

刘思言,高 玮,夏海丰,等. 植物激素对大豆愈伤组织诱导和继代培养的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(4):40-42.

植物激素对大豆愈伤组织诱导和继代培养的影响

刘思言¹, 高 玮², 夏海丰², 姚 丹¹, 关淑艳¹, 刘洋洋¹, 王丕武¹
(1. 吉林农业大学, 吉林长春 130118; 2. 吉林省通化市农业科学研究院, 吉林梅河口 135007)

摘要:以 3 个基因型大豆无菌实生苗的真叶和胚轴为外植体,在 MS 培养基上附加不同浓度的 TDZ、NAA、6-BA 以及 2,4-D,研究不同激素浓度对大豆愈伤组织诱导及继代培养的影响,结果表明:在愈伤组织诱导阶段,以真叶为外植体时,吉农 28 + 1.5 mg/L TDZ + 0.2 mg/L NAA + 200 mg/L 活性炭为最佳组合;以胚轴为外植体,吉农 17 + 1.0 mg/L TDZ + 0.1 mg/L NAA + 200 mg/L 活性炭为最佳组合。在继代组织培养阶段,对真叶诱导形成的愈伤组织而言,吉农 17 + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L NAA + 3.0 mg/L 2,4-D 为最佳组合;对胚轴诱导的愈伤组织而言,吉农 17 + 1.5 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 2.0 mg/L 2,4-D 为最佳组合。

关键词:大豆;愈伤组织;激素;继代培养

中图分类号: S565.104 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)04-0040-02

大豆是全世界重要的粮食和经济作物,也是人类主要的食用蛋白和工业原料来源,与人们的日常生活息息相关^[1-2]。大豆的组织培养技术起步较晚,直到 20 世纪 80 年代的中后期大豆组织培养技术才取得了突破性的进展,大豆的原生质体培养、子叶节培养和胚尖培养相继取得了成功^[3-13]。但大豆愈伤组织诱导的研究相对较少,而愈伤组织诱导具有外植体来源广泛,扩繁量大等优点^[14]。尤其是随着近些年来大豆遗传转化的研究越来越多,能通过愈伤组织诱导建立一个高效的遗传转化受体系统更具有重要的意义。本试验以 TDZ、NAA、6-BA、2,4-D 为供试激素作为生长调节剂,以吉农 28、吉农 27、吉农 17 3 种基因型为材料,进行大豆愈伤组织的诱导和继代培养,以期找到最适合诱导和继代培养大豆愈伤组织的培养基,为建立一个高效的大豆愈伤组织遗传转化受体系统奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

吉农 28、吉农 27、吉农 17 的种子均由吉林农业大学生物技术中心提供。

1.2 试验方法

1.2.1 种子的萌发 挑取成熟饱满的大豆种子,先用 75% 的乙醇消毒 30 s,再用 0.1% 的升汞溶液消毒 10 min,无菌水冲洗 3~5 次,接种到 MS 基础培养基上,培养 7 d 后取胚轴,14 d 后取真叶作为外植体材料。

1.2.2 愈伤组织的诱导 以无菌实生苗的胚轴、真叶为外植体,分别接种于添加不同浓度激素的 MS 愈伤组织诱导培养基中,采用四因素三水平的 $L_9(3^4)$ 正交设计(表 1),将各处理放置于黑暗条件下培养 7 d,然后置于恒温的黑暗 12 h,光照 12 h 的培养箱中,于 20 d 后统计其愈伤组织诱导情况。

表 1 大豆愈伤组织诱导正交试验因素及水平

水平	因素			
	A:基因型	B:TDZ 浓度 (mg/L)	C:NAA 浓度 (mg/L)	D:活性炭浓度 (mg/L)
1	吉农 28	0.5	0.1	0
2	吉农 27	1.0	0.2	100
3	吉农 17	1.5	0.3	200

1.2.3 愈伤组织的继代 将培养 25 d 左右的愈伤组织置于添加不同浓度激素的 MS 继代培养基中培养,采用四因素三水平的 $L_9(3^4)$ 正交设计(表 2),并于 20 d 后统计结果。

表 2 大豆愈伤组织继代诱导试验因素及水平

水平	因素			
	A:基因型	B:6-BA 浓度 (mg/L)	C:NAA 浓度 (mg/L)	D:2,4-D 浓度 (mg/L)
1	吉农 28	0.5	0.1	1.0
2	吉农 27	1.0	0.2	2.0
3	吉农 17	1.5	0.3	3.0

