

## 农杆菌介导大豆子叶节遗传转化体系的优化研究

姬月梅<sup>1,2</sup>, 陈受宜<sup>3</sup>, 李英慧<sup>2</sup>, 张丽娟<sup>2</sup>, 宋晓华<sup>1</sup>, 常汝镇<sup>2</sup>, 邱丽娟<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>宁夏大学农学院, 宁夏银川 750021; <sup>2</sup>中国农业科学院作物科学研究所/农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程/农业部作物种质资源与生物技术重点开放实验室, 北京 100081; <sup>3</sup>中国科学院遗传与发育生物学研究所, 国家重点实验室植物基因组学, 北京 100101)

**摘要:**以大豆品种“中豆 32、Peking、早熟 18、绥农 14”子叶节为受体材料, 用农杆菌介导法转入与抗逆相关的小麦  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白基因 ( $TaNHX2$ ), 探索外植体大小、培养基主要成分、培养时间等因素对外植体分化的影响, 旨在优化遗传转化条件, 提高大豆转基因的遗传转化效率。研究表明, 以健康外植体获得率、抗性丛生芽获得率和抗性芽伸长比率为指标, 筛选并建立的优化转化系统为: 大豆萌发和不定芽诱导时分别加入  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  6-BA 和  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  6-BA, 浸染时间为 30 min, 共培养时间为 3 d; 外植体大小为 2/3 子叶, kan 抗性筛选浓度第一阶段和第二阶段分别是 60 和 50  $\text{mg L}^{-1}$ ; 利用上述方法, 已获得中豆 32 转基因再生植株, 经 PCR 分子检测, 证明目的基因  $TaNHX2$  已导入并整合到大豆基因组中, 转化率为 3.78%。

**关键词:**大豆; 遗传转化; 子叶节;  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  逆向转运蛋白; 再生

## Optimization of Genetic Transformation System from Soybean Cotyledon Mediated by Agrobacterium

Ji Yue-mei<sup>1,2</sup>, CHEN Shou-yi<sup>3</sup>, LI Ying-hui<sup>2</sup>, ZHANG Li-juan<sup>2</sup>, SONG Xiao-hua<sup>1</sup>, CHANG Ru-zhen<sup>2</sup>, and QIU Li-juan<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Ningxia University Agricultural College, Yinchuan 750021, Ningxia; <sup>2</sup>The National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement (NFCRI) / Key Laboratory of Germplasm & Biotechnology (MOA), Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, 100081 Beijing; <sup>3</sup>The National Key Lab of Plant Genomics, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** Transgenic soybeans have been widely planted abroad, which leading the development of the transgenic crop in the world. Establishment of an efficient genetic transformation technology system will facilitate physiological and molecular biology studies as well as the improvement of cultivars in China. The objective of this study was to optimize the conditions of the cotyledon node system of Agrobacterium-mediated soybean transformation so that the transformation plants can be obtained. Four soybean genotypes of Zhongdou 32, Peking, Zaoshu 18 and Suinong 14 was used to introduce the wheat transcription factor  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter into soybean genome by Agrobacterium-mediated transformation. The proportions of healthy explants, resistance tuft shoots and elongated shoots used as criteria for selection of proper conditions. The results indicated that the optimal system included in  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  and  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  of 6-BA for germination medium and shoot induction, 2/3 cotyledon infected with 30 min for infection, 3 days for co-culture, selection with 60 and 50  $\text{mg L}^{-1}$  Kan during the first and second shoot initiation stages. Based on the optimized condition positive transformed plants containing  $TaNHX2$  was obtained, which tested by specific PCR, indicating that  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gene was into the genome of soybean. The results indicated that genotypes mainly affected rates of transformation and regeneration. The rate of genetic transformation in cultivar Zhongdou 32 was 3.78%.

**Key words:** Soybean; Transformation; Cotyledonary-node;  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter; Regeneration

大豆是重要的粮食、油料和饲料作物,也是人类蛋白质食物、工业原料的主要来源,大豆在医药保健以及防病治病方面,也有一定的用途。现代生物技

术的应用将会对大豆生产和育种起重大的推动作用,建立良好的受体系统是实现基因遗传转化的先决条件,自 Cheng 等(1980)首次用大豆无菌苗子叶

收稿日期(Received): 2007-11-04; 接受日期(Accepted): 2007-12-12

基金项目: 农作物基因资源与遗传改良国家重大科学工程开放课题(NFCRI 2006)

