

# Establishment of *in Planta* Transformation of Soybean

Lingjun Xia, Chaofan Chen, Mingxue Pi, Meng Cao, Youping Wang

College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou  
Email: [wangyp@yzu.edu.cn](mailto:wangyp@yzu.edu.cn)

Received: Jul. 14<sup>th</sup>, 2014; revised: Aug. 12<sup>th</sup>, 2014; accepted: Sep. 2<sup>nd</sup>, 2014

Copyright © 2014 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## Abstract

Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] is recognized as one of the plants which is very difficult to be transformed. *Agrobacterium*-mediated transformation method is the most commonly used method in soybean transformation. However, it results in a relatively lower transformation rate. In this study, *in planta* transformation was used to introduce thermal resistance gene (*BnTR1*) into soybean. The experiment process was through seed germination, wounds making, *Agrobacterium* infection and new buds induced afterwards. Finally 100 mg/L PPT (glufosinate) was used for screening resistant plantlets. Through this method, we successfully introduced plasmid pc3301-121-*BnTR1* into soybean and got resistant plantlets. With approval of PCR detection, six T0 transgenic plants harboring *BnTR1* were obtained with a transformation rate of 4.96%.

## Keywords

*Glycine max* (L.) Merr., *In Planta*, *BnTR1*, *Agrobacterium tumefaciens*

# 原位转化获得转基因大豆方法的建立

夏凌君, 陈超凡, 皮明雪, 曹 梦, 王幼平

扬州大学生物科学与技术学院, 扬州  
Email: [wangyp@yzu.edu.cn](mailto:wangyp@yzu.edu.cn)

收稿日期: 2014年7月14日; 修回日期: 2014年8月12日; 录用日期: 2014年9月2日

## 摘要

大豆是公认的较难转化的植物之一，农杆菌转化大豆是大豆遗传转化中最常用的方法，但是目前的转化效率仍很低。本实验采用原位转化法将具有耐热功能的基因(*BnTR1*)导入大豆，具体方法是大豆种子萌发、伤口制造、农杆菌侵染、诱导新芽分化，最后用100 mg/L的PPT(草丁膦)筛选鉴定抗性苗。通过该方法成功将pc3301-121-*BnTR1*质粒转化大豆中，经PCR检测，共获得6棵T0代阳性植株，转化率为4.96%。

## 关键词

大豆，原位转化法，*BnTR1*，根癌农杆菌

## 1. 引言

大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.] 是全世界主要的蛋白和油料作物之一[1]。建立一个高效的遗传转化体系不仅可以促进大豆分子生物学和功能基因组学的研究，还可以改善大豆的品质、实现农艺性状的改良[2]。通过使用微粒轰击芽分生组织[3]、胚胎细胞悬浮培养[4]、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导T-DNA进入大豆未成熟的子叶[5]以及幼苗的子叶节[6]等方法已成功获得转基因大豆。根癌农杆菌转化法是目前使用最广泛的植物遗传转化方法，在拟南芥[7]、玉米[8]、水稻[9]、烟草[10]中均成功运用。在大豆农杆菌转化中，主要是以子叶节为外植体，诱导分化丛生芽、再生植株[11]。该方法对无菌环境的要求高，培养技术复杂且转化率低，转化苗成活率低，对人力物力的消耗也较大。

植物原位转化法(*in planta transformation*)是一种简单的转基因技术，它和传统组培技术的根本区别是不需要组织和细胞培养手段而达到植物在活体而非离体状态下的转化[12]，原位转化法包括种子转化法、伤口接种法、真空渗入法、和浸花法等[13]。该方法在拟南芥、苜蓿、白菜、萝卜等植物上有成功报道[14]。*BnTR1*(thermal resistance)是四川大学杨毅教授的科研团队在甘蓝型油菜中克隆到的能提高植物耐热性的基因。*BnTR1*是膜结合的蛋白，该蛋白有一个典型的锌指结构域(RINGv)，在体外具有E3泛素连接酶活性，目前已经成功地将*BnTR1*基因导入油菜和水稻中；在高温胁迫下，*BnTR1*基因能明显提高植物的存活率、花粉活力、结实率等[15]。本实验首先建立了大豆的原位转化方法，并成功地将*BnTR1*基因导入到大豆中，获得阳性苗，为转基因大豆建立了一个稳定的转化平台，同时可以丰富大豆的种质资源，为大豆抗逆品种的选育提供宝贵的材料。