2 结果与分析

2.1 大豆真叶外植体愈伤组织的诱导

取培养 10 d 后的无菌苗的真叶为外植体,接种到愈伤组织诱导培养基上,20 d 后记录,结果见表 3。由表 3 可以看出,NAA 对以真叶为外植体影响最显著,其次为激素 TDZ,而大豆基因型和活性炭的影响较小。同时组合 $A_1B_3C_2D_3$ 对大豆真叶外植体愈伤组织的诱导效果最好,即吉农 28 + 1.5 mg/L TDZ + 0.2 mg/L NAA + 200 mg/L 活性炭为最佳组合。

2.2 大豆胚轴外植体愈伤组织的诱导

取培养 5 d 后的无菌苗的胚轴为外植体,接种到愈伤组织诱导培养基上。20 d 后记录,结果见表 4。由表 4 可以看

收稿日期:2013-08-19
基金项目:吉林省科技发展计划(编号:201101111);吉林省教育厅科学技术研究项目(编号:2011-41);吉林省科技厅项目(编号:20120215);吉林省科技成果转化补助项目(编号:2009S044);吉林农业大学科研启动基金(编号:201242)。
作者简介:刘思言(1979—),女,吉林四平人,硕士,讲师,主要从事作物生物技术研究。E-mail:siyan_2001@163.com。
通信作者:王丕武,教授,博士生导师。E-mail:peiwuw@yahoo.com.cn。

表 3 大豆真叶外植体愈伤组织诱导

处理	A:基因型	B:TDZ 浓度	C:NAA 浓度	D:活性炭 浓度	出愈率 (%)
1	1	1	1	1	8.3
2	1	2	2	2	33.3
3	1	3	3	3	41.6
4	2	1	2	3	33.3
5	2	2	3	1	25.0
6	2	3	1	2	16.7
7	3	1	3	2	25.0
8	3	2	1	3	8.3
9	3	3	2	1	33.3
k_1	27.7	11.1	11.1	22.2	
k_2	25.0	22.2	33.3	25.0	
k_3	22.2	30.5	30.5	27.7	
R	5.5	19.4	22.2	5.5	

表 4 大豆胚轴外植体愈伤组织诱导

处理	A:基因型	B:TDZ 浓度	C:NAA 浓度	D:活性炭 浓度	出愈率 (%)
1	1	1	1	1	33.3
2	1	2	2	2	25.0
3	1	3	3	3	25.0
4	2	1	2	3	8.3
5	2	2	3	1	8.3
6	2	3	1	2	25.0
7	3	1	3	2	8.3
8	3	2	1	3	41.6
9	3	3	2	1	16.7
k_1	27.8	16.6	33.3	19.4	
k_2	13.9	25.0	16.7	19.4	
k_3	47.1	22.2	13.9	25.0	
R	33.2	8.4	19.4	5.6	

出,以胚轴为外植体诱导形成愈伤组织时,基因型的影响最大,NAA、活性炭的影响其次,影响最小的因素是 TDZ。同时最佳组合为 A₃B₂C₁D₃,即吉农 17 + 1.0 mg/L TDZ + 0.1 mg/L NAA + 200 mg/L 活性炭对大豆胚轴外植体愈伤组织的诱导效果最好。

2.3 大豆真叶愈伤组织的继代培养

继代培养 10 d 后进行观察,结果见表 5。由表 5 可以看出,基因型对以真叶为外植体的愈伤组织生长影响最为显著,其次是 NAA、6-BA、2,4-D 对真叶为外植体的愈伤组织生长影响最小。最优组合为 A₃B₁C₃D₃,即吉农 17 + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L NAA + 3.0 mg/L 2,4-D 为最佳组合。

2.4 大豆胚轴愈伤组织继代培养

将以胚轴为外植体的大豆愈伤组织继代到以新的激素配比而成的继代培养基中,10 d 后观察,结果见表 6。由表 6 可以看出,NAA 对以胚轴为外植体的愈伤组织生长的影响最大,当浓度为 0.2 mg/L 时愈伤组织呈现最好的生长状态。其次为 6-BA、2,4-D,添加 6-BA、2,4-D 后愈伤组织增殖变快,基因型的影响相对来说较小。最优组合为 A₃B₃C₂D₂,即吉农 17 + 1.5 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 2.0 mg/L 2,4-D 为最佳的组合。

