

大豆子叶节及苗期 NaCl 筛选试验研究

张云月, 王 鹏, 王丕武, 付永平, 李 勃

(吉林农业大学 生物技术中心, 吉林 长春 130118)

摘 要:以 NaCl 为筛选剂, 对 5 个大豆品种的子叶节诱导、丛生芽生根及大豆苗期的生长情况进行研究。结果表明:不同基因型大豆对 NaCl 的敏感性不同, 同一基因型的不同部位对 NaCl 的敏感性也存在差异。最终确定了 NaCl 对子叶节分化、丛生芽生根以及苗期生长适宜的筛选浓度。大豆子叶节分化 NaCl 临界筛选浓度: 吉农 27 和吉农 17 为 $225 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 吉林 30 和 DE2259 为 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 吉农 28 为 $175 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。丛生芽生根 NaCl 临界筛选浓度: 吉农 27 和吉农 17 为 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 吉林 30、DE2259 和吉农 28 为 $75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。大豆苗期 NaCl 临界筛选浓度: 吉农 27、吉农 17、吉林 30 和 DE2259 均为 $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 吉农 28 为 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词:大豆; 基因型; NaCl; 筛选

中图分类号: S565. 1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2011)03-0438-04

Susceptibility of Soybean Cotyledonary Node and Seedlings to NaCl Stress

ZHANG Yun-yue, WANG Peng, WANG Pi-wu, FU Yong-ping, LI Bo

(Biotechnology Center of Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China)

Abstract: During plant genetic transformation, the use of marker gene is an efficient method to select and identify transgenic plants. Using safe selectable marker not only screened transformants but also decreased potential risk of genetically modified food. In this study, NaCl was regarded as selectable marker. The effects of NaCl on cotyledonary node bud differentiation, rooting of shoots and growing of soybean seedling were investigated using five soybean varieties. The results showed that the effects of NaCl on different genotypes and explants exist differences. For cotyledonary node, the critical concentration of NaCl was $225 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ for Jinong 27 and Jinong 17; $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ for Jilin 30 and DE2259; $175 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ for Jinong 28. For rooting, the critical concentration of NaCl was $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ for Jinong 27 and Jinong 17; $75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ for Jilin 30, DE2259 and Jinong 28. For soybean seedling the critical concentration of NaCl was $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ for Jinong 27, Jinong 17, Jilin 30 and DE2259; $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ for Jinong 28.

Key words: Soybean; Genotype; NaCl; Screening

大豆[*Glycine max* (L.) Merrill]是我国重要的油料作物和高蛋白粮饲兼用作物。传统育种方法存在一定的局限性,随着分子生物学与基因工程的迅速发展,基因工程已成为大豆育种最有前途的新技术之一。在基因转化过程中,利用转化细胞获得了对筛选剂的抗性,在一定浓度的选择培养基上存活下来,而非转化的细胞则因不含该抗性基因而被抑制或杀死的原理,对转化子进行筛选^[1]。目前,转化体的筛选包括利用抗生素筛选、除草剂筛选和 β -葡萄糖苷酸酶(GUS)染色反应^[2-5]。选择标记基因的存在有可能影响目的基因的稳定性、加重受体植物细胞的代谢负担,而且人们还担心抗性标记基因的表达产物是否会被肠道内的寄生菌摄取而产生抗生素抗性,对人畜产生危害。这些潜在的问题

对转基因作物的进一步应用造成了一定的影响,也增加了人们对转基因食品安全性的担忧^[6-9]。而以对人体及环境没有毒害作用的 NaCl 代替抗生素作为筛选剂则不用产生这样的担忧,从而提高了转基因食品的安全性。

在对植物材料进行遗传转化之前,对受体材料进行选择性的抗生素敏感性试验是十分必要的。选择性抗生素浓度过低,不能充分抑制或杀死未转化细胞,造成假阳性率过高,增加筛选和检测的工作量;选择性抗生素浓度过高,又抑制甚至杀死了转化细胞,导致不能得到足量的转基因植株^[10-15]。该试验对 5 个基因型大豆在不同浓度 NaCl 筛选培养基中生长情况进行研究,以期以 *badh* 耐盐基因为选择标记基因的大豆遗传转化提供依据。

