

适于子叶节和胚尖再生体系的大豆基因型筛选

郑丽红^{1,2}, 季 静², 王 罡², 关春峰², 王 萍³, 王婉婉^{1,2}

(1. 天津大学 化工学院, 天津 300072; 2. 天津大学 遗传工程研究所, 天津 300072; 3. 淮海工学院 海洋学院, 江苏 连云港 222005)

摘 要:以吉育 91 等 6 个基因型大豆的子叶节和胚尖为外植体, 研究了大豆不同基因型在子叶节、胚尖 2 个再生体系中的不定芽诱导率、不定芽伸长率和不定芽数。结果表明: 基因型对大豆不同再生体系的再生有显著影响, 合丰 35 和合丰 25 在子叶节体系中的不定芽诱导率和伸长率均高于胚尖体系, 而黑农 37 的不定芽诱导率和伸长率在胚尖体系高于子叶节体系。不同基因型适合的大豆再生体系不同, 合丰 35、合丰 25 和绥农 14 适合选用子叶节再生体系, 黑农 37 更适合选用胚尖再生体系, 而吉育 91 和北京小粒豆则既可以选子叶节再生体系又可选胚尖再生体系。

关键词:大豆; 基因型; 子叶节; 胚尖; 再生体系

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2012)02-0213-04

Selection of Suitable Soybean Genotype Based on Cotyledon Node and Embryonic Tip Regeneration Systems

ZHENG Li-hong^{1,2}, JI Jing², WANG Gang², GUAN Chun-feng², WANG Ping³, WANG Wan-wan^{1,2}

(1. School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072; 2. Tianjin Research Institute of Genetic Engineering, Tianjin 300072; 3. School of Marine Science and Technology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, Jiangsu, China)

Abstract: Cotyledon nodes and embryonic tips of soybean were used as explants to investigate the induction rate of adventitious shoots, elongation rate of adventitious shoots and the number of adventitious shoots. The results showed that genotype could affect regeneration frequency obviously in the selected regeneration system. For Hefeng35 and Hefeng25, both induction rates and elongation rates in cotyledon node regeneration system were higher than those in embryonic tip regeneration system, while the induction rates and elongation rates of Heinnong37 were opposite. Different regeneration system should be applied when different soybean genotypes were used. Hefeng35, Hefeng25 and Suinnong14 were suitable for cotyledon node regeneration system, Heinnong37 was more suitable for the embryonic tip regeneration system. Furthermore, Jiyu91 and Beijingxiaolidou were suitable for both regeneration systems.

Key words: Soybean; Genotype; Cotyledon node; Embryonic tip; Regeneration system

大豆 (*Glycine max* L.) 是重要的粮食和油料作物, 通过转基因技术改善大豆品质对培育大豆新品种有积极作用, 但大豆转化一直是植物基因工程领域的难点之一^[1]。建立高效的再生体系是高效转化体系的前提。近年来, 研究和应用比较多的大豆再生体系是子叶节再生体系和胚尖再生体系。子叶节再生体系具有取材方便, 操作相对简单, 较易出芽等优点, 但伸长困难; 胚尖再生体系具有生长周期较短, 出芽较快, 伸长容易, 生长较整齐等优点, 但前期获得外植体的工作量较大^[2]。子叶节再生体系和胚尖再生体系的再生率都受基因型的限制, 因此在遗传转化前确定不同基因型所适用的再生体系非常关键^[3-5]。

大豆不同基因型在相同再生体系中的再生率不同。刘北东等^[6]研究了大豆 10 个基因型对子叶节再生的影响, 发现子叶节分化能力存在基因型特异性, 再生能力较强的基因型有合丰 35、合丰 25 和

黑农 40。潘川芝等^[7]发现大豆不同基因型在相同培养条件下再生率不同。王萍等^[8-9]的研究结果表明不同基因型的胚尖不定芽诱导率和平均芽数存在较大差异, 8 个基因型的不定芽诱导率范围为 35.0% ~ 100%, 不定芽的个数变化幅度为 0.60 ~ 1.58。邱承祥等^[10]研究的 6 个大豆基因型的胚尖芽诱导率也存在差异。

