

农杆菌介导法将 *Bt* 基因转入大豆的研究

刘尚前¹, 王 罡², 季 静², 王 萍³

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

摘要 以6个品种大豆体细胞胚为受体, 以 *Bt* 基因为目的基因, 应用根癌农杆菌介导法对大豆进行了遗传转化, 经体细胞胚萌发、生根及壮苗培养和卡那霉素选择培养, 获得了完整的抗性再生苗, 经 PCR、PCR-Southern 和点杂交分析鉴定, 初步证明外源基因 *Bt* 已整合到大豆的基因组中。

关键词 大豆; 体细胞胚; *Bt* 基因; 遗传转化

中图分类号 S565.103.53 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)01-0103-04

PUT *Bt* GENE TRANSFER INTO SOMATIC VIA AGROBACTERIUM TUMEFACIEN

LIU Shang-qian¹, WANG Gang², JI Jing², WANG Ping³

(1. Department of Agriculture Sciences of Hebei North University, Xuanhua 075131; 2. Tianjin University of Agricultural and Biological Engineering, Tianjin 300072; 3. Huaihai Institute of Technology, Marine School, Lianyungang 222005)

Abstract Somatic embryos of 6 different soybean were transformed by *Agrobacterium tumefaciens*. The resistant plants to kanamycin were obtained. 5 positive plants were obtained among them by PCR. These positive plantlets were further analyzed by dot blotting and PCR-Southern blotting. The results demonstrated that the target gene had been transformed into the soybean genome.

Key words Soybean; Somatic embryos; *Bt* gene; Genetic transformation

长期以来, 虫害一直是制约大豆高产、稳产、优质的因素, 传统的防治方法是使用化学杀虫剂, 杀虫剂的长期使用在杀死了害虫的同时, 也杀死了有益昆虫及害虫的天敌, 造成生态平衡的破坏, 不仅给人和动物带来危害, 而且污染环境。随着基因工程的发展, 通过转基因技术将抗虫基因转入大豆, 可能成为提高大豆产量和改善品质的有效途径之一。Hinchee^[1]等首次用农杆菌介导法以子叶为受体, 经不定芽获得大豆转基因植株, McCabe 等^[2]首次用基

因枪法转化大豆未成熟胚的生长点, 获得大豆转基因植株。

本研究以大豆体细胞胚为受体, 以 *Bt* 基因为目的基因, 应用根癌农杆菌介导法对大豆进行了遗传转化, 为大豆基因工程育种提供理论依据和指导。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期: 2005-12-21

基金项目: 本研究由“国家植物转基因技术研究开发与中试基地建设”专项课题(J99-B-001)资助

作者简介: 刘尚前(1972-), 男, 讲师, 硕士, 主要从事作物栽培与遗传育种工作研究。

通讯作者: 王罡教授, 博士生导师。E-mail: Wggt2003@yahoo.com.cn

1.1.1 植物材料、质粒和菌株 大豆品种东农 L13、黑农 40、合丰 25、东农 40、黑农 35、PRO-GRESS 的体细胞胚块,由王萍老师和季静老师提供。

质粒为二元载体 pGBI121S4ABC,由中国农业科学院生物技术研究中心郭三堆实验室构建和提供,含有 *Bt* 基因。带有卡那霉素抗性筛选标记。

实验所用农杆菌菌株为 LBA4404,由周思军先生提供。

1.1.2 培养基 基本培养基为 MS,工程菌 LBA4404 的培养基用 YEP 培养基,重悬培养基和共培养基培养基中加入 50~100 μ mol/LAS,萌发培养基为 MS 附加有一定浓度的卡那霉素和适宜的抑菌剂头孢霉素,壮苗培养基为 MS。

1.2 方法

1.2.1 抗性筛选标记卡那霉素浓度的确定实验

将不同基因型大豆的体细胞胚团块(直径 3mm 左右),不经过农杆菌侵染,直接接种到含有不同浓度卡那霉素的继代培养基上,每 15~20d 转接一次,1~2 个月以后,调查结果,确定其适宜的筛选浓度。卡那霉素浓度设 7 个水平,分别为 0、12.5、25、50、100、200、400mg/L。

