

α -硫辛酸对大豆农杆菌介导 *GUS* 瞬时表达和芽诱导的影响

杨晓凤¹, 卢涛¹, 周正剑², 寿惠霞², 唐桂香¹

(1. 浙江大学 农业与生物技术学院 作物科学研究所, 浙江 杭州 310058; 2. 浙江大学 生命科学院 植物科学研究所, 浙江 杭州 310058)

摘要:以适宜转化大豆受体 YC-2 为材料,研究了抗氧化剂 α -硫辛酸对农杆菌介导 *GUS* 瞬时表达和芽诱导率的影响。结果表明:在共培养基中添加不同浓度的抗氧化剂可显著降低外植体的褐化率,随 α -硫辛酸浓度的增加外植体褐化率明显减少,但白化率增加,且这些白化的外植体在后期不易产生诱导芽;共培养基中添加不同浓度的 α -硫辛酸可增强 *GUS* 瞬时表达率和芽诱导的再生率,且以 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 效果最佳。

关键词:大豆; α -硫辛酸; *GUS* 瞬时表达; 芽诱导率

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2011)04-0552-05

Effect of α -Lipoic Acid on the *Agrobacterium-tumefaciens* Mediated *GUS* Transient Expression Rate and Shoot Induction Percentage in Soybean (*Glycine max* L.)

YANG Xiao-feng¹, LU Tao¹, ZHOU Zheng-jian², SHOU Hui-xia², TANG Gui-xiang¹

(1. Institute of Crop and Science, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058; 2. Institute of Plant Science, College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China)

Abstract: Antioxidant- α -lipoic acid (LA) influencing on the *Agrobacterium-tumefaciens* mediated *GUS* transient expression rate and shoot induction percentage in soybean cultivar 'YC-2' was studied in this paper. The results showed the explant browning percentage was markedly decreased after added different concentrations of α -lipoic acid in the co-cultivation medium. In the meantime, the explant whitening percentage was increased with the increased concentration of α -lipoic acid in co-cultivation medium. Meanwhile, the whitening explant couldn't induce shoot regeneration after cultured on the shoot induction medium for a month. It also showed the transient *GUS* expression rate and shoot induction frequency were also increased after added different LA concentrations in the co-cultivation medium. The optimized LA concentration was $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ in the co-cultivation medium.

Key words: Soybean (*Glycine max* L.); α -Lipoic acid; *GUS* transient expression; Shoot induction percentage

植物组织或细胞褐变坏死、转基因芽再生率低和转化“顽拗”现象常与农杆菌侵染植物过程中产生“氧爆反应”有关^[1-2]。氧爆反应指产生大量的活性氧,添加抗氧化剂可以清除活性氧和自由基,抑制活性氧的大量生成并螯合金属离子有利于细胞信号传导和基因表达。

抗氧化剂是指一类当其浓度低于氧化底物时依然可以延迟或抑制底物氧化反应的物质。在水稻基因转化过程中,外植体在含有 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗坏血酸、 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 半胱氨酸和 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 硝酸银的液体培养基中暗培养 6 h 后,每个外植体平均只有 6% 的区域坏死,而不加抗氧化剂每个外植体平均有 80% 的区域坏死,同时添加抗氧化剂的水稻转化

效率由 17% 提高到 30%^[3];在大豆农杆菌介导转化共培养基中添加 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗氧化剂半胱氨酸,外植体存活率由没有加半胱氨酸的 37% 提高到了 91%,外植体组织褐化和坏死明显减少,农杆菌介导的转化效率也由 0.9% 提高到 2.1%^[4-5]。在花生叶片再生和共培养过程中添加抗氧化剂硫酸硒、生育酚和谷胱甘肽不仅减少了外植体组织的丙二醛含量而且增强了超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活性,因此也提高花生外植体的再生能力和转化效率^[6]。

α -硫辛酸(α -Lipoic acid,简称 LA)被称为万能抗氧化剂,它是丙酮酸脱氢酶、酮戊酸脱氢酶、支链上的酮酸脱氢酶和甘氨酸脱羧化酶等含硫多酶的

收稿日期: 2011-05-04

基金项目: 国家转基因专项资助项目(2009ZX08010-013B, 2008ZX08004-0004, 2008ZX08004-001); 国家自然科学基金资助项目(31071443)。

