影响农杆菌介导大豆子叶节遗传转化因素的研究

王凤敏,李 涛,王运杰,荆慧贤,史晓蕾,张孟臣,邸 锐,蒋春志

(河北省农林科学院 粮油作物研究所 国家大豆改良中心石家庄分中心,河北省作物遗传育种实验室,河北 石家庄 050031)

摘 要:利用 *GUS* 基因的稳定性和特异性及在植物体中瞬时表达的特点,对农杆菌介导大豆子叶节遗传转化过程中的一些影响因素(激素浓度、筛选剂浓度、基因型和农杆菌菌株)进行研究。结果表明:芽诱导阶段 6-BA 浓度为 1.6 mg·L^{-1}时诱导效率较高;适宜的草铵膦筛选浓度为 3 mg·L^{-1};同时对 24 个大豆基因型的再生能力和对农杆菌菌株 EHA101、LBA4404 和 EHA105 的敏感性进行比较,再生能力最强的基因型为吉林小豆和 Maverick,侵染能力最强的农杆菌菌株为 EHA101,*GUS* 阳性率为 0~41.03%,其次是 EHA105,LBA4404 侵染效果最差;就受体基因型而言,吉林小豆和 Maverick 的 *GUS* 阳性率最高。EHA101 侵染时,吉林小豆和 Maverick 的阳性率分别达 40.25% 和 29.89%;EHA105 侵染时,吉林小豆和 Maverick 的阳性率分别达 33.35% 和 27.52%,而冀豆 15、冀豆 17 和 nf58 的阳性率分别为 12.47%、10.67% 和 9.11%。

关键词:大豆;*GUS*;菌株;基因型;遗传转化

中图分类号:S565.1 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-9841(2011)04-0557-06

Assessment of Factors Affecting Soybean Cotyledonary-node *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation

WANG Feng-min, LI Tao, WANG Yun-jie, JING Hui-xian, SHI Xiao-lei, ZHANG Meng-chen, DI Rui, JIANG Chun-zhi

(Lab of Crops Genetic Breeding of Hebei, National Soybean Improvement Center Shijiazhuang Sub-Center, Institute of Food and Oil Crops, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050031, Hebei, China)

Abstract: Based on stability, specificity and transient expression of *GUS* gene in plant, we assessed factors affecting soybean *Agrobacterium*-mediated cotyledonary-node genetic transformation including hormone concentrations, selective agent concentration, genotypes, *Agrobacterium tumefaciens* strain. For shoot induction, a higher regeneration rate was obtained with 1.6 mg·L^{-1} 6-BA; the suitable selective agent concentration of glufosinate was 3 mg·L^{-1}. Based on their regeneration ability and sensitivity to *Agrobacterium* EHA101, EHA105 and LBA4404, 'Jilin xiaodou' and 'Maverick' had higher regeneration capacity. The infection rate of *Agrobacterium* strain was EHA101(0-41.03%) better than EHA105(0-35%), LBA4404(0-18.27%) was the lowest. Based on the analysis of receptor genotypes, 'Jilinxiaodou' and 'Maverick' was selected as the best receptor genotypes for the *Agrobacterium*-mediated cotyledonary-node transformation system. When infected by strain EHA101, *GUS* positive rate of 'Jilinxiaodou' and 'Maverick' reached 40.25% and 29.89%, respectively; while EHA105 infected soybean cotyledonary-node, percentage of *GUS* positive of 'Jilinxiaodou', 'Maverick', 'Jidou15', 'Jidou17' and 'nf58' were 33.36%, 27.52%, 12.47%, 10.67% and 9.11%, respectively.

