

中国转基因大豆的研究进展及其产业化

余永亮,梁慧珍,王树峰,练云,位艳丽,王庭峰

(河南省农业科学院 经济作物研究所,国家大豆改良中心郑州分中心,河南 郑州 450002)

摘要:大豆的转基因研究是国内植物分子生物学研究的热点之一。转基因大豆已成为世界大豆主产国大豆产业发展的主要动力。我国应该借鉴国外转基因大豆发展经验,立足已有的技术、人才和材料储备,在农业转基因生物安全管理等相关法律、政策下,完善和健全我国转基因大豆技术及其产业化体系。大力发展我国转基因大豆,可以降低生产成本,提高种植效益,提升我国大豆产业的市场竞争力、保障国家粮食安全、促进农民增收。该文概述我国转基因大豆技术的研究进展及其产业化现状,并对其发展前景进行了探讨和展望。

关键词:转基因大豆;再生体系;遗传转化;外源基因;产业化

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2010)01-0143-08

Research Progress and Commercialization on Transgenic Soybean in China

YU Yong-liang, LIANG Hui-zhen, WANG Shu-feng, LIAN Yun, WEI Yan-li, WANG Ting-feng

(Institute of Industrial Crops, Henan Academy of Agricultural Science, Zhengzhou Subcenter of National Center for Soybean Improvement, Zhengzhou 450002, Henan, China)

Abstract: Soybean transformation research is a "hot spot" in the area of plant molecular genetics. Transgenic soybean has become the important power of soybean's industry development in the world's major producers of soybean. By using its own technology, personnel and materials under the related laws and policies of agricultural genetically modified bio-safety management and drawing on the experience of other countries, China should consummate and improve the technology and the industrial production system of transgenic soybean. The development of transgenic soybean is of importance for enhancing market competitive of soybean industry in China, strengthening national food security and increasing farmer's income by decreasing production cost, improving economic returns and promoting science and technology advancement. The status of research and commercialization on transgenic soybean technology was summarized, and its future development and prospects was discussed.

Key words: Transgenic soybean; Regeneration system; Genetic transformation; Exogenous gene; Commercialization

大豆是重要的油料作物和高蛋白粮饲兼用作物,含有丰富的蛋白质、脂肪和多种人体有益的生理活性物质,是蛋白质、油脂及保健活性物质的重要来源,又是食品、饲料等多种加工工业的优质原料。近年来,我国大豆面临着国际市场廉价大豆产品(特别是转基因大豆产品)大量进口的压力与挑战,直接导致国内大豆价格不断下降,种植效益明显下滑,使我国失去了发展大豆产业的掌控权,并对数千万大豆产区从业人口的生计造成威胁。在发展中国家,人口增长和食物短缺的矛盾日益尖锐,同时伴随着耕地减少、生物种植和生存环境的恶化,转基因技

术是解决这些问题的最有效途径。在发达国家,转基因作物的种植已经产生了巨大的经济效益。因此大力发展我国具有自主知识产权的转基因大豆迫在眉睫。

近年来,由于转基因技术突破了生物物种间遗传物质转移和交换的天然屏障,使人类从对生物的简单认识和利用进入了可以按自己的意愿改造和创造新种质的时代^[1]。转基因技术打破了常规育的各种局限^[2],并且得到迅猛发展和不断完善,现已成为大豆品质改良育种主要的且最有前途的技术手段^[3]。自从世界第一例转基因烟草 1983 年在美国

收稿日期:2009-09-28

基金项目:引进国际先进农业科学技术计划资助项目(2009-Z34);转基因生物新品种培育科技重大专项资助项目(2008ZX08004-005; 2009ZX08018-001B)。

第一作者简介:余永亮(1979-),男,助理研究员,硕士,研究方向为大豆品质遗传改良与分子育种。

通讯作者:梁慧珍,研究员,博士。E-mail:lhzh66666@163.com。

问世以来,国际上已有 30 多个国家批准了数千例转基因植物进入田间试验,涉及的植物种类达 40 多种。1994 年 5 月,美国孟山都公司培育的抗草甘膦除草剂转基因大豆首先获准在美国商业化种植。1997 年,杜邦公司获得美国食品药品监督管理局批准推广种植高油酸(70%)转基因大豆。1998 年 AgrEvo 公司研制的抗草丁膦大豆被批准进行商业化生产([http://biology. aweb. com. cn/news/2007/8/30/15050899. shtml](http://biology.aweb.com.cn/news/2007/8/30/15050899.shtml))。转基因大豆品种的育成和推广是世界大豆科技史上具有里程碑意义的重大突破,产生了巨大的经济效益和广泛而深远的社会影响,已成为世界大豆生产发展的主流趋势。目前我国已正式批准棉花、西红柿、烟草和牵牛花 4 种转基因作物进行商业化生产,但真正商业化生产的转基因作物只有棉花,转基因水稻的安全评价已经进入到了最后阶段。转基因大豆、玉米等转基因作物正处于中间试验和环境释放试验阶段,进入商业化推广的准备阶段。该文综述我国转基因大豆遗传转化再生体系、遗传转化方法、目的基因类型的研究进展及其产业化现状,并就我国转基因大豆的未来发展前景进行了展望。

