

向大豆导入几丁质酶基因的初步研究^{*}

徐香玲 邹联沛 刘伟华 李集临

(哈尔滨师范大学 150080)

摘 要

以根癌农杆菌的 Ti 质粒为介导,将抗真菌病的几丁质酶基因,导入黑龙江省栽培大豆—东农 37 号,吉林 28 号等 14 个品种。从子叶节和下胚轴诱导出丛生芽,并再生植株,经 PCR 和 DNA 分子杂交检测,确认为转化植株。用花粉管通道导入法,直接导入几丁质酶基因,共获 223 粒种子,经 PCR 和 DNA 分子杂交检测的 113 株大豆幼苗中,有 7 株呈阳性反应,证明几丁质酶基因已导入并整合到大豆的基因组中。

关键词 Ti 质粒;大豆;几丁质酶基因;转基因植株

近 20 年来,植物基因工程随 DNA 重组技术、遗传转化和植物组织培养技术的进展而发展起来,迄今为止,已有 60 多种植物获得了转基因植株,据不完全统计有 80% 的转基因植株是以农杆菌为介导的,从而建立起以农杆菌为载体的遗传转化体系^[1]。除此之外,也有一些研究人员用非载体遗传转化法,获得一些转化植株^[2-5,7]。

大豆是我国东北地区主要的经济作物,也是人们所需植物蛋白的主要来源。由于真菌病的危害,使大豆的产量和质量下降。几丁质是真菌细胞壁的组成成分,几丁质酶能分解真菌细胞壁的几丁质,从而产生对真菌病害的抗性^[6]。由于几丁质酶是单基因控制的,易于进行基因的转移。我国时焦^[3]已将几丁质酶基因导入烟草的栽培品种,经检测在转基因烟草中,具有高效的几丁质酶活性。

本文用不同的转基因方法,将几丁质酶基因导入大豆植株,从中选择抗真菌病害的大豆品系,以求进一步扩大大豆的品种资源,加速大豆抗病育种工作的进展。

材料与方 法

1 大豆品种

黑农 32 黑农 36 黑农 35 黑农 37,东农 37 东农 42 东农 593 东农 837 东农 39,吉林 28 吉林 29 吉林 169,绥农 8 号。实验用大豆品种由黑龙江省农业科学院,东北农业大学和吉林省农业科学院大豆所提供。

^{*} 收稿日期 1998-11-04

Received on Nov. 4, 1998

2 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)

根癌农杆菌 LB A4404中 PB_n437质粒上具有几丁质酶基因和卡那霉素 (Km)的抗性。由中国科学院遗传所陈正华教授惠赠。

3 方法

3.1 用载体法转化大豆

3.1.1 菌种的活化: 质粒的提取和大豆无菌苗的获得同徐香玲^[4]。感染菌液用不同 pH值和不同成分液体培养基,并加以稀释

3.1.2 外植体感染直接诱导再生植株:

子叶节诱导丛生芽再生植株: 取生长一周左右的无菌苗,切去胚轴和子叶上半部,将子叶分开,切去两片子叶或保留一片子叶,去掉顶芽,用注射器吸取活化的菌液,向子叶节处注射多次,然后接种于 MS固体培养基上,一天后转入含 1mg/L KT+ 0.2mg/L NAA + 500mg/L Cb(羧苄青霉素)和各含 60mg/L的天门冬酰胺、谷氨酰胺、尿囊酸和尿囊素的 MSB固体培养基上或转入 3mg/L 6-BA+ 0.5mg/L NAA+ 500mg/L Cb的 MSB固体培养基上,开始每 4天继代一次,然后一周继代一次,等丛生芽长到 1cm时,切下转到含 0.1mg/L NAA+ 500mg/L Cb+ 50mg/L(卡那霉素)+ 0.1mg/L NAA的 1/2MS固体培养基上诱导生根,待根生出主根和须根后转入花盆中。对保留一片子叶的子叶节可在 MS+ 500mg/L Cb的无激素培养基中诱导丛生芽,直接从胚轴切口处长出繁茂的根,移植时成活率较高。

