

大豆子叶节遗传转化体系优化及抗逆基因 *AtNHX5* 的转化研究

杨 权¹, 王月月¹, 刘炎光¹, 蒋春志², 张孟臣², 张洪霞³, 张 洁¹, 王冬梅¹

(1. 河北农业大学 生命科学学院, 河北 保定 071001; 2. 河北省农林科学院 粮油作物研究所, 河北 石家庄 050000; 3. 中国科学院 上海植物生理研究所, 上海 200032)

摘要:以河北省优良大豆品种冀豆 15、五星 2 号和 NF-58 的子叶节为受体材料, 利用农杆菌介导法进行遗传转化, 探讨了影响农杆菌侵染后子叶节不定芽诱导的因素。结果表明: 以萌发 6 d、4℃ 处理 24 h 的子叶节为外植体, 农杆菌侵染后经超声波处理 30 s, 共培养基中添加 20 mg · L⁻¹ 硝酸银, 能够提高子叶节丛生芽诱导率, 转化植株经草铵膦筛选以及 PCR 检测, T₀ 代转化率达 0.97%。利用该体系对大豆品种五星 2 号进行 *AtNHX5* 基因的遗传转化, 获得 3 株 T₀ 代 RT-PCR 检测阳性植株, 且 2-1 号 T₁ 代阳性植株检测具有一定耐盐性, 初步证明获得了转 *AtNHX5* 基因的大豆新材料。

关键词:大豆; 子叶节; *AtNHX5* 基因; 遗传转化; 除草剂

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2015.02.0205

Study on Optimization of Soybean Cotyledonary Node Genetic Transformation System and the Transformation of Resistance Gene *AtNHX5*

YANG Quan¹, WANG Yue-yue¹, LIU Yan-guang¹, JIANG Chun-zhi², ZHANG Meng-chen², ZHANG Hong-xia³, ZHANG Jie¹, WANG Dong-mei¹

(1. College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China; 2. Grain and Oil Crop Research Institute, Academy of Agriculture and Forestry of Hebei Province, Shijiazhuang 050000, China; 3. Shanghai Institute of Plant Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: In this study, soybean cotyledonary node of Jidou 15, Wuxing 2 and NF-58 were used as materials. An efficient *Agrobacterium*-mediated gene transformation system based on the examinations of several factors influencing transformation efficiency was developed for soybean. The results indicated that the optimum transformation conditions were as follow: seeds germinated 6 days, 4℃ low temperature treatment, 20 mg · L⁻¹ anti-oxidant silver nitrate during co-cultivation, ultrasonic treatment for infected explants 30 s. In the above condition, PCR-positive rate was 0.97%. Using the optimized system an stress-resistant gene *AtNHX5* was transformed. Using the optimized system, the gene was transformed into soybean Wuxing 2. After detected the transgenic plants resistant to glufosinate by PCR, the transformation efficiency was 0.23%. The expression of *AtNHX5* was assessed by RT-PCR analysis. One positive plant of T₁ generation was obtained by detection of PCR, which has salt-tolerance. It preliminarily demonstrated that the target gene was integrated into the soybean genome.

Keywords: Soybean; Cotyledonary node; *AtNHX5*; Genetic transformation; Glufosinate

大豆是重要的粮食和经济作物,也是食用油和植物蛋白的主要来源之一^[1],利用分子育种方法可以提高大豆的产量和品质。目前,农杆菌介导的子叶节转化法在大豆遗传改良中应用最为广泛^[2],但转化效率低一直是困扰大豆遗传转化的主要问题,因此近年来围绕如何提高农杆菌介导法的转化频率展开了大量的研究,其中较为成功的是超声波辅助农杆菌介导法,简称 SAAT 法^[3-4]。另外,在大豆遗传转化中由于外植体的褐化现象比较严重进而影响到外植体的分化,采取有效的防止褐化的措施也是保证大豆遗传转化成功的关键之一^[5]。所以,建立良好的大豆子叶节转化体系,是遗传转化成功

的前提条件。本试验首先以 *GUS* 为报告基因,探讨影响河北省优良大豆品种子叶节不定芽诱导的因素,建立了高效的大豆子叶节转化体系,为进一步利用该体系进行目的基因的遗传转化,获得优质抗逆大豆新材料奠定基础。

植物在高盐环境中,可通过 Na⁺ 外排、Na⁺ 的区隔化以及降低 Na⁺ 的吸收来抵御高盐浓度对自身的伤害^[6]。拟南芥液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因 *AtNHX5* 属于 CPA1 家族,该家族系列基因 *AtNHX1*^[7-8]、*AtNHX3*^[9] 已被证明与植物耐盐有关,转化 *AtNHX1* 基因的大豆^[7] 可以在 200 mmol · L⁻¹ NaCl 下正常生长。目前已证明 *AtNHX5* 的功能也与

收稿日期:2014-05-15

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08004-002-002,2014ZX0800402B-001)。

