

# 大豆整体子叶节再生体系的建立及应用于农杆菌介导遗传转化初探

张福丽<sup>1</sup>,舒文涛<sup>2</sup>,张怡<sup>1</sup>,高丹<sup>1</sup>,张丽<sup>1</sup>,陆亚杰<sup>1</sup>,罗祥<sup>1</sup>,李成伟<sup>1</sup>

(1. 周口师范学院 生命科学系,植物遗传与分子育种重点实验室,河南 周口 466001;2. 周口市农业科学院,河南 周口 466001)

**摘要:**以中黄20、周豆02005、周豆11和周豆18整体子叶节为材料,以MSB为基本培养基,通过 $L_9(3^4)$ 正交设计研究了6-BA、IBA和KT 9种浓度组合对大豆整体子叶节丛生芽再生的影响;并将大豆的整体子叶节应用于农杆菌介导的遗传转化研究。结果表明:9种激素组合中以MSB + 3.0 mg·L<sup>-1</sup>6-BA + 0.1 mg·L<sup>-1</sup>IBA + 0.5 mg·L<sup>-1</sup>KT最适合周豆02005丛生芽的诱导,而MSB + 3.5 mg·L<sup>-1</sup>6-BA + 0.2 mg·L<sup>-1</sup>IBA + 0.2 mg·L<sup>-1</sup>KT最适宜周豆11、周豆18和中黄20的丛生芽诱导;4个大豆基因型中,以中黄20的丛生芽数最多;丛生芽用于诱导生根时,IBA为0.8 mg·L<sup>-1</sup>、NAA为0.8~1.0 mg·L<sup>-1</sup>时较适合大豆生根,其中以中黄20生根数最多。以中黄20整体子叶节为材料,进行了农杆菌介导的遗传转化研究。PCR分析和GUS染色初步表明,外源基因转入到了大豆的基因组中,转化率为7.8%,得到转基因植株的周期为35~42 d。

**关键词:**大豆;整体子叶节;再生;农杆菌介导;遗传转化

**中图分类号:**S565.1

**文献标识码:**A

**文章编号:**1000-9841(2012)06-0865-04

## Cluster Bud Induction of Soybean Whole Cotyledonary Node and Application in *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation

ZHANG Fu-li<sup>1</sup>, SHU Wen-tao<sup>2</sup>, ZHANG Yi<sup>1</sup>, GAO Dan<sup>1</sup>, ZHANG Li<sup>1</sup>, LU Ya-jie<sup>1</sup>, LUO Xiang<sup>1</sup>, LI Cheng-wei<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Plant Genetics and Molecular Breeding, Department of Life Science, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466001, Henan; 2. Zhoukou Academy of Agricultural Sciences, Zhoukou 466001, Henan, China)

**Abstract:** The effects of nine concentration combinations of 6-BA, IBA and KT designed by orthogonal design [ $L_9(3^4)$ ] were evaluated on induction of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] multi-shoot from whole cotyledonary nodes. Four soybean genotypes, including Zhouhuang 20, Zhoudou 02005, Zhoudou 11 and Zhoudou 18, were used as plant materials, while MSB was used as basic medium. The results showed that nine concentration combinations had different effects on induction of multi-shoot for soybean whole cotyledonary nodes. The regeneration system was further used to *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. For nine concentration combinations, MSB + 3.0 mg·L<sup>-1</sup>6-BA + 0.1 mg·L<sup>-1</sup>IBA + 0.5 mg·L<sup>-1</sup>KT for Zhoudou 02005 and MSB + 3.5 mg·L<sup>-1</sup>6-BA + 0.2 mg·L<sup>-1</sup>IBA + 0.2 mg·L<sup>-1</sup>KT for Zhouhuang 20, Zhoudou 11 and Zhoudou 18 were optimum to induce multi-shoot than other combinations. For four genotypes, the regeneration efficiency of multi-shoot for Zhouhuang 20 was the highest. The concentration of 0.8 mg·L<sup>-1</sup> for IBA and 0.8-1.0 mg·L<sup>-1</sup> for NAA was much more suitable for soybean rooting, and rooting efficiency of Zhonghuang 20 was the highest. *Agrobacterium*-mediated transformation of Zhonghuang 20 was performed using whole cotyledonary nodes as explants, it showed that reporter gene (*GUS*) had been transformed into soybean genome by PCR analysis and GUS staining with 7.8% transformation efficiency, and the period of obtaining transgenic plant was 35-42 d.

