

大豆遗传转化的主要障碍及研究进展^{*}

周思军

(黑龙江省农科院生物技术研究中心, 哈尔滨 150086)

摘要: 尽管抗除草剂转基因大豆已经商品化, 但大豆的转化频率仍很低, 是公认的难转化作物。本文从再生系统和转化方法两个方面阐述大豆转化的主要障碍和最新研究进展。

关键词: 大豆; 再生植株; 遗传转化

中图分类号: S 565. 103. 53 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2001)03-0024-04

The Major Obstacles and Research Progress on Soybean Transformation

ZHOU Si-jun

(Biotechnology Research Center, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: Soybean is a generally acknowledged recalcitrant crop for transformation although the transgenic soybean with herbicide resistance has been commercialized. The article will expound the major obstacles and the new research progress on soybean transformation by reviewing the regeneration systems and transformation methods of soybean.

Key words: soybean; plant regeneration; transformation

大豆是公认的难转化作物, 其主要原因是从转化的细胞或组织分化再生植株困难。虽然已经有了再生频率相对较高的再生系统, 但它们尚不能与现有的植物转化方法很好地结合。Hinchee 等^[1]和 McCabe 等^[2]首先获得大豆转基因植株, 他们分别采用了农杆菌介导法和基因枪法。此后, 又有一些成功的报道, 包括最成功的商品化抗除草剂转基因大豆。尽管许多研究者致力于优化大豆的转化系统, 但大豆转化的频率仍很低, 重复性很差, 还远未模式化。本文从再生系统和转化方法两个方面阐述大豆转化的主要障碍和最新进展。

1 用于大豆遗传转化的再生系统

大豆的组织培养经历了漫长的艰苦过程, 一度十分困难。终于在 80 年代初期有了转机。人们选择了幼胚、幼胚子叶或胚轴为外植体, 用异常高浓度的植物生长调节物质, 建立了大豆的体细胞胚胎发生和器官发生再生系统。随后用成熟胚子叶、子叶节、初生叶和初生叶节等相继获得了较高频率的源于不定芽的再生植株。80 年代末期原生质体培养

获得突破。至此, 大豆的植株再生似乎不再是遗传转化的绝对限制因子, 大量的转化研究付诸实施。

1.1 大豆体细胞胚胎发生再生系统

该系统是以未成熟胚子叶、胚轴或整胚为外植体, 用改良 MS 培养基附加高浓度的 2, 4-D 或 NAA 诱导体细胞胚胎发生, 然后再生植株。Christianson 等^[3]以幼胚轴为外植体, 在以柠檬酸铵为氮源并含有 5 mgL^{-1} 2, 4-D 的改良 MS 培养基上诱导了体细胞胚胎发生, 首先获得再生植株。随后 Ranch 等^[4]对 2, 4-D 诱导的大豆未成熟胚的体细胞胚胎发生系统进行了较为详细的研究。Lazzeri 等^[5]用 10 mgL^{-1} NAA 诱导了大豆幼胚子叶的体细胞胚胎发生。他们认为, 2, 4-D 诱导的体细胞胚胎发生虽然频率高, 但形态不正常, 难以萌发形成完整植株; NAA 诱导的体细胞胚胎发生虽然频率低, 但形态更正常。周思军等^[6]对影响大豆体细胞胚胎发生的因素进行了系统研究, 认为 2, 4-D 的诱导效果优于 NAA; 细胞分裂素对体细胞胚胎发生有抑制作用; 蔗糖浓度以 1.5% 为好; 未成熟胚的长度和接种的方

* 收稿日期: 2001-01-02

作者简介: 周思军(1957—), 男, 内蒙古自治区赤峰市人, 博士, 研究员, 从事植物生物技术研究。

式也是影响大豆体细胞胚胎发生的重要因素。在上述体细胞胚胎发生系统中,体细胞胚均在幼胚子叶的上表皮直接产生,一般不经过胚性愈伤组织的增殖,并且起源于多细胞。能形成体细胞胚的细胞在外植体中占极小的比例。因此,转化和筛选都十分困难。到目前为止,尚没有用这两个再生系统获得转基因植株成功的报道。

