

大豆两种外植体不定芽诱导能力的比较

王罡¹,王娇^{2,3},王萍²,季静¹

(1. 天津大学 环境科学与工程学院,天津 300072;2. 淮海工学院 海洋学院,江苏 连云港 222005;3. 江苏师范大学 生命科学院,江苏 徐州 221116)

摘要:以大豆6个基因型的胚尖和下胚轴为外植体,研究了大豆不同基因型在胚尖、下胚轴两种再生体系中的不定芽诱导率、芽数和芽长情况,并比较了各基因型两种外植体的再生能力。结果表明:大豆不定芽的产生对基因型具有依赖性。在胚尖再生体系中,不定芽诱导率以吉林35较好;芽数以吉林35和合丰35较好;芽长以黑农44较好。在下胚轴再生体系中,不定芽诱导率以淮豆4号、黑农44、淮豆9号和吉林35较好;芽数除黑农40较差外,其他5个基因型相似;芽长以淮豆9号、黑农44和合丰35较好。综合不定芽诱导率、芽数、芽长比较两种外植体的再生能力可知,合丰35适合于胚尖和下胚轴两种再生体系,黑农40较适合于胚尖再生体系,淮豆9号较适合于下胚轴再生体系。

关键词:大豆(*Glycine max* L.);胚尖;下胚轴;不定芽

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

DOI:10.11861/j.issn.1000-9841.2014.05.0680

Comparison on Adventitious Buds Induction Capacities of Two Kinds of Explants in Soybean

WANG Gang¹, WANG Jiao^{2,3}, WANG Ping², JI Jing¹

(1. School of Environmental Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. School of Marine Science and Technology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 3. School of Life Science, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, China)

Abstract: To compare regeneration capacities of two kinds of explants in soybean (*Glycine max* L.), the induction rate, number and length of adventitious buds were investigated with embryonic tips and hypocotyls as explants. The results showed that the adventitious bud production depended on the genotypes applied in soybean. In the embryonic tip regeneration system, the maximum induction rate of adventitious buds was observed in Jilin 35, and the maximum number of adventitious buds was observed in Jinlin 35 and Hefeng 35, while as the longest adventitious buds appeared in Heinong 44. In the hypocotyls regeneration system, desired induction rates of adventitious buds were realized in Huaidou 4, Heinong 44, Huaidou 9 and Jinlin 35. Similar number of adventitious buds were achieved in all of those genotypes except for Heinong 40 possessing less adventitious buds. Furthermore, the maximum length of adventitious buds appeared in genotypes Huaidou 9, Heinong 44 and Hefeng 35. The results indicated that Hefeng 35 had the best regeneration capacity in both regeneration systems, based on the data from induction rates of adventitious buds, number and length of adventitious buds, and their regeneration capacities. In addition, Heinong 40 may to be more suitable for embryo tip regeneration system, and Huaidou 9 was more desirable for hypocotyl regeneration system.

Key words: Soybean(*Glycine max* L.); Embryonic tip; Hypocotyl; Adventitious bud

大豆(*Glycine max* L. Merrill)是自花授粉植物,其遗传变异范围狭窄,依靠传统育种方法改善和优化品种性状比较困难,而通过转基因技术改良作物品种的遗传特性相对较容易。因此,大豆组织培养再生体系的研究是高效遗传转化的前提。大豆组织培养主要有体细胞胚发生途径和器官发生途径^[1]。大豆的器官发生途径由于是用大豆成熟种子无菌苗切割外植体,比如子叶节、胚尖、下胚轴,材料来源方便、不受生长季节限制而受到广泛关注。子叶节作为外植体用于大豆组织培养的研究较多^[2-5],近年来以大豆胚尖作为外植体的研究逐渐增加^[6-10],相比之下,以下胚轴作为外植体的研究较少^[11-12]。植物的组织培养与再生能力是由基因决定的,大豆的再生能力对基因型有很强的依赖

性,外植体对大豆植株再生的影响也有比较研究,如大豆子叶节与胚尖的比较^[13-16]、大豆子叶节和下胚轴的比较^[17],未见大豆胚尖与下胚轴再生能力的比较研究。本文通过比较大豆6个基因型两种外植体的不定芽诱导能力,探讨各基因型较适合的再生体系,以期为进一步大豆遗传转化奠定试验基础。

1 材料与方法

1.1 大豆基因型

选用的大豆6个基因型分别是淮豆4号、淮豆9号、吉林35、黑农40、黑农44和合丰35,种子分别由淮阴农业科学院、吉林省农业科学院大豆研究所和黑龙江省农业科学院大豆研究所提供。