**Key words:** Soybean; Whole cotyledonary node; Regeneration; *Agrobacterium*-mediated; Genetic transformation

自1988年Hinchee等<sup>[1]</sup>应用农杆菌介导的单个子叶节法首次获得转基因大豆植株以来,研究人员不断的对该转化系统进行改进和完善<sup>[2-3]</sup>,但是仅有少数转基因大豆能够再生<sup>[4]</sup>,且存在转化周期长等问题。有效的植物再生是获得转基因植株的基础<sup>[5-6]</sup>,能在较短时间内获得较多再生芽并形成完整的植株,是提高大豆遗传转化效率的关键<sup>[7]</sup>。1980年,Cheng等<sup>[8]</sup>首先报道了大豆传统单个子叶节的成功再生,此后,不同基因型大豆应用于此种

再生体系的研究。对于整体子叶节再生而言,仅有少数大豆通过此方法再生成功<sup>[7]</sup>,整体子叶节应用于农杆菌介导的遗传转化研究更鲜有报道。本文以中黄20、周豆02005、周豆11和周豆18为材料,以整体子叶节为外植体,研究了不同激素组合对大豆再生的影响,建立了快速和有效的再生体系;并将大豆的整体子叶节外植体应用于农杆菌介导的遗传转化研究,以期为大豆的遗传转化提供材料和技术支持,加快大豆遗传转化的进程。

收稿日期:2012-08-06

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项子任务(2008ZX08010-004);河南省教育厅自然科学项目(2012B210028,2011B180060);周口师范学院博士科研启动基金;周口师范学院实验室开放项目基金。

第一作者简介:张福丽(1975-),女,讲师,博士,研究方向为植物分子生物学。E-mail:zhangfl666@yahoo.com.cn。

通讯作者:李成伟(1972-),男,教授,博士,研究方向为植物与病原菌互作及分子育种。E-mail:lichengwei@zknz.edu.cn。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

中黄 20 购于周口市种子公司;周豆 11、周豆 02005 和周豆 18 由周口市农业科学院提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 培养基和培养条件** 以 MSB 为基本培养基 (MS 盐<sup>[9]</sup>和 B5 维生素<sup>[10]</sup>), 3% 蔗糖,  $6.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂, pH5.8, 附加不同浓度的植物激素。培养室温度为  $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 14 h 光照/10 h 黑暗, 光强为 2 000 Lx。

**1.2.2 外植体的获得** 参照 Ma 等<sup>[7]</sup>的方法培养和准备用于再生的子叶节外植体。将大豆种子用 0.1% 的升汞消毒 5 min, 无菌水冲洗 5~6 次后接种于 MSB 培养基, 附加  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA, 培养 5~6 d 或当外植体刚转绿时, 去掉种皮, 用解剖刀去除无菌苗的初生叶、上胚轴及部分下胚轴, 留取 3~5 mm 的连着两片子叶的下胚轴, 将两个子叶之间的整个部位用无菌手术刀片划 5~6 下, 得到可用于再生和转化的整体子叶节外植体。

**1.2.3 不定芽的诱导和生根** 将 4 个大豆品种获得的整体子叶节外植体分别接种在附加不同浓度 6-苄氨基嘌呤 (6-BA)、吲哚丁酸 (IBA) 和激动素 (KT) 的芽诱导培养基上进行培养, 10 d 后统计每株的丛生芽数。采用正交试验 [ $L_9(3^4)$ ] (表 1) 设计分化培养基进行丛生芽诱导。

在进行丛生芽的生根时, 将长至 3~4 cm 的丛生芽切下, 转入加有 IBA 或 NAA 的生根培养基上进行根的诱导, IBA 和 NAA 的浓度梯度分别为 0、0.6、0.8、1.0、1.2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。10 d 后统计再生根数。

**1.2.4 遗传转化** 参照 Olhoft 等<sup>[11]</sup>的方法进行工程菌的活化和培养, 菌株为 EHA105, 质粒 pBI121 含有 *GUS* 基因、*NPTII* 基因、CaMV35S 启动子和 NOS 终止子。转化时, 菌液的浓度为  $\text{OD}_{600} = 1.0$ , 附加  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  L-半胱氨酸。在进行遗传转化时, 将蘸取携带目标基因农杆菌工程菌液的无菌棉球放于两子叶间的划伤组织上, 于  $26^\circ\text{C}$ 、黑暗条件下共培养 3 d。共培养的第 2 天用移液枪吸取携带目标基因的农杆菌工程菌液滴到无菌棉球上。共培养结束后, 去掉棉球, 不转换培养基, 直接将外植体转入光下, 于  $26^\circ\text{C}$  培养 7 d 后, 外植体转入附加  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  头孢噻肟和  $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  卡那霉素、pH 5.8 的 MSB 进行为期 12 d 的芽伸长及筛选培养, 当抗性分化芽长至 3~4 cm 时, 切下, 转入生根培养基 (附加

