

## 大豆不定胚悬浮培养基基因型筛选及基因枪遗传转化的研究

盖江南,张彬彬,吴瑶,李文滨

(东北农业大学大豆生物学教育部重点实验室,东北农业大学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:**对32个不同基因型大豆的幼胚进行不定胚诱导,30 d时统计分析初生胚诱导率、次生胚诱导率和诱导效率,经综合比较得出适合体细胞诱导不定胚的4种基因型为L155、垦丰16、绥农25和吉育91。然后以不定胚诱导率较高的L155为材料建立大豆悬浮培养不定胚繁殖体系,并用基因枪轰击的方法将GUS表达盒片段转入不定胚细胞团。X-gluc染色后显微观察到基因蓝色产物,说明GUS基因通过微弹轰击法导入大豆不定胚细胞并表达。

**关键词:**大豆;不定胚悬浮培养;基因枪;基因型筛选

**中图分类号:**S565.1

**文献标识码:**A

**文章编号:**1000-9841(2013)01-0038-05

## Screening of Soybean Genotypes Suitable for Suspension Culture with Adventitious Embryos and Genetic Transformation by Particle Bombardment

GAI Jiang-nan, ZHANG Bin-bin, WU Yao, LI Wen-bin

(Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education, Key Laboratory of Biology and Breeding/ Genetics of Chinese Agriculture Ministry, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

**Abstract:** In this work, we used the immature cotyledons of 32 soybean genotypes to induce adventitious embryos and compared the percentage of primary embryo induction, percentage of secondary embryo induction and induction efficiency after 30 days inducing culture. The results showed that L155, Kenfeng 16, Suinong 25 and Jiyu 91 had higher frequency of adventitious embryos induction. Furthermore, L155 was selected to further establish the soybean suspension culture system. The secondary embryogenesis systems were used for GUS gene transformation by particle gun bombardment method. The GUS staining results showed that the GUS gene was imported into soybean adventitious embryos cells and successfully expressed.

**Key words:** Soybean; Adventitious embryos suspension system; Particle bombardment; Genotype screening

大豆是我国重要的粮食、油料和饲料作物。以往大豆新品种的培育主要以常规育种为主,自从1980年Cheng等第一次报道利用大豆子叶节外植体在改良的B5培养基上成功再生以来<sup>[1]</sup>,植物基因工程已经逐步成为大豆遗传改良的重要新途径。近几年来大豆转化方法得到了快速的发展,主要有农杆菌介导法、基因枪法、显微注射法、PEG法、超声波辅助农杆菌转化法、花粉管通道法等,但实际应用最广泛的还是根癌农杆菌转化法和基因枪法<sup>[2-3]</sup>。

关于大豆体细胞胚再生已有许多报道,Tulecke等<sup>[4]</sup>在1988年提出用胚性组织被转化的部位诱导次生胚,因其可能起源于单细胞,同时延长细胞分裂周期使胚增殖生长,从而提高了再生率和转化率,已成为植物转化最适宜的受体。Finer等建立的可增殖的胚性悬浮培养系统具有这些优点,已经证明是目前大豆基因枪转化最适宜的受体系统<sup>[5-6]</sup>。但研究发现,不定胚的诱导受基因型限制,不同基因型诱导效率差异很大<sup>[7]</sup>。

本研究对32个基因型大豆的幼胚子叶进行不定胚诱导,统计分析初生胚诱导率、次生胚诱导率和诱导效率,筛选适合体细胞诱导不定胚的基因型。然后对适宜基因型进行悬浮培养不定胚,并利用基因枪对胚性细胞团进行GUS的瞬时转染,旨在建立有效的不定胚悬浮培养体系,为遗传转化提供理想的受体材料。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 植物材料 32个大豆基因型由东北农业大学大豆研究所提供(表1)。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶购自TaKaRa公司;酶切产物胶回收试剂盒购自上海宝生物工程有限公司;其它各种生化试剂均购自Sigma公司。

1.1.3 植物组织培养基 诱导培养基:MSB(MS无机盐+B5有机成分),L-Asparagine 100 mg·L<sup>-1</sup>, 2,4-D 40 mg·L<sup>-1</sup>,蔗糖 30 g·L<sup>-1</sup>,琼脂为 2 g·L<sup>-1</sup>,

