

根癌农杆菌 Chry5 对我国栽培大豆子叶致瘤作用的研究*

李洪泉 李红卫 王 茜 黄永芬 汪清胤

(哈尔滨师范大学 哈尔滨 150080)

摘 要

本文报道了根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) Chry5 对我国 10 个大豆栽培品种子叶的致瘤效应。结果表明对 7 个品种的致瘤率略高于超毒菌株 A281, 对所有品种的致瘤率均高于 T37。通过抽样检测发现, Chry5 所诱导产生的冠瘿瘤, 瘤上的不定根和子叶均含有胼脂碱。有 1 个品种诱发出畸胎瘤苗, 并进行了生长测定。

关键词 Chry5; 中国栽培大豆; 致瘤; 畸胎瘤苗

Chry5 是生物 I 型的根癌农杆菌, 从菊花中分离得到, 为广寄主范围的菌株, 它的强毒性最初是由 Benny 和 Pueppke 发现的^[8]。特别是对大豆的高致瘤力引起人们对它的研究兴趣^[10]。目前大豆的外源基因转化仍是比较困难的工作, 利用超毒的农杆菌 Ti 质粒载体有可能提高外源基因对大豆的转化频率。因超毒载体比正常载体能转化更多的靶组织细胞, 提高 T-DNA 在胚和再生转基因植物配子里的存在概率^[11]。根癌农杆菌对我国大豆的致瘤作用研究国内已有许多报道^[1,2], 但用 Chry5 的感染致瘤尚属首次。有关畸胎瘤的研究工作国外有许多报道, 国内也在白菜、甘蓝和花生上获得畸胎瘤苗^[3,4,5]。我们利用超毒的根癌农杆菌得到大豆的畸胎瘤苗。

材 料 和 方 法

一、菌株及培养

根癌农杆菌 *A. tumefaciens* Chry5 (pTi Chry5)、*A. tumefaciens* A281 (pTi A281) 和 *A. tumefaciens* T37 (pTi T37) 由美国密苏里大学 Pueppke 教授惠赠。

将测试菌接种在 YEB 培养基 (每升含牛肉膏 5g、酵母膏 1g、蛋白胨 5g、蔗糖 5g, Mg-

* 八五国家自然科学基金资助项目。岳中辉、丁晔参与前期部分工作。

本文于 1993 年 9 月 6 日收到。

This paper was received on Sep. 6, 1993.

SO₄·7H₂O. 2mM. pH7. 2)中,28℃振荡培养过夜,用 PBS 缓冲液稀释菌体,重新悬浮制成 OD₆₂₅=0. 5 的菌悬液,待用。

二、大豆品种

所用栽培 (*Glycine max*) 品种除吉林 8 引自吉林省农科院外均由黑龙江省农科院提供。

三、子叶感染方法

大豆种子用清水洗净,70%乙醇消毒 5 分钟,0. 2%升汞消毒 3 分钟,无菌水清洗数遍,转接水琼脂平板,30℃培育发芽。4 天后,切下子叶,将每片子叶纵向切成大约相等的两份,仅留用没有胚的外侧一份,切掉两端部,与农杆菌共培养 10 分钟,用无菌吸水纸吸干,接到水琼脂平板上,24℃12 小时光照培养。3 天后转接 B₅ 培养基,12 天后观察和测定。

四、胭脂碱测定方法

参照日本京都大学遗传实验中心的方法进行^[12]。

结果与讨论

一、根癌农杆菌的致瘤效应

利用上述方法,用三种根癌农杆菌分别感染 10 个品种的栽培大豆,结果见表 1。

表 1 不同大豆品种子叶的致瘤效应

Table 1 Soybean varietal difference on effectiveness of tumor formation on cotyleon

菌种	<i>A. tumefaciens</i> Chry5			<i>A. tumefaciens</i> A281			<i>A. tumefaciens</i> T37		
	接种数	致瘤子叶数	结瘤率	接种数	致瘤子叶数	结瘤率	接种数	致瘤子叶数	结瘤率
合丰 25	207	198	95%	110	95	86%	105	85	81%
合丰 28	120	108	90%	85	71	84%	65	42	65%
合丰 29	235	200	85%	85	72	85%	65	41	63%
黑农 11	45	42	93%	35	30	86%	35	26	74%
黑农 26	70	68	97%	35	30	86%	35	25	71%
黑农 33	70	68	97%	60	52	87%	50	41	82%
黑农 36	90	85	94%	40	39	95%	50	44	88%
黑农 37	85	80	94%	85	79	93%	40	21	53%
黑河 6	50	46	92%	50	25	50%	40	19	48%
吉林 8	105	85	81%	80	74	93%	40	29	73%

