

Ri 质粒介导大豆花叶病毒外壳蛋白 基因转化大豆的研究*

徐香玲 李兴华 刘伟华 李集临

(哈尔滨师范大学 150080)

王 毅

(吉林农业大学 130043)

摘 要

本文用含有 Ri 质粒的发根农杆菌介导,克隆在大肠杆菌 JM109 中,中间载体质粒 PES(具有大豆花叶病毒外壳蛋白基因),通过三亲杂交的方法,将质粒 PES 导入具 Ri 质粒的发根农杆菌(pRiA4b)中,用二元载体法转化黑龙江省常见的大豆品种,合丰 25,黑农 33 等品种。用子叶节,胚轴,幼胚和整株感染转化子菌液,诱导出毛状根,经纸电泳检测有 25%左右的毛状根含有冠瘿碱。感染的下胚轴,诱导的毛状根直接形成愈伤组织,从愈伤组织分化出芽,幼胚培养获得不定芽,叶状体和胚状体结构,由器官发生途径产生丛生芽。从下胚轴和子叶节获得丛生芽并再生植株,经纸电泳检测约 30%再生植株含有冠瘿碱,PCR 和 DNA 斑点杂交检测均证明大豆花叶病毒外壳蛋白基因,已导入并整合到大豆基因组中。

关键词 Ri 质粒;大豆;转基因植株

前 言

大豆花叶病毒病是影响大豆产量和质量的一个重要原因。1929 年 Mickinney^[4]发现植物的交叉保护现象,1980 年 Harmilton^[5]设想能否在植物中表达病毒的单个基因来模仿交叉保护现象,现代生物技术使其成为现实。目前已克隆的植物病毒外壳蛋白基因有:烟草、黄瓜、芜菁、大豆花叶病外壳蛋白基因(TMV-cp,CMV-cp,TuMV-cp 和 SMV-cp)和马铃薯

* 本课题为黑龙江省科委资助重点攻关课题

本文于 1996 年 5 月 15 日收到。This paper was received on May 15, 1996.

y 病毒外壳蛋白基因(pvy-cp)等多种病毒外壳蛋白基因,将其导入植物体内表现出一定的抗性。我国施树良^[1]和徐香玲^[2]用 Ri 质粒介导马铃薯 y 病毒外壳蛋白基因转化大豆;向番茄导入黄瓜和烟草花叶病毒外壳蛋白基因,均获得转化的再生植株。

发根农杆菌和根癌农杆菌属根瘤科的格兰氏阳性菌,含有巨大的质粒,前者称为 Ri 质粒(root inducing plasmid),感染植物体时,诱导产生毛状根(hair root),后者称为 Ti 质粒(Tumor inducing plasmid),二者的结构相似,均有能插入植物基因组使其发生转化,在细胞中稳定存在的 T-DNA(Transfer-DNA),T-DNA 由多种基因组成,在转化的植物细胞中有转录和转译的功能,转化的再生植株可通过减数分裂稳定地,将 T-DNA 及其携带的外源基因遗传给后代。所以 Ri 和 Ti 质粒均可做为导入外源基因的良好载体。

本文利用具 Ri 质粒的发根农杆菌(pRiA4b)为受体载体质粒 PES(具有大豆花叶病毒外壳蛋白基因-SMV-cp)为供体,Ecoli HB101 为诱动菌,通过三亲杂交的方法获转化子,用转化子菌液感染大豆品种,得到转化的再生植株,经冠瘿碱检测,PCR 和斑点杂交,证明大豆花叶病毒外壳蛋白基因(SMV-cp)已导入,为大豆抗病育种提供了新途径。

材料与方法

1. 材料

大豆品种合丰 25、合丰 28、东农 37、东农 42、黑农 32、黑农 33、86-632、吉林 28、丰收 22 等 12 个品种,由东北农业大学和黑龙江省农科院提供;发根农杆菌(pRiA4b)带有链霉素(sm)抗性位点,由日本筑波大学遗传子研究中心引入;E·coli HB101 为诱动菌,具有诱动(mob)和转移(tra)功能,具有卡那霉素(km)抗性标记本研究室提供;中间载体 6.8Kb 的质粒 PES(带有 808bp 的 SMV-cp 基因)和壮观霉素(spe)抗性位点,由北京大学生物系提供;转化受体 E·coliJM109 由中国农科院黑龙江畜牧研究所提供(图 1,2)。

