

GmAOC3 基因转化载体构建及转化大豆的初步研究

宁爱玲,杜海平,喻德跃,王 慧

(南京农业大学 大豆研究所/国家大豆改良中心/农业部大豆生物学与遗传育种重点实验室/作物遗传与种质创新国家重点实验室,江苏 南京 210095)

摘 要:选用内切酶 *Sac* I 和 *Mlu* I 切割目标基因和载体,构建了携带 *bar* 基因的重组载体 pBA002-*GmAOC3*,选用 2 个大豆品种(Jack 和南农 88-1)和 2 种外植体(子叶节和整个子叶节),研究大豆品种和外植体对根癌农杆菌介导的子叶节转化 *GmAOC3* 基因的影响。结果表明:外植体为整个子叶节的大豆品种 Jack 的出芽率和转化率最高,分别为 79.5% 和 2.27%。经 QuickStix PAT/*bar* 基因试纸条检测、目标基因的分子检测和草丁膦抗性鉴定,共得到转 *GmAOC3* 基因的 T₀代阳性株系 3 株,T₁代阳性转基因大豆 6 株,其中 5 株以 Jack 品种为受体的转基因大豆 *GmAOC3* 基因的表 达量均显著高于非转基因植株,荧光定量拷贝数检测结果显示,4 株转基因单株为单拷贝,2 株为双拷贝。

关键词:大豆;丙二烯氧化物环化酶;载体构建;遗传转化;分子检测

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2015.04.0588

Construction of Transformation Vector of *GmAOC3* Gene and Preliminary Study on the Transformation of Soybean

NING Ai-ling, DU Hai-ping, YU De-yue, WANG Hui

(Soybean Research Institute, Nanjing Agricultural University/National Center for Soybean Improvement, Ministry of Agriculture/Key Laboratory for Biology and Genetic Improvement of Soybean (General), Ministry of Agriculture / National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement; Nanjing 210095, China)

Abstract: Allene oxide cyclase (AOC) plays a key role in the synthesis of jasmonic acid, which is an important defense signaling molecular in plant. In this study, we constructed a recombinant vector pBA002-*GmAOC3* with *bar* gene using double enzymes cleavage method (*Sac* I and *Mlu* I) and the recombinant vector was successfully transformed into soybean via *Agrobacterium* transformation system. Two soybean varieties (Jack and Nannong 88-1) and explants (cotyledonary node and whole cotyledonary node) were used to study their effects on the *Agrobacterium*-mediated transformation of *GmAOC3*. The results showed that the whole cotyledonary node of Jack had the highest budding rate (79.5%) and conversion rate (2.27%). Based on the results of QuickStix PAT/*bar* test paper detection, molecular detection of target DNA and Basta resistance test of leaves, we obtained three T₀-generation *GmAOC3* positive transgenic soybean plants and six T₁-generation *GmAOC3* positive transgenic soybean plants, of which five T₁-generation transgenic plants from Jack showed higher expression level of *GmAOC3* than Jack. We also used the fluorescence quantitative PCR to detect the copy number of target gene. Besides two T₁-generation transgenic plants with two copies of *bar* genes, the others contained one copy of *bar* gene. The data in this study would give some references to soybean genetic transformation and the *GmAOC3* transgenic plant obtained in this study could be used in soybean insect resistance breeding in future.

Keywords: Soybean; Allene oxide cyclase; Vector construction; Genetic transformation; Molecular detection

大豆的遗传改良和功能基因组学研究在很大程度上取决于一个有效的转化体系^[1-2]。自 1988 年 Hinchee 等^[3]用农杆菌侵染大豆子叶节获得第一株转基因大豆以来,研究者们不断地通过使用大豆不同的外植体^[4-10]和优化影响转化效率的因素^[11-16]提高了转化率,而应用最广泛的是农杆菌介导的子叶节转化法和基因枪轰击体细胞胚法^[17]。然而,与许多其它植物相比,大豆的转化效率仍然较低,而且转化周期更长,所以需要进一步优化大豆遗传转化的条件。

大豆是我国重要的植物蛋白和使用脂肪的来

源,但在大豆的整个生育期内常常受到各种病虫害的危害,导致产量和品质下降。化学杀虫剂的使用不仅污染环境增加生产成本,而且在长期的使用过程中,害虫产生抗药性,导致恶性循环,因此,通过转化植物内源抗虫基因提高作物抗虫型成为一种快速、经济、环保、有效的害虫防治策略。茉莉酸是一种重要的植物抗虫信号分子^[18]。丙二烯氧化物环化酶(AOC;EC5.3.99.6)是茉莉酸合成途径中最重要酶,决定了茉莉酸分子的立体异构型和生物活性^[19],因而受到广泛的关注。2011 年,本实验室的吴倩从大豆中克隆了 6 个 AOC 基因(*GmAOC1-6*),

收稿日期:2014-02-18
基金项目:国家自然科学基金(31201230);江苏省自然科学基金(BK2012768)。
第一作者简介:宁爱玲(1987-),女,硕士,主要从事大豆基因工程研究。E-mail:futurenal@163.com。
通讯作者:王慧(1977-),女,博士,副教授,主要从事大豆抗虫研究。E-mail:wanghuio@njau.edu.cn。

其中转 *GmAOC3* 基因的烟草植株茉莉酸含量增加, 抗虫性增强^[20]。

在前人研究的基础上, 本研究用双酶切的方法重新构建了携带 *bar* 基因的重组转化载体 pBA002-*GmAOC3*, 通过农杆菌介导的子叶节转化法转化大豆, 研究不同大豆品种 (Jack 和南农 88-1) 和不同外植体 (大豆子叶节和整个子叶节) 对转化效率的影响; 采用 PCR 法、*bar* 试纸条法和草丁膦叶片涂抹法等检测方法, 获得 6 株稳定遗传的阳性转 *GmAOC3* 基因大豆植株。该研究不仅为大豆转基因育种提供借鉴参考, 而且为大豆抗虫育种提供了新的抗性种质资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受体大豆材料 大豆材料 Jack 和南农 88-1 由南京农业大学国家大豆改良中心提供。根据马晓红等^[21]的报道, 分别选取了子叶节和整个子叶节作为遗传转化的外植体。与子叶节相比, 整个子叶节作为外植体保留了两片子叶。