$1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA、 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  头孢噻肟, pH5.8 的 MSB) 生根 10~15 d, 之后将生根的转基因植株移栽入土中。

**1.2.5 转化植株的 GUS 染色和 PCR 检测** 根据 Jefferson 等<sup>[12]</sup>和 Kosugi 等<sup>[13]</sup>的方法对抗性芽和花粉粒以及转基因植株的豆荚及种子进行 GUS 染色分析。对 GUS 染色呈阳性的植株进行 PCR 检测。采用 CTAB 法提取叶片基因组 DNA, 引物为 5'-GCTGCTATCGATGCTTTCATTGGTGACG-3' 和 5'-CGGTGATACGTACACTTTTCCCCGGC-3', 扩增包括部分 *GUS* 基因在内的共计 1 709 bp 的片段。25  $\mu\text{L}$  反应体系包括 Ex *Taq* 12  $\mu\text{L}$ 、1  $\mu\text{L}$  DNA、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  引物各 1  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为:  $94^\circ\text{C}$  变性 5 min,  $95^\circ\text{C}$  变性 30 s,  $50^\circ\text{C}$  退火 30 s,  $72^\circ\text{C}$  延伸 2 min,  $72^\circ\text{C}$  延伸 10 min,  $4^\circ\text{C}$  终止反应, 共计 30 个循环。

### 1.3 数据分析

采用 SPSS 13.0 中的 Duncan 进行多重比较分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 激素组合对丛生芽诱导的影响

如表 1 所示,  $\text{MSB} + 3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IBA +  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  KT 最适合周豆 02005 的丛生芽诱导,  $\text{MSB} + 3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IBA +  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  KT 则最适合于周豆 11、周豆 18 和中黄 20 的丛生芽诱导。最优激素组合诱导下, 不同基因型的大豆平均分化芽数不同, 其中以中黄 20 最易分化 (24.3 个), 周豆 02005 分化芽数最少 (14.3 个)。

### 2.2 不同激素对再生植株生根的影响

由图 1 可知, 不同激素适合于大豆再生植株生根的最优浓度不同, IBA (图 1-A) 为  $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 较适合大豆生根; 而 NAA (图 1-B) 的浓度为  $0.8 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 大豆再生植株的生根效果较好。4 个基因型大豆植株在 IBA 作用下进行生根时, 中黄 20、周豆 11 和周豆 18 要优于周豆 02005, 其中以中黄 20 生根数最多, 在最优激素浓度下平均生根数为 11.3 个。IBA 与 NAA 相比, 相同的浓度条件下, IBA 可以诱导植株再生出更多的根, 但试验中发现, NAA 诱导的再生根较粗壮, 而 IBA 诱导的根细弱, 植株移栽成活率低。

综合丛生芽诱导和生根试验, 在后续的试验中以中黄 20 为材料, 采用  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 进行生根诱导。

表 1 不同激素组合对大豆丛生芽诱导的影响

Table 1 Impact of different hormone combinations on soybean cluster bud induction

试验号 Test number	激素浓度 Hormone concentration/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$			平均芽数 Mean number of shoots			
	BA	IBA	KT	周豆 02005 Zhoudou 02005	中黄 20 Zhonghuang 20	周豆 18 Zhoudou 18	周豆 11 Zhoudou 11
1	2.5	0.1	0.2	9.0bc	10.3de	10.7cd	5.3c
2	2.5	0.2	0.5	8.3c	7.0e	7.3d	6.0c
3	2.5	0.3	0.8	4.0d	10.3de	8.7cd	10.0bc
4	3.0	0.1	0.5	14.3a	6.3e	20.3ab	7.0c
5	3.0	0.2	0.8	7.0cd	12.3cd	10.3cd	9.3c
6	3.0	0.3	0.2	7.0cd	16.7bc	10.0cd	11.0bc
7	3.5	0.1	0.8	8.3c	15.0cd	14.0c	16.0ab
8	3.5	0.2	0.2	9.3bc	24.3a	22.3a	19.0a
9	3.5	0.3	0.5	12.3ab	20.7ab	14.7bc	11.0bc

同列数值后不同小写字母表示 0.05 水平上差异显著。  
Values followed by different letters are significantly different at 0.05 probability level.