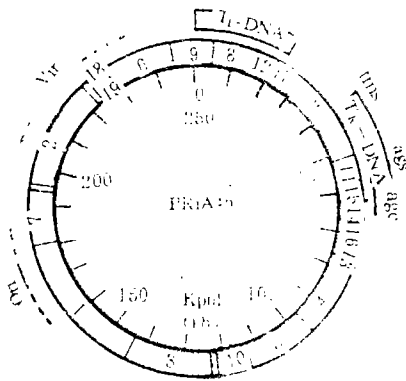


图 1 农杆菌型 Ri 质粒 pRiA4b 的图谱

Fig. 1 Agropine type Ri-plasmid pRiA4b function

图外示功能区域

Ori:复制起始区;Vri:T-DNA 导入植物所必需的区域

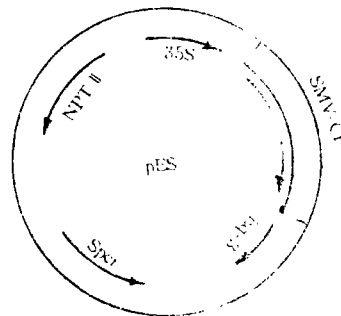


图 2 含 SMV-cp 基因的载体质粒的图谱

Fig. 2 Fig. of vector plasmid of SMV-cp gene

T_L-DNA 和 T_R-DNA; 导入植物细胞并整合到植物基因组中的区域

ags; 农杆菌合成酶基因; agc; 农杆菌分解酶基因

tms; 与 Ti 质粒中植物激素合成酶基因同源的基因

Ori; Origin of replication

Vri; It is must that transfer DNA into plant

T_L-DNA and T_R-DNA; The region into plant genome

ags; Agropine synthetase gene

agc; Agropine catabolismase gene

Tms; Ti-plasmid plant hormone synthetase gene and nomologous gene

2. 方法

(1) 载体质粒 PES 克隆在 E·ColiJ M109 中^[11], 从转化的 E·ColiJ M109 中提取质粒 DNA^[11]和琼脂糖电泳检测, 证明 PES 质粒克隆在 E·ColiJ M109 中。经三亲杂交, 将质粒 PES 导入发根农杆菌, 经 sm 和 spe 抗性选择培养基选出转化子, 用稍有改进的方法提取转化子、受体菌和供体质粒 DNA^[11], 经 PCR 检测, 确认 PES 质粒导入发根农杆菌, 培养转化子菌液, 用于转化大豆的外植体。

(2) 外植体的感染方法: 用大豆无菌苗的子叶、子叶节、胚轴、整株和幼胚为外植体。用注射法、共培养法和涂抹法进行感染。

(3) 毛状根的诱导: ①胚轴注射法: 无菌苗的胚轴切段, 从其中一端注射转化子菌液, 将另一端插入含有 500mg/l 羧苄青霉素(cb)的 MSO(MS 培养基的无机物和 B₅ 培养基的有机物)固体培养基中诱导毛状根, 经 2 周左右将诱导的毛状根切下, 接种在 MSO+cb 固体培养基除菌, 确认菌除净后, 转入 1/2MSO 液体培养基以使不定根增殖。②子叶节注射法: 剪去下胚轴和子叶远轴端, 子叶节基部注射转化子菌液, 培养基同上。③整株注射: 完整的无菌苗, 分别于子叶节基部, 胚轴处注射转化子菌液, 置于上述培养基中。

(4) 愈伤组织的诱导: ①直接诱导毛状根形成愈伤组织, 注射转化子菌液的胚轴, 接种于 MSO+cb+1mg/1Kt+500mg/l 2.4D 固体基, 从胚轴长出毛状根, 继续培养形成愈伤组织。②毛状根诱导愈伤组织: 确定为转化毛状根, 剪成小段转入 MSO+1mg/l BA+0.05mg/l IBA, 诱导培养基, 再转入分化培养基。③子叶诱导愈伤组织: 切去胚轴的子叶基部注射转化子菌液, 接种 MSO+500mg/l cb+1.2mg/l 6BA 培养基诱导出愈伤组织。④共培养法诱导愈伤组织: 大豆真叶切成小块与稀释的菌液共培养 10 分、20 分、40 分和 1 小时后, 转入 MSO+500mg/l cb+1mg/1Kt+0.2mg/l NAA 培养基, 形成愈伤组织, 再转入分化培养基。

