

八氢番茄红素合成酶基因(PSY)对大豆的遗传转化*

龚学臣^{1,2} 季 静¹ 抗艳红² 王 罡^{1*} 吴 颖³ 王 萍³

(1. 天津大学农业与生物工程学院, 天津 300072; 2. 河北北方学院农业科学系, 张家口 075131;
3. 淮海工学院海洋学院, 连云港 222005)

摘要 以三个大豆品种的无菌苗子叶节为受体, 以 PSY 为目的基因, 应用根癌农杆菌介导法对大豆进行了遗传转化, 经子叶节丛生芽诱导、茎伸长培养、生根培养和潮霉素选择培养, 获得了完整的抗性再生苗, 经 PCR 和 PCR-Southern 分析鉴定, 初步证明外源基因 PSY 已整合到大豆的基因组中, 并对影响遗传转化的因子进行了研究。

关键词 PSY 基因; 大豆; 子叶节; 遗传转化

中图分类号 S 565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2005)01-0030-04

八氢番茄红素合成酶(Phytoene synthase, PSY)是类胡萝卜素生物合成的限速酶, 通过转化 PSY 基因可以加速催化反应, 促进相应类胡萝卜素的合成^[1-3]。

大豆是重要的粮食、油料和饲料作物, 是植物蛋白和植物油的主要来源, 大豆油是当今人们最喜食的食用油, 在国内外市场上占有十分重要的地位。

类胡萝卜素是一类营养元素, 有益于人类的健康, 增强人体免疫力, 延缓机体衰老, 预防癌症, 减少因缺乏维生素 A 而引起的夜盲症、幼儿弱视等一系列眼病^[4]。类胡萝卜素是脂溶性物质, 而且它的存在可有效地延缓植物油的氧化。如果能将类胡萝卜素合成酶基因导入大豆, 用来提高大豆类胡萝卜素的含量, 对提高大豆品质, 促进人类健康均具有十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料、质粒和菌株

大豆品种吉林 30、吉林 35 由吉林省农业科学院提供; 合丰 25、黑农 35 由黑龙江省农业科学院提

供; 九 9313 由吉林市农业科学院提供; 长农 9 由长春市农业科学院提供。

根癌农杆菌 EHA 101 和来自枸杞的 PSY (1.3 kb) 基因由季静教授提供, 质粒 pEbisPSYHyg 上构建有目的基因 PSY 和植物抗性筛选标记潮霉素磷酸转移酶基因 Hpt。

1.1.2 培养基

基本培养基为 MSB (MS 无机盐 + B₅ 有机物), 农杆菌 EHA 101 培养用的是 YEB 培养基, 遗传转化培养基为 MSB 附加不同浓度的 6-BA (1.5 - 2.0 mg/L)、GA (0.5 - 1.0 mg/L) 和 IBA (0.5 - 1.0 mg/L), 并在重悬液培养基和共培养培养基中加入 100 μmol/L AS。

1.2 方法

1.2.1 遗传转化方法及步骤

试验采用农杆菌介导法, 以大豆子叶节为受体进行遗传转化。首先, 将切好的外植体浸入重悬后的菌液 (OD₆₀₀ = 0.6 - 0.9) 中, 浸泡 10 - 15 min, 倒掉菌液, 将外植体移到无菌滤纸上吸干菌液。然后将子叶近轴面朝下接种在共培养培养基上, 25 ± 1 °C 条件下暗培养 3 d。将共培养后的外植体转入脱菌筛选培养基, 待子叶节长出抗性芽后, 将抗性芽切割

* 收稿日期: 2004-09-13

项目来源: “国家植物转基因技术研究开发与中试基地建设” 专题课题 (项目编号 199-B001)

作者简介: 龚学臣 (1963-), 男, 硕士, 副教授, 主要从事植物基因工程方面的研究。E-mail: gxc2004@yeah.net

通讯作者: 王罡, E-mail: wgtt2003@yahoo.com.cn

分离,转入抽茎筛选培养基,15–20d后转入生根筛选培养基,抗性芽生根后,转入1/2MSB培养基中培养,最后移栽直至成活。

1.2.2 抗性选择标记适宜浓度的确定试验

以吉林30、九9313、长农9的子叶节为外植体,在诱导丛生芽的培养基中分别加入潮霉素(Hyg):0.5、10、15、20、25、30mg/L,进行潮霉素对大豆子叶节诱导丛生芽影响的试验。每个处理30–40个外植体,三次重复,15d后记录产生抗性芽的外植体数。