Finer 等^[7]报道了一个体细胞胚胎发生的悬浮培养系统。该系统由于胚性细胞团中可增殖的胚性细胞处于表面及近表面,且能在众多的位点上形成体细胞胚,使转化变得方便而高效;另外在胚性细胞团增殖培养过程中,由于培养液与胚性细胞团充分接触,可进行高效筛选获得均一的转化胚性细胞团,进而获得大量转化的非嵌合的体细胞胚以再生转化植株。因此,该系统为基因枪和农杆菌转化提供理想的靶组织^[8,9]。该系统的缺点是较多的转化植株不育;另外外植体为幼胚子叶,取材受季节和温室条件的限制。不育性可能是组织培养过程引起的,因为长时间继代的培养物再生的植株常常表现出部分不育或完全不育及其它变异。

1.2 大豆器官发生再生系统

Cheng 等^[10]首先报道用无菌苗的子叶节为外植体,在含高浓度 BA (10—50 μM) 的改良 B5 培养基上诱导丛生芽获得高频率的再生植株。随后, Kartha 等^[11]用无菌苗茎尖、Bawale 等^[12]用未成熟胚子叶、Wright 等^[13]用上胚轴和出生叶、Hinchee 等^[1]用成熟胚子叶、McCabe 等^[2]用幼胚轴、Kim 等^[14]用出生叶节,通过器官发生获得再生植株。在这些器官发生程序中,植物生长调节物质一般用 1.5 ~ 3.0 mgL⁻¹BA,基本培养基用 B5 或 MS。已经获得转化成功的器官发生再生系统有成熟胚子叶再生系统^[1]、无菌苗子叶节再生系统^[15,16]和幼胚轴再生系统^[2,17,18,19]。器官发生再生系统用于遗传转化的主要优点是:(1)组培时间短,可在 3 个月内得到再生植株,而体细胞胚胎发生途径则需 4 个月或更长时间;(2)不育的再生植株少;(3)外植体来源范围广,未成熟胚或无菌苗均可。但因其一般不经过愈伤组织的继代增殖,所以筛选较难,得到的转化植株多为嵌合体,后代的鉴定、筛选和纯化工作量大。

1.3 原生质体再生系统

Wei 等^[20]首次获得大豆原生质体再生植株。罗希明等^[21]和 Dhir 等^[22]以相似的方法获得了不同品种的大豆原生质体再生植株。张贤泽等^[23]和肖文言等^[24]培养大豆原生质体经胚胎发生获得再生

植株。南相日等^[25,26]用 Bt 基因分别经 PEG 和 P10 介导转化大豆原生质体获转基因植株。理论上,原生质体再生系统是克服嵌合体问题的最有潜力的系统。但因该系统操作复杂、工作量大、再生不易成功和培养周期过长容易产生变异等原因,在大豆转化中不常用。

2 大豆遗传转化方法

2.1 农杆菌介导法

到目前为止,农杆菌介导法因其低拷贝、完整整合和操作简便仍是大豆转化的首选方法。不定芽器官发生再生系统是农杆菌介导法转化大豆的常用受体系统。Hinchee 等^[1]首次用农杆菌介导法获得大豆转基因植株。他们从 100 个栽培大豆品种中筛选到 3 个对农杆菌较敏感的基因型。从 4 ~ 10 d 的无菌苗上分离子叶,经农杆菌感染后,在含卡那霉素的筛选培养基上经不定芽获再生植株。经检测,再生植株的 6% 为转基因植株。其中两株的后代转基因按 3:1 分离,表明外源基因是以单拷贝整合进大豆基因组。

子叶节再生系统虽然被一些公司和试验室用作农杆菌转化法的常规系统,但成功的报道却很少。Di 等^[13]以卡那霉素为筛选剂将 BPMV (Bean Pod Mottle Virus) 外壳蛋白基因转入大豆。Zhang 等^[14]以 bar 基因作选择标记基因,用除草剂草甘膦进行筛选获得转化植株。但该系统的转化频率仍很低。