收稿日期:2012-10-19

基金项目:抗逆转基因大豆培育专项(2011ZX08004-002)。

第一作者简介:盖江南(1987-),女,在读硕士,研究方向为大豆遗传育种。E-mail:little35friend@163.com。

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研究。E-mail:wenbinli@neau.edu.cn。

pH5.8。悬浮培养基:MSB(MS 无机盐 + B5 有机成分), L-Asparagine  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 2,4-D  $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 蔗糖  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH5.8。

## 1.2 方法

**1.2.1 不定胚诱导** 大田种植的苗壮大豆植株开花后约 14 d 开始取荚, 每 3 d 取样 1 次, 最多取 3 次。取荚时逆光观察幼胚长度为 3~4 mm 为宜。将豆荚用自来水洗净, 75% 酒精溶液表面消毒 30 s, 20% 次氯酸钠溶液浸泡 20 min, 无菌水冲洗 3 次。用镊子取出种子, 将尖端切开, 剥去种皮, 挤出两片子叶, 近轴面向上分别接种到体细胞胚诱导培养基上, 每品种幼胚子叶接种数不少于 200 片,  $25^\circ\text{C}$ , 8 h 黑暗, 16 h 光照条件培养 30 d。调查初生胚诱导率(有初生胚发生的外植体数/接种外植体数  $\times 100\%$ )、次生胚诱导率(有次生胚发生的外植体数/有初生胚发生的外植体数  $\times 100\%$ )和诱导效率(有次生胚发生的外植体数/接种外植体数  $\times 100\%$ )。次生胚为表面球形颗粒明显的不定胚团。

**1.2.2 不定胚悬浮培养** 在显微镜下将不定胚细胞团从基部与外植体剥离, 放入悬浮诱导培养基中, 然后将培养瓶置于摇床上, 在  $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $25^\circ\text{C}$ , 8 h 黑暗, 16 h 光照条件下培养。每 14 d 或发现培养基浑浊时进行继代, 继代时显微镜观察不定胚团生长情况, 挑选出鲜绿色、可增殖、未分化的不定胚团, 将其轻压为数块, 放入新的悬浮诱导培养基中培养, 从而实现大量扩繁的目的。

**1.2.3 微弹准备** 亚精胺(Spermidine,  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、 $\text{CaCl}_2$  ( $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和金粉(1 nm)需提前准备, 前二者过滤灭菌,  $-80^\circ\text{C}$  保存。金粉准备时称取 30 mg 至 1.5 mL EP 管, 加 500  $\mu\text{L}$  100% 酒精涡旋 20 s, 待金粉自然沉降后  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 1 min, 无菌水洗 3 次, 然后加入 500  $\mu\text{L}$  无菌水, 分装 10 管, 每管 50  $\mu\text{L}$ ,  $-20^\circ\text{C}$  保存。

**1.2.4 DNA 制备及包被** 实验所用 pBI121 质粒携带一个由 CaMV 35S 启动子控制下的 GUS 基因(图 1), 用 HindIII 和 EcoRI 两种酶将 pBI121 质粒上的 GUS 基因表达盒切下, 酶切体系为 20  $\mu\text{L}$ , pBI121 质粒 15  $\mu\text{L}$ , HindIII 和 EcoRI 各 0.4  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  Buffer 2  $\mu\text{L}$ , 补水至 20  $\mu\text{L}$ 。胶回收, 测定浓度为  $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

转化当天取 1 管金粉, 加入 30  $\mu\text{L}$  DNA, 涡旋 10 s, 加 50  $\mu\text{L}$   $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ , 涡旋 10 s, 加 20  $\mu\text{L}$   $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  亚精胺(spermidine), 涡旋 10 s。振荡 7 min, 静置 7 min。去上清, 加 200  $\mu\text{L}$  100% 酒精洗 2 次, 静置 5 min。去上清, 加 120  $\mu\text{L}$  100% 酒精, 混匀, 取 8  $\mu\text{L}$  滴在飞盘中心, 干燥。

