

发根农杆菌介导不同基因型大豆转化效率的筛选

李锦锦^{1,2}, 王 昉³, 张万科³, 文自翔², 李海朝², 袁道华²,
李金英², 张 辉², 杨青华¹, 卢为国^{2*}

(1. 河南农业大学 农学院, 河南 郑州 450002; 2. 河南省农业科学院 经济作物研究所/国家大豆改良中心郑州分中心,
河南 郑州 450002; 3. 中国科学院 遗传与发育生物学研究所, 北京 100101)

摘要: 基因型是影响发根农杆菌转化大豆的主要因素之一, 为筛选转化效率高的大豆基因型, 利用不同基因型大豆的下胚轴接种发根农杆菌 K599(含 *GUS* 基因), 待长出毛状根后, 根据不同基因型大豆发根诱导率和发根数的差异, 选择适宜大豆基因型进行 *GUS* 基因的组织化学染色和 RT-PCR 分析。结果表明, 34 个大豆基因型发根诱导率和发根数有很大差异, 选择发根诱导率大于 60% 以及发根数大于 1.6 条的 20 个大豆基因型毛状根进行 *GUS* 基因组织化学染色, 其中 Y091、Z184、P108、L010 等 4 个大豆基因型的 *GUS* 基因转化效率较高, 分别为 96.2%、91.7%、87.5%、86.4%; 进一步对以上 4 个大豆基因型毛状根进行 RT-PCR 分析, 结果表明, *GUS* 基因均得到了正确转录。表明大豆基因型 Y091、Z184、P108、L010 是发根农杆菌转化大豆较为理想的受体材料。

关键词: 发根农杆菌; 大豆; 毛状根; *GUS* 基因转化效率

中图分类号: S565.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)05-0037-05

Transformation Frequency Screening Different Soybean Genotypes Mediated by *Agrobacterium rhizogenes*

LI Jin-jin^{1,2}, WANG Fang³, ZHANG Wan-ke³, WEN Zi-xiang², LI Hai-chao²,
YUAN Dao-hua², LI Jin-ying², ZHANG Hui², YANG Qing-hua¹, LU Wei-guo^{2*}

(1. Agronomy College, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;
2. Institute of Industrial Crops, Henan Academy of Agricultural Sciences/National subcenter for Soybean Improvement in Zhengzhou, Zhengzhou 450002, China; 3. Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Soybean genotype might be one of the most important factors that influenced *Agrobacterium rhizogenes* transformation. In order to screen soybean genotypes with high transformation efficiency, K599 *Agrobacterium rhizogenes* harboring a binary vector pBI121 with *GUS* gene was used to inoculate different hypocotyls of different soybean genotypes. Suitable soybean genotypes were chosen to conduct histochemical staining for *GUS* gene and RT-PCR analysis according to the differences of hairy roots inducing rate and the number of roots when hairy roots grown. The results showed that there were great differences among 34 soybean genotypes in hairy roots inducing rate and the number of roots. Among them 20 soybean genotypes whose hairy roots inducing rate over 60% and number of roots per plant more than 1.6, were chosen to detect *GUS* histochemical staining, indicating Y091, Z184, P108 and L010 showed higher transformation frequencies

收稿日期: 2012-01-11

基金项目: 转基因生物新品种培育科技重大专项(2009ZX08009-054B); 河南省创新型科技人才队伍建设工程项目(094100510004); 郑州市创新型科技人才队伍建设工程项目(096SYJH14103)

作者简介: 李锦锦(1986-), 女, 河南巩义人, 在读硕士研究生, 研究方向: 大豆遗传育种。E-mail: happyjinjin213@126.com

* 通讯作者: 卢为国(1971-), 男, 河南伊川人, 研究员, 博士, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: 123bean@163.com

of 96.2%, 91.7%, 87.5% and 86.4%. Further RT-PCR analysis of those 4 soybean genotypes revealed *GUS* gene were transcribed correctly. It was indicated that soybean genotypes Y091, Z184, P108 and L010 were ideal receptor materials for *Agrobacterium rhizogenes* transformation.

