

利用农杆菌介导将抗逆相关基因 *GmDREB* 导入大豆的研究

王 萍¹, 高世庆², 郭永来³, 程宪国⁴, 王 罡⁵, 马有志², 季 静⁵

(¹淮海工学院海洋学院, 江苏连云港 222005; ²中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; ³长春龙洋大豆生物蛋白股份有限公司, 吉林长春 130041; ⁴中国农业科学院资源与农业区划研究所, 北京 100081; ⁵天津大学农业与生物工程学院, 天津 300072)

摘 要:转基因技术用于作物改良是分子育种技术的重要内容之一, 分子育种技术与传统育种技术相结合方法来改良大豆品种的性状已展现出良好的应用前景。以大豆未成熟子叶为外植体, 研究了 5 个基因型体细胞胚发生率以及未成熟子叶对 PPT 的基础抗性。用农杆菌介导法将含有 *GmDREB* 基因的 *prdGm-200* 质粒转化大豆未成熟子叶, 并探讨了影响农杆菌大豆遗传转化的主要因素。结果表明, 5 个大豆基因型的未成熟子叶体细胞胚胎发生率存在显著差异, 东农 40 和吉林 35 的胚胎发生率显著高于黑农 41、九 9568、九 9313。东农 40 和吉林 35 未成熟子叶对 PPT 很敏感, PPT 适合筛选浓度为 2~3 mg L⁻¹。农杆菌 EHA101 菌液浓度、浸染时间对转化效率均有影响, 农杆菌菌液浓度为 OD₆₀₀ = 0.5~0.7, 浸染时间 10~20 min 有利于转化。经 PPT 筛选, PCR、PCR~Southern 检测得到抗性体细胞胚和抗性植株, 初步证明 *GmDREB* 基因转入到大豆中。

关键词:大豆; 农杆菌; *GmDREB* 基因; 未成熟子叶

Transformation of Stress Resistance Related Gene *GmDREB* into Soybean via *Agrobacterium*-mediation

WANG Ping¹, GAO Shi-qing², GUO Yong-lai³, CHENG Xian-guo⁴, WANG Gang⁵, MA You-zhi², and JI Jing⁵

(¹ School of Marine Technology and Aquiculture, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, Jiangsu; ² Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ³ Changchun Longyang Soybean Biologic Albumen Co. Ltd, Changchun 130062, Jilin; ⁴ Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ⁵ Agriculture and biology engineering college, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Plant genetic transformation techniques have been important to improve crop varieties. Combined with traditional breeding process, molecular breeding techniques have showed bright prospects for improving agronomic characters in soybean. The somatic embryogenesis and basic resistance to PPT in immature cotyledon with 5 genotypes of soybean were tested. Plasmid *prdGm-200* containing *GmDREB* gene was transformed into immature cotyledon of soybean via *Agrobacterium*-mediation. The main factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation were also investigated. The result showed that the somatic embryogenesis of immature cotyledon were different among 5 genotypes in soybean. The somatic embryogenesis in Dongnong 42 and Jilin 35 were higher than those in Heinong 41, Jiu 9568 and Jiu 9313. The immature cotyledon of Dongnong 42 and Jilin 35 were sensitive to PPT. The screening concentration of PPT was appropriate with 2~3 mg L⁻¹. Transformation efficiency was also affected by concentration of *Agrobacterium* EHA101 and inoculation time. OD 0.5~0.7 and 10~20 minutes of inoculation were helpful to transformation. The resistant somatic embryos and plantlets were identified after PPT screening, PCR and PCR~Southern detection. It was demonstrated that the *GmDREB* gene had been transformed into soybean.

Key words: Soybean (*Glycine max* L.); *Agrobacterium*; *GmDREB* gene; Immature cotyledon

大豆 (*Glycine max* L.) 是世界上重要的油料作物和经济作物, 也是重要的工业原料和食品原料。我国是世界上主要的大豆生产国之一, 大豆在我国

国民经济上占有相当重要的地位。目前, 有许多因素影响着大豆产量和品质, 包括病害、虫害、草害及逆境因素 (干旱、低温、高盐) 等, 用传统的育种方法

收稿日期 (Received): 2007-09-03; 接受日期 (Accepted): 2007-12-25

基金项目: 教育部大豆生物学重点实验室资助项目 (SB06A07); 国家植物转基因研究与产业化专项 (JY03-A-18)