1.1.2 载体及菌株 载体 pBA002 (10 182 bp) 含有 *bar* 基因, 具有草丁膦抗性, 由中国科学院遗传与发育生物学研究所陈受宜研究员惠赠。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 和根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 由本实验室保存。

1.1.3 酶和试剂 限制性内切酶和 T4 连接酶购自 Fermentas 公司, *Taq* DNA 聚合酶购自南京博尔迪生物科技有限公司, DNA 凝胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司, 试剂和抗生素均购自美国 Sigma 公司, QuickStix PAT/*bar* 转基因检测试纸条购自上海佑隆生物科技有限公司, 除草剂 (商品名为 Basta, 主要成分为草丁膦) 购自南京鼎国生物技术有限公司。PCR 检测引物合成和目的基因的测序均由上海立菲生物技术有限公司完成。

1.2 *GmAOC3* 转化载体的构建

运用 Bio. XM 软件分析 *GmAOC3* 基因和 pBA002 载体的 DNA 序列, 选择合适的限制性内切酶 (*Sac* I 和 *Mlu* I), 用 Primer Premier 5 软件设计含酶切位点的扩增引物 (上游引物 5'-TCGACGCG-TATGGCATCATCCTCATCAACC-3', 下游引物 5'-AGCGAGCTCTTAGTCAGTGAAGCCAGCAA-3'), 从载体 pMDC83-*GmAOC3*^[20] 上扩增目的基因 *GmAOC3*。用 *Sac* I 和 *Mlu* I 切割基因和载体, 构建重组载体 pBA002-*GmAOC3*, 用热击法将重组质粒导入农杆菌 EHA105 菌株中。

1.3 农杆菌介导的大豆遗传转化法

农杆菌介导的子叶节转化法参考马晓红等^[21]、

王霞^[22]、Yi 等^[23]的方法略有改动。具体步骤为: 成熟大豆种子经氯气灭菌 6~7 h 后, 接种在萌发培养基 (SG4: 1/2MS 培养基, 5 g·L⁻¹ 蔗糖, 3.5 g·L⁻¹ 植物凝胶, pH5.8) 上, 以发芽 4 d 成熟大豆子叶节和整个子叶节为外植体, 农杆菌共侵染 30 min, 侵染后的外植体在共培养基 (CCM: 1/10 B₅ 培养基, 30 g·L⁻¹ 蔗糖, 3.9 g·L⁻¹ MES, 1.67 mg·L⁻¹ 6-BA, 0.25 mg·L⁻¹ GA₃, 200 μ mol·L⁻¹ 乙酰丁香酮, 154.2 mg·L⁻¹ 二硫苏糖醇, 158 mg·L⁻¹ 硫代硫酸钠, 5 g·L⁻¹ 琼脂糖, pH5.4) 中 25℃ 暗培养 4 d, 之后转入含筛选剂的芽诱导培养基 (SIM: B5 培养基, 30 g·L⁻¹ 蔗糖, 3.9 g·L⁻¹ MES, 1.67 mg·L⁻¹ 6-BA, 50 mg·L⁻¹ 头孢霉素, 500 mg·L⁻¹ 羧苄青霉素, 3~5 mg·L⁻¹ 草丁膦, 3.5 g·L⁻¹ 植物凝胶, pH5.6) 上外植体每隔 14 d 更换培养基, 共诱导 28 d 后, 将外植体转入含有筛选剂的芽伸长培养基 (SEM: MS 培养基, 0.1 mg·L⁻¹ IAA, 0.5 mg·L⁻¹ GA₃, 1 mg·L⁻¹ 玉米素, 50 mg·L⁻¹ 天冬氨酸, 100 mg·L⁻¹ 焦谷氨酸, 75 mg·L⁻¹ 头孢霉素, 500 mg·L⁻¹ 羧苄青霉素, 1~3 mg·L⁻¹ 草丁膦, 3.5 g·L⁻¹ 植物凝胶, pH5.8) 诱导芽伸长, 每隔 14 d 更换培养基, 直至芽伸长至 3~5 cm, 将芽切下, 放入生根培养基 (RM: 1/2 B5 培养基, 30 g·L⁻¹ 蔗糖, 1 mg·L⁻¹ IBA, 75 mg·L⁻¹ 头孢霉素, 500 mg·L⁻¹ 羧苄青霉素, 8 g·L⁻¹ 琼脂糖, pH5.7) 中诱导生根, 生长出健壮的根系的苗移入生长室驯化 7 d 左右, 之后将成活的苗移入温室中。各阶段培养基配方同王霞^[22], 均采用高温 (121℃) 和高压 (0.11 MPa) 灭菌, 激素、抗生素和筛选剂采用 0.22 μ m 过滤灭菌头灭菌, 待培养基冷却到 65℃ 左右时加入到培养基中。大豆培养室温度为 (24 \pm 1)℃, 光周期为 16 h 光照和 8 h 黑暗, 光照强度 7 000 lx。

1.4 转化体的分子鉴定

1.4.1 T₀、T₁ 代转化体的阳性鉴定 T₀ 代大豆幼苗移栽于国家大豆改良中心室内培养室内, 待植株健壮后取叶片进行检测, 包括 *bar* 试纸条检测和 PCR 检测。T₁ 代阳性植株后代种植于南京农业大学牌楼试验田, 采用 *bar* 试纸条法、PCR 法、草丁膦叶片涂抹法进一步鉴定阳性植株。

