

# 大豆子叶节、胚尖再生植株的研究

李海燕,武小霞,刘 淼,韩英鹏

(东北农业大学大豆研究所,教育部大豆生物学重点实验室,哈尔滨,150030)

**摘要** 为了获得高效的大豆再生体系,以大豆品种合丰 35 和北京小黑豆的成熟种子为材料,利用氯气和升汞两种消毒方法,研究不同浓度 6-BA 和 2,4-D 对子叶节和茎出芽的影响。结果表明:在大豆萌发时,加入  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  6-BA 和  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D,每个外植体分化的芽数较高;在茎尖再生系统中,6-BA 和 2,4-D 诱导茎尖不定芽形成的最佳浓度是  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$  和  $3.5 \text{ mg L}^{-1}$ ,最佳诱导时间是 24 – 48 h。

**关键词** 大豆;子叶节;茎尖;激素;再生

**中图分类号** S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000 – 9841(2007)05 – 0709 – 04

## PLANT REGENERATION FROM COTYLEDONARY NODES AND EMBRYONIC TIPS OF SOYBEAN

LI Hai-yan, WU Xiao-xia, LIU Miao, HAN Ying-peng

(Soybean Research Institute of Northeast Agricultural University, Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education, Harbin 150030)

**Abstract** In order to obtain high efficiency soybean regeneration system, cotyledonary nodes and stem tips of soybean Hefeng 35 and Peking was used as explants. The disinfect ways of mercuric chloride and chlorine gas were compared, and the effect of 6-BA and 2,4-D on the regeneration of soybean cotyledonary node and stem tip were investigated. The results showed chlorine gas was a better disinfection method. The best concentration of 6-BA and 2,4-D was  $1.0$  and  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  in germination medium respectively. The optimum concentration of 6-BA and 2,4-D was  $3.0$  and  $3.5 \text{ mg L}^{-1}$  in regeneration of stem tips. And the best inducing time was 24 – 28 h.

**Key words** Soybean; Cotyledonary node; Stem tip; Hormone; Regeneration

大豆组织培养技术,对加速良种繁育、优良种质资源保存、有益突变体筛选及大豆遗传操作等都具有重要意义。虽然人们从 1960 年开始就对大豆组织培养进行了广泛的研究,但到目前为止大豆的遗传转化还是相当困难。如何建立一个稳定的再生实验系统是大豆遗传操作的关键性问题<sup>[1]</sup>。王萍

等<sup>[2]</sup>、刘北东等<sup>[3]</sup>、刘金华等<sup>[4]</sup>对大豆子叶节丛生芽形成的影响因素,特别是激素对丛生芽诱导的影响进行了研究。在此基础上,将品种、无菌苗苗龄与 6-BA 或 2,4-D 浓度 3 个因素放在一起进行研究,并对主要影响大豆子叶节丛生芽和茎出芽的诱导影响因素进行了讨论,为建立高效稳定的大豆再生体系

收稿日期:2007 – 02 – 25

基金项目:大豆生物学教育部重点实验室主任基金项目(SB07A04)

作者简介:李海燕(1978 – ),女,研究实习员,主要从事大豆基因工程方面的研究。Tel: 0451 – 55191945; E – mail: lhy2112002@ yahoo.com.cn

提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大豆品种合丰 35 和北京小黑豆,由东北农业大学大豆所提供。

1.2 试验方法

1.2.1 种子消毒 挑选健康无病害的大豆种子,采用以下两种种子消毒方法。(1)升汞消毒法,大豆种子分别用洗涤剂、自来水、蒸馏水冲洗后,用 70% 酒精缓慢摇动,0.1% 升汞消毒 4~20 min,无菌水冲洗 4~5 次。(2)氯气消毒法,将种子放于通风橱内密闭的干燥器内,混合 96 mL 5% 次氯酸钠和 4 mL 6 mol L<sup>-1</sup> 盐酸于反应液容器中,消毒 8~24 h 后用无菌水浸泡。待种子充分吸水,种皮软化后接种于萌发培养基上。每种方法处理 100 粒种子,2 次重复。

1.2.2 培养基 基本培养基为 B5 盐(B5 培养基的大量元素和微量元素),MS-C(MS 培养基的铁盐),B5-D(B5 培养基的有机物),3% 蔗糖,0.8% 琼脂粉,pH 5.8,在基本培养基上附加不同浓度的 6-BA 和 2,4-D,分别设 0、0.5、1.0、2.0、4.0 mol L<sup>-1</sup> 5 个浓度,以分化率[分化率=(有芽分化的外植体数/接种的外植体数)×100%]为指标,将外植体接种于芽诱导培养基上,每个处理 5 瓶,每瓶 6 个外植

