

农杆菌介导的大豆子叶节非组织 培养遗传转化体系优化

李丹丹, 张 洁, 刘 娜, 陈 琰, 韩胜芳, 王冬梅

(河北农业大学生命科学学院, 保定 071001)

摘要:本研究以 *GUS* 基因在子叶节区的瞬时表达为依据, 通过探讨影响农杆菌转化效率的因素, 优化了大豆子叶节非组织培养遗传转化体系; 利用该体系对冀豆 16 号进行 *Bar* 基因的遗传转化, 并使用针刺法对转基因植株进行草铵膦筛选。结果表明, 侵染液中附加 3% 蔗糖、 $OD_{600}=0.6$ 、以脱脂棉作为菌液附着介质同时不添加表面活性剂 Silwet L-77、侵染 1 次的 *GUS* 阳性率最高达到 62.13%。草铵膦抗性植株经 PCR 检测获得 T_0 阳性植株 10 个, 转化率为 2.5%。经 PCR 和 RT-PCR 鉴定共获得 3 株 T_1 阳性植株, 初步证明目的基因已整合到大豆基因组中。

关键词: 大豆; 子叶节; 非组织培养; 遗传转化; 草铵膦筛选

Optimization of the *Agrobacterium*-Mediated Genetic Transformation System of Soybean Cotyledonary Node With Non Tissue-Culture

LI Dan-dan, ZHANG Jie, LIU Na, CHEN Yan, HAN Sheng-fang, WANG Dong-mei

(College of Life Sciences, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001)

Abstract: By investigating the factors influencing the transformation efficiency of *Agrobacterium*, a genetic transformation system of soybean cotyledonary node with non tissue-culture was optimized using the transient expression of *GUS* in the region of cotyledonary node. Gene *Bar* was transformed into soybean Jidou 16, and the transgenic plants were screened by glufosinate injected on leaves. The results indicated that infection medium contains 3% sugar, $OD_{600}=0.6$, none Silwet L-77 with the absorbent cotton as attached media and the highest percentage of *GUS* positive was 62.13% by one time. We obtained 10 positive plants in T_0 generation after detected the transgenic plants resistant to glufosinate by PCR. The transformation efficiency was 2.5%. Three positive plants of T_1 generation were obtained by PCR and RT-PCR, which demonstrated that the target gene was integrated into the soybean genome.

Key words: Soybean; Cotyledonary node; Non tissue-culture; Genetic transformation; Glufosinate screening

大豆是全球重要的经济作物, 是食用油和蛋白的主要作物来源^[1-2]。利用分子育种的方法可以提高大豆的产量及品质。目前, 在大豆的遗传转化中常用的方法主要有农杆菌介导法^[3]和基因枪法^[4], 而农杆菌介导法中又以子叶节法最为常用^[5]。子叶节转化体系具有操作简便、外植体获得不受季节限制、操作周期较短等特点^[6]。但农杆菌介导的子

叶节遗传转化体系仍存在着组织培养过程中茎伸长和生根难的问题, 因此尝试建立一个非组织培养的子叶节遗传转化体系是解决上述问题的有效途径。王全伟等^[7]以大豆幼苗的顶端生长点和叶腋生长点为靶点, 通过农杆菌介导的整体转化法——注射法进行转录因子 *DREB1C* 基因的遗传转化, 最终获得 1 株阳性植株。该方法克服了大豆组织培养再生

收稿日期: 2011-10-10 修回日期: 2011-12-09

基金项目: 河北省科技攻关计划项目 (042401116D-1); 转基因生物新品种培育重大专项子课题 (2008ZX08004-002-1-5; 2009ZX08004-001B; 2011ZX08004-002-002)

作者简介: 李丹丹, 硕士研究生, 研究方向为植物抗逆生理及遗传转化。E-mail: lidandan. 123. xue@ 163. com

张洁, 博士研究生, 副教授, 并列第一作者。

通讯作者: 王冬梅, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事植物逆境分子细胞生物学领域的研究工作。E-mail: dongmeiwang63@ 126. com

难、转化率低的缺点,是一种高频、简单、快捷的非组织培养遗传转化途径。这种非组织培养的遗传转化方法在其他作物的转化中如苜蓿^[8]、拟南芥^[9-10]、白菜^[11-12]、萝卜^[13]、棉花^[14]、小麦^[15]等也得到了广泛应用。程云清等^[16]发明了一种以大豆子叶节为受体不依赖组织培养的大豆遗传转化新方法,该方法是依据农杆菌介导的子叶节法建立起来的。本试验以河北省推广的优良大豆品种为材料,试图通过对影响转化效率的多种因素进行研究,来优化农杆菌介导的大豆子叶节非组织培养遗传转化体系,为大豆分子育种研究打下良好的基础。

随着转基因生物安全越来越多的被人们关注,除草剂草铵膦已成为大豆转化中常用的筛选剂^[17],但在实际应用过程中一直存在着草铵膦筛选假阳性率高的问题。本试验通过比较叶片针刺法和涂抹法两种方法的筛选效率,以确立大豆子叶节非组织培养遗传转化体系的有效筛选方法,为今后大豆转化植株的筛选奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 供试大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.] 为河北省优良大豆品种:高蛋白品种冀豆 7 号和冀豆 16 号,脂肪氧化酶缺失品种五星 1 号。上述 3 个大豆品种的土培萌发率较高,可以提供较多的可用外植体,由河北省农林科学院粮油作物研究所提供。

1.1.2 农杆菌菌株和质粒 农杆菌菌株为 EHA105,质粒为 pCAMBIA3301,该质粒带有 *GUS* 报告基因和抗除草剂草铵膦 *Bar* 基因。

1.2 试验方法

1.2.1 大豆种子的萌发 选取成熟饱满、无病斑的大豆种子,播种于塑料花盆中,温室(光照强度 10000lx,14h 光照/10h 黑暗)25℃ 萌发 5d 后,待子叶变绿并稍稍展开时用于子叶节的转化。

