

## 适于体细胞胚发生的大豆基因型筛选

王鹏飞<sup>1,2</sup>, 刘丽君<sup>2</sup>, 唐晓飞<sup>2</sup>, 魏 峡<sup>2</sup>, 吴广锡<sup>2</sup>, 王兴宇<sup>1,2</sup>

(1. 东北农业大学 生命科学学院, 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:**以41个北方春大豆品种为材料,研究了不同基因型大豆体细胞胚的诱导率。结果表明:不同基因型大豆的体细胞胚发生率有显著差异,在供试品种中,垦丰23的体细胞胚胎发生率(99.7%)最高,合丰55等9个基因型体细胞胚诱导率为70%~90%;登科4等5个基因型无体细胞胚发生。垦丰23体细胞胚呈葡萄状、颜色鲜绿、每个未成熟子叶上体细胞胚的数量较多、无畸形胚、且每个体细胞胚是独立存在的,其他诱导率较高的基因型每个未成熟子叶分化体细胞胚的数目较少,且部分基因型含有畸形胚。

**关键词:**大豆;基因型;体细胞胚;筛选

**中图分类号:**S565.1

**文献标识码:**A

**文章编号:**1000-9841(2013)01-0043-03

## Screening of Soybean Genotypes Suitable for Somatic Embryogenesis

WANG Peng-fei<sup>1,2</sup>, LIU Li-jun<sup>2</sup>, TANG Xiao-fei<sup>2</sup>, WEI Lai<sup>2</sup>, WU Guang-xi<sup>2</sup>, WANG Xing-yu<sup>1,2</sup>

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

**Abstract:** Genotype is one of the important factors influencing soybean somatic embryo induction and plant regeneration. Forty one spring soybean cultivars were researched to screen the ideal genotype for somatic embryo induction. The frequencies of soybean somatic embryo was different among tested materials, Kenfeng 23 (99.7%) was the highest; nine genotypes, including Hefeng 55, ranged from seventy to ninety percent; five genotypes, including Dengke 4, had no somatic embryos. The somatic embryos of Kenfeng 23 were grape-like and in bright green color. Kenfeng 23, with great number of somatic embryo on each immature cotyledon, did not produce deformity embryos, furthermore, each somatic embryo existed independently. For the other high inductivity cultivars, the somatic embryos number of each immature cotyledon was less than Kenfeng 23, and some cultivars had deformity embryos.

**Key words:** Soybean; Genotype; Somatic embryos; Screening

大豆是重要的经济作物之一,其生长过程中极易受到病虫、逆境的影响,致使产量、品质下降。常规育种在短时间内很难解决这些问题,因此利用基因工程进行品种改良和种质创新是大豆育种的重要手段之一。然而,大豆是目前公认的比较难以转化的作物,现在还没有高效、稳定的组织培养系统和遗传转化系统<sup>[1]</sup>,已有研究人员用无菌苗的子叶节<sup>[2]</sup>、无菌苗茎尖<sup>[3]</sup>、未成熟胚子叶<sup>[4]</sup>、上胚轴和初生叶<sup>[5]</sup>、出生叶节<sup>[6]</sup>获得再生植株。虽然器官再生取材不受季节限制、诱导再生快,但是存在再生频率比较低并且容易出现嵌合体等问题。

1988年,Finer等<sup>[7]</sup>报道了一个体细胞胚胎发生的悬浮培养系统,这个系统的出现解决了以上的问题,是基因枪和农杆菌转化理想的靶组织。生长素的种类和浓度、光暗周期、培养基和基因型、未成熟子叶大小对大豆体细胞胚胎的发生都有着很大的影响。周思军等<sup>[8]</sup>研究表明2,4-D的诱导效果

优于NAA;吴超等<sup>[9]</sup>利用2,4-D(40 mg·L<sup>-1</sup>)进行诱导,诱导率高达80.5%。随着对大豆未成熟子叶体细胞胚诱导的深入研究,培养体系逐渐得到了完善,曲桂芹等<sup>[10]</sup>和王晓春等<sup>[11-12]</sup>研究表明基因型是影响体细胞胚诱导的主要因素。因此选择胚胎发生率高的基因型品种是建立大豆悬浮体系培养的关键环节。

本研究以41个北方春大豆为材料,筛选体细胞胚胎诱导率较高的品种,为大豆悬浮体系的建立提供依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试材料

