

## 农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化技术流程及操作要点

赵晓雯, 吴芳芳, 狄少康, 柏锡, 纪巍, 李勇, 才华, 朱延明

(东北农业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:**大豆遗传转化效率低,是大豆转基因育种亟待解决的重要问题。以大豆子叶节为外植体采用农杆菌介导法,系统地研究了大豆子叶节遗传转化各技术环节的操作要点,包括工程菌液制备、无菌苗获得及外植体制备、农杆菌的侵染及共培养、不定芽诱导、不定芽伸长、根诱导、驯化与移栽、抗性植株的获得及转基因植株的检测等,建立了一套较稳定、高效的大豆子叶节遗传转化体系。并利用该体系,将野生大豆耐盐碱相关基因 A1 对大豆品种绥农 28、合丰 50、合丰 55、东农 50 进行遗传转化,系统地探讨了大豆基因型、影响 T-DNA 的转移效率的各环节、筛选剂浓度及不同基因型转化效率等几个重要因素。

**关键词:**大豆;遗传转化;农杆菌介导;子叶节;技术流程

**中图分类号:**S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2011)03-0362-07

## Technique flow and Key Operation Points of *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation of Soybean Cotyledonary Node

ZHAO Xiao-wen, WU Fang-fang, DI Shao-kang, BAI Xi, JI Wei, LI Yong, CAI Hua, ZHU Yan-ming

(College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

**Abstract:** The low soybean genetic transformation frequency was one of the difficult problems that needed be resolved in soybean transgenic breeding. In this study, the soybean cotyledonary node was used as explants, and the technique flow and key operation points of *Agrobacterium*-mediated transformation method, including *Agrobacterium* preparation, explant and aseptic seedling preparation, infection and co-cultivation, adventitious bud induction, shoot elongation, regeneration of transgenic plantlets, plant habituation, obtaining of antibiotic resistant detection of transgenic plants, was systematically investigated. Therefore, a stable and efficient genetic transformation system using soybean cotyledonary nodes as explants was established. Using this transformation system, A1 gene isolated from *Glycine soja* was transformed into four soybean cultivars, including Suinong28, Hefeng55, Hefeng50 and Dongnong50. And several important factors affecting the transformation efficiency were also discussed in the explant.

**Key words:** Soybean; Genetic transformation; *Agrobacterium*-mediated; Cotyledonary node; Technique flow

大豆遗传转化效率低,是目前国内外基因工程与分子生物学领域亟待解决的重要问题。大豆遗传转化方法主要有农杆菌介导法、基因枪法、电激法、PEG法、显微注射法、超声波辅助农杆菌转化法和花粉管通道法等<sup>[1]</sup>。其中,农杆菌介导法具有操作简单、效率高、周期短、可插入外源基因片段大、不易发生重排、拷贝数低、宿主范围广等优点,是目前国内外最常用的遗传转化方法之一。

自1988年Hinchee等<sup>[2]</sup>用农杆菌侵染大豆子叶节获得转基因大豆植株以来,大豆的遗传转化研究受到广泛的重视,农杆菌介导法也成为大豆分子育种和基因功能研究的重要手段。1988年Meurer

等<sup>[3]</sup>报道了农杆菌转化大豆子叶节的影响因素,发现用超声处理过的子叶节较对照容易转化。1999年Zhang等<sup>[4]</sup>以*Bar*基因作为筛选标记基因,农杆菌法转化大豆子叶节频率达3%。2003年Olhoft等<sup>[5]</sup>相继报道了在培养基中添加硫醇类化合物和L-半胱氨酸可以防止由农杆菌侵染导致的组织坏死现象,从而提高转化频率。2006年Paz等<sup>[6]</sup>以无菌水浸泡16h的子叶节为外植体进行转化,遗传转化效率达到了1.4%~7.8%。2010年Yamada等<sup>[7]</sup>通过用微型金属毛刷对子叶节外植体造成机械损伤以及在侵染液中加入0.02%的Silwet L-77使遗传转化效率从1.0%提高到4.4%。

收稿日期:2011-03-30

基金项目:国家高技术研究发展计划(“863”计划)资助项目(2008AA10Z153);转基因生物新品种培育科技重大专项资助项目(2008ZX08004-002)。

第一作者简介:赵晓雯(1985-),女,在读硕士,研究方向为植物基因工程与分子生物学。E-mail:longshelan615@yahoo.com.cn。

通讯作者:朱延明(1955-),男,教授,博士生导师,从事植物基因工程与分子生物学研究。E-mail:ymzhu2001@hotmail.com。

迄今,虽有很多研究者对农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化进行了大量研究,但因物种的特殊性,大豆遗传转化操作环节复杂,技术难度大,重复性差,尚未建立起稳定、高效的遗传转化体系,严重影响大豆转基因育种的效率和进程。

