



利用 *GUS* 基因的瞬时表达优化大豆根癌农杆菌介导的遗传转化

杨明明, 高海京, 马啸燕, 孙英楠, 邵宇鹏, 包格格, 李文滨, 王志坤

(东北农业大学 大豆生物学教育部重点实验室/农业部东北大豆生物学与遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 高转化效率是分子育种的重要前提, 根癌农杆菌介导的遗传转化由于其具有较高的遗传效率和较低的拷贝数成为目前优选方法。为优化大豆遗传转化体系, 以本实验室已有转化体系为基础, 利用 pCambia3301 中 35S: *GUS* 基因瞬时表达体系, 从萌发时间、切豆方法、侵染时间、共培养方式以及共培养时间等方面对东农 47、垦农 18 和 B12088 大豆栽培品种的遗传转化体系进行优化。结果表明: 东农 47 萌发 1 d, 侵染 30 min; 垦农 18 和 B12088 萌发 12 h, 侵染 30 min, *GUS* 基因瞬时表达率最高。在其它的处理上, 3 个品种表现结果一致, 即蘸取菌液切豆, 共培养中子叶伤口朝下摆放, 黑暗条件下共培养 3~5 d, *GUS* 基因瞬时表达最高。3 个品种在最适条件下, *GUS* 染色效率均达到 90% 以上, 垦农 18 遗传转化效率较高。本研究为大豆农杆菌介导子叶节转化方法提供了一个改进的方案, 并且为拓宽可利用于大豆遗传转化的种质资源奠定基础。

关键词: 根癌农杆菌; 大豆遗传转化; 转化率; *GUS* 基因瞬时表达

Optimization of *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation of Soybean with Transient Expression of *GUS* Gene

YANG Ming-ming, GAO Hai-jing, MA Xiao-yan, SUN Ying-nan, SHAO Yu-peng, BAO Ge-ge, LI Wen-bin, WANG Zhi-kun

(Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education/Key Laboratory of Biology and Genetics & Breeding for Soybean in Northeast China, Ministry of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: High transformation efficiency is an important factor for plant molecular breeding. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation is commonly used in plant genetic transformation because its higher heritability and lower copy number. To optimize the soybean genetic transformation system used in our laboratory, we optimized *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformations of Dongnong 47, Kennong 18 and B12088 soybean varieties of germination time, bean cutting methods, infestation time, co-culture method and co-culture time with the expression of 35S: *GUS* of pCambia3301. The results showed that the expression level of *GUS* was highest when Dongnong 47 was germinated for 1 d, infested for 30 min and Kennong 18 and B12088 germinated for 12 h, infected for 30 min. In other treatments, the results of the three varieties were consistent. The *GUS* gene expression was highest when we cut the soybean cotyledonary with dipped *Agrobacterium* and when the cotyledon's wound is placed face down and co-cultivated for 3-5 d in the dark. Under the optimal conditions, the Kennong 18 showed the highest transformation efficiency. This study provides an improved protocol for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybean cotyledonary nodes that can be utilized for soybean genetic transformation.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*; Soybean genetic transformation; Transformation rate; Transient expression of *GUS* gene

大豆作为世界上重要的油料作物, 是人们获取植物蛋白质和油的主要来源, 两者总量约占大豆种子干重的 60%^[1], 具有丰富的维生素、异黄酮和不饱和脂肪酸。我国是大豆油消费大国, 很大程度上需要进口^[2]。摆脱对进口大豆的依赖, 以及大力发展我国转基因大豆的研究水平, 能够为我国大豆的需求提供技术保障。在众多转基因作物中, 大豆是全球种植面积最大的作物^[3], 也是转化效率最低的作物。因此, 高效的转化方法成为研究转基因大豆

的重要前提。农杆菌介导大豆遗传转化由于拷贝数低、遗传稳定、基因沉默现象少和成本低等优点而被广泛应用^[4]。

自 Hinchey 等^[5]第一次利用农杆菌介导大豆子叶节转化方法获得大豆转基因苗以来, 研究者开始了对大豆遗传转化体系优化方面的探索。Olhoft 等^[6-7]以萌发 5~7 d 的大豆子叶节为外植体, 为降低子叶伤口处褐化程度, 在共培养培养基中添加硫醇化合物, 增加了大豆的转化效率, 为研究人员在

收稿日期: 2018-12-20

基金项目: 国家转基因生物新品种培育科技重大专项 (2016ZX08004-003); 东北农业大学“学术骨干”项目 (16XG01)。

第一作者简介: 杨明明 (1994 -), 男, 硕士, 主要从事大豆分子遗传育种研究。E-mail: 920555200@qq.com。

通讯作者: 王志坤 (1978 -), 女, 博士, 副研究员, 主要从事大豆遗传育种与分子生物学研究。E-mail: zhikunwang1998@aliyun.com;
李文滨 (1958 -), 男, 博士, 教授, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: wenbinli@neau.edu.cn。

