

# 我国大豆转基因研究进展<sup>\*</sup>

武小霞 李文滨<sup>\*\*</sup> 张淑珍

(东北农业大学大豆研究所, 哈尔滨 150030)

**摘要** 我国大豆转基因发展很快, 本文就大豆转基因中常用的方法: 农杆菌介导法、电击法、PEG 转化法、基因枪法、花粉管通道法、农杆菌传导的原位基因转化等的技术环节、在大豆抗虫、抗病、抗除草剂等方面转化外源基因上的应用状况, 大豆再生体系建立以及对国内大豆转基因的展望。

**关键词** 大豆; 转化方法; 外源基因; 再生体系

中图分类号 S 565. 1 文献标识码 A 文章编号 1000—9841(2005)02—0144—06

大豆既是粮食作物, 又是经济作物, 对改善人类的生活产生巨大的贡献。但同时大豆的品质和产量又受各种病、虫、草害的影响, 人们试图利用转基因方法来改善大豆的产量、品质和抗逆能力, 按着人的需求培育不同类型的大豆品种。本文将对 20 年来我国在大豆转基因研究与利用方面的概述, 特别是重点阐述采用的主要转基因方法、转入外源基因和大豆再生体系建立以及在大豆上应用的状况及展望。

## 1 国内大豆转基因的主要方法

国内大豆转基因的主要方法有: 农杆菌介导法、电击法、PEG 转化法、基因枪法、花粉管通道法等方法, 下面将它们的技术环节、在大豆上应用的状况做以介绍。

### 1.1 农杆菌传导法

农杆菌介导的大豆遗传转化外源基因农杆菌介导转化大豆最早始于 Facciotti (1985)。Hinchee (1988)首次通过农杆菌介导转化获得转基因大豆植株, 再生植株后代呈 3 : 1 分离。此项技术发展到现在已经非常成熟, 被大多数转基因工作者使用。

#### 1.1.1 农杆菌介导的基因转化机理

农杆菌是一种革兰氏阴性土壤杆菌。现已发现, 与植物基因转化有关的有两种类型: 一为根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*), 它含有 Ti 质粒, 能诱导被侵染的植物细胞形成冠瘿瘤; 二为发

根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*), 它含有 Ri 质粒, 能够诱导被侵染的植物细胞产生毛发状根。Ti 质粒(包括 Ri 质粒)上有一段转移 DNA (transfer DNA, 又称 T—DNA), 在农杆菌侵染植物时, 这段 DNA 可以插入到植物基因组中, 使其携带的基因在植物中得以表达。由于 T—DNA 能够进行高频率的转移, 而且 Ti 质粒和 Ri 质粒上可插入大到 50kb 的外源基因。因此, Ti 质粒和 Ri 质粒就成为植物基因转化的理想载体系统<sup>[1]</sup>。根癌农杆菌的致瘤菌株都含有一个约 200kb 的环状质粒, 被称为 Ti 质粒, 包括毒性区 (Vir 区)、接合转移区 (Con 区)、复制起始区 (Ori 区)和 T—DNA 区 4 部分。其中与冠瘿瘤生成有关的是 Vir 区和 T—DNA 区。前者大小为 30kb, 分 VirA—J 等至少 10 个操纵子, 决定了 T—DNA 复合体的形成和向植物细胞的转移过程。T—DNA 可以将携带的任何基因整合到植物基因组中, 但这些基因本身与 T—DNA 的转移与整合无关。在受到受损伤植物细胞分泌物的诱导后, 激活质粒 Vir 基因和根癌农杆菌染色体基因, 启动这些基因的转录, 对 T—DNA 进行剪切, 产生 T—DNA 单链。然后以类似于细菌接合转移过程的方式将 T—DNA 与 VirD2 组成的复合物转入植物细胞中。之后, 这一复合物在 VirD2 和 VirE2 核定位信号 (NLS) 的引导下以 VirD2 为先导被转运进细胞核。转入细胞核的 T—DNA 以单拷贝或多拷贝的形式随机整合到植物染色体上<sup>[2]</sup>。

