

大豆离体培养及高频再生基因型的筛选

张艳^{1,2,3}, 南相日^{4,*}, 满为群^{5,*}, 李柱刚⁴

¹东北林业大学博士后流动站, 哈尔滨 150040; ²黑龙江省农业科学院博士后工作站, 哈尔滨 150086; ³黑龙江省教育学院理科教育研培部, 哈尔滨 150080; 黑龙江省农业科学院⁴生物技术研究所, ⁵大豆研究所, 哈尔滨 150086

摘要: 为建立一个高效的大豆再生体系用于大豆的遗传转化, 选用3个东北主栽品种‘黑农35’、‘黑农41’和‘黑农58’的子叶节和胚尖作为外植体, 分别建立了3个品种的子叶节和胚尖再生体系, 并研究了6-BA对大豆再生的影响。结果表明, ‘黑农41’子叶节最适芽诱导培养基为MSB₅+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ IBA, 胚尖最适芽诱导培养基为MSB₅+0.2 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ IBA。‘黑农41’再生体系在出芽率、出芽数和芽伸长数上均远高于‘黑农35’和‘黑农58’, 是一个优秀的大豆转基因受体材料。

关键词: 大豆; 子叶节; 胚尖; 再生体系

Culture *in vitro* and High-Frequency Regeneration Genotype Selection of Soybean

ZHANG Yan^{1,2,3}, NAN Xiang-Ri^{4,*}, MAN Wei-Qun^{5,*}, LI Zhu-Gang⁴

¹Station of Postdoctor, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; ²Station of Postdoctor, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; ³Department of Science Education Research and Training, Heilongjiang College of Education, Harbin 150080, China; ⁴Biological Technology Research Institute, ⁵Soybean Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China

Abstract: To establish a high frequency regeneration system for the gene transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.], cotyledonary nodes and embryonic tips from three varieties ‘Heinong 35’, ‘Heinong 41’ and ‘Heinong 58’ were used as the explants. Regeneration systems of cotyledon nodes and embryonic tips from three varieties were established in this research. Effect of 6-benzylaminopurine (6-BA) on soybean regeneration was studied. The results indicated that the optimal shooting induction medium of cotyledonary node from ‘Heinong 41’ was MSB₅ added 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA and 0.2 mg·L⁻¹ indolebutyric acid (IBA) and the optimal shooting induction medium of embryonic tip from ‘Heinong 41’ was MSB₅ added 0.2 mg·L⁻¹ 6-BA and 0.2 mg·L⁻¹ IBA. In comparison with ‘Heinong 35’ and ‘Heinong 58’ regeneration systems, ‘Heinong 41’ regeneration system was superior in shoot regeneration frequency, shoot regeneration number and shoot elongation number. ‘Heinong 41’ was an excellent receptor material in soybeans genetical transformation.

Key words: soybean; cotyledonary node; embryonic tip; regeneration system

大豆是重要的粮食作物、饲料作物和油料作物, 同时还是重要的工业原料, 在我国广泛种植。人们对大豆组织培养再生体系的研究可以追溯到20世纪60年代, 但直到80年代才有突破性进展。Cheng等(1980)首次报道用无菌苗的子叶节为外植体, 在含高浓度BA的改良B5培养基上诱导丛生芽获得高频率的再生植株。此后, 各种不同的再生体系逐渐为人们所发现。Christianson等(1983)首次以大豆未成熟胚为外植体, 通过胚胎发生途径获得再生植株。Wei和Xu(1988)首次获得大豆原生质体再生植株。随后, Lazzeri等(1985)、Barwale等

(1986)、周思君等(1989)通过大豆幼胚培养, 经体细胞胚胎发生途径获得了再生植株。Dhir等(1992)和南相日等(1998)对不同品种的大豆原生质体进行处理也获得了再生植株。

目前大豆再生体系主要包括: 大豆体细胞胚发

收稿 2010-06-24 修定 2010-09-03

资助 国家转基因重大专项(2008ZX08004-005-02)。

* 共同通讯作者(E-mail: nanxr@hotmail.com, Tel: 0451-86676104; E-mail: manweiqun@163.com, Tel: 0451-86668734)。

