

# 大豆未成熟种子子叶节不定芽再生的初步研究

王卢平, 乔亚科, 李桂兰, 钟 磊, 崔姗姗, 纪展波

(河北科技师范学院 生命科技学院, 河北 昌黎 066600)

**摘 要:**以冀豆 12 和中黄 13 的未成熟种子子叶节为外植体, 研究了 6-BA 浓度、取材时间和种子发育程度对大豆未成熟种子子叶节不定芽诱导的影响。结果表明:冀豆 12 最佳取材时间为开花后 60~66 d, 最佳 6-BA 浓度为  $1.0 \sim 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 出芽率达 96.67%~100%。中黄 13 最佳取材时间为开花后 49~65 d, 6-BA 浓度为  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 出芽率达 93.33%~100%。冀豆 12 和中黄 13 未成熟种子子叶节的出芽率比成熟种子子叶节分别提高 4% 和 10%。

**关键词:**大豆; 未成熟种子子叶节; 诱导

**中图分类号:**S565.1

**文献标识码:**A

**文章编号:**1000-9841(2011)-0369-05

## Shoots Regeneration of Cotyledon Node from Soybean Immature Seeds

WANG Lu-ping, QIAO Ya-ke, LI Gui-lan, ZHONG Lei, CUI Shan-shan, JI Zhan-bo

(Life Science and Technology College, Hebei Normal University of Science and Technology, Changli 066600, Hebei, China)

**Abstract:** Immature seed cotyledons nodes of Jidou 12 and Zhonghuang 13 were used as explants to research the effect of 6-BA concentration, time of obtaining materials and degree of seeds development on the proportion of shoots regeneration from immature seeds cotyledons nodes. The result showed that the best time of obtaining materials of Jidou 12 was 60–66 d after flowering, the optimal concentration of 6-BA in multiple shoots induction medium was  $1.0 \sim 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , and the proportion of shoots reached 96.67%–100%. The best time of obtaining materials of Zhonghuang 13 was 49–65 d after flowering, the optimal concentration of 6-BA in multiple shoots induction medium was  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , and the proportion of shoots reached 93.33%–100%. Proportion of shoots by immature seeds cotyledons nodes were higher than mature seeds cotyledons nodes by 4% and 10% for Jidou 12 and Zhonghuang 13, respectively.

**Key words:** Soybean; Immature seeds cotyledon node; Induction

大豆是世界上重要的粮食和油料作物,也是主要的工业原料。多年来,研究者通过传统的杂交育种和现代的转基因手段对大豆的性状进行改良,并取得了重要成果。尤其是随着基因工程技术的发展,大豆转基因技术也取得了快速发展<sup>[1-3]</sup>。

相对于水稻,玉米,烟草等作物,大豆是目前公认的较难进行遗传转化的植物,主要是因为大豆的再生率较低,高效大豆再生体系的建立是大豆遗传转化的基础。目前,大豆再生所用的外植体主要有子叶节<sup>[4-5]</sup>,无菌苗的茎尖<sup>[6]</sup>,未成熟胚子叶<sup>[7]</sup>,上胚轴和初生叶<sup>[8]</sup>,子叶<sup>[9]</sup>,成熟胚的胚尖<sup>[10]</sup>等。大豆子叶节<sup>[5]</sup>是遗传转化中应用最普遍的外植体,子叶节是成熟的大豆种子通过萌发后获得的。对未成熟大豆种子子叶节的再生系统研究则很少<sup>[11]</sup>。大豆未成熟子叶外植体诱导体细胞胚已经有很多

研究<sup>[12-18]</sup>,但是通过未成熟子叶直接诱导丛生芽的途径未见报道。大豆未成熟种子与成熟种子相比,其发育状态,生理状态都有很大差别,该文主要对大豆未成熟种子子叶节不定芽诱导条件进行了研究,旨在建立高效的不定芽再生系统,为大豆转基因提供应用基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

