

苏哲正,邢子烟,朱晨博,等.大豆遗传转化方法的研究进展[J].黑龙江农业科学,2020(9):112-116.

大豆遗传转化方法的研究进展

苏哲正,邢子烟,朱晨博,曲迪,上官艺馨,滕卫丽
(东北农业大学农学院,黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:近年来,随着基因工程的快速发展,利用转基因技术进行大豆分子育种已成为一种重要手段,而良好的大豆遗传转化方法是进行转基因育种的前提。本文通过对大豆遗传转化相关方法及其影响因素进行阐述,为大豆遗传转化及转基因新材料创制等相关研究提供参考。

关键词:大豆;遗传转化;研究进展

大豆 [*Glycine max* (L.) Merrill] 是我国重要的油料和粮食作物,其种子中含有约 40% 的蛋白质、20% 的脂肪,还富含人体所需的 8 种必需氨基酸,对于人类而言是最为理想的植物蛋白来源^[1],在我国工业原料、食品加工和农业生产等方面都扮演着不可或缺的重要角色。因存在着无法跨越不同物种之间杂交不亲和以及基因连锁效应等方面的障碍,传统育种会阻碍不同优良基因间的组合达到最优化的程度^[2]。由于转基因技术的发展进程不断加快,将外源基因整合到大豆基因组中来创制转基因大豆新材料,已成为大豆分子育种的重要手段。迄今为止,转基因大豆是全球范围内种植规模最大、应用性最强、适用性最广的转基因作物。自 1996 年转基因大豆被首次批准可以进行大面积规模性种植之后,历经长达 24 年的发展,转基因大豆在当今拥有着高达 77% 的应用率。转基因大豆的种植面积在全球范围内高居不下,在所有转基因作物总种植面积中占据一半的比例。目前,转基因大豆在我国作物科研领域中是一个重要的研究对象,但能否实现转基因大豆的商业化种植仍是未知数,因此自主研发培育大豆转基因新材料是我国大豆分子育种领域刻不容缓的重任^[3-4]。

McCabe 等^[5]在 1988 年借助基因枪轰击胚生长点,获得了转化的大豆再生植株;随后 Hinchee 等^[6]使用农杆菌介导的方法转化大豆子

叶节,也获得了转基因再生植株。自此以后,大豆遗传转化方面的研究报告不断涌现,但报道其遗传转化本质性突破的研究报告却少之又少,这是因为大豆的转化效率不甚乐观,始终没能得到大幅度的提升。本文通过对大豆遗传转化相关方法和影响因素进行阐述,为大豆遗传转化及转基因新材料创制等相关研究提供参考。

1 大豆遗传转化方法

目前大豆遗传转化的常用方法有农杆菌介导法、基因枪法、花粉管通道法、聚乙二醇法、电击转化法、超声波辅助转化法和真空抽滤辅助处理法^[7-8]等。

1.1 农杆菌介导法

农杆菌介导法 (*Agrobacterium*-mediated) 作为遗传转化方法中效率最可观的方法之一,现阶段已成为大部分研究者进行大豆转化的最先选择。农杆菌介导法的原理是农杆菌 Ti 质粒的 T-DNA 可高效率地整合到植物受体细胞的染色体上并得到表达。在植物机械损伤部位的细胞和组织会不断分泌酚类物质,这些酚类物质会作为一种化学信号指引农杆菌识别植物的小伤口;同时,这些微小伤口会作为农杆菌吸附到植物细胞内部的通道。农杆菌进入细胞后会移动到染色体附近,并将自身 Ti 质粒上的 T-DNA 片段转移到该植物的基因组中参与表达和遗传,从而获得包含外源基因的转基因植株^[9]。

农杆菌介导法具备诸多优点:一是稳定性好。农杆菌介导法具备优良的稳定性,所获得再生植株最终确定为成功转化的比例较高;因为目的基因是通过农杆菌的 Ti 质粒整合到植物基因组中的,这意味着目的基因可以精准完整地转入植

收稿日期:2020-06-03

基金项目:黑龙江省大学生创新创业训练计划项目(201910224106)。

第一作者:苏哲正(1998-),女,在读学士,专业为农学。E-mail: 1024538902@qq.com。

通信作者:滕卫丽(1972-),女,博士,研究员,从事大豆遗传育种与生物技术研究。E-mail: twlneau@163.com。

物的基因组内并参与表达,而且还可以依照试验目的与需求有选择地移动位置。二是技术成熟。农杆菌介导法的研究时间较长,相比于其他方法,农杆菌介导法的技术手段较为成熟,相关报道诸多,原理简单易懂。三是容错率高。农杆菌介导法可以做到对目的基因的片段大小不做严格要求,绝大多数情况下以单拷贝的形式导入大豆的染色体基因组中,间接降低了基因沉默等现象发生的概率,存在一定的容错率。但值得注意的是农杆菌介导法依然存在的问题,受到菌株类型、基因型、外植体类型、筛选试剂以及相关试剂(包括抗氧化试剂、植物激素)等因素的严重影响^[10-11]。