胚轴诱导丛生芽再生植株: 取萌发 6天的无菌苗,切去子叶和胚轴下端,用注射器向胚轴的生理上端注射活化的菌液,将胚轴的生理下端朝下,插入 MS固体培养基中,一天后转入含 500mg/L Cb和各含 60mg/L的天门冬酰胺、谷氨酰胺、尿囊酸和尿囊素、1mg/L KT和 0.2mg/L NAA的 MSO固体培养基中,待芽长到 1cm时,转入 500mg/L Cb+ 50mg/L Km+ 0.1mg/L NAA的 1/2MS培养基中,诱导生根。

3.1.3 愈伤组织的诱导:

子叶诱导愈伤组织: 取萌发 5天的无菌苗的子叶,沿子叶中脉和基部多次注射菌液,然后接种于含 1mg/L KT+ 5mg/L 2⁻4D+ 500mg/L Cb的 MS固体培养基上,2周后可生出有光泽的愈伤组织,将愈伤组织转入 1mg/L KT+ 0.3mg/L NAA的 NS分化培养基中,2周后生出芽状体。

胚轴愈伤组织的诱导: 取生长 7天的无菌苗,只保留胚轴,其它部分切除。用菌液感染胚轴的生理上端和生理下端,然后将胚轴平放在含有 5mg/L 2⁻4D+ 1mg/L KT+ 500mg/L Cb的 MS培养基上,暗培养两天后,转入光下培养,待长出愈伤组织后转入 1mg/L KT+ 0.2mg/L NAA+ 500mg/L+ MS固体培养基上诱导生芽。

真叶诱导愈伤组织: 取培养 15天左右的无菌苗,待长出真叶时,将真叶取下剪成 0.5cm的小块,放入经稀释 100倍的菌液中,在摇床上共培养 5小时左右,取出用无菌滤纸吸干叶片小块上的多余菌液,转入含 5mg/L 2⁻4D+ 1mg/L KT+ 500mg/L Cb的 MS培养基上,诱导愈伤组织,获得愈伤组织后再转入 0.2mg/L NAA+ 1mg/L KT+ 500mg/L Cb的 MS分化培养基上。

3.2 直接导入的花粉管通道法

选择未开放的花,花冠略低于花萼(约 0.5mm),去掉花瓣,柱头与花药基本平齐,花药呈淡黄色,此时已授粉(授粉后 6–32小时),若花药变褐花粉管已萎缩,切去柱头,滴一滴质粒 DNA(浓度为 400 μ g/ml),用附近豆叶包上,挂牌标明日期和品种名,隔 3–5天检查一次,摘去旁边新长出的花蕾,保持一个节上只有一个转化的花,待成熟时收获转化花结的荚。

3.3 PCR和 DNA分子杂交检测

从转化植株提取总 DNA,人工合成特异引物,5'端引物序列为: CCACCTTAT-CATTTAG,3'端引物序列为: GAUGGUGGG AAAAGUG (特异引物由美国博特公司合成),PCR反应条件是: 预变性 95 $^{\circ}$ C 5min,后经 95 $^{\circ}$ C 15s, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 2min, 30个循环,延伸 10min。提取质粒 DNA经 BamHI和 SstI酶切,回收几丁质酶基因片段,经光生物素标记做探针,杂交时间为 20–24小时,硝酸纤维膜显色时间为数分钟至 16小时。(试剂盒购于北京华美生物工程公司)。

结果与分析

1 质粒 DNA的检测

从根癌农杆菌提取质粒 PBin437经琼脂糖电泳,紫外灯下检测可见到 13.4Kb的带(PBin437为 13.4Kb),说明质粒存在于根癌农杆菌中,对质粒 DNA经 BamHI和 SstI酶切,电泳检测可见 1.1Kb的带(几丁质酶基因为 1.1Kb),是回收的几丁质酶 DNA片段。

