

# 大豆生物工程研究进展<sup>\*</sup>

程林梅 孙 毅 岳焕荣<sup>\*\*</sup>

(山西省农业生物技术研究中心 太原 030031)

## ADVANCES IN SDUDY OF BIOTECHNOIOGY SOYBEAN

Cheng Linmei Sun Yi Yue Huanrong

(The Agro - Biotechnology Research Center of Shanxi Province, Taiyuan, 030031)

**摘要** 90年代以来,大豆的生物工程研究重点放在建立遗传转化和再生体系上,随着遗传转化和再生技术的发展,我国已获得了抗病、抗虫转基因大豆植株,取得突破性进展。目前,大豆遗传转化主要采用农杆菌介导法、花粉管通法、基因枪及 PEG法。农杆菌介导的遗传转化是以大豆子叶、胚轴为外植体,通过卡那霉素筛选,器官发生再生转化植株;花粉管介导法是以植株整体为受体导入外源基因,获得稳定遗传品系;基因枪介导的遗传转化是以大豆幼胚的胚轴,用基因枪轰击生长点,可以从任意一个基因型获得转基因植株;PEG介导的遗传转化是将质粒导入大豆原生质体,通过潮霉素进行筛选,获得转基因植株

**关键词** 大豆;生物工程;遗传转化;农杆菌;花粉管通道;基因枪;PEG

**中图分类号** S565.035.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2001)01-0066-05

大豆是重要的油料作物,是我国营养丰富的重要农产品,90年代中期,全国大豆种植面积 1120万公顷,总产量 1734万吨,发展我国大豆生产对改善人民的食物结构,满足对植物蛋白、油脂的要求,发展畜牧业、食品业都具有十分重要的意义。但大豆生产受病、虫害以及干旱等不利因素的影响,产量很不稳定,虽然常规育种技术在抗性品种中发挥了重要作用,但由于受物种间杂交不亲和性及与不良性状连锁等因素影响而难以利用,使常规育种受到了限制,因此,现代生物工程技术可以打破生物之间的界限来实现遗传物质的重新组合,因而可按照人类预先设计来改造生物,使之符合人类的需要,成为解决农业问题的一条重要出路。大豆比其它作物在遗传操作技术的某些方面难度较大,但随着现代生物技术的飞速发展,大豆的生物技术研究取得了较大的突破。80年代以来,已分别建起细胞、组织和原生质体水平的植株再生体系。大豆的遗传转化研究于

1984年首次报道<sup>[1,2]</sup>,1988年<sup>[3]</sup>获得转基因大豆植株,这是遗传工程应用于大豆改良上的一个里程碑。目前,大豆遗传转化主要采用农杆菌介导法、花粉管通道法、基因枪法和 PEG法介导法。农杆菌介导的遗传转化法是以大豆的子叶、子叶节、胚轴为外植体,通过卡那霉素筛选,器官发生再生转化植株;花粉管通道法是以植株整体为受体导入外源基因,经严格的筛选可获得稳定转化品系;基因枪法是以大豆幼胚的胚轴,用基因枪轰击生长点,通过潮霉素筛选转化植株;PEG介导法是将质粒导入大豆原生质体,通过潮霉素筛选,获得转基因植株。本文就将这些研究进展作一综述。

