

利用双目标组织建立高频大豆再生体系的研究

张 标,薛仁镐*,张 娟

(青岛农业大学 生命科学学院,山东 青岛 266109)

摘要: 利用双目标组织(即一个外植体同时含有子叶节和初生叶节两个目标组织)进行了大豆高频再生体系建立的研究,以便为高效大豆转基因技术体系的建立提供技术保障。结果表明,不同基因型之间大豆不定芽诱导率不同,在所试的5个大豆品种中,初生叶节不定芽诱导率最高的品种是合丰35,合丰25次之,分别达到50.0%,46.9%;而子叶节不定芽诱导率最高的品种是合丰25,为75.0%;总的不定芽诱导率最高的品种是合丰25,达到121.9%。不同浓度6-BA对丛生芽的诱导率在不同品种间有差异,6-BA浓度为1.5 mg/L时,合丰35的丛生芽诱导率最高,平均每个外植体诱导出6.7个丛生芽。

关键词: 大豆;组织培养;双目标组织;子叶节;初生叶节

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)04-0039-03

Establishment of High Frequency Regeneration of Soybean by Binary Target Tissues

ZHANG Biao, XUE Ren-Gao*, ZHANG Juan

(College of Life & Science, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: Soybean regeneration system was studied using an explant containing cotyledonary node and primary leaf node as the target tissue in the paper. The results showed that regeneration frequency of adventitious shoots was different among 5 soybean varieties tested. The variety with the highest regeneration frequency from the primary leaf node was Hefeng 35, reached up to 50.0%, and the variety with the highest regeneration frequency from the cotyledonary node was Hefeng 25; whereas the variety with the highest regeneration frequency from both the cotyledonary node and the primary leaf node was Hefeng 25, reached up to 121.9%. The inducing rate of different 6-BA concentration on multi-shoots was different among different variety. The inducing rate of the multi-shoots from Hefeng 35 was the highest when the concentration of 6-BA was 1.5 mg/L.

Key words: Soybean; Tissue culture; Binary target tissues; Cotyledonary node; Primary leaf node

大豆是世界上最重要的粮油作物之一,因此,其再生体系的建立和遗传转化的研究一直受到学者们的广泛关注。目前,大豆从器官发生途径和胚胎发生途径均能获得再生植株。

1980年,Cheng等^[1]首先报道了在附加高浓度6-BA的培养基上从大豆子叶节诱导出不定芽,进而获得再生植株。现已从大豆茎尖^[2]、下胚轴和小真叶^[3]、未成熟子叶^[4]、上胚轴和出生叶^[5]、成熟子叶^[6]、幼胚胚轴^[7]、初生叶节^[8]等外植体,通过器官发生途径获得再生植株。

1983年,Christianson等^[9]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。Lazzeri等^[10]、Barwale等^[4]、Ranch等^[11]、周思君等^[12]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。

目前最成熟最常用的大豆转基因技术是基因枪介导法和农杆菌介导法。基因枪法是利用大豆胚状体再生体系进行转化,农杆菌介导法是利用成熟子叶节器官发生途径进行转化。虽然这两种方法比较成熟,但与烟草、水稻等作物相比,其转基因效率低,

收稿日期:2007-10-18

基金项目:山东省教育厅基金(J05K04)

作者简介:张 标(1982-),男,山东泰安人,在读硕士研究生,研究方向:植物基因工程。

通讯作者:薛仁镐(1965-),男,吉林汪清人,副教授,博士,主要从事植物分子生物学与基因工程方面的研究。

还无法利用这两种方法开展功能基因组研究。大豆转基因效率低的原因之一是再生频率低,因此,如何提高大豆再生频率对高效大豆遗传转化体系的建立具有重要意义。本试验利用我国栽培大豆品种,以具有子叶节和初生叶节两个组织的外植体为目标组织进行了大豆高频再生体系建立的研究,以便为大豆转基因技术体系的建立奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试大豆品种

合丰 25、合丰 35、东农 42、东农 1168、鲁豆 10。

1.2 培养基

基本培养基:MS 大量元素,MS 微量元素,B5 有机元素,MS 铁盐,蔗糖 30 g/L,琼脂粉 8 g/L, pH5.8;萌发培养基:基本培养基+0.5 mg/L 6-BA;诱导培养基:基本培养基+0.5~1.5 mg/L 6-BA。

1.3 无菌苗的获得

在超净工作台将成熟大豆种子表面用 70%酒精灭菌 1 min,用 0.1% HgCl₂ 消毒 7~10 min,再用无菌水洗 4 次,接种在种子萌发培养基上,在培养室光照培养 14 d。

1.4 外植体的制备

取萌发 14 d 的大豆幼苗,在上胚轴的初生叶节处切去叶片,2 个子叶横向各切去 1 半,离子叶节 0.5 cm 处切去下胚轴,剩下的便是外植体。

1.5 丛生芽的诱导

将外植体接种在含 0.5~1.5 mg/L 6-BA 的诱导培养基上,在 25℃,16 h/8 h(光/暗)光周期下培养。

2 结果与分析

2.1 基因型对不定芽诱导率的影响

不同基因型对大豆不定芽诱导率有一定的差异,在所试的 5 个大豆品种中,初生叶节不定芽诱导率最高的品种是合丰 35,合丰 25 次之,分别为 50.0%,46.9%;而子叶节不定芽诱导率最高的品种是合丰 25,为 75.0%;总的不定芽诱导率最高的品种是合丰 25,达到 121.9%(表 1)。