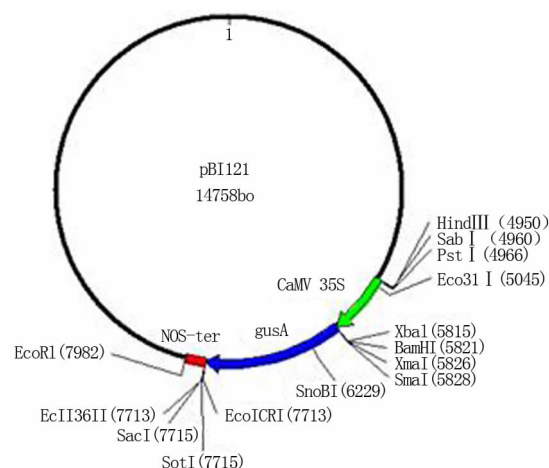


图 1 pBI121 GUS 质粒结构图

Fig. 1 Map of the plasmid pBI121 GUS

**1.2.5 基因枪转化** 转化当天将材料从培养基中捞出, 用滤纸吸去水分, 静置 3 min 后轰击, 轰击过程按 Bio-Rad PDS1000/He 基因枪使用说明书进行, 轰击压力为 1 100 psi, 轰击距离 6 cm, 每皿轰击一枪, 轰击后将材料放回原来的培养瓶里。

**1.2.6 GUS 染色** 转化后的植物组织在原液体培养基中恢复 3 d 后参照 Jefferson<sup>[8]</sup> 和 Sambrook 等<sup>[9]</sup> 的方法进行 GUS 染色。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因型筛选

如表 1 所示, 诱导 30 d 时初生胚诱导率大于 10% 的有 11 个基因型, 其中大于 50% 的 5 个基因型, 分别是 L155、东农 47、东农 49、垦丰 16 和绥农 25; 次生胚诱导率大于 10% 的有 22 个, 其中大于 50% 的有 7 个品种, 分别是 L155、垦丰 15、垦丰 16、合丰 52、绥农 25、吉育 91 和上 09-15; 诱导效率大于 10% 的有 9 个基因型, 其中大于 40% 的有 4 个品种, 分别是 L155、垦丰 16、绥农 25 和吉育 91, 可初步判断这 4 个基因型较适合不定胚诱导。

### 2.2 悬浮培养不定胚再生流程

以不定胚诱导效率较高的 L155 为受体建立转化体系, 在大田中种植 L155, 待其开花后 14 d 开始取荚, 图 2 为不同大小的幼胚, 取荚时首先可逆光观察幼胚长度为 3~4 mm 为宜(图 2A), 幼胚太小, 接种后不易成活, 幼胚太大则分化能力降低, 诱导不定胚发生的效果较差; 然后用手轻捏豆荚, 选择饱满、健康幼胚的幼胚接种(图 2B)。不定胚诱导 30 d 时已经分化出肉眼可观察到的不定胚团(图 3A), 要对每块不定胚团都进行显微观察, 挑选葡萄样表面球形颗粒明显的不定胚团(图 3B), 将其剥离子叶, 放入液体培养基进行悬浮培养。每 14 d 继

代 1 次,挑选鲜绿色、可增殖、未分化的不定胚团 (图 3C),将其轻压为数块,放入新的液体培养基中 扩增。保留一瓶生长状态最好的母体进行扩繁,其余可以用于基因枪转化的研究。

表 1 大豆不定胚诱导的基因型筛选  
Table 1 Genotype screening of adventitious embryos induction in soybean

基因型 Genotype	初生胚诱导率 Percentage of primary embryos induction/%	次生胚诱导率 Percentage of secondary embryos induction/%	诱导效率 Induction efficiency/%
L155	73.06	75.91	55.46a
东农 2 Dongnong2	2.42	12.78	0.31 h
东农 5 Dongnong5	4.31	21.60	0.93 h
东农 7 Dongnong7	2.63	33.72	0.89 h
东农 24 Dongnong24	0	0	0 h
东农 47 Dongnong47	98.70	30.16	29.77 d
东农 48 Dongnong48	1.90	0	0 h
东农 49 Dongnong49	81.40	13.68	11.14e
东农 52 Dongnong52	15.20	36.80	5.59f
黑河 38 Heihe38	0	0	0.00h
黑河 45 Heihe45	0.60	0	0.00h
黑农 44 Heinong44	0.30	0	0.00h
黑农 48 Heinong48	0	0	0.00h
黑农 54 Heinong54	0	0	0.00h
垦丰 15 Kenfeng15	1.10	52.69	0.58h
垦丰 16 Kenfeng16	75.20	57.91	43.55bc
垦丰 18 Kenfeng18	1.60	24.36	0.39h
合丰 47 Hefeng47	12.70	15.17	1.93g
合丰 50 Hefeng50	41.40	25.93	10.74e
合丰 52 Hefeng52	46.60	68.94	32.13d
合丰 57 Hefeng57	8.40	26.88	2.26g
绥农 25 Suinong25	58.90	79.98	47.11b
绥农 28 Suinong28	30.90	46.51	14.37e
吉育 82 Jiyu82	3.80	22.15	0.84h
吉育 91 Jiyu91	45.30	90.10	40.82c
垦 02-347 Ken02-347	1.60	0	0.00h
垦 05-3389 Ken05-3389	6.10	19.50	1.19g
平安 05-1703 Pingan05-1703	1.50	45.90	0.69h
上 09-15 Shang09-15	4.90	83.16	4.07f
上 09-4 Shang09-4	1.60	26.10	0.42h
吉 98-4032 Ji98-4032	0.40	0	0.00h
吉 20-339-2 Ji20-339-2	1.90	0	0.00h