体,3 次重复。14 d 后统计每个处理的分化率和每个外植体的芽数,探讨 6-BA 和 2,4-D 对丛生芽诱导的影响。

1.2.3 培养基附加的激素 在大豆萌发和诱导子叶节不定芽两个阶段,分别设计了 6-BA 和 2,4-D 在 0.5、1.0、2.0、4.0 mg L<sup>-1</sup> 范围和 6-BA 和 2,4-D 在 1.0、2.0、4.0、5.0 mg L<sup>-1</sup> 范围两对浓度梯度。6-BA 和 2,4-D 对诱导茎出芽时,设计 6-BA 的浓度范围是 1.0、2.0、3.0、4.0 mg L<sup>-1</sup>;2,4-D 的浓度范围是 1.0、3.0、3.5、4.5 mg L<sup>-1</sup>。而 6-BA 对不同外植体分化率的浓度范围是 0.5、1.0、2.0、4.0 mg L<sup>-1</sup>。

2 结果与分析

2.1 灭菌方法

通过对合丰 35 和北京小黑豆的种子分别进行不同消毒方法的比较发现(表 1),氯气消毒法相对升汞消毒法能够显著地降低污染率,提高分化率,二者的污染率分别为 3.0% 和 33.0%,分化率分别为 96.0% 和 84.0%。在保持高分化率的前提下,将大豆种子的污染率降到最低,是大量获得无菌苗的基础,也是大豆组织培养能够正常、顺利进行的前提条件。因此,建议采用氯气消毒法作为大豆种子消毒的方法。

表 1 大豆种子消毒方法的选择  
Table 1 Selection of the method for sterilization of soybean seeds

消毒方法 Method of sterilization	接种数 No. of seed	污染数 Contaminated seed	污染率/% Contaminated rate	发芽数 Germinated seed	分化率/% Differentiation
升汞消毒法 Mercuric chloride	100	33	33	84	84
氯气消毒法 Chlorine gas	100	3	3	96	96

对升汞和氯气的消毒效果也进行了对比,结果发现在升汞消毒 16 min 后,萌发率最高为 94%,比氯气消毒 14 h 后的萌发率低,氯气最高萌发率为 98%。

2.2 6-BA 和 2,4-D 对子叶节不定芽形成的影响

在大豆萌发时,虽然 6-BA 为 0.5 mg L<sup>-1</sup> 时所用萌发时间最短,但 6-BA 为 1.0 mg L<sup>-1</sup> 时萌发后的效果最好(图 1);2,4-D 为 2.0 mg L<sup>-1</sup> 时所用萌发时间最短(图 2)。合丰 35 的外植体出芽数高于北京

小黑豆,无菌苗苗龄短于北京小黑豆,并且在加 6-BA 和 2,4-D 的培养基中幼苗长得比较粗壮。不加 6-BA 和 2,4-D 的培养基大豆幼苗长得细长且出现大量弯曲,这一阶段加入的 6-BA 和 2,4-D 对其后丛生芽的出芽数也有影响<sup>[5]</sup>。在诱导子叶节不定芽时,6-BA 为 2.0 mg L<sup>-1</sup> 外植体出芽数最多(图 3),2,4-D 为 4.0 mg L<sup>-1</sup> 的萌发效果最好(图 4),并且合丰 35 比北京小黑豆好。选择 6-BA 作为大豆萌发和子叶节诱导不定芽的激素<sup>[6]</sup>。

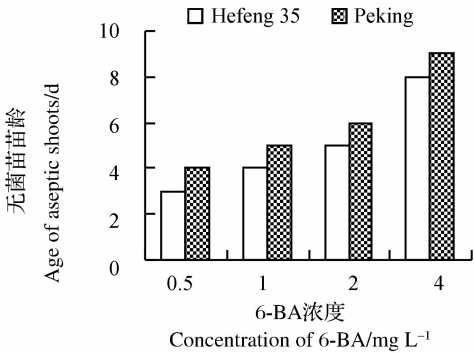


图1 不同浓度 6-BA 对无菌苗苗龄的影响  
Fig. 1 Effect of different concentrations of 6-BA on the age of aseptic shoots