作者简介: 王萍 (1957-), 女, 教授, 博士, 主要从事生物技术与植物转基因的研究。Tel: 051885895427; Fax: 0 518-85895429; E-mail: y_pwang@yahoo.com.cn

改良大豆品种的不良性状由于基因资源匮乏而受到限制。随着基因工程研究的深入,用包括转基因技术在内的分子育种技术与传统育种技术相结合方法来改良大豆品种的性状已展现出良好的应用前景。1988年,McCabe等和Hinchee等分别用基因枪轰击大豆未成熟胚生长点和用农杆菌侵染大豆子叶节的方法几乎同时获得大豆转基因植株。目前,用不同的外植体、各种遗传转化方法对大豆进行转化已获得抗虫(Parrott et al.,1994;Stewart et al.,1996;苏彦辉等,1999;周思君等,2001;王萍等,2004)、抗病(刘德璞等,1997;徐香玲等,1996;1999)、抗除草剂(Clemente et al.,2000;Zhang et al.,2006),以及品质得到改良(赵桂兰等,2005)的转基因大豆,而抗逆基因转化大豆的研究较少。尹青女等(2004)为加强 *hsp70* 的表达以增加转基因大豆的抗逆性将热激转录因子8基因用农杆菌介导法转入大豆品种科新3号中,获得抗性植株。

DREB(Dehydration responsive element binding)转录因子可以调控下游多个与植物干旱、高盐及低温耐性有关的功能基因的表达。高世庆等(2005)从大豆吉农27克隆了 *GmDREB* 基因,并通过基因枪法转化小麦品种鲁麦22号,获得103株 T_0 代再生植株。王萍等(2007)将 *GmDREB* 基因导入农杆菌中,为用农杆菌介导法转化 *GmDREB* 基因到大豆中奠定了基础。本文以大豆未成熟子叶为外植体,探讨了受体不同基因型的体细胞胚胎发生率和对筛选剂PPT的基础抗性,以及影响农杆菌介导大豆遗传转化的主要因素,将 *GmDREB* 基因用农杆菌介导法导入大豆中,获得抗性植株。经PCR、PCR-Southern等分子生物学方法检测,证明目的基因已整合到大豆基因组中。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大豆为东农40、黑农41、九9568、吉林35、九9313等5个基因型,由东北农业大学、黑龙江省农业科学院、吉林省农业科学院和吉林市农业科学院馈赠。农杆菌为含有质粒 *prdGm-200* 的EHA101菌株。质粒 *prdGm-200* 有 *GmDREB* 基因、诱导型启动子 *rd29A*,筛选标记 *bar* 基因,由中国农科院作物栽培育种所马有志博士惠赠。

1.2 试验方法

1.2.1 受体基因型的筛选

在大豆开花20 d左

右,取未成熟子叶约为3~5 mm长的新鲜豆荚,经75%乙醇消毒2 min,0.1% $HgCl_2$ 消毒10~15 min,无菌水冲洗2~3次,剥开种皮,去掉胚轴,将子叶近轴面向上接种于 $MS + 10 \sim 20 \text{ mg L}^{-1} 2,4-D$ ($pH = 5.8$) 诱导培养基诱导体细胞胚胎发生,选择体细胞胚胎发生率较高的基因型用于遗传转化。

1.2.2 大豆未成熟子叶对筛选剂PPT的基础抗性

以大豆未成熟子叶为外植体,以体细胞胚发生率为指标,测定其对筛选剂PPT的基础抗性,以确定筛选剂适宜的筛选浓度。PPT设7个浓度水平(0.1、2、3、5、7、9 mg L^{-1}),每15 d继代一次。

1.2.3 农杆菌转化大豆未成熟子叶及不同转化因素对转化效率的影响

以吉林35、东农40的未成熟子叶为受体进行农杆菌转化(加入100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 乙酰丁香酮)。同时,以抗性体细胞胚胎发生率为指标,进行农杆菌菌液浓度和农杆菌侵染时间试验,以确定农杆菌介导大豆未成熟子叶遗传转化的最佳条件。其中农杆菌菌液浓度(OD_{600})为0.3、0.5、0.7、0.9、1.1;农杆菌侵染时间为5、10、15、20、25、30 min。

1.2.4 抗性筛选及植株再生

农杆菌浸染大豆未成熟子叶在共培养后转移到脱菌筛选培养基($MS + 10 \sim 20 \text{ mg L}^{-1} 2,4-D + 50 \sim 300 \text{ mg L}^{-1}$ 头孢霉素 + 2 mg L^{-1} PPT, $pH = 5.8$) 上,待形成体细胞胚后,将其转入萌发培养基($MS + 1\%$ 活性炭 + 5%~10% 蔗糖)中。待小苗长至5~7 cm左右,经炼苗移入花盆中。