同列数值不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。  
Values in a column followed by different lowercase letters are significantly different at 0.05 probability level.

2.3 基因枪转化组织 GUS 染色分析

实验所用 pBI121 质粒携带一个由 CaMV 35S 启动子控制下的 GUS 基因,大量提取质粒(图 4A),用 HindⅢ 和 EcoRI 两种酶将 GUS 基因表达盒切下,酶切采用每管 20 μL 小体系,5 管混合后电泳(图 4B),取 3 030 bp 大小的目的片段进行胶回收,胶回

收产物见图 4C。  
将基因枪轰击后的植物组织进行 GUS 染色后可在显微镜或解剖镜下观察到 GUS 基因产物染成的深蓝色小点(图 5),说明 GUS 基因通过微弹轰击法导入大豆不定胚细胞并表达。

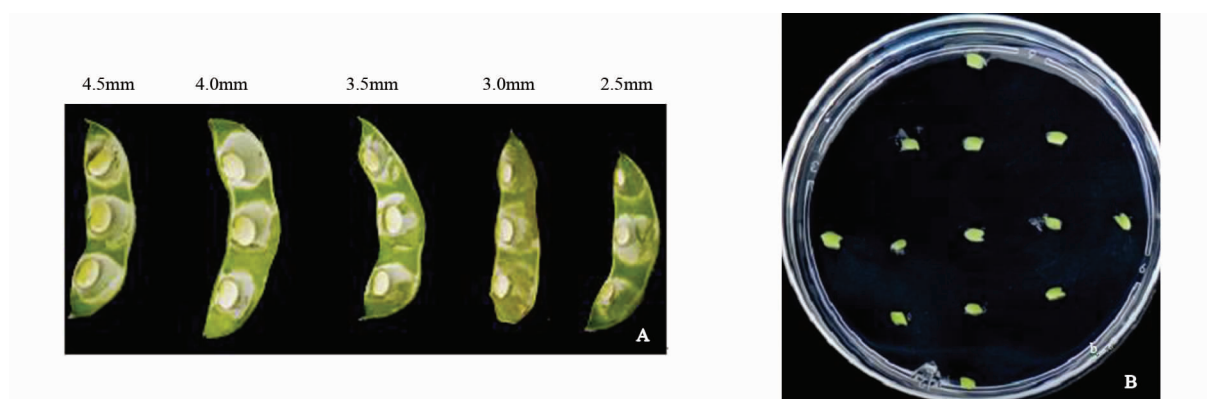


图2 幼胚选择

Fig. 2 Selection of immature embryo

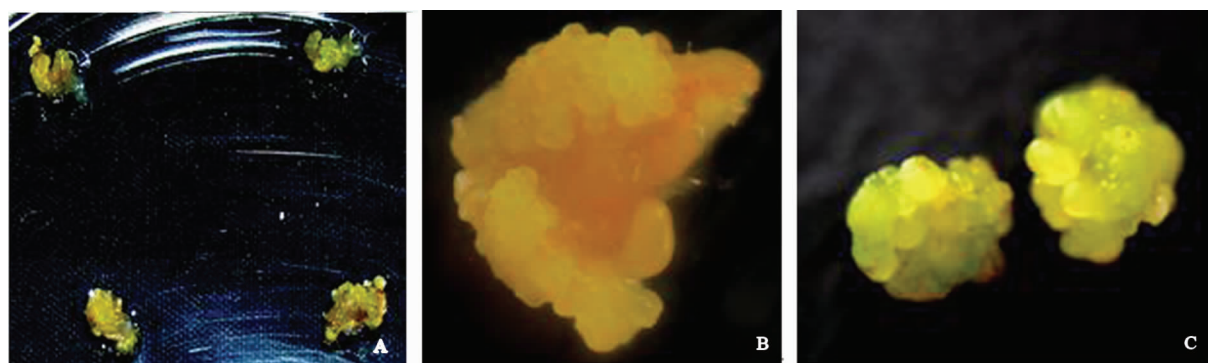