收稿日期:2014-07-16

基金项目:国家转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08004-001)。

第一作者简介:王罡(1964-),男,博士,教授,主要从事生物技术与植物转基因研究。E-mail:wanggangtjdx@126.com。

通讯作者:季静(1965-),女,博士,教授,主要从事植物基因工程与分子生物学研究。E-mail:jjingtjdx@163.com。

1.2 试验方法

1.2.1 大豆种子消毒 选取没有病斑、饱满、表面光滑的大豆种子用氯气熏蒸法消毒 8 h 后,用无菌水冲洗 3~4 次备用。

1.2.2 大豆胚尖不定芽的诱导 将冲洗过后大豆种子放入含有无菌水的三角瓶中浸泡 24 h 后,在超净工作台上去除种皮、两片原叶、两片子叶,得到胚尖垂直插入胚尖不定芽诱导培养基 ($MS + 3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}$) 中,放入光照培养箱 25°C ,光周期 16 h/8 h 培养,3 d 后胚尖变绿,在超净工作台取出胚尖,然后将胚尖转入伸长培养基 ($MS + 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IBA}$) 中,每 14 d 继代 1 次。

1.2.3 大豆下胚轴不定芽的诱导 把消毒过的大豆种子接种在萌发培养基中 ($MS + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}$) 中,6 d 后取出大豆无菌苗,在无菌条件下用解剖刀切去子叶、侧芽和部分根,得到 0.5~1.5 cm 下胚轴生长点向上插入下胚轴不定芽诱导培养基 ($MS + 3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IBA}$) 中,放入 25°C 光照培养箱中,光周期 16 h/8 h 培养诱导不定

芽。7 d 后在无菌条件下取出下胚轴,然后转入下胚轴伸长培养基 ($MS + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IBA}$) 中,每 14 d 继代 1 次。

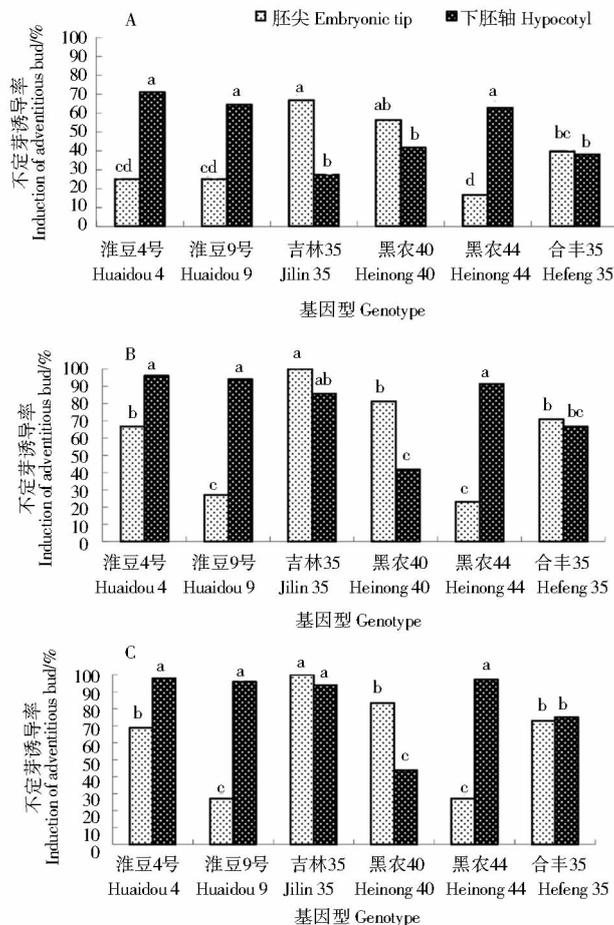
1.3 数据分析

每 14 d 记录 1 次大豆产生不定芽的外植体数和每个外植体上的芽数和芽长(芽长 $\geq 5 \text{ mm}$ 记为出芽),共记录 3 次,计算不定芽诱导率、芽数和芽长。不定芽诱导率(%) = 出芽外植体数/接种外植体数 $\times 100$; 平均芽数 = 总的出芽数/出芽外植体数; 平均芽长 = 总芽长/总芽数。采用 Excel 2007 分析数据及作图,SPSS 17.0 软件进行方差分析与差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 两种再生体系对不同基因型大豆不定芽诱导率的影响

