

## 基于不定芽原位诱导的大豆转基因方法

李永光,李冬梅,李维娜,盖江南,王 涛,谷翰卿,李文滨

(东北农业大学 大豆研究所,教育部大豆生物学重点实验室/农业部东北大豆生物学与遗传育种重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘 要:**建立了一种新型农杆菌介导的大豆转基因方法(专利公开号:102181479A),以萌发大豆为外植体,最大限度地保持了大豆植株的完整性,在非无菌环境下进行转化,利用草丁膦筛选阳性植株。该方法不需要组织培养,脱离了传统组培的限制。对16个大豆基因型进行转化,经PCR、RT-PCR、qPCR和GUS染色鉴定转基因株系,平均转化率为23%。获得当代转基因植株接近实生苗,收获种子仅需3~4个月。该方法将有利于促进大豆基因功能研究和规模化转化。

**关键词:**大豆;转基因方法;农杆菌;不定芽原位诱导

**中图分类号:**S565.1

**文献标识码:**A

**文章编号:**1000-9841(2012)02-0163-04

## A New Soybean Transformation Method Based on Adventitious Shoots Induction

LI Yong-guang, LI Dong-mei, LI Wei-na, GAI Jiang-nan, WANG Tao, GU Han-qing, LI Wen-bin

(Soybean Research Institute, Northeast Agricultural University, Chinese Education Ministry's Key Laboratory of Soybean Biology, Agricultural Ministry's Northeast Area Key Laboratory of Soybean Biology and Genetic Breeding, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

**Abstract:** In this work, a novel *Agrobacterium*-mediated transformation methodology, independent of organ culture, was established. The germinated entire seedlings of soybean were used as explants. The transformation system maximum to maintain the integrity of soybean itself, keep off the limitations of traditional tissue culture. The transformation was under non-sterile environment. The transgenic regeneration plants were selected with herbicide glufosinate. The transgenic lines were confirmed by PCR, RT-PCR, qPCR and GUS staining. Sixteen genotypes of soybean were transformed, and the average transgenic frequency was 23%. Transgenic soybean plants were usually produced in less than 2 month after *Agrobacterium* inoculation and seeds could be harvested in 3-4 months. The growth characteristics and morphology of transgenic plants were identical to the untransformed wild type plants. This method would be beneficial to facilitate the characteristic of gene functions and boosted the manipulation of soybean transformation for commercial purpose.

**Key words:** Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]; Transformation method; *Agrobacterium tumefaciens*; Adventitious shoots induction

大豆属于豆科、蝶形花亚科、大豆属的二倍体( $2n=40$ )植物,是目前公认的几种再生困难的作物之一。自从1980年Cheng第一次报道了利用大豆子叶节外植体在改良的B5培养基上成功再生以后,研究人员致力于以大豆植株不同部位为外植体的再生体系的建立,抗性基因,以及遗传转化方法的改良等工作,并且已经取得了很大的进展<sup>[1]</sup>。植物基因工程是大豆遗传改良的重要新途径。近几年来转基因植物数量与日俱增,转化方法也得到了快速的发展<sup>[2]</sup>。但是由于大豆的外植体再生困难、基因型限制等原因,遗传转化仍是大豆基因工程研究的重点和热点。

大豆转基因的方法主要有农杆菌介导法、基因枪法、电激法、PEG法、超声波辅助农杆菌转化法和花粉管通道法等。然而大豆转基因存在转化率低、

重复性差、基因型局限等问题,目前主要依靠大量的转化受体来获得转基因植株<sup>[2-3]</sup>。随着大豆基因组学和基因功能研究的深入,大豆的转基因方法研究方面也在不断的完善和创新,但目前普遍采用的农杆菌介导的大豆转基因体系包括子叶节法、下胚轴法、胚尖法等转化方法存在操作复杂、转化周期长,生根、移栽过程成活率低,转基因效率偏低等问题。因此,进一步研究建立新的、高效稳定的大豆转基因体系是十分必要的。

