

大豆子叶节植株再生体系的研究

赖冰冰¹, 韩阳^{1,2,3}, 李春风¹, 张兴政¹, 张立军², 宋书宏³

(1. 辽宁大学 生命科学院, 辽宁 沈阳 110036; 2. 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110866; 3. 辽宁省农业科学院 作物所, 辽宁 沈阳 110866)

摘要:以大豆品种“辽豆 17”、“辽豆 18”和“辽豆 23”子叶节为外植体诱导不定芽的发生。结果表明:随着培养基中 6-BA 浓度的增加,每块外植体上不定芽的数量呈增加的趋势,当向 1/2MSB 培养基中添加 0.05 mg · L⁻¹ IBA 和 4.0 mg · L⁻¹ 6-BA 时,不定芽的诱导率最高。比较不同的外植体获得方法,保留半片子叶的外植体诱导丛生芽的效果好于不保留子叶的外植体。1/2 MSB + 0.5 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.05 mg · L⁻¹ IBA 是适宜的 不定芽伸长培养基。1/2MSB + 1.0 mg · L⁻¹ IBA 是适宜的生根培养基。

关键词:大豆;子叶节;不定芽;植株再生

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2011)02-0303-03

Research on Cotyledonary Nodes Regeneration System of Soybean

LAI Bing-bing¹, HAN Yang^{1,2,3}, LI Chun-feng¹, ZHANG Xing-zheng¹, ZHANG Li-jun², SONG Shu-hong³

(1. School of Life Science, Liaoning University, Shenyang 110036; 2. College of Biological Sciences and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866; 3. Crop Institute, Liaoning Academy of Agricultural Science, Shenyang 110866, Liaoning, China)

Abstract: The adventive shoots were induced from cotyledon nodes with soybean cultivar Liaodou 17, Liaodou 18 and Liaodou 23 as explants. With the increase of 6-BA concentration, the number of adventitious shoots on each explant showed an increasing trend, when 0.05 mg · L⁻¹ IBA and 4.0 mg · L⁻¹ 6-BA were added into 1/2MSB medium, the induction rate of adventive shoots is the highest. Compared the effect of explants, the explants of reserving half cotyledon was better than the cotyledon nodes without cotyledon. Therefore, the optimum culture medium for elongation of adventitious bud was 1/2MSB + 0.5 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.05 mg · L⁻¹ IBA, and the optimum culture medium for rooting was 1/2MSB + 1.0 mg · L⁻¹ IBA.

Key words: Soybean; Cotyledonary node; Adventive shoots; Plant Regeneration

大豆是重要的油料作物和粮食作物,是世界上食用油和植物蛋白的主要来源。将优良的外源基因导入大豆中将对大豆育种和生产起到推动作用并能提升大豆的经济价值。建立高效稳定的大豆再生体系是大豆遗传转化的先决条件。至今已对大豆子叶^[1]、子叶节^[2-3]、上胚轴^[4]、茎尖^[5]和未成熟种子的子叶^[6]及茎尖^[7]等不定芽器官发生再生系统进行了研究。子叶节具有取材不受季节限制、诱导率高、组培成苗时间短、不易发生变异、遗传稳定性好等优点^[8],尽管以子叶节为外植体作遗传转化时会出现嵌合体,但目前仍被认为是用于大豆遗传转化的比较理想的外植体^[9-10]。

吲哚丁酸(IBA)和 6-苄基腺嘌呤(6-BA)是植物组织培养常用的植物激素,相关研究表明 IBA 和 6-BA 的配合使用能够有效地促进大豆芽的生长与分化^[11-12]。现以大豆子叶节为外植体,从不同浓度

6-BA 对不定芽的诱导率、外植体的获得方式以及 IBA 浓度对生根的影响几方面对大豆植株再生体系进行了研究,旨在为建立稳定、高效的大豆遗传转化体系提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

大豆品种辽豆 17,辽豆 18 和辽豆 23,由辽宁省农业科学院提供。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的获得 选取无病斑、饱满的大豆种子放入培养皿中,将培养皿置于密闭的容器内,同时在容器内放入盛有 100 mL 次氯酸钠和 4 mL 浓盐酸的小烧杯,在通风处灭菌 2~6 h^[13]。将消毒后的种子种脐向下接种于萌发培养基中,在 26℃,每天光照 16 h 的条件下培养。种子萌发培养基采