Key words: Soybean; *GUS*; *Agrobacterium tumefaciens* strain; Genetypes; Genetic transformation

大豆是我国重要的经济和油料作物,也是重要的工业原料。大豆在生长期内易遭受病虫害,使产量和品质下降,传统的防治方法存在一定的局限性,通过转基因技术可将抗病、虫基因转入大豆,成为提高大豆产量和改善大豆品质的有效途径之一。实现这一目标需要建立良好的大豆转基因体系,但是由于组织再生困难,大豆是世界上公认的较难进行组织培养的农作物之一。

大豆转基因的遗传研究开始于 1984 年[1],国内外对大豆转基因研究有过大量的报道,1988 年 Hinchee 等[2]用根癌农杆菌介导法获得了大豆的转基因植株。Cheng 等[3]首先报道用无菌苗的子叶节为外植体,在含高浓度 6-BA(10~50 μmol·L^{-1})的改良 B5 培养基上诱导丛生芽获得高频率的再生植株。Zhang 等[4]以 *Bar* 基因作选择标记基因,用除草剂草铵膦进行筛选获得转化植株。陈秀华等[5]利用

收稿日期:2011-01-06

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项资助项目(2009ZX08004-001B)。

第一作者简介:王凤敏(1981-),女,硕士,主要从事大豆遗传转化研究。E-mail:wangfm89@163.com。

通讯作者:蒋春志(1964-),女,硕士,研究员,从事大豆遗传育种工作。E-mail:jchzh64@sohu.com。

农杆菌介导法将抗虫基因转入大豆。刘海坤等[6]首次提出了农杆菌介导大豆胚尖转化系统。Dang 等[7]用农杆菌介导胚尖法,获得了抗虫的大豆转基因植株。Liu 等[8]采用 EHA105 获得了较高的转化频率。但是由于农杆菌介导的大豆子叶节转化系统具有较高的基因型依赖性,不同农杆菌菌株对大豆不同基因型侵染能力相差悬殊,所以成功进行基因转化的前提是筛选适宜的大豆基因型,并确定相应的激素浓度及比例。该文研究了激素水平、大豆基因型以及农杆菌菌株对大豆子叶节遗传转化的影响,旨在筛选出适宜大豆遗传转化的激素浓度、基因型和相应的农杆菌菌株,优化大豆农杆菌介导子叶节遗传转化体系,提高转化效率,为大豆转基因体系的建立奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 大豆基因型 供试大豆基因型 24 个,分别为冀豆 7、冀豆 12、冀黄 13、冀豆 15、冀豆 16、冀豆 17、冀豆 18、冀豆 19、冀豆 20、五星 1 号、五星 2 号、五星 3 号、五星 4 号、nf58、吉育 99、吉林小豆、中黄 37、中黄 43、中黄 46、垦丰 22、垦丰 17、绥农 28、绥农 29 和 Maverick。

1.1.2 菌株和质粒 农杆菌菌株 EHA101、LBA4404 和 EHA105,由河北省粮油作物研究所大豆实验室提供。携带 *bar* 基因(抗除草剂草铵膦,glufosinate)和 *GUS* 报告基因载体 pZY102,由张展元博士馈赠。

1.1.3 培养基 培养基的配制:萌发培养基:B5 基本培养基(pH 5.7);共培养基:B5 基本培养基 + 200 μmol · L^{-1}AS(pH 5.4);芽诱导培养基:B5 基本培养基 + 6-BA + 0.05 g · L^{-1} Cefotaxime + 0.05 g · L^{-1}万古霉素(pH 5.7)。

1.2 试验方法

1.2.1 质粒 pZY102 转化农杆菌 采用电击转化法以质粒 pZY102 分别转化农杆菌 LBA4404、EHA101 和 EHA105,质粒抗性为壮观霉素,3 个菌株的基因组抗性分别为 Rif、Chl 和 Rif。

1.2.2 种子灭菌和萌发 挑取成熟饱满无菌的大豆种子,氯气表面灭菌 16 ~ 18 h。将无菌的种子置于萌发培养基上培养 5 d。每个基因型针对每个菌株处理 80 个外植体,2 次重复。