第一作者简介: 杨晓凤(1986-),女,硕士,研究方向为大豆分子育种。E-mail: yangxiaofeng0716@sina.com。

复合体,它既是脂溶性又是水溶性的抗氧化剂^[7-8]。研究表明在动物中,游离的 LA 是代谢作用的抗氧化剂,可以清除大部分活性氧和自由基,增强维生素 C,谷胱甘肽和维生素 B 等其它抗氧化剂的作用^[9-10]。研究表明共培养基中加入 α -硫辛酸可以将大豆的转化效率由 0.6% 提高到 3.7%;西红柿的转化效率由 29.8% 提高到 87.0%;小麦的转化效率由 2.8% 提高到 5.7%;棉花的转化效率由 41.4% 提高到 61.2%^[11]。该文以南方大豆品种 YC-2 为材料,以含有 β -葡萄糖苷酸酶(*GUS*)报告基因和编码膦丝菌素乙酰转移酶基因(除草剂草丁膦, *bar*)作为筛选标记的 pTF102 为载体,研究在共培养基中添加不同浓度 α -硫辛酸对大豆子叶节外植体褐变、*GUS* 瞬时表达率及芽诱导率的影响,为优化大

豆遗传转化体系提高大豆农杆菌介导子叶节外植体转化体系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 植物材料 供试大豆品种为华南农业大学资环学院提供的 YC-2。

1.1.2 质粒和菌株 采用双元载体 pTF102(图 1)用于大豆农杆菌介导转化研究。该载体由浙江大学生命科学院植物科学研究所寿惠霞教授惠赠,它含有编码膦丝菌素乙酰转移酶基因(*bar*)作为筛选标记基因和 β -葡萄糖苷酸酶(*GUS*)作为报告基因,这 2 个基因均由 35S 启动子启动,并采用电转法将质粒转入农杆菌感受态细胞 EHA101 中。

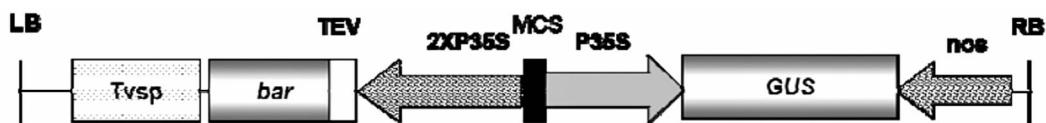


图 1 pTF102 双元载体结构图

Fig. 1 Binary vector map of pTF102

1.2 试验方法

1.2.1 农杆菌菌液的培养 在 YEP(含 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蛋白胨, $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 酵母提取物, $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠)固体培养基上挑单克隆放入 2 mL 添加了抗生素的 YEP 液体培养基中,在 28°C , $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 生长至饱和。取 0.2 mL 饱和菌液加入含有抗生素的 250 mL YEP 培养基中, 28°C , $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养过夜,至对数生长期。室温离心($3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min),收集菌液,用液体共培养基^[12]重悬浮沉淀,调整重悬浮菌液 OD_{650} 为 0.6 左右。

1.2.2 α -硫辛酸浓度和作用的确定 将 α -硫辛酸(α -Lipoic acid, 简称 LA)溶于 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 中,配成 $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的母液;分别在共培养基中加入 0、25、50、75 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LA,在共培养结束后分别观察和计算外植体的褐化率(褐化外植体数/总外植体数 $\times 100\%$)和白化率(白化外植体数/总外植体数 $\times 100\%$);在芽诱导 28 d 结束后统计不同抗氧化剂处理外植体的芽诱导率(芽诱导的外植体数/总外植体数 $\times 100\%$)。每处理至少 50 个外植体,重复 3