2.2 不同浓度 6-BA 对丛生芽诱导的影响

在植物遗传转化过程中,往往存在着转基因植物不能成活的现象,而丛生芽的诱导可以克服这种现象,因此在此利用上述合丰 35、合丰 25、东农 42、东农 1168 等 4 个品种在 4 种不同 6-BA 浓度处理下,进行了子叶节丛生芽诱导研究。结果表明,合丰 35、合丰 25 在 6-BA 浓度为 1.5 mg/L 时,每个外

表 1 基因型对不定芽诱导率的影响

基因型	接种的外植体总数	诱导不定芽的子叶节数	子叶节不定芽诱导率(%)	诱导不定芽的初生叶节数	初生叶节不定芽诱导率(%)	总诱导率(%)
东农 42	45	25	55.6	17	37.7	93.3
合丰 25	32	24	75.0	15	46.9	121.9
合丰 35	40	20	50.0	20	50.0	100.0
东农 1168	20	14	70.0	8	40.0	110.0
鲁豆 10	30	13	43.3	13	43.3	86.7

注:总诱导率=[(诱导不定芽的子叶节总数+诱导不定芽的初生叶节总数)/总外植体数]×100%

植体分化出芽数量最多,平均为 6.7 和 6.3 个,而东农 42 在 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时,每个外植体分化出芽数量最多,为 6.0 个(表 2、图 1)。

表 2 不同浓度 6-BA 对丛生芽诱导的影响

基因型	6-BA 浓度(mg/L)	平均每个外植体诱导的丛生芽数(个)
合丰 35	0.5	3.8
	0.8	4.1
	1.0	4.6
	1.5	6.7
合丰 25	0.5	3.2
	0.8	4.7
	1.0	4.3
	1.5	6.3
东农 42	0.5	4.5
	0.8	3.8
	1.0	6.0
	1.5	5.0
东农 1168	0.5	3.7
	0.8	4.5
	1.0	3.2
	1.5	4.7

3 讨论

植物组织培养及植物基因转化的成功必须建立在良好的植物受体系统基础上,而良好的受体系统必须具有高频植株再生能力和高效遗传转化能力^[13]。目前大豆较成熟的转基因受体是大豆成熟子叶节组织和体细胞胚,利用这两种受体获得了大量的转基因大豆植株,但仍然存在转化效率低、重复性差等问题。因此要想大幅度提高大豆转基因效率必须在高频大豆再生体系的建立上要有新的突破。本研究首次引入双目标组织概念(即一个外植体同时具有子叶节组织和初生叶节组织)进行了高频植株再生研究,目的就是建立新的高频大豆再生体系,从而为高效大豆转基因技术体系的建立奠定基础。由于子叶节组织和初生叶节组织是一个外植体上的两个不同组织,因此分别从这两个组织诱导出不定芽时,其再生频率或转基因效率就是两者之和。因此只要能提高从双目标组织同时诱导不定芽的效



图1 从外植体诱导的不定芽
A. 从子叶节和初生叶节双目标组织诱导的不定芽, 上箭头所指的是初生叶节部位, 下箭头所指的是子叶节部位; B. 从子叶节组织诱导的丛生芽

率, 就能提高再生频率。本试验初步研究结果表明, 通过基因型的筛选、萌发阶段和诱导阶段 6-BA 浓度(数据未列)的调节能够提高大豆再生频率, 在所试的 5 个品种中, 合丰 25 的不定芽诱导率最高, 可达 121.9%, 这为高效大豆转基因技术体系建立的研究提供了参考。但研究过程中也发现, 提高子叶节组织不定芽诱导率时, 初生叶节组织不定芽诱导率下降; 反之亦然, 这使总的再生频率未能得到较大幅度的提高。因此, 如何同时提高双目标组织不定芽诱导率还有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Cheng T Y, Saka T, Voqui-Dinh T H. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture[J]. Plant Sci Lett, 1980, 19: 91-99.
- [2] Kartha K K, Pahl K, Leung M L, et al. Plant regeneration from meristems of grain legumes: soybean, cowpea, peanut, chickpea and bean[J]. Can J Bot, 1981, 59: 1671-1679.
- [3] 陈云昭, 王玉国. 大豆外植体培养再生植株的研究[J]. 山西农业大学学报, 1983, 3(1): 41-45.
- [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, Williams M H, Pierson R E. Initiation and propagation of *Glycine max* L. Merr. Plants from tissue-cultured epicotyls[J]. Plant Cell Tissue Org Cult, 1987, 8: 83-90.
- [6] Hinchee M A W, Connor-Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plant using *Agrobacterium*-mediated gene transfer[J]. Bio/Technology, 1988, 6: 915-922.
- [7] McCabe D E, Swain W F, Martinell B J, et al. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration[J]. Bio/Technology, 1988, 6: 923-926.
- [8] Kim J, LaMotte C E, Hack E. Plant regeneration in vitro from primary leaf nodes of soybeans (*Glycine max*) seedlings[J]. Plant Physiol, 1990, 136: 664-669.
- [9] Christianson M L, Warinck D A, Carlson P S. A morphogenetically competent soybean suspension culture[J]. Science, 1983, 222: 632-634.
- [10] Lazzeri P A, Hildebrand D F, Collins G B. A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean[J]. Plant Mol Bio Rep, 1985, 3: 160-167.
- [11] Ranch J P, Oglesby L, Zielinski A C. Plant regeneration from embryo-derived tissue cultures of soybean by somatic embryogenesis[J]. In Vitro Cell Dev Biol, 1985, 21: 653-657.
- [12] 周思军, 尹光初, 雷勃钧, 等. 从大豆胚诱导胚胎发生再生植株[J]. 大豆科学, 1989, 8(1): 39-45.
- [13] Parrott W A, Hoffman L M, Hildebrand D F, et al. Recovery of primary transformants of soybean[J]. Plant Cell Rep, 1989, 7: 615-617.