鉴于农杆菌介导法转化大豆的频率仍很低,最近一些新的旨在提高农杆菌介导法转化频率的方法被探索。研究最多的是超声波辅助农杆菌介导转化法,简称为 SAAT 法^[27,28]。SAAT 法主要是将外植体在接种农杆菌后进行短暂的超声波处理。扫描电镜及光学显微镜揭示超声波处理使外植体表面及近表面产生大量的细小贯穿通道。因此,农杆菌易于渗入并与植物细胞接触,从而促进转化。与该方法类似的还有真空抽滤或粒子轰击与农杆菌介导相接合等方法。这些新的技术正处在研究之中,其效果尚无定论。

除再生系统的限制外,农杆菌介导法转化大豆的主要限制因素是基因型和组织特异性,即不同的大豆品种对农杆菌的敏感性不同,另外农杆菌对大豆可再生组织(如体细胞胚、子叶节等)的感染率可能是低的^[9]。

2.2 基因枪(粒子轰击)法

基因枪法是对农杆菌不敏感的物种和基因型转

化的常规方法,也是研究瞬间表达的常用技术。首次用此方法获得转基因大豆植株的报道^[2]是以大豆未成熟胚生长点为靶组织进行轰击,然后在高浓度细胞分裂素的培养基上形成丛生芽。该转化系统因为所有转化体均为嵌合体,所以在丛生芽诱导阶段并不筛选,而是通过对所有再生苗进行GUS分析选择嵌合转化体,然后再在后代中选择获得非嵌合转化株^[17,18]。虽然该系统已被一个商业实验室用作大豆转化多年,但其转化植株的频率很低,而且工作量很大,成本很高。

如前所述,悬浮培养的胚性细胞团是基因枪轰击的较好的靶组织。Finer等^[29]首次用携带hph(潮霉素磷酸转移酶)和uidA(GUS)基因的DNA包裹的钨粒轰击大豆的悬浮胚性细胞团,通过潮霉素筛选获得大量转基因植株。随后,又有一些成功的报道。其中,Stewart等^[30]用合成的Bt(cry I Ac)基因,通过基因枪轰击悬浮培养的球形体细胞胚,经潮霉素筛选获得3个转基因株系。与以往不同的是他们得到的转基因植株都是可育的并高表达抗虫基因。最近,Maughan等^[31]用基因枪轰击固体培养的胚性细胞团,并在固体培养基上筛选,将牛酪蛋白基因转入大豆获可育转基因植株。悬浮的胚性组织在6个月前是相对不易转化的,但随着培养周期的延长,再生能力和再生植株的育性都将降低^[32]。

2.3 原位转化法

以上所述各种大豆转化方法均为离体转化,即用离体的细胞或组织作受体进行转化。在离体转化系统中,组织培养过程是不可避免的。既然大豆的愈伤组织分化和植株再生比较困难,探索新的能够避免组织培养的原位转化方法对大豆遗传转化具有重大意义。同时,因为组织培养过程常引起变异,因此尽量缩短或避免组培过程也是所有植物遗传转化的发展方向。

Chee等^[33]用农杆菌感染大豆发芽种子的腋芽区,获得的植株中有0.07%产生了转化的种子。这种方法尽管转化频率有些过低,但仍不失为大豆原位转化的一次有益尝试。

Bechtold等^[34]创立了一个简单、高效的拟南芥浸花转化法。他们在一个密封容器内将处在开花期的拟南芥植株颠倒,使其浸入农杆菌菌液,抽真空使农杆菌进入花器内部。然后让植株生长至成熟,收获种子并让它们在选择培养基上发芽(或用选择剂喷洒小植株)筛选到抗性植株,并证明抗性植株被稳定转化。后来该方法又被改进,只是简单地将花组

