

野生大豆丛生芽诱导及快速繁殖

蒋向辉^{1,2}, 余朝文^{1,2}, 李 丹¹, 郝博飞¹

(¹怀化学院生物工程系, ²怀化市生物育种与加工技术实验室, 湖南 怀化 418008)

摘 要:野生大豆(*G. soja*)是豆科大豆属 *Soja* 亚属的唯一野生种,为了有效地保护我国的野生大豆资源,推动优良的野生大豆材料在育种及生物技术中的应用,以野生大豆无菌苗幼叶为外殖体,采用正交试验设计方法,对影响野生大豆丛生芽发生和生根诱导的因素进行比较研究。结果表明:适合野生大豆丛生芽诱导的培养基为 MS + 6-BA 1.5 mg · L⁻¹ + IBA 2.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.3 mg · L⁻¹,适合生根的培养基是 1/2 MS + IBA 1.0 mg · L⁻¹ + IAA 1.2 mg · L⁻¹,在此条件下获得大量移栽成活的植株。

关键词:野生大豆;丛生芽;快速繁殖

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2008)04-0697-04

Caespitose Shoots Induction and Rapid Propagation of *G. soja*

JIANG Xiang-hui^{1,2}, SHE Chao-wen^{1,2}, LI Dan¹, HAO Bo-fei¹

(¹Department of Bioengineering; ²Key Laboratory of Huaihua for Breeding and Bioprocess Technology, Huaihua College, Huaihua 418008, Hunan, China)

Abstract: *G. soja* is the only wild germplasm of *Soja* subgenus, in order to protect *G. soja* resource availably and expedite the application of excellent resource in breeding and biotechnology, young leaf of *G. soja* was used as explants for rapid propagation, the effect of different culture medium and concentration of phytohormon on inducing caespitose shoots and roots of *G. soja* was studied using an orthogonal experimental designed. The results showed that the best medium inducing caespitose shoots of *G. soja* was MS + 6-BA 1.5 mg · L⁻¹ + IBA 2.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.3 mg · L⁻¹, the proper rooting medium is 1/2 MS + IBA 1.0 mg · L⁻¹ + IAA 1.2 mg · L⁻¹, and many regeneration plantlets were obtained.

Key words: *G. soja*; Caespitose shoots; Rapid propagation

野生大豆(*G. soja*)是豆科大豆属 *Soja* 亚属的唯一野生种,在我国分布广泛,现有资源 6 000 余份,占世界总数的 90% 以上,其中蕴藏着品质好、抗性强、丰产性好等一大批优异基因型^[1]。近年来,许多学者对野生大豆分别从农艺性状、生化性状、遗传多样性^[2]及核心资源构建^[3]等方面进行了广泛的研究,发现野生大豆较栽培大豆具有更为丰富的变异类型,并且有些性状变异是野生大豆所特有的。但近年来由于环境条件的恶化和缺乏合理的保护和管理,野生大豆群体的多样性变得越来越单一。为了有效地保护我国的野生大豆资源,将优良的野生大豆材料应用于育种及生物技术,建立野生大豆高效的组培快繁技术体系势在必行。以野生大豆无菌苗幼叶为外殖体,采用正交试验设计方法,对影响野生大豆丛生芽发生和生根诱导的因素进行比较研

究,筛选出适合野生大豆丛生芽诱导和根的生长条件,为进一步利用野生大豆资源奠定良好的基础。

1 材料与方法

以野生大豆(*G. soja*)品系 YA398 为试验材料,选取饱满充实,色泽鲜亮,无病虫害的种子,先用浓硫酸浸泡 8 min,后用酒精消毒 1 min,再用 0.1% 的 HgCl₂ 溶液表面灭菌 8 min,无菌水冲洗 4 ~ 5 次,接种在 MS 培养基上,取苗龄 15 d 左右的幼叶,切成大小为 0.5 cm × 1.0 cm 的外殖体用作试验。

以 MS 培养基为基本培养基,附加不同浓度的 6-BA、IBA 和 NAA,参照蒋向辉等^[4]方法进行正交试验设计,形成不同配方丛生芽诱导与生根诱导培养基(表 1,表 3),每处理接种 5 瓶,每瓶 6 个外植体。