大豆 6 个基因型的胚尖和下胚轴两种外植体在伸长培养基中培养 14, 28, 42 d 时的不定芽诱导率及其基因型间的差异显著性见图 1。



A. 培养 14 d; B. 培养 28 d; C. 培养 42 d。

A. Cultivated for 14 d; B. Cultivated for 28 d; C. Cultivated for 42 d.

图 1 大豆两种外植体各基因型的不定芽诱导率

Fig. 1 Induction of adventitious buds in different genotypes with two kinds of explants in soybean

从图 1A 中可见,在伸长培养基中培养 14 d 时,大豆每一种外植体在基因型间不定芽诱导率均存在显著差异。胚尖作为外植体时,吉林 35 的不定芽

诱导率最高,为 66.67%,黑农 40 次之,为 56.25%,两者差异不显著,吉林 35 不定芽诱导率显著高于其他 4 种基因型,黑农 44 不定芽诱导率最低,只有

16.67%。下胚轴作为外植体时,淮豆4号、淮豆9号和黑农44的不定芽诱导率变化在62.67%~71.00%,显著高于其他3个基因型。

培养28和42 d时(图1B和C),大豆两种外植体、各基因型的不定芽诱导率都有所上升,其中淮豆4号胚尖和吉林35下胚轴不定芽诱导率增幅较大。淮豆4号胚尖在培养14 d时不定芽诱导率只有25.00%,在培养42 d时不定芽诱导率已达到68.75%。吉林35下胚轴在培养14 d时不定芽诱导率最低,仅有27.33%,在42 d时不定芽诱导率已达到94.00%。培养42 d时,胚尖不定芽诱导率由高到低的排列顺序为:吉林35 > 黑农40 > 合丰35 > 淮豆4号 > 淮豆9号 = 黑农44;下胚轴不定芽诱导率由高到低的排列顺序为:淮豆4号 > 黑农44 > 淮豆9号 > 吉林35 > 合丰35 > 黑农40。

从图1C还可以看出,吉林35和合丰35两种外植体的不定芽诱导率相似,经*T*检验结果表明在胚尖和下胚轴两种外植体间不定芽诱导率无显著差异,说明这两个基因型在组织培养过程中对外植体的依赖性较小。另外4种基因型在两种体系中的不定芽诱导率差别较大,不定芽诱导率在两种外植体间存在显著或极显著差异,其中,淮豆4号、淮豆9

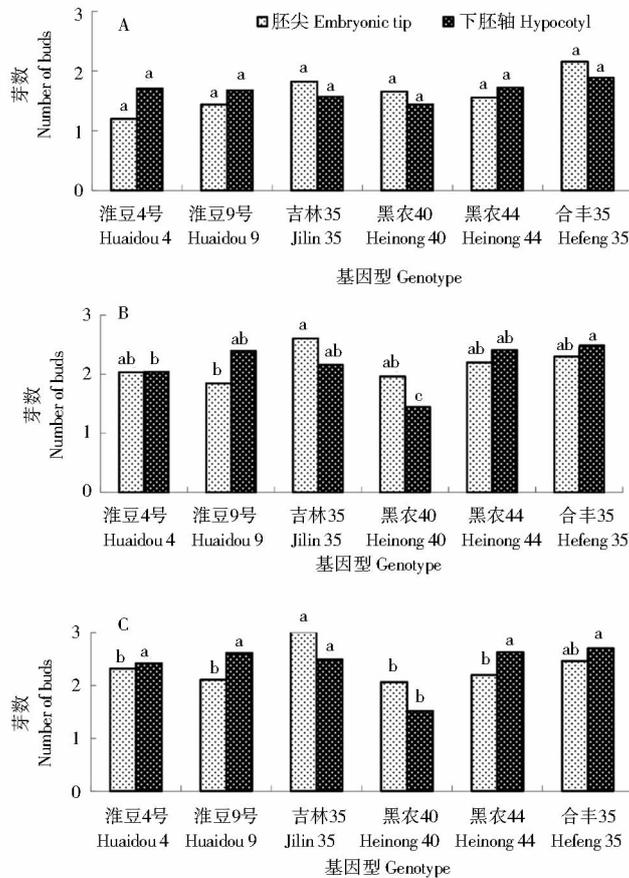
号及黑农44下胚轴的不定芽诱导率均高于胚尖的不定芽诱导率,而黑农40胚尖不定芽诱导率高于下胚轴不定芽诱导率。