1 大豆遗传转化再生体系研究

近些年来,以重组 DNA 技术和植物离体再生技术为基础的植物基因工程在大豆上的研究倍受青睐,为外源基因导入大豆提供了有效的受体系统,大大推动了大豆遗传转化等基因工程的研究工作。大豆再生体系建立的主要工作是进行原生质体和单细胞培养等大豆的组织培养研究,是大豆转基因研究的关键所在。虽然未成熟子叶、未成熟胚、胚轴、子叶节、胚性悬浮培养物(细胞团)、子房和原生质体等都可以作为大豆遗传转化的受体系统,但由于其受体系统与转化方法的匹配性较差,致使大豆诱导再生植株频率较低,重复性较差;其次由于大豆对农杆菌十分敏感,一经感染,难以从特殊组织或细胞再生植株,因此,大豆是遗传工程最困难的作物之一。目前大豆遗传转化的受体系统主要有不定芽器官发生途径、体细胞胚胎发生途径和原生质体途径 3 种,各种受体系统的研究正逐步深入和不断优化。

1.1 不定芽器官发生再生体系

陈云昭等^[4]以大豆上胚轴和下胚轴为外植体培养出再生植株。程林梅等^[5]以大豆上胚轴、下胚轴、幼胚等作为不同外植体,通过器官发生途径均获

得再生植株。周思君等^[6]通过大豆幼胚培养诱导器官发生,获得了再生植株。王生吉等^[7]利用不同大豆品种的顶芽、胚轴、子叶节、子叶、叶片等做为外植体,进行组织培养再生研究。结果表明,不同大豆品种诱导分化芽的能力差别较大,选择再生频率高的基因型、外植体和培养基对大豆组织培养很重要。各项研究表明,不同的外植体再生频率差异较大,其中以子叶节的再生频率较高,常被作为农杆菌介导转化的受体材料。以子叶节再生系统为代表的大豆不定芽器官发生再生体系,相对于体细胞胚胎发生再生体系和原生质体再生体系,它具有对农杆菌“敏感性”较高、取材不受季节限制、组培时间短、外植体来源广、转化再生植株育性好、易成活等优点,是大豆基因工程理想的受体系统。但转化后代嵌合现象严重,鉴定、筛选、传代、纯化工作量较大,不同基因型间诱导植株再生效果差异较大。

1.2 体细胞胚胎发生再生体系

国外对体细胞胚胎发生再生体系研究较早且获得了高频率的再生植株。Christionson 等^[8]1983 年观察到了大豆细胞悬浮培养时体细胞胚胎发生。Lazzeri 等^[9]1985 年用 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 诱导了大豆未成熟子叶的体细胞胚胎发生,获得了再生植株。此后,Lazzeri、Lee、Finer 等^[10-12]也均对体细胞胚胎发生再生体系进行了系列研究和改进优化。刘博林等^[13]通过提高植物生长激素浓度和蔗糖浓度来优化培养条件,建立了一种再生频率较高的大豆植株再生的方法。王萍等^[14]研究表明,大豆未成熟子叶诱导体细胞胚胎发生主要与未成熟子叶长度有关,接种时最佳取荚时间与品种的成熟期有关。李海燕、王晓春等^[15-16]也对体细胞胚胎发生再生体系及其体细胞胚诱导因素进行了相关性研究。体细胞胚胎是基因枪转化较为理想的转化受体,为目前大豆转化适宜的受体再生体系。体细胞胚胎发生再生体系的外植体取材、发生机理及其分子基础还需进一步探究。

1.3 原生质体再生体系

植物原生质体比较容易摄取外来遗传物质,是遗传转化的理想受体,为细胞水平、分子水平上的遗传操作提供了理想的实验体系。植物原生质体再生体系在遗传工程研究和植物分子育种方面具有重要的意义,是克服转化植株嵌合性最有效途径之一。卫志明^[17]和张贤泽等^[18]利用原生质体再生体系均获得了再生植株。肖文言等^[19]经大豆幼胚子叶原

生质体培养获得再生植株。由于原生质体再生频率较低、操作较为复杂、不同基因型差异很大,可重复性差以及原生质体再生植株易发生变异现象等缺点,近年来鲜有研究报道,但实践证明通过原生质体获得再生植株的途径是可行的,可为大豆遗传转化受体系统的研究提供依据。

2 大豆遗传转化技术研究

以前转基因工作的重点主要是在一些模式植物(如烟草、番茄、矮牵牛、拟南芥菜等)上,随着植物分子生物学和转基因技术的迅猛发展,近年内以实用为目标的研究数目大大增加,导致植物基因工程向一些重要粮食和豆科作物遗传改良的实用化目标迈进。随着转基因作物种植面积的日益扩大,遗传转化技术在作物新品种培育、基因功能研究等领域中的作用越来越大。应用于大豆育种上的转基因技术方法主要有:农杆菌介导法、花粉管通道法、基因枪法、电击法、PEG 转化法、超声波法等。经过多年的实践和优胜劣汰,多数遗传转化方法已被逐步放弃,目前国外大豆的转基因方法主要以农杆菌介导法、基因枪法为主;国内主要是超声波辅助农杆菌转化法和花粉管通道法。基因枪介导法在小麦中应用的最多,其次是玉米和水稻。其优点是不受受体植物范围的限制,而且其载体质粒的构建也相对简单,但基因枪介导法存在转化效率比较低,插入外源 DNA 的片段大小不明确,多拷贝整合比较多,容易发生基因沉默现象,不利于外源基因在宿主植物的稳定表达等缺点,而且成本高,操作比较复杂,在实际应用中有一定局限性^[20];花粉管通道法在我国有很多成功的事例,利用花粉管通道法,我国已获得一批高油、高蛋白、高产的优良大豆品种及株系^[21-24],具有很强的实用性。