<sup>\*</sup> 收稿日期: 2005—02—03

项目来源: 黑龙江省科技攻关计划大豆马铃薯抗病和抗虫基因工程的研究。

作者简介: 武小霞(1971—), 女, 博士研究生, 研究方向大豆遗传转化。

### 1.1.2 农杆菌 Ti 质粒载体系统

目前,人们已经构建成了若干种能应用于植物基因转化的农杆菌 Ti 质粒载体系统。所有这些系统都包括了两个基本要素。第一,组成一个重组的质粒载体。它含有 T-DNA 的边界序列,而且这个质粒还能够在大肠杆菌和农杆菌之间进行穿梭。这是由于 Ti 质粒是一个大质粒,很难在其上进行普通的基因克隆操作,必须使用一种中间载体质粒,在大肠杆菌上进行普通的基因操作,连接上外源基因,然后转移到土壤农杆菌中,与相应的 Disarmed Ti 质粒共同作用组成一个完整的 Ti 质粒载体系统。第二,作为载体系统的质粒及农杆菌株必须含有完整的 Vir 基因<sup>[3]</sup>。

在植物基因转化中应用最多的 Ti 质粒载体系统有共整合载体系统和双元载体系统。共整合载体是指 Ti 质粒上编码致瘤基因的序列被一段 pBR322 DNA 所取代,带外源基因的 pBR322 衍生型中间载体由大肠杆菌转入农杆菌后,二者相同的 pBR322 序列发生同源重组,外源基因就此整合到 disarmed Ti 质粒上。双元载体系统是指在一个农杆菌株系中含有两个彼此分离的质粒。一个质粒含有 T-DNA 和外源基因重组的多功能克隆载体质粒。它既能够在大肠杆菌中复制,又能在农杆菌中进行复制,并能够从大肠杆菌迁移到土壤农杆菌中。另一个质粒是含有 Vir 基因的 Ti 衍生质粒,如 pGV2260。近年来,科学家又构建出了一种超级双元载体(将详细内容写出),在大豆的转化中也开始应用<sup>[4]</sup>。

### 1.1.3 农杆菌介导在大豆中的应用

Fscciotti 等于 1985 年克隆了 SSU (1,5-二磷酸核酮糖融化酶)、OSU (章鱼碱合成酶)和 npt II (新霉素磷酸转移酶)的融合基因,最先用农杆菌对大豆进行侵染转化,所用的外植体是栽培大豆 Forrest 的子叶、子叶节和节间,得到的抗性愈伤组织经检测后证明有融合基因的诱导表达<sup>[5]</sup>。Parrot 等用含有 npt II 和玉米醇溶蛋白基因的农杆菌<sup>[6]</sup>、Di 等用含有 BPM V 外壳蛋白基因的农杆菌侵染大豆,都获得了转基因植株<sup>[7]</sup>。徐香玲等于 1997 年和 1999 年用农杆菌 Ti 质粒介导分别将 Bt (苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因)和菜豆几丁质酶基因导入大豆,得到转化植株,经检测证明外源基因已整合到大豆基因组上<sup>[8,9]</sup>。1999 年苏彦辉等和 Zhao 等用农杆菌介导法分别得到转 Bt 基因和 bar 基因的大豆转化植株<sup>[10]</sup>。2001 年赵桂兰等将 npt II 和 Barnase

基因导入大豆幼胚和大豆子叶节中,筛选得到转基因植株,PCR 检测证明 npt II 和 Barnase 基因已整合到大豆基因组上,T0 代转基因植株生物学观察,花粉不育率达 98%<sup>[11]</sup>。

### 1.2 农杆菌介导的植物原位转基因方法

植物原位转基因方法 (in planta transformation) 的根本特点就在于它不需要组织或细胞培养手段而达到植物在活体而非离体状态下的转化。自然发生的突变,要能成为一个遗传性状,必须发生在它可以遗传的组织细胞中。与此类似,外源基因的插入引起的人为突变,如果不依靠转化细胞的组织培养脱分化与再分化途径,外源基因也只有进入配子体细胞中,才可以得到遗传。无论那一种原位转基因方法,都是利用材料自身与农杆菌接触,在活体条件下,完成可遗传细胞的转化,并通过对后代的筛选抗生素抗性、除草剂抗性等,获得转化株。所用材料包括萌发的种子、幼苗、开花或未开花植株等。转化可以在外界的强压下进行,也可以在常温、常压下进行。

农杆菌介导的植物原位基因方法的应用到现在为止,国际上仅在白菜、苜蓿、萝卜上有成功报道。特别是作为经典模式植物的拟南芥及正在成为豆科模式植物的苜蓿,其高频率、简单、快捷的种质转化途径,还能为其突变体库的构建提供大量的避免了组培突变干扰的 T-DNA 插入突变体,这些突变体可用于基因的定位、结构和相关功能研究<sup>[12]</sup>。