该研究基于组织培养过程中诱导不定芽分化及再生的原理,采用水培和蛭石培养2种转化培养方式,利用农杆菌直接对萌发的大豆进行微创和侵染,保持大豆其它部位完整性,经不定芽诱导再生和除草剂筛选最终获得转化植株,达到转化目的。

收稿日期:2012-02-13

基金项目:抗逆转基因大豆培育专项(2011ZX08004-002)。

第一作者简介:李永光(1984-),男,博士,助理研究员,研究方向为大豆生物技术。E-mail:yongguangli\_0451@yahoo.com.cn。

通讯作者:李文滨(1958-),男,教授,博士生导师,主要从事大豆遗传育种方面的研究。E-mail:wenbinli@neau.edu.cn。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 受体大豆品种 大豆转基因受体:合丰 35、黑河 38、东农 8004、黑农 51、合丰 45、东农 44、绥农 28、黑农 48、东农 50、黑河 48、黑农 44、垦丰 16、合丰 55、东农 48、东农 53 和东农 47,由东北农业大学大豆研究所、黑龙江省农业科学院和黑龙江省农垦科学院共同提供。

1.1.2 载体和菌株 选用的载体为 pCAMBIA3301 和 pCAMBIA3301-GIa(含有大豆 *GI* 基因)载体,含有除草剂草丁膦抗性 *Bar* 基因、*GUS* 基因,35 S 启动子,由实验室构建和保存,农杆菌工程菌株为 EHA105。

1.1.3 主要试剂 SYBR(R) ExScript™ RT-PCR Kit 购自 TaKaRa 公司,草丁膦( $200\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )购自拜耳公司;草丁膦( $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )溶液配制:草丁膦 +  $0.5\%$  SilWet-77<sup>[4]</sup>;农杆菌重悬液 MS2:  $1/2\text{MS} + 1.67\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6BA +  $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  L-cys +  $1.58\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  +  $1.54\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  DTT +  $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  AS +  $0.5\%$  SilWet-77;不定芽诱导液 MS3:  $1/2\text{MS} + 2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.5\%$  SilWet-77。

### 1.2 大豆转化方法

该方法已申请发明专利(公开号:102181479A);

1.2.1 种子萌发及微创 挑取饱满大豆种子,置于水或蛭石中,25℃萌发,4 d 后(子叶未展开)用刀片小心去除顶芽及侧芽,轻轻划 3~5 道伤口(保持子叶尽量合拢),作为侵染受体。

1.2.2 农杆菌侵染 农杆菌培养至  $\text{OD}_{600} = 0.6 \sim 0.8$  时,用 MS2 重悬,将制备好的菌液沿子叶缝隙滴入,保湿培养,第 2 天重复滴加 1 次。

1.2.3 不定芽诱导 农杆菌侵染后,移入水培箱中,隔天在伤口处滴加 MS3 芽诱导液,诱导不定芽的分化生长,分化的生长点处膨大分化出不定芽,并开始伸长生长。

1.2.4 抗性植株筛选 利用  $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的 PPT(phosphinothricin,草丁膦)对分化后伸长芽的三出叶进行涂抹,用剪刀从基部去除阴性植株,直至筛选得到连续 3 片叶无明显变化的 PPT 抗性植株,移入土中正常培养。

### 1.3 转基因植株的鉴定

1.3.1 转基因大豆 PCR 鉴定 用 *bar* 基因特异性

引物对草丁膦抗性植株进行 PCR 分析,上游引物序列为 5'-GCGGTACCGGCAGGCTGAAG-3',下游引物序列为 5'-CCGCAGGAACCGCAGGAGTG-3',扩增片段大小 403 bp;PCR 反应体系为  $20\text{ }\mu\text{L}$ (大豆基因组 DNA  $50\text{ ng}$ ,  $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP  $0.3\text{ }\mu\text{L}$ ,  $10\times$  Buffer  $2\text{ }\mu\text{L}$ , EX-Taq  $0.3\text{ }\mu\text{L}$ ,  $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  引物  $1\text{ }\mu\text{L}$ , 补水至  $20\text{ }\mu\text{L}$ )。PCR 反应条件:95℃, 4 min;95℃, 30 s;58℃, 30 s;72℃, 30 s;35 循环,72℃, 10 min;4℃ 保存。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果。