农杆菌介导法是获得第一个转基因植物的方法,迄今为止,农杆菌介导法获得的转基因植物占转基因植物总数 85% 左右,它已成为植物基因转化的首选方法。农杆菌是革兰氏阴性土壤杆菌,目前与植物基因转化有关的 2 种类型为:根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)和发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*),分别含有 Ti 质粒和 Ri 质粒。在植物基因工程中,利用根瘤农杆菌介导的遗传转化最多。根瘤农杆菌具有趋化性,侵染受体时,在植物受伤组织产生的一些糖类和酚类物质诱导下,向受伤组织集中,通过供体和受体特异互作,农杆菌细胞

识别并附着到植物细胞表面,将 Ti 质粒上的一段 T-DNA 片段导入植物细胞基因组中。农杆菌介导的遗传转化,通常以单拷贝或者低拷贝的形式将外源基因插入到植物基因组,转育周期短、重复性好、基因沉默现象少、组织培养简单^[25-27],但是转化和再生受体材料基因型限制^[28]。

国外大豆遗传转化领域的研究起步较早且成功报道很多,1988 年 Hinchee 等^[29]首次利用农杆菌介导法将 *npt II* 基因和草甘膦抗性基因导入大豆,获得了转基因植株;Christou 等^[30]利用基因枪转化未成熟幼胚获得了只含 *gus* 基因和含 *gus* 及 *npt II* 基因的转基因植株;Parrot 等^[31]用含有 *npt II* 基因和玉米醇溶蛋白基因的农杆菌、Di 等^[32]用含有 BPMV 外壳蛋白基因的农杆菌浸染大豆,也都获得了转基因植株;Finer 等^[33]、Sato 等^[34]也都利用基因枪转化法获得了大豆再生植株。我国大豆遗传转化研究相比国外起步较晚,但已取得了很大的进步。王连铮等^[35-36]开展的大豆遗传转化研究拉开了我国转基因大豆研究的序幕;徐香玲等^[22]利用农杆菌介导法将大豆花叶病毒外壳蛋白基因转入了大豆植株;南相日^[37]等通过 PEG 介导转化大豆原生质获得了转 *Bt* 基因的植株;黄健秋等^[38]利用改良的 PEG 介导法对大豆未成熟子叶原生质体进行 *PSBA* 基因转化,检测到了其稳定表达;卜云萍等^[39]采用农杆菌介导的大豆子叶节系统成功将深黄被孢酶 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因导入大豆;Xing 等^[40]通过构建二段 T-DNA 的双元表达载体,获得了无筛选标记的转基因大豆植株;王罡等^[41]研究了大豆基因型对根癌农杆菌的敏感性,认为不同大豆基因型对根癌农杆菌的敏感性存在显著差异;雷勃钧等^[42]通过花粉管通道法直接导入外源 DNA,育成了高产、优质、高蛋白大豆新品种“黑生 101”。

近几年来,我国已经初步建立了主要禾本科粮食作物农杆菌介导的转化体系,但现有遗传转化体系仍然存在周期长、转化率低、稳定性和重复性差、基因型限制等突出问题,转化效果极大地依赖于物种、基因型、外植体以及其它一些未知因素。虽然双子叶植物是农杆菌的天然宿主,但是农杆菌介导的大豆转化仍然存在一定程度的基因型特异性,由于大豆的组织培养再生植株困难及组培受体系统与转化方法匹配的局限性,成为开展大豆转基因育种工作的主要瓶颈。今后,在探索高效、稳定、简易的基因转化新方法,新型无选择标记技术,基因删除技术

等安全转基因技术方法,叶绿体等新型转基因技术,新型多基因转基因技术方法;建立并优化简单、高效、稳定的基因转化体系;建立成熟、可靠、高频率的再生体系,提高大豆遗传转化效率;开发新型安全大豆选择标记(包括可视选择标记)等方面,还需进行深入研究。

3 转入大豆的外源基因类型

大豆中导入的外源基因主要是解决其高产、优质、抗逆和抗病虫等问题。目前,应用于大豆转基因研究的外源基因除 *gus*、*npt II*、*hyg*、*gfp* 等标记基因和报告基因外,还涉及以下几种:抗除草剂、抗病毒、抗虫、抗逆境、品质(脂肪、蛋白、生物活性物质)改良、雄性不育、改变花形和花色等。我国转基因大豆的研究多是围绕对转基因植株进行抗性标记筛选、PCR 检测、Southern 杂交和部分抗性基因的功能检测开展的,研究广度和深度不够。不仅缺乏具有自主知识产权的载体和像 *Bt* 和 *EPSP* 基因一样具有重大应用前景的基因,而且基因转化和筛选效率较低^[43],所转化的外源基因多为单个基因,今后转入双价抗虫(或抗病)基因是大豆转基因的一个方向。

3.1 抗除草剂基因

抗除草剂基因的研究是目前大豆转基因研究中最成功的,它往往是与光谱高效除草剂的研究相结合的,利用的基因主要有二类,一类是可以改变除草剂靶物敏感性的基因,另一类是除草剂解毒基因,包括来自农杆菌的 *CP4EPSPS*、*pat* 和 *psbA* 基因等。目前应用面积较大的是抗草甘膦除草剂的转基因大豆品种,其次是抗草铵膦品种,此外还有抗磺酰脲类除草剂(绿磺隆、氯嘧磺隆等)品种。由于草甘膦具有高效、安全、无残留、杀草谱广的突出优点,使种植者大大地降低了除草成本,而获得丰厚的经济效益。国外通过基因枪转化获得的抗草铵膦转基因大豆新品种 A-27-04-14、A5547-127 分别含 2 个、1 个 *pat* 基因,1997 年经营养、环境安全评价后申请进入商业化生产^[44]。我国获得的转基因抗阿特拉津大豆,是我国最早的转基因抗除草剂作物^[45]。

