

大豆新品系黑农 56 子叶节再生体系的优化

寇 坤^{1,2}, 刘丽君², 曲姗姗^{1,2}, 唐晓飞², 杨 喆²

(¹东北农业大学研究生院, 黑龙江 哈尔滨 150030; ²黑龙江省农业科学院大豆研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘 要:为获得高效的大豆再生体系, 选用大豆新品系黑农 56 子叶节进行了组织培养的研究, 确定黑农 56 最适的萌发培养基与芽诱导培养基激素浓度。即萌发培养基为不含 6-BA 的 MS 培养基; 芽诱导培养基添加 6-BA 和 IBA 的浓度分别为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 B5 培养基。并确定黑农 56 的草铵膦选择压力为 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词:大豆; 子叶节; 再生

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2009)03-0400-03

Improvement of Regeneration System in New Soybean Line Heinong 56

KOU Kun^{1,2}, LIU Li-jun², QU Shan-shan^{1,2}, TANG Xiao-fei², YANG Zhe²

(¹Graduate School of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang; ²Soybean Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, Heilongjiang, China)

Abstract: In order to acquire high efficiency soybean regeneration system, cotyledonary nodes organ of new soybean line Heinong 56 was used as explants. The effect of different concentration of 6-BA and IBA on the ratio of shooting was investigated in the shoot induction medium. The optimum concentration of 6-BA and IBA was $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. Adopting the model of late selection, the optimal concentration of Glufosinate-ammonium was $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ in phase of shoots induction.

Key words: Soybean; Cotyledonary nodes; Regeneration

大豆(*Glycine max*)是我国重要的粮食和油料作物, 虽然目前转基因大豆已在全球大规模种植, 但其遗传转化依然是植物基因工程领域的一大难题。植物基因转化的成功, 有赖于建立良好的转基因体系。

大豆的再生体系主要包括: 大豆体细胞胚发生再生系统^[1]、大豆不定芽器官发生系统和原生质体再生系统^[2-3]。无菌苗的子叶、子叶节、下胚轴、胚尖等^[4]可以作为不定芽器官发生再生系统所用的外植体。由于子叶节具有取材不受季节限制、再生频率高等优点, 是目前大豆遗传转化的首选外植体^[5]。

不同大豆基因型再生频率差异较大, 选用再生率高的基因型是成功转化的前提。为拓宽大豆受体材料基因型, 提高转基因大豆的应用价值, 在菜豆几丁质酶基因导入大豆研究之前, 对一个综合性状较好的新品系黑农 56 的再生体系进行了优化, 为获得高效转基因植株提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试大豆品种为黑农 56, 由黑龙江省农科院大豆所提供。

1.1.2 培养基配置 萌发培养基 1/2MSB 培养基 + 2% 蔗糖 + 0.8% 琼脂, pH5.8; 1/2MSB 培养基 + $1.67 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + 2% 蔗糖 + 0.8% 琼脂, pH5.8; 芽诱导培养基 B5 培养基 + $(1, 1.5, 2) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $(0.1, 0.2, 0.3) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA + 4% 蔗糖 + 0.8% 琼脂, pH5.7; 伸长培养基 1/2MSB 培养基 + $0.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA + 3% 蔗糖 + 0.8% 琼脂, pH5.8; 生根培养基 MSB + $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA + 2% 蔗糖 + 0.8% 琼脂, pH5.8。

1.2 方法

1.2.1 种子灭菌和萌发 大豆种子的灭菌采用氯气表面灭菌法^[6]。大豆种子按单层平铺在开盖的

收稿日期: 2009-03-04

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2006AA10ZF9); 国家转基因重大专项(2008ZX08004-002)资助项目。

作者简介: 寇坤(1981-), 女, 硕士研究生, 研究方向为分子育种。E-mail: koukun2006@163.com。

通讯作者: 刘丽君, 研究员。E-mail: nkyssbd@126.com。

培养皿内,培养皿放置于可密封的干燥器。干燥器的中部放置一烧杯,灭菌前在烧杯内加入 120 mL 蒸馏水,80 mL 商用漂白水,再贴壁缓慢加入 5 mL 浓 HCl,灭菌 12 ~ 16 h 后取出。消毒后的种子置于萌发培养基中培养。(26 ± 1)℃、16 h 光照/8 h 黑暗下培养。

