

CaCl₂ 诱导大豆花粉管通道农杆菌转基因研究

李 卉, 武天龙

(上海交通大学农业与生物学院, 上海 201101)

摘要 为了提高大豆花粉管通道法转基因效率, 研究直接用农杆菌转化方法的可行性, 以秋大豆品种上海本地青为受体材料, 用花粉管通道法在三种 CaCl₂ 浓度水平下进行质粒 pCAMBIA3301 转化, 又以 GV3101、LBA4404、EHA105 三种农杆菌菌株直接导入花粉管通道为处理进行了遗传转化。以质粒为外源基因平均结实率为 36.83%, T₀ 代种子平均成活率为 60.89%, T₁ 植株喷施除草剂后平均存活率为 8.24%。以农杆菌直接转化平均结实率为 15.92%。T₀ 代种子平均成活率为 20.40%, T₁ 植株喷施除草剂后平均存活率为 7.79%。对存活的植株提取 DNA 进行 PCR 检测, 以质粒为外源基因的处理共获得 20 株转化苗, 三种 CaCl₂ 浓度水平的转化效率分别为 0.56%、1.64%、1.40%, 有两种水平的转化效率约为传统转化效率的三倍。以农杆菌直接转化的处理共获得 5 株转化苗, 转化效率分别为 0.17%、0.33%、0.29%。

关键词 花粉管通道; 大豆; CaCl₂; 质粒 pCAMBIA3301; 农杆菌

中图分类号 S 565.103.52 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)01-0055-05

TRANSFORMING AGROBACTERIUM INTO SOYBEAN BY MEANS OF POLLEN TUBE PATHWAY INDUCED BY CaCl₂

LI Hui, WU Tian-long

(Agriculture & Biology College, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 201101)

Abstract In order to improve transgene efficiency of pollen tube pathway, and study the possibility of direct transformation of *Agrobacterium*, pCAMBIA3301 at 3 concentration levels of CaCl₂ was transformed into Shanghai Bending Soybean receptors by means of pollen tube pathway, meanwhile, 3 different varieties of *Agrobacterium* GV3101, LBA4404, EHA105 were introduced into soybean as another treatment. When pCAMBIA3301 was served as foreign gene transformed by pollen tube pathway, an average seed-set percentage of 36.83% and an average seedling percentage of 60.89% were achieved. An average seedling survival percentage was 8.24% when 0.2% Basta was conducted with T₁ plants. When *Agrobacterium* GV3101, LBA4404, EHA105 were served as foreign gene transformed by pollen tube pathway, an average seed-set percentage of 15.92% and an average seedling percentage of 20.40% were achieved. An average seedling survival percentage was 7.79% when 0.2% Basta was conducted with T₁ plants. Leaf genome DNA from survived T₁ plant of different treatments were analyzed by PCR, 20 positive plants

收稿日期: 2006-06-19

基金项目: 863“大豆基因工程育种”(2004AA212150)

作者简介: 李卉(1981-), 女, 在读硕士, 从事作物遗传育种学研究。E-mail: syringali@sjtu.edu.cn

通讯作者: 武天龙教授。Tel: 021-64789018; E-mail: tianlongwu@263.net

were obtained with pCAMBIA3301 as foreign gene, 3 concentration levels of CaCl_2 gained 0.56%, 1.64%, 1.40% efficiency respectively, 2 of which were about 3 fold higher than that of traditional way. 5 positive plants were obtained which 3 different varieties of *Agrobacterium* were directly introduced into soybean, gained 0.17%, 0.33%, 0.29% efficiency respectively.

Key words Pollen tube pathway; CaCl_2 ; Soybean; pCAMBIA3301; *Agrobacterium*

花粉管通道法作为一种转基因技术自 20 世纪 70 年代末开始,可以用于基因表达载体和总 DNA 等多种形态的遗传物质的转化,由于方法简便易行,又不受生殖隔离的限制,能促进远缘种属间的基因交流,因而受到了国内外学者的重视。20 多年来花粉管通道法在水稻、小麦、玉米、棉花等作物上获得成功^[1~3]。

