

## 农杆菌介导大豆子叶节遗传转化体系的优化

翟锐, 高乐, 丁雪妮, 廖文林, 郑明洁, 陆智文, 智海剑

(南京农业大学大豆研究所/国家大豆改良中心/作物遗传与种质创新国家重点实验室/农业部大豆生物学与遗传育种重点实验室, 江苏南京 210095)

**摘要:**利用农杆菌菌株 EHA105, 对 17 个栽培大豆品种的大豆子叶节进行了侵染, 从大豆基因型、氯气灭菌时间、外植体状态、菌株活力、侵染浓度、侵染时间、共培养时间等方面进行了优化。结果表明: 氯气灭菌 14 ~ 18 h, 可在不影响大豆种子活力的同时最大限度的减少污染; 暗处理 1 d 的外植体活力高于光照处理 5 ~ 7 d 的外植体; 菌液浓度 ( $OD_{600nm}$ ) 在 0.8 ~ 1.0 且侵染浓度 ( $OD_{600nm}$ ) 为 0.6 ~ 0.8 时 GUS 瞬时表达率最高; 适宜的侵染时间和共培养天数分别为 30 min 和 4 d。在上述优化研究基础上, 形成一套综合的转基因体系, 该体系的最高转化率可达 3.33%。不同处理下的 GUS 瞬时表达率以及 17 个大豆品种的丛生芽诱导率综合评价显示, 适宜转化的基因型为 TL-1、HC-3、HC-6、Williams 82。

**关键词:**大豆; 子叶节; 农杆菌中文; 转基因体系优化

**中图分类号:** S565.1      **文献标识码:** A      **DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2015.05.0768

## Optimization of Cotyledonary-node *Agrobacterium*-mediated Soybean Transformation System

ZHAI Rui, GAO Le, DING Xue-ni, LIAO Wen-lin, ZHENG Ming-jie, LU Zhi-wen, ZHI Hai-jian

(Soybean Research Institute of Nanjing Agricultural University/National Center for Soybean Improvement/National Key Laboratory for Crop Genetics and Germplasm Enhancement/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Soybean, Ministry of Agriculture, P. R. China, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** In the present study, cotyledon nodes obtained from 17 soybean cultivars were infected with *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. Subsequently, we optimized the soybean genotype, chlorine sterilization time, explant state, vitality of bacterial strain, concentration of infection liquid, infection time and co-cultivation time. As a result, when the chlorine sterilization time was 14-18 h, the minimal pollution and the highest seed vigor was observed. The vitality of overnight-treated explants in the dark were better than those germinated in the light for 5-7 d. The highest GUS transient rate was achieved when the bacterial concentration at  $OD_{600nm}$  was 0.8-1.0 and the infection liquid at  $OD_{600nm}$  was 0.6-0.8. We also found that the best infection and co-cultivation time were 30 min and 4 d, respectively. Based on the above optimized research, we established a comprehensive transgenic system which resulted in the maximum transformation efficiency of 3.33%. For the comprehensive evaluation about the transient GUS expression under different treatments and the shoot induction rate of 17 soybean varieties, TL-1, HC-3, HC-6 and Williams 82 were the ideal genotypes for transformation.

**Keywords:** Soybean; Cotyledonary-node; *Agrobacterium tumefaciens*; Optimization

大豆原产于中国,是我国重要的油料和粮食作物。随着人们对大豆及大豆制品需求的增加,向栽培大豆品种中引入有益基因从而提高大豆产量、抗性和品质变得十分必要。大豆转基因技术成为实现这一目标的重要途径。目前,常用的大豆转基因方法主要有基因枪轰击未成熟种子的分生组织<sup>[1]</sup>、胚悬浮组织<sup>[2]</sup>、原生质体<sup>[3]</sup>等和农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导大豆子叶节<sup>[4-9]</sup>、未成熟子叶<sup>[10]</sup>、体细胞胚<sup>[11]</sup>、愈伤组织<sup>[12]</sup>、下胚轴<sup>[13]</sup>、根毛<sup>[14]</sup>等组织。

由于农杆菌介导法具有成本低、转基因后代外源基因拷贝数少、遗传稳定等优点而逐渐成为目前遗传转化的主流方法。自从 Hinchee 等<sup>[15]</sup>首次利

用农杆菌介导大豆子叶节的方法获得了大豆转基因植株以来,许多科研人员都对此体系进行了优化。Olhoft 等<sup>[6-7]</sup>以萌发 5 ~ 7 d 的大豆子叶节为外植体,通过在共培养基中添加 L-半胱氨酸(L-Cysteine)、铜铁螯合物(copper and iron chelators)等硫醇化合物(thiol compounds),利用潮霉素(hygromycin B)筛选系统<sup>[16]</sup>将平均转化率提高到了 16.4%。Meurer 等<sup>[17]</sup>使用 3 种不同的农杆菌对 25 个大豆基因型的易感性进行了检测,发现 KYRT1 菌株对多种大豆品种的侵染性最高,尤其是 Jack、Peking 等品种,GUS 瞬时表达率最高可达 18.3%。武小霞等<sup>[18]</sup>也利用农杆菌 LBA4404 介导 7 个大豆品种,通过对抗性丛生芽再生率评价,从中筛选出了黑农

