

影响农杆菌介导的大豆基因转化因素的研究^{*}

赵桂兰 刘艳芝 李俊波 徐洪志 刘 莉 尹爱平

(吉林省农业生物技术重点开放实验室 公主岭 136100)

摘要 通过农杆菌介导法用含 NPT-Ⅱ 和 Bamase 基因导入到大豆幼胚,大豆子叶节中,然后经过含 Kan 的筛选培养基中连续筛选,获得一批 Bamase 转基因植株。经 PCR 扩增结果,证实此基因已整合到大豆中,在当代植株中生物学特性观察。花粉粒不育率在 98%。

关键词 大豆;农杆菌介导法;Barnase 基因;基因转化

中图分类号 S565. S336 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2001)02-0084-05

大豆是重要的油料作物,是植物蛋白质的重要来源。近年来,利用农杆菌介导及基因枪转化技术已趋于完善,并已建立转化技术体系^[1]。鉴于大豆转化频率不高,一般为 1.0—2.0%之间、重复性差、大豆组培有一定难度,建立理想的高频再生受体系统与转化系统有效结合的体系,使转基因大豆达到实用化阶段是国内外学者们的研究热点之一。我们利用大豆幼胚发生再生系统和不定芽器官发生再生系统分别建立了农杆菌介导大豆转化方法。以农杆菌介导转化法将雄性不育基因导入大豆进行了一些研究。利用转基因技术创造雄性不育,在烟草、油菜、花椰菜及莴苣等方面已有报道。Mariani(1992)等将花药绒毡层启动子(TA 29)与 RNA 酶基因 barnase 拼接(TA 29-barnase)并转入烟草与油菜。获得这两个作物的工程雄性不育植株^[2]。随后他们将 RNA 酶抑制基因(Barstar)与 TA 29 构建 bamase 的恢复基因(TA 29-bastar),使不育植株的育性得以恢复^[3]。但在大豆遗传转化研究方面未见过报道。我们用农杆菌介导法,获得 bamase 阳性转基因的大豆雄性不育株,本文重点报道农杆菌介导大豆转化中几个有关因素的研究结果。

1 材料和方法

1.1 供试材料

以栽培大豆(*Glycine max* (L.))7 个品种的(吉林 20,吉林 27,吉林 30,吉林 31,吉林 35,吉林 36,吉林小粒 1 号)未成熟子叶和 3 个品种(合丰 25,吉林小粒 1 号,吉林 27)的无菌苗子叶节为实验材料。未成熟子叶材料取自田间及温室,消毒后分别接种诱导培养基。^[4]

1.2 农杆菌的质粒和菌种

农杆菌 LBA 4404(PBI 35Sbox)由中国科学院遗传所李文彬先生提供。基因结构如图 1 所示:

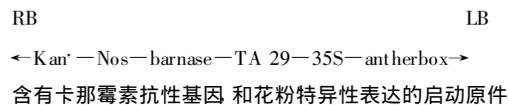


图 1 大豆转化农杆菌中的双元载体 T-DNA 区

Fig. 1 The T-DNA region of binary vectors for Agrobacterium mediated transformation in soybean

1.3 农杆菌的培养及制备

从 4℃保存的平板上取单菌落,接入 10ml YEB 液体培养基+50mg/L Kan 中,26℃,160r/min 振荡培养至对数期,OD 600=0.6,将菌液用 MSO 液体培养基稀释 2 倍,做为农杆菌转化的工程菌液。

1.4 外植体与农杆菌侵染过程

1.4.1 大豆幼胚农杆菌介导转化和再生

取开花后 25 天左右的边荚^[4],诱导产生胚状体后浸入制备好的工程菌液中 3—5 分钟,再取出侵菌

* 收稿日期:2000-07-03

基金项目:国家八六三计划项目。

作者简介:赵桂兰(1953-),女,研究员,主要从事大豆及豆科牧草遗传转化研究。

后的外植体置入无菌滤纸上,吸掉多余的菌液,转至(G9 + As100 μ m/L)共培养基中共培养 3d 后再转入筛选培养基(G10 + Kan 50mg/L Cef. 500mg/L),每二周继代一次,继代 3 次后,获得的抗性胚体逐渐发育,分离成单个的不同阶段的胚体(图片 1, 2, 3, 4).子叶胚在 G70 培养基上萌发抗性植株。