3.2 抗虫基因

大豆抗虫转基因研究涉及到来自苏云金杆菌的 *Bt* 基因和豇豆胰蛋白酶基因。徐香玲等^[22]以 Ti 质粒为介导,将 Pkt54B7C5 质粒上的 B、t、K^δ 内毒素蛋白基因导入东北大豆“黑农 37”、“黑农 39”等品种;郭三堆等^[46]将构建成的带有 *CryIA* 和 *Cpti* 2 个基因

的 pGB14ABC 植物高效表达载体,通过花粉管通道法,获得了有较好抗虫能力的再生植株;苏彦辉等^[47]用 *Bt* 基因和 *GUS* 基因通过基因枪和根瘤土壤杆菌介导转入主栽大豆品种中获得了再生植株;高越峰等^[48]利用 RT-PCR 方法扩增出大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂基因单一目的片段 DNA 并成功克隆且转化到烟草中去,获得了具有明显抗棉铃虫能力的转基因烟草。

3.3 抗病基因

抗病基因研究主要是病毒外壳蛋白(virus coat protein)基因和几丁质酶基因。近年来,人们已相继克隆了 *SMV CP* 基因、*NIB* 基因、*NIA* 基因,并构建植物表达载体 PsmI 24 等转化土壤农杆菌^[49-51],获得转基因大豆(或烟草)植株;徐香玲等^[52]利用农杆菌介导法将几丁质酶基因导入东农 37 号、吉林 28 号大豆中用于抗大豆真菌病害的研究;刘德璞等^[53]通过花粉管介导法,将具有高抗花叶病的外源 DNA 导入大豆基因组中获得抗 SMV 的大豆新品系。

3.4 抗逆境基因

目前已分离出大量与抗逆代谢相关的基因,包括与抗(耐)寒有关的脯氨酸合成酶基因、鱼抗冻蛋白(*AFP*)基因、拟南芥叶绿体 3-磷酸甘油酰基转移酶基因,与抗旱有关的萆蜜糖合成酶基因及一些植物去饱和酶基因等。中国在抗逆基因的分离、克隆和转化等方面的研究已取得一定进展,克隆了耐盐碱相关基因,但多运用在烟草、番茄、小麦、玉米等作物上,在大豆上鲜有报道^[54]。

3.5 品质基因改良

分子生物学的迅速发展,使转基因作物(Genetically Modified Organism Crops)正从以改善作物间接性状(抗除草剂、抗病、抗虫、抗逆等)为主的第 1 代向以改善品质特性(营养组成和含量等)为主的第 2 代转换。品质改良主要涉及蛋白质的含量、氨基酸的组成、淀粉和其它多糖化合物以及脂类化合物的组成。富含蛋氨酸的转基因烟草、直链淀粉含量降低的转基因水稻、月桂酸含量高达 40% 的转基因油菜都相继成功,有的已进入大田试验^[55]。

应用生物技术改良大豆脂肪酸组成就是大豆基因工程育种的成功范例,目前商业化的有关品质改良的转基因大豆已有高油酸大豆和高硬脂酸转基因大豆^[56]。最近国外转 Δ^2 脂肪酸脱氢酶基因(*FAD2-1*)基因大豆^[57-58]及其它相关品质基因的改良研究^[59-64]正在深入,有的品种已获推广并开始大面积

种植。国内的李明春等^[65] 将从高山被孢霉 (*Mortierella alpina*) 中分离出的 Δ^6 脂肪酸脱氢酶基因成功转化, 获得了高 γ -亚麻酸含量的转基因大豆。刘兰英等^[66] 将构建 35S 启动子和水稻 10KD 富硫醇溶蛋白基因双拷贝的表达载体 PBIN - OKEM, 利用根癌农杆菌介导法转化大豆子叶、子叶节, 将目的基因整合到大豆基因组中。

4 转基因大豆产业化现状

转基因大豆是世界上最早商品化、推广应用速度最快的转基因作物。国际农业生物技术应用服务组织 (ISAAA) 2008 年 2 月 13 日公布的年度报告显示, 2007 年全球转基因作物的种植面积达到 1.143 亿 hm^2 , 是 1996 年的 67 倍, 占全球作物种植总面积 15 亿 hm^2 的 8%。其中转基因大豆依然是种植最广泛的转基因作物, 占全球转基因作物总种植面积的 57% (5860 万 hm^2), 占大豆总播种面积的 64%。转基因大豆成为世界大豆主产国大豆产业发展的主要动力。目前, 转基因大豆正以不可逆转的势头迅猛发展, 其产量已经超过世界大豆总产量的 50% 以上。虽然抗除草剂转基因已用于商业化生产, 高油酸、高赖氨酸转基因大豆已进入大田试验, 但大豆转基因研究仍有较多的不足, 如存在转基因研究涉及的目的基因不多、遗传转化效率较低、外源基因定向插入、表达时间、位置、表达量及转基因农产品安全性等问题。作为世界第 4 位大豆主产国, 我国转基因大豆的研究却尚在起步阶段, 转基因大豆育种一定程度上还处于转基因安全性评价的中试和环境释放阶段, 未能实现转基因大豆的商业化生产和大面积示范推广。

5 展望

目前, 我国已初步建立了转基因生物安全管理技术体系, 制订了一系列法规、规范和标准, 为转基因大豆环境和食用安全的检测、监测以及大豆产品转基因成分提供了可靠的技术规范和标准。我国已获得一批具有自主知识产权的关键基因, 逐步优化了大豆遗传转化体系, 获得了一批具有潜在应用价值的转基因材料, 建立了安全评价和检测监测技术体系。中国大豆产业应和其它主要农作物一样, 大力加强大豆转基因生物技术的研发, 早日创造出具有中国特色和自主知识产权的、已建立高效、稳定的大豆遗传转化受体系统的安全的转基因大豆。发展转基

