

2,4- D 对大豆体细胞胚胎发生及增殖的影响

王晓春¹,王 罡²,季 静²,王 萍³

(1. 河北北方学院 农林科技学院 农业科学系,河北 宣化 075131;2. 天津大学 农业与生物工程学院,天津 300072;3. 淮海工学院 海洋学院,江苏 连云港 222005)

摘 要:研究不同浓度的 2,4- D 对不同基因型大豆体细胞胚胎发生及增殖的影响。结果表明:不同基因型大豆体细胞胚胎发生率存在显著差异,在供试的 6 种基因型中,以 CH21141 和黑农 40 体细胞胚胎发生率最高,黑农 35 诱导率最低;大豆体细胞胚胎发生及继代增殖的最佳 2,4- D 浓度为 10 ~ 20 mg · L⁻¹,继代扩繁系数为 3ⁿ(n 为继代培养次数)。
关键词:大豆;基因型;体细胞胚;继代增殖
中图分类号:S565. 1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2009)06-1112-03

Somatic Embryogenesis and Proliferation of Soybean Embryogenic Tissue Treated with 2,4- D

WANG Xiao- chun¹,WANG Gang²,JI Jing²,WANG Ping³

(1. Department of Agriculture Sciences of Hebei North University,Xuanhua 075131,Hebei;2. Tianjin University of Agricultural and Biological Engineering,Tianjin 300072;3. Huaihai Institute of Technology,Marine School,Lianyungang 222005,Jiangsu,China)

Abstract:Taking immature cotyledon of six soybean varieties as explants,the effect of 2,4- D on the frequencies of somatic embryogenesis and the proliferation of embryogenic tissue were investigated. Results showed that the frequencies of somatic embryogenesis varied with soybean genotypes,CH21141 and Heinong 40 had highest frequencies ,while Heinong 35 had the lowest frequency among six genotypes. The optimum media for somatic embryogenesis and the proliferation of embryogenic tissue was MS with 10-20 mg · L⁻¹2,4- D,and the proliferation speed of progeny was 3ⁿ.
Key words:2,4- D concentrations;Soybean;Somatic embryos;Proliferation

大豆是世界性的主要农作物之一,传统育种存在着一定的局限性,随着生物技术的发展,大豆的基因工程育种也取得了一定的进展,日益受到世界各国的普遍重视,大豆是世界上公认的难以转化的作物,目前没有高效、稳定的组织培养系统和遗传转化系统^[1]。大豆体细胞胚具有繁殖快、单细胞起源、两极性等优点,是基因枪和农杆菌转化的最理想的受体^[2]。诱导大豆体细胞胚胎发生的外植体有子叶节、胚、胚轴、真叶、未成熟子叶等^[3-10],其中未成熟子叶是诱导体细胞胚胎发生较好的外植体,但是用于遗传转化,还存在未成熟子叶取材时间受季节的限制、体细胞胚胎发生率低以及诱导出来的体细胞胚不能在固体培养基中继代增殖和保存等问题,因此不能满足遗传转化对组织培养体系的要求,在

此基础上进行了研究,确定了大豆体细胞胚胎发生及继代增殖的最佳 2,4- D 浓度。大豆体细胞胚能够长期继代增殖和保存,不仅避免了取材时间的限制,对于大豆种质的保存、人工种子的制备^[11]和转基因育种^[12]等具有重要意义;也为建立一个高效、稳定的大豆组织培养系统和遗传转化系统提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为大豆品种合丰 25、东农 L13、东农 40、黑农 40、黑农 35、CH21141。

1.2 试验方法

1.2.1 大豆体细胞胚胎发生的诱导 在大豆开花

收稿日期:2009-04-29
基金项目:国家植物转基因技术研究开发与中试基地建设专项课题资助项目(J99-B-001)。
第一作者简介:王晓春(1971-),女,副教授,硕士,现从事作物栽培与遗传育种工作与研究。E-mail:wangxiaochun305@sina.com。

