

农杆菌介导的大豆子叶节 基因导入和再生植株*

吕慧能** 盖钧镒 马育华

(南京农业大学大豆研究所, 南京, 210014)

卫志明 许智宏

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海, 200032)

摘 要

以栽培大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) 南农 73-935、南农 87C-39、南农 86-21、卫 515 子叶节组织为材料, 接种农杆菌 C58C1(pGV2260::pGV300), 在含卡那霉素(km)200mg/l 的 MS 培养基上仅自卫 515 品种筛选得到 5 株抗性小植株, 对其中最绿的一株进行新霉素磷酸转移酶Ⅱ活性测定。

关键词 大豆; 遗传转化; 农杆菌

近年来植物遗传转化技术发展非常迅速。在大豆方面, 人们用农杆菌感染^[5,9,13,16]大豆组织, 成功地将新霉素磷酸转移酶Ⅱ(NPT II)等报道基因及玉米转座因子(Ac, Dc)导入了大豆基因组。此外, 电击^[7]、PEG/电击^[11]、基因枪^[6]、子房注射^[2]和花粉管通道^[4]等方法也进行了遗传转化及外源基因表达的研究。和其它方法相比, 农杆菌介导转化有方法简单、效率高等优点。本文以新选育的大豆品种(系)为材料, 用植株再生能力较强的子叶节为外植体研究这种方法的应用和改进。

材 料 与 方 法

供试大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) 材料南农 73-935、南农 86-21、南农 86-4、卫 515 等品种(系)由南京农业大学大豆研究所提供。

* 本课题得到国家自然科学基金和江苏省科学技术基金的资助, 主要实验工作在中国科学院上海植物生理研究所植物分子遗传国家重点实验室里完成。复旦大学遗传所汪训明教授为本工作提供了所有菌株, 谨此致谢。

** 现在浙江省农科院原子能利用研究所, 杭州, 310021。

本文于 1992 年 11 月 16 日收到。 This paper was received on Nov. 16, 1992.

菌株 土壤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) C58C1 (pGV2260::pGV300)、C58C1(pGV2260)^[6]皆由复旦大学遗传所提供。pGV300 T-区有卡那霉素抗性(新霉素磷酸转移酶 I, NPT II)、潮霉素抗性等报道基因。

烟草 (*Nicotiana tabacum*) 革新一号由中国科学院上海植物生理研究所植物分子遗传国家重点实验室提供。

农杆菌质粒活性检定 参考 Horsch et al.^[10]方法,以烟草无菌苗叶片为材料检定农杆菌的转化活性

大豆子叶节组织培养再生植株 参照 Wright et al.^[15]方法。

大豆子叶节外植体和农杆菌共培养 农杆菌 C58C1 (pGV2260) 和 C58C1 (pGV2260::pGV300) 分别于含羧苄青霉素 (Cb, Carbenicillin) 100 μ g/ml 的 YEB 培养基和同时含羧苄青霉素 (Cb, Carbenicillin) 100 μ g/ml 及链霉素 (Sm, Streptomycin) 100 μ g/ml 的 YEB 培养基、28 $^{\circ}$ C 150rpm 液体摇床培养,取对数生长期菌液,接种大豆子叶节。在 $\frac{1}{10}$ SH 固体培养基上^[14]共培养二天后,移到加有卡那霉素 (Km, Kanamycine) 200mg/l 氨基头孢菌素 (Cefotaxime) 500mg/l 的再生植株培养基上(其成分为附加 BA1. 15mg/l 及前述抗生素的 $\frac{1}{2}$ MS) 培养。2—3 个月后产生 2 厘米左右芽(卫 515)。



图 1 大豆子叶节外植体的转化

左:接种 C58C1(pGV2260)的对照(Km 200mg/l 上)。

右:接种 C58C1(pGV2260::pGV300)的卫 515 外植体 Km 200mg/l 上长绿芽。

Fig. 1 Transformation of explants from cotyledon tissue of *Glycine max*.

Left: the control (cocultivated with C58C1(pGV2260)) on medium with Km 200mg/l.

Right: treated explants (cocultivated with C58C1(pGV2260::pGV300))

shooting on medium with Km 200mg/l (cv. Wei 515).

