

农杆菌介导大豆未成熟子叶的遗传转化^{*}

王 萍 王 罡^{**} 季 静 周智明 郭 威 拉 巴 吴 颖

(解放军军需大学植物基因工程研究中心, 长春 130062)

摘要 用农杆菌 LBA 4404 (pGBI121S4ABC) 转化 5 个大豆品种的未成熟子叶, 经卡那霉素筛选得到抗性植株, 进一步用 PCR 检测, 获得 10 株 PCR 阳性植株。同时发现, 不同大豆品种农杆菌转化的效率是不同的, 吉林 43 较易于转化; 共培养时间是影响转化效率的主要因子。

关键词 大豆 (*Glycine max*); 农杆菌; 遗传转化; PCR 检测

中图分类号 S 565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000—9841 (2004)02—0086—05

大豆食心虫是大豆发生频率较高的虫害之一, 常导致大豆严重减产。特别是在东北三省更为严重, 如在吉林省因食心虫发生可减产约 20%。大豆食心虫还严重地影响大豆外观品质和加工品质, 给种植者造成重大的经济损失。目前, 生产上主要防治方法仍是大剂量的使用农药, 这不仅提高了大豆生产的成本, 还使生态平衡遭到了严重的破坏, 造成环境污染。随着分子生物学的发展和植物转基因技术的应用, 许多研究者尝试用转基因技术获得抗病虫的作物品种^[1-3]。1988 年, Hinchee 等^[4]和 Mc-Cabe 等^[5]分别用根癌农杆菌介导法和基因枪法获得大豆的转基因植株。本研究以大豆的未成熟子叶为外植体, 用农杆菌介导法将抗虫基因转入大豆品

种中, 为培育抗虫大豆品种提供材料与理论依据。

1 材料与方法

- 1.1 受体材料及预培养
选用吉林 35、吉林 43、合丰 25、合丰 35 和辽豆 11 共 5 个体细胞胚胎发生率较高的东北三省大豆主栽品种为受体, 预培养见王萍等(2002)^[6]方法。
- 1.2 质粒
质粒为 pGBI121S4ABC, 由中国农业科学院郭三堆先生提供, 含有 GFM CryIA 基因、CpTI 基因、NPT II 基因和 Gus 基因(见图 1)。

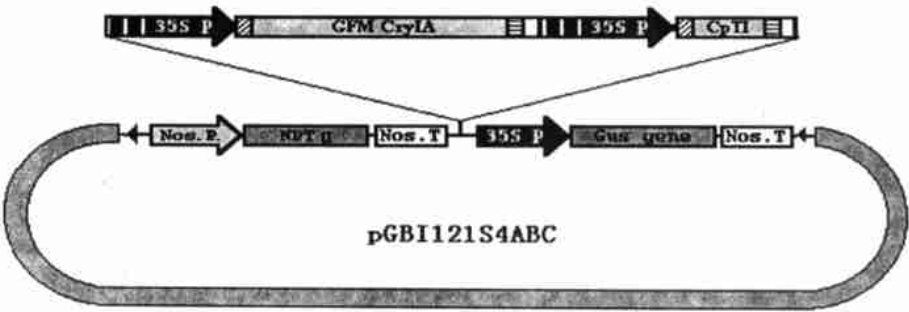


图 1 pGBI121S4ABC 质粒图谱
Fig. 1 Map of plasmid pGBI121S4ABC

- 1.3 农杆菌菌株及培养
农杆菌菌株为 LBA 4404, 由黑龙江农业科学院周思君博士馈赠。挑取农杆菌 LBA4404 (pG-BI121S4 ABC) 一单菌落, 接种于加有相应抗生素的 YEP 液体培养基中, 在 28℃170 r/min 条件下振荡培养至对数生长期, 菌液在 4000 r/min(4℃)离心 10