收稿日期:2014-11-26

基金项目:转基因专项(2008ZX08004-004);国家自然科学基金(31171574,31101164);现代农业产业技术体系(CARS-004)。

第一作者简介:翟锐(1987-),女,硕士,主要从事转基因大豆抗病品种培育。E-mail: 2012101166@njau.edu.cn。

通讯作者:智海剑(1957-),男,教授,博导,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: zhj@njau.edu.cn。

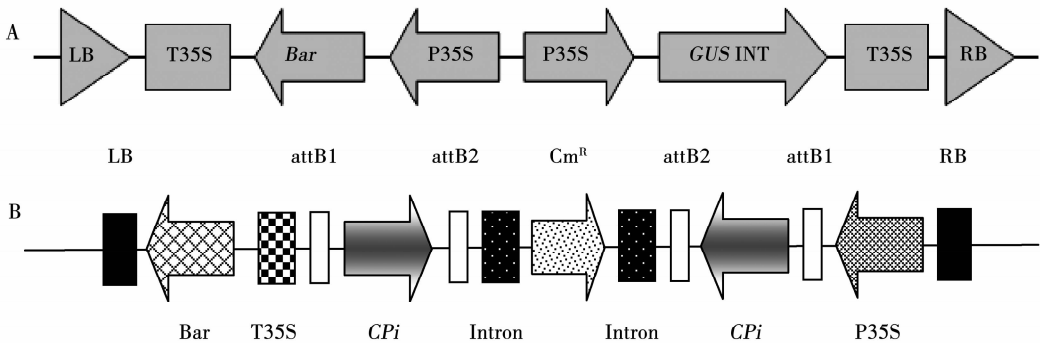
35、绥农 14、合丰 35 等易转化受体品种。

本研究以大豆子叶节为外植体,对氯气灭菌时间、外植体状态、菌株活力、侵染浓度、侵染时间、共培养时间等因素进行系统的研究,对不同处理下的 GUS 瞬时表达率以及 17 个大豆品种的丛生芽诱导率进行了综合评价,以期从中筛选出适合农杆菌介导大豆子叶节遗传转化体系的易感基因型和高再生基因型,进而对农杆菌介导大豆子叶节遗传转化体系的改进进行有益探索。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试材料 所用受体品种黑农 35、黑农 37、吉



A: pCambia3301 图谱; B: 重组质粒 pB7GWIWG2(II) - Cpi 结构图。

A: The map of pCambia3301; B: Construct map of recombinant plasmid pB7GWIWG2(II) - Cpi.

图 1 pCambia3301 和 pB7GWIWG2(II) - Cpi 图谱

Fig. 1 The map of pCambia3301 and pB7GWIWG2(II) - Cpi

### 1.2 方法

1.2.1 氯气灭菌时间的确定 将供试 17 个大豆品种发育饱满的种子置于密闭干燥器中,向密闭干燥器中的 100 mL 次氯酸钠中缓慢加入 3.5 mL 浓盐酸<sup>[19]</sup>,灭菌时间设置为 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 h 共计 13 个时间段。灭菌后的种子接种于萌发培养基(germination medium, GM),种子萌发 6 d 后统计萌发率和污染率。

1.2.2 外植体的制备 将灭菌的大豆种子(黑农 35、黑农 37、吉育 35、吉林 30)接种于 GM 培养基,在 25℃ 恒温组培室中进行如下处理:1. 黑暗条件培养 24 h 后,去掉种皮并用手术刀片沿着子叶轴纵向切开,并在子叶节节点区域划伤 10 次(图 2A),侵染浓度( $OD_{600nm}$ )为 0.6~0.8 条件下侵染 30 min;2. 光照周期 18 h/6 h 条件下萌发 5~7 d,保留 3~5 mm 下胚轴,将 2 片子叶分开并去除顶芽和腋芽,之后用上述相同的方法对外植体进行划伤以及侵染(图 2B)。完成侵染后,在共培养培养基(Co-culture medium, CCM)中共培养 3 d。

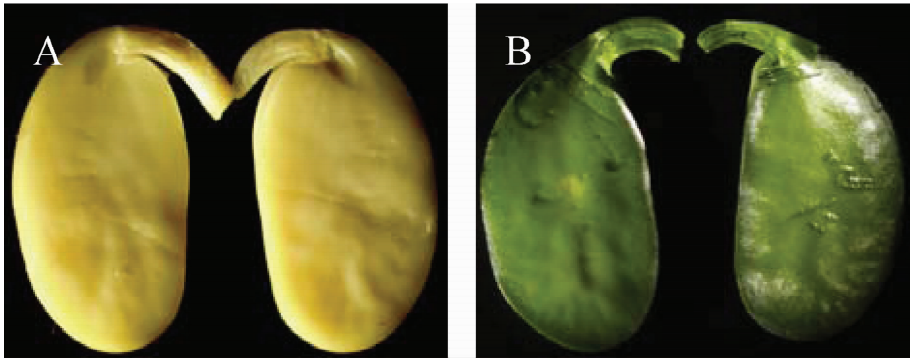
育 35、吉林 30、合丰 25、合丰 35、合丰 39、Jack、猴子毛、88-1、88-31、99-6、TL-1、HC-3、HC-6、68 号、Williams82 均由南京农业大学国家大豆改良中心提供。