1.2.2 农杆菌菌液的制备 从含有 50mg/L 利福平和 50mg/L 卡那霉素的 YEB 平板上挑取已转入质粒 pCAMBIA3301 的农杆菌 EHA105 单菌落,接种于 50ml 含有 50mg/L 利福平和 50mg/L 卡那霉素的 YEB 液体培养基中,28℃,180r/min 震荡培养过夜。将培养好的菌液 ($OD_{600} = 0.6$) 3000r/min 离心 10min 收集菌体,弃上清,用感染液[1/2 MS;3% 蔗糖;1.67mg/L BA;200μmol/L 乙酰丁香酮(As);8.8mmol/L 半胱氨酸(L-Cys);1.0mmol/L 二硫苏糖醇(DTT);pH5.4]重悬菌体至 $OD_{600} = 0.6$ 。

1.2.3 农杆菌介导的大豆子叶节转化 生长在沙土中的大豆苗萌发 5d 后(图 1,A),用手术刀片切去 1 片子叶,留取另 1 片子叶连同下胚轴,小心去除腋芽,并沿下胚轴方向轻划 5~6 刀(图 1,B 中箭头所示)。用镊子夹取适量脱脂棉放入配制好的农杆菌菌液中润湿至饱和,将脱脂棉放置于伤口处进行感染,然后将感染的大豆苗用黑色塑料袋套好保湿(图 1,C),25℃ 黑暗条件下共培养 3d。

1.2.4 农杆菌介导的大豆子叶节非组织培养转化体系优化 研究多种因素对转化效率的影响 试验在 1.2.2 和 1.2.3 的基础上对影响转化效率的多种因素进行研究,分别设置以下 5 个试验,所有试验均进行 3 次重复,每次重复每个处理外植体数≥30。

蔗糖浓度和表面活性剂 Silwet L-77:以冀豆 16 号为材料,感染液分为不添加和添加 0.01%~0.03% 的 Silwet L-77 两种,同时二者分别又设置 3%、5% 和 10% 3 个不同浓度的蔗糖处理,用此感染液进行子叶节的转化,重复感染 3 次,每天 1 次。

感染方式:以冀豆 16 号为材料,设计 3 种感染方式,见表 1,重复感染 3 次,每天 1 次。

感染次数:以冀豆 16 号为材料,感染时分别设 1、2 和 3 次重复处理。

感染液浓度 OD_{600} :以冀豆 16 号为材料,共设计 4 个感染液浓度即 $OD_{600} = 0.2、0.4、0.6$ 和 0.8 ,分别用这 4 个浓度的感染液进行感染。

大豆基因型:以冀豆 7 号、冀豆 16 号和五星 1 号为材料。

表 1 不同感染方式的感染液组成及操作方法
Table 1 Composition of infection medium and operation method for different ways of infection

| 感染方式 Ways of infection | 感染液组成及操作方法 Composition of infection medium and operation method |
|---------------------------|--|
| A | 感染液附加 3% 蔗糖,不添加 Silwet L-77,以脱脂棉作为菌液附着介质 |
| B | 感染液附加 3% 蔗糖,同时添加 Silwet L-77,滴加菌液至伤口处 |
| C | 感染液附加 3% 蔗糖,同时添加 Silwet L-77,滴加此菌液至伤口处,待菌液完全渗入再以脱脂棉作为菌液附着介质,使只附加 3% 蔗糖不添加 Silwet L-77 的菌液附着于伤口 |

GUS 基因在子叶节区瞬时表达的检测 *GUS* 瞬时表达分析可以作为外源基因进入受体细胞的指示^[18],因此以共培养 3d 后 *GUS* 在子叶节区的瞬时

表达为依据,通过计算 GUS 阳性(GUS⁺)率来研究不同因素对农杆菌转化效率的影响。共培养结束后,切取带有一部分子叶和一部分下胚轴的子叶节区外植体进行 GUS 染色检测,以非转基因的外植体作为阴性对照。先将切取的外植体用蒸馏水清洗 3 遍以去除农杆菌,用滤纸吸干水分后将外植体浸泡在 X-gluc 染液 [50mmol/L PBS pH 7.0 (50mmol/L NaH₂PO₄; 50mmol/L Na₂HPO₄), 10mmol/L Na₂EDTA, 0.1% (v/v) Triton X-100, 0.5mmol/L 铁氰化钾, 0.5mmol/L 亚铁氰化钾, 20% (v/v) 甲醇, 1g/L X-gluc] 中,于 37℃ 染色 24h,去除染色液,依次用 70%、80%、90% 和 100% 的乙醇梯度脱色,实体显微镜(OLYMPUS SZX16) 下观察并拍照。记录 GUS 在子叶节区表达的外植体数并计算 GUS 阳性率 [GUS 阳性率 = (GUS 在子叶节区表达的阳性外植体数 / 染色总外植体数) × 100%]。

1.2.5 转化芽的诱导和植株再生 共培养结束后将塑料袋揭去(图 1,D),用浓度为 3.34mg/L 的 BA 水溶液浸润脱脂棉后置于子叶节部位,再套白色透明塑料袋保湿(图 1,E),置于光照下 25℃ 诱导培养。诱导 7~9d 后待子叶节部位长出丛生芽(图 1,F 中箭头所示),揭去白色塑料袋和脱脂棉进行正常培养。10d 后丛生芽即可伸长并长成枝条(图 1,G),3~4 个月即可获得转基因后代(图 1,H)。

