

向大豆导入深黄被孢霉 Δ^6 —脂肪酸脱氢酶基因的初步研究^{*}

卜云萍 李明春 胡国武 王广科 邢来君^{**}

(南开大学微生物系, 天津 300071)

摘要 通过农杆菌介导法, 将深黄被孢霉 Δ^6 —脂肪酸脱氢酶基因导入到栽培大豆吉育 43、黑农 36、黑农 37 等品种。采用多种外植体和感染方法, 从子叶节和胚轴诱导出丛生芽与再生植株。经过在含 50mg/L 卡那霉素的筛选培养基中连续筛选, 获得一批转基因植株。经 PCR 检测和 DNA 分子杂交分析, 初步证明外源基因已导入并整合到大豆基因组中。

关键词 大豆; Δ^6 —脂肪酸脱氢酶基因; 农杆菌介导法; 转基因植株

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2003)01-0011-06

外源基因导入大豆, 首例报道见于 1984 年^[1,2]。而转基因大豆植株诞生于 1988 年, 由 Monsanto 公司和 Agracetus 公司同时报道^[3,4], 这是遗传工程技术应用于大豆改良上的一个里程碑。前者用农杆菌介导, 后者用基因枪法。迄今为止, 已经从 30 多个品种上得到几百株转基因植物, 其中, 抗除草剂的转基因大豆已进入大规模的田间应用。在大豆脂肪酸成分改造方面也取得了较大的研究进展, 杜邦公司于 1997 年获美国食品药品监督管理局(FDA)批准, 推广高油酸(70%)转基因大豆; 此外, 低亚麻酸(2%)大豆, 低棕榈酸(4%)大豆, 高硬脂酸(28%)大豆, 高棕榈酸(27%)大豆等转基因品种也已在美国培育成功^[5]。

深黄被孢霉(*Mortierella isabellina*)是一株可以产生多烯不饱和脂肪酸的低等真菌, 它可以产生 γ —亚麻酸(γ —Linolenic Acid, GLA)。GLA 是一种十八碳三烯全顺式不饱和脂肪酸, 在碳链的第 6, 9, 12 位各有一个双键。它作为人体必需的不饱和脂肪酸, 对人体的激素调节及脂肪代谢发挥着重要的生理作用, 尤其在心血管疾病、糖尿病以及癌症方面的医疗价值而成为学术界研究的热点^[6,7]。 Δ^6 —脂肪酸脱氢酶(Δ^6 —fatty acid desaturase, D6D)是 γ —亚麻酸生物合成的关键酶, 它以亚油酸为底物, 在

C6 和 C7 位之间脱氢形成 γ —亚麻酸, 然后通过 C 链延长和脱氢作用进一步形成花生四烯酸, 前列腺素类和白三烯类生物活性物质^[8]。

本实验室经过多年研究, 从高产 γ —亚麻酸的深黄被孢霉菌株中分离克隆出 Δ^6 —脂肪酸脱氢酶的结构基因^[9](GenBank 号为 AF306634), 并在酵母和烟草中得到表达^[10]。这为将该基因转化到大豆中, 提供了前提和基础。大豆是我国重要的粮油作物之一, 富含亚油酸, 而不含 γ —亚麻酸或 γ —亚麻酸含量极低。因此, 本试验采用农杆菌介导的转化方法, 将 Δ^6 —脂肪酸脱氢酶基因转入中国东北 3 个大豆品种中, 获得了一批转化植株。这为大豆的脂肪酸基因工程研究提供了可借鉴的方法和经验。本试验仅刚刚获得初步结果, 进一步深入研究正在进行中。本实验室以期培育出富含 γ —亚麻酸的转基因大豆, 分析该基因在转基因大豆中的表达情况, 从而改善大豆脂肪酸的组成。这对大豆品质的改良和脂肪酸脱氢酶调控机制等方面的研究将具有更为重要而深远的意义。

1 材料和方法

^{*} 收稿日期: 2002-02-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(30200176)和天津市自然科学基金重点项目(013802511)