1.1.1 大豆品种 冀豆 12(河北省粮油作物所),中黄 13(中国农科院),种植在河北科技师范学院试验站。

1.1.2 不定芽诱导培养基 基本培养基为: B<sub>5</sub>培养基 + 3% 蔗糖 + 0.8% 琼脂, pH 5.8; 附加的 6-BA 浓度分别为 0、0.5、1.0、1.5、2.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

收稿日期:2011-02-19

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项资助项目(2009ZX08004-001B; 2009ZX08004-004B); 河北省自然科学基金资助项目(C2009000868); 河北省科技支撑计划资助项目(09220103D)。

第一作者简介:王卢平(1985-),女,在读硕士,研究方向为植物基因工程。E-mail: wangluping8503@163.com。

通讯作者:李桂兰(1963-),女,教授,博士,从事植物基因工程研究。E-mail: lgl63@126.com。

## 1.2 试验方法

1.2.1 外植体的制备 大豆开花后,定期取田间未成熟大豆豆荚,用水冲洗表面,75%的酒精处理30 s,再用0.1% HgCl<sub>2</sub>浸泡消毒8 min,在超净工作台上,剥去种皮,将2片未成熟子叶从子叶节处纵向切开,用解剖刀将下胚轴切断。每粒未成熟种子获得2个未成熟种子子叶节外植体。

1.2.2 芽诱导 将上述获得的外植体近轴面朝上接种到诱导培养基中。(25 ± 1)℃,16 h光照/8 h黑暗培养,每隔15 d继代1次。30 d后统计外植体的出芽率。出芽率(%) = (出芽外植体数/外植体总数) × 100;平均出芽数 = 总芽数/外植体总数(个)。

## 1.3 数据统计

采用 Microsoft Office Excel 2003 进行数据整理分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 6-BA 浓度对大豆未成熟种子子叶节不定芽诱导的影响

在一定范围内,随着6-BA浓度逐渐升高,大豆未成熟种子子叶节出芽率随之升高。6-BA浓度在0~1.0 mg · L<sup>-1</sup>范围内,随着激素浓度的升高,冀豆12的出芽率逐渐升高,在1.0 mg · L<sup>-1</sup>达到最高,出芽率达到92.00%,平均出芽数为1.88个,6-BA浓度超过1.5 mg · L<sup>-1</sup>出芽率下降。中黄13有相同的变化趋势,不同的是在6-BA浓度为1.5 mg · L<sup>-1</sup>时丛生芽获得率达到最高,达到81.25%,平均出芽数为1.89个(表1)。

表1 不同6-BA浓度对大豆未成熟种子子叶节出芽率的影响

Table 1 Effects of 6-BA concentration on Budding rate of immature seeds cotyledon node

大豆品种 Varieties	6-BA 浓度 Concentration of 6-BA/ mg · L <sup>-1</sup>	外植体数 Explants	出芽率 Budding rate /%	平均出芽数 Average of shoots
冀豆 12	0	90	87.33	1.15
Jidou 12	0.5	90	90.67	1.62
	1.0	90	92.00	1.88
	1.5	90	85.33	1.73
	2.0	90	88.67	1.70
中黄 13	0	110	38.50	0.75
Zhonghuang 13	0.5	100	58.50	1.09
	1.0	100	64.13	1.37
	1.5	100	81.25	1.89
	2.0	100	61.13	1.06

### 2.2 取材时间对大豆未成熟种子子叶节不定芽诱导的影响

分别在冀豆12开花后51、60、66 d取其未成熟种子,接种在诱导培养基上,获得不定芽诱导率分别为76.6%、94.8%、95%。51~60 d不定芽诱导率直线上升,此后不定芽诱导率保持平稳,到66 d时,出芽率仅提高了0.2%(图1)。冀豆12以开花后60~66 d为适宜取材时间段。分别在中黄13开花后42、45、49、65 d取材,出芽率分别为55.3%、49.5%、67.4%、73.3%(图2)。因此,利用未成熟种子子叶节进行丛生芽诱导的最佳取材时期,冀豆12为开花后60~66 d,中黄13为开花后49~65 d。

