

## 6-BA 浓度及基因型对大豆胚尖诱导丛生芽的影响

闫帆, 孙昕, 翟莹, 李晓薇, 王英, 李景文, 王庆钰

(吉林大学植物科学学院, 吉林 长春 130062)

**摘要:**以吉林 35、吉林 47 等 5 个大豆品种为材料, 胚尖为外植体, 研究不同浓度 6-BA 对丛生芽诱芽率和平均芽数的影响, 同时测定吉林 35 在胚尖诱导丛生芽的过程中对潮霉素的耐受性。结果表明: 3.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA 浓度下吉林 35 的诱芽率最高, 综合考虑丛生芽诱芽率和平均芽数 2 个性状, 吉林 35 更加适合于大豆胚尖再生系统; 在遗传转化中, 以 3.0 mg · L<sup>-1</sup> 潮霉素作为吉林 35 抗性筛选的适宜浓度。

**关键词:**大豆; 胚尖; 6-BA; 基因型

**中图分类号:** S565.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-9841(2011)01-0029-04

## Effect of Different 6-BA Concentration and Genotypes on Shoots Induced from Embryonic Tips

YAN Fan, SUN Xin, ZHAI Ying, LI Xiao-wei, WANG Ying, LI Jing-wen, WANG Qing-yu

(College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062, Jilin, China)

**Abstract:** In order to establish an efficient embryonic tip regeneration system for soybean (*Glycine max* L. Merr.), five soybean cultivars, including Jilin 35, were used as explants to study the effects of 6-BA and genotypes on the numbers and induction rate of adventitious shoots. The endurance of the induced shoots of Jilin 35 to Hygromycin B was also studied. The results showed that Jilin 35 was fit for soybean embryonic tip regeneration system according to the numbers and inductivity of adventitious shoots. The concentration of 3.0 mg · L<sup>-1</sup> Hygromycin B was advised for resistance screening in embryonic tip regeneration system.

**Key words:** Soybean; Embryonic tip; 6-BA; Genotype

大豆是人类重要的油料作物和蛋白来源, 利用转基因技术提高大豆品质是当今育种的重要目标, 而建立一个高效、稳定的再生体系是实现这一目标的基础。近些年发展起来的以大豆胚尖为外植体的再生体系, 因操作简便, 再生周期短等优点受到关注。邱承祥等<sup>[1]</sup>建立了以茎尖为外植体的大豆组培高效再生植株体系, 报道了不同品种对 6-BA 的耐受程度存在一定差异, 合适的 6-BA 浓度有使差异减少的趋势。张东旭等<sup>[2]</sup>探讨了激素种类、浓度、诱导时间等因素对胚尖生长过程的影响, 表明经 0.5 ~ 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA 诱导 5 d 大豆的胚尖出芽率、植株再生率及胚尖丛生芽数等综合指标较好, 再生率最高达 84.1%。刘海坤等<sup>[3]</sup>用农杆菌转化大豆胚尖再生系统已成功将外源基因整合到大豆基因组中, 获得转基因大豆的频率达 6.4% ~ 12.1%。研究者还对大豆胚尖、子叶节和下胚轴再生体系进行了比较研究, 因所选用大豆品种、激素

浓度与配比不同, 所得结果有差异<sup>[4-6]</sup>。该试验以吉林 35 等 5 个基因型大豆为材料, 研究不同浓度 6-BA 对诱导胚尖出芽的影响, 在此基础上以吉林 35 为材料, 探讨了大豆胚尖对不同浓度潮霉素的敏感性, 确定大豆在转基因过程中利用潮霉素作为筛选剂的最适浓度, 从而为农杆菌介导进行大豆的遗传转化提供依据。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 供试材料

吉林 35、吉林 47、东农 42、平安 8 和美国扁茎大豆, 由吉林农业大学植物科技学院提供。

#### 1.2 外植体的获得

选取种皮完整无病斑、无虫害、无霉菌的成熟大豆种子, 用 75% 的酒精处理 35 s, 然后用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 10 min, 无菌水洗 3 ~ 5 次, 无菌水浸泡种子 6 h, 取出萌动的种子, 在无菌条件下去掉种