1.1.2 菌株与质粒 根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105、植物表达载体 pCAMBIA3301、干扰表达载体 pB7GWIWG2(II) - Cpi(图 1)由本实验室保存。

1.1.3 主要试剂 培养基基础成份、抗生素、植物激素、添加剂等均购自美国 Phyto Tech 和 Sigma 公司;GUS 染色实验相关试剂购自南京寿德试验器材有限公司和国药集团化学试剂有限公司;2 × Taq Master Mix 购自南京博尔迪生物科技有限公司;DNA Marker 购自 TAKARA 公司。

1.2.3 最佳菌液浓度和侵染浓度的筛选 以萌发 1 d 的种子(TL-1、HC-6、Williams 82、Jack)为外植体材料,挑取含有质粒 pCambia3301 的单克隆于含有 50 mg·L<sup>-1</sup> 卡那霉素(kanamycin, Kan)和 25 mg·L<sup>-1</sup> 利福平(rifampicin, Rif)的液体 YEB 培养基中过夜培养(28℃, 200 r·min<sup>-1</sup>),之后取 200 μL 上述菌液加入 200 mL YEB 培养基中,相同条件下培养至  $OD_{600nm} = 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.5$  共 6 个梯度。4 000 r·min<sup>-1</sup>、4℃ 离心 10 min,收集菌体后用液体共培养培养基(liquid co-culture medium, LCCM)进行重悬至  $OD_{600nm} = 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2$  共 6 个梯度,共 36 种组合对上述外植体进行侵染,侵染时间 30 min, 25℃ 下共培养 3 d 后进行 GUS 染色。

1.2.4 最佳侵染时间的筛选 以合丰 25、合丰 35、猴子毛、88-31 为受体品种,各取 50 粒灭菌种子接种至 GM 培养基萌发 1 d,将菌液浓度和侵染浓度分别控制在  $OD_{600nm} = 0.8 \sim 1.0$ 、 $OD_{600nm} = 0.6 \sim 0.8$ ,侵染时间设定为 15, 30, 45, 60 min 共 4 个时间段,共培养 3 d 后进行 GUS 染色。



A: 暗培养 1 d 的子叶外植体; B: 光培养 5~7 d 的子叶外植体。

A: The cotyledon explants germinated for 1 d in the dark; B: The cotyledon explants germinated for 5-7 d in the light.

图2 外植体状态

Fig.2 The state of explants

1.2.5 最佳共培养天数的筛选 以 HC-3、88-31、99-6、68 号为受体品种,各取 150 粒种子接种到 GM 培养基上过夜处理,将菌液浓度和侵染浓度分别调整为  $OD_{600nm} = 0.8 \sim 1.0$ 、 $OD_{600nm} = 0.6 \sim 0.8$ , 侵染 30 min 后,共培养时间设定为 1,2,3,4,5 d 共 5 个时间段,之后进行 GUS 染色。

1.2.6 易感基因型和高再生基因型的筛选 以 17 个大豆品种为对象,在上述优化体系下进行如下实验:各取 100 粒无菌种子进行转化试验,共培养 4 d 后随机取 100 个外植体进行 GUS 瞬时表达率的统计,作为易感基因型。剩余的 100 个外植体接种到不含抗生素的芽诱导培养基 (shoot induction medium, SIM) 进行 14 d 延迟筛选,之后转入含有 Kan ( $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的 SIM 中进行培养,14 d 后统计丛生芽诱导率。

1.2.7 GUS 组织学检测 GUS 染液参照 Jefferson 等<sup>[20]</sup>的配方,具体做法如下:将共培养后的外植体的子叶切除一半,将剩余的外植体用纯水清洗 3 次,加入 GUS 染色液 ( $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸缓冲液 pH7.0,  $\text{Na}_2\text{EDTA} 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] 40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] 40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , Triton X-100 0.5%, 甲醇 20%, X-Gluc (BBI, 优级纯)  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 将共培养后的外植体完全浸没,避光条件下  $37^\circ\text{C}$  恒温反应过夜,反应结束后去掉染色液,用纯水清洗外植体 1 次,加入脱色液 (70% 乙醇:冰醋酸 = 9:1) 进行脱色反应,每 6 h 更换一次,脱色 3 次后实体显微镜下观察并统计 GUS 染色情况,计算 GUS 瞬时表达率。以上试验均设置 3 次重复。

