

转 ipt 基因大豆感染 SMV 1号 的生理特性变化^{*}

刘丽君¹ 吴俊江¹ 高明杰¹ 汪清胤²
黄永芬² 夏 凯³ 李文华⁴

(1 黑龙江省农科院大豆研究所 150086 2 哈尔滨师范大学生物系
3 南京农业大学 4 东北农业大学农学院)

摘 要

本文对黑龙江省推广的三个大豆品种及它的转 ipt 基因株系 F₄, 采用生化技术酶联免疫检测技术 (ELISA), 研究了病毒病侵染条件下, 转基因植株的生理特性变化及对内源激素含量及其平衡状况的影响。实验结果表明: SMV 1 号诱导条件下, 转基因大豆细胞中 MDA 含量减少, SOD 酶活性较强; 转 7SL- ipt 基因的大豆, 内源激素 IPA IAA GA 含量明显增加; 而转 8SL- ipt 基因的大豆, 则通过内源激素 IAA ABA 含量的增加, 来改变大豆的形态发生和提高抗病性。

关键词 ipt 基因; 转基因植株; 病毒病

ipt 基因是植物细胞分裂素合成相关的异戊烯基转移酶 (Isopentenyl Transferase 简称 ipt) 基因, 它可催化 5'-Amp 和异戊烯基焦磷酸转变成异戊烯基腺苷-5'-pi, 使异戊烯基腺苷-5'-pi 迅速转化成异戊烯基腺苷 (9Rip) 和异戊烯基腺嘌呤 (ip), 9Rip 和 ip 的羧化作用可分别产生玉米素核苷和玉米素 (Barry, G. G. 1984. Bachmann, I. 1985, Letham D. S. 1983). Roeckel (1993) 等人报道了细胞分裂素生物合成基因在种子中的特异表达对油菜和烟草表现型的影响, 实验证明: 转基因的烟草和油菜的平均结荚数和种子数比野生型的高 80% 和 10%。在动物基因转移方面, 已利用生长激素基因转入猪、牛、羊等而获得了巨猪、巨羊的实践。1996 年我们与哈师大生物系合作, 将含有 P^{SVR}-ipt-Str^R-Spe^R 的融合基因的 Ti 质粒 P^{Mon}505, 通过花粉管通道法导入了黑龙江省已推广的大豆品种中, 经同工酶检测、Southern 杂交证实该基因在 F₁ 代获得表达并遗传到后代 (许志茹等, 1996)。从形态表现看转基因材料生育进程加快, 株高降低, 水平抗病性提高 (病菌接种鉴定结果)、分枝数增加, 结荚数增多等。由此, 我们对转基因植株的产量水平、抗病

* 黑龙江省自然科学基金、杰出青年基金资助。

收稿日期 1998-10-12

Received on Oct. 12, 1998

性和遗传特性进行了探讨,本文仅就病毒病侵染条件下,转基因大豆的生理特性变化进行探索,旨在揭示大豆转 ipt 基因后,水平抗病性提高的内涵

材料与方法

1 材料

以绥农 8 庆丰 1 号、黑农 36 为受体材料;0793101 07933601 0793801 用 Ecoli 7SL 含有 $P^{SAVR}-ipt$ 的 $P^{Mon}505$ 转化到 DH5a 中,由美国哥伦比亚大学提供载体质粒导入获得的转基因后代株系;0893807 0893102 08933601 用 Ecoli 8SL 为载体质粒转入而获得的后代株系(7SL 8SL 间的不同主要是 SAVR 分子长度的不同)

2 供试菌种

大豆病毒病 1 号生理小种,由东北农业大学大豆所提供

3 接种与取样

每个材料播 12 盆,每盆 4 株于防虫网室内。当真叶展开时接种,接种两周后进行采样测定

4 超氧化物歧化酶的测定

采用 NBT 法^[5]进行

5 丙二醛含量的测定

参照王爱国 1986 年的方法。

6 内源激素含量测定

剪取实验材料的叶片立即准确称重并用液 N 速冻。后置于密闭小瓶中低温 (-40°C) 保存。每个处理(含不接种的)取 4 份样品,每份 1g 左右。激素的纯化和酶联免疫测定(ELISA)方法基本同吴颂如等^[9]。其中,IAA(吲哚乙酸)和 IPA(细胞分裂素)用固相抗原型 ELISA,GA(赤霉素)和 ABA(脱落酸)用固相抗体型 ELISA 测定。每份材料 5 个样品孔,重复读数 2 次。所用药盒由南京农业大学植物激素研究室提供。