第一作者简介:杨权(1986-),女,硕士,主要从事植物抗逆生理及遗传转化研究。E-mail:yangquan19860918@hotmail.com。

通讯作者:张洁(1974-),女,博士,副教授,主要从事植物抗逆机理研究。E-mail:zhangjiezhao@163.com;

王冬梅(1963-),女,博士,教授,博导,主要从事植物逆境分子细胞生物学领域的研究工作。E-mail:dongmeiwang63@126.com。

植物耐盐有关^[10-11]。因此,本试验以河北省推广的大豆品种为材料,建立子叶节遗传转化体系,首次将 *AtNHX5* 基因用于大豆遗传转化,以期获得优质抗逆大豆新品系,为利用分子育种方法培育抗逆优质大豆品种提供新材料。

1 材料与方法

1.1 大豆子叶节遗传转化体系的优化

1.1.1 材料 供试大豆 [*Glycine max* (L.) Merrill] 为河北省优良大豆品种:冀豆 15、五星 2 号和 NF-58,由河北省农林科学院粮油作物研究所张孟臣研究员提供。供试农杆菌菌株为 EHA105;质粒为 pCAMBIA3301,该质粒带有 *GUS* 报告基因和抗除草剂草铵膦 *Bar* 基因。试验中所涉及到的培养基配方参照 Olhoft 等^[12]方法进行配置。

1.1.2 试验方法 (1)农杆菌侵染:选取种皮光滑无病斑、无裂纹、无霉菌的成熟大豆种子,采用氯气熏蒸法进行灭菌^[13]。将消毒处理后的大豆种子接种于萌发培养基,于 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、16 h/8 h 光周期条件下培养,每粒种子获得 2 个子叶节外植体^[14]。采用 YEP 固体培养基加入 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 利福平和 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素,挑取已转入质粒 pCAMBIA3301 的农杆菌 EHA105 单菌落, 28°C 、 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇至 $\text{OD}_{600} = 0.6$ 将菌液离心 ($3\ 000 \text{ g}$, 10 min),收集菌体,弃上清,用侵染液 [$1/2\text{MS}$; 3% 蔗糖; $1.67 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA; $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮 (As); $8.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ L-半胱氨酸 (L-Cys); $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二硫苏糖醇 (DTT); pH5.4] 重悬菌体至 $\text{OD}_{600} = 0.6$ 。将外植体在侵染液中浸泡 30 min,然后切口向下,平铺在放有一层滤纸的固体共培养基上,于 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 暗培养 5 d。

在此基础上对影响转化效率的多种因素,如种子萌发处理时间 (5, 6, 7 d)、预处理温度 (4°C 低温、 25°C 常温处理分别处理 24 h)、超声波处理 (0, 20, 30, 40 s) 以及在共培养基中添加不同浓度抗氧化剂硝酸银 ($0, 5, 10, 20, 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 或维生素 C ($0, 100, 200, 300, 400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 进行摸索。

(2)转基因植株的获得:经农杆菌侵染后的子叶节外植体近轴面朝上转入附加抗生素 $\text{cef } 400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $\text{cb } 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的诱导培养基中,诱导培养 20 d,培养温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,观察并统计丛生芽数。丛生芽诱导率 (%) = 丛生芽外植体数/转化外植体数 $\times 100$; 平均丛生芽数 = 丛生芽总数/丛生芽外植体数。随后取生长状态好的外植体再转入含 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Basta 的筛选培养基,筛选培养 12 ~ 14 d。挑选抗性丛生芽继代到伸长培养基,待苗长到 3 ~

5 cm 进行生根培养,最后炼苗移栽得到转化植株。培养温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,光周期为 16 h/8 h。

(3)转化植株的 *GUS* 活性测定 参照 Jefferson 的方法,*GUS* 瞬时表达可以作为外源基因进入受体细胞的指示剂^[15-16]。对五星 2 号转化植株进行 *GUS* 染色,同时以未经农杆菌侵染的子叶节再生植株为对照。所有试验均进行 3 次重复,每次重复 ≥ 30 个外植体。

(4) *GUS* 基因 T_0 代转化植株的草铵膦筛选 以五星 2 号子叶节为外植体进行转化,再生植株移栽一个月后,分别取对照及转化植株叶片,用注射器滴注 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Basta^[17],每个叶片滴注一滴,筛选一周后进行形态学观察。

(5) *GUS* 基因转化植株的 PCR 检测 按 CTAB 法提取大豆基因组 DNA^[18],以 Basta 序列为模板设计引物由上海生物工程有限公司合成, F primer: ACGCTCTTGAAGCCCTGT; R primer: GCACCATCG-TCAACCACT 片段大小为 300 bp。以设计的特异引物进行 PCR 扩增。对获得的转基因植株基因组 DNA 进行 PCR 鉴定。以未转化的大豆叶片基因组为阴性对照,以转化所用的农杆菌菌株的质粒为阳性对照。转化率 (%) = 阳性植株数/子叶节外植体总数 $\times 100$ 。PCR 采用 $20 \mu\text{L}$ 反应体系,反应程序为: 94°C 8 min; 94°C 1 min, 57.5°C 45 s, 72°C 50 s, 35 个循环; 72°C 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测并拍照。