该研究以成熟大豆子叶节为受体,采用农杆菌介导转化法进行遗传转化,系统地探讨了影响转化效率的主要因素,以及各操作环节的操作技术要点,建立起一套较稳定、高效的农杆菌介导的大豆

子叶节遗传转化体系。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

1.1.1 植物材料 大豆品种为东北地区主栽品种绥农 28、合丰 50、合丰 55 和东农 50。

1.1.2 培养基 试验所用的培养基及其成分参考 Zhang 等<sup>[4]</sup>和 Paz 等<sup>[6]</sup>的方法,见表 1。

表 1 农杆菌介导大豆子叶节转化过程中应用的培养基

Table 1 Culture medium used for *Agrobacterium*-mediated cotyledonary-node transformation of soybean

培养基 Media	培养基成分 Composition
YEP	5 g · L <sup>-1</sup> 牛肉膏 + 1 g · L <sup>-1</sup> 酵母提取物 + 5 g · L <sup>-1</sup> 蛋白胨 + 5 g · L <sup>-1</sup> 蔗糖 + 0.493 g · L <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> , pH 7.0
萌发培养基 GM	B <sub>5</sub> 无机物 + B <sub>5</sub> 有机物 + 2%蔗糖 + 1 mg · L <sup>-1</sup> 6-BA + 0.2%凝胶, pH 5.8
预培养培养基 PCM	B <sub>5</sub> 无机物 + B <sub>5</sub> 有机物 + 6%蔗糖 + 1 mg · L <sup>-1</sup> 6-BA + 0.2%凝胶, pH 5.8
共培养培养基 CCM	1/10B <sub>5</sub> 无机物 + B <sub>5</sub> 有机物 + 3%蔗糖 + 20 mmol · L <sup>-1</sup> MES + 0.25 mg · L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub> + 1.67 mg · L <sup>-1</sup> BAP + 200 μmol · L <sup>-1</sup> AS + 400 mg · L <sup>-1</sup> Cys + 1 mmol · L <sup>-1</sup> DTT + 0.5%琼脂, pH 5.2
菌体重悬培养基 REM	1/10B <sub>5</sub> 无机物 + B <sub>5</sub> 有机物 + 3%蔗糖 + 20 mmol · L <sup>-1</sup> MES + 0.25 mg · L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub> + 1.67 mg · L <sup>-1</sup> BAP + 200 μmol · L <sup>-1</sup> AS + 1 mmol · L <sup>-1</sup> DTT, pH 5.2
不定芽诱导培养基 SIM	B <sub>5</sub> 无机物 + B <sub>5</sub> 有机物 + 3%蔗糖 + 3 mmol · L <sup>-1</sup> MES + 0.2%凝胶 + 1.67 mg · L <sup>-1</sup> BAP + 250 mg · L <sup>-1</sup> 头孢噻肟钠 + 100 mg · L <sup>-1</sup> 阿莫西林, pH 5.7
不定芽伸长培养基 SEM	MS无机物 + B <sub>5</sub> 有机物 + 3 mmol · L <sup>-1</sup> MES + 3%蔗糖 + 50 mg · L <sup>-1</sup> 天冬酰胺 + 100 mg · L <sup>-1</sup> L-焦谷氨酸 + 0.1 mg · L <sup>-1</sup> IAA + 0.5 mg · L <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub> + 1 mg · L <sup>-1</sup> 玉米素核苷 + 250 mg · L <sup>-1</sup> 头孢噻肟钠 + 100 mg · L <sup>-1</sup> 阿莫西林 + 0.2%凝胶, pH 5.7
生根培养基 RM	MS无机物 + B <sub>5</sub> 有机物 + 2%蔗糖 + 3 mmol · L <sup>-1</sup> MES + 0.7%琼脂粉, pH 5.6

1.1.3 菌株和质粒 农杆菌菌株为 EHA105,由东北农业大学植物生物工程研究室保存。二元载体质粒以 pCambia3300 为骨架,构建由强组成型启动子 E12、CaMV35S 调控的植物表达载体 pCBA1,目的基因为野生大豆基因 A1,筛选标记基因为除草剂抗性 *Bar* 基因。参考 Hofgen 和 Willmitzer<sup>[8]</sup>的冻融法直接将质粒导入农杆菌菌株中。其 T-DNA 区的结构如图 1 所示。

### 1.2 试验方法

采用农杆菌介导的子叶节转化法<sup>[9-10]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 工程菌液制备

