

农杆菌介导植酸酶基因转化大豆的研究

刘琦¹, 夏善勇¹, 张军², 段忠卫², 刘鑫磊³, 李希臣¹

(1. 黑龙江省农业科学院生物技术研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 东北农业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150086; 3. 黑龙江省农业科学院大豆研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:以大豆胚尖为受体, 利用农杆菌介导法将来源于泡盛曲霉的植酸酶基因 *phy* 转入黑农 37 和吉林小粒豆中。此法取材方便, 操作简单, 产生嵌合体的可能性低。在筛选培养基中经草胺磷(1.0 mg · L⁻¹) 筛选, 获得抗性植株。对获得的草胺磷抗性植株采用除草剂(10% Basta) 筛查表型鉴定与目的基因、筛选标记基因 PCR 分子检测相结合的方法, 检测结果直观、可信度高。最终获得 5 株阳性植株, 转化率为 0.5%。

关键词:大豆胚尖; 农杆菌; 植酸酶基因

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2011)03-0397-04

Transformation of *Phytase* Gene into Soybean via *Agrobacterium*-mediated Method

LIU Qi¹, XIA Shan-yong¹, ZHANG Jun², DUAN Zhong-wei², LIU Xin-lei³, LI Xi-chen¹

(1. Biotechnology Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086; 2. Life Science College of Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 3. Soybean Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, Heilongjiang, China)

Abstract: The *Phy* gene cloned from *Aspergillus awamori* was transformed into soybean varieties Heinong37 and Jilinxiaoli soybean through *Agrobacterium*-mediated method with soybean embryonic tips as acceptors. The method has advantage of easy operation and lower chimera rate. The regenerated plants were screened by glufosinate-ammonium(1.0 mg · L⁻¹) of medium. The regenerated plantlets resistant to glufosinate-ammonium were detected by combining the PCR analysis of the target gene as well as selective marker gene and the herbicide screening. The result was intuitive and credible. Finally, 5 positive plants were obtained, and the transformation efficiency reached 0.5%.

Key words: Embryonic tips of soybean; *Agrobacterium*; *Phytase* gene

植酸酶是催化植酸及其盐类物质水解成肌醇和磷酸的一类酶的总称^[1], 可以作用于植酸, 并且打破其对钙、铁、锌、镁或与氨基酸的束缚, 转变为可被利用的状态, 能减少饲料中 50% 以上无机磷的添加量, 减少环境磷排泄 30% 以上, 极大地提高饲料安全性和利用率^[2]。

20 世纪 90 年代, 国内外科学家开始致力于将来源于黑曲霉或无花果曲霉的植酸酶基因导入到烟草、油菜、大豆、苜蓿、马铃薯及小麦等植物中进行重组植酸酶表达的研究^[3]。重组植酸酶在烟草、拟南芥等模式植物中的成功表达加快了植酸酶基因导入饲料作物的研究。大豆是动物饲料中蛋白的主要来源, 通过转基因技术将植酸酶基因导入到大豆中, 可以有效地降低大豆体内植酸含量, 提高种子中磷等矿物质元素和蛋白质的利用效率, 改良大豆品质^[4]。

该研究利用大豆成熟种子的胚尖作为外植体^[5], 通过农杆菌介导法将来源于泡盛曲霉的植酸酶基因 *phy* 转入大豆, 为培育磷高效利用转基因大豆新品种提供种质资源。

1 材料与方法

1.1 供试材料

东北地区主栽大豆品种黑农 37 由黑龙江省农科院大豆所提供, 小粒豆由吉林省农科院大豆中心提供。大肠杆菌 DH5 α (含 *phy* 基因) 由大连理工大学生命科学与技术学院提供; 农杆菌菌株 LBA4404 由黑龙江省农科院生物所保存; 抗生素卡那霉素(Kanamycin Sulfate)、利福平(Rifampicin)和硫酸链霉素(Streptomycin Sulfate)均由 SIGMA 公司生产, 头孢噻肟钠(Cefotaxime Sodium)和羧苄青霉素(Carbenicillin Disodium)均为 Solarbio 公司生产。进

收稿日期: 2011-03-23

基金项目: 国家转基因专项资助项目(ZJN04—0402); 黑龙江省农业科学院创新工程资助项目。

第一作者简介: 刘琦(1980-), 女, 硕士, 从事作物生物技术研究。E-mail: liuqi0316@163.com。

通讯作者: 李希臣(1968-), 男, 研究员, 主要从事作物生物技术研究。E-mail: lixichen1968@163.com。

