

文章编号 1003-8701(2001)06-0020-04

# 影响大豆子叶节丛生芽形成的诱导因子研究

王 萍, 王军军, 商德虎, 王 罡

(中国人民解放军军需大学植物基因工程研究中心, 吉林 长春 130062)

**摘 要:**以栽培大豆品种吉林 43 和东农 42 的子叶节为外植体, 研究了无菌苗培养基、基本培养基、6-苄氨基嘌呤(6BA)和吲哚丁酸(IBA)4 个因子对丛生芽形成的影响。结果表明:3 种无菌苗培养基在诱导丛生芽率和每个外植体丛生芽数上无显著差异, 基本培养基 MSB 诱导丛生芽的效果好于 B<sub>5</sub>, 在基本培养基中附加 1.1 mg/L 或 1.7 mg/L 的 6-苄氨基嘌呤对诱导子叶节丛生芽有显著的促进作用。子叶节丛生芽诱导率在吉林 43 和东农 42 两个基因型间存在差异。

**关键词:**转基因; 大豆; 子叶节; 丛生芽

**中图分类号:**S565.103.53

**文献标识码:**A

大豆是世界上主要农作物之一, 在为人们提供食用油和植物蛋白质方面具有重要的地位, 然而大豆病虫害严重威胁着大豆生产。自 1984 年植物转基因首次在烟草上获得成功以来, 植物转化的研究发展异常迅猛, 为用基因转化方法培育抗病虫大豆新品种奠定了基础。人们试图用转基因的方法来改善大豆的某些性状, 至今已对大豆胚轴<sup>[1-3]</sup>、真叶<sup>[4]</sup>、未成熟子叶<sup>[5-12]</sup>、胚<sup>[13-15]</sup>以及子叶节<sup>[16-18]</sup>等进行再生植株的研究。由于子叶节具有取材不受季节限制、组培成苗时间短、再生植株不育株少等优点, 尽管以子叶节为外植体作遗传转化时会出现嵌合体, 但目前仍被认为是用于遗传转化的较好外植体。以往对子叶节的研究多集中在单一因素对诱导丛生芽的研究上, 本研究以大豆子叶节为外植体, 采用正交试验设计, 探讨无菌苗培养基、诱导培养基以及细胞分裂素(6BA 和 IBA)对诱导丛生芽产生的影响, 为建立高效稳定的大豆遗传转化系统提供依据。

## 1 材料与方 法

试验采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)的正交试验设计。4 个因子分别为无菌苗培养基、基本培养基、6-苄氨基嘌呤(6BA)和吲哚丁酸(IBA)。每个因子设 3 个水平, 共 9 个处理组合(表 1)。

供试品种为吉林 43 和东农 42, 挑选无病虫害的大豆种子, 用 75% 的乙醇表面消毒 3~5 min, 0.1% 的 HgCl<sub>2</sub> 消毒 15~20 min, 无菌水冲洗 3~4 次后, 接种于无菌苗培养基上, (25±1)℃弱光培养 5 d。切去大豆子叶的 1/3 和下胚轴(子叶节留 3~5 mm 下胚轴), 纵向切开子叶为两瓣, 每瓣子叶都带有部分下胚轴, 切去腋芽接种于各种诱导培养基上。在培养基上培养两周后调查丛生芽数, 计算丛生芽诱导率和每个子叶节平均丛生芽数, 并进行方差分析和

收稿日期: 2001-09-25

基金项目: 国家植物转基因中试及产业化基地专项基金(J99-B-001)

