

文章编号: 1003-8701(2002)02-0007-04

# 生长素诱导大豆未成熟子叶 胚胎发生效应的研究

王 罡, 王 萍, 吴 颖

(中国人民解放军军需大学植物分子生物学研究室, 吉林 长春 130062)

**摘 要:**用 2,4-D 与萘乙酸两种生长素的各 4 种浓度诱导大豆未成熟子叶胚胎发生。结果表明,两种生长素均可诱导胚胎发生,并且胚胎发生率和平均胚数在两种生长素间无显著差异;品种在平均胚数上存在差异。高浓度的 2,4-D 诱导胚胎发生效果好于低浓度,诱导率达 41.23%。同时,观察到诱导大豆未成熟子叶胚胎发生时,开始第一周高浓度的 2,4-D 对胚胎发生有更重要的作用。

**关键词:**大豆;生长素;未成熟子叶;胚胎发生

**中图分类号:**S565.103.53

**文献标识码:**A

近年来,随着分子生物学的迅猛发展,植物的遗传转化研究已成为基因工程的一个重要领域,它可克服远缘杂交的困难,缩短育种周期,改良品种的农艺性状,成为农作物育种工作的重要组成部分。我国在水稻、小麦、玉米等作物上广泛开展了转基因作物的研究,但大豆在这方面的研究进展较慢,其主要原因是大豆的组织培养,尤其是植株再生极其困难,不能满足遗传转化的要求。1983 年 Christiansont 等人<sup>[1]</sup>首次报告了栽培大豆以幼胚胚轴为外植体诱导胚性愈伤组织,将此在含有 5 mg/L 2,4-D,以 20 mM 柠檬酸铵作为氮源的改良 MS 培养基中培养,诱导胚状体发生,并首次获得再生植株。Lizzeri 等人<sup>[2]</sup>以子叶为外植体,用 10 mg/L NAA 诱导幼嫩子叶不经愈伤化而直接产生子叶期体细胞胚,并获可育植株。尽管以大豆的真叶、胚轴、子叶等为外植体都获得了植株再生<sup>[3-5]</sup>,但诱导频率低,重复性差,不能满足遗传转化对组织培养的要求。因此,如何提高大豆的再生率和优化大豆组织培养体系是急需解决的问题。本研究选用东北三省 6 个大豆主栽品种,用 2,4-D 和萘乙酸两种生长素诱导未成熟子叶体细胞胚胎发生,探讨生长素种类和浓度对胚胎发生的影响,并研究在诱导培养中培养基与生长素的浓度更换与否对胚胎发生的作用,以其寻找较适合于大豆主栽品种诱导未成熟子叶体细胞胚胎发生的激素种类、浓度以及培养方法,进一步完善大豆组织培养体系,为大豆遗传转化奠定基础。

## 1 材料与方 法

供试材料为东北三省主栽的 6 个大豆品种:吉林 26、吉林 35、黑农 41、东农 37、绥农 14

收稿日期:2001-12-20

基金项目:国家植物转基因中试及产业化基地专项基金(项目编号 J99-B-001)

作者简介:王 罡(1964-),男,吉林省吉林市人,教授,主要从事植物分子生物学与基因工程研究。

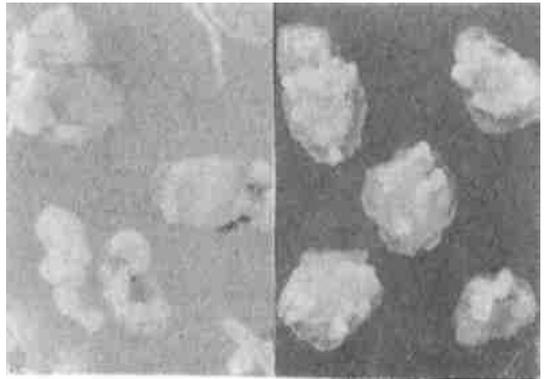
和辽豆 10。以 MS 为基本培养基,分别附加 2,4-D 和萘乙酸两种生长素,浓度各设 4 个(5、10、15 和 20 mg/L)。培养基更换试验所用大豆品种为吉林 43,设 4 个处理:①MS+2,4-D 20 mg/L;②MS+2,4-D 20 mg/L,2 周后更换一次培养基;③MS+2,4-D 20 mg/L,2 周后换 MS+2,4-D 5 mg/L;④MS+2,4-D 20 mg/L,每周换一次 MS+2,4-D 5 mg/L 培养基,换 2 次。

大豆开花后 20 d 左右取大豆幼荚,用 75%乙醇消毒后,剥出未成熟子叶,切去胚轴接种在各种培养基中,于 25℃条件下暗培养。5~6 周调查各处理的出愈和出胚外植体数,计算出愈率(%)=出愈外植体数÷接种外植体数×100,胚胎发生率(%)=胚胎发生外植体数÷接种外植体数×100,平均出胚数=出胚数÷接种外植体数。出愈率和胚胎发生率经反正弦转换进行方差分析和显著性测验。