1.3.2 转基因大豆 RT-PCR 及 *GUS* 染色 提取大豆叶片总 RNA,合成 cDNA 第一链进行 RT-PCR(方法参见 RNAiso、PrimeScript II 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit 说明书, TaKaRa)。以大豆看家基因 *Actin4* (AF049106) 为内参,上游引物序列为:5'-GTGT-CAGCCATACTGTCCCCATT-3',下游引物序列为:5'-GTTTCAAGCTCTTGCTCGTAATCA-3', *GUS* 扩增片段大小为 598 bp,上游引物序列为 5'-AAAGGTT-GGGCAGGCCAGCG-3',下游引物序列为:5'-CTGC-CACTGACCGGATGCCG-3'。PCR 反应体系同上,PCR 反应条件:95℃, 1 min;95℃, 20 s;60℃, 20 s;72℃, 20 s;28 个循环,72℃, 10 min;4℃ 保存。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

*GUS* 染色参照 Jefferson(1987)的方法<sup>[5-6]</sup>。

1.3.3 qPCR 分析转基因大豆基因表达 RNA 提取方法同上,qPCR 检测方法参照 SYBR(R) Ex-Script™ RT-PCR Kit 说明书(TaKaRa),内参引物 *Actin4* 同上,目的基因 *Gla* 引物为:上游:5'-GGCTTTGCTATTTCTATCT-3'下游:5'-GAGAAGGTT-TACTTATTTGC-3'。

## 2 结果与分析

### 2.1 大豆转基因流程及 $T_0$ 代苗的获得

以大豆东农 50 为受体建立转化体系,选取 150 粒饱满的种子播种于蛭石中,萌发后进行农杆菌转化。由于不定芽的分化需要高湿度和较强光照,为了创造适合转化的环境,采用水培方式,水培装置包括水培箱体、气泵通气管、植株支架、固定漂浮板、保湿膜、遮光布。水培养装置结构见图 1。

对萌发 4 d 的大豆进行去除顶芽及侧芽处理,见图 2。在农杆菌侵染后,利用不定芽诱导液诱导不定芽的分化和生长,每 2 d 在创口处滴加一次不定芽诱导液,7~10 d 后分化的生长点处膨大,并不断分化出不定芽,随着不定芽的继续生长,长势旺盛的芽开始伸长生长。待伸长芽展开三出复叶时,

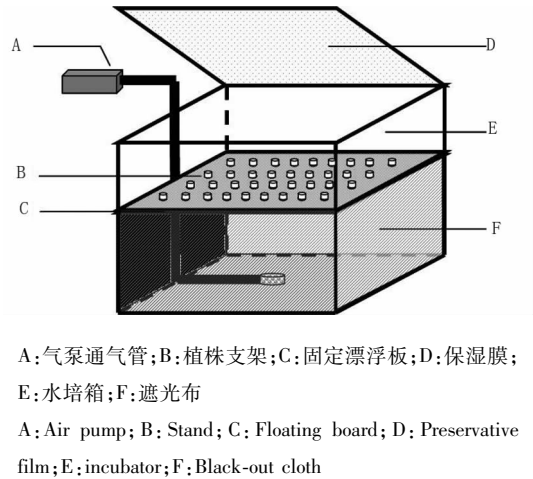


图1 水培养装置结构

Fig. 1 The draft of water culture device

涂抹 100 mg·L<sup>-1</sup> 草丁膦, 2~3 d 后进行观察。叶片大面积失绿变黄的为不具有 PTT 抗性表现, 用剪刀从基部去除阴性植株, 直至筛选在同一受体上得到叶片无明显变化的抗性植株, 对于第一次涂抹获得抗性枝要经过依次长出的不同部位的 3 次筛选, 记为草丁膦抗性植株<sup>[7,9]</sup>。结果见图 3a~d。