1.4.2 大豆子叶节农杆菌介导转化及再生

将无病斑的大豆种子消毒,萌发^[5]取 7—10 天子叶节,用解剖刀在子叶节部位划破数条裂痕,将子叶节浸没在农杆菌 + B5 液体培养基中侵染 30 分钟后,吸掉多余菌液,置入暗处共培养 3d 后,转入筛选培养基中(M4-1 + Kan 200 mg/L + Cef. 500 mg/L)连续筛选,每二周继代一次,待丛生芽生长至 2cm 左右时,切下移入生根培养基(1/2MS + IBA 2mg/L + Kan 50mg/L + Cef. 300mg/L)可获得抗性植株。

1.5 GUS 的组织化学检测

依照 Jefferson(1987)的方法^[7],将经过筛选存活下来的胚体(不同发育时期)放到 X-Gluc 液中,37 $^{\circ}$ C 保温,过夜观察 GUS 的瞬时表达及稳定表达结果。

1.6 PCR 扩增鉴定

bamase 基因的 PCR 引物由鼎国生物技术公司合成。

引物 I 序列:

5' ' — ACTGCAGGATC-CATGGCACAGG TATCAACACGT-3'

引物 II 序列:

5' -GCCCTCGAGCTCGTTATCTGATCTT TGTA-3'

PCR 扩增程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 分钟,94 $^{\circ}$ C 变性 1 分钟,54 $^{\circ}$ C 退火 1 分钟,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 分钟 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 8 分钟。

1.7 生物学特性观察

对转基因植株 1 $^{\#}$ 、4 $^{\#}$ 、8 $^{\#}$ 株分别进行 1% I-KI 溶液染色鉴定。检测花粉粒育性。以转基因植株(T₀代)的花粉粒不被 I-KI 染色为标准。

2 结果与分析

2.1 选择压的实验

不同浓度的 Kan(0, 5, 25, 50, 75, 100mg/L)分别用于大豆胚性愈伤组织生长及个体胚发育阶段的抑制实验见(图 2、图 3)。

接种生长一致的胚性愈伤 1.0g, 每个处理 5 个重复。

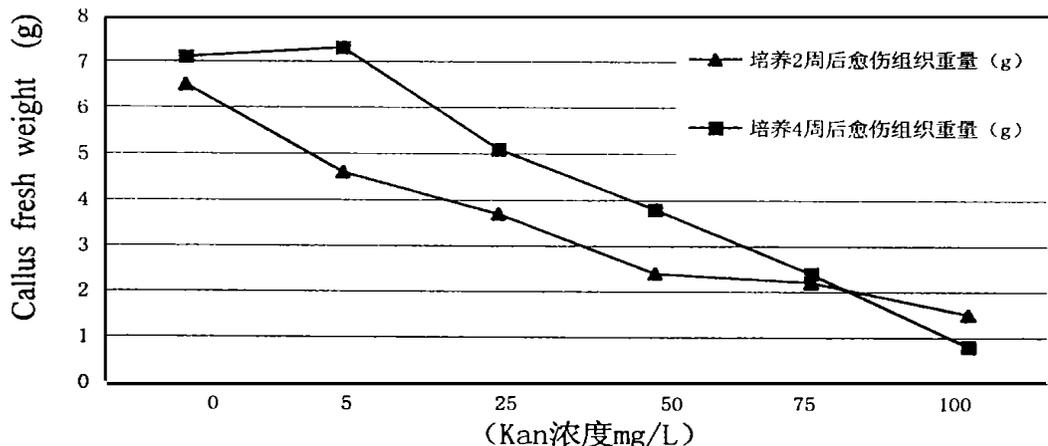


图 2 卡那霉素对大豆愈伤组织的敏感性试验

Fig. 2 Kanamycin sensitivity tests on callus of soybean

接种生长发育基本一致的子叶型胚 10 个/皿(5 个重复),在分化培养基上连续培养 30 天,检测胚体生存率。

上述试验表明 25—50mg/L 的 Kan 浓度对大豆的愈伤及胚状体均可达到近 50% 的抑制作用。特别是在 Kan 的浓度为 50 mg/L 时,个体胚体的生存率相对低下(18%),抑制了胚状体的发育及分化。

