

菜用大豆高效胚尖离体再生基因型筛选

钟 灿¹, 肖深根¹, 朱保葛³, 薛仁镐⁴, 卫志明², 朱木兰²

(1. 湖南农业大学 园艺园林学院, 湖南 长沙 410128; 2. 中国科学院 上海生命科学研究院, 植物生理生态研究所, 国家植物基因研究中心(上海), 上海 200032; 3. 中国科学院 遗传与发育生物学研究所, 北京 100101; 4. 青岛农业大学 生命科学院, 山东 青岛 266109)

摘要:以华东地区4个主栽菜用大豆品种(交大05-133、交大02-89、沪宁96-10、青酥二号)的胚尖为起始外植体, 研究消毒方法、预培养天数、6-BA浓度和培养基组合等对不定芽的诱导和伸长的影响。结果表明:用0.1% HgCl₂消毒10 min后配合5%的NaClO消毒5 min, 消毒效果最佳, 胚尖活力好, 且适用于各个品种;预培养时间为2 d, 6-BA浓度为3.0 mg·L⁻¹, 有利于菜用大豆不定芽的诱导;1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA培养基组合有利于增加有效不定芽数;0.05 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ IBA培养基组合有利于不定芽的伸长;交大05-133为最佳胚尖离体再生基因型, 其分化频率为90.86%, 诱导15 d后外植体平均不定芽数为4.65个, 不定芽平均长度为1.38 cm。

关键词:菜用大豆;胚尖;基因型筛选;离体再生

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2012)01-0009-04

Selection of High-efficient Regeneration Genotype from Embryonic Tips of Vegetable-type Soybean

ZHONG Can¹, XIAO Shen-gen¹, ZHU Bao-ge³, XUE Ren-gao⁴, WEI Zhi-ming², ZHU Mu-lan²

(1. College of Horticulture and Gardening, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan; 2. Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, National Center for Plant Gene Research (Shanghai) Chinese Academy of Sciences (CAS), Shanghai 200032; 3. Institute of Genetics and Developmental Biology, CAS, Beijing 100101; 4. College of Life and Science, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong, China)

Abstract: To study the effect of sterilization, pre-culture days, different concentrations of 6-BA and medium formulations on induction and elongation of adventitious buds, embryonic tips from four vegetable-type soybean varieties 'Jiaoda 05-133', 'Jiaoda 02-89', 'Huning 96-10' and 'Qingsuerhao' were used as the initial explants. The results showed that the optimal sterilization was using 0.1% HgCl₂ for 10 min and 5% NaClO for 5 min. The optimal adventitious buds induction formulation was MSB₅ base medium with 3.0 mg·L⁻¹ 6-BA, and the optimal pre-culture days of embryonic tips was 2 d. The combination of 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA and 0.1 mg·L⁻¹ NAA benefited to produce many adventitious buds. The combination of 0.05 mg·L⁻¹ 6-BA and 0.1 mg·L⁻¹ IBA benefited to the elongation of adventitious buds. Among the four varieties, the embryonic tips from Jiaoda 05-133 is the best one for regeneration, with 90.86% of adventitious buds induction rate, 4.65 of mean number of adventitious buds and 1.38 cm of mean length of adventitious buds after culture for 15 d.

Key words: Vegetable-type soybean; Embryonic tips; Selection of genotype; Regeneration

菜用大豆, 又名毛豆、青毛豆, 在日本称为枝豆或者啤酒豆^[1], 它是在豆荚鼓粒饱满, 菜色、籽粒呈翠绿色时剥仁作为菜用的大豆, 是大豆的专用型品种, 也是深受广大消费者喜爱的高蛋白蔬菜之一^[2]。

菜用大豆的食用品质和营养品质都优于普通大豆^[3]。菜用大豆的不饱和脂肪酸含量也高于普通大豆^[3]; 菜用大豆还含有丰富的氨基酸、多种矿物质和维生素等^[2,4,5]。在药用保健方面, 菜用大豆籽粒中的异黄酮有很好的乳腺癌预防和治疗效果^[6]。

