

密级：

论文编号：

# 中国农业科学院 博士学位论文

基于水稻全长 cDNA 的大豆种质创新技术体系  
的构建

**Construction of Technical System for Soybean Germplasm**

**Enhancement based on Rice Full-length cDNA**

博士研究生：马丽萍

指导教师：张辉 研究员

申请学位类别：理学博士

专          业：生物化学与分子生物学

研究  方  向：植物抗逆分子生物学

培  养  单  位：研究生院

作物科学研究所

提交日期 2006 年 12 月

Secrecy:

No.

**Chinese Academy of Agricultural Sciences**  
**Ph.D Dissertation**

**Construction of Technical System for Soybean Germplasm**  
**Enhancement based on Rice Full-length cDNA**

Ph.D Candidate : Liping Ma

Advisor : Hui Zhang

Major : Biochemistry and Molecular Biology

Specialty : Molecular Biology of Stress Tolerance

Chinese Academy of Agricultural Sciences

December 2006

# 独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名: 马丽萍

时间: 2006年 10月 19日

# 关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

**(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)**

论文作者签名: 马丽萍

时间: 2006年 10月 19日

导师签名: 林功

时间: 2006年 10月 19日

## 论文评阅人、答辩委员名单

论文题目	基于水稻全长 cDNA 大豆种质创新技术体系的构建				
论文作者	马丽萍	指导教师	张辉	培养单位	中国农科院作物科学所

	姓名	职称职务	导师类别	单位	专业
评阅人	张相歧	研究员	博士生导师	中国科学院遗传发育所	分子生物学
	于嘉林	教授	博士生导师	中国农业大学	分子生物学
	马有志	教授	博士生导师	中国农科院作物科学所	分子生物学
答辩主席	王国英	教授	博士生导师	中国农业大学	分子生物学
答辩委员	魏景芳	教授	博士生导师	河北科技大学生物技术学院	分子生物学
	瞿礼嘉	教授	博士生导师	北京大学生物技术学院	分子生物学
	曹小凤	研究员	博士生导师	中国科学院遗传发育所	分子生物学
	唐赛君	教授	博士生导师	中国农业大学	分子生物学
	李立会	研究员	博士生导师	中国农科院作物科学所	作物种质资源
	黎裕	研究员	博士生导师	中国农科院作物科学所	分子生物学
答辩时间与地址	2006 年 10 月 17 日下午 3 : 00 中国农科院作科所南库一楼会议室				
记录人员	韩敬花 副研究员 中国农科院作物科学所				

## 英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文名称
bp	base pairs	碱基对
DNA	DeoxyriboNucleic Acid	脱氧核糖核苷酸
EB	Ethidium Bromide	溴化乙锭
kb	kilo-bases	千碱基对
6-BA	6-benzylaminopurine	6-苄氨基嘌呤
NAA	Naphthylacetic acid	萘乙酸
IAA	Indolacetic acid	吲哚乙酸
IBA	Indolebutyric acid	吲哚丁酸
GA	Gibberellic acid	赤霉素
Asn	Asparagine	天冬酰胺
Gln	Glutamin	谷氨酰胺
Cb	Carbenicillin	羧苄青霉素
As	Acetosyringone	乙酰丁香酮
Cef	Cefotaxime	头孢霉素
Bt	Bacillus thuringiensis	苏云金杆菌
CTAB	Cetyl Triethyl Ammonium Bromide	十六烷基三乙基溴化氨
<i>GUS</i>	<i>β-glucuronidase</i>	β-葡萄糖醛酸糖苷酶
<i>NPTII</i>	Neomycin phosphotransferase	新霉素磷酸转移酶
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
RT-PCR	Reverse transcription - Polymerase chain reaction	反转录聚合酶链式反应
SDS	Sodium lauryl sulfate	十二烷基硫酸钠
T-DNA	Transferred DNA	转移 DNA
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫法
Rif	Rifampicin	氯福平
rpm	Rounds per minute	每分钟转数
PEG	Polyethylene Glycol	聚乙二醇
min	Minute	分钟
h	Hour	小时
ml	Milliliter	毫升
μl	Microliter	微升
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素

## 文中图表目录

图 1-1 全球转基因植物种植趋势( Global area of transgenic plants area ).....	8
图 1-2 T-DNA 转化植物基因组示意图( T-DNA transfer into the plant's genome ).....	11
图 3-1 SMART 技术流程图( Flow chart of BD SMART technology ).....	39
图 3-2 pGEM-T easy 载体结构图( Structure of pGEM-T easy vector ).....	41
图 3-3 质粒 DNA pBI121 的单酶切位点示意图( The single restrictive site map of pBI121 ).....	44
图 3-4 表达载体构建流程图( Flowchart of expression vector construction ).....	47
图 3-5 总 RNA 和 mRNA 的变性琼脂糖凝胶电泳 ( Testing of total RNA and mRNA after electrophoresis in denatured agrose gel ).....	48
图 3-6 水稻 cDNA 电泳检测 ( Electroporesis of rice cDNA ).....	49
图 3-7 蓝白斑筛选( blue and white ( <i>Lac Z</i> ) selection ).....	49
图 3-8 菌液 PCR 结果 ( Single clone PCR result ).....	50
图 3-9 质粒 pBI121 双酶切鉴定结果( The result of plasmid pBI121 by double diges ).....	50
图 3-10 重组质粒 pBI121 菌液 PCR 结果( The result of single clone PCR of recombinated plasmid DNA pBI121 ).....	51
图 3-11 重组质粒 pBI121 酶切结果( The result of recombinated plasmid DNA pBI121 digested ).....	51
图 4-1 大豆外植体生根诱导 ( Rooting induction of soybean explants ).....	60
图 4-2 大豆再生植株( Regenerated plant let of soybean ).....	60
图 5-1 得到的再生植株 ( Regenerated plants of this system ).....	62
图 5-2 转化植株的 <i>GUS</i> 检测( <i>GUS</i> test of transformants ).....	64
图 5-3 转基因大豆基因组 DNA 质量检测 ( Genome DNA quality in ransgenic soybean ).....	64
图 5-4 转基因大豆 <i>NPT</i> 基因 PCR 检测( PCR detecting of <i>NPT</i> in transgenic soybean ).....	65
图 5-5 转基因大豆 <i>NPT</i> 基因 RT-PCR 检测( RT-PCR screening of <i>NPT</i> in transgenic soybean ).....	65
图 5-6 大豆转基因株系 Southern 杂交( Southern blotting in transgenic soybean ).....	66
图 5-7 大豆转基因株系 Southern 点杂交( Dot-Southern blotting in transgenic soybean ).....	66
表 1-1 50 ~ 70 年代我国小麦育种起巨大作用的种质简介 ( Introduction of wheat important germplasm in breeding of 50 ~ 70 ).....	4
表 1-2 传统种质创新技术简表 ( Tradional techniques for germplasm enhancement ).....	7
表 1-3 几种主要转基因技术 ( Several main transgene techniques ).....	9
表 1-4 农杆菌毒蛋白的功能( Functions of virulence proteins in <i>Agrobacterium</i> ).....	10
表 1-5 农杆菌菌株 ( <i>Agrobacterium</i> strains ).....	12
表 1-6 1961-2004 年世界大豆主产国单产水平比较 ( Comparasion of soybean yield among major producing countries during 1961-2004 ).....	22
表 1-7 大豆遗传转化的主要成果 ( The main achievements of soybean transformation ).....	23
表 2-1 大豆材料( Soybean cultivars ).....	27
表 2-2 水稻抗逆材料( Rice with stress tolerance ).....	27
表 2-3 试验所用的试剂、酶和试剂盒 ( Reagents, enzymes and Kits ).....	28
表 4-1 大豆子叶节发芽培养基中 6-苄氨基嘌呤的优化 ( Optimization of 6-BA in GM medium for soybean cotyledonary node ).....	57
表 4-2 诱导培养基中 6-苄氨基嘌呤的优化 ( Optimization of 6-BA in induction medium ).....	58
表 4-3 诱导培养基中吲哚丁酸的优化( Optimization of I-BA in induction medium ).....	58
表 4-4 诱导培养基中头孢霉素浓度的优化 ( Optimization of Cef concentration in induction medium ).....	59
表 4-5 三个大豆品种转化率( Transformation efficiency of 3 soybean cultivars ).....	59
表 4-6 不同培养条件对转化率的影响( Effect of co-cultivation condition on transformation efficiency ).....	61
表 4-7 三种转化系统的综合比较( Comprehensive comparasion among 3 transformation systems ).....	61

# 摘要

种质创新是作物种质资源有效利用的前提和关键，是顺利开展作物遗传育种工作的基础和保证。50多年来，我国作物种质创新在促进农业新品种更新换代、提高粮食产量、保障我国的粮食安全等方面做出了巨大贡献。大豆是人类食用油和蛋白质的主要来源，而普通栽培大豆遗传基础过于狭窄、传统种质创新周期过于漫长，难以满足大豆育种的需求。此外，国外对基因的专利保护更是影响了我国大豆转基因育种的进程。因此，改善现有的大豆种质创新技术，不断提高大豆种质创新效率，将是缓解作物种质资源相对贫乏与育种需求不断增大之间矛盾所需解决的首要问题。

本研究借助转基因技术的原理和方法，在获得了高质量水稻全长 cDNA 的前提下，开展了高通量转化表达载体的构建以及农杆菌介导大豆转化体系的优化等方面的研究，并最终构建了基于水稻全长 cDNA 的大豆种质创新技术体系。对转基因大豆植株的组织化学检测及分子生物学的检测结果证明了该种质创新技术体系的可行性。大豆种质创新技术体系的建立为农作物种质创新突破国外基因专利保护，充分发挥植物转基因技术在种质创新中的应用潜力以及实现优异农艺性状的跨种、属间的基因交流提供了全新的思路。本研究取得的主要研究结果如下所述：

1. 高质量水稻全长 cDNA 的获得。本研究以抗逆性水稻品种靖粳 7 号、合系 15 号、珍珠 42、辽盐 16、旱稻 277、及旱稻 502 为材料，得到了不同时间点混合的水稻抗旱、耐盐、耐冷胁迫处理下的总 RNA，利用 SMART 技术合成水稻全长 cDNA，利用 pGEM-T easy 载体试剂盒克隆所得水稻 cDNA，单克隆菌液 PCR 扩增结果表明所得水稻 ds cDNA 片段平均长度为 900bp，插入片段大小分布在 0.3 ~ 2kb。

2. 携带不同大小水稻 cDNA 高效表达载体的构建。经过片段分级的水稻 cDNA 采用平末端连接和 T-A 连接两种方案分别与具有相应末端的双元表达载体质粒 DNA 连接并转化农杆菌，制备含有连接着水稻不同大小 cDNA 表达载体的工程菌液，用于农杆菌介导的大豆遗传转化。对平末端连接和 T-A 连接两种连接效果的鉴定结果显示得到了连接有外源水稻 cDNA 的质粒表达载体，连接效率为 60% ~ 75%，连接效率较低，有待改进。

3. 农杆菌介导的大豆高效遗传转化体系的建立。选用了 3 个大豆栽培品种中品 661、垦农 18 和绿 75，在已有研究基础上，本文首次探索了介于子叶节和胚尖之间的新的外植体类型，即带有 1 片子叶的胚尖，该方法大大缩短了试验流程，而且此转化技术体系的再生率达 90% 以上（中品 661 为 95%；垦农 18 为 93%；绿 75 为 90%），高于子叶节的 50% 和胚尖的 70%；分子检测结果表明转化效率高达 10%（垦农 18）。因此，本研究建立的大豆农杆菌介导的转化技术体系较前人的更加快速、高效，将是从事农杆菌介导的大豆转基因、突变体构建等基因组学研究强有力的技术平台。

4. 新型大豆种质创新体系的验证。将连接有水稻不同全长 cDNA 的载体转化农杆菌后，借助于本研究初步建立的农杆菌介导的大豆新型外植体遗传转化技术体系，获得了 500 多株大豆转基因

因再生植株。通过对大豆再生植株的组织化学GUS检测、PCR及Southern杂交等分子生物学检测,结果表明水稻cDNA已经转移到了大豆基因组中,证明了本研究所探索的基于水稻全长cDNA的大豆种质创新技术体系是可行的。

5. 与传统的种质创新技术相比,本研究构建的基于水稻全长 cDNA 的大豆种质创新技术体系具有如下的优点:(1) 外源基因不受基因专利的限制:本技术体系所需的外源基因直接来自水稻全长 cDNA,不必知道所转基因的序列,突破了国外基因专利的壁垒;(2) 最大限度地突破物种间的生殖隔离:利用转基因技术的原理和方法使得种质创新不仅可以在不同科、族间,甚至可以打破动植物间的界限而进行,拓宽了优异基因应用领域;(3) 提高了种质创新的效率:以往的植物转基因过程中,一次转基因事件只能完成 1~2 个基因的转移,该技术体系是直接转移所得水稻全长 cDNA“基因池”,实现了植物转基因的高通量转化;同时,该技术体系省略了费时、费力的基因克隆步骤。

**关键词:** 种质创新; 全长cDNA; 水稻[*Oryza sativa* (L.)]; 转基因; 大豆[*Glycine max* (L.) Merrill]

# Abstract

Crop germplasm enhancement is the key factor for effective utilization of germplasm resource and the basis for breeding project. During the past 50 years, crop germplasm enhancement had played important role on agricultural cultivars renewal, crop yield increasing and food security etc. Common soybean is the main source of vegetable oil and protein for human being, but its narrow genetic background and longer cycle for germplasm enhancement was difficult to meet the requirement of soybean breeding. In addition, gene patent protection affected the progress of soybean transgenic breeding in our country. So, developing a new type of technique on soybean germplasm enhancement is important to increase efficiency of soybean enhancement and meet the need of soybean breeding.

In this study, based on transgenic technique, a new type of soybean germplasm enhancement technique was developed with synthesis of rice full-length cDNA, construction of effective expression vector and optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation system. Examining results of his-chemical and molecular biology for transformed soybean plantlets showed that this technique system was feasible on soybean germplasm enhancement. So, this technique developed provided us a brand-new approach to break through gene patent protection and made excellent agronomic trait genes exchange among different species and generas. The main research results were showed as following:

1. Obtaining high quality rice full-length cDNA. In this study, total RNA of rice varieties Jingjing7, Hexi15, Zhenzhu42, liaoyan16, Handao277 and Handao502 expressed in different period were isolated after treatment of drought, salt and cold stress, respectively. Rice full-length double strand cDNAs were reverse transcribed from mRNA by SMART technique and were cloned by pGEM-T easy vector. PCR results indicated that the size of insert cDNA fragments ranged from 0.3kb to 2kb with average size of 900bp.

2. Construction of powerful expression vector with different size of rice full-length cDNA. Rice full-length cDNA were ligated to binary expression vectors through blunt-ended and T-A ligation methods respectively, and then were transformed into *Agrobacterium tumefaciens* which was ready for soybean gene transformation. Detect results showed that these two ligation strategies were feasible with 60% ~ 75% ligation ratio, although the ligation efficiency was low.

3. Construction of *Agrobacterium*-mediated soybean transformation system. A new type of explant was explored for the first time, which was composed of one embryonic tip and one cotyledon of soybean using 3 cultivars of Zhongpin 661, Kennong 18 and Lv75. The regeneration efficiency was more than 90% with Zhongpin661 95%, Kennong18 93% and Lv75 90%, which was higher than that of cotyledonary-node (50%) and embryonic tip (70%). The results showed that the transformation efficiency of Kennong 18 was 10%, and indicated that this new transformation system was a powerful technical platform for soybean genomic study in *Agrobacterium* -mediated transformation and construction of mutants libraries.

4. Examination of new type of germplasm enhancement: different rice genes ligated to vector were transferred into soybean by primarily constructed *Agrobacterium tumefaciens*-mediated

transformation system and more than 500 transformed regenerated plantlets were obtained. The results of histochemical (GUS) and molecular biology (PCR, Southern, etc.) indicated that rice genes had been transferred into soybean genome and obtained rice gene integrated soybean plantlets. Thus the germplasm enhancement technical system based on rice full-length cDNA was feasible.

5. Compared with traditional germplasm enhancement, this innovation technical system based on rice full-length cDNA had its advantages. ( 1 ) no gene patent restriction : genes used in this technique were came from rice full-length cDNA directly and no need to know their sequence; ( 2 ) breaking through reproductive interspecific segregation furthest : this technique made germplasm enhancement could not only happen between different familia and races but also between animal and plant, which would broaden application domain of excellent genes ; ( 3 ) increasing efficiency of germplasm enhancement : compared with previous plant transgenic method with one gene transformation every transgenic event, this technical system transformed rice cDNA “gene pool”, and implemented high throughput gene transfer. At the same time, this system no needed to do time-consuming gene cloning.

**Key words:** germplasm enhancement, full-length cDNA, rice [*Oryza sativa* (L.)], transgene, soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]

# 目 录

第一章 前言 .....	1
1.1 作物种质资源研究概况 .....	1
1.2 作物种质资源创新研究 .....	3
1.2.1 作物种质资源创新的必要性 .....	3
1.2.2 传统作物种质资源创新的途径 .....	5
1.2.3 基于转基因技术的作物种质资源创新 .....	7
1.3 我国大豆种质资源与遗传改良研究现状 .....	20
1.3.1 我国大豆种质资源研究现状 .....	20
1.3.2 我国大豆遗传改良研究 .....	21
1.4 研究目的与意义 .....	24
1.5 研究的技术路线 .....	26
第二章 材料与方法 .....	27
2.1 植物材料 .....	27
2.1.1 大豆材料 .....	27
2.1.2 水稻材料 .....	27
2.2 主要化学试剂、酶类及试剂盒 .....	27
2.3 培养基、溶液等试剂的配制 .....	28
2.3.1 大豆遗传转化主要组织培养基配方 .....	28
2.3.2 其它试剂及培养基配方 .....	29
2.4 主要实验技术 .....	33
2.4.1 水稻材料胁迫处理 .....	33
2.4.2 植物叶片总RNA的分离与检测 .....	33
2.4.3 mRNA的分离 .....	34
2.4.4 工程菌液制备 .....	34
2.4.5 基因组DNA的提取 .....	35
2.4.6 PCR反应 .....	36
2.4.7 Southern杂交 .....	37
第三章 连接有水稻不同cDNA表达载体的构建 .....	39
3.1 高质量水稻全长cDNA的获得及其末端的改造 .....	39
3.1.1 总RNA的提取与检测 .....	39
3.1.2 mRNA的分离 .....	39
3.1.3 高质量水稻全长cDNA的合成与质量检测 .....	40
3.1.4 水稻ds cDNA片段大小检测 .....	41
3.1.5 水稻cDNA测序分析 .....	43
3.1.6 水稻ds cDNA末端的补平 .....	43
3.2 载体的筛选与改造 .....	44
3.2.1 质粒载体筛选的原则 .....	44
3.2.2 载体的改造 .....	45
3.3 含不同大小水稻基因表达载体的工程菌构建 .....	46
3.3.1 含不同大小水稻基因表达载体的构建 .....	46
3.3.2 连接产物转化农杆菌 .....	47
3.3.3 农杆菌单克隆菌液PCR检测平末端连接效果 .....	48

3.3.4 含不同大小水稻基因表达载体的工程菌液制备	48
3.4 结果与分析	48
3.4.1 水稻总RNA及mRNA浓度与质量检测结果	48
3.4.2 水稻cDNA的获得	49
3.4.3 插入水稻cDNA片段长度的鉴定	49
3.4.4 部分水稻cDNA序列分析	50
3.4.5 双元表达载体的酶切鉴定	50
3.4.6 平末端连接效果的检测结果	50
3.4.7 T-A连接效果的检测结果	51
3.5 小结	51
第四章 农杆菌介导大豆快速高效转化体系的构建	53
4.1 传统农杆菌介导大豆转化体系的优化	53
4.1.1 工程菌液制备	53
4.1.2 大豆种子表面消毒	53
4.1.3 大豆种子萌发及不同外植体的获得	54
4.1.4 农杆菌侵染大豆外植体	54
4.1.5 农杆菌与大豆外植体共培养	54
4.1.6 大豆外植体的丛生芽诱导	54
4.1.7 大豆外植体的芽伸长诱导	55
4.1.8 大豆外植体的生根诱导	55
4.1.9 大豆外植体的移栽	55
4.1.10 发芽培养基中 6-苄氨基嘌呤的优化	55
4.1.11 诱导培养基中激素浓度的优化	55
4.1.12 其它因子的优化	55
4.2 快速、高效农杆菌介导大豆转化体系的构建	56
4.2.1 工程菌液制备	56
4.2.2 大豆种子表面消毒	56
4.2.3 大豆种子萌发及外植体的获得	56
4.2.4 农杆菌侵染大豆外植体	56
4.2.5 农杆菌与大豆外植体共培养	56
4.2.6 大豆外植体的移栽	56
4.2.7 大豆不同基因型的比较	56
4.3 结果与分析	57
4.3.1 农杆菌介导大豆子叶节和胚尖转化系统的优化	57
4.3.2 快速、高效农杆菌介导大豆转化体系的建立	60
第五章 携带水稻CDNA大豆转基因植株的检测	62
5.1 携带水稻cDNA大豆转基因植株的获得	62
5.2 大豆转基因株系的表型鉴定	62
5.3 大豆转基因株系组织化学GUS基因表达鉴定	62
5.4 大豆转基因株系的分子鉴定	63
5.4.1 转基因植株的PCR检测	63
5.4.2 RT-PCR检测	63
5.4.3 Southern检测	63
5.5 结果与分析	63
5.5.1 大豆转化再生植株的表型鉴定	63

5.5.2 大豆转化再生植株的组织化学和分子鉴定 .....	63
第六章 讨 论 .....	67
6.1 基于水稻全长cDNA的大豆种质创新技术体系的建立 .....	67
6.1.1 高质量水稻全长cDNA的获得 .....	67
6.1.2 载体的筛选和改造 .....	68
6.1.3 快速、高效农杆菌介导大豆转基因技术体系的建立 .....	68
6.2 基于水稻全长cDNA的大豆种质创新技术体系的验证 .....	71
6.3 本研究大豆种质创新技术体系存在的问题 .....	71
6.3.1 cDNA序列的完整性 .....	71
6.3.2 cDNA 片段分级准确性 .....	72
6.3.3 cDNA “基因池” 的容量 .....	72
6.4 今后研究计划 .....	72
6.4.1 技术体系的完善 .....	72
6.4.2 技术体系的应用 .....	73
第七章 结 论 .....	74
参考文献 .....	75
附录 .....	89
致谢 .....	105
作者简介 .....	106

## 第一章 前言

作物种质资源 (Crop Germplasm Resources) 是指具有特定种质或基因的作物类型的总称, 它是控制作物性状的基因载体, 所以有时也称作物基因资源 (Crop Gene Resources), 是蕴藏在作物各类品种、品系、类型、野生种、和近缘植物中的全部基因遗产, 而任何一种作物种质资源一旦从地球上消失, 就难以用任何先进方法再创造出来 (董玉琛, 1999)。

作物育种实际上是对作物种质资源中的基因进行选择与组合, 没有作物种质资源就没有作物育种。作物种质资源中一些优异基因的开发和利用可以使作物的产量取得突破性进展, 如第一次“绿色革命”就是由于小麦、水稻资源中少数几个矮秆基因的开发利用引发的。我国的杂交水稻取得了巨大的成功, 其中水稻资源“野败”的发现与应用起着关键的作用。因此, 作物种质资源被认为是一个国家拥有的最有价值和战略意义的物质财富之一, 是生物多样性的重要组成部分, 是人类赖以生存、繁衍和发展所必需的物质基础, 是农作物品种改良的物质基础, 是农业可持续发展的重要保证。

### 1.1 作物种质资源研究概况

世界各国政府及科学家都十分重视作物种质资源的收集保存, 世界各国收集保存的各类物种质资源多达610万份 (含重复) (林富荣等, 2004)。我国于1956和1957年两次收集各地农作物的地方品种, 全国共收集43种大田作物国内品种。此后又相继收集到一些濒于灭绝的作物品种, 挖掘出一批稀有珍贵品种。通过对野生大豆、野生稻、野生小麦、棉花 (琼、黔、桂) 等的考察, 总体上摸清了有关作物野生种的种类和分布, 为种质资源的保护和利用奠定了基础。1979~1997我国先后从100多个国家和地区引进各种作物种质资源88000余份。经过这些努力, 迄今为止, 我国已收集、保存种质资源38万份, 仅次于美国(55万份), 跃居世界第二位。

为了实现作物种质资源的安全保存, 避免已收集资源的再度丢失, 发达国家在种质资源保存方面建立了原生境保护与非原生境保护 (如种质库、种质圃、植物园等) 相结合的标准化、规模化、自动化和网络化的保存体系。另外, 发达国家还加大力度寻求新的种质资源保存方法, 完善作物种质资源保存与利用平台。20世纪50年代, 美国发现花费大量人力、财力从世界各地收集来的种子大都失去了发芽力, 决定采用机械降温的种子库, 来保存这些收集的种子。经国会决议, 于1958年在科罗拉多州柯林斯堡建成国家种子贮藏研究室 (National Seed Store Laboratory, NSSL), 这是世界上第一座现代化种质库。此后, 世界各国及国际农业研究组织相继建立现代化种质库, 至今全世界作物种质库已达1300多座, 保存种质610万份 (据Plucknett 等统计, 为2500万份) (董玉琛, 2001)。现今种质库有3种: 长期库, 种子活力可维持50~100年; 中期库, 可维持种子活力10~30年, 为研究、鉴定、利用者提供种子, 并负责种子的繁殖更新; 短期库存放正在使用的材料。1986年在洛克菲勒基金会和国际遗传资源委员会 (International Board for Plant

Genetic Resources (IBPGR), 后更名为国际遗传资源研究所 (International Plant Genetic Resources Institute, IPGRI) 部分资助下, 建成我国国家作物种质库 (长期库)。该库周年维持温度  $-18^{\circ}\pm 2$ , 相对湿度  $50 \pm 7\%$ , 容量 40 万份。经“七五”、“八五”、“九五”三个五年计划, 长期库现存入 160 种作物的种子 31 万余份。并在西宁建成复份库, 长期库保存的材料全部另存一套。在中国农业科学院的 8 个作物专业所和 14 个省、市、自治区农科院建设了中期库, 保存有关作物的种质资源。对于无性繁殖作物, 在全国各地建立了 30 个国家种质圃, 共保存果树、茶、桑及其他无性繁殖作物种质 3.7 万份。此外还建立了甘薯、马铃薯两个试管苗库。初步建成了我国作物种质资源保存体系 (董玉琛, 1999)。

鉴定评价及信息化建设是作物种质资源开发与利用的前题。我国截止 1995 年底, 共进行各种作物田间农艺性状鉴定 35 万余份, 抗病虫鉴定 20 万余份, 抗逆鉴定 14 万余份, 品质鉴定 19 万余份。1988 年建成中国作物种质资源信息系统 (Crop Germplasm Resources Information System, CGRIS) 并开始对外服务。建立了作物种质资源数据采集网, 由一个信息中心, 20 个作物分中心, 50 个一级数据源单位, 近 400 个二级数据源单位组成。已在因特网上向用户提供无偿共享信息 (网址: <http://icgr.caas.net.cn/>), 总共向国内用户提供了 2400 万个数据项值的种质信息, 产生了明显的社会效益 (刘澍才, 2001)。

丰富的遗传资源为遗传研究及育种工作提供了大量的材料, 然而如此众多的资源给保存、评价、鉴定及利用带来了困难 (FAO, 1996), 人们开始寻求解决这一矛盾的方法。Harlan (1972) 曾提出为方便资源的保存、评价与利用而建立整个资源库的亚库, 称为活动收集品 (active collection)。澳大利亚 Frankel 于 1984 年提出了核心种质 (core collection) 的概念, 并与 Brown (1989a) 将其进一步发展。它是用一定的方法选择整个种质资源的一部分, 以最小的资源数量和遗传重复最大程度地代表整个遗传资源的多样性, 未包含于核心种质中的种质材料并不被遗弃, 而是作为保留种质 (reserve collection), 从而方便于种质的保存、评价与利用。核心种质的概念提出后, 国际上一些农业研究中心和一些发达国家很重视对核心种质的研究。1992 年在巴西召开了关于核心种质的国际会议, 会上就核心种质的概念, 建立核心种质的步骤以及今后核心种质研究的方向进行了讨论。中国于 1994 年在杭州召开了核心种质专题会议。至今, 全世界在包括野生大豆、花生、芝麻 (Corley, 1995; 沈金雄, 1995) 等 30 多种植物上已经或正在建立核心种质。1998 年, 我国在水稻、小麦、大豆三种作物上正式立项进行研究。云南省、贵州省也已经开始建立地方稻种资源的核心种质 (Tanksley et al, 1997; 曾亚文等, 2000; Moore et al, 1995; 阮仁超等, 1995)。魏兴华等以 480 份浙江地方籼稻资源为材料, 率先成功地构建了浙江地方籼稻的核心样品 (魏兴华等, 1999)。董玉琛等 (2003) 对中国普通小麦种质资源构建了初选核心种质。

传统的种质资源评价是针对特定性状, 从中筛选具有目标性状的材料。现在应用分子生物学技术在分子水平上进行质量性状和数量性状基因的鉴定已取得重要进展, 仅在小麦方面就已经找到 30 多个基因的 RFLP 标记, 涉及到抗三种锈病、白粉病、眼斑病、孢囊线虫、俄罗斯斯蚜虫、麦蝇, 以及抗霜冻、抗穗发芽、春化反应、控制  $K^{+}/Na^{+}$  离子等多种抗病虫和其他性状。过去对 10000 余份小麦种质资源进行了抗条锈病鉴定, 其中 140 份表现抗条锈病性, 1997 年董玉琛以新的条锈菌混合小麦种重新对它们接种鉴定, 其中 7 份苗期和成株期均免疫。对其中来自湖南

隆回县的“和尚麦”用微卫星标记 (SSR) 进行抗病基因染色体定位, 查明其抗病基因位于小麦 1B 染色体长臂上, 与 SSR 标记 WMS11 的遗传距离为 2612cM, 与标记 xpsp300 为随机分离, 该抗病基因为隐性, 与已知的抗条锈基因在染色体位点上和抗性遗传上不同, 故为一新基因 (马渐新, 博士学位论文, 1999)。应用分子标记构建各种作物的遗传连锁图, 对种质资源的深入评价、发掘新基因以及分子标记辅助育种产生了巨大推动作用, 例如 Bemacchi 等应用遗传连锁图在野生番茄中发现了三种与产量有关的基因, 并用数量性状位点 (QTL) 回交法把这三种基因转移到栽培番茄中, 育成了产量、可溶固体物含量和色素含量三种性状分别比原农艺亲本提高 48%、22% 和 33% 的一批番茄新品系 (Tanksley et al, 1997)。利用 RFLP 连锁图揭示了禾本科植物基因组的保守性, 即已发现水稻、小麦、玉米、高粱、谷子、甘蔗等不同作物染色体间存在部分同源关系 (Pereira, 1994; Grivet, 1994; Kurata, 1994; Ahn S et al, 1993; Paterson et al, 1995), 在种质资源评价、分子标记辅助育种、基因克隆等方面具有重要作用。

此外, 我国科学家已经从重要农作物中分离获得了多个重要功能基因, 如水稻的雄性不育基因、抗白叶枯病基因、脆秆基因和分蘖基因, 小麦的抗白粉病基因和“磷高效”基因等 (Li et al, 2003; Song et al, 1995; Yi et al, 2005; Li et al, 2003)。所开发出的各种分子标记及 DNA 指纹图谱对于农作物和林木种质资源评价和利用具有广泛的应用价值。构建了主要农作物的 BAC 库和一系列 cDNA 库、构建了多种作物的分子连锁图谱、定位了多个抗病虫害、抗逆、优质的基因。构建了水稻、小麦、玉米、棉花、大白菜等多种作物的 DNA 芯片。现代育种由于选用亲本只集中在少数综合性状好、配合力高的品种上, 以及人为选择驯化的结果使得作物品种的遗传基础不断狭窄。通过对我国丰富的地方品种和近缘野生种的初步鉴定, 发现其中蕴藏着许多优良基因, 那么, 利用分子标记技术与常规方法相结合从中发掘新的有益基因并实现有益基因向栽培品种中的转移, 培育新品种, 无疑为种质资源高效利用另辟蹊径。

## 1.2 作物种质资源创新研究

种质创新是指人们利用各种自然的和人工的变异, 通过人工选择的方法, 根据不同目的而创造新作物、新品种、新类型、新材料。种质创新根据目标的不同可以分为两大类, 一是以遗传学工具材料为主要目标的种质创新, 如非整倍体材料、近等基因系、加倍单倍体 (DH) 作图群体和重组近交系 (RIL) 作图群体等; 二是以育种亲本材料为主要目标的种质创新。这两大类都是种质创新的内容, 但目前国内学者比较重视的是后者, 对于前者我国重视程度远不如国外。

### 1.2.1 作物种质资源创新的必要性

过去的十几年间人们通过特异种质材料的挖掘和利用、新品种的选育、性状的改良, 使许多作物的产量得到持续稳定的提高 (Evans, 1983)。例如小麦矮秆基因——*Rht1*、*Rht2*: 其原初载体为 Daruma (达摩小麦), 后经杂交育成 Norin 10 (农林 10), 被引入美国又育成 (Norin 10 × Brevor 14) 品种, 继而以此为亲本至 70 年代末北美已育成 100 余个品种, 因此, 这一矮源被誉为“绿色革

命”基因；小麦矮秆基因——*Rht8*、*Rht9*：其原初载体为赤小麦，后经杂交育成 VillaGlori（中农28）、Ardito（矮立多）、Mentana（南大2419）、Funo（阿夫）、（Abbondanza 阿勃）及 Orofen（欧柔）等种质，1B $\delta$ 1R代换/易位系也含有此矮秆基因，其血统遍及地中海沿岸、南美洲的北部和亚洲的主要小麦品种中；小麦优异源：1B $\delta$ 1R代换 $\delta$ 易位系被引入50余个国家，育成400个品种，中国80~90年代推广的品种有70%直接或间接地有此血统；小麦抗源：“阿夫 $\times$ 台湾小麦”育成的苏麦3号成为世界上首屈一指的小麦抗赤霉病扩展的品种，表1-1列举了50~70年代在我国小麦育种上起巨大作用的14个种质；水稻矮源：*Sd1*，其原初载体为中国台湾低脚乌尖，后经杂交育成台中1号，被引入国际水稻所又培育成IR8等一系列品种，目前，带有*Sd1*基因改良品种占亚洲水稻种植面积的40%；水稻不育基因：“野败型”不育系，目前我国的杂交水稻绝大多数采用此不育系。

表 1-1 50~70年代我国小麦育种起巨大作用的种质简介(刘旭,1999)

Table 1-1 Introduction of wheat important germplasms in breeding of 50~70's (Liu X., 1999)

	名 称 Name	系 谱 Pedigree	推广面积 (hm <sup>2</sup> ) Spread area
地方品种	蚂蚱麦 (1942 年利用)	陕西关中地方品种	最大 33.3 万
	燕大 1817 (1936 年选出)	山西平遥小白麦系选	1960 年有 8700
	江东门 (1925 年选出)	南京东门外大田中选出	
	成都光头 (1941 年推广)	四川历史悠久的地方品种	1950 年有 4.67
	蚰子麦 (1950 年推广)	河南靖丰靖丰地方品种	最大 73.3 万
育成品种	碧蚂 4 号 (1948 年育成)	蚂蚱麦 $\times$ 碧玉麦	最大 86.7 万
	北京 8 号 (1962 年育成)	碧蚂 4 号 $\times$ 早洋麦	最大 166.7 万
	西农 6028 (1947 年育成)	西北 60 $\times$ 中农 28	最大 30.7 万
	五一麦 (1951 年育成)	(成都光头 $\times$ 矮立多) $\times$ (川福麦 $\times$ 碧玉麦)	1960 年 6.67 万
引进品种	南大 2419	(1932 年从意大利引进)	1958~1961 年 400 万
	阿夫	(1956 年从意大利引进)	1977 年 118.1 万
	阿勃	(1956 年从意大利引进)	60 年代末 206.7 万
	欧柔	(1958 年从智利引进)	1979 年 32.7 万
	早洋麦	(1946 年从智利引进)	1959 年 13.3 万

建国 50 多年来我国共培育出 40 多种农作物的近 5,000 个高产、优质、抗性强的新品种、新组合，使主要农作物品种更新了四至五次，每更新一次的增产幅度可达 10%~30%，作物的抗性与品质也有显著的提高。而这些优良品种大都是作物种质资源创新与遗传改良研究的结果。自 20 世纪 60 年代始，我国就开始了远缘杂交与染色体工程、植物组织培养与细胞工程育种、基因工程育种、诱变育种、杂种优势利用方面的基础研究。近年来又开展了空间育种技术的研究和应用，形成了一个涵盖育种基础理论研究、生物高技术研究、新品种选育及其推广的完整的科研体系。

但是近年来，由于缺乏优质的育种材料，我国作物育种工作者都感到“巧妇难为无米之炊”，造成育成品种遗传基础日趋狭窄，已经成为限制作物品种改良发展的重要因素。随着农业生产的发展和新品种的推广应用，一些具有优良特性的地方品种、先前的改良品种又因无法满足生产的需求而被相继淘汰，遗传多样性严重降低。现代育种工作又往往只注重少数农艺性状，选种上集中于少数材料上，结果导致育种材料的遗传基础越来越窄。例如：我国水稻中占一半的杂交水稻，其不育系大部分为“野败型”，恢复系大部分为 IR 系；建国以来，我国育成数百个小麦品种，其亲本大多离不开 14 个骨干亲本。80 年代中期以来，生产上利用的小麦品种 70% 具有 1B/1R 代换/易位系的血统（金善宝，1996）；我国 24 个种植面积在 13.3 万公顷玉米单交种中，其中 21 个只

有 9 个自交系组成，占种植面积 13.3 万公顷以上总面积的 80%左右；就大豆而言，1923~1992 年全国育成 564 个品种，其中 208 个有金元的血缘，占 36.9%，所以大豆也正面临遗传基础越来越狭窄的现状。因此，进入 20 世纪 80 年代以来，我国及世界上许多国家的作物育种呈现徘徊不前的状态，鲜有突破性的新品种问世，其根本原因在于缺乏创新种质。

因此，作物种质创新是作物遗传资源研究的重要组成部分，是种质资源有效利用的前提和关键，是作物遗传育种发展的基础和保证。只有加强种质资源的深入鉴定和利用，拓宽遗传基础，丰富遗传多样性，才能解决种质资源的相对贫乏与育种需要之间的矛盾，使作物育种和农业生产取得突破性进展。而种质资源的创新和利用研究是一项需要长期坚持的极为重要的一项基础性工作。

### 1.2.2 传统作物种质资源创新的途径

传统的种质资源的创新途径多种多样，主要有以下几种（表1-2）：第一，充分利用自然的基因突变和人工诱变来培育或改造现有作物品种来创制新种质。自然状态下发生的突变产生了一些具有重大历史意义的珍贵的育种材料，例如：中国水稻的“矮脚南特”、小麦的“矮变一号”和最初发现的非整倍体材料等，但是自发突变得频率极低，在高等生物中大约10万个至一亿个生殖细胞才会有一个生殖细胞发生突变，突变率 $10^{-5} \sim 10^{-8}$ ，而且许多突变通过表型无法鉴定而丢失；人工诱变是利用X-射线、热中子、快中子、DES、EMS等化学或物理诱变技术通过制造基因突变培育新种质。上个世纪遗传学史上最重要的发现之一就是突变能够被诱发（Muller, 1930）。Muller（1927）在柏林举行的第三届国际遗传学会议上论述了X-射线能够使果蝇发生变异并认为诱发突变将在植物遗传改良上发挥重要作用。从1960年起由于对辐射诱变规律有了进一步认识，越来越多的植物育种家注意辐射诱变工作，发展中国家也开始把诱变育种工作放在重要位置，市场上出现了水稻诱变新品种。70年代是辐射育种成为一种有效的育种手段走向成熟并得到迅速发展的时期。80年代突变育种稳定深入发展，并逐步向植物育种的一些新兴领域渗透并取得了一些可喜的成果。我国的突变育种工作开始于上个世纪50年代后期，多年来我国的辐射育种取得了显著成果，获得了大量有利用价值得早熟、矮秆、抗逆、抗病优质及其它特异突变体，为育种者提供了遗传资源及育种方法、技术等应用基础研究有了很大改进和提高（赵孔南等，1990；王玉兰，1991）。纵观近几年来有关诱变育种的研究报道，几乎都是采用复合诱变处理。早期研究均以大麦作试才（Favret 1963；Doll, 1969；Aastveit, 1968），并以叶绿素突变为指标，研究均表明复合处理呈累加效应和协同效应。Kar（1982）复合处理小麦获得了多个矮秆抗锈突变体和7个早熟抗锈丰产优质突变系。张秀阁等（2001）应用杂交、物理化学诱变相结合的小麦“三结合”突变育种方法选育出小麦大穗种质；此种途径虽然能够产生大量的变异类型，但是，发生的机率极低，随机性大，而且诱变技术难于掌控。

第二，通过种内杂交、远缘杂交等方式创造新的变异类型。远缘杂交是指种以上分类单位的生物类型之间的杂交，是20世纪以来在农作物育种及基础遗传研究中应用最广泛的技术之一，几乎涉及到所有与栽培作物有关的科属内相对近缘的植物种类（Sharma, 1995；Riplevl et al,2003）。