共41个供试大豆品种,包括丰源3、抗线10、抗线9、抗线3、东农54、东农58、铁豆61、合丰55、合丰52、蒙豆3、吉育406、铁豆31、绥农33、绥农34、绥农26、登科4、登科5、登科15、吉育202、吉农17、

收稿日期:2012-10-18

基金项目:国家转基因重大专项(2011ZX08004-002);国家科技支撑计划(2011BAD35B06-1-4);大豆产业技术体系(CARS004-PS05)。

第一作者简介:王鹏飞(1988-),女,在读硕士,研究方向为分子遗传学。E-mail:wangpengfei\_885@126.com。

通讯作者:刘丽君(1958-),女,研究员,从事大豆遗传育种的研究。E-mail:nkyssbd@126.com。

长农 20、长农 24、嫩丰 19、嫩丰 16、垦丰 23、垦丰 17、垦丰 16、黑农 53、黑农 54、黑农 56、黑农 62、黑农 59、黑农 43、黑农 64、黑农 63、黑农 67、黑河 38、垦豆 26、黑农 55、黑农 68 和黑农 52。以 Jack 为对照,由加拿大农业部实验室周思军老师提供。

1.2 试验方法

取开花后 2~3 周的幼嫩豆荚,每 3~4 d 取样 1 次,每个植株最多取 3 次。取样后用自来水冲洗豆荚 10~30 min,75% 酒精对豆荚表面消毒 2 min,取出种子,用 10% 的次氯酸钠对种子消毒 15 min,无菌水冲洗 3 次,每次 15 min。解剖针剥去种皮,挤出子叶。选取 4~5 mm 的淡绿色子叶近轴面向上接种于诱导培养基(MS+0.3% 蔗糖+0.58% 琼脂+2,4-D 40 mg·L<sup>-1</sup>+pH 7.0),每个品种接种 300 个未成熟子叶。在 26℃,16 h 光照/8 h 黑暗条件下

培养。30 d 后调查体细胞胚诱导率(有胚胎发生的外植体数/接种外植体数总数×100%)。

2 结果与分析

2.1 不同基因型品种的胚胎发生率

大豆未成熟子叶接种后 14 d 左右在子叶上开始形成小的突起,以后逐渐形成大的体细胞胚。大豆未成熟子叶接种 30 d 后的结果见表 1,不同大豆基因型的体细胞胚诱导率存在差异。垦丰 23 的诱导率高达 99.7%,合丰 55 和吉农 17 的诱导率在 80% 以上。体细胞诱导率为 60%~70% 的基因型有 12 个,大部分基因型的诱导率都较低,登科 4、垦丰 16、抗线 3、黑农 43 和黑河 38 没有体细胞胚胎发生。因此,大豆体细胞胚胎发生对基因型有很大的依赖性。

表 1 不同基因型大豆体细胞胚胎的诱导率

Table 1 The induction rate of somatic embryos in the different soybean genotypes

基因型 Genotype	胚诱导率 IRSE/%	基因型 Genotype	胚诱导率 IRSE/%	基因型 Genotype	胚诱导率 IRSE/%
垦丰 23 Kenfeng 23	99.7	黑农 62 Heinong 62	64.7	黑农 56 Heinong 56	30.3
合丰 55 Hefeng 55	88.7	登科 15 Dengke 15	61.3	嫩丰 16 Nenfeng 16	25.7
吉农 17 Jinong 17	81.3	铁豆 31 Tiedou 31	58.7	丰源 3 Fengyuan 3	23.7
登科 5 Dengke 5	77.3	黑农 68 Heinong 68	57.7	垦丰 17 Kenfeng 17	20.7
绥农 26 Suinong 26	76.3	黑农 55 Heinong 55	54.3	垦豆 26 Kendou 26	15.7
铁豆 61 Tiedou 61	76.3	长农 24 Chengnong 24	49.7	黑农 54 Heinong 54	13.7
黑农 53 Heinong 53	73.7	合丰 52 Hefeng 52	47.7	蒙豆 3 Mengdou 3	3.3
吉育 406 Jiyu 406	73.3	黑农 67 Heinong 67	46.7	长农 20 Changnong 20	2.3
嫩丰 19 Nenfeng 19	71.7	吉育 202 Jiyu 202	43.3	东农 54 Dongnong 54	1.3
黑农 64 Heinong 64	70.0	黑农 63 Heinong 63	42.3	登科 4 Dengke 4	0
东农 58 Dongnong 58	69.7	抗线 10 Kangxian 10	36.3	垦丰 16 Kenfeng 16	0
绥农 34 Suinong 34	69.0	黑农 59 Heinong 59	33.0	抗线 3 Kangxian 3	0
抗线 9 Kangxian 9	68.3	黑农 52 Heinong 52	33.0	黑农 43 Heinong 43	0
绥农 33 Suinong 33	31.0	黑河 38 Heihe 38	0		

IRSE:Induction rate of somatic embryos.