1.2.5 抗性植株的分子检测

抗性植株大豆叶片DNA提取、PCR、PCR-Southern杂交(DIG试剂盒方法)检测参照王关林和方宏筠(1998)方法进行。*GmDREB* 基因引物序列(5'-ATG GAA GAC AGG GAT CAC TGT TGT TC-3', 5'-TCA ATC TTG AAG CTC TTC GAG TTT TC-3')扩增长度500 bp,PCR反应程序为94℃变性5 min,(94℃变性1 min,56℃退火1 min,72℃延伸1 min)35个循环,72℃延伸7 min。

2 结果与分析

2.1 不同大豆基因型体细胞胚胎发生率

东农40、黑农41、九9568、吉林35、九9313等5个大豆基因型的未成熟子叶体细胞胚胎发生率不同,介于13.2%~49.8%之间,东农40(49.8%)和吉林35(46.7%)最高,之后依次为九9313

(39.6%)、九 9568(33.2%)、黑农 41(13.2%)。经方差分析,东农 40 和吉林 35 与其它 3 个基因型间达显著差异。选择东农 40 和吉林 35 两个基因型作为大豆遗传转化受体,进一步用农杆菌介导法转化 *GmDREB* 基因。

2.2 大豆未成熟子叶对筛选剂 PPT 的基础抗性

大豆未成熟子叶对筛选剂 PPT 非常敏感,随着 PPT 浓度的增加,东农 40 和吉林 35 体细胞胚胎发生率呈急剧下降的趋势(图 1)。未加 PPT 时,东农 40 和吉林 35 的体细胞胚胎发生率分别为 43.2% 和 48.9%。当在培养基中添加 1 mg L^{-1} PPT 时,体细胞胚胎发生率分别下降至 28.4% 和 25.9%。当 PPT 浓度加大到 2 mg L^{-1} 时,两个品种的胚胎发生率迅速下降到 9.8% 和 5.5%。当 PPT 浓度为 7 mg L^{-1} 时,胚胎发生率则为 0%。因此,在以大豆未成熟子叶为受体进行遗传转化时,PPT 适合筛选浓度以 $2 \sim 3 \text{ mg L}^{-1}$ 为宜。

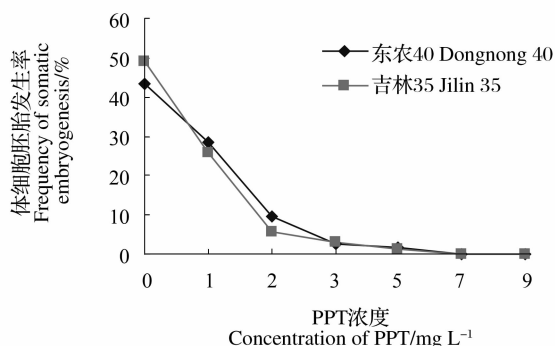


图 1 PPT 浓度对大豆体细胞胚胎发生率的影响

Fig. 1 The effect of PPT concentrations on frequency of embryogenesis in soybean

2.3 影响农杆菌介导大豆遗传转化的主要因素

用含有质粒 *prdGm-200* 的农杆菌 EHA101 侵染大豆未成熟子叶,农杆菌菌液浓度、农杆菌浸染时间对转化效率影响的结果见图 2 和图 3。

由图 2 可见,不同 OD_{600} 的农杆菌对大豆体细胞胚胎发生率影响很大。当 $\text{OD}_{600} = 0.5 \sim 0.7$ 时,两个大豆基因型的体细胞胚胎发生率都最高,达到 25% 左右。随着 OD_{600} 的升高,大豆体细胞胚胎发生率逐渐下降。说明农杆菌浓度过高时影响大豆体细胞胚胎发生率。因此,较适合的农杆菌菌液浓度为 $\text{OD}_{600} = 0.5 \sim 0.7$ 。

图 3 为农杆菌浸染时间对转化的影响。从图中可以看出,浸染时间是影响转化效率的一个重要因素。浸染时间在 $10 \sim 20 \text{ min}$ 时,体细胞胚胎的发生