次,采用 SPSS 统计软件进行统计处理。

1.2.3 *GUS* 检测 *GUS* 检测参照 Jefferson 等^[13]的方法,具体做法:将共培养后的子叶节外植体,清洗多余的农杆菌并浸入 *GUS* 染色液(10 mL X-GLUC buffer; $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 铁氰化钾 1 mL; $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚铁氰化钾 1 mL; $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钠缓冲液(pH 7.0) 5 mL; 3 mL ddH₂O; $10 \mu\text{L}$ DMSO; 7.5 mg X-gluc)中,在 37°C 培养箱中反应 10 ~ 12 h;反应结束后弃去 *GUS* 染色液,将外植体浸入 75% 的乙醇中脱色,一直脱到阴性对照变白为止。在实体显微镜下观察和统计有 *GUS* 染色反应的外植体并计算 *GUS* 瞬时表达率(有染色的阳性外植体数/总外植体数 $\times 100\%$)。

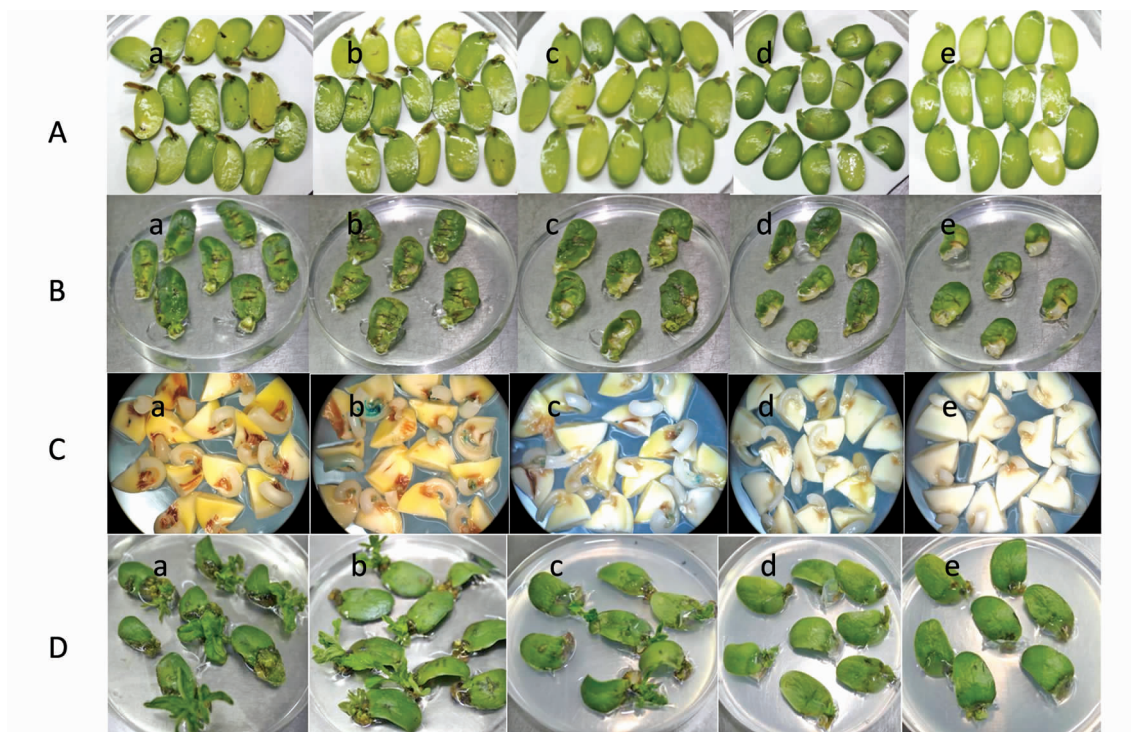
2 结果与分析

2.1 不同浓度 LA 对大豆子叶节外植体褐化率的影响

外植体与农杆菌共培养后,常发生褐化和坏死的现象。由图 2A 可知,不同浓度 LA 对子叶节外植

体褐化影响大,随着共培养 LA 浓度的升高,外植体褐化程度明显下降;当 LA 浓度达 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,下胚轴会发生向内侧卷曲的现象(图 2Ac),且随 LA 浓度的升高,下胚轴转曲程度越大,生长也越细弱。由图 3 可知,共培养基中添加不同浓度 LA 各处理间外植体的褐化率呈显著性差异,当共培养基中不添加抗氧化剂时,外植体褐化率为 100% 且褐化范