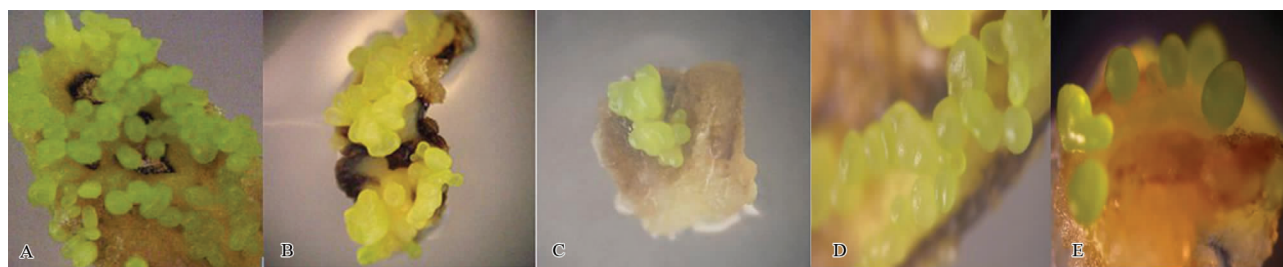
2.2 优异基因型品种胚胎发生的特点

高质量的体细胞胚是后期增殖和分化成植株的重要前提。不同基因型大豆体细胞胚的状态存在差异,垦丰 23(图 1-A)体细胞胚呈葡萄状、颜色鲜绿、每个未成熟子叶上体细胞胚的数量较多、没有畸形胚、各体细胞胚独立存在。部分参试基因型的体细胞胚诱导率高,如合丰 55(图 1-B)体细胞胚的诱导率达 88.7%,但是含有畸形胚、颜色鹅黄、成簇生长、体细胞胚的数量较垦丰 23 少。黑农 53(图 1-C)体细胞胚质量较好,颜色深绿、呈葡萄状、但是

每个子叶节的体细胞数目较少。黑农 62(图 1-D)体细胞胚呈葡萄状、颜色淡黄。黑农 64(图 1-E)体细胞胚呈葡萄状、颜色深绿,但是每个未成熟子叶分化的体细胞胚数目较少。

3 讨论

不同基因型体细胞胚胎发生频率不同,这在许多研究中都有体现,刘艳芝等<sup>[13]</sup>选取东北三省的 52 种基因型大豆未成熟子叶进行了体细胞胚的诱导,吉农 30 的诱导率达 56.3%。李海燕等<sup>[14]</sup>选取



A: 垦丰 23; B: 合丰 55; C: 黑农 53; D: 黑农 62; E: 黑农 64

A: Kenfeng 23; B: Hefeng 55; C: Heinong 53; D: Heinong 62; E: Heinong 64

图 1 优异基因型胚胎发生的特点

Fig. 1 Embryogenic characteristics of superior genotypes

了黑龙江省 5 种基因型大豆未成熟子叶进行了诱导,黑农 35 诱导率在 50% 左右。张淑珍等<sup>[15]</sup> 2003 ~2004 年以黑龙江省 30 个主栽大豆品种的未成熟胚为试材进行体细胞胚发生途径的基因型筛选,初步确定了东农 46、东农 47、东农 42 和黑农 42 为较理想的大豆基因型。本试验中的 41 份北方大豆中,垦丰 23 的胚胎发生率高达 99.7%,是作为大豆未成熟子叶体细胞胚诱导理想的基因型。