大豆同一基因型在不同再生体系中再生率存在很大差异。马晓红等^[2]研究发现合丰 46 大豆胚尖体系优于子叶节体系。李海燕等^[11]研究表明合丰 35 和北京小黑豆选择子叶节作为外植体可以获得更高的再生率。而刘栋等^[12]的研究结果显示中黄 13、黑农 37 和吉林 40 适合选取胚尖为外植体, 而合丰 25 和合丰 35 更适合子叶节法。张艳等^[13]研究结果显示黑农 51 子叶节再生体系的出芽率、芽伸长数和生根率均高于胚尖再生体系。

高效的转化体系有赖于高效的再生体系, 因

收稿日期: 2012-01-13

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项 (2008ZX08004-001, 2009ZX08010-013B)。

第一作者简介: 郑丽红 (1985-), 女, 在读硕士, 研究方向为植物转基因。E-mail: zlh855822@qq.com。

通讯作者: 季静 (1965-), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事植物基因工程研究。E-mail: jijingtjdx@163.com。

此,选择不同基因型适合的再生体系是进行遗传转化的前提。该试验对6个大豆基因型进行子叶节和胚尖再生的研究,比较了在子叶节体系和胚尖体系中大豆不同基因型不定芽诱导率、伸长率和个数的差异,以期选择出每个大豆基因型适合的再生体系。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆基因型为吉育91、黑农37、合丰35、合丰25、绥农14和北京小粒豆。

1.2 方法

1.2.1 子叶节再生体系 挑选种皮完整、无病斑、干燥的大豆种子用氯气灭菌方法灭菌5 h,将灭菌好的大豆种子在超净台中取出,种脐向上侧着接种到发芽培养基上($1/2\text{MSB} + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 2.0\%$ 蔗糖 $+ 0.7\%$ 琼脂, pH 5.8), 25°C 暗培养1 d后16 h/8 h光周期培养4 d。将发芽的大豆去掉种皮,保留全部子叶和3~5 mm下胚轴,切掉下胚轴的其余部分,纵向切开后将子叶分为两瓣且平分下胚轴,切去顶芽和腋芽。将外植体的近轴面朝上接种在诱导培养基中($\text{MSB} + 1.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{MES} + 3.0\%$ 蔗糖 $+ 0.7\%$ 琼脂, pH 5.6), 25°C , 16 h/8 h光周期培养7 d后转入芽伸长培养基中($\text{MSB} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}_3 + 0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IAA} + 3.0\%$ 蔗糖 $+ 0.7\%$ 琼脂, pH 5.6), 每隔14 d继代1次。接种到伸长培养基中14 d后统计不定芽诱导率,28 d后统计不定芽伸长率和不定芽数。每个处理20个外植体,3次重复。当不定芽芽长为3~5 cm时切下转入到生根培养基中($1/2\text{MSB} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IBA} + 3.0\%$ 蔗糖 $+ 0.7\%$ 琼脂, pH 5.6)诱导生根。当长出2~3条主根后炼苗2~3 d,然后移栽到营养土:珍珠岩:蛭石为1:1:1的花盆中。

1.2.2 胚尖再生体系 大豆种子灭菌方法同子叶节再生体系中灭菌方法,将灭菌好的大豆种子在超净台中取出,倒入装有无菌水的培养瓶中, 25°C , 16 h/8 h光周期浸泡萌发24 h。在超净台中去掉种皮,切去子叶和原叶以及胚根部分,将得到的胚尖垂直接种在不定芽诱导培养基中($\text{MSB} + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 3.0\%$ 蔗糖 $+ 0.7\%$ 琼脂, pH 5.8)培养24 h。然后将胚尖转移到胚尖不定芽伸长培养基中($\text{MSB} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IBA} + 3.0\%$ 蔗糖 $+ 0.7\%$ 琼脂, pH 5.8), 每隔14 d继代1次。每个处理20个外植体,3次重复。数据统计方法、生根和移栽步骤同子叶节再生体系。

1.3 数据分析

利用SPSS 20作方差分析、显著性检验和 t 检验。不定芽诱导率(%) = 出芽外植体/接种外植体 $\times 100$; 不定芽伸长率(%) = 芽长大于2 cm外植体数/接种外植体数 $\times 100$ ^[9]。