1.2.2 遗传转化方法与步骤 实验采用农杆菌介导法,将球形期体细胞胚团块直径 3mm 左右,每个品种 50 块,放到含有甘露糖的预培养培养基中预培养 2.5~3.5d 后,侵入预备好的农杆菌感染液中(OD₆₀₀=0.3~0.5)中侵染 15min 中,然后共培养 3d,再转移到含有 50~300mg/L 头孢霉素和 1.2.1 所确定的适宜浓度卡那霉素筛选培养基上进行选择培养两个月,然后转移到萌发培养基中,直到长成再生抗性小植株,再转入壮苗培养基中培养。最后直至移栽成活。

1.2.3 分子检测 按照王关林^[3]的 SDS 方法提取植物基因组 DNA,并进行 PCR、PCR-Southern 杂交、点杂交分子检测。

2 结果按与分析

2.1 选择压力卡那霉素浓度的确定实验

2.1.1 卡那霉素浓度对不同基因型体细胞胚团块生长的影响 实验中发现刚加入卡那霉素时,绿色的五种基因型体细胞胚团块颜色更绿,随着时间的延长,有些体胚开始白化,然后再逐渐褐化,随着

时间的延长,褐化增加。不同浓度的卡那霉素对五种基因型体细胞胚团块褐化率的影响结果见图 1,不同基因型体细胞胚对卡那霉素敏感性差异显著($F=103.875>F_{0.05}=2.51$)。东农 40 对卡那霉素的反应最敏感,在卡那霉素浓度 50mg/L 时,褐化率达到 50%;黑农 40 对卡那霉素的反应不敏感,在卡那霉素浓度 100mg/L 时,褐化率达到 50%;东农 L13、黑农 35 和合丰 25(三者无差异)对卡那霉素的反应介于上述基因型之间,在卡那霉素浓度 75mg/L 时,褐化率达到 50%。因此,以卡那霉素作为筛选标记时,应该注意不同基因型对卡那霉素的反应敏感的差异。以上实验表明,以大豆体细胞胚作为转基因的受体材料时,最初的选择剂浓度为 100mg/L。此时褐化率为 80%。

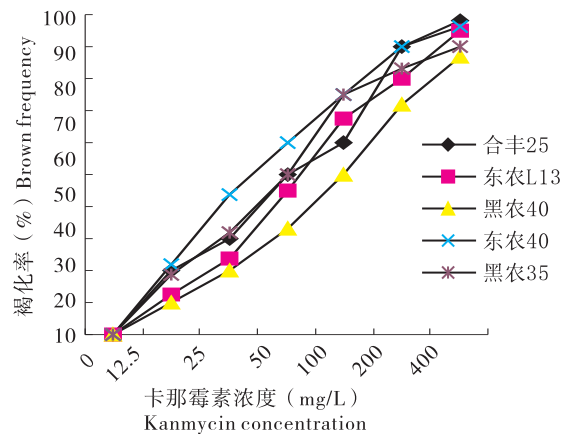


图 1 卡那霉素浓度对不同基因型体细胞胚团块褐化率的影响

Fig. 1 The effect of kanmycin concentration on brown frequency of embryo with different genotypes

表 1 卡那霉素对不同基因型体细胞胚块直径大小(mm)的影响

Table 1 The effect of kanmycin on diameter of embryo with different genotypes

基因型 Genotype	卡那霉素浓度(mg/L) Kanmycin concentration						
	0	12.5	25	50	100	200	400
黑农 40 Heinong 40	8.0	5.0	4.0	3.0	3.0	2.5	2.0
东农 L13 Dongnong L13	8.0	4.5	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0
黑农 35 Heinong 35	7.5	5.5	5.0	5.0	4.6	4.2	3.8
东农 40 Dongnong 40	8.0	7.8	7.0	6.0	5.3	4.8	4.0
合丰 25 Hefeng 25	6.5	5.8	5.2	5.0	4.6	4.0	3.1

2.1.2 卡那霉素浓度对不同基因型体细胞胚体积

的影响 结果见表 1。可以看出,随着卡那霉素浓度的增大,不同基因型大豆体细胞胚团块的体积增殖变小,可见卡那霉素对大豆体胚的生长有抑制作用。实验中观察到黑农 35 在卡那霉素浓度大于 50mg/L 时全部褐化,直径增殖不大;合丰 25、黑农 40 在卡那霉素浓度大于 100mg/L 时,直径 3mm 左右;东农 40 在卡那霉素浓度大于 15mg/L 增殖比较大,但是全部褐化;东农 L13 在卡那霉素浓度大于 100mg/L 时直径小于 3mm 且全部褐化。综合上述,在大豆的遗传转化中,筛选剂卡那霉素适宜的浓度为 50~100 mg/L。

