

Ti 质粒介导的 B t k- δ 内毒素蛋白 基因转化大豆的初步研究^{*}

徐香玲 高 晶 刘伟华 李集临

(哈尔滨师范大学生物系 150080)

摘 要

以 Ti 质粒为介导,将 pKT₅₄B₇C₅ 质粒上的 B t k- δ 内毒素蛋白基因导入东北大豆“黑农 37”、“黑农 39”等品种。采用多种外植体和感染方法,从胚轴和子叶节诱导出丛生芽与再生植株。经卡那霉素筛选和冠瘿碱检测,初步证明外源基因导入大豆基因组中。共获得 81 株再生植株,其中成活 30 株,仅 3 株结 7 个荚,得到 7 粒种子。PCR 检测和 DNA 分子杂交,鉴定这 7 株再生植株呈阳性反应,证明外源基因已导入并整合到大豆的基因组中。7 粒种子均已萌发,植株生长发育正常。

关键词 大豆; Ti 质粒; B t k- δ 内毒素蛋白基因; 再生植株

近年来由于植物分子生物学和组织培养技术的迅速发展,建立了多种向高等植物导入外源基因的途径。其中最为常用,较普遍的是利用根癌农杆菌的 Ti 质粒为载体的转基因技术。Ti 质粒作为植物转基因载体,具有操作简便,转化率较高,使外源基因完整地导入植物的细胞,并整合到基因组中等优点,所以 Ti 质粒是目前植物基因工程中重要的转移载体。

目前国内外用 Ti 质粒作为转植物基因的载体,报导较多。Vacek^[9]、Fischhoff^[8]、Barton^[6]成功地利用 Ti 质粒,将 5.5kb 或 4.5kb 毒素蛋白基因导入烟草和番茄,获得抗虫的转基因植株。Delannay^[7]对转抗虫基因的番茄进行了大田实验,证明能有效地抗御口科鳞翅目害虫。田颖川等人^[1]将 B t 基因导入烟草,得到抗虫的转基因烟草,李太元等人^[2]利用 Ti 质粒为介导将苏云金杆菌 HD-1 杀虫蛋白基因导入烟草,获得了具高抗虫性的转基因烟草的纯合株系 D₈-14 和 D₉-8 等。

本文的目的,是利用 Ti 质粒为介导将 B t k- δ 内毒素蛋白基因导入大豆,以获得抗大豆食心虫的大豆新类型。目前研究大豆的转基因工作,多局限于转移“报道基因”,用带

^{*} 本课题为黑龙江省科委资助重点攻关课题

本文于 1996 年 9 月 6 日收到。 This paper was received on Sep. 6, 1996.

有经济价值的基因转化大豆的研究甚少,所以进行有经济价值的基因转化大豆的研究,对大豆育种工作将开辟一条新的途径

材料和方法

1. 大豆品种

实验采用“东农 37”、“东农 837”、“东农 42”、“东农 593”、“86-623”、“黑农 39”、“黑农 23”、“黑农 33”、“吉林 169”、“吉林 29”、“吉林 28”、“绥农 8号”13个优良品种。种子由东北农业大学大豆研究所,黑龙江省农科院,吉林农科院大豆研究所提供

2. 菌种

根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404中 pK T₅4B7C₅ 质粒上具有卡那霉素 (km)抗性位点和 Bt k- δ 内毒素蛋白基因(简称 Bt 因素), 黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因 (CMV-cp)和 TMV-54KD Replicase 基因 (TMV-54KD), 由北京大学生物系基因工程国家重点实验室提供。

3. 方法

1) 菌种的活化: 取一环菌接种于具 Km 的 YEB 液体培养基, 28℃ 培养过夜, 用于转化大豆的外植株。用培养过夜的菌液与烟草组织提取物的混合液转化外植体。

2) 用培养过夜的菌液, 按 kado^[3]法提取质粒 DNA 进行检测。

3) 无菌苗的培养: 挑取无病虫害的大豆种子, 0.2% HgCl₂ 消毒 7-8 分, 无菌水冲洗 3-4 次, 再用无菌水浸 1-15 分 (可适当延长无菌水浸泡时间促进萌发), 置于 2% 蔗糖的 1/2MSO (MS 无机物和 B₅ 有机物) 固体培养基。

4) 外植体的感染: 直接诱导再生植株;