3 讨论

目前,大豆组织培养研究中虽然使用的外植体不同,但愈

表 5 大豆真叶外植体愈伤组织继代培养试验结果分析

处理	A:基因型	B:6-BA 浓度	C:NAA 浓度	D:2,4-D 浓度	出愈率 (%)
1	1	1	1	1	41.7
2	1	2	2	2	33.3
3	1	3	3	3	58.3
4	2	1	2	3	66.7
5	2	2	3	1	58.3
6	2	3	1	2	41.7
7	3	1	3	2	75.0
8	3	2	1	3	50.0
9	3	3	2	1	66.7
k_1	44.4	61.1	44.5	55.6	
k_2	55.6	47.2	55.6	50.0	
k_3	63.9	55.6	63.9	58.3	
R	19.5	13.9	19.4	8.3	

表 6 大豆胚轴外植体愈伤组织继代培养

处理	A:基因型	B:6-BA 浓度	C:NAA 浓度	D:2,4-D 浓度	出愈率 (%)
1	1	1	1	1	66.7
2	1	2	2	2	58.3
3	1	3	3	3	41.7
4	2	1	2	3	58.3
5	2	2	3	1	33.3
6	2	3	1	2	75.0
7	3	1	3	2	66.7
8	3	2	1	3	41.7
9	3	3	2	1	83.3
k_1	55.6	63.9	61.1	61.1	
k_2	55.5	44.4	66.6	66.7	
k_3	63.9	66.7	47.2	47.2	
R	8.4	22.3	19.4	19.5	

伤组织的诱导多以一定浓度的 2,4-D 和 6-BA 配合使用,朱学艺等^[15]在培养基中添加 6-BA 后,愈伤组织出愈率低,形成的愈伤组织结构紧密,呈小颗粒状;NAA 和 6-BA 结合使用诱导出的大豆愈伤组织也呈现质地坚硬的特点,愈伤组织量也相对较少^[16]。TDZ 是一种苯基脲衍生物,具有类细胞分裂素活性,已被广泛用于大豆组织培养,在孙明杰^[24]等的研究中使用低浓度 TDZ 和 6-BA 配比,通过愈伤组织途径获得再生植株,提高了植株再生效率。本研究以 3 种不同基因型大豆的真叶及胚轴为外植体,不同的激素配比进行大豆愈伤组织诱导和继代研究,结果表明,在愈伤组织诱导阶段:以真叶为外植体时,最佳的组合为吉农 28 + 1.5 mg/L TDZ + 0.2 mg/L NAA + 200 mg/L 活性炭;当以胚轴作为外植体时,诱导愈伤组织最佳组合为吉农 17 + 1.0 mg/L TDZ + 0.1 mg/L NAA + 200 mg/L 活性炭。在愈伤组织继代培养阶段:以真叶作为外植体时,最佳的组合为吉农 17 + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L NAA + 3.0 mg/L 2,4-D;以胚轴为外植体时,最佳的组合为吉农 17 + 1.5 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 2.0 mg/L 2,4-D。

参考文献:

[1]Wang H J,Murphy P A. Isoflavone content in commercial soybean foods[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994, 42: 1666-1673.

陆敏佳,莫秀芳,王 勤,等. 藜麦基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 江苏农业科学,2014,42(4):42-45.

藜麦基因组 DNA 提取方法的比较

陆敏佳,莫秀芳,王 勤,陆国权,蒋玉蓉

(浙江农林大学农业与食品科学学院,浙江杭州 311300)

摘要:为了快速获取高质量的藜麦基因组 DNA,采用改良的 CTAB 法、SDS 法和高盐低 pH 值法等 3 种方法分别提取藜麦不同组织(叶、茎、根部)的基因组 DNA。通过琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法测定比较所提 DNA 的质量和产量,同时进行了 PCR-SSR、SSCP 等分子检测。用不同方法提取藜麦不同组织部位 DNA 的结果表明:不同提取方法的凝胶检测条带均比较清晰,且无明显降解;改良的 CTAB 法所提取的 DNA 产率最高,SDS 法其次,而高盐低 pH 值法最低;不同方法提取的叶片 DNA 产率均明显高于根部和茎部;改良的 CTAB 法和高盐低 pH 值法所提取的 DNA 质量较好,多酚类化合物和多糖等杂质去除得比较完全。PCR-SSR 和 SSCP 检测结果表明:不同方法和不同组织所提取的 DNA 均能跑出良好的条带,适合进行后续的分子生物学研究。