作者简介: 姬月梅(1981-), 女, 硕士, 主要从事大豆转基因研究。E-mail: ji\_yumei@126.com

通讯作者(Corresponding author): 邱丽娟, 研究员, 博士。Tel: 010-62186623; E-mail: qiu\_lijuan@263.net

节获得再生植株后已有许多研究报道,如大豆体细胞胚发生再生系统(Parrott et al.,1989),大豆不定芽器官发生再生系统和原生质体再生系统(肖文言和王连铮,1994)。选用大豆无菌苗子叶(Wright et al.,1986)、子叶节(Zhang et al.,1999)、上胚轴、茎尖和未成熟种子的子叶(Sato et al.,1993)及无菌苗上胚轴(Wright et al.,1987)等多种外植体经不定芽器官发生途径得到了再生植株。然而不同大豆基因型间再生频率差异较大(王升吉等,1999;袁鹰等,2001),同一基因型不同外植体大小再生频率差异也较大。随着近年来基因工程技术的迅速发展,对组培再生频率有了更高的要求。因此,筛选再生能力强的基因型及外植体类型是大豆遗传转化的先决条件,但是遗传转化再生系统与组织培养再生系统不同,不仅要求再生频率高而且能与转化方法相结合,虽然抗除草剂转基因大豆已用于商业化生产,但大豆遗传转化依然受到许多因素限制,转化效率仍然很低是其转化未能成为模式作物的主要原因之一(邓向阳和卫志明,1998)。为此,本文开展新霉素磷酸转移酶(*NPT II*)基因转化大豆,进行了大豆组培再生及农杆菌介导转化影响因素研究,以期获得

最优转化条件。

本研究利用农杆菌介导的子叶节转化系统,在萌发培养、诱导丛生芽培养、浸染时间、芽伸长等组织培养条件和植物激素配比进行优化分析,为建立理想的、高效的大豆转化体系,探索提高大豆遗传转化效率的可能性,为进一步通过转基因方法有效提高大豆抗逆性新品种培育提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 大豆材料

选用绥农 14、早熟 18、peking 和中豆 32 等 4 个栽培大豆品种作为研究材料,其中绥农 14、早熟 18、peking 来自国家农作物种质保存中心,中豆 32 由中国农业科学院油料所周新安研究员提供。

### 1.2 农杆菌菌株及质粒载体

遗传转化所用的双元植物表达载体 pBIN438-*TaNHX2* 的农杆菌菌株 AGL1(由中国科学院遗传发育研究所陈受宜研究员惠赠),含有 CaMV35S 启动子和植株筛选标记新霉素磷酸转移酶(*NPT II*)基因(图 1)。

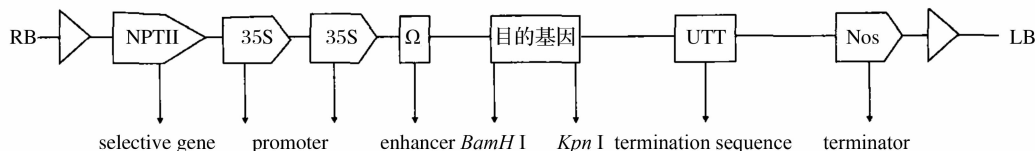


图 1 pBIN438-*TaNHX2* 表达载体结构

Fig. 1 The structure of expression vector pBIN438-*TaNHX2*

### 1.3 转化方法

**1.3.1 子叶节再生系统** 取成熟的大豆种子进行氯气灭菌 24 h(Di et al.,1996),子叶节描述的方法参照 Olhoft 等(2001),培养基配方参照 Olhoft 等(2003);子叶节的切取方式参照林树柱等(2005);子叶节切取方式分为两种(切去子叶上端的 1/3 和大部分的下胚轴,只留靠近子叶的 3~5 mm 下胚轴和切取大部分的下胚轴保留原子叶);GM 培养基激素 6-BA 选择 3 种浓度(0、0.5、1.0 mg L<sup>-1</sup>);SIM 培养基激素 6-BA 选择 3 种浓度(0、1.0、1.67 mg L<sup>-1</sup>);芽伸长培养基激素选用 2 种 IBA 浓度(1.0、1.2 mg L<sup>-1</sup>),NAA 0.3 mg L<sup>-1</sup>;共培养时间选择 3 个梯度(2、3、5 d);浸染时间选择 3 个梯度(15、30、60 min);诱导丛生芽时选择两种不同浓度抗性筛选压力 kan:第一阶段高浓度筛选有 2 种浓度(60、80