花粉管通道法在大豆上的应用也已经进行了许多的试验,但由于大豆的花器小,花粉管通道细,以及闭花授粉等原因使得花粉管通道技术在大豆上的应用难度较大。在大豆转基因中的效率,以单一基因作为供体,一般在 0.2%~0.6%^[4~6]。闫洪奎等发现^[7]外源 DNA 滴于花柱切口后,大部分能被切口组织吸附,但是向花粉管内移动难度大,因此有必要考虑某种胁迫或诱导方法,加快外源 DNA 移动。大量研究表明, Ca^{2+} 对启动花粉萌发、调节花粉管伸长有重要作用^[8~12]。Chee 等^[13]在萌发种子的胚芽、子叶节及子叶附近注射农杆菌(pGA482),得到 16 株阳性 T_1 。把农杆菌菌株直接以花粉管通道法直接转化大豆还鲜有人报道。本试验以 CaCl_2 三种浓度水平,把质粒 pCAMBIA3301 通过花粉管通道法导入大豆,以 GV3101、LBA4404、EHA105 三种农杆菌菌株通过花粉管通道法直接导入大豆作为处理,通过除草剂筛选转基因大豆植株,经过 PCR 扩增、PAGE 电泳分析转基因大豆的转化效率,为基因工程育种奠定基础。

1 材料与方法

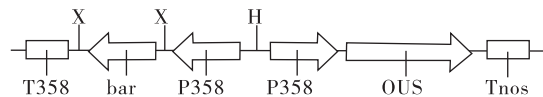
1.1 实验材料

受体材料:秋大豆品种上海本地青 CaCl_2 三种浓度水平: 0.021 mol/L, 0.0021 mol/L, 0.001 mol/L。

1.2 菌株和质粒

GV3101 : : pCAMBIA3301, LBA4404 : : pCAMBIA330, EHA105 : : pCAMBIA3301 由本实验室保存。pCAMBIA3301 包含编码抗除草剂的 bar 基因和 GUS 基因。pCAMBIA3301 酶切图谱

见图 1。



注:pCAMBIA 3301 携带由 CaMV35S 启动子所驱动 bar 和 GUS 基因,缩写:H, Hind III; X, Xho I。

Note:pCAMBIA 3301 contains bar and GUS gene which are promoted by promoter CaMV35S. abbreviation: H, Hind III; X, Xho I.

图 1 pCAMBIA3301 酶切图谱

Fig. 1 Restriction endonuclease maps of pCAMBIA 3301

1.3 质粒的繁殖提取

质粒 pCAMBIA3301 繁殖的受体菌株为 *E. coli*-DH5 α 工程菌。用 CaCl_2 法制备感受态细胞,采用含卡那霉素(50 $\mu\text{g/L}$ Kanamycin)的 LB 平板筛选重组转化菌落,进行重组质粒繁殖扩增。碱裂解法提取质粒 DNA^[14]。提取的质粒 DNA 经 UV-VIS 8500 紫外/可见光分光光度计和 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 约 1.8。

1.4 受体材料

以秋大豆品种上海本地青为花粉管通道法转化质粒 pCAMBIA3301、农杆菌菌株 GV3101、LBA4404、EHA105 的受体材料。

1.5 转化方法

在秋大豆上海本地青开花的盛花期(8~9月),于上午 8:00~11:00,下午 3:00~5:00 导入。选择中上部的花冠高于最高花萼 0.5~1.0mm 的新鲜花蕾,摘除植株生长点及周围不符合标准的小花蕾。摘去龙骨瓣,旗瓣,用锋利的刀片切去约 1/3 柱头,用注射器滴一滴外源 DNA,即含目的基因的质粒 DNA 溶液(质粒浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$, TE 缓冲液 pH 为 8.0)以及农杆菌菌液(农杆菌处于对数生长期)于切口处,刚好被留下的两片翼瓣包裹起来^[15]。在该节的基部挂牌,在标记牌上注明品种名、所转基因、转化朵数及日期。处理 5、10、15、20d 后,观察并摘除其周围新长出的花蕾。

1.6 收获及出苗统计

将收获的豆粒保存在信封中,在信封上记录好标签上的原纪录。统计导入花的朵数和收获总粒数。在次年3月将转基因(*bar* 基因和 GUS 基因)的 T₀ 代种子播种,统计出苗率。

1.7 转基因植株的检测

1.7.1 除草剂抗性植株的鉴定 当苗龄达到5叶时,用0.2%的 Basta 除草剂进行喷雾处理。7日后调查抗性。

1.7.2 转基因植株基因组总 DNA 的提取 取喷施除草剂后存活的植株和对照植株的叶片约1g,采用 CTAB 法提取植株叶片总 DNA。DNA 浓度及质量用天美科学仪器有限公司 UV-VIS 8500 紫外/可见光分光光度计及 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,测定 OD₂₆₀、OD₂₈₀、OD₂₃₀ 值,计算 DNA 浓度和纯度,1.8 ≥ OD₂₆₀/OD₂₈₀ ≤ 2.0,OD₂₆₀/OD₂₃₀ ≥ 2.0 即可达到实验要求。