收稿日期:2008-02-15

基金项目:怀化市科技局科技基础条件平台建设资助项目(06-6)。

作者简介:蒋向辉(1974-)男,硕士,讲师,现从事植物遗传育种研究。

通讯作者:余朝文,博士,教授。E-mail: shechaowen@tom.com。

表 1 丛生芽诱导试验结果
Table 1 The result of caespitose choots induction

处理 Treatment	培养基 Medium	6- 苄氨基嘌呤 6- BA/mg · L ⁻¹	吲哚丁酸 IBA/mg · L ⁻¹	萘乙酸 NAA/mg · L ⁻¹	愈伤诱导率 Ratio of callus induction/%	不定芽数 Bud number per plant
1	1	0.5	0.5	0.1	34	2.2
2	1	1.0	1.0	0.2	77	7.2
3	1	1.5	2.0	0.3	79	8.5
4	1/2	0.5	1.0	0.3	48	3.1
5	1/2	1.0	2.0	0.1	71	5.2
6	1/2	1.5	0.5	0.2	57	5.7
7	2/3	0.5	2.0	0.2	96	3.3
8	2/3	1.0	0.5	0.3	91	4.8
9	2/3	1.5	1.0	0.1	72	6.5

采用透明玻璃锥形瓶培养,每瓶含培养基大约 25 mL,培养温度为(26 ± 2)℃左右,光照强度为 30 ~ 40 μmol · m⁻² · s⁻¹,每日光照 10 h,14 h 黑暗。培养基和接种所需各种器皿均经高压消毒灭菌。野生大豆幼叶接种于培养基 35 d 后,参照赵建萍等^[5]的方法统计每个外殖体上丛生芽数以及有效苗(高 1.0 cm 以上且生长健壮的小苗)数,以筛选适宜于芽增殖的培养条件。将 2 cm 左右长的无根苗接种到不同组合的生根培养基中(表 1),培养 40 d 后统计生根率、平均根长、平均根数。将已诱导生根并开瓶炼苗试管苗取出,移栽至草皮土与泥炭土以不同比例混合培养物中,保持温度 18 ~ 25℃,相对湿度 80%,30 d 调查成活率。统计方法参照盖钧镒^[6]方法,数据分析以 SPSS14.0 软件进行。

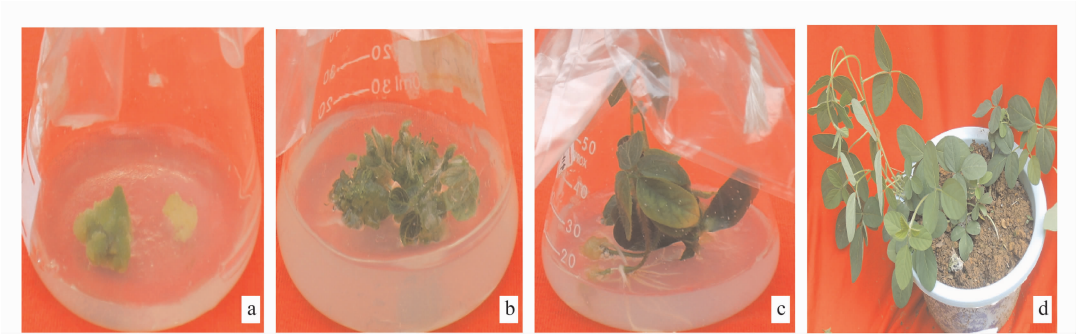
2 结果与分析

2.1 不同培养基及激素对野生大豆愈伤诱导及不定芽分化的影响

不同培养基及激素对野生大豆幼叶愈伤诱导的影响结果见表 2,从表可看出,不同的培养基及激素配比对幼叶愈伤的诱导影响较大,F 值测定表明:各处理间差异达极显著水平($F = 9.53 > F_{0.99} = 8.65$),多重比较认为 2/3 MS 培养基中,6- BA 浓度为 0.5 mg · L⁻¹、IBA 浓度为 2.0 mg · L⁻¹、NAA 浓度为 0.2 mg · L⁻¹的生长调节物质配比对野生大豆幼叶的愈伤组织诱导最好(图 1)。不定芽诱导率是衡量分化质量优劣的主要性状指标,表 2 显示,不同处理间的不定芽数诱导率相差较大,为此对不同因子处理的不定芽数进行方差分析,据表 3 可知,不同培养基和 6- BA 对野生大豆芽增殖培养的影响达极显著差异水平,而且培养基比 6- BA 对不定芽分化的影响更大,而 IBA 和 NAA 对不定芽的影响不显著。多重比较分析认为,在 MS 培养基中添加 6- BA 1.5 mg · L⁻¹、IBA 2.0 mg · L⁻¹、NAA 0.3 mg · L⁻¹对野生大豆幼叶不定芽的分化效果最好。