mg L<sup>-1</sup>),第二阶段低浓度筛选用 50 mg L<sup>-1</sup>;每个品种设 4 个处理,每个处理 10 次重复试验(表 2、表 3);正交试验 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>),4 个因子、每个因子 3 个水平共 9 个处理,每个处理每次重复统计的外植体数量 45 个,10 次重复试验(表 5);因素水平设计见表 1。  
**1.3.2 PCR 检测** 采用快捷型植物基因组 DNA 提取再生植株叶片 DNA。PCR 扩增的 pBIN438-*TaNHX2* 引物:P1-CACACTATTTGGTGCCGTTG;P2-GCAGCTCTTCCAACCAGAAC。反应体系(20 μL):灭菌蒸馏水,7.6 μL;10 × Ex Taq buffer,2 μL;dNTP Mixture(各 2.5 mmol L<sup>-1</sup>),2.0 μL;引物(2 μmol L<sup>-1</sup>),各 1.5 μL;DNA,5 μL;Ex Taq 酶(2.5 U μL<sup>-1</sup>),0.4 μL。反应程序:(1)94℃ 变性 3 min;(2)94℃ 变性 30 s;(3)53℃ 退火 1 min;(4)72℃ 延伸 30 s;(5)72℃ 延伸 5 min;(6)4℃ 保温(43 个循环)。

表 1 正交试验因素水平表  $L_9(3^4)$   
Table 1 The factor and its level of orthogonal test

水平 Level	因素 Factor			
	A	B	C	D
	萌发时 6-BA 的浓度 Concentration of 6-BA in GM/ mg L <sup>-1</sup>	诱导丛生芽 6-BA 的浓度 Concentration of 6-BA in SIM/ mg L <sup>-1</sup>	浸染时间 Infection time/min	共培养时间 Co-culture time/d
1	0	0	15	3
2	0.5	1.0	60	5
3	1.0	1.67	30	2

1.4 统计分析

以抗性丛生芽、芽伸长获得率、再生频率、每个外植体出芽数的平均数为指标,进行方差分析。  
抗性丛生芽获得率 = 抗性丛生芽数量/浸染外植体数量 × 100% ;  
芽伸长获得率 = 伸长的抗性芽( >5cm) 数量/抗性丛生芽数量 × 100% ;  
再生率 = 再生植株数量/外植体数量 × 100% ;  
转化率 = 阳性植株数量/外植体数量 × 100% ;  
每个外植体出芽数 = ( 总芽数( >0.5cm)/接种外植体数) × 100% 。

2 结果与分析

2.1 6-BA 对中豆 32 丛生芽率的影响

中豆 32 的丛生芽获得率在 4 个处理间差异都达到极显著水平( 表 2),以萌发和不定芽诱导时都不加 6-BA,抗性丛生芽获得率最低为 30.2% ;只在诱导丛生芽或萌发时加 6-BA,丛生芽获得率分别为 57.1%、52.2% ;而萌发和不定芽诱导培养基中都加 6-BA,丛生芽获得率最高为 70% ,分别比前 3 个处理提高了 1.0、0.7、0.8 倍。这说明 6-BA 在这两个培养阶段都对丛生芽的诱导起促进作用。

表 2 不同培养阶段加入 6-BA 对丛生芽率的影响  
Table 2 The effect of 6-BA on obtain rate of shoots in different culture steps

处理 Treatment	检测外植体总数 Quantity of explants	6-BA 处理 6-BA treatment		丛生芽获得率 Obtain rate of shoots/%	
		萌发培养基 Germination media	诱导丛生芽培养基 Shooting induction media	平均值 Average	变异范围 Variance range
1	376	-	-	30.2 D	13.5 ~48.3
2	372	-	+	57.1 B	5.6 ~71.3
3	385	+	-	52.2 C	0 ~65.0
4	382	+	+	70.0 A	8.3 ~89.1

“+”表示有 6-BA,“-”表示未加入 6-BA;大写字母表示处理间差异显著性( $P<0.01$ ),4 个处理中 6-BA 的组合分别为(0,0 mg L<sup>-1</sup>)、(0,1.67 mg L<sup>-1</sup>)、(1.67,0 mg L<sup>-1</sup>)、(0.5,1.0 mg L<sup>-1</sup>)。  
“+” indicate abundance,“-” indicate lack;The capital letters show high significant difference( $P<0.01$ ),four 6-BA treatment combinations were (0,0 mg L<sup>-1</sup>), (0,1.67 mg L<sup>-1</sup>), (1.67,0 mg L<sup>-1</sup>), (0.5,1.0 mg L<sup>-1</sup>) .