1.2.3 农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化因子的优化

以大豆品种吉林30、长农9、九9313的子叶节为受体,以抗性芽率为指标,进行脱菌剂(头孢霉素,Cef)浓度、农杆菌菌液浓度、侵染时间、共培养时间试验,以确立农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化的最佳条件。各试验设计如下:

农杆菌菌液浓度(OD₆₀₀):0.3、0.6、0.9、1.2;

侵染时间(min):1、5、10、15、20;

共培养时间(d):1、2、3、4、5。

1.2.4 分子检测

按照王关林的SDS方法提取植物基因组DNA,并进行PCR、PCR–Southern检测^[5]。

2 结果与分析

2.1 抗性选择标记(Hyg)适宜浓度的确定

以三个大豆品种的子叶节为外植体,进行的潮霉素对大豆子叶节诱导丛生芽影响试验结果见图1。

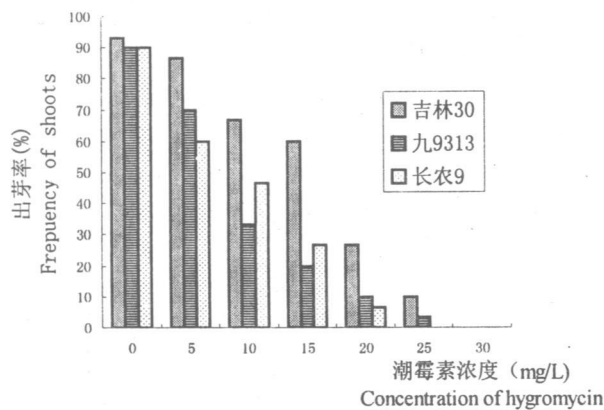


图1 潮霉素对大豆子叶节出芽率的影响

Fig 1 The effect hygromycin on frequency of shoots from cotyledonary node of soybean

由图1和方差分析结果可知,不同基因型间对潮霉素的耐受性存在极显著的差异($F=39.84>F_{0.01}=5.05$),即不同的基因型对潮霉素的反应不同,对潮霉素耐受性最强的是吉林30、九9313次之、长农9最弱。当潮霉素浓度大于20mg/L时,长农9的出芽率低于6.7%;当潮霉素的浓度大于25mg/L时,长农9的出芽率为零,吉林30和九9313的出芽率低于10%;当潮霉素浓度达到30mg/L时,三个品种的出芽率都为零。因此,确定遗传转化时潮霉素的适宜筛选浓度长农9为20–25mg/L,吉林30和九9313为25–30mg/L。

2.2 菌液浓度的确定

以吉林30、长农9、九9313大豆种子萌发10d的子叶节为受体,以抗性芽率为指标,进行了菌液浓度试验,结果见图2。

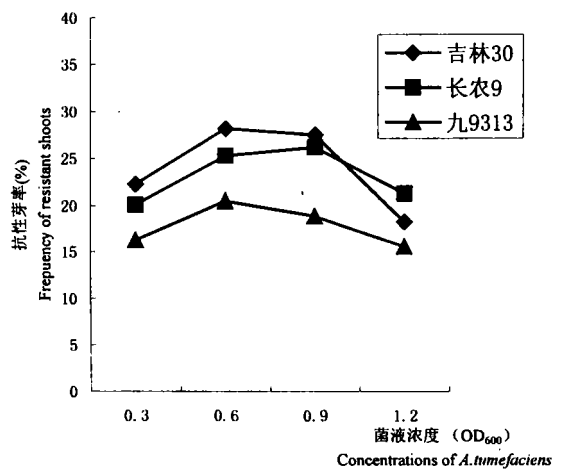


图2 菌液浓度对大豆子叶节抗性芽率的影响

Fig 2 The effect of concentrations of *A. tumefaciens* on frequency of resistant shoots in soybean cotyledon node

由图2可以看出,菌液浓度OD₆₀₀值在0.3–1.2范围内,供试的三个大豆品种的子叶节抗性芽率都存在差异,但菌液浓度在0.6–0.9范围内,三个品种都表现出较高的抗性芽率。因此,确定农杆菌介导转化的适宜菌液浓度OD₆₀₀为0.6–0.9。

2.3 侵染时间的确定

以吉林30、长农9和九9313大豆种子萌发10d的子叶节为受体,以抗性芽率为指标,进行了农杆菌侵染时间的试验,结果见图3。

由图3可知,农杆菌对子叶节的侵染时间不同,子叶节抗性芽率存在差异,三个品种子叶节的侵染时间以10min的抗性芽率最高,且显著地高于1min和20min两个处理。因此,确定农杆菌侵染子叶节的适宜时间为5–15min。