## 2. 材料与方 法

### 2.1. 供试材料和培养基成分

供试大豆为东农 50(小粒豆)，由东北农业大学大豆研究所提供。大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ ，农杆菌菌株 EHA105 均为本室保存；质粒 pc3301-121-*BnTR1* 是由四川大学杨毅博士提供。大豆原位转化方法中所用的培养基见表 1。

### 2.2. 农杆菌介导的大豆原位转化法

受体材料的准备：挑取饱满的大豆种子，置于蛭石中萌发 4 d，子叶展开前用刀片小心去除顶芽和侧芽，轻轻在子叶节上划 3~5 道伤口后作为受体。

农杆菌侵染：农杆菌培养至 OD<sub>600</sub> = 0.8 时，取 30 mL 于 4000 rpm 离心 5 min；用 50 mL 的培养基

M1 重悬，将制备好的菌液沿子叶缝隙滴入，保湿培养。

芽诱导阶段：隔天在伤口处滴加培养基 M2，诱导新芽的分化生长。

抗性苗的筛选：利用 100 mg/L 的 PPT(草丁膦)对分化后伸长芽的三出叶进行涂抹，3 d 后观察，用剪刀从基部去除阴性植株，直至筛选到抗性植株。PCR 检测 PPT 阳性苗。

移栽：将 PCR 阳性苗移至土中正常培养。

### 2.3. 抗性植株分子检测

采用 CTAB 法提取大豆叶片 DNA，PCR 检测。*BnTR1* 基因引物序列：5'-GGATCCATGTCGGATCA TTTGAGTTTATGTACC-3', 3'-GAGCTCTCAGACTGGTGTGGGTTGGATATTG-5'，预期扩增长度为 861 bp，PCR 反应程序为 94℃ 预变性 5 min，(94℃ 变性 30 s，51℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 1 min)35 个循环，72℃ 复性 10 min。

## 3. 结果与分析

### 3.1. 原位转化法转 *BnTR1* 基因大豆植株的获得

用含有 *Bar* 筛选基因的 *BnTR1* 质粒载体的农杆菌侵染大豆，具体的实验过程如图 1 所示。先将种子放置在蛭石中进行萌发，播种时要保证浇水充足，用保鲜膜覆盖保持湿度，在温室中进行培养，25℃，光周期 16 h/8 h(day/night)，生长 4 d 后(图 1A)，用手术刀片(11<sup>#</sup>)将主芽和侧芽去净(图 1B)，并用刀片在节上轻轻划 3~5 刀(划伤后的分生组织可以使农杆菌更加容易侵染进入)。这时期幼苗生长活力旺盛，分生组织分裂快速，适合进行农杆菌侵染；所制造的伤口不宜太深，以防损伤子叶节中的分生组织等。将农杆菌菌液(OD<sub>600</sub> = 0.8)滴加在伤口上进行侵染(图 1C)，重复两次，每天一次，期间保持暗培养。隔天在

Table 1. Culture media used for soybean *in planta*\*

表 1. 大豆原位转化法中应用的培养基\*

培养基类型	培养基成分
M1	1/2 MS + 3% 蔗糖 + 1.67 mg/L 6-BA + 0.3‰ Silwet77 + 0.1 g/L Cys + 0.158 g/L Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> + 0.154 g/L DTT + 200 μM AS
M2	1/2 MS + 1.67 mg/L 6-BA + 0.3‰ Silwet77