2.2 不同基因型的再生率比较

4 个农杆菌易感性大豆品种的植株再生率存在明显差异(表 3),以中豆 32 植株再生率最高,变化范围为 20%~62% ,与其他品种之间的差异达到极显著水平;每个外植体的出芽数也最多,变化范围为 1.0~4.56 个,与其他品种之间的差异极显著;其次为绥农 14、早熟 18,植株再生率变化范围分别为 32%~59%、36%~55% ,这两个品种之间差异不显著,但与其他品种之间差异显著;每个外植体的出芽数变化范围分别为 1.07~2.1 和 0.98~1.46,与其他品种之间差异显著;而 Peking 最低,再生率变化范围

为 6%~45% ,与其他品种之间差异极显著;两种外植体大小比较,保留 2/3 子叶时,4 个品种的再生率依次为 62%、59%、55%、45% ,比完整子叶再生率 20%、32%、36%、6% 明显要高,且差异显著;同样 4 个品种的出芽数在保留 2/3 子叶时要比完整子叶平均出芽数高;两种激素浓度比较,4 个品种之间表现相同的规律,加 IBA1.2 mg L<sup>-1</sup>时,出芽数依次分别为 4.56、2.1、1.46、1.26,均高于 IBA1.0 mg L<sup>-1</sup>出芽数 1.0、1.07、0.98、0.1,且差异显著;从抗性筛选压力来看,同样 4 个品种也表现一致,以第一阶段 Kan 浓度为 60 mg L<sup>-1</sup>比 80 mg L<sup>-1</sup>再生率的出芽数

高,且差异显著。

表 3 不同基因型大豆遗传转化效果及转基因植株再生率比较

Table 3 Comparison of transformation effect and regeneration rate for different genotypes

基因型 Genotypes	接种外植体数 No. of explants	外植体大小 Size of explants	激素浓度 IBA + NAA Concentration of plant regulators /mg L <sup>-1</sup>	第一阶段 Kan 浓度 The first stage concentrations of Kan/ mg L <sup>-1</sup>	生长状况 State of growth	每个外植体出芽数 Mean no. of shoots per explant	再生率 Regeneration frequency/%
中豆 32 Zhongdou 32	188	原子叶 Cotyledons	1.0	80	15% 褐化 15% Browning	1.00 E	20 E
	163	2/3 子叶 2/3Cotyledons	1.2	60	良好 Good	4.56 A	62 A
	143	原子叶 Cotyledons	1.0	80	极差 Bad	0.10 F	6 F
	102	2/3 子叶 2/3Cotyledons	1.2	60	10% 褐化 10% Browning	1.26 D	45 C
早熟 18 Zaoshu 18	167	原子叶 Cotyledons	1.0	80	25% 褐化 25% Browning	0.98 E	36 D
	158	2/3 子叶 2/3Cotyledons	1.2	60	良好 Good	1.46 C	55 B
绥农 14 Suinong 14	187	原子叶 Cotyledons	1.0	80	2% 褐化 20% Browning	1.07 E	32 D
	182	2/3 子叶 2/3Cotyledons	1.2	60	良好 Good	2.10 B	59 B

大写字母表示 1% 水平下差异显著性。

The capital letter after the number represented the greatly significant difference between cultivars at 1% level.

综上所述,4 个品种在外植体大小、激素浓度、抗性筛选浓度这 3 个因素的变化相似,以中豆 32 是再生能力最好。中豆 32 在最优组合(外植体大小保留 2/3、生根激素 IBA1.2 mg L<sup>-1</sup>、抗性筛选压力第一阶段 Kan 的浓度为 60 mg L<sup>-1</sup>时)条件下的再生率最高,为 62%,每个外植体出芽数最多 4.56,生

长状况良好;并且与其他品种之间差异显著。

2.3 四种不同因素互作对中豆 32 丛生芽率和芽伸长率的影响

由于不同基因型在诱导丛生芽和芽伸长阶段受多种因素的影响,在两种激素配比的基础上,选择浸染时间和共培养时间进行了 4 个因素分析(表 4、表 5)。

表 4 正交设计方差分析表

Table 4 Variance analysis of orthogonal test result

因素 Factors	平均数 Average	水平 Level			变异范围 Variance range	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F value
		1	2	3					
萌发时 6-BA 的浓度 Concentration of 6-BA in GM/ mg L <sup>-1</sup> (A)	37.4	33.5	48.5	39.8	33.5 ~ 48.5	3421.3	2	1710.6	62.3 **
诱导丛生芽 6-BA 的浓度 Concentration of 6-BA in SIM/mg L <sup>-1</sup> (B)	47.2	28.8	52.2	40.7	28.2 ~ 52.2	8214.2	2	4107.1	149.5 **
浸染时间 Infection time/min (C)	32.1	39.1	31.1	51.6	31.1 ~ 51.6	6430.1	2	3215.0	117.0 **
共培养时间 Co - culture time/d (D)	41.4	41.7	38.7	41.4	38.7 ~ 41.7	158.5	2	79.2	2.9
误差 Error					222	5.6	81	27.5	