C58C1(pGV2260)每品种(系)接种 30 个子叶节,C58C1(pGV2260::pGV300)对卫

515 接种 130 个子叶节,其余品种(系)接种 80 个子叶节(每个品种)。

将卡那霉素抗性的转化绿芽割下移到 $B_5 + Km\ 200mg/l + Cefotaxime\ 200-500mg/l$ 固体培养基上生根。同时观察含卡那霉素的培养基上长出的白化芽在 $B_5 + Cefotaxime\ 200-500mg/l$ 上的生长情况。

NPT II(neomycine phosphotransferase II)检测 参照 McDonnell et al. 方法。

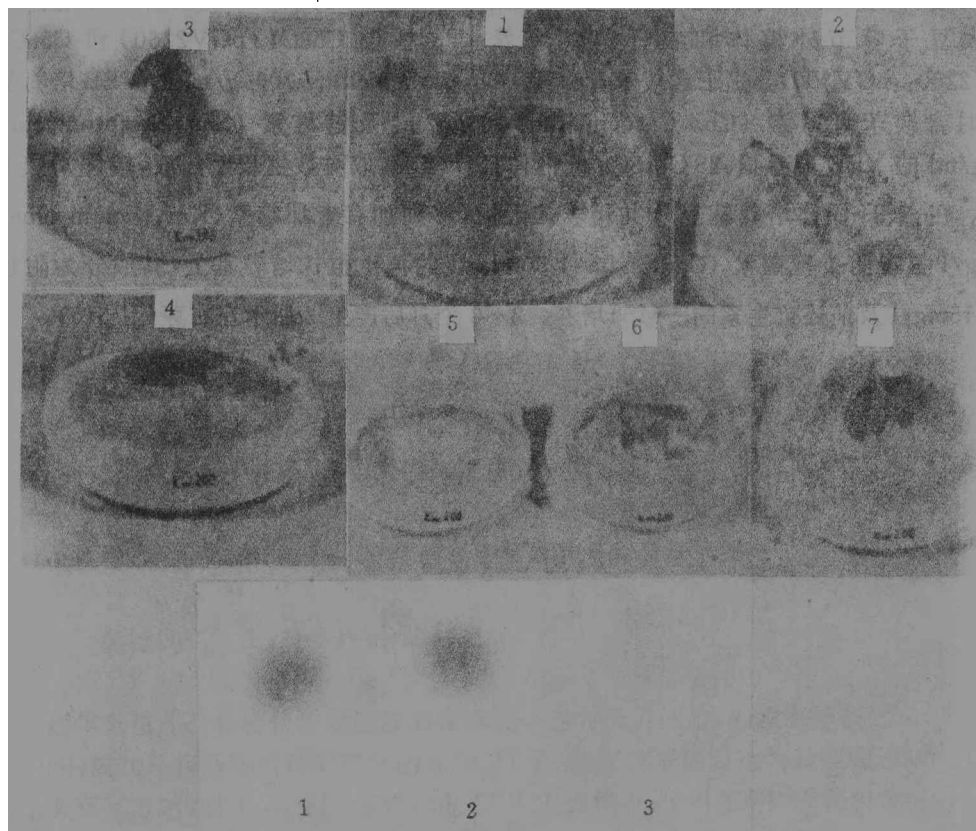


图2 大豆转化再生植株(卫515)和NPT II检测

上:1. 负对照(Km 200mg/l 上);2. 正对照(无 Km);3-7. Km 200mg/l 上转化小植株。

下:1、2 分别是转化的烟草和大豆;3. 大豆负对照。

Fig. 2 Transformed plantlets of *Glycine max* cv. wei 515 and Detection of NPT II.

Upper:1. negative control (on medium with Km 200mg/l).

2. Positive control (on medium without Km).

3-7. transformed plantlets on medium with Km 200mg/l.

Below: detection of NPT II, 1, 2 and 3 are transformed tobacco, transformed soybean and negative control of soybean, respectively.