Key words: *Agrobacterium rhizogenes*; soybean; hairy roots; *GUS* gene transformation frequency

随着生物信息技术的飞速发展,功能基因组学逐渐成为后基因组时代的的研究重心。对于植物来说,建立高效、稳定的遗传转化体系是验证基因功能的重要手段。尽管许多植物转基因方法得到了发展,但对于一些难转化植物,如大豆,转化效率仍然很低。自从第一个成功转基因大豆^[1]报道后,大豆遗传转化方法有所改进^[2-3],但是高效率的大豆遗传转化及再生体系对于许多大豆研究仍然是个挑战。近年来,一种利用发根农杆菌转化不同植物形成毛状根的快速、简便方法得到了发展。这种转化方法主要应用于产生次生代谢物^[4-5]、表达特异性启动子^[6]、分析与根系发育相关的基因功能^[7]、进行植株的再生培养^[8-9]等。采用发根农杆菌转化豆科植物产生的“复合体”植株包含一个野生型的非转基因苗和转基因的毛状根^[10],目前,这种转化方法已经成功地应用于大豆^[11-12],成为研究功能基因组学的一种快速、有效工具。

与根癌农杆菌生物学特性相似,发根农杆菌通过转化自身染色体外复制子上的一段内源 T-DNA (Ri 质粒) 进入植物基因组 DNA, 其上所携带的基因在宿主细胞中整合表达,使植物产生毛状根。前人对影响发根农杆菌 T-DNA 转化大豆的因素,如基因型、菌液浓度、接种温度、幼苗年龄等均进行了报道^[13-14],但研究筛选出来的大豆基因型相对有限^[14],不能满足国内尤其是黄淮地区试验材料所需,因此,筛选转化效率高并能稳定表达的大豆基因型显得尤为重要。鉴于此,选择 34 个大豆基因型进行了发根农杆菌转化,通过比较不同基因型大豆的发根诱导率、发根数量及转化效率,筛选出适宜发根农杆菌转化的大豆基因型,为利用大豆转基因毛状根研究基因功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 发根农杆菌菌株及质粒

试验菌株为野生型发根农杆菌 K599 和含有 *GUS* 基因的 K599 (中国科学院遗传与发育生物学研究所陈受宜惠赠)。分别在固体 LB 培养基和附加 50 mg/L 卡那霉素的固体 LB 培养基上划线, 28 °C 下暗培养 2 d。然后挑取单菌落于 5 mL 液体 LB 培养基中, 28 °C、180 r/min 条件下振荡培养过夜。待菌液 OD₆₀₀ 为 0.8 时用于接种。

1.2 供试大豆材料及培养

试验材料为河南省农业科学院的 34 个大豆栽培品种, 编号依次为 Z001、Z005、Z006、Z007、Z013、Z014、Z022、Z033、Z035、Z040、Z043、Z050、Z056、Z059、Z061、Z063、Z081、Z098、Z102、Z111、Z152、Z184、Z216、Z406、Z532、Y091、L010、P108、F127、F128、F131、F132、F142、F147。大豆种子使用 H₂O₂/乙醇溶液 (10 mL 30% 的 H₂O₂ 加入 75 mL 96% 的乙醇, 用无菌水定容至 100 mL) 消毒 2 min, 然后用无菌水冲洗 5~6 次, 将消毒后的种子种入蛭石, 在 23 °C 恒温、16 h/d 光照条件下进行发芽。

1.3 大豆毛状根的诱导

为了避免种子质量和播种深度的影响, 选择长势一致、5 d 苗龄的大豆幼苗 (图 1A), 每个大豆基因型 50 株, 用注射器针头将发根农杆菌菌液注射大豆下胚轴 1 次 (图 1B)。接种完毕后, 用含有通风孔的透明塑料盖子覆盖保湿, 23 °C 恒温、16 h/d 光照条件下进行毛状根的诱导。2~3 周后, 接种部位长出毛状根 (图 1C)。去掉初生根, 将形成的大豆“复合体”植株 (图 1D) 泡入水中。