两个试验虽有个体差异,可能是供试外植体发育时期不同,前一个试验是测量胚性愈伤生长量,新增殖的愈伤是在筛选培养基的上部,直接接受选择的时间相对晚些,而单个胚状体是直接接受选择压的筛选,且外植体小。故此,在 Kan 50mg/L 上进行筛选时胚状体生存率相对低些。笔者认为,二个试验结果基本吻合。依据不同外植体的生理指标来确定

Kan 抗性的临界浓度, 方能达到筛选的目的, 降低假转化体的逃逸。

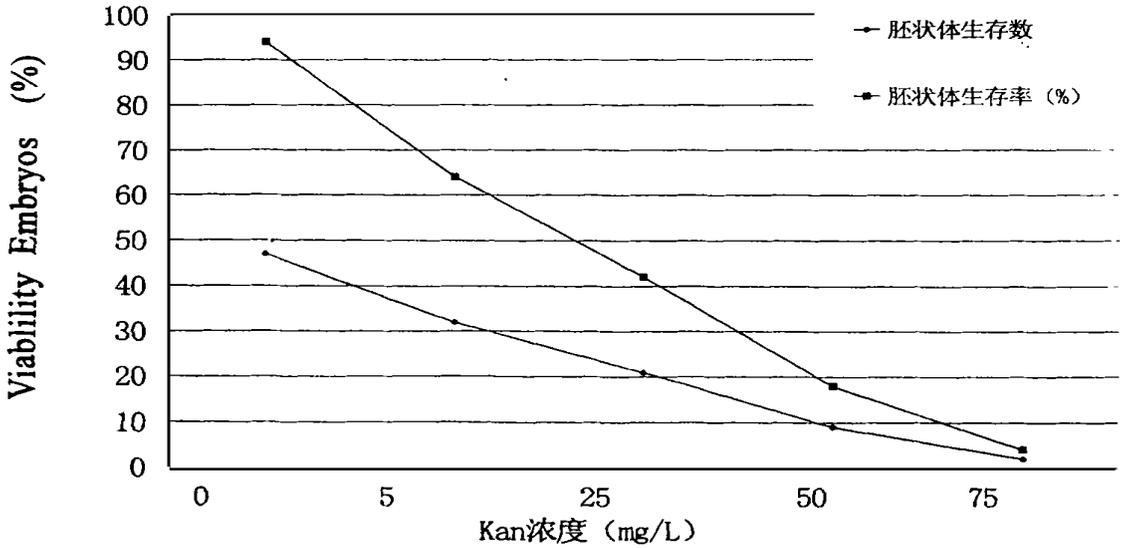


图3 卡那霉素对胚状体发育的敏感试验

Fig. 3 Kanamycin sensitivity tests on embryos of soybean

2.2 外植体的类型对瞬时表达及稳定表达的影响
将来自同一外植体大豆幼胚诱导的胚性愈伤组织, 簇状细胞团, 子叶胚状体分别进行农杆菌介导转

化试验。为明确同一外植体不同类型(不同发育阶段)瞬时表达和稳定表达水平, 根据 GUS 标记基因跟踪观察, 统计 GUS 酶活性的表达效果(见图 4)。

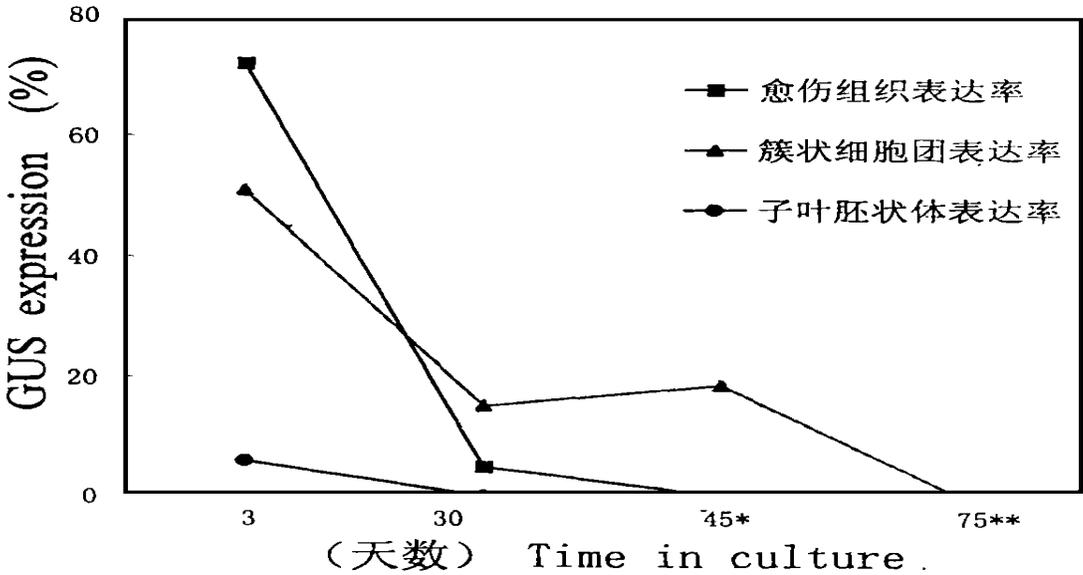


图4 不同发育阶段 GUS 表达活力分析

Fig. 4 Analyses of GUS activity in different developmental of embryo phases