共培养期间进行其它条件优化提供思路。Xue 等^[8]采用独特的多针法对品种 Jungery 制造伤口进行遗传转化方法的优化,增加了其遗传转化率,填补了伤口制造方式等方面研究的空缺。在最适菌液浓度和侵染时间上,众多研究结果趋于一致。陈李森和翟悦等^[9-10]探究出农杆菌侵染的最佳浓度 $OD_{600} = 0.6$, 侵染时间 30 ~ 40 min, 共培养 4 d。Dang 等^[11]为进一步提高遗传转化率,研究了 KYRT1、EHA105 和 LBA4404 3 种不同农杆菌菌株的侵染效率,发现 KYRT1、EHA105 有较高的转化效率。目前在农杆菌菌株 EHA105 应用较为普遍。Li 等^[12]对 8 种不同大豆基因型进行了萌发时间和共培养时间等研究,发现部分品种在萌发 1 d 和共培养 5 d 之后的子叶节 *GUS* 基因瞬时表达较高。在整个农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化体系中,萌发时间的研究较多,普遍认为 5 d 最适,但也有少数的研究者认为 1 d 也有利于基因的瞬时表达。侵染时间、共培养时间以及光暗处理的研究也较为广泛,普遍认为侵染 30 ~ 60 min, 共培养期间进行暗处理培养 5 d 的基因瞬时表达率较高。但是,切豆方式和共培养期间外植体摆放方式的研究较为少见,对基因的瞬时表达率的影响研究讨论的也较少。总之,关于各种优化条件的说法不尽一致。

本研究参考前人对于优化方法的思路和研究成果,对本课题组现有常用转基因大豆品种的萌发时间、切豆方式、侵染时间、共培养方式、光暗处理以及共培养时间等方面进行优化,重点研究萌发时间、切豆方式和共培养期间大豆子叶伤口朝向的优化问题。通过比较不同处理下丛生芽诱导率和 *GUS* 基因瞬时表达效率确定最佳遗传转化体系并筛选出最适转化受体,为大豆基因功能和调控途径等研究提供良好的大豆转基因材料和方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 供试东农 47、B12088 由东北农业大学大豆生物学教育部重点实验室提供,垦农 18 由黑龙江省八一农垦大学朱洪德研究员提供。

1.1.2 菌株与质粒 根癌农杆菌 EHA105、融合 *GUS* 报告基因的植物表达载体 pCAM-BIA3301 由本实验室保存。

1.2 试验设计

1.2.1 种子最适萌发时间的筛选 将灭菌的大豆种子种脐向下播种于萌发培养基中,分别设置 12 h、1,3,5 d 萌发时间梯度。将萌发好的种子在子叶生长点处用手术刀片制造伤口并进行侵染,在 16 h/8 h

(光/暗)的条件下,子叶伤口朝向培养基共培养 5 d,进行 *GUS* 染色,3 次重复。

1.2.2 最佳切豆方式和最适侵染时间的筛选 在大豆最适萌发条件下,将萌发种子的下胚轴切割至约 2 ~ 3 mm,退去种皮,用手术刀纵向切分种子。切豆方式为:用手术刀蘸取提前配制好的重悬菌液在子叶的生长点处制造 5 ~ 7 个伤口、手术刀不蘸取菌液制造同样的伤口。制造伤口后用菌液进行侵染,不时摇动。侵染时间分别为 30 和 60 min。侵染完毕后将外植体置于 16 h/8 h(光/暗)的条件下共培养 5 d,并进行 *GUS* 染色,3 次重复。

1.2.3 共培养期间大豆子叶节伤口朝向的筛选 在大豆的萌发时间、切豆方式、侵染时间最佳的前提下,将共培养的外植体分成 4 部分处理:子叶伤口朝向培养基光下培养、子叶伤口背向培养基光下培养、子叶伤口朝向培养基暗下培养、子叶伤口背向培养基暗下培养。共培养 5 d 后进行 *GUS* 染色,3 次重复。

1.2.4 共培养期间大豆子叶节暗条件下的最佳培养时间筛选 萌发、切豆方式、侵染、子叶摆放均按照 *GUS* 基因瞬时表达率高的方式处理,共培养处理时间设置为 3 和 5 d,共培养结束后进行 *GUS* 染色检测,3 次重复。

1.3 方法

1.3.1 *GUS* 组织学检测 *GUS* 染液的配制具体参照 Jefferson 等^[13]的方法,*GUS* 基因的染色操作:将共培养后的外植体的子叶切除 1/2,剩余带有生长点的外植体用纯水清洗 3 次。