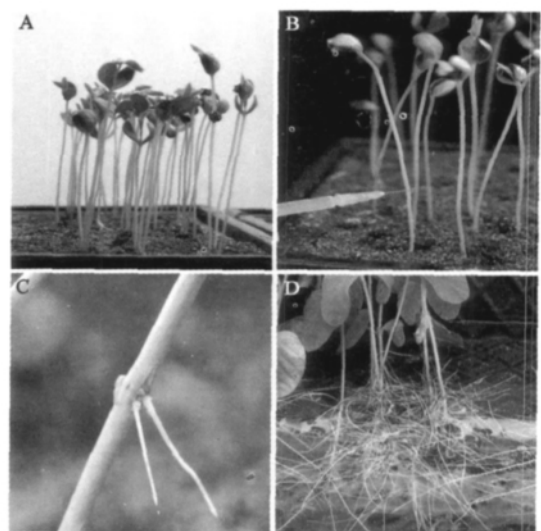


图 1 大豆毛状根诱导过程

1.4 大豆毛状根的组织化学染色

接种后 3~4 周, 大豆毛状根长到 5~10 cm 时, 使用 Jefferson 等^[15]改进的方法进行组织化学染色, 鉴定毛状根 *GUS* 基因的表达。分别将野生型 K599 (阴性对照) 和含 *GUS* 基因的大豆毛状根放入 X-Gluc 溶液, 置于 37 °C 下暗培养 12 h, 进行染色。

X-Gluc 溶液包含 50 mmol/L $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (pH = 7.0)、10 mmol/L Na_2EDTA 、0.1% (V/V) Triton X-100、50 mmol/L $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 、50 mmol/L $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、0.5 mg/mL X-Gluc。将染色后的根放入 70% 乙醇中脱色 30 min, 观察显色反应, 呈现蓝色的根为 *GUS* 阳性克隆。计算大豆毛状根 *GUS* 基因转化效率。

1.5 大豆毛状根 *GUS* 基因的 RT-PCR 分析

每个大豆基因型分别取 1 株对照(野生型 K599 转化)和 5 株转入 *GUS* 基因的转基因毛状根, 采用 Trizol 法提取大豆总 RNA, 用 Transscript First-strand cDNA Synthesis SuperMix(北京全式金生物技术有限公司试剂盒)合成 cDNA 第一链, 反应依据产品说明书进行。cDNA 稀释 5 倍后用于 *GmTubulin* 基因和转 *GUS* 基因的 PCR 扩增反应。以 *GmTubulin* 基因为内参调整 cDNA 模板用量, 当扩增产物的亮度基本一致时, 用此 cDNA 模板扩增 *GUS* 基因。

上游引物 *GmTubulin*-F: 5'-AACTCCATTT CGTCCATTCCTTC-3' 与下游引物 *GmTubulin*-R: 5'-TTGAGTGGATTCCCAACAACG-3' 用来扩增 *GmTubulin* 基因。PCR 扩增进行 28 个循环。预变性 95 °C, 10 min; 每个循环变性 95 °C, 30 s; 退火 57 °C, 30 s; 延伸 72 °C, 30 s。PCR 体系包括 cDNA 20 ng, 2× *Tag* MasterMix(购自 CWBio 康为世纪) 10 μL, *GmTubulin* 基因引物 mix(10 pmol) 1 μL, 总体系 20 μL。

上游引物 *GUS*-F: 5'-ATGTTACGTCCTG-TAGAAACCCC-3' 与下游引物 *GUS*-R: 5'-TCAT-TGTTTGCCCTCCCTGCT-3' 用来扩增 *GUS* 基因。PCR 扩增进行 40 个循环。预变性 95 °C, 10 min; 每个循环变性 95 °C, 30 s; 退火 65 °C, 30 s; 延伸 72 °C, 2 min 30 s。PCR 体系包括 cDNA 20 ng, 2× *Tag* MasterMix 10 μL, *GUS* 基因引物 mix(10 pmol) 1 μL, 总体系 20 μL。

1.6 数据处理方法

发根诱导率 = 发根株数/接种株数 × 100%; *GUS* 基因转化效率 = *GUS* 基因阳性根数/染色总根数 × 100%。采用 Excel 2003 软件进行数据处理和分析。

2 结果与分析

2.1 不同基因型大豆发根的诱导率, 发根数和转化效率

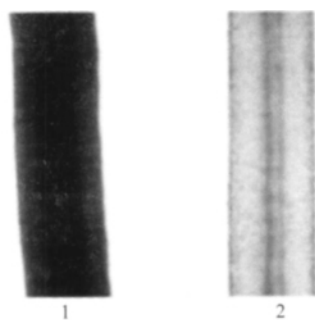
从表 1 可以看出, 不同基因型大豆发根诱导率、单株发根数有很大差异。其发根诱导率低于 60%、