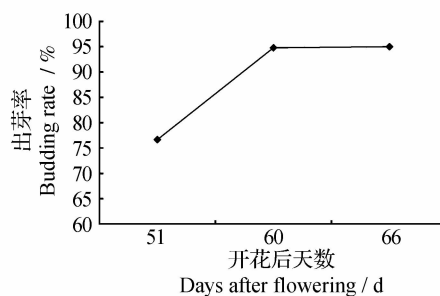


图1 冀豆12未成熟种子取材时间对出芽率的影响

Fig. 1 Effect of pods picking time on budding rate of Jidou 12

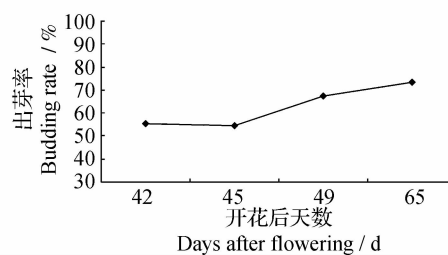


图2 中黄13未成熟胚取材时间对出芽率的影响

Fig. 2 Effect of pods picking time on budding rate of Zhonghuang 13

### 2.3 未成熟种子发育程度对不定芽诱导的影响

取冀豆12和中黄13不同发育阶段的未成熟种子,制备外植体,接种在含1.5 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA的诱导培养基上。随着种子发育未成熟种子的出芽率和平均出芽数都逐渐增加。冀豆12豆荚长度达到5.45 cm时,种子长度1.57 cm,此时种子颜色由绿色变为黄色,未成熟种子出芽率和平均出芽数都显著增加,出芽率达到100%,平均出芽数也达到最高(2.57个)。中黄13豆荚长度达到5.87 cm时,出芽率显著提高(表2),此时,豆荚及种子呈现黄色。

表 2 大豆未成熟种子发育程度对不定芽诱导的影响

Table 2 Effects of the degree of development on proportion of shoots of immature seeds

大豆品种	豆荚长度	豆粒的长度	豆荚和种子颜色	出芽率	平均出芽数
Varieties	Length of pods/cm	Length of seeds/cm	Pod and seed color	Budding rate/%	Average of shoots
冀豆 12	5.22	1.44	绿	60.00	0.83
	5.35	1.55	绿	96.67	1.62
	5.45	1.57	黄绿	100.00	2.57
中黄 13	5.08	1.08	绿	66.67	1.57
	5.64	1.38	绿	93.33	2.37
	5.87	1.59	黄	100.00	1.87

2.4 冀豆 12 和中黄 13 未成熟种子子叶节不定芽诱导最佳组合

综合取材时间、种子发育程度、外植体对 6-BA 敏感性来探索大豆未成熟种子子叶节的最佳芽诱导条件。从表 3 看出,冀豆 12 在开花后 60~66 d,豆荚及种子发育到最大,豆荚经历由绿变黄,配合 6-BA 浓度为 1.0~1.5 mg·L<sup>-1</sup> 条件下诱导出芽率为 96.67%~100%,诱导效果最佳,可作为冀豆 12 未成熟种子子叶节丛生芽诱导最佳诱导条件。

表 3 冀豆 12 未成熟种子子叶节丛生芽诱导最佳条件筛选

Table 3 The optimum condition of shoots induction of immature seeds cotyledon node of Jidou 12

取材时间	6-BA 浓度	出芽率	平均出芽数
Time of	Concentration of	Budding rate	Average of shoots
picking pods/d	6-BA/ mg · L <sup>-1</sup>	/%	
51	0	83.33	1.00
51	0.5	83.33	1.17
51	1.0	80.00	1.30
51	1.5	60.00	0.83
51	2.0	76.67	1.07
60	0	96.67	1.07
60	0.5	93.33	1.47
60	1.0	96.67	1.77
60	1.5	96.67	1.60
60	2.0	93.33	1.50
66	0	83.33	1.37
66	0.5	96.67	2.33
66	1.0	100.00	2.57
66	1.5	100.00	2.53
66	2.0	96.67	2.73

取材时间为开花后的天数。  
Time of picking pods is the days after flowering.