将获得的草丁膦抗性植株移栽至土中, 于温室

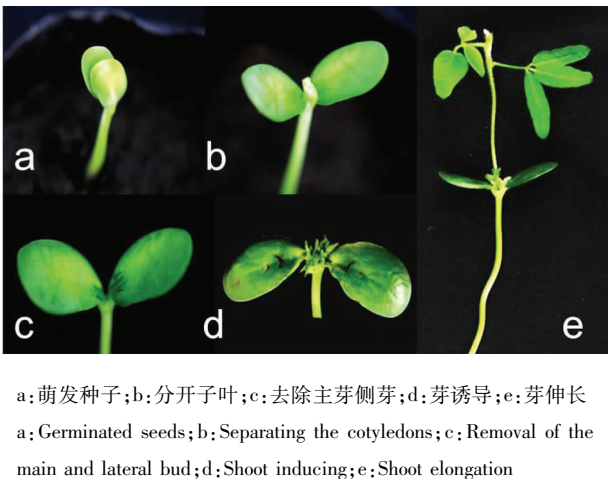


图2 大豆种子处理

Fig. 2 Soybean seeds processing

培养。T<sub>0</sub>代植株避免了传统组培方式的继代、再生根, 其根系为原始生长的根系, 获得的植株更接近于实生苗, 经在土中正常培养结实率较高, 子叶脱落后其节处可明显观察到分化后的膨大状态, 随着生长变粗, 经过草丁膦筛选去除的阴性芽的基部清晰可见, 多数植株剩余 1 个阳性芽, 少部分出现 2 个和 3 个阳性芽(图 3f~h)。

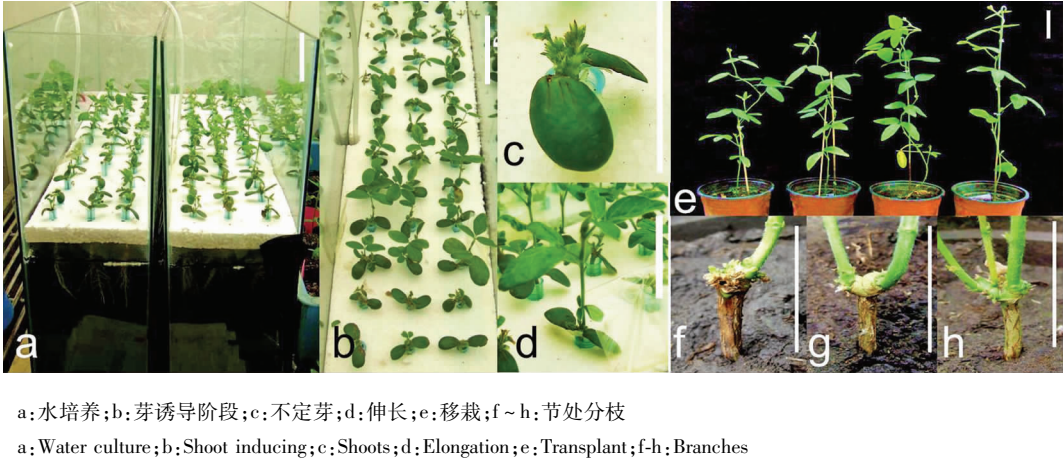


图3 水培养和不定芽诱导

Fig. 3 Water culture and shoot inducing

2.2 转基因大豆的分子检测

对获得的 48 株草丁膦抗性植株分别编号并取新鲜叶片, 利用 SDS 小量法提取基因组 DNA, 琼脂糖电泳检测 DNA 质量及浓度。通过设计的 *bar* 引物, 设计扩增 403 bp 的目的片段, 对 48 株草丁膦抗性植株 PCR 鉴定, 其中 25 株检测到 403 bp 大小的目的条带(图 4); 同时利用转化目的基因 *GI* 的引物进行扩增, 其中 23 株具有目的条带。48 株中 2 种引物均被扩增的共有 20 株。