60%~80% 的大豆基因型各有 13 个, 均占参试大豆基因型总数的 38.2%; 发根诱导率在 80% 以上的大豆基因型有 8 个, 占参试大豆基因型总数的 23.5%, 其中 Z216、Y091、L010 基因型的发根诱导率分别为 95.8%、92.9%、90.6%。单株发根数少于 1.6 条的大豆基因型有 12 个, 占参试大豆基因型总数的 35.3%; 单株发根数在 1.6 条以上的大豆基因型有 22 个, 占参试大豆基因型总数的 64.7%, 其中 17 个基因型大豆单株发根数在 1.6~2.4 条; Y091、L010、Z040、P108 等 4 个大豆基因型的单株发根数分别为 2.9、2.6、2.5、2.5 条; Z216 单株发根数最多, 平均为 4.0 条。

表 1 34 个大豆基因型发根诱导率、发根数

基因型	发根诱导率/%	单株发根数/条	基因型	发根诱导率/%	单株发根数/条
Z216	95.8	4.0	Z061	66.7	2.1
Y091	92.9	2.9	Z022	66.7	1.6
L010	90.6	2.6	Z056	62.5	1.7
Z152	88.2	2.2	Z006	62.5	1.6
Z040	88.0	2.5	F127	58.8	1.5
Z059	85.7	2.2	F147	55.6	1.6
Z532	82.8	1.9	Z050	55.6	1.4
Z001	81.0	1.9	F128	52.9	1.4
Z033	80.0	2.0	F132	50.0	1.0
Z005	79.2	2.1	Z007	45.5	1.2
P108	78.6	2.5	Z081	40.9	1.0
Z013	78.3	1.6	F142	37.5	0.8
Z184	73.3	2.0	Z102	34.4	0.7
Z014	71.4	1.6	Z098	26.7	1.0
Z063	70.4	1.6	F131	22.2	0.3
Z111	66.7	2.4	Z035	15.4	0.3
Z406	66.7	1.7	Z043	14.0	0.1

根据以上大豆基因型发根诱导率、单株发根数的差异, 从发根诱导率大于 60%、单株发根数 1.6 条以上的大豆基因型中选择 20 个进行 *GUS* 基因组织化学染色, 鉴定毛状根的 *GUS* 基因转化效率。转入 *GUS* 基因的毛状根经过组织化学染色后呈蓝色反应(图 2), 说明 *GUS* 基因在毛状根中得到了整合和表达, 未转基因毛状根均没有蓝色反应。由表 2 可知, *GUS* 基因转化效率低于 60% 的大豆基因型有 9 个, 占所选大豆基因型的 45.0%; *GUS* 基因转化效率 60%~80% 的大豆基因型有 7 个, 占所选大豆基因型的 35.0%; *GUS* 基因转化效率在 80% 以上的大豆基因型有 4 个, 占所选大豆基因型的 20.0%, Y091、Z184、P108、L010 等 4 个大豆基因型的转化效率分别为 96.2%、91.7%、87.5%、86.4%。而发根诱导率 95.8%、单株发根数量 4.0 条的 Z216 的 *GUS* 基因转化效率只有 56.4%。

