

对 1553 个野生、半野生、栽培大豆基因型致瘤及基因转移研究

王连铮 尹光初 罗教芬 雷勃钧

王 剑 姚振纯 李秀兰

(黑龙江省农业科学院)

邵启全 蒋兴邨 周泽其

(中国科学院遗传研究所)

摘 要

从致瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 的 15 个菌系中筛选出 7 个对大豆致瘤效果较好的菌系。找出了大豆结瘤较好的条件。对野生大豆 (*Glycine soja*)、半野生大豆 (*G. gracilis*) 和栽培大豆 (*G. max*) 的 1553 个基因型做了引瘤实验, 从中筛选出 94 个结瘤基因型。从瘤组织中诱导出脱菌的愈伤组织。生化鉴定证明, 上述瘤来源的愈伤组织中有一部分含有胭脂碱。它们分属于野生大豆、半野生大豆和栽培大豆。成功地实现了基因转移。

由于基因工程的研究从一开始就鲜明地显示出直接为生产服务的目的。因此, 近年来植物基因工程的研究相当活跃, 这和作为遗传载体的 Ti 质粒的发现和利用密切相关^[10,4,2]。致瘤农杆菌的 Ti 质粒进到植物组织以后, 可使多数双子叶植物致瘤, 在瘤组织中形成胍基氨基酸衍生物 (Opine), 如章鱼碱 (Octopine), 或胭脂碱 (Nopaline)。致瘤组织的生长可以不需要外源激素^[9]。这是因为 Ti 质粒上的 T-DNA 整合到植物细胞核 DNA 中以后, 在植物组织中产生大量的内源激素^[8]。这为筛选转化了的植物材料提供了方便的实验技术。利用 Ti 质粒作为遗传载体转移基因在检测方面也有方便的地方, 例如 Ti 质粒的 T-DNA 上的与产生 Nopaline 有关的基因活动产物——胭脂碱, 可以通过纸上电泳法准确地测出^[1,7]。正因为有了这些有效的技术, 有人在

* 本研究得到王金陵教授、张国栋付所长, 吴和礼、胡启德付主任的指导和帮助; 杜红、卢翠华、李安生、李全国同志参加部分实验工作, 一并致谢。

烟草上完成了基因转移,现正试图转移目的基因^[5]。许多人正在把这种技术用到研究主要经济作物的改良上,然而还未见到较大突破。我们的研究正是这方面的尝试之一。本研究旨在把植物遗传工程的基本技术用在大豆的品种改良上。这就要求做好致癌农杆菌对大豆基因型致癌作用的筛选,继而追踪异源基因进到大豆基因组以后的命运。这种工作一旦完成,就会同时解决大豆基因工程中的载体和受体的问题。

我国是大豆的原产地,有着极其丰富的品种资源和野生大豆资源。对这些资源进行普遍而广泛的结瘤鉴定,其直接的结果是可以大大地提高品种资源的使用价值。我们就致癌农杆菌对大豆的致癌作用曾有过一个初报^[11]。本文将报导对1500余个大豆基因型致癌筛选的结果和基因转移的情况。

材 料 和 方 法

供试载体材料为致癌农杆菌的15个菌系。其中pTi214、M₃/73、C58、G₁/73、B₃/73、542、A208、A4、233、K₉/73、K27和B₁/73等12个菌系为美国华盛顿大学E. W. Nester教授所提供,其余T₃₇、B₆、ACH₅3个菌系为中国科学院遗传所303组提供。

供试受体材料为栽培大豆984个品种,半野生大豆129个和野生大豆440个基因型。

致癌农杆菌的培养,采用牛肉汁培养基。接种农杆菌后,放在每分钟振荡80次的往复振荡器上培养。试验应用培养2—3天菌液,用注射器直接注射大豆茎的幼嫩部分。

大豆瘤组织经0.1%升汞表面消毒10分钟后,接种在无任何激素的MS培养基上诱导愈伤组织,对瘤组织产生的愈伤组织的生化检测采用了纸上电泳法^[1,7],用紫外荧光的方法观察并照相。

试 验 结 果

1. 致癌农杆菌对大豆的致癌作用

15种致癌农杆菌对栽培大豆和野生大豆的致癌筛选实验结果列入表1。

表1中所列的试验结果表明15个致癌农杆菌菌系对栽培大豆京黄3号、黑龙江11号、黑龙江26号和新黑豆4个品种进行了接种处理共3137株,其中只有B₃/73一个菌系处理254株栽培大豆获得了4个瘤组织,其结瘤率为1.6% (图版3)。其它菌系对这4个品种均无反应。另外用致癌农杆菌的12个菌系对7个野生大豆的基因型(79—0619、79—3301、79—3104、79—4001、79—3202、79—2101和79—2827)进行了处理,其中有7个农杆菌菌系能使野生大豆致癌(图版1),其致瘤率在0.5—11.9%之间,这说明了不同菌系对野生大豆的致癌效果是不同的。

