

大豆遗传转化研究的进展*

吕慧能 盖钧镒 马育华

(南京农业大学大豆研究所)

本文综述近年来农杆菌介导、电击、PEG/电击、基因枪、注射、花粉管通道等方法应用于大豆遗传转化所取得的进展;并扼要地介绍这些方法的基本原理以及存在问题。

植物的外源基因转化研究近年来已发展成为一个重要领域。从应用上讲,希望通过这条途径克服远缘杂交困难、缩短育种周期,改良农作物的农艺性状、满足人类的需要;而从基础研究来说,它使人们能对基因结构、调控进行深入一步的研究。近几年中,通过转化技术,人们对启动子、增强子、终止子以及组织、器官表达特异性等方面有了更深入的了解。

在大豆研究中,已分别建立了组织、细胞^[5]、和原生质体^[1,4],水平的植株再生技术,为大豆的外源DNA导入提供了有效的受体系统。关于大豆遗传转化方面的研究已有较多积累,本文将综述通过农杆菌介导、电击、基因枪、花粉管通道与注射等方法进行的大豆遗传转化研究的进展。

一、农杆菌介导的大豆遗传转化

土壤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)和发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)介导转化是通过感染将所带有的经过或未经改造的T-DNA导入植物细胞,引起相应的植物细胞可遗传的变异^[2,10]。以往的研究多数在双子叶植物上进行,对单子叶植物的遗传转化也逐渐增加^[8]。

大豆的遗传转化研究从野生型菌株感染开始,这包括对转化大豆T-DNA的研究^[22]、转化细胞系建立^[37]、大豆易感性、菌株感染转化能力等方面的研究及其在大豆基因工程中的应用。

(一)大豆易感性研究

农杆菌感染转化与受体基因型有关。大豆也是这样。通过对24个栽培大豆品种和3个野生大豆(*G. soja*)株系活体转化研究,Owens和Cress^[29]筛选出3个栽培品种,(Biloxi, Jupiter和Peking)及一个野生材料(PI 398.693B)对土壤农杆菌A348(pTiA6)高度易感(培养5周瘤鲜重大于15mg),而对发根农杆菌R1000(pRiA4b)则仅4个品种和2个野生材料产生明显的发状根。大豆基因型对不同质粒的易感性有重叠也会有差异。易感性还和

* 本文于1991年12月6日收到。

This paper was received on Dec. 6, 1991.

发芽天数、环境、培养条件、接种的时间(伤口造成过4小时后接种会使频率下降)、以及共培养温度(32~34℃共培养阻断稳定转化)等因素有关^[25]。

虽然人们对影响易感性的因素研究不少,但对它的遗传学方面作为一个性状进行研究却未曾见到。

(二)农杆菌转化能力的研究

筛选出 Peking 品种是最易感的品种,Byrne 等^[11]以它为材料对 11 个菌株的转化能力进行了研究。以致瘤频率和瘤的大小为指标,他们发现不同菌株的转化能力的差异主要是 Ti 质粒的差异所致,胭脂碱型 Ti 质粒转化能力强于章鱼碱型的 Ti 质粒。

通过野生型农杆菌 A348(pTiA6)和去毒农杆菌 LBA4404(pBin6)混合感染子叶, Owens 等^[30]得到了同时表现不依赖于激素生长。(属野生 T-DNA 转化的现象)和卡那霉素抗性(属去毒 T-DNA 转化的现象)的愈伤组织,结合交叉保护试验的结果,他们认为很可能不是由于 A348(pTiA6)分泌扩散物质帮助了 LBA4404(pBin6)的转化,可能是由于 pBin6 的 T-DNA 插入基因组增加了大豆细胞活性和/或 pTiA6 转移到 LBA4404(pBin6)后 pBin6 T-DNA 与 pTiA6 T-DNA 一起插入大豆基因组。他们还发现酚类化合物 AS 和 SA 只对 A348(pTiA6)菌株感染转化能力有显著的提高效应。