收稿日期: 2010-12-02

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项资助项目(2008ZX08004-003); 国家自然科学基金面上资助项目(30971808); 吉林省科技发展计划重点资助项目(20080204); 长春市科技局国际科技合作资助项目(08GH10); “211 工程”三期重点学科建设资助项目。

第一作者简介: 闫帆(1987-), 女, 在读硕士, 研究方向为大豆分子育种。E-mail: fenfeiyongyuan@163.com。

通讯作者: 王庆钰(1963-), 女, 教授, 博士, 主要从事作物遗传育种与分子生物学研究。E-mail: wqy414cn@yahoo.com.cn。

皮、原叶及 2 片子叶,取下胚轴连同胚尖生长点接种在丛生芽诱导培养基上。

### 1.3 基本培养基和培养条件

MS 培养基的无机盐 + B5 培养基的有机部分,附加  $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  MES、 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖、 $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂, pH 5.8。培养温度  $25 \sim 28^\circ\text{C}$ , 光照周期为 16 h 光照 / 8 h 黑暗,光照强度  $2000 \text{ Lx}$ 。

### 1.4 6-BA 处理

以吉林 35、吉林 47、东农 42、平安 8 和美国扁茎为材料,在诱导培养基上分别加入不同浓度 6-BA ( $0, 0.2, 0.5, 1.0, 3.0$  和  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 每个处理 30 个外植体, 3 次重复。14 d 调查统计各基因型产生不定芽的外植体数、芽数, 用 SPSS16.0 做不定芽诱导率、芽数等性状的方差分析和 LSD 法显著性检验。

不定芽诱导率 (%) = 出芽外植体数 / 接种外植体数;

平均芽数 = 总芽数 (芽高  $\geq 2\text{cm}$ ) / 出芽外植体数。

### 1.5 潮霉素处理

以吉林 35 为材料, 接种到含  $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 的芽诱导培养基上, 诱导 5 d 后转入含潮霉素的芽伸长培养基上, 研究大豆胚尖对潮霉素的敏感性。潮霉素设  $0, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5$  和  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  共 6 个处理, 每个处理 30 个外植体, 3 次重复。调查、分析方法同 1.4。

## 2 结果与分析

### 2.1 6-BA 浓度和基因型对诱芽率的影响

从 6-BA 浓度来看, 随着 6-BA 浓度的增加诱芽率先降低然后逐渐增加, 达到最大值后, 诱芽率又降低。在  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 浓度下吉林 47 诱芽率最高, 达 72%;  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 浓度下平安 8 诱芽率最高, 达 67%;  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 浓度下美国扁茎诱芽率最高, 达 10%;  $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 浓度下吉林 35 诱芽率最高, 达 81.67%。从基因型来看, 不同基因型胚尖诱芽率在同一激素浓度和不同激素浓度下均有差异。在供试品种中吉林 35 整体诱芽率最高, 而美国扁茎整体诱芽率最低。

从表 1 可以看出, 6 个 6-BA 浓度间的诱芽率和 5 个基因型间的诱芽率差异均达极显著水平, 说明不同 6-BA 浓度和大豆不同基因型诱导胚尖不定芽的能力存在差别。

LSD 法显著性检验,  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 与  $0.5, 1.0$  和  $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 浓度间存在显著差异,

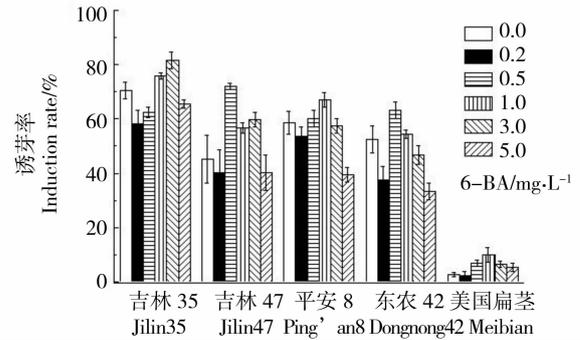


图 1 6-BA 浓度对大豆不同基因型胚尖丛生芽诱芽率的影响

Fig. 1 Effect of different 6-BA concentration on induction rate of adventitious of embryonic tip of different soybean genotypes