2 结果与分析

2.1 大豆基因型对子叶节再生体系的影响

由表1可知,不同基因型对子叶节再生体系中不定芽诱导率和伸长率、不定芽数的影响存在显著差异,不定芽诱导率最高的是北京小粒豆(94.7%),合丰25次之(93.3%),黑农37最低(44.1%);不定芽伸长率最高的是北京小粒豆(82.4%),最低的仍然是黑农37(33.4%);平均每个外植体的不定芽个数为1.68~4.27,表现出较大差异。不定芽诱导率高的基因型其不定芽伸长率也较高。从不定芽诱导率、伸长率、不定芽数这3个性状看,合丰35和合丰25是较适合选择作为子叶节再生体系的大豆基因型。

表1 大豆子叶节再生体系不同基因型不定芽诱导率、伸长率和不定芽数的差异显著性

Table 1 Significant difference of adventitious shoots induction rate, elongation rate and adventitious shoots number in cotyledon node regeneration system

基因型 Genotype	不定芽诱导率 Adventitious shoots induction rate/%	不定芽伸长率 Adventitious shoots elongation rate/%	不定芽数 Adventitious shoots number
北京小粒豆 Beijing xiaolidou	94.7a	82.4a	2.48c
合丰 25 Hefeng 25	93.3b	74.7c	3.83b
合丰 35 Hefeng 35	91.3c	81.7a	4.27a
吉育 91 Jiyu 91	88.1d	77.3b	2.57c
绥农 14 Suinong 14	85.6e	72.3d	3.80b
黑农 37 Heinong 37	44.1f	33.4e	1.68d

同列数值后不同小写字母表示在0.05水平差异显著,下同。

Values in the same column followed by different lowercase letters are significantly different at 0.05 probability level, the same below.

2.2 大豆基因型对胚尖再生体系的影响

胚尖体系中不定芽诱导率、伸长率和不定芽数的显著性检验结果见表2。北京小粒豆的不定芽诱导率最高,吉育91最低;不定芽伸长率最高的是北京小粒豆,最低的为合丰35;平均每个外植体的不定芽数差异显著,变化范围为2.27~4.21。北京小

粒豆和黑农37不定芽诱导率、伸长率和不定芽数均比较高;吉育91虽然不定芽诱导率低,但其伸长率较高且不定芽数最多;而合丰35、合丰25和绥农14虽不定芽诱导率较高,但不定芽伸长率较低且不定芽数较少。

表2 大豆胚尖再生体系不同基因型不定芽诱导率、伸长率和不定芽数的差异显著性
Table 2 Significant difference of adventitious shoot induction rate, elongation rate and adventitious shoots number in embryonic tip regeneration system

基因型 Genotype	不定芽诱导率 Adventitious shoots induction rate/%	不定芽伸长率 Adventitious shoots elongation rate/%	不定芽数 Adventitious shoots number
北京小粒豆 Beijing xiaolidou	91.0a	86.3a	3.09b
黑农 37 Heinong 37	87.7b	73.9b	4.06a
合丰 35 Hefeng 35	86.7b	39.7f	2.71bc
绥农 14 Suinong 14	79.3c	55.4d	2.27c
合丰 25 Hefeng 25	73.3d	43.7e	2.41c
吉育 91 Jiyu 91	69.1d	58.7c	4.21a

2.3 大豆不同基因型适合的再生体系的选择

大豆不同基因型在子叶节体系和胚尖体系中不定芽诱导率、不定芽伸长率、不定芽数的t检验结果分别如图1~3所示。对吉育91而言,子叶节体系中的不定芽诱导率和伸长率均高于胚尖再生体系,但不定芽数却远低于胚尖再生体系,因此,吉育91可选择子叶节体系和胚尖体系作为再生体系;黑农37大豆子叶节体系中的不定芽诱导率、伸长率和不定芽数均低于胚尖再生体系,因此,黑农37较适合的再生体系是胚尖再生体系;合丰35、合丰25和绥农14在2个再生体系中,不定芽诱导率子叶节再生体系略高于胚尖再生体系,不定芽伸长率 and 不定芽数高于胚尖体系,因此适合选择子叶节体系作