1.2 基因枪法

基因枪法(Particle bombardment)的原理是借助低压气体使包裹 DNA 分子的金属颗粒轰击受体,将外源 DNA 导入植物细胞、组织、器官或原生质体中,并成功整合到基因组中。基因枪法广泛应用于不易感农杆菌类型的植物遗传转化中^[12]。与农杆菌介导法相比,它的优势是基因型不是限制因素,可同时转移多拷贝的重组 DNA 片段;劣势则是成本很高,受限于外源目的基因片段的大小,并且获得的再生植株中存在嵌合体的概率较高。

没有完全成熟的大豆子叶诱导培养的体细胞团是基因枪法中常用的外植体^[13]。Santarem 等^[14]将未成熟的大豆子叶诱导产生的胚性悬浮培养物作为外植体,使用基因枪法成功得到了转基因大豆植株。Maughan 等^[15]也利用基因枪法成功将牛酪蛋白基因转入大豆基因组中。此外,利用基因枪法进行大豆遗传转化时,也可以用大豆其他的组织器官作为外植体开展相关研究。McCabe 等^[15]使用基因枪法对大豆的芽分生组织进行转化,成功得到了转基因大豆植株。Aragao 等^[16]将大豆胚尖作为外植体同样使用基因枪法进行转化,也成功获得了再生植株,转化效率可观。

1.3 花粉管通道法

花粉管通道法(Pollen-tube pathway)的原理是将外源目的基因注射进植物体内因开花授粉而自然形成的花粉管通道内,使外源 DNA 顺着花粉管通道进入胚囊,并转化胚囊中的胚性细胞,然后对后代植株的表型进行观察和鉴定,并检测外

源基因的表达水平,进而筛选得到转基因再生植株。1983 年,周光宇等^[17]最先创建了花粉管通道法,该方法自问世以来经不同学者陆续研究而得以迅速发展,如今已被广泛应用于各类育种研究中,其中不乏有关大豆遗传转化的研究,雷勃钧等^[18]使用该方法将外源 DNA 导入大豆基因组中,培育出性状优良的大豆新品系,其中涉及成熟期、株型等多个重要性状;随后 Liu 等^[19]也利用花粉管通道法把 *smGFP* 基因整合至大豆基因组中,得到了大豆转基因再生植株,转化效率达到 3.2%。

花粉管通道法具备的优势是操作容易,简单易懂,可直接将外源目的基因导入目标受体内,而不必经过繁琐的组织培养过程。但不可否认的是,使用该方法对大豆进行遗传转化,其转化效率较低且基本不能进行重复操作^[20],因为大豆是闭花授粉作物且花器很小,这就很大程度地限制了花粉管通道法在大豆实际遗传转化研究上的使用进程;同时后期筛选后代的难度较高,非常考验操作者的熟练程度和技术水平。因此,花粉管通道法在大豆遗传转化的实际应用并不广泛。

1.4 聚乙二醇法

聚乙二醇法(Polyethylene glycol method)又称为 PEG 介导法,它的原理如下:聚乙二醇作为原生质体融合的化学试剂,可以使植物的原生质体缩水而改变细胞膜的通透性,有利于外源 DNA 被原生质体主动吸收。同时,其中聚乙二醇能够促进细胞膜与细胞膜之间或细胞膜与外源 DNA 之间形成桥梁,有利于它们彼此之间相互连接。聚乙二醇还可以造成细胞膜表面电荷错乱,利于外源 DNA 进入原生质体^[21]。Lin 等^[22]使用聚乙二醇法在大豆的原生质体中导入 *nptII* 和 *cat* 基因,并获得了抗性愈伤组织。

然而聚乙二醇法存在一定程度上的弊端:其转化效率的高低较为依赖于植物原生质体再生能力的强弱,而原生质体的再生能力是植物自身的品种特性,很难人为地对它们进行改变或调控。同时,聚乙二醇的使用浓度、实验环境下设置的 pH 也会影响该方法的转化效率。目前聚乙二醇法在自身原生质体再生能力较强的植物中广泛使用,但该方法在大豆中的转化效率并不理想,原因是大豆的原生质体再生困难。

