

# 农杆菌介导的大豆体细胞胚遗传转化系统的优化研究<sup>\*</sup>

王晓春<sup>1, 2, 3</sup> 刘尚前<sup>3</sup> 季 静<sup>1, 2</sup> 王 罡<sup>\* 1, 2</sup> 王 萍<sup>2</sup> 王军军<sup>4</sup>

(1. 天津大学农业与生物工程学院, 天津; 2. 中国人民解放军军需大学, 长春 100062;  
3. 河北北方学院南校区农业科学系, 宣化 075131; 4. 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

**摘要** 以大豆球形期体细胞胚为外植体, 以抗性体细胞胚筛选率为指标, 对影响农杆菌介导的大豆体细胞胚遗传转化频率的因子进行了优化。结果表明, 菌液浓度以  $OD_{600}=0.5-0.7$ 、AS 浓度为  $50-100\mu\text{mol/L}$ 、侵染时间 10 分钟、共培养时间 2—3 天, 有利于提高转化率。

**关键词** 大豆; 体细胞胚; 遗传转化

中图分类号 S 565.103.53 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2004)03-0200-05

大豆是世界上重要的油料作物, 也是植物蛋白的主要来源, 随着生物技术的发展, 大豆的遗传转化也取得了一定的进展。在各种遗传转化方法中, 农杆菌是自然界存在的天然基因工程载体, 具有操作简单、经济、能够准确、完整地将 T-DNA 转入受体基因组中, 可插入外源基因, 片段大、不易发生重排、拷贝数低、被转基因遗传较稳定等优点已经被许多植物转基因研究应用, 它是大豆遗传转化的首选方法。长期以来, 由于大豆对农杆菌不敏感, 使农杆菌介导的大豆遗传转化频率低, 实验结果重复性差, 致使对影响转化频率的因子的系统优化难以进行。体细胞胚多数来源于单细胞起源, 转基因植株嵌合体少, 胚的结构完整, 成苗快, 数量多, 重复性好, 转化功能细胞多, 即处于转化感受态的细胞数量多, 因此是基因转化的良好受体。

本文用带有双价抗虫基因(Bt 基因和 CptI 基因)的根癌农杆菌, 以大豆的球形期体细胞胚为受体进行遗传转化, 对影响农杆菌转化的因素(侵染时间, 共培养时间, AS 浓度,  $OD_{600}$  值), 等进行了研究, 优化农杆菌介导的大豆体细胞胚遗传转化体系, 以期获得抗虫转基因植株, 为大豆的遗传转化提供实验依据和理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

受体材料: 军需大学植物基因工程中心提供的大豆东农 L13 球形期体细胞胚团块。

质粒和菌株: 质粒为双元载体 pGB1121S4ABC, 由中国农业科学院生物技术研究中心郭三堆实验室构建和提供, 含有 Bt 基因、CpTI 基因、NPT II 基因、Gus 基因, 启动子分别为 35S、35S、NOS 和 35S。实验所用农杆菌菌株为 LBA4404 带有卡那霉素筛选标记, 由郭三堆提供。

植物组织培养培养基以及培养条件:

继代培养基 MS+15mg/L)-20mg/L 2, 4-D+0.8%琼脂+3%蔗糖 pH=5.8 自然光

重悬培养基 继代培养基(液体)+AS(0-100 $\mu\text{mol/L}$ ) pH=5.8 自然光

共培养基培养基 感染培养基+AS(0-100 $\mu\text{mol/L}$ ) pH=5.6

脱菌筛选培养基 继代培养基+(50-300mg/L)头孢霉素+25-50mg/L 卡那霉素

萌发培养基 1: MS+1%活性炭+0.8%琼脂+10%蔗糖 光照 16h/d

萌发培养基 2: MS+0.8%琼脂+10%蔗糖 光照 16h/d

壮苗培养基 MSB+0.8%琼脂+3%葡萄糖 pH=7 光照 16h/d

(最后三种培养基同时加入卡那霉素 0-50mg/

\* 收稿日期: 2004-04-14

基金项目: 本研究由“国家植物转基因技术研究开发与中试基地建设”专项课题(J99-B-001)资助

\*\* 通讯作者: 王罡, 教授, 博士生导师。wgt12003@yahoo.com.cn

作者简介: 王晓春(1972-), 女, 讲师, 硕士, 主要从事作物栽培与遗传育种工作与研究。0313-2111778 或 13180579055

L 和头孢霉素(0—300mg/L)