因大豆有利于改革耕作制度, 降低生产成本, 提高种植效益, 对于提升我国大豆产业的市场竞争力、保障国家粮食安全、促进农民增收具有重要意义。

参考文献

- [1] 张兆熙. 转基因技术的研究综述及利弊关系[J]. 科技创业, 2006(11):111-112. (Zhang Z X. Summary of study with advantages and disadvantages relations analysis on transgenic technology [J]. Pioneering with Science & Technology Monthly, 2006(11): 111-112.)
- [2] 杨桂英, 马绍宾, 何瀚. 大豆的遗传特点、品质改良与育种难点[J]. 贵州农业科学, 2002, 30(6):57-60. (Yang G Y, Ma S B, He H. Genetic characters, quality amelioration and difficulties in breeding of soya[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2002, 30(6): 57-60.)
- [3] Cahoon E B. Genetic enhancement of soybean oil for industrial uses; Prospects and challenges[J]. AgBioForum, 2003, 6(1&2): 11-13.
- [4] 陈云昭, 王玉国. 大豆外植体培养再生植株的研究[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 1983(1):41-45. (Chen Y Z, Wang Y G. Study on the regeneration of explants of soybean [J]. Journal of Shanxi Agricultural University (Nature Science Edition), 1983(1):41-45.)
- [5] 程林梅, 孙毅, 刘少翔, 等. 大豆不同外植体植株再生的研究[J]. 中国油料作物学报, 1998, 20(2):24-25. (Cheng L H, Sun Y, Liu S X, et al. Study on the regeneration of various explants of soybean [J]. Chinese Journal of Oil Crop Scieives, 1998, 20(2): 24-25.)
- [6] 周思君, 尹光初, 雷勃钧, 等. 从大豆幼胚诱导器官发生再生植株[J]. 大豆科学, 1990, 9(4):285-290. (Zhou S J, Yin G C, Lei B J, et al. Plant regeneration from immature embryos culture of soybean via organogenesis [J]. Soybean Science, 1990, 9(4): 285-290.)
- [7] 王升吉, 吴元华, 王洪岩, 等. 大豆不同外植体组织培养及再生研究[J]. 沈阳农业大学学报, 1999, 30(3):255-259. (Wang S J, Wu Y H, Wang H Y, et al. Studies on the regeneration of tixue culture of different exophytes in soybean [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 1999, 30(3):255-259.)
- [8] Christianson M L, Warineck D A, Carlson P S. A morphogenetic competent soybean suspension culture [J]. Science, 1983, 222: 632-634.
- [9] Lazzari P A, Hildebrand D F, Collins G B. A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean [J]. Plant Molecular Biology Reports, 1985, 3:160-167.
- [10] Lazzari P A, Hildebrand D F, Collins G B. Soybean somatic embryogenesis; Effects of hormones and culture manipulations [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1987, 10:197-208.
- [11] Lee W, Komatsuda T, Oka S. Comparison of embryogenesis efficiency on eight portions immature embryos in *Glycine gracilis* [J]. Soybean Genetics Newsletter, 1990, 17:59-61.