1.2.3 工程菌液的制备 从 YEP 培养平板上挑含有目的基因的农杆菌单菌落接种于含抗性的 YEP 液体培养基,28℃、200 r · min^{-1}震荡过夜培养至农杆菌的对数生长期(EHA101 OD_{650} = 1.0 ~ 1.2;EHA105 OD_{600} = 0.5 ~ 0.6;LBA4404 OD_{600} = 0.6 ~ 0.8)。将农杆菌培养物于 4 000 r · min^{-1}离心 10 min,收集菌体。

1.2.4 侵染及共培养 将制备(蘸有菌液的刀尖进行划切处理)的外植体置于菌液中侵染 30 min,将外植体切口向下水平置于共培养基上 28℃培养 5 d。

1.2.5 芽诱导 将共培养 5 d 的外植体用液体芽诱导培养基浸洗,然后将外植体子叶节下胚轴部分呈 30 ~ 45 度角倾斜插入固体芽诱导培养基中进行分化 28 d,每 14 d 继代 1 次。

1.2.6 *GUS* 检测 将诱导 28 d 的外植体纵向切开,浸泡在 X-gluc 染色液中(100 mL X-gluc buffer;50 mmol · L^{-1}铁氰化钾 10 mL;50 mmol · L^{-1}亚铁氰化钾 10 mL;0.2 mol · L^{-1}磷酸钠缓冲液 pH 7.0 50 mL;3 mL ddH_2O;10 μL DMSO;75 mg X-gluc),于 37℃培养箱中暗培养 24 h,在解剖镜下观察和统计 *GUS* 表达点及幼芽的外植体数目,照相。

GUS 瞬时表达率 = (*GUS* 表达点外植体数/检测的外植体数) × 100%

GUS 阳性率 = (*GUS* 表达幼芽的外植体数/检测的外植体数) × 100%

1.3 数据分析

使用 SAS 软件对试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 激素水平对大豆子叶节芽诱导率的影响

大豆子叶节在芽诱导阶段的丛生芽诱导率受植物激素 6-BA 的影响。由表 1 可知,随着 6-BA 含量的增加,丛生芽诱导率呈先升高后降低的趋势,当 6-BA 的含量达到 1.6 mg · L^{-1}时,丛生芽诱导率高达 75.3%,显著高于 1.1 和 2.0 mg · L^{-1}6-BA 处理,因此,在芽诱导时期选择的最适 6-BA 浓度为1.6 mg · L^{-1}。

表 1　6-BA 浓度对子叶节丛生芽诱导率的影响

Table 1　Influence of 6-BA concentration on shoot induction ratio

6-BA 浓度 6-BA concentration /mg·L^{-1}	外植体数 No. of explants	丛生芽数 No. of shoots	丛生芽诱导率 Induction ratio of shoots/%
0.5	75	20	26.7d
0.8	76	24	31.6c
1.1	75	36	48.0b
1.6	77	58	75.3a
2.0	78	38	48.7b

同列数值的不同小写字母代表 5% 水平差异显著,多重比较采用新复极差法,下表同。

Values within a column followed by different lowercase letters were significantly different at 0.05 probability levels, multiple comparisons use Fisher's LSD method, the same as below.

2.2　筛选剂浓度确定

载体 pZY102 上的筛选标记基因为草铵膦抗性,设置 6 个草铵膦浓度梯度对芽诱导阶段筛选剂的浓度进行了研究,结果见表 2。冀豆 12、冀豆 15、Maverick 和吉林小豆随着草铵膦浓度的增加,丛生芽存活率逐渐下降,当草铵膦浓度在 3 mg·L^{-1}时,4 个基因型的丛生芽存活率在 70% 左右,显著高于草铵磷浓度为 4、5、6 mg·L^{-1}时的丛生芽存活率,此筛选剂浓度既达到了筛选的效果,也保证了一定的丛生芽存活率。筛选剂浓度在 2 mg·L^{-1}时,起不到筛选效果,当筛选剂浓度再增加时,丛生芽的存活率显著下降,当达到 6 mg·L^{-1}时,丛生芽存活率仅为 20% 左右,由此认为选择 3 mg·L^{-1}的草铵膦浓度在芽诱导阶段进行筛选最为合适。