1.2.8 遗传转化与  $T_0$  代转基因植株的检测 依据 Song 等<sup>[21]</sup>的转化方法,使用载体 pB7GWIWG2 (II)-*CPi*<sup>[22]</sup> 对大豆栽培品种 HC-6 进行遗传转化实验,并使用引物 *CPi*-F 和 *CPi*-R、*Bar*-F 和 *Bar*-R 对

转化植株进行 PCR 检测。25  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系与反应程序均参照高乐等<sup>[22]</sup>的实验方法,并使用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 检测结果进行观察。

1.2.9 数据分析 采用 Excel 2003 和 SigmaPlot 10.0 对种子萌发率、GUS 瞬时表达率、丛生芽诱导率进行统计和作图,利用 R 语言进行方差分析和显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 氯气灭菌对污染率及种子萌发率的影响

延长氯气灭菌的时间,污染率会大幅度下降,但种子的萌发率也会因受到氯气的伤害而降低<sup>[8]</sup>。因此,在保证无菌的情况下,通过合理控制氯气灭菌的时间来保持种子活力,可以有效地提高大豆转基因的效率。以大豆品种 HC-6 为例(图 3):随着灭菌时间的增加,其污染率大幅降低,同时萌发率显著升高;当灭菌时间超过一定时间后,萌发率逐渐下降。因此,HC-6 的最佳灭菌时间为 18 h,此时萌发率高达 93.5%,污染率为 0(图 3)。其余品种也表现出类似的规律,但不同基因型的最佳氯气灭菌时间略有不同。综上所述,本研究所用 17 个大豆基因型的最佳灭菌时间范围为 14~18 h(表 1)。

### 2.2 不同外植体的 GUS 瞬时表达率

对于过夜处理的外植体与萌发 5~7 d 的外植体来说,由于所处的分化分裂时期不同,对农杆菌的敏感程度也有所不同,这与后期丛生芽再生率有很大关系<sup>[23]</sup>。本试验对黑农 35、黑农 37、吉育 35、吉林 30 的两种外植体类型进行了 GUS 瞬时表达率的研究。差异显著性分析表明:4 个基因型中,过夜处理的外植体 GUS 染色率范围为 35.8%~63.6%;萌发 5~7 d 的范围为 30.7%~51.7%。因此,黑暗处理 1 d 外植体的 GUS 瞬时表达率极显著优于萌发

5~7 d 的外植体(表 2)。

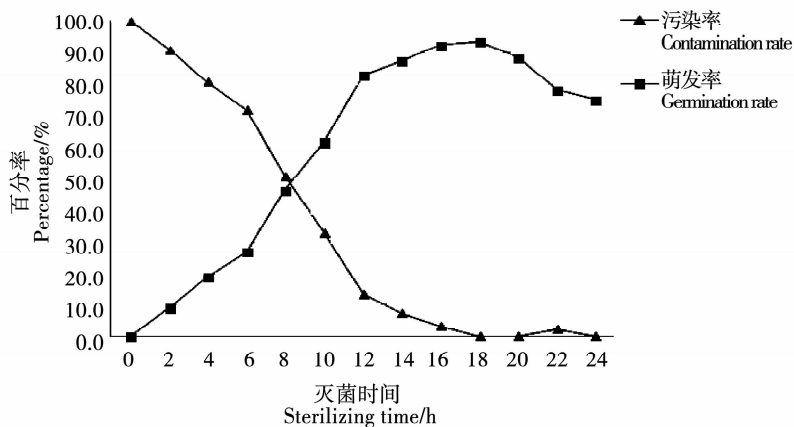


图 3 HC-6 品种在不同时间下的污染率和萌发率

Fig. 3 The contamination rate and germination rate of HC-6 under different time

表 1 不同基因型的最佳灭菌时间

Table 1 The optimization sterilizing time of different genotypes

基因型 Genotype	最佳灭菌时间 Sterilization time/h	污染率 Contamination rate/%	萌发率 Germination rate/%	基因型 Genotype	最佳灭菌时间 Sterilization time/h	污染率 Contamination rate/%	萌发率 Germination rate/%
TL-1	16	0.0	96.6	黑农 37 Heinong 37	14	0.0	93.8
HC-3	18	0.0	94.1	吉林 30 Jilin 30	14	3.1	81.3
HC-6	18	0.0	93.5	吉育 35 Jiyu 35	14	0.0	80.2
68 号 No. 68	16	0.0	85.0	88-31	14	3.5	89.4
Williams 82	14	0.0	96.7	99-6	18	0.0	87.5
Jack	18	7.2	82.7	合丰 25 Hefeng 25	16	0.0	77.9
88-1	16	2.6	81.8	合丰 35 Hefeng 35	16	0.0	77.1
猴子毛 Houzimaao	16	3.7	87.7	合丰 39 Hefeng 39	16	1.7	79.3
黑农 35 Heinong 35	18	0.0	88.5				