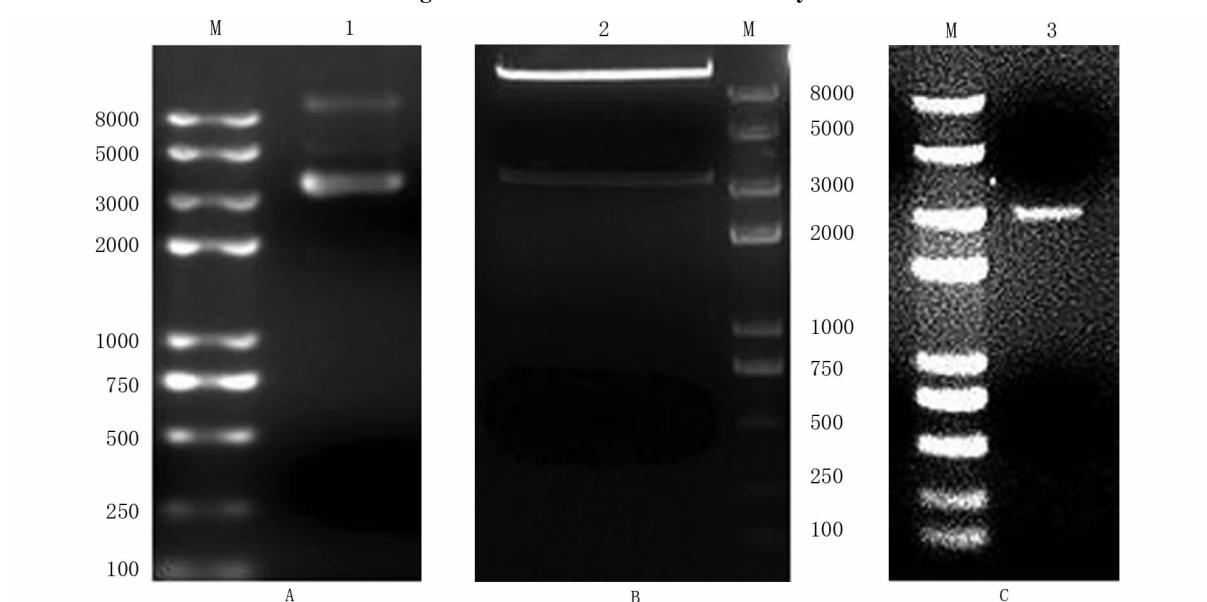


图3 不定胚的诱导

Fig. 3 Induction of adventitious embryos



M: DL2000; 1: pBI121 质粒; 2: 酶切产物 *GUS*; 3: 胶回收 *GUS*

M: DL2000; 1: Plasmid pBI121; 2: Enzyme-digested product *GUS*; 3: Gel extraction *GUS*

图4 质粒提取(A), 质粒酶切(B)和胶回收片段(C)的电泳图

Fig. 4 Electrophoretogram of plasmid extraction(A), enzyme-digested plasmid(B) and gel extraction(C)

### 3 讨论

利用转基因技术将优良农艺性状的相关基因转入普通大豆,使其成为综合性状优良的转基因大豆品种,可以拓宽栽培大豆的遗传背景,丰富栽培

大豆的基因资源<sup>[10]</sup>。多年来,研究人员致力于大豆不同部位再生体系的建立,遗传转化方法改良等工作,已经取得了很大进展。但大豆转基因仍然存在转化率低、重复性差等问题。