鉴于菜用大豆的营养价值和防病功效, 近年来其消费量猛增, 中国、日本、韩国等东南亚国家为主

要消费国^[7]。因此, 菜用大豆的种植前景十分看好。然而, 目前我国鲜有优良菜用大豆品种或品系广为种植的报道, 可见其遗传育种任务之艰巨。

高效的离体再生体系为外源基因导入大豆提供了可靠的技术支持, 从而给大豆的品种改良带来新的生机。目前, 有专家和学者开始研究将提高异黄酮含量的基因导入豆科植物中, 研究其异黄酮含量的变化^[8]。然而, 菜用大豆的基因工程育种研究与应用却大大滞后于普通大豆。关于菜用大豆的高效离体再生与遗传转化的研究也鲜有报道。

课题组通过开展菜用大豆高效胚尖离体再生基因型筛选研究, 建立了菜用大豆的高效离体再生体系, 并筛选出适于外源基因导入的菜用大豆基因

收稿日期:2011-11-11

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项资助项目(2009ZX08010-009B, 2009ZX08004-009B)。

第一作者简介:钟灿(1986-), 女, 硕士, 研究方向为蔬菜生物技术。E-mail: canzhong651@163.com。

通讯作者:朱木兰(1968-), 女, 副研究员, 从事植物分子遗传研究。E-mail: mlzhu@sippe.ac.cn。

型,以期为菜用大豆新品种选育与品质改良奠定一定的理论与技术基础。

1 材料与方 法

1.1 供试品种

菜用大豆专用品种:沪宁 96-10、交大 05-133、交大 02-89、青酥二号。

1.2 培养基与培养条件

将下述 3 种培养基在手提式灭菌锅 121℃,105 kPa 条件下灭菌 20 min 后使用。培养条件温度为 24~26℃,光强 3 000 lx,每天光照 14 h。

1.2.1 初代培养基 MSB₅ + 0~7.0 mg·L⁻¹ 6-BA。

1.2.2 继代培养基 MSB₅ (记作处理 A,下同); MSB₅ + 0.2 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.02 mg·L⁻¹ NAA (B); MSB₅ + 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.05 mg·L⁻¹ NAA (C); MSB₅ + 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.1 mg·L⁻¹ NAA (D); MSB₅ + 0.2 mg·L⁻¹ NAA (E); MSB₅ + 0.05 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.1 mg·L⁻¹ IBA (F)

以上培养基均添加 200 mg·L⁻¹ 肌醇,30 g·L⁻¹ 蔗糖和 6.5 g·L⁻¹ 琼脂,pH 值均为 5.5~5.8。

1.2.3 生根培养基 1/2 MSB₅ + 200 mg·L⁻¹ 肌醇 + 20 g·L⁻¹ 蔗糖 + 6.5 g·L⁻¹ 琼脂 + 1.0 mg·L⁻¹ IBA,pH 为 5.5~5.8。

1.3 试验方法

取干净、健壮饱满、种皮无破损的菜用大豆成熟种子,在超净工作台上用 70% 酒精浸泡 1 min,然后用 0.1% HgCl₂ 浸泡 6~15 min,用无菌水洗 4~6 次后,再用 0~8% 的 NaClO 浸泡 5 min,用无菌蒸馏水清洗 5 次,最后用无菌水浸泡 15~18 h,当室温在 20℃ 以上时将其置于 4℃ 冰箱。在超净工作台上剥下胚尖作为起始外植体预培养 1~4 d,随后转接到不定芽伸长培养基中,10 d 后统计不定芽诱导率,15 d 后统计不定芽数量和不定芽平均长度。当不定芽伸长到 2~3 cm 后,将其切下转移到生根培养基中,待长出健壮根系后炼苗移栽。

2 结果与分析

2.1 不同消毒组合对菜用大豆胚尖活力的影响

挑选饱满、无病菌、种皮无破损的菜用大豆种子,在超净工作台上用酒精浸泡 1 min,再用 0.1% HgCl₂ 浸泡 6、8、10、12、15 min,用无菌水反复洗,然后用 0%、3%、5%、8% 的 NaClO 浸泡 5 min,最后用无菌水反复洗,浸泡 15~18 h 剥去胚尖作为起始外植体。接种 2 d 后统计胚尖活力和污染率,研究适

合菜用大豆的消毒方法。有活力胚尖呈乳黄色,接种 1 d 后开始变绿萌发;而没有活力的胚尖消毒后呈乳白色,接种后不萌发(图 1-A)。从表 1 中可以看出,单独用升汞消毒,随着消毒时间的增长,对胚尖活力的影响不大,污染率降低,但整体来说消毒不彻底。继升汞之后,使用次氯酸钠二次消毒,随着其浓度的增加,消毒种子的胚尖活力大大降低,当次氯酸钠浓度为 8% 时,其胚尖活力数最低。因此,次氯酸钠对胚尖的伤害与其浓度有正相关性。升汞配合次氯酸钠消毒时,以 0.1% 的升汞消毒 10 min 配合 5% 的次氯酸钠消毒 5 min 效果最佳,其污染率为 0,有活力的胚尖数最多。这一消毒方法在不同菜用大豆品种和普通大豆中也较为可行。