## 2 结果与分析

### 2.1 生长素对诱导未成熟子叶胚胎发生的效果

2,4-D 和萘乙酸两种生长素均可诱导大豆体细胞胚胎发生,但发生的过程不同。以 2,4-D 诱导胚胎发生时,未成熟子叶先形成愈伤组织,之后在愈伤组织中出现黄色的胚;未成熟子叶在加有萘乙酸的培养基培养时,形成很少或不形成愈伤组织,在绿色子叶上直接产生胚(图 1)。大豆品种和两种生长素浓度所诱导产生的出愈率、胚胎发生率、平均出胚数等性状的 F 测验结果列于表 1。



NAA 诱导                      2,4-D 诱导  
图 1 大豆未成熟子叶的胚胎发生

表 1 大豆品种和两种生长素浓度的胚胎发生 F 值

变异来源	自由度	出愈率		胚胎发生率		平均出胚数		F <sub>0.05</sub>
		2,4-D	NAA	2,4-D	NAA	2,4-D	NAA	
大豆品种	5	0.793	11.279**	1.663	2.346	3.076*	4.185*	2.90
生长素浓度	3	0.994	2.998	4.071*	0.952	4.163*	0.517	3.29

从表 1 结果可知,两种生长素在诱导大豆品种出愈率、胚胎发生率和平均胚数等性状上结果相似,除用 NAA 诱导出愈率时在大豆品种间差异达极显著外,出愈率和胚胎发生率在品种间差异均未达显著水平;平均出胚数在使用两种生长素时,品种间差异均达显著。各品种在不同生长素条件下形成平均胚数见图 2、图 3。

从图 2 和图 3 可以看出,在两种不同生长素诱导下,平均出胚数均以绥农 14 为最好。差异显著性测验结果表明,绥农 14 的平均出胚数除用 2,4-D 诱导时与品种辽豆 10、用 NAA 诱导时与品种吉林 35 间差异达显著外,显著或极显著地高于其他品种。辽豆 10 在 2,4-D 诱导时平均出胚数较高,但当用 NAA 诱导时效果不佳。吉林 35 则相反,在 NAA 诱导时平均出胚数最高,为 1.888 个,而在 2,4-D 诱导时仅为 0.588 个。可见,大豆不同品种在诱导未成熟子叶胚胎发生时所需要的生长素种类和浓度存在差异,即各品种在诱导胚胎发生时有其各自所需要的生长素种类。与以往的胚胎发生受基因型影响的试验结果<sup>[6-8]</sup>是一致的。

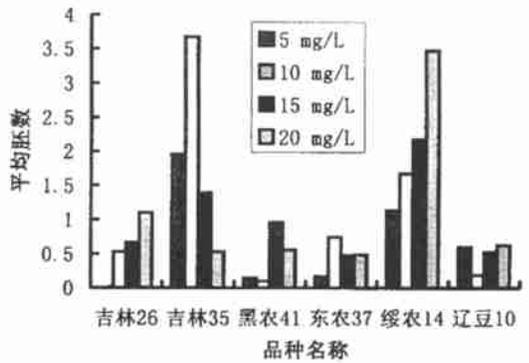
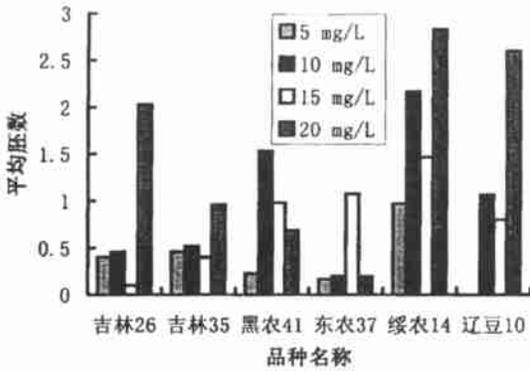


图2 大豆在不同浓度 2,4-D 诱导下的平均胚数

图3 大豆在不同浓度 NAA 诱导下的平均胚数

从表1我们已经知道,NAA对大豆未成熟子叶的出愈率、胚胎发生率和平均出胚数均无明显影响,而加入不同浓度2,4-D后胚胎发生率和平均出胚数存在显著差异,对其进行显著性测验,结果列于表2。

表2 不同浓度 2,4-D 诱导大豆胚胎发生率和平均胚数的显著性测验

2,4-D 浓度 (mg/L)	胚胎发生率 (%)	显著性		平均出胚数	显著性	
		0.05	0.01		0.05	0.01
20	41.23	a	A	1.552	a	A
15	30.04	a	A	0.805	ab	A
10	28.18	ab	A	0.992	ab	A
5	11.77	b	A	0.372	b	A