1.2.2 丛生芽的诱导 5 ~ 7 d 后取出无菌苗,剥去种皮,将下胚轴切断,保留 2 ~ 3 mm 下胚轴,将 2 片子叶从下胚轴处切出,除去顶芽及侧芽,保留完整的子叶,在子叶的叶腋处划几刀,形成网状伤口。以每瓶 5 个外植体接种在含有不同激素的丛生芽诱导培养基上。(26 ± 1)℃、16 h 光照/8 h 黑暗下培养。

1.2.3 不定芽的伸长、生根培养 将分化的丛生芽外植体转入低浓度 6-BA 伸长培养基中。待丛生芽长至 4 ~ 5 cm 时,从芽基部将芽切下,将芽接入生根培养基中诱导生根。

1.2.4 草铵膦对大豆选择压力 后续试验中植物表达载体的筛选标记基因为 bar,设置了 0、1、2、3、4、5、6 mg · L⁻¹ 7 个不同浓度梯度对大豆子叶节分化率进行选择压力试验。其中每个梯度接种 30 个子叶节,计算子叶节分化率。分化率 = 分化的子叶节数/总子叶节(%)。3 次重复取平均值。

2 结果与分析

2.1 激素水平对大豆子叶节芽分化率的影响

2.1.1 6-BA 对子叶节不定芽分化的影响 为得到最适宜大豆萌发的培养基,设置 2 种不同培养基。种子萌发率均为 98% 以上,这表明 6-BA 浓度对大豆萌发没有太大影响。只是在高浓度 6-BA 的刺激下的幼苗比不添加激素中的幼苗粗壮。

子叶节不定芽诱导阶段,将在不添加激素的萌发培养基上获得的子叶节,转接到不同浓度激素配比的芽诱导培养基上。高浓度 6-BA 对大豆子叶节分化有较好的促进作用,而 IBA 的浓度对子叶节分化影响不明显(表 1)。

与不添加激素的萌发培养基相比,在 6-BA 浓度为 1.67 mg · L⁻¹ 萌发培养基上获得的子叶节,芽诱导培养基中不同激素对比对芽分化率影响并不十分明显,只是分化率总体高于前者(表 2)。最后确定最适宜芽诱导培养基的激素配比 6-BA 2.0 mg · L⁻¹,IBA 0.2 mg · L⁻¹。

表 1 不同激素浓度对子叶节外植体分化率的影响
Table 1 Effects of different concentrations of phytohormone on shoots induced from cotyledonary nodes

6-BA 浓度 Concentrations of 6-BA/ mg · L ⁻¹	IBA 浓度 Concentrations of IBA/ mg · L ⁻¹	外植体数 Total explants	丛生芽数 Total shoots	出芽率 Budding percentage /%
1.0	0.1	30	9	30.0
1.0	0.2	30	11	36.6
1.0	0.3	30	12	40.0
1.5	0.1	30	11	36.7
1.5	0.2	30	13	43.3
1.5	0.3	30	15	50.0
2.0	0.1	30	12	40.0
2.0	0.2	30	21	70.0
2.0	0.3	30	9	30.0