## 1 大豆植株再生技术

### 1.1 以幼胚上胚轴和下胚轴为外植体诱导再生植株的技术

\* 收稿日期:2000-04-12

\*\* 现在山西省农科院高寒研究所工作。

基金项目:山西省自然科学基金项目和财政厅科技支农项目。

作者简介:程林梅(1954-),女,副研究员,从事棉花、大豆抗旱生理方面的研究。

大豆的组织培养,从60年代以来就开展了广泛的研究,曾采用过各种不同的外植体,但植株再生曾一度十分困难,即使有再生植株发生,频率和重演性极低。进入80年代以来,随着生物技术的迅速发展及植物基因工程发展的需要,大豆的组织培养才有了突破性的进展。1983年陈云昭等<sup>[4]</sup>以大豆上胚轴和下胚轴为外植体培养出再生植株。1986年Wright等<sup>[5]</sup>分别用大豆的子叶节、上胚轴和初生叶为外植体,通过器官发生获得再生植株。1987年Lazzzeri等<sup>[6]</sup>从一对未成熟子叶外植体,用MSN10培养基能产生多至25个体细胞胚,并可用于多种基因型。1989-1990年周思君等<sup>[7]</sup>通过大豆幼胚培养,经体细胞胚胎发生或器官发生,获得高频率的再生植株,并所有的基因型都能成功。1998年程林梅等人<sup>[8]</sup>以大豆上胚轴、下胚轴、幼胚和小真叶为外植体,高频率地诱导出再生植株。但不同基因型由于遗传和生理差异,诱导植株再生效果不同。汾豆33号不论是上胚轴、下胚轴、小真叶和幼胚诱导植株再生率都最高。1999年刘博林等人<sup>[9]</sup>从大豆幼胚中诱导形成体细胞胚胎愈伤组织并分化成苗,建立了一套再生频率较高的大豆植株再生方法。

## 1.2 以原生质体培养的植株再生技术

原生质体是除去细胞壁的裸露细胞,它比利用大豆外植体培养再生植株的利用有着更为优越之处,去壁细胞容易摄取外源遗传物质,目前进行基因枪等技术均以原生质体为受体进行外源基因导入,因而它是进行遗传转化操作的一个理想受体系统;去壁细胞可像动物细胞一样进行融合,产生种间和属间细胞杂种,从而克服远缘杂交不亲和性;去壁细胞也同细胞一样具有全能性,可分化并再生植株,这种原生质体无性系也可以获得明显变异,因而也可以用于物理、化学因素进行人工诱变和细胞级育种。因此植物原生质体的培养,对于遗传工程研究和开拓植物育种新途径具有重要意义。

大豆的原生质体培养更加受国内外学者的关注,但实践证明,获得大豆原生质体再生植株十分困难,经过多年的艰苦探索,直到近年来才有新的突破。1981年Newell等,1997年Hammatt等相继报道了经子叶、下胚轴分离出原生质体培养获得再生植株。1988年报道了卫志明<sup>[10]</sup>等,从大豆成熟种子的子叶分离原生质体经培养得到了再生植株。1993年张贤泽等<sup>[11]</sup>培养大豆幼胚原生质体经细胞胚胎发生再生植株。

## 2 农杆菌介导的基因转化研究

植物基因工程能有今日的快速发展,也正是在于发展了以根癌农杆菌的Ti及发根农杆菌的Ri质粒作为转移基因的载体,才使植物尤其是双子叶植物的基因工程出现了一个新的转折点。由于农杆菌对双子叶植物感染率很高,因此,大豆与之有关的一系列研究,尤其对Ti质粒的研究更为深入,大豆可成为以Ti质粒、Ri质粒为载体进行基因转移的成功受体。迄今为止,已有60多种植物获得了转基因植物,据不完全统计有80%的转基因植物是以农杆菌为介导的,从而建立起以农杆菌为载体的遗传转化体系<sup>[12]</sup>。其方法是采用共培养法:将植物的外植体与Ti质粒或Ri质粒上携有外源基因的根癌农杆菌在液体培养基中共培养2-3天,在共培养过程中,农杆菌的Vir被诱导活化,使农杆菌附着于外植体受伤部位的细胞上,T-DNA穿过农杆菌和外植体细胞的细胞壁和细胞膜,转移到外植体细胞中,共培养后,将外植体转移到选择培养基上进行培养,选择培养基中含有能杀死农杆菌的羧苄青霉素和供筛选转化植物细胞所用的抗菌素,然后诱导外植体再生植株。由于目的基因同时连接有抗抗菌素的选择标记基因(如NPT-II等),凡能在培养基上出愈的,就初步表明目的基因被整合到植物细胞的核基因组中。农杆菌介导法优点在于可靠性强、效率高,但需要严格的组织培养过程形成再生植株,因而转化周期比较长,并只有外植体能再生的双子叶植物及少数的单子叶植物才能采用。1988年Hinchee等<sup>[3]</sup>首次通过农杆菌介导的转化获得转基因大豆植株,从100份栽培大豆品种中筛选出3个最敏感品种,用农杆菌与子叶共培养,得到NPT-II和Gus以及NPT-II和Glyphosate耐性基因共转化的转基因植株,两种类型的转基因植株后代按孟德尔3:1的遗传规律分离。王连铮1984年研究了15个农杆菌与2759个野生、半野生栽培大豆基因型之间的相互作用,筛选出7个致癌能力较强的菌系和858份作为外源基因转移的大豆受体,其中包括野生、半野生。经对癌组织的培养获得了T-DNA转移的细胞系,并能在大豆细胞基因组中稳定地整合和表达。1991年Kumar等用野生型Ri和带重组质粒的发根土壤农杆菌转化野生大豆,经组培产生愈伤,有新霉素磷酸转移酶活性,卡那霉素抗性基因在