1.2.6 T₀/T₁ 转基因植株的 PCR 检测 采用 CTAB 法提取大豆叶片基因组 DNA^[19],用 GUS 基因引物和 Bar 基因引物进行 PCR 鉴定。引物序列分别为 GUSF1: 5'-CATCGCAGCGTAATGCTCTA-3'; GUSR1: 5'-AACGTATCCACGCCGTATTC-3', Bar1: 5'-ACGCTCTTGAAGCCCTGT-3'; Bar2: 5'-GCAC-CATCGTCAACCACT-3'。PCR 反应体系为 20μl,其中 10 × Taq Reaction Buffer 2μl, dNTP 1μl, 引物各 0.5μl, Taq DNA Polymerase 0.3μl, 大豆基因组 DNA 1μl, 去离子水 14.7μl。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 8min; 94℃ 变性 1min, 复性 45s (GUS 引物退火温度为 63℃、Bar 引物退火温度为 62.2℃), 72℃ 延伸 (GUS 引物为 1min 15s、Bar 引物为 50s), 35 个循环; 72℃ 延伸 10min。GUS 引物的扩增产物长度为 1019bp、Bar 引物的扩增产物长度为 300bp。PCR 产物采用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。最后对 T₀ 转基因植株的再生率、PCR 阳性率和转化率进行计算 [再生率 = (再生植株数 / 转化植株数) × 100% ; PCR 阳性率 = (Bar 阳性中 GUS PCR 阳性数 / 草铵膦抗性植株数) × 100% ; 转

化率 = (Bar 阳性中 GUS PCR 阳性数 / 转化植株数) × 100%]。

1.2.7 T₁ 转基因植株的 RT-PCR 检测 对 T₁ PCR 检测呈阳性的转基因植株进行 RT-PCR 检测。利用 TaKaRa 公司的 RNAiso Plus 试剂提取大豆叶片总 RNA,然后以 TaKaRa 公司的反转录试剂盒进行反转录得到双链 cDNA,以 cDNA 为模板进行 RT-PCR 检测。分别用 Bar1、Bar2 和 GUS1、GUS2 (GUS1: 5'-CGACGGCCTGTGGGCATTCA-3'; GUS2: 5'-TGGTCGTGCACCATCAGCAC-3') 引物进行 PCR,反应体系及反应条件同 1.2.6。GUS1、GUS2 引物退火温度为 65.2℃, 72℃ 延伸 1min 15s,扩增产物长度为 900bp。

1.2.8 叶片针刺法和涂抹法草铵膦适宜筛选浓度的摸索 以非转基因大豆为试验材料,进行两种方法适宜筛选浓度的摸索。共设计 6 个草铵膦浓度,分别为 0、50、100、150、200、250mg/L。待大豆植株第 2 片 3 出复叶完全展开且第 3 片 3 出复叶还未展开时,此时叶片较嫩,分别用以上 6 个浓度进行针刺和涂抹,7d 后观察叶片及植株的生长情况。每个浓度处理 12 株植株,每个处理重复 3 次。

针刺法:用 1.0ml 的微量注射器吸取一定量配制好的草铵膦溶液,缓慢推动注射器柄当针头处水滴将要自然滴下时(约 0.02ml),在叶片偏上部主叶脉两侧分别进行针刺,使水滴覆盖在针刺后叶片留下的小孔上方。7d 后观察叶片及整个枝条的变化。

涂抹法:用棉签蘸取配制好的草铵膦溶液,在叶片的中心区域进行均匀涂抹。7d 后观察叶片及整个枝条的变化。

1.2.9 叶片针刺法和涂抹法对转基因再生植株进行草铵膦筛选 转化再生芽生长约两周后,在每个枝条上任意选取 1 片 3 出复叶进行草铵膦的针刺和涂抹。7d 后观察叶片及枝条的生长情况,保留抗性枝条并去除阴性枝条。对草铵膦抗性植株取样进行 Bar 基因的 PCR 检测,计算筛选效率 [筛选效率 = (Bar 基因 PCR 阳性植株数 / 草铵膦抗性植株数) × 100%]。

2 结果与分析

2.1 农杆菌介导的大豆子叶节非组织培养遗传转化体系的优化

2.1.1 蔗糖浓度和表面活性剂 Silwet L-77 对转化效率的影响 GUS 阳性率统计结果见表 2 和表 3,

子叶节区的 GUS 染色结果见图 2,其中在子叶节区出现蓝色的为阳性外植体,表明 GUS 基因在子叶节区进行了瞬时表达(图 2,A、B、C 和 D)。图 2E 为非转基因的阴性对照。

由表 2 可以看出,侵染液中不添加 Silwet L-77

且蔗糖浓度为 3% 时 GUS 阳性率达到 44.05%,显著高于其他处理。对丛生芽得率的统计结果与 GUS 染色的统计结果一致(表 3),即侵染液中不添加 Silwet L-77、同时附加 3% 的蔗糖时其丛生芽得率最高,达到了 60.40%。



图 1 农杆菌介导的大豆子叶节非组织培养遗传转化体系的操作及获得的转基因植株

Fig. 1 Operation and the transgenic plants of the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation system of soybean cotyledonary node with non tissue-culture

A:大豆种子土培萌发 5d;B:切取子叶节外植体,圆圈和箭头分别表示子叶节区和刀痕;C:套黑塑料袋共培养 3d;
D:共培养结束后外植体状态;E:套白塑料袋保湿进行芽诱导;F:诱导 10d 后丛生芽的状态,箭头表示丛生芽;
G:丛生芽生长 10d 后的状态;H:转化后 3~4 个月获得的转基因 T_0 植株

A: Soybean seeds germinated in sandy soil for 5 days; B: Cotyledonary node explant. The circle and arrow indicate the region of a cotyledonary node and the wound by a scalpel, respectively; C: Co-cultivation for 3 days by covering the black plastic bag;
D: Explants after co-cultivation; E: Multiple shoots induced with covering the white plastic bag to keep moisture;
F: Multiple shoots induced for 10 days; G: Multiple shoots elongated for 10 days;
H: T_0 transgenic plants after transformation for 3-4 months