① 子叶诱导丛生芽: 取萌发 5-7 天的大豆无菌苗, 切去胚轴和子叶的一半, 将子叶分开, 若出芽须切去, 在子叶节部位一次或多次注菌, 接种于 MSO 的固体培养基上, 24-48 小时后转入含有 1mg/L KT, 0.2mg/L NAA, 500mg/L 羧苄青霉素 (Cb), 各 60mg/L 的天门冬酰氨, 谷氨酰胺, 尿囊酸和尿囊素的 MSO 固体基上, 每周继代一次, 诱导的丛生芽长到 1cm 左右, 切下转入含有 Cb, 50mg/L Km, 0.1mg/L NAA 的 1/2MS 固体基, 出根后移入土中。

② 胚轴诱导再生植株: 取萌发 7 天无菌苗的胚轴段, 注菌后接种 MSO 固体基上, 24 小时后转入上述培养基中, 长出丛生芽后转入上述生根培养基中。

③ 幼胚直接诱导再生株: 从大田或温室植株上, 取 4mm 左右幼胚, 子叶背部向上注菌, 接种于 MSO 固体基上, 出芽后转入 MS 固体基上 (其中 VB₆ 甘氨酸的量有变化), 2 周后转入生根培养基。每天光照 14-16 小时, 光照 2500lux, 温室 18-26℃。

5) 冠瘿碱的检测: 从转化再生植株中, 取叶片按日本筑波大学遗传子研究中心的实验方法^[10], 进行纸电泳检测转化植株是否有冠瘿碱。

6) PCR 检测: 从转化植株提取总 DNA^[3], 人工合成特异引物 (由美国博特公司合成), 5'端特异引物序列: GGATCCATGGATAACAATCC, 3'端为 GGATCCCTAATC-CGTCACATCTGT, 扩增条件同施树良^[3]

7) DNA斑点分子杂交: 从转化再生植株和根癌农杆菌中提取 pKT₅₄B7C₅ 质粒 DNA^[3],用生物素标记质粒 DNA作探针,进行 DNA斑点分子杂交^[3]。试剂盒购于北京华美生物工程公司。

结 果

1. 质粒 DNA的检测

从根癌农杆菌提取质粒 pKT₅₄B7C₅, DNA,琼脂糖电泳,紫外灯下看到有约 20kb的带 (pK T₅₄B7C₅质粒为 20kb)。说明质粒存在于根癌农杆菌中。

表 1 不同品种的胚轴对诱导丛生芽的影响

Table 1 The affection of adventitious bud on cotyledon of different cultivars

品种 Cultivars	感染用菌液 Infectious bacterium	接种数 Infective number	形成芽数 Number of abventitious bud	平均每个外植体形成芽 Average formation abventitious buds of on single explant
吉林 169	菌液 1 bacterium solution 1	66	218	3.10
Jilin 169	菌液 2 bacterium solution 2	58	192	3.70
黑农 37	菌液 1 bacterium solution 1	44	128	2.91
Heinong 37	菌液 2 bacterium solution 2	41	115	2.82
黑农 39	菌液 1 bacterium solution 1	46	75	1.63
Heinong 39	菌液 2 bacterium solution 2	50	71	1.42
吉林 29	菌液 1 bacterium solution 1	72	96	1.33
Jilin 29	菌液 2 bacterium solution 2	45	68	1.52
东农 37	菌液 1 bacterium solution 1	68	112	1.81
Dongnong 37	菌液 2 bacterium solution 2	59	79	1.34
东农 837	菌液 1 bacterium solution 1	45	93	1.72
Dongnong 837	菌液 2 bacterium solution 2	49	77	1.85
菌液 1 bacterium solution 1	烟草提取物+ 菌液 the abstract of tobacco+ bacterium solution			
菌液 2 bacterium solution 2	YEB培养菌液 YEB culture solution			

2 直接诱导丛生芽

1) 胚轴诱导丛生芽: 在胚轴上注射菌液,不同处理方法形成丛生芽的数目不同,表 1看到具有烟草组织提取物的菌液,感染的“吉林 169”产生的丛生芽数目最多,有的成丛分布,但芽细小且生根极难。用 YEB液活化菌,产生丛生芽数较少,说明烟草组织提取物能促进菌液的感染与丛生芽的产生。感染菌液后的胚轴段接种 M SO固体基 1- 2天,加入 1mg /L K T+ 0. 2mg /L N A A有利于胚轴产生丛生芽再生植株。当 K T浓度增加一倍, N A A浓度增加到 1mg /L时则不利于胚轴产生丛生芽再生植株,因此适当的使用植物激素可提高丛生芽再生植株的频率。丛生芽再生植株培养一个月左右,取小叶片进行冠瘿碱检测。经 K_m抗性筛选,看到具有烟草组织提取物的菌液比 YEB液培养的菌液转化率高。