QuickStix PAT/*bar* 转基因检测试纸条法: 取少量叶片放入 1.5 mL 的离心管中, 用研磨棒将叶片研碎, 加入 500 μ L 的提取液, 搅拌均匀, 将试纸条插入混合液中, 5 min 后观察结果。当试纸条出现 2 条指示带时说明受检植株是阳性植株, 否则为阴性植株。

PCR 法: 用 CTAB 法提取大豆基因组 DNA。根据检测片段的序列设计引物和设置合适的 PCR 扩增程序, 具体如下:

bar 基因引物:*bar*-F:5′ CGAGACAAGCACGGT-CAACTT 3′,*bar*-R:5′ AAACCCACGTCATGCCAGTTC 3′;PCR 反应程序(博尔迪 MIX):94℃/3 min,(94℃/30 s、63℃/30 s、72℃/25 s)10 个循环,(94℃/30 s、59℃/30 s、72℃/25 s)20 个循环,72℃/2 min。

SA(35S-P + *GmAOC3* 部分片段)引物:SA-F:5′ ATGACGCACAATCCCA 3′, SA-R:5′ GCTGT-TATCCCTACCCTC3′;PCR 反应程序(博尔迪 MIX):94℃/3 min,(94℃/30 s、60℃/30 s、72℃/40 s)10 个循环,(94℃/30 s、55℃/30 s、72℃/40 s)20 个循环,72℃/2 min。

AST(35S-P + *GmAOC3* + NOS-T)引物:AST-F:5′ ATGACGCACAATCCCA3′, AST-R:5′ CTCACT-CATTAGGCACCC3′;PCR 反应程序(KOD):94℃/2 min,(98℃/10 s、60℃/30 s、68℃/45 s)36 个循环,68℃/7 min。

大豆 *Actin* 基因引物:AF:5′ GTTCTCTCCTTG-TATGCAAGTG 3′, AR:5′ CCAGACTCATCATAT-TCACCTTTAG 3′;PCR 反应程序(博尔迪 MIX):94℃/3 min,(94℃/30 s、56℃/30 s、72℃/40 s)26 个循环,72℃/2 min。

经 1% 琼脂糖凝胶电泳和凝胶成像系统观察 PCR 扩增情况。

除草剂叶片涂抹法:将 Basta 原液稀释至 25 ~ 400 mg·L⁻¹,以大豆相同部位叶片的主叶脉为分界线,用黑色记号笔标记半片叶子,棉签蘸取草丁膦液体直接擦拭未标记的半片叶子,4 d 后观察叶片的反应,选出合适的草丁膦浓度。按上述方法对转基因植株进行检测。与未涂抹的半片叶片相比,草丁膦涂抹过的半片叶片没有显著改变的受检植株为阳性植株,否则为阴性植株。

1.4.2 T₁代转基因大豆 *GmAOC3* 基因的表达分析
用 Trizol 法提取大豆总 RNA,反转录合成 cDNA 后备用。根据 *bar*、*GmAOC3* 基因序列设计 RT-PCR

引物,检测 *GmAOC3* 基因在转基因植株中的表达情况。

大豆 *Actin* 和 *bar* 基因的检测引物和反应程序、体系同 1.4.1。

GmAOC3 内部引物:AOC3-F:5′AAACCTGCCA-CCACAA 3′, AOC3-R:5′ CACCACTCACAGCAAGA-TA 3′;PCR 反应程序(博尔迪 MIX):94℃/3 min,(94℃/30 s、56℃/30 s、72℃/30 s)26 个循环,72℃/2 min。

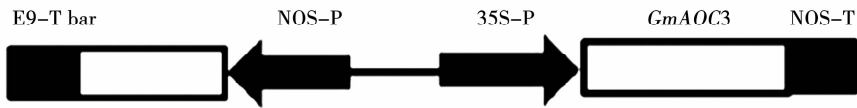
1.4.3 T₁代转 *GmAOC3* 大豆目标基因拷贝数分析

利用绝对定量法检测转基因大豆中外源基因拷贝数,内源参照基因和外源基因标准曲线建立分别选用大豆 *Tubulin* 基因(T-F:5′ GACTACGTCCCTGC-CCTTTG 3′, T-R:5′ AACATTTACCCGGATCAT-TCAAT 3′)和含 *bar* 基因(B-F:5′ TTGAACGCG-CAATAATGGTTT 3′,B-R:5′ GAACTGACAGAACCG-CAACGT 3′)的阳性质粒为标准品,并以稀释的 DNA 为模板,以水为空白对照,非转基因大豆为阴性对照,建立 20 μL 荧光定量反应体系,PCR 反应程序(SYBR[®] Green PCR Master Mix)为:95℃/1 min,(95℃/15 S、60℃/15 s、72℃/45 s)40 个循环,72℃/10 min。经过 SYBR Green 荧光定量 PCR 反应,得到相应标准品 Ct 值。根据 Ct 值与起始模板数的对数值成反比线性关系的原理,制作标准曲线,获得 Ct 值与起始模板数的相关性方程,将样品的 Ct 值代入该方程就可获得目的基因的起始模板数,通过与大豆内源参照基因起始模板数的比较,计算出基因组中外源基因的拷贝数^[24]。

2 结果与分析

2.1 *GmAOC3* 转化载体的构建

根据上述方法构建了植物重组表达载体 pBA002-*GmAOC3*,如图 1 所示。通过双酶切验证,目标基因成功插入表达载体(图 2)。

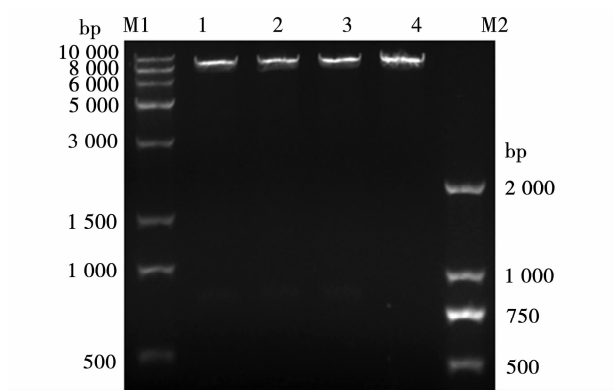


35S-P:花椰菜花叶病毒(CaMV)35S 启动子;*GmAOC3*:*GmAOC3* 的编码区;NOS-T:胭脂碱合成酶基因终止子;NOS-P:胭脂碱合成酶基因启动子;*bar*:膦丝菌素乙酰转移酶基因;E9-T:核酮糖-1,5 二磷酸羧化酶 E9 基因小亚基 3′端序列。

