

农杆菌介导的下胚轴法转化大豆研究

罗秋兰, 周 失, 赵 琳, 李永光, 李文滨

(东北农业大学 教育部大豆生物学重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要: 以下胚轴为外植体, 采用农杆菌介导方法成功将大豆的蓝光受体启动子 *pGmPLP1* 导入大豆基因组中, 并且该基因在后代中得到稳定遗传表达。比较了栽培品种黑农 44 用子叶节法和下胚轴法转化的区别, 发现用子叶节法不能获得高效转基因植株的品种可以顺利通过下胚轴法进行转化。

关键词: 大豆器官发生途径; 再生率; 丛生芽; 下胚轴

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841 (2010) 06-0925-05

Study on Hypocotyl-based Agrobacterium-mediated Transformation of Soybean

LUO Qiu-lan, ZHOU Shi, ZHAO Lin, LI Yong-guang, LI Wen-bin

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

Abstract: The study successfully transformed the soybean blue light receptor gene promoter *pGmPLP1* into soybean genome by hypocotyl-based Agrobacterium-mediated transformation method, and the gene was steady expressed in progenies. Also the comparison between cultivar Heinong 44 transformed by cotyledon nodes and hypocotyls was conducted. The results showed that the cultivars that cannot efficiently transformed by cotyledon nodes method could successfully transformed by hypocotyl method.

Key words: Soybean organogenesis; Regeneration rate; Regenerated multi-shoots; Hypocotyls

大豆 [*Glycine max* (L.) Merrill] 是世界重要的经济和粮食作物^[1], 通过遗传转化改变大豆的营养成分、提高产量以及增加大豆的抗病和抗逆性, 是全世界大豆转基因工作的重点。但是, 与其它植物相比, 大豆再生植株较困难, 遗传转化进展缓慢, 因此急需寻找一种有效快速的大豆遗传转化方法, 应用于大豆基因工程^[2]。大豆的遗传转化方法有农杆菌介导法、基因枪轰击法和花粉管通道法等, 其中农杆菌介导法为目前应用最广泛的方法。科研人员通过选用不同的外植体作为受体^[3-4], 改变转化条件如改变激素浓度和在共培养阶段加入硝酸银等抗氧化剂^[5]等方法来提高大豆的转化效率。但目前用于大豆转化的方法多集中在农杆菌介导的子叶节再生系统上, 通过农杆菌的 T-DNA 将外源基因导入大豆的基因组^[6]。子叶节介导的转化方法受到基因型的限制严重, 只有再生频率高的品种对农杆菌侵染有较好反应, 才可以获得较好的转化效率^[7]。尽管还有一些再生体系在大豆的遗传转化中应用, 但也都存在一定缺陷, 如未成熟胚的再生存在取材时间受季节性影响大的缺点等。

大豆的下胚轴再生体系是以幼苗的下胚轴和生长点部位作为外植体的另一种不定芽器官发生途径的再生体系。最先由 Handberg 和 Stougaard 通过农杆菌侵染苜蓿的下胚轴, 获得了高转化率的转基因植株^[10], 之后 Dan 和 Reichert 建立了以下胚轴为外植体经过器官发生途径的高效大豆再生体系^[11]。2006 年 Ji 等成功应用该体系获得了大豆转基因植株^[12], 2008 年 Wang 和 Xu 也通过下胚轴转化方法获得了 GmFAD2-1 基因干涉表达的高油酸大豆^[13]。该研究对已有的大豆下胚轴转化体系进行改良, 以实验室克隆的 GmPLPA 启动子基因为例, 成功利用该体系将目的基因导入大豆基因组中并稳定遗传表达, 并与大豆子叶节农杆菌转化体系进行比较, 建立了一种可以有效应用于大豆的功能基因组研究和遗传改良的转基因方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料