2.2 转化及抗性植株的获得

农杆菌侵染后的大豆体细胞胚,在共培养基上经过 2~3d 的培养,经过连续三个月的筛选,得到抗性体细胞胚。然后,转入萌发培养基得到抗性子叶期胚,有正常和不正常的;长成小苗后再转入壮苗培养基继续筛选,一些抗性体细胞胚能够萌发,形成抗性植株;而另一些抗性体细胞胚不能够萌发、生根,随着时间的延长逐渐变白死亡;还有一些植株无根,逐渐变白死亡;一部分抗性植株移栽后成活。

2.3 PCR 检测

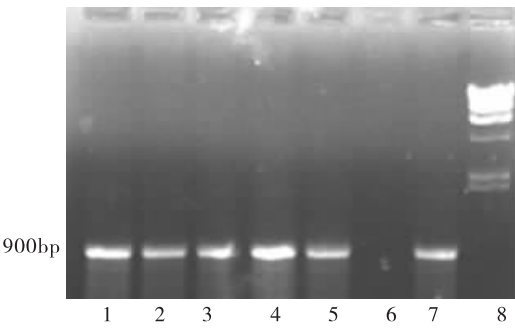
取成活抗性植株叶片,提取基因组总 DNA,以其为模板,用 *Bt* 基因 5'端和 3'端引物进行 PCR 扩增。以未转化大豆植株作阴性对照,以质粒为阳性对照,共得到 5 株阳性植株 DNA 都扩增到与质粒扩增产物相同的分子量为 900bp 的片段,而对照植株则没有扩增到上述片段(见图 2)。总的检测结果见表 2。初步确定已将 *Bt* 基因转移到大豆中。

表 2 抗性植株再生及转化频率

Table 2 Frequency of transformation and reproduce for resistant plant

基因型 Genotype	抗性植株 Fastness plant	阳性植株 Masculine plant	阳性率(%) Masculine frequency
东农 L13 DongnongL13	103	2	1.94
黑农 40 Heinong 40	90	1	1.11
Progress	65	1	1.54
合丰 25	60	1	1.67
Hefeng25			
东农 40	45	0	0
Dongnong 40			
黑农 35	37	0	0
Heinong 35			

注:阳性率(%)=阳性植株数÷抗性植株数×100%
Note:Masculine frequency(%)=No. of masculine plant÷No. of resistant plant×100%



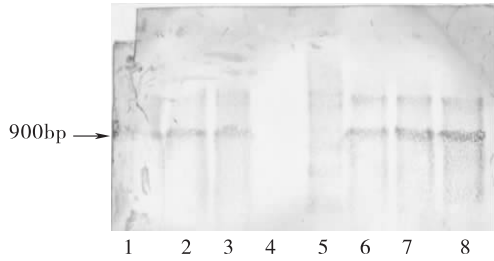
1、2、3、5、7 为阳性植株 6 为未转化植株
4 为阳性对照 8 为 DNA/EcoRI+HindIII

1、2、3、4、5、7Masculine plant
6、Non-transformed plant
4、Masculine check
8、DNA/EcoRI+HindIII

图 2 在卡那霉素抗性大豆植株中 *Bt* 基因的 PCR
Fig. 2 PCR identification of resistant plant

2.4 PCR-Southern 杂交检测

对大豆苗进一步进行 PCR-Southern 杂交检测(见图 3),结果表明 PCR 阳性植株与质粒 DNA 扩增片段在 900bp 处有杂交信号,而非转化植株则没有杂交带,进一步证明外源基因 *Bt* 已经整合到大豆的染色体基因组中。



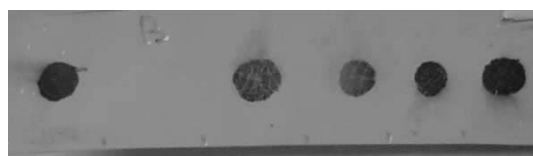
1、2、3、6、7 为阳性植株 5 为 Marker(DGL2000)
4 为未转化植株 8 为阳性对照