1.2 *AtNHX5* 基因的大豆子叶节遗传转化

1.2.1 植物材料 大豆品种为五星 2 号,农杆菌菌株 GV3101,质粒为 pCAMBIA3301,该质粒带有 CaMV35S 启动的拟南芥液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 (*AtNHX5*, 该基因由中科院上海植物生理生态研究所张洪霞博士提供) 和抗除草剂草铵膦 *Bar* 基因。

1.2.2 试验方法 同 1.1.2。

1.2.3 *AtNHX5* 基因转化植株的 PCR 及 RT-PCR 检测 反应体系同上, *Bar* 引物为 F primer X: GCAC-CATCGTCAACCACTAC; R primer ZX: TCAAATCT-CGCTGACGGGC, 片段大小为 480 bp。对 T_0 代 PCR 检测呈阳性的转基因植株进行 RT-PCR 检测。利用 TaKaRa 公司的 RNAiso Plus 试剂提取大豆叶片总 RNA,以全式金公司的 cDNA 试剂盒进行反转录得到双链 cDNA,然后以 cDNA 为模板进行 RT-PCR 检测。以引物 F primer X, R primer ZX 进行 PCR 扩增。产物检测:取 $7 \mu\text{L}$ PCR 扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 *AtNHX5* 基因 T_1 代转化植株的盐胁迫处理

将经 PCR 及 RT-PCR 检测为阳性的 T_1 代转化植株种子及未经转化的植株种子萌发于温室沙盆中,用 Hoagland 营养液浇灌,照光培养 30 d 后,利用 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 盐溶液进行胁迫处理 10 d,恢复正常浇水 7 d,进行形态学观察。

2 结果与分析

2.1 大豆子叶节遗传转化体系的优化

2.1.1 萌发天数对大豆子叶节丛生芽诱导率的影响 分别以 3 个品种萌发 5、6 和 7 d 的无菌苗为外植体进行遗传转化。结果表明:3 个基因型均以萌发 6 d 的无菌苗为外植体丛生芽诱导率最高,随萌发时间的延长,子叶节丛生芽诱导率下降(图 1),可能是子叶节分生组织再生能力变弱导致了丛生芽诱导困难。

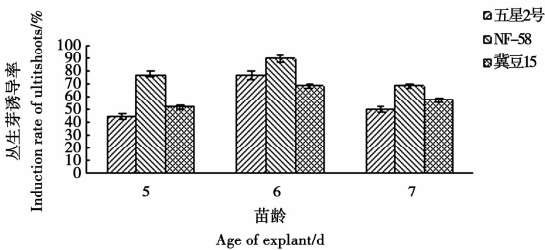


图 1 不同萌发天数对子叶节丛生芽诱导的影响

Fig. 1 Effect of different germinating days on the induction of multiple shoots

2.1.2 预处理温度对大豆子叶节平均丛生芽数的影响 大豆无菌苗经 4°C 低温胁迫后,不同品种的平均丛生芽数均高于常温处理(图 2),丛生芽生长状况优于常温处理并且封顶芽数量少。说明 4°C 低温处理无菌苗能够降低子叶节外植体的褐化程度,从而提高了子叶节丛生芽数。

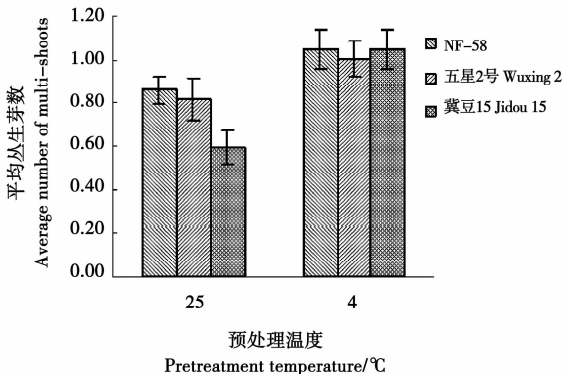


图 2 预处理温度对子叶节平均丛生芽的影响

Fig. 2 Effect of pretreatment temperature on average number of multiple shoots

2.1.3 超声波处理时间对大豆子叶节平均丛生芽数的影响 超声波处理后的子叶节侵染后,培养 20 d 后统计外植体平均丛生芽数,发现随着超声波作用时间的延长,子叶节平均丛生芽数呈现出先升高后下降的趋势,不同品种间在相同的超声波处理时间存在差异(图 3),但供试的 3 个品种均在超声波处理 30 s 条件下平均丛生芽数达到最高,其中 NF-58 为 2.26 个,冀豆 15 和五星 2 号均为 1.98 个。

