

大豆基因转移高蛋白受体系统的建立^{*}

王连铮 尹光初 罗教芬 雷勃钧

王 剑 卢翠华 姚振纯 李秀兰

(黑龙江省农业科学院)

邵启全 蒋兴村 周泽其

(中国科学院遗传研究所)

摘 要

通过农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 致瘤, 从大豆属三个种的蛋白质含量不同的 627 份种质资源中, 筛选出致瘤材料 223 份。其中蛋白质含量在 43.00—45.52% 的栽培大豆 (*Glycine max*) 品种 4 份; 蛋白质含量在 44.00—49.55% 的半野生大豆 (*Glycine gracilis*) 类型 23 份; 蛋白质含量在 48.00—51.79% 的野生大豆 (*Glycine soja*) 类型 19 份。通过组织培养, 从瘤组织中得到了脱菌的愈伤组织。生化检测表明, 3 个种的大豆瘤来源的部分愈伤组织含有 T—DNA。并通过液体培养, 建立了含 T—DNA 的细胞系。现已培养 50 多代, 胭脂碱合成酶基因仍然稳定地整合在大豆基因组中, 其染色体数为 $2n=40$, 表明是含 T—DNA 的稳定的细胞系。为基因转移打下了良好的基础。

T₁ 质粒作为植物基因工程的载体受到了广泛的重视。它的载体功能是通过擦伤感染致瘤的过程进入植物细胞来实现的, 因此, 通过致瘤反应筛选出理想的受体显得非常重要。我们对大豆属的致瘤反应曾作过一些报道, [1, 2, 3] 为了充分利用我国大豆的丰富资源, 选育出高蛋白品种, 我们进行了基因转移的高蛋白受体系统的研究, 本文报道这些研究的初步结果。

材 料 和 方 法

供试载体材料为致瘤农杆菌 C₅₈、T₃₇、B₃/73。其中 C₅₈、B₃/73 菌系为美国华盛

^{*} 张开旺同志参加部分工作, 李东来、徐兴昌同志协助拍照, 一并致谢。

顿大学 E. W. Nester 教授所提供, T₃₇ 为中国科学院遗传所303组提供。

受体材料为不同蛋白质含量的栽培大豆 374 份, 半野生大豆 82 份, 野生大豆 171 份。

致瘤农杆菌的培养、接种、瘤组织的生化检测的方法与前文相同^[3]。

含 T-DNA 细胞系的建立。将来源于瘤组织的脱菌愈伤组织先培养在 MS+GA1mg/l+NAA1mg/l+KT2mg/l 培养基上, 软化后移至 R₃ (MS+1AA5mg/l+24D0.5mg/l+KT2mg/l) 培养基中, 置于80次/分振荡器上悬浮培养, 培养温度26—82℃, 光照3000—5000lux。采用醋酸洋红染色法。观察了细胞染色体数目。

结 果

1. 不同蛋白质含量的大豆对致瘤农杆菌的反应

对蛋白质不同的野生、半野生、栽培大豆的627份材料进行了致瘤实验, 结果列入表1。从实验结果看, 大豆属不同种对农杆菌的致瘤反应不同。半野生大豆的平均致瘤率最高, 达89.02%; 其次是栽培大豆为50.53%; 野生大豆最低为36.26%。

从大豆蛋白质含量和农杆菌致瘤的关系来看, 随着蛋白质含量的增高致瘤率有逐渐

表 1 不同蛋白质含量的大豆对致瘤农杆菌的反应

接种大豆类型	蛋白质含量 (%) 区 段	平均蛋白质含量%	接种基因型	致瘤基因型	%
栽培大豆 G. max	34.02—37.99	36.78	106	53	50.00
	38.00—38.99	38.51	74	38	51.35
	39.00—39.99	39.50	88	43	48.31
	40.00—42.99	40.85	94	51	54.26
	43.00—45.52	43.86	12	4	33.33
小 计	34.02—45.52	39.01	374	189	50.53
半野生大豆 G. gracilis	37.03—41.99	40.78	23	23	95.65
	42.00—43.99	43.14	33	28	84.85
	44.00—49.55	45.35	26	23	88.46
小 计	37.03—49.55	43.18	82	73	89.02
野生大豆 G. soja	41.56—45.99	44.63	48	22	45.83
	46.00—47.99	46.97	59	21	35.59
	48.00—51.79	49.18	64	19	29.69
小 计	41.56—51.79	47.14	171	62	36.26

降低的趋势, 这在野生大豆的类型中表现得比较明显。通过致瘤筛选, 从374份栽培大豆品种中选出蛋白质含量在43.00—45.52%的致瘤品种4份; 从82份半野生大豆材料中选出蛋白质含量在44.00—49.55%的致瘤材料23份; 从171份野生大豆材料中筛选出48.00—51.79%的致瘤材料19份。