作者简介: 王 萍(1957-), 女, 长春市人, 教授, 主要从事作物遗传育种和植物转基因的研究。

差异显著性测验。

表 1 各处理组合的培养基及细胞分裂素浓度

处理组合	无菌苗培养基	基本培养基	6BA(mg/L)	IBA(mg/L)
CL <sub>1</sub>	1/2 MSB+1.1mg/L 6BA, 蔗糖 20 g, pH=5.5	MS	1.1	0
CL <sub>2</sub>	1/2 MSB+1.1mg/L 6BA, 蔗糖 20 g, pH=5.5	MSB	1.7	0.2
CL <sub>3</sub>	1/2 MSB+1.1mg/L 6BA, 蔗糖 20 g, pH=5.5	B <sub>5</sub>	10.0	0.5
CL <sub>4</sub>	MS+5 mg/L 6BA+0.05 mg/L IAA, 蔗糖 30 g, pH=5.8	MS	1.7	0.5
CL <sub>5</sub>	MS+5 mg/L 6BA+0.05 mg/L IAA, 蔗糖 30 g, pH=5.8	MSB	10.0	0
CL <sub>6</sub>	MS+5 mg/L 6BA+0.05 mg/L IAA, 蔗糖 30 g, pH=5.8	B <sub>5</sub>	1.1	0.2
CL <sub>7</sub>	B <sub>5</sub> +1.7 mg/L 6BA, 蔗糖 20 g, pH=5.5	MS	10.0	0.2
CL <sub>8</sub>	B <sub>5</sub> +1.7 mg/L 6BA, 蔗糖 20 g, pH=5.5	MSB	1.1	0.5
CL <sub>9</sub>	B <sub>5</sub> +1.7 mg/L 6BA, 蔗糖 20 g, pH=5.5	B <sub>5</sub>	1.7	0

注:MS 为无机, B<sub>5</sub> 为有机。

## 2 结果与分析

### 2.1 各因子对吉林 43 子叶节丛生芽诱导的影响

吉林 43 在各处理因子的作用下, 对子叶节出芽率和每个子叶节出芽数进行了方差分析和差异显著性测验, 结果见表 2 和表 3。

表 2 吉林 43 子叶节出芽率和每个子叶节出芽数的方差分析

变异来源	DF	出芽率			每个子叶节出芽数			F <sub>0.05</sub>	F <sub>0.01</sub>
		SS	MS	F	SS	MS	F		
区 组	2	211.93	105.96	<1	0.40	0.20	<1	3.63	6.32
无菌苗培养基	2	155.66	77.83	<1	1.81	0.91	2.29		
基本培养基	2	952.44	476.22	2.35	0.98	0.49	1.24		
6-苄氨基嘌呤	2	1 680.97	840.48	4.14*	5.12	2.56	6.46**		
吲哚丁酸	2	875.86	437.93	2.16	0.27	0.14	<1		
误 差	16	3 244.38	202.77		6.34	0.40			

\* 表示 0.05 水平显著, \*\* 表示 0.01 水平显著。

表 3 6-苄氨基嘌呤对吉林 43 子叶节出芽率和每个子叶节出芽数的显著性测验

6BA (mg/L)	子叶节出芽率			每个子叶节出芽数		
	平均(%)	差异显著性		平均(个)	差异显著性	
		0.05	0.01		0.05	0.01
1.1	65.90	a	A	2.60	a	A
1.7	64.47	a	A	2.19	a	A
10.0	48.49	b	A	1.54	b	B

方差分析结果表明, 吉林 43 在培养基中加 6-苄氨基嘌呤时对于诱导子叶节出芽有明显作用, 而其它因子(无菌苗培养基、基本培养基和吲哚丁酸)对诱导子叶节出芽没有明显作用。由多重比较结果可知, 在培养基中加入 1.1 mg/L 6-苄氨基嘌呤可显著提高丛生芽的诱导率, 浓度增大至 10 mg/L 时反而抑制芽的产生。

### 2.2 各因子对东农 42 子叶节丛生芽诱导的影响

对东农 42 大豆品种在各处理因子的作用下, 子叶节出芽率和每个子叶节丛生芽数进行方差分析(表 4)。

由表 4 可知, 4 个因子中只有基本培养基对东农 42 每个子叶节出芽数有明显作用。多

重比较结果表明,以 MSB 和 MS 为基本培养基时,每个子叶节出芽数为 2.25 和 1.8 个,差异不明显,而 MSB 对丛生芽的诱导率显著高于 B<sub>5</sub>(1.45 个)。