关键词:藜麦;DNA 提取方法;分子检测;SSR;SSCP

中图分类号:S512.901 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)04-0042-04

藜麦(*Chenopodium quinoa* Willd),又称南美藜、藜谷、奎奴亚藜等,是一年生的藜科草本作物,原产于南美洲安第斯山脉海拔 2 800~4 200 m 的地区,分布于 12°N~39°S 的范围,在安第斯山脉已有 5 000 多年的种植历史,被印加人称为“谷物之母”^[1]。藜麦蛋白质含量高,具有近乎完美的氨基酸组成,含有较高的钙磷铁,是联合国 FAO 唯一认定的完美营养食品,被誉为“未来的超级谷物”“营养黄金”“有机谷类之王”等^[2-3]。研究表明,长期食用藜麦,对心脏病、高血压、高

血糖、高血脂等有很好的辅助治疗作用,此外还有增强免疫力、修复体力、补充营养、减肥等功效^[4-5]。联合国大会宣布 2013 为“国际藜麦年”,旨在让世界更多地关注藜麦的生物多样性和营养价值在提供粮食和营养安全等方面所发挥的作用。藜麦的营养和开发利用价值在最近几十年才得到人们的广泛认识和重视。目前,藜麦的研究主要集中在生物学特性^[6-7]、化学成分^[8-9]、抗逆性等生理学特性^[10-11]方面。与国外相比,我国对藜麦的研究还较少,尤其在藜麦分子生物学方面的研究几近空白。获取高质量的 DNA 样品是植物分子生物学研究的基础,而研究者对不同植物以及相同植物不同部位的 DNA 提取、处理方法又有所区别^[12-16],目前尚无关于藜麦基因组 DNA 提取方法的报道。本研究用改良的 CTAB 法、SDS 法、高盐低 pH 值法 3 种不同方法分别提取藜麦的幼叶、茎、根部基因组 DNA,同时进行 SSR 和 SSCP 等分子标记检测,旨在筛选出一种快速、简便且可获得高质量 DNA 分子的提取方法,为进一步开展藜麦分子生物学研究提供参考。

收稿日期:2013-08-10

基金项目:国家自然科学基金(编号:31301372);浙江省重大科技专项计划(编号:2011C12030);浙江农林大学创新训练计划(编号:201301004)。

作者简介:陆敏佳(1992—),女,浙江嘉兴人,研究方向为种子科学。
E-mail:1035660826@qq.com。

通信作者:蒋玉蓉,博士,主要从事植物分子育种和种质创新研究。
E-mail:yurongjiang746@126.com。

[2]杨 超.大豆植株再生和遗传转化技术体系的研究[D].南京:南京农业大学,2009.

[3]Cheng T Y, Saka H, Voqui - Dinh T H. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture[J]. Plant Science Letters,1980,19:91-99.

[4]肖文言,王连铮.大豆幼荚子叶原生质体培养及植株再生[J].作物学报,1994,20(6):665-669,769.

[5]王升吉,吴元华,王洪岩,等.大豆不同外植体组织培养及再生研究[J].沈阳农业大学学报,1999,30(3):255-259.

[6]Yoshida T. Adventitious shoot formation from hypocotyls sections of mature soybean seeds[J]. Breeding Science,2002,52:1-8.

[7]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):32-35.

[8]Wang P, Wang G, Jing J I, et al. A novel system for proliferation, maintenance and plantlet germination from somatic embryo of soybean[J]. Acta Botanica Sinica,2004,46(2):154-158.

[9]林树柱,曹越平,卫志明,等. 6-BA 诱导大豆子叶节和茎尖出芽的研

究[J]. 上海交通大学学报:农业科学版,2005,23(2):138-142.

[10]李海燕,武小霞,刘 森,等.大豆子叶节、胚尖再生植株的研究[J].大豆科学,2007,26(5):709-712.

[11]孙文丽,刘显辉,吴元华,等.大豆胚尖再生体系的建立及转基因初步研究[J].湖北农业科学,2008,47(6):615-618.

[12]张东旭,张 洁,商 蕾,等.大豆胚尖再生体系的研究[J].河北农业大学学报,2008,31(4):7-13.

[13]武小霞,李 静,姜成涛,等.大豆子叶节再生中植物生长调节剂浓度及基因型筛选[J].中国油料作物学报,2011,33(2):123-129.

[14]谢从华,柳 俊.植物细胞工程[M].北京:高等教育出版社,2004:236.

[15]朱学艺,梁晓芳,李红芳.激素对大豆悬浮细胞系愈伤组织诱导的影响[J].厦门大学学报:自然科学版,2008,47(4):562-566.

[16]李大玮, Schmid J, Keller E R. 植物生长调节剂的使用和大豆愈伤组织的诱导及保持[J].遗传,1989,11(2):1-4,49.