

转基因技术在大豆育种中的应用^{*}

王 芳, 朱洪德, 李 伟
(黑龙江八一农垦大学, 大庆 163319)

摘要: 转基因技术作为一门新兴技术, 在大豆育种中应用前景巨大。简要介绍了转基因技术在国内外
的应用, 同时概述了大豆遗传转化主要采用的花粉管通道法、农杆菌介导法和基因枪法。
关键词: 转基因技术; 大豆; 育种
中图分类号: S 565. 103. 53 **文献标识码:** A **文献编号:** 1002—2767(2007)01—0090—03

Application of Transgenic Technology in Soybean Breeding

WANG Fang, ZHU Hong-de, LI Wei
(Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319)

Abstract: Transgenic technology has great foreground as a new technology in soybean breeding. The
text introduced the application of transgenic technology in the national and abroad in brief, meanwhile
it summarized the genetic transformation mediated by Pollen-tube pathway, agrobacterium tumefaciens
and particle bombardment.
Key words: transgenic technology; soybean; breeding

0 前言

过去, 人们从生理生化、形态、细胞遗传、同工酶等方面对大豆进行了大量遗传研究, 但这些研究结果容易受到其它因素的影响, 进而阻碍了遗传研究的发展。自 20 世纪 80 年代以来, 人们利用转基因技术将不同种、属间的优异基因经过体外切割、搭配、重组, 删除不良性状, 保留有效成分, 将此基因导入植物, 从而起到了传统育种无法实现的基因重组的目的, 大大地提高了育种水平, 开辟了植物育种新时代。

目前, 主要应用于大豆育种上的转基因技术方法有: 农杆菌介导法、基因枪法和花粉管通道法。农杆菌介导的遗传转化是通过感染将所带的经过或未经改造的 T—DNA 导入植物细胞, 引起相应的植物细胞可遗传的变异; 花粉管通道法是以植株整体为受体, 利用植物在开花、受精过程中形成的花粉管通道, 将外源 DNA 导入受精卵细胞, 从而导入外源基因, 经严格的筛选而获得稳定转化品系; 基因枪法

是利用火药爆炸或高压气体加速, 将包裹了带目的基因的 DNA 溶液的高速微弹, 直接送入完整的植物组织和细胞中, 然后通过细胞和组织培养技术, 经筛选得到转基因植株。

1 大豆转基因技术的应用

1983 年采用根癌农杆菌 Ti 质粒作为载体, 通过遗传转化培育成功的一种含有抗生素类抗体的烟草是世界上第一种转基因植物。世界上第一种转基因食品是 1993 年投放美国市场的转基因晚熟西红柿。自从 1981 年 Whitely 克隆了 Bt(苏云金芽孢杆菌)毒蛋白基因 cryIA (b)以来, 大豆转基因技术主要应用在抗除草剂、改良大豆品质、抗病虫及抗逆境等方面。在我国大豆转基因育种中最卓有成效的是品质改良。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。雷勃钧等^[1]应用花粉管通道法直接导入高蛋白野生大豆 DNA, 获得高蛋白含量的黑生 101。河南周口农科所利用花粉管通道法, 将玉米总 DNA 导入大豆中,

^{*} 收稿日期: 2006—03—09
第一作者简介: 王芳(1981—)女, 黑龙江鸡西市人, 在读硕士研究生, 从事植物病理学研究。E—mail: lottost@sohu.com。
通讯作者: 朱洪德, 研究员, 主要从事于大豆育种与栽培方面的研究。E—mail: ndzhd@sohu.com。

获得高油高产大豆周豆 12 号。徐香玲等^[3]用质粒做介导已将 PK T54B7C5 质粒上的 Btk—内毒素蛋白基因导入东北大豆黑农 37, 黑农 39 等品种, 从而开发出了抗除草剂的大豆。

近 25 年来, 经过广大科学工作者的不懈努力, 转基因大豆层出不穷, 转基因大豆面积在全球转基因作物面积中高居榜首。转基因技术的研究和应用, 必将对人类产生更大的影响。

2 转基因技术方法

遗传转化的方法, 按其是否需要通过组织培养再生植株可分成两大类, 第一类方法不需要通过组织培养, 目前比较成熟的主要有花粉管通道法; 另一类需要通过组织培养再生植株, 常用的方法有农杆菌介导转化法、基因枪法。

2.1 花粉管通道法

2.1.1 花粉管通道法研究进展 周光宇^[3]于 1978 年设计了花粉管通道转移源 DNA 技术。此技术与基因枪法和农杆菌介导的植物转化方法相比, 不需要精密的仪器可以在大田条件下进行, 常规育种工作者易于掌握, 理论上适用于任何有性生殖植物的遗传转化, 因此应用十分广泛。雷勃钧^[4,5]最早在大豆上应用花粉管通道技术进行转基因研究。此后我国许多学者相继做了利用花粉管通道法将外源基因导入大豆的研究, 并育成了抗病丰产品系^[6~9]。