转基因组中稳定的整合并表达。1996年徐香玲等<sup>[13]</sup>用含 Ri 质粒的发根农杆菌介导,克隆到大肠杆菌 JM 109 中,中间载体质粒 PES(具有大豆花叶病毒外壳蛋白基因)通过三系杂交法,将质粒 PES 导入具 Ri 质粒的发根农杆菌 (PRiA4b) 中,用二元载体法转化黑龙江省大豆合丰 25 黑农 33 等品种。用子叶节、胚轴、幼胚和整株感染转化子菌液,诱导毛状根,毛状根直接形成愈伤组织从愈伤组织分化出芽,幼胚获得不定芽,由器官发生途径产生丛生芽并再生植株,经纸电泳测定约 30% 再生植株含有冠瘿碱,PCR 和 DNA 斑点杂交检测,证明大豆花叶病毒外壳蛋白基因已导入并整合到大豆基因组中。1997年徐香玲等<sup>[14]</sup>以 Ti 质粒为介导,将 B. t. K- $\delta$  内毒蛋白基因导入东北大豆黑农 37 黑农 39 品种,采用多种外植体感染方法,从胚轴和子叶节诱导出丛生芽与再生植株。经卡那霉素筛选和冠瘿碱检测,证明外源基因导入大豆基因组中,获得 81 株再生植株,其中成活 30 株,得到 7 粒种子,PCR 检测和 DNA 分子杂交,7 株再生植株呈阳性反应。1999年徐香玲等<sup>[15]</sup>以根癌农杆菌的 Ti 质粒为介导,将抗真菌性病害的几丁质酶基因导入黑龙江省栽培大豆品种东农 37 号、吉林 28 等 14 个品种,从子叶节和下胚轴诱导出丛生芽,并再生植株,经 PCR 和 DNA 分子检测,确认为转化植株。利用根癌农杆菌的 Ti 质粒 Ri 质粒为载体的转基因技术,具有操作简便、转化率高,使外源基因完整地导入植物的细胞,并可整合到基因组的优点。

### 3 花粉管通道介导的遗传转化研究

利用开花植物授粉后形成的花粉管通道,直接导入外源 DNA,来转化尚不具备正常细胞壁的卵,合子或早期胚胎细胞,进而实现某些目的基因转移技术。自 70 年代以来,我国学者周光宇提出了授粉后外源 DNA 导入植物的技术,即将带有目的性状的供体总 DNA 片段导入植物,筛选获得目的性状的后代,培育新品种。20 年来,我国利用这一技术相继对高粱、玉米和向日葵等作物及花卉的主要植物学、抗性品质性状进行了改造,获得了一些具有目的性状且遗传稳定的转基因后代<sup>[16]</sup>,尤其在棉花、小麦和水稻育种上应用多年,成功地获得了抗病棉花、抗病小麦新品种<sup>[17]</sup>。大豆方面的研究,80 年代后期,雷勃钧等人将外源(包括野生大豆)DNA 经花