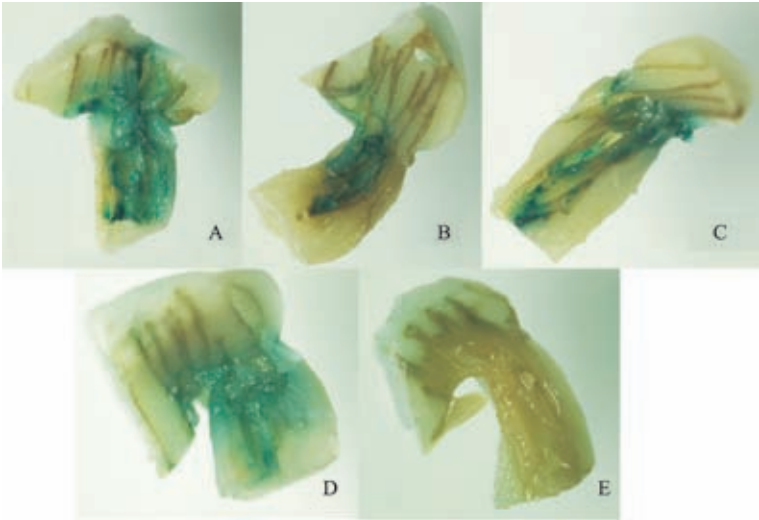


图 2 GUS 基因在子叶节区的瞬时表达

Fig. 2 Transient expression of GUS gene in the region of cotyledonary node

A-D:GUS 染色阳性外植体;E:阴性对照(16 ×)
A-D:GUS staining positive explants;E:negative control(16 ×)

表 2 不同蔗糖浓度和表面活性剂 Silwet L-77 对 GUS 阳性率的影响

Table 2 Effect of different concentrations of sugar and surfactant Silwet L-77 on the percentage of GUS positive

| 处理 Treatment | 蔗糖浓度(%) Concentrations of sugar | 外植体总数 Total of explants | GUS 阳性率(%) Percentage of GUS positive |
|-----------------|---------------------------------------|-------------------------------|---|
| 不添加 | 3 | 109 | 44.05 ± 1.66a |
| Silwet L-77 | 5 | 97 | 28.74 ± 2.44b |
| | 10 | 92 | 11.94 ± 1.73c |
| 添加 | 3 | 102 | 10.74 ± 0.93c |
| Silwet L-77 | 5 | 102 | 11.67 ± 1.44c |
| | 10 | 103 | 9.66 ± 0.76c |

表中数据均来自 3 次重复试验,小写字母代表 5% 的差异显著水平,多重比较采用 LSD 法。下同

The data in the table were devived from three repeated experiments. Small letter means significant difference at 5% level by LSD. The same as below

表 3 不同因素对丛生芽得率和 GUS 阳性率的影响

Table 3 Effect of different factors on the regeneration rate of multiple shoots and the percentage of GUS positive

| 因素 Factors | 处理 Treatments | 丛生芽得率(%) Regeneration rate of multiple shoots | GUS 阳性率(%) Percentage of GUS positive |
|---|------------------|---|---|
| 蔗糖浓度(%) Concentrations of sugar | 3 | 60.40 ± 2.83a | — |
| | 5 | 50.45 ± 1.75b | — |
| | 10 | 46.82 ± 1.06b | — |
| 侵染方式 Ways of infection | A | 61.66 ± 3.96a | 43.53 ± 1.76b |
| | B | 26.77 ± 3.49b | 61.94 ± 1.73a |
| | C | 15.21 ± 1.71c | 18.26 ± 1.41c |
| 侵染次数 Times of infection | 1 | 73.14 ± 2.30a | 62.13 ± 2.59a |
| | 2 | 67.36 ± 1.20b | 53.01 ± 1.34b |
| 侵染液浓度 (OD ₆₀₀) Concentrations of infection medium | 3 | 61.31 ± 1.34c | 43.24 ± 3.10c |
| | 0.2 | — | 27.58 ± 1.58d |
| | 0.4 | — | 40.82 ± 2.62c |
| | 0.6 | — | 61.00 ± 2.30a |
| 大豆基因型 Soybean genotypes | 0.8 | — | 54.85 ± 1.69b |
| | J-16 | — | 61.79 ± 1.56a |
| | J-7 | — | 18.67 ± 1.77b |
| | WX-1 | — | 13.37 ± 1.17c |

2.1.2 不同侵染方式对转化效率的影响 表面活性剂有较强的渗透能力,在侵染液中添加 Silwet L-77 等物质往往可以代替抽真空操作^[20]。但是用脱脂棉作为菌液附着介质可能会降低 Silwet L-77 的渗透能力,且这种操作方式因菌液与伤口的作用时间较长而对伤口处的细胞伤害较大,最终出现 GUS 阳

性率降低的情况。不同侵染方式试验表明(表 3),使用 A 组侵染液及操作方式时获得最高的丛生芽得率达 61.66%,GUS 阳性率为 43.53%;使用 B 组侵染液及操作方式时获得最高的 GUS 阳性率为 61.94%,但其丛生芽得率较低仅为 26.77%;使用 C 组侵染液及操作方式时 GUS 阳性率和丛生芽得率均为最低。以上结果表明选择 A 组侵染液及操作方式既能保证一定的 GUS 阳性率,也能获得较高的丛生芽得率。

2.1.3 重复侵染次数对转化效率的影响 侵染方式 A 的 GUS 阳性率较低只有 43.53%,可能是由于重复侵染 3 次对伤口处细胞的伤害太大造成的。因此为了确定最适侵染次数,分别进行 1、2 和 3 次不同次数的侵染,试验表明,在只进行 1 次侵染的条件下分别获得了最高的 GUS 阳性率(62.13%)和丛生芽得率(73.14%),均显著高于 2 次和 3 次侵染时的 GUS 阳性率和丛生芽得率(表 3)。