图 4 实验结果看出, GUS 瞬间表达时, 受体材料顺序为胚性愈伤组织, 簇状细胞团, 子叶胚状体(胚发育过程), GUS 酶活性表达能力与受体材料发育时期呈负相关。即愈伤组织 72.0%; 簇状细胞团 51.0%; 子叶胚状体 6.0%。而在 GUS 的稳定表达中, 受体材料为簇状细胞团的 GUS 酶活性呈增强的趋势, 30 天时 GUS 酶活性为 15.3%, 45 天 18.7%。

此时子叶胚状体及胚性愈伤组织 GUS 酶活性逐渐消失。不同的外植体类型表现了不同的转化效果, 且差异显著。另外, 本项实验还可以看出, 植物细胞对农杆菌的侵染时期确实存在着感受态的问题, 也就是说, 当植物细胞进行转化时易于接受外来遗传物质住处的一种状态。当用胚性愈伤组织做受体侵染时, 或是并非分生组织分化最佳时期, 农杆菌不能

侵染,或是组织幼嫩,对农杆菌产生过敏反应,导致感染部位褐化、坏死,从而影响了转化效果。T-DNA 的转移是随着细菌进入伤口发生的,致使植物细胞分泌一些酚类物质,增强农杆菌侵染能力和表达效果,创伤反应是植物感受态细胞存在的前提条件之一,而子叶型胚状体的发育状态,已在萌发培养基中继代培养近二十天,已发育为一个独立的,完整的个体胚,似一粒种子,胚状体上没有创伤区域,自然减弱了创伤反应条件,因此转化水平低。

