

农杆菌介导大豆子叶节系统的两个问题突破

李文霞¹, 李文滨², 吕文河¹, 宁海龙²

(¹东北农业大学农学院, 黑龙江哈尔滨 150030; ²东北农业大学大豆研究所, 教育部大豆生物学重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:为解决大豆子叶节系统存在的再生和检测问题, 对影响丛生芽伸长和植株检测的因素进行研究。以大豆品种黑农 35 的子叶节为外植体, 利用 L_93^4 正交试验确定影响再生系统丛生芽伸长的因素及水平, 将转基因小植株的叶片培养愈伤组织以提取基因组 DNA 进行 Southern 检测。结果表明, 丛生芽伸长的最佳组合为继代培养基与初始芽诱导培养基的 6-BA 浓度比为 1/5, 芽伸长培养基中添加 50 mg L^{-1} Glu、 0.5 mg L^{-1} GA₃、 0.5 mg L^{-1} ZT; Southern 杂交信号说明利用叶片培养的愈伤组织能够提取足够量的基因组 DNA。

关键词:大豆; 子叶节; 丛生芽伸长; 愈伤组织

Breakthrough of Two Questions on the Agrobacterium-mediated Soybean Cotyledonary Node Systems

LI Wen-xia¹, LI Wen-bin², LÜ Wen-he¹, and NING Hai-long²

(¹College of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang; ²Soybean Research Institute of Northeast Agricultural University, Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: The factors influencing soybean (*Glycine max* L.) cotyledonary node regeneration and detection from soybean cultivars “Heinong 35” were studied in this research so as to solve the two problems. L_93^4 orthogonal design was used to discuss effect of four key factors and levels on multiple shoot elongation. DNA for Southern blot were extracted from calli tissue which were induced from putative transgenic plants leaves. The results indicated that the better conditions for elongation were got when concentration of 6-Benzylaminopurine in subculture medium for shoot induction was dropped to 1/5 to the preceding shoot induction medium, and 50 mg L^{-1} Glutamic acid, 0.5 mg L^{-1} Gibberellin A₃ and 0.5 mg L^{-1} Zeatin were added to shoot elongation medium; Southern blot signal indicated that calli tissue from leaves could extract enough genomic DNA.

Key words: Soybean; Cotyledonary node; Multiple shoots elongation; Calli tissue

大豆 (*Glycine max* L.) 起源于中国, 是我国五大作物之一, 是重要的油料作物及主要的食物蛋白来源和饲料原料。当生物学进入分子生物学时代以后, 有关大豆的科学研究也进入快速发展的时期, 尤其大豆的基因工程研究工作给生产上带来了巨大的经济效益。大豆已经成为用来研究植物病理学、生物化学和分子生物学的重要植物, 优良的外源基因导入大豆将促进这些领域的发展及提升大豆的价值 (Zhang et al., 2000)。但是相对于水稻、烟草等作物来说, 大豆的高效遗传转化一直是植物基因工程领域的难点之一 (刘海坤和卫志明, 2005; Trick et al., 1997), 其主要原因是从转化的细胞或组织分化再

生植株困难。在大豆再生系统中, 大豆体细胞胚发生再生系统 (Finer and Nagasama, 1998; Samoylov et al., 1998)、不定芽器官发生再生系统和原生质体再生系统 (Wei and Xu, 1988) 已多有报道。其中子叶节系统相对于其他再生系统有其特有优点, 即获得再生植株的时间短、不可育的再生植株少、外植体来源不受时间限制 (Meurer et al., 1998; 林树柱等, 2005), 并且其外植体内已存在的分生组织和有分化潜力的表皮、亚表皮细胞都可作为遗传转化的靶组织 (李明春等, 2006), 因此子叶节器官发生系统是目前公认为比较成熟易行的。但由于 T-DNA 从农杆菌转移到子叶节细胞的转化效率低、再生的转

收稿日期 (Received): 2007-11-02; 接受日期 (Accepted): 2007-12-11

基金项目: 黑龙江省科技攻关项目“大豆、马铃薯抗病和抗虫基因工程的研究” (GB04B101)

作者简介: 李文霞 (1974-), 女, 讲师, 博士, 研究方向为植物分子生物学。Tel: 13796674549; E-mail: wxlee2006@yahoo.com.cn