远缘杂交育种的理论依据在于,地球生命的共同由来决定了地球生物遗传上的同源性和异质性,这是实现远缘杂交及获得远缘杂种优势的物质基础。在同源异质遗传基础上借助人因因素发生在不同植物种、属、科间的杂交有别于经典的有性杂交,更多的是分子水平上的片段杂交,而往往没有双亲染色体的配对过程。从整体分子而言亲缘关系越远的生物间的染色体和染色体外DNA的结构越不亲和,很容易互相排斥;但从局部DNA分子来看,部分DNA间的结构却可能保持一定的亲和性(周光宇,等1977;1979)。小麦(*Triticum carthlicum*)和冰草(*Agropyron cristatum*)的属间杂交,在前苏联不但得到了杂种后代,而且应用于生产;中国利用远缘杂交合成了小黑麦新物种并具有黑麦某些优良的性状;小麦与偃麦合成小偃麦(*Agrotriticum*);小麦与簇毛麦合成小簇麦(*Hayanldriticum*)(Damania,1997)这些都说明远缘杂交在理论研究和生产实践上的重大意义。任正隆等(1996)以小麦品种为受体,黑麦自交系作为外源基因供体,将黑麦染色体片段引入小麦,选育出几个超重穗型小麦-黑麦特殊易位系,包括多小穗、集生大穗和小叶大穗等类型。沈天民(2000)采用六倍体小黑麦与普通小麦杂交,结合染色体工程技术,培育出超高产黑麦-普通小麦1BL/1RS易位系兰考906,该品系是典型的直立大穗、多小穗、多粒型品系,此外,通过小麦种间杂交和聚合杂交先后培育出具有超亲性状的小麦新品系或品种(杨武云等,1997;刘镜明,1990;任德良等,1996;李维平等,2000)。1984年最早报道了六倍体普通小麦与玉米之间的远缘杂交并获得了球形杂种胚的研究结果(Zenktele et al, 1984)。在棉花育种方面,梁正兰(1995),经过十几年的不懈努力,利用远缘杂交得到了14个野生种与陆地棉的杂交种,其中12个野生种中已有高代杂种,选育出了一大批优异种质材料。

综上所述,种内杂交、远缘杂交的种质创新手段虽然经过多年的努力也培育出了一些新种质,但成功率非常低,尤其在配制杂交组合的过程中一般只有1%左右的组合有希望选出符合生产需求的品种(Wang, 2005)。此外,远缘杂交的理论研究相对于应用研究仍然严重滞后,虽然国内外有些学者在染色体行为(Wu et al,2001; Butruille et al, 2000; Soltis et al, 2000)、花粉管行为与胚胎发育(王景林, 1995; 梁铁金等, 1995; 黄群策等, 2004)、分子标记鉴定(Brunnell et al, 1999; Bourdonce et al, 2003)及后代表型分离(Barre et al, 1998; 赵秀琴等, 2003)等方面开展了一些研究工作,初步了解远缘杂交是部分遗传物质的导入,但其杂交过程却还不甚明了,有待于作深入地研究,因此传统手段存在很大的盲目性和不可预测性。

第三,组织培养诱发的突变。通过组织培养诱发的变异叫作体细胞变异(Larkin et al, 1981),其变异频率随着培养时间的延长而提高,结合化学诱变和利用选择压力进行细胞突变体筛选可实现一定程度的定向诱发(Jain et al, 2001; Lee et al, 2002)。Larkin和Scowcroft(1981)发现在体细胞再生植株培养过程中会产生大量的变异植株,将其用于小麦近缘杂交中,得到了一些小麦-外源染色体易位株和其它数量变异株(辛志勇,1990; 徐惠君,1996; 李洪杰, 2000)。由于组织培养的特殊环境(如光照、化学试剂等因素)可能以某种方式诱导处于有丝分裂前期的异染色质推迟复制,进而产生染色质后期桥和染色质断裂,再融合时就可能发生易位(Larkin et al, 1989)。胡含等(1999)用单倍体花粉经组织培养诱导易位,这种方法具有产生变异类型丰富、稳定速度快和易于选择等优点,但组织培养诱导易位主要发生在非同源群的染色体之间。因此同样易造成遗传上的不平衡。

表 1-2 传统种质创新技术简表

Table 1-2 Traditional techniques for germplasm enhancement

类别	技术方法	特点
Sort	Technical Method	Charateristic
突变	自然突变	突变频率极低
	人工诱变（物理、化学）	变异类型丰富；但是发生机率极低，随机性大
杂交育种	种内杂交	杂种优势利用；成功率低，周期长
	远缘杂交	创造新物种；难以突破种间生殖隔离，具有盲目性
体细胞变异	组织培养	变异类型丰富；遗传不平衡

### 1.2.3 基于转基因技术的作物种质资源创新

基于转基因技术的作物种质资源创新是指通过基因工程技术将外源基因导入受体细胞的过程。传统作物种质资源创新手段在很大程度上依赖于经验和机遇，而且难以将多个优良基因组合到一个品种上，选择的效率低、周期长。而以基因改良为主要目标的新型作物种质资源创新技术，不仅可以在不同科、族间，甚至可以打破动植物间的界限而进行基因转移，改良现有物种的生物性状，最大限度的为人类服务，从而可实现作物育种的新突破。

自1983年首例转基因植物问世以来，转基因研究主要在进一步提高转基因效率，外源基因定点、定量、稳定地转移到植物基因组中及后代的遗传稳定性等方面进行了深入的探索。随着转基因技术的不断改进，转基因植物种类越来越多，据不完全统计，至今已有至少35个科120种植物成功获得了转基因植株（Das et al,2002; Maximova et al,2003; Hu et al, 2002; Park et al,2000; Charity et al, 2004; Maliga, 2003; Negrotto et al, 2000; Peng et al, 2000; Paola et al, 2001; Giovnna et al, 2002）。近年来，全球转基因农作物的种植面积呈现逐年大幅度增长的趋势（图1-1）。1997年为1100万公顷，1999年增加到3,990公顷，2000年发展到4,420公顷，2002年进一步增至5,870万公顷。种植面积在100万公顷以上的作物包括大豆、玉米、棉花和油菜，涉及的性状包括对除草剂的抗性、抗虫性、抗病性和品质性状等。根据“经济合作与发展组织”（Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD）的数据，从1986到2000年的15年间，OECD国家共批准10,313例转基因生物进入中间试验，其中农作物占98.4%，细菌占0.1%，病毒占0.3%，真菌占0.2%，动物占0.1%。据国际农业生物工程应用机构（International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, ISAAA）统计和预测，在全球范围内，2005年转基因农作物销售额达到80亿美元，2010年将达到280亿美元。可见转基因植物所占的比例将呈直线上升趋势，抗性基因的转入技术的应用将越来越广泛。

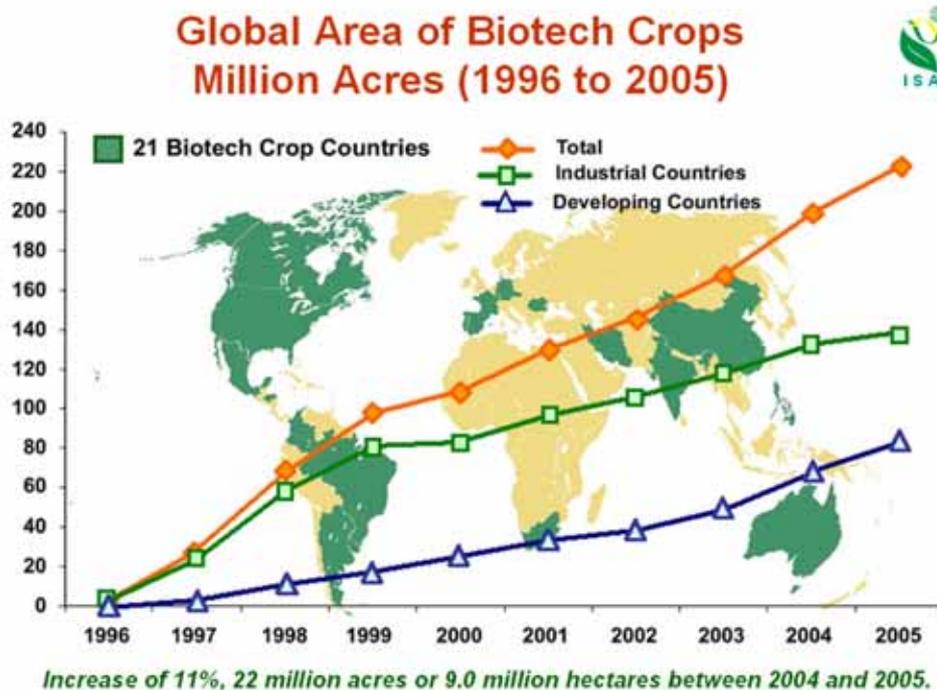


图 1-1 全球转基因植物种植趋势 (James C., 2005)

Fig.1-1 Global area of transgenic plants area (James C., 2005)

### 1.2.3.1 植物基因遗传转化技术

如何将目标基因高效地转移到受体，是对于转基因技术最为关键的一环。按其属性，植物基因遗传转化技术可分为生物学方法（例如农杆菌介导法、病毒介导法）、化学方法（聚乙二醇介导法）、物理方法（基因枪法、显微注射法、超声波导入法、低能粒子束介导法等）以及利用种质系统介导的基因转移方法（花粉管通道法、生殖细胞浸泡法、胚囊子房注射法）。目前，用于植物遗传转化的方法和技术很多，主要包括土壤农杆菌转化系统和人工方法（物理和化学法）。前者主要以Ti和Ri质粒为载体，通过农杆菌将目的基因转入植物细胞；后者将目的基因直接导入植物细胞，主要包括化学物质诱导法、电穿孔法、脂质体法、微注射法、基因枪法和花粉管通道法。此外，不同的植物基因遗传转化技术各有其优缺点（表1-3）。可根据不同的转基因对象、技术的熟练程度、设备条件等不同因素，选择合适的技术。

表1-3几种主要转基因技术

Table 1-3 Several main transgenic techniques

转基因技术 Transgene technique	技术原理 Technical principle	转化受体 Acceptor	技术优点 Perfects	技术缺陷 Defects
农杆菌转化	T - DNA介导的外源基因的转移	胚、器官、原生质体等	单低拷贝整合基因组	寄主限制, 转化效率较低
基因枪法	将载有外源DNA的钨或金颗粒加速后射入植物细胞	茎尖分生组织、原生质体、配子体胚、胚胎细胞	适用范围广、转化效率较高	嵌合率高、成本过高、遗传不稳定
PEG/电击	电击或PEG/电击的处理下, 增加细胞膜透性, 使DNA转入	原生质体	操作简单	转化率低
花粉管通道法	利用花粉管通道, 将外源DNA导入受体胚囊	受体胚囊	避免了植株再生的障碍, 简单易行	转化率低, 不稳定的
超声波辅助农杆菌转化	利用低声强脉冲超声波的物理作用, 击穿细胞膜, 使外源DNA进入细胞	原生质体、器官等	提高了农杆菌的转化效率	技术不成熟
原位转化法	直接侵染或注射	种子、花、子房等	操作简单	转化率较低

### 1.2.3.1.1 农杆菌介导法

用于植物遗传转化的土壤农杆菌有两类：根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 和发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*)，均是寄主非常广泛的革兰氏阴性菌 (Stanton, 2003)。在自然状态下通过伤口感染植物细胞，分别导致冠瘿瘤和毛状根的发生。Zaenen et al (1974) 在根癌农杆菌的体内发现并分离了一种与肿瘤诱导有关的质粒 (Tumor-inducing plasmid)，即 Ti 质粒。Chilton et al (1977) 在研究由农杆菌侵染所形成的肿瘤细胞时，用分子杂交的方法发现在肿瘤细胞的 DNA 中，有农杆菌 Ti 质粒的一个片段。称其为转移 DNA (Transfer DNA)，即 T-DNA。农杆菌的病原性及与之相关的一些功能，如 Opine (冠瘿碱) 的合成和降解，是由 Ti (或 Ri) 质粒上的基因编码的。所有具有毒力的菌系都带有这些质粒 (Van et al, 1984; Watson et al, 1975)。

野生型 Ti 质粒很大 (>200K)，单酶切位点很少，不能直接用于植物转化的载体，而且还会导致植物产生冠瘿瘤，很难再生出正常的完整植株，所以必须对其进行改造，成为基因工程可用的载体。研究表明，Ti 质粒中大约 50% 的序列参与质粒的复制、冠瘿碱的代谢和接合功能，对致瘤并不起作用。另外 50% 的序列包括 T-DNA 区和毒性区 (Vir-region)，所编码的毒蛋白及其种类参见表 1-4。在农杆菌的 Ti 和 Ri 质粒上只有两个区段是 T-DNA 转移所必须的，即 Vir 区和 T-DNA 的边界序列。

表 1-4 农杆菌毒蛋白的功能 (Gelvin, 2000)

Table 1-4 Functions of virulence proteins in *Agrobacterium* (Gelvin, 2000)

毒蛋白	在农杆菌中的功能	在植物中的功能
Virulence protein	Function in <i>Agrobacterium</i>	Function in plant
Vir A	Phenolic signal sensor	
VirB1-11	Synthesis and assembly of T-pilus	
VirC1	Putative “overdrive” binding protein; enhancement of T-DNA transfer	
VirD1	Required for T - DNA processing in vivo, and for double strand T-DNA border nicking in vitro	
virD2	T-DNA border-specific endonuclease; putative “pilot” protein that leads the T-strand through the transfer into plant cells	Nuclear targeting of the T-strand; Protection of the T-strand from 5'exonucleolytic degradation; T-strand integration into the plant genome
VirE1	Required for VirE2 export from <i>Agrobacterium</i> ; Chaperone for VirE2	
virE2	Formation of a putative “T-complex”	Formation of a putative “T-complex” Protection of the T-strand from nucleolytic degradation Nuclear targeting of the T-strand Synthesis of the second T-strand
VirF		Host range factor Possible interaction with Skp1nproteins to regulate plant cell division cycle
VirG	Phenolic signal response regulator to activate other <i>vir</i> genes	
VirH	Putative cytochrome P450 enzyme	
VirJ	Putative T-strand binding protein	

T-DNA的转移是在*Vir*-区基因群的作用下进行的(图1-2)(Zupan et al, 2000)。当植物的某些部位受伤时会产生一些酚类化合物,附着在创伤部位的农杆菌*Ti*质粒的*VirA*基因被激活,活化的*VirA*感应蛋白激活*VirG*基因产生DNA结合蛋白(转录激活因子),从而启动*VirB*、*VirC*、*VirD*、*VirE*、*VirH*等基因的转录。*VirD*基因产物对T-DNA进行酶切,*VirC*基因产物对T-DNA剪切和加工成T链,*VirE*蛋白包被T链形成T-复合体。*VirD2*及*VirE2*蛋白引导T-DNA整合。T-DNA的转移与端区边界序列(LB和RB),转移的方向取决于右边界。T-DNA以线性方式进入植物细胞,通过DNA末端的生成和DNA末端再连接完成整合过程。根据*Ti*质粒的这些性质,可构建适合于植物转化的*Ti*质粒载体。目前,植物转化所利用的*Ti*质粒载体系统主要有两大类:第一类是共整合载体系统,是使pBR322中带有小一段T-DNA区,组成中介质粒载体,并将外源基因插入到该质粒的pBR序列中,该中介质粒及其插入的外源基因可通过结合转移进入农杆菌,同时再将野生型*Ti*质粒中T-DNA中的致瘤基因缺失掉(卸甲载体),组成受体载体。当这两种质粒同时存在于农杆菌中时,由于中介载体没有能在农杆菌中复制所需的复制子,只能通过T-DNA区的同源重组整合到受体载体中才能存在。两种质粒通过T-DNA区发生同源重组,从而使中介载体和外源基因插入到受体*Ti*质粒中。

当农杆菌感染植物细胞后,外源基因随同T-DNA插入到植物染色体中。另一类称为二元载体系统,原理在于当T-DNA与Ti质粒其它部分在物理结构上分开时也可以从农杆菌转移到植物细胞中。在这个系统中,先将T-DNA插入到一种质粒中,这种质粒较小,可提供单酶切位点进行基因操作,再用去除T-DNA后余下的Ti质粒构成另一个辅助Ti质粒(helper Ti)。这两种质粒互相相容,分别带有T-DNA区和*Vir*区。当两种质粒共同存在于农杆菌中时,由于它们的功能互补,T-DNA仍可转到植物细胞中去。

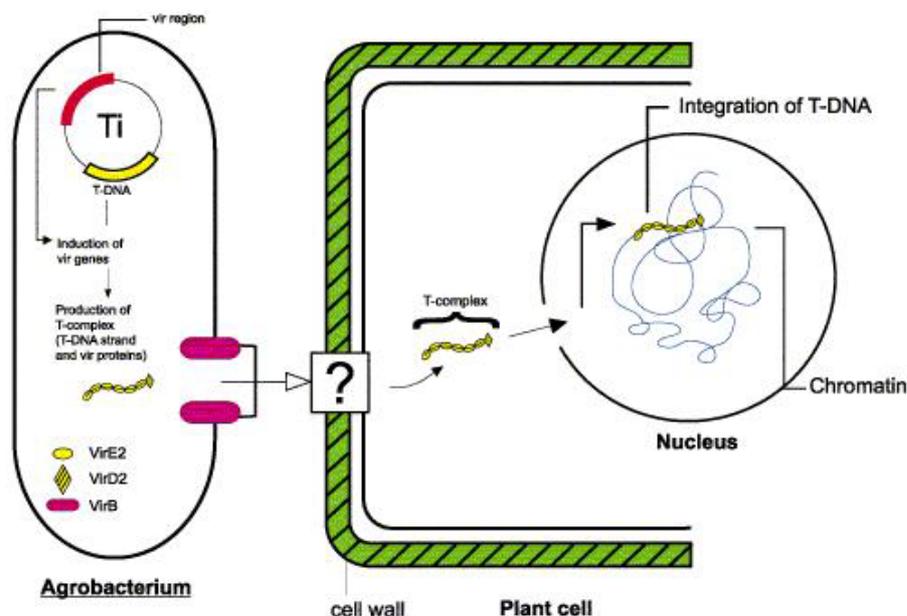


图1-2 T-DNA转化植物基因组示意图 (Zupan et al, 2000)

Fig. 1-2 T-DNA transfer into the plant's genome (Zupan et al, 2000)

发根农杆菌携带诱发毛根的质粒 (Root-inducing plasmid), Ri质粒, 与Ti质粒的结构相似, 具有T-DNA和*Vir*区。T-DNA的转移过程与Ti质粒相似。不同的是, Ri质粒的T-DNA区有编码合成植物激素的基因, 转化体在其激素的作用下容易分化再生植株。此外, 一条毛根起源于一个细胞, 转化后遗传稳定, 不易出现嵌和体现象; 但Ri质粒转化后难以得到形态正常的植株, 因而限制了其应用。

由于农杆菌的寄主范围广泛, 所以农杆菌Ti和Ri质粒转化系统是理想的转化系统 (农杆菌主要菌株参见表1-5)。自Horsch et al (1985) 建立叶盘法共培养转化体系以来, 农杆菌介导的遗传转化体系较原生质体操作更加简单易行, 而得到普遍应用。随着基因工程技术的不断发展, 能被农杆菌感染的植物种类不断扩大 (Wenck et al, 1999; 贺晨霞等, 1999; Schlappi et al, 1992; Paula et al, 2003; Miguel et al, 2004; Yan et al, 2000; Margie et al, 2005), 以前不能被农杆菌感染的一些禾本科植物现在也可以通过农杆菌介导法进行转化。

表1-5 农杆菌菌株 (Larry D, 2004)  
Table 1-5 Agrobacterium strains (Larry D, 2004)

Hcsr <sup>a</sup>	Plasmid	Opine	GALLS gene <sup>b</sup>	<i>virE2</i> <sup>b</sup>	<i>virD2</i> <sup>b</sup>	Source/notes
A4 (no. 100)	pRiA4	Agropine	+	-	+	S. Farrand
A4 (no. 117)	pRiA4	Agropine	+	-	+	F. White via S. Farrand
A136	None	None	-	-	-	E. Nester
A136 (R1000)	pRiA4	Agropine	+	-	+	E. Nester
A136 (A348)	pTiA6	Octopine	-	+	+	E. Nester
A136 (A856)	pTiAg162	<i>A. vitis</i>	-	+	+	E. Nester
A136 (MX243)	pTiA6::Tn3	Octopine	-	+	+	E. Nester/ <i>(virB1::Tn3)</i>
A136 (MX328)	pTiA6::Tn3	Octopine	-	+	+	E. Nester/ <i>(virD4::Tn3)</i>
A136 (MX358)	pTiA6::Tn3	Octopine	-	Tn3	+	E. Nester/ <i>(virE2::Tn3)</i>
A136 (MX368)	pTiA6::Tn3	Octopine	-	+	+	E. Nester/ <i>(virB10::Tn3)</i>
ATCC 15834	pRi15834	Agropine	+	-	+	F. White via S. Farrand
C58C1	pRi1724::kan	Mikimopine	+	-	+	N. Tanaka via S. Farrand
C58C1	pRiA4	Agropine	+	-	+	Y. Dessaux via S. Farrand
C58C1RS	pArA4a	None	-	-	-	Y. Dessaux via S. Farrand
C58C1RS	pRiTR105	Agropine	+	-	+	A. Kerr via S. Farrand
ICPB-TR7	pRiTR7	Mannopine	-	+	+	A. Kerr via S. Farrand
NCIB8196	pRi8196	Mannopine	-	+	+	A. Kerr via S. Farrand
NCPPB1855	pRi1855	Agropine	+	-	+	S. Farrand
NCPPB2655	pRi2655	Cucumopine	+	-	+	A. Kerr via S. Farrand
NCPPB2657	pRi2657	Cucumopine	+	-	+	A. Kerr via S. Farrand
NCPPB2659 (K599)	pRiK599	Cucumopine	+	-	+	A. Kerr via S. Farrand
NT1	pRiK599	Cucumopine	+	-	+	S. Farrand
A136 (WR5000)	pTiA6 $\Delta$ <i>virE2</i>	Octopine	-	$\Delta$ <i>virE2</i>	+	W. Ream/ <i>(\Delta</i> <i>virE2::nptII</i> <i>)</i>

<sup>a</sup> Alternate strain names (or isolate numbers) are indicated in parentheses.

<sup>b</sup> +, present; -, absent.

### 1.2.3.1.2 基因枪法

基因枪法，也称粒子轰击 (particle bombardment) 法。它是以火药爆炸、高压放电和高压气体为驱动力，直接将载有外源DNA的钨或金颗粒加速后射入植物细胞的一种转基因方法。转化过程中，质粒DNA首先沉淀在微弹表面，结合有DNA分子的微弹经加速而获得足够的动力，进而穿透植物细胞壁进入靶细胞，随后释放DNA分子并随机整合到寄主基因组内。根据动力来源不同，基因枪可分为火药式、放电式和气动式。火药式 (Gun powder) 是原始的基因枪类型，是由美国康奈尔大学Sanford et al (1988) 设计制造的，1990年由美国杜邦公司推出PDS-1000系统。工作原理是利用弹膛中火药爆炸产生的动力驱动载有微弹的微弹载体高速运动 (328 ~ 656/s)，当微弹载体抵达弹膛末端时被带有穿孔的挡板所拦截，而微弹由于惯性作用继续高速运动并击中靶细胞。气动式 (gas powder) 基因枪中具有代表性的是Bio-RAD公司的PDS-100He型气动式基因枪，是由美国康奈尔大学的Sanford et al (1991) 在火药式基因枪的基础上设计的，动力来源是高度压缩的氢气、氮气或其它气体的爆炸性释放，其中惰性气体具有爆炸性能好和安全性特点，因此作为首选气体。气动式基因枪更加清洁、安全，通过调节气体的压力可以更有效地调节粒子的运行速度，金属颗粒分布更加均匀，每枪之间差异更小，转化效率较高。放电式 (Electric discharge) 基因枪的工作原理是通过高压放电引起水滴汽化产生的冲力驱动微弹载体连同微弹加速运动，行驶一定距离后微弹载体被阻拦网挡住，而微弹则穿过阻挡继续向前运行轰击真空室中的靶细胞或组织。这种类型的基因枪可有效地转化多种类型的器官组织，特别是茎尖分生组织、配子体及胚胎细胞等。通过改变工作电压可精确地控制微弹速度和射入深度，使微弹特意地射入具有分生能力的细胞层，以利于转化再生植株的获得。在十几年中基因枪已经发展成为继农杆菌介导法之后的第二大植物遗传转化方法，尤其在大豆 (Stewart et al, 1996; Françoise et al, 2003) 禾本科 (Paul et al, 1995; Shou et al, 2004) 等难转化作物上得到广泛应用。但该方法尚存在成本过高，转化率不高，

遗传不稳定, 质粒DNA在操作过程中易断裂等缺陷。

### 1.2.3.1.3 电击和 PEG/电击法

电击和PEG/电击 (Polyethylene/electroporation) 法遗传转化的基本原理是在电击或PEG/电击的处理下, 增加植物细胞膜的透性, 从而使溶液中的大分子 (如DNA) 进入细胞, 并改变细胞的遗传物质构成。将植物细胞原生质体置于高压电脉冲下, 质膜会出现穿孔, 每个细胞可多达上百个; PEG (聚乙二醇) 能够促进原生质体直接吸收外源质粒DNA, PEG通过电荷之间的相互作用与DNA形成紧密复合物, 通过电击产生的穿孔植物细胞吸收这些复合物到细胞内。由于这种孔径较小 (约8.4nm) 并且可在很短时间内 (200ns) 内恢复到0.5nm, 所以细胞本身生理活动受到的影响不大。PEG浓度较低时一般不会对原生质体造成伤害。除了植物原生质体系统本身之外, PEG法的影响因素有PEG的浓度、PEG的分子量、缓冲液的浓度和pH值等。此方法主要用于原生质体再生较容易的植物。Lin et al (1987) 用PEG/电击法将外源基因NPT II和CAT转入大豆原生质体中, 经原生质体培养和G418筛选, 获得抗性愈伤组织, 经CAT活性检测证明CAT基因已经转入并整合到大豆基因组中, 表达外源基因产物。Dhir et al (1992) 用电击法将构建有GUS和HPT基因的质粒导入大豆原生质体, 用40ug/L潮霉素B筛选, 获得转化愈伤组织和芽, 并用Southern blot 证明转化愈伤组织中含有GUS基因和HPT基因。在国内, 南向日等 (1998) 利用PEG法将苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因 (Bt基因) 导入大豆的4个主栽品种的原生质体中, 经过潮霉素筛选获得了3株抗性植株, 对抗性植株的PCR及Southern检测表明Bt基因已经整合到大豆基因组中。

### 1.2.3.1.4 花粉管通道法

花粉管通道 (Pollen-tube pathway) 法是利用植物授粉后花粉萌发, 花粉管穿过花柱进入子房所形成的通道, 将外源DNA导入受体胚囊转化受体合子胚的方法。70年代末期, 我国学者(周光宇, 1978)在远缘杂交的基础上, 通过授粉时混入异种作物花粉匀浆的方法, 看到后代中出现与异种作物对应性状的变异, 推测异源DNA有可能参与了受精过程。Hess (1980) 报道了应用花粉为载体, 通过花粉萌发吸收外源DNA, 由伸长的花粉管携带进入受体胚囊, 诱导矮牵牛和烟草花色和叶形发生了变异。Ohta et al (1986) 将外源DNA与花粉混合转化玉米得到高频率的胚乳基因转移。此外, 国外还有人于开始应用于玉米抗叶斑病育种。我国学者从一开始即以育种为目标, 以主要农作物为受体进行外源DNA的导入研究, 取得了较好效果。

自1978年开始先后以大豆等主要作物为受体进行外源DNA的导入研究。雷勃钧等 (1991) 将蛋白含量高的野生大豆的DNA导入栽培品种获得了变异后代, 并培育出早熟高蛋白大豆新品种。此后其它作物上的研究也被相继报道。Luo et al (1988) 首次利用花粉管通道法将质粒DNA导入水稻, 并经Southern杂交和酶学鉴定证实了被转基因的整合和表达。曾君祉等 (1998) 利用此方法将GUS基因转入小麦, 并证明该基因已经整合到小麦基因组上。崔岩等 (2000) 利用花粉管通道法首次将几丁质酶基因转入大豆中。后来, 亦有一些成功的报道, 但由于缺乏分子水平的检测, 因而难以令人信服。Li et al (2002) 利用花粉管通道技术将外源基因导入大豆, 得到了大约5,000粒种子, 但是转化率很低, 而且后代鉴定表明所导入的基因并不能稳定遗传。利用花粉管通道法

进行植物遗传转化虽然避免了植株再生的障碍，简单易行，但是目前该转化途径尚未被优化，转化频率很低。

#### 1.2.3.1.5 超声波辅助农杆菌转化法

超声波辅助农杆菌转化 (Sonication-assisted Agrobacterium-mediated) 法是近年来发展起来的遗传转化方法。基本原理是利用低声强脉冲超声波的物理作用，击穿细胞膜，使外源DNA进入细胞。在进行农杆菌转化时，用超声波处理外植体组织，使其产生小的通道，以利于农杆菌进入植物细胞内。SAAT法集合了超声波法和农杆菌介导法的优点，近年来常被用于提高植物的转化效率，并在一些植物上(玉米、黄瓜、苦豆子、花生、苹果和油棕榈等)取得成功。农杆菌转染时，将转化材料浸在农杆菌悬液中，进行超声波处理，在目标材料的表层和深层可能产生超声波的空化效应，即气泡闭合形成瞬间高压，连续不断的高压象发生一连串小“爆炸”不断地冲击材料表面，造成许多微损伤，有利于农杆菌进入组织内部，同时从伤口处分泌出较多的酚类物质，有助于提高农杆菌的转化活力，明显地提高农杆菌的感染效率。但高强度和长时间的超声波处理可能损伤外植体和核基因组DNA，降低转化率，因此超声波处理强度不宜过大，时间不宜过长。Trick et al(1998)用扫描电镜及光学显微镜观察发现，超声波处理后使外植体表面及近表面产生大量贯穿的细小通道，农杆菌易于与植物细胞接触，从而促进转化过程。Santarem et al(1998)和Meurer et al(1998)分别以未成熟子叶和子叶节为外植体进行了超声波辅助农杆菌转化法的研究，结果前者以未成熟子叶为外植体，在农杆菌侵染共培养3d后，用超声波处理2s，获得了更高的GUS表达；而后的结果则表明超声波辅助农杆菌的转化没有增加稳定的转化。此外，其它转基因方法或某些物理因素与农杆菌介导转化技术联用能有效地提高转化效率。Bidney et al(1992)报道用基因枪轰击烟草和向日葵顶端分生组织，造成细小的伤口，再进行农杆菌侵染，取得了比刀切等方法大100倍的转化效率。另外，Kohler et al(1989)和Benediksson分别报道先用电离射线(如10~15GY的X射线)或非电离射线(20Jm<sup>2</sup>的紫外线)处理受体植物细胞(烟草、矮牵牛、黑芥等)，而后再施以转基因处理，可提高转化频率3~7倍。近几年，鲜见这方面的报道。

直接转化方法中，除以上介绍的几种以外，还有脂质体法(Liposome)，是根据细胞膜的结构特性，用脂类化学物质合成人工膜，然后将外源DNA包裹于其中形成球体，此方法的受体也是原生质体，通过原生质体的吞噬或融合作用将人工膜包裹的DNA转入受体细胞中；微注射法(Microinjection)，用专门的仪器制作毛细玻璃针(一般针尖的直径是0.5nm)，在显微镜下将外源DNA注入植物细胞或原生质体的一种最直接的DNA导入法，此种方法首先应用在了动物细胞转基因中，固定的方法是以吸管吸住细胞，在植物应用中可以琼脂糖多聚赖氨酸固定植物细胞，该方法操作难度大，所以绝对转化率低。

#### 1.2.3.1.6 原位转化法

以上所述方法中，无论是基因枪法、农杆菌介导法以及其它的几种转基因的方法，都必须经过组织培养。但是，外植体在组织培养过程中容易发生变异，而且大豆又较难再生，应尽量避免组织培养或缩短组织培养的时间，这在其它植物遗传转化过程中也得到了证实。Chee et al(1989)

用农杆菌感染大豆发芽种子的腋芽区所获得的植株中有0.07%产生了转化的种子。Bechtold et al (1993) 创立了拟南芥侵花转化法, 将种子在含0.5%蔗糖和0.05%表面活性剂的菌液中浸一下, 可获得0.5%的转化种子, 目前已被用于大豆。刘博林等(1989) 利用子房微注射技术将龙葵的抗性基因*Atrazine*导入大豆叶绿体, 并获得了表达。

### 1.2.3.2 植物遗传转化受体

在植物基因转化过程中, 受体系统是指选择合适的器官、组织或细胞(称为外植体)进行转基因后, 能通过组织培养或其它途径再生出新生植株的无性繁殖体系。

#### 1.2.3.2.1 胚状体再生系统

成功的遗传转化首先依赖于良好的植物受体系统。胚状体再生系统是最理想的基因转化受体系统: 体细胞胚是由具有卵细胞特性的胚性细胞发育而来, 接受外源DNA的能力强, 是理想的基因转化感受态细胞; 体胚发生多为单细胞起源, 转基因植株嵌合体少; 体胚具有两极性, 在发育过程中可同时分化出芽和根, 形成完整植株; 体细胞胚个体间遗传背景一致, 无性系变异小; 体胚发生繁殖效率高、可通过生物反应器进行大规模生产。自从上世纪五十年代末Steward et al(1958) 在胡萝卜组织培养中发现胚状体发生以来, 各国学者对植物细胞、组织和器官离体培养胚状体发生及其机理进行了广泛研究。作为一种基因转移的受体系统、制造人工种子的核心部分以及实现植物脱毒快繁的一个重要途径, 如何提高胚状体的发生率、发生的一致性、再生数量和发生时期的可调控性就显得十分必要。自1988年体细胞胚转化技术在美国西部核桃(*Juglans regia L.*) 转*NPTII*基因获得成功以来(Dandekar et al, 1989; Mc Granahan et al, 1990), 已经在苜蓿(黎茵等, 2004)、小麦(伍碧华等, 2005; Xia et al, 1999; 徐慧君等, 2001; 叶兴国等, 2001)、大豆(王晓春等, 2004; Komatsuda et al, 1985; Parrott et al, 1989; Bailey et al, 1993; Deng et al, 2000; Hartweck et al, 1998; Lee et al, 1990)、葡萄(Das, 2002)、可可(Maximova et al, 2003)、非洲枸杞(Hu et al, 2002)、罂粟(Park et al, 2000)等植物中相继获得成功。在农杆菌介导的非洲枸杞遗传转化研究中发现, 采用茎段直接分化系统或愈伤组织再生系统, 分化的不定芽90%以上玻璃化, 只有30%能再生完整植株。而Mazur et al, 1999年采用胚状体再生系统, 转基因植株形态和核型正常, 转基因胚性愈伤长时间保持高效体胚分化频率和植株再生频率, 通过1次转化即可获得大量的转基因植株。此外, 体胚则可用于快速的转基因检测, 有利与对转基因植株进行早期分子鉴定。

目前采用胚状体再生系统进行转化主要是报告基因, 如*GUS*和*GFP*。Charity et al (2004) 通过该系统将*bar*基因转入火炬松, 转基因植株在4 kg/h的除草剂压力下生长正常, 且外源基因表达稳定, 说明利用胚状体再生系统进行转基因是可行的。

#### 1.2.3.2.2 器官发生再生系统

器官发生途径是指植物愈伤组织在适宜条件下形成单极性的不定芽或不定根, 然后在芽下方形成不定根, 或在不定根上方形成不定芽, 在二者之间形成维管组织, 形成完整植株。本研究中

的作物遗传转化技术平台采用的是农杆菌介导的大豆器官发生途径的遗传转化体系,所以下面着重介绍大豆器官发生途径的研究进展。Cheng et al (1980) 最早报道通过器官发生途径再生大豆植株,他们以无菌苗的子叶节为外植体,在附加高浓度6-BA (10~50 $\mu$ M)的B5培养基上诱导出不定芽,获得高频率再生的植株。Kantha et al (1981) 以大豆无菌苗的茎尖,Barwale et al (1986) 以大豆未成熟胚子叶(培养基:MS大量元素+4 $\times$ MS微量元素+B5维生素+3mg/L BA+0.04mg/L NAA+1.5mg/L维生素B1+140mg/L脯氨酸),Wright et al (1986;1987) 以大豆上胚轴和初生叶,McCabe et al (1988) 以大豆幼胚轴,Kim et al (1990) 以大豆初生叶节为外植体,通过器官发生途径都获得了再生植株。在这些器官发生过程中,所采用的BA的浓度一般为1.5~3mg/L,基本培养基采用B5或MS。

近年来,国内外成功的大豆转基因事例多以大豆无菌苗子叶节为外植体,通过施加外源细胞分裂素(一般为6-BA)来诱导子叶节处潜在的分生组织增殖产生不定芽,不定芽经抽茎生根后再生植株。Hinchee et al (1988) 最早报导了以大豆子叶节为外植体进行农杆菌转化,他们从100余个大豆品种中筛选出最适合农杆菌转化的大豆品种Pecking,此品种亦是经常被采用的一个品种。此后又有一些关于大豆子叶节外植体转化的报导相继发表(Di et al, 1996; Zhang et al, 1999; Clemente et al, 2000; Olhoft et al, 2001),均是以Hinchee的工作为基础。Santarem et al (1998) 对于超声波辅助农杆菌转化对外植体再生的影响进行了研究,发现用超声波处理过的子叶节较对照易于转化;Donldson et al (2000) 用农杆菌转化12个短季大豆的子叶节,采取了几种不同的方案,虽然感染率高达92%,但仅从其中一个品种中获得了遗传稳定的转基因植株,转化率较低,认为大豆对于农杆菌的敏感性比较低,这是导致大豆外植体转化效率低的原因之一;而另一个原因则是农杆菌介导的大豆外植体转化率的高低是依赖于不同大豆品种的基因型的,不同基因型之间农杆菌的转化率存在很大差异。Olhoft et al (2003) 通过在培养基中添加硫醇类化合物和L-半胱氨酸来提高外植体的转化率。器官发生再生系统用于遗传转化的主要优点是:(1)组织培养所需时间短,一般3个月即可得到再生植株,而体细胞胚胎发生途径则需4个月或更长的时间;(2)不育的再生植株少;(3)外植体来源范围广,未成熟胚或无菌苗均可。但因其一般不经过愈伤组织的继代增殖,所以筛选较难,同时得到的转化植株嵌合率较高,后代的鉴定、筛选和纯化工作量较大。

### 1.2.3.2.3 原生质体再生系统

原生质体是除去细胞壁后的裸露细胞,早在上个世纪60年代,Cocking et al (1963) 用酶法分离出了高等植株原生质体,后研究者试图用豆科植物进行原生质体的分离和培养。Kao et al (1970) 和Miller et al (1971) 最早研究大豆原生质体培养,他们从悬浮细胞游离原生质体获得愈伤组织。此后,许多学者相继开展了大豆原生质体培养的研究,从成熟子叶(Wei et al, 1988)、叶和根(Schwenk et al, 1981; Xu et al, 1982) 游离出原生质体,经培养获得愈伤组织,个别有根的分化,但未分化出植株。Wei et al (1988) 最早成功报道利用大豆原生质体培养获得再生植株,他们从大豆的未成熟胚(3~5mm)子叶分离、纯化原生质体培养于相应培养基中,当愈伤组织长到2~3mm时移入含有1~2mg/L 2,4-D和0.1~0.5mg/L BA的MSB培养基中,使愈伤组织形成紧密的瘤状

结构,然后再转移到0.1~0.3mg/L NAA、BA、KT、ZT各为0.3~0.5mg/L及500mg/L CH的MSB分化培养基中,15d后有34.6%的愈伤组织分化出了芽。当苗长到3~4cm时,切下转入1/2MS+0.2mg/L IBA培养基中诱导生根获得再生植株。后来,卫志明等(1990)用不同的栽培大豆和野生大豆所作的进一步试验结果表明:1. 选用未成熟子叶分离原生质体的材料,由于未成熟子叶的细胞具有活跃的分裂能力及代谢能力,易于分裂。由未成熟子叶获得了高产量的原生质体和再生细胞的高频率分裂;2. 在原生质体的整个培养过程中,特别注意激素的前后影响,在原生质体再生细胞分裂形成小愈伤后,调节激素配比,使之长成结构紧密的瘤状愈伤组织,从而使之分化成苗。在分化培养中,附加不同细胞分裂素的合适配比及与CH(水解蛋白)的组合,均明显促进芽的形成和其后的植株再生;3. 由栽培大豆建立的原生质体再生成株的实验体系同样适用于野生大豆。