1. 转 *GUS* 基因毛状根; 2. 未转基因毛状根图 2 大豆毛状根 *GUS* 基因组织化学染色表 2 20 个大豆基因型 *GUS* 基因转化效率

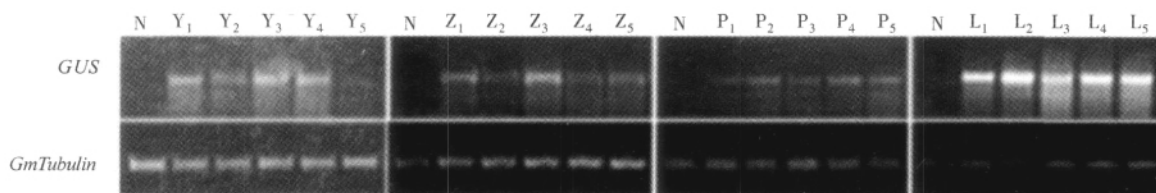
基因型	染色总根数/条	<i>GUS</i> 阳性根数/条	<i>GUS</i> 基因转化效率/%
Z216	78	44	56.4
Y091	26	25	96.2
L010	44	38	86.4
Z152	30	11	36.7
Z040	58	27	46.6
Z059	54	18	33.3
Z532	59	42	71.2
Z001	54	24	44.4
Z033	45	26	57.8
Z005	41	26	63.4
P108	32	28	87.5
Z184	48	44	91.7
Z014	25	17	68.0
Z063	39	20	51.3
Z111	51	32	62.7
Z406	28	17	60.7
Z061	40	24	60.0
Z022	40	26	65.0
Z056	54	32	59.3
Z006	27	13	48.1

2.2 不同基因型大豆 *GUS* 基因 RT-PCR 分析

根据 *GUS* 基因组织化学染色结果,选择转化效率 80% 以上的 4 个大豆基因型 Y091、L010、P108、Z184 进行 RT-PCR 分析,检测 *GUS* 基因在不同基因型大豆毛状根中转录水平的表达情况。扩增结果如图 3 所示,4 个大豆基因型对照(野生型 K599 转化)植株没有扩增出目标条带,而 4 个大豆基因型中每个基因型的 5 株转基因大豆根系均扩增出 1 812 bp 的目标条带,不同基因型大豆之间和同一种基因型不同转基因株系之间 *GUS* 基因的表达量存在差异。内参 *GmTubulin* 基因的表达在对照和转基因大豆植株间没有差别,该结果表明 *GUS* 基因分别在 Y091、L010、P108、Z184 等 4 个大豆基因型毛状根基因组中得到了正确转录。

3 结论与讨论

Kereszt A 等^[13]对发根农杆菌介导转化大豆方法进行了系统描述,指出采用发根农杆菌侵染大豆能够得到 70%~100% 的发根诱导率,单株发根数 6~7 条(至少 1 条根携带目标载体),转化效率为 25%~80%。Cao 等^[14]采用发根农杆菌介导转化大豆的方法对发根农杆菌菌液浓度、接种温度、幼苗年龄等影响 T-DNA 转化大豆的因素进行优化,并筛选出自贡冬豆和粤春 04-5 是发根农杆菌 K599 介导转化比较优秀的大豆基因型,然而该研究认为,采用发根农杆菌介导形成的一个“复合体”大豆植株,只要含有 *GUS* 基因表达的转基因毛状根(尽管



N. 用 K599 转化根系(阴性对照); Y₁—Y₅. Y091 转基因根系; Z₁—Z₅. Z184 转基因根系; P₁—P₅. P108 转基因根系; L₁—L₅. L010 转基因根系; *GUS*. 目标基因; *GmTubulin*. 大豆内参基因

图 3 4 个大豆基因型毛状根 *GUS* 基因的 RT-PCR 检测

不是所有的根都是转基因的),这个植株就被认为是转基因的。很显然,这样界定出来的大豆转化效率缺乏准确性。

参照前人研究方法,本研究选择生长 5 d 的大豆幼苗、菌液接种量 OD₆₀₀ 值 0.8、23 °C 恒温、16 h/d 光照保湿条件下,对 34 个大豆基因型进行了筛选。研究发现,不同大豆基因型的发根诱导率、发根数、转化效率之间有很大差异。选择发根诱导率大于

60%、发根数 1.6 条以上的 20 个大豆基因型进行 *GUS* 基因组织化学染色,结果表明,Y091、Z184、P108、L010 等 4 个大豆基因型的 *GUS* 基因转化效率较高,分别为 96.2%、91.7%、87.5%、86.4%。进一步对 4 个大豆基因型进行 RT-PCR 分析,*GUS* 基因在 4 个大豆基因型毛状根中均得到了正确转录。由此可见,Y091、Z184、P108、L010 等 4 个大豆基因型是发根农杆菌转化的理想受体材料,适宜用

于后续试验。

参考文献:

