

杂交转育植酸酶 *phyA* 大豆阳性材料筛选研究

李喜焕¹, 刘 渊¹, 闫瑞叶¹, 孔佑宾¹, 李桂兰², 常文锁¹, 张彩英¹

(¹教育部华北作物种质资源研究与利用重点实验室/河北农业大学, 保定 071001; ²河北科技师范学院, 昌黎 066000)

摘要:植酸及其盐类占土壤非有效态磷 30% ~ 40%, 利用转基因技术结合常规育种手段培育能够分解利用植酸磷的作物新品种是解决这一问题的最新途径。本研究以农杆菌转化子叶节所获得的 JL35-*phyA* 为试材, 采用 PCR 与 RT-PCR 进行目的基因检测, 获得转基因阳性材料; 随后将这些阳性材料与 38 个常规大豆杂交, 实现 *phyA* 向不同大豆品种的转育。结果表明, 利用农杆菌转化技术已将 *phyA* 转入吉林 35, 且基因在大豆根系能够正常转录表达, 转基因株系的单株荚数、粒数、粒重及百粒重显著高于野生型, 蛋白质和脂肪含量与野生型差异不显著; 利用这些转基因株系, 通过杂交转育获得 F₁ 阳性单株 427 个, 涉及上述 38 个不同组合, 说明目标基因 *phyA* 已转移到杂交后代; 将 F₁ 阳性单株自交后筛选得到部分组合的阳性 F₂ 植株及 F₃ 子粒, 经农艺性状考察, 这些后代材料中存在丰富的遗传变异, 并在杂交后代中选育出一些转有目标基因的优良株系, 为今后培育转 *phyA* 大豆新品种(系)提供了一批重要的遗传资源。

关键词:植酸酶基因; 农杆菌转化; 大豆; 杂交转育; 遗传资源

Introducing Phytase Gene *phyA* into Different Soybean Varieties from Transgenic Line Utilizing Sexual Hybridization

LI Xi-huan¹, LIU Yuan¹, YAN Rui-ye¹, KONG You-bin¹, LI Gui-lan², CHANG Wen-suo¹, ZHANG Cai-ying¹

(¹ North China Key Laboratory of Crop Germplasm Resources, Educationministry of China,

Agriculture University of Hebei, Baoding 071001; ² Hebei Normal University of Science & Technology, Changli 066600)

Abstract: Phosphorus (P) is one of the most important inorganic nutrients that can significantly affect plant growth and metabolism. However, 30 to 40 percent of the unavailable P in agricultural soils exists as phytate, which can not directly be absorbed by plant except for resolved by phytase. So selecting or developing new varieties that can resolve phytate-P through the modern transgenic breeding approach provided a new opportunity to improve the efficiency of phosphorus by plants. In this paper, a phytase gene (*phyA*), isolated from *Aspergillus ficuum*, was introduced into soybean by *Agrobacterium*-mediated transformation, and then thirty-eight soybean crosses had been made between transgenic lines (JL35-*phyA*, male parent) and other non-transgenic varieties (female parent). PCR and RT-PCR results showed that the *phyA* was successfully incorporated into soybean genome and expressed in transgenic line JL35-*phyA*. Furthermore, the pods, seeds, and weights per plant and weight 100 seeds of JL35-*phyA* were higher than wildtype JL35 significantly. The results also showed that 427 PCR positive transgenic F₁ plants from the thirty-eight cross combinations above and 377 PCR positive transgenic F₂ plants from the progenies of the cross combination JD17 × JL35-*phyA* were obtained by the sexual hybridization transfer method. Analysis results of these progenies showed that the variation of agronomic characters were abundant, and some excellent transgenic lines were selected. So it provides many important genetic resources to transgenic breeding of *phyA* in soybean.

Key words: phytase gene; *Agrobacterium*-mediated; Soybean; sexual hybridization transfer; genetic resources

收稿日期: 2012-02-14 修回日期: 2012-04-29 网络出版日期:

URL:

基金项目: 国家转基因重大专项资助项目 (2009ZX08004-004B); 国家自然科学基金项目 (31071441); 河北省自然科学基金项目 (C2010000749)

作者简介: 李喜焕, 博士, 副教授, 主要从事大豆分子生物学与转基因研究。E-mail: lixihuan@hebau.edu.cn

通信作者: 张彩英, 博士, 研究员, 从事大豆遗传育种与转基因研究。E-mail: zhangcaiyi@hebau.edu.cn

转基因技术可以突破物种界限,实现遗传物质在不同物种间的交流,因而越来越受到各国科学家和决策者的重视,各种转基因植物层出不穷^[1-2]。但随着转基因植物应用范围和进程的不断推进,人们也逐渐认识到由于转基因技术存在一定程度的受体基因型限制,因而仅仅依靠少数模式品种而得到的转基因材料,远远不能满足多种生态条件和地理环境等现有农业生产的迫切需求。因此,利用转基因技术结合常规育种手段,将已转入有利基因的受体材料与常规品种进行杂交,从而使有利基因能够在多种不同的遗传背景下高效表达,并最终获得类型丰富、范围更广的转基因材料,以适应现有农业生产的多种需求,就成为当前农作物转基因分子育种的重要发展趋势。