表 1 不同消毒组合对交大 05-133 胚尖活力的影响

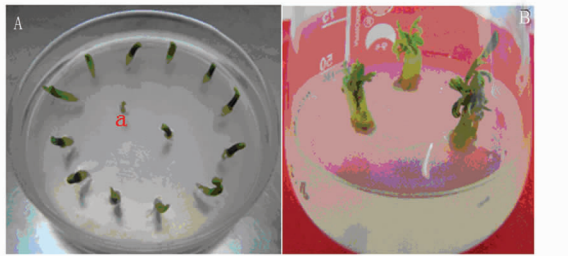
Table 1 Effect of different sterilization on viable embryonic tips of Jiaoda 05-133

升汞消毒 时间 Sterilizing time of HgCl ₂ /min	次氯酸钠 浓度 NaClO concentration/%	消毒 种子数 Total sterilized seeds	有活力 胚尖数 Viable embryonic tips	污染率 Pollution rate/%
6	0	98	94	93.2
	3	92	45	40.1
	5	95	58	26.2
	8	91	9	98.9
8	0	90	85	85.8
	3	95	79	19.4
	5	98	81	9.6
	8	92	11	98.5
10	0	93	78	45.6
	3	94	86	2.7
	5	97	94	0
	8	91	8	100
12	0	90	71	26.1
	3	100	79	4.1
	5	97	85	3.5
	8	92	9	100
15	0	100	89	15.8
	3	93	71	5.8
	5	89	62	6.1
	8	90	8	100

2.2 预培养天数对菜用大豆胚尖分化性能的影响

为了确定预培养时间对菜用大豆胚尖分化性能的影响,将 4 个不同品种的菜用大豆消毒后剥取胚尖,接种在 MSB₅ + 3.0 mg·L⁻¹ 6-BA 培养基上,分别预培养 1、2、3、4 d,然后转接到芽伸长培养基,10 d 后统计其不定芽诱导率。从表 2 可以看出,不同预培养天数对胚尖的分化性能影响差异性不大,当预培养时间为 1 d 时,各供试品种的萌发率均处于最低水平。预培养时间为 4 d 时菜用大豆各供试

品种的不定芽诱导率均处于最高水平,其中交大05-133最高(90.66%),青酥二号最低(60.76%)。预培养3~4 d时其诱导率略高于2 d时,但在后续的继代培养过程中发现其胚尖基部愈伤化程度较2 d的高,不定芽伸长也较慢。因此,2 d为胚尖最佳预培养天数。



A:交大05-133预培养;B:交大05-133不定芽伸长;
a:没有活力的胚尖外植体

A:Pre-culture;B:Elongation of adventitious buds;
a:Unviable explant of embryonic tips

图1 交大05-133的胚尖预培养与不定芽诱导
Fig. 1 Pre-culture and induction of adventitious buds of embryonic tips of Jiaoda 05-133

表2 预培养天数对菜用大豆胚尖分化性能的影响

Table 2 Effect of pre-culture days on capacity of differentiation of embryonic tips in vegetable-type soybean

预培养天数 Pre-culture days/d	不定芽诱导率 Introduction rate of adventitious bud/%			
	沪宁96-10 Huning 96-10	交大05-133 Jiaoda 05-133	交大02-89 Jiaoda 02-89	青酥二号 Qingsu No. 2
1	72.25	80.96	76.16	51.22
2	81.21	89.87	85.58	57.18
3	83.39	90.14	86.63	59.98
4	83.51	90.66	87.77	60.76

2.3 6-BA浓度对菜用大豆分化性能的影响

在基本培养基中分别添加浓度为0、1、2、3、5、7 mg·L⁻¹ 6个6-BA浓度处理,预培养2 d后转接到伸长培养基,10 d后统计其不定芽诱导率,以确定最适合诱导菜用大豆胚尖不定芽的6-BA浓度。