围较大;当 LA 浓度为 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时外植体褐化率降低到 93.99% 且褐化范围较小;LA 浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时褐化程度显著降低到 22.87%,为 $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时褐化程度降低到 5%,当 LA 浓度达到 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时外植体不褐化且伤口处十分鲜嫩,与共培养前无明显差异。



A: 外植体褐化; B: 芽诱导培养基 7 d 后的长势; C: *GUS* 染色; D: 芽诱导培养基 28 d 后芽诱导

LA 浓度: a- $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; b- $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; c- $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; d- $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; e- $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

A: Necrosis of explants; B: Growing of explants after shoot induction for 7 d; C: *GUS* staining; D: Growth of explants after induced shoot for 28 d

LA concentration: a- $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; b- $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; c- $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; d- $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; e- $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

图 2 不同浓度 LA 对大豆子叶外植体的影响

Fig. 2 Effect of different LA concentrations on growth of soybean cotyledonary txplant

2.2 不同浓度 LA 对大豆子叶节白化率的影响

尽管在共培养基中随着 LA 浓度的升高外植体褐化现象明显减少,但这些在高浓度 LA 下没有褐化的外植体在转入芽诱导培养基中培养 7 d 后,外植体靠近子叶节部位有伤口发白和硬化的现象(图 2B),且随 LA 浓度的升高,外植体发白加剧;在芽诱导后期发现这些发白的外植体上无从生芽的生长。进一步统计发现,随着 LA 浓度的升高外植体白化率明显增加,各处理间呈显著性差异(图 4)。当 LA 浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时外植体发白率达 86.45%;而 LA 浓度为 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时外植体发白率仅为

1.38%。由此可知,添加适宜浓度 LA 有助于减缓外植体的发白率。

2.3 不同浓度 LA 对大豆子叶节农杆菌介导瞬时表达的影响

图 2C 为子叶节外植体在含有不同浓度 LA 共培养基共培养后的 *GUS* 染色效果,当 LA 浓度为 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时染色的外植体数较多(图 2Cb),而随着 LA 浓度的升高,染色的外植体数明显减少(图 2Cd 和图 2Ce)。由图 5 可知不同浓度 LA 对 *GUS* 瞬时表达率的影响,以 LA 浓度为 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时为最高(66.46%)且和其它处理间呈显著性的差异;其次

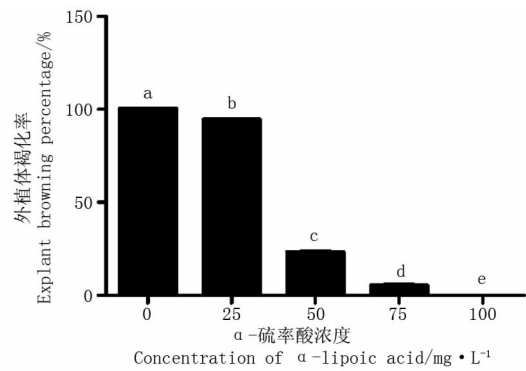


图3 不同浓度 LA 对子叶节外植体褐化率的影响

Fig. 3 The effect of different LA concentrations in co-cultivation medium on the cotyledon explants browning frequency

