

## 基因枪法转化大豆未成熟子叶影响因素的研究

王萍<sup>1</sup>,李倩<sup>1</sup>,王罡<sup>2</sup>,冯远航<sup>1,2</sup>,季静<sup>2</sup>,王恩旭<sup>3</sup>,邱丽娟<sup>4</sup>

(1. 淮海工学院 海洋学院,江苏 连云港 222005; 2. 天津大学 环境科学与工程学院,天津 300072; 3. 中国人民解放军 92323 部队农副业基地,江苏 连云港 222247; 4. 中国农业科学院 作物科学研究所,北京 100081)

**摘要:**以大豆未成熟子叶为外植体,采用基因枪轰击法进行遗传转化,探讨大豆基因型、受体轰击前预培养时间、轰击次数、轰击距离等因子对大豆未成熟子叶基因枪转化的影响。结果表明:大豆基因型对未成熟子叶基因枪转化有较大的影响,在参试的 22 个基因型中有 40.91% 的基因型体细胞胚胎发生率大于 40%,胚数在 2 个以上,适宜用作大豆遗传转化的受体;合丰 25 未成熟子叶在轰击前预培养 10 d 优于预培养 5 和 14 d。基因枪轰击 1 或 2 次对转化没有影响。基因枪轰击距离对转化的影响依大豆基因型而异。

**关键词:**大豆;未成熟子叶;体细胞胚;基因枪法;遗传转化

**中图分类号:**S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2013)06-0735-05

## The Impact Factors of Immature Cotyledons Transformation *via* Particle Bombardment in Soybean

WANG Ping<sup>1</sup>, LI Qian<sup>1</sup>, WANG Gang<sup>2</sup>, FENG Yuan-hang<sup>1,2</sup>, JI Jing<sup>2</sup>, WANG En-xu<sup>3</sup>, QIU Li-juan<sup>4</sup>

(1. School of Marine Science and Technology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 2. School of Environmental Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 3. Agriculture and Parergon Base, Unit of 92323, PLA, Lianyungang 222247, China; 4. Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** Using immature cotyledons of soybean as explants, the effects of soybean genotype, pre-culture time of receptor before bombardment, bombardment times and target distance on transformation immature cotyledons of soybean *via* particle bombardment were investigated. The results showed that genotype of soybean had obvious effects on transformation of immature cotyledon. Rates of somatic embryogenesis in 40.91% of 22 genotypes used in the experiment reached more than 40% with at least 2 embryo. These genotypes were fitted as receptor for further transformation. Before Hefeng 25 was transformed by particle bombardment, treatment with 10 days pre-cultured was superior to those with 5 and 14 days pre-cultured treatment. Bombardment times did not affect on transformation. Effect of target distance on transformation varied with soybean genotypes.

**Key words:** Soybean; Immature cotyledons; Somatic embryo; Particle bombardment; Genetic transformation

基因枪转化法具有不需要考虑菌株与转化宿主的亲和性,且微粒高速轰击产生的微创有利于快捷、方便地将外源重组 DNA 或者 DNA 片段转化进细胞,并可同时将多个质粒或目的 DNA 片段导入植物基因组等优点<sup>[1]</sup>。自从 1988 年 McCabe 等用基因枪法获得第一例大豆转基因植株以来<sup>[2]</sup>,陆续出现以大豆不同材料为受体的基因枪转化报道,如以胚性悬浮培养物<sup>[3-5]</sup>、愈伤组织<sup>[6]</sup>、茎尖<sup>[7]</sup>、体细胞胚<sup>[8]</sup>、胚轴<sup>[9-11]</sup>、未成熟子叶<sup>[12-13]</sup>、成熟种子胚尖<sup>[14]</sup>、半片种子<sup>[15]</sup>等为受体的大豆遗传转化研究,而对影响基因枪法转化大豆的因素研究较少。为此,以大豆未成熟子叶为受体,探讨基因枪法转化时大豆基因型、受体轰击前预培养时间、轰击次数、轰击距离等因素对大豆体细胞胚胎发生的影响,以期进一步优化大豆未成熟子叶基因枪转化体系,为应用基因工程方法改良大豆品种奠定基础。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