转基因所用的大豆材料为黑农 44, 以大豆下胚轴为受体材料。工程菌为含 pBI121 质粒的

收稿日期: 2010-09-30

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (30971810)。

第一作者简介: 罗秋兰 (1984-), 女, 在读博士, 研究方向为大豆分子遗传育种。E-mail: luoqiulan_79@163.com。

通讯作者: 李文滨, 教授, 博士生导师。E-mail: wenbinli@neau.edu.cn。

LBA4404 农杆菌菌株, 内含大豆蓝光受体 *GmPLP1* 的启动子全长基因 (*pGmPLP1*) (该实验室克隆的启动子)、*NPTII* 基因和 *GUS* 基因 (见图 1)。

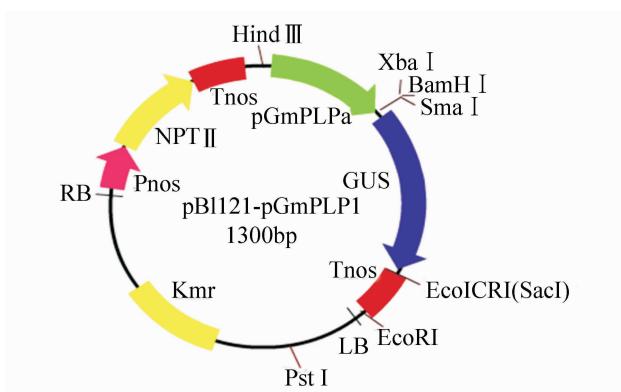


图 1 用于大豆遗传转化的 *pBI121-pGmPLP1* 载体图谱

Fig.1 Structures of *pBI121-pGmPLP1* vector used for soybean transformation

1.2 试验方法

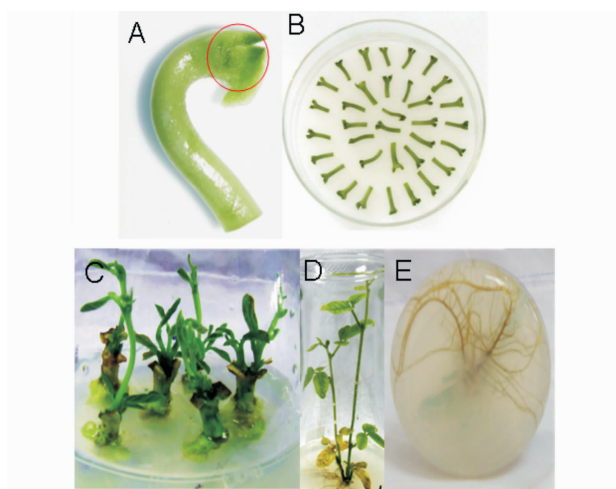
1.2.1 外植体制备 挑选饱满大豆黑农 44 成熟种子, 进行氯气灭菌 16 h, 种植于 GM 培养基上 (MS 大量盐 + MS 铁盐 + 3% 蔗糖 + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + 0.8% 琼脂, pH5.8), 培养室 (温度 25°C , 光照强度 $0.3 \sim 0.4 \text{ mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 生长光/暗周期为 16 h/8 h, 相对湿度 80%) 培养 5~7 d, 切取下胚轴部分, 用于浸染。下胚轴保留长度为 1~2 cm, 顶端保留生长点部位, 去除大豆本身的幼芽, 并在生长点部位造成划伤, 便于农杆菌的侵染 (图 2A)。

1.2.2 菌液的准备 含有目的载体的农杆菌 LBA4404 单菌落接种于 5 mL 含有 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Str、 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Rif 和 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Kan 的 YEP 液体培养基中 ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ yeast extraction, $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ peptone, $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, pH7.0), 28°C $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养过夜, 取 2 mL 培养物, 加入到 50 mL YEP 液体培养基中, 28°C 培养至 OD_{600} 为 0.6~0.8, 将 50 mL 培养物于 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清, 收集菌体, 用等体积 50 mL CCM 液体培养基 ($1/2\text{MS}$ 大量盐 + MS 铁盐 + $1.67 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ As + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ + $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cys + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT + 3% 蔗糖, pH5.6) 重悬菌体, 将 OD_{600} 调整至 0.6~0.8。