肖文言等(1994)以13个栽培大豆为试材,从未成熟子叶中游离出原生质体,用Gellan Cum进行珠状包埋,悬浮在0.1~0.2mg/L的2,4-D,0.5~1mg/L的BA改良MS液体培养基中。原生质体培养3d开始第一次分裂,以后持续分裂。然后将愈伤组织转移到含0.3mg/L 2,4-D和0.5mg/L BA的MSB固体培养基中,促使其进一步生长。再转入附加5mg/L NAA、0.5mg/L BA、0.5mg/L KT和3%蔗糖的MS分化培养基中,分化出的胚状体在含1.0mg/L NAA和0.5mg/L KT的MSB培养基上可发育成再生植株。南向日等(1998;2000)用*Bt*基因分别采用PEG和PLO方法介导转化大豆原生质体获得转基因植株。近几年来从事这方面研究报道较少。

#### 1.2.3.2.4 花药再生系统

植物花药培养研究起始于50年代初,60年代相继获得了烟草、水稻、小麦、玉米等重要农作物的单倍体植株。经过近30年的努力,利用花药培养技术已经培育了小麦、水稻等大田作物新品种和玉米自交系。印度德里大学的Guha和Maheshwar(Guha et al, 1964;1966;1967)从茄科植物毛叶曼陀罗(*Datura innoxia*)的离体花药中成功的诱导出单倍体植株后,这项研究很快被Bourgin和Nitsch(1967),Nakata和Tanaka(1968)等人扩展到烟草上,这两种植物单倍体植株诱导的成功引起了全世界的关注,自此,日本、法国、英国、丹麦、德国、美国、加拿大、澳大利亚等国家相继进行这方面的研究工作,使花药培养在国际上取得很大进步。近30年来利用花药培养产生单倍体植株的技术已被广泛应用到28个科68个属170多种植物上(Maheshwari et al, 1980),至1996年,已有10个科24个属34个种的250多种高等植物的花药培养获得成功(胡道芬,1996),其中,小麦、玉米、大豆、甘蔗、橡胶和杨树等近50种植物的花粉再生植株由我国科技人员在国际上首先培育成功(Loo et al,1986)。自1972年以来人们陆续开展了观赏植物花药培养单倍体的研究,由花粉或花药培养获得单倍体植株或单倍体愈伤组织的观赏植物有四季海棠、芍药、风信子、天竺葵、百合、毛地黄、石龙芮、矮牵牛、花烟草等。

相对于其它植物而言,大豆花药培养的研究远远落后,未取得突破性进展(叶兴国,1997)。大豆的花药培养与大豆的其它外植体培养同样存在获得愈伤组织容易、再生植株困难的问题。Ivers et al(1974)最初开展花药培养,但只获得了愈伤组织及其类苗器官。此后,一些研究报道中获得了少量的根分化。尹光初等(1982)通过对B5培养基的改进才使愈伤组织诱导率得到了提高,并分化出芽,得到了再生植株,但是分化率很低。刘德璞等(1986)用改良的B5、KM8P、

MB、MKM8P培养基获得了游离花粉愈伤组织，在分化培养基上有芽点和根形成，但是没有再生出芽。Kadlec et al (1991) 和 Zhuang et al (1991) 通过改变无机盐或添加有机物的方法，获得了花粉培养的愈伤组织。叶兴国等 (1997) 报道了由花粉愈伤组织诱导出胚状体，并发育成根芽齐全的再生植株。

### 1.2.3.3 转基因植物的鉴定与检测方法

经过筛选得到的转化外植体或转化植株，通常需要经过不同的方法进行检测，从而验证所转化的外源目的基因是否已经转到外植体中，并且整合到受体基因组中。目前常用的检测方法主要有以下几种：

#### 1.2.3.3.1 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因 (*GUS*) 显色法

主要是利用载体上所携带的报告基因进行显色反应。Jefferson et al (1987) 首次提出 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因 (*GUS*) 可以作为植物遗传转化时的报告基因，因其检测方法简便，灵敏度高，目前该基因已经成为应用最广泛的报告基因。*GUS*基因最初是从大肠杆菌中克隆得到的，研究表明*GUS*基因活性在微生物中十分普遍。近年的研究结果表明，动物和人体中也存在*GUS*活性。*GUS*基因编码 $\beta$ -葡萄糖苷酶 ( $\beta$ -Glucuronidase *GUS*) 该酶为水解酶，能够催化 $\beta$ -葡萄糖苷脂类物质的水解。常用的检测方法是组织化学染色定位。以5-溴-4-氯-3-吲哚- $\beta$ -D-葡萄糖苷酸酯 (X-GluC) 为底物。*GUS*可将GluC水解为蓝色物质。检测时，如果转化细胞具有*GUS*活性部位，则呈现蓝色，而非转化细胞由于没有此酶活性而不呈现蓝色。所以由此来区分转化与非转化细胞。对于含有叶绿素的植物材料，需要利用乙醇来进行脱色处理，从而避免因检测材料出现绿色，而与阳性对照结果对比不明显。到目前为止，*GUS*基因的应用仍然十分广泛，估计现今已有上千种以*GUS*为报告基因的转基因植物。除了*GUS*基因以外，绿色荧光蛋白也是比较常用的报告基因之一，已经被广泛应用，例如：*Gfp*用于水稻、玉米、烟草等 (Davis et al, 1998; 王泽宙等, 2000; Vain et al, 1998)。

#### 1.2.3.3.2 PCR检测法

PCR技术是一种体外快速扩增特异基因或DNA序列的方法，又称为基因的体外扩增法，其原理与体内发生的DNA复制过程十分类似。一般在转基因植株检测过程中，经过*GUS*检测后便进行初步的分子水平检测，即利用PCR技术以转基因植株的基因组DNA为模板扩增所转化的外源基因。对于已转化的植株则可得到外源基因的PCR产物，而非转化植株理论上应该不出现相同的PCR产物。但是有时难免会有细胞质DNA等非核DNA的影响，PCR结果会出现假阳性的扩增结果，同样不能证明所转化的外源基因是否已经转化到外植体的基因组中，所以还需要进行分子杂交检测。

#### 1.2.3.3.3 分子杂交法

证明外源基因在植物染色体上整合的比较可靠的方法就是分子杂交。其原理就是在一定条件下，两条不同来源的核酸链根据碱基互补配对原则，特异结合成稳定的双链分子的过程，从而达到用已知的DNA或RNA片断为探针来检测同源基因是否存在的目的。比较常用的方法是Southern

杂交。即将外源基因整合的植物基因组经酶切电泳后转移到膜上,用已知DNA序列为探针,通过杂交检测目的基因。常用的转移方法有毛细管转移和电转移。此外在此基础上发展了一种PCR-Southern杂交,该方法先对被检测材料进行外源基因PCR扩增,然后以目的基因同源探针与扩增的特异带进行杂交,对于检测显示的阳性植株进一步进行斑点杂交,PCR-Southern杂交来证明外源基因是否整合到植物染色体上。斑点杂交可以快速粗略的检测植物基因组是否含有外源基因,植物基因组总DNA无需限制性酶切,直接点在固相膜上,这一点是与Southern杂交不同的。

#### 1.2.3.3.4 实时定量PCR法

在植物遗传转化中,一般外源基因随机插入染色体1~2个拷贝时基因的表达效率最高,多个拷贝时基因表达效率降低甚至沉默。因此越早对转基因植株进行分子检测,验证外源基因插入的拷贝数,对下一步的实验越有利。目前,检测基因的拷贝数一般采用经典的Southern杂交技术,但是该方法费时、费力、试剂昂贵,需要大量的植物材料,同时还可能因为基因重排(Rearrange)丢失酶切位点,导致实验结果误差。而近年来发展起来的Quantitative Real-time PCR技术可快速、准确、高效地检测到转基因的拷贝数。

Quantitative Real-time PCR主要通过荧光报告物对PCR反应进行实时检测。荧光报告物可以是特异性的(如Taqman probes, molecular beacons, FRET probes)和非特异性的(如SYBR Green)。PCR产物量与起始模板量成正比。因此,选取基因组中的某个单拷贝基因为对照,精确定量待测样品起始模板量,进行Quantitative Real-time PCR,最终对反应结果进行客观、快速的统计分析,即可准确、方便地检测出每一转基因植株中所含的拷贝数,即使发生基因重排,也不会产生误差。Giovanna et al (2002)采用Real-time PCR技术对转基因番茄的1个内源单拷贝基因*Apx*和两个外源基因*TSWV 2N*和*NPT*进行了Quantitative Real-time PCR检测。结果表明,虽然两个外源基因*TSWV 2N*和*Npt*插入于同一个T-DNA中,紧密连锁,但所检测到的拷贝数在同一转基因植株中却不尽相同,这可能是由于转化基因盒(transformation cassette)在插入植物基因组中时发生了某种修饰,导致基因重排,而采用一般的分子检测,如Southern杂交是无法检测到的。

#### 1.2.3.3.5 免疫学检测法

免疫技术即是一种蛋白质水平上的检测技术,目前用于转基因研究中的主要有酶联免疫法和免疫荧光技术。

##### (1) 酶联免疫法

酶联免疫法Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA),是指特殊的抗体被结合固定在固体表面,如微孔板上,加入样品,未被结合的成分被洗掉,然后通过加入酶的抗体来检测抗原,未被结合的成分再次被洗掉,酶与底物反应的颜色与样品中抗原的含量成正比。在转基因植株中,含有抗体的均可采用此方法进行。

##### (2) 免疫荧光技术

免疫荧光(Immunofluorescence),也是以抗体为基础,一抗与结合有荧光色素的二抗结合,所发出的荧光可由免疫荧光显微镜进行检测。此外,还可采用统计的方法,尤其是对其基因产物,

看是否符合孟德尔规律或其它遗传规律。还可利用形态学、细胞学、差异显示毛细管电泳、蛋白质毛细管电泳分析等进行转基因植株的鉴定。

### 1.3 我国大豆种质资源与遗传改良研究现状

大豆【*Glycine max* (L.) Merrill】是我国重要的经济类作物，它是食用油和蛋白质的主要来源 (Gary et al, 2004; Nadim et al, 2004)。从1949到1999年的半个世纪时间里,世界上没有哪一种作物像大豆这样获得快速发展。1949年全世界大豆面积1,277.8万 $\text{hm}^2$ ，总产1400.6万t；1999年面积增加到7,205.2万 $\text{hm}^2$ ，总产达15,774.4万t，面积增长5.6倍，产量增长11.3倍 (常汝镇等, 2004)。中国是大豆的源产地，直至上世纪中叶一直是世界上最大的大豆生产国和出口国。20世纪50年代，美国大豆产业飞速发展，播种面积和总产量均超过我国而跃居世界第一的位置。此后，南美洲的巴西和阿根廷的大豆产量也相继超过我国。目前，我国大豆种植面积和总产量暂居世界第四的位置 (常汝镇, 2003)，并由原来的大豆出口国变为大豆进口国。

#### 1.3.1 我国大豆种质资源研究现状

我国在长期的种植过程中，经过自然选择和人工选择，形成了丰富多彩、类型各异的大豆种质资源，其丰富程度在世界上是独一无二的经过收集、整理，大豆种质资源研究得到了很大发展。我国1956年进行全国农作物品种资源征集，1979年~1981年对全国农作物品种资源进行补充征集，经过整理、鉴定，编入《中国大豆品种资源目录》及其续编一、续编二的大豆品种共2,2637份。还编入国外引进大豆品种3000份，主要是美国、加拿大、日本及俄罗斯等国家的品种，2156份种质资源通过鉴定和评价已编入《中国大豆品种资源目录》，其中美国的育成品种、遗传材料和近等基因系比较珍贵，因为它们是发掘新基因和新等位变异的物质基础 (杨守萍等, 1998; Lightfoot et al, 2005; 密士军等, 2004)。早期大豆种质主要是由地方研究单位分别保存，更新过程中往往由于自然灾害和人为原因而有损失。“七五”期间，国家建设了农作物种质资源库，由中国农业科学院作物品种资源研究所主持，将全部大豆资源经繁种送入国家种质库长期保存。国家种质库温度为-18℃，相对湿度小于57%，每年对入库种子进行生活力监测，确保种子的安全保存，预期大豆种子在这种保存条件下可以保存50年 (常汝镇等, 1998)。1927年，美国开始从中国、朝鲜、日本和前苏联引进种质资源，到1949年已由专人负责保存和鉴定评价。在20世纪80年代初，美国已从种质资源中筛选出了一些特性基因或特性种质，其中包括抗病 (疫霉根腐病、菌核病、细菌性斑疹病等17种)、抗虫 (食叶性害虫、红蜘蛛等7种)、抗逆性 (倒伏、抗寒、缺铁等)等，并研究其遗传规律和在育种中的利用。80年代以后，私人种子选育的品种逐渐成为主要大豆品种资源。目前，美国保存的栽培品种和野生大豆10,000份左右，仅次于中国；日本保存的大豆品种资源约4,000多份。设在中国台湾省的亚洲蔬菜研究中心，从1973年到1995年底AVRDC共收集大豆种质资源13,618份，目前已全部保存在中期库和长期库中。1986年建立了一套完整的中心化种质引进系统,新引进种质主要信息供所有科学家利用。大豆育种家、病理学家、昆虫学家及种子研究室的研究人员对AVRDC收集的大部分种质,对高产、早熟、光周期不敏感、抗病、虫等性状进行了评价，筛选出一些供育种利用的有益的基因源.利用筛选出的优异种质。AVRDC的科学

家配制了大量不同育种目标的杂交组合, 培育出了一大批结合高产、抗病、早熟、光温不敏感, 适合热带、亚热带地区种植的高代选系(常汝镇等, 2000)。

凡是编入目录的大豆品种, 均对其农艺性状、品质性状、抗性以及所具有的基因资源进行了鉴定和深入评价, 从中筛选出了一批优异的资源。我国大豆种质资源蛋白质含量主要分布在40%~45%, 约为其它植物蛋白含量的1~6倍, 除蛋氨酸和胱氨酸含量较低外, 其它人体所必需氨基酸含量均较高, 尤其以赖氨酸含量为最高; 大部分大豆品种含油量为20%左右; 研究表明, 蛋白质和油份含量呈负相关, 但我国丰富的大豆种质资源中仍然具有高蛋白高油类型; 在抗性鉴定方面, 筛选出一些对大豆花叶病毒、大豆包囊线虫、大豆蚜虫以及大豆食心虫表现高抗的大豆品种; 对大豆品种资源的抗逆旱性评价表明, 山西、山东、陕西的大豆材料多表现较强的抗旱性, 山西为大豆抗旱基因中心。现代分子生物学的发展为大豆品种资源的鉴定创造了有利条件。通过对大豆的耐盐性遗传及耐盐基因的分子标记研究表明, 大豆耐盐性受一对基因控制, 显性, 获得了与耐盐/盐敏感等位基因紧密连锁的RAPD分子标记(邱丽娟等, 2000), 并应用于大豆品种资源耐盐鉴定和分子标记辅助选择。除大豆耐盐分子标记外, 其它重要基因分子标记也取得了进展, 先后获得了与抗大豆花叶病毒(Soybean mosaic virus, SMV)、抗大豆包囊线虫(*Heterodera glycines*, SCN)、抗大豆灰斑病等的分子标记(刘丽君, 2002; Hayes et al, 2000; 邹继军等, 1999)。此外, 大豆遗传多样性的分子标记可应用于系统进化研究、亲缘关系研究等, 利用RAPD标记发现中国和美国大豆祖先品种在聚类时截然分开, 且两国的南方和北方大豆祖先品种也存在明显差异, 表明美国的绝大多数祖先亲本与中国大豆品种祖先亲本各具有其特殊性, 分属于不同的基因源(邱丽娟等, 1998); 利用SSR标记对日本大豆和中国大豆种质资源进行分子鉴定, 结果表明两国大豆也属于不同的基因源(关荣霞, 2003), 这些研究结果为我们引进国外大豆品种从而拓宽中国大豆遗传基础从分子水平上提供了证据。

美国每年都有新的大豆种质材料在Crop Science 上注册, 如2005年注册了几个新品种(Shannon et al, 2005; Mebrahtu et al, 2005; Helms et al, 2005; Graef et al; Edme et al, 2005); 巴西选育的品种已超过100个(刘丽君等, 2003); 阿根廷在1996-1997年间生产上释放了第一个转基因大豆品种, 之前培育的是非转基因大豆, 目前又非常重视菜用大豆种质资源的挖掘与利用(邱丽娟等, 2006)。通过引进和应用国外大豆种质在一定程度上拓宽了中国大豆育成品种的遗传基础。盖钧镒等用南方品种1138-2和南农493-1与美国品种Wayne、SRF400、Clark63、Williams的F1和F3进行杂种优势和配合力分析(邱丽娟等, 2006)。结果表明, 美国品种在长江下游杂种优势利用及品种改良中具有引用价值。张淑珍和杨庆凯(2000)对东北春大豆与美国半矮秆品种杂交后代分析中, 发现许多农艺性状有超亲优势、遗传变异大, 相对预期遗传进度大且与目标产量性状高度相关, 为育种后代选择创造了条件。育种实践证明, 美国和日本大豆种质资源在中国大豆品种选育中发挥了重要作用。新育成品种和品系的引进和利用是迅速缩小国内外育种差距的重要途径。

### 1.3.2 我国大豆遗传改良研究

我国从1923年王绶教授选育“金大332”起到1995年共育成大豆品种651个, 品种产量的遗传改

进为每年2%左右,育成品种在抗倒伏、适应性、抗病性等方面都有较大改进。但是与玉米、水稻、油菜等作物相比,大豆品种选育进展较慢。此外,中国虽然是大豆的起源国,但不是种质资源研究的强国,主要表现在育种和生产水平上与国际大豆主要生产国存在明显的差距。从表1-6中可以看出美国、巴西、阿根廷三个大豆主产国的大豆单产水平在发展初期就已经超过中国,到2004年,大豆单产均增加了1~2倍,但中国大豆单产水平不仅低于3个大豆主产国,而且低于世界平均水平。美国大豆产量的不断提高,其中品种改良的贡献占35%~40%。大豆产量进展缓慢得主要原因是遗传基础过于狭窄。近年来大豆品种选育往往趋于优良性状集中于少数品种上,大豆品种改良主要局限在当地品种或品系间的杂交,造成大豆遗传基础狭窄性普遍存在。所以拓宽大豆遗传基础,利用和创造新种质是使大豆产量突破的根本途径。

表1-6 1961-2004年世界大豆主产国单产水平比较 (kg/hm<sup>2</sup>)Table1-6 Comparasion of soybean yield among major producing countries during 1961-2004 (kg/hm<sup>2</sup>)

国家 Country	年份Year					
	1961	1971	1981	1991	2001	2004
中国China	626	1108	1164	1738	1720	1840
巴西Brazil	1127	1210	1765	2375	2710	2230
阿根廷Argentina	977	1624	2005	2388	2600	2710
美国United States	1690	1852	2033	2452	2560	2860
世界平均Average	1129	1437	1753	2170	2290	

多年来各国科学家一直致力于利用遗传转化的途径来丰富大豆的基因多样性,拓宽其遗传基础。大豆的遗传转化研究1984年首次报道(Deblock et al, 1984),过去的十几年中,大豆的转化研究工作主要集中在通过利用GUS基因等报告基因优化转化方法建立不同的转化体系(Chee & Hu, 2000)(表1-7)。与此同时,一些公司已经获得了不同性状的转基因大豆(Clemente, 2000; Falco et al, 1995; Mazur et al, 1999; Cahoon et al, 1999; Cahoon et al, 2000)。但是,大豆始终是一种难以转化(Recalcitrant)的作物之一(Trick et al, 1998),主要原因在于组织培养再生系统与转化系统尚不能有效地结合。Hinchee et al(1988)和McCabe et al(1988)首次获得了大豆转基因植株,虽然此后又有一些成功报道(Komatsuda et al, 1992; Tae-Seok Ko et al, 2004; Donaldson et al, 2000; Clemente et al, 2000; Olhoft et al, 2001; Li et al, 2002; Olhoft et al, 2003; Françoise et al, 2003),但大豆转化频率较玉米和水稻(Hiei et al, 1994; Ishida et al, 1996; Zhao et al, 2001; Frame et al, 2002)等其它作物仍然很低,试验方法重复性差,远未模式化。根据大豆品种改良的目标不同,选择不同外源基因进行转化。在早期的研究中,大豆遗传转化所用的基因主要是报告基因,如GUS基因、NPT基因、Hpt基因以及NOS基因等(Christous et al, 1988; Donaldson et al, 2000)。迄今,大豆遗传转化所转移的目的基因包括一些抗病虫基因如Bt基因(Stewart et al, 1996)、抗包囊线虫病的基因(Narayanan et al, 1999)、几丁质酶基因、BPMV-CP基因(Di et al, 1996)、Ipt基因(刘丽君等, 1999)及Barnase基因(赵桂兰等, 2001)等;转座子基因如玉米转座子Ac基因;抗除草剂基因,如CP4基因、Atrazine基因、Imazapyr及Bar基因等(Padgett et al, 1995; Clemente et al, 2000; Aragao et al, 2000; Margie et al, 2004);其它基因,如Zein(Yan et al, 2000)基因、Pep基因(郎春

秀等, 1999)、牛酪蛋白基因 (Maughan et al, 1999) 及一些基因的启动子等。

表 1-7 大豆遗传转化的主要成果

Table 1-7 The main achievements of soybean transformation

供试品种 varieties	外植体 explants	外源基因 Foreign genes	转化方法 Methods	转化结果 Results	文献 References
野生, 半野生, 栽培品种	上胚轴	T-DNA	根癌农杆菌介导	转化愈伤	王连铮, 1984
Ferrest	子叶, 子叶节, 节间	SSU	根癌农杆菌介导	转化愈伤	Facciotti, 1985
Soybean cv. Wye	原生质体	nptII和CAT	PEG/电击	抗性愈伤	Lin N, 1987
MaplePresto	子叶	nptII, GUS, Glyphosate	根癌农杆菌介导	转化植株	Hinchee, 1988
Peking Dolnat	未成熟胚	nptII	基因枪	抗性愈伤	Christou, 1988
Glycine max	未成熟胚	nptII	基因枪	转化植株	Mccabe, 1988
Glycine max	胚芽, 子叶节	nptII	根癌农杆菌介导	转化植株	Chee, 1989
8311T	大豆合子期子房	龙葵Atrazine抗性基因	微注射	转化植株	刘博林, 1989
Williams 82	胚轴, 子叶	T-DNA	发根农杆菌	发状根	Savaka, 1990
黑农26, 32, 34, 35等	卵, 合子, 早期胚细胞	外源总DNA	花粉管通道	转化植株	雷勃钧, 1991
中豆5号	原生质体	GUS	PEG	转化愈伤	黄键秋, 1992
Fayetle	胚性愈伤	GUS	基因枪	转化植株	Sato, 1993
小黑豆	大豆顶芽	nptII	根癌农杆菌介导	抗性愈伤	王慧中, 1995
黑农36	萌动种胚	GUS-ipt-NOS	根癌农杆菌介导	转化植株	付桂荣, 1996
合丰25等	子叶节, 胚轴, 幼胚, 整株	nptII	发根农杆菌介导	转化植株	徐香玲, 1996
Chapman	胚性愈伤	GUS	SAAT	转化愈伤	Trick, 1998
Jack	未成熟子叶	GUS	SAAT	转化愈伤	Santarem, 1998
Glyxhine max (L)	胚性悬浮细胞	GFP	基因枪	转化愈伤	Ponappa, 1999
中黄4号等	未成熟子叶	Bt. GUS	基因枪 根癌农杆菌介导	转化植株	苏宏辉, 1999
黑农35, 37	原生质体	Bt. GUS; nptII	多聚氨基酸介导	转化植株	南向日, 2000
Cmatarty group	子叶节	GUS; nptII	根癌农杆菌介导	转化植株	Donalilson, 2000
Cmatarty group	未成熟子叶	GUS	基因枪	转化愈伤	Simononds, 2000
AC Colibri	子叶节	gf-2.8	根癌农杆菌介导	抗性愈伤	Donalilson, 2001
Williams 82, Macon, Clark 63 and Iroquois	花	bar	花粉管通道技术	转化植株	Li, 2002
Bert	子叶节	nptII, hpt	根癌农杆菌介导	抗性愈伤	Olhofs, 2003
Hefeng 35等	大豆胚尖	nptII, GUS	根癌农杆菌介导	抗性愈伤	Liu, 2004

虽然大豆遗传转化研究困难重重, 但是转基因大豆是转基因作物中发展最快的, 1999年全球转基因作物种植面积3,992万 $hm^2$ , 大豆为2,160万 $hm^2$ , 占54.12%。美国转基因植物的商业化速度进展很快, 2001年主导的转基因大豆占据全球转基因作物的63%; 同时有数据显示, 2001年全球种植总面积7,200 $hm^2$ 的大豆中, 46%是转基因品种 (杨加银, 2002)。随着大豆转基因研究的

不断深入，转基因大豆将会被更大面积的生产种植，而且提高抗性和改善营养成分将是转基因大豆的主要发展趋势。

## 1.4 研究目的与意义

种质创新是作物种质资源有效利用的前提和关键，是遗传育种良性发展的基础和保证。50多年来，我国农作物种质资源创新在促进农业新品种更新换代、提高粮食产量、保障我国的粮食安全等方面做出了巨大贡献。

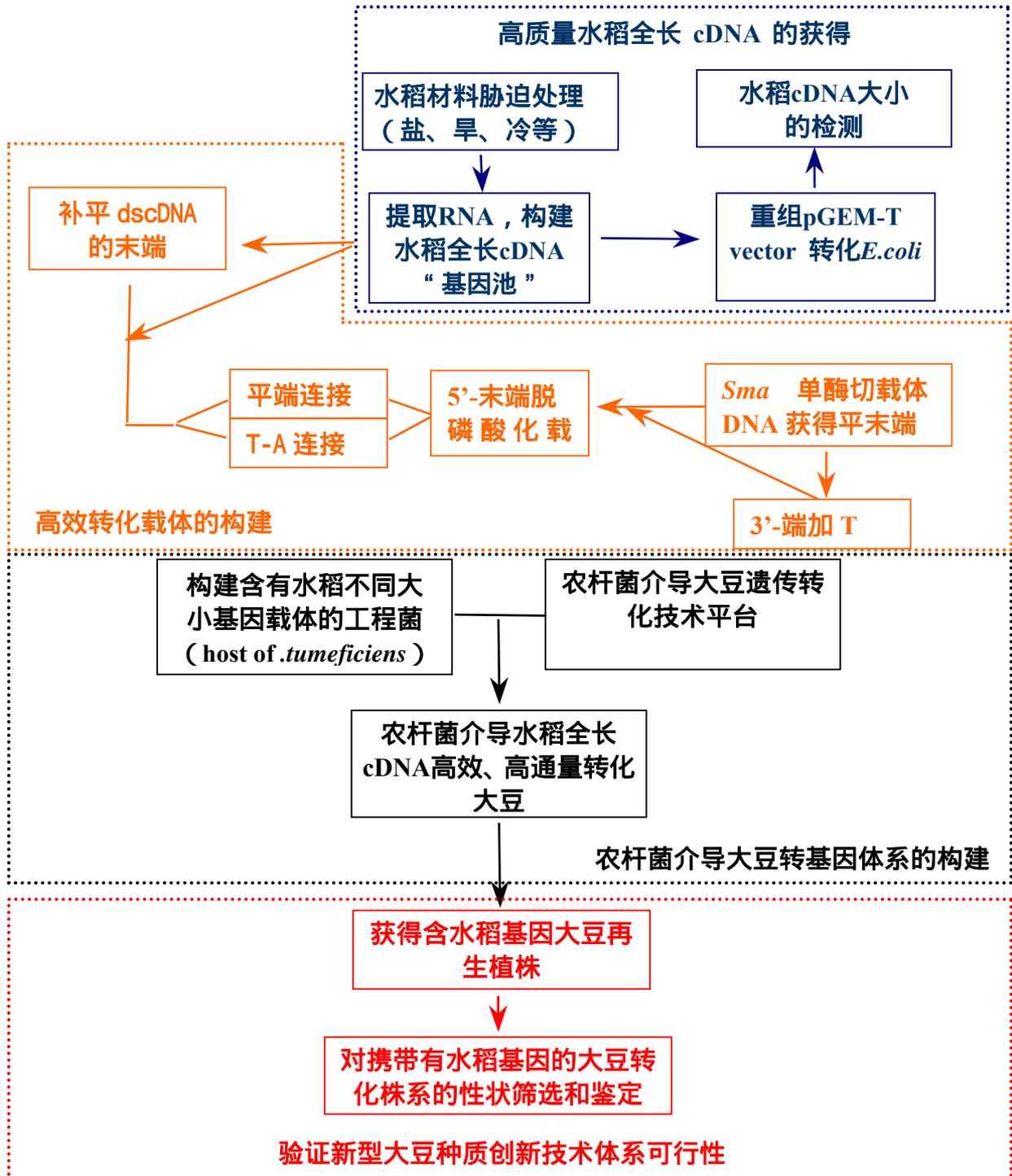
转基因技术是提高作物种质创新效率的最有效手段之一。它不仅可以在不同科、属间，甚至可以打破动植物间的界限而进行基因转移。自1983年首例转基因植物问世以来，已有至少35个科120种植物成功获得了转基因植株。然而，拥有基因是利用转基因技术进行种质创新的前提，目前大部分的基因专利被国外所拥有，我国拥有专利的基因为数很少，严重阻碍了我国转基因研究的进程。因此，如何打破国外基因专利壁垒，是利用转基因技术开展作物种质创新急待解决的关键问题之一。

水稻是重要的粮食作物之一，其基因组（430Mb）是禾谷类作物中最小的。水稻与其它作物（如玉米、大麦和小麦等）在染色体上存在明显的共线性，而且重复序列少，易于开展遗传操作，能为今后的研究提供有效的基因功能模型。伴随着植物功能基因组学的迅速发展，一些模式植物先后完成了全基因组测序。水稻是继拟南芥之后又一种基因组全测序的模式植物，测序结果显示，水稻基因组包含5万~6万个基因，其中，已被报道的基因占20%，包括各类参与细胞新陈代谢、转录、信号转导、运输和植物防御等功能基因。为我们充分利用基因资源进行植物遗传转化，并为最终实现种质创新奠定了坚实的基础。

大豆是重要的粮食作物，是食用植物油和蛋白质的主要来源，同时也是非常受欢迎的营养保健食品，在国内外市场上占有重要地位。实践证明，常规育种手段由于栽培大豆遗传基础相对狭窄，育种周期过长等原因，远不能满足国内和国际市场的需求。随着转基因技术的日渐成熟，转基因大豆越来越受到人们的青睐。利用转基因技术，将野生大豆或其它作物的一些优良农艺性状或高价值的营养品质性状转入栽培大豆品种中，获得综合性状优良的转基因大豆，以丰富栽培大豆的基因资源，拓宽栽培大豆相对狭窄的种质资源基础，提高大豆产量，进一步改善大豆的蛋白、油等品质性状，通过遗传工程的手段为传统的大豆育种提供新思路新方法。

本研究利用转基因技术的原理和方法，通过对水稻全长cDNA的分离、水稻全长cDNA与载体的连接、农杆菌介导的水稻全长cDNA转化大豆、大豆转化植株的筛选等实验步骤的完善，构建基于水稻全长cDNA的大豆种质创新技术体系；通过形态鉴定、Southern杂交、PCR、基因表达等技术对大豆转基因植株的目标基因和标记基因进行检测，从而验证该技术体系的可行性。本研究将要构建的基于水稻全长cDNA的大豆种质创新技术体系，是在无需进行基因克隆的前提下，通过构建含水稻全长cDNA的载体，在农杆菌的介导下将水稻基因导入大豆。因此，该技术体系将开辟一条打破物种间生殖隔离和国外基因专利壁垒、提高大豆等作物种质创新效率的新途径。

### 1.5 研究的技术路线



## 第二章 材料与方法

### 2.1 植物材料

#### 2.1.1 大豆材料

本试验中用于大豆遗传转化的材料包括3个大豆栽培品种：中品661、垦农18和绿75，均由中国农科院作物科学研究所大豆课题组提供。3个大豆品种对干旱、盐碱等逆境较为敏感（表2-1）。

表2-1大豆材料  
Table 2-1 Soybean cultivars

品种名称 Name	来源 Source	特性 Character
垦农18	黑龙江八一农垦大学于2001年育成 (绥87-5603X宝丰7号)	百粒重18-20g, 抗大豆灰斑病, 蛋白质35.23%, 脂肪23.17%, 属高油优质大豆
中品661	中国农科院品资所于1992年育成。	百粒重18-20g, 蛋白质41.25%, 脂肪21.93%, 是耐肥、抗病、 枝型紧凑、高光效
绿75	日本菜用大豆品种, 90年代中期经 台湾引进, 故又称“台75”。	干豆百粒重35克左右, 受蚜虫危害, 花叶病重。

#### 2.1.2 水稻材料

本试验所选用的6个抗逆性水稻品种由中国农业科学院作物科学研究所作物种质资源研究中心水稻种质资源课题组提供。名称、抗逆性及来源见表2-2。

表2-2 水稻抗逆材料  
Table 2-1 Rice with stress tolerance

代号 Code	材料名称 Name	起源地 Origin	抗逆性及其它性状 Stress tolerance and other characters
04-203	靖粳7号	云南农科院	耐冷
04-198	合系15号	云南农科院	耐冷, 穗实粒数94粒, 千粒重24.8克, 生长整齐, 分蘖力强
04-865	珍珠42	中国农科院	耐盐
04-033	辽盐16	辽宁农科院	耐盐, 株型披散, 穗实数95.9粒, 千粒重26.3克
04-110	旱稻277	中国农大	抗旱, 生育期短, 穗实数100粒, 千粒重27克, 高抗稻瘟病
04-112	旱稻502	中国农大	抗旱, 分蘖力强, 高抗稻瘟病, 穗实数150粒, 千粒重30克

### 2.2 主要化学试剂、酶类及试剂盒

本试验中所用到的酶类、化学试剂及试剂盒见表2-3。

表2-3 试验所用的试剂、酶和试剂盒  
Table 2-3 Reagents, enzymes and Kits

试剂名称 Reagent Name	公司名称 Company Name	试剂名称 Reagent Name	公司名称 Company Name
Pyrobest DNA Polymerase	Takara	<i>Bam H</i>	New England Lab
Taq 酶	Promega	<i>Not</i>	New England Lab
dATP	Promega	<i>Sma</i>	New England Lab
dCTP	Promega	Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal(CIP)	New England Lab
dGTP	Promega	T4 DNA Polymerase	New England Lab
dTTP	Promega	1 Kb DNA Ladder	New England Lab
T4 DNA ligase	New England Lab	<i>Sac</i>	New England Lab
<i>EcoR</i>	New England Lab	Klenow Fragment	New England Lab
<i>Hind</i>	New England Lab	<i>EcoR</i>	New England Lab
BD SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit	BD Clontech	Trizol	Invitrogen
PolyAtract mRNA Isolation kit	Promega	pGEM-T Easy Vector	Promega
RNase	Promega	Agrose	Amresco
Bacto tryptone	OXOID	Bacto yeast extraction	OXOID
IPTG	Promega	X-Gal	Promega
a-[ <sup>32</sup> P] dCTP	Amersham Biosciences	Proteinase K	Sigma
gelatin	Sigma	FicoU-400	Sigma
PVP-360	Sigma	PIPES	Sigma
Kanamycin	Sigma	MOPS	Sigma
Cefotaxime	Sigma	Formamide	Sigma
Glycerol	Sigma	Gel extraction kit	Omega
Plasmid mini kit	Omega	Ampicillin	Sigma

## 2.3 培养基、溶液等试剂的配制

### 2.3.1 大豆遗传转化主要组织培养基配方

本试验组织培养过程中子叶节外植体所用基本培养基均为B5基本培养基，胚尖以及带有1片子叶的胚尖外植体所用基本培养基是MSB5培养基培养。

#### 2.3.1.1 子叶节外植体系统

##### 1. 发芽培养基

B5 + 2% sucrose + 0.6% agar + 1% B5 vitamin + 1 mg/L BA, pH 5.8

##### 2. 共培养培养基

B5+3% sucrose + 0.8% agar + 1% B5 vitamin + 1mg/L BA + 200 $\mu$ M acetosyringone , pH5.4

### 3. 恢复培养基

B5+2% sucrose + 1% B5 vitamin + 0.75% agar + 1.5mg/L BA + 500mg/L cefotaxime + 500mg/L carbenicillin, pH5.8

### 4. 筛选培养基

B5+2% sucrose + 1% B5 vitamin + 0.75% agar + 1.5mg/L BA + 500mg/L cefotaxime + 500mg/L carbenicillin + 50mg/L kanamycin, pH5.8

### 5. 芽伸长培养基

B5 +2% sucrose + 1% B5 vitamin + 0.2mg/L BA + 500 $\mu$ g/L gibberellin + 50mg/L Asp + 50mg/L Glu + 300 $\mu$ g/L IAA + 500mg/L cefotaxime + 500mg/L carbenicillin, pH5.8

### 6. 生根培养基

B5+2% sucrose + 1% B5 vitamin + 1.5mg/L IBA + 10mg/L Asp + 10mg/L Glu + 300mg/L IAA, pH5.8

#### 2.3.1.1.2 胚尖外植体系统

##### 1. 发芽培养基

MS + 3% sucrose + 0.6% Agar + 1% B5 vitamin + 3.5mg/L BA , pH5.8

##### 2. 共培养培养基

2/3 MS+3% sucrose + 0.8% agar + 1% B5 + 6mg/L BA + 200 $\mu$ M acetosyringone , pH5.4

##### 3. 恢复培养基

2/3 MS+3% sucrose + 1% B5 vitamin + 0.75% agar + 2mg/L BA + 500mg/L cefotaxime + 500mg/L carbenicillin , pH5.8

##### 4. 筛选培养基

2/3 MS+3%蔗糖 + 1% B5 + 0.75%琼脂 + 2mg/L BA + 500mg/L cefotaxime + 500mg/L carbenicillin + 50mg/L kanamycin , pH5.8

##### 5. 芽伸长培养基

2/3 MS+3%蔗糖 + 1% B5 vitamin + 0.2mg/L BA + 500 $\mu$ g/L gibberellin + 50mg/L Asp + 50mg/L Glu + 300mg/L IAA + 500mg/L cefotaxime + 500mg/L carbenicillin, pH5.8

##### 6. 生根培养基

2/3 MS+3% sucrose + 1% B5 vitamin + 1.5mg/L IBA + 10mg/L Asp + 10mg/L Glu + 300mg/L IAA, pH5.8

#### 2.3.2 其它试剂及培养基配方

##### 1. YEP Medium (*A.tumefaciens*): 1 liter

成分	用量	终浓度
Ingredient	Amount	Final Concentration
Bacto tryptone	10g	1%
Bacto yeast extraction	5g	0.5%
NaCl	5g	0.5%
H <sub>2</sub> O	to 1 liter	

Agar(for plate)	15g	1.5%
-----------------	-----	------

Adjustment: Adjust pH to 7.0 and autoclave.

## 2. LB Medium (*E. coli*): 1 liter

成分	用量	终浓度
Ingredient	Amount	Final Concentration
Bacto tryptone	10g	1%
Bacto yeast extraction	5g	0.5%
NaCl	10g	1%
H <sub>2</sub> O	to 1 liter	
Agar(for plate)	15g	1.5%

Adjustment: Adjust pH to 7.0 and autoclave.

## 3. Lysozyme solution (Solution ): 100ml

成分	用量	终浓度
Ingredient	Amount	Final Concentration
Glucose	0.9g	50mM
EDTA(pH8.0)	2 ml of 0.5M stock	10mM
Tris-HCl(pH8.0)	25ml of 1M stock	25mM
H <sub>2</sub> O	to 100ml	

Adjustment : Adjust volume to 100ml with pure water and autoclave. Store at 4 °C.

## 4. NaOH-SDS stock (Solution )

成分	用量	终浓度
Ingredient	Amount	Final Concentration
NaOH	1/2 volume of 0.4N stock	0.2N
SDS	1/2 volume of 2% stock	1%

Adjustment : Mix NaOH and SDS stocks just prior to use.

## 5. Potassium acetate stock (Solution ): 100ml

成分	用量	终浓度
Ingredient	Amount	Final concentration
Potassium acetate	60ml of 5M KOAc	3M
Glacial Acetic Acid	28.5ml	
H <sub>2</sub> O	11.5ml	

**6. 50 × TAE (Electrophoresis buffer):1 liter**

成分	用量	终浓度
Ingredient	Amount	Final Concentration
Trisma Base	242g	2M
Glacial Acetic Acid	57.1ml	
EDTA	100ml of 0.5M EDTA(pH8.0)	50mM

Dilute 50 fold with pure autoclaved water.

**7. 10×FA gel Buffer**

成分	终浓度
Ingredient	Final concentration
MOPS(free acid)	200mM
Sodium acetate	50mM
EDTA	10mM

Adjustment : pH to 7 with NaOH.

**8. 1×FA gel Buffer : 1 liter**

成分	终浓度
Ingredient	Final Concentration
10×FA buffer	100ml
37%(12.3M) formaldehyde	20ml
Rnase-free water	to 1 liter

**9. 5 × RNA Loading Buffer : 10ml**

成分	用量
Ingredient	Amount
Saturated aqueous bromophenol blue solution 1	16μl
500mM EDTA,pH8.0	80μl
37%(12.3M) formaldehyde	720μl
100% glycerol	2ml
formamide	3.084ml
10 × FA buffer	4ml
Rnase-free water	to 10ml

**10. 1.2% FA Agrose Gel : 100ml**

成分	用量
Ingredient	Amount
agrose	1.2g
10 × FA gel buffer	10ml
Rnase-free water	To 100ml

**11. EDTA (0.5M, pH8.0) : 1 liter**

成分	用量	终浓度
Ingredient	Amount	Final Concentration
EDTA-disodium salt	186.1g	0.5M
NaOH	40g	
H <sub>2</sub> O	to 1 liter	

Adjustment : pH to 8.0 with NaOH. Autoclave.