2.1.2 花粉管通道法研究热点 花粉管通道法是在授粉后向子房注射含目的基因的 DNA 溶液, 利用植物在开花、受精过程中形成的花粉管通道, 将外源 DNA 导入受精卵细胞, 并进一步地被整合到受体细胞的基因组中, 随着受精卵的发育而成为带转基因的新个体。利用花粉管通道法导入外源基因的方法有子房和胚囊微注射法、柱头滴加法、花粉粒携带法和生殖细胞浸泡法等。花粉管通道法虽然简便易行, 但需要育种工作者摸索具体的外源 DNA 导入时间与方法^[10], 另外还有后代选择问题^[11]。近年来一些学者尝试将“改良浸种法”应用于大豆的遗传转化, 即结合应用花粉管通道法和幼荚注射法等方法进行外源总 DNA 或目的基因的导入, 得到一系列的优良株系和品系^[12~14]。在取得转基因大豆之后, 利用标记基因检测、PCR 检测等方法对转基因植株进行检测以提供充足的分子生物学证据^[15~17]。

2.2 农杆菌介导法

2.2.1 农杆菌介导法研究进展 农杆菌是普遍存在于土壤中的一种革兰氏阴性细菌, 它能在自然条件下趋化性地感染大多数双子叶植物的受伤部位,

并诱导产生冠瘿瘤或发状根。根癌农杆菌和发根农杆菌的细胞中有一段 T—DNA, 农杆菌通过侵染植物伤口进入细胞后, 可将 T—DNA 插入到植物基因组中。因此, 农杆菌是一种天然的植物遗传转化体系。农杆菌介导的遗传转化是通过感染将所带的经过或未经改造的 T—DNA 导入植物细胞, 引起相应的植物细胞可遗传的变异^[18]。Facciotti 等^[19](1985)最早开始克隆基因用于农杆菌侵染大豆进行转化, 它们构造 1, 5—二磷酸核酮糖融化酶(SSU)、章鱼碱合成酶(OSU)和 NPT II 的融合基因, 转化栽培大豆 Forrest 的子叶、子叶节和节间, 检测后证明在愈伤组织中诱导表达。1988 年, Hinchee 等^[20]首次用农杆菌介导法获得大豆转基因植株。目前, 一般的做法是以大豆的子叶、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。

2.2.2 农杆菌介导法的特点 农杆菌介导法优点是手段相对简单, 可靠性强, 效率高, 周期短, 但在只有外植体能再生的双子叶植物中才能采用, 大豆转化的效率受到农杆菌菌株感染转化能力、大豆基因型、组织培养条件、T—DNA 的转移效率和转化后的筛选模式的影响。

2.3 基因枪法

2.3.1 基因枪法的研究进展 基因枪法也叫微弹轰击法, 就是把直径很小的钨粉或金粉粒子微粒浸泡在供体 DNA 中, 使外源基因吸附在表面, 然后用基因枪以很高的速度将金属微粒射入受体植物细胞内实施转化。基因枪法最早由美国 Comell 大学的 Sanford 等(1987)提出来的, 获得转基因大豆的首例报道是 McCabe 等(1988), 他们用基因枪轰击芽分生组织, 诱导芽分生组织形成丛生不定芽后再生成完整植株。应用在大豆上主要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。随着基因枪法技术的成熟, 基因枪轰击的位置已不局限于胚轴, 还有大豆茎尖^[21]、大豆胚性悬浮细胞^[22]和大豆未成熟胚茎尖^[23]。

在大豆转基因抗虫育种方面, Parrott 等^[24]用携带 Bt 结晶蛋白毒性基因和(或)CpTi 基因的微弹轰击各种基因型大豆品种的胚状悬浮系, 获得转基因植株, 后代对黎豆夜蛾幼虫有明显抑制生长的作用。Stewart 等^[25]将人工合成的 Bt 晶体蛋白基因通过基因枪法导入感虫品种 Jack 里, 获得的转基因植株的后代对棉铃虫、大造桥虫、烟芽夜蛾、黎豆夜蛾等均有较强的抑制作用。

2.3.2 基因枪法的特点 与农杆菌转化相比, 基因

枪法转化的一个主要优点是不受受体植物范围的限制,其载体质粒的构建也相对简单,因此也是目前转基因研究中应用较为广泛的一种方法。其缺点是转入的基因拷贝数是随机的,使导入的外源基因表达水平降低或沉默,容易将较大片断的基因断裂成小片段。

3 小结与展望

目前,在技术上几乎所有的生物都可以通过转基因来改变其生物特性。转基因技术突破了自然资源的限制,可按照人类的需要选择基因,改造农作物的遗传物质,赋予其新的性状,大幅度提高了农作物的产量和品质,使农作物可能同时具有高产、优质、抗病毒、抗虫、抗寒、抗旱、抗涝、抗盐碱、抗除草剂等多重优点。利用转基因技术已获得抗病虫、高产、高油、高蛋白的大豆品种。但目前转基因技术的应用存在诸多问题,主要集中在大豆的许多经济性状是数量性状,受微效多基因控制,而且基因数量庞大,分离目的基因困难;外源 DNA 直接导入,一般导入的是总 DNA,缺乏标记基因,鉴定难度大;转化后表达基因的调控、标记基因的去除都是大豆转化的研究热点。我们有理由相信,在未来几年,随着分子生物学的快速发展,转基因技术必将会在大豆育种中大显身手。

参考文献:

[1] 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.