### 1.3 基因枪转化法

1.3.1 基因枪法 (particle gun) 是 1987 年美国康奈尔大学 Sanford 等人首先发明的,又叫微弹轰击法 (microprojectile bombardment),是借用高压气体或高压放电为动力,用微粒对植物组织进行轰击而将其上的外源基因带入到植物细胞内,此法可以不受基因型和轰击靶组织的限制。

#### 1.3.2 基因枪转化法在大豆中的应用

1988 年 McCabe 等以大豆芽分生组织为靶组织,经基因枪轰击获得转基因大豆,这是基因枪法转化大豆的首例报道,虽然获得了转基因植株,但都为嵌合体。Christou 等用基因枪法转化未成熟胚,金粉粒子深入到 5~7 层细胞,不同抗性愈伤插入 nptII 基因拷贝数不同,nptII 酶活性不同<sup>[13]</sup>。McCabe 等首次用基因枪转化大豆未成熟胚,获得的再生植株有 2% 表现 gus 基因嵌合表达,并获得 R1 转基因植株<sup>[14]</sup>。Christou 利用基因枪转化未成熟幼胚获得转基因植株;两个独立转化再生植株开花

获得 R<sub>1</sub> 代, 其中一个只含 *gus* 基因, 另一个有 *gus* 和 *nptII* 基因<sup>[15]</sup>。其后 Yang 利用基因枪转化 CaMV35S+*gus*+NOS poly(A) 获得转基因植株, 观察到 R<sub>1</sub> 代植株 CaMV35S 启动子的特异表达特点。利用基因枪转化大豆芽分生组织获得转基因植株相对较为困难, 而悬浮培养胚性细胞才是大豆基因枪转化的理想靶组织<sup>[16]</sup>。此外, 利用基因枪转化法 Liu (1996) 还探索了悬浮培养胚性细胞培养时期对转化的影响。

#### 1.4 PEG 介导转化法

##### 1.4.1 PEG 介导基因转化机理

PEG 介导基因转化是 Davey 等 (1980) 和 Krens 等 (1985) 首先建立。PEG 法的主要原理是化合物聚乙二醇、多聚 L- 鸟氨酸 (pLO)、磷酸钙及高 PH 值条件下诱导原生质体摄取外源 DNA 分子。聚乙二醇、聚乙烯醇 (PVA) 和多聚 L- 鸟氨酸等都是细胞融合剂。PEG 分子量为 1.5kDa ~ 6kDa, 水溶性, pH 从 4.6 ~ 6.8, 因多聚程度不同而异。它可以使细胞膜之间或使 DNA 与膜形成分子桥, 促使相互间的接触和粘连。另有实验证明, PEG 是通过引起膜表面电荷的紊乱, 干扰细胞间的识别, 而有利于细胞膜间的融合和外源 DNA 进入原生质体, 因此称之为 PEG 诱导法<sup>[17]</sup>。

Lin 用 PEG 法把 *nptII* 和 *cat* 基因导入大豆原生质中, 6h 后检测到 CAT 酶活性, 并获得有 CAT 酶活性的抗性愈伤组织。

##### 1.5 电击转化法

1.5.1 电击法: 利用植物原生质体具有整合和表达外源 DNA 的能力, 使细胞膜透性在电击或聚乙二醇处理下发生变化, 出现一些可逆性孔隙, 和原生质体膜直接接触的 DNA 分子可进入细胞, 其中大部分 DNA 被细胞内酶降解, 一小部分 DNA 整合到核基因组中, 并可稳定遗传。质膜上可逆孔隙的大小、数量取决于电场强度、处理时间、溶液性质细胞种类等。此方法优点是可以一次转化许多原生质体, 但须具备原生质制备、培养和再生系统<sup>[18]</sup>。

1.5.2 用电击法转化大豆愈伤组织, 根据细胞存活率和 NPTII 酶活性, 摸索出最适电击条件后用于稳定转化, 得到的抗性愈伤都有 NPTII 酶活性; 应用电击法获得了表达多个外源基因 (*nptII*、*gus*、*cat* 和 *bar*) 的稳定转化抗性愈伤, 构建在同一质粒中的选择标记基因和非选择标记基因的共转化率为 50%, 不同质粒间的选择标记基因和非选择标记基因的共转化率为 18%—27%。黄健秋等用改良的 PEG 直