1.7.3 PCR 特异性扩增 根据 *Bar* 基因序列合成一对特异引物,其序列:上游引物:TCA AAT CTC GGT GAC GGG CA,下游引物:GGT CTG CAC CAT CGT CAA CC。由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。用 ASTEC PC-808 PCR 仪进行特异性扩增。PCR 扩增的反应体系(25μL)为:ddH₂O 17.75μL,PCR buffer (10X) 2.5μL,MgCl₂ (25mmol/L) 1.5μL,dNTPmix(10 mmol/L) 1μL,上游引物 (20μmol/L) 0.5μL,下游引物 (20μmol/L) 0.5μL, *Taq* DNA polymerase (5u/μL) 0.25μL、模板 DNA (250 ng/μL) 1μL。其中

的缓冲液、MgCl₂、dNTPs、*Taq* 酶由上海赛百盛公司提供。PCR 扩增循环参数为:95℃预变性 3min;94℃变性 45s,58℃退火 45s,72℃延伸 1min,重复上述循环 30 次;72℃延伸 10 min;4℃保温。

1.7.4 PCR 产物的电泳分析

将扩增产物和 Marker3 做琼脂糖凝胶电泳,琼脂糖浓度为 0.8%,两极间电压为 120 v。当指示剂(溴酚蓝)区带迁移到胶长的一半距离时停止电泳,EB 染色。用上海天能科技有限公司的 GIS 凝胶图像分析系统进行成像分析。

2 结果与分析

2.1 导入质粒花朵的结实率及成活率

利用花粉管通道法将质粒导入大豆品种中,统计结果如表 1。由表 1 可以看出,利用花粉管通道法处理导入质粒的花朵总数为 1895 朵,收获种子 698 粒,平均结实率为 36.83%。第二年将 T₀ 代种子播种,总出苗数为 425 株,平均成活率为 60.89%。其平均结实率和平均成活率远远低于非转基因大豆。究其原因,主要有以下三种:一是切除部分花柱对子房造成机械刺激导致死亡;二是 DNA 溶液对子房的刺激导致死亡;三是夏日光照强烈,引起花柱脱水死亡。另外获得的种子有部分呈干瘪状,这可能影响了之后的出苗率。因此,在大豆上利用花粉管通道法进行转基因时,需要选择合适的时机,操作尽量娴熟,减少对柱头造成损伤。在喷施除草剂后平均存活率为 8.24%。

表 1 不同 CaCl₂ 浓度下利用花粉管通道法处理导入 pC3301 花朵的结实率、成活率及存活率

Table 1 Seed-set percentage, seedling percentage and survival percentage gained by conducted pC3301 through pollen tube pathway at different levels of CaCl₂

外源基因 Foreign gene	浓度 CaCl ₂ (mol/L)	导入朵数 No. of flowers treated	豆粒数 No. of seeds achieved	结实率 Seed-set percentage (%)	出苗数 No. of plants achieved	成活率 Seedling percentage (%)	喷施除草剂 存活苗数 No. of survived seedling after served Besta	存活率 Seedling survival percentage (%)
质粒 pC3301	0	368	134	35.87	77	57.46	5	6.49
	0.021	537	191	35.57	114	59.69	6	5.26
	0.0021	489	178	36.40	115	64.61	13	11.30
	0.001	501	195	38.92	119	61.03	11	9.24
合计 Sum		1895	698	36.96	425	60.70	35	8.07

2.2 导入农杆菌菌株花朵的结实率及成活率

利用花粉管通道法将 3 种农杆菌菌株导入大豆品种中,统计结果如表 2。由表 2 知,共转化 1878 朵花,收获 299 粒种子,平均结实率为 15.92%。第二年将 T₀ 代种子播种,总出苗数为 154 株,平均成活率为

20.40%,在喷施除草剂后存活 12 株,平均存活率为 7.79%。此种以花粉管通道法把农杆菌菌株转化大豆的方法以前未见报道过,造成其极低的平均结实率和平均成活率原因,除了切除花柱对子房的刺激,大豆花粉管非常细致使农杆菌菌液很难渗入,还可能因

为农杆菌导入的时间、菌液的浓度等体系尚不完善等,另外农杆菌本身对受伤的花柱就是一种刺激。

表 2 不同菌株农杆菌利用花粉管通道法处理导入质粒花朵的结实率及成活率及存活率
Table 2 Seed-set percentage, seedling percentage and survival percentage gained by conducted *Agrobacterium* through pollen tube pathway