收稿日期:2010-11-05

基金项目:国家科技攻关资助项目(2003ba538e)。

第一作者简介:赖冰冰(1982-),女,硕士,从事转基因大豆方面的研究。E-mail:lai-bingbing@sina.com。

通讯作者:韩阳(1962-),女,博士,教授,从事植物学方面的教学和科研工作。E-mail:hanyang_0802@163.com。

用1/2MSB(MS大量元素减半,有机成分为B5)+3%蔗糖+0.7%琼脂,pH值5.8。

1.2.2 不定芽的诱导 取出培养5 d的大豆种子,去除种皮,将子叶横向切去1/2,保留3~5 mm下胚轴,再纵切分离2片子叶,切除顶芽及叶腋,接种于不定芽诱导培养基中。不定芽诱导培养基以1/2MSB为基本培养基,添加0.05 mg·L⁻¹ IBA和0~6.0 mg·L⁻¹ 6-BA,加3%蔗糖和0.7%琼脂,pH值5.8。接种21 d后统计不定芽数量。

不定芽诱导率指发生不定芽的外植体占接种外植体总数的百分比。

1.2.3 不定芽的伸长 接种28 d后,将不定芽从外植体上切下,接种于不定芽伸长培养基中进行培养。采用1/2MSB+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.05 mg·L⁻¹ IBA+3%蔗糖+0.7%琼脂,作为不定芽伸长培养基。

1.2.4 生根 将长至2~3 cm的不定芽接种于基本培养基为1/2MSB+3%蔗糖+0.7%琼脂,分别加入0、0.5、1.0、1.5、2.0 mg·L⁻¹的IBA的培养基中进行生根培养,比较IBA对不定芽生根的影响。

2 结果与分析

2.1 6-BA浓度对大豆子叶节不定芽诱导的影响

如表1所示,大豆子叶节在6-BA浓度低于4.0 mg·L⁻¹时,不定芽的诱导频率随6-BA浓度的升高而升高;在6-BA浓度达到4.0 mg·L⁻¹时,不定芽的诱导率最高,辽豆17、辽豆18、辽豆23的诱导率分别为67.69%、60.95%、56.64%;当6-BA浓度超过4.0 mg·L⁻¹时,不定芽诱导率随6-BA浓度升高呈下降趋势,说明过高浓度6-BA对不定芽的发生有抑制作用。

随着6-BA浓度的增加,每个外植体的出芽数目随之增加,但是当芽数过多时,芽的伸长受到抑制,较小的芽不再发育形成完整的植株。

2.2 保留半片子叶与不保留子叶的外植体对丛芽诱导的影响

对辽豆17的子叶节外植体采用不保留子叶和保留半片子叶2种处理方法,比较子叶外对不定芽诱导的影响。结果如表2所示,保留半片子叶的外植体在相同6-BA浓度时的不定芽再生频率明显高于不保留子叶的外植体。从每个外植体的出芽数目来看,保留半片子叶的外植体也要高于不保留子叶的外植体。因此说明子叶对于不定芽的发生是重要的,保留半片子叶的外植体更适宜用于不定芽的诱导。

表1 6-BA浓度对大豆子叶节不定芽诱导率的影响
Table 1 Effect of 6-BA concentration on adventitious shoots regeneration rate of soybean cotyledonary node

基因型 Genotype	IBA 浓度 Concentration /mg·L ⁻¹	6-BA 浓度 Concentration /mg·L ⁻¹	不定芽诱导率 Adventitious shoots regeneration rate/%	每个外植体 的出芽数 Budding number of each explants
辽豆17 Liaodou17	0.05	0.0	6.51 ± 1.42a	2.30 ± 0.20a
		1.0	18.42 ± 1.67b	4.83 ± 0.25b
		2.0	43.08 ± 4.35c	5.23 ± 0.49b
		3.0	52.75 ± 0.65d	14.30 ± 0.46b
		4.0	67.69 ± 1.58f	17.87 ± 0.83d
		5.0	64.49 ± 2.09f	18.97 ± 0.25de
辽豆18 Liaodou18	0.05	0.0	4.15 ± 1.48a	1.80 ± 0.10a
		1.0	11.28 ± 3.81b	3.93 ± 0.15b
		2.0	36.01c ± 2.33c	4.20 ± 0.10b
		3.0	57.83a ± 3.00e	12.37 ± 0.15c
		4.0	60.95a ± 2.44e	15.50 ± 0.36d
		5.0	41.68b ± 2.47d	16.80 ± 0.95de
辽豆23 Liaodou23	0.05	0.0	35.91c ± 3.52c	18.07 ± 0.45e
		0.0	2.63e ± 2.63a	1.70 ± 0.10a
		1.0	12.86d ± 3.44b	3.80 ± 0.30b
		2.0	27.18c ± 2.14c	4.73 ± 0.47c
		3.0	42.84b ± 3.44d	13.03 ± 0.21d
		4.0	56.64a ± 3.85e	17.93 ± 0.15e
		5.0	47.23b ± 1.83d	18.63 ± 0.35ef
		6.0	45.89b ± 0.77d	19.17 ± 0.40f