表2结果表明,在诱导大豆未成熟子叶胚胎发生时,在MS培养基中附加20 mg/L高浓度的2,4-D效果较好,比5 mg/L低浓度时诱导率增加3.5倍,这与周思君<sup>[9]</sup>、刘艳芝<sup>[10]</sup>的试验结果是相似的,可能作为高脂肪和高蛋白含量的大豆,在诱导胚胎发生时需要较高水平的生长素浓度。

## 2.2 培养基与 2,4-D 浓度的更换对胚胎发生的影响

在组织培养中,培养基的更换以及生长素浓度的改变都会直接影响到外源激素的水平,势必会对胚胎发生产生影响。为此,我们以吉林43为材料对此进行了研究,方差分析结果列于表3。

表3 不同培养基更换方法对胚胎发生的方差分析

性状	范围	自由度(DF)	平方和(SS)	均方(MS)	F值	F <sub>0.05</sub>
出愈率(%)	90.83~100	3	125.550	41.850	0.251	3.86
胚胎发生率(%)	16.17~22.5	3	10.297	3.432	0.023	3.86
平均胚数	0.62~1.08	3	0.588	0.196	0.685	3.86

从表3可知,4种更换培养方法在大豆的出愈率、胚胎发生率和平均胚数性状上的差异不大,均未达到显著水平,说明在用2,4-D诱导大豆未成熟子叶胚胎发生的过程中,第一周的高2,4-D浓度对胚胎的发生是非常重要的,而后在培养基中2,4-D浓度并不是很重要。

## 3 结论

2,4-D与NAA两种生长素均可诱导大豆体细胞胚胎发生,尽管大豆品种对两种生长素的反应不完全相同,但经t测验,两种生长素间差异未达显著,即两种生长素对胚胎发生率

和平均胚数的诱导效果是相似的。

高浓度(20 mg/L)2,4-D 比低浓度(5 mg/L)可更好的诱导大豆体细胞胚胎发生,在以大豆未成熟子叶作为外值体诱导胚胎发生时,开始第一周的 2,4-D 浓度至关重要,而后的 2,4-D 浓度对胚胎发生的影响作用不大。

#### 参考文献:

- [1] Christianson M L, Warnick D A and Carlson P S. A morphogenetically competent soybean suspension culture[J]. Science, 1983, 222, 632—634.
- [2] Lazzari P A, Hidebrand D F, Collins G B, et al. A procedure for plant regeneration from immature cotyledone tissue of soybean[J]. Plant Molec Biol. Reporter, 1985, 3, 160—167.
- [3] Wright M S, Ward D V, Hinchee MA, et al. Regeneration of soybean (*Glycine max* L. Merr.) from cultured primary leaf tissue[J]. Plant Cell Reports, 1987, 6, 83—89.
- [4] Kameya T and Widholm J. Plant regeneration from hypocotyls sections of *Glycine* species[J]. Plant Sci. Lett., 1981, 21, 289—294.
- [5] Barwale U B, Kerns H R and Widholm J M. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis [J]. Planta, 1986, 167, 473—481.
- [6] Komatsuda T and K Ohyama. Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean *Glycine max* [J]. Thero Appl Genet. 1988, 75, 695—700.
- [7] Parrott W A, William E G, Hildebrand D F, Collins G B. Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1989, 16, 15—21.
- [8] Bailey M A, Boerma H R and Parrott W A. Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean[J]. In Vitro Cell Dev Biol., 1993, 29, 102—108.
- [9] 周思君,尹光初,雷勃钧,何志鸿. 从大豆幼胚诱导胚胎发生再生植株[J]. 大豆科学, 1989, 8(1): 39—45.
- [10] 刘艳芝,赵桂兰,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.

## The Effect of Embryogenesis of Immature Cotyledon Induced by Auxins in Soybean

WANG Gang, WANG Ping, WU Ying

(Laboratory of Plant Molecule Biology, Quartermaster University, Changchun 130062, China)

**Abstract:** Embryogenesis were induced under 4 concentrations of 2,4-D and NAA in immature cotyledon of soybean. The results showed that embryogenesis in soybean could be induced with 2,4-D and NAA. The difference of frequency of embryogenesis and means of embryo was not significant between 2,4-D and NAA. The means of embryo was different among soybean varieties. The effect of higher concentration 2,4-D to induce embryogenesis was better than lower one. The frequency of embryogenesis under 20 mg/L 2,4-D was 41.23%. The high concentration 2,4-D used in the first week of culture was very important when embryogenesis were induced in immature cotyledon of soybean.

**Key words:** Soybean; Auxin; Immature cotyledon; Embryogenesis