

吉林47大豆子叶节遗传转化体系的优化

孙 昕,赵健如,闫 帆,姬长媛,杨旭光,李景文,王 英,王庆钰

(吉林大学 植物科学学院,吉林 长春 130062)

摘要:为检测不同基因型大豆对于根癌农杆菌的敏感性,使用携带 pCAMBIA1301 质粒(含 *GUS* 基因)的农杆菌 EHA105 对 10 个性状优良的大豆基因型进行侵染,共培养后进行 *GUS* 染色,筛选得到对根癌农杆菌较敏感的基因型吉林47、吉林35和绥农10号;而后以吉林47子叶节为外植体进行大豆遗传转化体系的优化,在重悬及共培养期间添加不同浓度巯基化合物,发现 $400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ L-Cys、 $248\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫代硫酸钠和 $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT 组合对于褐化的抑制效果最好;对芽伸长阶段的关键激素 GA_3 和 IAA 进行比较研究,得到最佳配比为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{GA}_3$ 、 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{IAA}$ 。

关键词:吉林47;子叶节;褐化;芽伸长

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2013)03-0291-04

Optimization on Cotyledonary-node Genetic Transformation System of Soybean Cultivar Jilin 47

SUN Xin, ZHAO Jian-ru, YAN Fan, JI Chang-yuan, YANG Xu-guang, LI Jing-wen, WANG Ying, WANG Qing-yu

(Plant Science College of Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: After infected by EHA105 caring plasmid pCAMBIA1301, the *GUS* staining of 10 soybean genotypes was carried out to detect the sensitivity for *Agrobacterium-tumefaciens*. Jilin 47, Jilin 35 and Suinong 10 were screened out as sensitive genotypes. Jilin 47 was chosen as the genotype for optimization of soybean cotyledonary genetic transformation due to its good performance on shoot regeneration. Amending thiol compounds in liquid and solid co-cultivation medium could decrease the browning rate of explants and the best combination of $400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ L-Cys, $248\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium thiosulfate and $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT were obtained through orthogonal test. The highest elongation rate was got when $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{GA}_3$ and $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{IAA}$ were added to shoot elongation medium.

Key words: Jilin 47; Cotyledonary-node; Browning; Shoot elongation

大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.] 是重要的食用油、食用蛋白和饲用蛋白原料,利用转基因技术对大豆品质调控的关键基因进行定向操作,可加速优质大豆品种的选育进程,培育出适应不同需求的多样化大豆品种,对提高大豆营养价值、保证大豆食品安全、增进居民健康有重要意义^[1]。

大豆遗传转化的常用受体系统有胚轴、未成熟子叶、子叶节、胚尖、胚性悬浮培养物和原生质体等,农杆菌在侵染受体时,会对受体造成伤害,而当以子叶节作为受体时,所受伤害最小,易于得到转化体,转化率也较高,因此应用较为广泛^[2]。但是子叶节受体也存在诸多难点,如对农杆菌敏感大豆基因型较少,创口褐化影响 T-DNA 转移效率,不定芽伸长率较低导致成苗率低等。相关学者对大豆遗传转化体系的优化方面进行了很多研究,闫帆

等^[3]对平安8等4种大豆基因型的胚尖进行 *GUS* 染色,发现吉林35和吉林47对农杆菌敏感性较高,可以作为遗传转化的良好受体材料。Olhoft 等^[4]研究了添加巯基化合物对 Williams 82 褐化率的影响,结果在共培养培养基中添加 L-cys 将 T-DNA 转移效率由 37% 提高到 91%。侵染后外植体的丛生芽伸长率过低一直是一个难点,李文霞等^[5]利用正交试验确定影响再生系统丛生芽伸长的因素及水平,确定芽伸长培养基中添加 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{Glu}$ 、 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{GA}_3$ 、 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ZT}$ 时可获得最佳效果。现使用携带 pCAMBIA1301 质粒(含 *GUS* 基因)的农杆菌 EHA105 对 10 个大豆基因型进行侵染并进行 *GUS* 染色,初步筛选出对农杆菌较敏感的基因型,之后研究了添加巯基化合物对褐化率的影响并对芽伸长阶段的关键激素浓度进行了研究,以期为提高大