2.1.4 不同侵染液浓度对转化效率的影响 表 3 显示,当侵染液浓度为 OD₆₀₀ = 0.6 时,获得最高的 GUS 阳性率 61.00% 且显著高于其他处理。同时 GUS 染色结果表明,随着侵染液浓度的增加,GUS 在子叶节区的着色面积逐渐增大。当 OD₆₀₀ = 0.8 时,GUS 染色面积最大,但其 GUS 阳性率却低于 OD₆₀₀ = 0.6 时的比率。所以,最终确定侵染液浓度为 OD₆₀₀ = 0.6 时适于本转化体系。

2.1.5 不同大豆基因型对转化效率的影响 利用上述已优化了的转化体系对 3 种基因型大豆进行转化。从表 3 中可以看出,冀豆 16 号的 GUS 阳性率为 61.79%,显著高于冀豆 7 号和五星 1 号。不同基因型之间 GUS 阳性率的差异如此之大,也许与不同基因型所要求的转化条件不同有关,但根本原因可能还是由于冀豆 16 号为易感大豆基因型所致。

2.2 冀豆 16 号 T₀ 转基因植株的 PCR 检测

采用已优化了的子叶节非组织培养转化体系对冀豆 16 号进行遗传转化,获得的再生植株经过除草剂草铵膦筛选后,提取抗性 T₀ 转基因大豆叶片的基因组 DNA,用 GUS 引物和 Bar 引物分别进行 PCR 扩增。以 pCAMBIA3301 质粒作为阳性对照,非转化大豆植株作为阴性对照,PCR 结果显示,分别扩增得到了 GUS(图 3,A)和 Bar(图 3,B)基因相应的条带,大小分别为 1019bp 和 300bp,同一植株上均扩增出两条条带的为阳性植株。在所有筛选得到的除草剂抗性植株中,两对引物的 PCR 扩增结果均呈阳性的共有 10 株,T₀ PCR 阳性率为 8.3%。

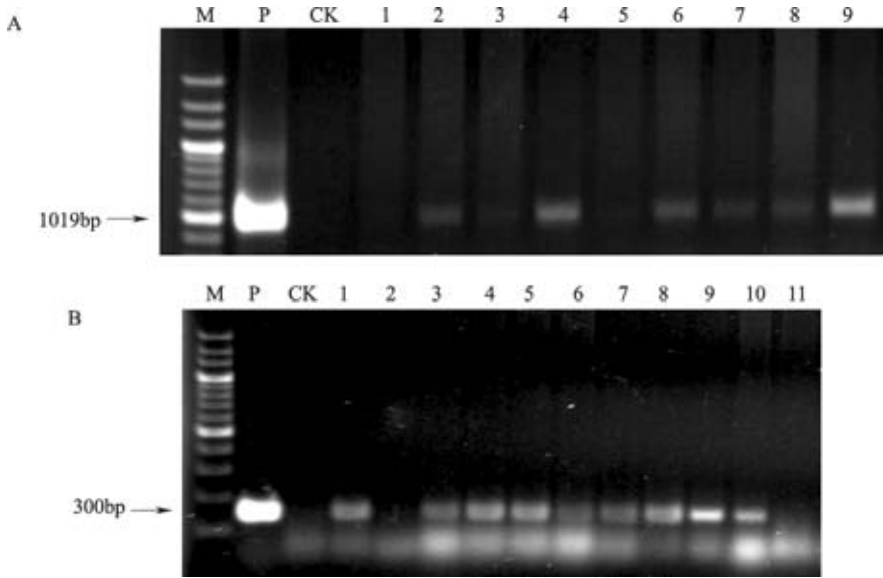


图3 冀豆16号T₀转基因植株的PCR检测

Fig. 3 Detection of T₀ transgenic plants of Jidou 16 by PCR

M;200 bp DNA ladder;P;pCambia3301 质粒(阳性对照);CK;非转基因植株(阴性对照)

A:用GUS引物对GUS基因片段进行PCR扩增。2,4,6-9为GUS阳性转基因植株,1,3和5为GUS阴性转基因植株

B:用Bar引物对Bar基因片段进行PCR扩增。1,3-10为Bar阳性转基因植株,2和11为Bar阴性转基因植株

M;200 bp DNA ladder;P;pCambia3301 plasmid(positive control);CK;non-transformed plant(negative control)

A:GUS gene segment amplified using GUS primer. 2,4,6-9;GUS-positive transgenic plants;1,3,5;GUS-negative transgenic plants

B:Bar gene segment amplified using Bar primer. 1,3-10;Bar-positive transgenic plants;2,11;Bar-negative transgenic plants

2.3 冀豆16号T₁转基因植株的PCR及RT-PCR检测

收获上述10株T₀PCR阳性植株的种子27粒,播种后即T₁转基因植株。提取其叶片基因组DNA后同样用GUS引物和Bar引物分别对GUS基因片段和Bar基因片段进行PCR扩增。结果显示,只有3株用两对引物均能扩增得到对应的GUS和Bar基因片段,为阳性植株;其他植株均没有扩增出条带,为阴

性植株。3株PCR阳性植株经草铵膦筛选后均表现抗性,表明目的基因已在大豆基因组中得到稳定遗传。

提取上述3株T₁转基因植株的总RNA,进行转录水平的分子检测。RT-PCR结果如图4,3株转基因植株中都分别扩增得到了Bar基因片段(300bp)和GUS基因片段(900bp),表明目的基因已在转录水平进行了表达。