接转化未成熟子叶原生质体, 检测到了 *gus* 基因的瞬时表达和稳定表达。

##### 1.6 花粉管通道法

1.6.1 花粉管通道法机理: 花粉管通道法的主要原理是授粉使外源 DNA 能沿着花粉管渗入, 经过珠心通道进入胚囊, 转化尚不具备正常细胞壁的卵、合子或早期胚胎细胞。这一技术原理可以应用于任何开花植物。这种方法已被许多育种工作者所采用, 并培育出一批抗病、抗虫及其他性状优良的农作物新品系。

1.6.2 花粉管通道法应用: 雷勃钧等导入外源 DNA 后代发现成熟期、花色、蛋白质含量、SOD 酶活性等性状产生变化; 将高蛋白含量的野生大豆总 DNA 导入栽培大豆品种中获得了蛋白含量高于对照 12.5% 的变异后代, 并检测到 RAPD 多态性<sup>[19]</sup>。张国栋等将玉米自交系和大豆品种的 DNA 导入另一大豆品种中, 其后代的突变率分别为 10% 和 5.32%, 出现了种子蛋白含量、株高、茎粗、结荚习性、倒伏性、每株分枝数与荚数、粒数与百粒重等性状变异<sup>[20]</sup>。刘德璞导入高抗花叶病的外源 DNA, 获得了生育期、生长习性、株高、节数、分枝数等倾向供体的变异性状, 且对 SMV 的抗性也得到了提高<sup>[21]</sup>。

## 2 转入大豆的外源基因

通过转基因培育的大豆新品种是较早用于商品化生产的转基因作物之一。大豆生育期间受病、虫、草侵害严重, 常给大豆生产造成巨大损失。大量喷施化学药剂, 不仅会增强抗药性, 而且严重污染环境, 提高生产成本, 破坏生态平衡。常规育种及栽培技术由于育种年限长, 遗传资源有限, 收效不大。80 年代迅速崛起的植物基因工程技术为大豆育种开辟了新的途径, 已引起了许多育种工作者的关注。导入的外源目的基因主要是解决大豆优质、高产和抗病抗虫等问题, 目前, 用于大豆转基因研究的基因除 *gus*、*nptII*、*hyg*、*gfp* 等标记基因和报告基因外, 还涉及以下几种: 抗虫、抗病、抗除草剂、提高大豆脂肪质量、降低大豆过敏蛋白含量、作为生物反应器等。

##### 2.1 大豆抗虫基因

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。

###### 2.1.1 Bt 基因的转化研究及利用

Bt 基因是苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)

杀虫结晶蛋白(insecticidal crystal protein, ICP)基因的简称, ICP 通常以原毒素的形式存在, 当昆虫取食 ICP 后, 在昆虫的消化道内, 原毒素被活化, 转型为毒性多肽分子。活化的 ICP 与昆虫肠道上皮细胞上面的特异性结合蛋白结合, 在大多数情况下, ICP 的毒性都来源于这种结合。结合以后, ICP 全部或部分嵌合于细胞膜中, 使细胞产生一些孔道, 从而导致细胞由于渗透平衡被破坏而破裂。伴随着上述过程, 昆虫将停止进食, 最终导致死亡。

我国的大豆外源抗虫基因研究起步较晚, 发展较慢。徐香玲等以 Ti 质粒为介导, 将 Pkt54B7C5 质粒上的 Btk- $\delta$ 内毒素蛋白基因导入东北大豆“黑农 37”、“黑农 39”等品种。采用多种外植体和感染方法, 从胚轴和子叶节诱导出丛生芽和再生植株。经卡那霉素筛选和冠瘿碱检测, 初步证明外源基因导入大豆中, 共获 81 株再生植株, 得到 7 粒种子<sup>[22]</sup>。

郭三堆等人 1997 年, 将构建成的带有 CryIA 和 Cpti 两个基因的 pGBI4ABC 植物高效表达载体。通过花粉管通道法, 注射了 300 朵开花受精 20h 左右的苏引 3 号大豆品种的子房中, 获得 136 粒种子, 播种后获得 86 棵植株。1998 年, 经 PCR 和 PCR-southern 分子检测有 7 株为阳性, 经生物抗虫试验, 其中 9-1, 11, 14, 21, 25 号, 有很好的抗虫能力。1999 年, 已形成 5 个品系, 它们的遗传性状和农艺性状分析研究工作正在进行中。本研究结果为我国抗虫转基因大豆基因工程的研究提供了依据<sup>[23]</sup>。

