

脯氨酸、硝酸银对农杆菌转化大豆的影响^{*}

刘金华¹ 王丕武² 武丽敏² 于彦春² 张 君² 郝文媛² 姚 丹²

(1. 吉林出入境检验检疫局技术中心 长春 130062; 2. 吉林农业大学生物技术中心 长春 130118)

摘要 农杆菌介导的遗传转化技术是植物遗传转化中广泛采用的一种技术。如何提高转化率是植物遗传转化中的一个关键问题。已发现有许多物质能够促进农杆菌介导的遗传转化,如乙酰 香酮(AS)等许多酚类化合物都有助于农杆菌T-DNA的转移从而提高转化率。本实验在农杆菌转化大豆的过程中辅加化合物脯氨酸、硝酸银,通过对GUS基因表达的分析,结果表明这两种化合物均能明显地提高大豆的转化率,其中2mg/L浓度的脯氨酸及2mg/L的AgNO₃具有最佳效果,较适合用于大豆的转化。

关键词 大豆; 农杆菌; 遗传转化; 脯氨酸; 硝酸银

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2003)01-0036-04

农杆菌介导的遗传转化方法,是植物遗传转化中一种重要的方法。与其它转化方法相比,农杆菌介导法有其独特的优点,它能使被转化的外源基因稳定地整合到植物基因组中,可以转移较大片段的DNA且插入拷贝数较低,不易导致外源基因的失活。

在利用农杆菌介导的转化过程中,有许多因素都对其转化效率和外源基因的表达有影响,如农杆菌菌株、受体基因型、侵染过程、受体状态、转化条件、及对转化植株的筛选程序等;有许多化合物可以诱导农杆菌vir基因的活化,如乙酰丁香酮(AS)、羟基乙酰丁香酮、儿茶酚等许多酚类化合物,可以提高农杆菌的转化率^[1],此外低pH值的培养基、半乳糖、葡萄糖、低磷酸盐、合适的碳源等也有助于T-DNA的转移从而提高转化率。本文以吉林地区生产上常用的两个大豆品种为受体材料研究了脯氨酸、硝酸银两种化合物对农杆菌介导法转化大豆的影响。

1 材料与方法

1.1 供试材料

大豆品种: 通农13、吉农DG3256。

外植体: 用萌动的大豆种子的子叶节作为农杆菌转化的受体材料。

农杆菌菌株: 根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株EHA101; 质粒为pBI121.1, 含有筛选基因NPT II基因及报告基因GUS基因。

1.2 培养基

预培养培养基: MSB基本培养基(MS^[2]基本培养基, 改加B₅^[3]培养基有机成分)+2.5mg/L6-BA+0.2mg/LIBA

共培养培养基: MSB基本培养基+100μmol/LAS+2mg/L6-BA+0.2mg/LIBA

筛选培养基: MSB基本培养基+2mg/L6-BA+0.2mg/LIBA+100mg/LKm+250mg/LCef+100mg/LCarb

注: 以上培养基均含30%蔗糖和8%琼脂, pH值调到5.8。

1.3 农杆菌菌液制备

从新鲜平板中挑取农杆菌EHA101单菌落, 接种于含50mg/LKm的YEB液体培养基中, 28℃, 200r/min振荡培养至对数生长期(OD₆₀₀=0.7左右)。菌液在4000mp、4℃下离心10分钟收集菌体, 再将农杆菌重悬于YEB液体培养基中, 使其菌液浓度达到OD₆₀₀=0.5左右备用。重悬浮培养基中附加

* 收稿日期: 2002-10-28

基金项目: “国家转基因植物中试与产业化基地建设”专项基金资助项目(J99-13-001)