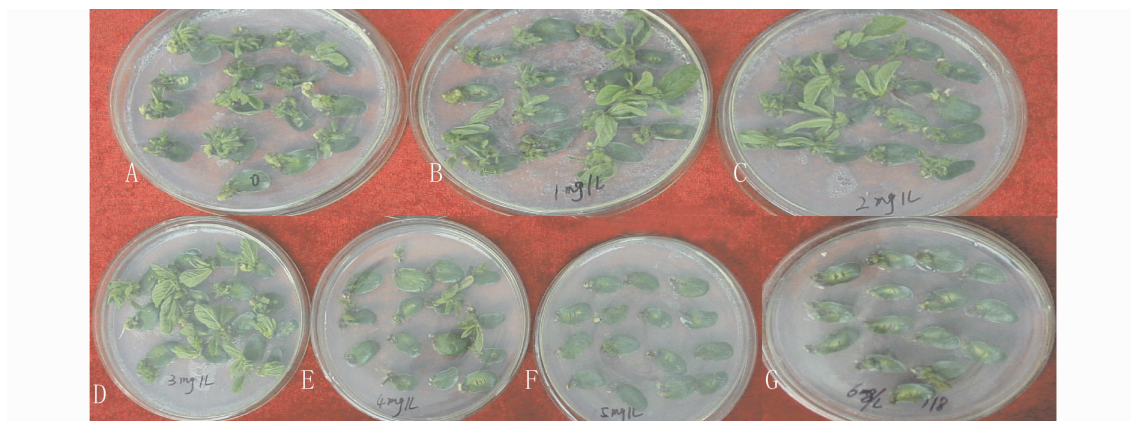
表 2 不同激素浓度对子叶节外植体分化率的影响
Table 2 Effects of different concentrations of phytohormone on shoots induced from cotyledonary nodes

6-BA 浓度 Concentrations of 6-BA/ mg · L ⁻¹	IBA 浓度 Concentrations of IBA/ mg · L ⁻¹	外植体数 Total explants	丛生芽数 Total shoots	出芽率 Budding percentage /%
1.0	0.1	30	17	56.6
1.0	0.2	30	15	50.0
1.0	0.3	30	16	53.3
1.5	0.1	30	18	60.0
1.5	0.2	30	20	66.6
1.5	0.3	30	17	56.6
2.0	0.1	30	15	50.0
2.0	0.2	30	19	63.3
2.0	0.3	30	14	46.6

2.1.2 诱导时间对子叶节出芽的影响 植物激素对大豆子叶节外植体处理时间对不定芽的诱导具有影响。子叶节在诱导培养基中培养 ≤ 14 d,即可诱导出绿色芽点,将出芽的外植体转入不定芽伸长培养基中,可以得到伸长的芽。随着诱导天数的增加,虽然仍有芽点出现,但数量很少。说明激素对芽的诱导在一定的时间阶段发挥作用,且效果不具有持续性。另外过多的芽点引起芽之间的相互作用,抑制了芽点的增加。

2.2 草铵膦的大豆选择压力试验

7 个不同浓度的草铵膦对大豆黑农 56 子叶节外植体出芽率的影响如图 1 所示。随着草铵膦浓度不断提高,大豆子叶节分化率受到的抑制逐渐加强,当草铵膦浓度为 4 mg · L⁻¹ 时,黑农 56 子叶节分化率仅为 10%。选择 4 mg · L⁻¹ 的草铵膦浓度作为黑农 56 的选择压力(图 1,图 2)。



A: $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; B: $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; C: $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; D: $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; E: $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; F: $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; G: $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

图1 草铵膦压力梯度试验

Fig. 1 Effects of Glufosinate-ammonium on shoot differentiation of cotyledonary nodes

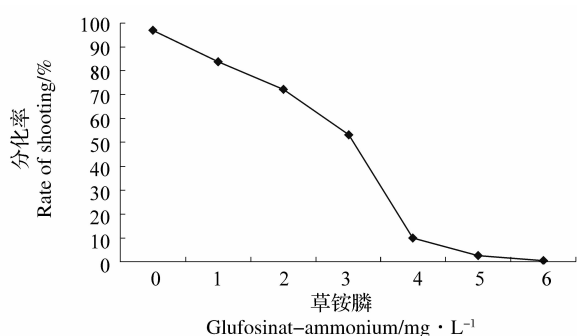


图2 草铵膦对大豆黑农 56 子叶节丛生芽分化的影响

Fig. 2 Effects of Glufosinate-ammonium on the shoot regeneration of Heinong 56 soybean cotyledonary

3 讨论

3.1 激素浓度对大豆子叶节诱导丛生芽的影响

植物激素是影响芽分化的重要因素。有研究表明,高浓度的细胞分裂素有利于细胞的分化,而高浓度的生长素有利于生根^[5-7]。选择细胞分裂素 6-BA、生长素 IBA,并对其不同的浓度配比做了一系列的研究。