通讯作者 (Corresponding author): 李文滨, 教授, 博士。Tel: 55190778; E-mail: wenbinli@yahoo.com; 吕文河, 教授, 博士。Tel: 55191763; E-mail: whlu@mail.neau.edu.cn; 宁海龙, 副教授, 博士。Tel: 55191042; E-mail: ninghailong1975@163.com

化细胞和再生芽的无效选择、植株再生困难等问题 (Olhoft and Somers, 2001) 使该系统仍然存在转化频率低的弊端。关于提高 T-DNA 从农杆菌转移到子叶节细胞的转化效率问题, 笔者已做深入研究 (另文发表)。本研究针对农杆菌介导大豆子叶节系统存在的再生和检测问题进行研究, 旨在解决当前大豆遗传转化存在的问题, 促进大豆基因工程的发展。

1 材料与方法

1.1 植物材料

大豆品种黑农 35, 由黑龙江省农科院提供。

1.2 方法

1.2.1 丛生芽的伸长 挑选健康无病害的大豆种子进行氯气消毒处理后接种于萌发培养基上, 取萌发 5~7 d 的无菌苗, 将两片子叶从子叶节处纵向切开, 用解剖刀切去萌发的顶芽和侧芽获得子叶节外植体, 将子叶节接近轴面朝上插入芽诱导培养基中, 每 14 d 继代一次。待丛生芽可见时, 将外植体转入芽伸长培养基 (MS 盐, MS 铁盐, B5 有机, 0.1 mg L^{-1} IAA, 10 mg L^{-1} 硝酸银, 3% 蔗糖, 0.8% 琼脂粉, pH 5.8) 中, 对影响丛生芽伸长的继代培养基与初始芽诱导培养基的 6-BA 浓度比 (A), 芽伸长培养基中 Glu 浓度 (B)、 GA_3 浓度 (C) 和 ZT 浓度 (D) 进行 L_93^4 正交试验, 因素的各水平见表 1。

表 1 因素水平表
Table 1 Levels of factors

水平 Levels	A	B	C	D
1	1/2	0	0	0.5
2	1/5	50	0.5	1.0
3	1/10	100	1.0	1.5

1.2.2 叶片愈伤组织的培养 在移栽成活的 T_0 代植株上取嫩叶 1~2 片, 消毒后切成小块接种在诱导叶片愈伤组织的培养基 ($\text{MSB} + 2 \text{ mg L}^{-1} 2, 4\text{-D} + 0.5 \text{ mg L}^{-1} \text{KT}$, pH 5.8) 上诱导叶片愈伤。等到愈伤组织生长到一定量后利用 CTAB 法提取基因组 DNA, 以确保每株提取足够量的 DNA。采用地高辛标记和检测试剂盒进行 Southern 检测。

1.2.3 统计分析方法 使用软件 SAS 8.2 对试验数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 影响丛生芽伸长的正交试验

由表 2 可见, A、B、C、D 各因素的 F 值均达到显著水平, 说明这 4 个因素对丛生芽伸长都有显著的

效应。4 因素中 F 值 $A > C > D > B$, 说明继代培养基中降低 6-BA 的浓度对丛生芽伸长的影响效应最大, 其次为芽伸长培养基中添加的 GA_3 , ZT 和 Glu 影响效应相对小一些。

表 2 丛生芽伸长影响因素的方差分析
Table 2 Analysis of variance for factors that affect multiple shoots elongation

变异来源 Source	F
A	1658.3 *
B	19.2 *
C	685.6 *
D	44.7 **

* 代表 5% 的差异显著水平。

* Means significant difference at 5% level.

各因素不同水平对丛生芽伸长的影响见表 3, A 因素将 6-BA 的浓度降为丛生芽诱导培养基的 1/5 显著高于其它两个水平。B 因素在丛生芽伸长培养基中不添加或添加 50 mg L^{-1} Glu 显著高于添加 100 mg L^{-1} Glu, 不添加和添加 50 mg L^{-1} Glu 之间差异不显著。C 因素在丛生芽伸长培养基中添加 1.0 mg L^{-1} GA_3 显著高于其它两个水平, 添加 0.5 mg L^{-1} GA_3 显著高于不添加 GA_3 , 但是在生根阶段发现, 添加 1.0 mg L^{-1} GA_3 后丛生芽因为伸长的茎比较纤细, 不易生根, 将浓度降为 0.5 mg L^{-1} 发现对生根没有影响。D 因素在丛生芽伸长培养基中添加 0.5 mg L^{-1} ZT 显著高于其它两个水平。综合以上各因素不同水平的影响, 确定最佳组合为继代培养基与初始芽诱导培养基的 6-BA 浓度比为 1/5, 在芽伸长培养基中添加 50 mg L^{-1} Glu、 0.5 mg L^{-1} GA_3 、 0.5 mg L^{-1} ZT。