(5) 直接诱导再生植株: ①子叶节诱导丛生芽: 萌发 5 天无菌苗, 切去胚轴, 在子叶节基部多次注射转化子菌液, 接种于 MSO+500mg/l cb+天门冬酰胺, 谷氨酰胺, 尿囊酸和尿囊素各 60mg/l 培养基, 从子叶节处诱导出丛生芽, 芽长 1cm 左右, 切下转入 1/2MSO+500mg/l cb 培养基生根。②胚轴诱导丛生芽, 萌发 7 天的无菌苗的胚轴, 注射转化子菌液转入上述培养基诱导再生植株。③幼胚诱导再生植株: 从田间大豆植株上取 4±mm 幼胚豆荚, 无菌条件下取出幼胚, 子叶上表皮注射转化子菌液, 子叶表皮朝上接种 MSO+500mg/l cb+1mg/l NAA 培养基上, 体细胞胚形成转入 MS 诱导发芽; 或者幼胚子叶表皮轴下、接种于 MS 大量元素+4 倍 MS 微量元素+B₅ 基的微元素+1.2mg/l IBA, 诱导再生

植株。在正个培养过程中光照 14—16 小时,平均光强度为 1500lux,室温 26℃ 左右。

(6)冠瘿碱的检测:按 A·J·Morgan^[6]方法进行检测,是否在转化的植株内具有冠瘿碱的存在、初步确定是否为转化植株。

(7)PCR 检测:从转化子菌和转化植株中,提取 DNA 为模板,人工合成特异引物(由中国科学院微生物研究所合成)5'端特异引物序列:CATATGTCAGGCAAGGAGAAGGAA, 3'端特异引物序列:TTTATTACTGCGGTGGGCCCATGCC,扩增条件,预变性 95℃ 10 分,变性 93℃ 1 分,复性 50℃ 30 秒,延伸 72℃ 2 分,温育 72℃ 5 分。共进行 35 个循环,回收 PCR 产物,琼脂糖电泳,进行检测是否有 SMV—cp 基因导入。PCR 试剂盒购于北京华美生物工程公司。

(8)DNA 斑点分子杂交的检测:转化的再生植株^[1]和载体质粒提取 DNA^[11],用生物素标记载体质粒 DNA 作探针、进行 DNA 斑点分子杂交^[1]。试剂盒购于北京华美生物工程公司。

结 果

1. 转化子的检测:

(1)抗菌素的筛选:供体菌 E-coliJM109(具 PES 质粒有 SMV—cp 基因, spe 抗性),受体菌发根农杆菌 PRiA4b(具 sm 抗性),转化子菌 PRiA4b+PES(具 spe 和 sm 抗性),分别接种具有抗菌素的培养基上,结果如表 1:

表 1 不同抗菌素的筛选

Table 1 Screening of different antibioticin

菌 种 Strain	加入抗菌素种类 Antibioticin variety	菌落生长情况 Bacterial colong growth
供体: E·ColiJM109	spe	+
Donor	spe+sm	-
受体: PRiA4b	sm	+
Vecipient	spe+sm	-
转化子: PRiA4b+PES	spe+sm	+
Transforming bacterium		

注:“+”表示生长“-”表示不能生长

表 1 看出,只有转化子菌能在 spe+sm 抗菌素培养基上生长,其抗性来自供体和受体,说明载体质粒 PES(具 SMV—cp 基因)进入受体菌,确认为转化子。

(2)质粒 DNA 的检测:分别提取供体,受体和转化子的质粒 DNA^[11],琼脂糖电泳发现仅在供体和转化子中约有 6.8kb 的 PES 质粒 DNA 带(未酶切),受体菌无此带,说明 PES 质粒导入受体 PRiA4b,证明是转化子菌。