芽诱导阶段设计了两种激素不同浓度的正交试验,并以两种萌发培养基中的子叶节做平行对照。含 6-BA 的萌发培养中的子叶节在芽诱导阶段,芽的分化受激素浓度变化的影响小于不含 6-BA 的萌发培养基中的子叶节。前者较后者形成的不定芽多且相对细小,后期生长中还不宜长高。可能是因为之前 6-BA 的量有一定的积累,而在芽诱导阶段对 6-BA 的需求量不大,高浓度反而抑制了细胞的分化,导致失去顶端优势^[8]。

不同浓度的激素对比对诱导大豆子叶节芽的形成是有影响的。所以不存在孤立的最佳的培养基,

必须综合考虑,协调组配使用,才能得到好的效果。

3.2 草铵膦对大豆选择压力试验

抗草铵膦转基因大豆目前在转基因作物中占据主导地位^[9]。选择压力过高会导致正常植株受到抑制,而选择压力过低,造成过多的逃逸植株,增加后续工作量。采用延时筛选的方法,设计了 7 个筛选梯度,最终将黑农 56 丛生芽分化阶段的草铵膦筛选压力定为 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

4 结论

对一个综合性状较好的新品系黑农 56 子叶节器官发生再生体系进行了优化。最终确定黑农 56 的最适萌发培养基为不含 6-BA 的 MS 培养基,芽诱导培养基为添加 6-BA 和 IBA 的浓度分别为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 B5 培养基,在丛生芽分化阶段采用延迟筛选的方法,草铵膦筛选浓度为 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

参考文献

- [1] Samoylov V M, Tucker D M, Thibaud-Nissen F, et al. A liquid-medium-based protocol for regeneration from embryogenic soybean cultures[J]. Plant Cell Reports, 1998, 18: 49-54.
- [2] Wei Z M, Xu Z H. Plant regeneration from protoplast of soybean (*Glycine max* L.) [J]. Plant Cell Reports, 1998, 7: 348-351.
- [3] 肖文言, 王连铮. 大豆原生质体培养研究进展[J]. 作物杂志, 1994, 3: 23-25. (Xiao W Y, Wang L Z. Advances in protoplast culture of soybean[J]. Crops, 1994, 3: 23-25.)
- [4] 刘海坤, 卫志明. 大豆遗传转化研究进展[J]. 植物生理与分子生物学报, 2005, 31(2): 126-134. (Liu H K, Wei Z M. Recent advances in soybean genetic transformation[J]. Acta Phytophysiologica Sinica 2005, 31(2): 126-134.) (下转第 408 页)

