# 农杆菌介导的大豆体细胞胚遗传转化影响因子的研究*

王晓春[1,2,3] 王 罡**[1] 季 静[1] 王 萍[2] 刘尚前[3]

(1. 天津大学农业与生物工程学院,天津 300072;2. 淮海工学院 海洋学院,连云港 222005;
3. 河北北方学院南校区农业科学系,河北宣化 075131)

摘要 用大豆体细胞胚为外植体,以抗性体细胞胚筛选率为转化率的指标,研究了农杆菌介导的大豆体细胞胚遗传转化系统的几种影响因子。结果表明,用球形期的体细胞胚受伤处理作为转基因的受体、预培养1.5天有利于转化;筛选不同的代数,转化率在3个月以前明显下降,而在3个月以后则基本稳定在8%左右。

关键词 大豆;农杆菌介导;体细胞胚;遗传转化
中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2005)01-0021-05

随着生物技术的发展,基因转移被视为大豆改良和常规育种的有效补充途径,并取得了一定的进展[1-3],在各种遗传转化方法中,农杆菌是自然界存在的天然基因工程载体,具有许多优点已经被许多植物转基因研究应用,它是大豆遗传转化的首选方法[4]。长期以来,由于影响大豆转化频率的因子[5],如受基因型限制、某些大豆品种对农杆菌不敏感[6]等原因,使转化的最佳条件难以确定,使农杆菌介导的大豆遗传转化频率低,实验结果重复性差。

体细胞胚多数来源于单细胞起源,转基因植株嵌合体少,胚的结构完整,成苗快,数量多,重复性好,转化功能细胞多,即处于转化感受态的细胞数量多,因此是基因转化的良好受体[7-10]。

本文用带有双价抗虫基因(Bt基因和CptI基因)的根癌农杆菌,以大豆的体细胞胚为受体进行遗传转化。对影响农杆菌转化的因素如外植体年龄、预培养时间、筛选代数[11]及筛选方式等进行了研究,优化农杆菌介导的大豆遗传转化体系,以期获得抗虫转基因植株,为大豆的遗传转化提供实验依据和理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

受体材料:军需大学植物基因工程中心提供的大豆体细胞胚东农L13、合丰25、东农40、黑农35、CH21141、PROGRESS。

质粒和菌株:质粒为双元载体pGBI121S4ABC,由中国农业科学院生物技术研究中心郭三堆实验室构建和提供,含有双价抗虫基因(Bt基因和CpTI基因)、NPTⅡ基因、Gus基因,启动子分别为35S、35S、NOS和35S。实验所用农杆菌菌株为LBA4404,带有卡那霉素抗性筛选标记。

植物组织培养基以及培养条件:

继代培养基 MS+2,4-D(15mg/L-20mg/L)+0.8%琼脂+3%蔗糖 pH=5.8 自然光

重悬培养基 液体继代培养基+AS(100μmol/L) pH=5.8 自然光

共培养培养基 继代培养基+AS(100μmol/L) pH=5.6 黑暗

脱菌筛选培养基 继代培养基+(50-300mg/L)头孢霉素+卡那霉素(25-50mg/L)

萌发培养基1 MS+1%活性炭 +0.8%琼脂+10%蔗糖 光照16h/d

萌发培养基2 MS+0.8%琼脂+10%蔗糖 光照16h/d

* 收稿日期:2004-07-12
项目来源:本研究由“国家植物转基因技术研究开发与中试基地建设”专项课题(J99-B-001)资助
作者简介:王晓春(1972-),女,讲师,硕士,主要从事作物栽培与遗传育种工作的研究。联系电话:0313-2111778或13180579055
**通讯作者:王罡,教授,博士生导师。Wgtt2003@yahoo.com.cn

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

壮苗培养基 MSB ＋0.8％琼脂＋3％葡萄糖 pH＝7 光照 16h/d

(上述后三种培养基同时加入卡那霉素(0－50mg/L)和头孢霉素(0－300mg/L)

预培养培养基 MS＋0.8％琼脂＋3％ 蔗糖＋0.3M 甘露糖 pH＝5.8 自然光

工程菌培养基：工程菌 LBA4404 的培养基用 YEP 培养基。

1.2 方法

1.2.1 工程菌液制备

在超净工作台上，从 YEP 培养平板上挑取单菌落接种于 YEP 培养液中(含 50mg/L 卡那霉素，50mg/L 利福平，25mg/L 链霉素)，于 28℃、180rpm 振荡培养过液(约 24～36h)。当菌液逐步浑浊时，随时取样测定其 $OD_{600}$ 值，然后在 4℃、3500 转/分，10 分钟离心搜集菌体，重悬于重悬培养基备用。