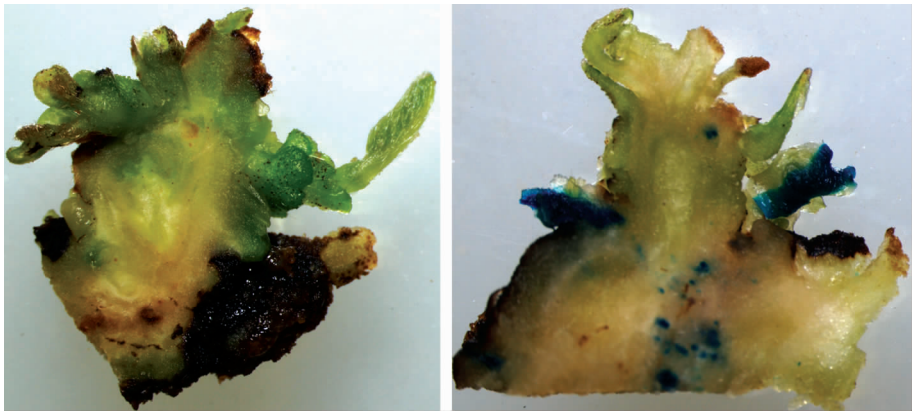
表 2　不同草铵磷浓度对丛生芽存活率的影响

Table 2　Changes of shoots survival rate under different glufosinate concentrations

草铵磷浓度 Glufosinate concentration /mg·L^{-1}	丛生芽存活率 Shoot survival rate/% 冀豆 12 Jidou12	冀豆 15 Jidou15	Maverick	吉林小豆 Jilinxiaodou
0	85a	86a	90a	94a
2	79b	76b	88a	84b
3	71b	68b	74b	69c
4	40c	36c	39c	42d
5	32d	34c	35c	31e
6	19e	18d	23d	20f

2.3　不同农杆菌菌株侵染力分析

2.3.1　农杆菌 EHA101　图 2 为 *GUS* 染色的效果图,其中图 2 a 是大豆子叶节未转化的丛生芽,图 2 b 是 *GUS* 阳性表达幼芽。由表 3 可见,农杆菌 EHA101 对 24 个大豆基因型进行遗传转化丛生芽再生率的变幅为 45% ~85%,吉林小豆和 Maverick 的再生率较高,分别为 81% 和 85%;*GUS* 瞬时表达率的变幅为 51%~99%,其中吉林小豆和 Maverick 瞬时表达率高达 99% 和 95%;*GUS* 阳性率变幅为 0~41.03%。利用 Fisher's LSD 法对基因型进行显著差异性分析,吉林小豆的阳性率最高,为 40.25%,单次阳性率达到 41.03%,其次是 Maverick(29.89%),2 个品种间存在显著差异,这 2 个品种的 *GUS* 阳性率与冀豆 15、冀豆 17 及 nf58 之间差异显著,说明吉林小豆是最易感基因型,其次是 Maverick,2 个基因型的阳性率都较高,适宜做遗传转化的受体材料;冀豆 15、nf58、冀豆 17 的 *GUS* 阳性率分别为23.03%、16.48%、13.24%,也较高,适宜做遗传转化的受体材料,而绥农 28、绥农 29、



a. 对照　**b.** ***GUS*** 表达幼芽

a. CK　b. ***GUS*** **transient expression buds**

图 2　丛生芽 *GUS* 染色示意图

Fig. 2　*GUS* transient expression of buds

中黄 46 的阳性率为 0,说明这 3 个基因型易感性很差,不适宜遗传转化。从试验中发现,阳性率高的易感基因型再生率高,并且丛生芽的状态很好,而易感性差的基因型再生率较低,并且丛生芽的状态不好,分化能力很弱。