为再生体系;北京小粒豆的不定芽诱导率和伸长率在2个体系中均较高,不定芽数在2个体系间相似,且t检验结果不显著,因此,北京小粒豆可以选择任一体系作为其再生体系。

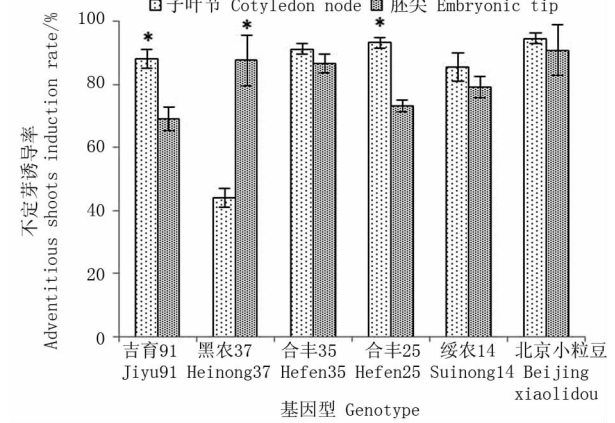


图1 在子叶节体系和胚尖体系中大豆不同基因型的不定芽诱导率
Fig.1 Adventitious shoots induction rate of different genotypes soybean in cotyledon node and embryonic tip system

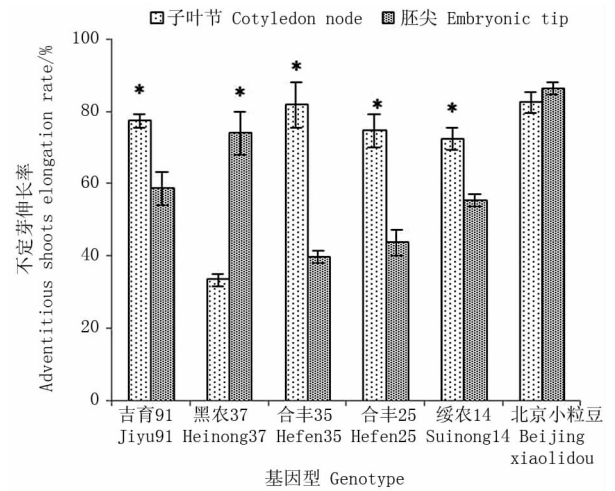


图2 在子叶节体系和胚尖体系中大豆不同基因型的不定芽伸长率
Fig.2 Adventitious shoots elongation rate of different genotypes soybean in cotyledon node and embryonic tip system

3 讨论

尽管在大豆遗传转化方面做了很多研究,但大豆遗传转化仍然是植物基因工程领域的难点之一,大豆在组织培养过程中形成再生植株较困难,且大豆再生体系对大豆基因型有较强的依赖性,因此,植株再生率因基因型和再生体系而异,选择适合的

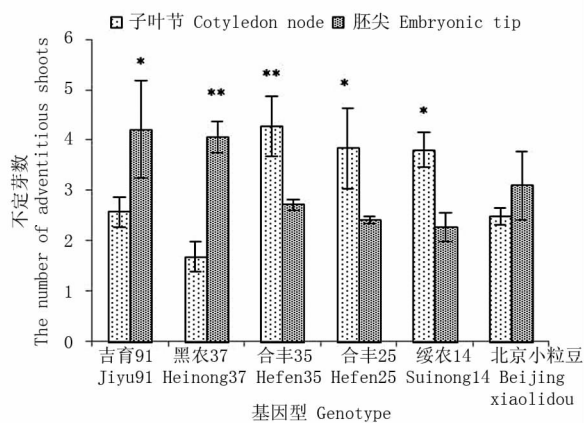


图3 在子叶节体系和胚尖体系中

大豆不同基因型的不定芽数

Fig. 3 Adventitious shoots number of different genotypes soybean in cotyledon node and embryonic tip system

再生体系是遗传转化高转化率的基础。在遗传转化前筛选大豆不同基因型适合的再生体系是必要的。

该试验对遗传转化常用的6个大豆基因型在子叶节和胚尖这2个再生体系中的不定芽诱导率、不定芽伸长率及不定芽数进行了研究,发现黑农37适合选用胚尖再生体系,这与王萍等^[8]的研究结果相同;合丰25、合丰35适合的再生体系为子叶节再生体系,这与刘栋等^[12]、武小霞等^[14]的合丰25、合丰35为子叶节器官发生途径的理想基因型这一结果相吻合;绥农14在子叶节体系中的不定芽诱导率、不定芽伸长率及不定芽数均高于胚尖体系中的水平,绥农14适合的再生体系是子叶节再生体系;北京小粒豆无论在子叶节再生体系还是胚尖再生体系,其不定芽诱导率、不定芽伸长率及不定芽数均较高。吉育91在子叶节体系中不定芽诱导率和伸长率较高但不定芽数较少,其胚尖再生体系则刚好相反。北京小粒豆和吉育91可以选择子叶节体系或者胚尖体系。

参考文献

[1] 练云,梁慧珍,王树峰,等. 农杆菌介导大豆遗传转化研究进展及转基因作物现状[J]. 大豆科学,2009,28(3):531-536. (Lian Y, Liang H Z, Wang S F, et al. Advances on *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of soybean and present status of genetically modified crops[J]. Soybean Science, 2009, 28(3): 531-536.)