以东北、华北和江淮地区生产上 22 个主栽大豆基因型为材料,种子由中国农业科学院作物科学研究所、吉林省农业科学院大豆研究所、黑龙江省农业科学院大豆研究所、黑龙江省农业科学院佳木斯分院、东北农业大学大豆研究所、江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所、浙江大学农学院等单位馈赠。质粒为 pSOY17(含有 *EPSPS* 基因),由浙江大学生命科学学院提供。

#### 1.2 方 法

采用单因素完全随机设计,以 22 个基因型大豆(表 1)为材料,研究大豆不同基因型对未成熟子叶基因枪转化的影响,3 次重复。

以合丰 25 为材料,在基因枪轰击前设 3 种预培

收稿日期:2013-05-14

基金项目:国家转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08004-001);中央财政支持地方高校发展专项资金(CXTD07)。

第一作者简介:王萍(1957-),女,博士,教授,主要从事生物技术与植物转基因研究。E-mail:y\_pwang@163.com。

养时间(5, 10, 14 d), 研究其对大豆未成熟子叶基因枪转化的影响, 9次重复; 以合丰25、合丰35、浙春3号为材料进行基因枪轰击, 研究不同轰击次数(1次、2次)对大豆未成熟子叶基因枪转化的影响, 4次重复。

采用二因素完全随机设计, 3次重复, 研究轰击距离(6, 9, 12 cm)对大豆不同基因型(合丰25、合丰35、中黄13、泗豆4号、浙春3号)未成熟子叶基因枪转化的影响。

取粒大饱满、无病的大豆种子, 5~9月分期播种于中国人民解放军92323部队农副业基地试验田。开花20d取未成熟子叶长约3~5mm幼荚, 置4℃处理2~5d后, 在75%乙醇中浸泡2min, 0.1% HgCl<sub>2</sub>处理10~15min, 无菌水冲洗2~3次, 剥开种皮, 去掉胚轴, 将未成熟子叶近轴面向上接种于体细胞胚诱导培养基中, 25℃黑暗条件下预培养10d左右。将未成熟子叶转入0.4 mol·L<sup>-1</sup>甘露醇高渗培养基处理7~24h。提取与纯化质粒, 金粉包弹, 按基因枪使用说明书轰击大豆未成熟子叶, 轰击距离为9cm。轰击后未成熟子叶在高渗培养基中25℃暗培养3d, 转至5 mg·L<sup>-1</sup>草甘膦筛选培养基中

在(25 ± 1)℃暗培养, 诱导抗性体细胞胚胎发生。记录出现抗性愈伤组织的外植体数、抗性体细胞胚的外植体数, 计算愈伤组织诱导率、体细胞胚胎发生率、胚数及其标准误。

### 1.3 数据分析

采用Microsoft Excel 2010进行数据分析及作图, 采用SPSS 17.0做t检验、方差分析及差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 大豆基因型对未成熟子叶基因枪转化的影响

由表1可知, 供试22个基因型的未成熟子叶经基因枪转化, 并在体细胞胚诱导筛选培养基上筛选后, 除吉林20、吉林47愈伤组织诱导率(分别为52.06%和63.91%)较低外, 其他20个基因型愈伤组织诱导率均为100%或接近100%。吉林30抗性体细胞胚胎发生率最高, 为73.33%。黑农44、吉林30、吉林35、吉育75和吉育89体细胞胚胎发生率均大于50%, 吉林20没有体细胞胚出现。胚数大于2个的基因型有合丰25、黑农44、黑农58、吉林30、吉林35、吉育71、吉育75、吉育89、吉育91和中黄13, 其中黑农58和吉林30胚数最多, 分别为3.16和3.47个。

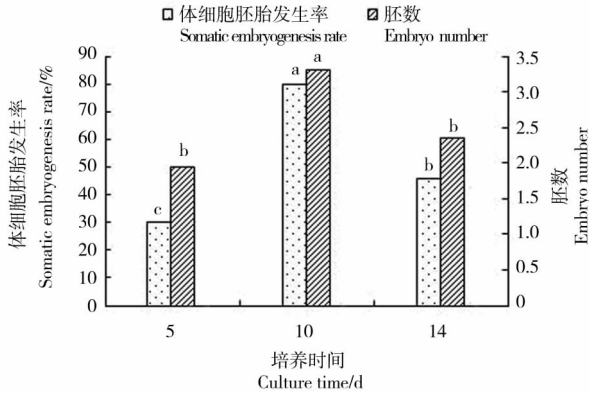
表1 基因枪法转化大豆不同基因型未成熟子叶各性状的平均值及标准误

Table 1 Average value and standard error of several traits of immature cotyledons transformation via particle bombardment in different genotypes of soybean

