

大豆胚芽尖再生体系的建立及转基因初步研究

孙文丽^{1,2,3}, 刘昱辉^{2,3}, 吴元华¹, 傅俊范¹

(1.沈阳农业大学植物保护学院, 沈阳 110161; 2.中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081;

3.农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程, 北京 100081)

摘要:建立了吉林小粒 1 号的胚芽尖再生体系, 对胚芽尖、子叶节、胚轴作为外植体的重生芽发生频率及主要影响因素进行了比较。结果表明, 胚芽尖重生芽发生频率高, 再生时间短, 对卡那霉素敏感, 合适的筛选浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以吉林小粒 1 号胚芽尖为外植体, 将植物表达载体 w10 通过农杆菌 (LBA4404) 导入吉林小粒 1 号, 在农杆菌中孵育 6 h, 筛选培养基上重生芽发生频率高, 成功获得了再生植株。

关键词:大豆组培; 胚芽尖; 子叶节; 胚轴

中图分类号: S565.1; Q78

文献标识码: A

文章编号: 0439-8114(2008)06-0615-04

A Pilot Study of An Soybeans Embryonic Tip Regeneration System

SUN Wen-li^{1,2,3}, LIU Yu-hui^{2,3}, WU Yuan-hua¹, FU Jun-fan¹

(1.Plant Pathology Department, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161, China;

2.Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

3.Important Scientific Engineerings of Crops Gene Resources and Gene Improvement of China, Beijing 100081, China)

Abstract: In order to improve the quality of Jilinxiao No.1, the embryonic tip regeneration system was set up according to the method of Wei-Zhi-ming. The differences of the multiple shoot frequency among embryonic tip, cotyledonary node and hypocotyl segment was compared with statistic analytical method. The result indicatd that embryonic tip had the highest frequency multiple shoot and the shortest time to get it. The embryonic tip was sensitive to kanamycin and the suitable concentration was $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The high frequency multiple shoot could be gained when the embryonic tip was incubated in LBA4404 for 6 h. The regeneration plants of Jilinxiaolil transformed the w10 with the embryonic tip by LBA4404 were obtained.

Key words: soybean tissue culture; embryonic tip; cotyledonary node; hypocotyl segment

建立一个良好的组培再生系统, 是大豆遗传转化成功的前提。目前研究再生频率比较高的再生体系有子叶节、胚轴和胚芽尖^[1,2]。由于子叶节具有取材不受季节限制、诱导再生快、转化突变率低等优点, 得到了广泛的应用。Zhou 等^[3-8]用子叶节为受体分别将几丁质酶基因、Bt 基因、玉米转座子 Ac 基因、SMV-CP 基因等转入 Peking 等大豆品种中。但也存在再生频率低、受基因型限制、转化株的嵌合体等问题。胚轴作为外植体, 是目前研究应用较多的农杆菌转化受体, 有许多成功的转化事例。早在 1983 年陈云昭等就以大豆上胚轴和下胚轴为外植

体培养出再生植株^[9]。徐香玲等^[4,5]和苏彦等^[7]分别将 Bt 基因、SMV-CP 基因、几丁质酶基因通过农杆菌介导法以胚轴为受体转入吉林 29 和中黄 4 号等品种中, 但其仍然存在诱导再生植株频率低、重复性差、转化效率低等缺点。胚芽尖作为大豆组培外植体是由 Liu 等^[10]2004 年首次研究报道的。Liu 等^[10]用大豆胚芽尖、胚轴、子叶节分别作为外植体进行 GUS 基因的遗传转化。发现胚芽尖的重生芽发生效率达到 87.7%, 而子叶节和胚轴分别为 40.3% 和 56.4%。并且胚芽尖利用农杆菌转化系统可以得到 15% 的转化效率, 是一个新的具有高转化效率的再

收稿日期: 2008-04-25

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2002AA206511)

作者简介: 孙文丽 (1980-), 女, 沈阳人, 博士, 从事大豆抗病基因的研究, (电话) 13810618499 (电子邮箱) sunwl1980@163.com。