表 3 农杆菌 EHA101 介导大豆基因型的遗传转化

Table 3 EHA101 mediated genetic transformation of soybean

基因型 Genotypes	再生率 Regeneration rate /%	*GUS* 瞬时表达率 *GUS* transient expression rate /%	*GUS* 阳性率 Positive rate of *GUS*/%
冀豆 7 Jidou 7	57	68	2.57 ±0.09ij
冀豆 12 Jidou 12	70	75	10.68 ±0.60fg
冀黄 13 Jihuang 13	79	79	12.68 ±0.68cd
冀豆 15 Jidou 15	77	80	23.03 ±2.79c
冀豆 16 Jidou 16	75	75	5.10 ±3.67hi
冀豆 17 Jidou 17	79	81	13.24 ±1.48ef
冀豆 18 Jidou 18	73	68	8.34 ±0.33gh
冀豆 19 Jidou 19	70	63	6.62 ±1.51ghi
冀豆 20 Jidou 20	63	69	5.33 ±0.10hi
五星 1 号 Wuxing 1	75	51	6.62 ±1.51ghi
五星 2 号 Wuxing 2	67	52	4.82 ±0.08hi
五星 3 号 Wuxing 3	75	55	10.19 ±7.34fg
五星 4 号 Wuxing 4	60	57	3.91 ±1.91hij
nf 58	78	82	16.48 ±4.19de
Maverick	85	95	29.89 ±2.39b
垦丰 22 Kengfeng 22	71	72	7.41 ±0.13gh
垦丰 17 Kenfeng 17	72	68	5.20 ±0.10hi
绥农 28 Suinong 28	69	62	0
绥农 29 Suinong 29	49	61	0
吉育 99 Jiyu 99	70	64	2.63 ±0.10ij
吉林小豆 Jilinxiaodou	81	99	40.25 ±1.10a
中黄 37 Zhonghuang 37	79	76	10.68 ±0.60fg
中黄 43 Zhonghuang 43	45	66	2.60 ±0.05ij
中黄 46 Zhonghuang 46	58	49	0

2.3.2 农杆菌 EHA105 由表 4 可见,农杆菌 EHA105 对 24 个大豆基因型进行遗传转化时,Maverick 和吉林小豆丛生芽再生率最高,分别达 86% 和 82%;*GUS* 瞬时表达率的变幅为 44%~98%,吉林小豆最高(98%),其次为 Maverick(93%);*GUS* 阳性率变幅为 0 ~ 35.00%,吉林小豆的阳性率最高(33.35%),单次最高阳性率达 35%,其次为 Maverick(27.52%)。利用 Fisher's LSD 法对 24 个基因型进行显著差异性分析,吉林小豆和 Maverick 2 个品种间存在显著差异,说明吉林小豆和 Maverick 都是易感基因型,但吉林小豆比 Maverick 易感性强,都是适宜做遗传转化的理想基因型;冀豆 15、冀豆 17、nf58 易感性也较强,3 个基因型阳性率分别为 12.47%、10.67% 和 9.11%,并且 3 个基因型的阳性率无显著差异,较适宜做遗传转化;而绥农 28、绥农 29 和中黄 46 的阳性率为 0,说明这 3 个基因型不适宜遗传转化,易感性差。

