

## 不同基因型大豆愈伤组织对农杆菌 EHA105 的敏感性研究

张庆林<sup>1</sup>, 赵艳<sup>2</sup>, 张艳<sup>1</sup>, 翟莹<sup>1</sup>, 苏连泰<sup>1</sup>, 王英<sup>1</sup>, 李景文<sup>1</sup>, 王庆钰<sup>1</sup>

(1. 吉林大学 植物科学学院, 吉林 长春 130062; 2. 齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**摘要:**研究了8个基因型的大豆愈伤组织 *GUS* 瞬时表达的效果及其最佳染色条件, 以考察不同基因型大豆愈伤组织对农杆菌菌株 EHA105 的敏感性。*GUS* 染色结果表明:不同品种对农杆菌 EHA105 敏感程度差别较大, 吉林 47 和东农 42 愈伤 *GUS* 染色效果较好;不同品种要求的最佳染色时间存在差异, 对农杆菌 EHA105 较敏感的2个基因型吉林 47 和东农 42, 较适宜的 *GUS* 染色时间为 9~10 h。

**关键词:**大豆;愈伤组织;基因型;*GUS* 染色;农杆菌

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2011)04-0566-03

## Sensitivity of Different Genotype Soybean Callus to *Agrobacterium* EHA105

ZHANG Qing-lin<sup>1</sup>, ZHAO Yan<sup>2</sup>, ZHANG Yan<sup>1</sup>, ZHAI Ying<sup>1</sup>, SU Lian-tai<sup>1</sup>, WANG Ying<sup>1</sup>, LI Jing-wen<sup>1</sup>, WANG Qing-yu<sup>1</sup>

(1. College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062, Jilin; 2. College of Life Science and Agro-forestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China)

**Abstract:** Soybean genotype has great impact on efficiency of genetic transformation. It is easy and convenient to evaluate the transgenic soybean by transient expression of *GUS* gene. This paper studied the sensitivity of eight genotypes to *Agrobacterium* EHA105 by *GUS* gene transient expression and staining times of *GUS* gene in soybean callus. The results showed that the sensitivity to *Agrobacterium* EHA105 varied with genotypes, the staining of Jilin47 and Dongnong42 were the best among the 8 soybean types indicated that soybean callus of Jilin47 and Dongnong42 were more sensitive to EHA105; the staining time was also varied with genotypes, appropriate *GUS* staining time was from 9 to 10 h.

**Key words:** Soybean; Callus; Genotype; *GUS* staining; *Agrobacterium tumefaciens*

大豆 (*Glycine max* L.) 是全球公认的难转化的作物之一, 在大豆遗传转化中农杆菌介导法因其转化方法简单、效率高的拷贝数低等优点一致倍受关注<sup>[1]</sup>, Hinchee 等<sup>[2]</sup>的研究表明基因型不同的外植体对农杆菌的敏感程度不同, 不同基因型的遗传转化效率差异也较大。利用 *GUS* 基因 ( $\beta$ -葡萄糖苷酸酶基因) 的瞬时表达水平能够初步地反映出基因型遗传转化效率的高低, 但一方面不同品种对农杆菌敏感程度不同, 染色效果有比较大的差异; 另一方面染色时间也直接影响染色效果, 因而, 研究不同基因型大豆愈伤组织对农杆菌的敏感性及其 *GUS* 染色适宜时间对于提高大豆遗传转化效率十分必要。该研究以 8 个大豆品种的愈伤组织为试验材料, 通过 *GUS* 染色效果比较它们对农杆菌菌株 EHA105 的敏感性, 并确定不同基因型适宜的 *GUS* 染色时间, 为进一步提高不同基因型大豆的遗传转化效率

提供参考依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试材料

选用吉林 47、吉林 35、吉林 32、吉豆 2 号、平安 8、东农 42、合丰 47 和绥农 14 共 8 个大豆品种, 由吉林大学植物科学学院种质资源与利用研究室保存。