2 直接诱导丛生芽和再生植株

在子叶节外多次注射菌液,培养 2周,在注射处长出丛生芽。由于大豆基因型,培养基

表 1 大豆基因型、激素种类和外植体对诱导丛生芽的影响

Table 1 The affection of adventitious bud on soybeans genotype harmoe type and explant

品种 Cultivars	培养基 Medium	外植体 Explant number	出芽数 Number of adv entious bud	出芽率 Rate of adventious bud%	卡那抗性 Km resistance	转化率(%) Rate of transformation
东农 37 Dongnong 37	A	60	60	100	7	11.7
	B	28	34	121	3	9.0
	C	17	32	188	4	12.5
黑农 37 Heinong 37	A	24	27	112	1	4.1
	B	56	61	108	2	3.0
	C	10	19	190	1	10.0
吉林 28 Jlin 28	A	34	34	100	0	0
	B	40	45	112	1	2.5
	C	34	45	132	2	7.0
黑农 39 Heinong 39	A	23	24	104	0	0
	B	36	28	107	1	4.0
	C	37	58	156	2	3.4

A: MSB+ 1mg/L KT+ 0.2mg/L NAA; B: MSB+ 3mg/L 6-BA+ 0.05mg/L NAA; C: MS(子叶节上保留一片子叶)。(one cotyledon on the cotyledon node)

中含激素种类数量和取材方式的不同,出芽率和转化率亦有不同(见表 1)。

从表 1中可以看出,子叶节外易于诱导丛生芽,丛生芽是在菌液诱导下直接由可以产生顶芽或腋芽的分生组织发生的,成芽率较高。在子叶节上留有一片子叶从子叶节上诱导的丛生芽多为 2个,于胚轴切口处生根,根繁茂,可能是由于留下的一片子叶能继续供应营养和内源激素的作用。大豆的转化率与基因型有关,“东农 27号”大豆的转化率相对较高,而“吉林 28号”的转化率则相对较低(表 2)。

表 2 不同基因型大豆的胚轴对出芽率和再生植株的影响

Table 2 The affection of hypocotyl of difference genotype on adventitious bud and survived regenerate

品种 Cultivars	感染菌液 Bacterium	接种数 Infective number	出芽数 Number of adventi- tious bud	出芽率(%) Rate of adventiti- ous bud	出根苗数 Number of growing roots	成活株数 Number of survived regenerate
黑农 37 Heinong 37	A*	52	114	219	9	2
	B*	40	101	252	7	1
	C*	21	43	204	4	1
黑农 39 Heinong 39	A	66	75	113	11	2
	B	30	38	126	3	0
	C	40	52	130	5	1
东农 37 Dongnong 37	B	14	14	100	3	1
	C	22	27	122	4	1
	A	70	24	34	23	6
吉林 28 Jlin 28	B	23	26	113	7	2
	C	33	40	121	13	3
	A	22	44	200	11	4
东农 38 Dongnong 38	B	42	12	28	4	1
	C	9	13	144	6	2
	A	32	36	112	8	6
吉林 29 Jlin 29	B	18	20	111	6	2
	C	27	28	103	7	3

* A: 烟草提取液+ 菌液 The abstract of tobacco+ bacterium solution

* B YEB培养液+ 菌液 YEB culeure solution+ bacterium solution

* C YEB培养液+ 菌液 YEB culeure solution

从表 2中看到,不同基因型的大豆胚轴诱导丛生芽数有差异,“黑农 4号”出芽率较高,但生根的株数不多。诱导大豆丛生芽生根是比较困难的。

3 愈伤组织的诱导和分化

不同大豆品种的外植体,诱导愈伤组织和分化有差异(表 3)。

从表 3中看出,胚轴和真叶诱导的愈伤组织略高于子叶。愈伤组织在诱导芽分化培养基上很少分化,能分化出芽又能生根的更少。因此转基因大豆通过愈伤组织分化获得再生植株的成功率极低。本实验曾诱导出大量的愈伤组织,但仅在胚轴诱导的愈伤组织中获得二个苗,移植时未能成活。