1.2.2 农杆菌侵染转化以及植株再生

分别取大豆球形期体细胞胚团块(直径 3mm 左右)40 块和子叶胚 90 个，预培养后进行侵染转化，侵入预备好的农杆菌感染液中 $OD_{600}$＝0.5，侵染 10 分钟，然后倒掉菌液，用无菌滤纸吸干后接种到共培养培养基上，三天以后再接种到含有卡那霉素 50 mg/L、头孢霉素浓度 300 mg/L(根据情况依次降低，以不长菌为宜)的培养基上，重复 4 次，然后每隔 15－20 天继代一次，四个月内(6 次筛选)调查各代产生的抗性体细胞胚团块(直径 3mm 左右)数。计算转化率(抗性体细胞胚块数/接种的体细胞胚块×100)和抗性筛选率(相邻代之间保持抗性的百分率)，然后将剥离出来的单个 D6 代抗性体细胞胚团块转入萌发培养基 1(含有 100mg/L 卡那霉素、适宜的抑菌剂头孢霉素)中。萌发 20 天以后，再转入萌发培养基 2 (含有 50mg/L 卡那霉素、适宜的抑菌剂头孢霉素)中。直到长成再生抗性小植株，再转入壮苗培养基得到转化植株。

因素与水平：预培养时间(d)：0、0.5、1.5、2.5、3.5、4.5；体细胞胚发育时期：球形期、子叶胚时期；筛选代数：1、2、3、4、5、6(每 15 天一代).

1.2.3 再生植株的筛选以及生长

再生植株转入壮苗培养基以后采取两种选择方式。第一种卡那霉素降为 25mg/L 的培养基上；另一种在壮苗培养基上不加卡那霉素，即不筛选，调查生长情况及再生植株数。

以上数据处理及分析均采用 SPSS 软件。

## 2 结果与分析

2.1 质粒 DNA 的检测

从根癌农杆菌中提取质粒 pBGI121S4ABC DNA 琼脂糖电泳，可以看到 17.5Kb 左右的条带。说明质粒存在于根癌农杆菌中，完全可以用于转化(见图 1)。

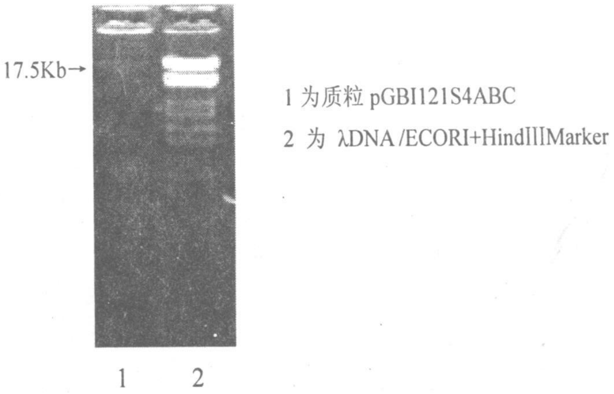


图 1 质粒 pBGI121S4ABC 电泳图

Fig 1 Figure of plasmid include in LBA4404

2.2 不同因子对体细胞胚转化率的影响

2.2.1 体细胞胚预培养对转化率的影响

农杆菌侵染外植体以前是否需要预培养，文献报道情况不一，有人认为预培养可以促进细胞分裂，而处于细胞分裂期的细胞是转化的感受态细胞，易于转化，外植体在高渗培养基上培养可以使细胞发生质壁分离，液泡变小，使农杆菌易于接触伤口处的细胞，从而提高转化率。鉴于这些报道，我们把体细胞胚团块在高渗培养基上进行 0－5 天的预培养然后用农杆菌侵染，1.5 个月以后，用产生的抗性体细胞胚团块占接种块数的百分率表示转化频率，我们跟踪调查了几种基因型中萌发率和再生率最高的基因型东农 L13(见王晓春[12])的实验结果(以下 2.2.2 和 2.2.3 同)如图 2。可以看出，预培养 1.5 天以内，转化率明显提高；1.5 天－4.5 天，转化率明显下