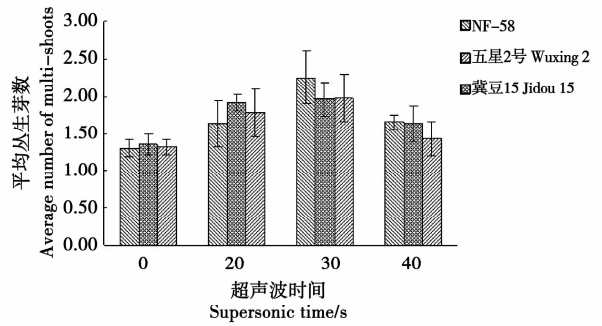


图 3 不同超声波处理时间对子叶节平均丛生芽的影响

Fig. 3 Effect of different supersonic time on average number of multiple shoots

2.1.4 抗氧化剂对大豆子叶节平均丛生芽数的影响 大豆中含有的多酚氧化酶和过氧化氢酶在遇到病原体侵染或物理损伤时,易造成外植体伤口的褐化和坏死,因而对农杆菌的侵染有一定阻止作用,从而降低感染效率^[26-27]。本试验探讨了在共培养培养基中添加硝酸银和维生素 C 对褐化现象及其对子叶节平均丛生芽数的影响。结果显示,随着抗氧化剂浓度的递增,子叶节平均丛生芽数呈现出先升高后下降的趋势,不同品种间存在差异(图 4)。NF-58 在维生素 C 浓度为 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时平均丛生芽数最高,达到 1.30;冀豆 15 在维生素 C 浓度为 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时平均丛生芽数最高,为 1.43;五星 2 号在维生素 C 浓度为 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时平均丛生芽数最高,达到 1.80(图 4A)。而添加硝酸银时,3 个供试品种均在硝酸银浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时平均丛生芽数达到最大,分别为 1.73, 1.43 和 1.45(图 4B)。可见,在培养基中无论添加硝酸银还是维生素 C 均能够减轻褐化现象,综合考虑试剂成本及获得的丛生芽数,认为硝酸银的抗氧化性优于维生素 C,所以在后续试验中采用硝酸银作为抗氧化剂。

2.1.5 *GUS* 基因转化植株的检测 本试验获得了大量五星 2 号子叶节的转化植株,转化材料在不同阶段的生长状况见图 5。通过对再生植株不同生长阶段 *GUS* 染色检测结果表明,农杆菌侵染 30 min,共培养 5 d,在子叶节区有明显的蓝色(图 6-A);经 6-BA 诱导 20 d,筛选 7 d 后在丛生芽阶段有明显的

蓝色(图 6-B)。上述结果表明筛选一周后 T-DNA 已被转移到外植体组织中,并且 *GUS* 基因得到了

表达。

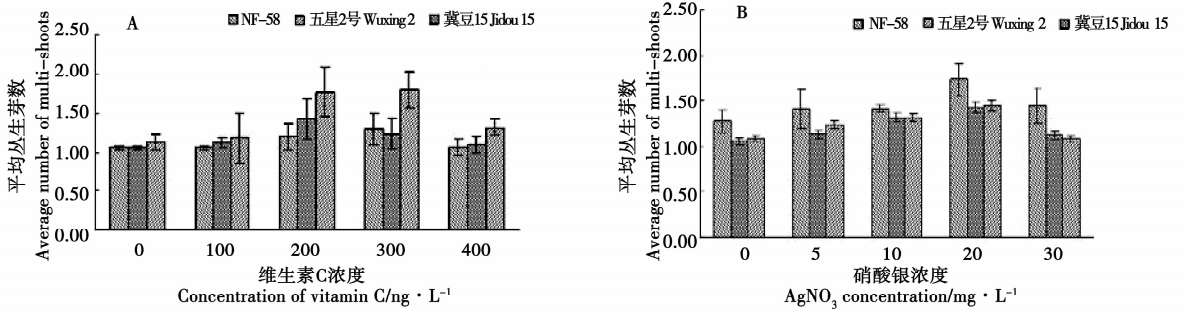
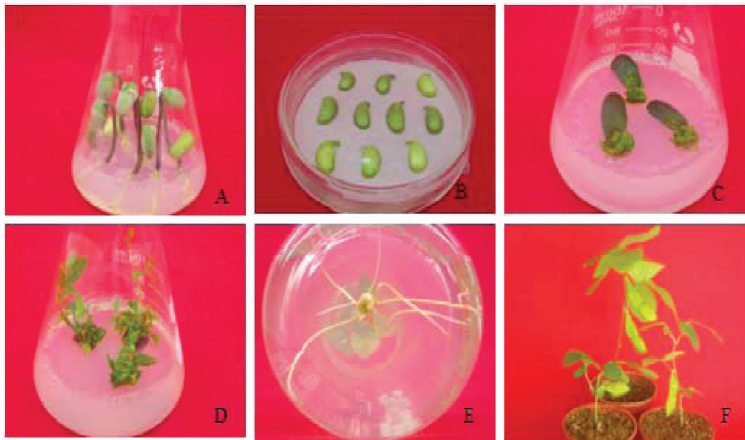