基因型 Genotypes	外植体数 No. of explants	愈伤组织诱导率 Induction rate of calli/%	体细胞胚胎发生率 Rate of somatic embryogenesis/%	胚数 No. of embryo
合丰25 Hefeng 25	824	100.00	48.51 ± 1.59	2.80 ± 0.13
合丰35 Hefeng 35	455	99.78 ± 0.37	29.05 ± 3.05	1.49 ± 0.19
黑农40 Heinong 40	158	100.00	31.74 ± 4.10	1.77 ± 0.26
黑农44 Heinong 44	170	100.00	52.79 ± 4.59	2.59 ± 0.31
黑农48 Heinong 48	130	100.00	21.54 ± 5.98	1.43 ± 0.37
黑农51 Heinong 51	38	100.00	13.06 ± 6.45	1.50 ± 0.43
黑农58 Heinong 58	235	100.00	45.09 ± 3.35	3.16 ± 0.26
绥农28 Suinong 28	205	100.00	26.45 ± 4.19	1.92 ± 0.35
东农42 Dongnong 42	89	100.00	9.01 ± 3.85	0.93 ± 0.31
吉林20 Jilin 20	104	52.06 ± 4.47	0	0
吉林30 Jilin 30	30	100.00	73.33 ± 4.22	3.47 ± 0.71
吉林35 Jilin 35	196	100.00	51.25 ± 4.22	2.48 ± 0.15
吉林47 Jilin 47	238	63.91 ± 6.10	2.50 ± 1.92	0.20 ± 0.11
吉育70 Jiyu 70	90	100.00	6.67 ± 4.68	0.47 ± 0.25
吉育71 Jiyu 71	195	100.00	25.79 ± 5.52	2.11 ± 0.36
吉育75 Jiyu 75	88	100.00	62.47 ± 6.15	2.15 ± 0.22
吉育89 Jiyu 89	188	100.00	62.41 ± 4.11	2.81 ± 0.24
吉育91 Jiyu 91	207	99.47 ± 0.87	40.86 ± 3.43	2.21 ± 0.20
中黄13 Zhonghuang 13	154	100.00	41.88 ± 4.93	2.71 ± 0.33
淮豆4号 Huaidou 4	134	100.00	10.83 ± 3.91	1.38 ± 0.42
泗豆4号 Sidou 4	169	100.00	20.99 ± 4.62	1.56 ± 0.37
浙春3号 Zhechun 3	308	100.00	1.58 ± 1.23	0.26 ± 0.12

## 2.2 预培养时间对大豆未成熟子叶基因枪转化的影响

在 3 种预培养处理下,合丰 25 未成熟子叶的愈伤组织诱导率均为 100%。体细胞胚胎发生率在 3 个预培养时间之间均存在显著差异,且以预处理 10 d 时最高。3 种预培养时间对合丰 25 胚数也有显著影响,预处理 10 d 时胚数最高,显著高于预处理 14 和 5 d,后两者间无显著差异(图 1)。



不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

Different lowercase letters indicate the significance at 0.05 level.

图 1 大豆在轰击前 3 种预培养时间下体细胞胚胎发生率和胚数比较

Fig. 1 Comparison on rate of somatic embryogenesis and embryo number under three pre-cultured time treatments before bombardment in soybean

## 2.3 轰击次数对大豆未成熟子叶基因枪转化的影响

从图 2 可以看出,轰击 1 次时,大豆 3 个基因型的愈伤组织诱导率均为 100%;轰击 2 次时愈伤组织诱导率相似,为 92.50%~99.17%。轰击次数对体细胞胚诱导率的影响大于对愈伤组织诱导率的影响,合丰 35 在轰击 1 次的体细胞胚诱导率高于轰击 2 次;合丰 25 与之相反;而浙春 3 号在轰击 1 次时没有出现抗性体细胞胚。轰击次数对胚数的影响与对体细胞胚发生率的影响相似,合丰 25 和浙春 3 号轰击 2 次胚数(2.40 和 0.50 个)略高于轰击 1 次胚数(2.19 和 0 个),而合丰 35 则轰击 1 次(2.05 个)略高于轰击 2 次(1.81 个)。t 检验结果显示,3 个基因型大豆愈伤组织与体细胞胚的诱导率、胚数在轰击次数间的差异均未达显著水平,说明轰击 1 或 2 次对这 3 个基因型大豆转化效果没有影响(结果未列出)。