生体系^[10]。目前还没有其他关于胚芽尖再生系统的报道,也没有关于大豆品种吉林小粒 1 号组培体系的报道。

为了利用转基因技术有效地提高吉林小粒 1 号的品质性状,本研究选用大豆品种吉林小粒 1 号为试验材料建立胚芽尖再生体系,并对以上 3 种再生体系在各种影响因素下的重生芽发生频率进行了比较,期望为吉林小粒 1 号品质性状的改良提供转化平台,并对大豆的遗传转化效率的提高提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大豆品种吉林小粒 1 号(由国家种质资源中心提供)。

1.2 外植体的准备

在超净台中先用 75% 的酒精处理 1~2 min,然后用次氯酸钠(80% 无菌水+20% 次氯酸钠)消毒 40 min,无菌水冲洗 4~6 次,再用无菌水浸泡 3 h 后,把水倒掉,放在滤纸上吸干。

胚芽尖:将消毒好的种子放在 MSB5(表 1)培养基中暗培养 2 d,转到 MSB5(0.2 mg·L⁻¹ 6-BA,0.2 mg·L⁻¹ IBA)培养基中培养 5~10 d。取上述无菌苗,切除子叶和第 1 片叶子,得到暴露的胚芽尖分生组织,作为外植体备用。

子叶节:将消毒好的种子,放在 1/2MSB5(1

mg·L⁻¹ BAP 和 100 μmol·L⁻¹ 乙酰丁香酮)培养基上培养 5 d 后,沿水平方向将子叶下的胚轴切开(大约离子叶下 3~5 mm)备用。

胚轴:种子灭菌后,放到 MSB5 (1.0 mg·L⁻¹ BAP)培养基上培养 1 d,将上胚轴(大约 1 cm 长)从种子上切离下来备用。

1.3 3 种外植体重生芽频率比较

由于再生频率是大豆遗传转化体系重要因素。因此,我们对大豆吉林小粒 1 号,分别利用胚芽尖、子叶节、胚轴 3 种再生体系进行再生,每种外植体取样 100,分装 15 皿。统计长有 3 个或以上重生芽的愈伤数量,与总的愈伤数量比较,计算重生芽频率,取 3 次重复平均值。

1.4 3 种外植体重生芽发生时间比较

我们对大豆吉林小粒 1 号胚芽尖、子叶节、胚轴 3 种转化体系进行了再生时间的比较,每种外植体取样 100,分装 15 皿,分别于分化培养基上培养 5、10、15、20、25 d 时进行大于 3 个重生芽的外植体数量进行统计,与总的外植体数量比较,计算重生芽频率,取 3 次重复平均值。

1.5 吉林小粒 1 号胚芽尖再生体系的建立

参考 Wei 等的方法,将胚芽尖外植体放在 MSB5 培养基上,培养 24 h 后,将胚芽尖向上插入 MSB5 (6 mg·L⁻¹ BAP 和 100 μmol·L⁻¹ 乙酰丁香酮)培养基中,25℃ 光照 18 h/黑暗 6 h,培养 10 d 后转接到新鲜培养基 1 次,待重生芽长到 2~3 cm 时,转到生根培养基 1/2MSB5(0.2 mg·L⁻¹ BAP,1.0 mg·L⁻¹ IBA)上,16 h 光照/8h 黑暗,培养至长成植株,正常光照培养^[10]。

1.6 3 种外植体卡那霉素筛选浓度的确定

卡那霉素(Kanamycin)是组培中常用的筛选指标,浓度过低引起假阳性增加后期检测的工作量,浪费成本。而浓度过高,则再生频率低。为此,我们将胚芽尖、子叶节、胚轴 3 种外植体重生芽再生培养基的 Kanamycin 筛选浓度设定为 10、20、30、40、50、70、80、100 mg·L⁻¹,3 周后统计大于 3 个重生芽的外植体数量,与总的外植体数量比较,计算重生芽频率,取 3 次重复平均值。