织在含有5%蔗糖和0.05%表面活性剂的菌液中浸一下,可获得0.5%的转化了的种子^[35]。该方法目前已被应用于大豆,但尚没有成功的报道。

Touraev等^[36]用含有npt II和gus的DNA通过粒子轰击转化烟草的单核期花粉,轰击过花粉离体培养6d后发育成熟,再用这些成熟的花粉给烟草植株授粉,收获的种子在含有卡那霉素的培养基上发芽,得到5株抗性植株。分子杂交和表达分析证明了被转基因的整合和表达。该技术依赖于花粉的离体培养,而大豆的花粉离体培养技术尚未发展。

能够免去组培过程的另外两个大豆原位转化方法是花粉管通道法和子房微注射法。雷勃钧等^[37]将国内周光宇等创立的植物花粉管通道转化法应用于大豆。他们提取野生大豆或花生等作物的总DNA,经花粉管通道导入大豆获得了变异的后代。但变异频率较低且不稳定,说明该系统还有待优化。用该方法转移目的基因尚无成功报道。刘博林等^[38]用子房微注射法将龙葵的Atrazine抗性基因导入大豆叶绿体中并得到表达。子房注射法虽然转化频率较高,但因大豆子房小,操作难度较大,使该方法的应用受到限制。

参考文献:

- [1] Hinchey MAW, DV Conner-Ward, CA Newell, RE McDonnell, SJ Sato, CS Gasser, DA Fischhoff, DB Re, RT Fraley and RB Horsch. Production of transgenic soybean plants using Agrobacterium-mediated DNA transfer[J]. BIO/TECHNOL. 1988, 6: 915-922.
- [2] McCabe DE, WF Swain, BJ Martinell and P Christou. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration[J]. BIO/TECHNOL. 1988, 6: 923-926.
- [3] Christianson ML, DA Warrick and PS Carlson. A morpho-genetically competent soybean suspension culture[J]. Science 1983, 222: 632-634.
- [4] Ranch JP, L Oglesby and AC Zielinski. Plant regeneration from embryo-derived tissue cultures of soybean by somatic embryogenesis. In Vitro Cell. Dev. Biol. 1985, 21: 653-657.
- [5] Lazzeri PA, DF Hildebrand and GB Collins. A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean[J]. Plant Mol. Biol. Rep. 1985, 3: 160-167.
- [6] 周思军,尹光初,雷勃钧,等.大豆体细胞胚胎发生影响因素的研究[J].植物学通报 1992, 9(2): 38-43.
- [7] Finer JJ and A Nagasawa. Development of an embryogenic suspension culture of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill][J]. Plant Cell Tissue Organ. Cult. 1988, 15: 125-136.
- [8] Saio S, C Newell, K Kolacz, L Trebb, J Finer and M Hinchey. Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems[J]. Plant Cell Rep. 1993, 12: 408-413.
- [9] Trick HN, RD Dinkins, ER Santarem, R Di, V Samoylov, CA Meurer, DR Walker, WA Parrott, JJ Finer and GB Collins. Recent ac-