工程菌培养基: 工程菌 LBA4404 的培养基用 YEP 培养基, 大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 含有质粒 pG-BI121S4ABC, 用 LB 培养基培养。

1.2 方法

1.2.1 工程菌液制备

在超净工作台上, 从 YEP 培养平板上挑取单菌落接种于 YEP 培养液中(含 50mg/L 卡那霉素, 50mg/L 利福平, 25mg/L 链霉素), 于 28℃、180rpm 振荡培养过夜(约 24~36h)。当菌液逐步浑浊时, 随时取样测定其 OD<sub>600</sub>值, 然后在 4℃、3500 转/分, 10 分钟离心搜集菌体, 重悬于重悬培养基备用。

1.2.2 农杆菌侵染转化以及植株再生

大豆的体细胞胚团块直径 3mm 左右, 侵入预备好的农杆菌感染液中侵染, 然后倒掉菌液, 用无菌滤纸吸干后接种到共培养培养基上, 再接种到含有卡那霉素 50 mg/L、头孢霉素浓度 300 mg/L (根据情况依次降低, 以不长菌为宜)的脱菌筛选培养基上。因素与水平: 4 个因素各设 5 个水平, 侵染时间(min): 3、5、10、15、20; 共培养时间(d): 1、2、3、4、5;

AS 浓度( $\mu$ mol/L): 0、50、100、200、400; OD<sub>600</sub>值: 0.3、0.5、0.7、0.9、1.1。上述每个处理取 40 块进行侵染转化, 每隔 15—20 天继代一次, 3 个月内调查产生的抗性体细胞胚团块数(直径 3mm 左右), 计算转化率(抗性体细胞胚块数/接种的体细胞胚块 $\times$ 100), 然后抗性体细胞胚块转入萌发培养基 1 中。萌发 20 天以后, 再转入萌发培养基 2 中。直到长成再生抗性小植株, 再转入壮苗培养基得到转化植株。

以上数据处理及分析均采用 SPSS 软件。

2 结果与分析

2.1 质粒 DNA 的检测

从根癌农杆菌中提取质粒 pGBI121S4ABC DNA 琼脂糖电泳, 可以看到 17.5Kb 左右的条带。质粒用 Hind III 酶切、电泳见图 1、2。可以看出, LBA4404(泳道 1)所含质粒被切成 12.8Kb 和 4.7 Kb 的两个片段, 与原来保存在大肠杆菌中的质粒 pGBI121S4ABC 被酶切的谱带(泳道 2)完全一样, 说明质粒存在于根癌农杆菌中, 可用于转化。

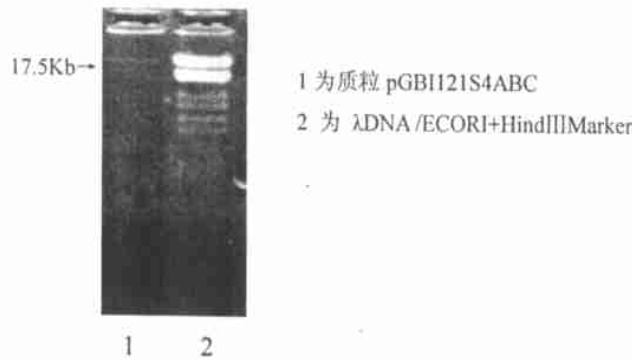


图 1 质粒 pGBI121S4ABC 电泳图  
Fig. 1 Figure of plasmid inculude in LBA4404

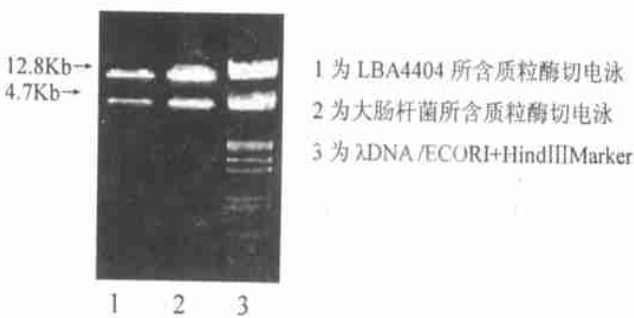


图 2 LBA4404 所含质粒酶切图  
Fig. 2 Figure plasmid include in lba4404digetid with restriction enzyme