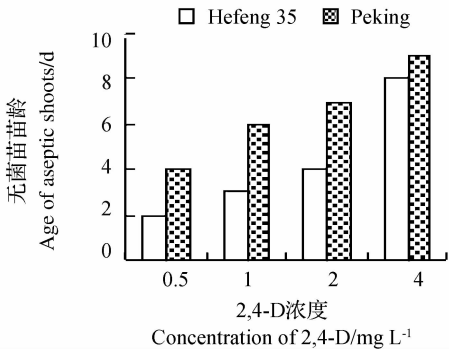


图2 不同浓度 2,4-D 对无菌苗苗龄的影响  
Fig. 2 Effect of different concentrations of 2,4-D on the age of aseptic shoots

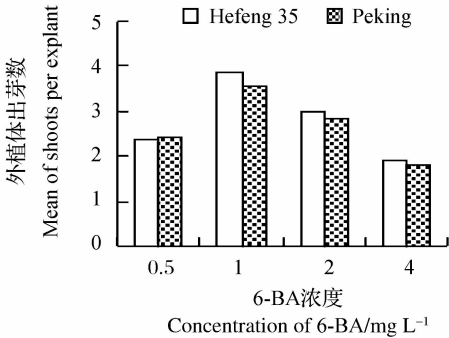


图3 不同浓度 6-BA 对外植体出芽数的影响  
Fig. 3 Effect of different concentrations of 6-BA on shoots per explant

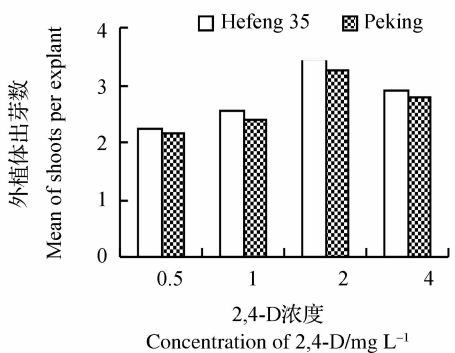


图4 不同浓度 2,4-D 对外植体出芽数的影响  
Fig. 4 Effect of different concentrations of 2,4-D on shoots per explant

D 浓度为 3.5 mg L<sup>-1</sup> 时,两个品种的出芽数最多。在 6-BA 和 2,4-D 诱导茎出芽时,两个品种差别不大。因此,应选择 6-BA 诱导茎出芽。

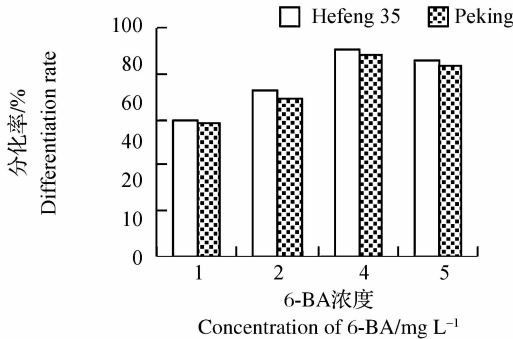


图5 不同浓度 6-BA 对诱导茎尖出芽的影响  
Fig. 5 Effect of different concentrations of 6-BA on shoots from stem tips

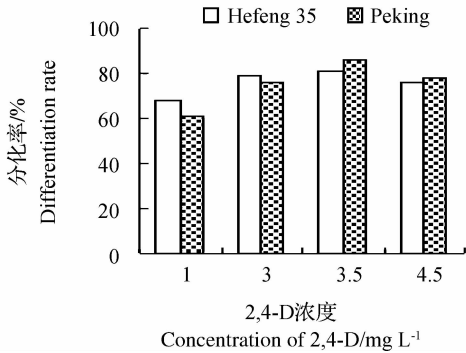


图6 不同浓度 2,4-D 对诱导茎尖出芽的影响  
Fig. 6 Effect of different concentrations of 2,4-D on shoots from stem tips

## 2.4 6-BA 浓度对不同外植体分化率的影响

由图 7、8 所示,在品种合丰 35 中子叶节随着 6-BA 浓度的增加,分化率也逐渐增大,当 6-BA 在 2.0 mg L<sup>-1</sup> 时分化率最大,但随着 6-BA 浓度的继续增

## 2.3 6-BA 和 2,4-D 对诱导茎出芽的影响

如图 5、6 所示,随着 6-BA 和 2,4-D 浓度的增加分化率逐渐增大,达到最大值后,分化率开始下降。低浓度时 6-BA 的出芽数少;6-BA 浓度达到 4.5 mg L<sup>-1</sup> 时,开始时出芽数比较多,但有些芽长到 1 ~ 2 mm 时就停止伸长,所以最后得到的大于或等于 0.5 cm 的芽也比较少。6-BA 浓度为 3.0 mg L<sup>-1</sup> 时,2,4-