收稿日期:2012-12-16

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08004-003);国家自然科学基金(30971808);“十二五”农村领域国家科技计划(2011BAD35B06-2);吉林大豆产业技术体系。

第一作者简介:孙昕(1988-),女,在读硕士,主要从事作物分子育种研究。E-mail: clytzein@163.com。

通讯作者:王庆钰(1963-),女,教授,博士生导师,主要从事植物种质资源与利用研究。E-mail: wqy414cn@yahoo.com.cn。

王英(1976-),女,博士,讲师,主要从事大豆分子育种研究。

豆遗传转化成苗率及转化率奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 美国扁茎、吉大豆2号、吉林32、吉林35、吉林47、绥农10号、绥农14、合丰43、平安8和东农42,由吉林大学植物科学学院植物种质资源与利用研究室提供。

1.1.2 培养基 萌发培养基: B_5 大量元素 + B_5 微量元素 + B_5 有机、 $0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MES、3%蔗糖、0.8%琼脂粉, pH5.7。

重悬液: $1/10B_5$ 大量元素 + B_5 微量元素 + B_5 有机、 $3.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MES、3%蔗糖、 $248 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫代硫酸钠、 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 二硫苏糖醇(DTT)、 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ L-半胱氨酸盐酸盐(L-Cys)、附加 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮(AS)、 $1.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA, pH5.4。

共培养培养基: $1/10B_5$ 大量元素 + B_5 微量元素 + B_5 有机、 $3.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MES、3%蔗糖、0.8%琼脂粉、 $248 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫代硫酸钠、 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 二硫苏糖醇(DTT)、 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ L-半胱氨酸盐酸盐(L-Cys), pH5.4。

芽诱导培养基: B_5 大量元素 + B_5 微量元素 + B_5 有机、 $0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MES、3%蔗糖、0.8%琼脂粉、附加 $1.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA、 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cef、 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ basta, pH5.7。

芽伸长培养基: MS大量元素 + MS微量元素 + B_5 有机、 $0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MES、3%蔗糖、0.8%琼脂粉、附加 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cef、 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ZT、 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Asn 及 Gln、不同浓度 IAA 和 GA_3 、 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ basta, pH5.7。

1.2 方法

1.2.1 种子的消毒及外植体的获得 挑选颗粒饱满,表面无病斑、褶皱及伤口的大豆种子,置于通风橱内的密闭干燥器中,在干燥器中放置1个100 mL烧杯,加入52 mL蒸馏水、44 mL次氯酸钠和4 mL浓盐酸,混合反应12 h,然后接入萌发培养基(GM)中培养5~6 d。

将在萌发培养基中萌发5~6 d的大豆种子,去掉种皮,保留3~5 mm下胚轴,纵切分离2片子叶,去掉原叶并在子叶节处划出长约5 mm的划痕5~7刀,获得大豆子叶节外植体。

1.2.2 菌液的制备及侵染 试验所用的工程菌为含双元载体质粒 pCambia1301 的农杆菌 EHA105,含有 CaMV35S 启动的转 β -葡萄糖醛酸酶(*GUS*)基因和 CaMV35S 启动的草甘膦(basta)抗性基因,由本

实验室构建。

挑菌在含抗生素的 YEP 平板上划线,28℃培养箱中培养2 d。接种单克隆菌落到5 mL含抗生素 rif + k 的 YEP 培养基中,在28℃振荡培养箱中 $170 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养24 h。将2 mL培养物转移到200 mL含抗生素的 YEP 中,28℃ $170 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下培养物生长约8 h至对数培养期($OD_{600} = 0.6 \sim 0.8$ for EHA105)。在50 mL离心管中加入40 mL菌液, $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 室温下离心15 min,用40 mL重悬培养基重悬菌体至 $OD_{600} = 0.5 \sim 0.6$ 备用。

将制备好的大豆子叶节外植体置于含菌体的重悬液中,然后置于真空泵中处理15 min,之后取出晾干,平铺在事先铺好一层滤纸的共培养培养基中,在22℃16 h光照+8 h黑暗光照培养箱中培养5 d。