收稿日期:2011-01-21

基金项目:国家转基因专项资助项目(2011ZX08004-004)。

第一作者简介:张云月(1985-),女,硕士,研究方向为生物技术在作物遗传育种中的应用。E-mail:hettyzy@163.com。

通讯作者:王丕武(1958-),男,教授,主要从事生物技术与作物遗传育种研究。E-mail:peiww@yaho.com.cn。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 植物材料 大豆品种(系) DE2259、吉林 30、吉农 28、吉农 27 和吉农 17, 由吉林农业大学生物技术中心提供。

1.1.2 培养基配置 萌发培养基:1/2MSB 培养基 + 59 mg · L⁻¹ MES + 0.3% 蔗糖 + 0.6% 琼脂, pH 5.8。

芽诱导培养基: MSB 培养基 + 590 mg · L⁻¹ MES + 2 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.2 mg · L⁻¹ IBA + 3% 蔗糖 + 0.7% 琼脂, pH 5.8。

伸长培养基: MSB 培养基 + 590 mg · L⁻¹ MES + 0.2 mg · L⁻¹ IBA + 0.54 mg · L⁻¹ GA + 3% 蔗糖 + 0.7% 琼脂, pH 5.8。

生根培养基: MSB 培养基 + 590 mg · L⁻¹ MES + 3 mg · L⁻¹ IBA + 3% 蔗糖 + 0.7% 琼脂, pH 5.8。

1.2 试验方法

1.2.1 种子的灭菌和萌发 选取表面光滑、饱满、无病斑的大豆成熟种子, 采用氯气消毒法对其进行灭菌, 12~14 h 后取出。将消毒后的种子接种到萌发培养基中, (26 ± 1) °C、暗培养 3 d。

1.2.2 子叶节外植体的制备 暗培养 3 d 后取出大豆萌动种子, 用镊子剥去种皮, 用解剖刀沿种子中线纵向切开, 使 2 片子叶分开, 切去子叶的 1/3, 再去除下胚轴及顶芽, 然后将近轴面向下置于芽诱导培养基中。每皿 10 个子叶, (26 ± 1) °C、16 h 光照 / 8 h 黑暗下培养, 每 15 d 继代 1 次。

1.2.3 丛生芽的伸长及生根 待丛生芽可见时, 将其转移至伸长培养基中抽茎, 每 15 d 继代 1 次。待丛生芽长至 3~5 cm 时切下丛生芽, 并将其转移至生根培养基中生根。

1.2.4 大豆子叶节分化 NaCl 选择压的筛选 采取延迟筛选方式, 将切取的子叶节放在无选择剂的芽

诱导培养基中培养 3 d, 然后再将其转移到添加有不同浓度 NaCl 的芽诱导培养基中进行筛选培养。NaCl 的浓度分别设置为 0、50、100、150、175、200、225 和 250 mmol · L⁻¹。每个浓度接 30 个外植体, 培养 15 d, 计算子叶节的分化率。分化率(%) = (分化的子叶节数/总子叶节) × 100。3 次重复取平均值。

1.2.5 大豆子叶节丛生芽生根阶段 NaCl 选择压的筛选 将诱导出的无菌的丛生芽切下, 接入到含有不同浓度 NaCl 的生根培养基中。NaCl 的浓度分别设置为 0、25、50、75、100、125 和 150 mmol · L⁻¹。14 d 后统计生根情况。

1.2.6 大豆苗期 NaCl 选择压的确定 选取籽粒饱满的大豆种子播种于小纸杯中萌发, 待长出 2 片复叶后用不同浓度的 NaCl 溶液进行浇灌。NaCl 的浓度分别设置为 0、50、100、150、175、200、225、250、275 和 300 mmol · L⁻¹。每个处理 30 粒种子, 3 次重复, 20 d 后计算正常生长大豆比率, 从而确定大豆苗期的 NaCl 选择压。

2 结果与分析

2.1 NaCl 对大豆子叶节分化的影响

将 5 个基因型大豆的子叶节, 接种到含有不同浓度 NaCl 的选择培养基上培养时, NaCl 浓度为 50、100 mmol · L⁻¹ 时, 子叶节长势良好; NaCl 浓度为 150 mmol · L⁻¹ 时, 子叶节长势一般, 但均有丛生芽产生, 而 NaCl 浓度为 175~225 mmol · L⁻¹ 时, 子叶节体积变小, 颜色加深, 由黄绿色变成黑褐色最后死亡。对丛生芽分化率进行统计, 并对其进行方差分析。从表 1 可以看出, 不同基因型对 NaCl 的敏感性存在显著差异。吉农 27 和吉农 17 的 NaCl 临界筛选浓度为 225 mmol · L⁻¹; 吉林 30 和 DE2259 为 200 mmol · L⁻¹; 吉农 28 为 175 mmol · L⁻¹。