^{**} 通讯作者: xinglaij@eyou.com

作者简介: 卜云萍(1971—), 女, 博士研究生, 从事分子真菌学及转基因植物工作。

1.1 材料

1.1.1 大豆品种

实验采用吉育 43, 黑农 36, 黑农 37 等三个优良品种。种子由吉林省农科院大豆研究所提供。

1.1.2 菌种和质粒

根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404, 质粒 pBI121, pBI221 由中国科学院微生物研究所方荣祥先生馈赠。含深黄被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的 pTMICL-6 质粒, 由南开大学真菌实验室保存。

1.1.3 培养基

LB 培养基见文献 10, MS 培养基见文献 11。

1.1.4 生化试剂

各种限制性内切酶购自华美生物工程公司。PCR 用 Taq 酶, dNTP 为上海 Sangon 公司产品。寡核苷酸引物由上海 Sangon 公司合成。“DIG DNA Labeling and Detection Kit”购自 Roche 公司。培养基所

需的各种氨基酸、抗生素及常规试剂均为国产试剂。

1.2 方法

1.2.1 植物表达载体的构建

从质粒 pTMICL-6 上 PCR 获得 5' 端带 Xba I 位点, 3' 端带 Sac I 位点的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因, 用 Xba I 和 Sac I (Sst I 同裂酶) 酶切, 将 PCR 产物中的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因片段替换 GUS 基因而克隆进 pBI221 质粒中。形成新的质粒 pBI221-D6DMI, 使该基因处于 CaMV35S 启动子的控制下, 然后通过 Hind III 和 EcoR I 限制位点将含有 CaMV35S 启动子的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的 DNA 片段克隆进另外一个含有卡那霉素选择性标记的载体 pBI121 质粒中, 构建出含 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的质粒 pBI121-D6DMI (图 1)。通过电转化技术, 将该表达体质粒引入根癌农杆菌 LBA4404 中, 以此菌对植物进行转化试验。

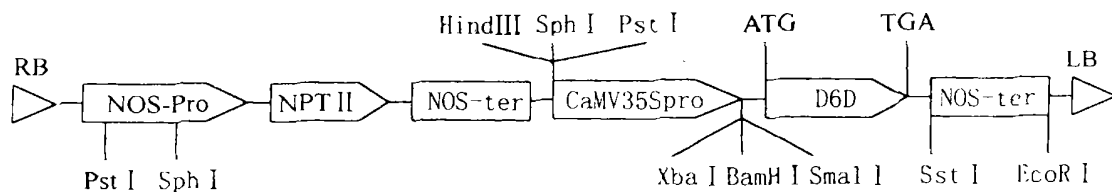


图 1 二元载体 pBI121 及嵌合 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因表达载体的结构

Fig. 1 The structure of binary vectors for pBI121 and D6D

1.2.2 农杆菌的培养及制备

从 4 °C 保存的平板上挑取含有表达载体的农杆菌单菌落接入含有 50mg/L Kan, 25mg/L Rif, 25mg/L Str 的 YEP 培养基, 28 °C, 160 r/min 振荡培养 18—20 h 左右至对数期, 然后用 MS 液体培养基将菌液稀释 5—10 倍, 作为农杆菌转化的工程菌液。

1.2.3 无菌苗的培养

挑取无病斑、种皮完好的大豆种子, 经清水浸泡过夜后, 70% 乙醇消毒 1min, 10%—15% 次氯酸钠消毒 15min, 无菌水冲洗 3—4 次, 去种皮, 置于 1/2 MS 固体培养基, 25 °C—30 °C 培养, 几天后获得无菌苗。

1.2.4 农杆菌介导的大豆遗传转化

直接诱导再生植株和愈伤组织的诱导, 所用各种添加不同生长激素的 MS 培养基, 按文献 12, 13, 14, 配制。

切取无菌苗的子叶、子叶节、胚轴、真叶, 分别采用多点注射和浸泡的方法感染。接种于相应的 MS 培养基中, 共培养 2—3 d, 转入含有 50mg/L Kan 和