1、2、3、6、7Masculine plant
5、Maker
4、Non-transformed plant
8、Masculine check

图 3 转基因植株的 PCR-Southern
Fig. 3 PCR-Southern identification of transgenic plant

2.5 转基因植株的点杂交

取 PCR 扩增阳性植株 DNA 进行点杂交,如图 4 所示。结果表明,PCR 阳性植株 DNA 能够与探针发生特异性结合,染色后均出现紫蓝色杂交信号,而非转化植株 DNA 则杂交后没有杂交信号。初步确定目的基因已整合到大豆染色体基因组中。



1 2 3 4 5 6

1 为阳性对照 2 为未转化植株

3、4、5、6 为阳性植株

1、Masculine check

2、Non-transformed plant

3、4、5、6 Masculine plant

图 4 转基因植株的斑点杂交

Fig. 4 Dot blotting cross of transgenic plant

3 讨论

在植物遗传转化中抗生素的使用浓度受植物材料和农杆菌等因素的限制,由于抗生素对外植体的生长有负作用,因此确定其使用的最低浓度,在大豆转化中是十分重要的。实验表明,大豆体细胞胚对卡那霉素的敏感性在基因型间存在显著差异,而且大豆体细胞胚对卡那霉素反应迟钝,可能是由于大豆本身对卡那霉素有内源抗性。王萍等^[4,5]的研究也表明,同一基因型大豆而所选用的外植体部位不同,比如子叶、子叶节、胚轴、成熟胚,甚至植株对卡那霉素的敏感性也不同,因此,在以卡那霉素作为选择标记时,不同的基因型、不同的外植体应使用不同的筛选浓度。

本实验用农杆菌法得到 5 株大豆阳性植株。这说明在实验中得到了大量假转化体。所谓假转化体即指在选择培养基上形成的植株,没有整合进外源基因却逃逸了选择压力的影响。假转化体的产生是目前遗传转化中比较普遍的现象^[7]。形成假转化体的原因主要有四个方面(1)外植体细胞暂时表达外源选择抗性基因,从而为其他非转化细胞提供了一道屏障,逃避了选择压力的影响而继续分裂分化;(2)大豆体细胞胚的某些表层细胞稳定表达外源选

择抗性基因,降低了其周围培养基中的卡那霉素浓度,为其他一些非转化细胞提供了一道屏障,逃避了选择压力的影响而继续分裂分化;(3)大豆可能对选择剂具有很高的内源抗性,而形成假转化体。(4)大豆的选择压力加的太迟或太少,致使非转化细胞分裂分化。

在转化中发现,球形期大豆的体细胞胚用农杆菌浸染后,在继代筛选中褐化严重;王昱等^[6]研究表明,大豆基因型对根癌农杆菌菌株存在敏感性。因此,选用其他菌株或用其他的转化方法对大豆的体细胞胚进行遗传转化有可能更好。

本实验所用的材料是继代 5~8 次的,转化率较低,可能与体细胞胚的感受状态及其分化能力下降有关,但是继代次数越多,细胞是否会发生变异,以及是否影响再生率和转化率有待于进一步研究。要提高转化频率,一方面要改进组织培养系统,另一方面可考虑增加一些处理因素。

参 考 文 献

- [1] Hinchee Maw, DVConner Ward, Ca Newell, et al. Production of transgenic soybean plants using agrobacterium — mediated DNA transfer [J]. bio/technol. 1988, 6(91): 2—5.
- [2] McCabe DE, WF Swain, BJ Martinell, et al. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration [J]. bio/technol. 1988, 6(92): 3—6.
- [3] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 386—389.
- [4] 王萍, 吴颖, 何娜, 等. 抗生素对农杆菌抑制的效果和大豆外植体诱导的影响 [J]. 东北大学学报自然科学版. 遗传学研究专辑, 2000, 11: 39—41.
- [5] 王萍, 吴颖, 季静, 等. 抗生素对大豆愈伤组织的诱导和生长的影响 [J]. 遗传, 2001, 23(4): 321—324.
- [6] 王昱, 季静, 王萍, 等. 大豆基因型对根癌农杆菌菌株敏感性的研究 [J]. 遗传, 2002, 24(2): 297—300.
- [7] 贾士荣. T—DNA 转移机理 [J]. 植物生理学通讯, 1994, 30(4): 306—311.