对获得的转基因材料进行 T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub> 连续 2 代的草丁膦抗性筛选, 淘汰阴性植株及草丁膦低抗性植株。筛选获得的 T<sub>2</sub> 代植株进行 Real-Time PCR(实

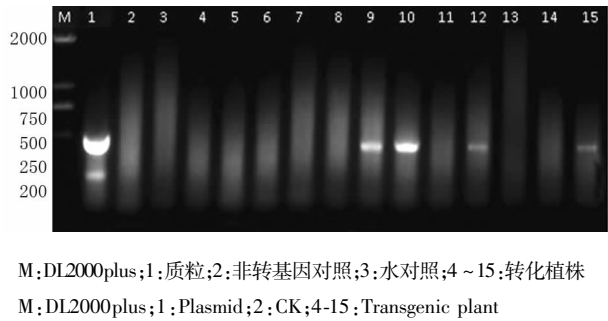


图4 Bar 引物扩增结果

时荧光定量 PCR), 检测基因表达。通过 RF PCR 检测了不同株系的 9 株 T<sub>2</sub> 代植株的基因表达情况, 6

株基因表达丰度显著增加,结果表明基因已经整合到基因组中并稳定表达(图5)。

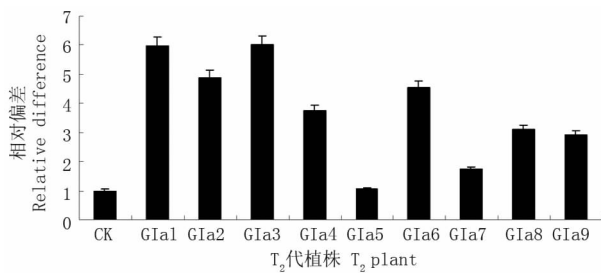
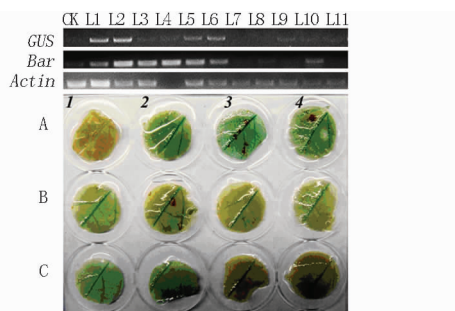


图5 T<sub>2</sub>代植株表达分析

Fig.5 Gene expression analysis in T<sub>2</sub> transgenic soybean

### 2.3 不同基因型转化率比较

目前的大豆转基因方法多受到基因型的限制,传统方法仅有少数适合转化的品种,为研究水培转基因方法受基因型的限制程度和转化率的影响,选取16个大豆不同基因型,其中多数为大豆主栽品种。每个大豆品种选取50粒饱满种子,转基因方法同上。通过对16个品种的转化,将获得的182株草丁膦抗性植株利用 $bar$ 基因引物进行PCR鉴定,并对获得的PCR阳性植株进行RT-PCR检测和叶片 $GUS$ 染色(图6)。16个基因型平均转化率为23%,转化率最高为黑农48,达34.5%,东农44转化率最低,为14.3%。转化较好的品种为黑农48、垦丰16和合丰55(表1)。



A1:CK;A2-C4:转基因株系 L1-L11

A1:CK;A2-C4:transgenic lines L1-L11

图6 PCR阳性植株的RT-PCR和 $GUS$ 染色分析

Fig.6 RT-PCR and  $GUS$  expression in transgenic soybean

## 3 讨论

通过组织培养的大豆转基因方法,要求条件较高,需要特定的无菌环境,并且组织培养操作繁琐,工作量大,对于外植体的处理要求高。大多数方法均对大豆外植体的完整性进行了大量的破坏,如切去下胚轴、切除子叶等,这种破坏在无形中必然提高了培养条件,需要人为的再创造出适合植物的培养环境来满足创伤外植体的正常生长,同时还要满