2.2 影响农杆菌介导的大豆体细胞胚遗传转化频率的因子的优化

以抗性体细胞胚的转化率作为指标, 几个因素(侵染时间; 共培养时间; AS 浓度; OD<sub>600</sub>值;)对大豆体细胞胚转化率的影响结果不同。

2.2.1 感染时间和共培养时间对体细胞胚转化率的影响

以大豆东农 L13 的体细胞胚为外植体, (直径 3mm 左右), 用含有质粒 pGBI121S4ABC 的农杆菌 LBA4404 以不同的感染时间和共培养时间进行转化, 3 个月以后, 用产生抗性体细胞胚团块(直径

3mm 左右)占总接种块数的百分率代表转化频率, 结果见表 1。实验观察到, 随着侵染时间的延长, 共培养时间越长, 则抑菌很难。农杆菌感染时间和共培养时间均对大豆的转化率有明显的影响, 方差分析(见表 2)达极显著水平。二者之间存在交互作用, 随着侵染时间的延长, 共培养适宜时间有相对缩短的趋势。多重比较(见表 3; 表 4。结果表明侵染时间以 10 分钟, 共培养时间以 2—3 天最好, 转化率最高。

2.2.2 乙酰丁香酮和农杆菌浓度对转化率的影响

用农杆菌侵染基因型东农 L13 的体细胞胚块, 3

表 1 感染时间和共培养时间对体细胞胚转化率的影响

Table 1 The effect on transformation frequency about infection and cocultive time					
感染时间 Infect time	共培养时间 Cocultive time				
	1 天	2 天	3 天	4 天	5 天
3 分钟	11.0	14.6	20.3	22.5	17.0
5 分钟	13.2	20.5	22.7	16.8	10.0
10 分钟	16.8	26.8	30.0	21.9	13.7
15 分钟	17.1	23.2	27.0	17.0	10.0
20 分钟	12.5	20.0	18.0	12.0	6.8

表 2 感染时间和共增减时间对体细胞胚转化率的影响

Table 2 The effect on transformation frequency frequency cocultive time					
变异来源 Variant source	SS	df	MS	F	F <sub>0.05</sub>
共培养时间	173.65	4	43.41	4.15	3.01
侵染时间	485.97	4	121.49	11.61	3.10
误差	167.46	16	10.47		
总计	827.08	24			

表 3 共培养时间转化率比较 (Duncan 法)

Table. 3 The effect on transformation frequency cocultive time		
共培养时间 Cocultive time	平均转化率 Transformation frequency (%)	差异显著性 (0.05)
5 天	11.50	a
1 天	14.12	ab
4 天	18.04	bc
2 天	21.02	cd
3 天	23.60	d

个月以后,用产生抗性体细胞胚块占接种块数的百分率表示转化频率,实验结果见表 5。方差异分析(见表 5)。结果表明乙酰丁香酮和农杆菌浓度对转

表 4 感染时间转化率比较 (Duncan 法)

Table 4 The effect on transformation frequency infecrion time		
感染时间 Infected time	平均转化率 Transformation frequency (%)	差异显著性 (0.05)
20 分钟	13.86	a
5 分钟	16.64	ab
3 分钟	17.08	ab
15 分钟	18.86	bc
10 分钟	21.84	c

表 5 乙酰丁香酮和农杆菌浓度对转化率的影响

Table 5 The effect on transformation frequency about As and on Agrobactium centrition					
AS 浓度 AS centrition (μmol/L)	农杆菌浓度(OD <sub>600</sub> 值) Agrobactium cenrtition				
	0.3	0.5	0.7	0.9	1.1
0	16.8	22.9	20.2	16.4	11.8
50	22.2	28.7	27.0	18.9	14.9
100	24.7	25.0	30.2	22.0	16.7
200	22.0	24.8	23.5	20.2	15.2
400	11.8	20.0	14.3	14.3	8.3

表 6 乙酰丁香酮和农杆菌浓度对转化率的影响方差分析

Table 6 The effect on transformation frequency about As and Agrobactium centrition (analysis of variance)				
来源 Source	SS	df	MS	F
Model	10408.87	9	1156.54	328.88
AS 浓度	325.25	4	81.31	23.12
OD <sub>600</sub> 值	369.55	4	92.39	26.27
误差	56.27	16	3.52	
总计	10465	25		

表 7 AS 浓度对转化率的影响 (Duncan 法)

Table 7 The effect on transformation frequenece		
AS 浓度 AS centrition (μmol/L)	平均转化率 Transformation frequency (%)	差异显著性 (0.05)
400	13.74	a
0	17.62	b
200	21.25	c
50	22.34	c
100	23.72	c