作者简介: 刘金华(1975-), 男, 硕士研究生, 主要从事大豆遗传转化及基因检测工作。

100umol /LAS(乙酰丁香酮)。

1.4 大豆子叶节的转化

1.4.1 大豆子叶节的制备

挑选无病、饱满、无破损的大豆种子进行消毒：将大豆种子盛于一培养皿中，不加上盖，放入一大的玻璃培养皿中。取 NaClO 15 mL、浓 HCl 5mL 于玻璃培养皿中混合，使产生氯气，迅速盖好玻璃培养皿的上盖，熏蒸消毒过夜。将消毒后的种子置于萌发培养基上进行大豆种子萌发。

取萌发培养 3 天的大豆萌动种子，制备子叶节外植体：剥去种皮，用解剖刀沿种子中线纵向切开，使 2 片子叶分开，并切去子叶的 1/3，再去掉下胚轴及顶芽。用解剖刀在子叶与胚轴交接处浅划 3—5 刀制造创伤，然后将其近轴面向下置于预培养培养基上进行预培养。

1.4.2 大豆子叶节的侵染

3 天后取大豆子叶节外植体，放入重悬后的菌液中浸泡 20min—30min，期间每隔 5min 摇动一次。倒掉菌液，将外植体放入铺有无菌滤纸的培养皿中，吸干多余菌液，然后将外植体近轴面向下置于共培养培养基中。在 25℃—26℃、黑暗或弱光下共培养 3 天后转入筛选培养基中，于 26℃，14h 光照培养条件下进行筛选培养，每两周转接一次，，一个月后可见子叶节处有丛生芽长出。切下带有丛生芽的子叶节，进行 GUS 染色过夜，然后用酒精脱色，对呈蓝色的子叶节进行统计分析，比较不同处理对转化率的

1.5 GUS 基因的组织化学检测

转化组织的β—葡萄糖苷酸酶活性的检测基本按照 Jefferson^[4] 的方法，将子叶节浸泡于含 10mmol / LEDTA，100mmol /L 磷酸钠，0. 5mmol /L 亚铁氰化钾，0. 5mmol /L 高铁氰化钾，0. 1% (w /v) X—Gluc 的溶液中，37℃保温过夜，依次用 50%，70%，100% 的酒精脱色。

2 结果与分析

本实验借助对 GUS 基因表达情况的分析，研究了对脯氨酸、硝酸银在农杆菌介导的大豆转化中的影响作用。以每个子叶节为单位，统计呈现蓝色子叶节的个数，计算其所占的百分率，每个处理重复 3 次，算出其平均数后作图。对农杆菌转化大豆的不同处理予以比较，从而确定最佳的转化条件。

2.1 硝酸银对农杆菌介导转化大豆的影响

在遗传转化中加入 AgNO₃ 可以明显地提高转化率^[3]。DeBloeck 等报道，AgNO₃ 对遗传转化中油菜外植体再生是必需的，且在筛选培养基中应尽早加入 AgNO₃；程振东等研究表明 AgNO₃ 可以提高转化甘蓝性油菜的频率。本实验在对大豆通农 13 的转化中，在共培养培养基中加入不同浓度的 AgNO₃，发现 AgNO₃ 对提高大豆的转化率具有明显效果，不同浓度的 AgNO₃ 的转化效果见图 1，结果表明 2mg /L 的 AgNO₃ 最有利于大豆的转化，其中 GUS⁺ 率达到 68.1%。