(3)PCR 检测:分别提取供体菌,受体菌和转化子菌质粒 DNA,PCR 代检测,仅在供体和转化子菌有 808bp 的 SMV—cp 的带,证明在转化子中有 SMV—cp 基因存在,转化和三亲杂交的正确性。

2. 毛状根的诱导:

(1) 胚轴注射法: 分别用 YEB 液, 受体和转化子菌液注射胚轴, 后二种菌液注射部位长出毛状根(图 1), 冠瘿碱检测均为阳性, 两者差异不显著, 产生毛状根部位, 数量和大豆基因型有关。如表 2, 表 2 中看到只有注射受体和转化子菌液诱导的毛状根含有冠瘿碱, 说明 T-DNA 导入, 因 T-DNA 带有产生冠瘿碱的基因, 在植物体内转录, 产生冠瘿碱, 不含有冠瘿碱的毛状根, 是没有 T-DNA 的不定根或只导入 T-DNA 的部分基因序列(只有导入 T_L-DNA 部分可诱导产生毛状根, 没有导入能合成冠瘿碱的 TR-DNA 部分)。从大豆基因型看“绥农 8 号”诱导的毛状根及含有冠瘿碱的百分数均高于前者。

表 2 不同菌液对大豆胚轴不同部位感染诱导毛状根情况

Table 2 The number of hairy root of hypocotyl of different points
were induced in different bacterial culture solution

品种 Cultivated	菌液 Infectious bacterium	感染部位 Inducted point	注射胚轴数 Number of inducted hypocoty	生根数 Number of growth root	含冠瘿碱数 Number of hairy root alkaloids	含冠瘿碱百分数(%) Ratio of hairy root alkaloids (%)
黑农 33 Heinong 33	YEB YEB culture solution	生理上端 hypocotyl top	7	0	0	0
		生理下端 hypocotyl below	7	0	0	0
	PRiA4b	生理上端 hypocotyl top	15	6	1	16
		生理下端 hypocotyl below	15	110	2	19
	转化子 Transforming bacterium	生理上端 hypocotyl top	32	11	3	27
		生理下端 hypocotyl below	32	24	40	16
86-632	YEB YEB culture solution	生理上端 hypocotyl top	8	2	0	0
		生理下端 hypocotyl below	8	30	0	0
	PRiA4b	生理上端 hypocotyl top	15	5	0	0
		生理下端 hypocotyl below	15	66	9	14
	转化子 Transforming bacterium	生理上端 hypocotyl top	30	7	1	14
		生理下端 hypocotyl below	31	127	14	11
绥农 8 号 Suinog 8	YEB YEB culture solution	生理上端 hypocotyl top	8	0	0	0
		生理下端 hypocotyl below	8	19	0	0
	PRiA4b	生理上端 hypocotyl top	16	8	2	25
		生理下端 hypocotyl below	15	71	17	24
	转化子 Transforming bacterium	生理上端 hypocotyl top	39	21	3	14
		生理下端 hypocotyl below	37	186	39	21

2)子叶节诱导法:YEB 液和转化子菌液感染子叶节,10 天左右在感染部位形成愈伤组织,从愈伤组织长出毛状根,冠瘿碱检测,转化率很高(表 3),表 3 中看出不同品种、诱导毛状根数及冠瘿碱数差异不大、平均高于胚轴感染率。

3)整株注射法:一周后在注射部位长出根,不具典型的毛状根形态,含冠瘿碱的百分率较低。用 YEB 液注射也产生许多不定根,对转化根的筛选带来麻烦,此法不易使用。

表 3 不同菌液对不同大豆品种子叶节诱导毛状根的数

Table 3 The number of cotyledonar node for different cultivated were induced in different bacterial culture solution

品种 Cultivated	菌液 Infectious bacterium	注射子叶节数 Number of induced cotyledonar node	生根数 Number of growth root	含有冠瘿碱 With alkaloids 数 number	%
合丰 25 号 Hefeng 25	YEB	7	5	0	0
	YEB culture solution				
	转化子	15	72	18	36
	Transforming bacterium				
黑农 32 Heinong 32	YEB	6	8	0	0
	YEB culture solution				
	转化子	18	82	24	29
	Transforming bacterium				
东农 837 Dongnong837	YEB	9	14	0	0
	YEB culture solution				
	转化子	16	62	20	32
	Transforming bacterium				