phyA 基因由于可以编码产生植酸酶,进而分解利用土壤中的有机态磷(尤其是植酸及其盐类)供植物生长发育所需,因而在改善植物分解,利用土壤有机态磷方面具有重要意义^[3-5]。有报道认为,转入黑曲霉植酸酶基因的拟南芥在仅含植酸磷的培养基上生长良好,且植株磷素营养状况也优于野生型对照^[6];转入植酸酶基因的马铃薯植株也表现出较对照明显增强的植酸盐利用能力^[7];转入黑曲霉 *phyA2* 的玉米在植酸为唯一磷源条件下能够分解利用基质中的植酸态磷^[8]。同时,Xiao 等^[9]将苜蓿中的植酸酶基因 *MtPHY1* 转入拟南芥,转基因植株在植酸磷条件下的生长状况明显优于对照,植株吸收有机态磷的情况也优于野生型;Ma 等^[10]将植酸酶基因 *MtPHY1* 转入白三叶草发现,*MtPHY1* 具有改善白三叶草吸收利用有机态磷的作用。Li 等^[11-12]克隆并转化了无花果曲霉中的植酸酶 *phyA*,与野生型相比,转基因大豆根系具有更高的植酸酶活性和无机磷含量;本课题组前期也曾将该基因转入大豆中,

经测定转基因植株根系植酸酶活性,发现基因能够在信号肽引导下分泌到植株根际周围,分解利用营养液中的植酸态磷^[13]。

目前,关于植酸酶基因转入不同植物种类及其品种的研究大多是基于转基因材料的自交后代来开展的,诸如基因在自交后代中的遗传方式、自交纯合材料的筛选获得等^[14-16]。然而,关于杂交转育植酸酶基因进而得到各种类型转基因新种质的研究则鲜见报道。本研究在前期工作基础上,采用农杆菌介导子叶节转化技术将植酸酶基因 *phyA* 转入大豆品种,获得转基因高代材料,随后以该转基因材料为父本,分别与 38 个不同来源的优良常规大豆品种进行有性杂交,以将植酸酶基因转入到多种类型大豆品种中,获得 *phyA* 超量表达转基因株系,为进一步培育植株根系植酸酶基因高效表达、根际土壤有机态磷高效利用的转基因大豆提供重要材料,也为今后利用转基因技术结合常规育种手段培育作物新品种提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试品种

以大豆品种吉林 35 为植酸酶 *phyA* 的转化受体;以 38 个常规大豆品种为杂交转育母本,待植株开花时,授以吉林 35-*phyA*(转有 *phyA* 的吉林 35,代号 JL35-*phyA*)的花粉,试验在专门用于转基因研究的网室进行。

1.2 转化载体

试验所用 *phyA* 转化载体为 pC-KSA(图 1),由河北科技师范学院李桂兰教授克隆并提供^[17]。载体中含有一个 KSA 嵌和基因,由植酸酶基因 *phyA*(无花果曲霉)、根特异表达启动子 Ppyk10(拟南芥)和信号肽 SP(胡萝卜)组成。

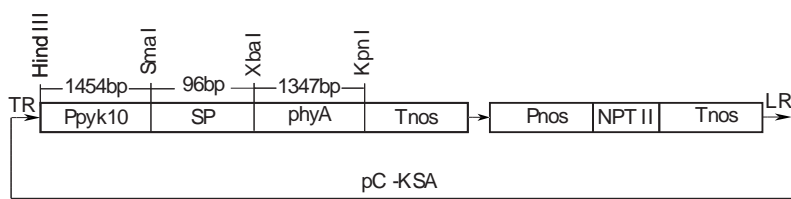


图 1 植酸酶基因 *phyA* 的 pC-KSA 表达载体
Fig. 1 Map of the plant expression vector pC-KSA

1.3 试验方法

1.3.1 农杆菌介导大豆子叶节遗传转化技术

挑取含有 pC-KSA 的农杆菌单菌落,接种于加有卡那霉素(Kan)、链霉素(Str)的 LB 液体培养基中,

28 ℃、180 r/min 振荡 48 h;随后吸取上述菌液加入无抗生素 LB 培养基中振荡 24 h,加入 100 μmol/L 乙酰丁香酮后进行大豆子叶节的侵染。侵染 30 min 后将子叶节接种在 MS 培养基上预培养 1 d,共培养 3 d。

将共培养后的子叶节接种在加有 60 mg/L 卡那霉素和 250 mg/L 头孢霉素 (Cef) 的 B₅ 培养基上 (加有 1.7 mg/L 的 6-BA) 诱导不定芽; 待不定芽长到 3 ~ 4 cm 时, 转入 1/2 MS 培养基中 (加有 1.6 mg/L 的 IBA) 诱导不定根。植株不定根长至 20 条左右、长 2 ~ 3 cm 时, 炼苗 3 ~ 5 d 后移栽。

1.3.2 转化大豆植株及其后代的 PCR 检测

采用 CTAB 法提取植株叶片 gDNA, 进行目的基因的 PCR 扩增和电泳检测。扩增所用引物分别为: phyA1: 5'-ATGTCTAGACTGGCAGTCCCCGCCTCGA-GA-3'; phyA2: 5'-CTAGGTACCCTAAGCAAAACAC TCCGCCCAATC-3'。PF1: 5'-TCAGGGGTATCAAT-GCTTCTCGG-3'; PR1: 5'-GCAAAGCTCAAACCCT-TCAC GAAG-3'; PF2: 5'-GGGCTTCCAGAGCACTAA-3'; PR2: 5'-ACCAAGACACGGACCAAA-3'。其中, phyA1 与 phyA2 的扩增片段长度为 1347 bp; PF1 与 PR1 的扩增片段长度为 1263 bp; PF2 与 PR2 的扩增片段长度为 753 bp。