35S-P:Cauliflower mosaic virus 35S promoter;*GmAOC3*: Coding region of *GmAOC3* gene; NOS-T: Nopaline synthase (nos) terminator; NOS-P: Nopaline synthase (nos) promoter; *bar*: Phosphinothricin acetyltransferase gene; E9-T: 3′ sequence of small subunit of rbcS E9 gene.

图 1 双元载体 T-DNA 区结构图

Fig. 1 The T-DNA region of pBA002-*GmAOC3* binary vector



1 ~ 3: 质粒 pBA002-*GmAOC3* 双酶切条带, 大小分别为 1 015和 776 bp; 4: pBA002 质粒酶切结果, 大小为10 129 bp; M1 :100 bp plus DNA ladder; M2 :*Trans2K*[®] DNA marker。
1-3: pBA002-*GmAOC3* double enzyme digestion, 10 159 and 776 bp; 4: pBA002 double enzyme digestion, 10 129 bp; M1 : 100 bp plus DNA ladder; M2 : *Trans2K*[®] DNA marker.

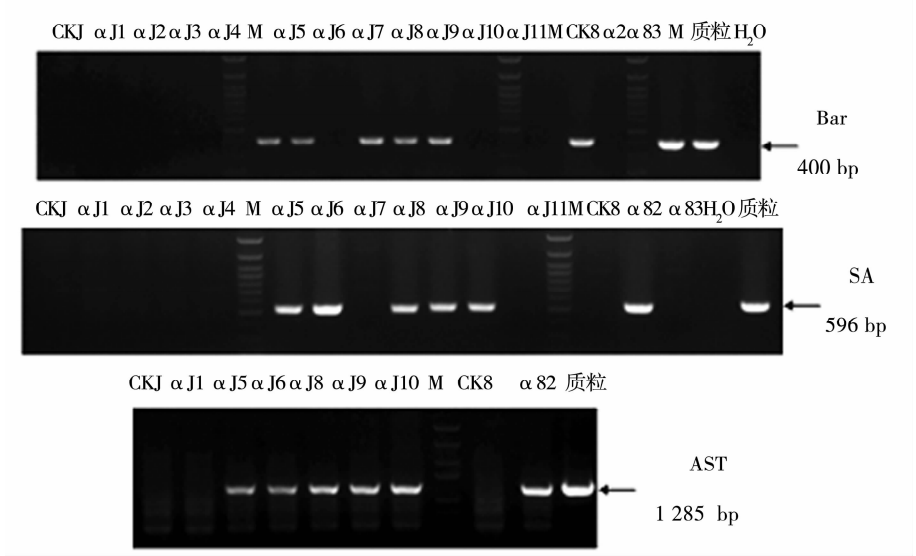
图2 pBA002-*GmAOC3* 质粒双酶切电泳图
Fig. 2 The double enzyme digestion electro phoresis of plasmid of pBA002-*GmAOC3*

2.2 T₀和 T₁代转 *GmAOC3* 大豆的鉴定

2.2.1 T₀和 T₁代转化体的分子鉴定 从 DNA 水平、蛋白质水平以及除草剂抗性三个方面鉴定转 *GmAOC3* 基因的阳性大豆植株。在 DNA 水平, 分别对 *bar* 基因序列 (*bar* 引物)、35S 启动子 + 部分 *GmAOC3* 基因序列 (SA 引物) 以及 35S 启动子 +

GmAOC3 基因 + 终止子序列 (AST 引物) 进行 PCR 扩增, 如图 3 所示, 来自受体 Jack 的转基因后代 αJ5, αJ6, αJ8, αJ9, αJ10 和来自受体南农 88-1 的转基因后代 α82 中均检测目标片段的扩增产物。对 35S 启动子 + *GmAOC3* 基因 + 终止子序列 (AST 引物) 的 PCR 扩增产物进行胶回收、测序, 所得序列与改造的载体序列完全一致。在 PCR 检测的基础上, 进一步采用 QuickStix PAT/*bar* 转基因检测试纸条法检测 *bar* 基因的蛋白产物, 以上 6 个转基因后代中均检测到 *bar* 条带 (图 4)。

针对转基因植株携带 *bar* 基因具有抗草丁膦的特性, 采用叶片涂抹法检测大豆转基因后代对草甘膦的抗性。参考 Paz 等^[25] 和 Xue 等^[26] 的报道, 共设置了 10 个草甘膦浓度梯度, 每一草丁膦浓度重复 2 次以上, 用非转基因植株确定合适的草丁膦筛选浓度 (图 5, 图 6)。从图 5 和图 6 可以看出, 当使用 150 mg·L⁻¹ 的草丁膦筛选浓度时, 大豆叶片既能表现出明显的受害症状又没有影响植株的正常生长, 所以在本研究中选择 150 mg·L⁻¹ 的草丁膦浓度筛选转基因 T₁代植株。如图 7 所示, 经过叶片涂抹草甘膦, 来自受体 Jack 的转基因后代 αJ5, αJ6, αJ8, αJ9, αJ10 和来自受体南农 88-1 的转基因后代 α82 对草甘膦表现出抗性。



M: 100 bp Plus DNA Ladder; CKJ、CK8 为对照 Jack 和南农 88-1; αJ1-αJ11: 转基因 Jack 的 T₁ 代; α82、α83: 转基因南农 88-1 的 T₁ 代。下同。
M: 100 bp Plus DNA Ladder; CKJ、CK8: Jack and Nannong88-1; αJ1-αJ11: T₁ transgenic lines of Jack; α82, α83: T₁ transgenic lines of Nannong 88-1. The same below.