1.7 不同侵染时间对胚芽尖重生芽频率的影响

将含有植物表达载体 w10 的农杆菌 LBA4404 在 YEB+K 中培养过夜。在 50 mLYEB 培养基中重培养至 OD₆₀₀ 达 1.3~1.5。3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,菌体用 1/2MSB5 洗 1 次,用 1/2MSB5 (3 mg·L⁻¹ BAP 和 100 μmol·L⁻¹ 乙酰丁香酮),调整 OD₆₀₀ 至 0.5。

将胚芽尖外植体放在含有 3% 蔗糖、0.6% 植物

表 1 MSB5 培养基储备液配方

贮备液	成分	浓度/mg·L ⁻¹
I	NH ₄ NO ₃	33 000
	KNO ₃	38 000
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	8 800
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	7 400
	KH ₂ PO ₄	3 400
	KI	166
	H ₃ BO ₃	1 240
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	4 460
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1 720
	Na ₂ MnSO ₄ ·2H ₂ O	50
II	CuSO ₄ ·5H ₂ O	5
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	5
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 560
III	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	7 460
	肌醇	2 000
IV	烟酸	100
	VB ₆	100
	VB ₁	100
	甘氨酸	400

凝胶和 $3.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP 的 MSB5 培养基上 24 h。外植体放入农杆菌的悬液中分别孵化 0.5、1.0、1.5、3.0、6.0、12.0 h, 每个时间段孵化外植体 60 个, 分别将其放在 6 皿铺有滤纸的 1/2MSB5 ($6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP 和 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮) 培养基上 (pH 值 5.8), 25°C , 黑暗培养 5 d。外植体转移到含 0.6% 植物凝胶的固体培养基上 1/2MSB5 ($0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP, $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA, $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 噻孢) 放置 5~7 d。然后, 将外植体转移到选择培养基 1/2MSB5 ($0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP, $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA, $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 噻孢, $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 羧苄, $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 卡那) 上光照培养, 两周后统计大于 3 个重生芽的外植体数量, 与总的外植体数量比较, 计算重生芽频率, 重复 3 次取平均值。

1.8 农杆菌转化吉林小粒 1 号再生植株的获得

方法同 1.7(将外植体放入农杆菌悬液中孵化 6 h), 待抗性芽长到 2~3cm 时, 转到生根培养基上 1/2MSB5 ($0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP, $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA, $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 噻孢, $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 羧苄, $25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 卡那) 16 h 光照/8 h 黑暗, 培养至长成植株, 正常光照培养。

2 结果与分析

2.1 3 种外植体重生芽频率比较

大豆吉林小粒 1 号 3 种外植体重生芽频率的比较结果见图 1。由结果我们可以得知胚芽尖的重生芽频率最高达到 95%, 子叶节的重生芽频率其次为 81%, 胚轴的重生芽频率相对较低为 78%。这说明对于大豆品种吉林小粒 1 号而言外植体的重生芽频率胚芽尖>子叶节>胚轴。

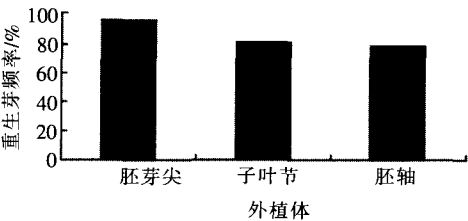


图 1 吉林小粒 1 号胚芽尖、子叶节、胚轴重生芽频率比较

2.2 3 种外植体重生芽发生时间比较

能够快速产生重生芽也是好的再生体系的一个评价因素。因此我们对吉林小粒 1 号, 3 种外植体的重生芽发生时间进行比较(表 2), 结果表明胚芽尖重生芽发生频率达到最高的时间出现在 15 d 左右, 而子叶节和胚轴均出现在 25 d 左右, 这说明胚芽尖的重生芽发生时间较短, 优于子叶节和胚轴。