500mg/L Cb 的培养基中, 二周继代一次, 等丛生芽长到 2cm 时, 切下转入诱导生根培养基, 待生根后转入花盆中。

1.2.5 卡那霉素对大豆选择压力的试验

本实验所用的表达载体 pBI121 上的植物筛选标记基因为卡那霉素抗性基因, 配制浓度分别为 0mg/L, 5mg/L, 25mg/L, 50mg/L, 75mg/L, 100mg/L 的卡那霉素, 进行大豆愈伤组织生长和分化再生芽的选择压力试验。接种生长发育基本一致的胚性愈伤 10 个/皿 (设 5 个重复), 在加有不同浓度 Kan 的分化培养基上连续培养四周。接种分化再生芽 3 个/瓶 (设 10 个重复), 在加有不同浓度 Kan 的分化培养基上连续培养四周。25 °C—30 °C 培养, 12 h 光照培养, 观察愈伤生长和分化再生芽的变化情况。

1.2.6 转基因大豆的分子生物学检测

1.2.6.1 转基因大豆的 PCR 检测

取卡那霉素筛选过的抗性愈伤和再生植株, 用 CTAB 法 (15) 提取总 DNA, 用于 PCR 技术扩增 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶的基因。

两个引物序列是 5' — GGCTTCTAGAAATG-GCTGCTGCTCCCACT-3' 和 5'-CTGCGAGCTCT-TACTGCGCTTACC-3'。PCR 反应条件是: 95℃变性 5min, 然后在 94℃变性 1min, 53℃退火 1min, 72℃延伸 2min 的条件下进行 35 个循环, 最后 72℃再延伸 10min。

1. 2. 6. 2 转基因大豆的 Southern 检测

大量提取 PCR 反应阳性大豆转基因苗的总 DNA, Hind II充分酶切后, 经过电泳、转膜等步骤, 与地高辛标记的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶的基因探针杂交, 具体试验步骤见试剂盒使用说明书。

2 结果与分析

2.1 质粒 DNA 的检测

从根癌农杆菌提取质粒 pBI121-D6DMI, Hind III单酶切后, 经琼脂糖电泳, 紫外灯下检测可见到 12.6kb 泳带(含 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的 pBI121 质粒为 12.6kb)。说明质粒存在于根癌农杆菌中。对重组质粒进行 PCR 及 XbaI 和 SacI 双酶切鉴定, 可见一条约 1.4kb 的电泳带(Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因约为 1.4kb)。说明目的基因存在。结果见图版 1。

2.2 卡那霉素对大豆选择压力的试验

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和分化再生芽的抑制试验见图 2。

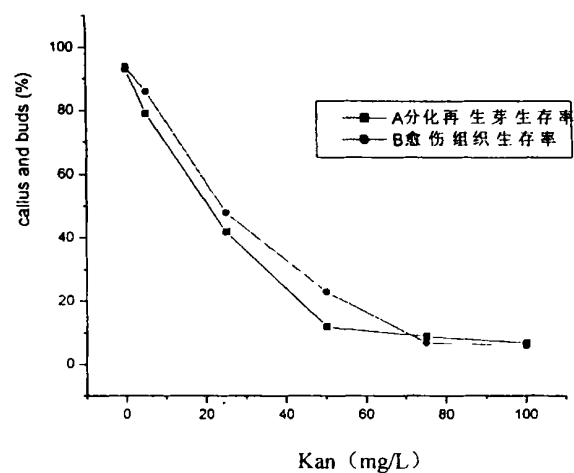


图 2 卡那霉素对大豆愈伤组织和分化再生芽的敏感性试验
Fig 2 Kanamycine sensitivity tests on callus and buds of soybean

上述试验表明 25—50mg/L 的 Kan 浓度对大豆胚性愈伤组织和分化再生芽均达到 50% 的抑制作用, 特别是在 Kan 浓度为 50mg/L 时, 再生芽的生存率低于 15%。所以, 本转化研究中, 开始所用的 Kan 筛选浓度为 50mg/L, 待再生芽长至 2cm 高时, 在生根培养基中则将 Kan 浓度降低为 25mg/L 或完全去除 Kan。