4 花粉管通道法直接导入外源基因

利用花粉管通道法直接导入外源基因共做了 6个品种,385朵花,有 137朵花结荚。大

表 3 不同基因型和不同外植体对愈伤组织分化的影响

Table 3 The affection of differend genotype and explant on differentiation of callua

品种 Cultivars	外植体 Explant	接种数 Number infective	始愈期 Day of frist callus	出愈伤数 Number of callus	出愈伤率% Rate of callus	愈伤组织分化数 Number of differe ntiation of callus		
						芽 bud	根 root	苗 seeding
东农 37 Dongnong 37	子叶	71	10	69	97			
	胚轴	62	8	62	100		1	
	真叶	73	7	72	98			
东农 42 Dongnong 42	子叶	46	9	44	95			
	胚轴	57	8	56	98	2	1	
	真叶	64	7	64	100			
黑农 36 Heinong 36	子叶	53	10	50	94			
	胚轴	63	7	61	94		1	
	真叶	47	8	47	100			
黑农 37 Heinong 37	子叶	63	11	60	94	1		
	胚轴	72	9	71	98			
	真叶	63	7	60	94			
吉林 29 Jilin 29	子叶	38	8	35	97			
	胚轴	46	6	45	68	3	1	
	真叶	52	7	52	100	1		
吉林 169 Jilin 169	子叶	45	9	40	90			
	胚轴	37	7	37	100	1		
	真叶	48	6	47	98			

表 4 花粉管道法转移基因的情况

Table 4 The number of trasfer gene of pollen tube

品种 Cultivars	注入花数 Flower number	结荚数 Pod number	结荚粒数 Number of seeds in pod	检沿出转化株数 Number of transformation of detected plants
黑农 32 Heinong 32	69	25	54	0
黑农 36 Heinong 36				
黑农 35 Heinong 35	45	16	36	2
黑农 39 Heinong 39				
吉林 28 Jilin 28	11	4	9	0
吉林 29 Jilin 29				
总计 Total	358	137	223	7

部分花经操作后 2 周脱落,原因可能是切去柱头时造成机械损伤所致。结荚粒数少于正常荚粒数,粒大小不一,不同品种间结荚数、粒大小有所不同(表 4)。

5 PCR和 DNA分子杂交检测的结果

由子叶节和下胚轴诱导的再生植株,经 PCR检测有 2 株为阳性,分别来自“黑农 37”和“吉林 28”2 个大豆品种。检测花粉管通道法获得 223 粒种子中的 113 粒种子萌发的植株,表现为阳性的有 7 株,转化率为 6.19%,分别来自吉林 29 黑农 35 黑农 26 三个品种。DNA 斑点分子杂交的结果与 PCR 检测相似(图)。

讨 论

1 大豆遗传转化再生途径的探讨

大豆组织培养再生植株有两种不同途径,即不定芽再生植株途径和器官分化再生植株途径,不定芽再生植株是由于子叶节或下胚轴部位有分生组织,分生组织可产生不定芽,因此感染子叶节或下胚轴诱导丛生芽的频率较高,在 90% 以上,通过对不定芽的筛选易于获得转化植株。但是由于不定芽不是全部由转化细胞分化而来,再生植株多为嵌合体,因此必需进行严格的筛选,首先是在培养基上进行严格的卡那霉素筛选,抑制非转化细胞的生长,对丛生芽和丛生芽发根的诱导,亦需在含有卡那霉素的培养基上进行,保持选择压力。由于导入的基因片段,常插入一条染色单体中,后代有分离,因此对转化植株的后代应继续进行选择与检测,从中选出遗传性稳定的纯合的转化植株。

本实验对外植体的筛选,采取两种方法:一是长出丛生芽后再进行抗性筛选,结果大部分丛生芽在抗性筛选中死亡,仅少数存活,经 PCR 检测只获得二株阳性植株。二是在外植体感染菌液后两天即进行抗性筛选,虽然出芽率低(3—4%),但经 PCR 检测多为阳性植株。

器官分化再生植株途径,虽然大豆外植体在含有激素培养基上,易于形成愈伤组织,但愈伤组织诱导芽分化非常困难,成苗率很低,很难重复,因此大豆通过器官分化途径获得再生植株还需做大量的基础研究工作。