同样,可用一系列大豆品种对一系列农杆菌的转化能力进行测试。Savaka 等^[34]以 10 个栽培大豆品种为材料测试了 4 个发根农杆菌的转化能力。它们感染转化能力大小依次是:"K599"、"8196"、"1855"和"A4"。

不同农杆菌质粒之间的差异同时表现在 T 区和 Vir 区,到底哪一区的差异导致了它们转化能力的差异还未见报导。

(三)大豆基因工程中农杆菌介导的遗传转化

融合基因转化大豆细胞的实验开始于 Facciotti 等^[19]。他们构建了 RUBP 小亚单位 5' 区—npt II—OCS 3' 区融合基因,用以转化栽培大豆品种 Forrest 子叶、子叶节和节间。测试转化愈伤组织 Km^R 性状、Poly A⁺ RNA 增加情况及 NPT II 酶活性,它们皆表现出光诱导表达。

首先通过农杆菌共培养获得转基因植株的是 Hinchee 等^[21]。他们从 100 份栽培大豆材料筛选出 3 个易感品种(Maple Presto, Peking 和 Dolmat),通过子叶农杆菌共培养得到 pnos—nptII 和 35s—gus 共同转化、以及 pnos—nptII 和强化 35s 矮牵牛 EPSPase 基因共同转化的转基因植株,并检测到这些基因表达、再生植株后代以 3:1 分离^[21]。

应用改良的 Hinchee et al. 方法,Zhou 和 Atherly^[38]得到玉米 Ac 因子和 Dc 因子转化的转基因植株,并追寻 Ac、Dc 因子的转座情况。为用转座子钓出目的基因建立了基础。以未成熟子叶为材料,Parrot 等^[31]对 14 个大豆品种的 9800 个子叶进行感染转化研究,得到 β -云扁豆蛋白启动子—15KD 玉米醇溶蛋白的基因和 npt II 转化的转基因植株。但由于组织水平转化的嵌合性,3 株转基因植株的后代无一转化的。

为避免再生植株的困难,在萌发的胚芽及附近接种农杆菌,Chee 等^[12]处理了 4000 粒发芽的种子,16 株的三出复叶有 npt II 杂交带,其中 10 株的杂交带特别强。但只有一株的后代兼有 npt II 杂交带和酶活性,且 36 个后代中只有 3 个是转化的。由此可见为得到转基因后代付出的巨大工作量。

要克服组织转化的嵌合性,在原生质体再生细胞水平上进行共培养转化是一条途径。Balades 等^[9]以丢失了三条染色体的细胞悬浮系游离原生质体,培养再生的细胞和农杆菌 C58(pTiC58)、C58(pTiC58 : : pMON200-pfdB2)共培养,将 pTiC58 的 T-DNA 以 5% 的频率使大豆细胞建立稳定转化。他们进一步发现 npt II 基因转化频率和选择顺序有关。通过悬浮系的研究发现,快速生长细胞同其它研究表明的那样,nos 启动子的碱基甲基化使该基因的表达受阻。

(四)发根农杆菌的感染转化

除 Owens 和 Cress^[29]的 26 个大豆基因型对野生 Ri 质粒易感性研究和 Savaka 等^[34]不同菌株感染转化能力研究外,Rech 等^[32]使带有嵌合 npt II 基因的 pRiA4b 和提供“超毒”表型的 pTVK291 共处于 R1601 菌株,用它针刺感染转化野生大豆 *Glycine canescens* 的下胚轴。产生根克隆后分化获得完整植株。它们的根系多分枝、发达。Southern 印迹结果表明 T-DNA 插入了 3 个不同的位点,同时测到 NPT II 酶活性。

总之,可将影响农杆菌共培养转化大豆的转化效率的因素归纳如下:1)大豆基因型;2)农杆菌的基因型;3)大豆组织的来源器官和发育状态;4)酚类化合物;5)接种农杆菌的时间、方式;6)共培养和培养的条件;7)选择的时间、方式等。