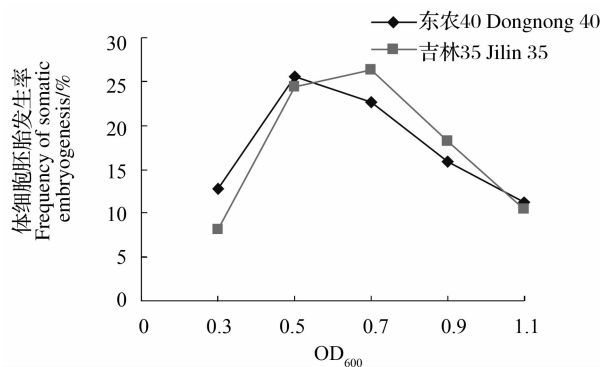


图 2 农杆菌浓度对大豆体细胞胚胎发生率的影响

Fig. 2 The effect of *Agrobacterium* concentrations on frequency of embryogenesis in soybean

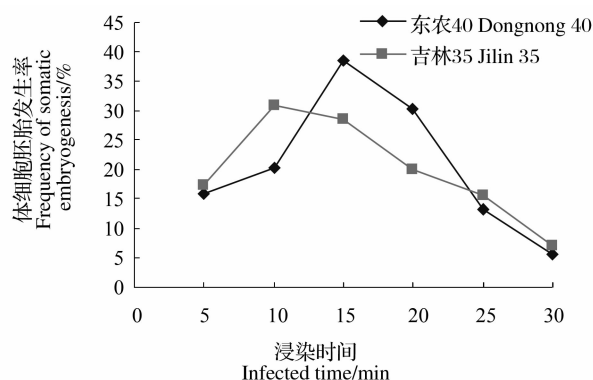


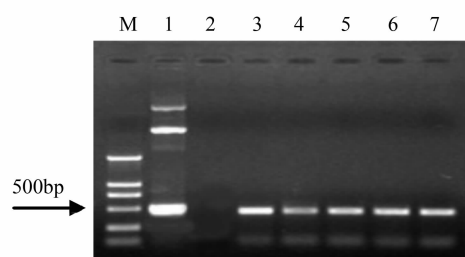
图 3 农杆菌浸染时间对大豆体细胞胚胎发生率的影响

Fig. 3 The effect of *grobacterium* infected time on frequency of embryogenesis in soybean

率最高。而随着时间的延长,体细胞胚胎的发生率呈下降趋势。两个基因型在农杆菌菌液浓度和浸染时间不同处理下体细胞胚胎发生率相似。

2.4 抗性植株的获得与分子检测

经 2 mg L^{-1} PPT 抗性筛选得到抗性体细胞胚,进一步培养成抗性小植株。分别提取抗性植株和未转化植株(阴性对照)叶片的总 DNA,以含目的基因的质粒为阳性对照进行 PCR 扩增。由图 4 电泳图可以看出,抗性植株 DNA 都扩增出与质粒 DNA 扩增产物相同的特异性条带,分子量约为 500bp,而阴性对照植株则没有扩增出特异性条带。初步证实,目的基因 *GmDREB* 已转入到大豆中。将 PCR 检测均为阳性的转化植株进行 PCR-Southern 检测(图 5),PCR 阳性植株 DNA 扩增片段与质粒 DNA 扩增特异片段处于同一位置出现杂交信号,而阴性对照植株则没有杂交信号,说明被检测阳性植株扩增出的 PCR 条带确实为特异性的目标带,证明 *GmDREB* 基因已整合到大豆植株基因组中。