为了进一步证明不同菌种对大豆属的不同致癌作用,我们又采用了T₃₇和C₅₈两个

表 1 不同致瘤农杆菌对栽培大豆、野生大豆的致瘤作用

大豆种	菌种	B ₃ /73	C ₅₈	T ₃₇	M ₈ /73	PTi114	ACH ₅	B ₆	G ₁ /73	542	A ₂₀₈	223	K ₆ /73	B ₁ /73	A ₄	K ₂₇	总计
栽培大豆	处理株数	254	540	646	224	205	296	165	221	33	251	41	190	18	33	0	3137
	结瘤株数	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
	G. max %	1.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.13
野生大豆	处理株数	140	59	213	215	200	172	165	187	171	164	102	56	—	—	—	1844
	结瘤株数	1	7	1	2	0	5	0	0	0	11	0	4	—	—	—	31
	G. soja %	0.7	11.9	0.5	0.9	0	2.9	0	0	0	6.7	0	7.1	—	—	—	1.7

菌种, 对 1553 个栽培大豆、半野生大豆和野生大豆基因型进行了比较实验。结果表明 C₅₈ 对大豆属三个种的致瘤能力强于 T₃₇。它们的共同特点是对半野生大豆致瘤 (图版 2) 能力最强, 其次是栽培大豆, 野生大豆的致瘤能力较差, 只有 0.38% 和 1.04% (表 2)。实验进一步表明不同菌种对大豆属三个种的植株致瘤能力是有差异的。

表 2 T₃₇、C₅₈ 两个菌种对大豆属致瘤反应

实 验 材 料	T ₃₇ 菌 种			C ₅₈ 菌 种		
	接种株数	结瘤株数	%	接种株数	结瘤株数	%
栽培大豆 (G. max)	1035	7	0.68	1035	33	3.19
半野生大豆 (G. gracilis)	820	16	1.95	820	70	8.54
野生大豆 (G. soja)	1820	7	0.38	1820	19	1.04

2. 大豆属不同基因型对致瘤农杆菌的反应

现将对栽培大豆的 984 个品种, 半野生大豆 129 个基因型和野生大豆 440 个基因型进行致瘤筛选的结果列入表 3。

从 984 份栽培大豆中, 筛选出能够接受致瘤农杆菌感染的 25 个基因型而致瘤的占 2.54%; 129 份半野生大豆中筛选出 35 个致瘤基因型, 结瘤的占 27.13%; 从 440 份野生大豆中筛选出 34 个致瘤基因型, 占 7.72%。供试材料共计 1553 份, 从中筛选出 94 份致瘤基因型, 占 6%。按结瘤多少排列, 最多的为半野生大豆, 其次是野生大豆, 最少者为栽培大豆。

表 3 所列资料表明, 大田和盆栽平均结瘤率在大豆属的种间是有区别的。由于在田间接种、温度、湿度条件不易控制, 因而致瘤效果较差, 基因型结瘤率为 0—1.16%, 结瘤株数只有 0—0.19%。而在较易控制温湿度的盆栽条件下接种, 能感染致瘤农杆菌的基因型的比例达 17.03—42.68%, 在半野生大豆中几乎一半的基因型能结瘤。栽培大豆和野生大豆也将近 20% 的材料产生致瘤反应。单株的结瘤率也由大田条件下不到 0.2%, 提高到 2.36—9.14%。这充分表明致瘤作用除了与菌种、基因型有关外, 温湿度等环境条件也影响很大。

表3 大豆的不同基因型对致瘤农杆菌的致瘤反应

大豆种类	栽培条件	接种基因型数目	致瘤基因型数目	%	接种株数	致瘤株数	%
栽培大豆	田间	870	4	0.45	11760	4	0.03
	盆栽	114	21	18.42	2070	84	4.05
G. max	小计	984	25	2.54	13830	88	0.63
半野生大豆	田间	47	0	0	282	0	0
	盆栽	82	35	42.68	1640	150	9.14
G. gracilis	小计	129	35	27.13	1922	150	7.80
野生大豆	田间	258	3	1.16	1548	3	0.19
	盆栽	182	31	17.03	3640	86	2.36
G. soja	小计	440	34	7.72	5188	89	1.71
总计		1553	94	6.05	20940	327	1.56

3. 对大豆瘤组织的培养及异源基因转移的鉴定

我们将一批大豆致瘤组织分批进行人工培养，首批材料在致瘤后20天，接种到无激素的MS培养基上，3天后全部污染。这是因为在幼嫩的瘤组织中，致瘤农杆菌的浓度很大造成的，培养没有成功。在以后的试验中，除进行严格消毒外，还用较老的瘤组织接种。瘤组织切成有1—2毫米直径大小的组织块进行培养。在培养早期将来污染的材料及时转移到新的培养基上，这样及时淘汰大批农杆菌污染材料，保存了部分没有农杆菌的瘤组织块。用这种方法我们获得了栽培大豆、半野生大豆和野生大豆的瘤组织的愈伤组织（图版4—7）。由于培养期间多次转移，培养基中没有任何激素，愈伤组织生长较慢，结构比较紧密，三个月时间能长到直径2—3厘米的愈伤组织块。在无激素培养基上，大豆组织的外植体很难产生愈伤组织，而瘤组织却能在无激素培养基上产生愈伤组织。这就间接地证明在这些愈伤组织中可能含有T-DNA，并整合在基因组中。