生系统、原生质体发生系统和大豆不定芽器官发生系统,其中大豆不定芽器官发生系统是目前公认比较成熟、易行的大豆再生体系。不定芽器官发生系统中,外植体内已存在的分生组织和有分化潜力的表皮、亚表皮细胞都可作为遗传转化的靶组织(李明春等 2006)。Barwale 等(1986)用未成熟胚子叶、Wright 等(1987)用上胚轴和初生叶、McCabe 等(1988)用幼胚轴、Kim 等(1990)以下胚轴相继通过器官发生途径获得再生植株。但由于大豆再生体系受不同基因型、不同外植体、不同激素浓度和不同培养基等诸多因素的影响,目前仍然是公认的几种再生困难的作物之一。因此,进一步研究和优化大豆组织培养,建立新的、高效稳定的再生体系是十分必要的,同时也是大豆遗传转化成功的前提和基础。

为选择农艺性状优良,且离体培养再生力强的大豆品种,本试验选用大豆‘黑农’系列品种的无菌苗子叶节和胚尖为外植体,研究了不同浓度激素对大豆两种外植体再生的影响,同时分别建立了3个品种的子叶节和胚尖再生体系,并筛选出再生效果最好的大豆品种,为下一步大豆的遗传转化提供新的受体材料。

材料与方法

供试大豆[*Glycine max* (L.) Merr.]品种‘黑农35’、‘黑农41’和‘黑农58’由黑龙江省农业科学院大豆所提供。实验所用化学药品均为分析纯。使用的基本培养基为 MSB₅ (MS 无机盐和 B₅ 维生素)。

种子消毒采用氯气消毒法。挑选饱满无病斑的大豆种子,在通风橱中将种子放于密闭容器中,同时在容器内放入一盛有 100 mL 次氯酸钠和 4 mL 浓盐酸的小烧杯,氯气消毒 8~24 h。

试验处理分为两种:(1)子叶节外植体的获得及处理。将消毒后的大豆种子用无菌水浸泡,待种子充分吸水,种皮软化后接种在添加 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA 的 MSB₅ 培养基中培养 5~6 d。用解剖刀切去无菌苗的部分下胚轴,留 2~3 mm,切去萌发的顶芽和侧芽,保留完整的子叶,从子叶节处纵向切开,得到 2 个外植体。将子叶节外植体分别转到附加不同浓度 6-BA (0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 mg·L⁻¹)和

0.2 mg·L⁻¹ IBA 的 MSB₅ 培养基中诱导出芽及伸长。(2)胚尖外植体的获得及处理。将消毒后的大豆种子在无菌水中浸泡 24 h,去掉种皮,去除子叶和原叶,分离得到胚尖外植体。将胚尖朝上,置于添加 3.5 mg·L⁻¹ 6-BA 的 MSB₅ 培养基中光培养 24 h,然后分别转到附加不同浓度 6-BA (0.2、0.4、0.6、0.8 mg·L⁻¹)和 0.2 mg·L⁻¹ IBA 的 MSB₅ 培养基中诱导出芽及伸长。两种外植体均每隔 10 d 继代一次。4 周后统计每个处理的出芽率、出芽数及芽伸长数。出芽率=出芽的子叶节数/接种的子叶节数×100%,伸长率=芽伸长数/出芽数×100%。

当芽伸长至 3~5 cm 后,将其转至添加 2.0 mg·L⁻¹ IBA 的 MSB₅ 生根培养基中培养,待根长出 2~3 条时,将瓶盖打开炼苗 2~3 d,小心取出小苗,洗净根部残留的培养基,然后栽于盛有土:蛭石:沙子 (1:1:1) 均匀混合的塑料盆中,注意保持一定湿度。

培养条件为温度(26±1) °C,光强 40 μmol·m⁻²·s⁻¹,光/暗周期 16 h/8 h。

数据统计分析采用 SPSS 软件,多重比较采用 Duncan's 法。

实验结果

1 大豆子叶节再生体系的优化

1.1 6-BA对大豆子叶节出芽率的影响 在前人实验基础上,采用 5 个浓度,对上述 3 个品种进行了子叶节出芽率测定试验。从表 1 可以看出,3 个大豆品种在不同 6-BA 浓度的培养基中都能分化出丛生芽,但出芽率存在差异。随着 6-BA 浓度的增加,出

表 1 不同浓度 6-BA 对大豆子叶节出芽率的影响

Table 1 Effects of different concentrations of 6-BA on the shoot regeneration frequencies of soybean cotyledonary node

6-BA/mg·L ⁻¹	出芽率/%		
	‘黑农 35’	‘黑农 41’	‘黑农 58’
0.5	63.4 ^{bc}	85.6 ^a	70.2 ^b
1.0	68.9 ^{bc}	94.5 ^a	87.5 ^a
1.5	71.2 ^b	80.3 ^{ab}	74.1 ^b
2.0	61.5 ^c	68.7 ^{bc}	57.5 ^c
3.0	41.7 ^d	52.3 ^c	36.7 ^d