表 1 NaCl 浓度对不同基因型大豆子叶节丛生芽分化率的影响

Table 1 Effects of NaCl concentration on cotyledonary node bud differentiation of five soybean varieties (%)

基因型 Genotypes	NaCl 浓度 Concentration of NaCl/ mmol · L ⁻¹								均值 Average	5% 显著水平 α = 0.05	1% 极显著水平 α = 0.01
	0	50	100	150	175	200	225	250			
吉农 27 Jinong27	100	96.7	76.6	37.7	22.3	11.0	2.0	0	42.9167	a	A
吉农 17 Jinong17	100	93.3	71.0	35.7	23.3	9.0	1.0	0	41.9444	a	A
吉林 30 Jilin30	100	92.3	65.7	32.3	24.3	5.7	0	0	38.3333	b	B
DE2259	100	92.2	63.3	33.3	21.1	4.0	0	0	37.3611	b	B
吉农 28 Jinong28	100	91.1	58.9	23.3	4.0	0	0	0	34.5833	c	C

ä%â, ð § Ç § ð ` t ô Hœ* T i
 ! Ô~ ç CÂž 1 ç ® ý ò Ž À q ~ ž ' ¶
 5 * á ¶ æ ... ð ' Öq Ô~ ç i T ~ ž é ' ¶
 é ... ð # 1 äçéçâ ë ð^â ý ò q ' ¶ 5 â q
 Ô~ ç i T ~ ž ð 4 ~ é , d ' Öã Ü Ø K ž 1 éçé
 äââ ë ð^â ý ò ' ¶ 5 â q Ô~ ç i T Þ † Þ
 e Ø K ž 1 ääçéçâ ë ð^â ý ò ' ¶ 5 â q
 Ô~ ç • b i T x Ý é Ü é ' ¶ äç ... ð # 1 äçé

çâ ë ð^â ý ò ' ¶ 5 q Ô~ ç ° › ~ ž ã ž
 ý † { äö , é ý , i öž 1 éçéääâ ë ð^â
 ý ò ' ¶ 5 q Ô~ ç › f ~ ž ð 4 ž , 9 „ ñ äö
 , ~ é ä Ü Ø ž 1 ääçéçâ ë ð^â ý ò ' ¶
 5 q Ô~ ç Á w ~ ž ð › k l è ò z äÄ i #
 Þ æ ' Ô~ ç ~ ž ö c ý ò q & 1 r s Ž À á
 ó ò ääçéçâ . äâç , äé , Q éç ë ð^â ç ,
 äéç , äéQ äââ ë ð^â é

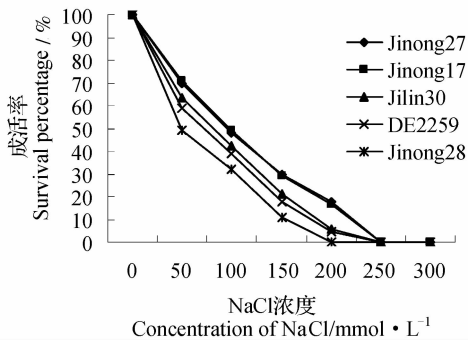
u ä, ý ò ä á © ð § Ç § ð * È É

ä, ô ! ý ò ! ! ! ! ! # & # ! á Ü ä

5 6 Ð	ý ò Ž À ò			!!	ý ò á	ë ð ^â	, ä	ç Ü ³ Á ú Ø	ä Ü B ³ Á ú Ø
ö l&	á	ää	çâ	éç	ääâ	ääç	ð#	° í ä%äç	° í ä%ää
¶ , äé ù äé	ääâ	çé%â	äé%â	ää%â	â	â	â	äé%âçâ	ð
¶ , äé ù äé	ääâ	äé%â	ää%â	ç%â	â	â	â	äé%âçâ	ñ
¶ . äâ ù äâ	ääâ	äâ%â	ää%â	â	â	â	â	äâ%âää	ò
ó ò ääçé	ääâ	äé%â	ää%â	â	â	â	â	äâ%âèè	ò
¶ , äé ù äé	ääâ	äé%â	ää%â	â	â	â	â	äé%âçâ	ó