从表 4 看出,中黄 13 在开花后 50~65 d,豆粒饱满,种皮变黄时取材,在 6-BA 浓度为 1.5 mg·L<sup>-1</sup> 条件下诱导,出芽率高达到 93.33%~100%,可作为中黄 13 未成熟种子子叶节丛生芽诱导最佳条件。

表 4 中黄 13 未成熟种子子叶节丛生芽诱导最佳条件

Table 4 The optimum condition of shoots induction of immature seeds cotyledon node of Zhonghuan 13

取材时间	6-BA 浓度	出芽率	平均出芽数
Time of	Concentration of	Budding rate	Average of shoots
picking pods/d	6-BA/ mg · L <sup>-1</sup>	/%	
42	0	42.50	0.55
42	0.5	50.00	1.10
42	1.0	66.67	0.90
42	1.5	66.67	1.57
42	2.0	50.00	0.90
45	0	37.50	1.03
45	0.5	60.00	1.15
45	1.0	52.50	1.38
45	1.5	65.00	1.75
45	2.0	57.50	1.10
49	0	46.67	0.87
49	0.5	56.67	1.17
49	1.0	70.00	2.00
49	1.5	93.33	2.37
49	2.0	70.00	1.43
65	0	66.67	0.53
65	0.5	66.67	0.93
65	1.0	66.67	1.20
65	1.5	100.00	1.87
65	2.0	66.67	0.80

取材时间为大豆开花后天数  
Time of picking pods is days after flowering.

2.5 未成熟种子与成熟种子子叶节不定芽诱导率的比较

在 1.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA 培条件下,研究了未成熟种子与成熟种子子叶节不定芽诱导的差异。结果表明,未成熟种子比成熟种子子叶节不定芽诱导效率高。冀豆 12 和中黄 13 未成熟种子子叶节的出芽率比成熟种子子叶节分别高出 4% 和 10%,平均出芽数也分别高出 0.73 和 0.94 个(表 5)。

表 5 未成熟种子与成熟种子子叶节不定芽诱导率的比较

Table 5 The comparison of different explants on the proportion of shoots

品种 Varieties	外植体类型 Types of explant	外植体数 Explants No.	出芽率 Budding rate /%	平均出芽数 Average of shoots
冀豆 12 Jidou 12	成熟种子子叶节 Mature seeds cotyledon node	60	96	1.80
	未成熟种子子叶节 Immature seeds cotyledon node	60	100	2.53
中黄 13 Zhonghuang 13	成熟种子子叶节 Mature seeds cotyledon node	60	83.3	1.43
	未成熟种子子叶节 Immature seeds cotyledon node	60	93.3	2.37

### 3 讨 论

大豆未成熟种子子叶节是相对于成熟种子子叶节的一种新型外植体类型。这种外植体的获得不需要种子萌发过程,直接取大田里合适发育期的未成熟大豆豆荚即可。这简化了大豆再生及遗传转化外植体制备的过程。

在诱导大豆未成熟种子子叶节出芽时加入一定浓度的 6-BA,能明显提高出芽率,未成熟种子子叶节的出芽率随着 6-BA 浓度的升高先升高后降低,与以往其它文献中植物对 6-BA 敏感性研究结果一致<sup>[19-21]</sup>。诱导冀豆 12 未成熟种子子叶节出芽的最佳 6-BA 浓度为  $1.0 \sim 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,对中黄 13 最佳浓度为  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