表 4 东农 42 子叶节出芽率和每个子叶节出芽数的方差分析

变异来源	DF	出芽率			每个子叶节出芽数			F <sub>0.05</sub>	F <sub>0.01</sub>
		SS	MS	F	SS	MS	F		
区 组	2	287.35	143.68	<1	0.01	0.005	<1	3.63	6.23
无菌苗培养基	2	1 077.45	538.73	2.45	0.20	0.10	<1		
基本培养基	2	506.45	253.22	1.15	2.86	1.43	4.55*		
6-卞氨基嘌呤	2	565.08	282.54	1.29	0.56	0.28	<1		
吲哚丁酸	2	904.03	452.02	2.06	0.02	0.01	<1		
误 差	16	3 516.48	219.78		5.03	0.31			

### 2.3 诱导大豆子叶节产生丛生芽的较适培养基的筛选

为寻找一个诱导大豆子叶节丛生芽较好的培养基,对两个品种的各处理组合的出芽率进行多重比较(表 5 和表 6)。

表 5 吉林 43 子叶节出芽率各个处理组合的多重比较

处理组合	平均数 (%)	差 异 显 著 性							
		X <sub>i</sub> -33.73	X <sub>i</sub> -51.26	X <sub>i</sub> -56.79	X <sub>i</sub> -59.51	X <sub>i</sub> -60.47	X <sub>i</sub> -61.52	X <sub>i</sub> -66.21	X <sub>i</sub> -69.96
CL <sub>9</sub>	77.10	43.37**	25.84	20.31	17.59	16.63	15.58	10.89	7.14
CL <sub>1</sub>	69.96	36.23*	18.70	13.17	10.54	9.49	8.44	3.75	
CL <sub>6</sub>	66.21	33.48*	15.95	10.42	7.70	6.74	4.69		
CL <sub>8</sub>	61.52	27.79*	10.26	4.73	2.01	1.05			
CL <sub>3</sub>	60.47	26.74	9.21	3.68	0.96				
CL <sub>4</sub>	59.51	25.78	8.25	2.72					
CL <sub>2</sub>	56.79	23.06	5.53						
CL <sub>5</sub>	51.26	17.53							
CL <sub>7</sub>	33.73								

表 6 东农 42 子叶节出芽率各个处理组合的多重比较

处理组合	平均数 (%)	差 异 显 著 性							
		X <sub>i</sub> -47.63	X <sub>i</sub> -48.93	X <sub>i</sub> -59.22	X <sub>i</sub> -69.52	X <sub>i</sub> -65.54	X <sub>i</sub> -66.58	X <sub>i</sub> -70.54	X <sub>i</sub> -74.40
CL <sub>4</sub>	81.89	34.26*	32.96*	22.67	22.37	16.35	15.31	11.35	7.49
CL <sub>9</sub>	74.40	26.77	25.47	15.18	14.88	8.86	7.82	3.68	
CL <sub>6</sub>	70.54	23.11	21.81	11.52	11.02	5.00	3.96		
CL <sub>1</sub>	66.58	18.95	17.65	7.36	7.06	1.04			
CL <sub>5</sub>	65.54	17.91	16.61	6.32	6.02				
CL <sub>3</sub>	69.52	11.89	10.59	0.30					
CL <sub>8</sub>	59.22	11.59	10.29						
CL <sub>2</sub>	48.93	1.30							
CL <sub>7</sub>	47.63								

由表 5 和表 6 可知,CL<sub>6</sub> 和 CL<sub>9</sub> 两个处理组合的子叶节出芽率在吉林 43 和东农 42 两个品种中均较高,排在前 3 位,且差异未达显著水平。而 CL<sub>1</sub> 仅对吉林 43 丛生芽的诱导效果好,CL<sub>4</sub> 仅对东农 42 丛生芽的诱导效果好。因此,建议选用 CL<sub>6</sub> 和 CL<sub>9</sub> 处理组合诱导大豆子叶节丛生芽的形成。