ä%â, ! " ¼ 3 ý ò ô Hœ* T i
 ž • Á < q äâ% ý ò Ž À ò À “ Wf d & '
 • # ~ é q => é ä æ ý ò Ž À q " # äö , !
 ô i T Þ † ü ü é Ý ý D Ü E † › á äâè äâ
 ... d ' Ö & ' ö , Ü E ~ é ä ð ¥ j k Þ † v ç ®
 > À q ü ü k l è õ – ääçéçâ ë ð^â q ý ò
 ² ³ § ó & ' ± ð † v & 1 ~ q ° › k l è 6
 ' ä Ü äââ ë ð^â q ý ò ² ³ Q ¶ , äé •
 # q s Ü Ü ô äçâ ë ð^â q ý ò ² ³ Q
 ó ò ääçéçâ . äâç , äéç , äé • # q s Ü Ü é

' W ç , äé T ¶ , äé d ý ò D ~ } 3 ä á È
 ¶ . äâ T ó ò ääçéçâ ç , äé d ý ò q D ~ } m é
 ® ± æ w ' / q ç ® › i d ý ò q µ ¶ ~ - ç
 ® é & ' • # d ý ò q D ~ } 3 ä Ö ~ ç q ~
 ž d ý ò q D ~ } m ä d ý ò q r s } µ ¶ é
 6 ' ä ý ò / Q r s ç Ü ± ä æ ö ú l á ç ® 5
 6 Ð q : x i • ' / q ç ® › i d ý ò p e µ ¶
 ~ q ç ® é
 K a P ç Ý c > * á s Ü µ é w x l d è x
 / 0 9 Q µ ¶ q s Ü j / Q r s ç Ü ä ñ _ s Ü
 } µ ¶ q ' / T j k O — æ ä Ä i » 5 6 q ç
 Ý O < ä ä é { x á s j # ú q i . - È ? _ ¼ \$
 q é k g ½ r s j q Ž À æ » ä Ü O < æ » ä ¼
 Ž À c » ä l m Ö š „ ... q ~ é ä Q v o C d „
 ... ~ é 3 À q => ä K F q 5 6 q ç Ý c > * á
 s j q # ú _ ! ô 8 ä Ž À é r s j # ú q ± .
 d % | Ô ~ ç q ` a - 1 w W q => é K € •
 F q 5 6 q a P ç Ý ± ä Ý ² r s j # ú c F ä
 ° U . ç Ý q „ ... 6 Q ~ é V { u m ä Ø a ö
 d r s j D ~ u m ð k l Ø r s j # ú c G ä
 Ä V 7 0 D ç Ý „ ... f Ö f Ý ä 0 ; ç Ý x q ,
 ¼ 9 » ä ö 5 w » ; W q = / . c & é 6 ' ä
 ç Ý c > * e • - È - r s — d ç Ý % € • r s é
 0 - { ° Ð q r s j d ç Ý x € • r s È w
 h 2 3 t u { ° ç 5 6 ö , q ° - -) ä w . u á
 ç 5 6 ' / í V A ° Ö - Ä E ~ & h ä è v & .
 q ~ 0 { ° - Ñ “ » ¼ ä # 2 & h € > ä è é 1 2



E ä, ý ò ä á © ! " ¼ 3 Þ ¥ È * È É
 ö %â, ô ! ý ò ! ! " ##
 ! &

â, € , •

& ' È * À e f ö 0 ä † † d ý ò 1 w W
 q D ~ ä ¼ ç ® 5 6 Ð q D ~ V { ç ® é K œ 1 2
 * ä g È % | q f Ý ä Ö ~ ç q ~ ž æ È • #

采用 NaCl 为筛选剂,为以耐盐基因 *badh* 为选择标记基因的大豆遗传转化研究奠定了一定的理论基础。

4 结论

不同基因型 NaCl 的敏感程度存在显著差异,相同基因型的不同材料部位对 NaCl 浓度敏感性也存在差异。大豆子叶节分化 NaCl 临界筛选浓度:吉农 27 和吉农 17 为 $225 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$;吉林 30 和 DE2259 为 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$;吉农 28 为 $175 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。丛生芽生根 NaCl 临界筛选浓度:吉农 27 和吉农 17 为 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$;吉林 30、DE2259 和吉农 28 为 $75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。大豆苗期 NaCl 临界筛选浓度:吉农 27、吉农 17、吉林 30 和 DE2259 均为 $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$;吉农 28 为 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