^{*} 收稿日期: 2003—11—03
基金项目: 国家植物转基因中试及产业化基地专项基金(项目编号 J99—B—001)
^{**} 通讯作者: wgtt2003@yahoo.com.cn
作者简介: 王萍 (1957—), 女, 教授, 博士, 主要从事作物遗传育种与植物转基因研究, E-mail: y-pwang@yahoo.com.cn

21994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

min, 弃上清液, 沉淀的菌体用等体积的重悬液重悬, 静止 30 min, 待浸染。

1.4 农杆菌浸染外植体及共培养

将预培养的大豆未成熟子叶浸泡在根癌农杆菌 LBA 4404 (pGB1121S4ABC) 中 5 ~ 20min, 之后, 弃除农杆菌液, 将未成熟子叶用无菌滤纸吸干后放入共培养培养基中暗培养 1 ~ 5d。

1.5 转化体的抗性筛选

将共培养后的未成熟子叶转入附加有 50 mg/L 卡那霉素和 100 ~ 400 mg/L 头孢霉素的筛选培养基上诱导抗性愈伤和体细胞胚胎发生, 计算抗性愈伤率和抗性体细胞胚胎发生率。当抗性体细胞胚形成时及时转入萌发培养基中(附加 25 mg/L 卡那霉素和一定浓度的头孢霉素), 进一步转入 MS 培养基萌发植株。

1.6 影响根癌农杆菌介导大豆未成熟子叶遗传转化的因子试验

影响因子设农杆菌菌液浓度 (OD600 = 0.3、0.5、0.7、1.0 和 1.5)、侵染时间 (5、10、15 和 20 min) 及共培养时间 (1、2、3、4 和 5 d)。

完全随机设计, 3 次重复, 每个处理组合接种 60 ~ 100 个外植体。在培养 14d 和 42 d 调查出愈数和体细胞胚胎发生情况, 计算抗性出愈率和抗性体细胞胚胎发生率, 经反正弦转换后用 SPSS 8.0 进行方差分析, 评价各因素对转化率的影响。

1.7 PCR 检测

取经卡那霉素筛选的抗性植株用植物基因组 DNA 快速提取试剂盒(购于北京鼎国生物技术发展中心)提取 DNA, PCR 扩增。Bt 基因的特异引物由大连宝生物生物工程公司合成, 引物 I 序列为: 5'-GGGCCCCGCTGAATCCAAC TGGAGAGGC-3'; 引物 II 序列为: 5'-CCATACAAC T-GCTTGAGTAACCCAGAAGTTG-3'。PCR 反应程序为 94℃变性 3 min; (94℃变性 1 min、55℃退火 1 min、72℃延伸 1 min) 35 个循环; 72℃延伸 5 min。取 5 ~ 10 μl PCR 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳, 以 λDNA/EcoRI +Hind III 双酶切 DNA 分子(购于北京鼎国生物技术发展中心)为标准分子量, 电泳结果在 BIO RAD 凝胶成像系统分析并打印。

2 结果与分析

2.1 农杆菌菌液浓度对转化的影响

农杆菌菌液浓度试验(图 2)结果表明, OD600

从 0.3 ~ 1.5 的范围内侵染吉林 43 和辽豆 11 的未成熟子叶时, 出愈率的变化不大, 尤其是辽豆 11 OD600 在 0.3 ~ 1.0 范围内对出愈率几乎没有任何影响, 这与 Yan 等(2000)在大豆品种 Jack 未成熟子叶农杆菌转化试验中得到的 OD600 为 0.2 ~ 1.1 间转化率无显著差异的结果是一致的。