从表 1 可见,大豆子叶为易感染根癌农杆菌的植物组织,三种菌株均获得较高的感染率。其中 Chry5 最佳,略高于 A281, T37 较差。Chry5 感染我国栽培大豆子叶后形成的瘤多在子叶的端部,多数瘤上诱发出发达的不定根、部分不定根上有明显的瘤组织,见图版 I (1-3)。A281 由 pTiBo542 转移到无质粒的 A136 中人工构建而成,对许多种植物,其中包括大豆,有很强的致瘤能力,被称为超毒菌株^[9], Chry5 则完全是一个从自然界的分

离的野生型菌株,它的强致瘤力是被 Benny 和 Pueppke 首先证实的^[8],对美国栽培大豆的强毒性也已被 Pueppke 实验室的 Laszlo 所证实。这种强毒性很可能与它们对酚类化合物乙酰丁香酮高度敏感有关^[6]。Chry5 对我国栽培大豆同样有强致瘤力这是很有意义的。因为它可以作为构建大豆基因工程载体的优良的出发菌株。

所用的 10 个品种的受体,均对 Chry5 有较高的感染率,其中以黑农 26、黑农 33 和合丰 25 为最高,致瘤率均高于对照 A281 和 T37。致瘤效果以合丰 25 为最好,将与菌体共培养的子叶接种在 B₅ 固体培养基上,在不转接的情况下,合丰 25 的结瘤子叶在三个月内存活率仍高达 25%,子叶体积和重量均增长 4 倍。这可能是由于 Ti 质粒上的 T-DNA 容易整合到合丰 25 的染色体基因组上,T-DNA 上所编码的植物生长激素基因得到很好表达所致。

二、胭脂碱检测

分别对 Chry5 感染大豆的子叶和所诱发的冠瘿瘤和瘤上的不定根抽样进行微量纸电泳检测,结果见图版 I(7-9)。从图可见,瘤、根和子叶均含有胭脂碱,但含量较低。Chry5 是同时能代谢胭脂碱和琥珀碱(*Succinamopine*)的菌株,胭脂碱的检出,表明 Chry5Ti 质粒的 T-DNA 区段有可能整合到植物的核基因组中,并得到表达。

三、畸胎致瘤苗的形成

从合丰 25 的冠瘿瘤上分化出两株畸胎瘤苗,分别在感染后的 21 天和 28 天从冠瘿瘤上发出。一株看不到有明显的茎,一片叶,叶柄长 0.3cm,叶长 1.2cm,叶宽 0.9cm。存活 14 天,死亡并溃烂。另一株分化出两条茎,经在 MS 培养基上多次转接,三个月后测量,苗高 2.5cm,顶端生长明显受到抑制。共 12 片叶,最大叶长 1cm,宽 0.5cm。最小叶长 0.2cm,宽 0.1cm。共有 8 条根,最大根长 8.5cm。将一条茎连同叶片切下,扦插在无激素的 MS 培养基里,4 天后开始生根,8 天观察共生根 5 条,最大根长 2.5cm 见图版 I(4-6)。

畸胎瘤是细胞靠瘤的激素生长并进行形态分化而产生的,在一般情况下,畸胎瘤细胞长成无结构的细胞团,但在有利于正常表型发育的情况下,则能通过形态的分化而形成苗^[7]。我们所得到的畸胎瘤苗,第一株具有典型的畸胎瘤苗的特征。第二株则发育出较为正常的小植株。我们推测,这有两种可能:1. 在器官分化过程中,通过机体内部的调整,特别是根与茎维管束的对接,发育成比较正常的植株;2. 可能由未转化细胞在瘤激素的刺激下发育而成。验证工作正在进行。

通常认为毒性高的菌株不能诱导畸胎瘤,因为用高毒菌株进行转化时,可能使畸胎瘤的诱导中断^[7]。我们的实验表明,高毒菌株同样可以诱发畸胎瘤苗,关键在于激素的协调平衡。由于高毒菌株更易获得转化细胞,使激素得到均匀分配,从而有利于器官的分化。

参 考 文 献

- [1] 王连铮、邵启全等,1984,中国科学,B(2):137~140
- [2] 简玉瑜、邵启全等,1985,遗传学报,12(2):113~118
- [3] 邓立平、邵启全等,1986,遗传学报,13(2):160~162
- [4] 董金铎、蒋兴邨等,1990,遗传学报,17(1):13~16
- [5] 蒋兴邨等,1986,遗传学报,13(1):43~47