1.2.3 浸染与共培养 将已切取好的下胚轴浸入制备好的重悬菌液中, 25°C 震荡浸泡 30 min, 用无菌滤纸吸干多余菌液, 将下胚轴平放在加盖一层滤纸的 CCM 固体培养基上 (含有 0.6% 琼脂), 25°C 暗培养 3 d (图 2B)。

1.2.4 除菌及不定芽的诱导 暗下共培养 3 d 后的下胚轴, 依次用无菌水洗 3 次, 每次 15 min, 洗掉表面的农杆菌, 其间不时摇动。捞出下胚轴, 放在滤纸上, 吸干多余水分。将下胚轴生长点朝上, 插入 SIM 培养基上 ($1/2 \text{MS}$ 大量盐 + MS 铁盐 + $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA + 3% 蔗糖 + $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cef + $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素 + 0.8% 琼脂, pH5.8)。 25°C , 生长光/暗周期为 16h/8h, 培养 7 d。

1.2.5 不定芽的伸长、生根及移栽 将诱导后的下胚轴切掉下端膨大的愈伤组织, 转移至 SEM 中 ($1/2 \text{MS}$ 大量盐 + MS 铁盐 + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA + $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素 + $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cef + 3% 蔗糖 + 0.8% 琼脂, pH5.8) 培养 1~2 个月, 每隔 10 d 继代 1 次, 诱导伸长芽 (图 2C)。当不定芽伸长到 3~5 cm 时, 转移至 RM 中 ($1/2\text{MS}$ 大量盐 + MS 铁盐 + $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA + $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素 + $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cef + 3% 蔗糖 + 0.8% 琼脂, pH5.8), 诱导生根 (图 2D)。待根生长健壮后 (图 2E), 开瓶炼苗 3~4 d, 移栽入蛭石: 土 = 1:1 的土中, 移栽后前 2 d 用保鲜膜覆盖保湿, 在光照培养箱中生长。



A: 切取的下胚轴; B: 共培养中的下胚轴; C: 下胚轴上的丛生芽; E: 再生的大豆植株; F: 大豆再生植株的根;
A: The cut hypocotyls; B: hypocotyls in co-culture;
C: regeneration shoots on hypocotyls; D: regeneration plant of soybean; E: the roots of regeneration soybean;

图 2 下胚轴法转化大豆

Fig.2 The hypocotyls based transformation for soybean

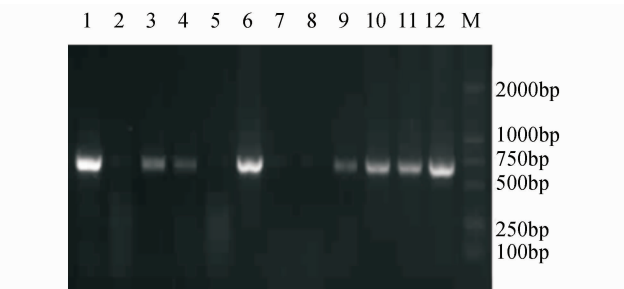
1.2.6 抗性植株的分子检测 采用 SDS 小量法提取卡那霉素筛选的抗性大豆植株的幼嫩叶片基因组 DNA, 进行 PCR 和 RT-PCR 检测。利用 GUS 组织化学染色检测外源基因的表达情况。

1.2.7 下胚轴法与子叶节法转化的比较 取部分黑农 44 大豆种子在不含有 6-BA 的培养基上萌发,切取子叶节外植体,用同样 CCM 共培养后,放置于 CSIM 中诱导丛生芽 7 d (MS 大量盐 + MS 铁盐 + B5 有机 + $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + 3% 蔗糖 + $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cef + $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素 + 0.8% 琼脂, pH5.8)。转移到 CSEM 培养基中 (MS 大量盐 + MS 铁盐 + B5 有机 + $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA3 + $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ZR + $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Asp + $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA + 3% 蔗糖 + $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cef + $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素 + 0.8% 琼脂, pH5.8) 诱导芽伸长,生根和移栽与下胚轴法相同。