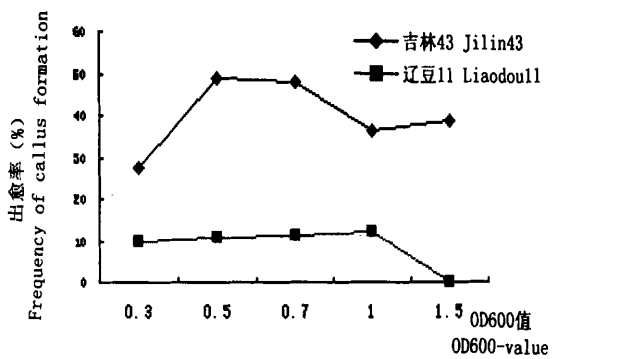


图 2 不同农杆菌浓度侵染下大豆出愈率

Fig. 2 Frequency of callus formation so *Agrobacterium*

2.2 共培养时间对转化的影响

两个品种在不同共培养时间所诱导的出愈率结果见图 3。从图中可以看到, 大豆未成熟子叶与根癌农杆菌共培养 1 ~ 5 d 时, 随着培养时间延长, 出愈率有降低的趋势, 尤其是辽豆 11 更为明显。这主要是因为共培养时间过长使大豆未成熟子叶表面聚集了大量的农杆菌影响了大豆未成熟子叶的正常发育。经农杆菌浸染后, 体细胞胚胎发生率很低, 仅吉林 43 在共培养 2 d 时得到 0.03% 的体细胞胚胎发生率, 其它处理没有体细胞胚胎发生。

2.3 农杆菌浸染时间对转化的影响

出愈率因品种不同对侵染时间的反应不同(图 4), 吉林 43 在农杆菌浸染 5min ~ 20min 时, 抗性愈伤百分率差异不大并高于黑农 35; 而黑农 35 则在浸染 10min ~ 15min 抗性愈伤率最高, 当浸染 20min 时, 抗性愈伤率明显下降。

2.4 影响农杆菌转化效率因子的方差分析

对农杆菌侵染时间、农杆菌菌液浓度以及农杆菌与大豆未成熟子叶共培养, 时间等因子的转化效率进行了方差分析, 结果见表 1。

从表中可知, 除农杆菌与大豆未成熟子叶共培养天数间的出愈率存在显著差异外, 农杆菌侵染时间和菌液浓度的差异均未达显著水平, 说明仅共培养时间影响农杆菌介导大豆未成熟子叶的遗传转化率。差异显著性测验结果表明, 共培养 1 ~ 2 d 显著地高于 3 ~ 5 d 处理, 说明未成熟子叶在进行农杆菌介导的遗传转化时共培养时间以 1 ~ 2 d 为宜。

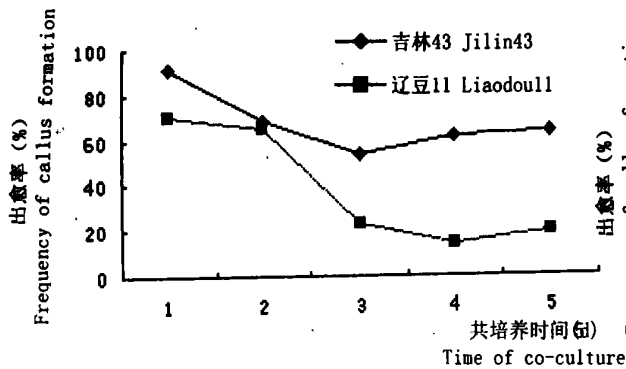


图3 不同共培养时间大豆的出愈率
Fig 3 Epequency of callus formation of soybean co-cultured in different days

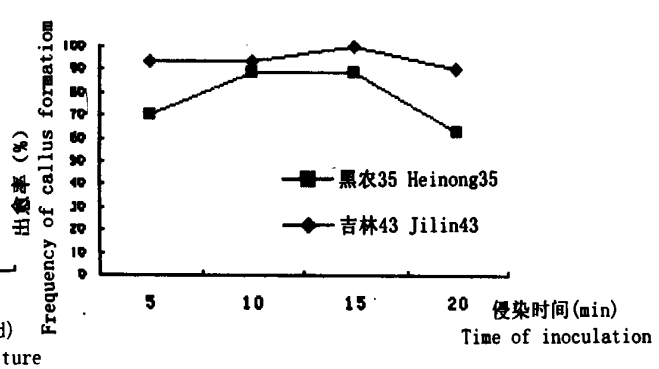


图4 农杆菌不同侵染时间下大豆的出愈率
Fig 4 Frequency of callus formation of varieties in soybean under different time of inoculation by Agr obacterium