同一测定项目数值标有不同小写字母表示在 α=0.05 水平上差异显著。下表同此。

芽率逐渐增大, 在 6-BA 为 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, ‘黑农 41’ 和 ‘黑农 58’ 的出芽率达到最大, 分别为 94.5% 和 87.5%, 而 ‘黑农 35’ 在 6-BA 为 $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 出芽率达到最大的 71.2%。随着 6-BA 浓度的继续增加, 子叶节的出芽率反而下降, 在 6-BA 为 $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时下降到最低。3 个品种中, ‘黑农 41’ 出芽率最高。

1.2 6-BA 对大豆子叶节出芽数和芽伸长数的影响

培养 4 周后, 统计 5 个浓度下子叶节出芽数和芽伸长数。从表 2 可以看出 ‘黑农 35’ 和 ‘黑农 41’ 在 6-BA 浓度为 $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 每个外植体分化出的丛

生芽数最多, 分别为 14.78 和 16.89 个; ‘黑农 58’ 在 6-BA 浓度为 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 每个外植体分化出的丛生芽数最多, 为 15.36 个。‘黑农 35’ 在 6-BA 浓度为 $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 每个外植体上的平均芽伸长数最多, 为 6.83 个; ‘黑农 58’ 在 6-BA 浓度为 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 每个外植体上的平均芽伸长数最多, 为 7.43 个。而 ‘黑农 41’ 虽然在 6-BA 浓度为 $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 每个外植体分化出的丛生芽数最多, 但在 6-BA 浓度为 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 每个外植体上的平均芽伸长数最多, 为 8.67 个。

表 2 不同浓度 6-BA 对大豆子叶节出芽数和芽伸长数的影响

Table 2 Effects of different concentrations of 6-BA on shoot regeneration number and shoot elongation number of soybean cotyledonary node

6-BA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	每个外植体上的平均出芽数 / 个			每个外植体上的平均芽($\geq 0.5 \text{ cm}$)伸长数 / 个		
	‘黑农 35’	‘黑农 41’	‘黑农 58’	‘黑农 35’	‘黑农 41’	‘黑农 58’
0.5	11.48 ^c	14.33 ^b	13.34 ^b	5.67 ^c	7.60 ^{ab}	6.80 ^b
1.0	12.21 ^{bc}	15.25 ^a	15.36 ^a	6.33 ^{bc}	8.67 ^a	7.43 ^{ab}
1.5	14.78 ^{ab}	16.89 ^a	14.84 ^{ab}	6.83 ^b	8.30 ^a	7.14 ^b
2.0	11.54 ^c	14.07 ^b	13.90 ^b	5.00 ^{cd}	7.56 ^{ab}	5.50 ^c
3.0	9.62 ^c	12.31 ^{bc}	10.28 ^c	3.40 ^d	6.20 ^{bc}	4.30 ^d

综上所述, 考虑出芽率、出芽数和芽伸长数这 3 个因素, 确定 ‘黑农 35’ 的子叶节最适芽诱导培养基中 6-BA 浓度为 $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ‘黑农 41’ 和 ‘黑农 58’ 的子叶节最适芽诱导培养基中 6-BA 浓度为 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2 大豆胚尖再生体系的优化

2.1 6-BA 对大豆胚尖出芽率的影响 对 3 个品种的胚尖进行了 4 个 6-BA 浓度的出芽率测定试验。从表 3 可以看出, 3 个大豆品种在不同 6-BA 浓度的培养基中都能分化出丛生芽, 但出芽率存在较大差异。‘黑农 35’ 在 4 个浓度中出芽率都不高, 在 30%~60% 之间; ‘黑农 58’ 除了在 6-BA 浓度为 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时出芽率达到 80% 外, 其他 3 个浓度出芽率也不高; 而 ‘黑农 41’ 在 4 个浓度中, 出芽率都达到了 70% 以上, 在 6-BA 浓度为 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时出芽率达到最高, 为 85.7%。三个品种中, ‘黑农 41’ 出芽率最高。

2.2 6-BA 对大豆胚尖出芽数和芽伸长数的影响 对 3 个品种出芽数和芽伸长数进行比较(表 4), 可以

表 3 不同浓度 6-BA 对大豆胚尖出芽率的影响

Table 3 Effects of different concentrations of 6-BA on the shoot regeneration frequencies of soybean embryonic tip