- vances in soybean transformation[J]. Plant Tissue Cult. Biotech. 1997, 3:9-26.
- [10] Cheng TY, H Saka and TH Voqui—Dinh. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture[J]. Plant Sci. Lett. 1980 19:91-99
- [11] Kartha KK, K Pahl, NL Leung et al. Plant regeneration from meristems of grain legumes: soybean, cowpea, peanut, chickpea and bean [J]. Can J. Bot. 1981, 59:1671-1679.
- [12] Barwale UB, HR Kerns and JM Widholm.. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis[J]. Planta 1986 67: 473-481
- [13] Wright MS, MH Williams, PE Pierson, et al. Initiation and propagation of *Glycine max* L. Merr.; Plants from tissue—cultured epicotyls [J]. Plant Cell Tissue Org. Cult. 1987, 8: 83-90
- [14] Kim J, CE LaMotte and E Hack. Plant regeneration In Vitro from primary leaf nodes of soybean (*Glycine max*) seedlings[J]. J. Plant Physiol. 1990, 136: 664-669
- [15] Di R, V Purcell, GB Collins and S Ghabrial. Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene[J]. Plant Cell Rep. 1996, 15: 746-750
- [16] Zhang Zhanyuan, Xing Aiqiu, et al. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*—mediated transformation of soybean [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 1999, 56: 37-46.
- [17] Christou P. Soybean transformation by electric discharge particle acceleration[J]. Physiol. Plant. 1990, 79: 210-212.
- [18] Christou P and DE McCabe. Prediction of germ—line transformation events in chimeric R0 transgenic soybean plantlets using tissue—specific expression patterns[J]. Plant J. 1992, 2: 283-290.
- [19] Yang YS, et al. Comparative studies of organogenesis and plant regeneration in various soybean explants[J]. Plant Science 1990, 72: 101-108.
- [20] Wei Zhi—ming and Xu Zhi—hong. Plant regeneration from protoplasts of soybean (*Glycine max* L.) [J]. Plant Cell Rep. 1988, 7: 348-351.
- [21] 罗希明 赵桂兰, 简玉瑜. 大豆原生质体的植株再生[J]. 植物学报, 1990, 32: 616-621.
- [22] Dhir SK, S Dhir, JM Widholm. Regeneration of fertile plants from protoplasts of soybean (*Glycine max* L. Merr.); genotypic differences in culture response[J]. Plant Cell Rep. 1992, 11: 285-289
- [23] 张贤泽, 小松田隆夫. 大豆原生质体经体细胞胚再生植株 [J]. 中国科学(B 辑), 1993, 23: 154-158.
- [24] 肖言文 王连铮. 大豆原生质体培养经胚胎发生高频率再生植株[J]. 大豆科学 1993, 12: 249-251
- [25] 南相日, 刘文萍, 刘丽艳, 等. PEG 介导 Bt 基因转化大豆原生质体获得转基因植株[J]. 大豆科学 1998 17(4): 326-329.
- [26] 南相日, 卫志明. 利用聚鸟氨酸提高大豆原生质体外源基因的转化效率(简报)[J]. 实验生物学 1999 32(4): 409-411.
- [27] Meurer CA, RD Dinkins and GB Collins. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation[J]. Plant Cell Reports 1998, 18: 180-186.
- [28] Trick HN and JJ Finer. Sonication—assisted *Agrobacterium*—mediated transformation of soybean (*Glycine max* [L.] Merrill) embryogenic suspension culture tissue[J]. Plant Cell Rep. 1998, 17: 482-488.
- [29] Finer JJ and MD McMullen. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue[J]. In Vitro Cell. Dev. Biol. 1991, 27: 175-182.
- [30] Stewart CN, MJ Adang, JN All, HR Boema, G Cardineau, D Tucker and WA Parrott. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic bacillus thuringiensis cryIAc gene[J]. Plant Physiol. 1996 112: 121-129
- [31] Maughan PJ, R Philip M—J Cho, JM Widholm and LO Vodkin. Biolistic transformation, expression and inheritance of bovine (—casein in soybean (*Glycine max*) [J]. In Vitro Cell. Dev. Biol. 1999 35: 344-349.
- [32] Hazel CB, TM Klein, M Anis, HD Wilde and WA Parrott. Growth characteristics and transformability of soybean embryogenic cultures [J]. Plant Cell Rep. 1998, 17: 765-772.
- [33] Chee PP, KA Fober, JL Slightom. Transformation of soybean (*Glycine max*) by infecting germinating seeds with *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Physiol. 1989, 91: 1212-1218.
- [34] Bechtold N, J Ellis and G Pelletier. In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants[J]. C. R. Acad. Sci. Paris. Life Sci. 1993, 316: 1194-1199
- [35] Clough SJ and AF Bent. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*—mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant J. 1998, 16: 735-743.
- [36] Touraev A, E Stoger, V Voronin and E Heberle—Bors. Plant male germ line transformation[J]. Plant Journal 1997, 12: 949-956.
- [37] 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
- [38] 刘博林, 岳绍先, 胡乃璧, 等. 龙葵 Atrazine 抗性基因向大豆叶绿体的转移及在转基因植株中的表达[J]. 中国科学(B 辑) 1989, 19: 699-705.