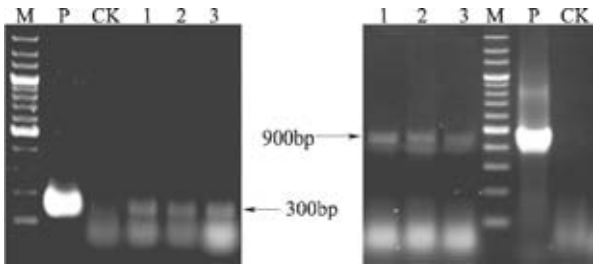


图4 冀豆16号T₁转基因植株的RT-PCR检测

Fig. 4 Detection of T₁ transgenic plants of Jidou 16 by RT-PCR

M;200 bp DNA ladder;P;pCambia3301 质粒(阳性对照);CK;非转基因植株(阴性对照);

1-3;T₁阳性转基因植株(左:Bar引物扩增;右:GUS引物扩增)

M;200bp DNA ladder;P;pCambia3301 plasmid(positive control);CK;non-transformed plant(negative control);

1-3;T₁ positive transgenic plants. Left;amplified with Bar primer;Right;amplified with GUS primer

2.4 转基因植株对草铵膦的抗性检测

2.4.1 叶片针刺法和涂抹法草铵膦适宜筛选浓度的确定 使用两种方法对非转基因大豆进行草铵膦处理时都出现随着天数增加施用草铵膦的叶片逐渐褪绿甚至枯焦的现象,但 7d 后随着草铵膦浓度的增加,叶片的枯焦面积和程度也越来越大(图 5, A 和

B),最后直至整个叶片死亡脱落,严重时出现植株茎尖枯焦死亡的现象(图 5, C)。使用针刺法草铵膦浓度为 150mg/L、涂抹法草铵膦浓度为 200mg/L 时,均出现叶片全部枯焦脱落、植株茎尖枯焦死亡的现象,从而确定 150mg/L 和 200mg/L 分别为针刺法和涂抹法的最适筛选初浓度。

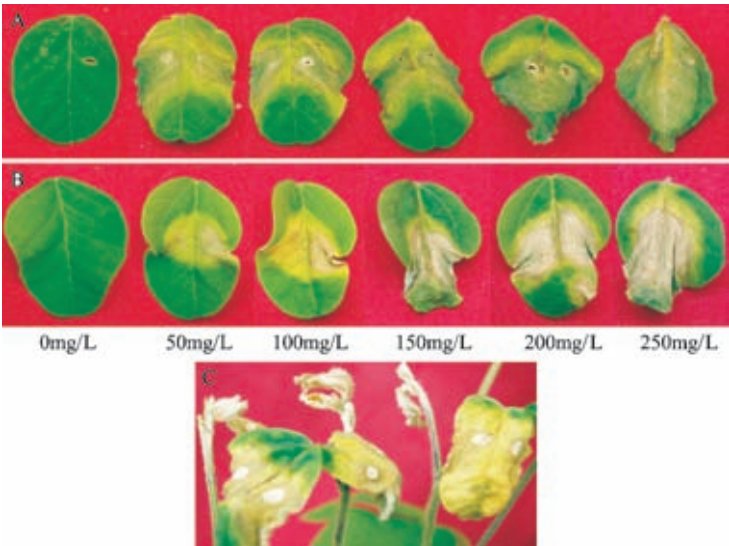


图 5 叶片针刺和涂抹草铵膦筛选的适宜浓度试验

Fig. 5 Test of the appropriate concentrations of glufosinate to screen plants with glufosinate injected and painted on leaves

A:不同浓度草铵膦针刺法筛选 7d 后的叶片情况;B:不同浓度草铵膦涂抹法筛选 7d 后的叶片情况;
C:针刺法和涂抹法筛选 7d 后植株茎尖死亡的情况
A: Leaf symptoms for 7d after injecting different concentration of glufosinate; B: Leaf symptoms for 7d after painting different concentration of glufosinate; C: Death of stem tip after 7d injecting and painting glufosinate

2.4.2 叶片针刺法和涂抹法筛选效率的比较 分别用这两种方法在最适筛选浓度下对转化再生植株进行筛选(图 6)。针刺法获得 *Bar* 基因 PCR 植株

为 49 株,筛选效率为 27.2%;涂抹法获得 *Bar* 基因 PCR 植株为 12 株,筛选效率仅为 9.1%,从而确定针刺法是适合此转化体系的有效筛选方法。

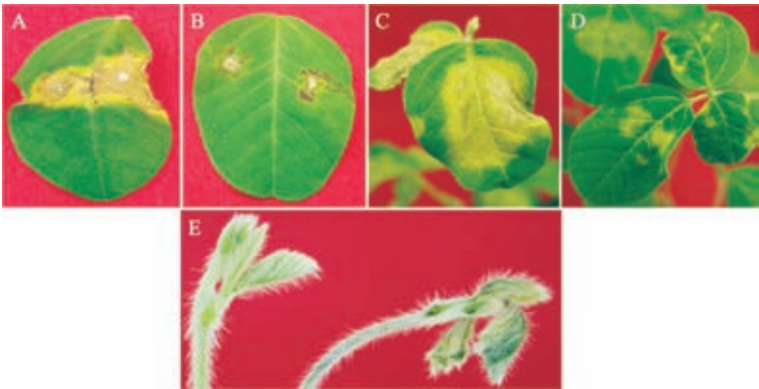


图 6 针刺法和涂抹法对转化再生植株的筛选

Fig. 6 The transformed regenerated plants screened by glufosinate injected and painted on leaves
A: 针刺法筛选转化再生植株阴性叶片; B: 针刺法筛选转化再生植株阳性叶片; C: 涂抹法筛选转化再生植株阴性叶片; D: 涂抹法筛选转化再生植株阳性叶片; E: 针刺法和涂抹法筛选转化再生植株茎尖对比(左:阳性;右:阴性)
A: Leaf symptom of negative transformed plants screened by injecting glufosinate; B: Leaf symptom of positive transformed plants screened by injecting glufosinate; C: Leaf symptom of negative transformed plants screened by painting glufosinate; D: Leaf symptom of positive transformed plants screened by painting glufosinate; E: Comparison of the stem tip of transformed plants after injecting and painting glufosination on leaves (left: positive; right: negative)