表 4 EHA105 介导不同大豆基因型的转化

Table 4 EHA105 mediated genetic transformation of soybean

基因型 Genotypes	再生率 Regeneration rate /%	*GUS* 瞬时表达率 *GUS* transient expression rate /%	*GUS* 阳性率 Positive rate of *GUS*/%
冀豆 7 Jidou 7	55	65	2.70 ±0.10hi
冀豆 12 Jidou 12	68	73	7.60 ±0.14def
冀黄 13 Jihuang 13	77	78	7.17 ±6.69defg
冀豆 15 Jidou 15	79	79	12.47 ±1.47c
冀豆 16 Jidou 16	76	72	5.34 ±0.30fgh
冀豆 17 Jidou 17	78	79	10.67 ±0.20cd
冀豆 18 Jidou 18	72	66	3.95 ±1.66gh
冀豆 19 Jidou 19	71	70	4.82 ±0.08fgh
冀豆 20 Jidou 20	64	68	3.81 ±1.86gh
五星 1 号 Wuxing 1	73	49	0
五星 2 号 Wuxing 2	68	70	6.83 ±1.80efg
五星 3 号 Wuxing 3	73	66	2.6 ±0.05hi
五星 4 号 Wuxing 4	60	65	2.47 ±0.04hi
nf 58	79	79	9.11 ±2.00cde
Maverick	86	93	27.52 ±0.97b
垦丰 22 Kenfeng 22	70	71	7.70 ±0.28def
垦丰 17 Kenfeng 17	71	72	3.92 ±1.72gh
绥农 28 Suinong 28	68	65	0
绥农 29 Suinong 29	50	69	0
吉育 99 Jiyu 99	69	71	2.60 ±0.05hi
吉林小豆 Jilinxiaodou	82	98	33.35 ±2.33a
中黄 37 Zhonghuang 37	78	75	10.39 ±0.19cd
中黄 43 Zhonghuang 43	48	70	2.74 ±0.05hi
中黄 46 Zhonghuang 46	56	44	0

2.3.3 农杆菌 LBA4404 由表 5 可见,利用农杆菌 LBA4404 对 24 个大豆基因型进行遗传转化时,Maverick 和吉林小豆丛生芽再生率最高,分别为 84% 和 83%;*GUS* 瞬时表达率的变幅为 10%~80%,吉林小豆最高,其次为 Maverick(75%);农杆菌 LBA4404 菌株的侵染能力较差,*GUS* 阳性率变幅为 0 ~ 18.27%。利用 Fisher's LSD 法对基因型进行显著差异性分析,吉林小豆的阳性率最高,为 18.27%,其次为 Maverick(15.89%),2 个品种间存在显著差异,且显著高于其它基因型,说明吉林小豆是最易感基因型,Maverick 次之;冀豆 15 阳性率为 5.06%,较易于侵染,其余基因型的阳性率都低于 5%,说明农杆菌 LBA4404 菌株的侵染能力较弱。

表 5　LBA4404 介导不同大豆基因型的转化

Table 5　LBA4404 mediated genetic transformation of soybean

基因型 Genotypes	再生率 Regeneration rate /%	*GUS* 瞬时表达率 *GUS* transient expression rate /%	*GUS* 阳性率 Positive rate of *GUS*/%
冀豆 7 Jidou 7	56	39	1.28 ± 1.81ef
冀豆 12 Jidou 12	68	33	2.53 ± 0.05de
冀黄 13 Jihuang 13	77	25	0
冀豆 15 Jidou 15	76	70	5.06 ± 0.09c
冀豆 16 Jidou 16	74	61	0
冀豆 17 Jidou 17	78	71	2.63 ± 0.01de
冀豆 18 Jidou 18	72	61	2.60 ± 0.05de
冀豆 19 Jidou 19	71	50	0
冀豆 20 Jidou 20	61	56	1.32 ± 1.86ef
五星 1 号 Wuxing 1	76	12	0
五星 2 号 Wuxing 2	68	18	1.39 ± 1.96ef
五星 3 号 Wuxing 3	73	46	1.35 ± 1.91ef
五星 4 号 Wuxing 4	61	41	1.35 ± 1.91ef
nf 58	79	67	0
Maverick	84	75	15.89 ± 2.27b
垦丰 22 Kenfeng 22	70	25	0
垦丰 17 Kenfeng 17	71	33	0
绥农 28 Suinong 28	66	22	0
绥农 29 Suinong 29	51	14	0
吉育 99 Jiyu 99	71	66	3.72 ± 1.64cd
吉林小豆 Jilinxiaodou	83	80	18.27 ± 1.09a
中黄 37 Zhonghuang 37	76	21	0
中黄 43 Zhonghuang 43	46	10	0
中黄 46 Zhonghuang 46	59	12	0