技术流程:挑取含有目的基因的农杆菌单菌落或冻存管农杆菌,按 1:100 的比例接种于含有抗生素的 YEP 液体培养基上,200 r · min<sup>-1</sup> 振荡培养过夜,进行一次活化。二次活化按 1:10 的比例振荡培养 6~8 h,即可用于侵染。侵染前,将活化好的农杆菌菌液分装到 50 mL 的离心管中,每管约 40 mL,4 000 r · min<sup>-1</sup>,离心 5 min,菌体沉淀用等体积的菌

体重悬培养基 REM 重悬(图 2A)。

操作要点:在工程菌液制备过程中为了保证侵染的效率二次活化后农杆菌菌液及用于侵染的农杆菌菌液的 OD<sub>650</sub> 值都应保持在 0.6~0.8 之间。

### 2.2 无菌苗的获得及外植体的制备

技术流程:挑选粒大、饱满、无病斑的成熟种子,采用氯气消毒法灭菌。在超净工作台内将种子吹至无明显氯气味道后,接种在萌发培养基 GM 上,温度为(24 ± 1) °C,每天光照 16 h。

种子萌发 5 d 后,幼苗可用作下一步外植体制备(图 2B)。取 5 d 苗龄的无菌苗,去掉种皮,保留子叶及下方的下胚轴,用解剖刀将 2 片子叶沿下胚轴的方向平行切开,去除所有的芽,分别在子叶节有效分化部位划 5~7 刀,将外植体(图 2C)转入 PCM 培养基中培养 1 d。