### 3 讨 论

#### 3.1 培养基成分与细胞分裂素浓度对大豆子叶节丛生芽诱导的影响

周思君认为在无菌苗培养基中附加低浓度(1.7 mg/L)的 6BA 可对诱导大豆子叶节丛生芽形成有明显的促进作用。袁鹰在以子叶节为外植体诱导丛生芽时,无菌苗培养基为 1/2 MS 附加 0.5~1 mg/L 6BA,每个外植体可诱导 2~3 个丛生芽,附加 1.5~2 mg/L 6BA 时为 20~30 个丛生芽,附加 4 mg/L 6BA 时平均 30 个丛生芽,但苗多为畸形。本研究采用的 3 个无菌苗培养基在平均丛生芽数上差异未达显著水平,这可能是由于各不同浓度的 6BA 与其不同基本培养基组合,尤其是较高浓度 6BA(MS+5 mg/L 6BA)未出现高频率丛生芽和畸形苗,可能是附加 0.05 mg/L IAA 有一定的作用。

诱导子叶节产生丛生芽时常采用 MS 或 B<sub>5</sub> 作为基本培养基,本试验中 MSB 作为基本培养基,在诱导东农 42 每个子叶节产生丛生芽显著好于 B<sub>5</sub>,在诱导出芽率上 3 种培养基间无明显差异。

细胞分裂素的种类和浓度对子叶节丛生芽的分化和发育具有重要的作用。有人认为低浓度的 6BA 促进芽的分化,高浓度 6BA 抑制芽的发育,但适量的 IBA(1~2 mg/L)有利于芽的分化。本试验中选用 1.1 mg/L 和 1.7 mg/L 的 6BA 对诱导丛生芽形成较 10 mg/L 6BA 具有良好的促进作用,而低浓度(0.2~0.5 mg/L)IBA 对诱导丛生芽的产生与对照无显著差异。

#### 3.2 大豆基因型在形成丛生芽时对培养基成分和细胞分裂素的反应

吉林 43 和东农 42 两个大豆基因型在 CL<sub>6</sub> 和 CL<sub>9</sub> 处理组合中丛生芽的诱导率均较高,即以 MS 附加 5 mg/L 6BA 和 0.05 mg/L IAA 为无菌苗培养基,以 B<sub>5</sub> 附加 1.1 mg/L 6BA 和 0.2 mg/L IBA 为诱导培养基组合时与 B<sub>5</sub> 附加 1.7 mg/L 6BA 为无菌苗培养基和诱导培养基组合相比,诱导大豆子叶节产生丛生芽的效果是一致的。前者在无菌苗培养基中加入了高浓度(5 mg/L)6BA 没有使丛生芽诱导率下降,可能与在无菌苗培养基中加入了 0.05 mg/L IAA 和在诱导培养基中加入 0.5 mg/L IBA 有关。此外,CL<sub>1</sub> 对吉林 43 丛生芽的诱导较好,CL<sub>4</sub> 对东农 42 丛生芽诱导效果较好,可能是东农 42 较吉林 43 在诱导子叶节丛生芽时需要更高的细胞分裂素水平,此问题有待于进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] 吉林省农业科学院作物育种所大豆组织培养组. 从大豆下胚轴愈伤组织诱导植株成功[J]. 植物学报, 1976, 18(3): 258-262.
- [2] Kimball S L and Bingham E T. Adventitious bud development of soybean hypocotyl sections in culture. Crop Science, 1973, 13: 758.
- [3] Buising Chariss M, et al. Early events of multiple bud formation and shoot developments in soybean embryonic axes treated with the cytokinin 6-benzylaminopurine. American Journal of Botany, 1994, 81(11): 1435-1448.
- [4] Wright M S, et al. Regeneration of soybean (*Glycine max* L. Merr.) from cultured primary leaf tissue. Plant Cell Reports, 1987, 6: 83.
- [5] Finer John J and Nagasawa Akitsu. Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill.). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1988, 15: 125-136.
- [6] Bailey M A, et al. Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean. In Vitro Cell Dev. Biol., 1993, 29: 102-108.
- [7] Liu W, et al. Somatic embryogenesis in soybean via somatic embryo cycling. In Vitro Cell Dev. Biol., 1992, 28: 153-160.
- [8] Komatsuda T and Ohyama K. Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean *Glycine max*. Theor Appl. Genet, 1988, 75: 695-700.
- [9] Parrott W A, et al. Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1989, 16: 15-21.