表 2 不同外植体类型的 GUS 瞬时表达率

Table 2 The GUS expression frequency of different explants

基因型 Genotypes	外植体类型 Explants type	外植体个数 The number of explants	GUS <sup>+</sup> 总数 The number of GUS <sup>+</sup>	GUS 瞬时表达率 Frequency of GUS expression/%	显著性 Significance	
					0.05	0.01
黑农 35	1 d	40	23	57.5	a	A
Heinong 35	5~7 d	58	30	51.7	b	B
黑农 37	1 d	44	28	63.6	a	A
Heinong 37	5~7 d	54	27	50.0	b	B
吉育 35	1 d	50	23	46.0	a	A
Jiyu 35	5~7 d	43	15	34.9	b	B
吉林 30	1 d	53	19	35.8	a	A
Jilin 30	5~7 d	75	23	30.7	b	B

### 2.3 菌液浓度与侵染浓度对 *GUS* 瞬时表达率的影响

农杆菌 EHA105 在培养过程中的生长曲线呈“S”状,且在对数期活力最高、侵染能力最强。对4个大豆品种进行不同组合(菌液浓度×侵染浓度)的侵染,共培养3 d后统计 *GUS* 瞬时表达率。结果发现:在菌液浓度  $OD_{600nm} = 0.8 \sim 1.0$ 、侵染浓度  $OD_{600nm} = 0.6 \sim 0.8$  时 *GUS* 瞬时表达率最高,在

71.9%~84.6%(图4,以 TL-1 为例)。

### 2.4 最佳侵染时间的确定

对合丰25、合丰35、猴子毛、88-31的种子进行过夜处理并制备外植体,完成侵染后共培养3 d并进行 *GUS* 染色,结果表明当侵染时间为30 min时, *GUS* 瞬时表达率最大,分别为34.1%、42.9%、53.8%、58.5%(图5)。

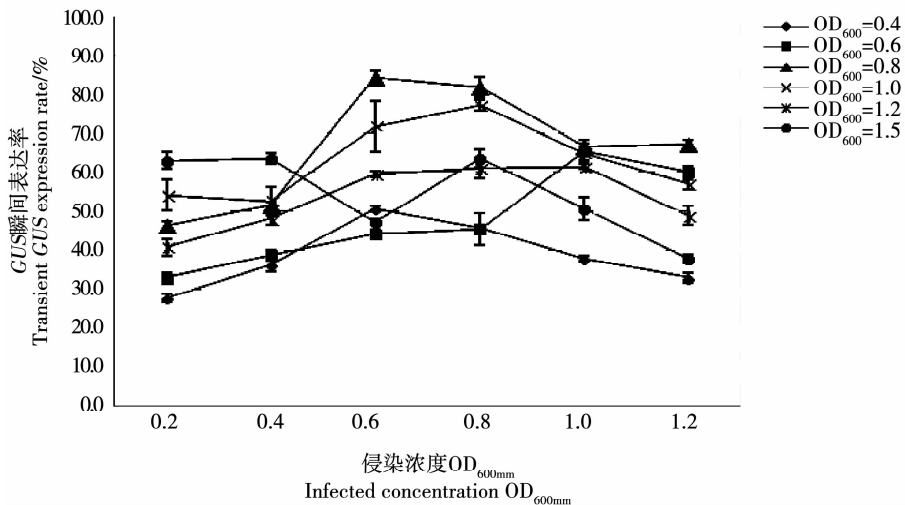


图4 TL-1品种不同组合下的 *GUS* 瞬时表达率

Fig. 4 Transient GUS expression rate with different combination under TL-1

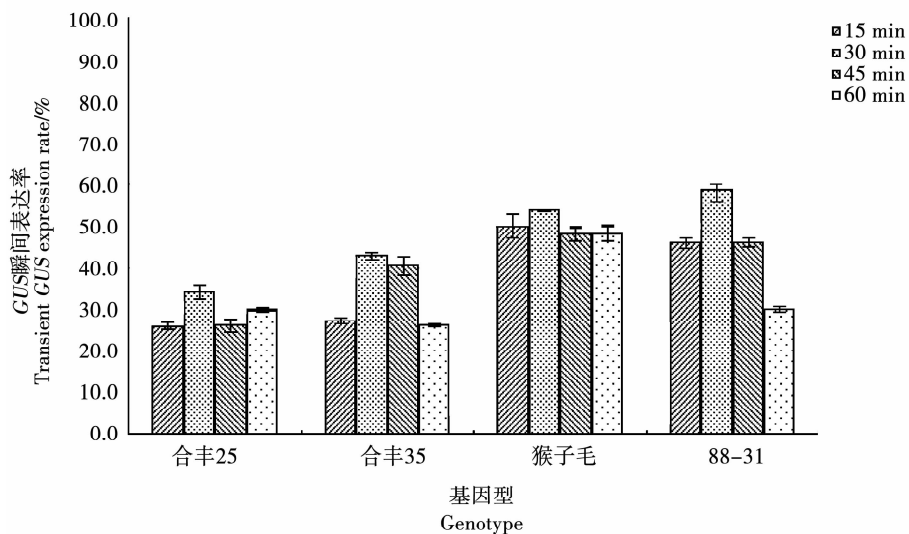


图5 不同侵染时间下的 *GUS* 瞬时表达率

Fig. 5 The transient GUS expression rate under different infection time

### 2.5 最佳共培养天数的确定

对HC-3、88-31、99-6、68号的种子进行过夜处理并制备外植体,侵染30 min后进行共培养1,2,3,4,5 d处理并进行 *GUS* 染色,结果表明当共培养天数为4 d时, *GUS* 瞬时表达率最大,分别为73.5%、60.9%、62.0%、48.9%(图6)。