$0.5, 1.0, 3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 与  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 间存在显著差异, 其余浓度间诱芽率相似, 无显著差异; 吉林 35 诱芽率显著高于其它大豆基因型, 吉林 47、平安 8 和东农 42 的不定芽诱导率相似, 美国扁茎诱芽率显著低于其它 4 个基因型。综合考虑, 吉林 35 是适于大豆胚尖不定芽系统的受体基因型, 并且在  $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 浓度下诱芽率最高。

表 1 6-BA 浓度和基因型对诱芽率的双因素方差分析

Table 1 Variance analysis of concentration of 6-BA and genotype on shoots induced rate

项目 Item	SS	DF	MS	F	Sig.
6-BA	1 285.181	5	257.036	5.215	0.003
基因型 Genotypes	13 807.022	4	3 451.755	70.033	0.000

### 2.2 6-BA 浓度和基因型对平均芽数的影响

从 6-BA 浓度看, 在 6-BA 浓度为  $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 5 个基因型之间基本没有差异, 之后随着 6-BA 浓度的增加, 平均芽数增多, 达到最大值后, 开始减少, 但 6-BA 浓度对美国扁茎平均芽数几乎无影响。从基因型来看, 不同基因型平均芽数有差异, 吉林 35 平均芽数表现出较大差异, 变化幅度在  $1.00 \sim 2.01$  个, 美国扁茎平均芽数几乎没有变化, 变化幅度在  $1.00 \sim 1.10$  个。

方差分析结果表明, 6 个 6-BA 浓度间的平均芽数和 5 个基因型间的平均芽数差异均达极显著水平, 说明不同 6-BA 浓度和大豆不同基因型诱导胚尖不定芽的能力存在差别。

LSD 法显著性检验,  $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 与其它浓度的 6-BA 间都呈显著差异, 说明 6-BA 对胚尖诱导丛生芽有作用,  $0.2$  与  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 对胚尖平均芽数影响有显著差异; 美国扁茎与其它 4 个基因型之间有显著差异, 各个激素浓度下平均芽数基本

没有变化,吉林 35 与吉林 47 和东农 42、吉林 47 与平安 8 平均芽数间存在显著差异。

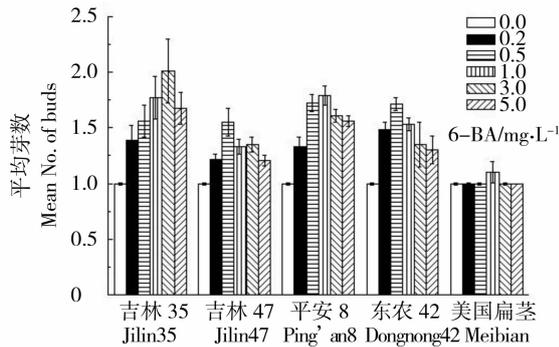


图 2 6-BA 浓度对大豆不同基因型胚尖丛生芽平均芽数的影响

Fig. 2 Effect of different concentration of 6-BA on average amount of buds of embryonic tip of different soybean genotypes

表 2 6-BA 浓度和基因型对平均芽数的双因素方差分析  
Table 2 Variance analysis of concentration of 6-BA and genotype on the average amount of buds

	SS	DF	MS	F	Sig.
6-BA	0.943	5	0.189	6.796	0.001
基因型 Genotypes	1.135	4	0.284	10.229	0.000

### 2.3 潮霉素对胚尖丛生芽诱芽率与再生率的影响

以吉林 35 为材料,研究潮霉素对胚尖丛生芽的影响,培养 25 d 的丛生芽诱芽率和再生率见表 3,从表 3 可以看出,随着潮霉素浓度增加,胚尖丛生芽诱芽率和再生率较对照急剧下降。在潮霉素浓度为  $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,胚尖未形成丛生芽;在潮霉素浓度为  $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,胚尖形成的丛生芽均未抽茎。