操作要点:外植体制备过程中,应确保解剖刀沿 2 片子叶下胚轴的方向平行切开,去除所有顶芽。子叶节有效分化部位所切伤口不宜过深,以免影响分化。

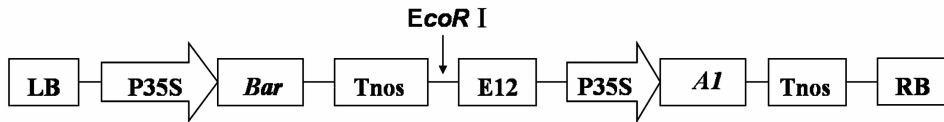


图1 质粒 pCBA1 的 T-DNA 区

Fig. 1 Linear map of plant expression plasmid pCBA1 T-DNA cassette

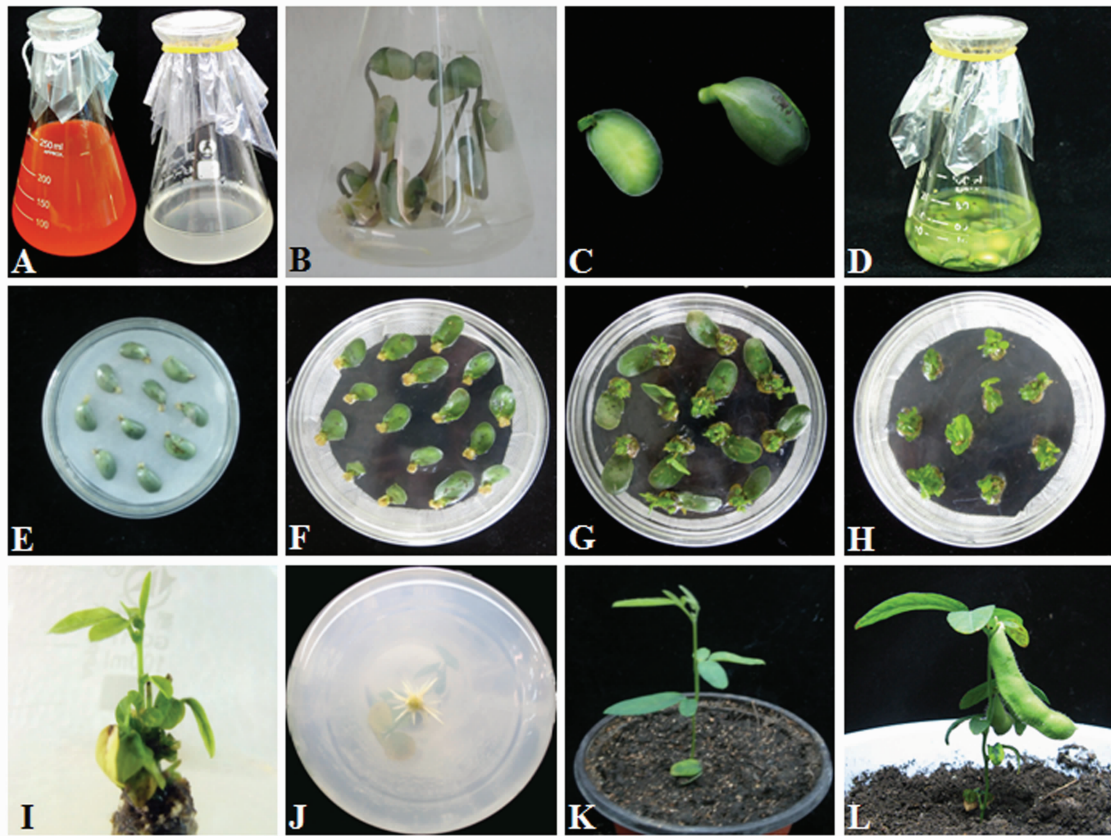


图2 大豆遗传转化及植株再生

Fig. 2 Genetic transformation and plant regeneration of soybean

2.2.1 种子萌发期 6-BA 对不同品种大豆不定芽分化率的影响 6-BA 是大豆子叶节丛生芽分化的最适细胞分裂素、其浓度的高低极大地影响分化率和出芽数。该试验以大豆品种绥农 28、合丰 50、合丰 55 和东农 50 为材料,观察不同浓度 6-BA (0、1.0、1.67  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 条件下不定芽诱导率。结果表明在添加 1.0 和 1.67  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 后不同品种大豆不定芽分化率明显提高(图 3)。但由于丛生芽过多不利于茎的伸长生长,因此最终选择在萌发培养基中添加 6-BA 的浓度为 1.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 2.3 农杆菌的侵染及共培养

技术流程:将制备好的子叶节外植体,放入装有工程菌重悬液的三角瓶中,大约每 30 mL 菌液 40 个子叶节外植体,负压 5 min,侵染 30 min(图 2D)。

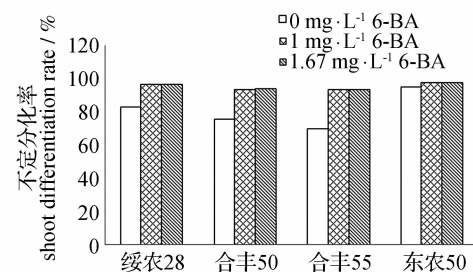


图3 6-BA 对不同品种大豆不定芽分化的影响

Fig. 3 The influence of concentration of 6-BA on the differentiation of shoots

侵染结束后,用无菌滤纸吸干子叶节外植体表面的菌液,然后将其近轴面向下放入含有 30 mL CCM 的  $90 \times 15 \text{ mm}$  的培养皿中(CCM 上附有一层无菌滤纸), $24^\circ\text{C}$  黑暗培养 3 d(图 2E)。

操作要点:侵染时负压 5 min 后,要每隔 10 min 轻缓的晃动三角瓶,使外植体与侵染液充分接触。共培养采用黑暗培养,温度保持在 $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。

2.3.1 影响侵染及共培养几个主要因子的探讨  
农杆菌介导的遗传转化频率受诸多因素影响,采用正交试验  $L_9(3^4)$ ,探讨了农杆菌侵染及共培养过程中的 4 个主要影响因素,即负压处理时间、共培养时间、预培养时间和共培养 pH 值对抗性芽率的影响(表 2),每个处理为 100 个子叶节,3 次重复(表 3)。从正交设计方差结果(表 4)可以看出,各因素不同水平对芽伸长率影响大小顺序为: $A_2 > A_3 > A_1, B_2 > B_3 > B_1, C_3 > C_1 > C_2, D_1 > D_3 > D_2$ ,并且 4 个因素的 3 个水平间差异极显著,因此,在负压处理 5 min,共培养 3 d,预培养 2 d,pH5.2 时得到最高的抗性芽率,为 83.7%。各影响因素的主次顺序是:共培养 pH 值 > 负压处理时间 > 共培养时间 > 预培养时间,即试验中影响遗传转化效率的最主要因素是共培养 pH 值(表 5)。

表 2 影响农杆菌介导遗传转化效率的因素水平表

Table 2 Factors and levels influencing the frequency of *Agrobacterium*-mediated transformation

	A	B	C	D
水平	负压处理时间	共培养时间	预培养时间	共培养 pH 值
Levels	Time of vacuum treatment/min	Time of co-culture/d	Time of pre-culture/d	pH value of co-culture
1	0	2	0	5.2
2	5	3	1	5.4
3	10	5	2	5.6