2.3 农杆菌介导的大豆遗传转化

2.3.1 直接诱导丛生芽和再生植株

对不同的外植体(子叶, 子叶节, 胚轴, 真叶), 分别采用多点注射工程菌和在菌液中浸泡的方法转化, 培养二周后, 在创口处长出丛生芽, 丛生芽逐渐长大形成再生植株(图版 2.3)。由于大豆基因型、取材部位的不同, 出芽率和转化率有差异(见表 1)。

表 1 不同大豆品种和不同外植体对诱导丛生芽的影响

Table 1 The affection of adventitious bud on soybean genotype and explant

品种 Cultivars	外植体 Explant	接种数 Infection number	出芽数 Number of adventitious bud	出芽率 Rate of adventitious bud	卡那抗性 Kan resistance	转化率 Rate of transformation
吉育 43 Jiyu 43	子叶	86	0	0	0	0
	子叶节	84	179	213	15	17.9
	胚轴	86	162	188	11	12.8
	真叶	86	0	0	0	0
黑农 36 Heinong 36	子叶	20	0	0	0	0
	子叶节	20	38	190	2	10.0
	胚轴	19	31	163	1	5.3
	真叶	20	0	0	0	0
黑农 37 Heinong 37	子叶	119	0	0	0	0
	子叶节	120	230	192	16	13.3
	胚轴	120	207	173	9	7.5
	真叶	120	0	0	0	0

从表 1 可以看出, 子叶节易于诱导丛生芽, 丛生芽数目最高达 7 个之多, 胚轴也易于诱导丛生芽, 但子叶和真叶分化生芽困难。从子叶节和胚轴诱导出丛生芽的时间大致相似, 丛生芽的数目前者高于后

者, 后者再生植株多细小。从表 1 中还可以看出, 不同基因型的大豆诱导丛生芽数差异明显, 吉育 43 出芽率较高。试验中发现, 诱导大豆丛生芽生根是比较困难的, 这与文献 10, 11 报道的一致。

表 2 不同大豆品种和不同外植体对愈伤组织分化的影响

Table 2 The affeccion of difference genotype and explant on differentiation of callus

品种 Cultivars	外植体 Explant	接种数 Infection number	始愈期 Day of first callus	出愈数 Number of callus	出愈伤率(%) Rate of callus	愈伤组织分化数		
						Number of differentiation of callus		
						芽 Bud	根 Root	苗 Seedling
吉育 43 Jiyu 43	子叶	50	10	50	100	2	3	0
	子叶节	50	11	46	92	2	1	0
	胚轴	50	8	49	98	1	1	0
	真叶	50	7	50	100	2	0	0
黑农 36 Heinong 36	子叶	50	11	50	100	1	2	0
	子叶节	50	10	47	94	0	1	0
	胚轴	50	9	50	100	3	0	0
	真叶	50	7	50	100	0	1	0
黑农 37 Heinong 37	子叶	50	10	50	100	0	3	0
	子叶节	50	11	49	98	2	2	0
	胚轴	50	8	50	100	2	1	0
	真叶	50	9	50	100	1	0	0

2.3.2 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略有差异(见表 2)。从表 2 中看出, 愈伤组织在诱导培养基上很少分化。因此转基因大豆通过愈伤组织分化再生植株的成功率极低。

2.4 转基因大豆的分子生物学检测分析

2.4.1 转基因大豆的PCR 检测分析

利用 CTAB 法提取大豆转化再生苗叶片中的总 DNA, 以材料和方法中的 PCR 反应条件进行扩增、电泳。结果: 在吉育 43、黑农 36、黑农 37 共 627 棵再生植株中, 有 17 棵吉育 43 和 14 棵黑农 37, 共 31 棵, 扩增出了约 1.4kb 的目的带, 而未转化的对照则无此目的带(图版 4)。PCR 阳性率为 4.9 %。