2 结果与分析

2.1 转基因植株的 PCR 鉴定

取卡那霉素筛选的大豆抗性植株幼嫩叶片,经 SDS 法提取叶片总基因组 DNA。由于在大豆中本身存在 *pGmPLP1* 基因,为了确定外源基因是否真正在大豆中过量表达,根据 pBI121-pGmPLP1 载体上的 *GUS* 基因序列设计引物 (F: AACTGCTGCTGCTCG-GCTTTA; R: GATTCATTGTTTGCCTCCCT), 以抗性植株总 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,反应条件为 (25 μL 体系): 94°C 5 min; 35 个循环: 94°C 30 s, 62°C 30 s, 72°C 2.5 min; 72°C 延伸 5 min。取 8 μL PCR 产物经 0.8% ~ 1.0% 琼脂糖电泳 (图 3), 确定阳性植株,进行下一步的鉴定。



M: DL 2000 DNA 分子量标准; 1: 阳性质粒;

2: 未转化大豆; 3 ~ 12: 转化植株

M: DL2000 DNA Marker; 1: positive plasmid; 2: plants without any transformation; 3 ~ 12: transformed soybean plants

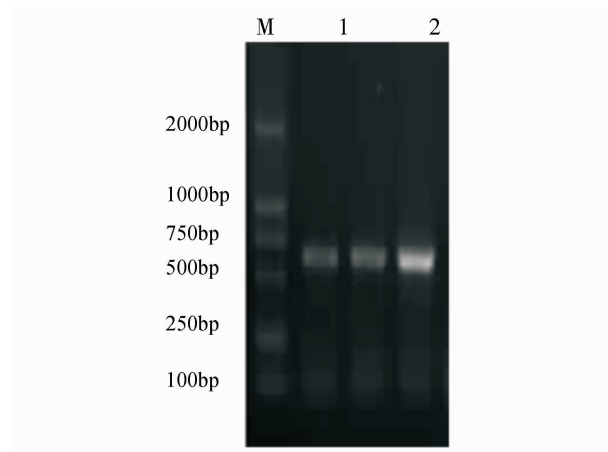
图 3 pBI121-pGmPLP1 转基因大豆的 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR identification results of pBI-pGmPLP1 transgenic soybean

2.2 转基因植株的 RT-PCR 鉴定

为了确定转化入大豆植株中的基因片段是否能够正常转录和翻译,进行了 RT-PCR 鉴定。采用 Trizol 法提取 PCR 阳性植株的总 RNA。PCR 引物选择的是报告基因 *GUS* 基因引物,电泳结果显示

PCR 阳性植株转化后的外源都能正常反转录成 mRNA (图 4)。



M: DL 2000 DNA 分子量标准; 1 ~ 3: PCR 阳性植株

M: DL2000 DNA Marker; 1 ~ 3: PCR positive transformed soybean plants

图 4 pBI121-pGmPLP1 转基因大豆的 RT-PCR 鉴定

Fig. 4 RT-PCR identification results of pBI-pGmPLP1 transgenic soybean

2.3 转基因植株的组织化学染色鉴定

参照 Fefferson 等^[14]的方法,取 PCR 阳性植株的 T1 代后代各个时期的组织器官进行 *GUS* 组织化学染色。结果 (图 5) 显示 T1 代转基因大豆经历过减数分裂后,仍然包含转化进入的外源基因 *GUS* 和 *pGmPLP1*,表明外源基因已经插入基因组中并通过有性繁殖传递到后代中,同时外源基因 *pGmPLP1* 在转基因后代可以正常发挥启动效应,启动外源基因 *GUS* 的表达并翻译成蛋白质,为研究 *pGmPLP1* 在大豆中的启动规律创造了重要的材料。