表1 影响农杆菌转化效率因子的方差分析

Table 1 The analysis of variance for effect factors on Agrobacterium-mediated transformation efficiency

影响因子 Effect factors	品种 Varieties	DF	SS	MS	F 值 F-value	F _{0.05}
侵染时间 Inoculation time	黑农 35 HeiNong 35	3	657.74	219.25	1.41	4.76
	吉林 43 Jilin 43	3	1389.97	463.32	1.05	4.76
共培养天数 Days of co-cultivation	吉林 43 Jilin43	4	1161.38	290.35	6.66 *	3.84
	辽豆 11 Liaodou 11	4	2256.44	564.11	4.70 *	3.84
农杆菌浓度 Concentration of agrobacterium	吉林 43 Jilin 43	4	331.61	82.90	1.55	3.84
	辽豆 11 Liaodou 1	3	1691.65	563.88	4.43	4.76

注: * 在 0.05 水平显著。 * Significant at 0.05 level

2.5 不同大豆品种对转化的影响

对 5 个大豆品种进行了农杆菌介导的遗传转化,其中,仅在吉林 35、吉林 43 和合丰 35 这 3 个品

种选获得了卡那霉素筛选的抗性植株(表 2),抗性植株率变化在 0.32%~0.87%之间,合丰 25 和辽豆 11 没有得到抗性植株。

表2 不同的大豆品种对转化的影响

Table 2 The effect of genotypes of soybean variety on transformation

品种名称 Variety name	外植体块数 No. of explants	抗性植株数 No. of plantlets resistant to Kan	PCR 阳性株 PCR-positive plantlets	PCR 阳性株率(%) Rate of PCR-positive plantlets
吉林 35 Jilin 35	310	1	1	0.32
吉林 43 Jilin 43	690	11	6	0.87
合丰 25 Hefeng 25	414	0	0	0
合丰 35 Hefeng 35	396	3	3	0.76
辽豆 11 Liaodou 11	68	0	0	0

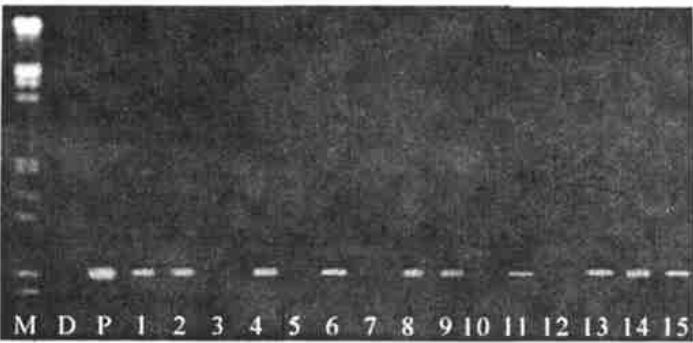
对所有的抗性植株进行了 PCR 检测,得到 10 株 GFM CryIA 基因 PCR 阳性株(图 5),说明 GFM CryIA 基因已经根癌农杆菌介导转入大豆中。

3 讨论

3.1 抗性筛选压力的确定

抗性选择压力的高低,直接影响到选择效果。

本试验在进行大豆不同品种对卡那霉素和头孢霉素敏感性试验的基础上,确定未成熟子叶诱导愈伤和体细胞胚胎发生的卡那霉素筛选浓度为 50mg/L,体细胞胚萌发的筛选浓度为 25mg/L。由于不同品种对卡那霉素的敏感性存在差异,对卡那霉素较不敏感的吉林 43 出现了假阳性株。因此,建议在进行大豆遗传转化的筛选时,不同品种选择采用不同的筛选压力,以此来克服假阳性现象。