1.3.3 转化大豆植株目的基因的 RT-PCR 检测

分别提取转 *phyA* 大豆及野生型植株的根系、茎秆、叶片、种子总 RNA, 经 DNase 消化后获得纯化的 RNA; 利用反转录试剂盒进行 RNA 反转录, 获得根系、茎秆、叶片、种子的 cDNA。采用内参引物 (AF1: 5'-GGTGATGGTGTGAGTCACACTGTACC-3'; AR1: 5'-GTGGACAATGGATGGGCCAGACTC-3') 进行反转录后 cDNA 的质量检测; 分别利用 phyA1 与 phyA2、PF1 与 PR1 两对引物进行目的基因转录水平的 RT-

PCR 检测, 并将检测后所获得的阳性克隆进行测序分析以进一步确认目的基因。

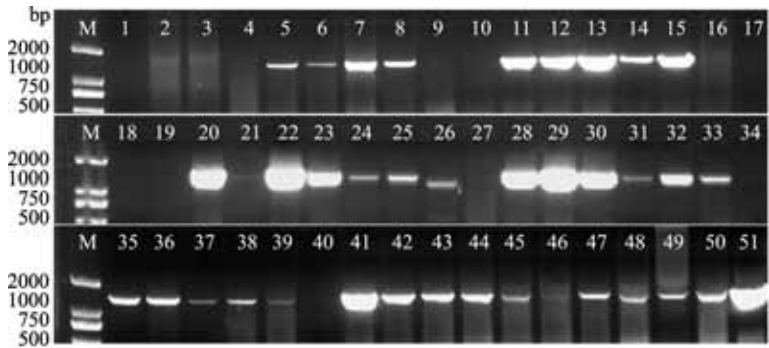
1.3.4 转基因材料与常规大豆品种的网室杂交及其后代检测

以 PCR 和 RT-PCR 鉴定为阳性的吉林 35-*phyA* 为父本, 38 个常规大豆品种为母本杂交获得不同杂交组合的 F₁; 将杂交 F₁ 种子播种, 出苗后进行 F₁ 植株的形态学真假杂交种鉴定和目的基因 PCR 检测, 以获得转入植酸酶 *phyA* 的 F₁ 单株个体。F₁ 阳性单株自交, 成熟后收取阳性植株及对照, 并测定其株高、分枝数、主茎节数、单株荚数、单株粒数、单株粒重、百粒重、蛋白质含量、脂肪含量等。收获后的 F₂ 种子出苗后进行目的基因的 PCR 检测, 获得转入 *phyA* 的 F₂ 阳性植株, 收获阳性植株的 F₃ 种子。

2 结果与分析

2.1 农杆菌介导子叶节转化大豆植株的 PCR 与 RT-PCR 检测

利用农杆菌介导大豆子叶节遗传转化方法, 将植酸酶 KSA 嵌和基因 (根特异启动子 P_{pyk10} + 信号肽 SP + 植酸酶 *phyA*) 转入吉林 35 中, 并对转化后的植株进行目的基因的 PCR 检测。将 PCR 呈现阳性的植株连续自交 3 ~ 4 代, 收获种子, 并对自交后代同样进行 *phyA* 的 PCR 检测。由检测结果可以看出 (图 2), 植酸酶基因 *phyA* 已整合至大豆品种吉林 35 的基因组中, 并可通过自交遗传给后代。



扩增所用引物为 phyA1 与 phyA2, 目的片段长度为 1347 bp。M: DL2000; 1: 空白对照; 2: 吉林 35; 3-50: 转化单株; 51: 质粒对照

The amplification primer is phyA1 and phyA2, the length of band is 1347 bp. M: DL2000, 1: Blank control, 2: JL35, 3-50: Transformation plants, 51: Plasmid control

图 2 吉林 35-*phyA* 单株目的基因的 PCR 检测结果

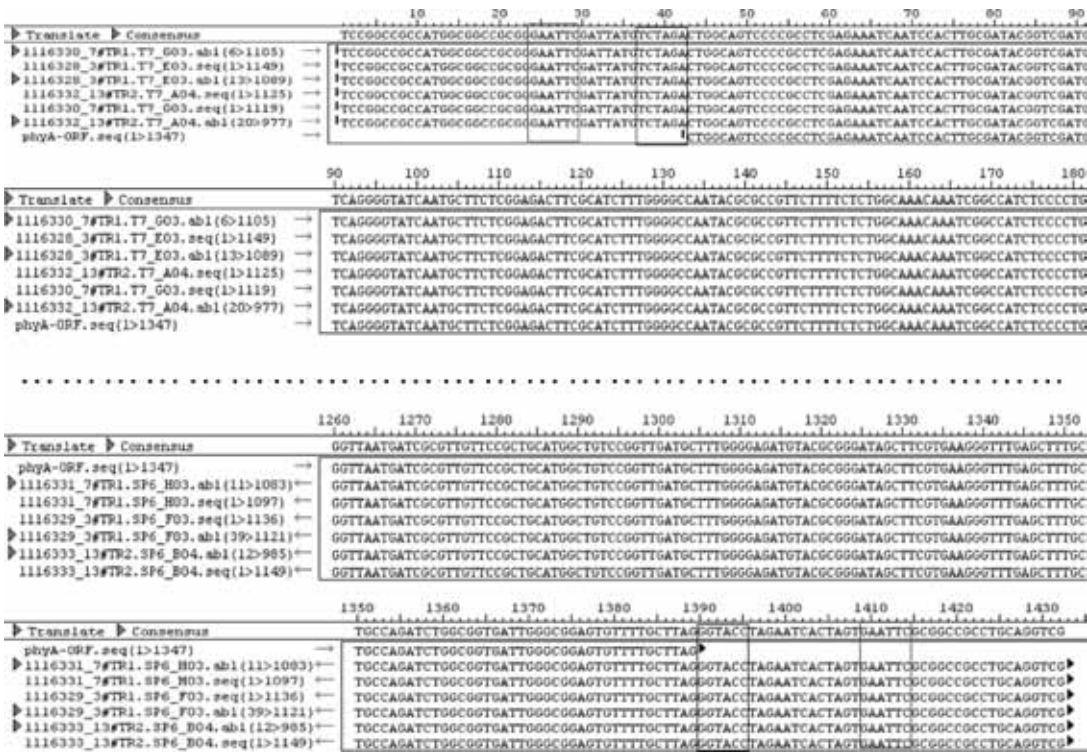
Fig. 2 PCR assay of transgenic soybean plants with *phyA*