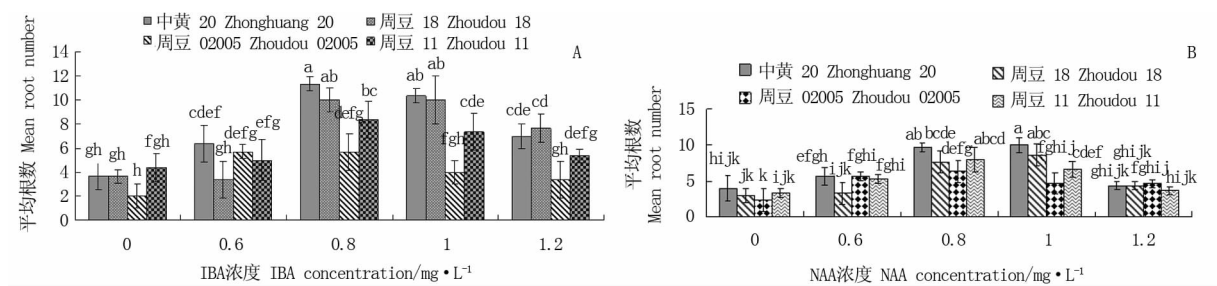


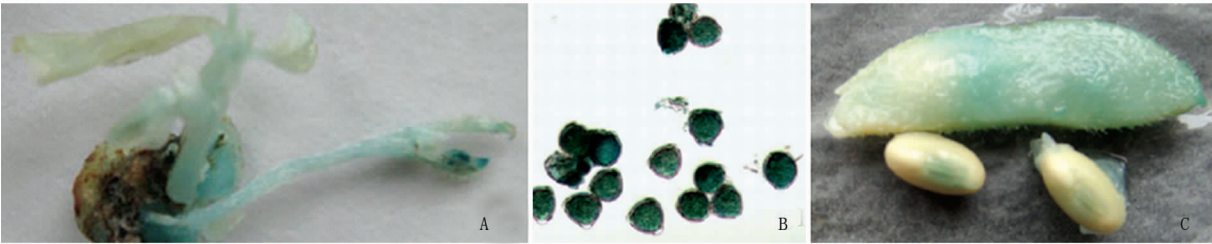
图 1 IBA (A) 和 NAA (B) 浓度对大豆生根的影响

Fig. 1 Effect of IBA (A) and NAA (B) concentration on soybean rooting

2.3 农杆菌介导的遗传转化

对中黄 20 的整体子叶节进行农杆菌介导的遗传转化时,转化率为 7.8%,转化周期由传统的单个子叶节的 56 d 以上缩短为 35 ~ 42 d。通过抗性芽、

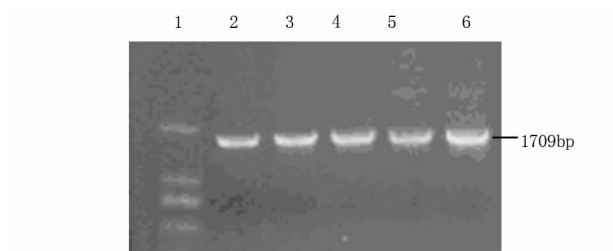
花粉粒、豆荚和种子 GUS 染色(图 2)以及 PCR 分析(图 3),初步表明外源基因已转入大豆的基因组中,同时说明整体子叶节完全可应用于大豆的遗传转化研究。



A: 抗性芽; B: 花粉粒; C: T1 豆荚和种子  
A: Resistant buds; B: Pollen grain; C: T1 pod and seeds

图 2 GUS 染色结果

Fig. 2 GUS staining result



1:DL Marker 2000; 2:阳性对照;3~6:GUS 染色阳性植株  
1:DL Marker 2000; 2: Positive control; 3-6:GUS positive plants

图3 PCR 检测结果

Fig.3 PCR analysis result

### 3 讨 论

本文突破了传统的单个子叶节的限制,以大豆的整体子叶节为外植体,通过分析不同激素组合对丛生芽诱导的影响,研究了不同基因型大豆整体子叶节的再生潜能以及整体子叶节应用于农杆菌介导的遗传转化的价值,为大豆的遗传转化研究提供新的转化材料,并将大豆的整体子叶节应用于农杆菌介导的遗传转化研究。对于豆类植物而言,离体再生具有很高的基因型依赖性<sup>[14]</sup>。本研究,4 种大豆基因型再生效率不同,中黄 20 最易再生。因此,选用中黄 20 进行了农杆菌介导的整体子叶节遗传转化。通过 GUS 染色和 PCR 分析,初步表明外源基因已转入大豆基因组中,转化率为 7.8%,虽然不及传统的单个子叶节的方法(16.4%)<sup>[11]</sup>,但可将转化周期由 56 d 以上缩短为 35~42 d。