M. Marker; λDNA/ EcoRI + Hind III; D. DNA of soybean P. Plasmid DNA; 1. DNA of resistant plant of Jilin35; 2~12. DNA of resistant plant of Jilin43; 13~15. DNA of resistant plant of Hefeng35

图 5 抗性植株的 PCR 检测

Fig. 5 PCR detection of plants resistant to kanamicy

3.2 共培养时间对农杆菌介导大豆遗传转化的影响

关于农杆菌介导大豆遗传转化时的共培养时间对转化效率的影响有 3 篇研究报道。Kudirka 等 (1986)^[7] 以 Peking 真叶为外植体研究了根癌农杆菌介导大豆遗传转化的效果, 认为共培养时间 48h 最好。Yan 等 (2000)^[8] 以 Jack 未成熟子叶为外植体对共培养 2~4 d 对转化效率进行分析, 认为较短的共培养时间会产生较高的外植体的存活率, 并有较多的外植体产生体细胞胚, 建议 2~3 d 共培养为宜, 而共培养 4 d 时很少有子叶存活, 体细胞胚胎发生率明显下降。采用直接筛选方法得到 0.03% 的转化率。

周思军等 (2001)^[9] 以抗线 2 号为材料, 用含 pGBI4A2B 质粒的 EHA105 根癌农杆菌侵染大豆成熟子叶节研究影响遗传转化的因子, 结果表明, 共培养时间和侵染时间都对转化率有显著影响, 且共培养时间的作用大于侵染时间, 共培养时间以 2~4 d 为宜, 侵染时间以 8 min 为宜, 侵染时间和共培养时间两者的作用相互制约。从以上的研究可以看出, 不同的外植体最佳的共培养时间不同, 未成熟子叶较子叶节需要更短的共培养时间, 这可能是因为未成熟子叶表面积小, 组织幼嫩, 对农杆菌的忍耐性较差的原因。因此, 建议用农杆菌介导大豆未成熟子叶遗传转化时, 共培养时间不宜超过 3d。

参考文献

- 1 De Block M, Herrera-Estrella L, Van Montagu M, et al. Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny[J]. EMBO J, 1984, 3: 1681—1689.
- 2 李宝健, 许新萍, 石和平, 等. 应用电注射法将外源基因导入水稻种胚及获得转基因水稻植株的研究[J]. 中国科学(B 辑), 1991, 21(3): 270—275.
- 3 谢道昕, 范云六, 倪万潮, 等. 苏云金芽孢杆菌(Bacillus thuringiensis)杀虫晶体蛋白基因导入棉花获得转基因植株[J]. 中国科学(B 辑), 1991, 21(4): 367—373.
- 4 Hinchee Maud A, Connor-Ward Dannette V, Newell Christine A, et al. Production of transgenic soybean plants using Agrobacterium-mediated DNA transfer[J]. Bio/Technology, 1988, 6: 915—922.
- 5 McCabe Dennis E, Swain William F, Martinell Brian J, et al. Stable transformation of soybean (Glycine Max) by particle acceleration [J]. Bio/Technology, 1988, 6: 923—926.
- 6 王萍, 王昱, 吕文河, 等. 大豆体细胞胚胎发生影响因子的研究[J]. 中国农业科学, 35(6): 606—609.
- 7 Kudirka DT, Colburn SM, Hinchee MA, et al. Interactions of Agrobacterium tumefaciens with soybean leaf explants in tissue culture[J]. Can. J. Genet. Cytol, 1986, 28: 808—817.
- 8 Yan B, Reddy M S S, Collins G B. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of soybean [Glycine (L.) Merrill.] using immature zygotic cotyledon explants[J]. Plant Cell Reports, 2000, 19: 1090—1097.
- 9 周思君, 李希臣, 刘昭军, 等. 通过农杆菌介导法将 Bt (cryI A) 基因导入大豆[J]. 大豆科学, 2001, 20(3): 157—162.