同时, 为研究目的基因 *phyA* 是否能够在转基因大豆中正常表达, 提取转 *phyA* 大豆植株根系、茎秆、叶片、种子的总 RNA, 反转录为 cDNA 进行 RT-PCR

检测。结果发现, 在转基因大豆根系中扩增出 1 条 1.3 kb 的目的条带, 经回收测序分析证实该目的片段即为所转入的植酸酶 *phyA* (图 3), 说明所转入的

phyA 可以在转基因大豆的根系中进行正常转录(图4);而在转基因植株的茎秆、叶片、种子中则没有该基因的转录表达,在野生型对照的各个组织中也未发现该基因的转录表达。由此说明,所转入的植酸

酶基因 *phyA* 在根系特异启动子的驱动下,仅在转基因大豆的根系进行组织特异性表达,而在其他部位诸如茎秆、叶片、种子中则没有该基因转录水平的表达。

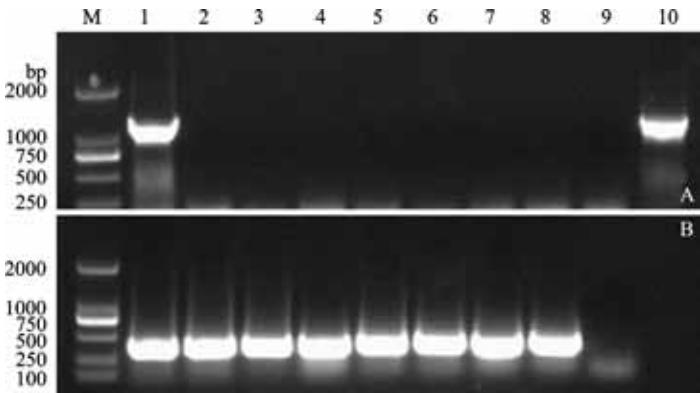


方框内为 *EcoRI*、*XbaI*、*kpnI*、*EcoRI* 酶切位点序列

EcoRI, *XbaI*, *kpnI*, *EcoRI* restriction endonuclease sites were in the box

图3 转 *phyA* 大豆根系 cDNA 扩增目的基因的测序结果

Fig. 3 The sequence of transgenic soybean root cDNA amplification band



A: 植酸酶基因的扩增结果; B 图: 内参基因的扩增结果; M: DL2000; 1: 转基因植株根系; 2: 转基因植株茎秆; 3: 转基因植株叶片; 4: 转基因植株种子; 5: 野生型根系; 6: 野生型茎秆; 7: 野生型叶片; 8: 野生型种子; 9: 空白对照; 10: 质粒阳性对照

A: Expression of *phyA* gene; B: Expression of *actin* gene control. M: DL2000, 1: Transgenic root, 2: Transgenic stem, 3: Transgenic leaf, 4: Transgenic seed, 5: Wild root, 6: Wild stem, 7: Wild leaf, 8: Wild seed, 9: Blank control, 10: Plasmid control

图4 植酸酶基因 *phyA* 在大豆植株不同部位的表达情况

Fig. 4 Expression of *phyA* in different transgenic soybean organs

2.2 转 *phyA* 大豆阳性材料与野生型对照的性状差异分析

为进一步研究植酸酶 *phyA* 对转基因大豆植株农艺、品质及产量性状的影响,以上述鉴定的转植酸酶 *phyA* 大豆阳性植株 (JL09-1, JL09-2) 与野生型对照 (JL35) 为试材,分别考察了转基因大豆植株与野生型对照在农艺、品质及产量性状上的差异表现。

表 1 转植酸酶 *phyA* 大豆阳性植株与野生型对照的性状差异表现

Table 1 The trait differences between transgenic soybean plants and wild-type

名称	株高 (cm)	分枝数	主茎节数	单株荚数	单株粒数	单株粒重 (g)	百粒重 (g)	蛋白质 (%)	脂肪 (%)
Name	Height	Branch number	Nodes number	Pods per plant	Seeds per plant	Weights per plant	Weight 100 seeds	Protein	Fat
JL35	62. 4a	0. 6b	15. 9ab	71. 3b	152. 3b	21. 4b	14. 0b	38. 9a	21. 0a
JL09-1	61. 5a	1. 1a	15. 3b	90. 8a	196. 8a	33. 2a	16. 9a	39. 2a	21. 1a
JL09-2	64. 9a	0. 9ab	16. 8a	87. 5a	181. 7ab	30. 7a	16. 9a	39. 3a	21. 0a

JL35 为吉林 35 (野生型), JL09-1 与 JL09-2 为吉林 35-*phyA*;表中数据为 15 个单株的平均值。a, b 代表 0. 05 显著性水平
JL35; Jilin35 wildtype, JL09-1 and JL09-2; Jilin35-*phyA*; The number is the average of 15 soybean plants. a or b means 0. 05 significant level.