20 d 左右,选取 3 ~ 5 mm 的子叶,用 75% 酒精消毒 3 ~ 5 min,然后用 0.1% 氯化汞溶液消毒 8 ~ 10 min,再用无菌水冲洗 3 ~ 5 次,剥开种皮,去掉胚轴,将子叶的近轴面朝上,分别接种到培养基 MS + 3% 蔗糖 + 0.8% 琼脂 + 2,4- D (0,5,10,20,40,60 mg · L⁻¹) 上,每个处理重复 4 次,每个处理共接种 200 个未成熟子叶,于 25℃ 黑暗条件下培养,20 d 以后开始调查,计算胚胎发生率(有胚胎发生的子叶数/接种子叶数 × 100%)。2 个月后调查比较不同 2,4- D 浓度对大豆体细胞胚胚胎发生的影响。

1.2.2 大豆体细胞胚的继代增殖 诱导 30 ~ 60 d 的大豆品种合丰 25、东农 L13、CH21141 的体细胞胚团块,分割成直径 3 mm 左右,分别接种到培养基 MS + 3% 蔗糖 + 0.8% 琼脂 + 2,4- D (0,5,10,20,40,60 mg · L⁻¹) 上,重复 4 次,于 25℃ 自然光条件下培养,15 d 以后开始调查,比较不同 2,4- D 浓度对大豆体细胞胚继代增殖的影响。

2 结果与分析

2.1 2,4- D 对大豆体细胞胚胎发生的影响

大豆未成熟子叶接种 1 个月左右开始在子叶上出现突起,以后突起逐渐长大形成体细胞胚,大豆未成熟子叶接种 60 d 的结果见表 1,方差分析结果见表 2。结果表明,不同 2,4- D 浓度,不同基因型大豆体细胞胚胎发生率存在显著差异($F_{\text{浓度}} = 8042 > F_{0.05} = 2.62$; $F_{\text{基因型}} = 56.02 > F_{0.05} = 2.62$)。在不加 2,4- D 时,几个基因型大豆都没有体细胞胚胎发生;在 2,4- D 浓度为 5 mg · L⁻¹ 时,各种基因型胚胎发生率低;在 2,4- D 浓度为 10 ~ 20 mg · L⁻¹ 时,各种基因型胚胎发生率均提高到最大值;而当 2,4- D 浓度增加到 40 ~ 60 mg · L⁻¹ 时,各种基因型胚胎发生率开始降低,说明 2,4- D 浓度为 10 ~ 20 mg · L⁻¹ 是诱导大豆体细胞胚胎发生的最佳浓度。从表 1 还可以看出,几种基因型在 2,4- D 浓度为 10 ~ 20 mg · L⁻¹ 时,以基因型 CH21141 和 黑农 40 体细胞胚胎发生率最高,黑农 35 则诱导率最低,这一结果说明大豆体细胞胚胎发生与否以及发生率的高低对基因型有很大的依赖性。

2.2 2,4- D 对大豆体细胞胚继代增殖的影响

大豆体细胞胚接种在含有不同浓度 2,4- D 的 MS 培养基继代 15 d 的结果见表 3。在不加 2,4- D

的情况下,几种基因型的体细胞胚都能够萌发,并且都出现愈伤。基因型合丰 25、东农 40 和东农 L13 在 2,4- D 浓度 5 mg · L⁻¹ 时,体细胞胚团均有 10% ~ 15% 左右萌发,而 CH21141 和 Progress 出现大量愈伤,但不萌发;10 ~ 20 mg · L⁻¹ 2,4- D 的情况下几种基因型的体细胞胚团块增殖 2.0 ~ 3.5 mm 左右,且体细胞胚状态好,颜色鲜绿;在加 20 ~ 60 mg · L⁻¹ 2,4- D 的情况下,随着 2,4- D 浓度的增大,体细胞胚团块增殖体积与 10 ~ 20 mg · L⁻¹ 2,4- D 相比,分别减少且体细胞胚逐渐变褐色,已经失去继代增殖和保存价值。因此,10 ~ 20 mg · L⁻¹ 2,4- D 的浓度为体细胞胚团块能够增殖的最佳浓度。

表 1 不同 2,4- D 浓度对大豆体细胞胚胎发生率的影响
Table 1 Effect of 2,4- D on the frequencies of somatic embryo in soybean