2. 不同致瘤农杆菌对蛋白质含量不同大豆的致瘤作用

采用农杆菌 C₅₈, T₃₇, B₃/73 三个菌系对蛋白质含量不同的致瘤实验结果列入表 2。从表 2 看出, C₅₈ 对栽培和半野生大豆的致瘤作用比 T₃₇, B₃/73 强, 其次是 B₃/73, T₃₇ 致瘤作用较差。但在野生大豆中, B₃/73 表现得比 C₅₈ 和 T₃₇ 致瘤能力强。就不同菌种对蛋白质含量不同的大豆致瘤作用而言, 相互之间差异较大, 表现不十分规律。其中 B₃/73 的致瘤作用, 在同一个种的材料中随着蛋白质含量的增高而逐渐减弱。

3. 瘤组织的培养和异源基因转移的鉴定

将较老的瘤组织进行严格的消毒, 在无茵条件下切成 1—2 毫米直径大小的组织块, 在无任何激素的培养基上进行培养, 在培养期间及时淘汰污染的组织块。采用这种方法, 获得了大豆属三个种的脱菌愈伤组织。将这些瘤来源的愈伤组织用纸上电泳法进行了检测。结果表明, 三个种的瘤来源的部分愈伤组织中分别都存在着胭脂碱, 而对照组没有胭脂碱。这表明农杆菌的 T₁ 质粒上的 T—DNA 中与产生胭脂碱有关的基因, 整合到大豆基因组中并能够表达, 产生了胭脂碱。

4. 含 T—DNA 细胞系的建立

在无激素培养基上生长的脱菌愈伤组织, 生长比较缓慢, 结构比较紧密。不能直接将愈伤组织进行液体培养, 需选择能使愈伤组织松散、软化的培养基。经过实验, 采用 MS+GA 1mg/l+NAA 1mg/l+KT 2mg/l 的培养基, 有利于愈伤组织的松散。用

表 2 不同致瘤农杆菌对蛋白质含量不同的致瘤作用

接种大豆类型	蛋白质含量 (%) 区段	致瘤株数占接种株数 %		
		C ₅₈	T ₃₇	B ₃ /73
栽培大豆 G. max	34.69—37.99	6.85	4.59	9.61
	38.00—39.99	11.21	5.81	9.47
	39.00—39.99	11.97	4.01	7.47
	40.00—42.99	15.22	3.19	6.39
	43.00—45.52	7.80	1.67	4.45
小 计	34.69—45.52	10.60	4.85	7.48
半野生大豆 G. gracilis	37.03—41.99	41.64	31.67	31.20
	42.00—43.99	44.09	34.84	26.18
	44.00—49.55	45.24	24.57	31.38
	37.03—49.55	43.66	39.36	29.59
野生大豆 G. soja	41.56—45.99	10.15	5.85	12.50
	46.00—47.99	6.74	5.15	9.89
	48.00—51.79	8.23	5.94	8.62
	41.56—51.79	8.37	5.65	10.34

这种培养基培养的愈伤组织,放在 R_3 液体培养基上进行振荡培养24小时后,愈伤组织基本上都已破碎成小愈伤组织块或单细胞。5天后进行分瓶培养,细胞生长迅速,未观察到分化现象。

采用上述方法和培养基已将栽培大豆的含 T-DNA 的细胞株悬浮培养了56个无性世代。都还保持良好的分生能力,胭脂碱合成酶基因仍然稳定地整合在大豆基因组中,其染色体数为 $2n=40$ 。表明是含 T-DNA 的稳定的系胞系。

主要参考文献

- [1] 黑龙江省农业科学院大豆所,中国科学院遗传所,黑龙江农业科学,1982, №6, 45—46.
- [2] 王连铮,邵启全等:大豆科学,1983, Vol. 2, №3, 194—199.
- [3] 王连铮,邵启全,中国科学, B 辑, 1984, Vol XXVII, №2, p. 137—142.

ESTABLISHMENT OF HIGH PROTEIN RECIPIENT SYSTEM OF GENE TRANSMISSION IN SOYBEAN

Wang Lianzheng Yin Guangchu Luo Jiaofen Lei Bojun

Wang Jian Lu Cuihua Yao Zhenchun Li Xiulan

(Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin)

Shao Qiquan Jiang Xingcun Zhou Zeqi

(Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing)

Abstract

223 genotypes which can form tumors with T-DNA have been screened from 627 genotypes, of three species of *Glycine* with different protein content, by infection with strains of *Agrobacterium tumefaciens*. Among 223 genotypes, 4 of cultivated soybean (*G. max*), 23 of semi-wild soybean (*G. gracilis*) and 19 of wild soybean (*G. soja*) contain protein at 43.00—45.52%, 44.00—49.55% and 48.00—51.79% respectively. The bacteria free calli were obtained from tumor tissues by means of tissue culture. Biochemical detection showed that partial calli derived from tumor tissues of three species mentioned above contain T-DNA of Ti plasmid. Cell lines of the calli with T DNA have been established by using liquid culture. Up to present, 50 generations of the cell lines have been propagated and the nopaline synthetase gene is integrated stably in the genomes of soybeans. Chromosome number of the cell lines is normal, $2n=40$, basically. This demonstrated that these cell lines are stable ones containing T-DNA. This is a good beginning for transferring high protein gene by using Ti plasmid.