参考文献

- [1] 王关林. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京:科学出版社, 1998:168-188. (Wang G L. Plant genetic engineering principles and technology[M]. Beijing: Science Press, 1998: 168-188.)
- [2] Vasil I K. Molecular improvement of cereal[J]. Plant Molecular Biology, 1994, 25: 925-937.
- [3] 克拉克,著. 顾红雅,翟礼嘉,译. 植物分子生物学实验手册[M]. 北京:高等教育出版社,1998. (Clark M S, ed. Gu H Y, Qu L J, trans. Experimental plant molecular biology manual[M]. Beijing: Higher Education Press,1998.)
- [4] Liu J F, Su Q, An J L, et al. Transfer of a minimal linear marker free and vector free *smGFP* cassette into soybean via ovary-drip transformation[J]. Biotechnology Letters, 2009, 31(2): 295-303.
- [5] Yoder J L, Goldsbrough A P. Transformation systems for generating marker-free transgenic plants[J]. Biotechnology, 1994, 12: 263-257.
- [6] 贾士荣. 转基因植物食品中标记基因的安全性评价[J]. 中国农业科学, 1997,30(2):1-15. (Jia S R. Safety evaluation of marker genes in transgenic food plants[J]. Scientia Agricultura Sinica, 1997, 30(2): 1-15.)
- [7] 于恒秀,刘巧泉,徐丽,等. 无抗性选择标记转基因软米和糯稻新品系的育及中间试验[J]. 作物学报,2009,35(6):967-973. (Yu H X, Liu Q Q, Xu L, et al. Breeding and field performance of novel soft and waxy transgenic rice lines without selectable markers [J]. Acta Agronomica Sinica, 2009, 35(6): 967-973.)
- [8] Rahman S M, Takagi Y, Kinoshita T. Genetic control of high stearic acid content in seed oil of two soybean mutants [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 95: 772-776.
- [9] Romano E, Soares A, Proite K, et al. Transgene elimination in genetically modified dry bean and soybean lines[J]. Genetic Molecular Research, 2005, 4: 177-184.
- [10] 杨金慧,王丕武,曲静. *BADH/pepB* 双价基因无选择标记表达载体转化苜蓿的初步研究[J]. 中国草地学报,2009,31(4): 20-23. (Yang J H, Wang P W, Qu J, et al. Research on transforming *BADH* and *pepB* bivalent gene with marker free expression vector into *Alfalfa* [J]. Chinese Journal of Grassland, 2009, 31(4): 20-23.)
- [11] 邹莉,文艺,张匀华,等. 大豆子叶节对潮霉素敏感性研究[J]. 大豆科学,2008,27(2):267-269. (Zou L, Wen Y, Zhang J H, et al. Susceptibility of soybean cotyledonary node to Hygromycin B [J]. Soybean Science, 2008, 27(2):267-269.)
- [12] 袁鹰,刘德璞,王玉民,等. 卡那霉素对大豆生长的抑制及筛选试验研究[J]. 大豆科学,2003,22(4):261-263. (Yuan Y, Liu D P, Wang Y M, et al. Study on critical and screen soybean grow of kanamycin [J]. Soybean Science, 2003, 22(4): 261-263.)
- [13] 张宁,司怀军,栗亮,等. 转甜菜碱醛脱氢酶基因马铃薯的抗旱耐盐性[J]. 作物学报,2009,35(6):1146-1150. (Zhang N, Si H J, Li L, et al. Drought and salinity tolerance in transgenic potato expressing the betaine aldehyde dehydrogenase gene [J]. Acta Agronomica Sinica, 2009, 35(6): 1146-1150)
- [14] 刘玉杰,王宝增. 不同品种大豆耐盐性的比较研究[J]. 安徽农业科学, 2007,35(15):4462-4464. (Liu Y J, Wang B Z. Comparison of the salt tolerance in different *Glycine max* L. varieties [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2007, 35(15): 4462-4464)
- [15] 刘海坤,卫志明. 大豆遗传转化研究进展[J]. 植物生理与分子生物学学报,2005,31(2):126-134. (Liu H K, Wei Z M. Recent advances in soybean genetic transformation [J]. Acta Phytobiologica Sinica, 2005, 31(2): 126-134.)
- [16] Zubko E, Scutt C, Meyer P. Intrachromosomal recombination between attP regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes [J]. Nature Biotechnology, 2000, 18: 442-445.