基因型 Genotype	2,4- D 浓度		2,4- D concentration/mg · L ⁻¹			
	0	5	10	20	40	60
合丰 25 Hefeng 25	0	20.38	40.34	41.50	32.10	21.0
东农 L13 Dongnong L13	0	15.68	41.90	42.10	32.46	18.1
东农 40 Dongnong 40	0	23.14	40.10	41.62	37.24	12.0
黑农 40 Heinong 40	0	22.14	58.12	56.43	52.40	21.2
黑农 35 Heinong 35	0	18.96	26.12	28.42	21.20	9.8
CH21141	0	30.20	60.12	58.32	42.9	21.3

表 2 不同 2,4- D 浓度对大豆体细胞胚胎发生率影响的方差分析
Table 2 Analysis about frequencies of somatic embryo treated with different concentrations of 2,4- D

差异源 Source	SS	df	MS	F	F _{0.05}
2,4- D 浓度间 2,4- D concentrations	1404.87	5	280.97	8.420	2.602
品种间 Genotype	9346.98	5	1869.39	56.022	2.602
误差 Error	834.32	25	33.37		
总计 Tatol	11586.17	35			

大豆体细胞胚接种 60 d 的结果与接种 15 d 的结果比较,10 ~ 20 mg · L⁻¹ 2,4- D 即体细胞胚团块能够增殖的最佳浓度对几种基因型的体细胞胚体积增殖不大,仅仅增加 1 mm 左右。而将体细胞胚团每隔 15 ~ 20 d 分割成 3 mm 左右的小块进行继代培养,可以继续增殖,而且形成的体细胞胚团仍保持新鲜绿色的良好状态,继代增殖能力强,扩繁系数为 3ⁿ (n 为继代培养次数)。因此它是基因转化的良好受体。

表3 不同 2,4- D 浓度对大豆体细胞胚性组织增殖的影响(直径及状态)
Table 3 Proliferation of embryogenic tissue induced by different concentration of 2,4- D

基因型 Genotype	2,4- D Concentrations/mg · L ⁻¹					
	0	5	10	20	40	60
合丰 25	7.0	5.4	5.5	5.1	4.4	4.0
Hefeng 25	有愈伤白或绿已萌发	有愈伤,白或绿萌发率 10%	颜色鲜绿	颜色黄绿	颜色黄	黄褐色
东农 L13	11.3	6.7	6.2	5.3	4.1	3.7
Dongnong L13	大量愈伤少数萌发	无愈伤绿色 萌发率 15%	鲜绿	黄绿	黄绿色	黄褐色
东农 40	7.5	6.4	6.0	5.4	4.0	3.2
Dongnong 40	大量愈伤 少数萌发	无愈伤,绿色 萌发率 15%	鲜绿	嫩绿	颜色黄	黄褐色
CH21141	7.6	6.0	5.1	4.3	3.9	3.1
	大量愈伤 大量萌发	愈伤占 85% ,鲜绿,不萌发	鲜绿	淡绿	黄绿	黄褐色
Progress	8.0	7.0	6.7	6.3	4.5	3.5
	大量愈伤大量萌发	愈伤 85% ,鲜绿,不萌发	鲜绿	鲜绿	黄绿	褐化严重

3 讨论

大豆体细胞胚胎发生与否以及发生率的高低对大豆基因型有很大的依赖性,因此,在大豆的组织培养中,应该注意基因型间的差异。通过改变培养条件,寻找适合多种基因型大豆组织培养的培养基,可能是解决这一问题的良好途径。

用高浓度 2,4- D 诱导大豆体细胞胚胎发生,这可能是大豆体细胞胚胎发生难易与内源激素水平有关^[12]。因此,在培养基中加入适量的外源激素(如高浓度的 2,4- D)对内源激素进行调节,从而有利于大豆体细胞胚胎的发生,提高体细胞胚胎发生率。

结果表明,大豆体细胞胚可以在固体培养基中长期继代增殖和保存,并可以正常萌发、再生植株,而 Finer 等^[13]用大豆品种 Fayette 诱导体细胞胚胎发生后,用悬浮培养使胚性组织增殖,这一操作过程复杂,影响了该技术的应用,而在固体培养基中继代增殖和保存操作简单,非常容易,这一问题的解决为大豆的遗传转化提供了良好的受体材料,可以不受季节限制,大大缩短了育种进程,这对于转基因技术在大豆育种中的应用提供了良好的试验体系。但是大豆体细胞胚多次继代增殖以后,细胞是否会发生变异以及萌发率和再生率是否会下降等问题有待于进一步的研究。

参考文献

[1] 周思军. 大豆遗传转化的主要障碍及研究进展[J]. 黑龙江农业科学,2001(3):24-27. (Zhou S J. The major obstacles and research progress on soybean transformation[J]. Heilongjiang Agricultural Science,2001(3):24-27.)