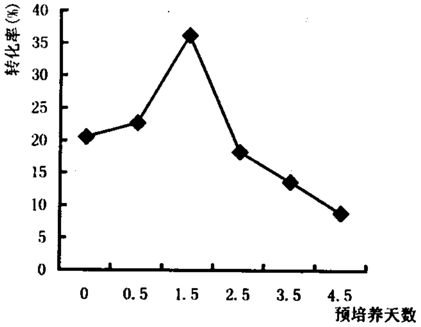


图 2 大豆预培养对转化率的影响

Fig. 2 The cffect on pre－cultare to transformation frequency

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

降;超过 2.5 天转化率甚至低于对照。最适宜的预培养天数为 1.5 天。

2.2.2 大豆体细胞胚的发育时期对转化率的影响

实验用体细胞胚团(球形期)和子叶期胚为材料,在相同农杆菌浓度侵染以及培养条件下进行比较实验。筛选一个月以后成为 D0 代,以后每隔 15 - 20 天继代一次,连续筛选 6 代统计结果见表 1。结果表明体细胞胚团有很高的转化率为 8.0%,而发育晚期的子叶胚很难诱导出抗性体细胞胚,转化率为 0,这可能与其分裂能力有关。实验可以看出,植物细胞对农杆菌侵染确实存在感受态问题。即植物细胞进行转化时易于接受外来遗传物质的一种状态。当以体细胞胚团做为受体进行侵染时,农杆菌侵染能力强。体细胞胚团经过切割破碎以后,T - DNA 随着菌液进入伤口,使细胞分泌一些酚类物质,增强农杆菌侵染能力。创伤反应是植物细胞感受态存在的前提条件。而子叶期胚已经在萌发培养基中继代 20 - 30 天,已经发育成独立完整的个体胚,没有创伤区域,子叶期胚为受体,侵染时农杆菌能力侵染能力弱,因此转化率低。再次证明体细胞胚团为大豆转化的良好受体。

表 1 大豆体细胞胚的不同发育时期对转化率的影响

Table 1 The effect on soybean embryo to transformation frequency in different growth period

| 外植体 Explant | 接种外植体数 Inoculation explant | D0 诱导率(%) Inducing frequency | D6 诱导率(%) Inducing frequency | D0 - D6 筛选率(%) Election frequency |
|---|---|---|---|---|
| 球形胚 Globular embryo | 50(块) | 38.9 | 8.0 | 25.5 |
| 子叶胚 Cotyledonary embryo | 90(个) | 30.2 | 0 | 0 |

注:诱导率(%)=抗性体细胞胚数/接种数×100

2.2.3 筛选代数对体细胞胚转化率的影响以及抗性植株再生

大豆体细胞胚团块切割成直径 3mm 左右,通过农杆菌侵染($OD_{600}$=0.5,侵染时间为 10 分钟、AS 浓度为 100μmol/L)共培养 3 天以后,转入含有卡那霉素 50mg/L 和头孢霉素 300mg/L 的培养基上,经过 1 周的恢复培养,然后转入含有卡那霉素 50mg/L 头孢霉素浓度根据情况逐渐降低(以不长菌的最低浓度为准)的培养基上,筛选培养 1 个月以后,可以看出大部分体细胞胚变褐、死亡,有的表现出对卡那霉素的抗性,生长出新的绿色体细胞胚,将这些抗性体细胞胚称为 D0 代,D0 代抗性体细胞胚再转入上述筛选培养基中培养,又有一些逐渐死亡,部分 D0 代抗性体细胞胚仍然能够继续生长,进而形成 D1 代抗性体细胞胚。本实验通过连续四个月 6 次筛选,得到 D6 代抗性体细胞胚。将 D6 代抗性体细胞胚团块切割成直径 3mm 左右进行继代增殖培养,形成抗性体细胞胚团块。将剥离出的单个 D6 代抗性体细胞胚转入有卡那霉素 50mg/L,头孢霉素浓度根据情况逐渐降低(以不长菌的最低浓度为准)的萌发培养 1 中萌发 20 天,再转入萌发培养基 2 中培养。两个月以后,抗性体细胞胚一端形成芽,另一端形成根,形成完整小植株。再转入壮苗培养基(含有卡那霉素 25mg/L)中,得到抗性植株。

从表 2 可以看出 D0 - D4 代,继代诱导率明显下降,D0 为 41.73%,D4 为 8.6%,经过四次筛选以后,诱导率基本稳定在 8%左右(D4、D5 与 D6 基本 8%左右),继代筛选率随着代数的增加,D0 - D1 为 52.5%,从 D3 到 D4 明显提高到 90%。此结果表明,筛选 6 代以后卡那霉素抗性的体细胞胚基本上没有嵌合体存在。