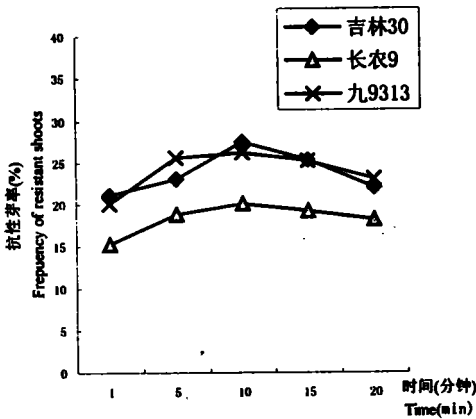


图 3 侵染时间对大豆子叶节抗性芽率的影响

Fig. 3 The effect of infection time on frequency resistant shoots in soybean cotyledon node

2.4 共培养时间的确定

以吉林 30、长农 9 和九 9313 大豆种子萌发 10d 的子叶节为受体, 农杆菌侵染子叶节后共培养时间试验结果见图 4。

图 4 表明, 共培养时间对子叶节抗性芽率存在显著差异, 共培养时间 3d 的较 1d 的抗性芽率吉林 30 提高了 11.0%、长农 9 提高了 7.8%、九 9313 提高了 7.6%, 3d 的较 5d 的抗性芽率吉林 30 高 11.5%、长农 9 高 11.0%、九 9313 高 9.3%, 且 5 个处理以共培养时间 3d 的抗性芽率最高。因此, 确定大豆子叶节农杆菌侵染后适宜的共培养时间为 3d。

2.5 大豆抗性苗的获得及其分子检测

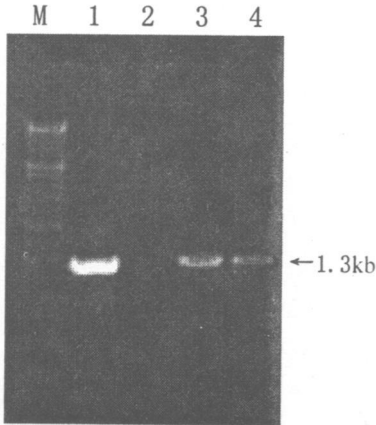


图 5 大豆子叶节遗传转化的 PCR 检测

Fig. 5 PCR detection of transformed soybean

M: λDNA /EcoRI+ HindIII 1: 阳性质粒 pEbisPSYHyg
2: 未转化株; 3、4: 转化株

对大豆苗进一步进行 PCR - Southern 杂交检测, 结果见图 6。结果表明 PCR 阳性株 DNA 扩增

以吉林 30、长农 9、九 9313 萌发 8 - 10d 的无菌苗子叶节为受体, 利用农杆菌介导法进行 PSY 基因的遗传转化, 经丛生芽诱导、茎伸长培养、生根培养和潮霉素筛选, 共获得大豆转基因抗性苗 6 株, 经 PCR 检测有 2 株呈阳性, 其中吉林 301 株, 九 9313 1 株。

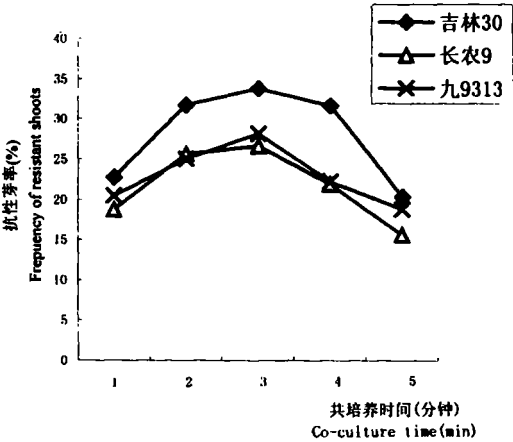


图 4 共培养时间对大豆子叶节抗性芽率的影响

Fig. 4 The effect of co-culture time on frequency of resistant shoots in soybean cotyledon node

从大豆抗性苗和未转化对照苗叶片提取总 DNA 作为模板进行 PCR 扩增, 未转化株为阴性对照, 含目的基因的质粒为阳性对照, 电泳结果见图 5。结果表明转基因株和质粒都在 1.3kb 附近扩增出特异条带, 而阴性对照株却未扩增出相应的特异条带, 由此初步证实, 目的基因 PSY 已转入大豆细胞内。