图 4 不同浓度维生素 C 和硝酸银对子叶节平均丛生芽数的影响

Fig. 4 Effect of different concentration of vitamin C and AgNO₃ on average number of multiple shoots

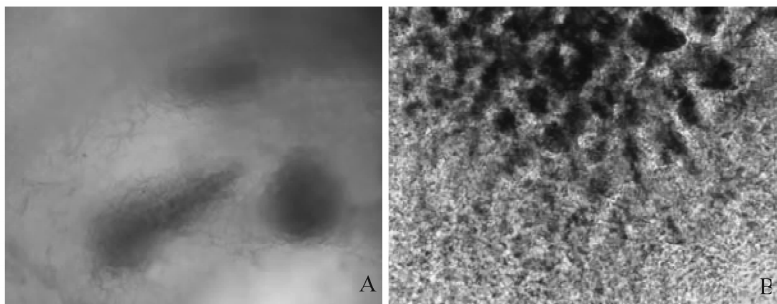


A: 萌发培养; B: 共培养; C: 丛生芽诱导; D: 丛生芽伸长; E: T₀代植株生根; F: T₀代植株结荚。

A: Seeds germinated on the GM; B: Co-culture; C: Formation of transgenic shoots from the callus; D: Shoots elongation on the SEM; E: T₀ plantlet with healthy roots growing on the rooting medium; F: T₀ generation were pod.

图 5 五星 2 号子叶节 *GUS* 基因转化获得再生植株

Fig. 5 Regenerated plants of Wuxing 2 transferred *GUS* by cotyledonary node



A: 子叶节区 40 ×; B: 丛生芽阶段 100 ×。

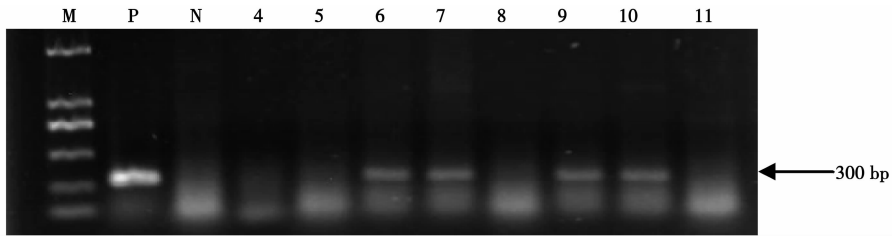
A: Cotyledonary node 40 ×; B: Multiple shoots 100 ×.

图 6 *GUS* 基因的瞬时表达

Fig. 6 Transient expression of *GUS* gene

对五星 2 号转化植株在移栽 30 d 后进行除草剂筛选,在叶片上滴注 100 mg · L⁻¹ Basta, 7 d 后进行观察,抗性植株在滴注 Basta 处出现褐斑但不扩散,而对照植株滴注 Basta 后出现大面积褐斑甚至干枯(图片略)。分别提取抗性植株和对照植株的叶片 DNA,以含有 *GUS* 报告基因的质粒为阳性对

照,以 F primer、R primer 为引物进行 PCR 扩增,经电泳检测(图 7),可以看出,阳性质粒和 4 棵再生植株在 300 bp 处均检测到特异性条带。在所检测的 130 个单株中,阳性植株 18 个,根据起始的外植体数(1 850 个)计算转化效率为 0.97%,初步证明 *GUS* 报告基因已经整合到五星 2 号大豆基因组中。



M: DNA marker(DL2000); P: 阳性对照; N: 阴性对照; 4: 加水对照; 5~11: 转化植株。

M: DNA marker(DL2000); P: Positive control; N: Negative control; 4: H₂O; 5-11: Transgenic plants.