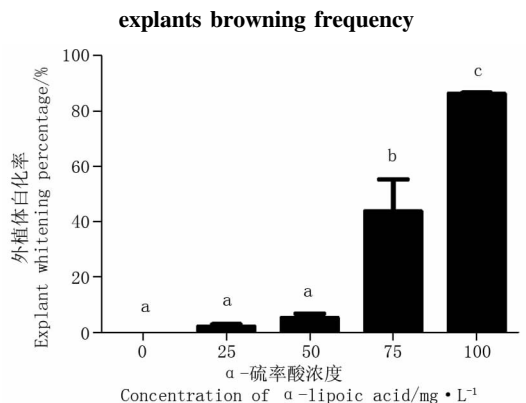


图4 不同 LA 浓度对大豆子叶节外植体白化率的影响

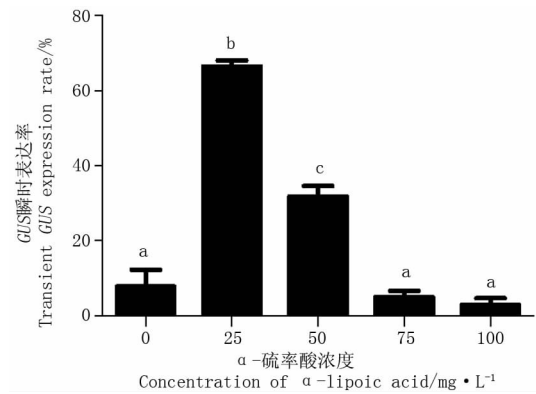
Fig. 4 Effect of different LA concentrations on the percentage of cotyledonary explant whitening in soybean

为 LA 浓度 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, *GUS* 瞬时表达率 31.79% ; 当 LA 浓度达到 75 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ *GUS* 瞬时表达率低于对照且与对照无显著性差异。由此可知适宜浓度的 LA 有助于 T-DNA 的转移。

2.5 不同浓度 LA 对大豆子叶节芽诱导的影响

将发芽 4 d 的子叶外植体,与不含质粒的农杆菌 LBA4404 侵染 30 min,在添加不同浓度 LA (0 、 25 、 50 、 75 、 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的共培养基上共培养 3 d 后,外植体的长势明显不同。在芽诱导培养基中培养 28 d 后,不同 LA 浓度对子叶节再生诱导率存在很大差异(图 2Da~e)。随 LA 浓度的升高,芽诱导率明显降低,但较低浓度的 LA 对大豆子叶节芽诱导影响不大。

不同浓度 LA 对大豆子叶节外植体芽诱导率的影响见图 6,共培养基中不添加 LA 和添加 25 或

图5 不同浓度 LA 对大豆子叶节 *GUS* 瞬时表达率的影响Fig. 5 Effect of different LA concentrations on the transient expression of *GUS* from cotyledonary explant in soybean

$50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LA 时对芽诱导无显著性差异,芽诱导率分别为 81.32% 、 76.40% 、 66.59% ,高于共培养基中添加 75 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LA,这与伤口白化数据相一致。

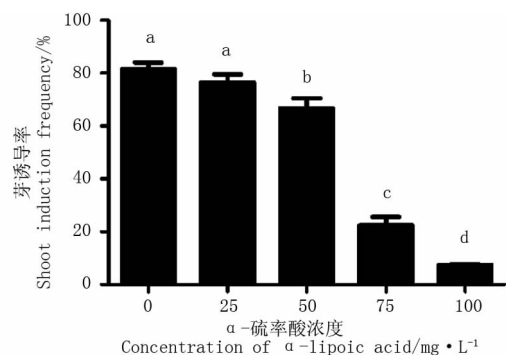


图6 不同 LA 浓度对外植体芽诱导率的影响

Fig. 6 The effect of different LA concentrations on shoot induction frequency from cotyledonary explant in soybean

3 讨论

农杆菌介导转化过程中氧爆反应的产生是影响农杆菌介导转化效率的一个重要因素。在外植体与农杆菌互作过程中,首先是外植体对农杆菌特殊信号的识别,然后是在农杆菌侵染过程中产生大量的活性氧,发生氧爆反应^[2]。氧爆反应是指产生大量的活性氧引起细胞死亡的现象,氧爆反应的主要成分是过氧化氢(H_2O_2), H_2O_2 本身没有活性,但在金属还原物质的作用下会产生更有活性的氢氧自由基。在氧化反应过程中许多酶的底物是 H_2O_2 ,

其中最主要的酶是过氧化物酶。Peral 等^[14]发现在农杆菌介导转化过程中,过氧化物酶活性的增加与农杆菌诱导寄主组织坏死有关。在共培养期间加入抗氧化剂如抗坏血酸、半胱氨酸、柠檬酸、聚乙烯吡咯烷酮、二硫苏糖醇和肌醇可抑制氧爆反应的发生。该研究比较了不同浓度的 LA 在大豆农杆菌介导转化中的作用,发现 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LA 能显著提高大豆转化效率。