苏彦辉等 1999 年用苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis* Berliner)杀虫晶体蛋白(Bt)基因和 $\beta$ -葡萄糖苷酸酶(GUS)基因通过基因枪和根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefactions*)介导转入大豆(*Glycine max* (L.) Merr.), 诱导大豆转基因植株再生。大豆主栽品种“中黄 4 号”和品系 8502 未成熟子叶有较强体细胞胚分化能力。体细胞胚的脱水处理显著促进“中黄 4 号”体细胞胚的萌发。未成熟子叶的预培养有利于根癌土壤杆菌感染子叶外植体体细胞胚的分化<sup>[24]</sup>。

### 2.1.2 豇豆胰蛋白酶抑制剂的转化研究及利用

豇豆胰蛋白酶抑制剂是天然的抗虫物质。与苏云金杆菌毒蛋白相比, 具有抗虫谱广, 对人无副作用以及害虫不易产生耐受性等优点。豇豆胰蛋白酶抑制剂是由设在尼日利亚的国际热带作物研究所(II TA)从几千份豇豆资源材料中筛选得到的一份抗豆象材料-TAu2027 中得到的。它是由约 80 个氨

基酸组成的多肽, 其产物可抑制昆虫消化道中的消化酶, 使昆虫取食后不能演化吸收营养物质而饿死。

高越峰等 1997 年从未成熟的大豆子叶中提取总 DNA, 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, 克隆到 pBluescript KS<sup>(+)</sup>的 SmaI 酶切位点上, 序列分析表明, 该基因与报导的序列高度同源。其核苷酸序列及推论的编码氨基酸序列的同源率分别为 99.5%和 98.2%。由此, 构建了大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂基因的植物高效表达载体 pBin SKT I。并采用农杆菌介导的叶盘法转化了烟草, 获得的转基因烟草再生植株经抗虫测试表明, 与对照烟草相比, 具有明显的抗棉铃虫的能力<sup>[25]</sup>。

郭三堆等人 1999 年利用人工合成的、密码子优化后的雪花莲凝集素(GNA)基因, 与人工合成的 GFM cryIA 构建了双价抗虫基因植物高效表达载体。通过根癌农杆菌介导转化烟草, 获得 28 株卡那霉素抗性植株, 经 PCR 及 Southern 印迹检测, 证实了双价抗虫基因在烟草基因组中的整合。如将其转入大豆中, 必将对抗大豆蚜虫提供了新的方法和基础<sup>[26]</sup>。

## 2.2 大豆抗病基因

抗病转基因研究主要是 CP 基因和几丁质酶基因。

2.2.1 CP 基因是指病毒外壳蛋白(virus coat protein)基因, 外源的病毒外壳蛋白基因导入植物细胞后, 可使植物细胞获得保护作用, 减少发病或延缓发病。徐香玲等以大豆的胚轴和子叶为外植体, 经发根农杆菌侵染, 将抗大豆花叶病毒病(SMV)的 CP 基因转入大豆, 经 PCR、DNA 斑点杂交证明, 获得转入 SMV 基因的大豆植株<sup>[27]</sup>。

2.2.2 几丁质酶(chitinase)存在于植物和微生物中, 为单基因编码, 具有降解几丁质的作用。由于许多危害植物的病原真菌的细胞壁主要成份之一是几丁质, 而植物中还未发现几丁质的底物, 所以, 几丁质酶在防御病原菌侵害中具有重要作用。病原真菌细胞壁中几丁质的降解, 不仅破坏细胞新物质的沉积, 致使病原体死亡, 而且产生的细胞壁碎片具有诱导物作用, 从而刺激寄主植物的抗病反应。徐香玲等以大豆下胚轴为外植体用农杆菌介导法和花粉管通道将几丁质酶基因转入大豆, 并得到了整合的分子证明<sup>[28]</sup>。