- [12] Finer K R, Finer J J. Use of *Agrobacterium* expressing green fluorescent protein to evaluate colonization of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation-treated soybean cotyledons [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2000, 30:406-410.
- [13] 刘博林, 徐民新. 两个栽培大豆品种的体细胞胚胎发生和植株再生的研究[J]. *中国油料作物学报*, 1999, 21(2):11-13. (Liu B L, Xu M X. Study on somatic embryogenesis and plant regeneration of two commercial soybean cultivars [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 1999, 21(2):11-13.)
- [14] 王萍, 吴颖, 杨武杰, 等. 大豆未成熟子叶体细胞胚胎发生及其相关因子的分析[J]. *中国油料作物学报*, 2002, 24(1):29-32. (Wang P, Wu Y, Yang W J, et al. Somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean and analysis of correlative factors [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2002, 24(1):29-32.)
- [15] 李海燕, 朱延明, 冯莹莹, 等. 大豆幼胚子叶胚性悬浮细胞系的建立与次生胚诱导[J]. *大豆科学*, 2002, 21(2):123-126. (Li H Y, Zhu Y M, Feng Y Y, et al. Establishment of embryogenic suspension with immature cotyledons of soybean (*Glycine max* (L) Merr.) and induction of secondary embryos [J]. *Soybean Science*, 2002, 21(2):123-126.)
- [16] 王晓春, 王罡, 季静. 农杆菌介导的大豆体细胞胚遗传转化影响因子的研究[J]. *大豆科学*, 2005, 24(1):21-26. (Wang X C, Wang G, Ji J. The factors influencing genetic transformation system in somatic embryos of soybean mediated by *agrobacterium* [J]. *Soybean Science*, 2005, 24(1):21-26.)
- [17] 卫志明. 大豆原生质体培养再生植株[J]. *植物生理学通讯*, 1988(2):53-54. (Wei Z M. Plant regeneration from protoplast of soybean [J]. *Plant Physiology Communications*, 1988(2):53-54.)
- [18] 张泽贤, 小松田隆夫. 大豆原生质体经体细胞胚胎再生植株[J]. *中国科学(B辑)*, 1993, 23(2):154-158. (Zhang Z X, Takao Komatsuda. Plant regeneration from somatic embryogenesis of soybean protoplast [J]. *Science in China (Series B)*, 1993, 23(2):154-158.)
- [19] 肖文言, 王连铮. 大豆幼荚子叶原生质体培养及植株再生[J]. *作物学报*, 1994, 20(6):665-669. (Xiao W Y, Wang L Z. Protoplast culture and plant regeneration of immature cotyledons of soybean (*Glycine max* L.) [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 1994, 20(6):665-669.)
- [20] 王芳, 朱洪德, 李伟. 转基因技术在大豆育种中的应用[J]. *黑龙江农业科学*, 2007(1):90-92. (Wang F, Zhu H D, Li W. Application of transgenic technology in soybean breeding [J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2007(1):90-92.)
- [21] 赵丽梅, 刘德璞, 孙寰, 等. 外源 DNA 导入大豆获得一不育材料[J]. *大豆科学*, 1995, 14(1):83-87. (Zhao L M, Liu D P, Sun H, et al. A sterile material of soybean gained by introducing exogenous DNA [J]. *Soybean Science*, 1995, 14(1):83-87.)
- [22] 徐香玲, 高晶, 刘伟华, 等. Ti 质粒介导的 B、t、K^ε 内毒素蛋白基因转化大豆的初步研究[J]. *大豆科学*, 1997, 16(1):6-8. (Xu X L, Gao J, Liu W H, et al. Studies on transferring B. t. K^ε endotoxin gene into soybean with Ti-plasmid primaril [J]. *Soybean Science*, 1997, 16(1):6-8.)
- [23] 雷勃钧. 外源 DNA 直接导入 (DIED) 法的大豆分子育种成效 [J]. *大豆科学*, 2001, 20(1):26-29. (Lei B J. Soybean breeding effective method- DIED [J]. *Soybean Science*, 2001, 20(1):26-29.)
- [24] 江巨鳌, 麻浩, 周治森, 等. 应用改良浸种法将外源 DNA 导入大豆的遗传育种效应研究 [J]. *湖南农业科学*, 2004(2):10-13. (Jiang J A, Ma H, Zhou Z M, et al. Genetic and breeding effects of introduction of exogenous DNA into soybeans by improved seed-soaking method [J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2004(2):10-13.)
- [25] Zhao Z Y, Gu W, Cai T, et al. Molecular analysis of T₀ plants transformed by *Agrobacterium* and comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation with bombardment transformation in maize [J]. *Maize Genet Coop Newsl*, 1998, 72:34-37.
- [26] Dai S H, Zheng P, Marmey P, et al. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment [J]. *Molecular Breeding*, 2001, 7:25-33.
- [27] Shou H X, Frame B R, Whitham S A, et al. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation [J]. *Molecular Breeding*, 2004, 13(2):201-208.
- [28] Meurer C A, Dinkins R D, Collins G B. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation [J]. *Plant Cell Reports*, 1998, 18:180-186.
- [29] Hinchee M A W, Comer-Ward D V, Newell C A. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer [J]. *Bio/Technology*, 1988, 6:915-922.
- [30] Christou P, Swain W F, Yang N S, et al. Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants [J]. *Proc. Natl. Academy Science USA*, 1989, 86:7500-7504.
- [31] Parrot W A, Hoffman L M, Hildedbrand D F, et al. Recovery of primary transformants of soybean [J]. *Plant Cell Reports*, 1989, 7:615-617.
- [32] Di R, Purcell V, Collins G B, et al. Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene [J]. *Plant Cell Reports*, 1996, 15:746-750.
- [33] Finer J J, McMullen M D. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue [J]. *In Vitro Cell and Develop Biol-Plant*, 1991, 27:175-182.
- [34] Sato S, Newell C, Kolacz K, et al. Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems [J]. *Plant Cell Reports*, 1993, 12:408-413.
- [35] 王连铮, 尹光初, 罗教芬, 等. 大豆致瘤及基因转移研究 [J]. *中国科学(B辑)*, 1984, 2:137-142. (Wang L Z, Yin G C, Luo J F, et al. Research on tumorigenic response and gene transferring in soybean [J]. *Science in China (Series B)*, 1984, 2:137-142.)
- [36] 王连铮, 尹光初, 罗教芬, 等. 大豆基因转移高蛋白受体系统的建立 [J]. *大豆科学*, 1984, 3(4):297-301. (Wang L Z, Yin G C, Luo J F, et al. Establishment of high protein recipient system of gene transmission in soybean [J]. *Soybean Science*, 1984, 3(4):