[2] 徐香玲, 高晶, 刘伟华, 等. Ti 质粒介导的 BK-1 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.

[3] 周光宇. 农业分子育种—授粉后外源 DNA 导入植物的技术[J] 中国农业科学, 1988, 21(3): 1-6.

[4] 雷勃钧, 尹光初, 卢秀华, 等. 外源野生大豆 DNA 导入栽培大豆引起的变异[J]. 中国油料, 1989, (3): 11-13.

[5] 雷勃钧, 尹光初, 卢秀华, 等. 外源 DNA 导入大豆的适宜时期与相应方法[J]. 中国油料, 1991, (1): 88-89.

[6] 黄承彦, 颜廷进, 战明奎, 等. 大豆自花授粉后外源 DNA 导入技术[J]. 山东农业科学, 1990, (5): 8-11.

[7] 雷勃钧, 卢翠华, 钱华, 等. 导入外源总 DNA 获得优质高蛋白和双高新品系[J]. 大豆科学, 1995, 14(3): 203-208.

[8] 赵丽梅, 刘德璞, 孙襄, 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.

[9] 苗保河. 外源 DNA 直接导入大豆遗传变异的研究[J]. 作物品种资源, 1998, (2): 21-23.

[10] 吴秀红. 大豆花粉管道法导入外源 DNA 的适宜时期与方法探讨[J]. 黑龙江农业科学, 2001, (2): 48-49.

[11] 吴秀红, 李希飞, 郭泰, 等. 导入外源总 DNA 选育大豆新品种的后代处理方法初探[J]. 大豆科学, 2001, 20(2): 98-101.

[12] 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.

[13] 麻浩, 江巨鳌, 田森林, 等. 将西洋参 DNA 导入大豆实现遗传转化的研究. I. 导入后代形态性状变异的分析[J]. 中草药, 2000, 31(1): 51-53.

[14] 刘塔斯, 麻浩, 田森林, 等. 将西洋参 DNA 导入大豆实现遗传转化的研究. II. 导入后代异黄酮类成分的含量测定[J]. 中草药, 2000, 31(2): 99-101.

[15] 雷勃钧, 李希臣, 卢秀华, 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 辑), 1994, 24(6): 596-601.

[16] 李希臣, 雷勃钧, 刘丽艳, 等. 早熟大豆外源 DNA 导入 RAPD 分子验证[J]. 大豆科学, 1994, 13(2): 152-156.

[17] 崔岩, 杨庆凯, 周思军. 利用花粉管通道技术导入大豆抗病虫目的基因[J]. 生物技术, 2002, 12(6): 5-7.

[18] 许智宏. Plant Biotechnology[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998. 321.

[19] Facciotti D, Oeal J, K O, Lee S, et al. Light-inducible expression of A chimeric gene in soybean tissue transformed with Agrobacterium[J]. Bio/ Technology, 1985, (3): 241-246.

[20] Hinchee M A W, Connor Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using Agrobacterium mediated DNA transfer[J]. Biotechnology, 1988, (6): 915-922.

[21] Christou P, Swain W F. Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants[J]. Proc Nat Acad Sci. USA. 1989, 86: 7500-7504.

[22] Finer J J, McMullen M D. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic Suspension culture tissue[J]. In Viro cell Dev Bio, 1991, 27: 175-182.

[23] Sato S, Newell C, Kolacz K, et al. Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems[J]. Plant Cell Rep, 1993, (12): 408-413.

[24] Parrott W A, Adang M. J., Bailey M. A, et al. Recovery and evaluation of soybean plants transgenic for a Bacillus thuringiensis var kurstaki insecticidal gene[J]. In Vitro-plant., 1994, (3): 144-149.

[25] Stewart C N, Adang M J, ALL J N, et al. Genetic transformation, recovery, and characterization of soybean (Glycine max L. Merrill.) transgenic for a synthetic Bacillus thuringiensis CRY IA(c) gene[J]. Plant Physiol, 1996, 112: 121-129.

我国第一家遗尿症医院

院长 刘兴禹

主治: 遗尿症、尿失禁、尿崩症、糖尿病、小儿神经性尿频。

地址: 山东省嘉祥县迎风路 3 号遗尿症医院
邮编: 272400
电话: 0537—6824392 6805999
网址: <http://www.cnynz.com>
(www.cnynz.com.cn)