粉管通道法直接导入推广品种大豆中,实现了高蛋白质、早熟性状转移,获得了稳定的遗传品系。它是集高产、优质、高蛋白于一身,是我国应用生物技术育成的第一个大豆新品种<sup>[18-19]</sup>。1997年刘德璞等人<sup>[20]</sup>用花粉管通道向大豆导入抗 SMV(大豆花叶病毒)的品种间、种间以及属间材料总 DNA,结合常规育种程序,培育出抗病丰产品系。抗病性鉴定结果表明,获得的抗性能稳定的遗传。1999年徐香玲等人<sup>[15]</sup>用花粉管通道法直接导入几丁质酶基因,共获得 223 粒种子,经 PCR 和 DNA 分子杂交检测的 113 株大豆幼苗中,有 7 株呈阳性反应,证明几丁质酶基因已导入并整合到大豆基因组中。此外,还对各种农作物及作物种间、属间或种间的遗传物质转移上进行了探索,将花生 DNA 导入大豆等作物,1992 年王丕武、许守民<sup>[21]</sup>等人用花生的 DNA 导入大豆取得成功,在后代中筛选出一个蛋白质含量高、产量性状好的品系。

花粉管通道法遗传转化途径是以植物整体为受体,因此可以任意选择生产上的当家品种作为受体进行基因导入,并保留受体优良性状基础上加以基因改进,所以省略了细胞组织培养的继代及诱导过程,并可以越过植株再生障碍,特别适于植物外植体再生困难和再生频率低的植物。但存在着转化率低、筛选工作量大等不利条件。

### 4 基因枪法的遗传转化技术

基因枪转化方法是近年来发展起来的一项新的植物遗传转化技术,基因枪法导入外源基因的技术本质上是一种物理过程,因此不受基因型限制。高速运动的金属粒子可非特异地将外源基因导入到植物细胞、组织或器官,并使之转化,因此可以避免费时的原生质体培养过程,从而大大缩短了获得转基因植株的周期,由此获得的转基因植株变异率低并具有正常的育性。基因枪介导的转化法与农杆菌转化法相比,基因枪转化频率较低、可靠性差、实验成本高,但该方法不受植物种类、器官等限制,特别用于农杆菌不易感染的单子叶植物。国外 McCabe 等人(1988)<sup>[22]</sup>利用此方法转化大豆未成熟胚的生长点,获得转基因大豆,并证明外源基因稳定地存在于转化植物及后代中,后代的遗传行为符合孟德尔规律。Christou 等(1989)<sup>[23]</sup>利用基因枪转化大豆茎尖可以从任意一个基因型获得转基因植株。Finer 等

(1991)<sup>[24]</sup>用 Biolistics 基因枪转化胚性悬浮细胞 Sato 等 (1993)<sup>[25]</sup>用 Biolistics 基因枪转化未成熟胚茎尖及分裂的大豆悬浮细胞培养物。Stewart 等 (1996)<sup>[26]</sup>利用基因枪法转化大豆体细胞胚获得成功。

## 5 PEG 介导的基因转化研究

采用 PEG 介导的遗传转化在大豆上也得到广泛应用,卫志明 (1996-1998)<sup>[27]</sup>用 PEG 法将外源基因导入大豆的原生质体中,获得 27 株转基因植株,其转化率达到 0.6%,这是通过原生质体途径转入大豆外源基因的首例报道。南相日、刘文萍等 (1998)<sup>[28]</sup>用 PEG 法,将 BT (*Bacillus thuringiensis* GyIAC) 毒蛋白基因导入大豆主栽品种黑农 35 黑农 37,合丰 25 和合丰 35 的原生质体中,经 30mg/L 潮霉素筛选,选择有抗生素的愈伤组织分化,获得再生植株。经 PCR 和 DNA 分子检测,均呈阳性,说明 BT 毒蛋白基因已整合到大豆细胞基因组中。其它外源基因导入方法在大豆基因工程中尚未见报道。