农杆菌介导转化效率低的一个重要因素是农杆菌介导转化过程中的植物组织褐变、坏死和细胞死亡^[5,7,14],褐变和坏死的细胞有可能会出现在细胞层即 T-DNA 转移的地方,有转化潜力的细胞嵌进坏死组织中会引起再生抑制,减少转化细胞的恢复^[15]。由该试验可知,共培养中不添加 LA,外植体的褐化率明显上升,GUS 瞬时表达率下降;而当 LA 浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,尽管外植体褐化率是 0,但在后期芽诱导期间发现,当 LA 浓度过高时,外植体伤口有发白的现象,这些发白的外植体最终都不会有芽诱导产生。这说明高浓度的 LA 会严重影响外植体芽的再生,综合褐化率、瞬时表达率和芽诱导率的结果,在大豆农杆菌介导转化过程中 LA 最佳浓度为 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,有利于农杆菌的转化。LA 对外植体的芽诱导没有显著影响却能显著提高农杆菌的转化效率。除抗氧化剂外,Han 等^[16]在猕猴桃叶片再生和转化过程中发现,减少 MS 盐的使用可减轻外植体和愈伤组织的褐化和提高 GUS 瞬时表达率及芽的再生率。

参考文献

- [1] Wojtaszek P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection[J]. *Biochemistry Journal*, 1997, 322: 681-691.
- [2] Dan Y. Lipoic acid-a unique plant transformation enhancer[J]. In *Vitro Cell Development Biology-Plant*, 2009, 45: 630-638.
- [3] Enríquez-Obregón G A, Prieto-Samsónov D L, Riva G A, et al. *Agrobacterium*-mediated japonica rice transformation: a procedure assisted by an antinecrotic treatment[J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1999, 59(3): 159-168.
- [4] Olhoft P M, Fligel C M, Denovan, et al. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method[J]. *Plant*, 2003, 216: 723-735.
- [5] Olhoft P M, Bernal L B G, Hill S L, et al. A novel *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation method of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using primary-node explants from seedlings[J]. In *Vitro Cell Development Biology-Plant*, 2007, 43(6): 536-549.
- [6] Zheng Q S, Ju B, Liang L K, et al. Effects of antioxidants on the plant regeneration and GUS expressive frequency of peanut (*Arachis hypogaea*) explants by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2005, 811: 83-89.
- [7] Packer L, Tritschler H. Alpha-lipoic acid; the metabolic antioxidant [J]. *Free Radical Biology-Medicine*, 1996, 20: 625-626.
- [8] Packer L, Tritschler H, Wessel K. Neuro protection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid [J]. *Free Radical Biology-Medicine*, 1997, 22: 359-378.
- [9] Halliwell B. How to characterize a biological anti-oxidant[J]. *Free Radical Research Communication*, 1990, 9: 1-32.
- [10] Halliwell B. Antioxidants in human health and disease[J]. *Annual Review Nutrition*, 1996, 16: 33-50.
- [11] Dan Y H, Armstrong C L, Dong J, et al. Lipoic acid-a unique plant transformation enhancer [J]. In *Vitro Cell Development Biology-Plant*, 2009, 45(6): 630-638.
- [12] Zhang Z Y, Xing A Q, Staswick P. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1999, 56: 37-46.
- [13] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1987, 5: 387-405.
- [14] Perl A, Lotan O, Abu-Abied M, et al. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.); the role of antioxidants during grape-*Agrobacterium* interactions[J]. *Nature Biotechnology*, 1996, 14: 624-628.
- [15] Kuta D D, Kuta L, Tripathi. *Agrobacterium*-induced hypersensitive necrotic reaction in plant cells: a resistance response against *Agrobacterium*-mediated DNA transfer[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2005, 4(8): 752-757.
- [16] Han M L, Gleave A P, Wang T C. Efficient transformation of *Actinidia arguta* by reducing the strength of basal salts in the medium to alleviate callus browning[J]. *Plant Biotechnology Reporter*, 2010, 4: 129-138.