表 2 不同处理的不定芽数方差分析(完全随机模型)
Table 2 Variance analysis of the number of adventitious bud (Completely randomized model)

变异来源 Variation source	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F value
培养基 Medium	6.315	2	3.1575	64.4388 **
6- 苄氨基嘌呤 6- BA	5.867	2	2.9335	59.8674 **
吲哚丁酸 IBA	0.925	2	0.4625	9.4388
萘乙酸 NAA	0.846	2	0.423	8.6327
误差 Error	0.147	3	0.049	
总和 Sum	14.1	11		



a. 野生大豆愈伤组织诱导;b. 丛生苗分化;c. 生根诱导;d. 移栽成活的植物
a. Callus induction of *G. soja*; b. Caespitose shoots induction; c. Inducing roots; d. Pot transplanting

图1 野生大豆组培快繁的过程

Fig. 1 Procedure of tissue cultuer and rapid propagation of *G. soja*

2.2 不同培养基和激素对野生大豆无根苗生根诱导的影响

据表4可知,不同处理间的生根数、根长相差较大。对不同因子处理的生根率进行方差分析(表5)发现,培养基各组分对野生大豆组培苗生根的影响均达到显著水平($P < 0.05$),其中IBA对生根的影响达到极显著水平,多重比较认为在1/2 MS培养基

中,不加6-BA,只加IBA 1.0 mg·L⁻¹和IAA 1.2 mg·L⁻¹得到的单株生根数最多,平均达4.4条,而在MS培养基中添加6-BA 0.5 mg·L⁻¹、IBA 2.0 mg·L⁻¹和IAA 1.2 mg·L⁻¹得到的生根最长(30 d),达到3.5 cm,由此可知6-BA和IBA的浓度共同影响野生大豆根的分化与伸长。

表3 激素对野生大豆生根诱导的影响

Table 3 Effects of different concneration of hormone on the root formation of *G. soja* plantlet

处理 Treatment	培养基 Medium	6-苄氨基嘌呤 6-BA/mg·L ⁻¹	吲哚丁酸 IBA/mg·L ⁻¹	吲哚乙酸 NAA/mg·L ⁻¹	单株生根数 Root number per plant	根长 Root length/cm
1	1	0	0.5	0.4	2.8	1.0
2	1	0.2	1.0	0.8	3.5	2.2
3	1	0.5	2.0	1.2	4.0	3.5
4	1/2	0.0	1.0	1.2	4.4	2.4
5	1/2	0.2	2.0	0.4	3.0	2.8
6	1/2	0.5	0.5	0.8	2.5	1.6
7	2/3	0.0	2.0	0.8	3.3	3.1
8	2/3	0.2	0.5	1.2	3.6	1.7
9	2/3	0.5	1.0	0.4	1.4	2.2

表4 不同因子处理的单株生根数方差分析(完全随机模型)

Table 4 Variance analysis of the number of adventitious root per plant (Completely randomized model)

变异来源 Variation source	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F value
培养基 Medium	54.026	2	27.013	9.717 *
6-苄氨基嘌呤 6-BA	63.14	2	31.57	11.356 *
吲哚丁酸 IBA	171.904	2	85.952	30.918 **
萘乙酸 NAA	88.192	2	44.096	15.862
误差 Error	8.34	3	2.78	
总和 Sum	54.026	11		

2.3 移栽驯化

在培养苗长至 4~6 cm 时,小心将苗取出,洗净根部培养基,将苗移入灭过菌的草皮土和泥炭土的混合基质中,移栽后定期浇水,避免高温直晒。研究发现以草皮土+泥炭土(体积比为 1:1)移栽成活率最高,超过 90%,原因可能是这种基质疏松湿润,持水能力强且通气性好,有机质含量较高。而较低的有机质含量以及保水能力较弱的基质不利于野生大豆管苗存活、生长。

3 讨论

野生大豆较难繁殖的一个原因就是种皮较厚,导致发芽率较低,研究采用浓硫酸处理的方法,既软化了种皮,而且有利于无菌材料的获得。有关浓硫酸处理获得无菌苗的方法时有报道^[7-8],但不同的物种处理时间差异较大,并且与其他灭菌试剂配合处理方式也各不相同。浓硫酸处理野生大豆种子,促进其生长发育,确为一种有效的方法,但处理的时间及处理后对其生理生化特性的影响还有待进一步研究。