农杆菌菌株 <i>Agrobacterium</i>	导入朵数 No. of flowers treated	豆粒数 No. of seeds achieved	结实率 Seed-set percentage (%)	出苗数 No. of plants achieved	成活率 Seedling percentage (%)	喷施除草剂 存活苗数 No. of survived seedling after served Besta	存活率 Seedling survival percentage (%)
GV3101	579	84	14.51	45	53.57	3	6.67
EHA105	615	102	16.59	53	51.96	5	9.43
LBA4404	684	113	16.52	56	49.56	4	7.14
合计 Sum	1878	299	15.87	154	51.70	12	7.75

2.3 T₀代转化苗的分子检测

对花粉管通道法转化的 T₀ 代苗在喷施除草剂后一周,进行大豆基因组 DNA 的 PCR 检测,花粉管通道法转化 T₀ 代苗的检测结果如表 3,PCR 检测结果见图 2,图 3。表明在被检测的所有 7 个处理中,检测出 25 个植株呈阳性反应,得到了预期的目的片段(557 bp)。检测结果表明,CaCl₂ 浓度为 0.0021mol/L 和0.001mol/L 时,导入效率较高,分

别为 1.64%和 1.40%,可能因为低浓度的 Ca²⁺ 促进了花粉管的萌发,增加了质粒进入子房的几率,而在 CaCl₂ 浓度为 0.021mol/L 时,转化效率较低,只有 0.56%,这可能因为较高浓度的 Ca²⁺ 抑制了花粉管的萌发。以 3 种农杆菌菌株直接转化,得到的转化率极低,只有 0.3%左右,远低于一般方法的转化率,这可能因为把农杆菌通过花粉管通道法转化大豆的体系尚未建立,从而导致花粉管通道法低效。

表 3 花粉管通道法转化 T₁ 代苗的检测结果
Table 3 PCR analysis of transgenic T₁ plants by means of pollen tube pathway

转化质粒 pC3301 pC3301 transformed	导入朵数 No. of flowers treated	PCR 检测 阳性株数 No. of positive plants	转化效率(%) Transformed efficiency	转化农杆菌 <i>Agrobacterium</i> transformed	导入朵数 No. of flowers treated	PCR 检测 阳性株数 No. of positive plants	转化效率(%) Transformed efficiency
CaCl ₂ =0mol/L	368	2	0.54	GV3101	579	1	0.17
CaCl ₂ =0.021mol/L	537	3	0.56	EHA105	615	2	0.33
CaCl ₂ =0.0021mol/L	489	8	1.64	LBA4404	684	2	0.29
CaCl ₂ =0.001mol/L	501	7	1.40				



注:M 为 Marker 3,N 为未转化植株,P 为阳性对照,1~2 为 CaCl₂ 浓度为 0mol/L 时转化株,3~5 为 CaCl₂ 浓度为 0.021mol/L 时转化株,6~13 为 CaCl₂ 浓度为 0.0021mol/L 时转化株,14~20 为 CaCl₂ 浓度为 0.001mol/L 时转化株。
Note:M; Marker 3, N; negative control, P; positive control, 1~2; transformed plants at CaCl₂ = 0mol/L, 3~5; transformed plants at CaCl₂ = 0.021mol/L, 6~13; transformed plants at CaCl₂ = 0.0021mol/L, 14~20; transformed plants at CaCl₂ = 0.001mol/L.

图 2 CaCl₂ 不同浓度下利用花粉管通道法处理导入质粒 T₁ 代苗转化的 PCR 检测结果
Fig.2 PCR result of T₁ plants transformed by pC3301 through pollen tube pathway at different levels of CaCl₂

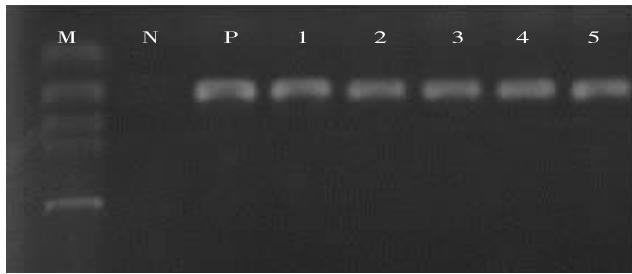


图3 三种农杆菌菌株花粉管通道法转化 T₀ 代苗的 PCR 检测结果

Fig.3 PCR result of T₀ plants transformed by three different varieties of *Agrobacterium* through pollen tube pathway

注: M为Marker 3, N为未转化植株, P为阳性对照, 1为GV3101转化株, 2~3为EHA105转化株, 4~5为LBA4404转化株。

Note: M: Marker 3, N: negative control, P: positive control, 1: transformed plants served by GV3101, 2, 3 transformed plants served by EHA105, 4, 5 transformed plants served by LBA4404.