3 讨论

在大豆的遗传转化中,农杆菌介导的子叶节转化是最常用的一种方法^[21-23],但该方法在芽伸长和生根方面存在着效率低和费时的难题。程云清等^[16]发明了一种以大豆子叶节为受体不依赖组织培养的大豆遗传转化新方法,该方法有效地解决了芽伸长和生根难的问题。本研究以传统子叶节原理为基础,探讨了蔗糖、表面活性剂、侵染方式、侵染次数、侵染液浓度及大豆基因型对转化效率的影响,优化了农杆菌介导的大豆子叶节非组织培养遗传转化体系,并利用该体系对河北省优良大豆品种冀豆 16 号进行了 *Bar* 基因的遗传转化,植株再生率达 71.2%,转化率为 2.5%。

表面活性剂 Silwet L-77 是一种有机硅化合物,能够减少表面张力使菌体更容易进入植物的伤口^[24]。在拟南芥^[20]、小麦^[25-26]、萝卜^[13]和油菜^[27]的遗传转化研究中发现,使用 Silwet L-77 能够提高农杆菌介导的转化效率。Liu 等^[24]首次证明在共培养基中添加 Silwet L-77 能够促进农杆菌介导的大豆子叶节转化。而本研究的结果恰恰相反,但 B 侵染方式使用 Silwet L-77 提高了转化效率却与其相吻合。这可能是由于在结果 2.1.1 中,Silwet L-77 的渗透作用被脱脂棉减弱,菌液更多地被吸附在脱脂棉中而不能进入植株的伤口,使转化率降低;而在结果 2.1.2 中 B 侵染方式有利于 Silwet L-77 发挥渗透作用,使转化率提高。另一方面由于 Silwet L-77 存在一定的毒性,其接触的伤口处细胞因伤害太大而导致死亡,所以在结果 2.1.1 和 2.1.2 中出现了因添加 Silwet L-77 使转化效率和丛生芽得率降低的现象。

高渗培养基可以减少伤口处的细胞伤流液,使细胞内或液泡变小并发生一定程度的质壁分离,使农杆菌易于接触伤口周围的细胞,从而提高转化效率^[28]。本研究探讨了不同蔗糖浓度对转化效率的影响,结果表明 3% 的蔗糖浓度最适合此体系进行农杆菌转化。这一结果与一般的大豆子叶节转化法使用的蔗糖浓度一致^[21-23]。高浓度的蔗糖不利于转化可能是由于蔗糖浓度过高,渗透压过大会导致伤口处细胞脱水,发生严重的质壁分离而导致细胞死亡,从而降低转化效率,同时也不利于丛生芽的再生。

农杆菌的转化是一个反复发生的过程,存活在植株体内的农杆菌的转化活力会随时间的推移而下降,反复侵染可以增加具转化活性的农杆菌数目及

转化的几率^[29],这已在拟南芥^[20,30]和油菜^[27,31]的转化中得以证明。而本研究结果表明 1 次侵染比多次侵染更利于农杆菌的转化,这可能是由于侵染次数过多会使菌体存留太多、侵染时间太长,对细胞的伤害加重而导致死亡,从而使 GUS 阳性率和丛生芽得率都降低。

侵染液浓度对 T-DNA 的转移有极强的效应^[32]。本研究结果表明侵染液浓度为 $OD_{600} = 0.6$ 时 GUS 阳性率最高,有利于农杆菌的转化。但随着侵染液浓度的增加,GUS 在子叶节区的着色面积是逐渐增大的。这可能是由于侵染液浓度越大,农杆菌的密度越大,其侵染子叶节区时有效的 T-DNA 转移则越多,所以 GUS 在子叶节区的着色面积越大;但是侵染液浓度过大,则导致子叶节区细胞的死亡,所以能进行 GUS 瞬时表达的外植体数量减少,GUS 阳性率降低。

为了解决草铵膦筛选假阳性率高的问题,本研究首次使用针刺法对转化植株进行草铵膦筛选,并与叶片涂抹法进行筛选效率的比较,发现针刺法明显优于涂抹法。使用针刺法筛选时能够对草铵膦进行定量实施,而涂抹法在涂抹时不容易掌握草铵膦的量,涂抹面积和涂抹量不能准确把握;另一方面由于草铵膦是内吸式除草剂,它的有效成分经叶脉渗入参与代谢^[33],针刺法筛选时草铵膦更容易进入叶脉传输,而涂抹法筛选时草铵膦进入叶脉易受气孔开度即蒸腾作用的影响。因此针刺法比涂抹法更准确,筛选效率更高。但是这种方法与涂抹法一样,受叶龄的影响较大^[34],使用该方法筛选时要掌握叶片叶龄的选择。

参考文献

- [1] Stacey G, Vodkin L, Parrott W A, et al. National science foundation-sponsored workshop report. Draft plan for soybean genomics [J]. *Plant Physiol*, 2004, 135: 59-70
- [2] Alkharouf N W, Matthews B F. SGMD: the Soybean genomics and microarray database [J]. *Nucleic Acid Res*, 2004, 32: 398-400
- [3] Hinchey M A W, Conner-Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer [J]. *Nat Biotechnol*, 1988, 6: 915-922
- [4] Vain P, McMullen M D, Finer J J. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize [J]. *Plant Cell Rep*, 1993, 12: 84-88
- [5] Cho H J, Widholm J M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the legume *Astragalus sinicus* using kanamycin resistance selection and green fluorescent protein expression [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cul*, 2002, 69: 251-258
- [6] 于洋, 侯文胜, 韩天富. 农杆菌介导大豆遗传转化技术的研究进展 [J]. *大豆科学*, 2010, 29(4): 696-701
- [7] 王全伟, 张海玲, 白晶, 等. 农杆菌介导的大豆植株整体转化 [J]. *大豆科学*, 2008, 27(2): 190-193