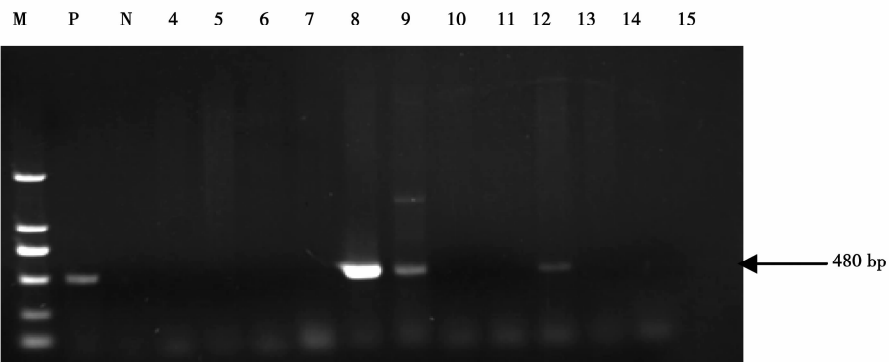
图 7 转化植株的 PCR 检测

Fig. 7 Detection of transgenic plants by PCR

2.2 *AtNHX5* 基因的大豆子叶节遗传转化

2.2.1 *AtNHX5* 基因转化植株的 PCR 及 RT-PCR 检测 利用上述优化的转化体系对五星 2 号进行 *AtNHX5* 的遗传转化,经除草剂筛选后取抗性植株及未转化植株叶片提取总 DNA,以含有 *AtNHX5* 基因的质粒为阳性对照,以 F primer X、R primer ZX 为引物进行 PCR 扩增,经电泳检测(图 8),可以看出,阳性质粒和 3 棵再生植株在 480 bp 处均检测到清晰

特异性条带。在所检测的 180 个单株中,阳性植株 8 个,根据起始的外植体数(3 443)计算转化效率为 0.23%。在此基础上,以 PCR 显示阳性的转化植株为试验材料进行转录水平的分子检测,RT-PCR 结果显示(图 9),阳性对照及 3 棵转化植株中均检测到特异性条带(片段大小为 480 bp),证明外源基因已经稳定整合到大豆基因组中,并已在转录水平表达。



M: DNA marker(DL2000); P: 阳性对照; N: 阴性对照; 4: 加水对照; 5~15: 转化植株。

M: M: DNA marker(DL2000); P: Positive control; N: Negative control; 4: H₂O; 5~15: Transgenic plants.

图 8 T₀ 代转化植株的 PCR 检测

Fig. 8 Detection of T₀ transgenic plants by PCR

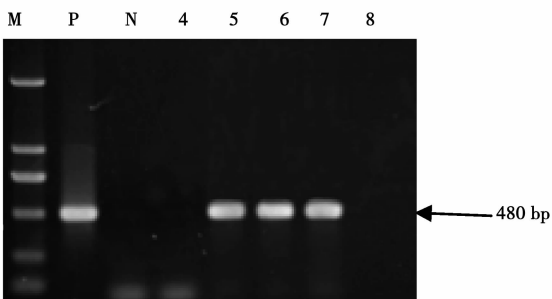


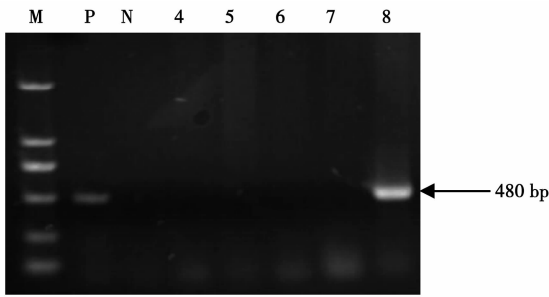
图 9 T₀ 代转化植株的 RT-PCR 检测

Fig. 9 Detection of T₀ transgenic plants by RT-PCR

2.2.2 *AtNHX5* 基因转化植株 T₁ 代幼苗的除草剂筛选及 PCR 检测 按照 2.1.5 的方法对 PCR 及 RT-PCR 检测均为阳性的五星 2 号 T₀ 后代即 T₁ 代幼苗进行除草剂筛选,分别提取抗性植株及未转化对

照植株的叶片 DNA,以含有 *AtNHX5* 基因的质粒为阳性对照进行 PCR 扩增,经电泳检测可以看出(图 10),阳性质粒和 1 棵再生植株在 480 bp 处均检测到清晰特异性条带,初步证明获得了转 *AtNHX5* 基因的 T₁ 代转化植株。

2.2.3 *AtNHX5* 基因转化植株 T₁ 代幼苗耐盐性检测 经除草剂筛选及 PCR 检测均为阳性的转 *AtNHX5* 的五星 2 号 T₁ 代幼苗,在温室培养 30 d 后,经 200 mmol·L⁻¹ NaCl 胁迫 10 d,恢复正常浇水 7 d,进行形态观察。发现 PCR 检测为阳性的 8 号转化植株仍然能够正常生长(图 11A),而对照植株叶片已经枯黄(图 11B)。初步证明,转 *AtNHX5* 基因的五星 2 号 T₁ 代植株与对照相比明显具有一定的抗盐性。



M: DNA marker (DL2000); P: 阳性对照; N: 阴性对照; 4: 加水对照; 5~8: 转化植株。

M: DNA marker (DL2000); P: Positive control; N: Negative control; 4: H₂O; 5-8: Transgenic plants.

图 10 T₁ 代转化植株的 PCR 检测

Fig. 10 Detection of T₁ transgenic plants by PCR



A: 五星 2 号 T₁ 代阳性 8 号; B: 对照。

A: Wuxing 2 T₁-8; B: Control.