GENETIC TRANSFORMATION OF IMMATURE COTYLEDON VIA AGROBACTERIUM TUMEFACIENS IN SOYBEAN

Wang Ping Wang Gang Ji Jing Zhou Zhiming Gui Wei La Ba Wu Ying

(Research Center For Plant Genetic Engineering, Changchun University of Agricultural and
Animal Sciences, Changchun 130062)

Abstract Immature cotyledon of 5 different soybean varieties were transformed by *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (pGB121S4ABC) and resistant plants to kanamycin were obtained. 10 regenerated plants gave positive PCR reaction. Transformation efficiency was different among 5 varieties. Jilin 43 was easy for transforming by *Agrobacterium tumefaciens*. The time of co-cultivation is one of the most important factors for transformation efficiency.

Key words Soybean (*Glycine max*); *Agrobacterium tumefaciens*; Genetic transformation; PCR detection

地神 22(豫泛 964)

1 品种来源 河南省黄泛区农场农科所于 1994 年用豫豆 18× 郑 492 有性杂交, 南繁加代结合系谱法于 1999 年选育而成。安徽省农作物品种审定委员会 2003 年 6 月 28 日审定通过, 被命名为地神 22, 审定号为: 皖品审 0304265。

2 特征 有限结荚习性, 茎秆粗壮。株高 86.5cm 左右, 株型紧凑, 有效分枝 2.2 个, 单株 46.1 个左右, 单株粒数 91.3 粒, 荚熟色褐, 底荚高 20.7cm, 主茎节数 18.4 节, 椭圆型叶, 叶色墨绿大小中等, 紫花, 灰毛。子粒圆形, 种皮色黄, 有光泽, 脐色褐, 百粒重 19.7g 左右, 蛋白质含量为 48.16%, 脂肪含量为 16.25%, 超过国家攻关 45% 的高蛋白标准和蛋白质脂肪合计 63% 的优质标准。

3 特性 黄淮海夏大豆, 生育期 104 天左右, 中早熟品种, 6 月上中旬播种, 9 月下旬成熟。抗花叶病毒病, 抗裂荚, 抗旱性强。

4 产量表现 2001 年安徽省区试 9 点, 其中在宿县试点、潘村湖试点产量居第一位, 分别为 241.32kg/667m² 和 251.66kg/667m², 比对照中豆 20 增产 20.7% 和 15.28%, 9 点平均平均产量 238.9kg/667m², 比对照中豆 20 增产 13.99%, 达极显著水平。2002 年省区试 9 点平均产量 229.31kg/667m², 比对照中豆 20 增产 11.5%, 达极显著水平。2001—2002 年两年省区试 18 点平均产量 234.11kg/667m², 比对照中豆 20 增产 12.75%。2002 年生产试验 9 点平均产量 218.28kg/667m², 比对照中豆 20 增产 14.82%。正常年景大田产量一般为 228.57kg/667m² 左右, 属高产稳产品种。

5 栽培要点 该品种适应范围广, 在安徽省全省和河南省全省种植。6 月上中旬为适宜播期, 播量为 5kg/667m², 行距 0.4m, 株距 0.13m, 留苗 1.25 万株/667m², 出苗后手间苗, 苗期注意蹲苗。适时中耕, 及时防治病虫害。分枝期至初花期前(7 月上中旬)可视苗情追施磷酸二铵 15kg 左右, 也可叶面喷肥。本品种成熟落黄好, 熟期一致, 裂荚性强, 等完全成熟、子粒干透后再行收获, 以保证外观和品质。

王永锋 刘 键 裴桂英 马赛飞 强跃进
河南省黄泛区农场农科所 电 话: 13938063376