## 6 小结

综上所述,90年代以来,大豆的基因工程研究取得了突破性进展,特别是应用花粉管通道法遗传转化技术上获得了可喜的进展。已在我国乃至世界的许多实验室和育种单位得到广泛应用<sup>[29]</sup>,得到一大批转基因后代,有的具有一定的应用价值。如花生 DNA 导入大豆后,子代种子的蛋白质含量明显高出双亲,表现出杂种优势<sup>[21]</sup>。为丰富大豆的遗传基础,为大豆育种和生产提供了后备材料。该方法简便易行,可避免农杆菌转化频率低和转化脱菌困难等问题,不受基因型影响,特别适合于植物外植体再生困难和再生频率低的植物。我们也将利用基因枪法进行外源基因导入研究。随着分子生物学的飞速发展,不久的将来,生物工程技术即将在大豆品种改良中大显身手。

## 参 考 文 献

- 1 Deblock, M. et al., Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny [J]EMBO J., 1984, 3, 1681- 1689
- 2 Horsch, R. B., et al., Inheritance of functional foreign genes in plants. [J]Science, 1984, 223, 496- 498
- 3 Hnchee, M. A. W., et al., Production of transgenic soybean plants using agrobacterium mediated DNA transfer. [J]Biotechnology, 1988, 6, 915- 922
- 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, 1983, 3(1)41- 44
- 5 Wright, M. S. et al., Plant regeneration by organogenesis in dycine Max. [R]Plant Cell Reports 1986, 5 150- 154
- 6 Lazzeri, p. A., D. F., Hildebrand, G. B. Collins, Soybean somatic embryogenesis. Effects of nutritnal, physical and chemical factors plant [J]Cell Tissue and ofgan culture 1997, 10 200
- 7 周思君,尹光初,雷勃钧等,从大豆幼胚诱导胚胎发生再生植株, [J]大豆科学, 1989, 8(1): 39- 44
- 8 程林梅,孙毅,王立国等,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): 25- 24
- 9 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
- 10 卫志明,许哲宏,大豆原生质体培养再生植株, [J]植物生理学通讯, 1988(2)53- 54
- 11 张贤泽,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
- 12 董立州, [J]生物工程进展, 1993, 14(2): 15- 18
- 13 徐香玲,李兴华,刘伟华等, Ti质粒介导大豆花叶病毒外壳蛋白基因转化的研究, [J]大豆科学, 1996, 15(4): 284- 287
- 14 徐香玲,高晶,刘伟华等, Ti质粒介导的 B. t. K-  $\delta$ 内毒素蛋白基因转化大豆的初步研究, [J]大豆科学, 1997, 16(1): 9- 11
- 15 徐香玲,邹联沛,刘伟华等,向大豆导入几丁质酶 基因初步的研究, [J]大豆科学, 1999, 18(2): 101- 107
- 16 杨立国,石太渊,梁国战等,转导外源总 DNA 创造农作物新种质, [J]作物品种资源, 1998, (1): 14- 16
- 17 雷勃钧,李希臣,卢翠华等,外源野生大豆 DNA 导入栽培大豆及 RAPD 分子验证, [J]中国科学 (B), 1994, 24(6): 596- 601
- 18 雷勃钧,尹光初,卢翠华等,外源 DNA 直接导入大豆的研究, [J]大豆科学, 1991, 10(1): 58- 62
- 19 刘广阳,杨兴勇,宋丽娟等,外源总 DNA 导入栽培大豆新品系 D89- 9822 及其育种价值初探, [J]大豆科学, 1996, 15(4): 353- 356
- 20 刘德璞,廖林,袁鹰等,导入外源 DNA 获得抗 SMV 大豆品系, [J]大豆科学, 1997, 16(4): 13- 16
- 21 王丕武,许守民等,花生 DNA 导入栽培大豆的研究初报, [J]吉林农业大学学报, 1992, 14(3): 1- 3
- 22 McCabe, D. E. et al., Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle accelation. [J] Bio/Techonlogy, 1988, 6, 923- 926
- 23 Christou, P. et al., Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. [J]Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1989, 86, 7500- 7504
- 24 Finer JJ, McMullen MD, Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue [J]In Vitro Cell Der Biol. 1991, 27, 175- 182
- 25 Sato, S. et al., Stable transformation via particle bombardment