表 3 影响遗传转化的主要因子对抗性芽率的影响

Table 3 Effect of affecting factors on the rate of resistant shoots

试验号 No. of experiment	抗性芽率				
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	41.2
2	1	2	2	2	57.7
3	1	3	3	3	22.3
4	2	1	2	3	43.4
5	2	2	3	1	83.7
6	2	3	1	2	65.6
7	3	1	3	2	18.9
8	3	2	1	3	25.9
9	3	3	2	1	71.4

## 2.4 不定芽诱导

技术流程:共培养 3 d 后,用液体不定芽诱导培养基 SIM 清洗除去子叶节外植体表面的农杆菌。用无菌滤纸吸干子叶节外植体表面多余水分后即可转入 SIM 培养基中进行不定芽诱导培养(图

2F)。14 d 后,取出外植体,将下胚轴与培养基接触部分切出新的伤口,转入含有相应浓度筛选剂草丁膦的芽诱导培养基中(图 2G)。

表 4  $L_9(3^4)$  正交设计方差分析表

Table 4 Analysis of variance table of  $L_9(3^4)$  orthogonal experimental design

因素 Factors	水平 Levels			极差 R	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F value
	1	2	3					
负压处理时间 A								
Time of vacuum treatment	121.2	192.7	116.2	25.5	1221.1	2	610.6	55.0**
共培养时间 B								
Time of co-culture	103.5	167.1	159.3	21.2	783.1	2	391.6	35.3**
预培养时间 C								
Time of pre-culture	132.7	172.5	124.9	15.9	434.5	2	217.3	19.6**
共培养 pH 值 D								
pH value of co-culture	196.3	142.2	91.6	34.9	1827.7	2	913.9	82.3**
误差 Error					22.2	18	11.1	

\*和\*\*分别表示在 5% ( $F_{0.05} = 3.55$ ) 和 1% 水平 ( $F_{0.01} = 6.01$ ) 的差异显著性。

\* and \*\* indicate the significant difference at the level of 5% ( $F_{0.05} = 3.55$ ) and 1% ( $F_{0.01} = 6.01$ ), respectively.

操作要点:应确保子叶节外植体表面的农杆菌去除干净,避免农杆菌在培养基上进一步生长。将外植体转入不定芽诱导培养基时,应倾斜  $45^\circ$  插入培养基。

2.4.1 不同品种外植体草丁膦筛选压力确定  
不同品种的大豆子叶节外植体对草丁膦的抗性不同,因此在转化前,首先要确定草丁膦对不同品种的大豆外植体的筛选浓度<sup>[11]</sup>。制备外植体模拟农杆菌的侵染、共培养、除菌过程,将除菌后的不同品种大豆子叶节外植体接种于含有不同草丁膦浓度梯度的芽诱导培养基上,以 14 d 后不定芽分化率确定草丁膦筛选压力。结果表明在含有草丁膦的培养基上,各外植体的生长明显受到了抑制,并且随着草丁膦浓度的升高逐渐褐化死亡。根据 3 次试验结果,每个梯度外植体数为 40,以完全抑制丛生芽分化的草丁膦浓度作为芽诱导阶段的选择压力,确定筛选压力绥农 28 为  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、合丰 50 为  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、合丰 55 为  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、东农 50 为  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (表 5)。

## 2.5 不定芽伸长

技术流程:不定芽诱导 28 d 后,转入不定芽伸长培养基中(图 2H),每 14 d 继代 1 次,直到不定芽伸长到 3~5 cm(图 2I)。

表5 草丁膦对不同品种大豆子叶节不定芽分化的影响  
Table 5 Effect of glufosinate on the shoot regeneration of cotyledonry node of different soybean cultivars

大豆品种 Soybean cultivars	草丁膦浓度 Glufosinate	外植体数 No. of explant	不定芽分化率 <sup>a</sup> Rate of shoot differentiation/%
绥农 28 Suinong28	0	40	82.6
	0.5	40	76.9
	1.0	40	37.5
	1.5	40	3.8
	2.0	40	1.7
	2.5	40	0
合丰 50 Hefeng50	0	40	78.5
	2.5	40	15.8
	3.0	40	3.0
	3.5	40	0
合丰 55 Hefeng55	0	40	69.9
	2.5	40	20.3
	3.0	40	0
东农 50 Dongnong50	0	40	94.3
	0.5	40	89.2
	1.0	40	75.9
Hefeng55	1.5	40	34.4
	2.0	40	3.3
	2.5	40	0

<sup>a</sup> 每组试验设 3 次重复, 分化率取 3 次试验结果的平均数。

<sup>a</sup> Each experiment set three replications and the rate of differentiation is the average of three experimental results.