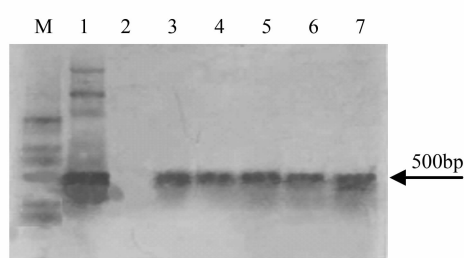


M:DL2000 1:质粒 prdGm-200;2:未转化植株;3~7:转化植株

M:DL2000 1:Plasmid prdGm-200;2:Untransformed plantlet;3~7:Transformed plantlets

图4 PCR 检测

Fig.4 PCR detection



M:DL2000 1:质粒 prdGm-200;2:未转化植株;3~7:转化植株

M:DL2000 1:Plasmid prdGm-200;2:Untransformed plantlet 3~7:Transformed plantlets

图5 PCR- Southern

Fig.5 PCR- Southern

3 讨论

3.1 大豆遗传转化中受体系统对转化的影响

大豆遗传转化受体系统包括大豆组织培养与再生的效率、大豆不同外植体对抗性筛选标记的基础抗性等。选择具有高诱导率的大豆基因型对提高遗传转化效率具有重要的意义,而适宜的抗性筛选浓度是提高选择效率的重要保证。本研究中以大豆的未成熟子叶为外植体,诱导大豆产生体细胞胚发生及再生植株,在供试的5个基因型间的诱导率存在显著差异,从中选择出体细胞胚发生率较高的东农40和吉林35作为受体,为获得转化后代奠定了基础。通过大豆未成熟子叶对筛选剂PPT的基础抗性实验找到了遗传转化筛选的适宜浓度,使抗性筛选与PCR检测结果基本一致,提高了选择效率,减少了分子检测工作量。

3.2 影响农杆菌介导大豆未成熟子叶遗传转化的因素

农杆菌侵染受体材料受许多因素的影响,如受体材料预培养时间、共培养时间、农杆菌菌液浓度、

农杆菌浸染时间及乙酰丁香酮(AS)的浓度等因素。本文对农杆菌的菌液浓度与农杆菌浸染时间进行了探讨。结果表明,当共培养2d, OD_{600} 为0.5~0.7、浸染10~20min时得到较高的抗性体细胞胚胎发生率。农杆菌的菌液浓度过低、浸染时间较短时,由于农杆菌数目不足和浸染的机会较小等原因而达不到转化的效果;农杆菌菌液浓度过高或浸染时间过长时,因为菌体本身易相互聚结,而影响其在外植体上的附着,不利于基因的转入。并且,细菌会抑制植物细胞的正常生长,对植物细胞造成一定的伤害,甚至造成植物细胞死亡。此外,过量的农杆菌浸染使共培养后的抑菌十分困难。因此,在进行农杆菌介导的植物遗传转化时,当使用不同的植物种类或不同的外植体时,为获得较高地转化效率,对转化条件的优化是十分必要的。

4 结论

5个大豆基因型的未成熟子叶体细胞胚胎发生率存在显著差异,东农40和吉林35的胚胎发生率显著高于黑农41、九9568、九9313。东农40和吉林35未成熟子叶对PPT非常敏感,PPT适合筛选浓度为2~3 $mg L^{-1}$ 。含有质粒prdGm-200的农杆菌EHA101菌液浓度、农杆菌浸染时间对转化效率均有影响。农杆菌菌液浓度为 $OD_{600}=0.5\sim0.7$ 、浸染时间10~20min有利于转化。经抗性筛选、PCR和PCR-Southern检测初步证明GmDREB基因已整合到大豆植株基因组中。

References

- Clemente T E, LaVallee B J, Howe A R, Conner- Ward D, Rozman R J, Hunter P E, Broyles D L, Kasten D S, and Hinchee M A. 2000. Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation. *Crop Science*, 40(3):797~803.
- Gao S Q, Xu H J, Cheng X G, Chen M, Xu Z S, Li L C, Du L P, Ye X G, Hao X Y, and Ma Y Z. 2005. Improvement of wheat drought and salt tolerance by expression of a stress-inducible transcription factor *GmDREB* of soybean (*Glycine max*), *Chinese Science Bulletin*, 50(23):2617-2625(高世庆,徐惠君,程宪国,陈明,徐兆师,李连城,杜丽璞,叶兴国,郝晓燕,马有志. 2005. 转大豆 *GmDREB* 基因增强小麦的耐旱及耐盐性. *科学通报*, 50(23):2617-2625)
- Hinchee M A W, Connor- Ward D V, Newell C A, McDonnell R E, Sato S J, Gasser C S, Fischhoff D A, Re D B, Fraley R T, and Horsch R B. 1988. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Bio/Technology*, 6:915-922.