表1 16个大豆基因型的转化率

Table 1 Transgenic efficiency of 16 soybean genotypes

品种	PCR 阳性率	品种	PCR 阳性率
Variety	PCR positive rate/%	Variety	PCR positive rate/%
合丰 35 Hefeng35	20.0	黑农 44 Heinong44	15.0
合丰 45 Hefeng45	22.2	黑农 48 Heinong48	34.5
东农 50 Dongnong50	20.0	垦丰 16 Kenfeng16	29.9
合丰 55 Hefeng55	33.3	东农 47 Dongnong47	18.3
黑河 38 Heihe38	22.7	8004	20.8
黑河 48 Heihe48	25.7	东农 48 Dongnong48	20.0
东农 53 Dongnong53	18.8	东农 44 Dongnong44	14.3
绥农 28 Suinong28	22.7	黑农 51 Heinong51	23.5

足外植体进行不定芽分化的需求,所以培养条件和外植体的创伤成为限制转基因效率的重要因素。长期以来众多学者对培养条件等进行了大量的研究,然而由于大豆基因型的多样性,适合某一品种转化的培养条件难以在多种基因型上使用,这也使得大豆的遗传转化受到基因型的严重限制。而其中转化过程中的各个环节也同样影响最终的转化效率,如继代、筛选剂添加、褐化、除菌染菌等。

与传统方法相比,该研究建立的转基因方法由于最大限度的保持了大豆的完整性,依靠其自身系统正常生长,在诱导下产生不定芽,获得转基因植株,整个过程在开放的非无菌环境进行,脱开了组织培养等限制因素。由于该方法设计路线脱离了传统的组织培养方式和无菌环境,所以创造一个适合基因转化的并适合大豆生长的环境至关重要,利用农杆菌介导的方法进行转化,考虑到转化细胞的组织分化对光照和湿度的需要,该研究参考并利用了水培养方式,保证适宜湿度条件,并且水培液的营养成分方便控制。在保持大豆完整性的基础上,考虑根对激素等敏感性问题,采用滴加诱导液(含激素溶液)的方式进行侵染和不定芽的诱导,并有针对性的进行不定芽的筛选,从而达到获得转化植株的目的。

该研究建立的方法受大豆基因型限制小,从侵染到PCR检测需要40~50d,整个周期获得种子需要3~4个月,T<sub>0</sub>代结实率高、种子数量多。由于不定芽再生途径为多细胞起源<sup>[9-10]</sup>,所以后代需经过除草剂单株多次筛选,淘汰嵌合植株,减少后期获得纯和体的工作量。

## 参考文献

- [1] Hincbee M A W, Connor-Wond D D, Newen C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated genetic transfer[J]. *Biotechnology*, 1988, 6:915-922.

(下转第172页)