2.4.2 转基因大豆的Southern 杂交检测

大量提取以上 PCR 检测阳性的转基因植株总 DNA, 与 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因探针进行斑点杂交检测, 结果 PCR 表现阳性的样品, 在斑点杂交中均表现为阳性, 杂交斑点清晰(图版 5)。用 Hind II 充分酶切后, 进行 Southern 吸印和分子杂交, 结果正对照和转基因植株显示特征带, 负对照未转化植株则没有带(图版 6)。因 Hind II 仅在 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因以外的质粒上有一个酶切位点, 因此, 图中的条带数应是整合位置数。从图版 6 中可以看出, 吉育 43 的转基因植株有一个整合位点, 黑农 37 有两个整合位点。

上述检测均证明: 深黄被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因已整合到大豆基因组中, 获得转基因的大豆再生植株。

3 讨论

3.1 关于再生途径的问题

大豆组织培养再生植株有两条不同的途径, 即器官发生再生途径和体细胞胚胎发育途径。器官发生途径是由于子叶节、胚轴部位有分生组织或幼芽的原始细胞, 经带有 T-DNA (TR-DNA 含有激素基因) 的转化子菌液感染, 可诱导分生组织或幼芽原始细胞分化产生丛生芽(子叶节、胚轴易形成丛生芽的可能机制)。通过对丛生芽的抗性筛选易于获得再生植株。但是由于这些丛生芽并不是全部由转化细胞分化而来, 因此再生植株多为嵌合体, 即便在选择介质较高的筛选培养基中, 仍会出现部分非转化体, 所以必须进行严格的筛选。设计卡那霉素选择压力试验目的在于确定适当的 Kan 浓度, 抑制非转化细胞的生长, 对丛生芽保持选择压力。

另一条途径即体细胞胚胎发育途径, 需经过胚性愈伤阶段, 虽然大豆外植体在含有激素的培养基上, 易于形成愈伤组织(见表 2), 但愈伤组织诱导分化较困难, 成苗率较低, 重复性差。这方面仍需做大量的基础研究工作。所以, 在供体材料取之便利, 来源广泛的前提下, 从子叶节和胚轴直接诱导丛生芽, 是简便、快捷、有效的。而无大量外植体来源时, 通过愈伤组织诱导和分化, 再生植株, 也是可取的。

3.2 关于抗性再生苗生根难的问题

发达的根系对于大豆植株的生长发育至关重

要, 但本试验初期, 很多再生苗转入诱导生根的培养基后, 不生根, 不抽茎长高, 只是叶片生长, 基部膨大、褐化, 叶片生长一段时间后发黄、脱落。或者生根缓慢, 根比较短, 少有侧根。这可能与转化苗极难生根有关。因此我们采用以下方法加以解决: (1) 在将再生苗转入生根培养基之前, 先将其基部切去, 再放入不含卡那霉素的生根培养基中培养。(2) 再生苗在生根培养基中长出主根后, 转入蛭石中。由于蛭石良好的透气性, 有利于主根的生长和大量侧根的形成。(3) 光照强度、光照时间、湿度和温度的控制也是十分必要的。

3.3 关于影响或限制农杆菌介导大豆遗传转化效率的问题

利用农杆菌介导转化, 技术简单易掌握, 不需要大型仪器设备, 转化周期短, 易获得再生植株, 拷贝数少, 因而被广泛应用于各种植物的遗传转化中。但利用农杆菌转化大豆的转化频率较低, 如何提高其转化的效率, 是值得探讨的问题, 影响农杆菌转化大豆的因素有多种:

3.3.1 大豆基因型: 王连铮等^[17]用致瘤农杆菌的 15 个菌株对 1553 个大豆品种的致瘤作用进行研究表明, 不同大豆基因型的易感性差异很大。Owens 和 Cress^[18]通过对 24 个栽培品种和 3 个野生大豆材料进行活体转化研究, 筛选出 3 个栽培品种及 1 个野生材料对土壤农杆菌 A398 (pTiA6) 高度易感。李洪泉等^[19]用根癌农杆菌 chry5 对我国 10 个大豆栽培品种子叶的致瘤作用进行了研究, 结果对 7 个品种的致瘤率略高于超毒菌株 A281, 对所有品种的致瘤率高于 T37。Hinchee 等^[20], 吕慧能等^[21]也有关于农杆菌感染转化频率与受体基因型有关的实验证明。本试验用东北 3 个品种, 取子叶、子叶节、胚轴和真叶等 4 种外植体, 感染外植体数达 8000 以上, 证明大豆不同基因型之间有差异 (见表 1), 其中吉育 43 较黑农 36、黑农 37 易感染农杆菌, 且转化率较高。

3.3.2 农杆菌菌株和 Ti 质粒: Byrne 等^[22]用最易感品种 Peking 为材料对 11 个菌株的转化能力进行了研究, 发现不同菌株转化能力有差异, 认为差异主要是 Ti 质粒造成的。Owens 等^[21]也做过相关实验, 证实: 不同农杆菌菌株之间其转化能力存在很大差异。本试验采用根癌农杆菌 LBA 4404, 该菌株广泛应用于大豆的遗传转化中。

3.3.3 外植体及其发育状态: 选择合适的靶组织是实现转化成功的最基本、也是最重要的条件之一。本实验发现不同外植体对农杆菌感染能力有差异

(见表 1), 以子叶节和胚轴为靶组织直接诱导的途径, 转化率较高, 成苗快、数量多、重复性好。但是, 同样是直接诱导途径, 以子叶和真叶为靶组织, 则无丛生芽产生。然而从不同外植体来源的愈伤组织诱导出芽率基本一致 (见表 2), 可见从愈伤诱导分化丛生芽无靶组织的差异, 这与愈伤组织是一些分化的细胞有关。试验还发现, 幼嫩组织比老的组织易转化, 无菌苗萌发 3—5 天为转化的最佳时间。

3.3.4 酚类化合物对农杆菌转化能力有明显影响: 本试验中, 加入乙酰丁香酮等酚类化合物对农杆菌转化能力有明显的提高 (有关数据未发表), 可能是这类物质能诱导 Vir 区基因活化, 增加农杆菌在植物细胞上的附着, 从而促进根癌农杆菌对外植体的高效转化。

3.3.5 感染方法和共培养过程: 本试验采用多点注射和浸泡的方法感染外植体, 都取得了较好的转化效果。感染时人为划伤痕的转化效果优于未造成伤口的转化效果, 感染 15—20min 后, 进行共培养。共培养时间以 2—3 天为宜, 时间过长外植体易黄化或褐化, 时间过短降低转化率。此外, 共培养时, 培养基上铺上一层灭菌滤纸, 可以减少暗培养过程中的污染, 提高转化频率。

参 考 文 献

- 1 Horsch, R B, Fraley R T, Rogers S G, et al. Inheritance of functional foreign genes in plants [J]. Science, 1984, 223: 496—498.
- 2 Hinchee, M A W, Connor—Ward D V, Newell C A et al. Production of transgenic soybean plants using Agrobacterium—mediated DNA transfer [J]. Bio/technology, 1988, 6: 915—922.
- 3 McCabe D E, Swain W F, Martinell B J et al. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration [J]. Bio/technology, 1988, 6: 923—926.
- 4 韩天富. 转基因大豆及其安全管理办法 [J]. 粮食与油脂, 2001, 2: 10.
- 5 Tsunehiro A, Yayoi S, Katsuya I et al. Molecular cloning and functional characterization of rat Δ^6 -fatty acid desaturase [J]. Biochemical and Biophysical Research Communication, 1999, 255: 575—579.
- 6 Shankin J, Whittle E, Fox B G. Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane—associated iron enzyme, stearyl—CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase [J]. Biochemistry, 1994, 33: 12787—12794.
- 7 Deborah S K, Jennifer M T, Huang Y S et al. Identification of Δ^5 -desaturase from *Mortierella alpina* by heterologous expression in baker's yeast and canola [J]. J Biol Chem, 1998, 273(45): 29360—29366.
- 8 李明春, 刘莉, 张丽, 等. 深黄被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的克隆及序列分析 [J]. 菌物系统, 2001, 20(1): 44—50.
- 9 刘莉, 李明春, 胡国武, 等. 深黄被孢霉 M6—22 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶

- 基因在酿酒酵母中的表达[J]. 微生物学报, 2001, 41(4): 397—401.
- 10 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning, 2nd ed[M]. Beijing: Science Press, 1993 pp463—468.
- 11 Mtushige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. Physiol Plant, 1962, 21: 473—479.
- 12 徐香玲, 邹联沛, 刘伟华, 等. 向大豆导入几丁质酶基因的初步研究[J]. 大豆科学, 1999, 18(2): 101—108.
- 13 徐香玲, 高晶, 刘伟华, 等. 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[J]. 大豆科学, 1997, 16(1): 6—11.
- 14 赵桂兰, 刘艳芝, 李俊波, 等. 影响农杆菌介导的大豆基因转化因素的研究[J]. 大豆科学, 2001, 20(2): 84—88.
- 15 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣主编. 植物遗传转化技术手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994
16. 王连铮, 尹光初, 罗教芬, 等. 大豆致瘤及基因转移研究[J]. 中国科学B辑, 1984 137—141
- 17 Owens L D., Cress D E. Genotypic variability of soybean response to *Agrobacterium tumefaciens* strains harboring Ti or Ri plasmids[J]. Plant Physiology, 1985, 77: 87—94.
- 18 李洪泉, 李红卫, 王茜, 等. 根癌农杆菌 chry5 对我国栽培大豆子叶致瘤作用的研究[J]. 大豆科学, 1994 13(2): 112—116.
- 19 吕慧能, 盖钧镒, 马育华, 等. 农杆菌介导的大豆子叶节基因导入和再生植株[J]. 大豆科学, 1993 12(4): 330—334.
- 20 Byrne M C, McDonnell R E, Wright M S, et al. Strain and cultivar specificity in the *Agrobacterium* soybean interaction[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1987, 8(1): 3—15.
- 21 Owens L. D. and Smigocki A. C. Transformation of soybean cells using mixed strains of *Agrobacterium tumefaciens* and phenolic compounds[J]. Plant Physiology, 1988, 88: 570—573.

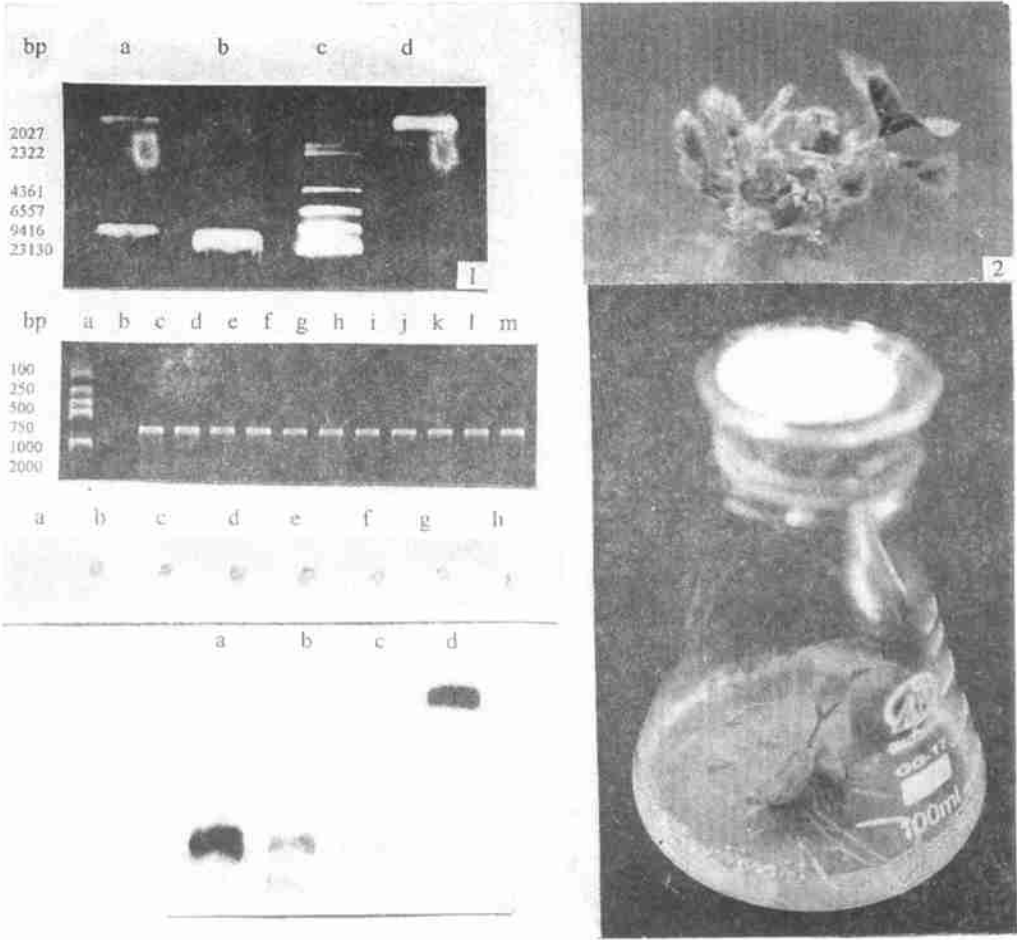
A PRELIMINARY STUDY ON TRANSFERRING Δ^6 -FATTY ACID DESATURASE GENE FROM *MORTIERALLA ISABELLINA* INTO SOYBEANS