2.3 吉林小粒 1 号胚芽尖再生体系的建立

利用胚芽尖作为外植体, 在 MSB5 培养基上, 培

表 2 不同时间的吉林小粒 1 号胚芽尖、子叶节、胚轴重生芽发生频率比较

时间/d	胚芽尖/%	子叶节/%	胚轴/%
10	70	60	58
15	94	74	70
20	94	82	78
25	94	84	83
30	94	85	83

养 24 h 后, 转入 MSB5 ($6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP 和 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮) 培养基中, 15 d 左右成功获得了大豆品种吉林小粒 1 号的重生芽, 将重生芽转到生根培养基 1/2MSB5 ($0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP, $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA) 上, 15 d 左右开始生根 (图 2), 1 个月左右全部生根, 将生根的再生苗打开瓶口炼苗 3 d 后, 洗去根部培养基, 移栽到盆中长成植株。

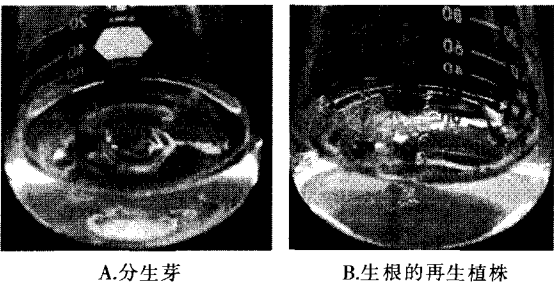


图 2 吉林小粒 1 号以胚芽尖为外植体获得生根的再生植株

2.4 3 种外植体卡那霉素筛选浓度的确定

3 种外植体重生芽再生培养基的 Kanamycin 筛选浓度设定为 10、20、30、40、50、70、80、100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 3 周后统计重生芽数量结果见表 3。表 3 结果表明, Kanamycin 浓度达到 $80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 3 种外植体重生芽数量均为 0, 因此, 我们认为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为合适的 Kanamycin 筛选浓度。

表 3 卡那霉素筛选浓度对吉林小粒 1 号胚芽尖、子叶节、胚轴再生频率 (%) 的影响

外植体	卡那霉素浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$							
	10	20	30	40	50	70	80	100
胚芽尖	43	30	14	3	0	0	0	0
子叶节	52	34	21	10	2	1	0	0
胚轴	49	32	19	9	1	0	0	0

2.5 不同侵染时间对胚芽尖体系重生芽发生频率的影响

不同侵染时间对胚芽尖外植体的重生芽发生频率影响不同, 结果(表 4)表明, 吉林小粒 1 号胚芽尖随着侵染时间的不同而在抗性培养基上重生芽

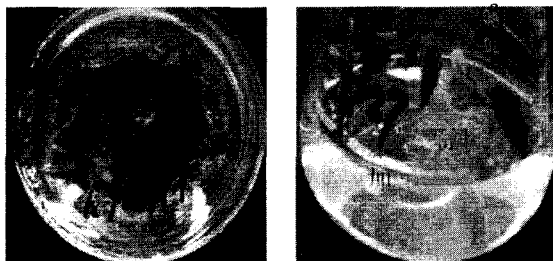
表 4 不同侵染时间的吉林小粒 1 号胚芽尖再生体系
重生芽的发生频率

侵染时间/h	胚芽尖再生频率/%
0.5	33
1.0	50
1.5	65
3.0	78
6.0	95
12.0	92

发生频率不同,最适侵染时间为 6 h。

2.6 吉林小粒 1 号转基因植株的获得

我们利用农杆菌(LBA4404)侵染法将 w10(带有植物抗病基因)导入大豆品种吉林小粒 1 号,得到再生植株 86 棵(图 3),经初步鉴定得到转基因阳性植株。初期转基因植株的生长状态与非转基因植株相同,随着大豆生育期的延长,转基因植株的生长状态逐渐表现差异,有的偏矮或叶片偏小,也得到了部分长势良好且与非转基因对照农艺性状相同的植株,为下一步研究转入基因的功能打下了基础。