\* 和 \*\* 分别表示在 5% (  $F_{0.05} = 3.11$  ) 和 1% 水平 (  $F_{0.01} = 4.88$  ) 的差异显著性。

\* and \*\* represented the significant difference at the 0.05 and 0.01 level.

从芽伸长率的平均值(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: A2 > A3 > A1, B2 > B3 > B1, C3 > C1 > C2, D1 > D3 > D2, 并且因素 A、B、C 的 3 个水平间差异极显著,以 A<sub>2</sub>、B<sub>2</sub>、

C<sub>3</sub>为最优水平,D 因素的 3 个水平间差异不显著,以 D<sub>1</sub>为最优,因此,最优组合为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>1</sub>处理间的差异性(表5)。

表5 四因素 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验结果分析

Table 5 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) Experimentation of four factors for transformation

处理 Treatment	接种外植体数 No. of explants	萌发时 6-BA 的浓度 Concentration of 6-BA in GM /mg L <sup>-1</sup> (A)	诱导丛生芽 6-BA 的浓度 Concentration of 6-BA in SIM /mg L <sup>-1</sup> (B)	浸染时间 Infection time /min (C)	共培养时间 Co-culture time /d (D)	丛生芽率 Percentage of shooting explants/%	芽伸长率 Rate of shoots elongate/%	每个外植体出芽数 Mean of shoots per explant
1	38	0	0	15	3	31 F	21.3 F	0.7
2	31	0	1.0	60	5	45 D	36.4 CD	1.1
3	37	0	1.67	30	2	47 CD	42.8 BC	1.7
4	36	0.5	0	60	2	25 G	25.4 EF	0.9
5	42	0.5	1.0	30	3	75 A	72.3 A	4.6
6	43	0.5	1.67	15	5	55 B	47.9 B	3.3
7	43	1.0	0	30	5	40 E	39.8 C	1.0
8	39	1.0	1.0	15	2	50 C	48.0 B	3.1
9	41	1.0	1.67	60	3	29 F	31.5 DE	1.9

在诱导健壮芽伸长的 9 种组合设计中,第 5 个处理的芽伸长率最高,达到 72.3%,出芽数最高为 4.56,并且诱导出的芽易生根,移栽成活率较高;第 1 个处理频率最低,仅为 21.3%,根细小且不易生根移栽,出芽数最低为 0.7。根据实验因子的总计数或平均数分析可得:诱导抗性芽伸长的最优组合配比应为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>1</sub>(GM:6-BA 为 0.5 mg L<sup>-1</sup>,SIM:6-BA 为 1.0 mg L<sup>-1</sup>,浸染时间为 30 min,共培养时间为 3 d)。

极差 R 分析看出,影响芽伸长最关键因素为诱导丛生芽要加入 6-BA 为 1.0 mg L<sup>-1</sup>和浸染时间为 30 min,其次为萌发时加入 6-BA 为 0.5 mg L<sup>-1</sup>,共培养时间对芽伸长影响较小。在萌发时加入较高浓度 6-BA 时,对芽伸长不是很好并且很难成活,诱导丛生芽阶段加入较高 6-BA 得到抗性芽伸长比率较高,而不加入 6-BA 则比率较低,说明 6-BA 对伸长有强烈的诱导作用。其次浸染时间很主要,浸染时

间太长不但不起作用,反而降低芽伸长频率。

从差异显著性看,9 个处理间丛生芽获得率都几乎达到极显著水平,芽伸长率处理间显著性也达到极显著水平。

综合上述,不论从芽伸长率均值、极差还是显著性来看,9 种组合配比中最优组合结论一致:最优组合配比应为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>1</sub>(GM:6-BA 为 0.5 mg L<sup>-1</sup>,SIM:6-BA 为 1.0 mg L<sup>-1</sup>,浸染时间为 30 min,共培养时间为 3 d)。影响芽伸长关键因素依次为诱导丛生芽要加入 6-BA 为 1.0 mg L<sup>-1</sup>、浸染时间为 30 min、萌发时加入 6-BA 为 0.5 mg L<sup>-1</sup>、共培养时间 3 d。