不同基因型大豆体细胞胚的最佳诱导条件不同,因此在大豆的组织培养中应该注意基因型的差异。对于合丰 55 等体细胞胚的诱导率在 70% 以上的品种,有待进一步对其培养条件进行优化,提高体细胞胚的诱导率和体细胞胚的质量。研究发现,大豆未成熟子叶的大小对于体细胞胚的诱导十分关键,未成熟子叶大于 7 mm 时体细胞胚的诱导率降低,并且每个子叶的体细胞胚的数量也很少。研究还发现,取材部位对于体细胞胚的诱导也有显著影响,越靠近植株顶端的未成熟子叶萌发率越低,并且所诱导的体细胞胚的质量也下降。

## 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 Sciences, 2001(3): 24-27.)
- [2] Cheng T Y, Hitoshi S, Thanh H V. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture[J]. Plant Science Letters, 1980, 19: 91-99.
- [3] Kartha K K, Pahl K, Leung N L, et al. Plant regeneration from meristems of grain legumes: soybean, cowpea, peanut, chickpea and bean[J]. Canadian Journal of Botany, 1981, 59: 1671-1679.
- [4] Barwale U B, Kerns H R, Widholm J M. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis[J]. Planta, 1986, 167: 473-481.
- [5] Wright M S, Ward D V, Hinchey M A, et al. Regeneration of soybean (*Glycine max* L. Merr.) from cultured primary leaf tissue[J]. Plant Cell Report, 1987, 6: 83-89.
- [6] Kim J, LaMotte C E, Hack E. Plant regeneration *in vitro* from primary leaf nodes of soybean (*Glycine max*) seedlings[J]. Plant Physiology, 1990, 136: 664-669.
- [7] Finer J J, Nagasawa A. Development of an embryogenic suspension culture of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] [J]. Plant Cell Tissue Organic Culture, 1988, 15: 125-136.
- [8] 周思军, 尹光初, 雷勃钧, 等. 从大豆幼胚诱导胚胎发生再生植株[J]. 大豆科学, 1989, 8(1): 39-44. (Zhou S J, Yin G C, Lei B J, et al. From soybean young embryo induced embryogenesis regeneration plant[J]. Soybean Science, 1989, 8(1): 39-44.)
- [9] 吴超, 武天龙. 大豆未成熟子叶体细胞再生及相关农艺性状影响因子的分析[J]. 大豆科学, 2004, 23(1): 22-25. (Wu C, Wu T L. Somatic embryogenesis from immature cotyledons and analysis of correlative agronomic characters[J]. Soybean Science, 2004, 23(1): 22-25.)
- [10] 曲桂芹, 张贤泽, 霍俊伟. 大豆体细胞胚的成熟处理及植株再生[J]. 东北农业大学学报, 2002, 33(1): 82-89. (Qu G Q, Zhang X Z, Huo J W. Maturation of soybean somatic embryos and the plant regeneration[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2002, 33(1): 82-89.)
- [11] 王晓春, 刘尚前, 季静, 等. 影响大豆体细胞胚萌发率的因素[J]. 大豆科学, 2004, 23(2): 151-154. (Wang X C, Liu S Q, Ji J, et al. The affect factors on the germination frequency of somatic embryos of soybean[J]. Soybean Science, 2004, 23(2): 151-154.)
- [12] 王晓春, 刘尚前, 王罡, 等. 大豆体细胞胚再生植株的研究[J]. 大豆科学, 2006, 25(2): 149-152. (Wang X C, Liu S Q, Wang G, et al. A study of soybean plant regeneration via somatic tissue cultures[J]. Soybean Science, 2006, 25(2): 149-152.)
- [13] 刘艳芝, 赵桂兰, 刘莉, 等. 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, Liu L, et al. Soybean young embryo cotyledon induced embryogenesis[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 1999, 24(6): 16-18.)
- [14] 李海燕, 朱延明, 冯莹莹, 等. 大豆幼胚子叶胚性悬浮细胞系的建立与次生胚诱导[J]. 大豆科学, 2002, 21(2): 123-126. (Li H Y, Zhu Y M, Feng Y Y, et al. Establishment of embryogenic suspension with immature cotyledons of soybean (*Glycine max* L. Merr.) and induction of secondary embryos[J]. Soybean Science, 2002, 21(2): 123-126.)
- [15] 张淑珍, 徐鹏飞, 林世锋, 等. 大豆体细胞胚再生体系的研究进展及展望[J]. 大豆科学, 2004, 23(3): 232-235. (Zhang S Z, Xu P F, Lin S F, et al. Recent advances and prospect on soybean somatic embryogenesis system[J]. Soybean Science, 2004, 23(3): 232-235.)