**12. Tris-HCl (pH8.0) : 1 liter**

成分	用量	终浓度
Ingredient	Amount	Final concentration
Trisma Base	121.1g	1M
HCl	42ml	
H <sub>2</sub> O	t 1 liter	

Adjustment : pH to 8.0 with HCl and adjust volume to 1 liter. Autoclave.

**13. 20 × SSC**

成分	用量
Ingredient	Amount
NaCl	877g
Na <sub>3</sub> .citrate	441
H <sub>2</sub> O	to 5 liter

**14. Denhardt's III: 100ml**

成分	用量
Ingredient	Amount
gelatin	2 g
FicoU-400	2 g
PVP-360	2 g
SDS	10 g
sodium pyrophosphate	5 g
H <sub>2</sub> O	to 100ml

Dissolve at 65 , and store on warm plate.

### 15. 5 × HSB: 1 liter

成分	用量
Ingredient	Amount
NaCl	175.3 g
PIPES	30.3 g
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	7.45 g
H <sub>2</sub> O	To 1 liter

Adjustment: Adjust to pH 6.8 with 4 M NaOH, make up to 1L with H<sub>2</sub>O. Autoclave.

## 2.4 主要实验技术

### 2.4.1 水稻材料胁迫处理

- (1) 将种子放入50 ℃ 恒温箱高温处理48h, 以打破种子休眠, 使种子成熟度保持一致;
- (2) 每份材料挑选50粒饱满的种子, 放置于垫有滤纸的口径为9cm的培养皿中;
- (3) 先用3%的次氯酸钠溶液消毒20 min, 然后用自来水冲洗3次;
- (4) 在每个培养皿里加10 ml 水, 放入30 ℃ 恒温箱催芽2d ~ 3d ;
- (5) 待芽长5mm左右时, 将材料放到有光照且温度为20 ℃ ~ 30 ℃ 的室内条件, 使幼芽继续生长;
- (6) 待苗长到两叶一心时, 分3组进行胁迫处理。a 耐盐处理: 施加适量 1.5%NaCl 溶液, 分别在处理后 2h、4h、6h、8h、12h、16h、20h、24h 剪取叶片并等量混合; b 耐冷处理: 将水稻幼苗材料置于 6 ℃ 恒温培养箱中, 分别在处理后 2h、4h、6h、8h、12h、16h、20h、24h 剪取叶片并等量混合; c 抗旱处理: 施加适量 16%PEG8000 溶液, 分别在处理后 2h、4h、6h、8h、12h、16h、20h、24h 剪取叶片并等量混合;

### 2.4.2 植物叶片总 RNA 的分离与检测

- (1) 一次性使用的进口枪头、离心管基本无 RNA 酶, 可不经预处理灭菌即可用于制备和储存 RNA ; 反复使用的试验用品如研钵、玻璃器皿和药匙等, 会有 RNA 酶污染, 使用前需用 0.1% DEPC 水溶液浸泡过夜处理, 然后高压灭菌, 烘干备用; 新开封的试剂基本无 RNA 酶污染, 可直接使用; 其他试剂一律用灭菌的 0.1% DEPC 水配制;
- (2) 先将研钵及药勺用液氮充分预冷, 取幼嫩叶片约 100mg, 于液氮中迅速充分研磨成粉末;
- (3) 转入预冷的加有 1.0ml Trizol 的 1.5ml 离心管中, 涡旋 15s 充分混匀, 置于 20 ~ 30 ℃ 静置 10min ;
- (4) 加入 0.2ml 氯仿, 涡旋 15s, 室温静置 2min, 4 ℃ 离心 12000rpm, 15min ;
- (5) 小心转上清于另一新 1.5ml 离心管中, 加入 0.5ml 异丙醇, 混匀, 室温静置 10min, 4 ℃ 12000rpm 离心 10min ;
- (6) 弃去上清, 加入 1ml 75%乙醇清洗沉淀一次, 空气干燥 10min, 加入适量 DEPC 水溶解沉淀;
- (7) 总 RNA 定量: 利用紫外分光光度计, 测定 A260nm 和 A280nm 处的吸光值, 根据 A260/A280 的

值来估算 RNA 的纯度；

- (8) 总 RNA 完整性检测：用 1.2% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的质量，若条带清晰，无拖尾，说明 RNA 完整，可用于文库构建。

注：电泳槽、胶板和梳子清洗干净后，用 0.4M NaOH 浸泡过夜，然后用 DEPC 水冲洗干净。

### 2.4.3 mRNA 的分离

- (1) 配制 SSC 溶液：

1.2ml 0.5 × SSC：在无菌、无 RNA 酶的 1.5ml 离心管中混合 30μl 20 × SSC 和 1.17 ml 无 RNase 水。

1.4ml 0.5 × SSC：在无菌、无 RNA 酶的 1.5ml 离心管中混合 7μl 20 × SSC 和 1.393ml 无 Rnase 水。

- (2) 探针退火【生物素化的 oligo (dT) 与 mRNA 的 poly (A) 尾结合】

在 DEPC 处理过的灭菌 1.5ml 离心管中加入水稻总 RNA，用无 RNase 灭菌水加至终体积 500μl，65 °C 水浴 10min，打破二级结构。取出立即向管中加入 3μl 生物素标记的 oligo (dT) 探针及 13μl 20 × SSC，轻轻混匀，室温放置至完全冷却，同时进行步骤 3。

- (3) 洗磁珠 SA-PMPS (streptavidin-paramagnetic particles)

轻弹离心管底直至磁珠彻底悬浮起来，置于磁架上吸集。小心移弃上清（不要离心），用 0.5 × SSC 洗磁珠 3 次，每次用 300μl，并用磁架吸集。小心的移去上清，洗好的磁珠用 100μl 0.5 × SSC 重悬。

- (4) 吸集和洗涤（生物素与 streptavidin 结合，洗去非结合物）

将步骤 2 冷却的反应混合物全部加入到洗过的 SA-PMPS 管中，室温静置 10min，并不时的轻轻混匀。用磁架吸 SA-PMPS，小心的移去上清（注意不要碰触磁珠沉淀）。用 0.1 × SSC 洗磁珠 3 次，每次用量为 300μl，且保证磁珠全部悬浮起来。最后一次洗完后，要确保吸净上清。

- (5) mRNA 洗脱

加入 100μl 无 Rnase 灭菌水，轻弹使磁珠充分悬起，用磁架吸附 SA-PMPS，将洗脱下来的 mRNA 移至一灭菌无 Rnase 新离心管中，磁珠不用扔掉。加入 150μl 无 Rnase 灭菌水重复洗脱步骤，洗脱下来的 mRNA 与第一次的混合，共 250μl。

- (6) mRNA 沉淀

加入 1/10 体积 (25μl) 3M 乙酸钠 (pH5.2) 和 1 倍体积异丙醇 (250μl)，轻轻混匀-20 °C 沉淀过夜，然后 12000rpm 离心 10min，弃上清，加入 1ml 75% 乙醇洗涤沉淀，重新离心，自然晾干。加入适量无 Rnase 灭菌水溶解沉淀，-70 °C 保存备用。

- (7) mRNA 的定量和电泳检测同总 RNA。

### 2.4.4 工程菌液制备

#### 2.4.4.1 质粒 pBI121 DNA 提取

用无菌牙签从保存有质粒 pBI121 的 LB (Kan<sup>r</sup>) yeast peptone 10g/L, yeast extraction 5g/L, NaCl 5g/L,

pH7.0, Agar 15g/L) 平板上挑取单克隆, 接种于加有 50mg/L kanamycin 的 20ml YEP 液体培养基 (peptone, 10g/L, yeast extraction 5g/L, NaCl 5g/L, pH7.0) 中, 37 °C 振荡培养过夜。

- (1) 收集振荡培养过夜的菌液, 每管 2ml;
- (2) 12000 rpm 离心 60s, 弃上清;
- (3) 加入 200 $\mu$ l 溶液, 用涡旋仪完全混匀;
- (4) 加入 400 $\mu$ l 溶液, 混匀, 冰上放置 5 min;
- (5) 加入 300 $\mu$ l 溶液, 混匀, 冰上放置 10 min;
- (6) 12000 rpm 离心 10 min, 取上清, 加入等体积的氯仿抽提一次;
- (7) 12000 rpm 离心 10 min, 取上清, 加入等体积的异丙醇, 室温静置 20 min, 离心 10 min;
- (8) 弃上清, 用 75% 乙醇洗涤沉淀, 干燥 DNA;
- (9) 加入含有 RNase 的 1 $\times$  TE 中溶解质粒 DNA 备用。

#### 2.4.4.2 农杆菌转化

采用冻融法转化农杆菌。

- (1) 于 200 $\mu$ l 感受态细胞中加入 1 $\mu$ l pBI121 质粒 DNA, 轻轻混匀, 冰浴 30min;
- (2) 置于液氮中冷冻 2min, 迅速转入 37 °C 水浴中热击 5min, 然后再冰浴 2min;
- (3) 加入 800 $\mu$ l LB 液体培养基, 28 °C 振荡培养 3~4h;
- (4) 5000 rpm 5min 离心, 弃上清;
- (5) 涂于含有 25mg/ml Rifampicin 和 50mg/ml Kanamycin 的平板上, 28 °C 培养 2~3 d。

#### 2.4.4.3 工程菌液制备

- (1) 从 YEP 培养平板 (Rif<sup>+</sup>, Kan<sup>+</sup>) (peptone, 10g/L, yeast extraction 5g/L, NaCl 5g/L, pH7.0, Agar 15g/L) 上用无菌的牙签挑取含有质粒 pBI121 的农杆菌 GV3101 单菌落接种于加有 50mg/L Rifampicin 和 50mg/L Kanamycin 的 20ml YEP 液体培养基 (peptone, 10g/L, yeast extraction 5g/L, NaCl 5g/L, pH7.0) 中;
- (2) 于 28 °C, 200 rpm 振荡培养过夜, 然后以 1/100~1/20 的比例进行二次活化后于 3500 rpm, 4 °C 离心 10min, 收集菌体, 重悬于液体共培养培养基中备用。

#### 2.4.5 基因组 DNA 的提取

采用常规 CTAB 法, 略加改进。具体操作如下:

- (1) 取 1~2 片幼苗新鲜叶片于研钵中, 加入适量液氮冷冻处理, 迅速将其研成细微粉末。然后将粉末转至经液氮冷冻处理过的一个(或几个) 1.5ml 离心管中, 加入 700 $\mu$ l 65 °C 预热的 DNA 提取缓冲液【2%CTAB, 0.1mol/L Tris-HCl, 0.1mol/L EDTA, 81.8g/L NaCl, 0.2% (V/V)  $\beta$ -mercaptoethanol】, 混合均匀后置于 65 °C 的恒温水浴锅中水浴 1~1.5h, 并定时进行混匀, 防止内容物沉积, 影响 DNA 的产量。
- (2) 水浴完成后, 取出离心管, 冷却到 10 °C 以下, 配平后, 12000 rpm, 16 °C 离心 10min。

- (3) 取出离心管, 吸出上清液于另一 1.5ml 离心管中, 并分别加入等体积的 Tris 饱和酚-氯仿 (V/V=1:1), 轻轻的颠倒, 直至管内液体混合均匀。配平后, 12000 rpm 离心 10min。
- (4) 将上清液转至另一 1.5ml 离心管中, 加入等体积的氯仿, 轻轻地混匀后, 在 12000rpm 离心 10min, 并转移上清液至另一 1.5ml 离心管中。
- (5) 加入等体积的冷 0.6 × 异丙醇, 反复颠倒, 直至成团的 DNA 出现, 于 4℃ 放置 30min 以上, 10000rpm 离心 10min。
- (6) 弃掉上清, 将 DNA 沉淀置于通风橱中, 自然风干, 加入 0.7ml 1×TE (pH8.0) 和 10μl RNase A, 轻弹管壁至 DNA 全部溶解, 37℃ 恒温箱中 1h。
- (7) 加 Tris 饱和酚-氯仿 (V/V =1:1), 轻轻混匀, 于 4000rpm, 4℃ 下离心 10min, 取上清液并转至另一 1.5ml 离心管中。
- (8) 加入等体积的氯仿, 轻轻混匀, 于 4000rpm, 4℃ 下离心 10min, 取上清液并转至另一 1.5ml 离心管中。
- (9) 加入 0.1 倍体积的 3M NaAC (pH5.2) 和 2 倍体积的冷无水乙醇, 充分混合均匀, 于-20℃ 静置片刻 (约 15min), 勾出 DNA, 风干并加入适量 1×TE (pH8.0), 使充分溶解, 并于 4℃ 备用。
- (10) 用紫外分光光度仪BECKMAN DU 640 测量DNA的浓度和相对纯度, 用OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>比值 (在 1.8 ~ 2.0 范围内为较好); 并用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测DNA的质量。
- (11) 调整所有样品 DNA 的量至约 300ng/μl, 备用。

#### 2.4.6 PCR 反应

PCR 反应体系 (25μl) :

成分	用量
Components	Volume
Buffer	2.5μl
Primer F (10μM)	1.25μl
Primer R (10μM)	1.25μl
dNTP (2.5mM)	2μl
DNA 模板	1μg
Taq DNA 聚合酶	2U
ddH <sub>2</sub> O	to 25μl

PCR 反应程序 :

Step 1	95	5min
Step 2	94	1min
Step 3	58	1min
Step 4	72	1min 30sec
go to step 2		29times
Step 5	72	10 min
Step 6	10	Keeping

PCR 产物检测 :

PCR 结束后,取 10 $\mu$ l 加有 8  $\mu$ l loading buffer 【98% formamide, 10 mM EDTA ( pH 8.0 ), 0.5 % (w/v) bromophenol blue,和 0.5 % ( w/v ) xylene cyanol】的 PCR 产物于 1 %的琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统照相,检测 PCR 结果。

#### 2.4.7 Southern 杂交

##### (1) 点膜

- 1) 按照一定的尺寸裁好带正电的尼龙膜,
- 2) 将3 $\mu$ l ( 1  $\mu$ g/ $\mu$ l ) 高分子量大豆基因组DNA均匀点到尼龙膜上,
- 3) 风干,将膜浸泡在0.6 M的NaOH ( 溶液必须是新鲜配制的 ) 溶液中处理5min,
- 4) 转入0.5M的Tris-HCl ( PH7.5 ) 中处理3min,
- 5) 最后用ddH<sub>2</sub>O漂洗3min,自然晾干,
- 6) 于紫外交联仪中交联1min,用保鲜膜包好,于-20 保存。

##### (2) 转膜

- 1) 取10 $\mu$ g大豆转化植株基因组DNA分别用*EcoR*、*Hind* 和*EcoR* 充分酶切,琼脂糖凝胶电泳后将凝胶转入0.25M HCl中,轻轻振荡15min,直到变色;
- 2) 倒掉HCl,用水冲洗凝胶,然后将胶块浸泡在0.4M NaOH中;
- 3) 裁一块适当尺寸的尼龙膜,在一个大的方皿中加入600ml 0.4M NaOH并在方皿上方放置一块玻璃板作为支持物;
- 4) 在玻璃板上放置3张适当大小用0.4M NaOH浸润的滤纸,并使滤纸两端浸在0.4M NaOH 溶液中,然后用玻璃棒将滤纸之间的气泡赶出;
- 5) 将胶块正面朝下放置到滤纸上,赶尽气泡,将裁好的浸有0.4M NaOH的尼龙膜放置到凝胶表面,赶尽气泡;
- 6) 将三张适当尺寸浸有0.4M NaOH的滤纸置于尼龙膜上,再在上面放一沓吸水纸巾;
- 7) 在吸水纸上方压上一500g重物,然后过夜转膜;
- 8) 16 ~ 24h后,将已经结合有DNA的尼龙膜浸泡在2  $\times$  SSC中3min以中和NaOH,然后将膜自然晾干后置于紫外交联仪中交联1min,于-20 保存备用。

##### (3) 探针的标记

- 1) 提前20min将<sup>32</sup>P从冰箱中取出融化;
- 2) 吸取25ng(水稻cDNA)探针于一0.5ml离心管中,加水补足至15 $\mu$ l,沸水浴7min,然后立即冰浴10min;
- 3) 在上述离心管中依次加入5 $\mu$ l OLB、2 $\mu$ l BSA和2 $\mu$ l *Klenow*酶,混匀,加入2 $\mu$ l <sup>32</sup>P后37 育2h,标记。
- 4) 标记完成后,加1  $\times$  TE至50 $\mu$ l。
- 5) 探针加5 $\mu$ l ( 1/10 ) NaOH ( 3M ), 变性7min。

##### (4) 预杂交

- 1) 预杂交液的配制 : 于50ml大离心管中分别加入ddH<sub>2</sub>O、5  $\times$  HSB、Denhart's ,混匀后 置

于65℃温育，直到液体澄清。成分和用量如下表：

成分	膜1~2张	膜3~6张	膜7~10张
Components			
ddH <sub>2</sub> O	6ml	12ml	18ml
5×HSB	2ml	4ml	6ml
Denhart'sIII	1ml	2ml	3ml

- 2) **鲑精DNA变性**：将盛有鲑精DNA的离心管沸水浴7min，迅速冷却，然后加入到已经预热的预杂交液中，100μl（10ml）、200μl（20ml）、300μl（30ml），混匀后加入杂交盒中。
- 3) **预杂交**：将尼龙膜在2×SSC中润湿后，将膜转移到加有杂交液的杂交盒中，必须保证每一张膜都浸过，用保鲜膜将盒口封住，以减少蒸发，再盖上盖子，65℃恒温箱中杂交5~6h。
- 4) **杂交**：向杂交盒中加入变性后的探针，注意勿加到膜上，而是加到溶液中，吸取一定要缓慢，封好杂交盒，65℃杂交过夜。
- 5) **洗膜**：把膜从杂交盒中取出，放入另一个盒中，用少量冷的wash I漂洗，以除去多余的杂交液；加65℃的Wash II于杂交盒中，在65℃恒温摇床中温育15min，检测放射性强度，视放射性高低再冲洗一次。若信号太强，用洗液II冲洗（65℃），冲洗过程中翻动膜，以使各张膜洗得均匀；用滤纸将膜吸干，用保鲜膜包好，排除气泡。
- 6) **定影**：将磷屏曝光15min，将膜DNA面朝上放于夹板上，将磷屏面朝下，将夹板夹好，胶布封口，标好日期。
- 7) **检测**：大约2~3天后用磷屏仪（BIO-RAD）公司检测杂交结果。

### 第三章 连接有水稻不同 cDNA 表达载体的构建

利用转基因技术的原理和方法，围绕高质量水稻全长 cDNA 的获得、载体的筛选与改造、不同大小水稻基因与载体的连接、农杆菌介导的高效转化等关键技术，建立基于水稻全长 cDNA 的作物种质资源创新技术体系。

#### 3.1 高质量水稻全长 cDNA 的获得及其末端的改造

##### 3.1.1 总 RNA 的提取与检测

首先对水稻材料进行胁迫处理，试验方法详见 2.4.1；然后进行水稻叶片 RNA 的分离与检测，试验方法详见 2.4.2。

##### 3.1.2 mRNA 的分离

该方法采用生物素标记的 Oligo (dT) 引物与成熟的真核 mRNA 3' polyA 区域高效结合，通过 Promega 公司的 polyAtract mRNA isolation system IV 试剂盒中的链霉素亲和标记的磁珠及磁性分离柱捕捉和洗脱杂种分子，利用无 RNA 酶水从固相洗脱 mRNA。具体步骤详见 2.4.3。

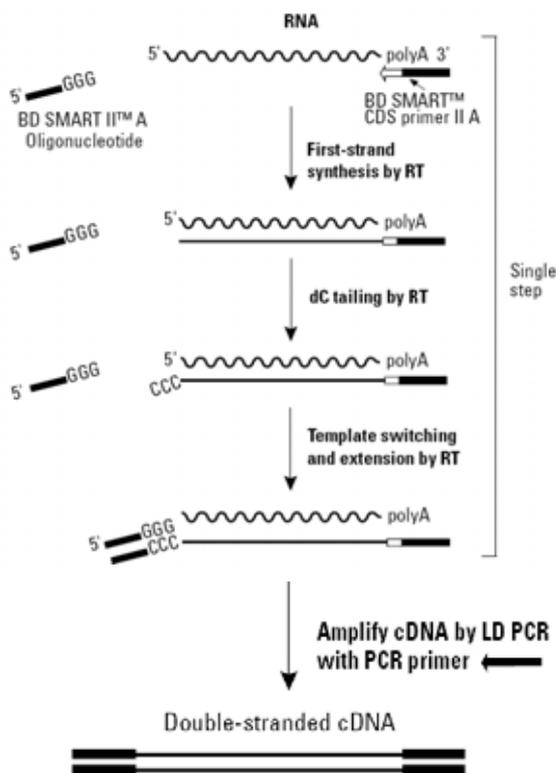


图3-1 SMART技术流程图

Fig.3-1 Flow chart of BD SMART technology

### 3.1.3 高质量水稻全长 cDNA 的合成与质量检测

按照Clontech公司SMART<sup>TM</sup> PCR cDNA Synthesis Kit 方法，原理如图3-1所示。

#### (1) cDNA 第一链的合成

1) 提前预热恒温箱到72℃，经DEPC处理的反应体系为：

成分	用量
Components	Volume
mRNA	0.025 ~ 1μg
3' BD SMART CDS Primer II A (12 μM)	1 μl
BD SMART II A Oligonucleotide (12 μM)	1 μl
Deionized H <sub>2</sub> O	x μl
Total volume	5 μl

2) 混匀，72℃ 温育2min；

3) 冰浴2min后，快速离心收集于管底；

4) 于管中依次加入下列成分：

成分	用量
Components	Volume
5 × First-Strand Buffer	2 μl
DTT (20 mM)	1 μl
dNTP Mix (10 mM of each dNTP)	1 μl
BD PowerScript Reverse Transcriptase	1 μl

5) 轻轻混匀，并快速离心收集于管底；

6) 42℃ 温育1h；

7) 将离心管置于冰上，终止第一链的合成。

#### (2) cDNA 第二链的合成

1) 将PCR仪预热到95℃；

2) 无菌0.5ml离心管中依次加入下列成分

3) 轻弹离心管混匀反应混合物，快速离心收集于管底；

4) 然后放到预热到95℃的PCR仪上；

5) 按照如下程序进行热循环：95℃ 1min，继而95℃ 15 sec，65℃ 30 sec，68℃ 6min，21cycles。

成分	用量
Components	Volume
first strand cDNA	2 $\mu$ l
Deionized H <sub>2</sub> O	80 $\mu$ l
10 $\times$ BD Advantage 2 PCR Buffer	10 $\mu$ l
50 $\times$ dNTP Mix ( 10 mM of each dNTP )	2 $\mu$ l
PCR Primer II A ( 12 $\mu$ M )	4 $\mu$ l
50 $\times$ BD Advantage 2 Polymerase mix	2 $\mu$ l
Total volume	100 $\mu$ l

(3) cDNA的片段分级及纯化

- 1) 将所得双链cDNA通过琼脂糖凝胶电泳展开；
- 2) 通过紫外凝胶成像，从胶上切取一定片段大小范围内的cDNA条带；
- 3) 利用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收纯化所切下的凝胶中的cDNA；
- 4) 琼脂糖凝胶电泳检测回收的cDNA。

3.1.4 水稻 ds cDNA 片段大小检测

为了检测所得水稻 ds cDNA 片段的大小，将经过上述纯化的 ds cDNA 连接克隆载体 pGEM-T easy vector( 图 3-2 )并转化大肠杆菌 DH10 $\beta$  感受态细胞，蓝白斑筛选后，挑单克隆进行菌液 PCR，检测插入 cDNA 片段大小。菌液 PCR 所用引物及其序列如下：

**T7 primer:** 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

**SP6primer:** 5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3'

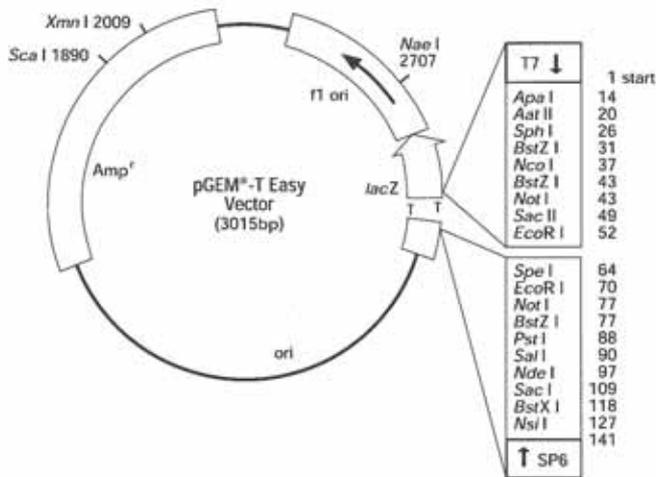


图3-2 pGEM-T easy 载体结构图

Fig 3-2 Structure of pGEM-T easy vector

(1) 大肠杆菌感受态细胞的制备

- 1) 接种活化的单菌落至10ml LB培养基中, 37 °C 振荡培养过夜;  
将过夜培养物转入100ml LB培养基中, 37 °C 振荡培养4~6h, 至OD<sub>0.3</sub>;
- 2) 将培养菌液转入两个预冷的50ml离心管中, 冰浴30min, 4 °C 4000rpm 离心10min;  
弃净上清, 将菌体重悬于预冷的0.1M CaCl<sub>2</sub>溶液, 冰浴20min, 4 °C 4000rpm 离心10min;
- 3) 弃上清, 将菌体重悬于预冷的5ml 0.1M CaCl<sub>2</sub>溶液, 4 °C 4000rpm 离心10min;
- 4) 弃上清, 将菌体重悬于2ml预冷的0.1M CaCl<sub>2</sub>溶液中, 混匀后, 200μl /管分装于1.5ml灭菌离心管中, 4 °C 保存备用。

## (2) dscDNA与pGEM-T Easy vector 连接

标记好3个0.5ml的离心管, 依次加入如下成分

成分 Components	用量 Standard Reaction	阳性对照 Positive Control	空白对照 Background Control
2 × Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5μl	5μl	5μl
pGEM-T Easy	1μl	1μl	1μl
PCR product	X μl	-	-
Control Insert DNA	-	2μl	-
T <sub>4</sub> DNA Ligase	1μl	1μl	1μl
Deionized water to a final volume of	10μl	10μl	10μl

混匀, 快速离心将反应混合物收集于管底, 于 25 °C 连接 1h。

## (3) 连接产物热击转化大肠杆菌

- 1) 冰箱取出连接产物置于冰上, -70 °C 冰箱中取出大肠杆菌感受态细胞置于冰上直至融化。  
轻弹离心管底部, 使感受态细胞悬浮于培养基中, 小心的将 20μl 感受态细胞加入含连接产物的离心管中;
- 2) 轻弹离心管底部混匀溶液, 冰浴 30min;
- 3) 42 °C 热击 90~100sec (不要振荡), 立即放于冰中 2min;
- 4) 每管加入 800μl LB 液体培养基, 37 °C 振荡培养 1.5h;
- 5) 1000rpm 离心 10min, 弃上清, 剩余 200μl 培养基重悬菌体, 涂板;
- 6) 37 °C 过夜培养, 筛选阳性克隆, 提取质粒并通过 PCR 扩增鉴定;

## (4) 单克隆菌液 PCR

- 1) 挑取寄主菌DH10β单菌落于 10ml LB培养基中, 37 °C 振荡培养过夜, 至OD<sub>600</sub>=1.5;
- 2) 模板的制备: 对于每个单克隆, 95μl ddH<sub>2</sub>O中加入 5μl菌液, 95 °C 变性 10min, 然后短暂离心, 菌液PCR检测的反应体系如下:

成分	用量
Components	Volume
Deionized water	16.2 $\mu$ l
10 $\times$ buffer	2.0 $\mu$ l
dNTP ( 25mM each )	0.2 $\mu$ l
T7 primer ( 10 $\mu$ M )	0.2 $\mu$ l
SP6primer ( 10 $\mu$ M )	0.2 $\mu$ l
Taq ( 5U/ $\mu$ l )	0.2 $\mu$ l
Template DNA	1 $\mu$ l
Total volume	20 $\mu$ l

菌液 PCR 检测的反应程序：94 变性 3min，继而 94 1min，52 1min，72 2min，32 cycles，72 延伸 3min，10 保温。

### 3.1.5 水稻 cDNA 测序分析

用无菌牙签于培养平板上随机挑取 50 个单克隆，在加有 1ml 液体 LB 培养基的 1.5ml 离心管中，过夜培养，将培养物送交测序公司测序，根据测序结果，进行生物信息学相关分析。

利用 DNASTar 软件的 Seqman 程序对所得序列进行质量检测，对于峰图比较好的序列递交 Genebank 数据库，利用 Blastn 和 Blastp 程序分别进行核酸水平和蛋白质水平基因的同源性比较。

### 3.1.6 水稻 ds cDNA 末端的补平

成分	用量
Components	Volume
cDNA	40 $\mu$ l
T4 polymerase buffer	5 $\mu$ l
dNTP ( 2.5mM )	1.2 $\mu$ l
T4 polymerase	1 $\mu$ l
BSA	0.8 $\mu$ l
Deionized water	to 50 $\mu$ l

通过 LD PCR 得到的 ds cDNA 多是 3' 末端带有一个腺嘌呤 A 的尾巴，在进行平末端连接时需要进行 ds cDNA 末端补平处理，本试验利用 T4 Polymerase ( NEB 公司 ) 对水稻 ds cDNA 进行了末端补平处理。将 ds cDNA 补平处理后，进行琼脂糖凝胶电泳，并利用凝胶回收试剂盒进行回收纯化，步骤同上。

## 3.2 载体的筛选与改造

### 3.2.1 质粒载体筛选的原则

本试验所用的质粒载体是双元表达载体 pBI121, 含有 *NPT* 基因, *GUS* 报告基因, 启动子 35S 和 NOS 等元件 (图 3-3); 此外还有双元表达质粒载体 pGreen35S 包含有 *Kanamycin* 抗性选择标记基因和 *GUS* 报告基因, 全长约 6kb, 由付永福研究员 (私人通讯) 惠赠; 双元质粒表达载体 p3301 包含有 膦丝菌素转移酶基因和 *Kanamycin* 抗性基因, 全长约 11kb, 由黎裕研究员 (私人通讯) 惠赠; 实验室所用工程菌株为农杆菌 *GV3101* 由本实验室保存。

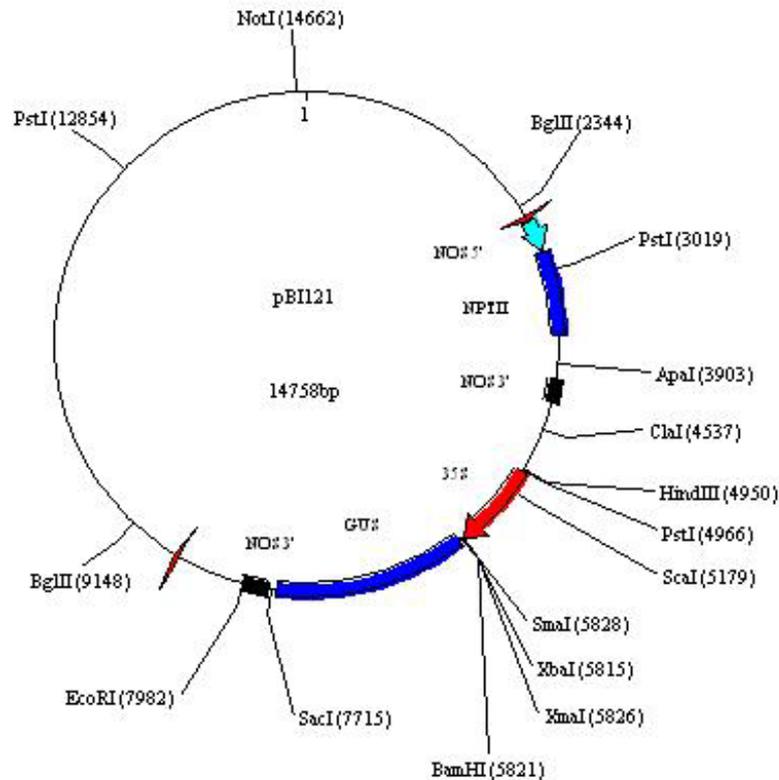


图 3-3 质粒 DNA pBI121 的单酶切位点示意图

Fig. 3-3 The single restrictive site map of pBI121

在以载体作为转化系统的植物遗传转化研究中, 质粒表达载体的选择是转基因事件能否达到预期目的的关键之一, 应该根据不同的作物不同的遗传转化体系选择适合的载体。在农杆菌介导的植物转基因体系中, 多采用带有 Ti 质粒转移所必需的左右边界序列, 并经过改造的双元表达质粒载体。一般表达载体具备几个必需元件, 即报告基因、选择标记基因以及外源基因表达所必需的启动子和终止子等能够保证外源基因的高效表达, 遗传稳定性, 载体的大小要适中以便于载体构建的操作。在本研究中, 基因转化的工程菌液包含的载体与以往不同, 是携带有水稻不同大小的 cDNA 的载体。本研究采用平末端连接载体和水稻 cDNA, 所以载体需要具备以上条件以外, 还必须具有平末端限制性内切酶位点, 并且位于多克隆位点处。

### 3.2.2 载体的改造

本实验所选用的几种表达载体均为 Ti 质粒双元表达载体，含有 *NPT II* 基因，*GUS* 基因。对质粒 DNA 进行酶切，鉴定其限制性酶切位点的准确性，然后 *Sma* 酶切，获得平末端质粒，经过末端加 T、去磷酸化处理后得到平末端质粒和末端加 T 质粒。

#### (1) 质粒 DNA 的中量提取

- 1) 挑取培养平板上的单克隆于 200ml LB 液体培养基中，37℃，200 rpm 振荡过夜培养；
- 2) 收集菌液并离心，收集菌体，弃净培养基，加入溶液（每 5ml 菌液加 250μl），并充分混匀；
- 3) 向混合液中加入溶液（每 5ml 菌液加 250μl），迅速轻轻混匀；
- 4) 向混合液中加入溶液（每 5ml 菌液加 350μl），迅速轻轻混匀，冰浴片刻，10000 rpm 离心 10min；
- 5) 转上清液于干净的 HiBind 柱中，室温 10000 rpm 离心 1min，弃掉液相，用 500μl buffer HB 洗柱，室温 10000 rpm 离心 1min；
- 6) 弃掉液相，加入 700μl Wash buffer，10000 rpm 离心 1min，弃掉液相，并重复此步骤 1 次；
- 7) 将 HiBind 柱于 50℃ 恒温箱中干燥 10 min，除去残余酒精；
- 8) 从恒温箱中取出 HiBind 柱，向柱中央加入 50~100μl 70℃ 预热的 Elution buffer 室温静置 2min，10000 rpm 离心 1 min；
- 9) 于 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测所提质粒 DNA 的质量。

#### (2) 质粒的酶切鉴定

为了验证质粒的酶切位点的准确性，本试验对质粒进行了酶切鉴定。根据质粒 pBI121 的物理图谱，选择 *SmaI* 和 *SacI* 进行双酶切。由于 *SmaI* 与 *SacI* 两种内切酶的最适温度不同（*SmaI*, 25℃；*SacI*, 37℃），本试验采用两步酶切，首先进行 *SmaI* 单酶切，酶切体系 25μl，反应条件如下：

成分	用量
Components	Volume
10 × NEB buffer4	2.5μl
DNA	2μg
100 × BSA	0.5μl
<i>SmaI</i>	1μl
Deionized water	至 25μl

充分混匀后，于 25℃ 下温育 3h，然后向反应体系中添加 0.5μl 10 × NEB buffer4，和 1μl *SacI*，补充灭菌双蒸水至 30μl 充分，混匀后于 37℃ 条件下温育 3h 琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果。

#### (3) 质粒 *Sma* 酶切

由于外源基因与载体之间不具备相互匹配的酶切位点，所以本试验拟采用平末端连接和在载体末端加 T 两种方法来构建重组子。利用质粒载体具有的平端限制酶切位点 *Sma* 对质粒进行单

酶切, 得到具有平末端的开环质粒载体, 将所得酶切产物进行脉冲场电泳, 同时一部分酶切质粒进行末端加 T 处理后通过凝胶回收纯化酶切产物, 步骤如下:

- 1) 在紫外凝胶成像系统下, 切胶回收目的质粒 DNA 大片断;
- 2) 加入适量融胶液 Binding buffer, 于 65 °C 水浴中温育溶解胶块;
- 3) 将 DNA/融胶液转入 HiBind 柱中, 室温, 10000 rpm 离心 1min;
- 4) 弃掉液体, 加入 300 $\mu$ l Binding buffer, 室温, 10000 rpm 离心 1min;
- 5) 加入 700 $\mu$ l SPW buffer (乙醇稀释过的), 静置 2~3min, 室温, 10000 rpm 离心 1min;
- 6) 琼脂糖凝胶电泳检测回收 DNA 质量。

#### (4) 质粒末端加 T 处理

将前面得到的一部分开环质粒 DNA 进行末端加 T 处理, 准备与末端具有 A 的 ds cDNA 连接, 具体步骤如下:

#### (5) 质粒 5'端脱磷酸化处理

在连接过程中, 为了避免载体发生自连, 需要对载体进行 5'端脱磷酸化处理, 本试验采用 NEB 公司的小牛碱性磷酸酶 Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP), 反应体系如下:

成分	用量
Components	Volume
1 × NEB buffer 3	5 $\mu$ l
vector	40 $\mu$ l
CIP	2 $\mu$ l
Deionized water	to 50 $\mu$ l

用枪头轻轻混匀, 快速离心收集于管底, 37 °C 温育 60min。反应结束后进行琼脂糖凝胶电泳, 并利用凝胶回收试剂盒回收纯化质粒 DNA。

### 3.3 含不同大小水稻基因表达载体的工程菌构建

#### 3.3.1 含不同大小水稻基因表达载体的构建

在分子生物学中, 将目的片段克隆于特定的载体有多种策略, 目前主要包括粘末端连接、平末端连接以及粘末端与平末端之间连接等。其中以粘性末端的连接效率为最高, 而以平末端的连接效率为最低。粘末端连接是建立在外源片段与载体之间具备匹配的限制酶切位点的基础之上的。在本试验中由于外源片段 ds cDNA 与双元表达载体之间不存在相同的限制性酶切位点, 所以拟采取平末端和 T-A 连接方法 (图 3-4), 连接体系如下:

成分	处理 1	处理 2	处理 3
Components	T1	T2	T3
dscDNA	0.5μl	1.0μl	2.0μl
载体 DNA	1.0μl	1.0μl	1.0μl
10 × ligation buffer	1.0μl	1.0μl	1.0μl
T4 DNA ligase	0.5μl	0.5μl	0.5μl
Deionized H <sub>2</sub> O	7.0μl	6.5μl	5.5μl
Final Volum ( μl )	10μl	10μl	10μl

16 温育连接过夜。

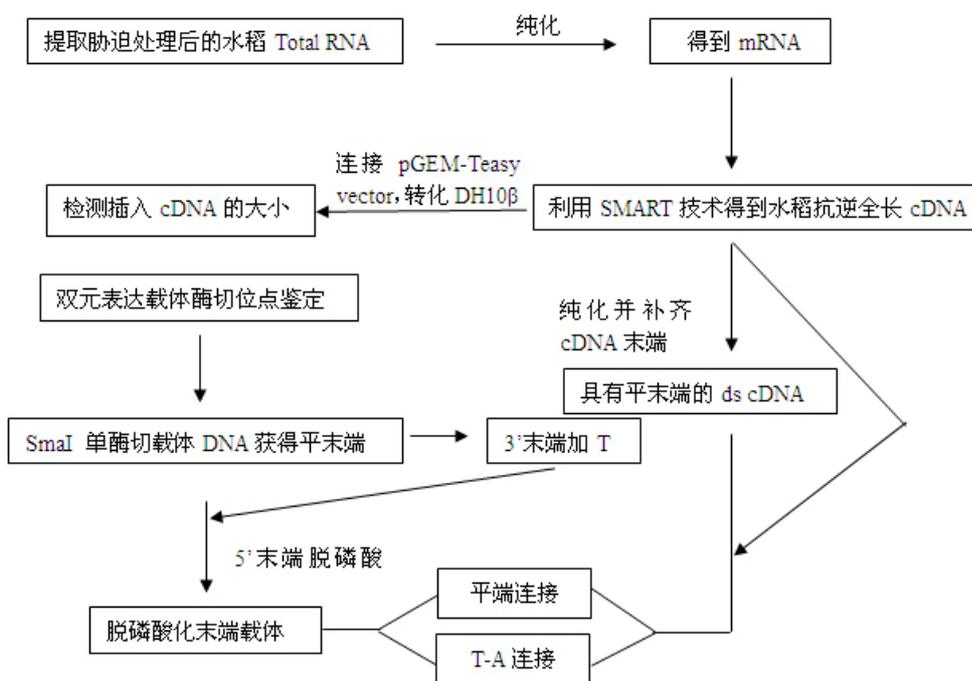


图3-4 表达载体构建流程图

Fig. 3-4 Flowchart of expression vector construction

### 3.3.2 连接产物转化农杆菌

- (1) 从-70 低温冰箱中取出感受态细胞置于冰上直至融化，轻弹离心管底部，使感受态细胞悬浮于培养基中；
- (2) 将三个连接体系产物混匀，吸取 10μl 小心地加入到 200μl 感受态细胞中，轻轻混匀冰浴至少 30min；
- (3) 置于液氮中冷冻 2 min，迅速转入 37 水浴中热击 5min，再冰浴 2min；
- (4) 加入 800μl YEP 液体培养基，28 振荡培养 3 ~ 4h；
- (5) 取出，5000rpm 离心 5min，弃掉 800μl 上清后重新悬浮菌体；  
剩余的菌液均匀涂布于涂于含有相应抗生素（25μg/ml利福平和50μg/ml卡那霉素）的LB培养基平板上，28 倒置培养2 ~ 3d。