[2] Sato S,C Newell ,K Kolacz ,et al. Stable transform ation via particle bombsrdment in two different soybean regeneration systems [J]. Plant Cell Report,1993,12:408-413.

[3] 周思军,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. The affect factors on the frequencies of somatic embryogenesis [J]. Chinese Bulletin of Botany,1992,9(2):38-43.)

[4] 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(3):249-251. (Xiao W Y,Wang L Z. Plant high frequency regeneration from protoplast of soybean [J]. Soybean Science,1993,12(3):249-251.)

[5] 薛仁镐. 大豆未成熟子叶诱导胚状体发生再生植株[J]. 延边农学院学报,1995,17(3):30-34. (Xue R G. Plant regeneration in embryo vitro from primary leaf nodes of soybean[J]. Journal of Yanbian AgriculturalUniversity,1995,17(3):30-34.)

[6] 曲桂芹,张贤泽,霍俊伟. 大豆体细胞胚诱导因素的研究[J]. 植物研究,2001,21(2):25-27. (Qu G Q,Zhang X Z,Huo J W. Studies on somatic embryos induction in soybean[J]. Bulletin of Botanical Research,2001,21(2):25-27.)

[7] 王萍. 大豆未成熟子叶体细胞胚胎发生及其相关因子的分析 [J]. 中国油料作物学报,2002,24(1):29-32. (Wang P. Somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean and analysis of correlative factors[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences,2002,24(1):29-32.)

[8] 刘博林. 两个栽培大豆品种的体细胞胚胎发生和植株再生研究[J]. 中国油料作物学报,1999,21(2):68-70. (Liu B L. Study on somatic embryogenesis and plant regeneration of two commercial soybean cultivars[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences,1999,21(2):68-70.)

[9] 王罡,王萍. 生长素诱导大豆未成熟子叶胚胎发生效应的研究 [J]. 吉林农业科学,2002,27(2):7-10. (Wang G,Wang P. The effect of embryogenesis of immature cotyledon induced by auxins in soybean[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences,2002,27(2):7-10.)

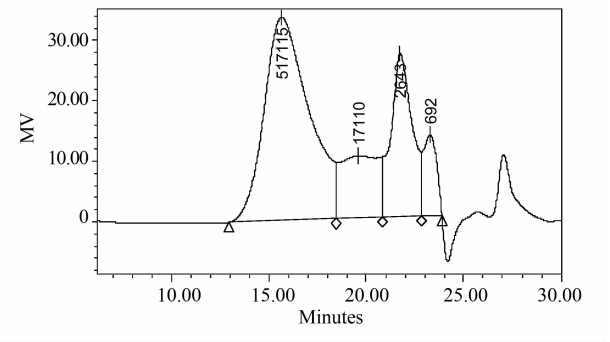


图5 水溶性大豆多糖分子量分布图

Fig.5 Molecular weight of SSPS

5000~1 000 000 之间,其3 种主要组分的分子量分别是 550 000、25 000、5 000^[6]。从图 5 可以看出,该工艺得到的水溶性大豆多糖的分子量峰值在 517 155 左右,经软件统计主峰所对应重均分子量为 5.6×10^5 , 占总质量的 60%,符合水溶性多糖的分子量范围。

3 结论

用有机酸提取水溶性大豆多糖的最佳条件为:酒石酸水溶液作为提取介质,提取温度 110℃,提取时间 1.5 h,pH3.8。在该条件下提取水溶性大豆多糖,有效地将部分不溶性多糖转化为可溶性多糖,较大幅度提高了 SSPS 得率,并且明显降低蛋白质的溶出率,可以省掉多糖脱蛋白的过程,简化了水溶性大豆多糖加工的流程,分子量分布符合国家标准。

参考文献

[1] Bron P A,Marco M,Hoffer S M. Genetic characterization of the bile salt response in lactobacillus planetarium and analysis of responsive promoters in vitro and in situ in the gastrointestinal tract [J]. Journal of Bacteriology,2004,186:7829-7835.