表 2 连续 6 次筛选各代抗性体细胞胚的块数与抗性诱导率以及抗性筛选率

Table 2 Transformation frequency of resistance and soybean somatic embryo after 6 selections

| 项目 Item | 一个月 One manth | 二个月 Two months | | 三个月 Three manths | | 四个月 Four months | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | D0 | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | D6 |
| | 17(块) | 9.1 | 5.4 | 3.8 | 3.4 | 3.4 | 3.1 |
| 抗性诱导率(%) The frequency of resistant inducing | 41.7 | 22.7 | 13 | 9.5 | 8.6 | 8.4 | 7.8 |
| 抗性筛选率(%) The frequency of resistant election | – | 52.5 | 60 | 70 | 90 | 91 | 92 |

注:抗性诱导率(%)=抗性体细胞胚块÷接种体细胞胚块×100;抗性筛选率(%)=相邻两代间保持抗性的体细胞胚块百分率

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2.4 再生小植株的筛选、生长及移栽

实验表明，再生小植株转入壮苗培养基以后，继续用卡那霉素按照第一种方式筛选，则再生小植株许多不会出现根，逐渐变白死亡，抗性植株少。而用第二种方式筛选，即在壮苗培养基上不再筛选，则发现有一部分无根的小植株会恢复生长，从而增加抗性苗的数目。所以我们分析，壮苗时不筛选，可能仍然有非转化植株大量存在。说明，壮苗筛选可能会有效地筛选掉非转化植株，提高阳性植株率。待转化植株根系良好，苗高 7－10cm，而且生长比较旺盛时练苗后进行移栽。原因是再生小植株是在高温、恒温的异养条件下生活，其生理代谢以异养为主，其组织器官的发育与正常条件下的植株均有差异，因此在再生小植株移栽前必需经过短时期的驯化或锻炼后才能适应外界环境的温度和湿度以及强烈光照。

# 3 结论与讨论

本实验对大豆体细胞胚转化条件进行了初步的研究，确定了影响大豆体细胞胚转化率的几种因素。

3.1 受体不同发育时期

实验中观察到不同发育时期的体细胞胚，基因转化率有明显差异，球形期转化率高于子叶期胚。这说明，植物细胞对农杆菌的侵染确实存在感受态，植物细胞与农杆菌都要处于旺盛分裂期，是农杆菌转化的前提条件。感受态与转化频率直接相关，球形期体细胞胚处于旺盛分裂期，是农杆菌转化的感受态，易于接受外源 DNA 并使其表达。

3.2 植物受体材料的受伤处理

切割体细胞胚团块造成损伤是农杆菌转化的重要条件，原因可能是转化材料受伤时，对农杆菌更敏感，这可能是易诱导伤口处的体细胞胚细胞，而成为活跃的分生细胞。Binns 等在 1992 年用基因枪轰击植物组织，受伤处理可以提高农杆菌转化的效率。这种方法是作为一种伤害机制，而促进农杆菌转化，它在被轰击的组织细胞表面造成或大或小的伤口，是农杆菌转化的有利位点。

3.3 预培养对转化率以及对转化植株再生的影响

Vijagachandra 等 1995 年认为，预培养对转化有一定的作用。实验表明，农杆菌侵染以前，让体细胞胚在高渗培养基上预培养 1.5 天左右，会提高转化率，这可能是预培养可以促进细胞分裂，使它处于感受态；另外，高渗培养基增加细胞质壁分离，液泡变小，使农杆菌易于接触伤口处的细胞，从而提高转化率。

3.4 筛选时间对转化率以及对转化植株再生的影响

筛选不同的代数，抗性体细胞胚的诱导率在 D0－D3 代（3 个月以前）明显下降，而在 D3 代以后则抗性诱导率基本稳定，但是抗性筛选率提高。说明此时抗性体细胞胚已经没有嵌合体。但是在壮苗培养基中，如果继续筛选，则仍然有大量的非转化植株大量死亡。如果壮苗培养基中不筛选，一些非转化植株又存活，抗性植株数就会增加。所以以抗性体细胞胚作为转化频率的指标可能偏高。原因是得到的抗性体细胞胚形态不一，正常的体细胞胚能够萌发，成为抗性植株，而不正常的体细胞胚不能够萌发或萌发率低，不能或很少形成抗性植株；另外，实验中还由于污染等原因，致使形成的抗性植株数目减少，致使转化率降低；此外，细胞的损伤也是转化率降低的一个重要因素。本实验以筛选 3 个月的抗性体细胞胚的诱导率作为衡量转化率的标准，而进行目的基因转化时，则以得到转基因植株为目的。所以，以抗性体细胞胚作为转化频率的指标会带来一定的误差。