## 2.4 轰击距离对不同基因型大豆未成熟子叶基因枪转化的影响

将合丰 25、合丰 35、中黄 13、泗豆 4 号、浙春 3

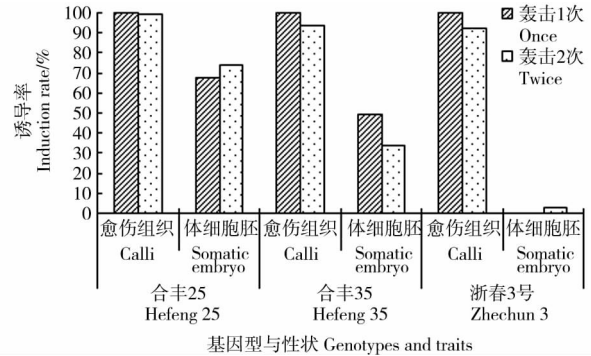


图 2 轰击次数对 3 个大豆基因型愈伤组织和体细胞胚诱导率的影响

Fig. 2 The effect of bombardment times on induction rate of calli and somatic embryo of three genotypes in soybean

号 5 个基因型用 6, 9 和 12 cm 3 个距离进行轰击,用经草甘膦筛选得到的抗性愈伤组织诱导率、体细胞胚胎发生率和胚数评价轰击距离对大豆各基因转化的影响。5 个基因型在 3 个距离轰击下的愈伤组织诱导率均为 100%。经方差分析,体细胞胚胎发生率、胚数在大豆基因型间、轰击距离间都存在极显著差异,大豆基因型与轰击距离的交互间胚数差异极显著。

表 2 5 个大豆基因型体细胞胚胎发生率和胚数的差异显著性

Table 2 Significance of somatic embryogenesis rate and embryo number among five genotypes in soybean

基因型 (Genotypes)	体细胞胚胎发生率 (Rate of somatic embryogenesis/%)	胚数 (No. of embryo)
合丰 25 Hefeng 25	66.77 aA	3.15 aA
中黄 13 Zhonghuang 13	33.74 bB	2.69 abAB
合丰 35 Hefeng 35	39.49 bB	2.12 bcBC
泗豆 4 号 Sidou 4	20.09 cBC	1.62 cdCD
浙春 3 号 Zhechun 3	8.38 cC	1.00 dD

同列数值标以不同大小写字母者表示在 0.01 和 0.05 水平上差异显著。

Values within a column followed by different capital and lowercase letters are significantly different at 0.01 and 0.05 levels, respectively.

从表 2 可看出,体细胞胚胎发生率以合丰 25 最高,为 66.77%,极显著高于其他 4 个基因型,中黄 13 和合丰 35 间显著不差异,而显著高于泗豆 4 号和浙春 3 号,后两者间差异不显著。胚数也是合丰 25 最高,为 3.15 个,与中黄 13 间无显著差异,但极显著高于合丰 35、泗豆 4 号和浙春 3 号。在 3 个轰击距离下,以轰击 12 和 9 cm 效果较好,大豆体细胞胚胎发生率分别为 43.83% 和 37.08%、胚数分别为

2.61个和2.39个,在两个距离间差异不显著,但显著高于6 cm轰击距离。

由图3可见,在3个轰击距离下,合丰25的体细胞胚胎发生率均高于60%,且差异不显著。合丰35和浙春3号以12 cm轰击距离的体细胞胚胎发生率最高,与9 cm轰击距离间差异不显著,但显著高于6 cm轰击距离;中黄13以9 cm轰击距离的体细胞胚胎发生率最高,与12 cm轰击距离间差异不显著,但显著高于6 cm轰击距离;泗豆4号在9和12 cm轰击距离时体细胞胚胎发生率分别为30.28%和30.00%,二者间差异不显著,而6 cm轰击距离时没有出现体细胞胚。