1.5 电击转化法

电击转化法(Electric shock)的原理是对植物

原生质体造成机械损伤而改变细胞膜的通透性,导致外源 DNA 被植物原生质体主动吸收并整合到基因组中。然而值得注意的是,该方法的转化效率并不高,多数外源 DNA 会被细胞自身的防卫机制识别而发生降解,只有少数的外源 DNA 可以成功整合。电击转化法优点在于高效,能够同时转化多个原生质体。但是,它同聚乙二醇法一样,其转化效率的高低取决于原生质体再生体系的繁简程度,电击转化法对于再生体系简的植物来说较为适用^[23]。Christou^[24]借助电击转化法对大豆的原生质体进行转化,并获得了可以生成根的抗性愈伤组织。

1.6 超声波辅助转化法

超声波辅助转化法(SAAT),其实是一种潜在的高效农杆菌介导法,已广泛应用于大豆遗传转化的相关研究中。超声波辅助转化法具备操作简单、成本低廉等优点,能够显著提高较难转化植物的转化效率。其原理是:超声波辅助处理外植体时,超声波可作为物理干扰因素对植物的细胞组织造成机械损伤而产生诸多微创伤口,这些微创伤口可以作为外源基因进入植物细胞的通道,有助于外源基因的顺利导入。

超声波辅助转化法只在农杆菌侵染的过程中额外增添了一个步骤,即声处理。声处理产生的空化作用会引起植物的表皮部位产生数以千计的微小伤口。农杆菌可借助超声波产生的这些微小伤口,更彻底更深入地侵染植物的细胞组织。然而这种辅助处理的时间过短则会导致伤口产生的数量太少;时间过长又会导致外植体表面的细胞组织被严重破坏,它们的生理活性和生物屏障已经丧失,因此这种辅助手段需要明确合适的超声波处理时间。赵桂兰^[25]使用超声波辅助转化法显著提升了大豆胚性愈伤和大豆未成熟胚的表达水平。

1.7 真空抽滤辅助处理法

真空抽滤辅助处理法(VFAT)的原理是使用农杆菌介导法进行大豆遗传转化时,运用真空抽滤辅助处理能够降低外植体受到的压强,低压强会使外植体表面产生微小的伤口,这些伤口可作为通道帮助农杆菌进行更加深入地侵染,加大其侵染的程度和范围。另外,低压强对外植体造成的机械损伤会引起细胞产生防卫反应从而大量产生酶类物质,加快侵染的进程。

李冬梅等^[26]报道,在农杆菌侵染阶段分别进行不同时间的超声波辅助处理和真空抽滤辅助处理可显著提高大豆子叶节的遗传转化效率。其中,超声 30 s 或者抽真空 2 min 的处理效果最佳,转化效率分别提高 8%~42%和 16%~41%。

2 影响大豆遗传转化效率的主要因素

目前,转化效率无法显著提高依然是大豆遗传转化研究中的最大难题。尽管在大豆遗传转化方法方面取得了诸多进步,但是大豆再生率低、再生植株获取效果不稳定等诸多难以解决的问题使大豆遗传转化方法难以做到本质性的大突破。因此,在不断完善优化大豆遗传转化方法的前提下,只有全面深入地探究影响大豆遗传转化效率的主要因素,尽可能避免和降低可控制因素带来的负面效应,才能真正达到大豆转化效率明显提高这一根本目的。

大豆遗传转化效率主要受到基因型、菌株类型、筛选剂、共培养时间以及相关试剂(包括酚类物质、抗氧化剂和植物激素)等因素的影响。

2.1 基因型

外植体子叶节在农杆菌侵染时的再生过程很大程度上取决于不同大豆品种的基因型。不同类型的基因型是影响大豆遗传转化能否成功的决定性因素,除此之外其他影响因子的研究都是在确定基因型属农杆菌敏感型之后再行开展的。农杆菌的自然寄主是双子叶植物,但大豆作为双子叶植物在进行大豆遗传转化时仍旧受基因型特异性的影响。不同大豆品种对农杆菌的易感程度呈现出显著的差异^[27]。李茂福等^[28]在研究中表明垦农 18 对农杆菌的敏感性和再生率较高,适合作为遗传转化的材料。

2.2 菌株类型

不同的农杆菌菌株类型呈现出不同的大豆转化能力,其主要原因是它们之间的 Ti 质粒表现出明显差别,目前应用范围较广的菌株类型有 LBA4404、EHA101 和 EHA105。研究表明^[29]LBA4404 的侵染力显著低于超毒力菌株的 EHA101 和 EHA105,这证明超毒类型的农杆菌的使用能够帮助提高大豆的转化率。