## 2.3 大豆抗除草剂基因

抗除草剂转基因机理研究及目前所获得的抗除

草剂基因种类按作用机理的不同,抗除草剂基因主要有3种类型。

2.3.1 产生靶标酶或靶标蛋白质,使作物吸收除草剂后,仍能进行正常代谢作用。草甘膦在细胞中的靶标是芳香氨基酸生物合成中的5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸酯合酶(EPSP合酶),EPSP合酶的缺乏会导致芳香氨基酸缺乏,莽草酸积累,最终导致细胞死亡。EPSP合酶在植物和微生物中均存在。孟山多公司通过克隆自农杆菌中得到该基因。这种来自农杆菌的EPSP合酶基因转入植物后不受草甘膦作用,因此达到抗草甘膦目的。

2.3.2 产生除草剂原靶标的异构酶或异构蛋白,使其对除草剂不敏感。磺酰脲类除草剂(如绿黄隆)和咪唑啉酮类除草剂(如普施特)都是植物体内支链氨基酸,如亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸生物合成的抑制剂,其作用靶标是乙酰乳酸合成酶(ALS)。

2.3.3 产生能修饰除草剂的酶或酶系统。在除草剂发生作用前将其降解或解毒,一般认为,产生外源酶使除草剂失活的基因比上述两种基因优越,因为靶标酶或靶标蛋白的过量产生会给作物造成代谢负担,对作物的生长势和产量不利;而如果靶标酶改变了,其异构酶的活性通常会降低,甚至对转基因作物有害。

我国在抗除草剂基因工程方面的研究起始于80年代,由中国科学院遗传所与中国农业科学院作物所合作,获得转基因抗阿特拉津大豆,这是我国获得的最早的转基因抗除草剂作物<sup>[29]</sup>。

### 3 大豆再生体系研究

大豆转基因是否能获得成功,再生体系的建立是必要的前提和基础。大豆再生体系建立主要工作是大豆的组织培养研究,大豆的组织培养研究始于20世纪60年代,但各种外植体的组织培养与再生植株都十分困难。直到进入80年代我国的此项工作才有报到。大豆的组织培养主要是原生质体和单细胞培养,常用的外植体还有真叶、下胚轴、子叶、子叶节、胚轴和胚等,其诱导途径有两种:一种是诱导外植体产生不定芽(或称丛生芽),之后诱导芽形成根,再形成完整植株,即器官发生途径;另一种途径是诱导体细胞胚胎发生,胚萌发再生植株,称胚胎发生途径。这两种途径的再生体系,在我国都获得了成功,得到的再生的植株,这将为大豆的转基因工作奠定良好的基础。

### 4 大豆转基因研究展望

大豆转基因在方法上,主要采用的是农杆菌介导法和基因枪法,其它方法应用较少,近年来有报道指出,通过一些辅助方法,如抽真空、超声波处理等,或不同转基因方法相结合,对于转化频率的提高都很有效。因此,在对大豆进行转基因研究时,对于转基因方法和方式要勇于创新,摸索一条有利于大豆转基因操作和转化频率提高的新体系。

第二大豆转基因中使用的目的基因多为抗病、抗虫的单一基因,而其它一些,如抗胁迫、耐储藏、参与代谢或光合作用以及与品质有关的基因则很少使用。植物的许多性状往往是由多个基因控制的,许多代谢过程也是由多个基因控制的酶来完成的,因此,在进行大豆转基因时,构建融合基因表达载体或使用新的目的基因用于大豆的转化。

第三,关于大豆转基因的研究报道不少,但一般分子检测证明外源基因整合到基因组上后,进一步的报道则很少,这可能不仅是因为大豆转基因系统还不完善,影响大豆转基因的进一步深入研究的原因,而且还可能是存在转基因沉默现象,即外源基因实现整合而不表达。因此,对大豆进行转基因时,不仅要检测到外源基因的整合,还要尽可能使外源基因稳定和高水平表达。

第四,大豆的组织培养的研究经历了比其它农作物更加艰难的历程,目前,大豆未成熟子叶体细胞胚胎发生途径与大豆成熟子叶节器官发生途径这两个体系基本建立起来,这些工作为大豆转基因工作的开展奠定了良好的基础。但目前大豆组织培养的植株再生率还不高,而且以子叶节为外植体进行遗传转化得到的再生植株多为嵌合体,利用大豆未成熟子叶诱导产生的体细胞胚胎发生这解决这一问题提供了可能途径,但此体细胞胚不能继代增殖,这种低的转化效率,也在一定程度上影响了大豆遗传转化工作进行。