- [6] 李洪泉等, 1992 年, 微生物学杂志, 东三省微生物学术会议论文汇编 20 页
- [7] G. 卡尔, J. S. 舍尔主编, 1988, 植物肿瘤的分子生物学, 科学出版社, 330~338
- [8] Benny. U. K et al., 1981, Physiol. Plant Pathol. 18, 169~179
- [9] Hood. E. E. et al., J. Bacteriol, 168, 1291~1301
- [10] S. G. Pueppke and Laszlo Kovacs, 1991, Agrobacterium tumefaciens Chry 5 is Supervirulent On Soybean (内部交流)
- [11] S. G. Pueppke and Laszlo Kovacs, 1991, A Hypervirulent Agrobacterium Vector Can Improve transformation efficiency. (内部交流)
- [12] University of Tsukuba, Gene experiment center, 1991, UTGEC training courses manual. 26-27

STUDY ON TUMOR-INDUCED ERACTION OF CHINESE CULTIVAR SOYBEAN INFECTED BY *Agrobacterium Tumefaciens* CHRY5

Li Hongquan Li Hongwei Wang Qian Huang Yongfeng Wang Qingyin

(Harbin Normal University, Harbin, 150080)

Abstract

Study on tumor-induced reaction of 10 Chinese soybean cultivars infected by *A. tumefaciens* Chry5 was carried out. We found that tumor-induced frequencies by Chry5 on 7 cultivars were higher than that of supervirulent strain A281, the induction frequencies on all cultivars were much higher than that of T37. Nopaline was present in adventitious roots and cotyledons of the crown gall tumors induced by Chry5. One cultivar was induced to form teratoma shoots.

Key words Chry5; Chinese soybean cultivars; Tumor-induced; Teratoma shoots

图版说明

图版 1:

1. 黑农 26 的冠瘿瘤; 2. 黑农 33 的冠瘿瘤; 3. 合丰 25 的冠瘿瘤;
 4. 4 和 6 畸胎瘤苗 2 号; 5. 畸胎瘤苗 1 号; 7. 子叶的胭脂碱检测;
 8. 瘤的胭脂碱检测; 9. 根的胭脂碱检测。
- a. 合丰 29; b. 合丰 28; c. 合丰 25; d. 对照; e. 胭脂碱; f. 精氨酸。

SOYBEAN SCIENCE

Vol. 13 No. 2 1994

CONTENTS

- Damage compensation of soybean Yang Fangren et al. (93)
- Effect of salt on agricultural characters and chemical quality of seed in soybeans
..... Chang Ruzhen, Chen Yiwu et al. (101)
- (Varyity environment) Interaction of Tofu processing traits in soybeans.....
..... Zhou Xinan, Zhu Jianchao(106)
- Study on tumor—induced reaction of Chinese cultivar soybean infected by *Agrobac-
terium Tumefaciens* Chry 5 Li Hongquan et al. (112)
- Studies on transformation of seed-germinating embryos of soybean by *A. tumef-
aciens* mediated ipt gene I Wang Qingyin et al. (116)
- The effects of ABT growth promoter on the contents of endogenous hormones and
agronomic characterisitics in soybean Han Tianfu et al. (121)
- Cultural practice of high—yield (300kg/mu) soybean field in North Xinjiang.....
..... Luo Gengtong Ji Liang (127)
- Affection of photoperiod to developmental stage in spring and summer soybeans...
..... Du Weiguang Zhang Guiru et al. (133)
- Study on the photosythetic characters of the high photosynthetic efficiency soyb-
ean VI Ge Qiaoying, Hao Naibin et al. (139)
- Physiological—biochemical characteristics of the three groups of soybean Rhizob-
ia* (I) Li Jun, Ge Cheng et al. (145)
- Molecular verification of soybean foreign DNA introduction to induce earliness
through RAPD technique Li Xichen, Lei Bojun et al. (152)

Review

- The problem countmeasured of soybean follows soybean of follows next crop
in Heilongjiang province Yang Qingkai et al. (157)
- Study survey of soyasaponin in bean Jiao Lianqing, Yu Min et al. (164)

News

- An analysis of isozyme patterns in progenies of soybean received foreign DNA.....
..... Lu Cuihua, Lei Bojun et al. (167)
- The study on induced synthesis HSP of soybean (*G. max*) of different Geogr-
aphical groups I. Wang Ping, Yin Tianfu et al. (171)