3 愈伤组织的诱导

1)胚轴产生的毛状根直接形成愈伤组织:处理的 5 个品种,感染后 7—12 天在胚轴生理下端产生毛状根,15—30 天后毛状根全部愈伤化,愈伤组织疏松而光滑,转入分化培养基后,多数愈伤组织变褐而死,其中 2 块愈伤组织出胚状体,日渐长大分化出叶和茎。经冠瘿碱检测表现阳性(表 4)。表中看出不同品种中,经感染产生愈伤组织数和含冠瘿碱数差异不大,“绥农 8 号”出愈数略高一些,“东农 37”含冠瘿碱略高一些。

2)子叶感染诱导的愈伤组织:子叶感染后,10 天内注射部形成黑点,逐渐变绿长大形成愈伤组织,转入分化培养基未见分化。

3)共培养法诱导愈伤组织:共培养的真叶块,2—3 天后多数叶片块发黄而少数成活,15 天后叶片块周围形成愈伤组织,渐向叶片中部扩,愈伤组织发黄而疏松,转入分化培养基,40 天后大部愈伤组织分化出根,一部愈伤组织变绿,没有分化出芽,对其进行冠瘿碱检测(表 5),从表 5 中看到,真叶诱导的愈伤组织数较高,但含冠瘿碱数较低,可能是真叶不易转化所致。

表 4 转化子菌液对不同大豆品种胚轴诱导毛状根和愈伤组织数

Table 4 The number of hairy root and callus of hypocotyl of different cultivated were induced in transforming bacterium

品种 Cultivated	出现毛状根的天数 Days of producted hairy root	检测愈伤组织数 Number of detected callus	含有冠瘿碱 With alkaloids	
			数 Number	%
丰收 22 Fengshou 22	9	16	4	25
黑农 32 Heinong 32	7	18	4	22
黑农 33 Heinong 33	7	20	5	25
绥农 8 号 Suinog 8	8	24	7	29
东农 37 Dongnong 37	9	18	6	33

表 5 共培养法对大豆不同品种诱导愈伤组织及愈伤组织中含有冠瘿碱数

Table 5 The number of callus and alkaloids of different cultivated were induced in confection

品种 Cultivated	愈伤组织 % Callus %	检测愈伤组织数 Number of detected callus	含冠瘿碱 With alkaloids	
			数 Number	%
黑农 32 Heinong 32	90.4	15	2	13.3
吉林 8 号 Jilin 28	91.4	20	2	10.0
86-632	81.2	15	0	0
绥农 8 号 Suinog 8	95.0	20	3	15.0

4. 诱导再生植株

1) 感染子叶节诱导丛生芽, 由丛生芽再生植株: 在子叶节部位多次注射转化子菌液, 大约 10~12 天后, 在注射点形成许多丛生芽, 丛生芽逐渐长大形成再生植株。不同品种产生的丛生芽数目最高达 6 个之多(表 6)。子叶节感染产生的丛生芽, 通过器官发生途径, 可能在子叶节部位有幼芽的原始细胞, 经带有 T-DNA (T_R -DNA 含有激素基因) 的转化子菌液, 诱导幼芽原始细胞分化产生丛生芽。“东农 42”产生丛生芽中含有冠瘿碱数较高(图 3)。

表 6 转化子菌液对不同品种子叶节感染丛生芽的情况

Table 6 The number of adventitious bud of cotyledonary node of different cultivated were induced in transforming bacterium

品种 Cultivated	菌液 Infectious bacterium	注射子叶节数 Number of induced cotyledonary node	平均产生丛生芽数 Average adventitious bud of single coty-lendonary node	丛生芽含有冠瘿碱数 Number of adventitious bud with alkaloids
黑农 33 Heinong 33	转化子 Transforming bacterium	30	3.1	16
东农 42 Dongnong 42	转化子 Transforming bacterium	42	1.9	22
东农 37 Dongnong 37	转化子 Transforming bacterium	34	1.6	13