不同品种转化率有差异(表 2)。“黑农 37”最高,“吉林 29”最低,基因型间差异明显。

表 2 不同品种产生冠瘿碱和 Km 抗性影响

Table 2 The situation of alkaloid and kanamycine resistance formed on different cultivars									
品种 Cultivarsd		菌液 Bacterium solution		芽数 Number of abventitious bud	冠瘿碱 Alkaloids		Km抗性 Km resistance	双转化率 Rate of double transfo r- mation %	
					数 Number	%			
吉林 169	菌液 1	bacterium solution 1		218	33	15.1	11	5	
Jlin 169	菌液 2	bacterium solution 2		492	15	3	6	1.2	
黑农 37	菌液 1	bacterium solution 1		128	19	14.9	12	9.3	
Heinong 37	菌液 2	bacterium solution 2		115	12	12.4	7	6.1	
黑农 39	菌液 1	bacterium solution 1		75	5	6.7	3	4	
Heinong 39	菌液 2	bacterium solution 2		71	3	4.2	2	2.8	
吉林 29	菌液 1	bacterium solution 1		96	3	3.1	1	1.4	
Jlin 29	菌液 2	bacterium solution 2		68	2	2.9	0	0	
东农 37	菌液 1	bacterium solution 1		112	18	16	7	6.2	
Dongnong 37	菌液 2	bacterium solution 2		79	11	14	4	5	
东农 839	菌液 1	bacterium solution 1		93	13	13.9	4	4.3	
Dongnong 837	菌液 2	bacterium solution 2		77	8	10.4	2	2.6	

2) 子叶节诱导丛生芽:子叶节处多次注射具有烟草组织提取物的菌液,10–20 天后在注射位点出现芽,芽长大后移入生根培养基生根,转入土中长成植株。子叶节诱导的丛生芽数少于胚轴诱导的丛生芽数目。丛生芽出现的时间两者大致相似,不同品种之间诱导丛生芽数目差异明显,含冠瘿碱数和具 Km 抗性数也有差异(表 3)

3) 幼胚诱导再生植株:取“黑农 32”、“黑农 33”、“东农 37”和“吉林 29”的幼胚子叶注菌,经 20 天左右在注射点形成不定芽,“黑农 32”和“黑农 33”形成不定芽数目多于“吉林 29”,芽长到 0.5cm 左右,取下转入生根培养基,结果生长缓慢,未形成根和再生植株。

3. 再生植株的培养与分子检测

从子叶节和胚轴诱导的丛生芽,经冠瘿碱和 Km 抗性检测为阳性,转入 1/2MS+0.1mg/L NAA 培养基生根,光照 2500lux,光照时间为 14–16 小时,白天温度 25℃,夜间温度为 18℃。主根长出侧根时,转入蛭石中,同 1/10MS 液体培养基或无菌水浇苗,3–7 天转入土中或一直培养在蛭石中,适当补充 1/10MS 营养物质。转至灭菌的土中应接种大豆根瘤菌。大豆再生植株移入土中,要保证强度,湿度和适宜温度。本实验共移苗 81 株,20 天内存活 30 株,2 个月成活 11 株,其中 3 株结 7 个荚,7 粒种子,粒比正常的籽粒小,7 粒种子播种在土中,全部萌发。

共检测 23 株,均为子叶节和胚轴的丛生芽再生植株,有 8 株经 PCR 与 DNA 斑点分子杂交检测表现阳性,其中有一株 PCR 检测为阴性的,而分子杂交表现阳性,证明有 8 株再生植株, Bt 基因已导入大豆植株中,并整合到大豆基因组中。

表 3 不同品种的子叶节诱导丛生芽的情况

Table 3 The situation of adventitious bud induced on cotyledon node of different cultivars

品种 Cultivars	菌液 Bacterium	接种数 Infective number	形成芽数 Number of abvent- itious bud	平均每个外	Km 抗性 Km resist- ance	冠瘿碱		双转化率 Rate of double transfor- mation %
				植体形成芽		Alkaloids		
				Average formation of abventitious bud of on single explant		数 Number	%	
黑农 37	菌液 1	47	44	0.93	5	8	17	10.6
Heinong 37	bacterium solution 1							
黑农 39	菌液 1	59	59	1	16	13	22	22
Heinong 39	bacterium solution 1							
吉林 169	菌液 1	88	104	1.18	9	21	23.38	10.2
Jilin 169	bacterium solution 1							
东农 593	菌液 1	28	27	0.96	4	7	25	14.2
Dongnong 593	bacterium solution 1							
吉林 28	菌液 1	30	32	1.07	6	9	30	20
Jilin 28	bacterium solution 1							
86-613	菌液 1	42	33	0.78	1	5	11.9	3
	bacterium solution 1							
东农 42	菌液 1	32	24	0.75	2	7	21.8	2
Dongnong 42	bacterium solution 1							