大豆未成熟种子子叶节的取材是在结荚期,过早取材种子未发育完成,过晚取材大豆种子已成熟,未成熟种子子叶的不同发育程度和状态对其丛生芽诱导起关键作用,已有研究表明大豆未成熟子叶诱导体细胞胚时生育期和取材大小存在相关性<sup>[22]</sup>,最佳的取材时间取决于相对发育时期<sup>[23]</sup>。该研究结果表明未成熟种子的发育程度对子叶节丛生芽诱导有很大影响,通过对大豆开花后不同时间和不同大小的豆荚 2 个因素进行试验,初步得出结论:冀豆 12 在开花后 60~66 d,期间豆荚及种子发育到最大,种皮变黄;中黄 13 在开花后 49~65 d,鼓粒饱满,种皮变黄,上述时间取材获得的出芽率最高。该研究中 2 个大豆品种随取材时间的延长,丛生芽诱导率升高,均未出现下降的拐点,尚有待进一步研究。

未成熟种子作为大豆遗传转化材料有明显的优点。在相同的诱导条件下,冀豆 12 和中黄 13 的未成熟种子子叶节出芽率均比成熟种子子叶节出芽率分别高出 4% 和 10%,平均出芽数也高出 0.73 和 0.94 个。说明大豆未成熟种子子叶节通过直接

诱导丛生芽途径比成熟种子子叶节更易获得再生植株,因此可作为大豆遗传转化的材料。同时它也存在受大豆生长季节限制,可取材时间短等不足之处。这一缺陷可以通过在温室中种植大豆获得未成熟种子的方法来解决。

### 参考文献

- [1] Hinchee M A W, Connor-Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer[J]. *Nature Biotechnology*, 1988, 6: 915-922.
- [2] McCabe D E, Swain W F, Martinell B J, et al. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration[J]. *Nature Biotechnology*, 1988, 6: 923-926.
- [3] Dhir S K, Dhir S, Savka M A, et al. Regeneration of transgenic soybean(*Glycine max*) plants from electroporated protoplasts[J]. *Plant Physiology*, 1992, 99: 81-88.
- [4] 卜云萍,李明春,胡国武,等. 大豆子叶节组培再生系统与农杆菌介导的基因转化系统的比较研究[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2003, 36 (1): 103-108. (Pu Y P, Li M C, Hu G W, et al. The study of comparing the transformation system of *Agrobacterium*-mediated and regeneration system of cotyledon node of soybean culture[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*( Natural Science Edition), 2003, 36 (1): 103-108.)
- [5] Tsai Y C, Hitoshi S. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture[J]. *Plant Science Letters*, 1980, 19: 91-99.
- [6] Kartha K K, Pahl K, Leung N L, et al. Plant regeneration from meristems of grain legumes: soybean, cowpea, peanut, chickpea and bean[J]. *Canadian Journal of Botany*, 1981, 59: 1671-1679.
- [7] Barwale U B, Kems H R, Widholm J M. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryo genesis and organogenesis[J]. *Planta*, 1986, 167: 473-481.
- [8] Wright M S, Ward D V, Hinchee M A, et al. Regeneration of soybean(*Glycine max* L. Merr) from cultured primary leaf tissue [J]. *Plant cell Reports*, 1987, 6: 83-89.
- [9] Seth M, Ralph S, John C. A simple rapid protocol for adventitious shoot development from mature cotyledons of (*Glycine max*) cv