2) 感染下胚轴顶端诱导丛生芽与再生植株: 在下胚轴顶端注射转化子菌液, 经一周后

长出许多芽点,20天后芽点长成小植株,小植株高4cm以上,转入1/2MSO培养基中,一个月左右可生根,形成再生植株。看到从下胚轴诱导的丛生芽与子叶节诱导的丛生芽时间上大致相似,丛生芽的数目前者高于后者,含冠瘿碱的植株数低于前者。后者再生的植株多细小、生根频率低,产生丛生芽的机制可能与子叶节相同。

3)感染幼胚诱导再生植株;感染幼胚子叶于注射部位开始发黑,伤口逐渐变绿,形成突起即球形体细胞胚,有的生根而没有形成完整植株。上述途径产生的丛生芽与再生植株,在不同品种中有差异和周思君^[3]获得结果一致。产生的不定芽转入MS+6BA0.5mg/l+IBA1.0mg/l+GA₃1mg/l培养基中,幼苗长出真叶后转入花盆,适宜温度、光照和湿度条件,可开花结实获得种子(图2)。

5. 再生植株的PCR检测

检测生长至小有2个月的叶片再生植株,共检测24株(均为子叶节和胚轴形成丛生芽并再生植株)中,有3株表现阳性,对照株为阴性,转化率为12.5%(图4)。

6. DNA斑点分子杂交检测

上述24株的DNA样品,经斑点分子杂交,结果有6个样品表现阳性,PCR检测表现阴性的3个样品,在斑点杂交中表现阳性,杂交斑点清晰(图6),按斑点杂交检测结果的转化率为25%与含有冠瘿碱的频率大致一致。

上述检测均证明:大豆花叶病毒外壳蛋白基因(SMV-cp)导入大豆植株,获得转基因的大豆再生植株。

讨 论

1. 子叶节和下胚轴诱导丛生芽与再生植株的可能性

Curistou^[8]认为器官发生是多细胞的,获得的再生植株可能是杂合体,我们从子叶节和下胚轴诱导的丛生芽和再生植株,有的纯合体是由单细胞发育来的。施树良^[1]通过子叶节诱导的转化株,经PCR和斑点杂交检测呈阳性,说明器官发生途径亦可得到纯合体。此法简便,快速和稳定,我们感染过下胚轴,真叶,子叶节和幼胚均得到再生植株,但再生能力最强乃是子叶节到下胚轴约5mm的区段,产生植株容易长大(从幼胚再生的植株多较矮小),说明该法是一种行之有效的方法。

2. 如何提高发根农杆菌转化大豆的频率

齐藤和季等^[10]利用Ri质粒转化大豆的频率较低,如何提高Ri质粒转化大豆的频率,是值得探讨的问题,影响Ri质粒转化大豆的因素有多种:1)大豆的基因型:Reeh^[9]实验表明对大豆毛状根诱导和植株的再生,提出转化率和大豆基因型有关。本文用东北大豆10几个品种,子叶,子叶节等6种外植体,感染外植体数达万个以上,多种方法感染与培养,从外植体诱导的毛状根和丛生芽,经各种方法检测,证明大豆不同基因型之间有差异,绥农8号,东农33,东农42和黑衣36等品种易感染发根农杆菌。2)外植体和发育状态:实验发现不同外植体对发根农杆菌感染能力有差异。子叶节和下胚轴的转化率相对较高;幼嫩组织比老的组织易转化、无菌苗萌发3—5天为最佳时间。3)加入乙酰丁香酮等酚类物质,可以提高Vir区的高水平表达,提高转化率。4)感染方法:最成功的转化方法是共培养法,外植体和发根农杆菌共培养时间不易过长或过短,时间过长外植体易黄化或褐化,过

短降低转化率。共培养后的外植体须在无抗菌素培养基培养一定时间,再除菌利于转化。不同外植体,用于感染的菌液应稀释,利于提高成活率和转化率。5)选择转化时间:大豆的组培难度大,诱导率低,生长慢和成活低,北方地区四季温差大,春季和秋季较易成活,须做好时间安排。