\*MS 基础培养基；Silwet77 有机硅表面活性剂；6-BA 6-苄氨基嘌呤；Cys 半胱氨酸；DTT 二硫苏糖醇；AS 乙酰丁香酮。



A. 种子萌发 4 d; B. 去除主芽和侧芽后的幼苗; C. 在子叶节位点制造伤口; D. 农杆菌侵染后的丛生芽诱导; E. 再生植株; F. PPT 涂抹筛选前的植株

Figure 1. The experimental process of *in planta* transformation of soybean

图 1. 大豆原位转化法的实验流程

伤口处涂抹芽诱导液 M2, 连续涂抹 5 次进行丛生芽的诱导(图 1D)。诱导出的丛生芽可再生植株(图 1E)。

待每个单枝上长出 3 片新叶后用 100 mg/L 的 PPT(草丁膦)对分化后伸长芽的叶片进行抗性筛选涂抹(图 1F), 3 d 后观察, 若叶片表现为不抗, 则用剪刀从基部去除阴性植株, 连续用 PPT 涂抹 3~4 次, 重复涂抹 PPT 时避开已涂抹的叶片, 经过 3~4 次筛选留下的高抗和中抗植株(图 2), 提取叶片基因组 DNA 进行 PCR 扩增检测。

### 3.2. 大豆再生植株的 PCR 检测

本实验通过种子萌发、去除主芽及侧芽、伤口制造、农杆菌侵染、诱导丛生芽、PPT 叶片抗性筛选等过程, 总共获得再生大豆植株 121 棵。取适量幼嫩叶片, 提取 DNA 用 *BnTR1* 基因引物进行 PCR 扩增, 以含 *BnTR1* 基因的质粒 DNA 为阳性对照, 以非转基因苗叶片 DNA 为阴性对照。扩增出与阳性质粒相同的 861 bp 的特异性条带(图 3), 有 6 棵大豆再生植株表现为阳性, 转化率为 4.96%。

## 4. 讨论

大豆是公认的较难转化的植物之一, 农杆菌转化大豆是大豆遗传转化中最常用的方法, 但是转化效率很低[16]。为了提高转化效率, 解决无菌培养带来的各种问题, 本研究利用一种新型的大豆农杆菌转化方法—原位转化法。在实验过程中有几点值得注意的地方: 1) 受体制备阶段, 将两片大豆子叶分开时动作尽量要轻, 否则容易将子叶弄断。在子叶节制造伤口时, 要切的尽量的深, 接近分生组织, 但也要避免造成其他组织伤害。2) 菌液的制备, 最重要的是控制好菌液的 OD 值, 我们研究发现当  $OD_{600} = 0.8$  时, 转化效果最佳。这就需要准确的把握好摇菌的时间, 菌液的制备是整个转化流程中关键的一步。3) 农杆菌侵染阶段, 要使两片子叶将农杆菌包裹住, 给予农杆菌足够的侵染时间, 研究表明, 农杆菌偏爱黑暗环境, 之后要进行暗培养, 研究表明在黑暗中转化率要比光照下高[17]。4) 诱导阶段, 受体制备时主芽

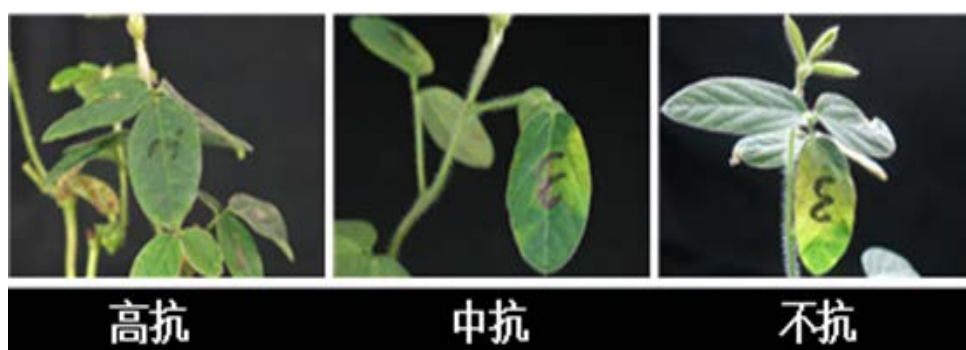


Figure 2. Different resistance of leaves in transformed plantlets under selection of 100 mg/l PPT  
图 2. 转化植株叶片对 100 mg/l PPT 的不同抗性