6-BA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	出芽率 / %		
	‘黑农 35’	‘黑农 41’	‘黑农 58’
0.2	60.0 ^b	85.7 ^a	80.0 ^a
0.4	54.5 ^b	74.0 ^a	55.7 ^b
0.6	45.5 ^c	73.3 ^a	55.5 ^b
0.8	30.0 ^d	75.0 ^a	28.6 ^d

看出: ‘黑农 35’ 在 6-BA 浓度为 $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时平均出芽数和平均芽伸长数均达到最多; ‘黑农 58’ 在 6-BA 浓度为 $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时平均出芽数最多, 为 3.87 个, 在 6-BA 浓度为 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时平均芽伸长数最多, 为 2.98 个; ‘黑农 41’ 在 6-BA 浓度为 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时平均出芽数最多, 达到了 5.61 个, 平均芽伸长数也达到最多, 为 4.22 个, 远远高于 ‘黑农 35’ 和 ‘黑农 58’。

综上所述, 考虑出芽率、出芽数和芽伸长数这 3 个因素, 确定 ‘黑农 35’ 的胚尖最适芽诱导培养基

表4 不同浓度6-BA对大豆胚尖出芽数和芽伸长数的影响

Table 4 Effects of different concentrations of 6-BA on shoot regeneration number and shoot elongation number of soybean embryonic tip

6-BA/mg·L ⁻¹	每个外植体上的平均出芽数/个			每个外植体上的平均芽(≥0.5 cm)伸长数/个		
	‘黑农35’	‘黑农41’	‘黑农58’	‘黑农35’	‘黑农41’	‘黑农58’
0.2	3.05 ^b	5.61 ^a	3.23 ^b	1.94 ^b	4.22 ^a	2.98 ^a
0.4	3.58 ^{ab}	4.53 ^a	3.87 ^a	2.58 ^a	3.63 ^a	1.87 ^b
0.6	2.37 ^b	3.45 ^{ab}	2.77 ^b	2.03 ^b	2.55 ^a	1.53 ^c
0.8	1.33 ^c	2.69 ^b	2.35 ^b	0.67 ^d	1.58 ^{bc}	1.09 ^c

中6-BA浓度为0.4 mg·L⁻¹, ‘黑农41’和‘黑农58’的胚尖最适芽诱导培养基中6-BA浓度为0.2 mg·L⁻¹。

3 ‘黑农41’子叶节和胚尖丛生芽不定根的诱导与再生植株的形成

当芽伸长至3~5 cm后, 将其转至IBA浓度为2.0 mg·L⁻¹的MSB₅生根培养基中培养, 待根长出2~3条时, 将瓶盖打开炼苗2~3 d, 然后栽于塑料盆中, 获得再生植株。由胚尖获得的丛生芽茎较细弱, 由子叶节获得的丛生芽茎较粗壮, 生根时间也比较短, 相同时间内得到的根数也较多。

4 ‘黑农41’子叶节和胚尖两种再生体系的比较

‘黑农41’的两种外植体在出芽率、出芽数和芽伸长数上均远高于‘黑农35’和‘黑农58’, 表现

出很强的再生能力。比较‘黑农41’的子叶节和胚尖两种再生体系在最适芽诱导培养基中的各项指标(表5)可知, 在丛生芽的伸长率上, 子叶节再生体系低于胚尖再生体系。这是因为子叶节虽然出芽数多, 但大部分的芽较易成为封顶芽, 因此伸长率只有56.8%, 而胚尖正相反, 出芽数不高, 但伸长率却高达75.2%, 且生长较整齐。另外, 在丛生芽的发生时间上, 由于子叶节外植体的获得需要生长5~6 d的无菌苗, 因此胚尖丛生芽发生时间较短, 优于子叶节。但子叶节再生体系的前3个指标却远远高于胚尖再生体系, 这是高效的再生体系应该具备的基本条件, 因此可以采用子叶节作为遗传转化的外植体。

表5 ‘黑农41’子叶节和胚尖两种再生体系的比较

Table 5 Comparison on the cotyledonary node and embryonic tip systems of ‘Heinong 41’

外植体	出芽率/%	每个外植体上的平均出芽数/个	每个外植体上的平均芽(≥0.5 cm)伸长数/个	伸长率/%
子叶节	94.5	15.25	8.67	56.8
胚尖	85.7	5.61	4.22	75.2