结 果

C58C1(pGV2260::pGV300)经烟草转化活性检测后用于大豆的遗传转化。转化的烟草(卡那霉素抗性植株)测得 NPT II 酶活性(图 2)

接种 C58C1(pGV2260::pGV300)的大豆子叶节如方法中的所述经再生,生根等选择培养后,卫 515 的 130 个子叶节得到了 5 株卡那霉素抗性的绿色的植株。为确定它的 NPT II 表达情况,选其中最绿的 1 株根茎叶各一小段,测得 NPT II 酶活性(图 2)。其它接种 C58C1(pGV2260::pGV300)的品种(系)仅观察到卡那霉素抗性的绿色小芽,在生根选择培养基上停止进一步发育。而接种 C58C1(pGV2260)的各品种(系)子叶节仅产生白化芽,即使移到无卡那霉素的 B₅ 固体培养基上也不再继续生长。未曾测得它们的 NPT II 酶活性。

讨 论

大豆不同基因型转化的成败,是各基因型对农杆菌的易感性差异所致^[9],也可能由于再生植株频率之间的差异。卫 515 品种的芽有时会成簇出现,而其它品种(系)却从未观察到这种现象。得到转化植株的频率还受接种时接种伤口深度与面积等因素影响。

从形态上看,卡那霉素抗性的转化植株不如不加卡那霉素的培养基上的所得的植株正常,这可能是组织水平转化嵌合性的缘故。为克服再生植株的嵌合性,提高转化效率,以便育种中应用,需要在更广泛的基因型中筛选更易感农杆菌,更易再生植株的材料,并利用原生质体再生植株受体系统^[1,3]进行原生质体、细胞水平转化的研究。

为精确地估计各品种(系)分化频率的差异,观察了几批试验的情况,发现批次之间这种差异不太稳定。但平均地讲,卫 515 品种每 10 个子叶节约有 3—4 个子叶节分化产生芽,而其它品种(系)只有 2 个左右子叶节分化产生芽。由此粗略的结果也可看出,基因型在作物离体遗传操作中的重要性。

参 考 文 献

- [1] 卫志明等:大豆原生质体培养和植株再生,植物学报,1990,32(8):582—588
- [2] 刘博林等:龙葵 Atrazine 抗性基因向大豆叶绿体的转移及在转基因植株中的表达,1990,中国科学 B 辑,7: 699—705
- [3] 罗希明等:大豆原生质体的植株再生,植物学报,1990,32(8):618—621
- [4] 雷勃钧等:外源 DNA 直接导入大豆的研究. 大豆科学,1991,10(1):58—62
- [5] Baldes, R. et. : Transformation of soybean protoplasts from permanent suspension cultures by cocultivation with cells of *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Mol. Biol. , 1987, 9:135—145
- [6] Christou, P. : Soybean transformation by electric discharge particle acceleration. Physiol. Plant. 1990, 79: 210—212
- [7] Christou, P. et al. : Cotransformation frequencies of foreign genes. Theor. Appl. Genet. 1990, 79:337—

341

- [8] Deblaere, R. et al. : Efficient octopine Ti plasmid - derived vector for *Agrobacterium* - mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acid Res.* 13:4777-4788
- [9] Hinchee, M. A. et al. : Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium* - mediated DNA transfer. *Bio/Technology*, 1988,6:915-922
- [10] Horsch, R. B. et al. : A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 1985,227: 1229-1231
- [11] Lin, W. et al. : Soybean protoplast culture and direct gene uptake and expression by cultured soybean protoplasts. *Plant Physiol.* , 1987,84:856-861
- [12] McDonnell, R. E. et al. : A simplified method for the detection of neomycin phosphotransferase II activity in transformed plant tissues. *Plant Mol. Biol. Rep.* , 1987,5:380-386
- [13] Parrott, W. A. et al. : Recovery of primary transformants of soybean. *Plant Cell Rep.* , 1989,7:615-617
- [14] Schenk, R. U. et al. : Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* , 1972,50:199-204
- [15] Wright, M. S. et al. : Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max*. *Plant Cell Rep.* , 1986,5:150-154
- [16] Zhou, J. H. et al. : In situ detection of transposition of the maize controlling element (Ac) in transgenic soybean tissues. *Plant Cell Rep.* , 1990,8:542-545

AGROBACTERIUM - MEDIATED GENE TRANSFORMATION OF SOYBEAN COTYLEDON NODES AND REGENERATED PLANTLETS

Lu Huineng Gai Junyi Ma Yuhua

(*Soybean Research Institute, Nanjing Agricultural University*)

Wei Zhiming Xu Zhihong

(*Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica*)

Abstract

Transformed plantlets of Wei 515, a breeding line of *Glycine max* (L.) Merr. , were selected on media with Km 200mg/l by using *Agrobacterium* infection method. The activity of NPT II enzyme of a transformed plantlets was tested. The differential reaction of soybean geotypes on transformation efficiency was observed.

Key words Soybean; Gene Transformation; *Agrobacterium*