研究发现在野生大豆丛生芽的诱导中先进行暗培养后再进行光培养效果较好,光照条件是影响野生大豆丛生芽分化的一个因素,如暗处理的时期、处理时间长短及暗处理将影响野生大豆哪些生理因素的变化,这些是后续研究中有待解决的问题。

4 结论

以野生大豆种子为外植体材料,运用正交设计的方法,进行了野生大豆有效灭菌方式与最佳分化培养基的摸索,研究发现对野生大豆灭菌时用浓硫酸处理 8 min,75% 乙醇处理 1 min,0.1% 升汞处理 8 min 的处理组合效果最好,其平均萌芽率高达 86%。以无菌苗幼叶为外植体,愈伤诱导的最适培养基为 $2/3 \text{ MS} + 6\text{-BA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IBA } 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;芽分化的最适培养基为: $\text{MS} + 6\text{-BA } 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IBA } 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;生根的最适培养基为 $1/2 \text{ MS} + \text{IBA } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IAA } 1.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。愈伤组织芽分化往往是多种激素相互平衡及协同作用的结果,激素的比例尤为重要^[9],运用正交设计的方法,极好地

优化了试验设计,在探求最佳激素配比方面大大增强了试验的可操作性。

参考文献

- [1] 赵洪锬,王玉民,李启云,等. 中国不同纬度野生大豆和栽培大豆 SSR 分析[J]. 大豆科学,2001,20(3):521-527. (Zhao H K, Wang Y M, Li Q Y, et al. SSR analysis of wild soybean (*G. soja*) and cultivated soybean from different latitude in China[J]. Soybean Science, 2001, 20(3):521-527.)
- [2] 董英山,庄炳昌,赵丽梅,等. 中国野生大豆遗传多样性中心[J]. 作物学报,2005,26(5):172-176. (Dong Y S, Zhuang B C, Zhao L M, et al. The genetic diversity centers of annual wild soybean in China[J]. Acta Agronomica Sinica, 2005, 26(5):172-176.)
- [3] 赵丽梅,董英山,刘宝,等. 中国一年生野生大豆 (*Glycine soja*) 核心资源构建[J]. 科学通报,2005,50(10):992-997. (Zhao L M, Dong Y S, Liu B, et al. Establishment of core resource of wild Soybean (*G. soja*) in China [J]. Chinese Science Bulletin, 2005, 50(10):992-997.)
- [4] 蒋向辉,余朝文,谷合勇. 观赏辣椒一步成苗诱导条件的筛选[J]. 植物生理学通讯,2007,43(4):705-707. (Jiang X H, She C W, Gu H Y. Selection of one-step seedling formation of ornamental *Capsicum annuum* L. [J]. Plant Physiology Communications, 2007, 43(4):705-707.)
- [5] 赵建萍,柏新富,蒋小满,等. 北高丛越桔芽器官离体培养与快繁体系的建立[J]. 林业科学,2007,43(5):111-116. (Zhao J P, Bai X F, Jiang X M, et al. Rapid propagation of plantlets from sprout of *Vaccinium corymbosum* in Vitro [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2007, 43(5):111-116.)
- [6] 盖钧镒. 试验统计方法[M]. 北京:中国农业出版社,2000:278-294. (Gai J Y. Trial statistical approach [M]. Beijing: Agricultural Press, 2000:20-25.)
- [7] 蒋昌顺,邹冬梅,张义正. 柱花草的组织培养及植株再生[J]. 植物生理学通讯,2003,39(1):33. (Jiang C S, Zou D M, Zhang Y Z. Tissue culture and plantlet regeneration of *Stylosanthes guianensis* [J]. Plant Physiology Communications, 2003, 39(1):33.)
- [8] 王永春,罗铮,曲超,等. 肥皂草种子的休眠和萌发特性初探[J]. 植物生理学通讯,2007,43(3):491-493. (Wang Y C, Luo Z, Qu C, et al. Preliminary study on dormancy and germination characteristics in seed of *Saponaria officinalis* Linn [J]. Plant Physiology Communications, 2007, 43(3):491-493.)
- [9] 姜蕾,兰天维,黎扬辉,等. 影响红掌愈伤组织诱导、增殖和芽分化的因素[J]. 种子,2006,11(25):26-30. (Jiang L, Lan T W, Li Y H, et al. Factors influencing callus induction, proliferation and bud differentiation of *Anthurium andraeanum* Lindl [J]. Seed, 2006, 11(25):26-30.)