大豆生物工程研究进展

周思君

（黑龙江省农科院生物技术研究中心）

近十年来，大豆生物工程研究有了许多新的突破。本文概述了大豆的细胞组织培养、原生质体培养以及基因转移等方面的研究进展。

1 花药（花粉）培养

大豆花药培养一直进展比较缓慢。虽然已经得到花粉植株，但频率极低，重复性很差。大豆花粉植株的诱导频率受许多因素的影响，这些因素主要是基因型、发育状况、培养基、培养条件等。在大豆花药培养中，几乎所有基因型都能产生愈伤组织，但不同材料形成愈伤组织的能力差异很大。起源于花丝、药隔、药壁的体细胞愈伤组织极易产生且增殖很快，常将产生较晚、增殖较慢的花粉愈伤组织覆盖。用PFP（对氟苯丙氨酸）或活性碳能够抑制这些体细胞愈伤组织的产生，但也抑制了花粉愈伤组织的形成。这个问题至今尚未能很好解决。

花粉的发育状况对花粉植株的诱导影响很大。生长在大田的大豆植株比生长在温室的有较高的花粉愈伤组织诱导率；初花期和盛花期的花药对诱导更为有利；只有处于单粒早、中期的花药，细胞逐渐分裂形成多细胞团，进而产生肉眼可见的花粉愈伤组织。

大豆花药培养的基本培养基一般认为以B_5或改良B_5较为适宜，但也有的研究者以MS为基本培养基。激素种类以2,4－D效果较好。蔗糖浓度以6～12%比较合适。

关于培养条件，一般认为低温处理（3～5℃）5天左右有助于启动花粉细胞分裂，但Kadlec等（1991）的研究认为低温预处理无效。接种后置23～28℃下培养比较有利。在诱导愈伤组织期间，光照并不重要，当愈伤组织分化时，需要补充一定的光照。

单花粉培养对于研究花粉脱分化、排除花药体细胞的干扰非常有利。刘德朴、赵桂兰等（1986）取单核期的花蕾，用盖玻片挤压法游离花粉，通过液体培养获得了大量愈伤组织。

2 细胞培养

大豆单细胞培养再生植株的研究报道较少。其中Li等（1985）、罗希明等（1989）从幼胚子叶的愈伤组织分离出单细胞，经培养再生成植株。

在单细胞培养中，来源于不同基因型的大豆细胞的再生能力差别很大；来自下胚轴的悬浮细胞的再生能力与来自幼胚子叶的不同；单独应用玉米素诱导分化获得再生植株，而采用6BA、NAA和IAA三种激素的不同比例配合都没有分化成功；愈伤组织在分化培养基上，如果一个月以上不转移，则不容易分化出芽。

3 组织培养

大豆的组织培养经过了长期的广泛研究，最近几年才有了突破性进展。

中国科学院植物所和黑龙江省农科院合作（1974）从大豆下胚轴诱导出再生幼苗。吉林省农科院（1976）从大豆下胚轴培养出再生植株。陈云昭等（1983）从大豆上胚轴和小真叶离体培养成再生植株。将兴村等（1983）离体培养野生大豆（G. soja）的下胚轴和子叶，经愈伤组织产生再生植株。杨振棠等（1984）培养大豆复叶，并分化成再生植株。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cn

国外大豆组织培养获再生植株的最早记载是 1973 年 Kimball 等人的报道。他们采用的外植体是大豆的下胚轴切段。此后，Dswald(1977)用大豆的种子芽培养获再生植株。Evans 等人(1981)对 7 个种的大豆下胚轴进行培养，仅在 G. canescens 和 G. tamentella 两种多年生野生大豆上获再生植株。Kartha 等人(1981)培养大豆的茎尖获得再生植株。Grant 等人(1984)用白毛多年生野生大豆子叶培养出再生植株。Wright 等(1986,1987)分别用大豆的子叶节、上胚轴和初生叶为外植体，通过器官发生获再生植株。

上述研究虽然再生频率不高，重复性较差，但却大大推动了大豆组织培养的研究。

Christianson 等(1983)从一个遗传型的未成熟胚培养获得再生植株。在一些其它的研究中获得了体细胞胚，但进展到鱼雷期就终止发育。Cheng 和 Saka 等(1980)通过大豆种子苗子叶节中的先存分生组织的增殖获得了再生植株。Lippmann、Tilton 等(1984)、Lazzeri 等(1985)、Ghazi 等(1986)报道了大豆未成熟胚的体细胞胚胎发生。Barwale 等(1986)、Ranch 等(1987)、周恩君等(1989,1990)通过大豆幼胚培养，经体细胞胚胎发生或器官发生，获得了高频率的再生植株，所有被试基因型都能成功。至此，大豆体细胞再生系统比较完整地建立起来，离体培养技术作为传统大豆品种改良技术的辅助手段，应用于体细胞无性系变异或基因转移等遗传操作中。

4 原生质体培养

植物原生质体培养，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到国内外学者的关注。但实践证明，获得大豆原生质体再生植株十分困难。自七十年代以来，人们对大豆原生质体培养进行了广泛研究，分别从子叶、下胚轴、根、茎、叶肉、荚果等器官分离原生质体进行培养，但只能诱导分裂、产生愈伤组织或分化出根。直到最近几年才有了突破性进展，结束了该项研究多年来停滞不前的局面。

Newell(1985)、Hamatt(1987)首先在多年野生大豆(G. canescens, G. clonolestina)上获得成功。继而卫志明等(1988)从大豆未成熟种子的子叶分离原生质体经培养得到了再生植株。张贤泽等(1993)培养大豆幼胚原生质体经体细胞胚再生植株。Hammatt 等(1989)、Jones 等(1991)又在野生大豆(G. argyrea Tind 和 G. clandestina wendl)上获得成功。