and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant and Soil*, 1997, 194, 99—114.

## Study on Rhizobia Infections to Tobacco Hairy Roots by Using Reporter Gene lacZ

WANG Yi-qun, et al.

(College of Biological Engineering, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China)

**Abstract:** Tobacco hairy roots were induced by *A. rhizogenes* strain LBA1314 using leaf disc transformation. The plasmids harboring the reporter gene lacZ fused to the promoters of hemA, nifHDK, and nifH respectively, were transformed into *rhizobia* by triparental mating and the conjugated *rhizobia* were inoculated into tobacco hairy roots. The results indicated that the histochemical staining of  $\beta$ -galactosidase and a cross-section of tobacco hairy roots showed that the *rhizobia* could infect or enter into the non-legume tobacco hairy roots. The bacteria isolated and purified from the colonized roots, which were stained again for  $\beta$ -galactosidase activity, were reinoculated into legume pea for nodulation. It was showed that the bacterias in the formed nodules with blue color after  $\beta$ -galactosidase staining were the pea *rhizobia* with lacZ reporter gene.

**Key words:** *Rhizobia*; Infection; Tobacco hairy roots;  $\beta$ -galactosidase

(上接 23 页)

- [10] 李大伟,等. 大豆未成熟胚培养中高浓度植物生长素的作用及其植株[J]. 植物学报, 1989, 3(5): 349—354.
- [11] 刘博林,等. 两个栽培大豆品种的体细胞胚胎发生和植株再生的研究[J]. 中国油料作物学报, 1999, 21(2): 11—13.
- [12] 刘艳芝,等. 大豆幼胚子叶诱导胚胎发生[J]. 吉林农业科学, 1999, 24(6): 16—18.
- [13] 邓向阳,等. 大豆主栽品种体细胞胚胎发生的影响因素及再生植株[J]. 实验生物学报, 2000, 33(1): 69—79.
- [14] Ranch J P, et al. Plant regeneration from embryo-derived tissue cultures of soybeans. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 1985, 21(11): 653—658.
- [15] 周思君,等. 从大豆幼胚诱导胚胎发生再生植株[J]. 大豆科学, 1989, 8(1): 39—44.
- [16] Cheng T Y, et al. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture. *Plant Science Letters*, 1980, 19: 91—99.
- [17] Mante S, et al. A simple, rapid protocol for adventitious shoot development from mature cotyledons of *Glycine max* cv Bragg. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 1989, 25(4): 385—388.
- [18] 袁 鹰,等. 大豆组织培养再生植株研究[J]. 大豆科学, 2001, 20(1): 9—13.

## Effect of Induce Factors on Multiple Bud Formation of Cotyledonary Node in Soybean

WANG Ping, WANG Jun-jun, SHNAG De-hu, WANG Gang

(Research Center of Plant Genetic Engineering, The Quatermaster  
University of PLA, Changchun, 130062, China)

**Abstract:** The effects of four factors on multiple bud formation using two varieties (Jilin 43 and Dongnong 42) cotyledonary node in soybean were researched. The results showed that difference of frequency and number of multiple bud did not reached significant level. MSB medium is better than B5 medium in inducing multiple bud. 6-benzylaminopurine (1.1 mg/L or 1.7 mg/L) stimulated multiple bud formation. The frequency of multiple bud formation was not different between two genotypes.

**Key words:** Trans gene soybean; Cotyledonary node; Multiple shoot-bud