- [1] Hinchey M, Connorward D V. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer[J]. Nature Biotechnology (NY), 1988, 6: 915-922.
 - [2] 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.
 - [3] 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(7): 478-482.
 - [4] Sevon N, Oksman C, Kirsi M. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation; root cultures as a source of alkaloids[J]. Planta Med, 2002, 68(10): 859-868.
 - [5] Moyano E, Jouhikainen K, Tammela P. Effect of *pmt* gene overexpression on tropane alkaloid production in transformed root cultures of *Datura metel* and *Hyoscyamus muticus* [J]. J Exp Bot, 2003, 54 (381): 203-211.
 - [6] Xiao K, Zhang C, Harrison M, et al. Isolation and characterization of a novel plant promoter that directs strong constitutive expression of transgenes in plants [J]. Mol Breed, 2005, 15(2): 221-231.
 - [7] Ivashuta S, Liu J Y, Liu J Q, et al. RNA interference identifies a calcium-dependent protein kinase involved in *Medicago truncatula* root development [J]. Plant Cell, 2005, 17(11): 2911-2921.
 - [8] Cho H J, Wildholm J M. Improved shoot regeneration protocol for hairy roots of legume *Astragalus sincus* [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 2002, 69: 259-269.
 - [9] Kuntal K N, Narayan B, Chaudhuri D, et al. Spontaneous plant regeneration in transformed roots and calli from *Tylophora indica*; changes in morphological phenotype and tylophorine accumulation associated with transformation by *Agrobacterium rhizogenes* [J]. Plant Cell Rep, 2006, 25(10): 1059-1066.
 - [10] Hansen A C, Busk H, Marcker A, et al. *VsENBP1* regulates the expression of the early nodulin *PsENOD12B* [J]. Plant Mol Biol, 1999, 40 (3): 495-506.
 - [11] Taylor C G, Fuchs B, Collier R, et al. Generation of composite plants using *Agrobacterium rhizogenes* [J]. Methods Mol Biol, 2006, 343(2): 155-167.
 - [12] Hayashi S, Gresshoff P M, Kinkema M. Molecular analysis of lipoxygenases associated with nodule development in soybean [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2008, 21(6): 843-853.
 - [13] Kereszt A, Li D, Indrasumunar A, et al. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study rootbiology [J]. Nat Protoc, 2007, 2 (4): 948-952.
 - [14] Cao D, Hou W S, Song S K, et al. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2009, 96(1): 45-52.
 - [15] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. *GUS*-fusions; β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants [J]. EMBO J, 1987, 6(13): 3901-3907.
-
- (上接第 22 页)
- [4] 吕育新. 蔬菜品种对发酵蔬菜质量及纯乳酸菌发酵过程的影响[J]. 中国调味品, 2009, 34(2): 59-61.
 - [5] 熊涛, 徐立荣, 范镭, 等. 蔬菜发酵专用乳酸菌的选育 [J]. 食品科学, 2008, 29(6): 264-267.
 - [6] Abraham M, Venter P, Lues J F R, et al. Changes in lipopolysaccharide-related endotoxicity of food-borne pathogens in response to safety treatments practised in South Africa [J]. Journal of British Food, 2009, 111 (67): 528-538.
 - [7] 刘金香. 苯甲酸钠对植物萌发的影响初探[J]. 生物学杂志, 2001, 18(6): 28, 35.
 - [8] 刘文, 张春海, 张子峰, 等. 防腐剂山梨酸钾对蚕豆根尖细胞的遗传毒性[J]. 江苏大学学报: 医学版, 2004, 14 (6): 489-493.
 - [9] 李浩川, 王琳, 刘宗华, 等. 不同遗传背景玉米自交系子粒主要营养品质的异性分析[J]. 河南农业大学学报, 2006, 40(3): 225-229.
 - [10] 陈广丰. 夏玉米高产综合配套栽培技术[M]. 天津农业科学, 2008, 14(6): 32-34.
 - [11] 刘萍, 李明军. 植物生理学试验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 39-41, 147-149.
 - [12] 任小林, 李嘉瑞. 杏果实成熟衰老过程中活性氧和几种生理指标的变化[J]. 植物生理学通讯, 1991, 27 (1): 34-36.
 - [13] 杨性愉, 王艳荣, 陈京珍, 等. 山梨酸钾清除超氧阴离子自由基的作用[J]. 内蒙古大学学报: 自然科学版, 1998, 29(3): 28-31.