实验结果

1 大豆花叶病毒病侵染条件下,转 ipt 基因大豆的膜质过氧化反应

大豆花叶病毒病侵染条件下,转 ipt 基因大豆的膜质过氧化水平发生了变化,特别是 MDA(丙二醛)含量减少,与受体比较减少的幅度在 $-4\% - 18\%$ 之间(参见表 1) 这表明:在大豆病毒病诱导条件下,转 ipt 基因大豆叶肉细胞内有毒代谢产物的积累少,膜脂的过氧化调节能力较强。

2 病毒病侵染条件下,转 ipt 基因大豆保护酶体系的变化

超氧化物歧化酶(SOD 酶)是细胞膜免受过氧化的两个保护酶,它在清除细胞内自由基、提高体内抗逆性方面起到了重要的作用,在 SMV 1 号株系诱导下,转基因大豆株系叶肉细胞中的超氧化物歧化酶活性增加幅度为 $18.5\% - 96\%$ (见图 1),增加幅度与受体的

抗病性有关,绥农 8做受体的转入后代增加幅度较小,而黑农 36做受体的转入后代 SOD 酶活性增加幅度较大,抗病性与受体比较,转基因株系的抗病性达中抗水平。

表 1 SMV 1号对 ipt基因转化大豆后代膜脂过氧化的影响

Table 1 Membranous peroxidatic veaction of soybean varieties after transforming ipt gene into soybean plant with SMV No. 1

处理 Treatment	品种 Cultivar	MDA含量 mol/L. g. F. W MDA Content	与受体比较含量 增加(降低)的百分数
SMV 1号 生理小种 Treatmont by SMV No. 1	0793101	7.3081 ⁻⁰³	- 18. 0%
	0893102	7.6612 ⁻⁰³	- 14. 0%
	庆丰 1号 Qingfeng 1	8.9238 ⁻⁰³	
	08933601	7.3723 ⁻⁰³	- 4. 0%
	07933601	6.848 ⁻⁰³	- 11. 0%
	黑农 36 Heinong 36	7.6612 ⁻⁰³	
	0893807	7.2546 ⁻⁰³	- 13. 0%
	绥农 8号 Suinong 8	8.3032 ⁻⁰³	

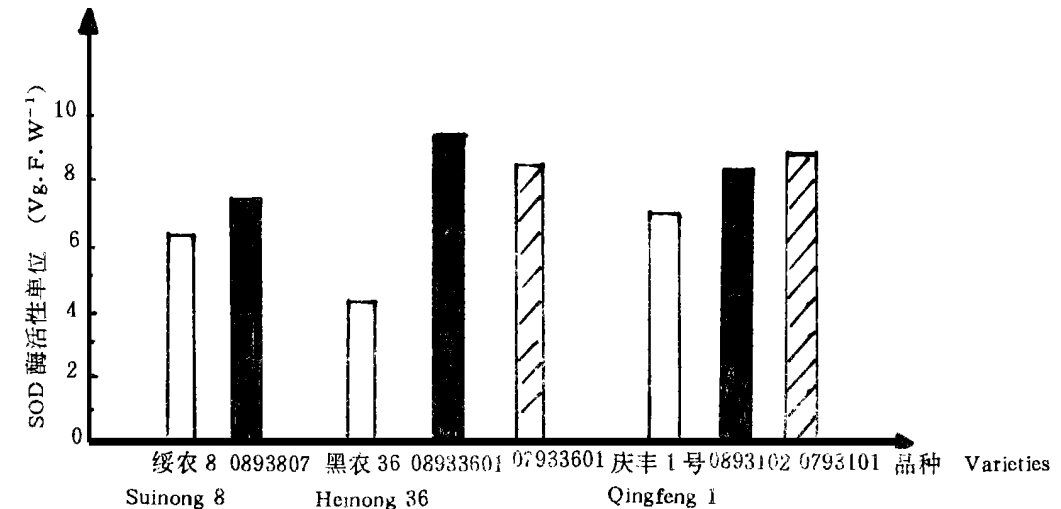


图 1 病毒病对转基因大豆超氧化物歧化酶活性的影响

Fig. 1 Effect of SMV on SOD activity of soybean varieties after transforming ipt gene into soybean plant