表 3 潮霉素浓度对大豆胚尖丛生芽诱芽率与再生率的影响

Table 3 Effects of hygromycin B on differentiation and regeneration frequency of embryonic tip

	潮霉素浓度 Concentration of HygromycinB/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$					
	0	2.0	2.5	3.0	3.5	5.0
诱芽率 Shooting/%	70.33	46.67	33.33	10	0	0
再生率 Regeneration/%	56.67	10.00	6.67	0	0	0

方差分析结果表明,大豆胚尖丛生芽诱芽率和再生率在不同浓度潮霉素间均表现出显著差异,表明潮霉素对大豆胚尖丛生芽的形成和再生均有明显的抑制作用。LSD 法显著性检验,潮霉素浓度为  $3.5$  和  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时诱芽率无差异,其它浓度下诱芽率间均存在极显著差异;潮霉素浓度为  $2.0$  和  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时再生率有显著差异,为  $3.0$ 、 $3.5$  和

$5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时再生率无差异,其它浓度下再生率间均有极显著差异。

表 4 潮霉素浓度对胚尖丛生芽诱芽率与再生率的方差分析

Table 4 Variance analysis of concentration of hygromycin B on differentiation and regeneration frequency

	SS	DF	MS	F	Sig.
诱芽率 Shooting/%	12 153.611	5	2 430.722	767.596	0.000
再生率 Regeneration/%	7 377.778	5	1 475.556	758.857	0.000

### 3 讨论

该试验结果表明不同基因型大豆诱芽率、形成丛生芽平均芽数在相同 6-BA 浓度和不同 6-BA 浓度诱导下均存在差异,与以往的研究结果<sup>[1-2,4,7-8]</sup>相一致。丛生芽的诱导是再生体系的基础环节,其数量及质量直接影响着整个再生系统的优劣。该试验选用 5 个基因型大豆品种,对于不同基因型其丛生芽形成的最适 6-BA 浓度均不相同,其中吉林 35 在整个胚尖再生系统中表现突出, $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 浓度下其诱芽率最高,达  $81.67\%$ ,每个外植体平均为 2.01 个芽,显著高于其它基因型品种;吉林 47、平安 8 和东农 42 表现中等;美国扁茎丛生芽诱芽率极显著低于其它 4 个基因型,这可能是由于美国扁茎中存在某种抑制物质,影响其丛生芽形成,导致其不适合为胚尖再生系统的外植体。吉林 35 是大豆遗传转化中胚尖再生系统较理想的受体基因型。

以大豆吉林 35 胚尖为外植体,探讨潮霉素对其诱芽率和再生率的影响,潮霉素浓度为  $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,未形成丛生芽;潮霉素浓度为  $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,丛生芽不能抽茎,再生率为 0 与对照有极显著差异。邹莉等<sup>[9]</sup>研究表明,不同基因型大豆对潮霉素的敏感性不同,潮霉素对大豆子叶节适宜筛选浓度黑农 35 为  $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、合丰 35 和合丰 25 为  $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。可见,同一作物不同基因型对潮霉素抗性不同,因此选择潮霉素进行筛选要针对不同基因型。理论上潮霉素的浓度越高,筛选效率越高,但浓度过高,会导致组织细胞生长受阻,影响作物正常生长,综合考虑,以  $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  潮霉素为吉林 35 胚尖筛选最适浓度。