表 3 各因素不同水平对丛生芽伸长率的影响

Table 3 Effect of different levels of each factor on percentage of multiple shoots elongation

水平 Levels	A	B	C	D
1	22.1 c	37.3 a	25.8 c	38.8 a
2	53.0 a	38.3 a	39.4 b	34.0 c
3	35.4 b	35.0 b	45.2 a	37.7 b

小写字母代表 5% 的差异显著水平, 多重比较采用新复极差法。

Small letter means significant difference at 5% level by SSR.

2.2 Southern 杂交

图 1-A 为由子叶节系统再生的转基因大豆植株, 可见再生植株叶片稀少, 由这样的植株上采摘的叶片提取基因组 DNA 进行 Southern 杂交检测很难保证提取到足够量的基因组 DNA。由再生植株的

叶片进行愈伤组织的诱导,待愈伤组织生长到一定量后利用愈伤组织提取基因组 DNA,由图 1-B 可见,转基因植株呈现杂交信号,说明利用叶片进行诱导愈伤后提取的基因组 DNA 量适合 Southern 杂交检测的需要。

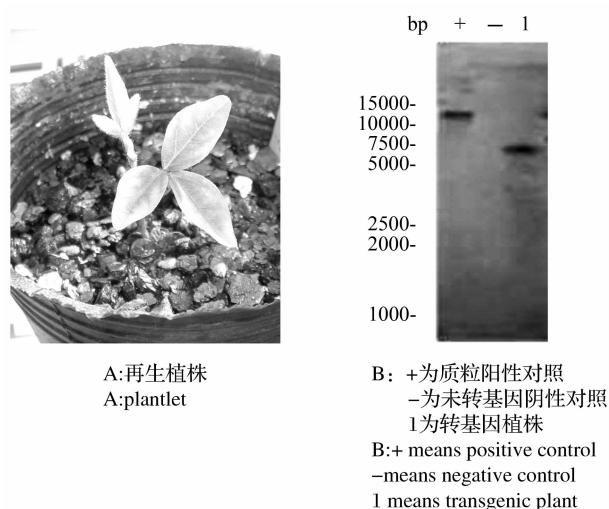


图 1 转基因植株的 Southern 杂交分析

Fig. 1 Southern blot analysis of transgenic soybean plant

3 讨论

大豆子叶节转化后丛生芽不抽茎长高,目前尚未见到分析这一现象机理的深入报道。邱承祥等认为从激素调节来看,子叶节培养中不同浓度的 6-BA 影响丛生芽的诱导率、不定芽的数量和芽的伸长(邱承祥和武天龙,2003)。低浓度的 6-BA 有利于芽的伸长,但芽的数量少,丛生芽诱导率低;高浓度的 6-BA 可提高丛生芽诱导率,但诱导的芽数量过多,芽生长的慢,一段时间即黄化脱落。本研究的 L_93^4 正交试验发现 6-BA 对丛生芽伸长的影响最大,继代培养基与初始芽诱导培养基的 6-BA 浓度比为 1/5,丛生芽伸长率最高,这样在第一次丛生芽诱导培养基中高浓度的 6-BA 能够保证丛生芽诱导率和芽数量,继代培养的低浓度 6-BA 能够保证丛生芽伸长。试验中发现高浓度的 GA_3 作用下伸长的芽不易生根,其原因与 6-BA 对丛生芽的影响是一样的,添加 $0.5 \text{ mg L}^{-1} GA_3$ 对伸长的芽生根没有影响,这与 Olhoft 等(2003)的研究结果是一致的。芽伸长培养基中添加了 10 mg L^{-1} 硝酸银,硝酸银是一种乙烯抑制剂,它能够减少外植体释放乙烯的量,因此硝酸银对植物生长和发育具有重要的作用(Santos, 1997)。

在试验中发现大豆子叶节系统的转基因植株检测也是目前存在的一个难点,源于再生小植株的叶片稀少。子叶节系统由于是器官发生途径,在植株再生的各个阶段分别采用不同的激素进行诱导,这可能会促进植株的过早成熟,导致移栽后的小植株没有完全经历营养生长而进入生殖生长阶段,以致植株矮小、叶片过少而在当代无法完成 Southern 杂交检测。本研究利用幼嫩叶片进行愈伤组织诱导,解决了检测中存在的这一至关重要的难题。