综上,在农杆菌介导大豆子叶节遗传转化系统中,就农杆菌而言,EHA101 转化效率最高,其次是 EHA105,LBA4404 转化效率最差。

2.4　不同大豆基因型对农杆菌敏感性分析

将 3 个菌株对吉林小豆、Maverick、冀豆 15、nf58、冀豆 17 共 5 个适宜转化的大豆基因型进行了遗传转化,并对 *GUS* 染色结果进行了方差分析。由表 6 可见,吉林小豆受 EHA101 侵染后 *GUS* 阳性率最高(40.25%),其次是 EHA105,LBA4404 最差,且 3 个菌株的侵染能力存在显著差异;Maverick 受 3 个菌株侵染后的 *GUS* 阳性率分别为 29.89%、27.52% 和 15.89%,EHA101 和 EHA105 之间差异不显著,但与 LBA4404 之间存在显著差异,说明 EHA101 和 EHA105 菌株对 Maverick 敏感性均较强,2 种菌株均适宜对 Maverick 进行转化。侵染后冀豆 15 的 *GUS* 阳性率分别为 23.3%、12.47% 和5.06%,3 个菌株之间存在显著差异,说明 EHA101 更适合对冀豆 15 进行转化;侵染后 nf58 的 *GUS* 阳性率分别为 16.48%、9.11% 和 0,EHA101 和 EHA105 之间差异不显著,EHA101 和 EHA105 均可以作为 nf58 的转化介质,而 LBA4404 不适宜作为其转化介质;对于冀豆 17,转化后 3 个菌株的 *GUS* 阳性率分别为 13.24%、10.67% 和 2.63%,EHA101 和 EHA105 均好于 LBA4404,而且存在显著差异,认为 EHA101 和 EHA105 作为冀豆 17 的转化介质更为适宜。总之,农杆菌 EHA101 和 EHA105 都有很强的侵染能力,是适宜做遗传转化的理想菌株。从 *GUS* 阳性表达率看,EHA105 和 EHA101 都是超毒力菌株,在今后大豆子叶节遗传转化试验中,可根据标记基因的抗性选择 EHA101 或 EHA105 做为侵染菌株,而 LAB4404 侵染能力弱,不建议使用。

表 6　不同基因型对不同农杆菌敏感性分析

Table 6　Sensitivity analysis of different soybean genotypes to different *Agrobacterium tumefaciens* strains

GUS 阳性基因型 Genotypes with positive GUS	再生率 Regeneration rate /%	*GUS* 瞬时表达率 *GUS* transient expression rate /%
吉林小豆 Jilinxiaodou	EHA101	40.25 ± 1.10a
	EHA105	33.35 ± 2.33b
	LBA4404	18.27 ± 1.09c
Maverick	EHA101	29.89 ± 2.39a
	EHA105	27.52 ± 0.97a
	LBA4404	15.89 ± 2.27b
冀豆 15 Jidou15	EHA101	23.03 ± 2.79a
	EHA105	12.47 ± 1.47b
	LBA4404	5.06 ± 0.09c
nf 58	EHA101	16.48 ± 4.19a
	EHA105	9.11 ± 2.00a
	LBA4404	0
冀豆 17 Jidou17	EHA101	13.24 ± 1.48a
	EHA105	10.67 ± 0.20a
	LBA4404	2.63 ± 0.01b

3　结论与讨论

任何成功的转化都有赖于高效的组织培养再生系统和转化方法的有效结合。大豆组织培养的丛生芽诱导率和再生植株率受基因型影响很大。据报道,不定芽诱导培养基中,使用激素种类和浓度是重要因素,6-BA 对大豆不定芽的诱导有着良好的效果[9]。该试验在农杆菌介导大豆子叶节转化体系优化方面,芽诱导阶段 6-BA 浓度为1.6 mg · L^{-1} 分化率较高,与曲姗姗等[10]的研究结果相一致,从