3. 再生植株的生长与培养

大豆是一种特殊植物,再生植株移植后正常发育困难,本实验获再生植株 50 株之多,仅存活 10 几株。如何改进大豆再生植株的生长发育条件,提高再生植株的成活率,正常生长,发育和开花结荚,仍需进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 施树良,1994,哈师大硕士研究生论文
- [2] 徐香玲,1994,植物研究,14(4):416~423
- [3] 周思君,1989,大豆科学,8(1):39~44
- [4] Mckinney · H · H. ,1929 Mosaic diseases in the canary Islands. West Africa and Gibraltar J Agric Res(39) 557-578
- [5] Hanilton. R. J. . 1980. Defence triggered by previous invaders. ciru ses plant Disease An Aduaned Treatise Vol. 5 279-303 Academic p. ress N. Y.
- [6] Morgan. A. J. et al. . 1987. Plant Science (49)37-49
- [7] Kado. C. I. et al. . 1987, J Bacteriol 145,1365-1373
- [8] Christou P. et al. . 1989. Proc Natl Acad Sci U. S. A 86:7500~7504
- [9] Rech E. L. et al. . 1988. Journal of Experimental Batany 39(206):1275~1285
- [10] 齐藤和季,1993,作为基因转移系的毛根利用,遗传(7)60~68
- [11] 金冬雁等译,1992,分子克隆实验指导(美)萨母布鲁克等著,科学出版社

STUDY ON TRANSFERRING SOYBEANS MOSAIC VRIIOUS COAT PROTEIN (SMV-CP) GENE INTO SOYBEANS BY RI-PLASMID

Xu Xiangling Li Xinghua Liu Weihua Li Jilin

(Harbin Normal University 150080)

Wang Yi

(JiLin Agricultural University 130043)

Abstract

The PES plasmid (T-DNA carrying SMV-CP gene) in the E. coli JM109 and was introduced into Agrobacterium rhizogenes (PRiA4b) with Ri-plasmid by tri-parental mating and was tranferred into cuiltived soybeans Hefen25,Heinong33 et al. by means of binary vecotors. The

hairy roots were induced from cotyledonary node. Hypocotyl and whole plants by in Jection of bacteria transferred. The analysis of paper electrophresis showed that alkaliod found in the 25% hairy roots and 30% regenerated plants. The cullus of formation of hairy roots were induced form hypocotylars. The cullus butting, adventition, leaf-like and embryoid were obtained from immature embryos and adventitiou were produced form organogeninsis. PCR and southern blotting proved that the SMV-CP gene have been introduced and interjected into genome of soybeans.

Key words Ri-plasmid; Soybean; Transferring gene plant

图版说明

1. 黑农 36 大豆下胚轴诱导出毛状根。
2. 绥农 8 号大豆转化株, 已结荚。
3. 丛生芽的冠瘿碱检测: a; 农杆碱 ck, b; 甘露碱 ck, c; 东农 42 子叶节产生丛生芽, d; 东农 37 子叶节产生丛生芽, e; 吉林 169 下胚轴产生丛生芽。
4. 再生植株 PCR 检测: a; 东农 42 产生丛生芽, b; 黑农 33 产生丛生芽。
5. 质粒 DNA、PCR 检测: 转化子的质粒 DNA PCR 阳性反应。
6. DNA 斑点分子杂交: a, b 为阳性对照, c; 黑农 33 下胚轴产生丛生芽, d; 绥农 8 号子叶节产生丛生芽, e; 黑农 32 下胚轴产生丛生芽。

Explanation of plate

- 1 Hairy roots were induced from hypocotyl of Heinong 36.
- 2 Soybean transferring plant and podding of Suinong 8.
- 3 Detecing the alkaloid of advenetive bud; a; Agropine ck. b; mannopine ck. c; the advenetive bud were produced from cotylendonar of Dongnong 42. d; the adventive bud were produced from cotylendonar of Dongnong 36. e; the adventive bud were produced from hypocotyl of Jilin 169.
- 4 Detecting the PCR of regeneration plant; a; the adventive bud were produced from Dongnong 42. b; the adventive bud were produced from Heinong 33.
- 5 Decting the plasmid DNA and PCR; plasmid DNA of transforming bacterium. PCR were positive reaction.
- 6 DNA dot hybridization; a, b; positive ck. c; the adventive bud were produced from hypocotyl of Heinong 33. d; the adventive bud were produced from cotylendonar node of Suinong 8. e; the adventive bud were produced from hypocotyl of Heinong 32.