- Liu D P, Liao L, Yuan Y, and Liu Y Z. 1997. Gaining of soybean lines resistant to SMV by introducing exogenous DNA. *Soybean Science*, 16 (4): 277-282 (刘德璞, 廖林, 袁膺, 刘玉芝. 1997. 导入外源 DNA 获得抗 SMV 大豆品系. *大豆科学*, 16(4): 277-282)
- McCabe D E, Swain W F, Martinell B J, and Christou P. 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine Max*) by particle acceleration. *Bio/Technology*, 6: 923-926.
- Parrott W A, All J N, Adang M J, Bailey M A, Boerma H R, and Stewart C N. 1994. Recovery and evaluation of soybean plants transgenic for a *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insecticidal gene. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 30(7): 144-149
- Stewart C N, Adang M J, All J N, Boerma H R, Cardineau G, Tucker D, and Parrott W A. 1996. Genetic transformation, recovery and characterization of fertile soybean transgenic for synthetic *Bacillus thuringiensis* cry *I*Ac gene. *Plant Physiology*, 112: 121-129.
- Su Y H, Wang H L, Yu M M, Lü D Y, and Guo S D. 1999. Studies on transfer of *Bt* gene into *Glycine max*. *Acta Botanica Sinica*, 41(10): 1046-1051 (苏彦辉, 王慧丽, 俞梅敏, 吕德扬, 郭三堆. 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因导入大豆的研究. *植物学报*, 1999, 41(10): 1046-1051)
- Wang G L, and Fang H J, eds. 1998. The principle and technology of plant engineering. Science Press, China, Beijing, pp. 598-625 (王关林, 方宏筠, 主编. 1998. 植物基因工程原理与技术. 科学出版社, 中国, 北京, pp. 598-625)
- Wang P, Gao S Q, Guo Y L, Cheng X G, Wang G, and Ma Y Z. 2007. The study on transformation of stress resistance related gene *GmDREB* into *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Jilin Agricultural University*, 29(2): 148-151 (王萍, 高世庆, 郭永来, 程宪国, 王罡, 马有志. 2007. 抗逆相关基因 *GmDREB* 导入农杆菌的研究. *吉林农业大学学报*, 29(2): 148-151)
- Wang P, Wang G, Ji J, Zeng F T, Huang B C, Cao J, and Wu Y. 2004. Studies of somatic embryogenesis and genetic transformation by *Agrobacterium*-mediated in soybean. *Hereditas (Beijing)*, 26(5): 695-700 (王萍, 王罡, 季静, 曾凡亭, 黄彬城, 曹江, 吴颖. 2004. 大豆体细胞胚胎发生与农杆菌介导的遗传转化. *遗传*, 26(5): 695-700)
- Xu X L, Li X H, Liu W H, Li J L, and Wang Y. 1996. Study on transferring soybeans mosaic various coat protein (SMV-CP) gene into soybeans by Ri-plasmid. *Soybean Science*, 15(4): 279-288 (徐香玲, 李兴华, 刘伟华, 李集临, 王毅. 1996. Ri 质粒介导大豆花叶病毒外壳蛋白基因转化大豆的研究. *大豆科学*, 15(4): 279-288)
- Xu X L, Zou L P, Liu W H, and Li J L. 1999. A preliminary study on transferring chitinase gene into soybeans. *Soybean Science*, 18(2): 101- (徐香玲, 邹联沛, 刘伟华. 1999. 李集临. 向大豆导入几丁质酶基因的初步研究. *大豆科学*, 18(2): 101-108)
- Yin Q N, Lv H Y, Zhu B G, and Zhang J. 2004. Heat shock factor 8 (hsf8) introduced into soybean mediated-*Agrobacterium* transformation. *Molecular Plant Breeding*, 2(6): 783-787 (尹青女, 吕慧颖, 朱保葛, 张敬. 2004. 农杆菌介导法将热激转录因子 8 基因转入大豆. *分子植物育种*, 2(6): 783-787)
- Zhang Y, Yang B Y, and Chen S Y. 2006. Inheritance analysis of herbicide-resistant transgenic soybean lines. *Acta Genetica Sinica*, 33(12): 1105-1111
- Zhao G L, Chen J Q, Yi A P, Hu Z H, Qian X Y, and Guo D Q. 2005. Transgenic soybean lines harbouring anti-PEP gene express super-high oil content. *Molecular Plant Breeding*, 3(6): 792-796 (赵桂兰, 陈锦清, 尹爱萍, 胡张华, 钱雪燕, 郭东全. 2005. 获得转反义 PEP 基因超高油大豆新材料. *分子植物育种*, 3(6): 792-796)
- Zou S J, Li X C, Liu Z J, Liu L Y, and Yang Q K. 2001. Intrduction of *Bt* gene (*cryIA*) into soybean by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Soybean Science*, 20(3): 157-162 (周思君, 李希臣, 刘昭军, 刘丽艳, 杨庆凯. 2001. 通过农杆菌介导法将 *Bt* (*cryI A*) 基因导入大豆. *大豆科学*, 20(3): 157-162)