2.2 两种再生体系对不同基因型大豆芽数的影响

大豆6个基因型的胚尖和下胚轴两种外植体在伸长培养基中培养14,28,42 d时的不定芽芽数及其基因型间的差异显著性见图2。

从图2A可以看出,在伸长培养基中培养14 d时,大豆胚尖各基因型的芽数变化在1.20~2.16个,下胚轴各基因型的芽数变化在1.45~1.89个,两种外植体各基因型间的芽数均无显著性差异。随着培养时间的延长两种外植体的芽数都有所增长(图2B)。

培养42 d时(图2C),胚尖以吉林35芽数最多,已达到3.02个;黑农40芽数较少,仅有2.07个。大豆6种基因型芽数由多到少的排列顺序为:吉林35 > 合丰35 > 淮豆4号 > 黑农44 > 淮豆9号 > 黑农40。下胚轴不同基因型芽数也都有所上升,其中合丰35的芽数最高,为2.71个,黑农40的最低,只有1.52个。其中黑农40的增长幅度较小。大豆6种基因型芽数的排列顺序为:合丰35 > 黑农44 > 淮豆9号 > 吉林35 > 淮豆4号 > 黑农40。



A. 培养14 d; B. 培养28 d; C. 培养42 d。
A. Cultivated for 14 d; B. Cultivated for 28 d; C. Cultivated for 42 d.

图2 大豆两种外植体各基因型的芽数

Fig.2 Number of buds in different genotypes with two kinds of explants in soybean

从图2C还可以看出,淮豆4号两种外植体的不定芽数相似,*T*检验结果表明,淮豆4号、黑农44

和合丰35三个基因型在胚尖和下胚轴两种外植体间不定芽无显著差异,吉林35、黑农40胚尖的芽数

显著地高于下胚轴芽数,淮豆 9 号芽数胚尖显著地低于下胚轴体系。

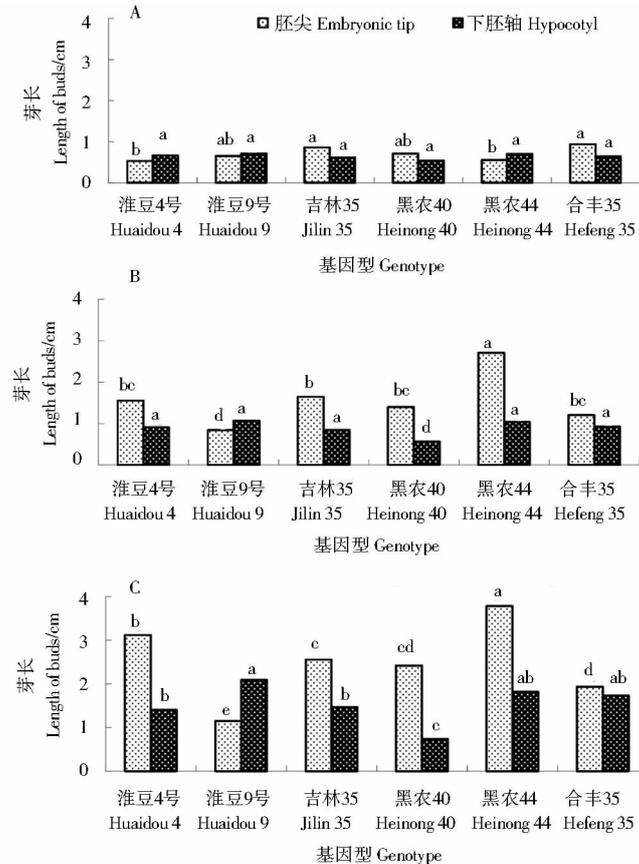
2.3 两种再生体系对不同基因型大豆芽长的影响

大豆 6 个基因型的胚尖和下胚轴两种外植体在伸长培养基中培养 14, 28, 42 d 时的不定芽芽长及其基因型间的差异显著性见图 3。

在培养 14~42 d 期间,大豆不同基因型胚尖和下胚轴的芽长都是随着培养时间的延长而有所上升,除下胚轴在培养 14 d 时芽长在大豆基因型差异不显著外,胚尖和下胚轴在培养各阶段芽长均存在显著差异。当以胚尖为外植体培养 42 d 时,黑农 44 芽长达到 3.77 cm,而淮豆 9 号只有 1.15 cm。各基