操作要点: 到该阶段子叶不再能提供外植体足够的营养, 因此可将子叶去掉。每 14 d 继代时, 应在外植体与培养基接触的部位切出新的伤口, 以利于外植体接触到筛选剂及营养物质。

## 2.6 根诱导及驯化、移栽

技术流程: 当不定芽伸长到 3~5 cm 之间时, 将其从基部切下, 在 1 mg · mL<sup>-1</sup> IBA 中蘸 1~2 min 后, 转入 RM 中进行生根培养(图 2J)。

当根长至约 2~3 cm 时, 移栽到混合土(蛭石: 珍珠岩: 上层土壤 = 1:1:1), 散射光下覆膜保湿培养。25℃, 约 3~5 d 后转入正常光下培养(图 2K、2L)。

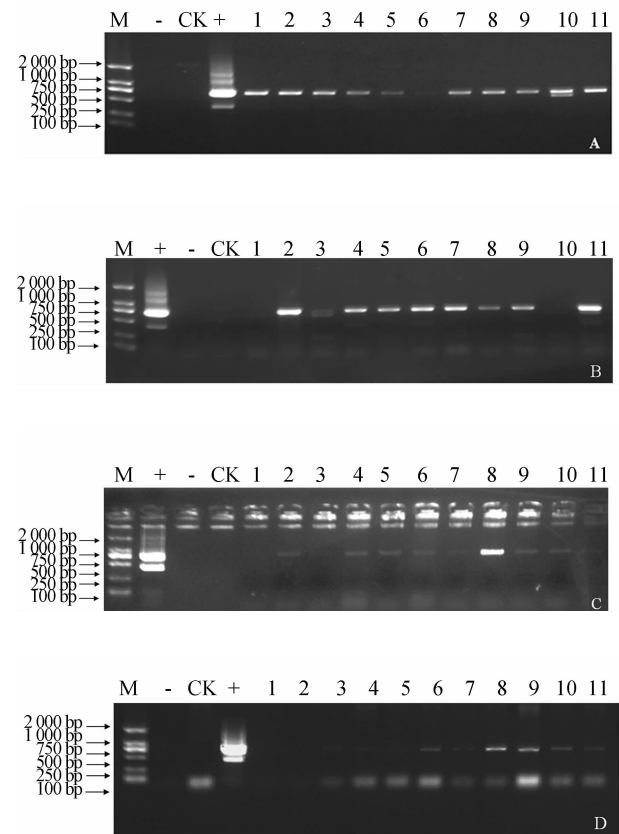
操作要点: 生根时基部在 IBA 中浸泡时间要适宜, 时间过短不易生根, 过长易产生愈伤。当根长至约 1 cm 时将抗性苗移栽, 移栽时注意应尽量洗净根部的培养基。

## 2.7 抗性植株的获得及转基因植株的检测

### 2.7.1 抗性植株的获得

用该研究室建立的遗传转化技术体系, 可在 4~6 个月内成功获得了大量抗性植株。到目前为止, 在含有目的基因 A1 质粒的农杆菌株 EHA105 浸染的大豆材料中绥农 28、合丰 50、合丰 55 和东农 50 的外植体中, 获得了大量抗性植株。

2.7.2 转基因植株的检测 提取抗性植株的 DNA, 进行 *Bar* 基因的 PCR 分析。PCR 扩增 *Bar* 基因的检测引物为 p1: 5'-AAGGATAGTGGGATTGTGCG-3', p2: 5'-AGTCGGGAAACCTGTCGTG-3'。PCR 鉴定证明外源基因已经整合到大豆的基因组中, 且大部分植株长势良好, 能够正常开花、结果。且 PCR 阳性植株率平均约为 74.8%。图 4 为部分抗性植株的 PCR 扩增结果。



A: 绥农 28; B: 合丰 50; C: 合丰 55; D: 东农 50。

M: DL2000 marker; - : 水对照; CK: 未转化植株(阴性对照);  
+ : 阳性对照; 4~11: 抗性植株;  
A: Suinong28; B: Hefeng50; C: Hefeng55; D: Dongnong50;  
M: DNA Marker DL2000; - : Negative control(water);  
CK: untransforming plants; + : Positive control of pCBA;  
4-11: resistant plant.