图3 PCR 检测结果
Fig. 3 The results of PCR

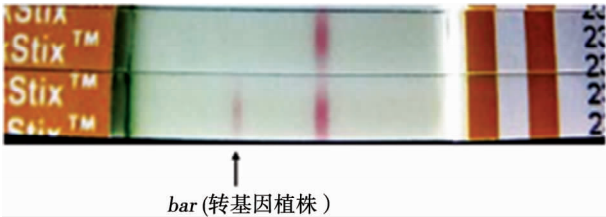


图 4 *bar* 试纸条结果
Fig. 4 The results of *bar* test

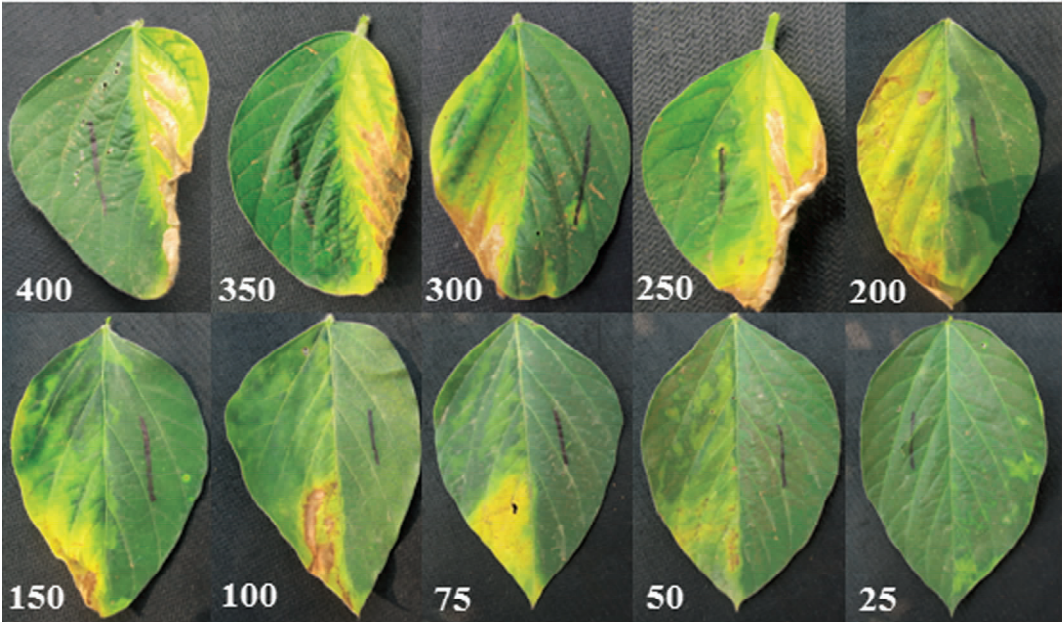


图 5 草丁膦筛选浓度的选择
Fig. 5 The choice of the concentration of glufosinate (Jack, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

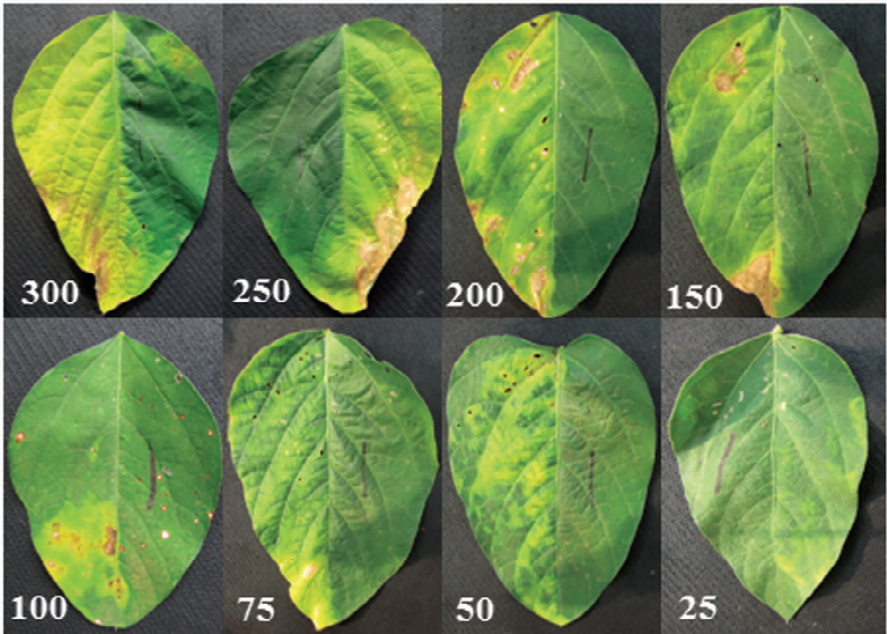


图 6 草丁膦筛选浓度的选择
Fig. 6 The choice of the concentration of glufosinate (Nannong 88-1, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