3 病毒病对转基因大豆内源激素含量及平衡的影响

- (1) GA含量的变化: SMV 1号小种侵染条件下,用 Ecoli 8SL载体质粒介导而获得的转基因大豆植株叶肉细胞内的 GA含量与受体比较含量降低,而转 Ecoli 7SL载体质粒转化 ipt基因的大豆叶肉细胞内 GA含量与受体比较含量是增加的(参见表 2)
- (2) ABA含量的变化: SMV 1号侵染条件下,转基因大豆植株叶肉细胞内的 ABA含量明显高于受体,特别是导入 8SL- ipt基因的后代,ABA含量的积累显著,08933601为受体的七倍。而转 7SL- ipt基因的个别株系的含量有所降低

(3) GA/ABA比值的变化: 在 SMV1号侵染条件下,转 8SL- ipt基因的后代材料中 GA/ABA比值与自身受体比较明显增加,而 7SL- ipt导入后代 GA/ABA比值与自身受

体比较变化不大,有的品种表现降低(参见表 2)。由此可见:用农杆菌 7SL转育 ipt基因大豆发育加快的原因之一,是体内 GA类物质相对含量的提高和 ABA含量的相对减少,即 GA/ABA比值降低。而转育 8SL- ipt基因的大豆发育加快的原因之一,是降低体内 GA类物质的含量而提高 ABA的相对含量,即增加 GA/ABA的比值。

表 2 SMV 1号小种转基因大豆 GA ABA含量及 GA/ABA平衡的影响

Bable 2 Effect of SMV on the amount of endogenous GA ABA and the retion of GA to ABA after transforming ipt gene into soybean plant

处理 Treatment	载体质粒 Plasmid	激素 Pmd 19. FW Hormones	绥农 8 Suinong 8	0893907	庆丰 1号 Qingfeng 1	0893102	黑农 36 Hein onh 36	08933601
SMV 1号 生理小种 Treatment by SMV No. 1	Ecoli 8SL	GA	578. 90	244. 30	498. 19	4. 75	113. 50	36. 64
		ABA	6428. 32	18170. 01	1131. 84	1517. 79	1084. 35	86003. 96
		GA /ABA	1∶ 10. 1	1∶ 73. 4	1∶ 1. 27	1∶ 318. 5	1∶ 8. 55	1∶ 2346. 3
	Ecoli 7SL			庆丰 1号 Qingfeng1	0793101	黑农 36 Heinong 36	07933601	
		GA			498. 19	667. 01	113. 50	192. 56
		ABA			1131. 84	1539. 27	1084. 36	422. 57
		GA /ABA		1∶ 1. 27	1∶ 1. 31	1∶ 8. 55	1∶ 1. 19	

(4) IPA含量的变化: 细胞分裂素能促进授粉子房的碳水化合物代谢,强化“库”的活动,提高结果率及产量。同时外源 IPA能刺激植物蛋白质的合成,促进侧芽的生长,大豆转 ipt基因后代株系叶肉细胞中的 ipt含量增加,增加幅度因品种而异。但在 SMV 侵染条件下,转 7SL- ipt基因大豆植株体内的 IPA含量仍高于受体的 2- 4倍,而转 8SL- ipt基因的后代材料,叶肉细胞内的 IPA含量与受体比较出现了个体间的差异,有的株系 IPA含量降低(参见表 3)。

表 3 SMV 1号小种对转基因大豆叶肉细胞中 IPA含量的影响

Table 3 Effect of SMV on the amount of endogenous IPA after transforming ipt gene into soybean plant

处理 Treatment	载体质粒	绥农 Suinong 8	0893801	庆丰 1号 Qingfeng 1	0893102	黑农 36 Heinong 36	08933601
SMV 1号生理小种 Treatmnet by SMV No. 1	Ecoli 8SL	145. 42	106. 44	12. 31	0. 026	37. 90	129. 29
	Ecoli 7SL			庆丰 1号 Qingfeng 1	0793101	黑农 36 Heinong 36	07933601
				12. 31	30. 14	37. 90	156. 18