2.3 筛选剂

筛选剂是大豆转化体系中极为重要的影响因素,它可帮助转入外源基因的细胞组织存活下来,也可杀死没有转入外源基因的细胞组织,从而减

少嵌合体和假阳性的可能,达到筛选的目的。在大豆遗传转化中较为常用的筛选剂是草丁膦(Phosphinothricin, PPT)。草丁膦是一种低毒型无污染的除草剂,同时也是国际上统一认可的无害转基因筛选剂。另外,要把握好筛选剂的使用浓度,筛选浓度过低将导致筛选结果不具有效果,徒增转化后期鉴定检测的工作量,浓度过高又会导致外植体发生二次损伤而失去生理活性。因此,筛选剂的使用浓度需要根据实际情况进行具体调整。

2.4 共培养时间

共培养阶段历经的时间长短也是影响大豆转化过程中的一环。赵桂兰等^[30]研究表明,当共培养阶段历经的时间为 3 d 时,不定芽诱导效果最佳,高达 40%。但是共培养的时间并不是越长越好,当共培养的时间延长到一定程度后,不定芽的诱导数量不再增加反而减少。

2.5 相关试剂

2.5.1 酚类物质 在农杆菌侵染的过程中,如若大豆缺乏酚类物质的累积则会表现出对菌株的较低激活能力,这一点也被广大研究者称作导致大豆转化效率不充分的影响因子,因此适当添加一些酚类物质可以显著提高大豆的转化效率。在农杆菌介导法的共培养阶段加入乙酰丁香酮(AS)可有效提升植物的转化能力,Jefferson 等^[31]的研究结果显示,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的乙酰丁香酮会使植物的转化效率明显提高,但这也对浓度的设定有一定要求,并不是浓度越高越好,乙酰丁香酮浓度的过度增大会引起反抑制作用。

2.5.2 抗氧化试剂 大豆被农杆菌侵染的过程中会产生自我保护的行为,产生大量的活性氧分子。活性氧分子具有使被侵染位置的细胞被迫死亡的作用,这导致农杆菌的侵染能力显著下降;并且这些死亡的细胞又会严重阻碍菌株继续侵染其他部位,这又更加导致农杆菌侵染能力的降低。为了克服这一障碍,许多研究者在转化大豆子叶节时,常在共培养阶段的培养基中添加一些抗氧化剂,通过抵抗过氧化物的产生所造成的伤口褐化,缓解这种防卫反应,来提高转化效率。Olhoft 等^[32]的研究表明,在共培养阶段的培养基中加入一定浓度的半胱氨酸(Cys)可以把外源基因在大豆子叶节部位的瞬间表达效率从 37% 提高到 92%。另外,在共培养阶段的培养基中同样添加

适当浓度的二巯基苏糖醇(DTT)和硫代硫酸盐也有助于转化率提高。另外,刘圣君等^[33]报道抗坏血酸(AA)能够促进对不定芽的诱导,其中在侵染液和共培养阶段的培养基中同时添加 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的抗坏血酸时,获得了最高的转化效率,而更高浓度的抗坏血酸反而对不定芽的诱导分化产生消极作用,间接影响了转化效率的提高。

2.5.3 植物激素 在不定芽诱导阶段的培养基中增添适当浓度的植物激素也有助于提高转化率。其中,6-BA 可以促进诱导不定芽,1.6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 6-BA 效果最佳。

3 结语

经过多年研究,大豆遗传转化方法获得了一定成果,但依旧存在诸多难题限制着大豆遗传转化的进一步发展,例如转化再生体系不完善、转化效率低、转化方法单一等。尽管大豆遗传转化的研究目前还存在着一些尚未突破的限制,但不断加大大豆遗传转化方法的创新与完善的力度,大豆转化效率低的难题终将得到有效解决,这会大大促进大豆转基因育种的全面展开,从而培育出优异的转基因大豆新品种。

参考文献:

- [1] 王志坤,李文滨. 转基因科普系列-转基因大豆[J]. 大豆科技, 2017(2): 52-53.
- [2] 李凤. 大豆子叶节高效再生体系的建立与 *GmCO1* 基因的遗传转化[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2006.
- [3] 杨加银. 转基因大豆生产的现状与趋势[J]. 世界农业, 2002(6): 40-42.
- [4] 钱迎倩, 魏伟, 桑卫国, 等. 转基因作物对生物多样性的影响[J]. 生态学报, 2001(3): 337-343.
- [5] McCabe D E, Swain W F, Martinell B J, et al. Stable transformation of soybean by particle acceleration[J]. Biotechnology, 1988, 6: 923-926.
- [6] Hinchee M A W, Connor-Ward A V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer [J]. Biotechnology, 1988, 6: 915-922.
- [7] Meurer C A, Dinkins R D, Collins G B. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation [J]. Plant Cell Reports, 1998, 18(3-4): 180-186.
- [8] Trick H N, Finer J J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue [J]. Plant Cell Reports, 1998, 17(6-7): 482-488.
- [9] Gelvin S B. Plant proteins involved in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation[J]. Annual Review of Phytopathology, 2010, 48: 45-68.