加入 *GUS* 染色液,将外植体完全浸没,避光并在 80 kPa 条件下进行抽真空 30 min,37℃ 的条件下孵育过夜,结束后倒除染色液,用无水乙醇进行脱色,定期更换,直至子叶颜色脱尽。观察并统计 *GUS* 染色情况,计算 *GUS* 基因瞬时表达率。保证每个处理的子叶节数为 50 个。

GUS 瞬时表达率(%) = 显色的外植体数量/染色的外植体总数 × 100

1.3.2 大豆子叶节的遗传转化方法 农杆菌菌液的制备与重悬:在相应抗性的 YEP 培养基中挑菌斑,加到含有卡那、利福平、链霉素的 2 mL 的菌液中进行活化,1 d 后转入含有相应抗性的 200 mL YEP 液体培养基中培养过夜,当菌液培养到 $OD_{600} = 0.8$ 时,将菌液放在 50 mL 离心管(无菌)中,4℃,4 000 r·min⁻¹,10 min;用液体共培养基将菌块重悬至 $OD_{600} = 0.6$ 左右备用。

外植体的获得和灭菌:选取表面光滑饱满的大豆种子,平铺于平皿。使用氯气消毒法进行灭菌,

在三角瓶中倒入 96 mL 的 NaClO, 将其与培养皿放在通风橱干燥容器中, 再量取 6 mL 的浓盐酸倒进三角瓶中, 灭菌 16 h。

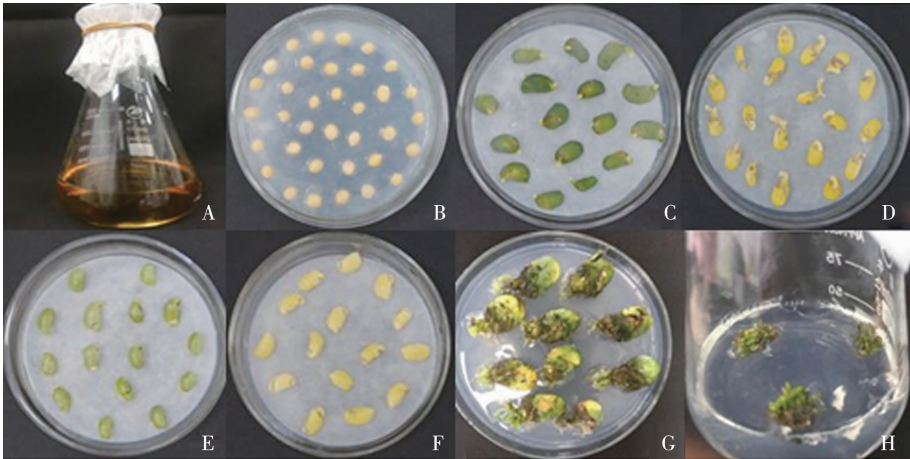
大豆子叶节的制备: 将灭菌过的种子种在萌发培养基中。萌发后, 将种皮去掉, 在子叶节下 2 ~ 3 mm 的地方切掉下胚轴, 将子叶分成 2 个, 切除腋芽、顶芽, 用手术刀蘸取重悬菌液在生长点处制造伤口, 准备侵染。

转化: 将制备好的子叶节外植体放入重悬后的菌液中进行侵染, 30 min, 其间要不时震荡。侵染结

束后倒掉菌液, 将子叶平铺在有无菌滤纸的培养皿内, 伤口朝向无菌滤纸, 16 h/8 h (光/暗) 条件下共培养 5 d, 得到转有 *GUS* 基因的外植体。

筛选: 经过共培养得到的大豆子叶节, 将子叶伤口朝向光, 与培养基保持 45° 插入到加有 8 mg · L⁻¹ PPT 的筛选培养基中培养 28 d, 14 d 继代培养一次, 期间将较大的丛生芽切除。

丛生芽再生效率 (%) = 出芽外植体数/外植体总数 × 100



A: 摇菌; B: 萌发; C、D、E、F: 共培养, 分别为伤口朝上光培养、伤口朝上暗培养、伤口朝下光培养、伤口朝下暗培养; G: 筛选; H: 伸长。

A: Shaking bacteria; B: Seed germination; C, D, E, F: Cocultivation, wound-up light culture, wound-up dark culture, wound-down light culture and wound-down dark culture, respectively; G: Shoot induction; H: Shoot elongation.