图 5 T1 代转基因后代的 *GUS* 组织化学染色

Fig. 5 The *GUS* staining analysis of T1 transgenic soybean

2.4 子叶节法获得的丛生芽

黑农 44 品种通过子叶节不定芽器官发生再生途径转化后,发现由于受到基因型的限制,在诱导培养基中外植体膨大严重,诱导出的大部分为叶片器官,少量诱导的芽在伸长阶段也难以拔高,最终黄化死亡,无法得到转基因植株 (图 6)。



图6 子叶节法转化的黑农44大豆外植体

Fig.6 The explants of Heinong 44 soybean transformed by cotyledon node-based *Agrobacterium*-mediated method

3 讨论

3.1 下胚轴法对大豆的转化

在切取大豆下胚轴为外植体时,需要十分谨慎,要将生长点原来残留的幼芽全部切除干净,否则诱导出来的不是丛生芽,而是膨大的大豆自身的芽,还要尽量造成生长点部位的划伤以利于农杆菌侵染,但也不能使造成的伤害过大,以免将生长点处细胞全部破坏,无法进行芽的再生。

下胚轴转化法中只应用到 6-BA 和 IBA,这 2 种激素的质量直接影响到试验结果。6-BA 是一种植物的细胞分裂素,直接参与下胚轴法中丛生芽的诱导。在萌发培养基中就加入 6-BA 可以获得具有 6-BA 适应性膨大的下胚轴组织,更利于转化的进行。IBA 在芽诱导和生根培养中都有应用,可能与下胚轴形成吸收营养物质的维管系统有关,因为在培养基中不加入 IBA 时,下胚轴很快就膨大成愈伤组织,不可能形成丛生芽。

每次继代时需要将下胚轴接触培养基部位膨大的愈伤组织切除,以免过大的愈伤组织影响营养物质的运输,使上端丛生芽无法吸收到营养,黄化死亡。

3.2 胚轴法和子叶节法的比较

子叶节再生系统之所以应用广泛是因为它具有如下优点:再生时间短;外植体容易获得;不受季节限制;再生过程简单,只需丛生芽分化培养、芽伸长及生根培养 3 个步骤,再生频率高。但子叶节不定芽再生系统又存在外植体较大,对基因型依赖性强,由于再生芽之间的保护作用以及外植体本身

抗性对于转化后的筛选工作不利等缺点^[15]。

下胚轴法从种子萌发到生根植株整个过程只需要 2 个多月,与子叶节再生一样具有生长周期短的特点,并且外植体很易获得。子叶节再生系统中所用的激素种类繁多,并且各种激素配比严重影响了丛生芽的诱导,当激素浓度改变时诱导产生的不是不定芽而是不定叶或不定根器官,适用的品种一般都需要具有高再生能力,但下胚轴法却没有这些限制。黑农 44 由于再生能力低,用子叶节进行转化时,不能有效诱导出丛生芽,诱导出的芽也存在无法伸长的问题,但是用下胚轴法进行转化,就能轻松诱导出丛生芽,并且容易伸长。可能的原因是在子叶节再生系统中生长点部位直接接触培养基,在吸收营养物质的同时也易受到培养基中有害物质的毒害,但是下胚轴法能利用下胚轴部位吸收营养物质,并通过植物自身的运输系统,将它们运输到分生部位,避免了生长点遭受毒害作用。另外从芽诱导到芽伸长阶段培养基的改变很小,只是降低了 6-BA 的浓度,丛生芽无需经过一个培养基适应阶段,即可开始伸长生长。