### 参 考 文 献

- 1 王景雪,孙毅.农杆菌介导的植物基因转化研究进展[J].生物技术通报,1999,1:7-13
- 2 李卫,董文,周菲,等.参与在农杆菌介导遗传转化过程中的植物因子研究进展[J].中国生物工程杂志,2003,12:17-20
- 3 Kung, Shain-down, Wu Ray. Transgenic plants[M]. Academic Press, Inc. 1996

- 4 王景雪, 孙毅. 农杆菌介导的植物基因转化研究进展[ J ]. 生物技术通报, 1999, 1: 7—13
- 5 Hinchey M A W, Connor—Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*—mediated gene transfer. [ J ]. *Bio/Technol*, 1998(6): 915—922
- 6 Parrot W A, Hoffman L M, Hildebrand D F, et al. Recovery of primary transformants of soybean[ J ]. *Plant Cell Rep*, 1989, (7): 615—617
- 7 Di R, Purcell V, Collins G B. Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene[ J ]. *Plant Cell Rep*, 1996, 15: 746—750.
- 8 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): 6—11.
- 9 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—108.
- 10 苏彦辉, 王慧丽, 俞梅敏, 等. 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因导入大豆的研究[ J ]. 植物学报, 1999, 41(10): 1046—1051.
- 11 赵桂兰, 刘艳芝, 李俊波, 等. 影响农杆菌介导的大豆基因转化因素的研究[ J ]. 大豆科学, 2001, 20(2): 84—88.
- 12 刘凡, 王国英, 曹鸣庆. 农杆菌介导的植物原位转基因方法研究进展[ J ]. 分子育种学, 2003(1), 1: 108—116
- 13 Christou P. Morphological description of transgenic soybean chimeras created by the delivery, integration and expression of foreign DNA using electric discharge particle acceleration[ J ]. *Ann. Bot.*, 1990, 66: 379—386
- 14 McCabe D E, W F Swain, B J Martinell et al. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration[ J ]. *Biotechnology*, 1986: 923—926
- 15 Christou P, W F Swain, N S Yang et al. Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants[ J ]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 7500—7504
- 16 Yang N Christou P. Cell types specific expression of a CaMV35S—GUS gene in transgenic soybean plants[ J ]. *Devel. Genet*, 1990, 11: 289—293
- 17 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[ M ]. 北京: 科学出版社, 1998, 6
- 18 赵锦, 刘孟军, 蒋洪恩. 转基因技术及其在植物育种中的应用[ J ]. 生物技术, 2002, 12(6): 42—43
- 19 雷勃钧, 李希臣, 卢翠华, 等. 野生大豆外源 DNA 导入栽培大豆及 RAPD 验证[ J ]. 中国科学, B 辑, 1994, 24(6): 596—601
- 20 张国栋, 赵长山. 将外源 DNA 注入幼荚实现大豆遗传转化[ J ]. 大豆科学, 1994, 13(3): 268—273
- 21 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): 277—282
- 22 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): 6—11
- 23 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
- 24 苏彦辉, 王慧丽, 俞梅敏, 等. 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因导入大豆的研究[ J ]. 植物学报, 1999, 41(10): 1046—1051
- 25 高越峰, 朱祯, 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
- 26 郭三堆, 李学勇. 雪花莲凝集素基因韧皮部表达载体的构建及其在转基因烟草中的表达[ J ]. 云南大学学报, 1999, (21): 125—127
- 27 徐香玲, 李兴华, 刘伟华, 等. Ri 质粒介导大豆花叶病毒外壳蛋白基因转化大豆的研究[ J ]. 大豆科学, 1996, 15(4): 279—288.
- 28 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—108
- 29 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

## THE RESEARCH ADVANCE ON SOYBEAN TRANSGENE IN CHINA

Wu Xiaoxia Li Wenbin<sup>\*\*</sup> Zhang Shuzhen

(*Soybean Research Institute of Northeast Agriculture University, Harbin 150030*)

**Abstract** Soybean Transgene development in China is rapid. The technique tache of the common methods used in soybean transgene, such as agro—bacterium medium, electro—pulse method, PEG, particle bombing, transformation in situ mediated by agro—bacterium, etc. and the application condition of them in soybean insect—resistance, disease—resistance, herbicide—resistance are related in this paper. The establishment of soybean regeneration system and prospects on soybean transgene at home and abroad are also mentioned.

**Key words** Soybean; Transgenic method; Alien gene; Regeneration system