二、大豆的电击和 PEG/电击方法遗传转化

电击和 PEG/电击方法遗传转化的基本原理是在电击或 PEG/电击处理下细胞膜透性的可逆变化使得溶液中的大分子物质(如 DNA)进入细胞,并改变细胞的遗传物质构成。由不同材料研究表明,影响转化的因素很多。可逆击穿的临界电压、脉冲时间长度、温度(包括热激、冷淬)、PEG 的浓度和处理的时间、各成份的添加顺序、溶液性质以及细胞类型等因素都影响转化的频率。不同研究者所得的最佳条件并不一样。

Christou 等^[13]采用 Fromm 等^[20]的方法得到了转化的大豆愈伤组织。他们由存活细胞率和 npt II 瞬间表达活性的平衡,摸索出最佳电击条件,然后用于稳定转化。即取 4~8mm 大小的胚,酶解游离原生质体,用 K8p+NaCl 40mM 调节密度 $2-4 \times 10^5/\text{ml}$,加及不加 pCMC1021(上有 pnos-npt II)10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 后进行冰浴冷淬—电击—冰浴冷淬处理后进行稀释 10 倍培养。2~3 周后形成微克隆。

电击后第 14 天将培养液移到卡那霉素 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的固体培养基上筛选出一些抗性愈伤组织。若电击后过 5 周再进行筛选,则使抗性愈伤组织数增加 10 倍。早期选择(14 天)的 47 个抗性愈伤组织仅 4 个测到 NPT II 酶活性,而 5 周后选择的 100 个抗性愈伤组织全部测得酶活性。这可能是早期的选择会将含有游离的 NPT II 基因的愈伤组织挑出了的结果。

Lin 等^[26]用矩形电脉冲电击大豆原生质体,并进行 PEG 处理,将 pnos-npt II 和 35s-cat 共建于同一个质粒,其中前者作为选择标记,然后进行热激—加小牛胸腺 DNA 及质粒 DNA—加 PEG—电击处理后培养一个月,再用 G418 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 筛选,二个月后产生的抗性愈伤组织都可测到 CAT 酶活性。

应用 Christou et al.^[13]的方法,Christou 和 Swain^[20]通过对连锁和非连锁基因电击共转化频率的研究以探讨多基因的转化。各次试验都以 NPT II 作为选择标记。非连锁非选择基因间的共转化频率在 10%~25%,选择基因(npt II)和非选择非连锁基因的共转化频率

一般20%~25%。它们都受质粒克分子比例的影响,同时还存在不同基因间共转化频率的差异。选择基因和非选择连锁基因的共转化频率在30%~100%,明显高于前二种情况。他们对 ptn I 表达或卡那霉素抗性的材料,同时都测得了 Southern 印迹杂交带。

Dron 等^[18]用电击处理后的瞬间表达来研究在细菌侵害下大豆基因表达的特异性启动子及其前导序列。

三、大豆的基因枪方法遗传转化

基因枪方法是将表面吸附了 DNA 的金或钨微粒加速后轰击植物组织块,将外源 DNA 带入植物细胞^[16,24,33]。

Christou 等^[16]用基因枪射击大豆未成熟胚后,在显微镜下观察可见金粒深入到 5~7 层细胞。游离原生质体后可见含金粒的原生质体比例达 10^{-3} 。培养 3 周后在含卡那霉素培养基上筛选 6~8 周,得到卡那霉素抗性的克隆皆有 NPT II 酶活性。但表达水平的差异可达 5 倍。由 DNA 分析结果知 NPT II 随机地插入大豆基因组,且插入的 NPT II 拷贝数和它的表达活性无关。表达活性最高的是单拷贝插入的转化愈伤组织。这说明插入位置的边缘 DNA 可能对表达起作用^[17]。