图 4 大豆转基因植株的 PCR 检测结果

Fig. 4 PCR identification results of resistant plant of different soybean cultivars

### 2.8 大豆基因型对转化效率的影响

大豆基因型对农杆菌的敏感性, 以及农杆菌对

大豆的侵染能力直接影响到大豆的遗传转化效率,是备受关注的问题。大豆是由古四倍演变而来的二倍体作物,其基因组大小为  $1.29 \times 10^{11} \sim 1.81 \times 10^{11}$  bp 之间,基因组比较复杂,其 Southern 杂交也较困难,因此暂以 PCR 阳性率作为衡量转化效率的

标准,结果显示不同基因型对根瘤农杆菌侵染的敏感性存在显著差异。以东农 50 最高(5%),合丰 50 最低(1.06%)。无论从不定芽的分化还是转化效率方面,在 4 个品种中东农 50 都是较为理想的遗传转化品种,转化效率最高可达到 7%(表 6)。

表 6 农杆菌介导的不同品种大豆子叶节的转化效率

Table 6 Transformation efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary node

品种 Soybean cultivars	侵染外植体数 No. of explant	移栽的抗性苗 Resistant plants	PCR 阳性植株 No. of PCR positive	PCR 阳性率 Rate of PCR positive/%	平均转化效率 Avg. of transformation efficiency/%
绥农 28	400	4	3	0.75	
Suinong28	800	23	21	2.26	1.67
	400	9	8	2.00	
合丰 55	800	14	13	1.63	1.38
Hefeng55	800	12	9	1.13	
合丰 50	200	4	3	1.50	1.06
Hefeng50	300	3	2	0.67	
	300	3	3	1.00	
东农 50	200	26	14	7.00	5.00
Dongnong50	100	5	3	3.00	

转化效率(%) = (PCR 阳性外植体数/侵染总外植体数) × 100。

Transformation efficiency(%) = (No. of positive explants/ No. of explants) × 100.

### 3 讨 论

大豆基因型及外植体、农杆菌菌株及转化效率、外植体与菌株之间的互作、抗性植株的筛选方法等因素影响大豆遗传转化的效率。

大豆基因型和外植体的差异是影响农杆菌介导大豆转化的 2 个重要因素。Hinchee 等<sup>[1]</sup>从 100 多个品种中选出了对农杆菌反应最佳的 Peking, Donaldson 等<sup>[12]</sup>对 12 个大豆品种进行转化,只从品种 AC Colibri 得到了遗传稳定的转基因植株。目前,遗传转化过程中常用的外植体主要有子叶节、未成熟种子的子叶和胚生长点、愈伤组织<sup>[13]</sup>等,2007 年 Hong 等<sup>[14]</sup>优化了以愈伤组织为转化受体的遗传转化体系,并获得大量遗传稳定大豆植株。Paula 等<sup>[15]</sup>用农杆菌菌株 SHA17 侵染无菌苗上胚轴,转化效率达到 6.6%。2010 年 Loganathan 等<sup>[16]</sup>首次以未成熟的大豆胚芽尖为外植体获得胚状体。因此,为了获得外源基因能够稳定遗传的大豆品种,不仅要选择适于农杆菌转化的基因型,也要从外植体选择方面提高大豆的遗传转化效率。该文采用已建立的遗传转化体系证明绥农 28、合丰 50、合丰 55 和东农 50 都可以视为遗传转化的优良品种,且以东农 50 最优。

农杆菌菌株的影响主要在于菌株的活力和致毒能力。目前应用于大豆遗传转化的主要菌株是 LBA4404、EHA105 和 KYRT1,就效果而言 EHA105 和 KYRT1 使用最为广泛,都是转化效率较高的株系,以 KYRT1 更优,而 EHA105 是超毒力菌株,可提高农杆菌侵染不敏感的转化受体的转化效率<sup>[17]</sup>。

大豆外植体与农杆菌菌株之间存在互作,农杆菌侵染植物外植体会引起植物的防卫反应,如 POD 和 PPO,这些反应会引起外植体的褐化,从而影响遗传转化效率。L-半胱氨酸、DTT、硫代硫酸钠能降低转化后组织培养时外植体的褐化现象,能大大提高农杆菌对子叶节的感染率,从而使转化效率提高<sup>[18-19]</sup>。共培养 pH 值也是影响农杆菌 Vir 区基因的诱导以及 T-DNA 向外植体转移的重要因素,Shrivastava 等<sup>[20]</sup>和 Husnain 等<sup>[21]</sup>报道了 pH 5.6 对 *Cajanus cajan* 和 *Cicerarietinum* 的转化最有效。另外,温度、湿度、光照等因素也会对菌液侵染效率、外植体生长状态、转基因组织再生等产生不同程度的影响<sup>[22-23]</sup>。

抗性芽的筛选在遗传转化中非常重要,直接关系到获得转化植株的多少,在诱导丛生芽分化阶段应以丛生芽分化数量为指标,以完全抑制丛生芽分化的最低浓度为最适浓度。该研究确定 4 个主栽品种筛选压力绥农 28 为  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、合丰 50 为  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、

合丰 55 为  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、东农 50 为  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

