson P A, Naylor R, Oritiz-Monasterio I. Integration of environmental, agronomic and economic aspects of fertilizer management [J]. Science, 1998, 280: 112-115.
- [11] Kurdali F, Al-Ain F, Al-Shamma M. Nodulation, dry matter production, and N_2 fixation by fababean and chickpea as affected by soil moisture and potassium fertilizer [J]. Journal of Plant Nutrition, 2002, 25: 355-368.
- [12] Clayton G W, Rice W A, Lupwayi N Z, et al. Inoculant formulation and fertilizer nitrogen effects on field pea: nodulation, N_2 fixation and nitrogen partitioning [J]. Canadian Journal of Plant Science, 2004, 84: 79-88.