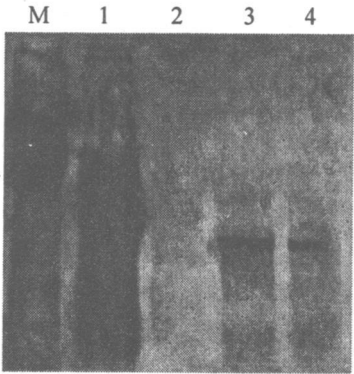


图 6 大豆子叶节遗传转化的 PCR - Southern 检测

Fig. 6 PCR - Southern detection of transformed soybean

M: λDNA /EcoRI+ HindIII 1: 阳性质粒 pEbisPSYHyg
2: 未转化株; 3、4: 转化株

片段和质粒 DNA 扩增特异片段有杂交信号, 且处于同一位置, 而阴性对照植株则没有杂交信号, 说明

被检测阳性株扩增出的 PCR 条带确实为特异性的目标带, 证明 PSY 基因确实已整合进大豆抗性再生植株基因组中。

3 讨论

3.1 共培养时间与侵染时间对农杆菌转化的影响

大豆子叶节作为农杆菌转化的受体, 由于子叶节是器官组织, 且表面积小, 只有 1mm 左右, 农杆菌侵染时不易接触到伤口细胞。因此, 所需的侵染时间比其它组织, 如愈伤、体细胞胚组织等要长。本试验确定 10–15min 为农杆菌侵染子叶节的适宜时间。

农杆菌对植物进行转化时, 必须在伤口部位存活 16h 以上, 才能进行 T-DNA 的转移。此期间涉及农杆菌向受伤部位的附着, Vir 区基因的诱导活化及 T-DNA 的转移整合。因此, 需要较长的共培养时间, 但在实际操作中, 共培养时间也不宜太长, 如果共培养时间太长, 农杆菌过度生长, 不仅造成脱菌困难, 还会使子叶节受到毒害, 不定芽形成困难或褐化死亡。本试验确定大豆子叶节农杆菌侵染的共培养时间为 3d。

3.2 重悬液对农杆菌转化的影响

Vir 区的诱导活化不仅受乙酰丁香酮(AS)浓度的影响, 而且还与 pH 值有关。Vir 区的诱导活化的 pH 值在 5.0–5.6 之间, 不宜超过 5.8。VirD 基因和 VirG 基因的活化温度也必须低于 28℃, 且培养基中不应有酵母提取物^[6]。因此, 在 pH 值为 7.0 的 YEB 中加 AS, 28℃摇菌来活化农杆菌是不

合适的。所以, 本试验在菌液重悬时, 不用 YEB, 而用不加琼脂粉的共培养培养基, 并添加 100 μ mol/L AS。

4 小结

4.1 大豆子叶节抗性筛选标记潮霉素的适宜浓度 长农 9 为 20–25mg/L, 吉林 30 和九 9313 为 25–30mg/L。

4.2 农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化体系, 适宜的菌液浓度 OD₆₀₀ 为 0.6–0.9mg/L、侵染时间为 5–15min、共培养时间为 3d。

4.3 利用农杆菌介导法对大豆子叶节进行 PSY 基因的遗传转化, 经潮霉素选择获得了大豆转基因抗性苗 6 株, 经 PCR、PCR–Southern 检测有 2 株呈阳性, 其中吉林 301 株, 九 9313 1 株。

参 考 文 献

- 1 徐昌杰, 张上隆. 柑橘类胡萝卜素合成关键基因研究进展[J]. 园艺学报, 2002, 29(增刊): 619–623
- 2 陈选阳, 郑金贵, 袁照年. 类胡萝卜素生物合成代谢工程研究进展[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2003, 32(3): 348–352
- 3 Shewmaker C K, Sheehy J A, Daley M. Seed-specific over expression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects[J]. Plant Journal, 1999, 20(4): 401–412
- 4 韩雅珊. 类胡萝卜素的功能研究进展[J]. 中国农业大学学报, 1999, 4(1): 5–9
- 5 王关林, 方宏筠主编. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2002, 386–389.

GENETIC TRANSFORMATION OF PHYTOENE SYNTHASE GENE(PSY) INTO SOYBEAN

Gong Xuechen^{1,2} Ji Jing¹ Kang Yanhong² Wang Gang¹ Wu Ying³ Wang Ping³

(1. Tianjin University, Tianjin, 300072; 2. Hebei North University, Zhangjiakou, 075131;
3. Huaihai Institute of Technology, Marine School, Lianyungang 222005)

Abstract Taking cotyledonary nodes of three varieties of soybean as acceptor, PSY gene were transformed into soybean via agrobacterium-mediated. Hygromycin resistant regeneration plants of soybean were obtained by cotyledonary nodes inducing, striking root cultivation and stem elongation cultivation and hygromycin screening in selective condition. PCR and PCR–Southern analysis from the transferred gene plants proved that PSY has been transferred into genome of soybean. The factors affecting genetic transformation were also investigated.

Key words PSY gene; Soybean; Cotyledonary node; The Genetic transformation