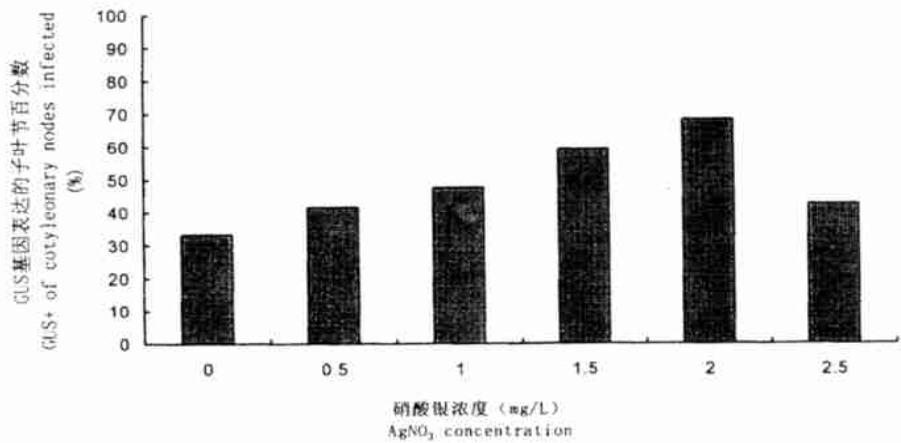


图 1 AgNO₃ 浓度对大豆转化率的影响

Fig 1 Effecting of AgNO₃ concentration on soybean transformation

2.2 脯氨酸对农杆菌介导转化大豆的影响

农杆菌的侵染能力大小与其 vir 区基因的活性

有关，有许多物质都可诱导农杆菌 vir 基因的活化，如许多酚类物质及糖类。Jame 等^[6] (1991) 在苹果叶

片转化中同时加入 AS 及渗透稳定剂甜菜碱或脯氨酸,促进了GUS 的表达。我们在转化大豆的过程中在共培养培养基中加入不同浓度的脯氨酸,观察到

一定浓度的脯氨酸对提高大豆的转化率也有帮助。图 2 表明各种浓度的脯氨酸对大豆 DG3256 转化率的影响。

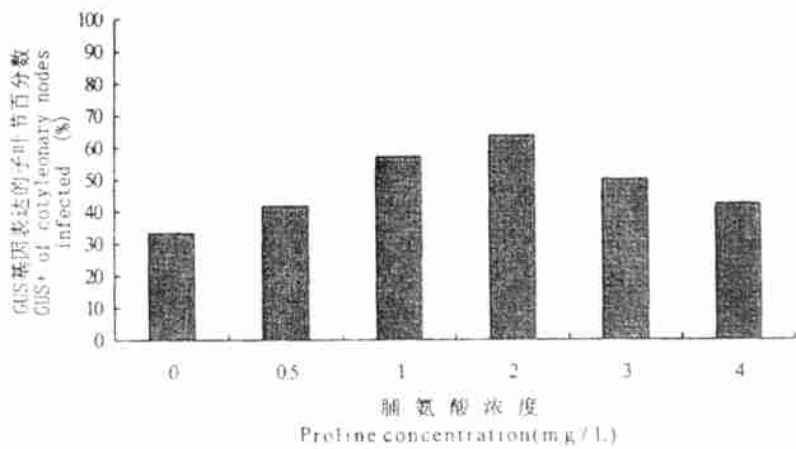


图 2 脯氨酸浓度对大豆转化率的影响

Fig 2 Effect of proline concnecration on soybean transformation

从图 2 中可以看出,当浓度在 2mg/L 时,明显地提高了 GUS 基因的表达效果,其 GUS⁺ 率为63.6%,但过高的脯氨酸浓度反而不利于 GUS 基因的表达。

3 讨论

农杆菌作为植物基因工程的载体,给将外源基因导入植物带来了极大方便,受到了广泛的应用。人们一方面力求扩大农杆菌的侵染范围另一方面也努力建立一个简便、高效的遗传转化体系。本实验中,我们以大豆子叶节为外植体,以农杆菌 EHA101 为转化菌研究了以上两种化合物对农杆菌转化效率的影响,发现在共培养培养基中加入脯氨酸、硝酸银对大豆的转化都有促进作用。本实验研究的是在用农杆菌侵染一个月后 GUS 基因的表达情况,这时外源基因已整合到植物基因组中,不同于 GUS 基因的瞬时表达,因此更具有说明意义。同时我们也继续观察了 GUS 阳性大豆植株不同生长时期 GUS 基因的表达情况,发现 GUS 基因在大豆的不同生长时期均有表达,表明 GUS 基因已稳定整合到了大豆基因组中。