References

- Finer J J, and Nagasama A. 1988. Development of an embryonic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill.). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 15:125-136
- Li M C, Cai Y, Zhao G L, Cai Y Q G L, Zhou H, Sun W, and Xing L J. 2006. Improvement of cotyledon node regeneration system in soybean (*Glycine max*). *Acta Agronomica Sinica*, 32(2):223-227(李明春, 蔡易, 赵桂兰, 财音青格乐, 周皓, 孙伟, 邢来君. 2006. 改良大豆子叶节再生体系的研究. *作物学报*, 32(2):223-227)
- Lin S Z, Cao Y P, Wei Z M, Ma X P, and Chen L Y. 2005. Studies on shoots induced by 6-BA from cotyledonary nodes and embryonic tips of soybean. *Journal of Shanghai Jiaotong University(Agricultural Science)*, 23(2):138-142(林树柱, 曹越平, 卫志明, 马晓平, 陈鲁勇. 2005. 6-BA 诱导大豆子叶节和茎尖出芽的研究. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 23(2):138-142)
- Liu H K, and Wei Z M. 2005. Recent advances in soybean genetic transformation. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 31(2):126-134(刘海坤, 卫志明. 2005. 大豆遗传转化研究进展. *植物生理与分子生物学报*, 31(2):126-134)
- Meurer C A, Dinkins R D, and Collins G B. 1998. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation. *Plant Cell Report*, 18:180-186
- Olhoft P M, Flagel L E, Donovan C M, and Somers D A. 2003. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta*, 5:723-735
- Olhoft P M, and Somers D A. 2001. L-Cysteine increases Agrobacterium-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Report*, 20:706-711
- Qiu C X, and Wu T L. 2003. Study on 6-BA to the regeneration of tip shoot of soybean. *Soybean Science*, 22(1):32-35(邱承祥, 武天龙. 2003. 6-BA 对大豆茎尖诱导再生植株的研究, *大豆科学*, 22(1):32-35)
- Samoylov V M, Tucker D M, and Thibaud-Nissen F. 1998. A liquid-medium-based protocol for rapid regeneration from embryogenic soybean cultures. *Plant Cell Report*, 18:49-54
- Santos K G B, Mundstock E, and Bodanese-Zanettni M H. 1997. Genotype-specific normalization of soybean somatic embryogenesis through the use of an ethylene inhibitor. *Plant Cell Report*, 16:859-864

(下转 180 页)

