

利用 Ri 质粒向栽培大豆导入马铃薯 y 病毒 外壳蛋白基因的研究简报

发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*) Ri 质粒做为基因载体的特点是:(1)由于 Ri 质粒的 T-DNA 不影响植物的再生,可直接用做中间载体的受体;(2)Ri 质粒的 T-DNA 插入受体细胞基因组 DNA 诱发的毛状根,起源于单细胞,所以由毛状根产生的再生植株是纯合的;(3)转化的毛状根易检测与再生植株。因此,近年来利用 Ri 质粒做转基因的载体,向受体植物导入外源基因的研究日益受到重视。

大豆在我国北方由于花叶病毒的危害,严重影响产量(可减产 10—17%)与质量(褐斑粒)。因此,大豆的抗花叶病毒育种,已成为当前大豆育种的重要课题。

大豆花叶病毒是属于马铃薯 y 组病毒的一个成员,两者具有同源性。利用 Ri 质粒将马铃薯 y 病毒外壳蛋白基因导入大豆基因组 DNA,有可能获得抗大豆花叶病毒的植株,获得新抗源,为大豆育种开辟一条新途径。

本实验用的表达载体为 PBCY-401,带有 NPT II 和 PVY-CP 基因(马铃薯 y 病毒外壳蛋白基因),是中国科学院微生物研究所构建。用发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*) R1000(pRiA4b)作为受体,大肠杆菌 HB101(pRK2013)为诱动菌,进行接转移,将 PBCY-401 质粒转移到发根农杆菌 pRiA4b 受体中,得到转移子(pRiA4b+PBCY-401)。

感染的大豆品种,均为黑龙江省推广的对花叶病毒易感或中抗品种。转移子菌液感染大豆的外植体有胚轴,子叶和子叶节;感染方法用注射法和带有切口的外植体与菌液共培养法。经 2—4 周诱导出毛状根和丛生芽。毛状根经卡那霉素(Km)培养基筛选和纸电泳农杆菌碱检测,确认为转化体后,培养在含有羧苄青霉素的 MS 培养基上,25℃黑暗条件下培养,使其大量扩增,然后转移到无激素的 MS 琼脂培养基上,在 16 小时光照条件下诱导愈伤组织与再生植株。

在“绥农 8 号”、“合丰 25 号”大豆的子叶与子叶节上诱导出丛生芽和再生植株,经 50μg/ml Km 培养基筛选和纸电泳检测,在再生植株的根、茎、叶、顶芽处均检测到农杆菌碱和甘露碱,证明检测的再生植株是转化体。

对转化体的 DNA 进行检测,用光生物素标记马铃薯 y 病毒外壳蛋白基因作探针,用斑点杂交的方法,与转化组织的核 DNA 杂交,观察到“绥农 8 号”大豆的毛状根和愈伤组织呈阳性,斑点清晰。证明有马铃薯 y 病毒外壳蛋白基因的存在。

再生植株转移到花盆中栽培,植株表现矮化,叶片皱缩,节间短,花期提前,花数减少,有的表现不育,获得少量结 1—2 个粒的豆荚,上述特征为 Ri 质粒 T-DNA 插入受体植物基因组 DNA 出现的典型的形态特征。

综上所述,利用 Ri 质粒为载体向受体植物导入外源基因是可行的。本实验正在扩大转化株数,进一步做 DNA 分子杂交检测,及对转化体进行遗传分析等。

徐香玲 刘伟华

(哈尔滨师范大学生物系)