- [8] Trieu A T, Burleigh S H. Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium* [J]. Plant J, 2000, 22: 531-541
- [9] Birch R G. Plant transformation: problem and strategies for practical application [J]. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1997, 48: 297-326
- [10] Bent A F. Arabidopsis in planta transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species [J]. Plant Physiol, 2000, 124(12): 1540-1547
- [11] 张广辉, 巩振辉, 薛万新. 大白菜和油菜真空渗入遗传转化法初报 [J]. 西北农业大学学报, 1998, 26(4): 81-86
- [12] Cao M Q, Liu F, Yao L, et al. Transformation of pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*) by *Agrobacterium* infiltration [J]. Mol Breed, 2000, 6: 67-72
- [13] Curtis I S, Nam H G. Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. *longipinnatus* Bailey) by floral-dip method—plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency [J]. Transgenic Res, 2001, 10: 363-371
- [14] Chen T Z, Wu S J, Zhao J, et al. Pistil drip following pollination: a simple in planta *Agrobacterium*-mediated transformation in cotton [J]. Biotechnol Lett, 2010, 32: 547-555
- [15] 王宏芝, 魏建华, 李瑞芬. 农杆菌介导的小麦生殖器官的整体转化 [J]. 中国农业科技导报, 2004, 6(3): 22-25
- [16] 程云清, 刘剑锋, 赵桂兰, 等. 一种以大豆子叶节为受体不依赖组织培养的大豆遗传转化新方法: 中国. 101736028 [P]. 2010-06-16
- [17] Zeng P, Vadnais D A, Zhang Z, et al. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium* mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] [J]. Plant Cell Rep, 2004, 22: 478-482
- [18] 于娅, 刘莉莎, 赵永钦, 等. 影响花椰菜农杆菌介导转化因素的研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(3): 320-325
- [19] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 744
- [20] Clough S, Bent A. Floral dip, a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant J, 1998, 16(6): 735-743
- [21] 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): 723-735
- [22] Chen S Y. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [J]. Acta Bot Sin, 2004, 46: 610-617
- [23] Cheng T Y, Saka T, Voqui-Dinh T H. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segment in culture [J]. Plant Sci Lett, 1980, 19(2): 91-99
- [24] 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 Rep, 2008, 27(3): 489-498
- [25] Cheng M, Fry J E, Pang S Z, et al. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Physiol, 1997, 115(3): 971-980
- [26] Wu H, Sparks C, Amoah B, et al. Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat [J]. Plant Cell Rep, 2003, 21(7): 659-668
- [27] 刘凡, 王国英, 曹鸣庆. 农杆菌介导的植物原位转基因方法研究进展 [J]. 分子植物育种, 2003, 1(1): 108-116
- [28] 周延清, 刘艳菊, 李敏, 等. 根癌农杆菌介导反义 *fad2-1* 基因转化大豆的研究 [J]. 河南农业科学, 2010, (9): 17-21
- [29] 邹智, 卢长明. 整株转化法及其在油菜上的应用与展望 [J]. 植物学报, 2009, 44(2): 236-244
- [30] Richardson K, Fowler S, Pullen C, et al. T-DNA tagging of a flowering-time gene and improved gene transfer by in planta transformation of *Arabidopsis* [J]. Aust J Plant Physiol, 1998, 25(1): 125-130
- [31] 付绍红, 李应泽, 杨洪全, 等. 表面活性剂 silwet-77 对 floral-dip 转化甘蓝型油菜效果的影响 [J]. 分子植物育种, 2004, 2(5): 661-666
- [32] 李文霞, 宁海龙, 吕文河, 等. 农杆菌介导大豆子叶节转化系统的优化 [J]. 中国农业科学, 2008, 41(4): 971-977
- [33] 朱晋云, 许玉娟, 杨丽萍, 等. 小麦组织培养再生系统及农杆菌介导的转基因技术研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(1): 84-89
- [34] 孙磊, 韩俊友, 李宏宇. 大豆再生植株抗草铵膦的筛选方法研究 [J]. 大豆科学, 2010, 29(6): 1019-1023

欢迎订阅 2013 年《大豆科学》

《大豆科学》是由黑龙江省农业科学院主管主办的大豆专业领域学术性期刊,也是被国内外多家重要数据库和文摘收录源收录的重点核心期刊。主要刊登有关大豆遗传育种、品种资源、生理生态、耕作栽培、植物保护、营养肥料、生物技术、食品加工、药用功能及工业用途等方面的学术论文、科研报告、研究简报、国内外研究述评、学术活动简讯和新品种介绍等。

《大豆科学》主要面向从事大豆科学研究的科技工作者,大专院校师生、各级农业技术推广部门的技术人员及科技种田的农民。

国内外公开发行,双月刊,16 开本,每期 180 页。国内每期订价:10.00 元,全年 60.00 元,邮发代号:14-95。国外每期订价:10.00 美元(包括邮资),全年 60 美元。国外由中国国际图书贸易总公司发行,北京 399 信箱。国外代号:Q5587。

本刊热忱欢迎广大科研及有关企事业单位刊登广告,广告经营许可证号:2301030000004。

地址:(150086)哈尔滨市南岗区学府路 368 号《大豆科学》编辑部。

电话:0451-86668735

E-mail: dadoukx@ sina. com ddkexue@ 126. com