从表3可以看出,6-BA对胚尖不定芽诱导有促进作用,不添加6-BA时各供试品种的不定芽诱导率均低于10%。当添加1 mg·L⁻¹ 6-BA时,各基因型菜用大豆的不定芽诱导率显著提高,其中交大05-133最为明显(图1-B),从8.17%提高到77.24%。6-BA浓度在1~3 mg·L⁻¹范围内,各供试品种随着6-BA浓度的增加不定芽诱导率提高。当6-BA浓度为3.0 mg·L⁻¹时,各供试品种的诱导率达最高。当6-BA浓度高于3.0 mg·L⁻¹时,其诱导率又呈下降趋势。从继代培养中发现不添加任

何激素的培养基诱导的胚尖均有褐化现象,并慢慢死亡;经7.0 mg·L⁻¹ 6-BA诱导的胚尖,基部愈伤化程度较高,顶端形成致密的绿色组织。因此,6-BA浓度对胚尖的分化性能有影响,3.0 mg·L⁻¹ 6-BA浓度适宜菜用大豆胚尖的分化。

表3 6-BA浓度对菜用大豆分化性能的影响

Table 3 Effect of 6-BA concentration on capacity of differentiation of embryonic tips in vegetable-type soybean

6-BA浓度 6-BA concentration	不定芽诱导率 Introduction rate of adventitious bud/%			
	沪宁96-10 Huning 96-10	交大05-133 Jiaoda 05-133	交大02-89 Jiaoda 02-89	青酥二号 Qingsu No. 2
0	9.19	8.17	9.84	6.88
1	60.39	77.24	72.41	28.76
2	78.65	85.87	83.12	58.16
3	85.51	90.86	87.57	64.76
5	72.17	78.31	76.54	43.21
7	51.97	60.21	55.38	33.69

2.4 不同激素组合对菜用大豆胚尖不定芽数量和长度的影响

为了提高菜用大豆的再生频率,获得更多健壮的再生植株。设置不同激素组合用于胚尖不定芽的伸长培养,15 d后统计不定芽的平均个数和伸长的平均长度。从表4看出,添加激素对胚尖不定芽的发生有明显的促进作用,不添加激素的培养基培育的菜用大豆不定芽发生频率极低,即使有少量不定芽形成,最终都因胚尖基部褐化而导致不定芽死亡。在6-BA + NAA和6-BA + IBA、NAA激素组合中,6-BA + NAA类组合有利于菜用大豆胚尖不定芽的发生,并且随着浓度配比的增加,不定芽的发生个数增多。然而,随着浓度配比的增加,不定芽的伸长渐显困难,且胚尖基部愈伤化程度增高。在培养基中添加6-BA + IBA或者仅用NAA,其不定芽的发生个数明显少于添加6-BA + NAA发生的不定芽个数。不过,此类组合有利于不定芽的伸长,20 d后即可用来生根。各品种在不同组合中不定芽个数及其伸长存在一定差异,但整体来说,4个品种都是在D处理中不定芽平均个数最多,除沪宁96-10的不定芽是在E处理中伸长最快以外,其余3个品种均是在F处理中伸长最快。

3 讨论

采用华东地区主栽的4个菜用大豆品种为材料进行菜用大豆高效离体再生基因型筛选研究,结

表 4 不同激素组合对菜用大豆胚尖不定芽数量和长度的影响
Table 4 Effect of different combination of hormones on number and length of adventitious buds from embryonic tips in vegetable-type soybean

不同激素组合 Combination of hormones	平均芽数				平均芽长			
	Mean No. of adventitious buds per explant				Mean length of adventitious buds/cm			
	沪宁 96-10 Huning 96-10	交大 05-133 Jiaoda 05-133	交大 02-89 Jiaoda 02-89	青酥二号 Qingsu No. 2	沪宁 96-10 Huning 96-10	交大 05-133 Jiaoda 05-133	交大 02-89 Jiaoda 02-89	青酥二号 Qingsu No. 2
A	0	0.32	0.11	0	0	0.53	0.44	0
B	2.16	3.53	3.24	1.83	0.41	0.34	0.36	0.12
C	3.91	4.17	3.72	2.84	0.28	0.23	0.27	0.10
D	4.33	4.65	4.36	2.92	0.19	0.18	0.21	0.09
E	1.56	2.72	2.88	1.12	1.18	1.22	0.99	0.66
F	1.97	3.16	3.19	1.45	1.25	1.38	1.12	0.55