- Bragg[J]. In Vitro Cellular and Developmental Biology, 1989, 25 (4): 385-388.
- [10] 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.
- [11] Ko T S, Lee S, Farrand S K, et al. A partially disarmed vir helper plasmid, pKYRT1, in conjunction with 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid promotes emergence of regenerable transgenic somatic embryos from immature cotyledons of soybean[J]. Planta, 2004, 218: 536-541.
- [12] Ko T S, Lee S, Krasnyanski S, et al. Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explant[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107: 439-447.
- [13] Finer J J, Nagasawa A. Development of an embryogenic suspension culture of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1988, 15: 125-136.
- [14] Meurer C A, Dinkins R D, Redmond C T, et al. Embryogenic response of multiple soybean cultivars across three locations[J]. In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant, 2001, 37: 62-67.
- [15] Samoylov V M, Tucker D M, Thibaud-Nissen F, et al. A liquid-medium-based protocol for rapid regeneration from embryogenic soybean cultures[J]. Plant Cell Reports, 1998, 18: 49-54.
- [16] Samoylov V M, Tucker D M, Parrott W A. Soybean embryogenic cultures: the role of sucrose and total nitrogen content on proliferation[J]. In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant, 1998, 34: 8-13.
- [17] Walker D R, Parrott W A. Effect of polyethylene glycol and sugar alcohols on soybean somatic [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2001, 64(1): 55-62.
- [18] Lazzeri P A, Hidebrand D F, Collins G B. A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1987, 10: 197-208.
- [19] 李文霞, 宁海龙, 李文滨, 等. 6-BA 对大豆子叶节再生的影响[J]. 核农学报, 2007, 21(5): 502-505. (Li W X, Ning H L, Li W B, et al. Effect of 6-BA on regeneration of soybean cotyledonary node [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2007, 21(5): 502-505.
- [20] 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. 吉林农业大学学报[J], 2005, 27(2): 128-130. (Gong X C, Ji J, Wang P, et al. Effect of aseptic seedling age and 6-BA concentration on overgrowing shoots of soybean cotyledonary node [J]. Journal of Jilin Agricultural University [J], 2005, 27(2): 128-130.)
- [21] 李桂兰, 乔亚科, 杨少辉, 等. 农杆菌介导大豆子叶节遗传转化的研究[J]. 作物学报, 2005, 31(2): 170-176. (Li G L, Qiao Y K, Yang S H, et al. Study of the *Agrobacterium*-mediated transformation systems of soybean cotyledonary node[J]. Acta Agronomica Sinica, 2005, 31(2): 170-176.)
- [22] 王萍, 吴颖, 杨武杰, 等. 大豆未成熟子叶体细胞胚胎发生及其相关因子的分析[J]. 中国油料作物学报, 2002, 24(1): 29-31. (Wang P, Wu Y, Yang W J, et al. Somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean and analysis of correlative factors[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2002, 24(1): 29-31.)
- [23] 吴超, 武天龙. 大豆未成熟子叶体细胞再生及相关农艺性状影响因子的分析[J]. 大豆科学, 2004, 23(1): 21-24. (Wu C, Wu T L. Somatic embryogenesis from immature cotyledons and analysis of correlative agronomic characters[J]. Soybean Science, 2004, 23(1): 21-24.)

## 欢迎订阅 2011 年《大豆科学》

《大豆科学》是由黑龙江省农业科学院主管主办的大豆专业领域学术性期刊,也是被国内外多家重要数据库和文摘收录源收录的重点核心期刊。主要刊登有关大豆遗传育种、品种资源、生理生态、耕作栽培、植物保护、营养肥料、生物技术、食品加工、药用功能及工业用途等方面的学术论文、科研报告、研究简报、国内外研究述评、学术活动简讯和新品种介绍等。

《大豆科学》主要面向从事大豆科学研究的科技工作者,大专院校师生、各级农业技术推广部门的技术人员及科技种田的农民。

国内外公开发行,双月刊,16 开本,每期 180 页。国内每期订价:10.00 元,全年 60.00 元,邮发代号:14-95。国外每期订价:10.00 美元(包括邮资),全年 60 美元。国外由中国国际图书贸易总公司发行,北京 399 信箱。国外代号:Q5587。另外,编辑部现有少量 2007~2010 年精装合订本,每册 100.00 元(含邮费),欲购从速。

本刊热忱欢迎广大科研及有关企事业单位刊登广告,广告经营许可证号:2301030000004。

地址:哈尔滨市南岗区学府路 368 号《大豆科学》编辑部。

邮编:150086

电话:0451-86668735

E-mail: dadoukx@sina.com ddkexue@126.com