- Genetic system of quantitative traits in plant[M]. Beijing: Science Press, 2003: 120-126.)
- [8] 寇秀颖, 于国萍. 脂肪和脂肪酸甲酯化方法的研究[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(2): 46-47. (Kou X Y, Yu G P. Methyl esterification methods of fatty oil and fatty acid[J]. Journal of Food Research and Development, 2005, 26(2): 46-47.)
- [9] 朱军, 季道藩, 徐馥华. 作物品种间杂种优势遗传分析的新方法[J]. 遗传学报, 1993, 20(3): 262-271. (Zhu J, Ji D F, Xu F H. Genetic approach for analyzing intra-cultivar heterosis in crops[J]. Acta Genetica Sinica, 1993, 20(3): 262-271.)
- [10] 孔繁玲. 植物数量遗传学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2006. (Kong F L. Quantitative genetics in plants[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2006)
- [11] 王庆钰, 朱立宏. 水稻广亲和性遗传的主基因多基因混合模型分析[J]. 遗传, 2004, 26(6): 898-902. (Wang Q Y, Zhu L H. Analysis on the major gene and multigene mixed inheritance of wide compatibility gene in rice[J]. Hereditas, 2004, 26(6): 898-902.)
- [12] 袁有禄, 张天真, 郭旺珍, 等. 棉花高品质纤维性状的主基因与多基因遗传分析[J]. 遗传学报, 2002, 29(9): 827-834. (Yuan Y L, Zhang T Z, Guo W Z. Major-polygene effect analysis of super quality fiber properties in upland cotton (*G. hirsutum* L.) [J]. Acta Genetica Sinica, 2002, 29(9): 827-834.)
- [13] 向道权, 黄烈健, 曹永国, 等. 玉米产量性状主基因-多基因遗传效应的初步研究[J]. 华北农学报, 2001, 16(3): 1-3. (Xiang D Q, Huang L J, Cao Y G, et al. A preliminary study on genetic effect of maize yield component traits based on major gene and polygene mixed inheritance[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2001, 16(3): 1-3.)
- [14] 戚存扣, 盖钧镒, 章元明. 甘蓝型油菜芥酸含量的主基因+多基因遗传[J]. 遗传学报, 2001, 28(2): 182-187. (Qi C K, Gai J Y, Zhang Y M. Major gene plus poly-gene inheritance of erucic acid content in *Brassica napus* L. [J]. Acta Genetica Sinica, 2001, 28(2): 182-187.)
- [15] Shaikh M Rahman, Takagi Y, Kumamaru T. Low linolenate sources at the Fan locus in soybean lines M25 and IL28 [J]. Breed-Science, 1996, 46: 155-158.
- [16] Rahman S M, Kinoshita T, Anai T, et al. Genetic relationships between loci for palmitate contents in soybean mutants [J]. Journal Heredity, 1999, 90: 423-428.
- [17] 年海, 王金陵, 杨庆凯. 大豆脂肪酸与主要农艺性状和品质性状的相关分析[J]. 大豆科学, 1996, 15(3): 213-221. (Nian H, Wang J L, Yang Q K, et al. Correlation analysis between fatty acids and main chemical and agronomic traits [J]. Soybean Science, 1996, 15(3): 213-221.)
- [18] 胡超越, 王振民. 大豆油脂脂肪酸含量与主要农艺性状的遗传相关及通径分析[J]. 大豆科学, 2006, 25(1): 18-22. (Hu C Y, Wang Z M. Genetic correlation and path-coefficient of important oil fatty acid content with the major agronomic characters in soybean [J]. Soybean Science, 2006, 25(1): 18-22.)
- [19] Rahman S M, Takagi Y, Kinoshita T. Genetic control of high stearic acid content in seed oil of two soybean mutants [J]. Theory and Applied Genetics, 1997, 95: 772-776.
- [20] Rahman S M, Takagi Y, Kinoshita T. Genetic control of oleic acid content in the seed oil of two soybean mutants [J]. Crop Science, 1996, 36: 1125-1128.
- [21] 陈银基, 鞠兴荣, 周光宏. 饱和脂肪酸分类与生理功能[J]. 中国油脂, 2008, 33(3): 35-39. (Chen Y J, Ju X R, Zhou G H. Classification and physiological function of saturated fatty acids [J]. China Oils and Fats, 2008, 33(3): 35-39.)
- [22] 田秀红. 食用油脂的营养及安全性分析[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 613-617. (Tian X H. Nourishment and safety analysis of edible grease [J]. Food Science, 2007, 28(9): 613-617.)
- (上接第 402 页)
- [5] 王萍, 王军军, 商德虎. 影响大豆子叶节丛生芽形成的诱导因子研究[J]. 吉林农业科学, 2001(3): 45-49. (Wang P, Wang J J, Shang D H. Effect of induce factors on multiple bud formation of cotyledonary node in soybean [J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2001(3): 45-49.)
- [6] 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.)
- [7] 李明春, 蔡易, 赵桂兰, 等. 改良大豆子叶再生系统的研究[J]. 作物学报, 2006, 32(2): 223-227. (Li M C, Cai Y, Zhao G L, et al. Improvement of cotyledon node regeneration system in soybean (*Glycine max* L) [J]. Acta Agronomic Sinica, 2006, 32(2): 223-227.)
- [8] Paz M M, Martinez J C, Kalvig A B, et al. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient Agrobacterium-mediated soybean transformation [J]. Plant Cell Reports, 2006, 25: 206-213.
- [9] 陈新, 朱成松, 顾和平, 等. 抗草甘膦大豆的遗传研究[J]. 江苏农业科学, 2002(6): 21-23. (Chen X, Zhu C S, Gu H P, et al. Genetic study on the soybean with resistibility to Roundup [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2002(6): 21-23.)