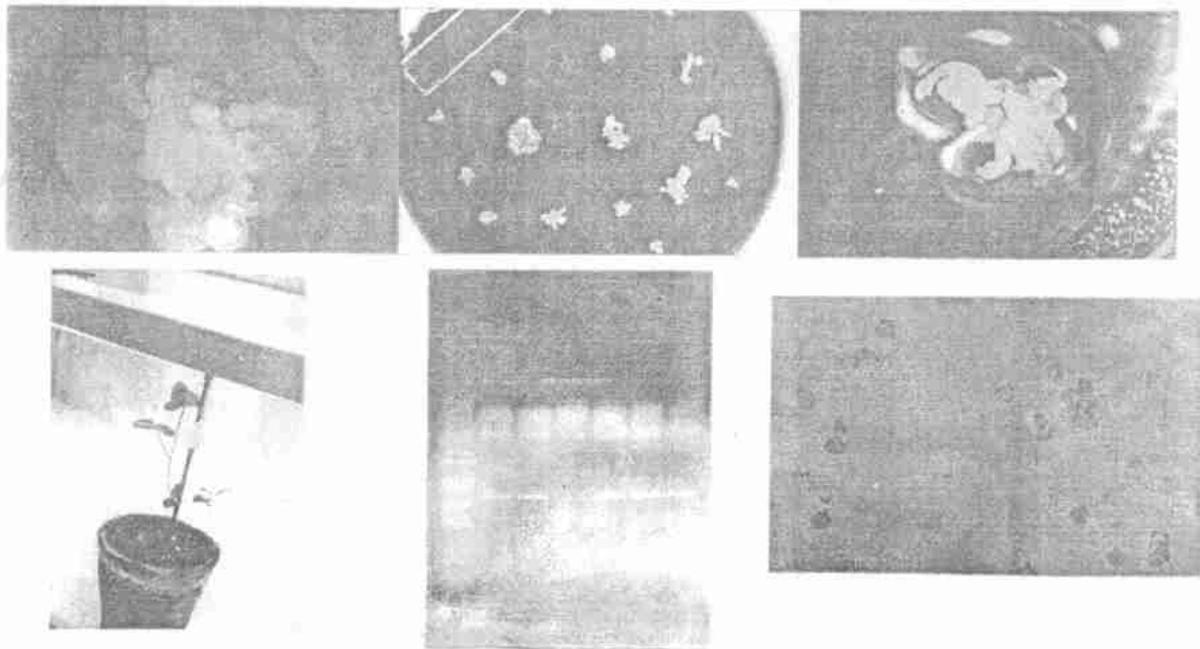
2.3 转化植株 GUS 酶活性测定

为了进一步测定农杆菌介导法对大豆幼胚转化的表达水平,我们跟踪到萌发成苗阶段,对再生植株的根进行了检测,共 29 条根。未见到在根中具有 GUS 阳性反应。推测有三种可能:一是提供的被检测材料太少,(29 株抗性转化株),通过在 Kan 霉素上筛选的小部分植株却没有 GUS 基因表达,可能是

假转化体;二是转化株为嵌合体;三是由于大豆根中存在大量的 DNase,比叶片中高得多,Garzon 和 Sayre(1993)曾用不同启动子及不同基因(GUS 和荧光素酶基因)研究中发现,GUS 基因同在大豆叶片中得到大量的瞬间表达,而在根中几乎检测不到。推测这是由于根中的外源 DNA 被 DNase 降解之故。

2.4 外源基因在 T₀ 代植株基因组中的整合

将来自 G9 转化系统中的抗性植株随机地选取 12 株植株提出基因组 DNA,对 12 株植株进行了 PCR 扩增分析,有 4 株抗性植株 DNA 都扩增到与质粒扩增产物相同的片段,而对照植株 DNA 没有扩增出上述片段(图片 PCR 分析)。由此看出,Bar-nase 基因已转化到被检测抗性植株中。幼胚转化的抗性植株通过 PCR 扩增重复三次获得阳性反应的(占 33%)[图片 5]。



1. 体细胞胚诱导 Embryo genesis stage
2. 存活的胚性愈伤 Viability embryos
3. 存活的子叶胚增殖状态 Viability cotyledonary stage
4. 移栽成活的转基因植株 Transgenic plant transformed in the pot
5. Lane 1= DNA marker Lane 2, 3, 5, 6, 7= PCR- Product of transgenic plant Lane 4= non- transgenic plant
6. 转基因植株中花粉粒为不育 Male sterile pollen grain of transgenic plant

2.5 转基因植株生物学特性表达

对获得移栽成活的转基因植株进行编号,每株分二次取花药统计花粉育性。来自 4[#]株的花粉育性结果,不育率达 93—98%[图片 6] 8[#]不育率在 10—14.8%; 1[#]株大部分花粉粒经 I—IK 染色着色浅,4[#]株进行人工授粉,杂交结实,得 2 粒种子,