而充分说明了激素浓度的重要性;通过对草铵膦筛选浓度试验,得出适宜浓度为 3 mg · L^{-1},这样既达到了筛选效果,又保证了一定的丛生芽存活率。

根癌农杆菌侵染过程和子叶节的组织再生性存在着很大的品种依赖性,在基因型之间存在很大差异,是限制大豆转基因技术发展的关键因素,其它任何影响因素的优化试验都是建立在易感性基因型基础之上的。另外,不同农杆菌菌株对大豆的转化能力也有差异,不同菌株的转化能力的差异主要是 Ti 质粒的差异所致,转化中选择对农杆菌敏感的大豆基因型和强毒农杆菌菌系有利于转化效率的提高[11]。研究发现通过对侵染 28 d 后丛生芽 *GUS* 报告基因表达的检测可以早期评估农杆菌的侵染效率,而侵染 28 d 后丛生芽的出芽率能准确地反映大豆的再生能力。目前应用于大豆遗传转化的主要菌株是 EHA101、EHA105 和 LBA4404,该试验通过比较 24 个大豆基因型的再生能力和对农杆菌菌株 EHA101、LBA4404 和 EHA105 的敏感性后发现,EHA101 和 EHA105 的侵染能力都很强,侵染能力明显高于 LBA4404,EHA101 和 EHA105 都是超毒力菌株,这与李文霞等[12]的研究结果相一致。通过基因型筛选得到大豆遗传转化理想的受体基因型为吉林小豆和 Maverick,其次为冀豆 15、冀豆 17 和 nf58。

参考文献

[1] Horsch R B, Fraley B T, Rogers S C. Inheritance of functional foreign genes in plants[J]. Science, 1984, 223: 496-498.

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

[3] Cheng T Y, Saka H, Thanh H V. Plant regeneration from soybean cotyledon node segments in cultures[J]. Plant Science Letters, 1980, 19: 91-99.

[4] Zhang Z Y, Xing A Q. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1999, 56: 37-46.

[5] 陈秀华,柏锡,潘欣,等. 转 *cry*1 *Lem* 基因大豆的培育及抗虫性检测[J]. 大豆科学,2009,28(6):959-963. (Chen X H, Bai X, Pan X, et al. Cultivation of *cry*1 *Lem* gene transform soybean and insect resistant assay[J]. Soybean Science, 2009, 28(6): 959-963.)

[6] 刘海坤,卫志明. 利用根瘤农杆菌介导转化大豆成熟种胚尖获得转基因植株[J]. 植物生理与分子生物学学报,2004,30(6):631-636. (Liu H K, Wei Z M. Transgenic soybean obtained with *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Embryonic tip of soybean mature seeds[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2004, 30(6): 631-636.)

[7] Dang W, Wei Z M. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation for soybean for expression of binary insect resistance genes[J]. Plant Science, 2007, 173: 381-389.

[8] 刘金华,王丕武,武丽敏,等. 脯氨酸、硝酸银对农杆菌转化大豆的影响[J]. 大豆科学,2003,12(2):36-40. (Liu J H, Wang P W, Wu L M, et al. Effection of proline and $AgNO_3$ on *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean[J]. Soybean Science, 2003, 12(2): 36-40.)

[9] 袁鹰,刘德璞,郑培和,等. 大豆组织培养再生植株研究[J]. 大豆科学,2001,20(1):9-13. (Yuan Y, Liu D P, Zheng P H, et al. Study on plant regeneration from soybean culture[J]. Soybean Science, 2001, 20(1): 9-13.)

[10] 曲姗姗,刘丽君,寇坤,等. 农杆菌介导法将 *Bt*(*cryIA*)基因导入大豆的研究[J]. 大豆科学,2009,28(2):186-194. (Qu S S, Liu L J, Kou K, et al. Transformation of *Bt*(*cryIA*) gene into soybean via *Agrobacterium*-mediated method[J]. Soybean Science, 2009, 28(2): 186-194.)

[11] 许智宏. 植物生物技术[M]. 上海:上海科学技术出版社,1998:321. (Xu Z H. Plant biotechnology[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1998: 321.)

[12] 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. (Li W X, Ning H L, Lu W H, et al. Optimization of the *Agrobacterium*-mediated transformation systems of soybean cotyledonary node[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(4): 971-977.)