- dase of potato. Journal of Gansu Agriculture University, 2: 190-191 (李敏, 刘磊, 郭玉蓉. 2005. 马铃薯多酚氧化酶的特性研究. 甘肃农业大学学报, 2: 190-191)
- Miao Y C. 2001. Hydrogen peroxide is a signal molecule of plant. Magazine of Biology, 18(2): 4-7 (苗雨晨. 2001. 过氧化氢—植物体内的一种信号分子. 生物学杂志, 18(2): 4-7)
- Sschreck R, Rieber P, and Bauuerle P A. 1991. Reactive oxygen intermediates as apparentes as apparently widely used messengers in the activation of the NF- KB transcription factor and HIV- 1. EMBO J, 10: 2247
- Wang A G, Luo G H, and Shao C B. 1983. Study on superoxide dismutase of soybean seed. Journal of Plant Physiology, 9(1): 77-84 (王爱国, 罗广华, 邵从本. 1983. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究. 植物生理学报, 9(1): 77-84)
- Write group of Seed Workbook. 1977. Seed Workbook. People Press, China, Shanghai, pp. 370-371 (种子工作手册编写组, 著. 1977 种子工作手册. 上海人民出版社, 中国, 上海, pp. 370-371)
- Wu X H, Chang Z M, and He S M. 2002. Effects on mung bean rooting of the plumular axis bottom by cutting with hydrogen peroxide. Journal of Science of Teachers' College and University, 22(3): 63-65 (吴旭红, 常志敏, 何士敏. 2002. 过氧化氢对绿豆种子下胚轴插条生根的影响. 高师理科学刊, 22(3): 63-65)
- Xie W H. 1985. Study of cucumber seeds dormancy and Hydrogen peroxide for cucumber germinating effect. Vegetable China, 2: 1-4 (谢文华. 1985. 黄瓜种子休眠及过氧化氢对其萌发效应的研究. 中国蔬菜, 2: 1-4)
- Xu S X, Tang X H, and Fu J R, eds. 1987. Study advance of seed physiology. Zhongshan University Press, China, Guangzhou, pp. 120-122 (徐是雄, 唐锡华, 傅家瑞, 著. 1987. 种子生理研究进展. 中山大学出版社, 中国, 广州, pp. 120-122)
- Xu Z, and Mao W J. 2006. Soybean trade of Brazil and opportunity facing of China. Test and Quarantine of China, 1: 47-50 (徐铮, 毛维军. 2006. 巴西大豆贸易和中国面临的机遇. 中国检验检疫, 1: 47-50)
- Yu J Y, Jiang Y, and Wang S L, eds. 2005. Experimental technology of biochemistry. Chemical Industry Press, China, Beijing, pp. 266-268 (俞建瑛, 蒋宇, 王善利, 著. 2005. 生物化学实验技术. 化学工业出版社, 中国, 北京, pp. 266-268)
- Zhang D X. 1996. Effects of hydrogen peroxide seeds soaking on rice and corn seeds germinating. Journal of Plant Physiology, 32(3): 115-117 (张东向. 1996. H₂O₂ 浸种对水稻和玉米种子萌发的影响. 植物生理学通讯, 32(3): 115-117)
- Zhang D X, He Y L, and Zheng W H. 1996. Effects of H₂O₂ on wheat seeds activity and some physical characteristic. Journal of Qiqihaer Teachers' University, 16(4): 49-50 (张东向, 赫延龄, 郑蔚虹. 1996. 过氧化氢对小麦种子活力及某些生理特性的影响. 齐齐哈尔师范学院学报, 16(4): 49-50)
- Zhang X L, Li R L, and Shi F C. 2007. Effect of salt stress on seed germination characteristics of *Glycine soja*. Seed, 26(8): 21-23 (张秀玲, 李瑞利, 石福臣. 2007. 盐胁迫对大豆种子萌发特性的影响. 种子, 26(8): 21-23)
- Zhang Z L. 2003. Experimental guiding of plant physiology. Higher Education Press, China, Beijing, pp. 213-214, 123-124, 120 (张志良. 2003. 植物生理学实验指导. 高等教育出版社, 中国, 北京, pp. 213-214, 123-124, 120)
- Zheng W H, and Leng J M 2003. Effects of H₂O₂ and KMnO₄ seeds soaking on Hippophae seeds germinating and seedling growing. Seed, (6): 21-22 (郑蔚虹, 冷建梅. 2003. 青霉素、过氧化氢和高锰酸钾浸种对沙棘种子萌发及幼苗生长的影响. 种子, (6): 21-22)
- bility of serum lipoproteins and effects of high-density lipoprotein against oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. Journal of Medical Postgraduate, 13(5): 304-307 (许跃龙, 张春妮, 庄一义, 万瑛. 2000. 2 型糖尿病患者血清脂蛋白氧化易感性及高密度脂蛋白抗氧化能力分析. 医学研究生学报, 13(5): 304-307)
- Yoshikoshi M, Yoshiki Y, Okubo K, Seto J, and Sasaki Y. 1996. Prevention of hydrogen peroxide damage by soybean saponins to mouse fibroblasts. Planta Medica, 62(3): 252-255
- bean (*Glycine max* L.). Plant Cell Report, 7: 348-351
- Zhang Z, Guo Z, and Shou H. 2000. Assessment of conditions affecting Agrobacterium-mediated soybean transformation and routine recovery of transgenic soybean. Plant Genetic Engineering, 88-94

(上接 172 页)

- Vedavanam K, Sriyayanta S, O'Reilly J, Raman A, and Wiseman H. 1999. Antioxidant action and potential antidiabetic properties of an isoflavonoid-containing soybean phytochemical extract (SPE). Phytotherapy Research, 13(7): 601-608
- Wang H J and Murphy P A. 1994. Isoflavone contents in commercial soybean foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42(8): 1666-1673
- Xu Y L, Zhang C N, Zhuang Y Y, and Wan Y. 2000. Oxidative suscepti-

(上接 175 页)

- Trick H N, Dinkins R D, Santarn E R, Di R, Samoylov V, Meurer C A, Walker D R, Parrott W A, Finer J J, and Collins G B. 1997. Recent advances in soybean transformation. Plant Cell Tissue Organ Culture, 3: 9-26
- Wei Z M, and Xu X. H. 1988. Plant regeneration from protoplast of soy-