(5) IAA含量的变化: 病毒病诱导条件下,所有转基因材料叶肉细胞中的 IAA含量都有明显增加,由此可见, ipt基因的转入可调节大豆内源激素 IAA的含量(参见图 2)。

讨 论

植物激素调节植物的分化形成,它包括两大类,即植物的细胞分裂素和生长素。从本

实验结果可以看出: 在病毒病诱导条件下, ipt 基因上的高活性启动子能通过内源激素的水平来加强和改变转化植株细胞的形态发生。SMV1 号诱导条件下, 转 7SL- ipt 基因大豆的内源激素 IPA IAA GA 含量明显提高, 改变了形态的发生。而转 8SL- ipt 基因的大豆则通过内源激素 IAA ABA 含量的增加, 来改变形态的发生。

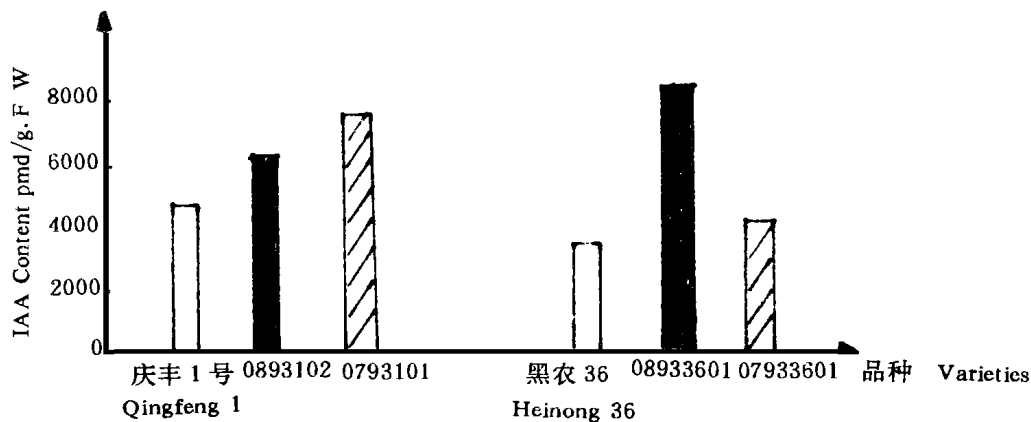


图 2 SMV1 号小种对转基因大豆叶肉细胞中 IAA 含量的影响

Fig. 2 Effect of SMV on the amount of endogenous IAA after transforming ipt gene into soybean plant

参试材料经 SMV1 号株系诱导后, 转基因植株细胞中 MDA 含量减少、SOD 酶活性增强, 说明 ipt 基因的插入使细胞中清除自由基的能力加强, 使膜脂的过氧化调节能力增强。因此, 导致转 ipt 基因大豆的水平抗病性增强。

参 考 文 献

- [1] Barry. G. G. et al., 1984, Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81: 4776- 4780
- [2] Bachmann. L. et al., 1985, Tumor genes in plants: T- DNA encoded cytokin in biosynthesis. EMBO J. 4: 853- 859
- [3] Letham. D. S. & Palni. L. M. S. 1983, Annu. Rev. Plant Physiol. 34: 163- 197
- [4] 许志茹, 汪清胤, 黄永芬, 1996, 根癌农杆菌 Ti 质粒介导的植物细胞分裂素基因转入大豆的研究, 哈尔滨师范大学硕士研究生论文
- [5] 刘丽君等: 1996, SMV1 号对大豆膜质过氧化及保护酶体系的影响, 《大豆科学》, (3): 248- 253
- [6] 韩天富等, 1996, 光周期对大豆叶片内源激素含量及其平衡的影响, 《作物学报》Vol. 22. (6): 661- 667
- [7] 赤霉素结合蛋白对水稻矮生性的调控, 宋平、曹显祖等: 1996, 《作物学报》, Vol. 22. (6): 652- 657
- [8] 张焱、官春云, 内源赤霉素与油菜不同种性品种花芽分化的关系研究, 1993, 《作物学报》, Vol. 19. (4): 365 - 371
- [9] 吴颂如、陈婉芬、周燮, 1988, 《植物生理学通讯》, (5): 53- 57
- [10] 汪清胤、黄永芬等, 1994, 含 ipt 融合基因的根癌农杆菌转化大豆萌动种胚的研究, 《大豆科学》, (2): 116