- 297-301.)
- [37] 南相日,刘文萍,刘丽艳,等. PEG 介导 *Bt* 基因转化大豆原生质体转基因植株[J]. 大豆科学,1998,17(4):326-329. (Nan X R, Liu W P, Liu L Y, et al. PEG-mediated transformation and regeneration of soybean protoplast with *Bacillus Thuringiensis* *crgiac* gene[J]. Soybean Science, 1998, 17(4):326-329.)
- [38] 黄健秋,卫志明,许智宏. *PSBA* 基因在大豆未成熟子叶原生质体中的表达[J]. 植物学报,1992,34:26-30. (Huang J Q, Wei Z M, Xu Z H. Expression of *PSBA* gene in immature cotyledon protoplasts of soybean[J]. Plant Journal, 1992, 34:26-30.)
- [39] 卜云萍,王广科,胡国武. 深黄被孢酶 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因导入大豆[J]. 生物技术,2003,13(3):6-8. (Bu Y P, Wang G K, Hu G W. Introduction of Δ^6 -fatty acid desaturase gene from *Mortierella isabellina* into soybeans by *Agrobacterium* infection[J]. Biotechnology, 2003, 13(3):6-8.)
- [40] Xing A, Zhang Z, Shirley S, et al. The use of the two T-DNA binary system to drive marker-free transgenic soybeans[J]. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 2000, 36:456-463.
- [41] Wang G, Wang P, Lin Y, et al. The studies of sensitivity of genotypes in soybean to line of *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Hereditas (Beijing), 2002, 24(3):297-300.
- [42] 雷勃钧,钱华,李希臣,等. 通过直接导入外源 DNA 育成高产、优质、高蛋白大豆新品种黑生 101 [J]. 作物学报,2000, 26(6):725-730. (Lei B J, Qian H, Li X C, et al. Breeding of a high-yielding, high quality and high-protein content soybean cultivar Heisheng 101 through direct introduction of alien DNA[J]. Acta Agronomica Sinica, 2000, 26(6):725-730.)
- [43] 邱丽娟,王昌陵,周国安,等. 大豆分子育种研究进展[J]. 中国农业科学,2007,40(11):2418-2436. (Qiu L J, Wang C L, Zhou G A, et al. Soybean molecular breeding[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(11):2418-2436.)
- [44] Dhir S K, Dhir S, Savka M A, et al. Regeneration of transgenic soybean (*Glycine max*) plants from electroporated protoplasts[J]. Plant Physiology, 1992, 99:81-88.
- [45] 梁雪莲,王引斌,卫建强,等. 作物抗除草剂转基因研究进展[J]. 生物技术通报,2001(2):17-21. (Liang X L, Wang Y B, Wei J Q, et al. The progress of studies on herbicide resistance gene of crop[J]. Biotechnology Information, 2001(2):17-21.)
- [46] 郭三堆,武东亮,崔洪志,等. 转双价抗虫基因大豆的研究[J]. 云南大学学报,1999, 21:125. (Guo S D, Wu D L, Cui H Z, et al. Development of bivalent insectresistant transgenic soybean plants[J]. Journal of Yunnan University, 1999, 21:125.)
- [47] 苏彦辉,王慧丽,俞梅敏,等. 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白导入大豆的研究[J]. 植物学报,1999,41(10):1046-1051. (Su Y H, Wang H L, Yu M M, et al. Studies on transfer of *Bt* gene into *Glycine max* [J]. Acta Botanica Sinica, 1999, 41(10):1046-1051.)
- [48] 高越峰,朱帧,朱玉,等. 大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂基因的克隆及其转基因烟草抗虫性初探[J]. 高技术通讯,1999(9):5-9. (Gao Y F, Zhu Z, Zhu Y et al. Cloning of soybean Kunitz trypsin inhibitor gene and preliminary results of bioassay on transgenic tobacco plants [J]. High Technology Letters, 1999(9):5-9.)
- [49] Eggenberger A L, Stark D M, Beachy R N. The nucleotide sequence of a soybean mosaic virus coat protein-coding region and its expression in *E. coli*, *Agrobacterium tumefaciens* and tobacco callus [J]. Journal of General Virology, 1989, 70:1853-1860.
- [50] 刘俊君,彭学贤,莽克强,等. 大豆花叶病毒 *Nib* 基因的 cDNA 克隆和序列分析[J]. 中国科学(B 辑),1994,24(3):265-271. (Liu J J, Peng X X, Mang K Q, et al. cDNA cloning and sequence characterization of *Nib* gene in soybean mosaic virus[J]. Science in China (Series B), 1994, 24(3):265-271.)
- [51] 刘忠智. 大豆花叶病毒生物学性状、*Nia* 基因的克隆与序列分析及其植物表达载体构建和表达的研究 [D]. 沈阳:沈阳农业大学,1996. (Liu Z Z. Studies on biological characteristics of soybean mosaic virus, cloning and sequence characterization of *Nia* gene and construction and expression of plant expression vector [D]. Shenyang:Shenyang Agricultural University, 1996.)
- [52] 徐香玲,邹联沛,刘伟华,等. 向大豆导入几丁质酶基因的初步研究[J]. 大豆科学,1999,18(2):101-106. (Xu X L, Zhou L P, Liu W H, et al. A preliminary study on transferring chitinase gene into soybean [J]. Soybean Science, 1999, 18(2):101-106.)
- [53] 刘德璞,廖林,袁鹰. 导入外源 DNA 获得抗 SMV 大豆品系 [J]. 大豆科学,1997,16(4):277-282. (Liu D P, Liao L, Yuan Y. Gaining of soybean lines resistant to SMV by introducing exogenous DNA [J]. Soybean Science, 1997, 16(4):277-282.)
- [54] 王仁祥,苏爱军,杨乾. 转基因作物的研究进展与应用[J]. 湖南农业大学学报,2005,31(4):447-450. (Wang R X, Su A J, Yang Q. Review on transgenic crops and their application [J]. Journal of Hunan Agricultural University, 2005, 31(4):447-450.)
- [55] 付顺华,梁锦锋,季宗富,等. 植物转基因研究进展[J]. 云南林业科技,2003(1):69-74. (Fu S H, Liang J F, Ji Z F, et al. Towards the research progress of plant transgene [J]. Yunnan Forestry Science and Technology, 2003(1):69-74.)
- [56] 陈锦清,黄锐之. 油料作物基因工程育种[J]. 中国生物工程杂志,2004,24(5):24-29. (Chen J Q, Huang R Z. Genetic engineering on oil crop breeding [J]. China Biotechnology, 2004, 24(5):24-29.)
- [57] Kinney A J. Development of genetically engineered soybean oils for food applications[J]. Food Lipids, 1996, 3:273-292.
- [58] Bnhr T, Sato S, Ebrabim F. Ribozyme termination of RNA transcripts down-regulate seed fatty acid genes in transgenic soybean [J]. The Plant Journal, 2002, 30(2):155-163.
- [59] Cahoon E B, Ripp. Formation of conjugated delta 8, delta 10 double bonds by delta12-oleic acid desaturase related enzymes: Biosynthetic origin of calendic acid [J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276:2637-2643.
- [60] Howe Arlene R, Sato Shirley. Production γ -linolenic acid and stearidonic acid in marker-free transgenic soybean [J]. Crop Science, 2004, 44:646-652.
- [61] Kim Won Seok, Hari B Krishnan. Expression of an 11kDa methio-