2.4 再生植株的获得及 PCR 鉴定

利用建立的优化转化条件对中豆 32 进行遗传转化,经抗卡那筛选,抗性苗(图 2)获得率为 75%,伸长率为 72.3%,共获得 29 株再生植株,再生率为 4.92%。

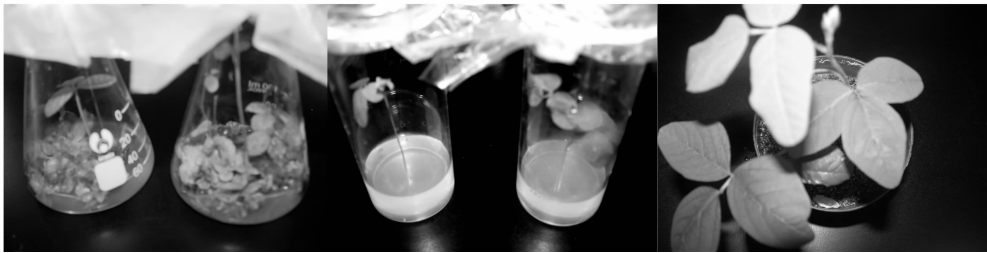
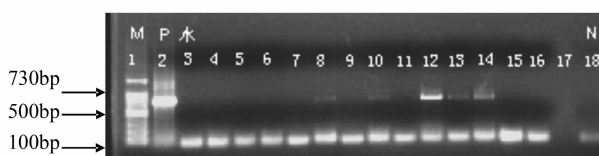


图2 中豆 32 再生植株

Fig.2 Zhongdou 32 fertile regeneration plant

用大豆抗性植株与未转化对照植株的叶片提取总 DNA 为模板,以含有目的基因的质粒为阳性对照进行 PCR 扩增,经电泳检测(图 3),可以看出,阳性质粒(泳道 P)和抗性植株(泳道 8、10、12、13、14)在 730bp 处均检测到特异性条带,而阴性对照植株(泳道 N)和其它再生植株(泳道 4~7、9、11、15、16、17)却未扩增出相应的特异条带。在所检测的 25 个单株中,阳性植株个体占 44%,说明小麦的 *TaNHX2* 基因已经整合到大豆基因组中。根据起始的外植体计算,转化效率为 3.78%。



M: marker; P: plasmid DNA; 4-17: regeneration plantlet DNA; N: wild type DNA

图 3 中豆 32 转化再生植株 *TaNHX2* 基因的 PCR 检测

Fig. 3 pBIN438-*TaNHX2* gene's PCR assay of regenerated plantlets of Zhongdou 32

### 3 讨论

#### 3.1 基因型对农杆菌遗传转化的影响

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。本研究中豆 32 的丛生芽诱导率为 75%,高于已报道丛生芽诱导率较高的辽豆 11 (39.8%) (王升吉等,1999) 和汾豆 33 (50%) (程林海等,2001),其出芽个数为 4.56 个,高于早熟 1 号 (3.42 个) (杨荣仲等,2003) 和合丰 35 (3.56 个) (林树柱等,2005)。不同基因型转化效率也存在很大差异。吉林小粒豆 10 mg L<sup>-1</sup> 6-BA 转化率为 2.8%,吉林 35、吉林 43 次之,黑农 10 最低(李明春等,2006);李桂兰等(2005)研究表明,吉林 35 转化率最好 2.16%,中黄 28 次之,平均转化率为 1.9%,;东农 L13 的转化率为 1.94% (王晓春等,2006);而国外基因型 Dwight 转化率为 1.8% (Chen et al.,2004);王萍等(2004)获得吉林 35、吉林 43 和合丰 35 这 3 个品种的卡那霉素抗性植株,转化率变化范围为 0.32%~0.87%,但合丰 25 和辽豆 11 没有得到抗性植株。相比之下,本研究中豆 32 在优化培养条件(GM:6-BA 为 0.5 mg L<sup>-1</sup>,SIM:6-BA 为 1.0 mg L<sup>-1</sup>,共培养时间为 3 d,浸染时间为 30 min)的转化率为 3.78%,高于上述研究报道;但低于薛任镐(2006)和 Paz 等(2006)的报道,转化率分别为