所采用的质粒为含有 *GUS* 报告基因的双元表达载体 pCAMBIA1301, 启动子为 CaMV35S (图 1); 农杆菌 EHA105 为吉林大学植物科学学院种质资源与利用研究室保存。rTaq 购自 Takara 公司, 5-溴-4-氯-3-吡啶葡萄糖苷酸 (X-Gluc) 购自上海生工生物工程公司, 4-MU 和 4-MUG 购自 Sigma 公司, 其它试剂均为进口或国产分析纯。

收稿日期: 2011-02-28

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项子课题 (2008ZX08004-003); 国家自然科学基金面上资助项目 (30971808); 吉林省科技发展计划重点资助项目 (20080204); 长春市科技局国际科技合作资助项目 (08GH10); “211” 三期建设资助项目。

第一作者简介: 张庆林 (1988-), 男, 在读硕士, 研究方向为作物遗传育种。E-mail: hn\_zhangqinglin@163.com。

通讯作者: 王庆钰 (1963-), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事植物种质资源与利用研究。E-mail: wqy414cn@yahoo.com.cn。

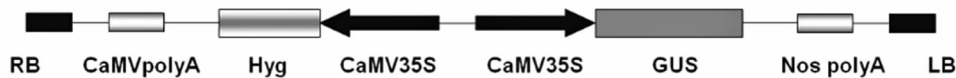


图 1 双元表达载体 pCAMBIA1301 结构示意图

Fig. 1 Structure map of plant expression vector pCAMBIA1301

## 1.2 试验方法

1.2.1 种子灭菌、萌发及愈伤组织的诱导 大豆种子分别采用氯气表面灭菌法,将种子平铺在开口的培养皿内,氯气灭菌 13~15 h。将灭菌的大豆种子接种于发芽培养基(MSB + 3% 蔗糖 + 0.6% 琼脂, pH 5.6)中,置于 25℃,光照周期 18/6 h 的条件下发芽 5~7 d。然后切取紧靠子叶节部位的下胚轴作为外植体,剪成小段,接种在诱导愈伤的诱导培养基(MS + 蔗糖 30 g · L<sup>-1</sup> + 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D) 1.5 mg · L<sup>-1</sup> + 6-BA 0.3 mg · L<sup>-1</sup> + 6 g · L<sup>-1</sup> 琼脂, pH 5.8)中,在 25℃ 条件下诱导愈伤组织。愈伤组织每隔 15~20 d,重新接种在诱导培养基中,进行继代培养。

1.2.2 根瘤农杆菌制备和转化 利用冻融法将质粒 pCAMBIA1301 导入根瘤农杆菌 EHA105 中。挑取单菌落进行小量培养,农杆菌在含有利福平(Rif) 50 mg · L<sup>-1</sup>和卡那霉素(Kan) 50 mg · L<sup>-1</sup>的 YEP 中 28℃ 振荡培养 24 h,然后取 3 mL 加入 300 mL 培养基中进行大量培养,直到对数生长期(OD 约为 0.5),离心后收集菌体,用重悬液 MMA<sup>[3]</sup>(MS + 10 mmol · L<sup>-1</sup> MES + 200 mmol · L<sup>-1</sup> LAS + 2% 蔗糖, pH 5.6)重悬菌体,重悬后 OD<sub>600</sub> 约为 0.2,将重悬后的菌体分在 8 个小瓶中,真空压力 0.09~0.1 MPa, 20 min<sup>[4]</sup>。之后将外植体取出,在无菌的滤纸上吸干菌液,放在铺有滤纸的重悬液培养基(另加 0.6% 琼脂的重悬培养基)中,在 22℃、黑暗条件下培养 36 h。