McCabe 等^[28]用基因枪射击胚轴后培养得到 389 株苗,然后嫁接到 10 天苗龄的大豆茎上。其中一株叶片测得 NPT II 酶活性并成熟结实得到 10 个 R_1 个体,3 个 R_1 苗测到 NPT II 酶活性。由大豆基因组大小和 NPT II 标准拷贝数的 Southern 印迹强度,估计有多于 5 个拷贝的插入。对这些再生植株后代进行分离分析得知:插入的拷贝作为一个整体遗传。

Wang 等^[35]用基因枪方法也获得了大豆悬浮系 CAT 基因的瞬间表达。

四、花粉管通道和注射方法外源 DNA 导入

作物授粉后,花粉萌发产生花粉管,柱头、胚囊则产生花粉管通道。柱头上滴加外源 DNA 通过花粉管通道可导入作物生殖细胞或早期胚细胞,使处理后代发生性状变异,其频率可高达 10^{-2} 甚至 10^{-1} ^[6,7,27]。雷勃钧等^[6]对大豆进行了 10 组处理,通过花粉管通道的方法,处理后代变异包括熟期、株型、花色、种皮色、百粒重、蛋白质含量、过氧化物同工酶谱、酶活性等方面。

从目前试验观察总 DNA 导入获得的转化后代分离不遵循孟德尔分离定律因此还没有发现清楚遗传分离比例。

刘博林等^[3]利用早期胚细胞转化易感性,用子房注射法将龙葵莠去净抗性基因转移到大豆叶绿体并得以表达。

小 结

农杆菌介导的大豆遗传转化在各方面进行了较深入的研究。应用它或基因枪方法都获得了转化的再生植株并结实产生后代。由于大豆原生质体再生植株的困难,电击和 PEG/电击方法并未得到转化的再生植株,但获得了转化的愈伤组织。转化的基因主要是野生 Ti、Ri 质粒的 T-DNA。报道基因 [NPT II cat gus bar (phosphinothricin acetyl

transferase)基因等]。Ac 因子、EPSP 合成酶基因和 15KD 玉米醇溶蛋白基因也曾用于农杆菌介导的转化。转移基因所用的启动子多为花椰菜花叶病毒 35s RNA 启动子(35s)或它的强化启动子^[23]、nos 启动子、光诱导启动子^[19]、细菌侵害下诱导表达的启动子^[18]、 β -云扁豆蛋白启动子^[31]等。

上述转化方法中,农杆菌共培养方法技术较简单,但有宿主范围、菌株特异性等问题。基因枪方法一次可射中许多细胞,且细胞被射后仍存活,是瞬间表达研究的好系统,但整合频率低,不易得到稳定转化。所幸的是由于少数大豆基因型有很强的器官发生潜势,由这种方法已获得转化的植株。电击或 PEG/电击一次便能处理很多原生质体,但由于原生质体再生植株困难,不易获得转化的植株。在大豆遗传转化研究中,利用花粉管通道方法是较有希望首先进入应用阶段的技术。

除上述方法外,还有脂质体-细胞、原生质体、组织融合方法、圆球体方法、脂质体注射方法、病毒载体系统、微注射方法、种子浸泡吸收 DNA 方法、花粉转化、激光穿孔、细胞与组织电击方法、超声波方法及细胞器转化等方法应用于其它作物中,但在大豆上还未见报道。