5.3% 和 3.8%。

#### 3.2 激素浓度、共培养时间、浸染时间和筛选压力对转化效率的影响

大豆外植体在萌发和不定芽诱导阶段的出芽率受植物激素的影响(林树柱等,2005)。试验最佳 6-BA 浓度组合(GM: 0.5 mg L<sup>-1</sup> 6-BA, SIM: 1.0 mg L<sup>-1</sup> 6-BA) (3.78%) 比 (2.1%) (GM: 0.0 mg L<sup>-1</sup> 6-BA, SIM: 1.67 mg L<sup>-1</sup> 6-BA) 诱导丛生芽 (Olthoff et al.,2001)、转化率要好。说明 6-BA 在萌发和诱导丛生芽这两个培养阶段都对丛生芽的诱导起到促进作用。所以本试验选择两阶段都加入 6-BA 来诱导丛生芽。

农杆菌介导大豆遗传转化时的激素 6-BA 浓度、共培养时间、浸染时间和筛选压力等对转化效率的影响非常重要。其中袁鹰等(2001)在以子叶节为外植体诱导丛生芽时,6-BA 浓度从 0.15~1.0 mg L<sup>-1</sup> 提高到 1.15~2 mg L<sup>-1</sup> 时,每个外植体诱导丛生芽数从 2~3 个显著增加到 20~30 个,但 6-BA 为 4 mg L<sup>-1</sup> 时,虽然丛生芽数增加到 30 个,但苗多为畸形。本研究结果表明,无论是在萌发培养基还是诱导丛生芽培养基阶段,均表现为随着 6-BA 浓度从低到高,丛生芽个数呈现为先增加而后下降的趋势,说明 6-BA 在适当浓度范围内,对组织分化起促进左右,而浓度过高,则抑制组织的分化。采用本研究筛选的最佳组合,即在萌发和诱导丛生芽培养基中分别加入 0.5 mg L<sup>-1</sup> 和 1.0 mg L<sup>-1</sup> 的 6-BA,丛生芽数最高,变化范围为 15~38 个,但仅有少数畸形苗。

综上所述,农杆菌介导的遗传转化受外植体切取方式、激素浓度、共培养时间、浸染时间及适宜的筛选压力的影响。本研究结果表明,不同处理间的再生频率变异范围较大,为 6%~62%。

### 4 结论

以健康外植体获得率、抗性丛生芽获得率和抗性芽伸长比率高为指标,建立了优化的大豆转化体系:大豆萌发和不定芽诱导时分别加入 0.5 mg L<sup>-1</sup> 6-BA 和 1.0 mg L<sup>-1</sup> 6-BA,浸染时间为 30 min、共培养时间为 3 d;外植体大小为 2/3 子叶,kan 抗性筛选浓度第一阶段和第二阶段分别是 60 和 50 mg L<sup>-1</sup>。