### 3.3.3 农杆菌单克隆菌液 PCR 检测平末端连接效果

菌液 PCR 所用引物序列如下，试验方法详见试验方法 2.4.4。

**Forward primer:** 5'-CGTTATTTATGAGATGGGTT-3'

**Reverse primer:** 5'-CGAGAAAGGAAGGGAAGA-3'

### 3.3.4 含不同大小水稻基因表达载体的工程菌液制备

将连接成功的连接产物再次转化农杆菌，经过 3~4h 的复苏培养后，转入 20ml LB 液体培养基中振荡培养至液体开始混浊，加入适量卡那霉素抗生素后继续培养 6~8h，然后将培养物以适当比例转入 100ml 加有适量卡那霉素抗生素的 LB 液体培养基中适当 OD 值，收集菌体制备转化用工程菌液，相关步骤的试验方法详见 2.4.4.3。

## 3.4 结果与分析

### 3.4.1 水稻总 RNA 及 mRNA 浓度与质量检测结果

从植物中分离得到的总 RNA 的纯度及完整性对于 cDNA 文库的构建至关重要，尤其对于低丰度表达的基因更加重要。本试验对抗逆性水稻材料分别进行了相关的盐胁迫、干旱胁迫和冷胁迫处理。取适量经过胁迫处理的水稻幼嫩叶片组织，利用 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂提取总 RNA，并用 Dnase 进行了消化，保证无痕量 DNA 的污染。取 5 $\mu$ l 总 RNA 稀释 100 倍后，测定其含量及纯度 A260/A280 为 1.86，表明 RNA 纯度很好。吸取 3 $\mu$ l RNA 溶液到 1.5ml 无 RNase 的灭菌离心管中，加入 1 $\mu$ l RNA Loading buffer，补足体积到 5 $\mu$ l，65 $^{\circ}$ C 变性 15min，于 1 $\times$ FA 胶电泳检测 RNA 的完整性。电泳检测结果如图 3-5 所示，1.2% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测 rRNA 的 18S 和 28S 条带清晰可见，表明 RNA 的完整性较好，可以进行 mRNA 的分离纯化。

本试验按照 Promega 公司的 PolyAtract mRNA Isolation System IV 试剂盒提取 mRNA。取 2 $\mu$ l 稀释 25 倍测定其含量，A260/A280 为 2.0，1.2% FA 胶检测在 28S 和 18S 上下呈现弥散状，表明 mRNA 质量良好，满足反转录 cDNA 以及文库构建的要求。

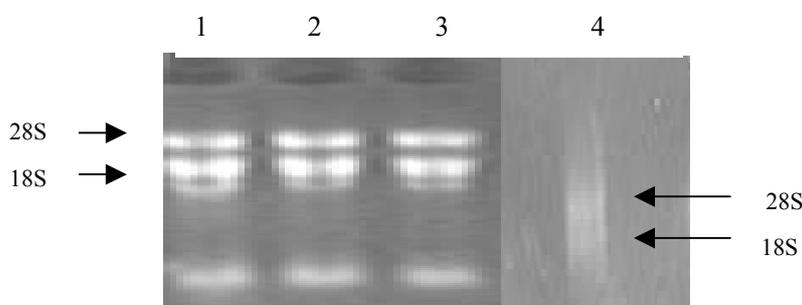


图 3-5 水稻总 RNA 和 mRNA 的变性琼脂糖凝胶电泳

泳道 1、2、3 是总 RNA；泳道 4 是 mRNA

Fig 3-5 Testing of rice total RNA and mRNA after electrophoresis in denatured agrose gel

Lane 1, lane 2 and lane 3 indicating total RNA; Lane 4 indicating mRNA

### 3.4.2 水稻 cDNA 的获得

经过 LD PCR 反转录得到了水稻 ds cDNA，从图 3-6 中可以看出所得 cDNA 片段大小分布在 8kb ~ 0.5kb 之间，扩增效果较好。

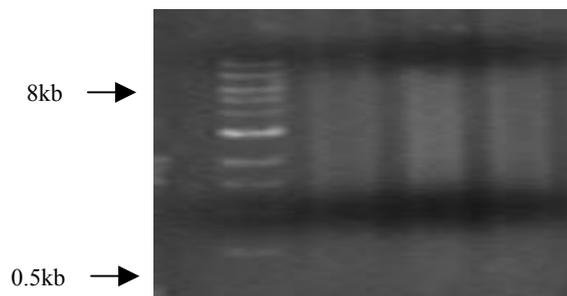


图 3-6 水稻 cDNA 电泳检测

Fig. 3-6 Electroporesis check of rice cDNA

### 3.4.3 插入水稻 cDNA 片段长度的鉴定

将所得水稻 cDNA 经过片段分级 (< 3kb) 后连接 pGEM-Teasy 载体并转化大肠杆菌 DH10 $\beta$ ，蓝白斑筛选(图 3-7)后随机挑取 40 个单克隆进行菌液 PCR 检测。结果表明插入片段大小在 0.3 ~ 2kb，平均插入片段大小为 900bp (图 3-8)。

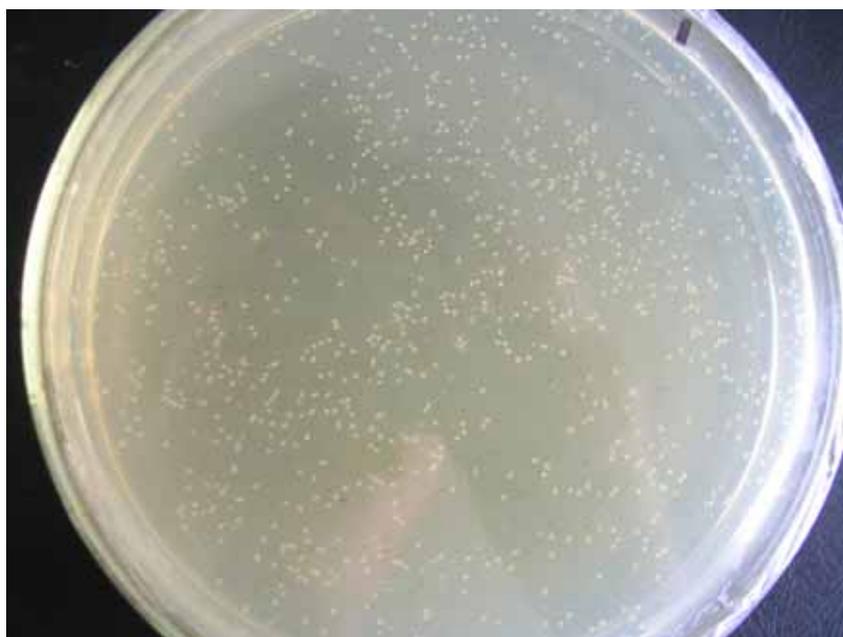


图 3-7 蓝白斑筛选

Fig. 3-7 blue and white (*Lac Z*) selection

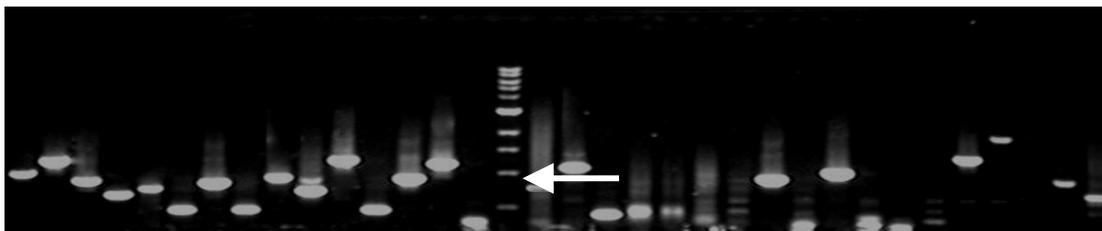


图 3-8 菌液 PCR 结果 (箭头所指的是 1kb)

Fig. 3-8 Single clone PCR result (Arrow indicating the fragment with 1kb length)

#### 3.4.4 部分水稻 cDNA 序列分析

本试验一共随机挑取了 50 个单克隆, 过夜培养后测序。利用 DNASTar 的 Seqman 程序对所得序列进行质量评估, 从中筛选出峰图比较好的 12 条 cDNA 序列进行下一步生物信息学分析。登陆 NCBI 网站, 利用 Blastn 程序对上述筛选出的 12 条 cDNA 序列与 Genebank 的 nr 数据库进行同源性对比分析, 结果表明所得 cDNA 与水稻 cDNA 及 SET 序列具有很高的同源性。其中一条编号 C05\_0706079-28-T7 序列与水稻肌动蛋白结合蛋白基因 NM\_001064798cDNA 具有 100% 同源性。当然, 这些数据只是对得到的水稻 cDNA 的序列结构进行了初步的分析, 随着本研究的不断深入, 相关系统的分析研究工作将陆续展开。

#### 3.4.5 双元表达载体的酶切鉴定

本试验所采用的表达载体均是长度在 10kb 左右的比较大的质粒载体, 为了保证后续连接试验的准确性, 对这些质粒载体进行了双酶切和单酶切鉴定。对于 pBI121 质粒采用的是 *Sma* + *Sac* 双酶切, 这两个酶切位点处于长度约为 1.8kb 的 *GUS* 基因的两侧。酶切产物电泳结果显示得到了一条约 1.8kb 的 DNA 条带 (图 3-9), 表明所切载体为 pBI121, 酶切位点正确。

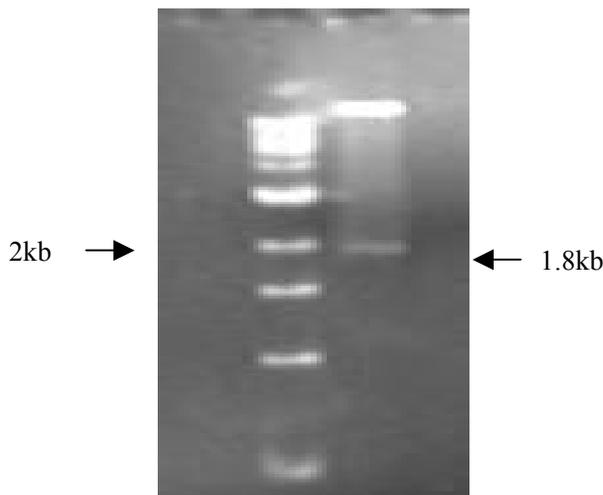


图 3-9 质粒 pBI121 双酶切鉴定结果 (1.8kb 为目的片段)

Fig. 3-9 The result of plasmid pBI121 by double diges (The 1.8kb length is the target fragment)

#### 3.4.6 平末端连接效果的检测结果

经过片段分级的 ds cDNA 由于末端已经进行了补平, 所以具备了平滑末端, 可以与同样是

平末端的 pBI121 载体 DNA 进行平端连接。连接产物转化农杆菌后,随机挑取单克隆振荡过夜培养后提取质粒 DNA,下图为质粒 pBI121 重组子的菌液 PCR 电泳检测结果。从图 3-10 中可知质粒 pBI121 中已经连接有外源 DNA 片段,片段长度大约分布在 1kb-0.3kb 之间。其中有一些单克隆质粒 DNA 未得到扩增产物,可能为空载体,总体而言连接效率较低,有待于进一步提高。

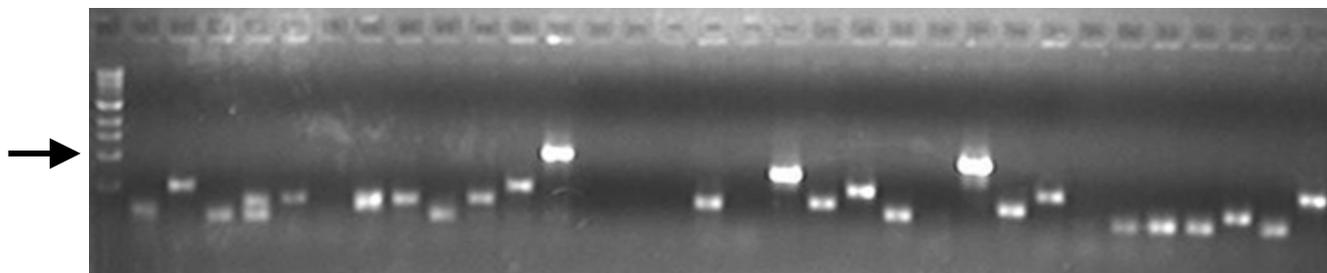


图 3-10 重组质粒 pBI121 菌液 PCR 结果(箭头所指是 1kb)

Fig. 3-10 The result of single clone PCR of recombinated plasmid DNA pBI121 (Arrow indicating the fragment with 1kb length)

#### 3.4.7 T-A 连接效果的检测结果

LD PCR 得到的水稻 cDNA 的 3'末端均带有腺嘌呤 A,所以可以利用这一特性与同样具备 T 末端的质粒 DNA 连接。转化农杆菌后挑单克隆振荡过夜培养后提取质粒 DNA,下图为质粒 pBI121 重组子的 *EcoR* 酶切电泳检测结果,根据质粒酶切图谱可知,图 3-11 中 2736bp、2421bp、1800bp 几条带是质粒本身酶切应该产生的谱带,根据限制性内切酶 *Sma* 的单酶切位点与 *EcoR* 之间的位置关系可以确定,分布在 2736bp 与 2421bp 两条带上下位置的条带就是插入的外源片段,即水稻 cDNA。

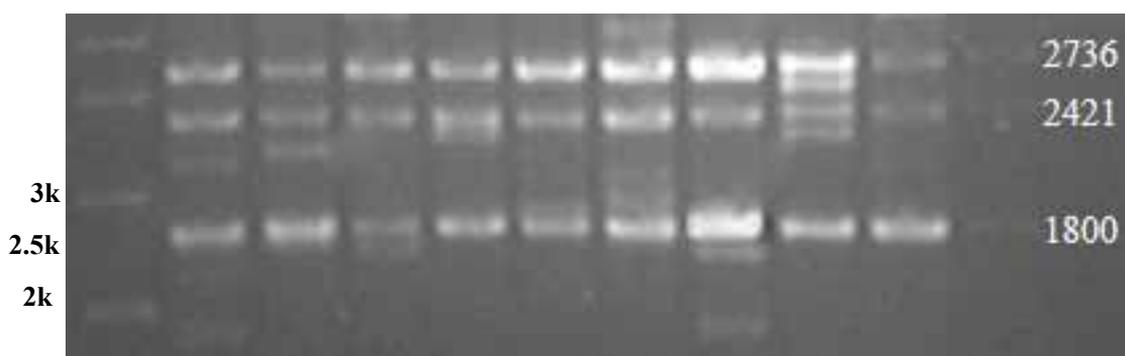


图 3-11 重组质粒 pBI121 酶切结果

Fig.3-11 The result of recombinated plasmid DNA pBI121 digested

### 3.5 小结

本试验对水稻材料进行抗旱、耐盐、耐冷处理后,将每个时间点处理材料等量混合并提取总 RNA,纯化后反转录得到水稻胁迫条件下表达的 ds cDNA。关于载体的构建,由于 ds cDNA 与质粒 DNA 之间没有匹配的酶切位点,此外出于不希望由于引入其它酶切位点而有可能切断 ds cDNA 的考虑,本试验采用了 T-A 连接和平末端连接两种方案。将连接产物转化农杆菌。进一步

鉴定农杆菌转化克隆的方法有菌落原位杂交、酶切质粒，前者准确性高但费用昂贵，所以本试验采用菌液 PCR 和酶切质粒的方法进行鉴定。结果表明两种连接方案都得到了插入有 ds cDNA 的重组质粒，虽然连接效率低，但是这两种方案是可行的。

## 第四章 农杆菌介导大豆快速高效转化体系的构建

植物基因转化是获得优异材料和鉴定新基因功能的重要途径。在上一章中,我们已经初步构建了含有不同大小的水稻基因的表达质粒载体,那么下一步需要利用转基因技术,实现水稻cDNA向大豆的转移。本试验采用的是农杆菌介导的大豆转基因技术体系。随着植物分子生物学技术的迅猛发展,转基因技术在大豆遗传改良的应用过程中也取得了许多成果(Deblock et al, 1984; Horsch et al 1984; Chee & Hu, 2000; Clemente, 2000; Falco et al, 1995; Mazur et al, 1999; Cahoon et al, 1999; Cahoon et al, 2000; Komatsuda et al, 1992; Tae-Seok Ko et al, 2004; Christou et al, 1987; Parrot et al, 1989; Dhir SK, et al 1992; Di et al, 1996; Reichert et al, 1998; Komatsuda et al, 1985; Bailey et al, 1993; Deng et al, 2000; Hartweck et al, 1998; Lee et al, 1990; Zhang et al, 1999; Olhoft et al, 2001; Donaldson et al, 2000; Olhoft et al, 2003; Kadlec et al, 1991; Zhuang et al, 1991; Françoise et al, 2003; Li et al, 2002; Aragao et al, 2000; Margie et al, 2004)。目前在大豆遗传转化过程中,农杆菌介导法是大豆遗传转化的首选方法。然而,众所周知大豆一直是难以转化的植物之一,虽然近年来不同的实验室相继建立起自己的农杆菌介导的大豆遗传转化体系,通过对这些体系的比较发现既有共同之处又存在自身的技术特点。但是普遍存在一个问题那就是可操作性和可重复性差,不具备广泛适用性(Margie et al, 2004)。因此若想以农杆菌介导的大豆遗传转化体系为技术平台开展相关的分子生物学研究,就有必要针对自身所具备的大豆材料及技术条件建立自己实验室的稳定、高效的大豆遗传转化体系,为相关种质创新技术的研究提供强有力的平台,验证该作物种质资源创新技术体系的可行性,并将该技术推广应用于其它作物。这也正是本试验的目的所在。

### 4.1 传统农杆菌介导大豆转化体系的优化

根据已有的研究报道(Cheng et al, 1980; Liu et al, 2004),本文对农杆菌介导大豆子叶节和胚尖转化系统的关键步骤进行优化:

#### 4.1.1 工程菌液制备

试验方法详见 2.4.6。

#### 4.1.2 大豆种子表面消毒

每个流程挑选 400~500 粒饱满健康成熟大豆种子,放入含有氯气(由 50ml 次氯酸钠和 2ml 浓 HCl 生成)的密闭容器内,消毒 4~6h(刘海坤等, 2002)。

### 4.1.3 大豆种子萌发及不同外植体的获得

#### 4.1.3.1 子叶节

- (1) 在超净工作台上将消毒后的大豆种子种脐向下播种于发芽培养基中；
- (2) 置于 25 ~ 28 ℃ 和光照/黑暗 (16h/8h) 条件下培养；
- (3) 5 ~ 7d 后, 将转绿并且发芽的大豆籽粒置于超净工作台上, 剥去种皮, 用一无菌手术刀沿种子中线切开, 使两片子叶分开, 留下胚轴 3 ~ 4mm, 去掉顶芽；
- (4) 然后将其近轴面向上, 倾斜植于发芽培养基上, 进行预培养。

#### 4.1.3.2 胚尖

- (1) 在超净工作台上将消毒后的大豆种子种脐向下播种于发芽培养基中；
- (2) 以封口膜封好培养皿, 置于 25 ~ 28 ℃ 和光照/黑暗 (16h/8h) 条件下培养；
- (3) 24h 后, 将刚刚萌动的大豆种子置于超净工作台上, 剥去种皮, 用一无菌手术刀将下胚轴连同刚刚萌动的胚尖与两片子叶剥离, 去掉原叶；
- (4) 然后胚尖向上, 垂直接种于发芽培养基中, 于 25 ~ 28 ℃ 光照下进行预培养。

### 4.1.4 农杆菌侵染大豆外植体

在超净工作台上将预培养 24h 的大豆子叶节外植体从预培养培养基上转入液体芽诱导培养基中浸泡 30 ~ 60 min, 然后转移到已经制备好的农杆菌工程菌液 ( $OD_{600}=1.0$ ) 中, 于 25 ℃ 下黑暗中轻微振荡 30 ~ 60min。

在超净工作台上将预培养 24h 后转绿的胚尖外植体从预培养培养基上转入已经制备好的农杆菌工程菌液 ( $OD_{600}=1.0$ ) 中, 于 25 ℃ 下黑暗中轻微振荡培养 21h。

### 4.1.5 农杆菌与大豆外植体共培养

- (1) 将侵染后的大豆子叶节和胚尖从菌液中取出, 置于铺有无菌滤纸的无菌培养皿中；
- (2) 用无菌镊子将外植体逐一均匀地斜插在共培养培养基上, 近轴面超向培养基, 然后于 25 ℃ 黑暗条件下共培养 3 ~ 5d。

### 4.1.6 大豆外植体的丛生芽诱导

- (1) 将共培养 3 天的子叶节和胚尖从培养基上转入小三角瓶中；
- (2) 用芽诱导液体培养基冲洗 1 次, 再用无菌水冲洗 3 ~ 4 次；
- (3) 用无菌滤纸吸干外植体表面的水珠, 然后接入恢复培养基中 6 ~ 8mm 深, 先恢复培养 1 周；
- (4) 待恢复培养后, 外植体转绿, 转入筛选培养基中进行丛生芽诱导, 子叶节两周继代一次, 胚尖 10d 继代 1 次。

#### 4.1.7 大豆外植体的芽伸长诱导

对于大豆子叶节待丛生芽长到 2~3cm 长度时, 将丛生芽从芽诱导培养基中转入芽伸长培养基中, 诱导外植体芽伸长。

对于大豆胚尖外植体待丛生芽长到 1~2cm 长度时, 将丛生芽从芽诱导培养基中转入芽伸长培养基中, 诱导外植体芽伸长。

#### 4.1.8 大豆外植体的生根诱导

待子叶节外植体芽伸长到 4~6cm, 胚尖外植体芽伸长到 2~3cm 时, 用无菌医用剪刀将伸长的茎从根部剪下, 并迅速植入生根培养基中开始生根诱导培养阶段。

#### 4.1.9 大豆外植体的移栽

待外植体长出健壮的根系后, 小心将外植体移出培养基, 用蒸馏水冲洗干净附着在根系表面的培养基, 防止滋生细菌, 然后小心地将整株外植体栽入灭菌土中(注意千万不要伤到根), 施以适量的水分, 于适宜温度及光照条件下培养。

#### 4.1.10 发芽培养基中 6-苄氨基嘌呤的优化

本试验选用了3个大豆基因型中品661、垦农18和绿75, 将大豆种子分别接种于添加有 0.0mg/L、0.2mg/L、0.5mg/L、0.8mg/L、1.5mg/L的6-苄氨基嘌呤的发芽培养基中, 3~5 d后观察种子发芽状况。大豆种子消毒同4.1.2、培养条件同4.1.3。

#### 4.1.11 诱导培养基中激素浓度的优化

本试验选用大豆品种垦农18, 在芽诱导阶段, 将两种外植体子叶节外和胚尖外植体分别接种在添加有不同浓度6-苄氨基嘌呤(子叶节: 0.1mg/L、0.15mg/L、0.2mg/L、0.3mg/L; 胚尖: 0.1mg/L、0.15mg/L、0.2mg/L、0.3mg/L、1mg/L、1.5mg/L、2mg/L、2.5mg/L、3mg/L、3.5mg/L)的诱导培养基中, 实验重复3次; 在生根阶段, 分别接种于添加有不同浓度吲哚丁酸(0mg/L、1.0mg/L、2.0mg/L、3.0mg/L)的生根培养基中, 实验重复三次, 旨在探索两种外植体所需的最适的激素浓度, 同时比较不同外植体在相同的培养阶段对于培养基中激素的需要情况有何不同。

#### 4.1.12 其它因子的优化

同样选用带有一片子叶的胚尖的外植体系统, 以绿75为试验材料, 对影响大豆转化率的其它的两个因子(筛选培养基中除菌剂浓度的优化、共培养条件)进行了探索和优化。

## 4.2 快速、高效农杆菌介导大豆转化体系的构建

### 4.2.1 工程菌液制备

试验方法详见 2.4.4。

### 4.2.2 大豆种子表面消毒

试验方法参照 4.1.2。

### 4.2.3 大豆种子萌发及外植体的获得

- (1) 在超净工作台上，将消毒后的大豆种子种脐向下播种于发芽培养基中，置于 25℃ 和光照/黑暗 (16h/8h) 条件下培养；
- (2) 24h 后，将刚刚萌动的大豆种子，置于超净工作台上，用无菌手术刀片切掉一片子叶，留下另一片子叶及下胚轴，去掉顶芽；
- (3) 处理好的外植体播种于发芽培养基中，预培养 24h，培养条件同前，直至外植体转绿。

### 4.2.4 农杆菌侵染大豆外植体

结束预培养后的带有一片子叶的胚尖外植体置于超净工作台上，然后接入已经准备好的工程菌液 (OD<sub>600</sub>=1.0) 中，于 25℃ 下黑暗条件下轻微振荡培养 21h。

### 4.2.5 农杆菌与大豆外植体共培养

试验方法参照 4.1.5。

### 4.2.6 大豆外植体的移栽

将带有一片子叶的胚尖外植体用无菌水冲洗 3~4 次后直接移栽入施加有适量水分和抗生素无菌营养土中，于适宜温度和光照下进行后期的培养，直至长成健壮的再生植株。

### 4.2.7 大豆不同基因型的比较

本试验对选用的三个大豆基因型中品661、垦农18和绿75进行了转化率的比较实验，利用带有一片子叶的胚尖的外植体系统，外植体的获得同4.1.3.3，农杆菌侵染同4.1.4，农杆菌与外植体共培养同4.1.5，外植体的移栽同4.1.9。

## 4.3 结果与分析

### 4.3.1 农杆菌介导大豆子叶节和胚尖转化系统的优化

#### 4.3.1.1 发芽培养基中 6-苄氨基嘌呤的优化

表 4-1 大豆子叶节发芽培养基中 6-苄氨基嘌呤的优化

Table 4-1 Optimization of 6-BA in GM medium for soybean cotyledonary node

基因型 Genotype	萌发时6-BA浓度 (mg/L) Concentration of 6-BA in GM (mg/L)	萌发率 (%) Germination ratio (%)	生长状况 Growth state	有/无根 (Not) have roots
中品661	0	90	芽很细	根多
	0.2	90	芽较细	有根
	0.5	95	芽较粗	根很少
	0.8	98	芽较粗	无根
	1.0	98	芽粗壮	无根
	1.5	96	芽粗壮	无根
肯农18	0	91	芽细长	多根
	0.2	94	芽细	有根
	0.5	95	芽较细	无根
	0.8	94	芽粗	无根
	1.0	100	芽粗壮	无根
	1.5	95	芽粗壮	无根
绿75	0	90	芽细长	有根
	0.2	92	芽细	无根
	0.5	97	芽粗	无根
	0.8	100	芽粗壮	无根
	1.0	100	芽粗壮	无根
	1.5	93	芽粗壮	无根

在大豆子叶节遗传转化过程中,大豆种子的萌发是组织培养的第一步,也是比较关键的步骤。因为这一步是获得健壮外植体的基础,而外植体的活力直接影响到后期的再生效率及转化效率。本试验以三个大豆品种中品 661、垦农 18 和绿 75 为材料,在种子萌发培养阶段,设计了一系列不同浓度 6-BA 的处理,观察不同浓度的 6-苄氨基嘌呤(6-BA)对大豆种子萌发率及芽的生长情况的影响(表 4-1)。6-苄氨基嘌呤是一种植物生长调节剂,可促进植物细胞生长,抑制植物叶绿素的降解,提高氨基酸的含量,延缓叶片衰老等,所以大豆发芽培养基中添加适量 6-苄氨基嘌呤必将促进种子分生出健壮的芽。从表中可以看出加入 6-苄氨基嘌呤后,生长状况明显改善,长出的芽由以前的细弱多根变得更加粗壮而且无根。

#### 4.3.1.2 共培养条件对转化率的影响

外植体经农杆菌侵染后,共培养阶段的光照条件也会影响到转化率的高低。本试验对光照共

培养和黑暗共培养条件下的转化率的高低设计了对比试验。结果表明(表4-2),黑暗条件下的转化率明显高于光照培养条件下的转化率。另外,农杆菌介导的遗传转化率的高低是否受温度,光照,时间等因素的影响,还有待于进一步探索。

表4-2 不同培养条件对转化率的影响

Table 4-2 Effect of co-cultivation condition on transformation efficiency

共培养条件 Co-cultivation condition	侵染外植体数目 No. of explants infected	PCR阳性外植体数目 No. of PCR positive explants	转化效率(%) Transformation efficiency (%)
黑暗 dark	150	3	5
光照 illumination	155	8	2

#### 4.3.1.3 培养基中除菌剂浓度的优化

农杆菌侵染并经过共培养的外植体,接入的诱导培养基中,必须添加适当浓度的除菌剂,从而有效的抑制附着在外植体表面的少量农杆菌继续繁殖,避免影响外植体后期的生长。为了探索诱导培养基中除菌剂的最佳用量,本试验设计了200mg/L,300mg/L,400mg/L,500mg/L,600mg/L和700mg/L浓度梯度的头孢霉素进行大豆外植体丛生芽诱导分化试验。10~15d后,调查大豆外植体分化的丛生芽的数量和外植体分化丛生芽分化率以及污染率,来研究头孢霉素对丛生芽分化的影响,从而最终确定诱导培养基中除菌剂的最佳浓度。

从表4-3中可以看出,诱导培养基中除菌剂的浓度对于外植体的分化是有一定影响的。随着除菌剂浓度的增加,外植体分化丛生芽数目有所降低,分化率也有所降低,但是农杆菌造成的污染得到了控制。当除菌剂浓度低时,虽然保证了一定的分化率,但由于污染严重,最终降低了再生率。当除菌剂浓度达到500mg/L时,基本控制住了农杆菌的滋生,当除菌剂浓度达到600mg/L时,分化率明显下降,所以最适浓度应该是500mg/L。

表4-3 诱导培养基中头孢霉素浓度的优化

Table 4-3 Optimization of Cef concentration in induction medium

头孢霉素浓度 (mg/L) Cefotaxime	外植体数(个) Number of explants	丛生芽数(个) Number of multiple shoots	分化率(%) Differentiation efficiency (%)	污染率(%) Contamination efficiency (%)
200	150	300	80.5	90
300	120	209	78	80
400	130	100	70	50
500	200	105	70	0
600	200	56	30	0
700	150	0	0	0

#### 4.3.1.4 诱导培养基激素浓度的优化

用于大豆器官发生的诱导培养基一般为MS、B5等基本培养基,在试验过程中观察到,诱导培养基中一些激素的用量会直接影响到大豆外植体丛生芽诱导及后期的生根等生长过程。为了得到最佳的再生和诱导效率,本试验对诱导培养基中激素的配比进行了优化。

##### (1) 6-苄氨基嘌呤的优化

在发芽培养基中如果加入适量的6-苄氨基嘌呤，所诱导的芽较未加有6-苄氨基嘌呤诱导的芽明显的粗壮，从而利于后期的外植体再生。此外，在大豆遗传转化过程中，丛生芽诱导率是至关重要的。诱导率高则有利于再生率的提高，从而提高转化率。本试验对丛生芽诱导阶段培养基中6-苄氨基嘌呤的最佳含量进行了探索。结果表明(表4-4)，6-苄氨基嘌呤是促进丛生芽诱导的，而且随着浓度的增加，诱导率也相应提高，但是过高则不再有明显的诱导效果，即6-苄氨基嘌呤在一定浓度范围内可以显著提高丛生芽诱导率。

表4-4诱导培养基中6-苄氨基嘌呤的优化  
Table 4-4 Optimization of 6-BA in induction medium

	处理1	处理2	处理3	处理4	处理5	处理6	处理7	处理8	处理9	处理10
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
6-BA浓度 (mg/L)	0.1	0.15	0.2	0.3	1	1.5	2	2.5	3	3.5
分化率	子叶节	40%	45%	50%	50%	50%	-	-	-	-
	胚尖	10%	12%	12%	13%	20%	30%	41%	50%	65%

## (2) 诱导培养基中吲哚丁酸的优化

大豆组织培养过程中，外植体生根诱导阶段是组织培养的最后阶段，也是最为关键的阶段。直接诱导外植体生根的激素是吲哚丁酸，所以诱导培养基中吲哚丁酸浓度会直接影响到外植体生根周期、长势等，而适宜的激素浓度则诱导外植体在较短时间内便可分化出健壮的根。本试验将外植体接入IBA浓度分别是0 mg/L、1.0 mg/L、2.0 mg/L和3.0 mg/L的MS培养基中，每瓶5个外植体。记录外植体首次分化出根的时间，15d后记录生根数量。从表4-5中可以看出，当生根培养基中IBA浓度是1.0mg/L时，外植体生根率是10%与对照的9%差异不显著。当IBA浓度提高到2.0mg/L时，生根率则明显提高。而且，添加IBA可显著缩短生根启动时间。但是如果IBA浓度过高，则会导致愈伤组织量生长，以至于影响生根率。图4-1为大豆外植体在适当浓度吲哚丁酸诱导下得到的粗壮的根系，并最终获得完整的再生植株(图4-2)。

表4-5 诱导培养基中吲哚丁酸的优化  
Table 4-5 Optimization of I-BA in induction medium

		处理1	处理2	处理3	处理4
		T1	T2	T3	T4
吲哚丁酸浓度( IBA )		0mg/L	1.0mg/L	2.0mg/L	3.0mg/L
分化率 ( % )	子叶节	9	10	60	70
	胚尖	0	8	40	60
启动时间	子叶节	15d	10d	7d	7d
	胚尖	-	20d	10d	10d



图 4-1 大豆外植体生根诱导

Fig 4-1 Rooting induction of soybean explants

图 4-2 大豆再生植株

Fig 4-2 Regenerated plantlet of soybean

### 4.3.2 快速、高效农杆菌介导大豆转化体系的建立

经过对农杆菌介导的大豆子叶节和胚尖转化体系中几个关键环节的优化,获得了大豆转化再生植株(图 4-2)。但是在研究中发现,这两种转化系统组织培养过程操作繁琐,最佳培养条件难于掌控,而且试验周期长,转化效率低,需要在此研究基础上不断完善农杆菌介导的大豆转基因体系,构建转化率更高的高效转化技术体系。所以本试验在上述研究基础上,探索了一种农杆菌介导的大豆新型外植体转化技术体系。

#### 4.3.2.1 不同转化系统之间的比较

本研究在大豆子叶节和胚尖两种外植体转化系统基础上尝试了一种新的外植体培育途径,是两种外植体类型的有机结合,即带有一片子叶的胚尖。综合各项试验结果,对三种转化系统进行了综合比较,结果如表4-6。从表中可以看出,这种新型外植体转化体系再生率 $>90\%$ ,而子叶节和胚尖转化系统仅分别为 $40\% \sim 50\%$ 和 $70\%$ ;转化率(最高可达 $10\%$ )相比于子叶节(平均转化率 $2\%$ )和胚尖(平均转化率 $2.83\%$ )两种转化系统也有明显提高;这种新型外植体转化体系最为明显的优势就是整个转化再生周期也明显缩短,只需要2个月左右,子叶节和胚尖转化体系则一般需要3~4个月,从而表明这种农杆菌介导的大豆新型外植体转化体系是一种更加高效的在技术体系。此外,从表中还可以看出,三个大豆基因型中,垦农18在三种大豆转化体系中转化率都是最高的,在第三种转化体系中,垦农18的转化率高达 $10\%$ ,所以本文后续试验均以此大豆材料为转化受体材料。

表4-6 三种转化系统的综合比较

Table 4-7 Comprehensive comparasion among 3 transformation systems

外植体类型 Explant Type	外植体数(个) Number of explant	再生率(%) Regeneration efficiency (%)	转化率(%) Transformation efficiency (%)	平均转化率(%) Average transformation efficiency (%)	平均转化再生周期(天) Period of transformation and regeneration (day)
子叶节	绿75	150	40	1	120 ~ 150
	垦农18	120	50	3	
	中品661	130	38	2	
胚尖	绿75	150	65	2	80 ~ 120
	垦农18	100	70	3.5	
	中品661	130	75	3	
带有子叶的胚尖	绿75	150	90	6	30 ~ 45
	垦农18	120	93	10	
	中品661	130	95	4	

#### 4.3.2.2 大豆不同基因型转化率的比较

本试验选用了3个大豆主栽品种，中品661、垦农18和绿75，分别获得了一定数量的转基因植株。研究结果表明（表4-7），再生率及转化效率在不同的大豆基因型间呈现一定的差异，与前人得出的研究结论基本一致（Somers et al, 2003）。其中，大豆栽培品种垦农18的转化率最高（10%），绿75次之（6%），而转化效率最低的是中品661（4%）。

表4-7 三个大豆品种转化率

Table 4-5 Transformation efficiency of 3 soybean cultivars

品种 Cultivars	侵染外植体数 Number of explants infected	再生植株中PCR阳性株数目 Number of explants regenerated to PCR positive	转化效率(%) Transformation efficiency (%)	再生率(%) Regeneration efficiency (%)
中品661 Zhongpin661	200	8	4	95
垦农18 Kennong18	100	10	10	93
绿75 Lv75	200	12	6	90

## 第五章 携带水稻 cDNA 大豆转基因植株的检测

### 5.1 携带水稻 cDNA 大豆转基因植株的获得

通过本文构建的基于水稻全长 cDNA 的大豆种质创新体系,开展了以肯农 18 为目标品种的大豆种质创新,共获得约 540 株转化再生大豆植株,并且均可以正常开花结实(图 5-1),长势良好。



图5-1得到的再生植株

1:共培养后移栽到土壤中的外植体;2:再生植株开花;3:转化植株结荚;4:T<sub>0</sub>代成熟;5:T<sub>1</sub>代转化植株。

Fig.5-1 Regenerated plants of this system

1: co-cultivated explants that transferred to sterilized soil; 2: Florescence of regenerated plants; 3: Pods of mature transformed plants; 4: Mature transformant of T<sub>0</sub> plants; 5: T<sub>1</sub> plants of transformants.