[2] 马晓红,姚陆铭,武天龙. 大豆整个子叶节外植体再生体系的建立及与子叶节、胚尖再生体系的比较[J]. 大豆科学,2008,27(3):273-278. (Ma X H, Yao L M, Wu T L. High frequency plant regeneration from whole cotyledonary node explants and comparison with cotyledonary node and embryonic tip regeneration sys-

tem in soybean[J]. Soybean Science, 2008, 27(3): 273-278.)

[3] Meurer C A, Dinkins R D, Collins G B. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation[J]. Plant Cell Reports, 1998, 18: 180-186.

[4] Donaldson P A, Simmonds D H. Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean[J]. Plant Cell Reports, 2000, 19: 478-484.

[5] 闫帆,孙昕,翟莹,等. 大豆胚尖再生体系的研究[J]. 大豆科学,2011,30(5):757-763. (Yan F, Sun X, Zhai Y, et al. Optimization on the regeneration system of soybean embryonic tips[J]. Soybean Science, 2011, 30(5): 757-763.)

[6] 刘北东,朱延明,李海燕,等. 大豆子叶节再生影响因素的研究[J]. 大豆科学,2002,21(2):88-92. (Liu B D, Zhu Y M, Li H Y, et al. Study on factors affecting the soybean cotyledonary node regeneration[J]. Soybean Science, 2002, 21(2): 88-92.)

[7] 潘川芝,李凤,戴良英. 大豆子叶节离体再生体系优化研究[J]. 湖南农业科学,2006(5):31-36. (Pan C Z, Li F, Dai L Y. Regeneration system of soybean cotyledonary nodes[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2006(5): 31-36.)

[8] 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.)

[9] 王萍,张艳君,管娟娟,等. 大豆胚尖不定芽诱导影响因子的研究[J]. 作物杂志,2011(1):17-20. (Wang P, Zhang Y J, Guan J J, et al. Induction of adventitious buds from embryonic tip in soybean[J]. Crops, 2011(1): 17-20.)

[10] 邱承祥,武天龙. 6-BA对大豆茎尖诱导再生植株的研究[J]. 大豆科学,2003,22(1):32-36. (Qiu C X, Wu T L. Study on 6-BA to the regeneration of tip shoot of soybean[J]. Soybean Science, 2003, 22(1): 32-36.)

[11] 李海燕,武小霞,刘森,等. 大豆子叶节、胚尖再生植株的研究[J]. 大豆科学,2007,26(5):709-712. (Li H Y, Wu X X, Liu M, et al. Plant regeneration from cotyledonary nodes and embryonic tips of soybean[J]. Soybean Science, 2007, 26(5): 709-712.)

[12] 刘栋,石强,李鹏丽,等. 利用GUS基因瞬时表达对大豆子叶节和胚尖转化方法的比较及优化[J]. 生物学通报,2008,43(12):35-39. (Liu D, Shi Q, Li P L, et al. Comparison and optimization of Soybean cotyledonary node and the embryonic tips transformation method using the transient expression of GUS gene[J]. Bulletin of Biology, 2008, 43(12): 35-39.)

[13] 张艳,满为群,南相日,等. “黑农51”子叶节和胚尖再生体系的建立及优化[J]. 中国农学通报,2011,27(9):148-151. (Zhang Y, Man W Q, Nan X R, et al. Establishment and improvement on regeneration systems of HeiNong51 cotyledonary nodes and embryonic tips[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(9): 148-151.)

[14] 武小霞,李静,姜成涛,等. 大豆子叶节再生中植物生长调节剂浓度及基因型筛选[J]. 中国油料作物学报,2011,33(2):123-129. (Wu X X, Li J, Jiang C T, et al. Optimization of regeneration system from soybean cotyledonary node[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2011, 33(2): 123-129.)