讨 论

本试验采用的3个大豆品种均为黑龙江省农科院大豆所培育, 是东北主栽品种, 其中‘黑农41’和‘黑农58’的再生体系研究尚未见报道。‘黑农35’由于选育时间较早, 对其子叶节的研究较多。李文霞等(2007)对‘黑农35’的子叶节再生的影响进行了研究, 结果表明丛生芽诱导培养基中6-BA的最适浓度为1.7 mg·L⁻¹, 本试验结果为1.5 mg·L⁻¹, 与之相近。但目前对‘黑农35’胚尖再生体系的研究

还未见报道。胚尖作为大豆组培的外植体是由Liu等(2004)首先研究报道的, 在近几年的大豆再生及农杆菌介导的大豆遗传转化中有所应用(Dang和Wei 2007)。马晓红等(2008)以‘合丰46’、‘东农42’和‘合丰48’为材料, 对大豆子叶节和胚尖再生体系进行了比较研究, 结果表明以胚尖为外植体, 出芽数一般为3~6个, 本试验的3个品种胚尖的平均出芽数在3.58~5.61个之间, 基本相符, 而子叶节的平均出芽数在14.78~16.89个之间, 远远高于胚尖, 这也印证了卜云萍等(2003)在对大豆品种‘吉林

43’、‘黑农36’和‘黑农37’的研究中得出的子叶节平均出芽数为15~20个的结论。李海燕等(2007)对‘合丰35’和‘北京小黑豆’子叶节和茎出芽的研究,证实为获得高分化率,选择子叶节作为外植体较适合,本研究的结果与之一致。本试验中‘黑农41’表现出了很强的再生能力,它不但具有高脂肪、高产、抗灰斑病及抗逆性强等特点,还是一个优秀的大豆转基因受体材料。

参考文献

- 卜云萍,李明春,胡国武,张飒,王广科,邢来君(2003). 大豆子叶节组培再生系统与农杆菌介导的基因转化系统的比较研究. 南开大学学报(自然科学版), 36 (1): 103~108
- 李海燕,武小霞,刘淼,韩英鹏(2007). 大豆子叶节、胚尖再生植株的研究. 大豆科学, 26 (5): 709~712
- 李明春,蔡易,赵桂兰,财音青格乐,周皓,孙伟,邢来君(2006). 改良大豆子叶节再生体系的研究. 作物学报, 32 (2): 223~227
- 李文霞,宁海龙,李文滨,吕文河(2007). 6-BA对大豆子叶节再生的影响. 核农学报, 21 (5): 502~505
- 马晓红,姚陆铭,武天龙(2008). 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. 大豆科学, 27 (3): 373~378
- 南相日,刘文萍,刘丽艳,吕晓波,何云霞,卫志明(1998). PEG介导BT基因转化大豆原生质体获转基因植株. 大豆科学, 17 (4): 326~330
- 周思军,尹光初,雷勃钧,何志鸿(1989). 从大豆幼胚诱导胚胎发生再生植株. 大豆科学, 1: 39~45
- Barwale UB, Kerns HR, Widholm JM (1986). Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. *Planta*, 167: 473~481
- Cheng TY, Saka H, Voqui-Dinh TH (1980). Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture. *Plant Sci Lett*, 19: 91~99
- Christianson ML, Warnick DA, Carlson PS (1983). A morphogenetically competent soybean suspension culture. *Science*, 222: 632~634
- Dang W, Wei ZM (2007). An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation for soybean for expression of binary insect resistance genes. *Plant Sci*, 173: 381~389
- Dhir SK, Dhir S, Widholm JM (1992). Regeneration of fertile plants from protoplasts of soybean (*Glycine max* L. Merr.): genotypic differences in culture response. *Plant Cell Rep*, 11: 285~289
- Kim J, LaMotte CE, Hack E (1990). Plant regeneration *in vitro* from primary leaf nodes of soybean (*Glycine max*) seedlings. *J Plant Physiol*, 136: 664~669
- Lazzeri PA, Hildebrand DF, Collins GB (1985). A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. *Plant Mol Biol Rep*, 3: 160~167
- Liu HK, Yang C, Wei ZM (2004). Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system. *Planta*, 219: 1042~1049
- McCabe DE, Swain WF, Martinell BJ, Christou P (1988). Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Nat Biotechnol*, 6: 923~926
- Wei ZM, Xu ZH (1988). Plant regeneration from protoplasts of soybean (*Glycine max* L.). *Plant Cell Rep*, 7: 348~351
- Wright MS, Williams MH, Pierson PE (1987). Initiation and propagation of *Glycine max* L. Merr.: plants from tissue-cultured epicotyls. *Plant Cell*, 8: 83~90