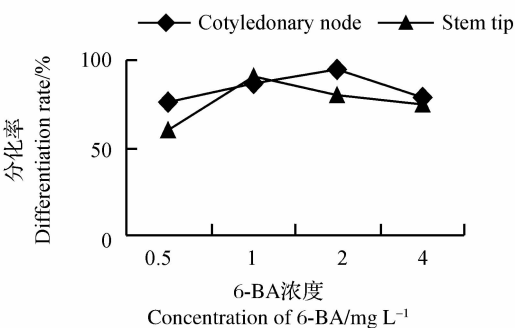


图 7 6-BA 对合丰 35 不同部位分化率的影响  
Fig. 7 Effect of 6-BA on differentiation rate of different explants in Hefeng 35

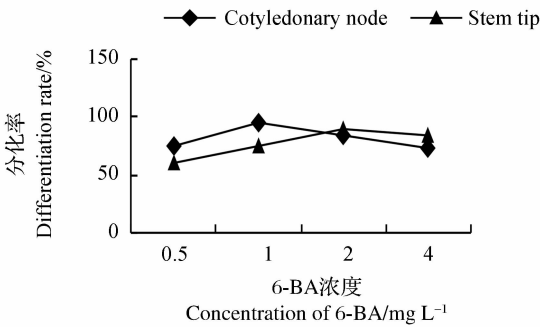


图 8 6-BA 对北京小黑豆不同部位分化率的影响  
Fig. 8 Effect of 6-BA on differentiation rate of different explants in Peking

加,子叶节的分化率不增加反而下降;合丰 35 茎尖在 1.0 mg L<sup>-1</sup> 时分化率达到最大,随着浓度增加分化率逐渐下降。北京小黑豆的子叶节在 1.0 mg L<sup>-1</sup> 时分化率最大,但随着 6-BA 浓度的继续增加,子叶节的分化率下降;而北京小黑豆的茎尖在 2.0 mg L<sup>-1</sup> 时分化率达到最大。从获得高分化率的角度

考虑,选择子叶节作为外植体比较适合。

3 结论

比较合丰 35 和北京小黑豆两个品种的试验结果,氯气消毒法是一种高效的种子消毒方法。6-BA 和 2,4-D 都对大豆萌发和诱导子叶节不定芽有作用,但从作用的效果看,6-BA 是大豆萌发和诱导子叶节不定芽的最佳激素。6-BA 和 2,4-D 在诱导茎出芽和促进大豆萌发一样,品种间差别不大。6-BA 对合丰 35 和北京小黑豆诱导茎出芽有明显的效果。在再生体系中,对比激素的种类对两个品种有明显的影响。为获得高分化率,可以选择子叶节作为适合的外植体。

参 考 文 献

[1] 薛仁镐,刘淑兰,韩碧文. 大豆再生植株的研究[J]. 延边农学院学报,1994,16:1-5.

[2] 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.

[3] 刘北东,朱延明,李海明,等. 大豆子叶节再生影响因素的研究[J]. 大豆科学,2002,21(2):88-92.

[4] 刘金华,王丕武,武丽敏,等. 大豆子叶节丛生芽的诱导[J]. 吉林农业大学学报,2001,23(4):15-17.

[5] 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.

[6] 袁鹰,刘德璞,郑培和,等. 大豆组织培养再生植株研究[J]. 大豆科学,2001,20(1):9-13.

(上接 704 页)

[14] 金剑,刘晓冰,王光华. 不同熟期大豆 R<sub>4</sub>-R<sub>5</sub> 期冠层某些生理生态性状与产量的关系[J]. 中国农业科学,2004,37(9):1293-1300.

[15] Upmeyer D J, Koller H R. Diurnal trends in net photosynthetic rate and carbohydrate levels of soybean leaves[J]. Plant Physiology, 1973, 51:871-874.

[16] Fulai L, Christian R. Jensen, Mathias N. Pod set related to photosynthetic rate and endogenous ABA in soybeans subjected to different water regimes and exogenous ABA and BA at early reproductive stages[J]. Annals of Botany, 2004, 94(3):405-411.

[17] Jiang H F, Egli D B. Soybean seed number and crop growth rate during flowering[J]. Agronomy Journal, 1995, 87:164-167.