不同字母为差异达显著水平($P \leq 0.05$)。以下各表相同。

Values within a column followed by different letters are significantly different at 0.05 probability level. The same as follow.

表2 外植体对大豆不定芽诱导率的影响
Table 2 Effect of explant on adventitious shoots regeneration rate of soybean cotyledonary node

外植体 获得方式 Mode	IBA 浓度 Concentration /mg·L ⁻¹	6-BA 浓度 Concentration /mg·L ⁻¹	不定芽诱导率 Adventitious shoots regeneration rate/%	每个外植 体的出芽数 Budding number of each explants
不保留子叶 Without cotyledon	0.05	0	2.36 ± 0.62a	0 ± 0.00a
		1.0	8.96 ± 2.58b	1.85 ± 0.79b
		2.0	17.23 ± 1.08c	3.67 ± 0.58c
		3.0	29.63 ± 1.48e	8.98 ± 0.97d
		4.0	35.67 ± 1.53f	12.65 ± 2.05e
		5.0	30.29 ± 1.54e	14.38 ± 0.54e
保留半片子叶 Reserving half cotyledon	0.05	0	6.51 ± 1.42a	2.30 ± 0.20a
		1.0	18.42 ± 1.67b	4.83 ± 0.25b
		2.0	43.08 ± 4.35c	5.23 ± 0.49b
		3.0	52.75 ± 0.65d	14.30 ± 0.46b
		4.0	67.69 ± 1.58f	17.87 ± 0.83d
		5.0	64.49 ± 2.09f	18.97 ± 0.25de
		6.0	57.47 ± 2.45e	20.53 ± 0.55e

2.3 不同基因型对不定芽诱导率的影响

比较辽豆 17、辽豆 18、辽豆 23 的不定芽再生情况。由表 1 可知,3 个供试品种不定芽诱导率及外植体出芽个数均无明显差异,适当浓度的 IBA 和 6-BA 组合均能有效地诱导 3 个品种不定芽的发生。

2.4 IBA 浓度对再生植株生根的影响

当再生植株生长至 2~3 cm 时,将其转称至 1/2MSB 附加不同浓度的 IBA 生根培养基中生根,如表 3 可知,不同浓度 IBA 诱导植株的生根率没有显著差异,但对生根的数目和生长状况有影响。不添加 IBA 时植株的根细、软、侧根少,长度显著长于其它组;当 IBA 浓度大于等于 0.5 mg·L⁻¹ 时平均根长差异不显著。当 IBA 浓度为 1.0 mg·L⁻¹ 时植株的主根粗壮、平均侧根数达到 14.07 个,显著多于其它组,表明 1/2MSB + 1.0 mg·L⁻¹ IBA 是适宜的生根培养基。

表 3 不同浓度 IBA 对大豆不定芽生根的影响

Table 3 Effect of IBA concentration on rooting in soybean adventitious shoots

IBA 浓度 IBA Concentration /mg·L ⁻¹	生根率 Rooting percentage /%	平均根数 Average number of roots	平均根长 Average long of roots/cm	生长状况 Growing condition
0.0	90.48 ± 2.89a	6.63 ± 0.31a	7.37 ± 0.34a	主根细,侧根少
0.5	90.54 ± 3.34a	8.14 ± 0.22b	3.51 ± 0.19b	主根较细,侧根较多
1.0	89.63 ± 3.39a	14.07 ± 0.64d	3.16 ± 0.11b	主根粗壮,侧根多
1.5	89.01 ± 3.35a	10.37 ± 0.73c	3.40 ± 0.24b	主根粗壮,侧根多
2.0	89.54 ± 4.26a	11.30 ± 0.74c	3.29 ± 0.14b	主根粗壮,侧根多