实验中也发现有许多小芽经 GUS 染色呈蓝色但大多较为细小,不易伸长,长成正常的植株较为困难,只有为数不多丛生芽,能正常生长、开花结实。在染色呈蓝色的叶片中,蓝色的深浅不同,有的整个叶片均呈蓝色,而有的叶片仅在叶脉呈现蓝色,这可能是 GUS 基因的表达强度不同。

我们仅对脯氨酸、硝酸银单独作用进行了研究,对于二者共同使用是否具有加性效应及硝酸银、脯氨酸的作用是否存在基因型的不同而存在差异还有待继续研究。对于其作用机理目前还不太清楚,现在大多倾向于认为硝酸银促进了芽的分化,使转化植株的再生频率提高从而提高了转化率,我们在实验中也发现了这一情况:经硝酸银处理后的大豆子叶节分化出的丛生芽较多而脯氨酸从有关报道来看可能诱导了农杆菌 vir 区基因的活化,促进了 T-DNA 的转移,从而提高了转化率。虽然利用农杆菌介导的方法已将许多具有实际应用价值的外源基因导入植物中,利用农杆菌介导的某些种属植物的遗传转化体系已渐趋成熟,但要获得稳定高效的遗传转化程序还有许多方面的工作要做。



图片 1 GUS 基因在大豆丛生芽中的表达

Plate 1 GUS gene express in multiple shoots of soybean



图片 2 GUS 基因在大豆叶片中的表达

Plate 2 GUS gene express in soybean leaves



图 3 片 GUS 基因在大豆茎中表达

Plate 3 GUS gene express in beanstalk



图片 4 GUS 基因在花及幼荚中表达

Plate 4 GUS gene express in flower and beanpod

参 考 文 献

- 1 王景雪, 孙毅. 农杆菌介导的植物基因转化研究进展[J]. 生物技术通报, 1999(1): 7—13
- 2 Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. Physiol Plant, 1962, 21: 473—479
- 3 Gamborg OL, Miller RA, Ojima K.. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean roots cells[J]. Exp Cell Res, 1968 50: 151—158.

- 4 Jefferson RA, TA Kavanagh, WM Bevan. GUS fusions; (X—glu—curonidase) as a sensitive and versatile gene—fusion marker in higher plants [J]. EMBOJ. 1987, 6: 3901—3907
- 5 蓝海燕, 陈正华. 农杆菌介导的芸薹属植物遗传转化技术的研究进展[J]. 生物技术通报, 1999 3: 15—18.
- 6 James D, Unatus S, cheng J, et al. Acetosyringone and Osmoprotectants like betaine or proline synergistically enhance Agrobacterium—mediated transformation of apple[J]. Plant cell Rep, 1993, 12: 559—563.

EFFECTION OF PROLINE AND AgNO_3 ON AGROBACTERIUM—MEDIATED TRANSFORMATION OF SOYBEAN

Liu Jinhua¹ Wang Peiwu² Wu Limin² Yu Yanchun² Zhan Jun² Hao Wenyan² Yao Dan²

(1. Center of Technology, Jilin Entry—Exit Inspection and Quarantine Bureau of the P. R. C Changchun 130062; 2. Center of Biotechnology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118)

Abstract *Agrobacterium tumefaciens* has been used extensively for genetic engineering in soybean, but to date, transformation frequency of soybean is still low relative to that obtained in other plants. At an attempt to improve transformation efficiency, present experiment was conducted to add two compounds on transformation of cotyledonary nodes in soybean via *Agrobacterium*—mediation.

The experiment result indicated that 2mg/L proline or 2mg/L AgNO_3 had the optimal effect on soybean transformation, the GUS gene transformation rate was increased obviously.

Key words Soybean; *Agrobacterium tumefaciens*; Genetic transformation; Proline; AgNO_3