### 2.6 易感基因型和高再生基因型的筛选

对供试17个大豆品种进行萌发率、*GUS* 瞬时表达率、丛生芽诱导率的调查。结果表明:Williams 82、TL-1、HC-3、黑农37、HC-6的萌发率均高于93.5%,显著高于其它品种,表明这些品种种子活力较强;HC-6、TL-1、Williams 82、Jack、HC-3的 *GUS* 瞬

时表达率均高于 73.5%, 显著优于其它品种, 表明这些品种较易被农杆菌侵染; HC-3、TL-1、88-31、Williams 82、猴子毛、黑农 37、HC-6 的丛生芽诱导率均高于 54.3%, 表明这些品种为高再生基因型(图 7)。对上述结果进行双因素方法分析结果表明:

TL-1 极显著优于其它基因型, Williams 82、HC-6、HC-3 次之, 表明这些品种既易被农杆菌侵染, 完成 T-DNA 的整合, 又有较高的丛生芽再生率, 所以该基因型为本试验理想的大豆转化的受体材料。

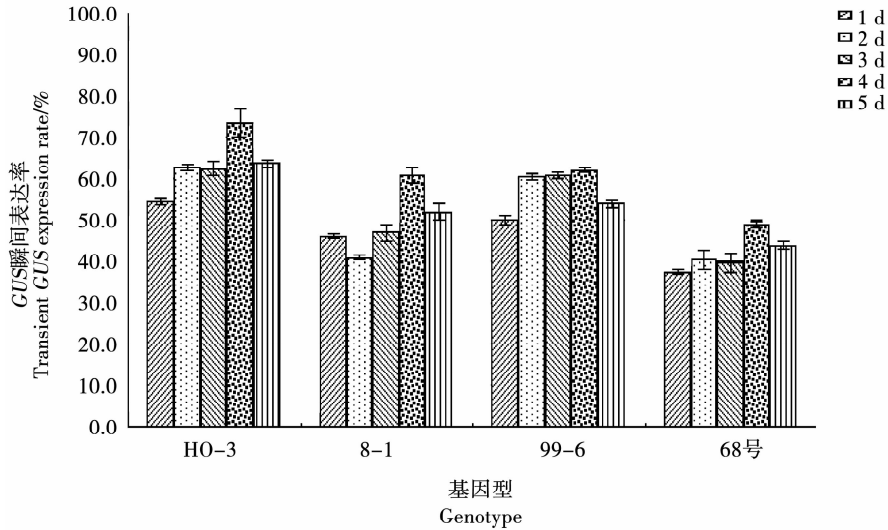


图 6 不同共培养时间的 GUS 瞬时表达率

Fig. 6 The transient GUS expression rate under different dark incubation time

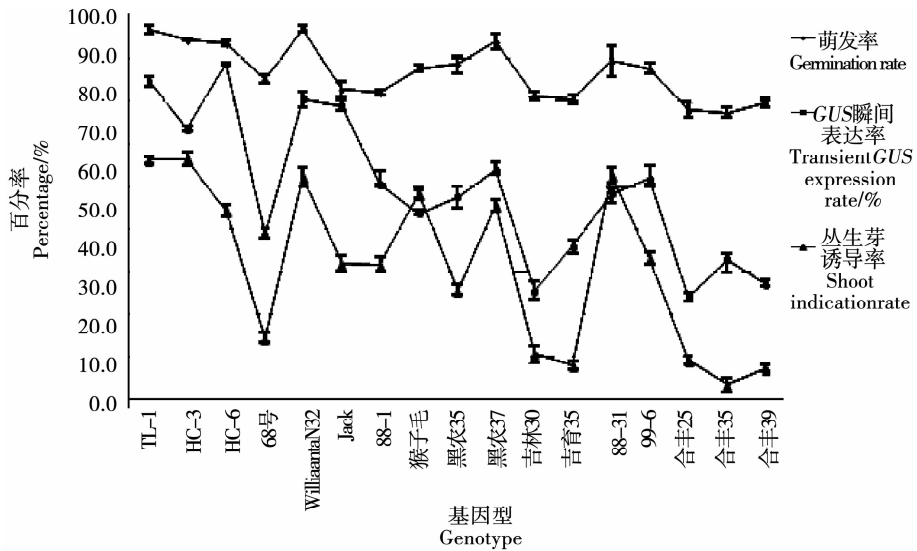


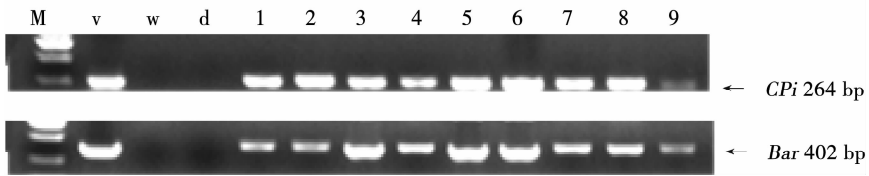
图 7 不同基因型的萌发率、GUS 瞬时表达率和丛生芽诱导率

Fig. 7 The germination rate, transient GUS expression rate and shoot indication rate of the different genotype