因型芽长的排列顺序为:黑农 44 > 淮豆 4 号 > 吉林 35 > 黑农 40 > 合丰 35 > 淮豆 9 号。当下胚轴为外植体时培养 42 d 时,淮豆 9 号芽长达到 2.09 cm,而黑农 40 只有 0.74 cm。不同基因型的芽长排列顺序如下:淮豆 9 号 > 黑农 44 > 合丰 35 > 吉林 35 > 淮豆 4 号 > 黑农 40。

从图 3C 也可以看出,合丰 35 两种外植体的芽长差别较小,*T* 检验结果表明在两种外植体间无显著性差异,其他 5 个基因型的芽长在两种外植体间的差异均达显著水平。淮豆 4 号、吉林 35、黑农 40 和黑农 44 胚尖的芽长高于下胚轴的芽长;而淮豆 9 号下胚轴芽长高于胚尖的芽长。



A. 培养 14 d; B. 培养 28 d; C. 培养 42 d。

A. Cultivated for 14 d; B. Cultivated for 28 d; C. Cultivated for 42 d.

图 3 大豆两种外植体各基因型的芽长

Fig. 3 Length of buds in different genotypes with two kinds of explants in soybean

3 结论与讨论

3.1 大豆不同基因型在同一再生体系中的不定芽诱导能力

大豆组织培养对基因型有明显的依赖性,不同基因型之间存在差异。邱成祥等^[9]研究结果表明,大豆 6 个基因型胚尖再生系统不定芽诱导率依 6-BA 浓度不同 ($1 \sim 3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 不定芽率范围为 30.77%~94.44%。本试验大豆 6 个基因型胚尖在培养 42 d 时不定芽诱导率变化在 27.08%~100.00%,基因型间不定芽诱导率、芽数和芽长都存在显著差异。不定芽诱导率以吉林 35 较高,黑农 40、合丰 35 和淮豆 4 号次之,淮豆 9 号和黑农 44 较

低。芽数以吉林 35 和合丰 35 较好,其他基因型次之。芽长以黑农 44 较好,淮豆 4 号次之,合丰 35 和淮豆 9 号较差。当以下胚轴为外植体时,不定芽诱导率以淮豆 4 号、黑农 44、淮豆 9 号和吉林 35 较好,合丰 35 次之,黑农 40 较低。芽数除黑农 40 较差外,其他 5 个基因型相似;芽长以淮豆 9 号、黑农 44 和合丰 35 较好。表现出在同一再生体系中不同基因型的再生能力不同,再次验证大豆组织培养效果对基因型的依赖性。

3.2 大豆同一基因型在不同再生体系中的不定芽诱导能力

大豆同一基因型在不同再生体系中的再生能力不同。李海燕等^[13]研究表明合丰 35 和北京小黑

豆选择子叶节作为外植体可以获得更高的再生率。而刘栋等^[18]的研究结果显示,中黄13、黑农37和吉林40适合选取胚尖为外植体,而合丰25和合丰35更适合子叶节法。张艳等^[14]研究结果显示黑农51子叶节再生体系的出芽率、芽伸长数和生根率均高于胚尖再生体系。本试验6个大豆基因型以胚尖和下胚轴为外植体,经过比较可知:合丰35不定芽诱导率、芽数和芽长在两种体系中无差异,说明合丰35适合于胚尖和下胚轴两种再生体系。黑农40不定芽诱导率、芽数和芽长在胚尖体系中明显高于下胚轴体系,所以黑农40较适合胚尖体系。淮豆9号不定芽诱导率、芽数、芽长在下胚轴体系中明显高于胚尖体系,所以淮豆9号较适合下胚轴再生体系。吉林35不定芽诱导率在两种外植体间差异不显著,但芽数和芽长在两种外植体间存在显著差异,且胚尖体系明显高于下胚轴体系,所以吉林35较适合胚尖体系。黑农44和淮豆4号的不定芽诱导率下胚轴高于胚尖,但芽长胚尖高于下胚轴。可见,大豆不同基因型对再生体系的反应存在差异,在进行大豆遗传转化研究中应注意对受体系统的选择。