- nine-rich delta-zein in transgenic soybean results in the formation of two types of novel protein bodies in transitional cells situated between the vascular tissue and storage parenchyma cells[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2004, 2(3):199-210.
- [62] Yu O, Shi J, Hession A O. Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean[J]. *Phytochemistry*, 2003, 63(7):753-763.
- [63] Van Eenennaam A L, Lincoln K, Durrett T P, et al. Engineering vitamin E content; from arabidopsis mut[J]. *Plant Cell*, 2003, 15(12):3007-3019.
- [64] Chiera J M, Finer J J, Grabau E A. Ectopic expression of a soybean phytase in developing seedsof to *Glycine max* to improve phosphorus availability[J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 56(6):895-904.
- [65] 李明春, 卜云萍, 王广科, 等. 深黄被孢霉 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因在大豆中的表达[J]. *遗传学报*, 2004, 31(8):858-863. (Li M C, Bu Y P, Wang G K, et al. Heterologous expression of *Mortierella isabellina* Δ^6 -fatty acid desaturase gene in soybean[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(8):858-863.)
- [66] 刘兰英. 大豆品质改良的基因工程[D]. 北京: 中国农业大学, 1996. (Liu L Y. Genetic engineering on improving soybean quality traits[D]. Beijing: China Agricultural University, 1996.)
-
- (上接第 135 页)
- [7] 陈辉, 张文明, 胡晨, 等. 安徽省野生大豆资源考察研究初报[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(36):11787-11788. (Chen H, Zhang W M, Hu C et al. Survey and study on the wild soybean resource in Anhui Province[J]. *Journal Anhui Agricultural Science*, 2007, 35(36):11787-11788.)
- [8] 林红, 齐宁, 李向华, 等. 黑龙江省野生大豆资源考察研究[J]. *中国油料作物学报*, 2006, 28(4):427-430. (Lin H, Qi N, Li X H et al. New progress on wild soybean survey in Heilongjiang province[J]. *Chinese Journal Oil Crop Science*, 2006, 28(4):427-430.)
- [9] 程春明, 王瑞珍, 叶厚专, 等. 江西野生大豆种质资源考察初报[J]. *江西农业学报*, 2005, 17(4):63-65. (Chong C M, Wang R Z, Ye H Z, et al. Investigation on wild soybean germplasm resources in Jiangxi province[J]. *Acta Agricultural Jiangxi*, 2005, 17(4):63-65.)
- [10] Vavilov N. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants[M]. //Trans. by Starr Chester K. *Chronica Botanica*, New York: The Ronald Press Company, 1951.
- [11] 刘德全, 徐树传. 福建野生大豆生态分布及其分类[M]//李福山. *中国野生大豆遗传资源研究进展*, 北京: 农业出版社, 1995:21-26. (Liu D Q, Xu S C. The ecological distribution and classification on the wild soybean in Fujian[M]//Li F S. *Research progress in Chinese wild soybean resources*, Beijing: Agriculture Press, 1995:21-26.)
- [12] 李向华, 田子罡, 李福山. 新收集野生大豆与已保存野生大豆遗传多样性比较[J]. *植物遗传资源学报*, 2003, 4(4):345-349. (Li X H, Tian Z G, Li F S. Genetic analysis of newly collected wild soybean materials and conserved germplasm collected from the same places[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2003, 4(4):345-349.)
- [13] 孙备, 李建东, 王国骄, 等. 一年生野生大豆 (*Glycine soja*) 生理生态学 and 种群生态学研究进展[J]. *大豆科学*, 2008, 27(4):687-692. (Sun B, Li J D, Wang G J, et al. Research progress on physiological ecology and population ecology of annual wild soybean (*Glycine soja*) [J]. *Soybean Science*, 2008, 27(4):687-692.)
- [14] Hymowitz T. On the domestication of soybean[J]. *Economic Botany*, 1970, 24:408-421.
-
- (上接第 142 页)
- [35] Nasir S A M. Grafting experiments on the nature of the decline in N_2 fixation during fruit development in soybean[J]. *Physiologia Plantarum*, 1983, 57:561-564.
- [36] Abd-Alla M H, Vuong T D, Harper J E. Genotypic differences in dinitrogen fixation response to NaCl stress in intact and grafted soybean[J]. *Crop Science*, 1998, 38:72-77.
- [37] Hirata Y, Yagishita N. Graft-induced changes in soybean storage proteins I. Appearance of the changes[J]. *Euphytica*, 1986, 35(2):395-401.
- [38] Carver B F, Burton J W, Wilson R F. Graft-transmissible influence on fatty acid composition of soybean seed[J]. *Crop Science*, 1987, 27:53-56.
- [39] Stegemann S, Bock R. Exchange of genetic material between cells in plant tissue grafts[J]. *Science*, 2009, 324:649-651.
- [40] Mower J P, Stefanovic S, Young G J, et al. Plant genetics: gene transfer from parasitic to host plants[J]. *Nature*, 2004, 432(7014):165-166.
- [41] Newell C A, Hymowitz T. Flower induction in *Glycine tomentella* Hayata following grafting onto *G. Max* (L.) Merr[J]. *Crop Science*, 1979, 19:121-123.