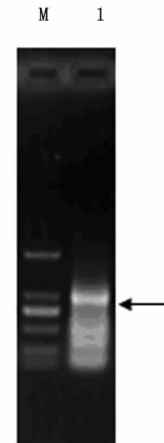
1.2.3 GUS 组织化学染色 将共培养的 8 个品种外植体分别用蒸馏水冲洗,参照 Jefferson 等<sup>[6]</sup>的方法进行 GUS 组织化学染色,将各个品种未侵染和侵染的大豆愈伤加入 GUS 染色液(50 mmol · L<sup>-1</sup> 磷酸钠缓冲液 pH 7.0, 10 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA, 1 mmol · L<sup>-1</sup> X-Gluc, 0.1% Triton X-100, 10 mmol · L<sup>-1</sup> 巯基乙醇),染色时间分为 6、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、11 和 12 h,分别进行取样,75% 乙醇脱色,直至底色完全消失,然后观察染色情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 根瘤农杆菌的转化

将质粒 pCAMBIA1301 转化根瘤农杆菌 EHA105 中,对 PCR 产物进行鉴定(图 2),结果在

1 000 bp 左右扩增出目的条带,表明 pCAMBIA1301 质粒已成功转入根瘤农杆菌 EHA105 中。



M. 2000 bp Marker; 1. 质粒 pCAMBIA1301 转化农杆菌菌株 EHA105 的 PCR 产物

M. 2000 bp Marker; 1. *Agrobacterium* EHA105 with plant expression vectors pCAMBIA1301.

图 2 农杆菌 EHA105 菌液 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of plant expression vectors in EHA105 by PCR

### 2.2 不同大豆基因型愈伤组织农杆菌转化后 GUS 染色结果

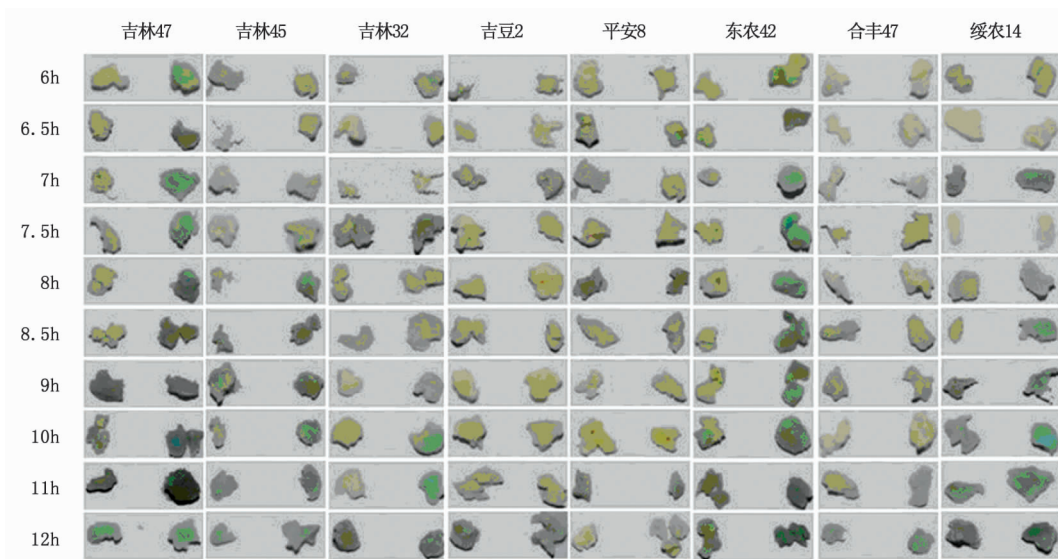
由图 3 的 GUS 染色结果中可以看出,8 个品种敏感程度由高到低依次为:吉林 47、东农 42、绥农 14、吉林 32、吉林 35、合丰 47、平安 8、吉豆 2 号;吉林 47、东农 42 和绥农 14 这 3 个品种对农杆菌 EHA105 较敏感,在染色时间内愈伤 GUS 染色效果较好,可以作为大豆愈伤转化的试验品种。