纵观大豆细胞、组织和原生质体培养的发展历程，可以看到，外植体的选择或细胞和原生质体的来源对植株再生非常重要。在大豆组织培养方面，虽然进行了广泛研究，但只有当选择了幼胚子叶作为外植体时，才在再生频率上获得真正突破。在此基础上，人们从幼胚子叶分离单细胞或原生质体也相继得到再生植株。

5 基因转移

随着分子生物学的飞速发展，DNA 体外重组和基因克隆技术的建立及植物细胞组织培养方法的不断完善，大豆的基因转移研究进展很快。农杆菌介导及直接基因转移相继获得成功。

Pederson 等(1983)首次用农杆菌感染大豆植株产生瘤，随后又得到冠缨瘤。在通过农植菌介导将外源 DNA 导入大豆组织的尝试中，人们很快意识到寄主范围的限制。王连铮等(1984)研究了 15 个农杆菌菌系与 2759 个野生、半野生和栽培大豆基因型之间的相互作用，筛选出 7 个致瘤能力较强的菌系和 858 个结瘤基因型，并获得了含 T－DNA 的稳定大豆细胞系。Facciotti 等(1985)用农杆菌感染大豆幼苗获得转化的组织并表达了对卡那霉素的抗性。Mi 等(1986)、Baldes 等(1987)获得转化的原生质体。上述研究证明了可以用农杆菌来转化大豆细胞，但未能从转化的细胞再生成植株。

Rech 等(1988,1989)用 Agrobacteriun rhizogenes 在野生大豆 G. canescens 上诱导产生转化

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cn

的根进一步诱导再生成完整植株，并对转入基因进行了分子验证。Jones 等(1991)用相似的方法在野生大豆 G. argyrea Tind 上也获得成功。不幸的是将这个可有效地转化野生大豆的程序用在栽培大豆上并未获得成功。

Hinchee 等(1988)选择对农杆菌敏感的大豆基因型，用含有重组质粒的农杆菌感染子叶外植体，并在含有卡那霉素的诱导不定芽的培养基上培养，大约获得 6%的转化了的芽。有两个植株后代表现卡那霉素、GUS 基因表达和耐草甘磷，并按孟德尔 3：1 的遗传规律分离。Parrott 等(1989)用体细胞胚胎发生系统通过农杆菌感染，获得大豆的嵌合转化体。同年，Chee 等用农杆菌感染发芽的大豆种子，获得转化的植株。

农杆菌介导的基因转移虽然已在大豆上获得成功，但它有很强的基因型依赖性。这表现在两个方面：一是基因型对农杆菌感染的敏感性；二是基因型的再生能力。换言之，一个基因型必须同时具备两个方面的"适宜性"，才有可能获得成功。为了克服这种局限性，研究者们对微注射、电激、粒子轰击(基因枪)等直接基因转移技术进行了广泛探索并取得了可喜进展。

Lin 等(1987)通过电激将外源基因导入培养的大豆原生质体并获得表达。Christou 等(1987)通过电激已使许多主栽大豆品种的原生质体得到稳定转化，并从转化的愈伤组织形成根。Dhir 等(1992)电激大豆的原生质体获得了转基因植株。应当指出，应用电激法，受体常用原生质体，而原生质体的再生尚较困难，所以该法目前仍有较强的基因型依赖性。

Liu 等(1990)用子房注射法将龙葵的抗阿特拉津(除草剂)基因转入大豆叶绿体基因组中。遗憾的是他们没有分子杂交(southern blot)的结果，所以未能确切证明外源 DNA 已经稳定地整合在大豆基因组中。点杂交(dot blot)和 PCR 分析易受背景和假阳性的影响，所以只能作为初级证据[7]。

Sanford(1988)首次提出的基因枪技术(biolistics)为植物的遗传转化提供了更有效的方法。Mccabe 等(1988)、christou 等(1990)、Finer 等(1991)相继报道在大豆上应用基因枪法获得稳定转化。取大豆幼胚的胚轴，用基因枪轰击其生长点，可以从任意一个基因型获得转基因植株。迄今为止，已经从 30 多个品种(包括所有熟期组)上得到几百株转基因植株，其中抗除草剂 Basta 和 Roundup 的转基因大豆已经进入大规模的田间鉴定。

以上是大豆生物工程近年来的研究进展，有的尚处探索阶段，有的获得了突破性进展，有的已经进入大田试验。无容置疑，生物工程技术即将在大豆品种改良中大显身手。

主 要 参 考 文 献

1 卫志明等. 大豆原生质体培养再生植株. 植物生理学通讯，1988(2)：53～54

2 尹光初等. 大豆花粉植株的诱导及其雄核发育的研究. 大豆科学，1982(1)：69～75

3 张贤泽等. 大豆原生质体经体细胞胚胎再生植株. 中国科学(B 辑)，1993，23(2)：154～158

4 罗希明等. 大豆单细胞培养再生植株的研究. 植物学报，1989，31(3)：231～234

5 Chee, P. P. et al. Plant Physiol., 1989, 91:1212～1218

6 Christou, P. et al. Trends in Biotech, 1990, 8:145～151

7 Christou, P. et al. Soybean Genet. Newsl., 1991, 18:201～209

8 Dhir, S. K. et al. Plant Physiol., 1992, 99:81～88

9 Finer, J. J. et al. Plant Cell Rep., 1992, 11:323～328

(篇幅所限，其它参考文献略)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cn