延迟筛选易于外植体的恢复,提高转化率。Olhoft 等<sup>[11]</sup>的研究表明,延迟筛选易于获得转基因植株,同时可以提高转化率。在玉米 Hi-II 的遗传转化中,为期 4 d 的恢复培养可以将玉米愈伤组织的转化率提高 2.7 倍<sup>[15]</sup>。研究发现,共培养的第 2 天添加菌液,有利于保持侵染时的菌液浓度,提高转化率;同时以整体子叶节作为外植体,与传统的单个子叶节相比,外植体的受伤较轻,有利于外植体的恢复。

大肠杆菌的 *GUS* 基因作为报告基因是分析基因转移的有效手段<sup>[16]</sup>。外源基因能在花粉粒中表达对于基因转化的成功与否相当重要,花粉的 DNA 将会进入生殖细胞中,从而遗传给后代<sup>[17]</sup>。本文通过花粉粒等组织的 GUS 染色和 PCR 分析,初步表明外源基因已转入大豆的基因组中,最终得到 *GUS* 阳性的豆荚和种子,结果表明,本试验建立的以大豆整体子叶节为外植体的农杆菌介导遗传转化体系,能够较好地应用于大豆的遗传转化,并具有周期短和操作简单的特点,对于解决传统子叶节再生困难和周期长的问题、缩短大豆分子育种进程具有重要意义。

### 参考文献

- [1] Hinchey M A W, Connor-Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer[J]. *Nature Biotechnology*, 1988, 6: 915-922.
- [2] Liu S J, Wei Z M, Huang J Q. The effect of co-cultivation and selection parameters on *Agrobacterium*-mediated transformation of Chinese soybean varieties[J]. *Plant Cell Reports*, 2008, 27(3): 489-498.
- [3] Paz M M, Shou H, Guo Z, et al. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explants[J]. *Euphytica*, 2004, 136(2): 167-179.
- [4] Mello-Farias P C, Chaves A L S. Advances in *Agrobacterium*-mediated plant transformation with emphasis on soybean[J]. *Scientia Agricola*, 2008, 65(1): 95-106.
- [5] Uranbey S, Sevimey C S, Ozcan S. Development of high frequency multiple shoot formation (*Trifolium resupinatum* L.) [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2005, 80(2): 229-232.
- [6] Haliloglu K. Efficient regeneration system from wheat leaf base segments[J]. *Biologia Plantarum*, 2006, 50(3): 326-330.
- [7] Ma X H, Wu T L. Rapid and efficient regeneration in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] from whole cotyledonary node explants[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2008, 30(2): 209-216.
- [8] Cheng T Y, Saka H, Voqui-Dinh T H. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture[J]. *Plant Science Letters*, 1980, 19(2): 91-99.
- [9] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture [J]. *Physiologia Plantarum*, 1962, 15(3): 473-497.
- [10] Gamborg O L, Miller R A, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells[J]. *Experimental Cell Research*, 1968, 50(1): 151-158.
- [11] Olhoft P M, Flagel L E, Donovan C M, et al. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method[J]. *Planta*, 2003, 216(5): 723-35.
- [12] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. *GUS* fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. *The EMBO Journal*, 1987, 6(13): 3901-3907.
- [13] Kosugi S, Ohashi Y, Nakajima K, et al. An improved assay for  $\beta$ -glucuronidase in transformed cells: methanol almost completely suppresses a putative endogenous  $\beta$ -glucuronidase activity [J]. *Plant Science*, 1990, 70(1): 133-140.
- [14] Somers D A, Samac D A, Olhoft P M. Recent advances in legume transformation[J]. *Plant Physiology*, 2003, 131(3): 892-899.
- [15] Zhao Z Y, Gu W N, Cai T S, et al. High throughput genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in maize[J]. *Molecular Breeding*, 2001, 8(4): 323-333.
- [16] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1987, 5(4): 387-405.
- [17] Kagi C, Grob-Hardt R. How females become complex: cell differentiation in the gametophyte[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10(6): 633-638.