### 5.2 大豆转基因株系的表型鉴定

对于所得到的转化再生植株进行表型观察,初步鉴定外源基因是否已经导入大豆外植体中以及在转基因大豆植株中的表达情况。

### 5.3 大豆转基因株系组织化学 GUS 基因表达鉴定

本试验采用Jefferson et al (1987)的方法,取不同培养阶段的外植体和转化大豆幼苗茎、叶片等生长旺盛部分,稍加挤压叶片,然后分别浸泡在X-gluc溶液中【EDTA 10 mM, 0.1 M NaPO<sub>4</sub> (pH7.0), potassium ferrocyanide 0.5mM, potassium ferricyanide 0.5mM, 20% methano( v/v )和 0.1% 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-glucuronide (X-gluc)】, 37 温育过夜,用 95%乙醇脱色,检测显

色反应。

## 5.4 大豆转基因株系的分子鉴定

### 5.4.1 转基因植株的 PCR 检测

移栽到土壤中的外植体，待长出第三片叶后，取 30 ~ 50mg 叶片，提取基因组 DNA，通过 PCR 反应扩增标记基因卡那霉素抗性基因，扩增产物长度为 710bp，以检测质粒的成功转化。

#### 5.4.1.1 大豆基因组 DNA 提取

试验方法详见 2.4.5。

#### 5.4.1.2 PCR 反应体系和反应条件

本试验根据所转化的质粒 pBI121 上所携带的 *NptII* 基因设计引物，进行 PCR 扩增。上游引物序列为 5'-TGCGCTGCGAATCGGGAGCG-3'，下游引物的序列为 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACT-3'试验方法详见 2.4.6。

### 5.4.2 RT-PCR 检测

对于 *GUS* 染色检测及 PCR 检测均呈阳性的转基因植株进行 RT-PCR 检测，以进一步验证外源基因在转录水平是否表达。利用 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂盒提取大豆基因组总 RNA，试验方法详见 2.4.2，采用以 Clontech 公司的 cDNA 试剂盒进行反转录得到双链 cDNA，以 cDNA 为模板进行 RT-PCR，PCR 反应及检测方法详见 2.4.6 所示。

### 5.4.3 Southern 检测

对得到的转化再生植株经过组织化学检测呈阳性的植株进行 Southern 杂交检测，鉴定水稻基因是否已经转入并整合到大豆基因组中，Southern 杂交试验方法详见 2.4.7。

## 5.5 结果与分析

### 5.5.1 大豆转化再生植株的表型鉴定

通过对转化再生大豆植株进行表型观察，发现个别植株较非转化植株表现出一些差异，例如株型、叶形等，初步推测可能是由于外源基因导入所致，仍需进一步验证。

### 5.5.2 大豆转化再生植株的组织化学和分子鉴定

#### 5.5.2.1 *GUS* 检测显色反应

用含有质粒pBI121的农杆菌株GV3101侵染后的外植体经过上述方法培养后,本试验对部分转化植株进行了*GUS*检测的组织化学显色反应,检测Ti质粒是否转移到大豆中。结果表明(图5-2),转化植株的显色部位主要集中于主叶脉和叶柄处,在茎中也得到了表达,而非转化植株的叶片无明显显色特征。结果表明T-DNA已被转移到外植体组织中,并且*GUS*基因得到了表达。

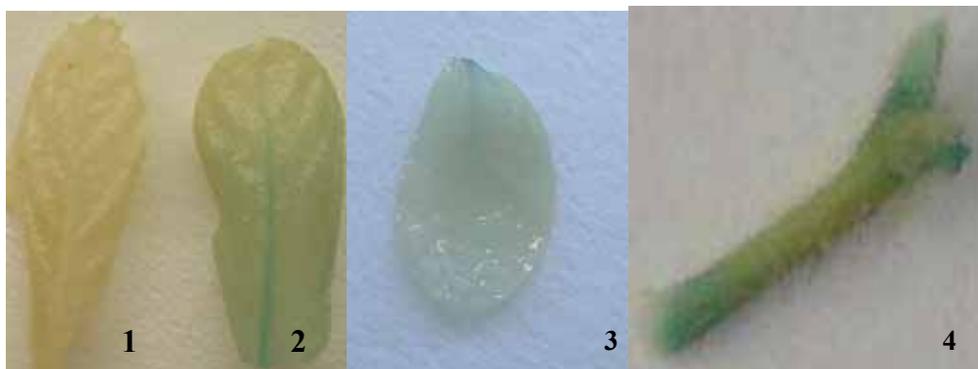


图5-2转化植株的*GUS*检测

1. 阴性对照(未转化大豆) 2. *GUS*表达在叶脉 3. *GUS*表达在叶柄 4. *GUS*表达在茎中

Fig.5-2 *GUS* test of transformants

1. negative; 2. *GUS* expression on vein; 3. *GUS* expression on petiole; 4. *GUS* expression in shoot

#### 5.5.2.2 PCR 检测

##### (1) 转基因大豆基因组DNA质量检测

在大豆遗传转化过程中,为了不影响转基因植株的后期成长,应该以尽量少的转基因植株叶片用于分子检测。所以本试验采用常规CTAB法,并略加改进,尽量简化操作步骤,从而利于获得足量的高纯度基因组DNA用于后续的PCR检测。琼脂糖凝胶电泳结果显示(图5-3)所提基因组DNA较完整,无降解,基本满足PCR检测的要求。

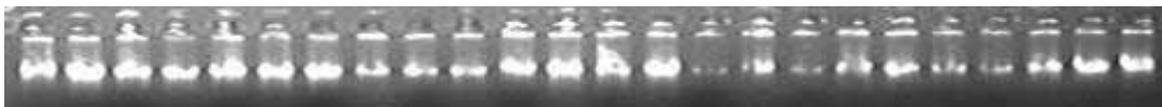


图5-3 转基因大豆基因组DNA质量检测

Fig.5-3 Genome DNA quality in transgenic soybean

##### (2) *NPT* 基因的PCR检测

用CTAB法提取*GUS*检测呈阳性的大豆转化再生苗叶片中的总DNA,通过PCR扩增检测*NPT*基因的表达情况,同时进一步验证*GUS*检测的真实性。以非转化大豆作为阴性对照,阳性质粒作为阳性对照。PCR产物的1%琼脂糖凝胶电泳结果如图5-4所示,阳性对照及转基因植株均扩增到了大小为710bp左右的目的条带(*NPT*基因的长度),而非转化的阴性对照则无此目的条带。同时表明此PCR体系可以扩增到*NPT*基因片段。



图5-4 转基因大豆 *NPT* 基因PCR 检测

CK: 阳性对照; 26: 阴性对照; 非转化大豆基因组DNA扩增; 1~4, 7, 9~12, 14, 16~23: 阳性转化植株。

Fig.5-4 Transgenic soybean PCR detecting of *NPT*

CK: positive control amplified from plasmid pBI121 genomic DNA; 26: Negative control, amplified from non-transformed soybean genomic DNA; 1~4, 7, 9~12, 14, 16~23: positive transformed plantlets

### 5.5.2.3 *NPT* 基因转录水平的检测 (RT-PCR)

本试验对于PCR及*GUS*检测均呈阳性的转基因植株进行了转录水平的分子检测。RT-PCR结果显示(图5-5), 扩增到了标记基因*NPT* 的特异性条带, 同时也证明外源基因已经稳定整合到大豆基因组中, 并能够在转录水平表达。

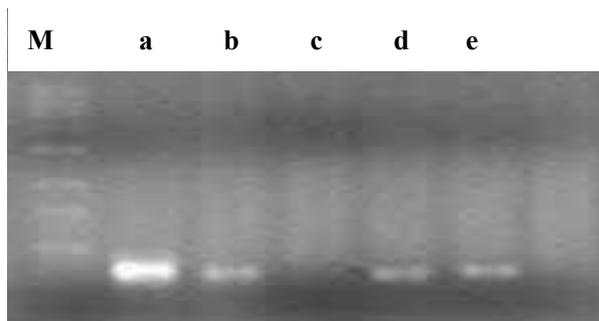


图5-5转基因大豆 *NPT* 基因 RT-PCR检测

CK: 阳性对照(未转化大豆); a,b,d,e: 阳性转化植株; c: 阴性对照

Fig. 5-5 Transgenic soybean RT-PCR screening of *NPT*

CK: positive control; a,b,d,e: positive transformed plantlets; c: negative control

### 5.5.2.4 Southern检测

借助于本研究初步建立的高效的农杆菌介导大豆转基因技术体系, 利用含不同大小水稻基因表达载体的工程菌液转化大豆外植体, 对得到的转化再生植株进一步进行了Southern杂交和Southern点杂交检测分析, 结果表明, 以水稻cDNA为标记探针与大豆基因组DNA杂交, 在转化植株间得到了清晰的杂交信号(图5-6, 图5-7), 表明水稻基因已经稳定地整合进大豆基因组中, 获得了含有水稻基因的大豆再生植株。

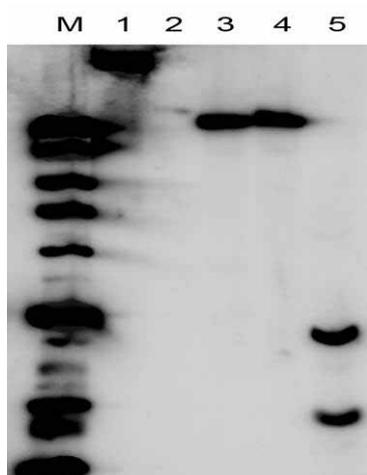


图5-6大豆转基因株系Southern杂交  
*EcoR* 酶切大豆基因组 DNA，以水稻 cDNA 为探针；  
 M：1kb ladder；1：阳性对照（重组质粒 pBI121）；2：阴性对照（非转基因大豆垦农 18）；3，4，5：阳性转基因植株。

Fig. 5-6 Southern blotting  
 Digested soybean genomic DNA, rice cDNA as probes; M: 1kb ladder; 1: positive control (pBI121 plasmid); 2: negative control (untransformed Kenong 18); 3, 4, 5: transformed

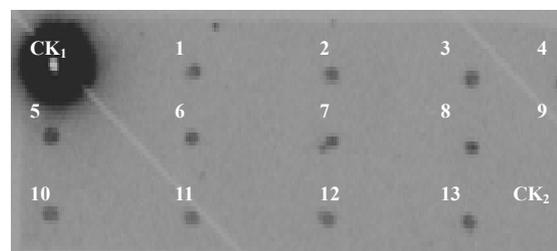


图 5-7 大豆转基因株系 Southern 点杂交  
 以 *NPT* 基因 PCR 产物为探针；CK<sub>1</sub>：阳性对照 (pBI121 质粒)；  
 CK<sub>2</sub>：阴性对照（非转化大豆垦农 18 基因组 DNA）；1~8 及  
 10~13：阳性转化再生植株；9：阴性转化再生植株

Fig. 5-7 Dot-Southern blotting  
 PCR of *NPT* as probes; CK<sub>1</sub>: Positive control (plasmid pBI121); CK<sub>2</sub>: Negative control (non-transformed soybean genomic DNA from Kenong 18); 1~8 and 10~13: Positive generated plants; 9: Negative generated plant.

## 第六章 讨论

### 6.1 基于水稻全长 cDNA 的大豆种质创新技术体系的建立

利用转基因技术的原理和方法,通过对水稻全长 cDNA 的分离、水稻全长 cDNA 与载体的连接、农杆菌介导的水稻全长 cDNA 转化大豆、转化大豆植株的筛选等实验步骤的完善,成功构建了基于水稻 cDNA 全长的大豆种质创新技术体系。

在利用转基因技术实现种质创新的过程中,拥有外源基因是进行植物转基因操作的前提。目前大部分的基因专利被国外所拥有,我国拥有专利的基因为数很少。在保证高质量RNA的前提下,本研究中水稻基因直接来自cDNA,不必知道所转基因的序列而且省略了基因克隆步骤,突破了基因专利的限制。以前的植物转基因过程中,一次转基因事件只能完成1~2个基因的转移,本技术体系是直接转移所得 全长cDNA“基因池”,实现了植物转基因的高通量,结合高效的大豆转基因技术体系简化了操作流程,提高了大豆种质创新的效率,为种质创新提供了新思路。

#### 6.1.1 高质量水稻全长 cDNA 的获得

高质量水稻全长cDNA包含两方面的内容:为了保证所得水稻cDNA包含完整的遗传信息从而准确快速的发现和确证新基因的功能,必须最大程度保证所得cDNA为全长。首先,必须获得高质量的原始材料mRNA, RNA的任何一端降解都无法保证全长cDNA的获得。本试验采用生物素标记的Oligo(dT)引物与成熟的真核mRNA 3' polyA区域高效结合,通过Promega公司的polyAtract mRNA isolation system IV试剂盒中的链霉素亲和标记的磁珠及磁性分离柱捕捉和洗脱杂种分子,利用无RNA酶水从固相洗脱mRNA,通过1.2%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测呈弥散状,主要分布在28S和18S上下,表明mRNA的质量良好。

其次,反转录也是影响能否获得全长cDNA的一个因素,本研究采用了SMART (Switching Mechanism at 5' end of RNA Transcript)技术,它克服了以往cDNA合成技术中的一些缺陷(Racine et al, 1993; Kato et al, 1994),在合成第一链时,当反转录到达mRNA的5'端时,逆转录酶的末端转移酶活性能够不依赖模板在第一链3'端加上几个C,与SMART IV Oligo寡核苷酸的3'端的几个G配对,这样就保证了反转录合成的cDNA第一链包含了完整的mRNA的信息和SMART IV Oligo寡核苷酸的序列信息。在通过LD-PCR合成cDNA的第二链时,由于该方法以CDS III Primer和SMART IV Oligo寡核苷酸上的一段序列作为PCR的两端通用引物,因此只有含有全长mRNA和SMART IV Oligo寡核苷酸的第一链cDNA才能作为模板合成出全长ds cDNA,对于那些过早终止第一链合成的非全长的cDNA第一链,因其不含有SMART IV Oligo寡核苷酸的序列信息而不能作为模板被扩增。将得到的水稻全基因组cDNA进行琼脂糖凝胶电泳检测,结果表明cDNA片段大小分布在8kb~0.5kb之间,扩增效果较好,为后续的基因的功能鉴定、功能分析等奠定了基础。将cDNA连接pGEM-T载体后经过蓝白斑筛选、菌液PCR检测,30个单克隆所插入cDNA平均长度为

900bp, 可以满足功能基因组学研究的要求。

### 6.1.2 载体的筛选和改造

在植物转基因操作过程中, 表达载体应具备几个必需元件, 即报告基因 (如*GUS*)、选择标记基因 (如*NPT*) 以及外源基因表达所必需的启动子 (如35S) 和终止子 (如*NOS*) 等。本研究对本实验室所保存的双元质粒表达载体进行了筛选和改造, 最终选用了转化效果较好的pBI121质粒载体。此双元质粒载体具有新霉素磷酸转移酶基因 (*NPT*) 选择标记基因、*GUS*报告基因以及基因表达必须的35S启动子和终止子等元件。多克隆位点的位置合理, 适合进行下一步的载体改造, 此外, 在农杆菌介导的遗传转化中, 该质粒载体转化效果也比较理想。

在以往文献所报道用于转化的表达载体多只对单个基因进行转化, 难以适应基因组学研究的需要以及种质创新过程中对优良基因的需求。本试验试图在一个连接体系中连接尽可能多的水稻抗逆cDNA, 通过构建多基因表达载体系统来实现功能基因组学研究的高通量。在所有的连接方案中, 粘性末端之间的连接效率最高, 然而由于本研究所用的外源片段与质粒DNA之间没有匹配的酶切位点, 所以只能采用连接效率较低的平末端连接或在质粒平末端加T后与具有A末端的ds cDNA进行T-A连接。成功的平末端连接反应要求一个连接体系中具有高浓度的末端以及载体与外源基因之间合适的末端摩尔比例。本试验中的平末端连接发生在载体DNA与水稻cDNA “基因池” 之间, 而非载体与单一外源片段之间的连接, 无形中降低了单条外源片段在连接反应体系中的绝对浓度, 增加了连接反应的难度。所以, 质粒DNA与外源DNA的连接效率是本文载体构建的一个关键步骤。本研究中对载体DNA进行酶切、去磷酸化以及纯化等操作过程中不断优化技术体系, 最大程度地剔除影响平末端连接的污染因子。采用脉冲场凝胶电泳分离单酶切大片段质粒pBI121DNA, 使得酶切不充分的质粒DNA与目的单酶切大片段质粒pBI121DNA完全分离开, 保证所得到的质粒DNA全部为高纯度的酶切完全的质粒DNA; 在连接反应体系中, 本研究采用的插入片段: 载体为6~8:1, 提高外源DNA片段在连接反应体系中的浓度, 提高反应效率。连接产物转化农杆菌后, 单克隆菌液PCR及酶切鉴定结果表明, 平末端连接和T-A连接均得到了连接有外源ds cDNA的质粒, 连接效率为60%~80%, 虽然连接效率较低, 但该连接方案确实可行。相信经过对连接体系的优化连接效率低的缺点会被克服。

### 6.1.3 快速、高效农杆菌介导大豆转基因技术体系的建立

本研究的目的在于构建借助于植物转基因技术的基于水稻cDNA全长的大豆种质创新技术体系, 所以快捷、高效的大豆遗传转化体系的建立, 是实现目标基因跨物种转化的关键环节。众所周知大豆是难转化的作物之一, 自上世纪中期以来, 大豆基因工程研究便已相继展开 (Hinchee et al, 1988; Liu et al, 2004; Hazel et al, 1998; Maughan et al, 1999; Simononds et al, 2000; Droste et al, 2002; Li et al, 2002)。目前, 用于大豆遗传转化的方法和技术很多, 主要包括土壤农杆菌转化系统和人工方法 (物理和化学法), 不同的基因遗传转化技术各有其优缺点, 目前, 在大豆转基因研究领域比较流行的技术是农杆菌介导的大豆器官发生途径的遗传转化技术。

### 6.1.3.1 关于大豆遗传转化方法

已经报道的大豆遗传转化方法主要包括：农杆菌介导法 (Hinchey et al, 1988; Liu et al, 2004)、基因枪法 (Hazel et al, 1998; Maughan et al, 1999; Simononds et al, 2000; Droste et al, 2002)、花粉管通道技术 (Li et al, 2002)、PEG/电击法 (Lin et al, 1987; 南向日等, 1998)、子房微注射法 (刘博林等, 1989) 等。目前, 大豆遗传转化以农杆菌介导法和基因枪法较为流行, 而其他几种方法因为存在难以克服的技术问题, 因而没能被广泛采纳。例如: PEG法需要以原生质体作受体, 而大豆原生质体的培养却存在程序复杂、再生困难、培养周期长等问题; 子房微注射法转化频率虽相对较高, 而且不涉及原生质体培养问题, 但该方法存在技术不完善, 稳定性差等缺点, 而且大豆子房十分微小, 也给操作带来很多不便, 因而很难实现规模化操作。

就基因枪法而言, 因为具有无宿主范围限制、受体 (靶细胞) 类型广泛、操作简便、容易控制等优点, 所以自从问世以来发展迅速。但是, 随着该方法在植物转化研究中应用范围的扩大以及研究的深入, 其弊端也逐渐暴露出来。例如: 在大豆转化过程中, 该方法表现出转化频率偏低、易出现嵌合体、整合不完整、转化成本高、存在再生系统的限制以及引起共抑制与基因的沉默等缺点 (Zhang et al, 2001)。而由农杆菌介导的大豆遗传转化方法主要通过农杆菌在与大豆的共生, 利用农杆菌中 *Ti* 质粒的转移特性, 将整合在质粒上的外源基因转移到植物体的基因组中而实现基因的转化。农杆菌介导的大豆遗传转化方法虽然同样存在转化频率偏低的缺点, 而且转化频率还与大豆基因型存在相关性; 但是该方法操作简单、且能够很好的将 T-DNA 转入受体细胞, 并以单 (低) 拷贝的形式插入到受体基因组中并稳定遗传, 所以因而成为大豆遗传转化研究的首选方法。近年来的研究报道表明, 农杆菌介导的大豆遗传转化效率偏低、试验结果可重复性差, 整个转化体系仍需优化。针对该系统的特点以及存在的问题, 本研究在农杆菌介导的大豆遗传转化体系构建过程中, 尝试分别以子叶节、胚尖及仅带有一片子叶的胚尖作为外植体, 研究大豆组织培养再生和遗传转化中的农杆菌侵染和诱导阶段各项影响因子的遗传转化效率的影响, 并对整个转化体系进行优化, 为逐步建立高效、稳定的大豆遗传转化体系提供理论依据和实践指导。

### 6.1.3.2 农杆菌介导高效大豆转化体系建立

近年来的研究报道表明农杆菌介导的大豆遗传转化效率仍然偏低、试验结果可重复性差, 整个转化体系仍需优化。所以本文高效的转化体系的初步构建不仅是基于水稻全长 cDNA 大豆种质创新体系的强有力的技术平台, 同时为突破大豆遗传转化困难的瓶颈提供一些理论借鉴。

迄今, 在以器官发生为主的农杆菌介导的大豆遗传转化研究中, 主要采用以子叶节为外植体的遗传转化方法 Cheng et al (1980), 以及以胚尖为外植体的方法 (Liu et al, 2004)。本研究对上面两种方法进行了有机的融合, 通过培养介于子叶节和胚尖之间的新型外植体 (即, 带有 1 片子叶的胚尖), 对大豆遗传转化体系进行了系统的研究。研究结果表明, 该方法基本脱离了要求严格操作繁琐的组织培养, 但再生植株的生长状况却好于以往, 在完成共培养后直接将外植体转入土壤中培养, 而且长势良好。另外, 该方法使得外植体的生长周期明显缩短, 一般移栽到土壤后

10~20d左右便可见第3片叶长出,从而可以用来进行组织化学检测或分子生物学检测,大大缩短了研究周期。本研究用3个大豆品种对新型外植体在组织培养及遗传转化过程中的再生率及遗传转化效率进行了比较,并对大豆外植体组织培养与再生系统和农杆菌介导的大豆遗传转化体系进行了优化。到目前为止,在含有质粒pBI121的农杆菌株GV3101浸染的540个外植体中,获得 $T_0$ 和 $T_1$ 代再生植株约500株,此转化技术体系的再生率达90%以上,中品661(95%),垦农18(93%),绿75(90%),高于子叶节的50%和胚尖的70%,大部分植株长势良好,而且能够正常开花、结实(图4-7)。分子检测结果表明,转化效率高达10%(垦农18)。此外直接采用器官发生途径进行遗传转化,降低了再生植株发生体细胞无性系变异的机率(Larkin et al,1981),利于转化基因的稳定遗传,保证了后期基因结构和功能分析的准确性。因此,本研究探索的大豆农杆菌介导的转化技术体系与前人报道的结果相比,更加快速、高效。随着该体系的不断完善,它不但为本文种质创新体系的完善和应用提供强有力的技术支持而且必将成为农杆菌介导的大豆转基因、突变体构建等基因组学研究的强有力的技术平台。

### 6.1.3.3 影响农杆菌介导大豆遗传转化率的关键因素

农杆菌介导大豆高效遗传转化体系中,影响其转化率的关键因素有:

1. 基因型:本试验中三个大豆基因型绿75、垦农18、中品661的转化率存在一定差异,分别是8%、10%和6%,即大豆遗传转化效率与大豆基因型存在一定程度的相关性。Delzer et al(1990)认为转化率在基因型之间的差异主要是由于农杆菌菌株与大豆基因型间的互作效应引起的,进一步的研究结果表明,在农杆菌共生瘤形成过程中,大豆基因型间存在差异(Mauro et al, 1995; Bailey et al, 1994)。所以,若想得到理想的大豆遗传转化效率,不仅要尝试不同的农杆菌株,而且要对大量的大豆品种进行筛选,并从中发现最佳的农杆菌菌株与大豆基因型互作组合(Zhang et al, 2001)。

2. 共培养条件:至于侵染阶段的影响因素,前人的研究主要侧重于农杆菌侵染外植体时间的长短及工程菌株最佳侵染活力对转化率的影响(Liu et al, 2004; Miguel et al, 2004)。本试验对比了农杆菌侵染后不同的共培养条件对转化率的影响,结果表明黑暗条件下共培养的转化率高于光照条件下的转化率,所以黑暗条件下进行共培养利于农杆菌和外植体共生及质粒的转移,从而利于进一步转化。

3. 外植体的活力:即无菌苗的苗龄将直接影响丛生芽的分化率,外植体活力高则每个外植体分化的丛生芽数量就多,本试验表明,以子叶节为外植体,则苗龄应该控制在3~5d为宜,而以胚尖为外植体则苗龄应该控制再24~36h为宜。

4. 外植体类型:本研究还对大豆不同外植体类型进行了比较,对上述3个大豆基因型分别以子叶节、胚尖以及带有一片子叶的胚尖为外植体,在试验过程中发现,对于大豆品种中品661而言,当以胚尖为外植体时,分化能力明显高于以子叶节为外植体的分化能力;而大豆品种肯农18则恰好相反,以子叶节为外植体的分化能力明显高于以胚尖为外植体的分化能力;此外,大豆品种绿75的第三种外植体在移栽到土壤后,长势明显好于中品661和肯农18的第三种外植体类型的

长势。因此，我们大胆的推测，在农杆菌介导的大豆遗传转化过程中，不同的大豆基因型有其最合适的外植体类型，这也恰恰从另外一个角度再次说明农杆菌介导的大豆遗传转化具有基因型特异性。

## 6.2 基于水稻全长 cDNA 的大豆种质创新技术体系的验证

本研究中将携带有水稻不同基因的双元质粒载体转化农杆菌，制备遗传转化用工程菌液。利用携带有水稻不同基因的双元质粒载体的工程菌，借助初步构建的快速、高效农杆菌介导的大豆遗传转化技术，在短期内成功获得了大量转化再生植株。为了证明转化是否成功，对转化再生植株进行了组织化学检测和分子生物学检测。*GUS*显色检测结果表明，发生了显色反应，显色部位主要集中于茎、主叶脉和叶柄处，而非转化植株的叶片无明显显色特征，初步证明Ti质粒已经转移到大豆外植体中，即 *GUS*基因得到了表达，而且Ti质粒所携带的水稻cDNA可能也已经转移到大豆基因组中；为了进一步验证这种可能性，本试验对部分大豆转基因植株总DNA进行了以水稻cDNA为探针的Southern杂交检测分析，结果表明，转基因大豆株系间显示了清晰的杂交信号，如图5-5所示杂交信号分布在大豆基因组DNA的不同位置，表明不同大小的水稻外源基因已经稳定地整合进了大豆基因组中，此外在5泳道处有两个杂交信号，根据以往的转基因事件，分析其原因可能是外源基因的多拷贝插入，但本研究转移的外源基因是水稻cDNA“基因池”，所以这种现象也可能是多个基因的插入，还有待于进一步研究。

利用构建的含有水稻不同基因载体的工程菌，借助初步构建的快速、高效农杆菌介导的大豆遗传转化技术，在短期内成功获得了大豆转化再生植株。对这些再生植株进行了组织化学检测和分子生物学检测，*GUS*显色检测结果表明，发生了显色反应，初步证明水稻cDNA已经转移到大豆外植体中；对部分大豆转基因植株总DNA的Southern杂交检测结果显示，转基因大豆株系显示了清晰的杂交信号，表明水稻基因已经稳定地整合进了大豆基因组中，从而证明本研究提出的基于水稻全长cDNA的大豆种质创新技术体系是可行的。

## 6.3 本研究大豆种质创新技术体系存在的问题

本研究利用转基因的技术原理，通过 RT-PCR 方法获得水稻全长 cDNA，通过水稻全长 cDNA 与载体的连接，借助农杆菌介导实现水稻全长 cDNA 转化大豆，经过对转化植株的检测表明获得了含有水稻基因的大豆转化植株，初步构建了基于水稻全长 cDNA 的大豆种质创新技术体系。然而，目前该技术体系还存在一些不足需要不断完善。

### 6.3.1 cDNA 序列的完整性

在本研究中，遗传转化的基因来源是水稻cDNA“基因池”即cDNA文库。高质量的cDNA文库主要依据全长cDNA所占比重和文库容量 也就是cDNA文库的代表性（文库中包含的重组

cDNA分子反映来源细胞中表达信息的完整性)来衡量。本文中所得水稻cDNA平均长度为900bp,但是所得cDNA序列是否具有开放阅读框(Open reading frame, ORF)的完整结构需要通过测序及序列分析来验证,这正是本研究需要继续完善的一部分研究内容。

### 6.3.2 cDNA 片段分级准确性

片段分级也是影响cDNA全长比例的一个重要因素,因为PCR扩增中产生的小片段cDNA由于更易于与载体连接从而增加无效重组子的数量。为了尽可能去掉小片段(<500bp)cDNA的污染,提高全长cDNA在反应体系中所占比例,本试验从cDNA充分分散的琼脂糖凝胶上直接回收并纯化片段在0.5~3kb范围的cDNA。单克隆菌液PCR结果显示仍然有小片段cDNA的插入。可能的原因是从琼脂糖凝胶中进行片段分级时,电泳时间或电压等因素的影响使得cDNA没有完全分散开,所以少量小片段cDNA没有电泳到足够的距离从而掺杂到片段大小选择的范围内。此外,cDNA片段分级还可以通过葡聚糖柱的方法,今后可以针对不同方法优化实验技术,使片段分级更加精确。

### 6.3.3 cDNA “基因池”的容量

本研究中一次连接反应(20 $\mu$ l)转化农杆菌后涂板所得克隆数不足500,与真正的cDNA文库需要的基本克隆数相差甚远,所以库容量很低。剔除了假阳性(载体自连)因素外分析其主要原因是载体与外源cDNA之间的连接效率较低,所以如何不断提高连接效率完善连接效果也是本研究仍需继续探索的技术环节;库容量低的另一个原因是载体的选择,一般构建cDNA文库的质粒载体基因组均小于6kb,而本文中选用的表达载体是14kb左右,无疑增加了试验操作的难度,那么适于遗传转化、基因组尽量小的表达质粒载体将是今后载体筛选和载体改造的主要研究目标。总之,提高cDNA的质量以及水稻cDNA“基因池”的代表性是提高后续功能基因组学研究效率的基础,也是本种质创新技术体系的宗旨。

## 6.4 今后研究计划

综上所述,本研究通过高质量水稻cDNA的获得、高效表达载体的改造及农杆菌介导的大豆转化体系的优化等方面的研究,初步构建了基于水稻全长cDNA的大豆种质创新技术体系,实验结果表明获得了含有水稻cDNA的大豆转基因植株,证明了该技术体系的可行性。虽然就技术体系整体而言还不完善,但是这部分研究作为今后该技术体系的不断优化及应用奠定了基础。

### 6.4.1 技术体系的完善

该技术体系包括水稻cDNA文库构建、高效转化表达载体构建以及大豆转基因技术体系三部分技术环节,所以,下一步工作将首先围绕如何提高水稻cDNA文库容量和及质量、提高水稻

cDNA 与双元表达载体的连接效率、实现水稻 cDNA 高效高通量地转化大豆这几个方面展开,旨在逐步建立一套完整的以高效大豆转基因技术作为技术平台,以连接有高质量水稻 cDNA 的双元表达载体为坚实物质基础的基于水稻 cDNA 大豆种质创新技术体系。(1)在现有研究基础上,继续提高外源水稻 cDNA 的质量和丰富度,保证所得水稻 cDNA 文库一定的库容量,丰富外源基因的类型,提高目的基因的获得率;(2)继续筛选最适载体,为了降低转基因沉默机率,可以采用水稻 cDNA 与质粒载体之间定向连接策略,添加筛选效率较高的标记基因(如 bar 基因),提高转化植株筛选效率,此外还可以探索构建无标记基因的转化载体,提高转基因生物安全性,加快本研究从理论上升为实践的步伐;(3)加强大豆转基因技术平台作用,提高获得含有期望性状转基因大豆的效率,实现本研究创造变异丰富大豆新种质的重大理论意义。

#### 6.4.2 技术体系的应用

目前,由于人为因素造成的生物及非生物胁迫已经越来越成为影响作物正常生长发育的主要因素,本研究立题目的在于通过基于水稻全长 cDNA 的大豆种质创新技术体系的建立,实现大豆抗逆性品种改良。本研究所获得的水稻 cDNA 来自耐盐、抗旱、耐冷等非生物胁迫下诱导表达的水稻 RNA,今后还可以利用抗病虫害的水稻材料,获得在施加相应生物胁迫条件下诱导表达的抗病虫相关 cDNA,将之转化逆境及病虫害敏感型大豆或其它农作物,然后对转化再生植株在同样施加相应生物及非生物胁迫条件下筛选抗性表型,获得具有目的性状的改良大豆及其它农作物品种,拓宽该种质创新技术体系的应用领域,最终实现该种质创新技术体系真正意义上的作物品种改良和种质创新研究中的应用。

经过表型鉴定,对获得的抗性表型大豆植株进行分子生物学检测。根据质粒载体克隆位点两侧酶切位点设计引物,对分子检测阳性的大豆转基因植株基因组 DNA 进行 PCR 扩增,进而调出整合在大豆基因组中的水稻 cDNA,然后测序及进行相关生物信息学分析,结合植株表型确定所转水稻 cDNA 生物学功能。此外,转基因植株的突变表型也有可能来自 Ti 质粒的插入,那么还可以利用质粒拯救方法,获得 Ti 质粒插入大豆基因组位点的临侧序列,研究插入所引起的大豆相关功能基因的突变。所以,该技术体系省略了基因功能验证,直接通过表型结合生物信息学分析预测基因功能,在推进大豆种质创新研究的同时,与水稻功能基因组学和大豆功能基因组学研究相链接,促进了功能基因组学和比较基因组学等相关学科的发展。

## 第七章 结论

通过高质量水稻 cDNA 的获得、高效表达载体的改造及农杆菌介导的大豆转化体系的优化等方面的研究,本试验初步构建了基于水稻全长 cDNA 的大豆种质创新技术体系,试验结果证实了该技术体系是可行的。因此,该技术体系的建立,将为作物种质创新如何突破国外基因专利的壁垒,拓宽大豆遗传基础,实现优异农艺性状的跨种、属间的基因交流提供了全新的技术途径。

1. 高质量水稻cDNA的获得:以抗逆性水稻品种靖粳7号、合系15号、珍珠42、辽盐16、旱稻277、旱稻277及早稻502为材料,得到了不同时间点混合的水稻抗旱、耐盐、耐冷胁迫处理的总RNA,利用Promega公司的polyAtract mRNA isolation system IV试剂盒纯化mRNA,利用Clontech公司SMART<sup>TM</sup> PCR cDNA Synthesis Kit方法合成水稻全长cDNA,连接pGEM-T easy vector并转化DH10 $\beta$ ,菌液PCR结果表明所得水稻ds cDNA片段平均长度为900bp,插入片段大小分布在0.3~2kb。

2. 高效表达载体的改造:经过片段分级的水稻cDNA采用平末端连接和T-A连接两种方案分别与具有相应末端的双元表达载体质粒DNA连接并转化农杆菌,随机挑取单克隆振荡过夜培养后菌液PCR以及质粒酶切鉴定结果显示得到了连接有外源ds cDNA的质粒。两种方案连接效率较低,有待改进。

3. 农杆菌介导的转化体系的优化:首次探索了介于子叶节和胚尖之间的新的外植体类型,即带有1片子叶的胚尖,该方法大大缩短了试验流程,分子检测结果表明,此转化技术体系的再生率达90%以上,中品661(95%),垦农18(93%),绿75(90%),高于子叶节的50%和胚尖的70%;转化效率高达10%(垦农18)。因此,本研究建立的大豆农杆菌介导的转化技术体系较前人的更加快速、高效,将是从事农杆菌介导的大豆转基因、突变体构建等基因组学研究强有力的技术平台。

4. 将连接水稻不同全长cDNA的载体借助于本研究初步建立的农杆菌介导的大豆遗传转化技术体系获得转基因再生植株。经过对再生大豆植株的组织化学检测、分子生物学检测,结果表明水稻外源基因已经转移到了大豆基因组中,证明了本研究所探索的基于水稻全长cDNA的大豆种质创新技术体系是可行的,为今后应用于大豆及其它作物种质创新奠定了基础。与传统的种质创新技术体系相比,本技术体系所需的外源期望基因直接来自水稻全长cDNA,突破了国外基因专利的壁垒;利用转基因技术的原理和方法使得种质创新不仅可以在不同科、族间,甚至可以打破动植物间的界限而进行,拓宽了优异基因应用领域,提高了种质资源的利用效率;该技术体系是直接转移所得水稻全长cDNA“基因池”,实现了植物转基因的高通量转化;同时,因为该技术体系省略了费时、费力的基因克隆步骤,大大地提高了种质创新的效率。

## 参考文献

1. 曹永生, 张贤珍. 中国主要农作物种质资源地理分布图集. 北京: 中国农业出版社, 1995, 1 ~ 449
2. 常汝镇. 中国大豆品种区划. 中国农业出版社, 2003
3. 颜清上, 邵桂花, 常汝镇. AVRDC的大豆种质资源研究. 大豆科学, 2000(1):63 ~ 73
4. 常汝镇, 邱丽娟, 许占友, 李向华, 刘立宏. 国外大豆科研现状及走势. 大豆通报, 2004(1):28 ~ 29
5. 程须珍, 王素华, 金达生. 绿豆抗豆象育种品系综合评价. 植物遗传资源学报, 2003, 4(2): 110 ~ 113
6. 程须珍, 王素华, 吴绍宇, 周吉红. 绿豆抗豆象育种后代 $F_2$ 群体遗传变异分析. 植物遗传资源学报, 2004, 5(4): 364 ~ 368
7. 崔岩. 大豆利用花粉管通道技术导入抗病虫目的基因的研究. 东北农业大学, 【学位论文】, 2000
8. 董玉琛, 曹永生, 张学勇, 等. 中国普通小麦初选核心种质的产生. 植物遗传资源学报, 2003, 4(1): 1 ~ 81
9. 董玉琛. 我国作物种质资源的现状与展望[EB/OL]http://www.world-agri.com/field/081.html
10. 董玉琛. 我国作物种质资源研究的现状与展望. 中国农业科技导报. 1999, (2): 36 ~ 4
11. 董玉琛. 作物种质资源学科的发展和展望. 中国工程科学, 2001, 3(1): 1 ~ 6
12. 关荣霞. 大豆遗传多样性分析及QTL定位研究. 中国农业科学院 【博士后论文】, 2003
13. 贺晨霞, 夏光敏. 农杆菌介导单子叶植物基因转化研究进展. 植物学通报, 1999, 16(5): 567 ~ 573
14. 胡道芬. 植物花培育种进展 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1996
15. 胡含. 离体诱导单倍体在植物遗传与育种中的应用. 世界科技研究与发展, 1999(2): 42 ~ 45
16. 黄群策, 秦广雍, 梁秋霞. 同源四倍体水稻与狼尾草杂交结实的胚胎学证据. 杂交水稻, 2004, 19(1): 56 ~ 59
17. 郎春秀, 胡张华, 刘智宏, 黄锐之, 陈锦清. 油菜农杆菌转基因体系的建立及转PEP反义基因油菜的获得. 浙江农业学报, 1999, 11(2): 99 ~ 100
18. 雷勃钧, 尹光初. 外源DNA直接导入大豆的研究. 大豆科学, 1991a, 10(1): 58 ~ 62
19. 雷勃钧, 尹光初. 外源DNA导入大豆的适宜时期与相应方法. 中国油料, 1991b, (1): 88 ~ 89
20. 黎茵, 黄学林, 肖洁凝, 等. 根癌农杆菌介导苜蓿体胚转化及转基因植株再生. 中山大学学报 (自然科学版), 2004, 43(4): 79 ~ 85
21. 李洪杰, 郭北海, 张艳敏, 李义文, 杜立群, 李银心, 贾旭, 朱至清. 利用组织培养和辐射诱变创造高频率小麦与簇毛麦染色体易位. 遗传学报, 2000, 6: 511 ~ 519
22. 李维平, 赵文明. 小麦增小穗育种方法与新种质拓宽研究. 作物学报, 2000, 26(2): 222 ~ 230
23. 梁铁金, 母锡金. 美味猕猴桃和软枣猕猴桃种间杂交花粉管行为和早期胚胎发生的观察. 植物学报, 1995, 37(8): 607 ~ 612

24. 梁正兰. 棉花远缘杂交的遗传与育种[M]. 科学出版社, 1995
25. 林富荣, 顾万春. 植物种质资源设施保存研究进展. 世界林业研究, 2004, 17(4): 19 ~ 23
26. 刘博林, 徐民新. 两个栽培大豆品种的体细胞胚胎发生和植株再生研究. 中国油料作物学报, 1999, 21(2): 11 ~ 13
27. 刘博林, 岳绍先, 胡乃璧. 龙葵Ktrazine抗性基因向大豆叶绿体的转移及在转基因植株中的表达. 中国科学(B)辑, 1989, 19: 699 ~ 705
28. 刘德璞, 赵桂兰. 大豆花粉离体培养获得愈伤组织. 大豆科学, 1986, 1: 17 ~ 19
29. 刘海坤, 卫志明. 一种大豆成熟种子的消毒方法. 植物生理学通讯, 2002, 38(3): 260 ~ 261
30. 刘镜明. 大粒小麦品种攀-80012-1-1. 作物品种资源, 1990, 32(2): 31
31. 刘丽君, 吴俊江, 高明杰, 汪清胤, 黄永芬, 夏凯, 李文华. 转*Ipt*基因大豆感染SMV1号的生理特性变化. 大豆科学, 1999, 18(3): 213 ~ 217
32. 刘丽君, 吴俊江, 高明杰, 鲁振明, 江清胤, 黄永芬, 夏凯, 李文华. 转*ipt*基因大豆感染SMV的生理特性变化. 云南大学学报(自然科学版), 1999, 21(S3): 99
33. 刘丽君, 吴俊江, 高明杰, 蒲国峰, 张淑珍, 邱丽娟, 郑翠明, 谢华, 郝连林, 李玉征. 大豆对SMV\_1株系抗性基因的分子标记研究. 大豆科学, 2002, 2: 93 ~ 95
34. 刘丽君. 巴西大豆的科研与生产服务体系. 大豆科学, 2003, 22(3): 236 ~ 239
35. 刘澍才, 吴燕. 国内外作物种质资源研究进展. 杂粮作物, 2001, 21(3): 26~271
36. 刘旭明, 金达生, 程须珍, 武晓菲, 王素华. 绿豆种质资源抗豆象鉴定研究初报. 作物品种资源, 1998, 2: 35 ~ 37
37. 密士军, 邱丽娟, 常汝镇, 郝再彬, 关荣霞. 利用SSR 指纹图谱分析大豆花叶病毒(SMV) 病抗源的遗传多样性. 植物病理学报, 2004, 34(3): 244 ~ 253
38. 南向日, 刘文萍. PEG介导*Bt*基因转化大豆原生质体获得转基因植株. 大豆科学, 1998, 17(4): 326 ~ 329
39. 南向日. 多聚鸟氨酸介导外源基因的直接转化法. 大豆科学, 2000, 19(1): 26 ~ 29
40. 邱丽娟, Nelson R, Vodkin L. 利用RAPD标记鉴定大豆种质. 作物学报, 1998, 23(4): 408 ~ 417
41. 邱丽娟, 常汝镇, 孙建英, 李向华, 许占友, 刘立宏. 中国大豆品种资源的评价与利用前景. 中国农业科技导报, 2000, 5: 60 ~ 63
42. 邱丽娟, 常汝镇, 袁翠平, 关荣霞, 刘章雄. 国外大豆种质资源的基因挖掘利用现状与展望. 植物遗传资源学报. 2006, 7(1): 1 ~ 6
43. 任德良, 孙松茂. 多枝多粒穗小麦分33. 天津农林科技. 1996, (2): 44
44. 任正隆, 张怀琼. 小麦 - 黑麦超大穗易位系的选育[A]. 庄巧生, 杜振华. “八五”小麦攻关研究论文集[C]. 北京: 中国农业出版社, 1996, 342 ~ 348
45. 阮仁超, 陈惠查, 杨五顺, 等. 构建贵州地方稻种遗传资源核心样品种质库的基本原则与程序. 贵州农业科学, 1999, 27(6): 41 ~ 431
46. 沈天民. 优质超级小麦新品系 - 兰考906-4简介. 麦类作物学报, 2000, 20(1): 99