M: DL2000, +: 阳性对照, -: 阴性对照, 1, 2, 4: 未转化植株, 3, 5~9: 阳性植株

Figure 3. PCR detection of *BnTR1* gene  
图 3. 转 *BnTR1* 基因大豆植株的 PCR 鉴定

和侧芽的切除不干净, 在这个阶段会产生较多的大芽, 要将这些大芽掐除干净, 否则在后期筛选阶段会造成干扰。

该方法进行大豆转化有很大的优势, 首先, 这种方法是在蛭石中培养, 减少了组织培养中各种培养基和激素的配制与使用, 降低了实验过程中的人力和物力。其次, 大豆无需在无菌环境中操作培养, 可以不用担心真菌污染对大豆培养过程中造成的影响, 对实验操作技能要求没有组培高, 操作起来比较容易, 苗成活率高。最后, 转化效率明显提高, 实验中共得到再生苗 121 棵, PCR 检测有 6 棵阳性苗, 转化率为 4.96%, 比起组培的子叶节转化率 1.5% [18], 转化效率要高。本实验利用原位转化法成功转入 *BnTR1* 基因, 证明了这种方法的有效性。同时通过摸索建立出适合大豆的转化体系, 为今后进行大豆转化实验提供了一个强有力的技术支持。

## 基金项目

扬州大学创新基金资助。

## 参考文献 (References)

- [1] Zeng, P., Vadnais, D.A., Zhang, Z., *et al.* (2004) Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Report*, **22**, 478-482.
- [2] Ko, T.S., Lee, S., Krasnyanski, S., *et al.* (2003) Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explant. *Theoretical and Applied Genetics*, **107**, 439-447.
- [3] McCabe, D.E., Swain, W.F., Martinell, B.J., *et al.* (1998) Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Nature Biotechnology*, **6**, 923-926.
- [4] Parrott, W.A., Hoffman, L.M., Hildebrand, D.F., *et al.* (1989) Recovery of primary transformants of soybean. *Plant Cell Report*, **7**, 615-617.
- [5] Yan, B., Reddy, M.S.S., Collins, G.B., *et al.* (2000) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using immature zygotic cotyledon explants. *Plant Cell Report*, **19**, 1090-1097.
- [6] Hinchee, M.A.W., Connor-Ward, D.V., Newell, C.A., *et al.* (1988) Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Nature Biotechnology*, **6**, 915-922.
- [7] Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998) Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **16**, 735-743.
- [8] Frame, B.R., Shou, H., Chikwamba, R.K., *et al.* (2002) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. *Plant Physiology*, **129**, 13-22.
- [9] Hiei, Y., Komari, T. and Kubo, T. (1997) Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*, **35**, 205-218.
- [10] Sparkes, I.A., Runions, J., Kearns, A., *et al.* (2006) Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature Protocols*, **1**, 2019-2025.
- [11] 周延清, 王娜, 苑保军等 (2004) 大豆遗传转化研究进展. *武汉植物学研究*, **22**, 163-170.
- [12] 刘凡, 王国英, 曹鸣庆 (2003) 农杆菌介导的植物原位转基因方法研究进展. *分子植物育种*, **1**, 108-115.
- [13] 曹士亮, 李文滨, 王石等 (2013) 农杆菌介导的 *BcWRKY2* 基因原位转化玉米茎尖的初步研究. *作物杂志*, **4**, 51-56.
- [14] 武小霞, 李文滨, 张淑珍 (2005) 我国大豆转基因研究进展. *大豆科学*, **24**, 144-149.
- [15] Liu, Z.B., Wang, J.M., Yang, F.X., *et al.* (2013) A novel membrane-bound E3 ubiquitin ligase enhances the thermal resistance in plants. *Plant Biotechnology Journal*, **12**, 93-104.
- [16] 林树柱, 曹越平, 卫志明 (2005) 根瘤农杆菌介导的大豆遗传转化. *生物工程学报*, **20**, 817-820.
- [17] 马丽萍, 胡正, 张保缺等 (2008) 一种快速高效的大豆农杆菌转化技术. *中国农业科学*, **41**, 661-668.
- [18] Paz, M.M., Martinez, J.C., Kalvig, A.B., *et al.* (2006) Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. *Plant Cell Report*, **25**, 206-213.