本研究建立的不定胚悬浮培养体系为解决这





图5 转化组织 GUS 染色分析

Fig. 5 GUS expression in transgenic tissue

些问题提供了思路。基因枪转化不定胚 GUS 染色的结果说明 GUS 基因可通过微弹轰击法导入大豆不定胚细胞并成功表达。本实验室的后续试验也证明在优化了培养基配方和培养条件后,一套悬浮培养不定胚系统可有效保持再生能力 7~8 个月,使用基因枪轰击的转化方法具有较高的转化效率,每次轰击可转化 10 块不定胚团,得到较多转化体。且由于不定胚可无限增殖,经基因枪转化后的组织可于再生前进行 PCR 和 Southern 检测,将阳性组织团继续扩繁,可得到许多相同的再生植株,解决大豆转基因重复性差的问题。

本研究结果表明,不同基因型的不定胚诱导效果差别很大。能诱导产生初生胚的基因型很多,但初生胚诱导率高于 50% 的只有 L155、东农 47、东农 49、垦丰 16 和绥农 25。能被诱导产生初生胚的基因型多数也能继续分化次生胚,但次生胚诱导率基因型之间差别显著,且次生胚诱导率与初生胚诱导率之间不存在相关性。例如,上 09-15 的初生胚诱导率只有 4.9%,但次生胚诱导率却高达 83.16%;东农 47 的初生胚诱导率为 81.4%,但次生胚诱导率却只有 13.68%。32 个基因型中诱导效率大于 40%

的只有 4 个品种,分别是 L155、垦丰 16、绥农 25 和吉育 91,可初步判断这 4 个品种是从幼胚诱导不定胚途径再生植株较好的试验材料。

## 参考文献

- [1] Hinchey 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.
- [2] 于洋,侯文胜,韩天富. 农杆菌介导大豆遗传转化技术的研究进展[J]. *大豆科学*, 2010, 29(4):696-701. (Yu Y, Hou W S, Han T F. Approaches to *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean[J]. *Soybean Science*, 2010, 29(4):696-701.)
- [3] 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.)
- [4] Tulecke W, McGranahan G. Regeneration by somatic embryogenesis of triploid plants from endosperm of walnut, *Juglans regia* L., cv. Manregian[J]. *Plant Cell Report*, 1988, 7:301-304.
- [5] Finer J J, McMullen M D. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue [J]. In *Vitro Cellular & Developmental Biology*, 1991, 27P:175-182.
- [6] Finer J J, Nagasawa A. Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill.) [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1988, 15:125-136.
- [7] Parrott W A, Williams E G, Hildebrand D F, et al. Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean[J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1989, 16:15-21.
- [8] Jefferson R. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system [J]. *Plant Molecular Biology Reports*, 1987, 5:387-405.
- [9] Sambrook J, Russell D W. *Molecular cloning: a laboratory manual* [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 2001.
- [10] 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 Agricultura Sinica*, 2008, 41(3):661-668.)
- [23] Bernard J C, David L M, Peter M G, et al. Mutagenesis of soybean (*Glycine max* L. Merr.) and the isolation of non-nodulating mutants[J]. *Plant Science*, 1986, 47(2):109-114.
- [24] Olsen O, Wang X, Wettstein D V. Sodium azide mutagenesis: preferential generation of A. T->G. C transitions in the barley *Ant18* gene[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993, 90(17):8043-8047.
- [25] 钮力亚,于亮,付晶,等. 叠氮化钠在农作物育种中的应用[J]. *河北农业科学*, 2010(12):52-53. (Niu L Y, Yu L, Fu J, et al. Application of sodium azide in crops breeding[J]. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*, 2010(12):52-53.)
- [26] Al-Qurainy F, Khan S. Mutagenic effects of sodium azide and its application in crop improvement[J]. *World Applied Sciences Journal*, 2009, 6(12):1589-1601.
- [27] Rao D R M, Reddi T V V S. Azide mutagenesis in rice[J]. *Proceedings, Plant Sciences*, 1986, 96(3):205-215.
- [28] 姜振峰,刘志华,李文滨,等. 叠氮化钠对大豆 M<sub>1</sub> 的生物学诱变效应[J]. *核农学报*, 2006(3):208-210. (Jiang Z F, Liu Z H, Li W B, et al. M<sub>1</sub> mutagenic effect on soybean induced by NaN<sub>3</sub> [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2006(3):208-210.)

(上接第 37 页)