8[#]、1[#]株自交未结实,未能保留后代。

转基因不育植株的 Southern 杂交检测及 T₁ 代生物学特性观察正在进行之中,涉及到的相关试验及数据将另文发表。

3 结论

本文通过对农杆菌介导大豆雄性不育基因转化技术的研究,论述了大豆遗传转化中几种因素的影响。影响农杆菌介导的因素很多,也很复杂。①基因型的因素,GUS瞬时表达上明显看出,同一培养条件下,有的基因型GUS阳性反应很弱(吉林20、吉林31),其它5个基因型阳性反应较强,PCR分析得到阳性结果。②选择合适的靶组织是实现转化成功的最基本条件之一。本实验表明,大豆体胚发生再生系统是理想的转化系统,该系统诱导胚状体的发生多数来源于单细胞起源,转基因植株嵌合体少,胚的结构完整(根、茎、叶),成苗快,数量多,重复性好,转化功能细胞多,即处于转化感受态的细胞数量多,有利于转基因植株的移栽及后代遗传稳定性分析。子叶节器官发生再生系统,供体材料取之便利,来源广泛,不定芽发生再生频率较高,但转化后的不定芽一般嵌合体高,即便在选择介质较高筛选培养基中,仍会出现部分非转化体。研究者要针对不同的靶组织设计合适的选择介质浓度。③关于Kan浓度的选择问题,我们认为,采用大豆幼胚再生系统进行转化,Kan最佳浓度在25—50mg/L。④

不同外植体类型和发育时期在农杆菌介导转化时,表现了不同的表达水平。簇状细胞团的瞬时表达及稳定表明高于较老的外植体(子叶胚状体)。该细胞团是在继代培养的第4天进行农杆菌侵染的。可能是再生细胞部位与转化感受态细胞部位比较一致。GUS酶活性显著增加。

参 考 文 献

- 1 Harold N. Trick, Randy D. Dinkins, Eliane R. Santarem et al., Recent advances in soybean transformation[J]. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 1997, Vol. 3 No. 1, 9—26
- 2 Mariani C., De Beuckeleer M, Truettner J et al., Induction of male sterility in plant by a chimaeric ribonuclease gene[J]. Nature, 1990, 347: 737—741
- 3 Mariani C, Gossele V, Beuckeleer M, et al., A chimaeric ribonuclease inhibitor gene restores fertility to male sterile plants[J]. Nature, 1992, 357: 384—387
- 4 刘艳芝, 赵桂兰, 刘莉, 等. 大豆幼胚子叶诱导胚胎发生[J]. 吉林农业科学, 1999, 24(6): 16—18
- 5 刘艳芝, 庄炳昌, 赵桂兰. 大豆子叶节组培耐盐突变体筛选[J]. 吉林农业科学, 1998, 4: 38—3
- 6 刘莉, 赵桂兰. 大豆子叶节组织培养再生研究[J]. 吉林农业科学, 1999, 24(5): 16—19
- 7 Jefferson, R A., 1987, Assaying Chimeric genes in plants the gus fusion system[R]. Plant Mol. Biol. Rep. 5: 389—405

STUDY ON FACTORS INFLUENCING AGROBACTERIUM—MEDIATED SOYBEAN TRANSFORMATION

Zhao Guilan Liu Yanzhi Li Junbo Xu Hongzhi Liu Li Yin Aiping

(Biotechnology Laboratory, Jilin Academy of Agricultural Science, Gongzhuling 136100)

Abstract Npt—II and Barnase gene was introduced into soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) immature cotyledonous and cotyledon nodes by gene transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*.

Kanamycin resistant (km^R) plantlets were obtained by 3—4 cycles screening in selective condition. The presence of barnase gene in the transgenic plants were confirmed by PCR. Results of PCR analysis proved that T—DNA was integrated into the genome of soybean. Alterant plants positive for barnase gene, the pollen grains in complete male sterile were 98%. Factors influencing agrobacterium—mediated soybean transformation were investigated.

Key words Soybean; *Agrobacterium*—mediated; Barnase gene; Transformation