2.3 吉林 35-*phyA* 与常规品种杂交 F₁ 目的基因的检测

为杂交转育植酸酶基因 *phyA*, 以 PCR 和 RT-PCR 鉴定的吉林 35-*phyA* 阳性植株为父本, 与 38 个常规大豆品种在网室进行人工杂交, 获得了 38 个杂交组合的 F₁ 种子, 共计 5332 粒, 具体每个杂交组合

结果发现, 转植酸酶 *phyA* 阳性植株的单株荚数、单株粒数、单株粒重及百粒重均显著高于野生型对照; 而转植酸酶 *phyA* 阳性植株的蛋白质含量和脂肪含量则与野生型对照差异不显著 (表 1)。由此可见, 植酸酶 *phyA* 对于转基因大豆植株的产量形成具有一定的促进作用, 而对于转化大豆子粒品质性状的形成则影响较小。

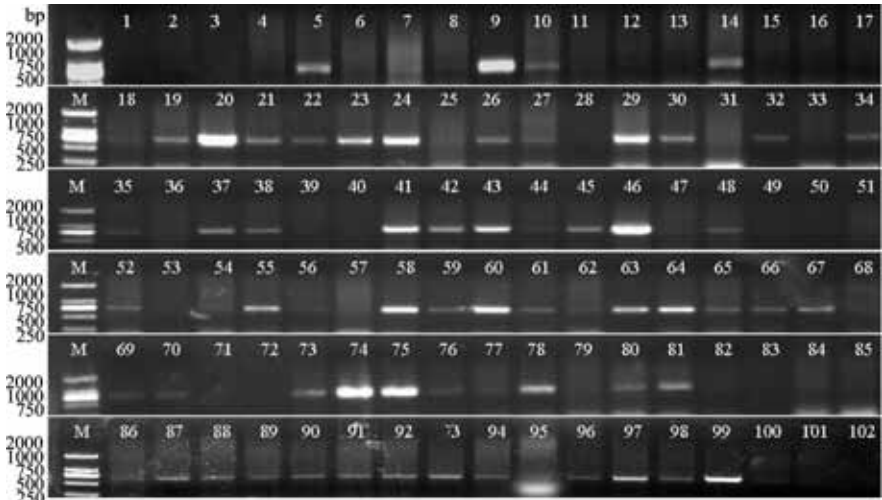
所获得 F₁ 种子的数量参见表 2。F₁ 种子播种后, 对 F₁ 植株进行形态学真假杂交种鉴定和目的基因 PCR 检测, 结果发现, 有 427 个杂交 F₁ 植株可以扩增出目的基因 *phyA*, 并分别属于上述 38 个杂交组合 (表 2, 图 5)。由此说明, 植酸酶基因 *phyA* 已经通过杂交转育手段, 初步转入到 38 个不同的杂交组合中。

表 2 常规大豆品种与吉林 35-*phyA* 杂交 F₁ 阳性植株统计

Table 2 PCR positive transgenic F₁ plants of non-transgenic soybean × JL35-*phyA*

序号	杂交母本	F ₁ 种子数	PCR 阳性	序号	杂交母本	F ₁ 种子数	PCR 阳性
No.	Female parent	F ₁ seeds	PCR positive	No.	Female parent	F ₁ seeds	PCR positive
1	沧豆 11 (Cang-dou 11)	174	6	20	五星 1 号 (Wu-xing 1)	103	3
2	德豆 99-16 (De-dou 99-16)	240	25	21	五星 2 号 (Wu-xing 2)	104	18
3	东农 52 (Dong-nong 52)	181	40	22	五星 3 号 (Wu-xing 3)	236	20
4	汾 9877-10 (Fen 9877-10)	166	27	23	五星 4 号 (Wu-xing 4)	112	21
5	冠豆 6 号 (Guan-dou 6)	57	5	24	徐豆 10 号 (Xu-dou 10)	138	4
6	邯 6013 (Han 6013)	192	9	25	易豆 04-6-2 (Yi-dou 04-6-2)	106	6
7	荷豆 14 (He-dou 14)	58	4	26	中黄 15 (Zhong-huang 15)	62	3
8	济 5075 (Ji 5075)	94	19	27	中黄 35 (Zhong-huang 35)	146	4
9	冀 09B3 (Ji 09B3)	90	4	28	中黄 41 (Zhong-huang 41)	71	5
10	冀豆 11 (Ji-dou 11)	199	4	29	中品 03-6025 (Zhong-pin 03-6025)	87	16
11	冀豆 17 (Ji-dou 17)	79	18	30	中作 017020 (Zhong-zuo 017020)	90	1
12	冀豆 18 (Ji-dou 18)	41	2	31	中作 05-15 (Zhong-zuo 05-15)	94	9
13	冀豆 19 (Ji-dou 19)	211	5	32	中作 056011 (Zhong-zuo 056011)	101	3
14	晋豆 34 (Jin-dou 34)	360	12	33	中作 5045 (Zhong-zuo 5045)	117	10
15	齐黄 28 (Qi-huang 28)	147	11	34	中作 J5032 (Zhong-zuo J5032)	141	7
16	石 H013 (Shi H013)	183	8	35	中作 J5050 (Zhong-zuo J5050)	54	3
17	石 H570 (Shi H570)	322	9	36	06b3 (06b3)	211	23
18	石豆 4 号 (Shi-dou 4)	116	10	37	07 鉴 375-377 (07 jian 375-377)	181	43
19	石豆 5 号 (Shi-dou 5)	227	4	38	SN 早黄 2 号 (SN Zao-huang 2)	41	6

1 ~ 38 为杂交母本, 杂交父本为吉林 35-*phyA*。
1-38; The female parent, the male parent was JL35-*phyA*