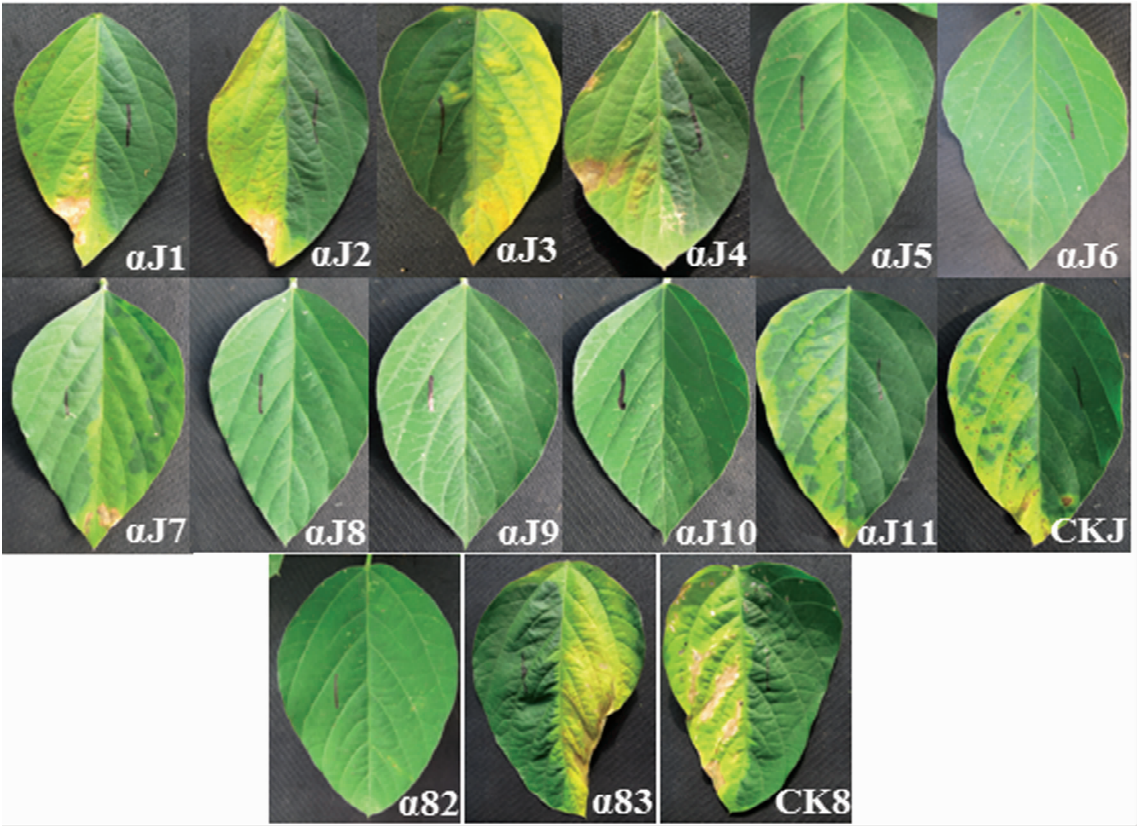


图 7 T₁代转 *GmAOC3* 大豆植株草丁膦抗性检测

Fig. 7 Phosphinothricin leaf paint assay results of the T₁ generation plants

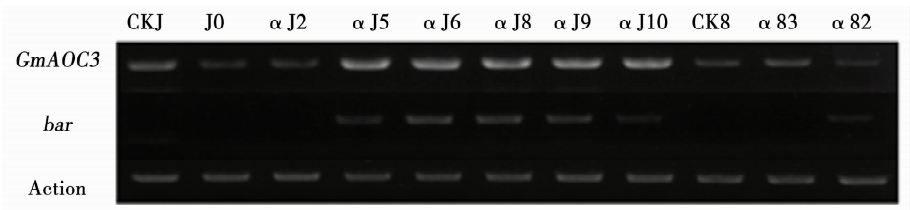
经过一系列的阳性检测,采用农杆菌介导的子叶节转化体系先后得到 T₀代总生根苗 20 株,移栽成活 8 株,经 *bar* 试纸条和 PCR 鉴定为阳性苗 3 株,其中 T₀代 Jack 生根苗 14 株,移栽成活 6 株,阳性苗 2 株,抗性筛选率为 14. 3% (阳性苗株数除以生根苗株数);南农 88-1 生根苗 6 株,移栽成活 2 株,阳性苗 1 株,抗性筛选率为 16. 7% (阳性苗株数除以生根苗株数)。T₁ 代共 13 株,其中 11 株来自受体 Jack, 2 株南农 88-1,经鉴定阳性苗 6 株,其中 5 株来自受体 Jack, 1 株来自受体南农 88-1。

2. 2. 2 T₁代转 *GmAOC3* 大豆相关基因相对表达情况的分析

为了了解转基因植株中相关基因的表达

水平的表达情况,取 6 株 PCR 阳性植株和非阳性植株(分别为对照植株、组培所得的后代植株、转基因植株后代非阳性植株)的叶片,提取总 RNA 做半定量分析。如图 8 所示,所有植株都有 *GmAOC3* 的表达,但来自受体 Jack 的转基因后代 αJ5, αJ6, αJ8, αJ9, αJ10 和来自受体南农 88-1 的转基因后代 α82 除了表达 *GmAOC3* 基因外还表达了 *bar* 基因。

基因的相对表达量分析表明,转基因 Jack 后代的 5 个 T₁代植株 *GmAOC3* 基因的表达量均显著高于非转基因植株(图 9),表明在 35S 强启动子的驱动下,目的基因得到了高效表达。但转基因南农 88-1 植株中 *GmAOC3* 基因的表达量并没有升高。



J0:非转基因组培苗的后代。下同。
J0: The tissue-cultured progeny of non transgenic plant. The same below.