图 11 转 *AtNHX5* 基因 T₁ 代幼苗耐盐性检测

Fig. 11 The salt-tolerance of T₁ transgenic seeding with *AtNHX5*

3 结论与讨论

超声波介导的农杆菌转化法可以有效提高植物遗传转化效率^[19-20], 目前已经广泛应用于多种植物的遗传转化^[21-23], 且能够辅助转化不同植物组织等。有研究表明, 高强度的超声波可导致细胞破碎和酶失活, 而适当的超声波处理强度和處理时间, 细胞自身能修复细胞壁和细胞膜的损伤, 所以不影响细胞的生物活性^[24]。因此, 针对不同的材料寻找超声波处理的最佳时间是提高转化效率的关键。刘莉莉^[25]在新红星苹果的遗传转化中, 超声波处理的最佳时间为 40 s; 而在水稻中最佳处理时间则为 3 min。本研究对 3 个河北省推广大豆品种叶节进

行了超声波处理, 发现在大豆子叶节遗传转化中超声波处理 30 s 较为适宜。

大豆遇到病原体侵染或物理损伤时, 由于自身含有较多的多酚氧化酶和过氧化氢酶使得酚类化合物会被氧化而产生一种深褐色的聚合物, 进而造成伤口的褐化和坏死, 从而阻止农杆菌的侵染, 降低感染率^[26-27]。因此, 在大豆遗传转化过程中常通过添加不同的抗氧化剂来降低外植体的褐化程度, 从而提高转化效率。王昌陵等^[26]2008 年指出抗氧化剂的使用可以促进大豆子叶节的转化和再生效果, 并证明硝酸银及维生素 C 对大豆褐化的抑制作用明显, 分别为 18.9%、21.1%。刘金华等^[27]在研究中发现, 在培养基中附加 AgNO₃ 可有效抑制乙烯的形成, 减少或消除乙烯对细胞生长的不利影响, 促进大豆子叶节丛生芽的分化。本试验结果也表明, 维生素 C 或硝酸银作为抗氧化剂, 均能提高 3 个供试品种的子叶节丛生芽数, 同时也减轻了外植体的褐化程度。

温度对组织褐变的影响从酶促反应角度看, 其根本原因是植物体内酶活性和温度直接相关^[28]。罗丽华等^[28]发现板栗在温度较低的情况下褐变明显减轻。本试验以 4℃ 预处理的大豆子叶节为外植体, 很好地抑制了褐化现象的发生, 降低了大豆外植体的褐化程度。另外, 大豆子叶节不定芽的再生能力和对农杆菌的感受能力也受到大豆苗龄的影响。Meyer 等^[29]在研究农杆菌转化机理时指出, 转化只发生在细胞分裂的一个较短的时期内, 因为核基因组 DNA 只有在复制时才能使外源 DNA 整合, 所以只有细胞处于分裂周期的 S 期 (DNA 合成期) 时才具有外源基因的转化能力。

本试验利用优化的大豆子叶节转化体系, 对五星 2 号进行 *AtNHX5* 基因的遗传转化, 通过 PCR、RT-PCR 检测以及 T₁ 代转化植株抗盐性检测证明 *AtNHX5* 基因整合到大豆基因组中, 且转化植株具有一定的抗盐性。但要确证目的基因的遗传稳定性, 还需要对转化材料的后代进行 RNA 水平和蛋白水平的验证, 结合田间试验分析转基因株系对盐碱等逆境环境的耐受性, 同时进行相关农艺性状的分析, 以确保所获得植株为转 *AtNHX5* 基因的抗逆大豆新品系, 为培育优质抗盐大豆新种质提供新材料。

参考文献

- [1] Stacey G, Vodkin L, Parrott W A, et al. National science foundation-sponsored workshop report. Draft plan for soybean genomics [J]. *Plant Physiology*, 2004, 135 (1): 59-70.
- [2] Cho H J, Widholm J M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated

- transformation of the legume *Astragalus sinicus* using kanamycin resistance selection and green fluorescent protein expression[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2002, 69 (3) : 251-258.
- [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] Trick H N, Finer J J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max* [L.] Merrill) embryogenic suspension culture tissue[J]. *Plant Cell Report*, 1998, 17 : 482-488.
- [5] 李海燕, 刘森, 武小霞, 等. 大豆转化过程中的褐化现象研究[J]. *作物杂志*, 2010(1): 33-35. (Li H Y, Liu M, Wu X X, et al. Study on the browning during soybean transformation[J]. *Crops*, 2010(1): 33-35.
- [6] Blumwald E. Sodium transport and salt tolerance in plants[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2000, 12 (4) : 431-434.
- [7] Li T X, Zhang Y, Zhang H X, et al. Stable expression of *Arabidopsis* vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene *AtNHX1*, and salt tolerance in transgenic soybean for over six generations[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2010, 55 (12) : 1127-1134.
- [8] Trieu A T, Burleigh S H. Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium* [J]. *The Plant Journal*, 2000, 22 (6) : 531-541.
- [9] Liu H, Wang Q, Yu M, et al. Transgenic salt-tolerant sugar beet constitutively expressing an *Arabidopsis thaliana* vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene, *AtNHX3*, accumulates more soluble sugar but less salt in storage roots[J]. *Plant Cell Environment*, 2008, 31 (9) : 1325-1334.
- [10] Li M, Li Y, Li H Q, et al. Over expression of *AtNHX5* improves tolerance to both salt and drought stress in *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent[J]. *Tree Physiology*, 2011, 31(3) : 349-357.
- [11] Shuji Y, Francisco J, Beatriz C, et al. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na^+/H^+ antiporters in the salt stress response[J]. *The Plant Journal*, 2002, 30 (5) : 529-539.
- [12] Olhoft P M, Fligel L E, Donovan C M. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method[J]. *Planta*, 2003, 216: 723-735.
- [13] Tang W, Ross W, Ron S. Advances on genetic transformation in conifers[J]. *Developmental and Reproductive Biology*, 2001, 10: 77-85.
- [14] Devi M K, Sakthivela G, Giridhar P. Protocol for augmented shoot organogenesis in selected variety of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2012, 50(10) : 729-734.
- [15] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system[J]. *Plant Molecular Biology*, 1987, 5(4) : 387-405.
- [16] 于娅, 刘莉莎, 赵永钦, 等. 影响花椰菜农杆菌介导转化因素的研究[J]. *植物遗传资源学报*, 2010, 11(3) : 320-325. (Yu Y, Liu L S, Zhao Y Q, et al. A study on the factors affecting the *Agrobacterium*-mediated transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2010, 11(3) : 320-325.
- [17] 李丹丹, 张洁, 刘娜, 等. 农杆菌介导的大豆子叶节非组织培养遗传转化体系优化[J]. *植物遗传资源学报*, 2012, 13, (5) : 789-797. (Li D D, Zhang J, Liu N, et al. Optimization of the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation system of soybean cotyledonary node with non tissue-culture [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2012, 13(5) : 789-797.
- [18] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002 : 744. (Wang G L, Fang H J. *Plant gene engineering* [M]. Beijing: Science Press, 2002 : 744.
- [19] Santarém E R, Trick H N, Finer J J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: Optimization of transient expression[J]. *Plant Cell Report*, 1998, 17: 752-759.
- [20] Trick H N, Finer J J. SAAT: Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. *Transgenic Research*, 1997, 6(5) : 329-336.
- [21] Hussain S S, Hussain T. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation (SAAT): An alternative method for cotton transformation [J]. *Pakistan Journal of Botany*, 2007, 39 (1) : 223-230.
- [22] Febres V J, Costa M G. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus via sonication and vacuum infiltration[J]. *Plant Cell Report*, 2009, 28 (3) : 387-395.
- [23] Flores Solís J I, Mlejnek P, Studená K S. Application of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation in *Chenopodium rubrum* L. [J]. *Plant Soil Environment*, 2003, 49 (6) : 255-260.
- [24] Joersbo M, Brunstedt J. Sonication: A new method for gene transfer to plants[J]. *Physiologia Plantarum*, 1992, 85: 230-234.
- [25] 刘莉莉, 刘丹, 丛郁, 等. 超声波辅助对农杆菌介导新红星苹果遗传转化 *GUS* 基因瞬间表达的影响[J]. *江苏农业学报*, 2008, 24 (2) : 213-215. (Liu L L, Liu D, Cong Y, et al. Effects of sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation instantaneous expression of *GUS* gene in Xinhongxing apple during genetic transformation[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2008, 24(2) : 213-215.
- [26] 王昌陵, 赵军, 李英慧, 等. 转录因子 ABP9 转化大豆 [*Glycine max* (L.) Merrill] 及遗传转化条件优化[J]. *中国农业科学*, 2008, 41 (7) : 1908-1916. (Wang C L, Zhao J, Li Y H, et al. Transforming transcription factor ABP9 into soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] and optimization of the transformation system [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(7) : 1908-1916.
- [27] 刘金华, 王丕武, 吴丽敏, 等. 脯氨酸、硝酸银对农杆菌转化大豆的影响[J]. *大豆科学*, 2003, 22 (1) : 36-39. (Liu J H, Wang P W, Wu L M, et al. Effect of proline and AgNO_3 on *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [J]. *Soybean Science*, 2003, 22(1) : 36-39.)
- [28] 罗丽华, 陈建华, 苏冬梅, 等. 板栗组培过程中褐变研究初探[J]. *经济林研究*, 2003, 21(4) : 30-31. (Luo L H, Chen J H, Su D M, et al. Primary study on the browning of chestnut in plant tissue culture[J]. *Economic Forest Researches*, 2003, 21(4) : 30-31.
- [29] Meyer P. Repeat induced gene silencing: Common mechanisms in plants and fungi[J]. *Biology Chemistry Hoppe Seyler*, 1996, 377 (2) : 87-95.