3 讨论

6-BA 是重要的植物外源激素,与生长激素 IBA 配合使用对丛生芽的形成影响很大。细胞分裂素 6-BA 可刺激子叶节丛生芽的产生,当 6-BA 浓度为 4.0 mg·L⁻¹ 时,不定芽诱导率最高;而且随着 6-BA 浓度的增高,每个外植体上不定芽数量呈增加的趋势。但是当在一个外植体上不定芽数量过多时,芽的进一步伸长受到抑制,较小的芽即使在伸长培养基上也不能生长,因此,4.0 mg·L⁻¹ 是诱导子叶节发生不定芽的适宜 6-BA 浓度。

从种子萌发到最后的生根移栽各个环节对植株的再生都是非常重要的。要及时将丛生芽进行分割,并转移至低浓度 6-BA 的培养基中,使之伸长,待无菌苗长至 3 cm 左右时,将其切下放入生根培养基中进行生根培养。发达健壮的根系对植株

生长以及移栽的存活是十分重要的,试验结果表明,当 IBA 浓度为 1.0 mg·L⁻¹ 时的主根粗壮、侧根多,为最佳浓度,有利于移栽。

参考文献

- [1] Hinchey M A W, Connor-Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using Agrobacterium-mediated DNA transfer[J]. Biotechnology, 1988, 6: 915-922.
- [2] Zhang Z Y, Xing A Q, Staswick P, et al. The use of glufosinate as a selective agent in Agrobacterium-mediated transformation of soybean[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1999, 56: 37-46.
- [3] Olhoft P M, Flagel L E, Donovan C M, et al. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method[J]. Planta, 2003, 216: 723-735.
- [4] Wright M S, Williams M H, Pierson P E, et al. Initiation and propagation of *Glycine max* L. M. :Plants from tissue-cultured epicotyls[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1987, 8: 83-90.
- [5] 李军,李霞,陈杭. 大豆茎尖离体培养再生植株[J]. 植物生理学通讯,2001, 37(2): 134. (Li J, Li X, Chen H. In vitro culture and plantlet regeneration of shoot tip of soybean[J]. Plant Physiology Communications, 2001, 37(2): 134.)
- [6] Barwale U B, Kems H R, Widholm J M. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryo genesis and organogenesis[J]. Planta, 1986, 167: 473-481.
- [7] Sato S, Newell C, Kolacz K, et al. Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration system [J]. Plant Cell Reports, 1993, 12: 408-413.
- [8] 刘博林,隗新民. 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): 11-13. (Liu B L, Li X M. Study on somatic embryogenesis and plant regeneration of two commercial soybean cultivars[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 1999, 21(2): 11-13.)
- [9] 袁鹰,刘德璞,郑培和,等. 大豆组织培养再生植株研究[J]. 大豆科学,2001,20(1): 9-13. (Yuan Y, Liu D P, Zheng P H, et al. Study on plant regeneration from soybean culture[J]. Soybean Science, 2001,20(1): 9-13.)
- [10] 王萍,王军军,商德虎,等. 影响大豆子叶节丛生芽形成的诱导因子研究[J]. 吉林农业科学, 2001,26(6): 20-23. (Wang P, Wang J J, Shang D H, et al. Effect of induce factors on multiple bud formation of cotyledonary node in soybean[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2001,26(6): 20-23.)
- [11] 邓向阳,卫志明. 大豆转化技术[J]. 植物生理学通讯,1998, 34(5): 381-387. (Deng X M, Wei Z M. Technology of soybean transformation[J]. Plant Physiology Communications, 2002, 34(5): 381-387.)
- [12] 刘金华,王丕武,武丽敏,等. 大豆子叶节丛生芽的诱导[J]. 吉林农业大学学报,2001,23(4): 15-17. (Liu J H, Wang P W, Wu L M, et al. The induction of multiple shoots via cotyledon nodes of soybean[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2001,23(4): 15-17.)
- [13] 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 Communications, 2002, 38(3): 260-261.)