## 4 结 论

以成熟大豆子叶节为受体,采用农杆菌介导转化法进行遗传转化,系统地探讨了影响转化效率的主要因素,以及各操作环节的操作技术要点,在已有的研究基础上,进一步研究了影响农杆菌介导大豆遗传转化的因素,发现绥农 28、合丰 50、合丰 55、东农 50 都可以视为遗传转化的优良品种,且以东农 50 最优。在共培养 4 种因素探讨中发现负压处理 5 min,共培养 3 d,预培养 2 d,pH 5.2 时得到的抗性芽率最高(83.7%),且 pH 值是影响遗传转化效率的最主要因素。供试的 4 个大豆品种均获得了抗性植株,PCR 分析基因已经整合到大豆基因组中,PCR 阳性植株率为 0.67%~7.0% 之间,转化试验结果验证了这一优化的农杆菌转化技术体系的有效性和可行性。

## 参考文献

- [1] Trick H N, Dinkins R D, Santarém E R, et al. Recent advances in soybean transformation[J]. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 1997, 3: 9-26.
- [2] Hinchey M A W, Connor Ward D V, Newell C A. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium* mediated DNA transfer[J]. *Nature Biotechnology*, 1988, 6: 915-922.
- [3] Meurer C A, Dinkins R D, Collins G B. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation[J]. *Plant Cell Reports*, 1998, 18: 180-186.
- [4] Zhang Z Y, Xiang A Q, Staswick Q. The use of glufosinate-ammonium as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1999, 56: 37-46.
- [5] Olthoff P M, Somer D A. L-cysteine increases *Agrobacterium* mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary node cells[J]. *Plant Cell Reports*, 2001, 20: 706-711.
- [6] Paz M M, Martinez J C, Kalvig A B, et al. Improved cotyledonary node method using an alternative explants derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation [J]. *Plant Cell Reports*, 2006, 25: 206-213.
- [7] Yamada T, Watanabe S, Arai M, et al. Cotyledonary node pre-wounding with a micro-brush increased frequency of *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean[J]. *Plant Biotechnology*, 2010, 27: 217-220.
- [8] Hfggen R, Willmitzer L. Storage of competent cells for *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16: 9877.
- [9] Zhang Z, Xing A, Staswick P E, 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.
- [10] Paz M M, Shou H, Guo Z, et al. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant[J]. *Euphytica*, 2004, 136: 167-179.
- [11] Zeng P, Vadnais D A, Zhang Z, et al. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] [J]. *Plant Cell Reports*, 2003, 22: 478-482.
- [12] Danaldson P A, Simmonds D H. Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short season soybean[J]. *Plant Cell Reports*, 2000, 19: 478-484.
- [13] Hong H P, Zhang H Y, Olthoff P, et al. Organogenic callus as the target for plant regeneration and transformation via *Agrobacterium* in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill][J]. *In Vitro Cellular & Development Biology-Plant*, 2007, 43: 558-568.
- [14] Sato S, Newell C, Kolacz K. Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems[J]. *Plant Cell Reports*, 1993, 12: 408-413.
- [15] Olthoff P M, Bernal L M, Grist L B, et al. A novel *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation method of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using primary-node explants from seedlings [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2007, 43: 536-549.
- [16] Loganathan M, Maruthasalam S, Shiu L Y, et al. Regeneration of soybean (*Glycine max* L. Merrill) through direct somatic embryogenesis from the immature embryonic shoot tip[J]. *In Vitro Cell Development biology-plant*, 2010, 6: 265-273.
- [17] 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.
- [18] Ko T S, Lee S, Krasnyanski S, et al. Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explants[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107: 439-447.
- [19] Olthoff 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.
- [20] Srivastava, Sanyal D K, Singh B D, et al. Endogenous *GUS*-activities in *Cajanus cajan* L. and some grain legumes: selective suppression for expression of *GUS* reporter gene[J]. *Plant Biology*, 2001, 28: 243-250.
- [21] Husnain T, Malik T, Riazuddin S, et al. Studies on expression of marker genes in chickpea[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1997, 49: 7-16.
- [22] Pline W A, Wu J, Hatzios K K. Effect of temperature and chemical additives on the response of transgenic herbicide-resistant soybean to glufosinate-ammonium and glyphosate applications [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1999, 65: 119-131.
- [23] 刘北东,朱延明,李海燕. 大豆子叶节再生影响因素的研究 [J]. *大豆科学*, 2002, 21(1): 88-92. (Liu B D, Zhu Y M, Li H Y. Study on factors affecting the soybean cotyledonary node regeneration[J]. *Soybean Science*, 2002, 21(2): 88-92.)