参考文献

- [1] 王萍,王罡,吴颖,等.大豆组织培养的研究进展[J].大豆科学,2003,22(2):142-145. (Wang P, Wang G, Wu Y, et al. Current progress on tissue culture of soybean[J]. Soybean Science, 2003, 22(2):142-145.)
- [2] 李明春,蔡易,赵桂兰,等.改良大豆子叶节再生体系的研究[J].作物学报,2006,32(2):223-227. (Li M C, Cai Y, Zhao G L, et al. Improvement of cotyledon node regeneration system in soybean (*Glycine max*) [J]. Acta Agronomica Sinica, 2006, 32(2): 223-227.)
- [3] 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.)
- [4] 龚学臣,季静,王萍,等.苗龄与6-BA浓度对大豆子叶节丛生芽诱导的影响[J].吉林农业大学学报,2005,27(2):128-130. (Gong X C, Ji J, Wang P, et al. Effect of aseptic seeding age and 6-BA concentration on overgrowing shoots of soybean cotyledonary node[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2005, 27(2): 128-130.)
- [5] 刘北东,朱延明,李海燕,等.大豆子叶节再生影响因素的研究[J].大豆科学,2002,21(2):88-91. (Liu B D, Zhu Y M, Li H Y, et al. Study on factors affection the soybean cotyledonary node regeneration [J]. Soybean Science, 2002, 21(2):88-91.)
- [6] Liu H K, Yang C, Wei Z M. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system [J]. Planta, 2004, 219:1042-1049.
- [7] 王萍,张淑珍,李文滨,等.大豆不同基因型胚尖不定芽的诱导及对抗生素的敏感性[J].作物杂志,2010(2):50-53. (Wang P, Zhang S Z, Li W B, et al. Induction of adventitious shoots from embryonic tip of different soybean genotypes and their sensibility to antibiotics[J]. Crops, 2010(2):50-53.)
- [8] 张艳,南相日,满为群,等.大豆离体培养及高频再生基因型的筛选[J].植物生理学通讯,2011,46(11):1135-1139. (Zhang Y, Nan X R, Man W Q, et al. Culture *in vitro* and high-frequency regeneration genotype selection of soybean [J]. Plant Physiology Communications, 2011, 46(11):1135-1139.)
- [9] 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. (Qiu C X, Wu T L. Study on 6-BA to the regeneration of tip shoot of soybean [J]. Soybean Science, 2003, 22(1):32-35.)
- [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] Kaneda Y, Tabei Y, Nishimura S, et al. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.] [J]. Plant Cell Report, 1997, 17:8-12.
- [12] 张晓娟,方小平,罗丽霞,等.TDZ和BA对诱导大豆胚轴植株再生的影响[J].中国油料作物学报,2000,22(1):24-26. (Zhang X J, Fang X P, Luo L X, et al. Influence of TDZ and BA on efficiency of plant regeneration *via* organogenesis in soybean [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2000, 22(1):24-26.)
- [13] 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. (Li H Y, Wu X X, Liu M, et al. Plant regeneration from cotyledonary nodes and embryonic tips of soybean [J]. Soybean Science, 2007, 26(5):709-712.)
- [14] 张艳,满为群,南相日,等.“黑农51”子叶节和胚尖再生体系的建立及优化[J].中国农学通报,2011,27(9):148-151. (Zhang Y, Man W Q, Nan X R, et al. Establishment and improvement on regeneration systems of ‘Heinong51’ cotyledonary nodes and embryonic tips [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(9):148-151.)
- [15] 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. (Lin S Z, Cao Y P, Wei Z M, et al. Studies on shoots induced by 6-BA from cotyledonary nodes and embryonic tips of soybean [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science), 2005, 23(2):138-142.)
- [16] 王伟,王罡,季静,等.大豆胚尖再生体系的优化及与子叶节再生体系的比较[J].大豆科学,2012,31(3):353-357. (Wang W, Wang G, Ji J, et al. Optimization of embryonic tip regeneration system and comparison with cotyledonary node regeneration system in soybean [J]. Soybean Science, 2012, 31(3):353-357.)
- [17] 段莹莹,赵琳,陈李森,等.农杆菌介导的大豆子叶节和下胚轴转化方法的比较及优化[J].大豆科学,2010,29(4):590-593. (Duan Y Y, Zhao L, Chen L M, et al. Comparison and optimization of the *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean by using cotyledonary node and hypocotyl explants [J]. Soybean Science, 2010, 29(4):590-593.)
- [18] 刘栋,石强,李鹏丽,等.利用GUS基因瞬时表达对大豆子叶节和胚尖转化方法的比较及优化[J].生物学通报,2008,43(12):35-39. (Liu D, Shi Q, Li P L, et al. Comparison and optimization of two kinds of transformation methods *via* cotyledonary node and embryonic tip using GUS gene transient expression in soybean [J]. Bulletin of Biology, 2008, 43(12):35-39.)