另外，本实验供试材料用了几种基因型，由于实验周期比较长、工作量大和农杆菌抑菌困难等问题，此部分只跟踪调查了几种基因型中萌发率和再生率最高的、非常有代表性的基因型东农 L13 的实验结果，这是本文的局限性。而其他基因型的最终抗性植株数及分子检测的结果以及分子检测的结果与抗性筛选结果间的差异我们将继续另文报道。

要提高稳定转化频率，一方面要改进组织培养系统；另一方面可以增加一些处理因素。如基因型的筛选、培养条件的改善、菌株类型、转化条件的优化、体细胞胚的处理等，促进大豆转基因研究的发展。

## 参 考 文 献


1 王景雪，孙毅．农杆菌介导的植物基因转化研究进展[J]．生物技术通报，1999 1：7－13.

2 周思军，李希臣，刘昭军，等．通过农杆菌介导法将 Bt(CryIA) 基因导入大豆[J]．大豆科学，2001，20(3)：157－162.

3 徐香玲，高晶，刘伟华，等．Ti 质粒介导 B、t、k－d 内毒蛋白基因转化大豆的初步研究[J]．大豆科学，1997，16(1)：6－11.

4 周思军，李希臣，刘昭军，等．大豆农杆菌介导转化系统的优化研究[J]．东北农业大学学报，2001，32(4)：313－319.

5 赵桂兰，刘艳芝，李俊波，等．影响农杆菌介导的大豆基因转化因素的研究[J]．大豆科学，2001，20(2)：84－88.

6 王罡，季静，王萍，等．大豆基因型对根癌农杆菌菌株敏感性的研


?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

究[ J] . 遗传, 2002, 24( 2) : 297 – 300.

7 Finer JJ, A Nagasawa. Developm ent of anembryogenic susben sion culture of soybean [ *Glycinemax* ( L . ) Merrill] [ J] . Plant Cell Tis sue Organ . Cult. 1988, 1( 5) : 125 – 136.

8 Sato S, C Newell, K Kolacz, LTredo J Finer et al. Stable transfor mation via Particle bombsrdm ent in two different soybean regeneration systems[ J] . Plant Cell ReP . 1993, 12: 408 – 413.

9 Trick HN, RD Dinkins, ER Santarem, et al. Recent aevances in soybean transformation[ J] . Plant Tissue Cult . Biotech . 1997, 3: 9 – 26.

10 Barwale UB, HR Kerns, JM Widholm . Plant regeneration from calluscultures of several soybean genotypes via embryo genesis and organ genesis[ J] . Planta 1986, 67: 473 – 481.

11 方宏筠. 黑核桃体细胞胚状体发生及基因转化系统的建立[ J] . 园艺学报, 2000, 27( 6) : 406 – 411.

12 王晓春, 刘尚前, 季静, 等. 影响大豆体细胞胚萌发率的因素[ J] . 大豆科学, 2004, 23( 2) : 151 – 154.

# THE FACTORS INFLUENCING GENETIC TRANSFORMATION SYSTEM IN SOMATIC EMBRYOS OF SOYBEAN MEDIATED BY *AGROBACTERIUM*

Wang Xiaochun[1,2,3] Wang Gang[1,2] Ji Jing[1,2] Wang Ping[2] Liu Shangqian[3]

(1. *Tianjin University of Agricultural and Biological Engineering Academy*, *Tianjin* 300072;
2. *Huaihai Institute of Techndogy*, *Marine School*, *Lianyungang*, 222005;
3. *Department of Agronomy*, *Hebei North University*, *Xuanhua* 075131)

**Abstract** The factors influencing genetic transformation about somatic embryos of soybean Mediated by *Agrobacterium tumefaciens* had been studied. It showed that the suitable condition was determined as followed: injured treatment of somatic embryos of soybean, pre – culture one day and a half. The transformation frequency decreased with the date of selection delayed in three months, The transformation frequency kept 8% after three months.

**Key words** Soybean; Somatic embryos of soybean; Mediated by *Agrobacterium*; Genetic transformation

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net