2.7 阳性 T<sub>0</sub>代转基因植株筛选

在氯气灭菌时间 18 h、菌液浓度 (OD<sub>600nm</sub>) 0.8 ~ 1.0 且侵染浓度 (OD<sub>600nm</sub>) 0.6 ~ 0.8、侵染时间 30 min、共培养 4 d 的优化条件下, 使用干扰载体 pB7GWIWG2 (II) -CPi 转化 HC-6 萌发 1 d 的子叶节外植体, PCR 检测 CPi 目的基因和 Bar 标记基因

分别得到 264 和 402 bp 的扩增条带(图 8), 与预期条带大小一致, 表明农杆菌 T-DNA 区域已成功插入到 HC-6 中。本试验共获得 81 棵阳性植株, 转化率介于 1.50% ~ 3.33%, 平均转化率为 2.70% (表 3)。



M:DL 2 000 Marker; v:阳性质粒; w:野生型 HC-6; d:ddH<sub>2</sub>O 空白对照; 1~9:转基因阳性植株。

M: Marker DL 2 000; v: Positive plasmid; w: Wild-type of HC-6; d: Black control of ddH<sub>2</sub>O; 1-9: Positive transgenic plants.

图8 T<sub>0</sub>代转基因大豆鉴定

Fig 8 Identification of T<sub>0</sub> transgenic soybean plants

表3 HC-6的转化率

Table 3 Transformation efficiency of HC-6

试验批次 Number	外植体个数 The number of explants	PCR <sup>+</sup> The number of PCR <sup>+</sup>	转化率 Efficiency/%
1	600	20	3.33
2	600	9	1.50
3	600	20	3.33
4	600	12	2.00
5	600	20	3.33

### 3 结论与讨论

选择合理的灭菌时间,是保持种子活力的关键。因此,在保证无菌的条件下,通过合理控制氯气灭菌的时间,可以有效地提高大豆转基因的效率。结果表明,本试验中17个不同基因型的最佳氯气灭菌时间略有不同,最佳灭菌时间为14~18 h。这可能与种子本身带菌情况、生长期、生长环境等因素有关。因此,采用上述方法进行灭菌时,应根据所选用的基因型,适当地延长或缩短灭菌时间,从而降低氯气对种子的伤害而提高大豆遗传转化效率。

良好的侵染方法和组织再生系统是大豆遗传转化的关键,决定试验的成败以及转化率的高低。因此,将高效的转化方法与适宜的基因型外植体有机地结合起来,对大豆遗传转化具有深远意义。本研究通过对比萌发5~7 d和1 d的外植体,发现暗处理1 d的外植体拥有较高的GUS瞬时表达率。虽然Olhoft等<sup>[6-7]</sup>以萌发5~7 d的大豆子叶节为外植体,利用潮霉素筛选系统将平均转化率提高到了16.4%,但后代出现嵌合体、“芽逃离”现象比较多。因此,暗培养1 d的外植体是大豆遗传转化中理想的易感受体,但后代中插入的外源基因能否稳定遗传表达以及是否存在嵌合情况将在今后的实验中进一步研究。

根癌农杆菌对子叶节的侵染以及其组织再生性都存在着很大的品种依赖性,基因型之间差异大,是限制大豆转基因技术发展的关键因素。Meurer<sup>[17]</sup>也在文章中充分阐述了农杆菌易侵染的大豆基因型并不一定就是从生芽高再生率的基因型。因此选用再生率高和对农杆菌侵染敏感的大豆品种是成功转化的前提。本试验通过比较17个大豆品种的萌发率、GUS瞬时表达率和丛生芽诱导率,得出比较适用于农杆菌介导的萌发1 d大豆子叶节转化的基因型为TL-1, Williams 82、HC-6、HC-3次之。从上述结果中发现,春大豆较之夏大豆易被农杆菌侵染并完成转化,且后代植株再生能力强,能获得更多的转化植株,其原因有待研究。

利用上述优化条件对大豆品种HC-6进行遗传转化,平均转化率为2.70%,有进一步优化大豆遗传转化体系以提高转化率的潜力。

### 参考文献

- [1] McCabe D E, Swain W F, Martinell B J, et al. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration[J]. *Nature Biotechnology*, 1988, 6(8): 923-926.
- [2] Finer J, McMullen M. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1991, 27(4): 175-182.
- [3] Nathalie D, Bernard P, Frederic G, et al. Generation of fertile transplastomic soybean[J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 55(4): 479-489.
- [4] Zhang Z, Xing A, Staswick P, et al. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean[J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1999, 56(1): 37-46.
- [5] Clemente T, La Valle B J, Howe A R, et al. Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. *Crop Science*, 2000, 40(3): 797-803.
- [6] Olhoft P M, Somers D A. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells[J]. *Plant Cell Reports*, 2001, 20(8): 706-711.
- [7] Olhoft P M, Lin K, Galbraith J, et al. The role of thiol com-

- pounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells[J]. *Plant Cell Reports*, 2001, 20(8): 731-737.
- [8] Paz M, Shou H, Guo Z, et al. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explants[J]. *Euphytica*, 2004, 136(2): 167-179.
- [9] Zeng P, Vagnais D A, Zhang Z, et al. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L) Merrill] [J]. *Plant Cell Reports*, 2004, 22(7): 478-482.
- [10] Tae-Seok Ko, Sangman Lee, Sergei Krasnyanski, et al. Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars; *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explant [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107(3): 439-447.
- [11] Santarém E R, Trick H N, Essig J S, et al. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: Optimization of transient expression [J]. *Plant Cell Reports*, 1998, 17(10): 752-759.
- [12] Hong H P, Zhang H, Olhoft P, et al. Organogenic callus as the target for plant regeneration and transformation *via Agrobacterium* in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2007, 43(6): 558-568.
- [13] Wang G L, Xu Y N. Hypocotyl-based *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max*) and application for RNA interference [J]. *Plant Cell Reports*, 2008, 27(7): 1177-1184.
- [14] Cao D, Hou W S, Song S K, et al. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean [J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2009, 96(1): 45-52.
- [15] Hinchee M A W, Connor-Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer [J]. *Nature Biotechnology*, 1988, 6(8): 915-922.
- [16] Olhoft P M, Fligel L E, Donovan C M, et al. Efficient soybean transformation using *hygromycin* B selection in the cotyledonary-node method[J]. *Planta*, 2003, 216(5): 723-735.
- [17] 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.
- [18] 武小霞, 李静, 刘伟婷, 等. 大豆农杆菌子叶节转化菌株适宜生长时期及浸染浓度的研究[J]. *东北农业大学学报*, 2010, 41(1): 1-6. (Wu X X, Li J, Liu W T, et al. Optimization study on strain cultivation period and infectious concentration on soybean cotyledonary node *via Agrobacterium*-mediated transformation system[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2010, 41(1): 1-6.)
- [19] 刘海坤, 卫志明. 一种大豆成熟种子的消毒的方法[J]. *植物生理通讯*, 2002, 38(3): 260-261. (Liu H K, Wei Z M. A method for sterilizing mature seeds of soybean[J]. *Plant Physiology Journal*, 2002, 38(3): 260-261.)
- [20] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. *GUS* fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 1987, 6(13): 3901-3907.
- [21] Song Z Y, Tian J L, Fu W Z, et al. Screening Chinese soybean genotypes for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation suitability[J]. *Journal of Zhejiang University-Sci B (Biomed & Biotechnology)*, 2013, 14(4): 289-298.
- [22] 高乐, 翟锐, 丁雪妮, 等. 大豆花叶病毒 CP 基因 RNAi 载体的构建及大豆遗传转化[J]. *植物保护学报*, 2014, 41(4): 453-460. (Gao L, Zhai R, Ding X N, et al. RNAi vector construction of soybean mosaic virus CP gene and soybean transformation[J]. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2014, 41(4): 453-460.)
- [23] 薛仁镐. 农杆菌介导大豆萌动种子遗传转化的影响因素研究[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(7): 2666-2667. (Xue R G. Study on the factors affecting the genetic transformation efficiency of soybean germinating seeds mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2008, 36(7): 2666-2667.)

### 全国中文核心期刊、全国优秀农业期刊

## 《中国种业》

《中国种业》是由农业部主管,中国农业科学院作物科学研究所和中国种子协会共同主办的全国性、专业性、技术性种业科技期刊。

刊物目标定位:以行业导刊的面目出现,并做到权威性、真实性和及时性。覆盖行业范围:大田作物、蔬菜、花卉、林木、果树、草坪、牧草、特种种植、种子机械等,信息量大,技术实用。

### 欢迎投稿、刊登广告

读者对象:各级种子管理、经营企业的领导和技术人员,各级农业科研、推广部门人员,大中专农业院校师生,农村专业户和广大农业生产经营者。

月刊,大16开,每期8.00元,全年96.00元。国内连续出版物刊号:CN 11-4413/S,国际连续出版物号:ISSN 1671-895X,全国各地邮局均可订阅,亦可直接汇款至编辑部订阅,挂号需每期另加3元。

邮发代号:82-132

地址:(100081)北京市中关村南大街12号 中国种业编辑部

电话:010-82105796(编辑部) 010-82105795(广告发行部)

传真:010-82105796 网址:www.chinaseedqks.cn

E-mail: chinaseedqks@caas.cn chinaseedqks@163.com