图 8 T₁代转基因大豆 *GmAOC3* 和 *bar* 基因半定量结果

Fig. 8 Semi-quantitative results of *GmAOC3* and *bar* in T₁ transgenic soybean

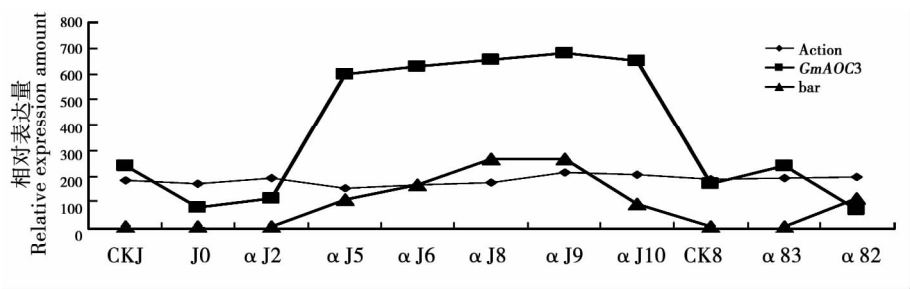


图9 转基因植株 *GmAOC3* 和 *bar* 相对表达情况
Fig. 9 The relative expression of *GmAOC3* and *bar* in transgenic plants

2.2.3 T₁代转 *GmAOC3* 大豆拷贝数的确定 为进一步确定 *GmAOC3* 已经整合到大豆基因组中,同时明确该基因在大豆基因组中整合的拷贝数,对6株PCR检测为阳性的植株进行荧光定量检测。经过SYBR Green 荧光定量PCR反应和计算,把各转基因植株 *bar* 基因的拷贝数结果列入表1。从表1可以看出,4株转 *GmAOC3* 基因的大豆植株 *bar* 基因为单拷贝,2株为双拷贝,为进一步评价 *GmAOC3* 基因的功能提供了材料,增加了新的大豆种质资源。

2.3 大豆不同品种和侵染外植体的再生率及转化效率的差异

本试验选用了2个大豆品种(Jack和南农88-1),分别进行外植体(子叶节和整个子叶节)培养及遗传转化研究。从表2可以看出,品种和外植体影响大豆转基因植株的再生率及转化效率。Jack相对于南农88-1具有更高的再生率及转化效率,此外

整个子叶节相对于部分子叶节作为外植体也具有更高的再生率及转化效率,这与前人得出的研究结论基本一致^[27]。

表1 转基因植株 *bar* 基因拷贝数检测
Table1 The copy number detection of *bar* in soybean transformants

样品编号 Code	拷贝数 Copies	样品编号 Code	拷贝数 Copies
CKJ	0.059	CK8	0.001
αJ5	0.784	α82	1.988
αJ6	1.975		
αJ8	0.982		
αJ9	0.947		
αJ10	0.931		

表2 大豆不同品种和侵染外植体的再生率及转化效率的差异
Table 2 The regeneration rate and transformation efficiency of different soybean varieties and infected explants

品种 Variety	外植体 Explant	侵染外植体数 Number of infected explants	出芽个数 Number of buds	阳性株数 Number of positive plant	出芽率 Bud ratio/%	转化率 Transformation efficiency/%
Jack	子叶节 Cotyledonary node	306	147	1	48.0	0.33
	整个子叶节 Whole cotyledonary node	44	35	1	79.5	2.27
南农88-1 Nannong 88-1	子叶节 Cotyledonary node	338	116	0	34.3	0
	整个子叶节 Whole cotyledonary node	60	35	1	58.3	1.67

出芽率 = (出芽个数/侵染的外植体数) × 100; 转化效率 = (阳性株数/侵染外植体数) × 100^[28]。
Bud ratio = (Number of bud / Number of infected explants) × 100; Transformation efficiency = (Number of positive explants detected / Number of infected explants) × 100^[28].

3 结论与讨论

本研究构建的植物转化载体为 pBA002-*GmAOC3* 具有两个优势:首先,该重组载体携带 *bar* 基因,该基因不仅可以作为转基因植株的选择标记,而且转基因植株获得除草剂的抗性,更利于该转基因植株的推广利用;其次,该重组载体只含有目的基因 *GmAOC3* 和 *bar* 基因,无 *GUS* 和 *gfp* 等额外基因,而且 *GmAOC3* 基因是大豆内源基因^[20],因此获得的转基因植株更容易被人们接受。

转基因技术可打破物种界限,对基因进行定向改造、重组和转移,在解决常规育种技术难以克服的产量、品质、多抗等性状协调改良方面发挥了重要作用。可是由于其低转化效率,大豆转基因一直很困难。本研究通过根癌农杆菌介导法,比较了不同大豆品种(Jack 和南农 88-1)和不同外植体(大豆子叶节和整个子叶节)的出芽率和转化效率,结果显示,在其它条件相同的情况下,就品种而言,Jack 比南农 88-1 出芽率高,更容易转化,褐化现象少,但需要较高的草丁膦筛选浓度;就外植体而言,无论 Jack 还是南农 88-1,整个子叶节的转化效率均高于子叶节,这与马晓红等^[21]的研究结果一致,而且对于经验不足的研究人员,整个子叶节更容易操作。

本实验通过半定量的方法,研究了转基因植株中过表达基因 *GmAOC3* 的相对表达量。从结果可以看出,以 Jack 为受体的 5 个转基因植株,目的基因的表达量均高于非转基因植株,表明在 35S 强启动子的驱动下,目的基因得到了高效表达,但转基因南农 88-1 中目的基因的表达量并没有升高,因此还需要后续的研究分析,进一步确定该基因的功能。

转基因事件的发生会受到许多因素的限制,如表达水平,插入基因的稳定性 and 继承性以及简单的插入事件的识别,而所有的因素都与转基因的拷贝数有关系^[29]。检测外源基因拷贝数,荧光定量 PCR 技术较 Southern blot 等分子杂交方法简便快捷,所需材料少,拥有高通量筛选能力,并有可能在短短几个小时的时间进行含量极低的 DNA 试验样品的测定^[24, 30]。本实验通过荧光定量 PCR 的方法确定了转基因植株中 *bar* 基因的拷贝数,其中大多数为单拷贝,少数为双拷贝,因此可供下一步的研究或者育种利用。

通过前期的研究发现,转 *GmAOC3* 烟草提高了烟草的抗胁迫和抗虫能力,抗虫相关产物增加^[20],

本研究对获得的转 *GmAOC3* 大豆进行了室内分子鉴定和初步的抗虫检测,经过 2 代的鉴定,发现目标基因在转基因品系中稳定遗传,虫荚显著少于对照。但由于材料有限,试验规模较小,因此还需要进一步的试验,对这些转基因后代进行抗虫性状、农艺性状以及其它非生物胁迫抗性的评价,为大豆抗虫育种提供可用的种植资源。

参考文献

[1] Olhoft P M, Flagel L E, Donovan C M, et al. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method [J]. *Planta*, 2003, 216:723-735.