基因转移的确切证据需要对坐落在T-DNA上面的与章鱼碱或胭脂碱产生有关的基因活动产物做出直接的测定。为此，我们对在无激素培养基上形成的瘤来源的愈伤组织用纸上电泳法检测了章鱼碱和胭脂碱。结果表明，3个种的大豆瘤来源的愈伤组织中都存在胭脂碱（图版8）。而对照组则没有胭脂碱，这就直接证实了坐落在致瘤农杆菌Ti质粒中的T-DNA上的与产生胭脂碱有关的基因整合在大豆基因组中并能够表达、翻译成氨基酸的衍生物—胭脂碱，从而成功地实现了基因的转移。

讨 论

近年来，在植物基因工程研究上取得了可喜的结果。以烟草为典型材料的研究进展表明，Ti质粒是一个较好的载体。目前人们正在把注意力从烟草转向大豆等主要经济作物上来，然而尚未见重大突破。

大豆基因工程的困难首先是大豆的再生能力不强,其次是缺乏理想的载体。本研究的目的是为了解决这两个问题。从茄科植物上的成功经验来看,再生能力和畸胎瘤之间有一定的相关性。在栽培大豆、半野生大豆和野生大豆的 1553 份品种和品系中已经筛选出 94 份材料,能被致瘤农杆菌感染而结瘤,其中有些是属于光滑型的瘤组织,它们是潜在的畸胎瘤。从而提高了我国丰富的大豆种源的价值。在试验中我们还找到了一种高结瘤率野生大豆基因型,在接种 A_{208} 菌种时,其单株结瘤率高达 50%。除菌种和基因型以外,也提供了结瘤的适宜条件方面的经验。这些结果为最终解决大豆再生能力问题打下了良好的基础。

本文所列事实,初次证明 Ti 质粒在栽培大豆、半野生大豆及野生大豆中都可以成为一个现实可用的基因载体。与产生胭脂碱有关的基因在整合到大豆基因组织后,在愈伤组织多次继代培养过程是稳定的,从而在大豆属中成功地完成了基因转移。

参 考 文 献

- [1] Arts, M. et al. : 1977. Plant Science Letters, 17 : 43—50.
- [2] Braun, A. C., Wood, H. N. : 1976, Proc. Matl. Acad. Sci. USA 73 : 496—500.
- [3] Declene, M. and Deley, J. : 1976, Botanical Review 42 (4) : 389—466.
- [4] Fox, J. L. : 1981. Chemical and Engineering News, 59 (25) : 33—44.
- [5] Kerns, F. A., et al. : 1932. Nature, Vol. 296 : 72—74.
- [6] Lopatin, M. I. : 1936. Mikrobiologia (Moskwa) 5 : 716—724.
- [7] Otten, L. A. and R. A. Schilperoot. : 1978. Biochemica et Biophysica Acta 572 : 496—500.
- [8] Schell, J., Van Montagu, M. : 1977. In "Genetic Interaction Gene Transfer", Brookhaven Symposia in Biology, 29 : 36—46.
- [9] Van Larebeke, N., et al. : 1974. Nature, 252 : 169—170.
- [10] 中国科学院上海植物生理所细胞室编译: 1978,《植物细胞和组织培养》344 页,上海科学技术出版社
- [11] 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 年,第 6 期 45—46 页。

GENE TRANSMISSION AND TUMOR-INDUCTION
FOR 1553 GENOTYPES OF *Glycine soja*,
G. gracilis AND *G. max*

Wang Lianzheng Yin Guangchu Luo Jiaofen Lei Bojun Wang Jian

Yao Zhenchun Li Xiulan

(*Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences*)

Shao Qiquan Jiang Xingcun Zhou Zeqi

(*Institute of Genetics, Academia Sinica*)

Abstract

Seven strains of *Agrobacterium tumefaciens* with best tumor-inducing effect for soybean were screened from 15 strains. Best conditions of tumor-formation for soybean were found out 94 tumor-formation genotypes were screened from 1553 genotypes of wild soybean (*G. soja*), semi-wild soybean (*G. gracilis*) and cultivated soybean (*G. max*). The kind of calluses contained nopaline for all three species above mentioned. Transmission of gene for soybean was successful.

王连铮等：对 1553 个野生、半野生、栽培大豆基因型致瘤及基因转移研究 图版 I