扩增所用引物为 PF2 与 PR2,目的片段长度为 753 bp。M:DL2000;1:空白对照;2:吉林 35;3-4:常规大豆品种;5-102:杂交 F₁ 单株
The amplication primer is PF2 and PR2,the length of band is 753 bp. M:DL2000,1:Blank control,2:Jilin35,3-4:Non-transgenic soybean,5-102:F₁ plants

图 5 常规大豆品种与吉林 35-*phyA* 杂交 F₁ 单株 PCR 检测结果
Fig. 5 PCR assay of F₁ plants(non-transgenic soybean × JL35-*phyA*)

对所获得的 38 个杂交组合 F₁ 阳性植株进行单株考种结果发现,产量相关性状中的株高、单株荚数、单株粒重、单株粒数、百粒重的分布范围分别在 43.0 ~ 98.0 cm、44.0 ~ 224.0 个、15.4 ~ 72.0 g、88.0 ~ 406.0 个、13.8 ~ 21.0 g 之间;子粒品质性状中的蛋白质含量分布范围在 37.0% ~ 44.3% 之间,脂肪含量分布范围在 15.6% ~ 21.3% 之间(表 3);可见所获得的杂交后代存在广泛的遗传变异,材料

类型丰富,可以从中选择出符合不同育种要求的后代材料,以适应不同生态地区的多种需求。同时发现,在所考察的 9 个性状中,以分枝数、单株荚数、单株粒数和单株粒重的变异系数较高;以蛋白质含量、脂肪含量、主茎节数的变异系数较低;且其中 8 个性状(除脂肪含量外)的平均值都明显高于吉林 35(野生型)与吉林 35-*phyA* 材料(表 3),说明通过杂交转育技术可以获得类型丰富且性状优良的转基因材料。

表 3 常规大豆品种与吉林 35-*phyA* 杂交 F₁ 阳性单株的总体表现

Table 3 The yield and quality traits of PCR positive transgenic F₁ plants

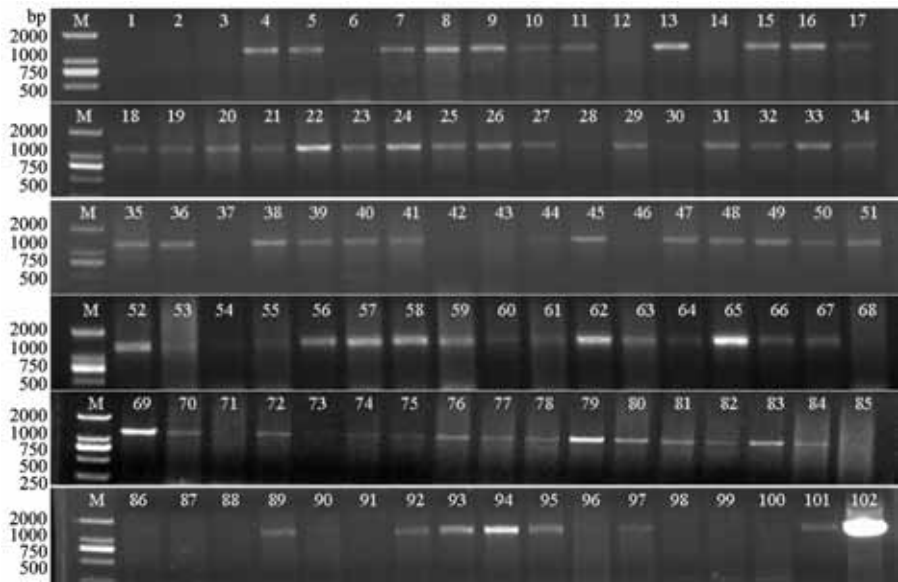
材料类别	株高 (cm)	分枝数	主茎节数	单株荚数	单株粒数	单株粒重 (g)	百粒重 (g)	蛋白质 (%)	脂肪 (%)
Type	Height	Branch number	Nodes number	Pods per plant	Seeds per plant	Weights per plant	Weight 100 seeds	Protein	Fat
吉林 35(野生型)	62.4	0.6	15.9	71.3	152.3	21.4	14.0	38.9	21.0
Jinlin35 wildtype									
吉林 35- <i>phyA</i> (父本)	61.5	1.1	15.3	90.8	196.8	33.2	16.9	39.2	21.1
Jinlin35- <i>phyA</i>									
F ₁ 单株(平均值)	75.1	2.5	18.0	112.3	230.0	39.3	17.2	40.5	18.0
F ₁ plant(Average)									
F ₁ 单株(最大值)	98.0	6.0	21.0	224.0	406.0	72.0	21.0	44.3	21.3
F ₁ plant(Max)									
F ₁ 单株(最小值)	43.0	0	14.0	44.0	88.0	15.4	13.8	37.0	15.6
F ₁ plant(Min)									
F ₁ 单株(极差)	55.0	6.0	7.0	180.0	318.0	56.6	7.2	7.3	5.7
F ₁ plant(Range)									
F ₁ 单株(标准差)	10.6	1.4	1.5	38.0	73.8	12.6	1.9	1.5	0.9
F ₁ plant(Stedv)									
F ₁ 单株(变异系数) (%)	14.1	55.1	8.1	33.9	32.1	32.0	10.9	3.7	4.9
F ₁ plant(CV)									

数据与中文类别名称平行

2.4 转 *phyA* 杂交 F₁ 单株自交后代的 PCR 检测及性状表现

通过对转有植酸酶 *phyA* 基因的杂交 F₁ 阳性单株(冀豆 17 × 吉林 35-*phyA*) 进行自交, 获得了该杂交组合的 F₂ 后代群体。通过对该后代群体所有 F₂ 单株进行目的基因的 PCR 检测, 结果发现, 在 1486 个 F₂ 个体中有 377 个 F₂ 单株带有目的基因 *phyA* (图 6), F₂ 阳性单株所占比例为 25. 4%。进一步考查这些阳性单株的农艺、产量性状结果发现, 群体中存在