参考文献

- [1] 武小霞,张淑珍,李文滨. 我国大豆转基因研究进展[J]. 大豆科学, 2005, 24(2): 144-149. (Wu X X, Zhang S Z, Li W B. The research advance on soybean transgene in China[J]. Soybean Science, 2005, 24(2): 144-149.)
- [2] Trick H N, Finer J J. Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue[J]. Plant Cell Report, 1998, 17: 482-488.
- [3] McCabe D, Christou P. Direct DNA transfer using electric discharge particle acceleration[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1993, 33: 227-236.
- [4] Stewart C N, Adang M J, All J N, et al. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIAc gene[J]. Plant Physiology, 1996, 112: 121-129.
- [5] Olhoft P M, Lin K, Galbraith J, et al. The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells[J]. Plant Cell Report, 2001, 20: 731-737.
- [6] Clemente T E, LaVallee B J, Howe A R, et al. Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. Crop Science, 2000, 40: 797-803.
- [7] 刘海坤,卫志明. 大豆遗传转化研究进展[J]. 植物生理与分子生物学学报, 31(2): 126-134. (Liu H K, Wei Z M. Recent

- advances in soybean genetic transformation[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2005, 31 (2): 126-134.)
- [8] Hinchey M A W, Connor-Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using Agrobacterium-mediated DNA transfer[J]. Nature, 1988, 6: 915-922.
- [9] Donaldson P A, Simmonds D H. Susceptibility to Agrobacterium tumefaciens and cotyledonary node transformation in short-season soybean[J]. Plant Cell Report, 2000, 19: 478-484.
- [10] Handberg K, Stougaard J. Lotus Japonicus, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics[J]. Plant Journal, 1992, 2:487-496.
- [11] Dan Y H, Reichert N A. Organogenic regeneration of soybean from hypocotyl explants[J]. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 1998, 34:14-21.
- [12] Ji F Y, Wang G L, Xu Y N. The effects of antioxidants on the transient expression of GUS gene in soybean hypocotyls mediated by Agrobacterium tumefaciens [J]. Journal of Plant Ecology, 2006, 30:330-334.
- [13] Wang G L, Xu Y N. Hypocotyl-based Agrobacterium-mediated transformation of soybean (*Glycine max*) and application for RNA interference[J]. Plant Cell Report, 2008, 27:1177-1184.
- [14] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. The EMBO Journal, 1987, 6:3901-3907.
- [15] 刘北东,朱延明,杨谦,等. 大豆再生体系的建立及遗传转化的研究进展[J]. 大豆科学, 2003, 22 (1):63-67. (Liu B N, Zhu Y M, Yang Q, et al. Recent advances in soybean tissue culture and gene transformation [J]. Soybean Science, 2003, 22 (1):63-67.)

科学出版社生物分社新书推介

生物营养强化农产品开发和应用

生命科学前沿

[美] G.S. 巴纽埃洛斯 林治庆 编著

尹雪斌 李 飞 刘 颖 周守标 译

2010 年 11 月出版 定价: ¥60.00

ISBN 978-7-03-029334-3 开本: B5

营销分类: 农业科学 装帧: 平装

内容简介

我国农业历经了从高产到无公害,再到绿色有机的发展阶段。但是,安全仅仅是对食品要求的一个方面,在中国科学院农业领域战略研究组编撰的《中国至 2050 年农业科技发展路线图》中,食品的营养化和功能化已被提上日程,代表了我国未来农业发展的新方向。

该书从生物营养强化的概念出发,寻求目前世界上普遍存在的营养失衡的解决之道。该书的撰稿人均是活跃在农产品生物营养强化领域有经验的科学家。他们从缺乏现象最为普遍的硒、铁、锌、碘出发,着力于通过品种选育、肥料施用、农艺管理以及现代基因工程等技术手段来改善或解决这个问题,对改善我国民众的微量营养水平和提高我国有关研究、实践均有着非常重要的启发意义。

该书适合生命科学、农学等相关方向的研究人员参考使用。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书

联系人: 科学出版社科学销售中心 周文宇

电话: 010-64031535

email: zhouwenyu@mail.sciencep.com

网上订购: www.shop.sciencepress.cn

联系我们:

010-64012501

www.lifescience.com.cn

email: lifescience@mail.sciencep.com

更多精彩图书请登陆网站, 欢迎致电索要书目