利用最佳的转化体系对中豆 32 进行遗传转化,从 291 个外植体中,共获得再生植株 25 个,其中 11

个经 *TaNHX2* 特异引物的 PCR 检测为阳性,表明该 *TaNHX2* 基因已整合到大豆基因组,遗传转化率为 3.78%。

## References

- Cheng L H, Sun Y, and Liu S X. 2001. The effects of genotype and phytohormone concentration on soybean plant regeneration. Chinese Bulletin of Botany, 18(3):367-370 (程林海, 孙毅, 刘少翔. 2001. 基因型和激素浓度对大豆植株再生的影响. 植物学通报, 18(3):367-370)
- Chen S Y. 2004. High efficiency Agrobacterium-mediated transformation of soybean. Acta Botanica Sinica, 46(5):610-617
- Cheng T Y, Saka T, and Voqil-Dinh T H. 1980. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture. Plant Science Letter, 19:91-99
- Di R, Purcell V, Collins G B, and Ghabrial S A. 1996. Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene. Plant Cell Reports, 15:746-750
- Deng X Y, and Wei Z M. 1998. Soybean conversion technology. Plant Physiology Communications, 34:381-387 (邓向阳, 卫志明. 1998. 大豆转化技术. 植物生理学通讯, 34:381-387)
- Li G L, Qiao Y K, Yang S H, Jin Z X, and Li M G. 2005. Study of the Agrobacterium-mediated transformation systems of soybean cotyledonary node. Acta Agronomica Sinica, 31(2):170-176 (李桂兰, 乔亚科, 杨少辉, 靳朝霞, 李明刚. 2005. 农杆菌介导大豆子叶节遗传转化的研究. 作物学报, 31(2):170-176)
- Li M C, Cai Y, Zhao G L, Cai Y Q, G L, Zhou H, Song W, and Xing L J. 2006. Improvement of cotyledon node regeneration system in soybean (*Glycine max*). Acta Agronomica Sinica, 32(2):223-227 (李明春, 蔡易, 赵桂兰, 财音青格乐, 周皓, 孙伟, 邢来君. 2006. 改良大豆子叶节再生体系的研究. 作物学报, 32(2):223-227)
- Lin S Z, Cao Y P, Wei Z M, Ma X P, and Chen L Y. 2005. Studies on shoots induced by 6-BA from cotyledonary-nodes and embryonic tips of soybean. Journal of Shanghai Jiaotong University, 23(2):138-142 (林树柱, 曹越平, 卫志明, 马晓平, 陈鲁勇. 2005. 6-BA 诱导大豆子叶节和茎尖出芽的研究. 上海交通大学学报, 23(2):138-142)
- Olhoft P M, Flagel L E, Donovan C M, and Somers D A. 2003. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. Planta, (216):723-735
- Olhoft P M, and Somers D A. 2001. L-Cysteine increases Agrobacterium-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. Plant Cell Reports, 20:706-711
- Parrott W A, Williams E G, and Hildebrand D P. 1989. Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 16(1):15-21
- Paz M M, Martinez J C, Kalvig A B, Fonger T M, and Wang K. 2006. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient Agrobacterium-mediated soybean transformation. Plant Cell Reports, 25:206-213
- Sato S, Newell C, and Kolacz K. 1993. Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems. Plant Cell Reports, 12:408-413
- Wright M S, Koehler S M, and Hichee M A. 1986. Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max*. Plant Cell Reports, 5:150-154
- Wright M S, Williams M H, and Pierson R E. 1987. Initiation and propagation of *Glycine max* L. Merr. Plants from tissue-cultured epicotyls. Plant Cell Tissue and Organ Culture, (8):83-90
- Wang P, Wang G, Ji J, Zhou Z M, Guo W, La B, and Wu Y. 2004. Genetic Transformation of Immature cotyledon via Agrobacterium-tumefaciens in soybean. Soybean Science, 23(2):86-90 (王萍, 王罡, 季静, 周智明, 郭威, 拉巴, 吴颖. 2004. 农杆菌介导大豆未成熟子叶的遗传转化. 大豆科学, 23(2):86-90)
- Wang S J, Wu Y H, Wang H Y, and Liu Z Z. 1999. Studies on the regeneration of tissue culture of different exophytes in soybean. Journal of Shenyang Agricultural University, 30(3):255-259 (王升吉, 吴元华, 王洪岩, 刘忠智. 1999. 大豆不同外植体组织培养及再生研究. 沈阳农业大学学报, 30(3):255-259)
- Wang X C, Wang G, Wang P, Ji J, and Liu S Q. 2006. Genetic transformation of somatic embryos via Agrobacterium tumefaciens in soybean. Chinese Agricultural Science Bulletin, 22(4):40-43 (王晓春, 王罡, 王萍, 季静, 刘尚前. 2006. 农杆菌介导法转化大豆体细胞胚获得转基因植株. 中国农学通报, 22(4):40-43)
- Xue R G. 2006. Agrobacterium-mediated transformation of soybean germinating cotyledonary node cells. Acta Agronomica Sinica, 32(8):1188-1192 (薛仁镐. 2006. 用根癌农杆菌介导法转化大豆萌动子叶节细胞. 作物学报, 32(8):1188-1192)
- Xiao W Y, and Wang L Z. 1994. David cotyledons of soybean pods protoplast culture and plant regeneration. Acta Agronomica Sinica, 20(6):665-669 (肖文言, 王连铮. 1994. 大豆幼荚子叶原生质体培养及植株再生. 作物学报, 20(6):665-669)
- Yang R Z, Tan Y M, Li S, Zhang M Q, and Chen R K. 2003. Studies on regeneration of soybean cotyledon node and Agrobacterium-mediated genetic transformation. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 16(4):33-38 (杨荣仲, 谭裕模, 李松, 张木清, 陈如凯. 2003. 大豆子叶节再生及农杆菌介导转化研究. 西南农业学报, 16(4):33-38)
- Yuan Y, Liu D P, Zheng P H, Xu W J, and Li H L. 2001. Study on plant regeneration from soybean culture. Soybean Science, 20(2):9-13 (袁鹰, 刘德璞, 郑培和, 徐文静, 李海龙. 2001. 大豆组织培养再生植株研究. 大豆科学, 20(2):9-13)
- Zhang Z Y, Xing A Q, Staswick P, and Clemente T E. 1999. The use of glufosinate as a selective agent in Agrobacterium-mediated transformation of soybean. Plant Cell. Tissue and Organ Culture, 56:37-46