- in two different soybean transformation systems. [J] Plant Cell Rep, 1993, 12, 408- 413
- 26 Stewart CN. Jr. et al. Genetic transformation, Recovery and characterization of fertile soybean transgenic for synthetic Bacillus thuringiensis CryIAc Gene. [J] Plant Physiol. 1996, 112, 121- 129
- 27 卫志明, 黄健秋, 徐淑萍等. 植物遗传国家重点实验室年报, [R] 1996, 36- 37
- 28 南相日, 刘文萍, 刘丽艳等, PEG介导的 BT基因转化大豆原生质体获转基因植株, [J]大豆科学, 1998, 17(4): 326- 329
- 29 李希臣, 雷勃钧, 卢翠华等. 外源 DNA导入大豆品种“黑生 101”的 RAPD初探. [J]大豆科学, 1999, 18(3): 230- 235

## 第三届国际大豆加工利用会议在日本召开

第三届国际大豆加工利用会议 (ISPUC- III) 于 2000 年 10 月 15 日 - 20 日在日本东京筑波科技城国际会议中心召开。大会的主题是: 2000, 大豆创新时代的开端

来自 22 个国家的近 300 名代表和 200 多名日本代表参加了 16 日的开幕式, 日本农林水产省研究委员会副秘书长、第三届国际大豆加工利用会议副主席岩本松、日本食品科学技术学会主席菅原立行、筑波市市长藤沢直万、日本国家食品研究所所长铃木馆尾先后在大会上致欢迎词, 热情欢迎来自世界各地的大豆科技专家和代表, 希望代表们在大会上广泛交流大豆科研工作的新成果、新技术, 促进全世界的大豆科研工作发展、大豆加工和产品的利用

国际大豆加工利用会议首次会议于 1990 年由我国发起, 在吉林省公主岭市吉林省农科院举办, 1996 年在泰国曼谷举办了第二届会议后, 成为国际大豆加工利用科研工作例会, 每四年举办一次

第一届国际大豆加工利用会议的发起和主持人, 吉林省农科院孙寰研究员应邀参加了会议, 每与第二届、第三届大会主席一起在主席台上就座, 接受了与会代表对他们给国际大豆加工利用会议所做的杰出贡献的致谢。孙寰研究员以“为大豆加工利用进行育种和生产”为题作了首席主题发言。

大会在 10 月 16 日 - 19 日四天期间, 分成 8 个分委会进行学术交流, 大会共发表论文 283 篇 (宣读论文 161 篇, 墙板展示论文 122 篇), 我国参加会议代表近 20 人, 共发表论文 15 篇 (宣读论文 10 篇, 墙板展示论文 5 篇)。

大会期间同时举办了大豆加工利用的设备及大豆产品展示会。日本在大豆加工设备及大豆加工产品品种和质量上显示了较强的实力, 大豆综合利用和精深加工技术的飞速发展, 给与会者带来耳目一新的感觉和很大启示

会议期间, 与会者分三组参观了日本的豆制品加工企业, 先进的设备设施、良好的工作环境、优良的产品质量和高工作效率给参观者留下深刻的印象

会议期间, 选举了大会连续委员会成员, 该委员会由大豆加工科技人员组成, 负责休会期间各国大豆科技工作者的组织协调工作和下届会议的准备工作。大会决定第四届国际大豆加工利用会议于 2004 年在巴西举行

梁 歧

解放军军需大学军需工程系