表 8 农杆菌浓度对转化率的影响 (Duncan 法)

Table 8 The effect on transformation frequency of Agrobactium centrition		
OD <sub>600</sub>	平均转化率 Transformation frequency (%)	差异显著性 (0.05)
1.1	13.38	a
0.9	18.36	b
0.3	19.50	b
0.7	23.04	c
0.5	24.28	c

化率有明显影响。差异达到显著水平,多重比较(见表 6 和 7),可以看出,农杆菌浓度以 OD<sub>600</sub>=0.5—0.7 为宜。OD<sub>600</sub>小于 0.5,不易侵染菌,或 OD<sub>600</sub>大

于 0.7, 则抑菌困难, 二者均使转化率下降。乙酰丁香酮 50—100 $\mu$ mol/L 均能够显著提高转化率。但是乙酰丁香酮浓度过高反而降低转化率。最佳乙酰丁香酮浓度为 100 $\mu$ mol/L。

### 3 讨论

在农杆菌介导转化过程中, 影响转化的因子许多, 如基因型、培养条件、农杆菌菌株类型、感受态、再生率等等。为了提高转化效率, 本实验对大豆体细胞胚转化条件进行了比较系统的研究, 确定了影响大豆体细胞胚转化率的几种因素。结果表明, 以抗性体细胞胚做转化频率的指标可能偏高。原因是得到的抗性体细胞胚形态不一, 正常的体细胞胚能够萌发, 成为抗性植株, 而不正常的体细胞胚不能够萌发或萌发率低, 不能或很少形成抗性植株; 另外, 实验中还由于污染等原因, 致使形成的抗性植株数目减少, 致使转化率降低; 此外, 细胞的损伤也是转化率降低的一个重要因素。本实验以筛选 2 个月的抗性体细胞胚的诱导率作为衡量转化率的标准, 而进行目的基因转化时, 则以得到转基因植株为目的。所以, 以抗性体细胞胚作为转化频率的指标会带来一定的误差。上述这些影响农杆菌转化的因素是分别考察的, 但是几种因素最优化条件的组合是否是转化的最好条件, 有待于进一步研究。

以抗性体细胞胚做为转化频率的指标, 尽管本实验对各个因子进行了优化, 但是大豆的转化率仍然很低, 原因可能是本实验所用的材料是继代 5—8 次的, 可能与体细胞胚的感受状态及其分化能力下降有关。而采用新诱导出的体细胞胚作为转基因的受体, 可能有利于提高转化率。继代次数越多, 细胞是否会发生变异, 以及是否影响再生率和转化率和有待于进一步研究。

本实验中大豆的转化率低, 也可能是本实验一直采用由高到低的方式进行筛选, 而抗生素对大豆细胞的生长有抑制作用, 抗生素的筛选方式是采用由低到高的方式还是由高到低的方式或者萌发以后去掉有利于转化, 有待于进一步研究。在转化中我们发现, 大豆体细胞胚受到农杆菌浸染之后, 褐化现象严重, 而且抑菌困难, 转化率低, 可能是由于大豆体细胞胚采用农杆菌法转化本身转化率低。用大豆

体细胞胚作为转基因的受体, 采用基因枪法或其他转化方法可能有利于提高转化率。

本实验只选用了一种基因型, 而不同基因型大豆对农杆菌的敏感性不同, 致使不同基因型大豆的转化率也应该不同。在大豆遗传转化中基因型也是值得注意的因子。

在实验中发现转化植株的获得至少需要 6 个月以上的时间, 而组织培养获得的再生植株只需要 3 个月的时间; 转化植株生长速度远远落后于组织培养再生植株。要提高稳定转化频率, 一方面要改进组织培养系统; 另一方面可考虑增加一些处理因素。