[2] Zeng P, Vadnais D A, Zhang Z, et al. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merril][J]. *Plant Cell Reports*, 2003, 22: 478-482.

[3] Hinchee M A W, Connor-Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer [J]. *Nature Biotechnology*, 1988(6):915-922.

[4] Ko T S, Lee S, Krasnyanski S, et al. Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: *Agrobacterium* strains and orientation of immature cotyledonary explant [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107: 439-447.

[5] Liu H K, Yang C, Wei Z M. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybean using an embryonic tip regeneration system [J]. *Planta*, 2004, 219:1042-1049.

[6] Paz M M, Martinez J C, Kalvig A B, et al. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation [J]. *Plant Cell Reports*, 2005, 25:206-213.

[7] Xue R G, Xie H F, Zhang B. A multi-needle-assisted transformation of soybean cotyledonary node cells [J]. *Biotechnology Letters*, 2006, 28:1551-1557.

[8] Hong H P, Zhang H, Olhoft P, et al. Organogenic callus as the target for plant regeneration and transformation via *Agrobacterium* in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2007, 43:558-568.

[9] Wang G L, Xu Y N. Hypocotyl-based *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max*) and application for RNA interference [J]. *Plant Cell Reports*, 2008, 27:1177-1184.

[10] Devi M K, Sakthivelu G, Giridhar P, et al. Protocol for augmented shoot organogenesis in selected variety of soybean [*Glycine max* L. (Merr.)][J]. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2012, 50 (10):729-734.

[11] Zhang Z Y, Xing A Q, Staswick P, et al. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1999, 56: 37-46.

[12] Olhoft P, Lin K, Galbraith J, et al. The role of thiol compounds

in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells [J]. Plant Cell Reports, 2001, 20: 731-737.

[13] Ko T S, Korban S S. Enhancing the frequency of somatic embryogenesis following *Agrobacterium*-mediated transformation of immature cotyledons of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill][J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2004, 40: 552-558.

[14] Dang W, Wei Z M. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation for soybean for expression of binary insect resistance genes [J]. Plant Science, 2007, 173:381-389.

[15] Liu S J, Wei Z M, Huang J Q. The effect of co-cultivation and selection parameters on *Agrobacterium*-mediated transformation of Chinese soybean varieties [J]. Plant Cell Reports, 2008, 27: 489-498.

[16] Vianna G R, Aragaõ F J, Rech E L. A minimal DNA cassette as a vector for genetic transformation of soybean (*Glycine max*) [J]. Genetics and Molecular Research, 2011, 10(1):382-390.

[17] Yamada T, Takagi K, Ishimoto M. Recent advances in soybean transformation and their application to molecular breeding and genomic analysis [J]. Breed Science, 2012, 61(5):480-494.

[18] Avanci N C, Luche D D, Goldman G H, et al. Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction[J]. Genetics and Molecular Research,2010,9: 484-505.

[19] Ziegler J, Stenzel I, Hause B, et al. Molecular cloning of allene oxide cyclase-the enzyme establishing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonates [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275: 19132-19138.

[20] 吴倩. 大豆丙二烯氧化物环化酶基因(*GmAOC*)家族克隆、进化与功能研究[D]. 南京:南京农业大学,2011. (Wu Q. Clone, evolution and functional study of study *GmAOC3* family [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University,2011.)

[21] 马晓红,姚陆铭,武天龙. 大豆整个子叶节外植体再生体系的建立及与子叶节、胚尖再生体系的比较[J]. 大豆科学, 2008,27(3):373-390. (Ma X H, Yao L M, Wu T L. High frequency plant regeneration from whole cotyledonary node explants and comparison with cotyledonary node and embryonic tip regeneration system in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]) [J]. Soybean Science, 2008, 27(3):373-390.)

[22] 王霞. *GmCBL* 基因转化大豆的初步研究[D]. 南京:南京农业大学,2012. (Wang X. The preliminary research on transferring *GmCBL* gene into soybean [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University,2012.)

[23] Yi X P, Yu D Y. Transformation of multiple soybean cultivarsby-infecting cotyledonary-node with *Agrobacterium tumefaciens* [J]. African Journal of Biotechnology, 2006, 5 (20):1989-1993.

[24] 王育花,赵森,陈芬,等. 利用实时荧光定量 PCR 法检测转基因水稻外源基因拷贝数的研究[J]. 生命科学研究, 2007, 11(4):301-305. (Wang Y H, Zhao S, Chen F, et al. Estimation of the copy number of exogenous gene in transgenic rice by Real-Time fluorescence quantitative PCR [J]. Life Science Research, 2007, 11: 301-305.)

[25] Paz M M, Martinez J C, Kalvig A B, et al. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *grobacterium*-mediated soybean transformation [J]. Plant Cell Reports, 2006, 25: 206-213.

[26] Xue R G, Xie H F. Rapid and efficient selection for transgenic soybean plants with the improved glufosinate selection system [J]. Soybean Science, 2006, 25(4):373-380.

[27] Somers D A, Samac D A, Olhoft P M. Recent advances in legume transformation [J]. Plant Physiology, 2003, 131: 892-899.

[28] Liu H K, Yang C, Wei Z M. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system [J]. Planta, 2004, 219: 1042-1049.

[29] Ingham D J, Beer S, Money S, et al. Quantitative Real-Time PCR assay for determining transgene copy number in transformed Plants [J]. Bio Techniques, 2001(3):132-140.

[30] Bubner B, Baldwin I T. Use of Real-Time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants [J]. Plant Cell Reports, 2004, 23:263-271.