丰富的遗传变异, 诸如花色和茸毛色的变异类型就有 4 种(冀豆 17 为白花、棕茸; 吉林 35-*phyA* 为紫花、灰茸; 故 F₂ 阳性材料出现白花棕茸、白花灰茸、紫花棕茸、紫花灰茸 4 种类型)。可见, 由于冀豆 17 (河北省) 与 *phyA* 受体材料吉林 35 (吉林省) 间存在较大遗传差异, 故而在杂交后代 F₂ 群体中出现多种遗传变异类型, 因此为进一步培育能够分解利用土壤植酸态磷的转基因大豆新品种(系) 提供了一批重要的遗传资源。



扩增所用引物为 PF1 与 PR1, 目的片段长度为 1263 bp。M: DL2000; 1: 空白对照; 2: 冀豆 17 野生型; 3: 吉林 35 野生型; 4-101: 冀豆 17 × 吉林 35-*phyA* 的杂交 F₂ 单株; 102: 质粒阳性对照

The amplication primer is PF1 and PR1, the length of band is 1263 bp. M: DL2000, 1: Blank control, 2: Jidou17 wildtype, 3: Jilin35 wildtype, 4-101: F₂ plants of Jidou17 × JL35-*phyA*, 102: Plasmid control

图 6 冀豆 17 × 吉林 35-*phyA* 杂交 F₂ 单株目的基因 PCR 检测结果

Fig. 6 PCR assay of F₂ plants from the progenies of Jidou17 × JL35-*phyA*

3 讨论

植物转基因技术(农杆菌介导、基因枪等)结合常规育种手段(杂交、回交等)是创作物新种质、培育作物新品种的有效途径^[18-20]。前者可充分利用其他(远缘)物种的有利基因, 但目前仅限于少数易于转化和再生的模式品种, 利用杂交(回交)转育技术则有效提高了模式品种中有利基因的应用范围。目前, 关于这方面的研究以抗虫 *Bt* 基因在棉花^[21]、水稻中的转育效果尤为突出。据报道, 美国岱字棉公司、斯字棉公司及 Calange 公司等曾以转 *Bt* 基因系为供体亲本, 通过杂(回)交转育技术将其转入不同常规棉品种, 获得了几十个适合于不同生态区种植的抗虫棉品种, 并在生产上大面积推广种植^[22]。在水稻外源基因转育研究方面, 崔海瑞

等^[23]将转 *Bt* 水稻与常规品种进行杂交, 经后代分子检测和农艺性状考察, 认为这是一种利用转 *Bt* 水稻培育优良抗虫品种的有效途径; 李霞等^[24]以转 *PEPC* 水稻为父本, 分别与 3 个不育系及 2 个恢复系杂交, 从 505 株后代材料中鉴定出 42 株高 *PEPC* 活性植株, 从而证明利用高光效转基因水稻与常规品种杂交可以获得高光效材料; 王才林等^[25]利用回交转育技术将抗除草剂 *bar* 基因转入受体材料 9311 中, 从而证实了通过回交将 *bar* 基因转育到其他品种, 是获得新抗除草剂水稻品种简便有效的途径。

同时, 王德正等^[26]以转玉米 *pepc* 基因的水稻为父本, 分别与培矮 64S、皖粳 97 等 8 个受体材料杂交, 育成了一批转 *pepc* 基因水稻品系, 其中有 3 个品系中的 *pepc* 基因能够稳定、高效表达。本课题组在前期工作中, 得到了转植酸酶 *phyA* 基因的 JL35-

phyA, 该材料具有可以分解利用土壤中植酸态磷的应用潜力, 其自交后代纯合株系曾在 2010 年经国家农业部批准(农基安办字 2009-T150)进行了转基因中间试验研究。结果表明, 植酸磷处理下转基因植株根系分泌植酸酶活性明显高于野生型, 转基因植株的叶片和根系磷含量均明显高于野生型, 且产量相关性状也明显优于野生型。可见, 转基因植株由于转入 *phyA* 基因, 故可分解利用根际周围植酸磷, 使植株可从基质中吸收更多磷素, 因而受低磷影响较小。为充分挖掘该植酸酶 *phyA* 基因在不同品种背景下的应用潜力, 本研究以所获得的转植酸酶 *phyA* 的 JL35-*phyA* 为父本, 采用杂交转育技术将其转入 38 个不同品种遗传背景下, 并经自交分离和目的基因检测, 筛选获得阳性植株的 F₃ 子粒。由于这些后代材料除含有目的基因 *phyA* 外, 还具有丰富的农艺、品质与产量性状遗传差异, 故可为今后继续培育土壤植酸磷高效利用型转基因大豆新品种(系)提供重要的遗传材料。

另外, 本研究所用表达载体为 pC-KSA, 在该载体中含有一个 KSA 嵌和基因, 由植酸酶 *phyA*、根特异表达启动子 Ppyk10 和信号肽 SP 组成。其中, Ppyk10 是从拟南芥黑芥子酶基因中分离获得, 仅仅在拟南芥的根和下胚轴中特异表达, 具有高强度的根特异表达特性。SP 是从胡萝卜伸展蛋白基因中分离获得, 能够在很大程度上提高基因编码蛋白(或酶)的外分泌量。本研究通过分析转 pC-KSA 表达载体大豆植株(JL35-*phyA*)不同组织部位的 RT-PCR 鉴定结果发现, 转基因大豆植株根部组织中存在 *phyA* 基因的高效表达产物, 而在植株其他部位(如子粒、叶片、茎秆)则未发现该基因表达, 这不仅在一定程度上解释了转植酸酶 *phyA* 基因大豆能够分解利用培养基中植酸磷的原因, 同时也在一定程度上表明所获得的转 *phyA* 基因材料由于仅在大豆植株根系存在基因表达产物, 因而可能具有更好的转基因生物安全性。