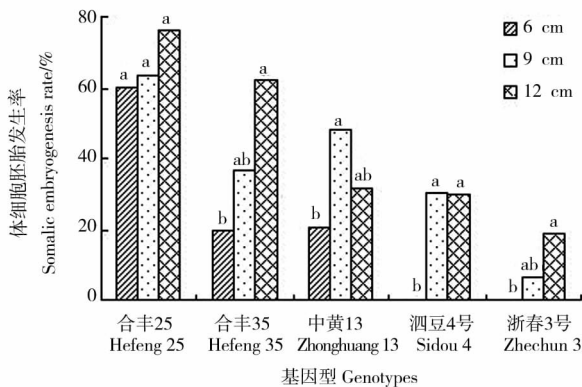


图3 5个大豆基因型在3个轰击距离下体细胞胚胎发生率比较

Fig. 3 Comparison on rate of somatic embryogenesis from five genotypes under three target distances in soybean

从图4可以看出,合丰25和中黄13在3种轰击距离间的胚数差异不显著;合丰35和浙春3号的胚数以12 cm轰击距离时最高,泗豆4号在9 cm轰击距离时胚数较多。总体上看,3个轰击距离对大豆5个基因型的体细胞胚胎发生率和胚数的影响相似。

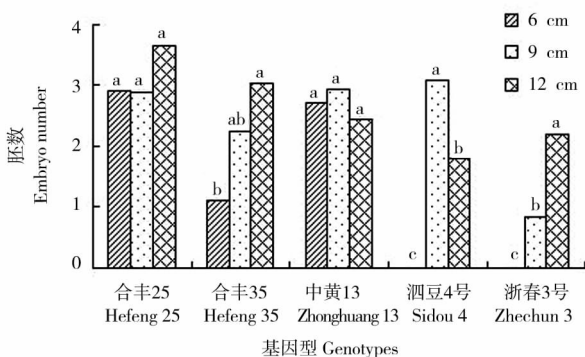


图4 5个大豆基因型在3个轰击距离下胚数比较  
Fig. 4 Comparison on embryo number from five genotypes under 3 target distances in soybean

### 3 讨论

#### 3.1 大豆不同基因型未成熟子叶基因枪转化的差别

大豆组织培养对基因型的依赖性是一种普遍现象。本文探讨了大豆基因型对未成熟子叶基因枪转化影响,结果显示22个基因型的抗性体细胞胚胎发生率和胚数变化均较大,并且体细胞胚胎发生率大于40%、胚数在2个以上的基因型有9个,占参试材料的40.91%,在生产上栽培面积较大的中黄13名列其中,这意味着采用基因工程方法改良生产上大面积种植的大豆品种是可行的。

#### 3.2 大豆未成熟子叶基因枪转化轰击前预培养时间的确定

在进行基因枪轰击前一般需要对转化受体进行预培养,Tee等<sup>[6]</sup>认为靶组织的发育时期是获得较好转化效果需要重点考虑的因素。胡张华等<sup>[12]</sup>发现,同一品种来源的不同时期愈伤组织的转化频率也不尽相同,由于大豆细胞处于不同的生理状态,初生愈伤组织细胞的结构紧密、细胞核大、质浓,而继代3个月后的愈伤组织逐渐老化、细胞液泡化程度高,因此继代1个月内的初生愈伤组织平均蓝点数和抗性愈伤组织比例较高。本试验以合丰25为材料,探讨了受体在轰击前预培养5,10,14 d对转化的影响,结果显示轰击前预培养时间对未成熟子叶愈伤组织诱导率没有影响,3种预培养时间的愈伤组织诱导率均为100%。但预培养时间对体细胞胚胎发生率和胚数具有显著的影响,体细胞胚胎发生率和胚数均以培养10 d时最高。在不同的试验中,由于试验材料与评价方法不同,试验结果不尽相同。

#### 3.3 不同受体基因枪转化时轰击距离的选择

轰击距离是影响基因枪转化的重要参数,轰击距离太小,受体组织损伤大;轰击距离太大,微弹进入受体组织的深度不够,转化效率低。Tee等<sup>[6]</sup>以愈伤组织为受体,用GUS染色的斑点数评价轰击距离6,9,12 cm时对转化的影响,发现A类愈伤组织在3种轰击距离间GUS染色斑点数差异不显著,而B类愈伤组织在轰击6和9 cm时的斑点数显著高于12 cm。薛仁镐<sup>[15]</sup>以半片萌动的种子为试验材料,在轰击2次条件下调查了3,6,9,12 cm轰击距离对萌动种子GUS瞬时表达效率的影响,结果显示9 cm轰击距离时GUS瞬时表达效率最高。本试验以5个基因型大豆为材料,以抗性体细胞胚胎发生率和胚数为评价指标,探讨基因枪轰击距离对转化