47. 王虎, 王晓健, 甄一松, 邹玉宝, 郑维越, 张芊. DNA测序模板的制备和测序引物设计中的相关问题. 中国分子心脏病学杂志, 2004, 4,(1): 56 ~ 60
48. 王景林. 小麦与赖草远缘杂交的受精和胚胎发育. 植物学报, 1995, 37(3): 177 ~ 180
49. 王晓春, 刘尚前, 季静, 等. 农杆菌介导的大豆体细胞胚遗传转化系统的优化研究. 大豆科学, 2004, 23 (3) : 200 ~ 204
50. 王玉兰主编, 作物育种学, 黑龙江科学技术出版社, 1991, 170 ~ 173
51. 王泽宙, 邱全胜. 绿色荧光蛋白基因*mgfp4*在水稻愈伤组织中的瞬时表达. 北京师范大学学报, 2000, 36: 385 ~ 389
52. 卫志明, 许智宏. 大豆原生质培养和再生植株. 植物学报, 1990, 32 ( 8 ) :582 ~ 588
53. 魏兴华, 颜启传, 应存山. 建立浙江地方粳型稻种资源的核心样品的研究. 中国水稻科学, 1999, 13(2):81 ~ 85
54. 伍碧华, 郑有良, 周永红, 等. 四川小麦幼胚脱分化特性研究. 麦类作物学报, 2001, 21(2): 25 ~ 301
55. 肖文言, 王连铮. 大豆幼荚子叶原生质体培养及植株再生. 作物学报, 1994, 20( 6 ) :665 ~ 670
56. 辛志勇, 徐惠君, 陈孝, 林志珊, 杜丽璞, 周广和, 钱幼亭, 成卓敏. 黄矮病抗性导入小麦的研究进展. 作物杂志, 1990, 3: 1 ~ 2
57. 徐惠君, 庞俊兰, 叶兴国, 等. 基因枪介导法向小麦导入黄花叶病毒复制酶基因的研究. 作物学报, 2001, 27(6): 689 ~ 693
58. 徐惠君, 辛志勇, 刘四新, 陈孝, 杜丽璞. 组织培养与普通小麦异源易位系选育. 遗传学报, 1996, 5: 376 ~ 381
59. 徐香玲, 邹联沛, 刘伟华. 向大豆导入几丁质酶基因的初步研究. 大豆科学, 1999, 18(2): 101 ~ 108
60. 杨加银. 转基因大豆生产的现状与趋势. 世界农业, 2002, 6: 40 ~ 42
61. 杨守萍, 盖钧镒, 徐汉卿. 大豆雄性不育突变体NJ8921 的遗传学与细胞学鉴定. 大豆科学, 1998,17 (1) :88 ~ 93
62. 杨武云, 黄钢, 饶世达. 多小穗小麦10-A幼穗发育遗传分析. 西南农业学报, 1997, 10(3): 43 ~ 47
63. 叶兴国, Shirley Sato ,徐惠君,等. 小麦农杆菌介导转基因植株的稳定获得和检测.中国农业科学, 2001 ,34 (5) : 465 ~ 4681
64. 叶兴国, 王连铮. 大豆花药愈伤组织的分化及其内源激素分析. 作物学报, 1997, 23(5): 555 ~ 561
65. 尹光初, 朱之垠, 徐振, 陈力, 李学湛, 毕凤云.大豆花粉植株的诱导及其雄核发育的研究. 大豆科学, 1982, 1: 69 ~ 75
66. 曾君祉, 吴有强, 王东江. 花粉管通道(或运载)法转化的植株后代遗传表现及转化机理的探讨. 科学通报, 1998, 43(6): 561 ~ 566
67. 曾亚文, 王象坤, 杨忠义, 等. 云南稻种资源核心种质库构建及其利用前景.植物遗传资源科学, 2000, 1(3): 12 ~ 161

68. 张辉, 贾继增. AFLP 实验操作程序. 中国农业科学院作物品种资源研究所农业部作物品种资源与生物技术重点实验室, 北京, 1997
69. 张淑珍, 杨庆凯. 中美半矮秆大豆早期世代农艺性状遗传变异研究. 大豆科学, 2000, 19(4): 320 ~ 325
70. 张秀阁, 李中恒, 李金良. 小麦突变体利用研究. 小麦研究, 2001, 22(3): 16 ~ 17
71. 赵桂兰, 刘艳芝, 李俊波, 徐洪志, 刘莉, 尹爱平. 影响农杆菌介导的大豆基因转化因素的研究. 大豆科学, 2001, 20(2): 84 ~ 88
72. 赵孔南, 陈秋芳. 植物辐射遗传育种研究进展, 原子能出版社, 1990
73. 赵秀琴, 赵明, 肖俊涛, 张文绪, 关东明, 王美云, 陆军, 臧宁. 栽野稻远缘杂交高光效后代及其亲本叶片的气孔特性. 作物学报, 2003, 29(22): 216 ~ 221
74. 周光宇. 从生物化学的角度探讨远缘杂交的理论. 中国农业科学, 1978, 2: 16 ~ 20
75. 周光宇, 龚蓁蓁, 王自芬. 远缘杂交的分子基础——DNA 片段杂交假设的一个论证. 遗传学报, 1979, 4: 405 ~ 412
76. 邹继军, 杨庆凯, 陈受谊, 陈庆山, 刘亚光, 董伟. 大豆灰斑病抗病基因 RAPD 标记的分子特征及抗、感种质的 SCAR 标记鉴定. 科学通报, 1999, 23: 82 ~ 88
77. Aastveit K. Effects of combinations of mutagens on mutation frequency in barley. Mutations in Plant Breeding II. IAEA. Vienna. 1968 : 5 ~ 14
78. Ahn S, Tanksley SD. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. Natl. Acad. Sci. USA. 1993,(90): 7980 ~ 7984
79. Aragao FJL, Sarokin L, Vianna GR. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. Theor Appl Genet, 2000, 101: 1 ~ 6
80. Bailey MA, Boerma HR, Parrott WA. Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean. In Vitro Cellular and Developmental Biology, 1993, 29: 102 ~ 108
81. Bailey MA, Boerma HR, Parrott WA. Inheritance of tumor formation in response to *Agrobacterium tumefaciens* in soybean. Crop Sci, 1994, 34:514 ~ 519
82. Barre P, Akaffou S, Louarn J, Charrier A, Hamon S, Noirot M. Inheritance of caffeine and heteroside contents in an interspecific cross between a cultivated coffee species *Coffea liberica* var *dewevrei* and a wild species caffeine-free *C. pseudozanguebariae*. Theor Appl Genet, 1998, 96 (2): 306 ~ 311
83. Barwale UB, Kerns HR, Widholm JM. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. Planta, 1986, 167: 473 ~ 481
84. Bidney D, Scelonge C, Martich J, et al. Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Mol Biol, 1992, 18: 301 ~ 313
85. Bechtold N, Ellis J, Pelletier G. In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of

- adult *Arabidopsis thaliana* plants. C R Acad Sci Paris Life Sci, 1993, 316: 1194 ~ 1199
86. Butruille DV, Botteux LX. Selection-mutation balance in polysomic tetraploids: impact of double reduction and gametophytic selection on the frequency and subchromosomal localization of deleterious mutations. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 6608 ~ 6613
  87. Cahoon EB, Carlson TJ, Ripp KG. Biosynthetic origin of conjugated double bonds: production of fatty acid components of high value drying oils in transgenic soybean embryos. Proceedings of National Academy of Science, 1999, 96: 12935 ~ 12940
  88. Cahoon EB, Marillia EF, Stecca KL. Production of fatty acid components of meadowfoam oil in somatic soybean embryos. Plant Physiology, 2000, 124: 243 ~ 251
  89. Charity JA, Holland L, Grace LJ. Consistent and stable expression of the *nptII*, *uidA* and *bar* genes in transgenic *Pinus radiata* after *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation using nurse cultures. Plant Cell Rep, published online: 2004
  90. Chee PP, Fober KA, Slightom JL. Transformation of soybean (*Glycine max*) by infecting germinating seeds with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiology, 1989, 91: 1212 ~ 1219
  91. Chee PP, Hu CY. Transgenic soybean (*Glycine max*). In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. 2000, Vol.46. Transgenic Crops I. (Bajaj YPS, ed) Springer-Verlag, Heidelberg, pp268 ~ 282
  92. Chen KC, Lin CY, Kuan CC. A novel defensin encoded by a mungbean cDNA exhibits insecticidal activity against bruchid. J Agric Food Chem, 2003, 51(2): 530
  93. Cheng TY, H Saka, TH Voqui-Dinh. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture. Plant Science Letters, 1980, 19: 91 ~ 99
  94. Christou P, Murphy JE, Swain WF. Stable transformation of soybean by electroporation and root formation from transformed cellus. Proceedings of National Academy of Science, 1988, 84: 3962 ~ 3966
  95. Christou P, McCabe DE, Swain WF. Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles. Plant Physiology, 1988, 87(3): 671 ~ 674
  96. Clemente TE, La Vallee BJ, Howe AR. Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation. Crop Science, 2000, 40: 797 ~ 803
  97. Cocking EC, Gregory DW. Organized protoplasmic units of the plant cell: I. their occurrence, origin, and structure. Journal of Experimental Botany, 1963, 14: 504 ~ 511
  98. Damania AB, Pecetti L, Qualset CO, Humeid BO. Diversity and geographic distribution of stem solidness and environmental stress tolerance in a collection of durum wheat landraces from Turkey. *Genetic Resources & Crop Evolution*, 1997, 44: 101 ~ 108
  99. Donaldson PA, Simmonds DH. Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean. Plant Cell Rep, 2000, 19: 478 ~ 484
  100. Dandekar AM, McGranahan GH, Leslie CA. *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic

- embryos as a method for the production of transgenic plants. *J Tissue Culture Methods*, 1989, 12 (4): 145 ~ 1501
101. Das D K, Reddy M K, Upadhyaya K C. An efficient leaf-disc culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Rep*, 2002, 20 (11): 999 ~ 1005
102. Davis SJ, Vierstra RD. Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (*GFP*) for use in higher plants. *Plant Mol Biol*, 1998, (36): 521 ~ 528
103. Deblock L. Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny. *The EMBO Journal*, 1984, 3: 1681 ~ 1689
104. Delzer BW, Somers DA, Orf JH (1990) *Agrobacterium tumefaciens* susceptibility and plant regeneration of 10 soybean genotypes in maturity groups 00 to II. *Crop Sci* 30:320 ~ 322
105. Deng XY, Wei ZM, Xu ZH. Factors on somatic embryogenesis of soybean elite cultivars and plant regeneration. *Acta Biologicae Experimentalis Sinica*, 2000, 33(1): 69 ~ 70
106. Dhir SK, Dhir S, Savka MA. Regeneration of transgenic soybean (*Glycine max*) plants from electroporated protoplasts. *Plant Physiology*, 1992, 99: 81 ~ 88
107. Dhir SK, Dhir S, Widholm JM. Regeneration of fertile plants protoplast of soybean (*Glycine max* L. Merr): genotypic differences in culture response. *Plant Cell Reports*, 1992, 11: 285 ~ 289
108. Di R, Purcell V, Collins GB. Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene. *Plant Cell Reports*, 1996, 15: 746 ~ 750
109. Doll H. Mutagenic effect of gamma rays, dithyl sulphate, ethylmethane sulphonate and various combinations of gamma rays and the chemicals. *Induced Mutation in Plant*, IAEA. Vienna. 1969: 195 ~ 205
110. Droste A, Pasquali G, Bodanese-Zanettini MH. Transgenic fertile plants of soybean [*Glycine max* (L). *Merrill*] obtained from bombarded embryogenic tissue. *Euphytica*, 2002, 127: 367 ~ 376
111. Edme PYP, Glaz B, Gilbert RA, Miller JD, Davidson JO, Dunkelmann JW, Comstock JC. Registration of 'CP 96-1252' Sugarcane. *Crop Science*, 2005, 45:423
112. Falco SC, Guida T, Locke M. Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. *Bio/Technology*, 1995, 13: 577 ~ 582
113. FAO. Report on the state of the world's plant genetic resource for food and agriculture, prepared for the International Technical Conference on Plant Genetic Resource. Leipzig, Germany, June 1996, 17 ~ 231
114. Favret EA. Genetics effects of single and combined treatment of ionizing radiation and ethylmethane sulphonate on barley seeds. *Proc 1<sup>st</sup> Int. Barley Genetics Symp*, 1963: 68 ~ 81
115. Frame BR, H Shou, RK Chikwamba, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using standard binary vector system. *Plant Physiology*, 2002, 129: 13 ~ 22
116. Françoise TN, Robin TS, Anupama K, Lila OV. Clustering of Microarray Data Reveals Transcript

- Patterns Associated with Somatic Embryogenesis in Soybean. *Plant Physiology*, 2003, 132: 118 ~ 136
117. Fujii KM, Ishimoto, K Kitamura. Patterns of resistance to bean weevils (*Bruchidae*) in *Vigna radiate-mungo-subloblata* complex inform the breeding of new resistant varieties, *Applied Entomology and Zoology*, 1989, 24(1): 126 ~ 132
118. Gary S, Lila V, Wayne A. Parrott, Randy C. Shoemaker. National Science Foundation-Sponsored Workshop Report. Draft Plan for Soybean Genomics. *Plant Biologists*, 2004, 135: 59 ~ 70
119. Giovanna M, Paolo P, AnnaM V. Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR. *BioMed Central Biotechnology*, 2002, 2 (1): 20
120. Graef GL, White DM, Korte LL. Registration of NE2701soybean. *Crop Science*, 2005, 45 :410 ~ 411
121. Grivet L. Comparative genomemapping of sugarcane with other species within the *Andropogoneae*. *Heredity*.1994, (73): 500 ~ 508
122. Guha S, Maheshwari SC. In vitro production of embryos from anther of *Datura*. *Nature*, 1964, 204: 497
123. Guha S, Maheshwari S C. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura* in vitro. *Nature*, 1966, 212: 97 ~ 98
124. Guha S, Maheshwari S C. Development of embryoids from pollen grains of embryoids from rice pollen *Phytomorphology*, 1967, 17 :454 ~ 461
125. Gujar GT, TD Yadav. Feeding of *Callosobruchus maculatus* (Fab.) and *Callosobruchus chinensis* (Linn), in green gram. *Indian Journal of Entomology*, 1978, 40: 108 ~ 112
126. Hartweck LM, Lazzeri PA, Cui D. Auxin-orientation effects on somatic embryogenesis from immature soybean cotyledons. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 1998, 24(8): 821 ~ 828
127. Hayes AJ, Ma G, Buss GR, Saghai Maroof MA. Molecular marker mapping of *RSV4*, a gene conferring resistance to all known strains of soybean mosaic virus. *Crop Science*, 2000, 40:1434 ~ 1437
128. Hazel CB, Klein TM, Anis M, Wilde HD, Parrott WA. Growth characteristics and transformability of soybean embryogenic cultures. *Plant Cell Reports*, 1998, 17: 765 ~ 772
129. Helms T C, Nelson BD, Goos RJ. Registration of Lamouresoybean. *Crop Science*, 2005, 45:410
130. Hess D. Investigations on the intra and interspecific transfer of anthocyanin genes using pollen as vectors. *Z Pflanzenphysiol Bd*, 1980, 98: 321 ~ 327
131. Hiei Y, Ohta S, Komari T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant Journal*, 1994, 6: 271 ~ 282
132. Hinchey MAW, Ward DVC, Newell CA. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Bio/Technology*, 1988, 6: 915 ~ 922
133. Horsch RB. Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science*, 1984, 223: 496 ~ 498
134. Horsch RB. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 1985, 227: 1229 ~ 1231
135. Hu Z, Yang J, Guo GQ. High-efficiency transformation of *Lycium barbarum* mediated by

- Agrobacterium tumefaciens* and transgenic plant regeneration via somatic embryogenesis. Plant Cell Rep, 2002, 21: 233 ~ 237
136. Ishida Y, Saito H, Ohta S. High efficiency transformation of maize (*Zea mays L.*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Nature biotechnology, 1996, 14: 745 ~ 750
137. Ivers DR, PG Palmer, W R Fehr. Anther culture in soybean. Crop Science, 1974, 14: 891 ~ 893
138. Jain S M, Tissue culture - derived variation in crop improvement. Euphytica, 2001, 118: 153 ~ 166
139. Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. The EMBO Journal, 1987, 6: 3901 ~ 3907
140. Kadlec M, Suchomelova J, Smirnov VA, Nikolajevna SL. Anther cultures in soybean. Soybean Genetics Newsletter, 1991, 18: 121 ~ 124
141. Kao KN, WA Keller, RA Miller. Experimental cell Research, 1970, 63: 338 ~ 340
142. Kar GN. Induction of semi-dwarf mutants in bread wheat var C-306. J Nucleic Agric Biol, 1982, 11: 51 ~ 53
143. Kartha KK, K Pahl, NL Leung. Plant regeneration from meristems of grain legumes: soybean, cowpean, peanut, chickpea and bean. Canadian Journal of Botany, 1981, 59: 1671 ~ 1679
144. Kato S, Sekin S, Oh SW. Construction of a full-length cDNA bank. Gene, 1994, 150: 243 ~ 250
145. Kim J, LaMotte CE, Hack E. Plant regeneration in vitro from primary leaf nodes of soybean (*Glycine max*) seedlings. Journal of Plant Physiology, 1990, 136: 664 ~ 669
146. Kohler F, Cardon G. Enhancement of transformation rates in higher plants by low - dose irradiation: Are DNA repair systems involved in the incorporation of exogenous DNA into the plant genome? Plant Mol Biol, 1989, 12: 189 ~ 99
147. Komatsuda T, Lee W, Oka S. Maturation and regeneration of somatic embryos as affected by sucrose and plant growth regulators in soybean *Glycine gracilis* and *Glycine max* (L). Merr. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1992, 28: 103 ~ 113
148. Komatsuda T, Ohyama K. Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean *Glycine max*. Thero Appl Genet, 1988, 75: 695 ~ 700
149. Kurata N. Conservation of genome structure between rice and wheat. Bioötechno logy. 1994, (12) : 276 ~ 278
150. Lambrides CJ, BC Imrie. Susceptibility of mungbean varieties to the bruchid species *Callosobruchus maculatus* (F.), *C. phaseoli* (Gyll.), *C. chinensis* (L.), and *Acanthoscelides obtectus* (Say.) (*Coleoptera: Chrysomelidae*). Australian Journal of Agricultural Research, 2000, 51: 85 ~ 89
151. Larkin PJ, Scowcroft WR. Somaclonal variation- a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet, 1981, 60: 197 ~ 214
152. Larkin PJ, Banks PM, Bhati R. From somatic variation to variant plants: mechanisms and applications. Genome, 1989, 31: 705 ~ 711
153. Larry D. Hodges, Josh Cuperus, Walt Ream. *Agrobacterium rhizogenes* GALLS Protein

- Substitutes for *Agrobacterium tumefaciens* Single-Stranded DNA-Binding Protein VirE. Journal of Bacteriology, 2004, 5: 3065 ~ 3077
154. Lawn R J. Agronomic studies on *Vigna* spp. In south-eastern Queensland I. Phenological response of cultivars to sowing date. Australian Journal of Agricultural Research, 1979, 30: 855 ~ 870
155. Lawn RJ. Agronomic studies on *Vigna* spp. In south-eastern Queensland II. Vegetative and reproductive response of cultivars to sowing date. Australian Journal of Agricultural Research, 1979, 30: 871 ~ 882
156. Lawn R J. Agronomic studies on *Vigna* spp. In South-Eastern Queensland III. Response to sowing arrangement. Australian Journal of Agricultural Research, 1983, 34: 505 ~ 515
157. Lawn R J, Ahn CS (1985) Mungbean (*Vigna radiate* (L.) Wilczek/*Vigna mungo* (L.) Hepper). In: RJ Summerfield & EH Roberts (eds) Grain Legume Crops. William Collins Sons & Co. Ltd, 584 ~ 623
158. Lee W, Oka S, Komatsuda T. Comparison of embryogenesis efficiency on eight portions of immature embryos in *Glycine gracilis*. Soybean Genetics Newsletter, 1990, 17(4): 59 ~ 6
159. Lee JH, Lee SY, Selection of stable mutants from cultured rice anthers treated with ethylmethane sulfonic acid, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2002, 71, 165 ~ 171
160. Li XY, Qian Q, Fu ZM. Control of tillering in rice. Nature, 2003, 422: 618 ~ 621
161. Li YH, Qian Q, Zhou YH, Yan MX, Sun L, Zhang M, Fu ZM, Wang YH, Han B, Pang XM, Chen MS, Li JY. *BRITTLE CULM1*, Which Encodes a COBRA-Like Protein, Affects the Mechanical Properties of Rice Plants. Plant Cell 2003 15: 2020 ~ 2031
162. Li ZL, Randall LN, Jack MW, Andrew B. Soybean Transformation via the Pollen Tube Pathway. Soybean Genetics Newsletter, 2002, 29: 1 ~ 11
163. Lightfoot VNN, Gibson PT, Kassem MA, Iqbal JM, Meksem K. Registration of the Essex × Forrest recombinant inbred line mapping population. Crop Science, 2005, 45: 1678 ~ 1681
164. Lin N, Odell JT, Schreiner RM. Soybean protoplast culture and direct gene uptake and expression by cultured soybean protoplasts. Plant Physiology, 1987, 84(3): 856 ~ 861
165. Liu HK, Yang C, Wei ZM. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system. Planta, 2004, 219(6): 1042 ~ 1049
166. Loo SW, Xu ZH. In: Cao TQ. Advances in Science of China, Biology, Vol. 1 [M]. Beijing: Science Press, 1986. 295
167. Luo ZX, Wu R. A simple method for the transformation of rice via the pollen-tube pathway. Plant Molecular Biology Reports, 1988, 6 (3): 165 ~ 174
168. Maheshwari SC, Tyagi AK, Malhotra K. Induction of haploidy from pollen grains in angiosperms: The Current Status. Theor Appl Genet, 1980, 58: 193 ~ 206
169. Maliga P. Progress towards commercialization of plastid transformation technology. Trends in Biotechnol, 2003, 21 (1): 20 ~ 28

170. Margie MP, Shou HX, Guo ZB, Zhang ZY, Banerjee AK, Wang K. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. *Euphytica*, 2004, 00: 1 ~ 13
171. Margie MP, Martinez JC, Kalvig AB, Fonger TM, Wang K. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation, *Plant Cell Reports*, 2005, 00
172. Maughan PJ, Philip R, Cho MJ. Biolistic transformation expression and inheritance of bovine  $\beta$ -casein in soybean (*Glycine max*). *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 1999, 35: 344 ~ 349
173. Mauro AO, Pfeiffer TW, Collins GB. Inheritance of soybean susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and its relationship to transformation. *Crop Sci*, 1995, 35: 1152 ~ 1156
174. Mazur B, krebbes E, Tingey S. Gene discovery and product development for grain quality traits. *Science*, 1999, 285: 372 ~ 375
175. Maximova S, Miller C, Ant G. Stable transformation of *Theobroma cacao L.* and influence of matrix attachment regions on GFP expression. *Plant Cell Rep*, 2003, 21: 872 ~ 883
176. McCabe DE, Swain WF, Martinell BJ. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Technology*, 1988, 6: 923 ~ 926
177. McDonnell RE, Clark RD, Smith WA, WA Hinchee. A simplified method for the detection of neomycin phosphotransferase II activity in transformed plant tissues. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1987, 5: 380 ~ 386
178. Mebrahtu T, Devine TE, Donald P, Abney TS. Registration of Asmara vegetable soybean. *Crop Science*, 2005, 45: 408 ~ 409
179. Meurer CA, Dinkins RD, Collins GB. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation. *Plant Cell Reports*, 1998, 18: 180 ~ 186
180. Miguel MT, Veronica LB, José Luis CP, Luis HE. Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2004, 22: 63 ~ 70
181. Miller RA. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 1971, 13: 347 ~ 353
182. Miyashita NT, Kawabe A, Innan H. DNA Variation in the Wild Plant *Arabidopsis thaliana* Revealed by Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis. *Genetics* 1999, 152: 1723 ~ 1731
183. Moore G, Devos KM, Wang Z. Grass, lone up and form a circle. *Current Biology*, 1995, 5(7): 737 ~ 739
184. Muller HJ. Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *J Genet*, 1930, 22: 299 ~ 334
185. Nadim W. Alkharouf, Benjamin F. Matthews. SGMD: the Soybean Genomics and Microarray Database. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32: 398 ~ 400
186. Narayanan RA, Atz R, Denny R, Young ND, Somers DA. Expression of Soybean Cyst Nematode Resistance in Transgenic Hairy Roots of Soybean. *Crop Science*, 1999, 39: 1680 ~ 1686
187. Negrotto D, Jolley M, Beer S. The use of phosphomannose isomerase selectable marker recover

- transgenic maize plant (*Zea mays* L) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Rep*, 2000, 19 (8): 798 ~ 803
188. Olhoft PM, Fligel LE, Donovan CM, Somers DA. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta*, 2003, 5:723 ~ 735
189. Olhoft PM, Lin K, Galbraith J, Nielsen NC, Somers DA. The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Reports*, 2001, 20: 731 ~ 737
190. Olhoft PM, Somers DA. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Reports*, 2001, 20: 706 ~ 711
191. Padgett SR, Kolacz KH, Delannay X, Re DB, LaVallee BJ, Tinius CN, Rhodes WK, Otero YI, Barry GF, Eichholtz DA, Peschke VM, Nida DL, Taylor NB, Kishore GD. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Science*. 1995, 35: 1451 ~ 1461
192. Paola L, Ye X, Lngo P. Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose selective agent. *Molecular Breeding*, 2001, 7 (1): 43 ~ 49
193. Park SU, Fachini PJ. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of California poppy, *schscholziacalifornica* Cham via somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 2000, 19: 1006 ~ 1012
194. Parrot WA, Hoffman LM, Hildebrand DF. Recovery of primary transformants of soybean. *Plant Cell Reports*, 1989, 7: 615 ~ 617
195. Paul Christou and Tameria L. Ford. Recovery of Chimeric Rice Plants from Dry Seed using Electric Discharge Particle Acceleration. *Annals of Botany*, 1995, 75: 449 ~ 454
196. Paula M, Olhoft LE, Fligel CM, Donovan DA, Somers. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta* (2003) 216: 723 ~ 735
197. Peng Z, Ingo P, Johanna P K. Efficient production of transgenic cassava using negative and positive selection. *Transgenic Research*, 2000, 9 (6): 405 ~ 415
198. Pereira M G. Construction of an RFLP map in sorgham and comparative mapping in maize. *Genome*. 1994,(37): 236 ~ 243
199. Racine MF, Bertrand E; Pictet R. A high sensitive method for mapping the 5' termini of mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(7): 1683 ~ 1684
200. Riplevl, Beversdorf WD. Development of self-incompatible *Brassica napus*. . Introgression of S-alleles from *Brassica oleracea* through interspecific hybridization. *Plant Breeding*, 2003, 122(1): 1 ~ 5
201. Santarem ER, Trick HN, Essig JS, Finer JJ. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledon: optimization of transient expression. *Plant Cell Reports*, 1998, 17: 752 ~ 759
202. Schlappi M, Hohn B. Competence of Immature Maize Embryos for *Agrobacterium*-mediated Gene Transfer. *The Plant Cell*, 1992, 4: 7 ~ 16

203. Schwenk FW, Pearson CA, Roth MR. Soybean mesophyll protoplasts. *Plant Science Letters*, 1981, 23(2): 153 ~ 155
204. Shan X, Blake T.K, Talbert LE, Conversion of AFLPs to sequence-tagged-site PCR markers. *Plant and Animal Genome Conf*, 1998, 18 ~ 22
205. Shannon JG, Anand SC, Arelli PR, Wrather JA, Slepser DA. Registration of S99-3181 soybean. *Crop Science*, 2005, 45: 407 ~ 408
206. Sharma HC. How wide can a cross be? *Euphytica*, 1995,82:43 ~ 64
207. Shou HX, Bordallo P, Wang K. Expression of the *Nicotiana* protein kinase (NPK1) enhanced drought tolerance in transgenic maize. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55: 1013 ~ 1019
208. Soltis PS, Soltis DE. The role of genetics and genomic attributes in the success of polyploids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 7051 ~ 707
209. Srinives P, Charles Y, Yang. Mungbean Production in Asia. *Compilation of Papers on Technology and Utilization of AVRDC-Improved Mungbean in China*. Beijing, China.1993, 67 ~ 73
210. Stanton B, Gelvin. *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, 67(1): 16 ~ 37
211. Steward FC, Mapes MO, Mears K. Growth and organized development of cultured cells. [J]. *Organization in cultures grown from suspended cells. Amer J Bot*, 1958, 45: 705 ~ 708
212. Stewart CNJ, Adang MJ, All JN, Boerma HR, Cardineau G, Tucker D, Parrott W A. Genetic Transformation, Recovery, and Characterization of Fertile Soybean Transgenic for a Synthetic *Bacillus thuringiensis cryIAc* Gene. *Plant Physiology*, 1996, 112(1): 121 ~ 129
213. Tae-Seok Ko, Randall L, Nelson, Schuyler S K. Screening Multiple Soybean Cultivars ( MG 00 to MG VIII ) for Somatic Embryogenesis Following *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Immature Cotyledons. *Crop Science*. 2004, 44: 1825 ~ 1831
214. Takayoshi O, Yeon SS, Hikaru T, Tadayuki W, Tsukasa N, Akio K. Genetic mapping of AFLP markers in Japanese bunching onion (*Allium fistulosum*). *Euphytica*, 2005, 144: 255 ~ 263
215. Talekar NS. Biology, damage and control of bruchid pests of mungbean. In ‘Munbbean. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on Mungbean’. (Eds S Shanmugasundaram, BT Mclean) 1988, 329 ~ 342. (AVRDC: Taiwan)
216. Trick HN, Finer JJ. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max*(L.) *Merrill*] embryogenic suspension culture tissue. *Plant Cell Reports*, 1998, 17: 482 ~ 487
217. Turpeinen T, Vanhala T, Nevo E, Nissil E. AFLP genetic polymorphism in wild barley (*Hordeum spontaneum*) populations in Israel. *Theor Appl Genet*, 2003, 106: 1340
218. Vain P, Worland B, Kohli A. The green fluorescent protein (GFP) as a vital screenable marker in rice transformation. *Theor Appl Genet*, 1998, (96): 164 ~ 169
219. Van Slogeren GMS, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA. Silent T-DNA genes in plant lines

- transformed by *Agrobacterium tumefaciens* are activated by grafting and by 5-azacytidine treatment. *Plant molecular biology*, 1984, 3:333 ~ 336
220. Vasil V , Brown SM , Re D. Stably transformed callus lines from microprojectile bombardment of cell suspension cultures of wheat .*Bio/Technology*, 1991, 9: 743 ~ 747
221. Wang J, Eagles HA, Trethowan R, Van GM. Using computer simulation of the selection process and known gene information to assist in parental selection in wheat quality breeding. *Aus J Agric Res*, 2005, 56(5): 465 ~ 473
222. Watson B, Currier RC, Gordon MP, Chilton MD, Nester EW. Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of bacteriology*, 1975, 123: 255 ~ 264
223. Wei ZM, Xu ZH. Plant regeneration from protoplasts soybean (*Glyci nemax* L). *Plant Cell Reports*, 1988, 7: 348 ~ 351
224. Wenck A R, Quinn M. High efficiency *Agrobacterium* mediated transformation of Norway spruce (*Piceaabies*) and loblolly pine (*Pinus taeda*). *Plant Mol Biol*, 1999, 39(3): 407 ~ 416
225. Wen-Yuan Song, Guo-Liang Wang, Li-Li Chen, Han-Suk Kim, Li-Ya Pi, Tom Holsten, J. Gardner, Bei Wang, Wen-Xue Zhai, Li-Huang Zhu, Claude Fauquet, and Pamela Ronald. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science*, 1995, 270: 1804 ~ 1806
226. Wright MS, DV Ward, MA Hinchee. Regeneration of soybean (*Glycine max* L. Merrill) from cultured primary leaf tissue. *Plant Cell Reports, Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1987, 8: 83 ~ 90
227. Wright N S, Koellwe SM, Hinchee M A et al. Plant regeneration by organogenesis in clycinemax. *Plant Cell Reports*, 1986, 5: 150 ~ 154
228. Wu RL, Gallo-Meagher M, Littell RC, Zeng ZB. A general polyploid model for analyzing gene segregation in outcrossing tetraploid species. *Genetics* , 2001, 159 : 869 ~ 882
229. Xia G M, Li Z Y, He C X, et all Transgenic plant regeneration from wheat (*Triticum aestivum.*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Phytophysiological Sinica*, 1999, 25 (1): 22 ~ 281
230. Xu ZH, M R Davey, E C Cocking. Callus formation from root protoplasts of *Glycine max* (soybean). *Plant Science Science Letters*, 1982, 24(1): 111 ~ 115
231. Xue GP. The DNA-binding activity of an AP2 transcriptional activator HvCBF2 involved in regulation of lowtemperature responsive genes in barley is modulated by temperature. *Plant J*, 2003 ,33: 373 ~ 383
232. Yan B, Srinivasa Reddy MS, Collins GB, Dinkins RD. *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.] using immature zygotic cotyledon explants. *Plant Cell Reports*, 2000, 19: 1090 ~ 1097
233. Yang CY. AVRDC Mungbean Research. Mungbean Germplasm: Collection, Evaluation and Utilization for Breeding Program. JIRCAS. Tsukuba, Ibaraki, Japan. 1996, 84 ~ 88

234. Yi KK, Wu ZC, Zhou J, Du LM, Guo LB, Wu YR, Wu P. *OsPTF1*, a Novel Transcription Factor Involved in Tolerance to Phosphate Starvation in Rice. *Plant physiology*, 2005, 138: 2087 ~ 2096
235. Young ND, L Kumar, D Menancio-Hautea. RFLP mapping of a major bruchid resistance gene in mungbean (*Vigna radiate*, L. Wilczek). *Theoretical and Applied Genetics*, 1992, 84: 839 ~ 844
236. Zabeau M, Vos P. 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting [P]. European Patent Amplification number 92402629.7; Publication number 0535858A1
237. Zenkteler M, Nitzsche W. Wide hybridization in cereals. *Theor Appl Genet*, 1984, 68: 311 ~ 315
238. Zhang H X, Blunwald E. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotech*, 2001, 19: 765 ~ 768
239. Zhang Z, Xing A, Staswick P, Clemente T. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1999, 56: 37 ~ 46
240. Zhao ZY, Gu W, Tishu C. High throughput genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in maize. *Molecular Breeding*, 2001, 8:323 ~ 333
241. Zhuang XJ, Hu CY, Chen Y, Yin GC. Embryoids from soybean anther culture. *Soybean Genetics Newsletter*, 1991, 18: 265

## 附录

注：本部分研究内容为作者攻读博士学位期间最初作的一些关于绿豆抗虫基因分子标记方面的研究工作，后来由于负责该部分工作的导师出国，以及导师更换等原因，这部分工作没有继续完成，只作了一些简单的初步研究，得到了一些结果，列在这里与各位读者互相交流与学习。

### 野生绿豆资源 TC1966 抗豆象相关基因的 AFLP 标记初步研究

#### 1 前言

绿豆 (*Vigna radiate* (L.) Wilczek) 是一种生育期短 (70~110天)、光周期敏感的热带亚热带作物 (Lawn, 1979; Lawn, 1979; Lawn, 1983) 主要生长在亚洲 (Lawn, 1985)。中国是绿豆的发源地之一，拥有类型繁多的绿豆品种资源。绿豆是我国主要的食用豆类作物之一，目前我国绿豆播种面积和总产量均居世界前列。然而，蛀食性害虫绿豆象 (*Callosobruchus chinensis*) 一直严重困扰着我国绿豆的生产和贮存，同时也制约着我国绿豆的出口创汇。

豆象 (*Genus Callosobruchus*) 是世界范围内对绿豆及其它豆科植物的危害性最强的一种仓储害虫 (Young et al, 1992)，主要包括绿豆象 (*Callosobruchus chinensis* L.)、四纹豆象 (*C. maculatus* F.)、灰豆象 (*C. phaseoli* G.) 等小种 (Lambrides et al, 2000)，其中绿豆象和四纹豆象对绿豆危害最强 (Talekar et al, 1988)，平均一个生活周期可降低绿豆籽粒重量的30.2~55.7% (Gujar et al, 1978)，严重得甚至绝收。绿豆象是绿豆、红小豆和豇豆贮藏期的主要害虫，田间和仓内都可发生，广泛分布于全世界。据记载，我国除西藏、宁夏、新疆、青海等省区外，其它各地均有发生。

多年来，各国科学家一直在积极寻求防治豆象的有效途径，以降低或避免豆象所造成的巨大损失。我国从亚洲蔬菜研究与发展中心 (AVRDC) 引进的野生品种 (*Vigna zlobata*) TC1966 高抗多个豆象小种 (Fujii et al, 1989)。另外，试验还证明 TC1966 可以与普通栽培绿豆正常杂交，利用该方法已培育出一大批农艺性状优良的绿豆新品系 (Yang et al, 1996; Srinives et al, 1993)。我国目前在绿豆抗豆象品种的遗传改良领域的分子生物学研究报道还很少，近年来，生产上所利用的绿豆象抗源主要是亚洲蔬菜研究与发展中心引进的，且多为野生品种。程须珍等 (程须珍等, 2003; 2004) 通过与栽培品种杂交，近年来已培育出一些农艺性状优良的抗豆象新品系，并通过抗虫性鉴定及后代的遗传变异发现，绿豆中的抗豆象基因呈质量性状遗传 (程须珍, 私人通讯)。

AFLP (amplified fragment length polymorphism) 技术是由Zabeau发明，并由Vos发展起来的。该技术于1993年获得欧洲专利局专利，其专利权归属荷兰Keygene公司。AFLP是RFLP和PCR相结

合的一种方法。基本原理是选择性扩增基因组DNA的酶切片段而产生多态性，选择性扩增是通过在引物3'末端加上选择性核苷酸而实现的。与其它分子标记相比，AFLP能更高效的揭示基因组中的核苷酸变异。一般，每对AFLP引物组合可通过扩增产生50~100条片段。目前，AFLP标记已被广泛应用于抗病基因的分子标记(William et al, 2003; Shan et al, 1998)、遗传作图(Takayoshi et al, 2005)及遗传多样性检测(Miyashita et al, 1999; Turpeinen et al, 2003)等研究领域。

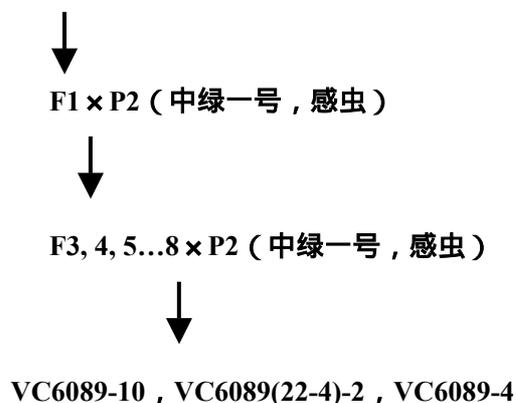
近年来针对于绿豆中抗豆象基因的分子生物学研究也相继展开。Young et al(1992)利用RFLP分子标记技术构建了一张抗豆象基因的连锁图；我国台湾的陈庆三先生从一个绿豆抗豆象品种中发现了一种名为防御素的蛋白质，对一些有害微生物及豆象幼虫均表现出抗性(Chen KC et al, 2003)；在我国，绿豆抗虫基因的研究目前正处于起步阶段，绿豆抗虫基因的生物化学与分子生物学研究几乎是空白。本文利用高通量的AFLP分子标记技术，通过抗豆象材料TC1966的AFLP研究，找到了一些与抗豆象基因存在潜在连锁关系的AFLP引物组合。如果能够通过抗源材料与非抗虫材料组建后代分离群体进行分析、研究，必将在绿豆抗豆象基因的分子标记领域有所突破。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

本研究所采用的实验材料均由中国农业科学院作物科学研究所豆类室提供，包括抗虫绿豆材料TC1966；感虫绿豆材料中绿1号及3个绿豆近等基因系材料VC6089-10、VC6089(22-4)-2和VC6089-4。其中，TC1966高抗多个豆象小种，且与栽培品种的杂交优势明显。栽培品种中绿1号是一个普通感虫绿豆栽培品种，具有高产、优质、适应性强等优良农艺性状；以TC1966与中绿1号杂交，以中绿1号作为轮回亲本经多代回交后获得3个近等基因系材料(程须珍，私人通讯)。

P1 (TC1966, 抗虫) × P2 (中绿一号, 感虫)