3 讨论

本试验中,施加微量的 CaCl₂ 可使花粉管通道法转化效率比常规导入方法提高 3 倍左右,表明了外源钙在花粉管通道转基因方法中的重要性, Ca²⁺ 在较低浓度可以促进花粉管生长,增加了外源基因进入子房的几率和速度,提高转化率;而高浓度 Ca²⁺ 可能影响了花粉管内细胞骨架的生理活动,抑制了花粉管的生长,从而降低了转化率^[16]。说明通过施加外源钙花粉管通道法转化大豆可获得较高效的转化率,但同其它许多直接转化法一样,外源基因的整合机理还不清楚,还需要进一步的研究。另外,采用质粒裸露 DNA 的直接转化中,适当的质粒十分重要,因为过大的质粒,其 DNA 完全没有保护,不可避免的要受到一定程度的机械剪切,导入基因的完整性可能因此受到破坏,不能表达甚至难以进行 PCR 检测,会大大影响其转化效率^[17]。本试验首次直接用农杆菌菌株转化外源基因到大豆受体植株内,虽然并没有取得理想的效果,转化效果仅 0.3%左右,但揭示了用农杆菌菌株直接通过花粉管通道法导入外源基因的可行性。致使此种方法转化效率低的原因,可能因为农杆菌导入的时间、菌液的浓度等体系尚不完善,导入后的整合机理尚不清楚,以及被直接涂抹在切割过的花柱上对花柱造成了刺激,导致花朵凋零、结实不饱满而难以发芽出苗。本课题为以后此方面的研究提供了参考。

参 考 文 献

- [1] 朱生伟,黄国存,孙敬三. 外源 DNA 直接导入受体植物的研究进展[J]. 植物学通报, 2000, 17(1):11—16.
- [2] 周光宇,翁坚,龚蓁蓁,等. 授粉后外源 DNA 导入植物的技术

- [J]. 中国农业科学,1988,21(3): 1—6.
- [3] 曾君祉,王东江. 用花粉管途径获得小麦转基因植株[J]. 中国科学(B 辑),1993,23 (3): 256—263.
- [4] 丁明忠,潘光堂,荣廷昭,等. 大豆总 DNA 直接导入法培育优质高蛋白玉米材料研究[J]. 西南农业学报,2001,14(1):8—12.
- [5] 雷勃钧,卢翠华,钱华,等. 导入外源总 DNA 获得大豆早熟新品系[J]. 作物学报,1996,22(2): 173—177.
- [6] 陈国庆,王武源,李忠超,等. 花粉管通道法转基因改良小麦品质的初步研究[J]. 广西植物,25(3): 245—248.
- [7] 闫洪奎,王丹恕,肖永瑚,等. 经水稻花粉管导入外源 DNA 的放射自显影研究[J]. 吉林农业科学, 1998, 1:38—40.
- [8] 龚明,杨中汉,曹中巽. 钙对花粉萌发的启动和对花粉管生长的调节作用(英文) [J]. 北京大学学报(自然科学医药版), 1995,31(2):38—49.
- [9] 龚明,曹中巽. 钙和钙调素对花粉萌发和花粉管生长的调控[J]. 植物生理学通讯, 1995, 31 (5): 321—328.
- [10] Hepler P K. Tip growth in pollen tubes: calcium leads the way [J]. Trends Plant Science, 1997, (2):79—80.
- [11] 田惠桥,远彤. Calcium function in fertilization process in angiosperms[J]. Acta Phytophysiol Sin,2000,26:369—380.
- [12] 盛仙永,胡正海. Ca²⁺、pH 在花粉及萌发花粉管生长中的作用研究进展[J]. 西北植物学报,2005, 25(1):0194— 0199.
- [13] Chee P P. Transformation of soybean (*Glycine max*) by infecting germinating seeds with *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Plant physiology, 1989, 91:1212—1218.
- [14] F. M. 奥斯伯. 精编分子生物学实验指南[M]. 第四版. 北京: 科学出版社,2005: 25—26.
- [15] 杨庆凯,崔岩,周思军,等. 利用花粉管通道技术将抗虫基因导入大豆的研究[J]. 中国油料作物学报, 2002, 24(3):17—20.
- [16] Tian H Q, Kuang A, Musgrave M E, et al. Calcium distribution in fertile and sterile anthers of a photoperiod -sensitive genetic male - sterile rice [J]. Plant,1998,204:183—192.
- [17] 侯文胜,郭三堆,路明. 利用花粉管通道法获得转雪莲凝集素基因(sgna)小麦[J]. 植物学通报,2003, 20(2): 198—204.