参 考 文 献

- [1] 卫志明、许智宏,1990,植物学报,32(8):582~588
- [2] 朱群、白永延,1987,细胞生物学杂志,(1):16~19;(2):56~60
- [3] 刘博林等,1989,中国科学 B 辑,7:699~705
- [4] 罗希明等,1990,植物学报,322(8):616~621
- [5] 罗希明等,1989,植物学报,31(3):231~234
- [6] 雷勃钧等,1991,大豆科学,10(1):58~62
- [7] 龚葵葵等,1988,中国科学 B 辑,6:611~614
- [8] 路铁刚、孙敬三,1990,生物工程进展,3:4~8
- [9] Baldes, R. et al., 1987, Plant Mol. Biol., 9: 135~145
- [10] Binns, A. N., 1990, Physiol. Plant., 79:135~139
- [11] Byrne, M. C et al., 1987, Cell Tiss. Org. Cult., 8:3~15
- [12] Chee, P. P. et al., 1989, Plant Physiol., 91: 1212~1218
- [13] Christou, P. et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 3962~3966
- [14] Christou, P. and W.F. Swain, 1990, Theor. Appl. Genet., 79: 337~341
- [15] Christou, P., 1990. Physiol. Plant. 79: 210~212
- [16] Christou, P. et al., 1988, Plant Physiol., 87: 671~674
- [17] Christou, P. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:7500~7504
- [18] Dron, M. et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:6738~6742
- [19] Facciotti, D. et al., 1985, Bio/Technology, 3:214~246
- [20] Fromm, M, et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:5824~5828
- [21] Hinchee, M. A., et al., 1988, Bio/Technology, 6: 915~922
- [22] Hood, E. E. et al., 1986, J. Bacteriol., 158:1283~1290
- [23] Kay, R. et al., 1987, Science, 236:1299~1301
- [24] Klein, T. M. et al., 1987, Nature, 327: 70~73

- [25] Kudirka, D. T. et al., 1987, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 8:3~15
- [26] Lin, W. et al., 1987, *Plant Physiol.*, 84: 856~861
- [27] Luo, Z. and R. Wu, 1988, *Plant Mol. Biol. Rep.*, 6: 165~174
- [28] McCabe, D. E. et al., 1988, *Bio/Techology*, 6: 923~926
- [29] Owens, L. D. and D. E. Cress, 1985, *Plant Physiol.*, 77:84~94
- [30] Owens, L. D. and A. C. Smigoki, 1988, *Plant Physiol.* 88:570~573
- [31] Parrot, W. A. et al., 1989, *Plant Cell Rep.*, 7: 615~617
- [32] Rech, E. L. et al., 1989, *Plant Cell Rep.*, 8: 33~36
- [33] Sanford J. C., 1990, *Physiol. Plant.*, 79: 206~209
- [34] Savaka, M. A. et al., 1990, *Phytopathology*, 80:503~508
- [35] Wang, Y-C. et al., 1988, *Plant Mol. Biol.*, 11: 433~439
- [36] Wright, M. S. et al., 1986, *Plant Cell Rep.*, 5:150~154
- [37] Xingcun, Jiang et al., 1986, *Sci. Sin. Ser. B*, 29:374~377
- [38] Zhou, J. H. and A. G. Atherly, 1990, *Plant Cell Rep.*, 8:542~545

隆重庆祝王金陵教授从事教学科研五十周年

1992年5月27日东北农学院隆重庆祝王金陵教授从事教学科研50周年。来自全国教学、科研、生产等40多个单位200余人出席了庆祝大会。首先由东北农学院院长史伯鸿教授介绍王先生从事教学、科研50年所创建的业绩和献身精神。接着黑龙江省戴漠安副省长致贺词,贺词中高度评价了王先生50年的丰硕成果和高尚品德。黑龙江省农科院院长许忠仁研究员、吉林农科院及中国作物学会大豆专业委员会等单位的代表向王先生致贺词。哈尔滨动植物检疫局向王先生敬赠纪念徽章。东北农学院学生敬献了花篮。黑龙江省孙魁文副省长和中国农科院王连铮院长发来贺信。

在热烈的掌声中王金陵教授致答词,他简要回顾了50年教学、科研的历程之后,谦虚地说,我所做的工作是微不足道的,而党和人民却给了我很高的荣誉。王先生对大会表示深切地感谢,他心情激动地表示,我虽年愈古稀,仍愿为我国的教育和科研事业再多做贡献。

崔文馥

《大豆科学》编辑部