我们认为通过不定芽再生植株,从子叶节和下胚轴直接诱导丛生芽,是简便、快速、有效的。

2 用花粉管通道法向大豆导入外源基因是可行的

花粉管通道法是基于卵与合子 DNA 有与外源 DNA 重组的可能,当外源 DNA 经花粉管通道进入胚囊,有可能与受精卵的染色体重组,从而使外源 DNA 整合到合子的染色体组中。确定大豆授粉时间是正确使用大豆花粉管通道法的关键。我们选择未开放的花,花冠略低于花萼,柱头与花药平齐,花药呈淡黄色,此时已授粉 6—32 小时,合子尚未分裂,我们认为这是最适宜的时间。应注意的是:随花粉管的生长,花粉管中形成胼质塞,阻碍外源 DNA 的导入,因此在导入外源 DNA 时应剪去一段柱头,使外源 DNA 能通过花粉管通道进入胚囊。花粉管通道法免去繁琐的组织培养过程,如果使用得当,也是一种可行的办法。

参 考 文 献

- [1] 董立州, 1993, 生物工程进展, 14(2): 15- 18
- [2] 刘广阳, 1996, 大豆科学, 15(4): 353- 356
- [3] 时焦, 1997, 中国烟草, 4 47- 50
- [4] 徐香玲, 1997, 大豆科学, 16(1): 6- 11
- [5] 雷勃钧等, 1991, 大豆科学, 10(1): 58- 62
- [6] Broglie K. et al 1991, Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *rhizoctonia solani*, Science 254 1194- 1197
- [7] Annu, Rev, 1991, Plant physiol, Plant Mol, Biol, 42 205- 225

A PRELIMINARY STUDY ON TRANSFERRING CHITINASE GENE INTO SOYBEANS

Xu Xiangling Zou Lianpei Liu Weihua Li Jilin

(Harbin Normal University 150080)

Abstract

The chitinase gene was transferred into cultivars Dongnong 37, Jilin 28, et al. with Ti plasmid. Adventitious buds and regenerated plant were induced from cotyledonous node and hypocotyl. PCR and DNA dot blotting proved that they were transferred plant. Purified plasmid PBin 437 with chitinase gene was also transferred into several soybeans varieties by the pollen tube technique and 223 seeds were obtained. Among 113 plants germinated from these seeds 7 showed positive reaction in PCR and DNA dot blotting.

Key words Ti plasmid; Soybean; Chitinase gene; Transferred gene plant

图版说明:

1 “吉林 28号”胚轴诱导丛生芽

2 “吉林 28号”丛生芽诱导生根

3 “东农 37号”子叶节诱导的再生植株

4 “吉林 28号”胚轴诱导的再生植株

5 PCR检测 a. marker b. 质粒阳性对照 c, d. 黑农 35转化植株 e. 黑农 35对照 g, h, i. 黑农 36转化植株

6 DNA斑点杂交 a. 阳性对照 b, c, d. 吉林 29转化植株* e, f. 黑农 35转化植株* g, h. 黑农 36转化植株* j. 吉林 28转化植株

* 花粉管通道法获得的转化植株

Explanation of plate

1. The adventive bud were induced from hypocotyl of Jilin 28.
2. The growing root were induced from adventitious bud of Jilin 28.
3. The regeneration plant were induced from cotylendinous of Dongnong 37.
4. The regeneration plant were induced from hypocotyl of Jilin 28.
5. PCR Detecting

a, marker. b, positive c, d, reansfer plants of Heinong 35. e, Heinong 35 ck. f, Heinong 36 ck. g, h, i, transferred plant of Heinong 36.

6. DN A dot hybridization

a, positive. b, c, d, transferred plant of Jilin 29* . e, f, transferred plant of Heinong 35* . g, h, transferred plant of Heinong 36* . i, transferred plant of Heinong 37. j, transferred plant of Jilin 28.

* Transferred plant of pollen tude.