[10] 刘艳芝,赵桂兰. 大豆幼胚子叶诱导胚胎发生[J]. 吉林农业科学,1999,24(6):16-18. (Liu Y Z,Zhao G L. Plant regeneration in embryo vitro from primary leaf nodes of soybean[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences,1999,24(6):16-18.)

[11] 白淑霞,刘立秋,陈文龙. 植物人工种子高质量体细胞胚胎发生的研究[J]. 河北农业大学学报,1998,21(1):50-52. (Bai S X,Liu L Q,Chen W L. Review on high quality somatic embryogenesis in artificial seed of plant[J]. Journal of Hebei Agricultural

[2] Champ M,Guillon F. Structural and physical properties of dietary fibers, and consequences of processing on human physiology [J]. Food Research International,2000,33:233-245.

[3] Schneeman B O. Dietary fiber and gastrointestinal function [J]. Nutritional Research,1998,18:625-632.

[4] Furuta H,Takahashi T,Tobe J, et al. Extraction of water- soluble soybean polysaccharides under acidic conditions [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry ,1998,62(12):2300-2305.

[5] Nakamura A,Takahashi T,Yoshida R, et al. Emulsifying properties of soybean soluble polysaccharide [J]. Food Hydrocolloids,2004,18:795-803.

[6] 谭永辉,王文生,秦玉,等. 豆渣中水溶性大豆多糖的提取与应用[J]. 大豆科学,2008,27(1):150-152. (Tan Y F,Wang W S, Qing Y, et al. Extraction and application of soluble soybean polysaccharides from bean curd waste [J]. Soybean Science,2008,27(1):150-152.)

[7] 王晓滨,段洪东,秦大伟. 螯合剂合成新方法及其在化学化工中的应用 [J]. 山东轻工业学院学报,2007,21(3):57-58. (Wang X B,Duan H D,Qing D W. New synthetical methods of chelating agent and application in chemistry and chemistry industry [J]. Journal of Shandong Institute of Light Industry,2007,21(3):57-58.)

[8] 郑亚军,陈华,李艳,等. 椰子分离蛋白质提取工艺的研究 [J]. 食品工业科技,2009,30(1):226-227. (Zheng Y J,Chen H,Li Y, et al. Study on extraction technology of coconut protein isolated [J]. Science and Technology of Food Industry,2009,30(1):226-227.)

[9] 宋永胜,段洪东. 螯合剂及其在食品中的应用 [J]. 广州食品工业科技,2004,20(2):147-148. (Song Y S,Duan H D. Chelating agent and application in food [J]. Guangzhou Food Science and Technology,2004,20(2):147-148.)

[10] 田其英,华欲飞. 大豆蛋白溶解性研究 [J]. 粮食与油脂,2006(6):6-7. (Tian Q Y,Hua Y F. Study on the solubility of soybean Protein [J]. Cereals and Oils,2006(6):6-7.)

[11] 杨大伟,钟菊英. 黄花草粗卵磷脂提取工艺研究 [J]. 食品工业科技,2008,20(1):205-206. (Yang D W,Zhong J Y. Study on extraction technology of crude lecithin from daylily [J]. Science and Technology of Food Industry,2008,20(1):205-206.)

[12] 郭子彪,盖钧镒. 内源激素 IAA、ABA 对大豆萌发子叶胚性愈伤组织诱导及其分化的调控 [J]. 大豆科学,1997,16(3):194-198. (Guo Z B,Gai J Y. Embryogenic callus inducing and differentiating ergulated by eudogenous IAA and ABA [J]. Soybean Science,1997,16(3):194-198.)

[13] Finer J J,Nagasawa A. Development of an embryogenic susbension culture of soybean [Glycine max (L.) Merrill] [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,1988,1(5):125-136.