参考文献

- [1] 陈洁君, 张维, 宛煜嵩, 等. 全球转基因作物发展现状及趋势[J]. 农业生物技术学报, 2011, 19(2): 369-374
- [2] 喻修道, 徐兆师, 陈明, 等. 小麦转基因技术研究及其应用[J]. 中国农业科学, 2010, 43(8): 1539-1553
- [3] Liu J F, Wang X F, Li Q L, et al. Biolistic transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) with the *phyA* gene from *Aspergillus ficuum* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2011, 106(2): 207-214
- [4] Lung S C, Lim B L. Assimilation of phytate-phosphorus by the extracellular phytase activity of tobacco (*Nicotiana tabacum*) is affected by the availability of soluble phytate [J]. Plant and Soil, 2006, 279(1-2): 187-199
- [5] Xiao K, Harrison M J, Wang Z Y. Transgenic expression of a novel *M. truncatula* phytase gene results in improved acquisition of organic phosphorus by *Arabidopsis* [J]. Planta, 2005, 222(1): 27-36
- [6] Richardson A E, Hadobas P A, Hayes J E. Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate [J]. Plant J, 2001, 25(6): 641-649
- [7] Zimmermann P, Zardi G, Lehmann M, et al. Engineering the root-soil interface via targeted expression of a synthetic phytase gene in trichoblasts [J]. Plant Biotechnol J, 2003, 1(5): 353-360
- [8] 张琪, 陈茹梅, 杨文竹, 等. 组成型表达转植酸酶基因(*phyA2*)玉米的获得[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(4): 623-629
- [9] Xiao K, Zhang J H, Harrison M, et al. Ectopic expression of a phytase gene from *Medicago truncatula* barrel medic enhances phosphorus absorption in plants [J]. J Integrative Plant Biol, 2006, 48(1): 35-43
- [10] Ma X F, Wright E, Ge Y X, et al. Improving phosphorus acquisition of white clover (*Trifolium repens* L.) by transgenic expression of plant-derived phytase and acid phosphatase genes [J]. Plant Sci, 2009, 176(4): 479-488
- [11] Li G L, Yang S H, Li M G, et al. Functional analysis of an *Aspergillus ficuum* phytase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its root-specific, secretory expression in transgenic soybean plants [J]. Biotechnol Letters, 2009, 31(8): 1297-1303
- [12] Li G L, Zhu J H, Sun J, et al. Cloning of the phytase gene *phyA* from *Aspergillus ficuum* 3.4322 and its expression in yeast [J]. Fungal Diversity, 2003, 13: 85-93
- [13] 闫瑞叶, 李喜焕, 李桂兰, 等. 植酸酶基因 *phyA* 转化大豆品种研究[J]. 大豆科学, 2011, 30(3): 356-361
- [14] Liu J F, Zhao C Y, Ma J, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) with a fungal phytase gene improves phosphorus acquisition [J]. Euphytica, 2011, 181(1): 31-40
- [15] Mudge S R, Smith F W, Richardson A E. Root-specific and phosphate-regulated expression of phytase under the control of a phosphate transporter promoter enables *Arabidopsis* to grow on phytate as a sole P source [J]. Plant Science, 2003, 165(4): 871-878
- [16] 韩胜芳, 谷俊涛, 肖凯. 高效表达黑曲霉 *phyA* 基因改善白三叶草对有机态磷的利用[J]. 作物学报, 2007, 33(2): 250-255
- [17] 李桂兰, 祝建洪, 孙建, 等. 无花果曲霉植酸酶基因 *phyA* 的克隆、序列分析及表达[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(5): 520-524
- [18] 殷跃, 陆坤, 王桂香, 等. *pin II* 基因在转基因大白菜 DH 纯系和试配 F₁ 代的遗传及表达[J]. 分子植物育种, 2011, 9(3): 350-356
- [19] 袁英, 李晓辉, 孔祥梅, 等. 转 *GFM CryIA* 基因玉米自交系及其杂交种的抗螟性鉴定[J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(5): 831-836
- [20] 杨爱芳, 张可伟, 尹小燕, 等. 转基因耐盐玉米自交系的农艺性状及杂种优势表现的分析[J]. 中国农业科学, 2007, 40(12): 2895-2902
- [21] 文学, 张宝红. 转基因抗虫棉研究现状与展望[J]. 农业生物技术学报, 2000, 8(2): 194-199
- [22] 崔海瑞, 王忠华, 舒庆尧, 等. 转 *Bt* 基因水稻克螟稻杂交转育后代农艺性状的研究[J]. 中国水稻科学, 2011, 15(2): 101-106
- [23] 李霞, 焦德茂, 戴传超, 等. 转育 *PEPC* 基因的杂交水稻的光合生理特性[J]. 作物学报, 2001, 27(2): 137-143
- [24] 王才林, 赵凌, 宗寿余, 等. 水稻抗除草剂基因 *bar* 的转育研究[J]. 作物学报, 2002, 28(3): 305-309
- [25] 王德正, 王守海, 吴爽, 等. 玉米 *pepc* 基因在杂交转育的转基因水稻后代中的传递和表达特征[J]. 遗传学报, 2004, 31(2): 195-201