### 参考文献

[1] 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.)
- [2] 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, 30(4):7-13. (Zhang D X, Zhang J, Shang L, et al. Study on the regeneration system of soybean embryonic tips[J]. Journal of Hebei Agricultural University, 2008, 30(4):7-13.)
- [3] 刘海坤, 卫志明. 利用根瘤农杆菌介导转化大豆成熟种子胚尖获得转基因植株[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2004, 30(6):631-636. (Liu H K, Wei Z M. Transgenic soybean obtained with agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of embryonic tip of soybean mature seeds[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2004, 30(6):631-636.)
- [4] 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 Edition), 2005, 23(2):138-142.)
- [5] 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 S, et al. Plant regeneration from cotyledonary nodes and embryonic tips of soybean [J]. Soybean Science, 2007, 26(5):709-712.)
- [6] 孙文丽, 刘昱辉, 吴元华, 等. 大豆胚芽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. (Sun W L, Liu Y H, Wu Y H, et al. A pilot study of an soybean embryonic tip regeneration system [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2008, 47(6):615-618.)
- [7] 刘海坤, 卫志明. 大豆遗传转化研究进展[J]. 植物生理与生物学报, 2005, 31(2):126-134. (Liu H K, Wei Z M. Recent advances in soybean genetic transformation [J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2005, 31(2):126-134.)
- [8] 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 genotype and their sensibility to antibiotics [J]. Crops, 2010(2):50-53.)
- [9] 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 Y H, et al. Susceptibility of soybean cotyledonary node to hygromycin B [J]. Soybean Science, 2008, 27(2):267-269.)

(上接第 28 页)

- [10] Huang J X, Qu L J, Yang J, et al. A preliminary study on the origin of chalcone synthase (CHS) gene: Molecular cloning of CHS-like gene from liverwort (*Lunularia cruciata*) and evolution of CHS genes in angiosperms [J]. Acta Botanica Sinica, 2004, 46: 10-19.
- [11] Yang J, Gu H Y, Yang Z. Likelihood analysis of the chalcone synthase genes suggests the role of positive selection in morning glories (*Ipomoea*) [J]. Molecular Evolution, 2004, 58: 54-63.
- [12] Ralston L, Subramanian S, Matsuno M, et al. Partial reconstruction of flavonoid and isoflavonoid biosynthesis in yeast using soybean type I and type II chalcone isomerases [J]. Plant Physiology, 2005, 137: 1375-1388.
- [13] Xu M, Brar H K, Grosic S, et al. Excision of an active CACTA-like transposable element from DFR2 causes variegated flowers in soybean (*Glycine max*) [J]. Genetics, 2010, 184:53-63.
- [14] Akada S, Kung S D, Dube S K. The nucleotide sequence of gene 1 of the soybean chalcone synthase multigene family [J]. Plant Molecular Biology, 1991, 16(4): 751-752.
- [15] Akada S, Kung S D, Dube S K. Nucleotide sequence and putative regulatory elements of gene 2 of the soybean (*Glycine max*) chalcone synthase multigene family [J]. Plant Physiology, 1993, 102: 317-319.
- [16] Akada S, Kung S D, Dube S K. The nucleotide sequence of gene 3 of the soybean chalcone synthase multigene family [M]. Oxford University Press, 1990.
- [17] Akada S, Kung S D, Dube S K. Nucleotide sequence of one member of soybean chalcone synthase multi-gene family [J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(11):3398.
- [18] Akada S, Kung S D, Dube S K. Nucleotide sequence of a soybean chalcone synthase gene with a possible role in ultraviolet-B sensitivity, Gmchs6 [J]. Plant Physiology, 1993, 102: 699-701.
- [19] Akada S, Kung S D, Dube S K. Nucleotide sequence and putative regulatory elements of a nodule-development-specific member of the soybean (*Glycine max*) chalcone synthase multigene family, GmCHS7 [J]. Plant Physiology, 1993, 102: 321-323.
- [20] Tuteja J H, Vodkin L O. Structural features of the endogenous CHS silencing and target loci in the soybean genome [J]. Crop Science, 2008, 48(S1), S49-S68.
- [21] Kasai A, Ohnishi S, Yamazaki H, et al. Molecular mechanism of seed coat discoloration induced by low temperature in yellow soybean [J]. Plant Cell Physiology, 2009, 50:1090-1098.
- [22] Bernard R L, Weiss M G. Qualitative genetics [M] // Caldwell B E (ed) Soybean: improvement, production, and uses. American Society of Agronomy, Madison, 1973:117-154.
- [23] Kasai A, Kasai K, Yumoto S, et al. Structural features of *GmIRCHS*, candidate of the I gene inhibiting seed coat pigmentation in soybean: implications for inducing endogenous RNA silencing of chalcone synthase genes [J]. Plant Molecular Biology, 2007, 64:467-479.