### 2.3 GUS 染色时间的比较

吉林 47 染色时间为 6~10 h 时染色效果较好,超过 8 h 阴性对照褪色不完全;东农 42 染色时间为 7~12 h 时染色效果较好;吉林 32 染色时间 9~11 h 染色效果较好,6~8.5 h 几乎没有被染出颜色;而其它品种整个过程染色效果都不好(图 3)。该试验确定农杆菌介导大豆遗传转化过程中大豆愈伤 GUS 染色适宜时间为 9~10 h。

## 3 讨论

由于在大多数高等植物中检测不到内源的 β-



每个图片左边无侵染的愈伤组织,右边为侵染转化 pCAMBIA1301 载体的农杆菌 EHA105 的愈伤组织。

The left one in each photo was no-transformed soybean callus, the right one was infected by *Agrobacterium* EHA105 with plant expression vectors pCAMBIA1301.

图3 大豆愈伤组织的 GUS 染色

Fig. 3 GUS staining of soybean callus

半乳糖苷酶(*GUS*)活性,同时 *GUS* 的组织化学染色和荧光活性测定都十分简单易行,使 *GUS* 编码基因被越来越广泛地用作指标外源基因在受体组织中表达的报告基因<sup>[6]</sup>。基因型对农杆菌介导转化大豆有重要影响,Hinchee 等<sup>[7]</sup>的研究表明基因型不同的外植体对农杆菌的敏感程度不同。该研究选用8个大豆品种的愈伤组织为外植体,利用 *GUS* 染色结果可以简易的筛选出对农杆菌敏感的基因型。

Jefferson 等<sup>[8]</sup>的研究表明,*GUS* 染色时间范围为4~16 h,不同的材料染色时间不同。而一般 *GUS* 染色的时间为7~12 h。该研究将染色时间6~12 h分为10个时间处理进行考察,结果显示不同基因型的最佳染色时间有较大差异,吉林47、东农42、吉林3、绥农14这4个染色效果较好品种的最佳染色时间为9~10 h,吉豆2号、平安8在12 h内几乎没有被染出颜色,没有染出颜色可能是染色时间不够或培养基不适宜等原因造成的。

### 参考文献

[1] 王萍,吴颖,季静,等. 抗生素对大豆愈伤组织的诱导和生长的影响[J]. 遗传,2001,23(4):321-324. (Wang P, Wu Y, Ji J, et al. Effect of antibiotics on induction of callus and callus growth in

soybean[J]. Hereditas,2001,23(4):321-324.)

[2] 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.

[3] Hu X W, Liu S X, Guo J C, et al. Embryo and another regulation of the mabinlin II sweet protein gene in *Capparis masaiikai Lévl*[J]. Functional & Integrative Genomics,2009,9:351-361.

[4] 赵艳,史岩玲,钱丹丹,等. 大豆脂肪氧化酶-3 基因(*Lox3*)启动子的克隆及其瞬时表达分析[J]. 生物技术通报,2010,9:65-69. (Zhao Y, Shi Y L, Qian D D, et al. Cloning and transient expression of soybean *Lox3* promoter[J]. Biotechnology Bulletin, 2010,9:65-69.)

[5] 汲逢源,王戈亮,许亦农. 抗氧化剂对农杆菌介导的大豆下胚轴 *GUS* 基因瞬时表达的影响[J]. 植物生态学报,2006,30(2):330-334. (Ji F Y, Wang G L, Xu Y N. The effects of antioxidants on the transient expression of *GUS* gene in soybean hypocotyls mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Journal of Plant Ecology,2006,30(2):330-334.)

[6] Jefferson R A, TKavanagh T A, Bevan W A.  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. The EMBO Journal,1987,6:3901-3907.

[7] Hinchee M A, Connor W D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer[J]. Biotechnology,1988,6:915-922.

[8] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants; the *GUS* gene fusion system[J]. Plant Molecular Biology Reporter,1987,5(4):387-405.