A. 吉林小粒 1 号抗性芽 B. 农杆菌转化后获得的吉林小粒 1 号再生植株

图 3 农杆菌法转化吉林小粒 1 号再生植株的获得

3 结论与讨论

本研究以大豆胚芽尖为外植体,在 MSB5 加入 $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BAP 和 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮,以及 $1/2\text{MSB5}$ 加入 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BAP 和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 培养基上,建立了高效快速的吉林小粒 1 号大豆组培再生体系。并利用农杆菌 LBA4404 介导法将构建好的植物表达载体 w10 转化吉林小粒 1 号,获得了再生植株。同时,对吉林小粒 1 号的胚芽尖、子叶节、胚轴 3 种外植体在再生频率、再生时间、Kanamycin 筛选浓度,农杆菌不同侵染时间对重生芽再生频率的影响进行了研究。结果表明,吉林小粒 1 号重生芽再生频率胚芽尖>子叶节>胚轴;再生

时间胚芽尖优于子叶节和胚轴;Kanamycin 最适筛选浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;最适农杆菌侵染时间为 6 h。

胚芽尖作为大豆遗传转化的外植体,目前研究报道比较少。Liu 等^[10]2004 年的研究表明,胚芽尖外植体再生频率高、再生时间短、对卡那敏感,我们的研究结果与之相符,进一步证明了胚芽尖再生体系相对于子叶节和胚轴再生系统的优越性。Liu 等^[10]试验显示胚芽尖再生系统农杆菌最适侵染时间为 20 h,而我们研究表明最适农杆菌侵染时间为 6 h,这可能是由于不同的基因型对大豆组培的影响造成的。大豆组培再生体系受不同的基因型,不同的外植体、不同的激素浓度、不同的培养基等诸多因素的影响,这也增加了大豆再生体系优化的复杂性和困难性。我们的研究为胚芽尖再生系统在再生时间和再生频率上相对于子叶节和胚轴再生系统的优越性提供了新的试验依据,首次为吉林小粒 1 号的遗传转化建立了再生体系,为进一步优化吉林小粒 1 号组培体系打下了研究基础,同时也对其他基因型的大豆遗传转化具有借鉴意义。

致谢:感谢国家种质资源中心邱丽娟博士提供大豆吉林小粒 1 号种子。

参考文献:

- [1] HINCHEE M A W, CONNOR-WARD D V, NEWELL C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer [J]. *Biotechnology*, 1988, 6:915-922.
- [2] OLHOFT P M, SOMERS D A. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary node cells[J]. *Plant Cell Rep.*, 2001, 20:706-711.
- [3] ZHOU J H, ATHERLY A G. In situ detection of transposition of the maize controlling element (Ac) in transgenic soybean tissues[J]. *Plant Cell Reports*, 1990, 8:542-545.
- [4] 徐香玲,李兴华,刘伟华,等. Ri 质粒介导的大豆花叶病毒外壳蛋白基因转化大豆的研究[J]. *大豆科学*, 1996, 15(4):279-288.
- [5] 徐香玲,邹联沛,刘伟华. 向大豆导入几丁质酶的初步研究[J]. *大豆科学*, 1999, 18(2):101-108.
- [6] 徐香玲,高 晶,刘伟华,等. Ti 质粒介导的 Bt k- & 内毒素蛋白基因转化大豆的初步研究. *大豆科学*, 1997, 16(1):6-11.
- [7] 苏彦辉,王慧丽,俞梅敏,等. 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因导入大豆的研究[J]. *植物学报*, 1999, 41(10):1046-1051.
- [8] 周思军,李希臣,刘昭军,等. 通过农杆菌介导法将 Bt(cryIA) 基因导入大豆[J]. *大豆科学*, 2001, 20(3):157-162.
- [9] 陈云昭,王玉国.大豆外植体培养再生植株的研究[J]. *山西农业大学学报:自然科学版*, 1983(1):41-45.
- [10] LIU H K, YANG C, WEI Z M. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system [J]. *Planta*, 2004, 219: 1042-1049.

(责任编辑 郑 威)