1.2.3 子叶节的 *GUS* 染色 将携带 pCAMBIA1301 质粒(含 *GUS* 基因)的农杆菌 EHA105 侵染10个基因型大豆子叶节,共培养5 d后,按照 Jefferson 等^[6]的方法进行 *GUS* 组织化学染色,将各品种未侵染和侵染的大豆子叶节加入 *GUS* 染色液($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钠缓冲液 pH7.0、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ X-Gluc、0.1% Triton X-100、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 巯基乙醇),放置于37℃烘箱中染色7~12 h,之后用75%乙醇脱色,直至底色完全消失,观察染色结果。

1.2.4 共培养阶段影响褐化率因素的研究 对1.2.3中 *GUS* 染色筛选得到对农杆菌敏感的基因型吉林47进行侵染和共培养,在侵染及共培养阶段加入的能抑制褐化的3种巯基化合物 L-半胱氨酸(A)、硫代硫酸钠(B)和 DTT(C)进行 L_93^4 正交试验^[7],共9个处理,每个处理30个外植体,重复3次。因素水平见表1。共培养5 d后,统计褐化率。其中,褐化率 I = 子叶部分50%以下面积出现褐化且子叶节部分轻微褐化外植体数/总外植体数;褐化率 II = 子叶部分50%以上面积出现褐化且子叶节部分严重褐化外植体数/总外植体数;总褐化率 III = 褐化率 I + 褐化率 II。

表1 因素水平表

Table 1 Level and factors ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

水平 Level	A	B	C	D
1	0	0	0	-
2	200	124	150	-
3	400	248	300	-

1.2.5 芽伸长阶段激素 GA_3 及 IAA 浓度的确定 在芽伸长阶段添加不同浓度关键激素 GA_3 及 IAA 进行最适浓度的确定,共6个处理,每个处理30个

外植体,重复 3 次,42 d 后统计不同处理的不定芽伸长率。激素配比见表 2。

不定芽伸长率(%) = 出芽外植体数(芽高 ≥ 3 cm)/芽伸长总外植体数

表 2 芽伸长阶段 GA₃及 IAA 浓度
Table 2 Concentration of GA₃ and IAA
in the period of shoot elongation (mg·L⁻¹)

项目 Item	1	2	3	4	5	6
GA ₃	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5
IAA	0.1	0.1	0.1	0.5	0.5	0.5

1.3 数据分析

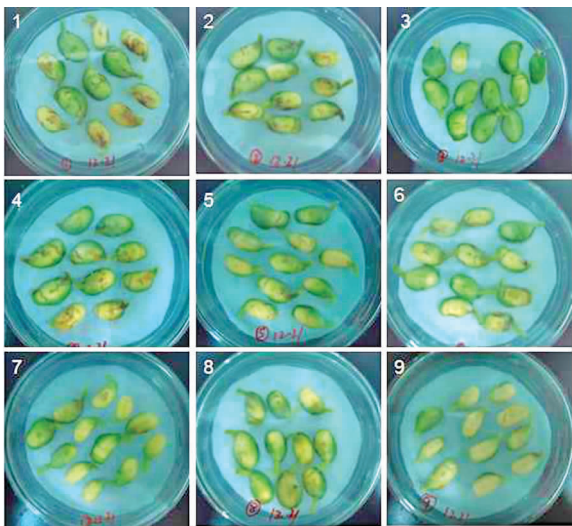
用 SPSS16.0 进行不定芽伸长率的方差分析和 LSD 法显著性检验。



A: 未转化组;B 转化组;1~10 分别为美国扁茎、吉大豆 2 号、吉林 35、吉林 32、吉林 47、绥农 10 号、绥农 14、合丰 43、平安 8、东农 42。
A: Non-transformed group; B: Transformed group; 1-10: Meiguobianjing, Jidadou 2, Jilin 35, Jilin 32, Jilin 47, Suinong 10, Suinong 14, Hefeng 43, Ping'an 8, Dongnong 42, respectively.

图 1 不同基因型大豆子叶节的 GUS 染色结果

Fig. 1 Assays for GUS activity in cotyledonary-node of different genotypes



1~9 代表处理号。
The number 1-9 represents different experimental treatment.