- [10] Simmonds D H, Donaldson P A. Genotype screening for proliferative embryogenesis and biolistic transformation of short-season soybean genotypes[J]. *Plant Cell Reports*, 2000, 19(5):485-490.
- [11] 王罡, 王萍, 蔺雨, 等. 大豆基因型对根瘤农杆菌菌株敏感性的研究[J]. *遗传*, 2002, 24(3):297-300.
- [12] 王晓春, 李静, 王萍, 等. 基因枪法对大豆进行 *CpTI* 基因的遗传转化[J]. *华北农学报*, 2007, 22(2):10-14.
- [13] Finer J J, McMullen M D. Transformation of soybean *via* particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1991, 27:175-182.
- [14] Santarem E R, Finer J J. Transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using proliferative embryogenic tissue maintained on semi-solid medium[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1999, 35(6):451-455.
- [15] Maughan P J, Philip R, Cho M J, et al. Biolistic transformation, expression, and inheritance of bovine beta-casein in soybean (*Glycine max*) [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1999, 35(4):344-349.
- [16] Aragao F J L, Sarokin L, Vianna G R, et al. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 101:1-6.
- [17] 周光宇, 翁坚, 龚蓁蓁. 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.
- [18] Lei B J, Yin G C, Lu C H, et al. Study on exogenous DNA directly transferred into soybean [J]. *Soybean Science*, 1991, 10(1):58-63.
- [19] Liu J F, Su Q, An L J, et al. Transfer of a minimal linear marker free and vector-free smGFP cassette into soybean via ovary-drip transformation [J]. *Biotechnological Letters*, 2009, 31(2):295-303.
- [20] Shou H X, Palmer R G, Wang K. Irreproducibility of the soybean pollen-tube pathway transformation procedure[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2002, 20:325-334.
- [21] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 北京科学出版社, 1998.
- [22] Lin W. Soybean direct gene uptake and expression by cultured soybean protoplasts[J]. *Plant Physiology*, 1987, 84:856-861.
- [23] 王晓春, 王罡, 李静. 农杆菌介导的大豆体细胞胚遗传转化影响因子的研究[J]. *大豆科学*, 2005, 24(1):21-26.
- [24] Christou P. Stable transformation of soybean by electroporation and root formation[J]. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*, 1989, 84:3962-3966.
- [25] 赵桂兰. 超声波辅助农杆菌介导法在大豆转化上的研究[C]//中国生物工程学会. 中国生物工程学会第三次全国会员代表大会暨学术讨论会论文摘要集, 2001:126-127.
- [26] 李冬梅, 陈薇, 李永光, 等. 大豆子叶节遗传转化体系的优化研究[J]. *大豆科学*, 2018, 37(4):531-538.
- [27] 王岚, 王连铮, 辛世文, 等. 大豆品种的再生性能及对 EHA105 农杆菌的敏感性[J]. *作物学报*, 2003, 29(5):664-671.
- [28] 李茂福, 李睿, 永福, 等. 农杆菌介导大豆遗传转化的影响因素[J]. *山地农业生物学报*, 2006(4):283-286.
- [29] 李文霞, 宁海龙, 吕文河, 等. 农杆菌介导大豆子叶节转化系统的优化[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(4):971-977.
- [30] 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.
- [31] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1987, 5(3):387-405.
- [32] Olhoft P M, Lin K, Galbraith J, et al. The role of thiol compounds increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells[J]. *Plant Cell Reports*, 2001, 20:731-737.
- [33] 刘圣君, 黄健秋, 卫志明. 影响农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化的因素[J]. *分子细胞生物学报*, 2007(5):286-294.

Research Progress on Genetic Transformation Methods of Soybean

SU Zhe-zheng, XING Zi-yan, ZHU Chen-bo, QU Di, SHANGGUAN Yi-xin, TENG Wei-li

(College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: In recent years, with the rapid development of genetic engineering, soybean molecular breeding using transgenic technology has become an important means, and a good method of genetic transformation is the premise of transgenic breeding. In this paper, the related methods of soybean genetic transformation and its influencing factors were elaborated, providing reference for the research of soybean genetic transformation and the creation of new transgenic materials.

Keywords: soybean; genetic transformation; research progress