讨 论

1. 移栽条件和方法对大豆再生植株成活的影响

大豆再生植株移栽成活率低，一直是急待解决的问题，我们从无菌环境中移出 50 几株大豆再生植株，仅成活 10 株，成活至花期植株的根系大小和从培养基中移出时大小相差无几。根上无根瘤，根系不发达，结的种子不能萌发。本实验对再生植株的移栽条件和方法做了若干的改变，见到一定的效果。

1) 由于大豆花期，需要从根部共生的根瘤菌中供应氮，移栽时用的土壤常是灭菌的，因此人工接种根瘤菌是必要的。

2) 发达根系对于大豆植株的生长发育至关重要，在组织培养中，根系发育不良，造成移栽不容易成活，因此必须在生根培养中，促使侧根发育，有一个发达根系，才能移栽成活。

3) 适当的湿度也是大豆植株移栽成活的必要条件，根瘤菌形成根瘤与固氮，土壤中的最大持水量应为 60- 80%。大豆植株在花期需要大量的水分，因此土壤与大气中的湿度对移栽的再生植株正常生长发育是非常重要的，我们对移栽的再生植株用乙烯膜覆盖，湿度保持在 70- 80% 之间，获得较好的效果。

4) 光照强度对大豆生长与发育和根瘤形成亦成重要作用。适当加强光照强度和保持 25- 28℃ 的温度也是必要的。

由于改进了移栽条件与方法,大大提高了再生植株的成活率,结的种子具有正常的萌发能力。

2 用烟草提取物处理菌液可提高大豆的感染率与转化率

菌液感染是从植物的伤口处,植株受伤部位的细胞合成一种特殊低分子的酚类化合物,使农杆菌的 *Vir* 区基因活化, T- DNA 进入植物细胞,并整合于基因组中。许跃^[4]和李宝健^[5]实验证明,用多酚化合物或用对农杆菌敏感的植物提取物处理农杆菌,诱导 *Vir* 区基因活化,能增加农杆菌对外植体培养细胞的附着,本实验在感染外植体时,采用烟草提取物处理菌液,由于烟草提取物含有较多的酚类化合物,对大豆的感染与转化是有促进作用的。

参 考 文 献

- [1] 田颖川等, 1991, “苏云金杆菌 δ - 内毒素基因的转基因烟草的抗虫性”生物工程学报, 7(1): 1- 10
- [2] 李太元等, 1994, “高效抗虫转基因烟草的研究”中国科学 B 辑, 24(3): 276- 282
- [3] 施树良, 1994, 哈师大生物系硕士研究生论文“发根农杆菌 *Ri* 质粒介导二元载体向大豆转移 *PVY- cp* 基因的研究”
- [4] 许跃等, 1988, “酚类化合物促进根癌农杆菌对植物离体外植体的高效转化”科学通报, 33(2): 1745- 1785
- [5] 李宝健, 1990, “应用农杆菌 *Ti* 质粒系统将外源基因导入水稻的研究”中国科学 B 辑, 2, 144- 149
- [6] Barton K. A. et al., 1987 Plant Physiol 85 1103
- [7] Delannay X. et al., 1989 Bio/Technology 7 1265
- [8] Fischhoff D. A. et al., 1987 Bio/Technology 5 807- 813
- [9] Vacek M. et al., 1987 Nature 328 33
- [10] "Vtgc Training course manual" University of Tsukuba Gene Experiment 1991

STUDIES ON TRANSFERRING B. t. k- DELTA ENDOTOXIN GENE INTO SOYBEAN WITH *Ti*- PLASMID PRIMARIL

Xu Xiangling Gao Jing Liu Weihua Li Jilin

(Harbin Normal University 150080)

Abstract

The pKT54 B/Cs plasmid with B. t. k. - delta endoxin gene were transferred into Heinong 37 and Heinong 39 et. al soybean cultivars by inducing with various explant methods. Adventitious buds and regeneration plant were obtained from hypocotyl, cotylendon node. They were detected by kanamycine selection and alkaoids and primarily proved that foreign gene were transferred into soybean genome. Only 30 of 81 regenerated plant survived. Only 3 plants with 7 pods were obtained from the survived regenerated plants. It proved that 7 plants of the regenerated plants were transferred with forgein gene by PCR technique and dot hybridization. The 7 seeds sprouted, plant growth is normal.

Key words Soybean; *Ti*- plasmid; B. t. k- delta endotoxin gene; Regenerated plant