图 2 褐化率正交试验的结果

Fig. 2 The effect of L-Cys, sodium thiosulfate and DTT on browning rate

2.2 共培养阶段褐化率的抑制

从图 2 可看出,不同的巯基化合物组合对于外植体的褐化具有不同的抑制效果,通过进一步方差

2 结果与分析

2.1 不同基因型大豆子叶节对农杆菌的敏感性

对 10 个基因型大豆子叶节共培养 5 d 后进行 GUS 组织化学染色,观察瞬时表达结果。由于不定芽发生处为子叶节区的居间分生组织,故认为该处染色为有效染色。结果表明(图 1),不同大豆基因型对于农杆菌的敏感性具有差异。吉林 35、吉林 47 和绥农 10 号在子叶节区分生组织处表达效果最好,合丰 43、平安 8 和东农 42 次之,美国扁茎、吉大豆 2 号、吉林 32 和绥农 14 表达效果较差。因吉林 47 丛生芽再生率较高^[8],且对农杆菌敏感性好,故选择该基因型作为理想转化受体。

分析发现(表 3),不同水平半胱氨酸对褐化率Ⅱ有显著影响,对总褐化率Ⅲ有极显著影响,不同水平硫代硫酸钠及 DTT 对总褐化率Ⅲ具有显著影响。从不同因素来看,影响总褐化率Ⅲ的 F 值表现为 A>C>B,且 A₃、B₃、C₃的褐化率低于同因素其他 2 个水平,因此选择最佳组合 A₃B₃C₃。即选择在共培养及重悬阶段加入 400 mg·L⁻¹ L-Cys、248 mg·L⁻¹ 硫代硫酸钠、300 mg·L⁻¹ DTT 可以得到最低的褐化率。

表 3 褐化率影响因素的方差分析
Table 3 Variance analysis for factors affecting browning rate

变异来源 Variance source	F 值 F value		
	I	II	III
A	1.953	5.162 *	8.867 **
B	1.586	1.217	4.098 *
C	0.681	3.318	4.167 *
D	-	-	-

* 和 ** 分别表示在 0.05 和 0.01 水平上差异显著。
* and ** mean significant difference at 0.05 and 0.01 level, respectively.

2.3 芽伸长阶段激素 GA₃及 IAA 浓度的确定

以吉林 47 为材料,研究芽伸长阶段的关键激素

GA₃及 IAA 对不定芽伸长率的影响。经方差分析发现不同处理的不定芽伸长率具有显著差异 (Sig. = 0.035), 其中处理 5 不定芽伸长率最高, 处理 4 和处理 1 次之, 三者间无显著差异, 处理 5 与处理 3 和处理 6 之间有显著差异。综合考虑, 选择芽伸长阶段加入 1.0 mg·L⁻¹GA₃、0.5 mg·L⁻¹IAA 为最佳配比。

表 4 不同浓度 GA₃、IAA 对不定芽伸长率的影响

Table 4 Effect of different concentration of GA₃ and IAA on rate of shoot elongation

处理 Treatment	GA ₃ 浓度 The concentration of GA ₃ /mg·L ⁻¹	IAA 浓度 The concentration of IAA/mg·L ⁻¹	不定芽伸长率 The rate of shoot elongation/%
1	0.5	0.1	12.68 ab
2	1.0	0.1	10.01 b
3	1.5	0.1	5.95 b
4	0.5	0.5	14.63 ab
5	1.0	0.5	18.72 a
6	1.5	0.5	7.95 b

小写字母代表 5% 显著性水平。

Lowercase letters mean significant difference at 5%.

3 结论与讨论

不同大豆基因型的外植体对农杆菌的敏感性不同^[9], 选择再生能力强且对农杆菌敏感性较强的基因型是建立良好大豆遗传转化体系的基础。由于在大多数高等植物中都检测不到 β-葡糖醛酸酶 (GUS) 基因活性, 且 GUS 的组织化学染色简便易行, 因此常使用 GUS 基因作为指标基因在受体组织中表达的外源基因^[10]。本试验以携带 pCAM-BIA1301 质粒 (含 GUS 基因) 的农杆菌 EHA105 对 10 个性状优良的大豆基因型其进行侵染和 GUS 组织化学染色, 结果表明, 吉林 35、吉林 47 和绥农 10 号在子叶节区居间分生组织部位着色情况较好, 这与闫帆等^[3]的试验结果较为一致, 又因吉林 47 不定芽再生率较高, 故选择其作为大豆遗传转化的理想受体。