### 参考文献

- 1 Hinchey Maw, DVConner—Ward, Ca Newell, et al Production of transgenic soybean Plants using Agrobacterium — mediated DNA transfer[ J ]. BIO/TECHNOL. 1988, 6(91): 2—5
- 2 McCabe DE, WFSwain, BJ MartineLL. Stable transformation of soybean ( *Glycine max* ) by Particle acceleration[ J ]. BIO/TECHNOL . 1988, 6(92): 3—6
- 3 Christianson ML, DA Wamick, PS Carlson . A morpho — Genetically competent soybean suspension culture[ J ]. Science 1983 , 222 (2): 632—634
- 4 Sato S, C Newell, K Kolacz, et al. Stable transformation via Particle bombardment in two different soybean regeneration systems[ J ]. Plant Cell Rep. 1993, 12: 408—413
- 5 周思军, 李稀臣, 刘昭军, 等. 大豆农杆菌介导转化系统的优化研究[ J ]. 东北农业大学学报, 2001, 32(4): 313—319
- 6 刘艳芝, 刘莉, 李俊波, 等. 浅析大豆组培系统与基因转化受体系统[ J ]. 吉林农业科学, 2000, 25(6)12—14
- 7 周思军, 李稀臣, 刘昭军, 等. 通过农杆菌介导法将 Bt (Cry IA) 基因导入大豆[ J ]. 大豆科学, 2001, 20(3): 157—162
- 8 徐香玲, 高晶, 刘伟华, 等. Ti 质粒介导 B、t、k—d 内毒蛋白基因转化大豆的初步研究[ J ]. 大豆科学, 1997, 16(1): 6—11
- 9 赵桂兰, 刘艳芝, 李俊波, 等. 影响农杆菌介导的大豆基因转化因素的研究[ J ]. 大豆科学, 2001, 20(2): 84—88
- 10 周思军. 大豆遗传转化的主要障碍及研究进展[ J ]. 黑龙江农业科学, 2001, (3): 24—27
- 11 王景雪, 孙毅. 农杆菌介导的植物基因转化研究进展[ J ]. 生物技术通报 1999 1: 7—13
- 12 张根义. 植物细胞感受态研究初探[ J ]. 农业生物技术学报, 1997, 5(1): 101—102
- 13 王 罡, 季静, 王萍, 等. 大豆基因型对根癌农杆菌菌株敏感性的研究[ J ]. 遗传, 2002, 24(2): 297—300
- 14 吴颖, 王萍, 王军军, 等. 农杆菌介导法进行大豆转基因的培养基研究[ J ]. 农业生物技术学报, 2002, 10(3): 20—21

## OPTIMIZATION OF GENETIC TRANSFORMATION SYSTEM IN SOMATIC EMBRYOS OF SOYBEAN MEDIATED BY *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Wang Xiaochun<sup>1, 2, 3</sup> Liu Shangqian<sup>3</sup> Ji Jing<sup>1, 2</sup> Wang Gang<sup>1, 2</sup> Wang Ping<sup>2</sup>

(1. *Tianjin University of Agricultural and Biological Engineering, Tian jin*;  
2. *Changchun University of Agricultural and Animal Sciences, Changchun 130062*;  
3. *Department of Agronomy, HeBei North University, Xuanhua 075131*)

**Abstract** The factors influencing genetic transformation about somatic embryos of soybean had been studied. Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. The suitable condition was determined as followed: injured treatment of somatic embryos of soybean, the bacterial concentration reached 0.5—0.7 (OD<sub>600</sub>), 10 minutes infection time, 50—100  $\mu$ mol/L AS. The transformation frequency increased in those condition.

**Key words** Soybean; Somatic embryos; Genetic transformation

## 《中国农业市场》报

《中国农业市场》报由全国农业院校校办产业协会、全国农业高新技术成果产品交流交易中心、《中国技术市场报》社共同创办。本报具有专业性强、信息量大、内容新颖、广告效果好、更具市场性等特点,是我国第一张面向农业市场的报纸。

2004 年开始,本报增至八版,增印彩版,订价不变,并免费给订户刊登供求信息 3 条(总共不超过 50 字)和 150 字以内的名片一个。本报每月一期,中旬出报,订阅本报请直接与编辑部联系,每份 1.50 元,全年订价 18.00 元(含邮资),可随时订阅。

## 《农村大市场》杂志

免费刊登 1/4 版广告 1 次

新版《农村大市场》由全国农业高新技术成果产品交流交易中心参与主办,仍将遵循“培育农村市场,发展农村经济”的宗旨,更加注重农业新技术、新产品、新品种的宣传报道,内容丰富、信息及时、技术性强、实用性好,是我国第一份面向广大农村市场的交流性刊物。

本刊为国际大十六开,52 页,每月 1 日出版,订价 5.00 元/本,全年 60 元(含邮资),可随时订阅,请直接与编辑部联系。

本刊设有政策要论、市场纵横、经营之道、良种园地、作物栽培、植物保护、水肥土壤、农机平台、养殖天地、人物扫描、农村百科等 20 多个栏目。

地址:(100094)北京·圆明园西路 2 号中国农业大学《中国农业市场》编辑部

电话:010—62891388

传真:010—62819231