## 2.2 试验方法

### 2.2.1 抗虫性鉴定

抗虫性鉴定采用了室内人工接虫的方法，具体步骤如下：

不同的品系及抗、感亲本对照，每份随机选取50粒健康绿豆种子，分别放入直径6cm、高1cm的无盖圆筒中，然后随机放入大塑料盒内（66cm×44cm×18cm）。以标准的绿豆籽粒被害率作为抗虫性评价指标，将供试材料置于塑料盒内，按平均供试每份材料接虫8对羽化1~3天的绿豆象成虫进行接虫鉴定，然后用纱布将盒子密封，于高湿、黑暗、27±2℃的养虫室内放置45 d，调查每份材料的受害粒数，根据种子受害百分率记载不同评定材料的抗虫性等级，抗虫分级标准见表（5-1）（刘旭明等,1998）。

表1 绿豆抗绿豆象分级评价标准

Table 1 Identification criteria of resistance to mungbean bruchid

分级	种子被害率 (%)	抗性
0	0	免疫 (Immune)
1	0.1-10.0	高抗 (HR)
3	10.1-35.0	抗 (R)
5	35.1-65.0	中抗 (MR)
7	65.1-90.0	感 (S)
9	>90	高感 (HS)

注：感虫对照种子被害率>90%，抗性表现为高感（HS）。

### 2.2.2 AFLP 分子标记

#### 2.2.2.1 模板 DNA 的准备

参试资源材料于2004年7月1日营养钵播种，室内温度25~30℃，出苗后7~15 d，从每份材料的5株幼苗上采收刚要展开的嫩叶0.1~0.2g，提取基因组DNA，具体步骤如下：

- 1) 将幼苗新鲜叶片置于研钵中，加入适量液氮冷冻处理，迅速将其研成细微粉末。然后将粉末转至经液氮冷冻处理过的一个（或几个）1.5ml离心管中，加入700μl 65℃预热的缓冲液“S”【100mM Tris-HCl (pH8.5)，100mM NaCl，50mM EDTA (pH8.0)，2% SDS】，混合均匀后置于65℃的恒温水浴锅中水浴1~1.5h，并定时进行混匀，防止内容物沉积，影响DNA的产量。
- 2) 水浴完成后，取出离心管，配平后，10000rpm，16℃离心10min。
- 3) 取出离心管，吸出上清液于新的1.5ml离心管中，并分别加入等体积的Tris饱和酚-氯仿(V/V=1:1)轻轻的颠倒，直至管内液体混合均匀。配平后4000rpm离心10min。

- 4) 将上清液转至新的 1.5ml 离心管中,加入等体积的氯仿,轻轻的混匀后,在 4000 rpm 离心 10 min,并转移上清液至新的 1.5ml 离心管中。
- 5) 加入等体积的冷 0.6 × 异丙醇,反复颠倒,直至成团的 DNA 出现。
- 6) 将 DNA 至于通风橱中,自然风干,加入 0.7ml TE (pH8.0) 和 10 $\mu$ l RNase A,轻弹管壁至 DNA 全部溶解,37 恒温箱中过夜。
- 7) 加 Tris 饱和酚-氯仿 (V/V=1 : 1),轻轻混匀,于 4000rpm,4 下离心 10min,取上清液并转至新的 1.5ml 离心管中。
- 8) 加入等体积的氯仿,轻轻混匀,于 4000rpm,4 下离心 10min,取上清液并转至新的 1.5ml 离心管中。
- 9) 加入 0.1 × 3M NaAc (pH5.2) 和 2 × 冰冻无水乙醇,充分混合均匀,于-20 静置片刻 (约 15min),勾出 DNA,风干并加入适量 1 × TE (pH8.0),使充分溶解,并于 4 备用。
- 10) 用紫外分光光度仪BECKMAN DU640 测量DNA的浓度和相对纯度,用OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>比值 (在 1.8 ~ 2.0 范围内为较好);并用 0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA的质量 (Talekar,1988)。
- 11) 调整所有样品 DNA 的量至 150ng/ $\mu$ l 左右,备用。

#### 2.2.2.2 主效抗虫基因AFLP标记筛选

参照Zabeau等 (1995) 和张辉等 (1997) 的AFLP的试验程序并稍作调整。AFLP体系中的限制性内切酶 (*Pst* 和 *Mse*) 和T4连接酶购自New England Biolabs (NEB) 公司, AFLP引物序列和PCR扩增所用接头由上海生物工程公司合成, Taq DNA聚合酶和dNTP购自Promega公司。

##### (1) 模板 DNA 的酶切

每个 DNA 样品酶切的混合液包括:

成分	用量
Components	Volume
DNA (200ng/ $\mu$ l)	1.25 $\mu$ l
限制性内切酶 <i>Mse</i>	3U
限制性内切酶 <i>Pst</i>	3U
Buffer	2 $\mu$ l
BSA	0.2 $\mu$ l

加ddH<sub>2</sub>O至 20 $\mu$ l, 37 酶切过夜。

##### (2) DNA 片段接头的连接

酶切完成的每个 DNA 样品, 加入 10 $\mu$ l 如下的反应液:

成分	用量
Components	Volume
<i>Mse</i> 接头 (50pm/μl)	1.0μl
<i>Pst</i> 接头 (50pm/μl)	1.0μl
ATP (10mM)	1.8μl
T <sub>4</sub> -DNA连接酶 (3U/μl)	0.5μl
Buffer	0.5μl
ddH <sub>2</sub> O	0.2μl

室温下连接 3h。

### (3) AFLP 的预扩增

取 5μl 连接完成的 DNA 样品，加入 15μl 如下反应混合液：

成分	用量
Components	Volume
<i>Mse</i> 引物 (M00, 50ng/μl)	0.6μl
<i>Pst</i> 引物 (P00, 50ng/μl)	0.6μl
10×PCR Buffer	2.0μl
Taq 酶 (5U/μl, Promega, AM)	0.1μl
dNTP (25mM)	0.2μl
ddH <sub>2</sub> O	14.5μl

说明：AFLP 分析所用引物及接头序列参见 Keygene 公司网站 (<http://www.keygene.com>)，AFLP 引物及接头的合成在上海生工生物工程技术有限公司完成。

混合后，按如下程序完成 PCR 扩增：

步骤 1	94	5min	} 30 个循环
步骤 2	94	30sec	
步骤 3	56	30sec	
步骤 4	72	1 min	
步骤 5	72	5min	
步骤 6	4	保存	

扩增在 Biometra 热循环仪上进行，反应结束后，将预扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测扩增效果。预扩增产物稀释 5 倍，备用。

#### (4) AFLP 的选择性扩增

取 5 $\mu$ l 稀释的预扩增混合液，加入 15 $\mu$ l 如下混合液：

成分	用量
Components	Volume
<i>Mse</i> 引物 (M <sub>00</sub> , 50ng/ $\mu$ l)	0.6 $\mu$ l
<i>Pst</i> 引物 (P <sub>00</sub> , 50ng/ $\mu$ l)	0.6 $\mu$ l
dNTP (25mM)	0.18 $\mu$ l
Taq DNA 聚合酶 (5U/ $\mu$ l)	0.18 $\mu$ l
10 $\times$ PCR Buffer	2.0 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	11.1 $\mu$ l

混合后，在如下 PCR 条件下扩增：

步骤 1	94	2min	
步骤 2	94	30sec	} 11 个循环 (-0.7 / Cycle)
步骤 3	65	30sec	
步骤 4	72	1 min	
步骤 5	94	30sec	
步骤 6	50	30sec	
步骤 7	72	1 min	
步骤 8	72	5 min	
步骤 9	4	保存	

选择性扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。扩增后的样品加入 5 ~ 8 $\mu$ l 上样缓冲液，充分混合，95 $^{\circ}$ C 变性 10min 后，立刻转移到冰浴中冷却，备用。以上扩增所采用引物组合为在 M<sub>00</sub> 和 P<sub>00</sub> 基础上在 3' 端添加 3 个选择性碱基的引物组合。

#### (5) 聚丙烯酰胺凝胶的制备

- 1) 用清洁球蘸上洗涤剂清洗玻璃板，重复 3 次。然后用无水乙醇擦干净，通风橱自然晾干。耳板用 2% 的剥离硅烷均匀涂抹，平板用 0.5% 的 Binding Silance 涂抹均匀，以上操作最好在通风橱进行，晾干。
- 2) 待两块玻璃板彻底干燥后，装好梳子和压条，并用铁夹将玻璃板夹紧。
- 3) 将事先配制好的 6% 的丙烯酰胺胶倒入胶瓶，加入 120 $\mu$ l 浓度为 10% 的过硫酸铵和 60 $\mu$ l 的 TEMED，混匀后开始灌胶，待胶到达玻璃板底部时，停止灌胶，插入梳子，用铁夹夹紧。以上操作动作要快，同时又要防止气泡儿产生。大约 1.5h 后丙烯酰胺

胶聚合完全。

#### (6) 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE):

将做好的凝胶固定在电泳槽中,在正、负极分别加入 1×TBE 电泳缓冲液。80W 恒功率预电泳 30min 后,加入变性的 DNA 扩增产物,电泳 2.5h。

#### (7) 银染程序

- 1) 脱色:在大小适中的固定盒中加入 1L 10% (900ml 蒸馏水,100ml 冰醋酸)的冰醋酸溶液,放入胶板,将固定盒放于摇床上,匀速轻摇直至指示剂的兰色带纹消失,时间约 30min。
- 2) 水洗:在水洗盒中加入 1L 蒸馏水,将水洗盒放于摇床上,匀速轻摇 5min,重复一次。
- 3) 银染:水洗后的胶板放入事先配制好的银染液(1g AgNO<sub>3</sub>,1L蒸馏水,1.5ml 37% 甲醛)中,将银染盒放于摇床上,匀速轻摇,银染 15min。
- 4) 水洗:胶板用新鲜的蒸馏水在水洗盒中来回冲洗 10 sec。
- 5) 显影:将胶板转移至事先配制好的冷的显影液(30g无水NaCO<sub>3</sub>,1.5ml 37% 甲醛,200μl硫代硫酸钠)中,均匀快速的摇晃,直至条带清晰可见为止。
- 6) 定影:用 10%的冰醋酸固定液终止反应,约 5min 后取出胶板,转移至水洗盒中再水洗 5min 后取出胶板自然晾干。
- 7) 晾干后的胶板置于灯箱上进行拍照。

#### 2.2.3 多态性DNA片段的回收、纯化和序列测定

用干净的刀片,将在抗感材料间表现多态的条带从聚丙烯酰胺凝胶上割下,放入 0.2ml 的干净离心管中,加入 50ul 超纯水于 4℃ 过夜,然后将离心管置于 90℃ 水浴中,30min 后取出,5000rpm 离心 2min,小心吸取上清于另一新离心管中,作为模板备用,吸取 15ul 模板 DNA 加入到 45μl 如下反应体系中。

成分	用量
Components	Volume
<i>Mse</i> 引物 (50ng/μl)	2.4μl
<i>Pst</i> 引物 (50ng/μl)	2.4μl
dNTP (25mM)	0.54μl
Taq DNA 聚合酶 (5U/μl)	0.54μl
10×PCR Buffer	6.0μl
ddH <sub>2</sub> O	33.12μl

其中,*Pst* 引物和 *Mse* 引物为回收片段的 AFLP 特定引物,PCR 循环参数同于 AFLP 选择性扩增参数。PCR 反应结束后,取 10μl 二次 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,如果扩增产物除了含有目的条带以外,还含有一些其它的非特异扩增条带,则应该进行进一步的纯化,以保

证试验的准确性。将扩增效果好无杂带的 PCR 产物 50 $\mu$ l 连同其相应特异引物组合一并送测序公司进行测序。

#### 2.2.4 同源序列的生物信息学比较

对测序得到的核苷酸序列进行生物信息学比较, 将序列提交NCBI互联网的BLASTN命令下, 进行序列同源性比较。

### 3 结果与分析

#### 3.1 绿豆抗豆象鉴定

5 份供试绿豆材料的抗性表现差异十分显著 (表 2-5)。轮回亲本中绿 1 号的种子被害率>90% ,表现为高感(HS);而抗性亲本 TC1966 及三个高代材料种子被害率<10% ,表现为高抗(HR)。抗虫鉴定结果表明, 经过连续多个世代的回交及人工选择, TC1966 中的抗虫基因已经转移到高代品系中, 并且该基因能够稳定遗传 (程须珍, 私人通讯)。

表 2-5 份供试绿豆材料的抗性鉴定结果

Table 2-5 Resistance identification results of 5 mungbean materials

试验材料	种子被害率 (%)	抗性评价
TC1966	0	免疫 (Immune)
中绿 1 号	> 90	高感 (High Susceptible)
VC6089-10	0	免疫 (Immune)
VC6089 (22-4) -2	0	免疫 (Immune)
VC6089-4	0	免疫 (Immune)

#### 3.2 AFLP 标记多态性分析

抗豆象野生绿豆资源 TC1966、感虫绿豆栽培品种中绿一号以及三个高抗豆象的近等基因系材料 VC6089-10、VC6089(22-4)-2 和 VC6089-4 为研究对象, 对 830 对 AFLP 通用引物组合进行多态性分析, 记录在抗感材料间有差异带扩增的引物组合作为候选标记, 最终确定了约 100 对能够扩增出差异条带的 AFLP 引物组合。

##### 3.2.1 用于 AFLP 分析的绿豆基因组 DNA 检测

在 AFLP 分子标记技术体系中, 基因组 DNA 的质量是关系 PCR 以及标记准确性的技术关键, 所以本实验首先对所提绿豆基因组 DNA 进行了质量检测, 为后续的实验操作奠定坚实的基础。将绿豆基因组 DNA 进行适当稀释, 对照标准的  $\lambda$ DNA 分子量, 进行浓度为 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳, 根据分子量标准估算稀释后的 DNA 样品浓度, 约为 150ng/ $\mu$ l (图 5-1)。从图中可以看出,

抗虫、感虫亲本以及抗虫的进等基因系基因组 DNA 条带完整，表明没有明显的降解。

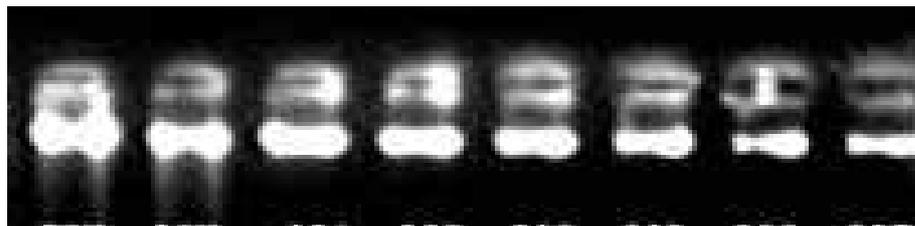


图 1 用于 AFLP 分析的绿豆基因组 DNA 的浓度稀释

Fig.1 Dilution of mungbean genome DNA used for AFLP analysis

### 3.2.2 抗豆象基因 AFLP 标记分析

AFLP 分子标记技术操作比较复杂，实验流程由几部分组成，包括基因组 DNA 的酶切与连接、酶切连接产物的预扩增以及选择性扩增等。为了保证实验流程的顺利进行以及实验结果的准确性，本试验对上述几步实验结果均进行了检测，然后进行下一步操作。

#### 3.2.2.1 AFLP 酶切和连接

将五个绿豆材料的基因组 DNA 均调整到  $150\text{ng}/\mu\text{l}$ ，以 5U 的 *Mse* 和 5U 的 *Pst* 于 37 环境下分别酶切 2~3h。然后向反应体系中添加 *Mse* 接头和 *Pst* 接头，16 环境下连接过夜。取  $4\mu\text{l}$  酶切 - 连接产物，用浓度为 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测酶切 - 连接结果。从图 (5-2) 可以看出，整个基因组经酶切后整个泳道呈比较均匀的弥散状，说明绿豆基因组 DNA 已经被两种限制性内切酶充分酶切。绿豆基因组的充分酶切为 *Mse* 接头和 *Pst* 接头与酶切片段的充分连接提供了保证。

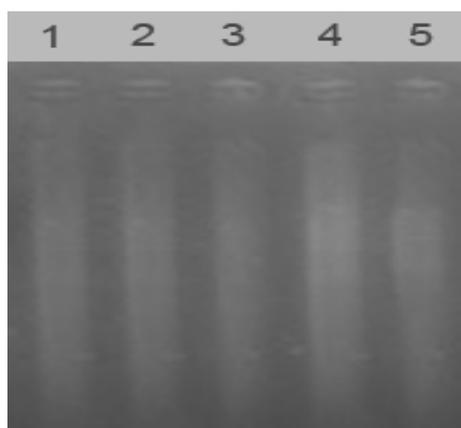


图 2 AFLP 酶切连接产物检测

Fig. 2 Check result of digest-ligated products for AFLP

#### 3.2.2.2 AFLP 预扩增

将绿豆基因组 DNA 酶切连接产物稀释 5 倍后，作为模板进行预扩增，PCR 结束后，取  $6\mu\text{l}$

预扩产物与  $1\mu\text{l}$  的上样缓冲液混合，在浓度为 1.2% 的琼脂糖上 120 V 电压电泳 1h，紫外灯下检测预扩增产物。如图 5 - 3 所示，整个泳道呈现 100 ~ 1000bp 的弥散。

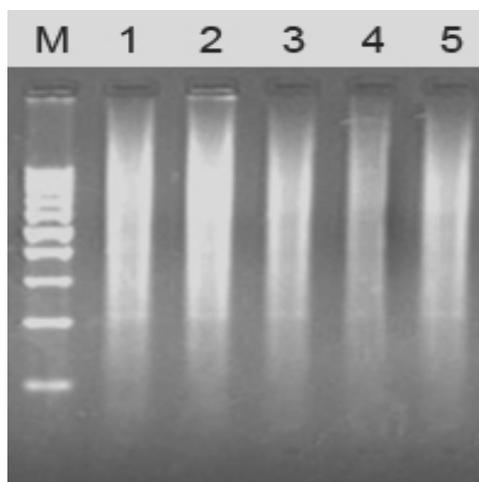


图 3 AFLP 预扩增产物检测

Fig.3 Check result of pre-amplified products for AFLP

### 3.2.2.3 AFLP 选择性扩增

将预扩增产物稀释 10 倍后，作为模板进行选择性扩增，PCR 结束后，取  $6\mu\text{l}$  选择性扩增产物与  $1\mu\text{l}$  的上样缓冲液混合，在浓度为 1.2% 的琼脂糖上 120V 电压下电泳 1h，紫外灯下检测预扩增产物。如图 5-4 所示，整个泳道呈现 100 ~ 800bp 的弥散，且有明显的 DNA 扩增条带。

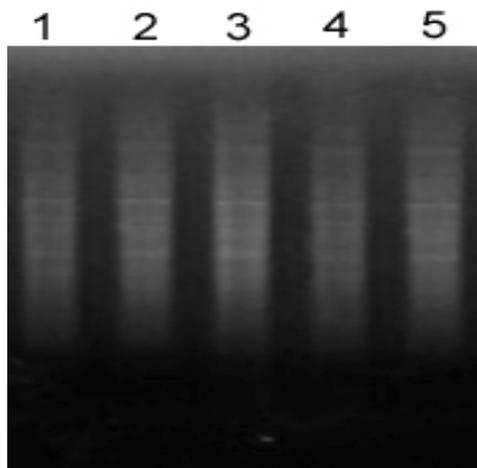


图 4 选择性扩增产物检测

Fig.4 Check result of selected amplified products

### 3.2.2.4 AFLP 多态性分析

绿豆基因组较小（约 470 Mb）。最初选择具有两个选择性碱基的 AFLP 引物组合，但由于扩增条带太多，不便于分析，后改用三个选择性碱基的 AFLP 引物组合。本试验共筛选 AFLP 引物组合 830 对（图 5-5），对抗虫亲本、感虫亲本以及抗虫进等基因系材料进行分子标记分析，最终

筛选出了在抗、感材料间表现出差异的 AFLP 引物组合 (表 5 - 3)。筛选出的多态性 AFLP 条带呈显性或共显性 (图 5 - 6 ; 图 5 - 7), 它们或者只出现在抗性材料或感性材料中 ; 或者在抗性材料和感性材料均出现 , 而分子量有差异。部分引物多态性分析结果如图 4-6 所示。

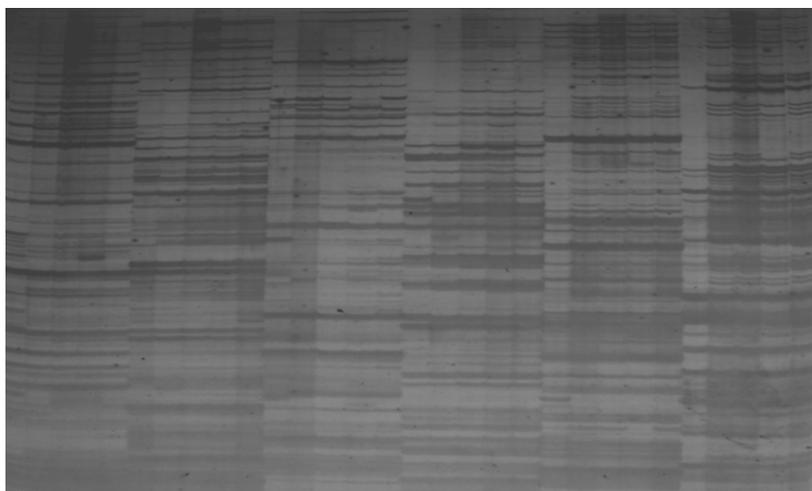


图 5 AFLP 引物组合筛选

Fig.5 AFLP primer screening

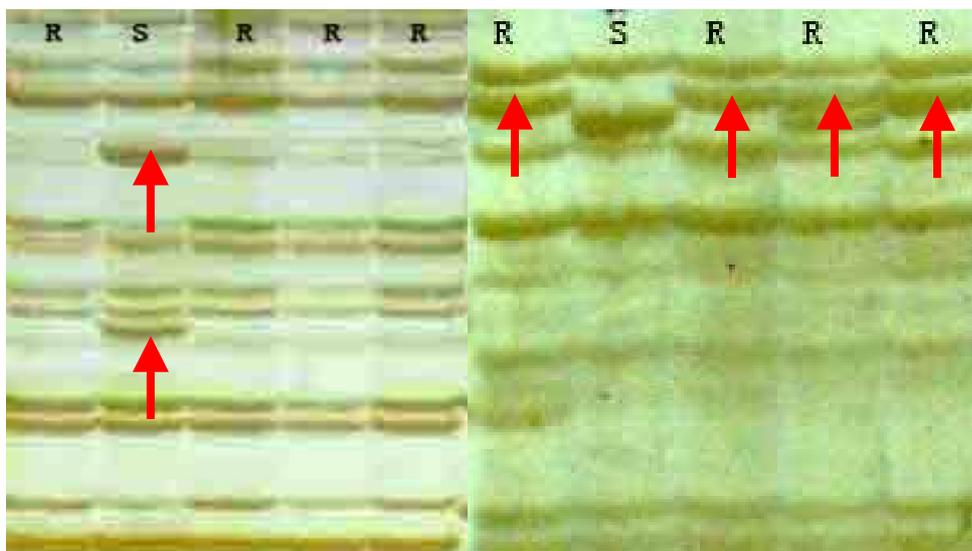


图 6 感性材料特征带型

Fig.6 Characterized bands of susceptible varieties

图 7 抗性材料特征带型

Fig.7 Characterized bands of resistant varieties

表 3 与抗性相关的多态性 AFLP 引物组合

Table 3 Polymorphic AFLP combinations related to bruchid resistance

引物组合 AFLP combinations	多态性条带数 Polymorphic bands	多态性位点数 Numbers of polymorphic loci	引物组合 AFLP combinations	多态性条带数 Polymorphic bands	多态性位点数 Numbers of polymorphic loci
M11-P79	4	1	M83-P51	5	2
M48-P23	1	1	M65-P26	1	1

引物组合 AFLP combinations	多态性条带数 Polymorphic bands	多态性位点数 Numbers of polymorphic loci	引物组合 AFLP combinations	多态性条带数 Polymorphic bands	多态性位点数 Numbers of polymorphic loci
M51-P23	5	2	M88-P46	5	2
M52-P23	4	1	M90-P46	20	5
M55-P23	4	1	M82-P44	1	1
M56-P24	3	3	M83-P45	4	1
M53-P24	3	3	M86-P51	40	10
M55-P24	2	2	M87-P51	9	3
M56-P24	3	3	M87-P56	4	1
M60-P24	2	2	M47-P24	4	1
M54-P26	2	2	M86-P44	1	1
M59-P25	4	1	M82-P53	4	1
M64-P25	8	2	M86-P49	6	3
M49-P25	4	1	M87-P49	18	9
M50-P25	4	1	M88-P49	8	2
M52-P25	4	1	M89-P49	10	4
M82-P42	4	1	M91-P49	4	1
M87-P42	8	2	M81-P49	5	2
M88-P65	1	1	M82-P49	12	3
M85-P61	1	1	M83-P49	8	2
M83-P57	8	2	M84-P49	8	2
M85-P61	1	1	M85-P49	13	4
M81-P50	12	4	M80-P48	5	2
M82-P50	18	9	M81-P48	9	3
M83-P50	11	5	M84-P48	8	2
M88-P58	4	1	M87-P42	8	2
M80-P54	4	1	M88-P54	4	1
M81-P54	1	1	M54-P25	4	1
M86-P50	19	5	M55-P25	1	1
M87-P50	21	6	M84-P45	1	1
M89-P50	9	3	M89-P45	4	1
M90-P50	1	1	M88-P57	1	1
M86-P54	4	1	M90-P56	5	2
M86-P51	28	7	M48-P24	4	1
M87-P51	9	3	M53-P24	2	2
M80-P51	1	1	M54-P24	4	1
M81-P51	4	1	M58-P26	2	2
M82-P51	4	1	M83-P45	4	1
M86-P72	4	1	M81-P67	4	1
M87-P72	4	1	M85-P67	8	2
M90-P72	1	1	M81-P84	20	5
M72-P71	1	1	M84-P84	8	2
M86-P71	8	2	M88-P75	1	1
M88-P71	8	2	M86-P78	5	2
M91-P71	4	1	M87-P78	2	2
M80-P72	25	8	M88-P78	3	3
M88-P65	1	1	M82-P80	1	1

引物组合 AFLP combinations	多态性条带数 Polymorphic bands	多态性位点数 Numbers of polymorphic loci	引物组合 AFLP combinations	多态性条带数 Polymorphic bands	多态性位点数 Numbers of polymorphic loci
M89-P65	4	1	M85-P80	1	1
M77-P68	4	1	M82-P73	4	1

### 3.3 AFLP 多态性 DNA 片段的回收

本试验总共得到了能够在抗感材料间表现差异的DNA条带170余条,为了将AFLP标记转化成更加简便的SCAR标记,本试验将筛选到的多态性DNA条带直接从聚丙烯酰胺凝胶上挖胶回收,经过溶胶纯化后,以相应的选择性引物进行第二次PCR扩增,经过琼脂糖凝胶电泳检测(图5-8),将PCR效果好的条带测序,并计划利用Premier Primer 5.0软件设计序列特异性的引物,通过进一步分子标记的筛选而得到SCAR标记。

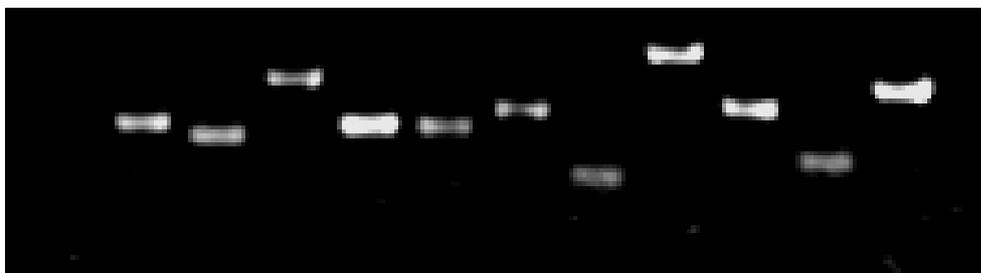


图8 二次扩增产物电泳琼脂糖电泳

Fig.8 Agrose gel of reamplified products

### 3.4 AFLP 多态性 DNA 片段的序列测定

由于多数回收差异片段的二次 PCR 效果并不理想,所以只有其中一部分能够得到测序结果, AFLP 引物组合 M87-P51 扩增的差异片段的测序结果如下所示:

```
AGCACAAACCTTGACGTTGAGAGAATAGAGGACGATTTCCCGATTGTGGTAACGTTTAGGTGCAAGATTGTGAGACGCATGC
CATGCAAACCTAGATACTATTTTCAAGAGCTGCTTTGGTCGTTTCTTGGATCTTATTTTGAATTTGCATGGCTCTCTACCATT
GTCACCTTCTATGTCAGCAATGCCAGACTGAACCTCGCCCTTTTGGTCGCTCATGGCTGCATGTACGCAGCTCAA
```

## 4 讨论

### 4.1 绿豆抗豆象基因 AFLP 分子标记初步研究

本实验共筛选AFLP引物约830对,扩增出64265条AFLP条带,平均每个AFLP引物组合能扩增出77.4条扩增带。其中,在抗、感材料间表现多态的引物组合约100对,多态性条带176个,多态性AFLP引物组合的比率为12%,与抗感相关的多态性AFLP条带占总AFLP条带的比率为2.37%,

较低。分析原因,主要有以下几点:(1)所选用的内切酶组合限制位点的分布不在目的基因位点附近;(2)检测的引物数量有限未能涵盖整个基因组;(3)所选材料本身的原因,比如所选用抗感亲本间遗传差异不大致使多态率不高等。

AFLP技术存在操作步骤复杂、基因组DNA用量较大、检测费用高等因素,不便于直接用于抗性基因的分子检测,转化SCAR标记能够使其更加方便的在育种中进行标记辅助选择。SCAR标记仅对基因组DNA的特定位点进行检测,是一种稳定可靠且便于应用的分子标记。本文将在抗感材料间表现差异的DNA条带从聚丙烯酰胺凝胶上回收,并用相对应的选择性引物进行了二次PCR,但是结果只有50%的差异片段能够得到二次扩增带。分析原因可能与引物本身序列组成有关系,或者是AFLP扩增带更适用于先克隆后测序,因为二次PCR后,PCR产物中残留有更多的引物二聚体,不易纯化去除,以致严重影响了测序效果(王虎等,2004)。将测序结果在NCBI上进行同源序列比对,没有在数据库中发现具有高度同源的大片段已知序列,此结果可能预示着新基因的发现,同时也表明人们对绿豆基因组研究的重视程度目前还不够,相关研究相对滞后。

## 4.2 关于绿豆分子生物学研究

绿豆因其基因组小,生长周期短,相对于基因组庞大的农作物(如小麦)而言,更适合于开展重要农艺性状相关基因的遗传分析、基因定位等领域的分子生物学研究。抗虫性作为农作物育种工作中的一项重要指标,一直备受育种家的关注。但是,绿豆作为一种重要的经济类作物,在该领域的研究却没能引起人们足够的重视,有关绿豆基因组学研究的报道十分稀少,针对绿豆中抗豆象基因开展分子生物学研究的报道更是少之又少。迄今,仅见Young et al(1992)利用RFLP分子标记技术构建了一张抗豆象基因的连锁图,从而为利用分子标记技术进行抗豆象基因的定位、遗传连锁图构建以及基因克隆从而研究抗虫基因的抗性机理奠定了一定的基础。但是,鉴于全球范围内开展的农作物抗病、虫基因资源的知识产权纠纷问题频发,如果我国在相关领域落后,势必会影响对应的抗虫基因在绿豆育种中的应用。为此,有必要开发具有自主知识产权的绿豆抗虫相关基因连锁的分子标记,并以此为工具进行绿豆育种中的辅助选择及抗豆象基因的克隆。目前,绿豆的全基因组的分子遗传连锁图谱尚未构建,绿豆中一些重要农艺性状相关基因还有待于通过分子标记技术手段进行挖掘;同时,通过比较基因组学的研究方法,与其它相近的豆科植物共享,将有利于其它豆科植物抗病、虫基因的分子标记及基因克隆等研究的开展,从而加快绿豆功能基因组学研究。本试验因适合作图的分离群体还尚未构建完成,所以只对亲本及近等基因系进行了AFLP分子标记的初步筛选,所得到的多态性特异条带与抗豆象基因是否连锁以及连锁距离的大小尚需通过分离群体进行验证和计算。目前,部分多态性特异片段已经回收,这为今后的测序及标记转化工作奠定了基础,从而使之能够真正服务于绿豆抗虫育种。

## 本试验所用 AFLP 引物列表

<i>Pst</i> 引物		<i>Mse</i> 引物			
<i>Pst</i> primers		<i>Mse</i> primers			
P23	5'-GACTGCGTACATGCAG	AG-3'	M11	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	AA-3'
P24	5'-GACTGCGTACATGCAG	AT-3'	M47	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	CAA-3'
P25	5'-GACTGCGTACATGCAG	CA-3'	M48	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	CAC-3'
P26	5'-GACTGCGTACATGCAG	CC-3'	M49	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	CAG-3'
P31	5'-GACTGCGTACATGCAG	AAA-3'	M50	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	CAT-3'
P32	5'-GACTGCGTACATGCAG	AAC-3'	M51	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	CCA-3'
P33	5'-GACTGCGTACATGCAG	AAG-3'	M52	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	CCC-3'
P34	5'-GACTGCGTACATGCAG	AAT-3'	M53	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	CCG-3'
P37	5'-GACTGCGTACATGCAG	ACG-3'	M54	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	CCT-3'
P39	5'-GACTGCGTACATGCAG	AGA-3'	M55	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	CGA-3'
P40	5'-GACTGCGTACATGCAG	AGC-3'	M56	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	CGC-3'
P41	5'-GACTGCGTACATGCAG	AGG-3'	M57	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	CGG-3'
P42	5'-GACTGCGTACATGCAG	AGT-3'	M58	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	CGT-3'
P43	5'-GACTGCGTACATGCAG	ATA-3'	M59	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	CTA-3'
P44	5'-GACTGCGTACATGCAG	ATC-3'	M60	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	CTC-3'
P45	5'-GACTGCGTACATGCAG	ATG-3'	M61	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	CTA-3'
P46	5'-GACTGCGTACATGCAG	ATT-3'	M62	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	CTT-3'
P47	5'-GACTGCGTACATGCAG	CAA-3'	M63	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	GAA-3'
P48	5'-GACTGCGTACATGCAG	CAC-3'	M64	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	GAC-3'
P54	5'-GACTGCGTACATGCAG	CCT-3'	M65	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	GAG-3'
P55	5'-GACTGCGTACATGCAG	CGA-3'	M66	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	GAT-3'
P56	5'-GACTGCGTACATGCAG	CGC-3'	M69	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	GCG-3'
P57	5'-GACTGCGTACATGCAG	CGG-3'	M70	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	GCT-3'
P58	5'-GACTGCGTACATGCAG	CGT-3'	M71	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	GGA-3'
P59	5'-GACTGCGTACATGCAG	CTA-3'	M72	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	GGC-3'
P60	5'-GACTGCGTACATGCAG	CTC-3'	M76	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	GTC-3'
P61	5'-GACTGCGTACATGCAG	CTG-3'	M77	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	GTG-3'
P62	5'-GACTGCGTACATGCAG	CTT-3'	M79	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	TAA-3'
P63	5'-GACTGCGTACATGCAG	GAA-3'	M80	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	TAC-3'
P64	5'-GACTGCGTACATGCAG	GAC-3'	M81	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	TAG-3'
P65	5'-GACTGCGTACATGCAG	GAG-3'	M82	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	TAT-3'
P66	5'-GACTGCGTACATGCAG	GAT-3'	M83	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	TCA-3'
P67	5'-GACTGCGTACATGCAG	GCA-3'	M84	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	TCC-3'
P68	5'-GACTGCGTACATGCAG	GCC-3'	M85	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	TCG-3'
P69	5'-GACTGCGTACATGCAG	GCG-3'	M86	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	TCT-3'
P70	5'-GACTGCGTACATGCAG	GCT-3'	M87	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	TGA-3'
P71	5'-GACTGCGTACATGCAG	GGA-3'	M88	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	TGC-3'
P72	5'-GACTGCGTACATGCAG	GGC-3'	M89	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	TGG-3'
P73	5'-GACTGCGTACATGCAG	GGG-3'	M90	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	TGT-3'
P74	5'-GACTGCGTACATGCAG	GGT-3'	M91	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	TTA-3'
P75	5'-GACTGCGTACATGCAG	GTA-3'	M92	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	TTC-3'
P76	5'-GACTGCGTACATGCAG	GTC-3'	M93	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	TTG-3'
P77	5'-GACTGCGTACATGCAG	GTG-3'	M94	5'-GATGAGTCCTGAGTAA	TTT-3'
P78	5'-GACTGCGTACATGCAG	GTT-3'			

---

P79	5'-GACTGCGTACATGCAG	TAA-3'
P80	5'-GACTGCGTACATGCAG	TAC-3'
P81	5'-GACTGCGTACATGCAG	TAG-3'
P82	5'-GACTGCGTACATGCAG	TAT-3'
P83	5'-GACTGCGTACATGCAG	TCA-3'
P84	5'-GACTGCGTACATGCAG	TCC-3'

---

## 致谢

首先，感谢我尊敬的导师张辉研究员。本论文是在导师的悉心指导下完成的，导师严谨的治学态度，开拓创新的思维方式，忘我的工作作风和对科学孜孜不倦的敬业精神以及宽厚待人的品格，将使学生受益终身。论文的选题、设计、实施到论文的撰写和修改都是在导师的悉心指导下完成的。恩师不仅在学业上及时给予学生关心和指导，而且对学生的生活也给予了巨大的关心和支持，学生的每一点进步都凝聚着恩师的心血。恩师对学生的关怀和教诲，我终生难忘。在此谨向恩师表示衷心的感谢和崇高的敬意！

本实验室的胡正老师对我在试验技术等方面给予了指导和帮助，在科研上他活跃的思维方式和严谨的科研态度不断地启发着我，在此表示感谢！

感谢李立会研究员和马有志研究员对本试验的关心和指导。感谢付永福研究员和黎裕研究员为本试验提供了部分试验材料；感谢韩天富研究员在试验技术方面给予的指导。在此，向以上诸位老师表示感谢。

论文的顺利完成得益于本实验室完备的试验条件和融洽的学术氛围，更离不开实验室各位同仁的支持与帮助。真诚感谢王果硕士、刘权硕士、盖如玉硕士、孙薇硕士、王艳艳硕士、陈学娟硕士以及技术员张宝缺、冯历、孙淑英阿姨在我试验过程中给予的大力支持。

此外，真诚感谢我的同学张兰博士、肖建会博士、宛淑艳博士、宋时奎博士、吴迪博士、赵光耀博士、李孟军博士、吴蓓蕾博士、代玉华博士、李会勇博士、于永涛博士、刘越博士对本试验给予的热心的指导和建议。

感谢中国农科院研究生院和作物科学研究所的各位领导和老师对我的帮助和培养。

最后，特别感谢我的爱人李勇博士，他乐观向上的人生态度和认真求实的工作作风一直激励着我，使我能够以一种比较平和的心态顺利完成我的博士学位论文。另外，郑重感谢多年来一直关心和爱护我的双方父母、妹妹，感谢他们对我学业的支持和精神上的鼓励，谨以此文献给他们，祝他们一生平安！

三年的求学时光匆匆而过，期间我付出了辛勤的汗水，同时也用自己宝贵的青春岁月，换来了丰富的知识和宝贵的人生阅历。三年的时光在我的人生长河中是短暂的，但对于我而言却是及其重要的，它不但磨练了我的坚强的毅志，同时也培养了我对待科研的严谨、认真的工作作风。我将永远铭记这段日子，并以之激励我在今后的工作中更加不懈的努力、拼搏。在此，也感谢陪伴我走过这段岁月的所有良师益友！

马丽萍

二零零六年八月

## 作者简介

**姓名：**马丽萍

**性别：**女

**民族：**汉

**出生年月：**1976年9月16日

**籍贯：**河北省保定市

**教育背景：**

2003.9~2006.8, 中国农业科学院作物科学研究所

研究方向：植物抗逆分子生物学

论文题目：基于水稻抗逆cDNA的大豆种质创新体系初探

2000.9~2003.6, 河北农业大学农学院

研究方向：作物品种改良

论文题目：菜用大豆主要生化物质积累特性及AFLP指纹分析

1995.9~1999.6, 河北农业大学农学院生物技术专业

**主要论文发表：**

- **马丽萍**, 胡正, 张保缺, 张辉. 一种快速、高效的大豆农杆菌转化技术. 中国农业科学, 2006 (已接收)
- **马丽萍**, 张辉. 野生绿豆种质资源TC1966抗豆象基因的AFLP标记研究. 西南农业学报, 2005, 5: 629~633
- **马丽萍**, 张彩英, 张丽娟, 马峙英. 预选菜用大豆主要生化物质积累特性初步研究. 植物遗传资源学报, 2004, 5(3): 262~267
- **马丽萍**, 张彩英, 张丽娟. [菜用大豆的研究进展](#). 河北农业科学, 2001, 3: 53~57
- 谢令琴, **马丽萍**, 等. 不同熟期小麦品种收获指数(HI)的遗传研究. 河北农业大学学报, 1999, 4: 15~18