- Han T F. Approaches to *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean[J]. Soybean Science, 2010, 29(4): 696-701. )
- [2] 王振华, 杨德光, 张辉, 等. 大豆遗传转化技术在转基因大豆研究中的应用[J]. 生物技术通报, 2010(10): 60-66. (Wang Z H, Yang D G, Zhang H, et al. Research progress of transgene method in transgenic soybean (*Glycine max*) [J]. Biotechnology Bulletin, 2010(10): 60-66. )
- [3] 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 Biotechnology, 1988, 6: 915-922.
- [4] 林树柱, 曹越平, 卫志明. 根瘤农杆菌介导的大豆遗传转化[J]. 生物工程学报, 2004, 20(6): 817-820. (Lin S Z, Cao Y P, Wei Z M. Genetic transformation of soybean mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2004, 20(6): 817-820. )
- [5] Somers D A, Samac D A, Olhoft P M. Recent advances in legume transformation[J]. Plant Physiology, 2003, 131: 892-899.
- [6] 刘海坤, 卫志明. 一种大豆成熟种子的消毒方法[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(3): 260-261. (Liu H K, Wei Z M. A method for sterilizing mature seeds of soybean [J]. Plant Physiology Communications, 2002, 38(3): 260-261. )
- [7] 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]. EMBO Journal, 1987, 6: 3901-3907.
- [8] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 438-440. (Wang G L, Fang H J. Plant gene engineering[M]. Beijing: Science Press, 2009: 438-440. )
- [9] Olhoft P M, Flagel L E, Donovan C M, et al. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method[J]. Planta, 2003, 216(5): 723-735.
- [10] Liu S J, Wei Z M, Huang J Q. The effect of co-cultivation and selection parameters on *Agrobacterium*-mediated transformation of Chinese soybean varieties [J]. Plant Cell Reports, 2008, 27: 489-498.
- [11] 马丽萍, 张辉. 一种快速、高效的大豆农杆菌转化技术[J]. 中国农业科学, 2008, 41(3): 661-668. (Ma L P, Zhang H. A fast and high efficient technique for *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean [J]. Scientia Agriculture Sinica, 2008, 41(3): 661-668. )
- [12] Bailey M A, Boerma H R, Parrott W A. Inheritance of tumor formation in response to *Agrobacterium tumefaciens* in soybean[J]. Crop Science, 1994, 34: 514-519.
- [13] Mauro A O, Pfeiffer T W, Collins G B. Inheritance of soybean susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and its relationship to transformation[J]. Crop Science, 1995, 35: 1152-1156.
- [14] Margie M P, Shou H X, Guo Z B, et al. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant[J]. Euphytica, 2004, 136: 167-179.
- [15] 叶美, 张敏, 杨素欣, 等. 大豆成熟种子胚尖基因枪法转化体系的优化[J]. 大豆科学, 2011, 30(1): 20-23. (Ye M, Zhang M, Yang S X, et al. Optimization of biolistics transformation of embryonic tips of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] mature seeds [J]. Soybean Science, 2011, 30(1): 20-23. )

(上接第 166 页)

- [2] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998. (Wang G L, Fang H J. Plant genetic engineering [M]. Beijing: Science Press, 1998. )
- [3] 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报, 2005, 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. )
- [4] 李永光, 黄文佳, 周失, 等. 大豆对草丁膦敏感性研究[J]. 大豆科学, 2011, 30(3): 749-756. (Li Y G, Huang W J, Zhou S, et al. Sensitivity of soybean to herbicide glufosinate [J]. Soybean Science, 2011, 30(3): 749-756. )
- [5] Jefferson R. Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system [J]. Plant Molecular Biology Reports, 1987, 5: 387-405.
- [6] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 2001.
- [7] 薛仁镐, 谢宏峰. 利用改良的草丁膦筛选系统快速而有效筛选转基因大豆[J]. 大豆科学, 2006, 25(4): 373-378. (Xue R G, Xie H F. Rapid and efficient selection for transgenic soybean plants with the improved glufosinate selection system [J]. Soybean Science, 2006, 25(4): 373-378. )
- [8] Butaye K M J, Cammue B P A, Delaur S L, et al. Approaches to minimize variation of transgene expression in plants [J]. Molecular Breeding, 2005, 16: 79-91.
- [9] 孙磊, 韩俊友, 李宏宇. 大豆再生植株抗草胺膦的筛选方法研究[J]. 大豆科学, 2010, 29(6): 1019-1023. (Sun L, Han J Y, Li H Y. Comparison on methods screening of transgenic soybean resistant to glufosinate [J]. Soybean Science, 2010, 29(6): 1019-1023. )
- [10] Zeng P, Vadenais DA, Zhang Z, et al. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] [J]. Plant Cell Reports, 2003, 22: 478-482.