大豆未成熟子叶的影响,结果显示不同基因型对轰击距离的反应不同,合丰 25 在 3 个轰击距离下体细胞胚胎发生率均较高(≥60%),在 3 个轰击距离间差异不显著。其他 4 个基因型的体细胞胚胎发生率在轰击距离间均存在显著差异,以轰击距离 12 或 9 cm 时体细胞胚胎发生率最高,二者间差异不显著,但显著高于 6 cm 轰击距离。由于转化受体试验条件的差异,不同研究者试验结果不尽一致。因此,在遗传转化中,各遗传体系的优化是非常必要的。

## 参考文献

- [1] Hadi M Z, McMullen M D, Finer J J. Transformation of 12 different plasmids into soybean *via* particle bombardment[J]. *Plant Cell Reports*, 1996, 15:500-505.
- [2] McCabe D E, Swain W F, Martinell B J, et al. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration[J]. *Nature Biotechnology*, 1988, 6:923-926.
- [3] Finer J J, Vain P, Jones M W, et al. Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells[J]. *Plant Cell Reports*, 1992, 11:323-328.
- [4] Finer J J, McMullen M D. Transformation of soybean *via* particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue [J]. In *In Vitro & Developmental Biology*, 1991, 27:175-182.
- [5] 盖江南, 张彬彬, 吴瑶, 等. 大豆不定胚悬浮培养基因型筛选及基因枪遗传转化的研究[J]. *大豆科学*, 2013, 32(1):38-42. (Gai J N, Zhang B B, Wu Y, et al. Screening of soybean genotypes suitable for suspension culture with adventitious embryos and genetic transformation by particle bombardment [J]. *Soybean Science*, 2013, 32(1):38-42.)
- [6] Tee C S, Maziah M. Optimization of biolistic bombardment parameters for 17 calluses using *GFP* and *GUS* as the reporter system[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2005, 80:77-89.
- [7] Sato S, Newell C, Kolacz K, et al. Stable transformation *via* particle bombardment in two different soybean regeneration systems[J]. *Plant Cell Reports*, 1993, 12:408-413.
- [8] 王萍, 郭永来, 高世庆, 等. 基因枪法将 *GmDREB* 基因导入大豆的研究[J]. *大豆科学*, 2007, 26(3):315-318. (Wang P, Guo Y L, Gao S Q, et al. Transforming *GmDREB* gene into soybean *via* particle bombardment[J]. *Soybean Science*, 2007, 26(3):315-318.)
- [9] Aragão F J L, Sarokin L, Vianna G R, et al. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 101:1-6.
- [10] Rech E L, Vianna G R, Aragão F J L. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3:410-418.
- [11] Christou P, Swain W F, Yang N S, et al. Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1989, 86:7500-7504.
- [12] 胡张华, 刘智宏, 郎春秀, 等. 影响大豆基因枪转化的几个参数[J]. *浙江农业学报*, 1999, 11(5):242-244. (Hu Z H, Liu Z H, Lang C X, et al. Several parameters involved in soybean transformation by particle bombardments[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 1999, 11(5):242-244.)
- [13] 王萍, 王罡, 吴颖, 等. 影响大豆基因枪遗传转化因子的研究[J]. *农业生物技术学报*, 2002, 10(3):36-37. (Wang P, Wang G, Wu Y, et al. Impact factors of soybean transformation by particle bombardments[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2002, 10(3):36-37.)
- [14] 叶美, 张敏, 杨素欣, 等. 大豆成熟种子胚尖基因枪转化体系的优化[J]. *大豆科学*, 2011, 30(1):20-23. (Ye M, Zhang M, Yang S X, et al. Optimization of biolistics transformation of embryonic tips of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] mature seeds[J]. *Soybean Science*, 2011, 30(1):20-23.)
- [15] 薛仁镐. 基因枪法转化大豆萌动种子影响因素的研究[J]. *大豆科学*, 2008, 27(2):194-198. (Xue R G. Factors affecting particle bombardment-mediated transformation of soybean germinating seeds[J]. *Soybean Science*, 2008, 27(2):194-198.)
- [16] Khalafalla M M, Rahman S M, El-Shemy H A, et al. Optimization of particle bombardment conditions by monitoring of transient *sGFP* (S65T) expression in transformed soybean[J]. *Breeding Science*, 2005, 55:257-263.