Bu Yunping Li Mingchun Hu Guowu Wang Guangke Xing Laijun

(Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract The Δ^6 -fatty acid desaturase gene from *Mortitieralla isabellina* was transferred into cultivars Jiyu 43, Heinong 36, Heinong 37, et al. via *Agrobacterium* infection by inducing with various explant methods. Adventitious buds and regeneration plant were induced from cotyledon node, hypocotyl. Kanamycin resistant (Kmr) plantlets were obtained by 3—4 cycles screening in selective condition. PCR and Southern blot analysis from the transferred gene plants proved that foreign gene were transferred and integrated into soybean genome.

Key word Soybean; Δ^6 -fatty acid desaturase gene; *Agrobacterium* infection; Transferred gene plant



图版说明:

- 1 重组质粒 pBI121-D6DMI 的酶切和 PCR 鉴定结果 a. pBI121-D6DMI/XbaI + SacI ; b. pBI121-D6DMI/ Hind III; c. marker (λDNA/Hind III); d. pBI121-D6DMI PCR
- 2 诱导丛生芽
- 3 抗性再生植株
- 4 PCR 检测 a. marker b. 未转化植株阴性对照 c. 质粒阳性对照 d-h. 吉育 43 转化植株 i-m. 黑农 37 转化植株
- 5 DNA 斑点杂交 a. 阴性对照 b. 阳性对照 c, d. 吉育 43 转化植株 e, f. 黑农 37 转化植株
- 6 Southern 杂交 a. 吉育 43 转化植株 b. 黑农 37 转化植株 c. 阴性对照 d. 阳性对照

Explanation of plate

- 1 The result of restriction and PCR identification of recombinant plasmid pBI121-D6DMI; a. pBI121-D6DMI/XbaI + SacI b. pBI121-D6DMI/Hind III c. marker(λDNA/Hind III) d. pBI121-D6DMI PCR
- 2 The adventive bud
- 3 The Kanamycin-resistant regeneration plant
- 4 PCR Detecting; a. marker b. positive ck c. negative ck d-h. transferred plant of Jiayu 43 i-m. transferred plant of Hei'ong 37
- 5 DNA dot hybridization; a. negative ck b. positive ck c, d. transferred plant of Jiayu 43 e, f. transferred plant of Hei'ong 37
- 6 Southern hybridization; a. transferred plant of Jiayu 43 b. transferred plant of Hei'ong 37 c. negative ck d. positive ck