植物体在遇到外源病原体侵害时, 会启动自身免疫防御机制, 在 PPOs 和 PODs 的作用下通过酚氧化引起单宁类物质的积累和植物抗菌素的释放, 从而在创口处形成保护层并导致褐化^[11]。保护层会阻挡农杆菌中 T-DNA 向植物体中的转移, 加入巯基化合物会抑制 PPOs 和 PODs 的活性并降低褐化率, 从而提高 T-DNA 转移效率。本研究中, 在共培养及侵染培养基中加入不同浓度的 L-Cys、硫代硫酸钠及 DTT, 通过正交试验发现不同浓度组合大豆子叶节外植体褐化程度不同, 经统计分析得到对褐化率影响大小依次为 L-Cys、DTT 和硫代硫酸钠, 并确定添加 400 mg·L⁻¹ L-Cys、248 mg·L⁻¹ 硫代硫酸钠和

300 mg·L⁻¹ DTT 对褐化的抑制效果最好。

GA₃及 IAA 都是调节植物体生长的重要植物激素, 低浓度有利于芽的伸长, 但丛生芽诱导率低; 高浓度可提高丛生芽诱导率, 但诱导的芽数量过多, 芽生长的慢, 时间久会黄化脱落。且二者之间的比例也对芽伸长及后期根的生长有一定影响。本试验得到芽伸长阶段的 GA₃及 IAA 的最佳浓度配比为添加 1.0 mg·L⁻¹ GA₃及 0.5 mg·L⁻¹ IAA。

参考文献

- [1] 程浩, 金杭霞, 盖钧镒, 等. 转基因技术与大豆品质改良[J]. 遗传, 2011, 33(5): 431-436. (Cheng H, Jin H X, Gai J Y, et al. Transgenic technology and soybean quality improvement[J]. Hereditas, 2011, 33(5): 431-436.)
- [2] 李文霞, 宁海龙, 李文滨. 大豆遗传转化系统的研究进展[J]. 中国农学通报, 2005, 21(12): 67-71. (Li W X, Ning H L, Li W B. Research on progress of transgenic system of soybean[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(12): 67-71.)
- [3] 闫帆, 孙昕, 翟莹, 等. 大豆品种吉林 35 胚尖再生体系的建立及对农杆菌的敏感性[J]. 中国油料作物学报, 2012, 34(1): 92-95. (Yan F, Sun X, Zhai Y, et al. Establishment of an embryonic tip regeneration system of Jilin35 soybean and susceptibility to *Agrobacterium-tumefaciens* [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2012, 34(1): 92-95.)
- [4] Olhoft P M, Somers D A. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells[J]. Plant Cell Reports, 2001, 20: 731-737.
- [5] 李文霞, 李文滨, 吕文河, 等. 农杆菌介导大豆子叶节系统的两个问题突破[J]. 大豆科学, 2008, 27(2): 173-175, 180. (Li W X, Li W B, Lyu W H, et al. Breakthrough of two questions on the *Agrobacterium*-mediated soybean cotyledonary node systems[J]. Soybean Science, 2008, 27(2): 173-175, 180.)
- [6] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1987, 5(4): 387-405.
- [7] 夏传涛, 袁秉祥. 无空列正交试验的设计及 SPSS 软件的数据处理[J]. 数理医药学杂志, 2006, 19(1): 91-92. (Xia C T, Yuan B X. No empty columns orthogonal experiment design and data processing of SPSS[J]. Journal of Mathematical Medicine, 2006, 19(1): 91-92.)
- [8] 孙昕, 闫帆, 赵健如, 等. 大豆子叶节丛生芽诱导的研究[J]. 大豆科学, 2012, 31(2): 181-185. (Sun X, Yan F, Zhao J R, et al. Induction of multiple shoots from soybean cotyledonary node[J]. Soybean Science, 2012, 31(2): 181-185.)
- [9] Hinchey M A W, Connor-Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer[J]. Bio/Technology, 1988, 6: 915-922.
- [10] Jefferson R A, TKavanagh T A, Bevan W A. β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. The EMBO Journal, 1987, 6: 3901-3907.
- [11] Olhoft P M, Lin K, Galbraith J. The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells[J]. Plant Cell Reports, 2001, 20: 731-737.