果交大 05-133 的离体再生性能表现最佳,交大 02-89 的离体再生性能次之,这 2 个菜用大豆品种都可作为遗传转化的受体品种。

种子消毒彻底是保证菜用大豆离体高效再生的前提。刘海坤等^[9]研究发现了一种适合大多数基因型大豆成熟种子的有效消毒方法,即氯气消毒法。但其消毒时间长,操作具有一定危险性,同时还会对环境造成污染,对人体造成伤害。该课题组主要针对升汞和次氯酸钠配合消毒的时间和浓度进行了优化研究,发现用 0.1% 的升汞消毒 10 min 配合 5% NaClO 消毒 5 min 的消毒效果好,污染率为 0,有活力胚尖数多,萌发率高。这种方法同样都能降低污染率和保证萌发率。此外,此方法具有操作方便简单、消毒时间短、消毒彻底等优点。

该研究发现预培养天数和 6-BA 浓度对菜用大豆不定芽分化的影响与普通大豆相似。预培养天数为 2 d,6-BA 浓度为 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时有利于各品种胚尖的分化,其中交大 05-133 的分化性能最好,分化频率为 90.86%。闫帆等^[10]和武承祥等^[11]研究发现普通大豆胚尖的预培养过程中,6-BA 浓度为 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时有利于不定芽的诱导。普通大豆的不定芽诱导比较容易而伸长普遍较难,进一步研究发现菜用大豆的离体再生不定芽伸长难度相对小些,培养基组合 $\text{MSB}_5 + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA}$ 有利于菜用大豆胚尖不定芽发生,培养基组合 $\text{MSB}_5 + 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ IBA}$ 有利于菜用大豆胚尖不定芽的伸长。

参考文献

- [1] 顾卫红,郑洪建,张燕,等. 菜用大豆的国际需求及科研工作动态[J]. 上海农业学报,2002,18(2):45-48. (Gu W H, Zheng H J, Zhang Y, et al. Trends in production, demand and scientific researches on vegetable soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] at home and abroad[J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2002, 18(2):45-48.)
- [2] 徐兆生,王素,魏民,等. 菜用大豆种质资源营养品质分析[J]. 作物品种资源,1995(3):40-41. (Xu Z S, Wang S, Wei M, et al. Analysis on nutritional quality of vegetable soybean germplasm [J]. China Seeds, 1995(3):40-41.)
- [3] 张惠君,敖雪,王海英,等. 菜用大豆与普通大豆产量及品质的比较[J]. 大豆科学,2009,28(6):1011-1015. (Zhang H J, Ao X, Wang H Y, et al. Comparison on seed yield and quality among vegetable-type and grain-type soybean [*Glycine max* (Merr. L.)] cultivars[J]. Soybean Science, 2009, 28(6):1011-1015.)
- [4] Asuhiro Y, Akazawa T, Abe T, et al. Changes in free amino and Kjeldahl N concentrations in seeds from vegetable-type and grain-type soybean cultivars during the cropping season[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1997, 45(5):1720-1724.
- [5] Mohamed A I, Rangappa M. Nutrient composition and anti-nutritional factors in vegetable soybean; II. oil, fatty acids, sterols, and lipoxygenase activity[J]. Food Chemistry, 1992, 44(4):277-282.
- [6] Barnes S, Grubbs C, Setchell K D, et al. Soybeans inhibit mammary tumors in models of breast cancer [J]. Progress in Clinical and Biological Research, 1990;347:239-253.
- [7] 张秋英,杨文月,李艳华,等. 中国菜用大豆研究现状、生产中的问题及展望[J]. 大豆科学,2007,26(6):950-954. (Zhang Q Y, Yang W Y, Li Y H, et al. Current status, production problem and prospects of vegetable soybean in China[J]. Soybean Science, 2007, 26(6):950-954.)
- [8] Yu O, Jung W, Shi J, et al. Production of the isoflavones genestein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues[J]. Plant Physiology, 2000, 124:781-793.
- [9] 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 Communication, 2002, 38(3):260-261.)
- [10] 闫帆,孙昕,翟莹,等. 6-BA 浓度及基因型对大豆胚尖诱导丛生芽的影响[J]. 大豆科学,2011,30(1):29-32. (Yan F, Sun X, Zhai Y, et al. Effect of different 6-BA concentration and genotypes on shoots induced from embryonic tips[J]. Soybean Science, 2011, 30(1):29-32.)
- [11] 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.)