图1 大豆子叶节遗传转化方法各环节

Fig. 1 Each link of genetic transformation methods for soybean cotyledonary nodes

1.4 数据分析

利用 Excel 2013 和 SPSS 24.0 软件对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 最适大豆种子的萌发时间

垦农 18 和 B12088 2 个基因型最适萌发时间均为 12 h, 该萌发时间的外植体农杆菌侵染后 *GUS* 基因的瞬时表达率显著高于其它几个处理 (图 2)。东农 47 的萌发 1 d 与 3 d 间农杆菌侵染的外植体 *GUS* 基因瞬时表达率没有显著性差异, 但是萌发 5 d 时, *GUS* 基因的瞬时表达明显降低, 最适萌发时间为 1 d (图 2)。

2.2 最适切豆方式和侵染时间

3 个品种在蘸取重悬菌液时切豆, 经农杆菌侵染外植体 *GUS* 染色表现出的转化效率均最高, 而且差异显著, 分别为 74%、49% 和 69% (表 1)。在侵染时间方面, 东农 47 和垦农 18 经过 30 min 的浸染

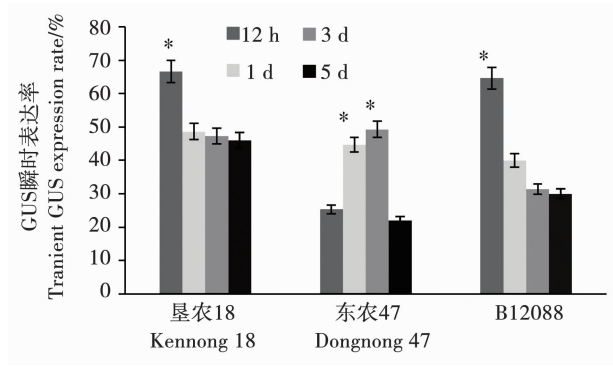


图2 不同萌发时间处理下大豆子叶节 *GUS* 基因瞬时表达率

Fig. 2 Transient expression rate of *GUS* gene in soybean cotyledonary nodes treated with different germination time

后, 转化效率达到最高; B12088 侵染 30 和 60 min 的 *GUS* 瞬时表达率没有显著差异 (表 1)。因此, 对于 3 个品种来说, 蘸取菌液切豆, 侵染时间 30 min 为最适条件。

表 1 不同处理条件下大豆子叶节 *GUS* 基因瞬时表达率

Table 1 Transient expression rate of *GUS* gene in soybean cotyledonary node under different treatment conditions

大豆品种 Soybean variety	处理条件 Treatment conditions	外植体数目 No. of explants	GUS + 外植体数 No. of GUS + explants	<i>GUS</i> 瞬时表达率 <i>GUS</i> transient expression rate/%
垦农 18 Kennong 18	不蘸取菌液	132	63	47.94 ± 9.02 a
	Not dip agrobacterium			
	蘸取菌液	118	99	84.29 ± 3.22 b
	Dip agrobacterium			
	侵染 30 min	118	97	82.27 ± 5.19 a
	Infection for 30 min			
东农 47 Dongnong 47	侵染 60 min	144	73	50.67 ± 4.80 b
	Infection for 60 min			
	不蘸取菌液	140	17	12.42 ± 5.67 a
	Not dip agrobacterium			
	蘸取菌液	149	48	32.31 ± 2.35 b
	Dip agrobacterium			
B12088	侵染 30 min	149	74	49.33 ± 10.91 a
	Infection for 30 min			
	侵染 60 min	149	45	30.00 ± 6.24 b
	Infection for 60 min			
	不蘸取菌液	158	72	45.81 ± 9.12 a
	Not dip agrobacterium			
	蘸取菌液	160	113	70.49 ± 2.82 b
	Dip agrobacterium			
	侵染 30 min	160	108	67.33 ± 8.45 a
	Infection for 30 min			
	侵染 60 min	160	103	64.67 ± 9.98 b
	Infection for 60 min			

不同小写字母表示处理间存在 5% 水平显著差异;GUS + 外植体表示外植体在 GUS 检测中被染色。下同。

Different lowercase indicate there was significant difference at the level of 5% between treatments; GUS + explant indicates that the explant was dyed in GUS expression assay. The same below.

2.3 共培养期间伤口最适朝向

暗培养的外植体 *GUS* 基因瞬时表达率高于光培养(表 2)。另外,3 个基因型大豆子叶节外植体伤口朝向对 *GUS* 基因瞬时转化效率的影响无显著差异(表 2)。但值得注意的是,子叶在染色程度上,

伤口朝向培养基(伤口朝下)的大豆子叶染色程度明显深于背向培养基(伤口朝上)的大豆子叶的染色程度(图 3)。共培养期间,暗培养和伤口朝向培养基处理更有利于大豆外植体 *GUS* 基因的瞬时表达。

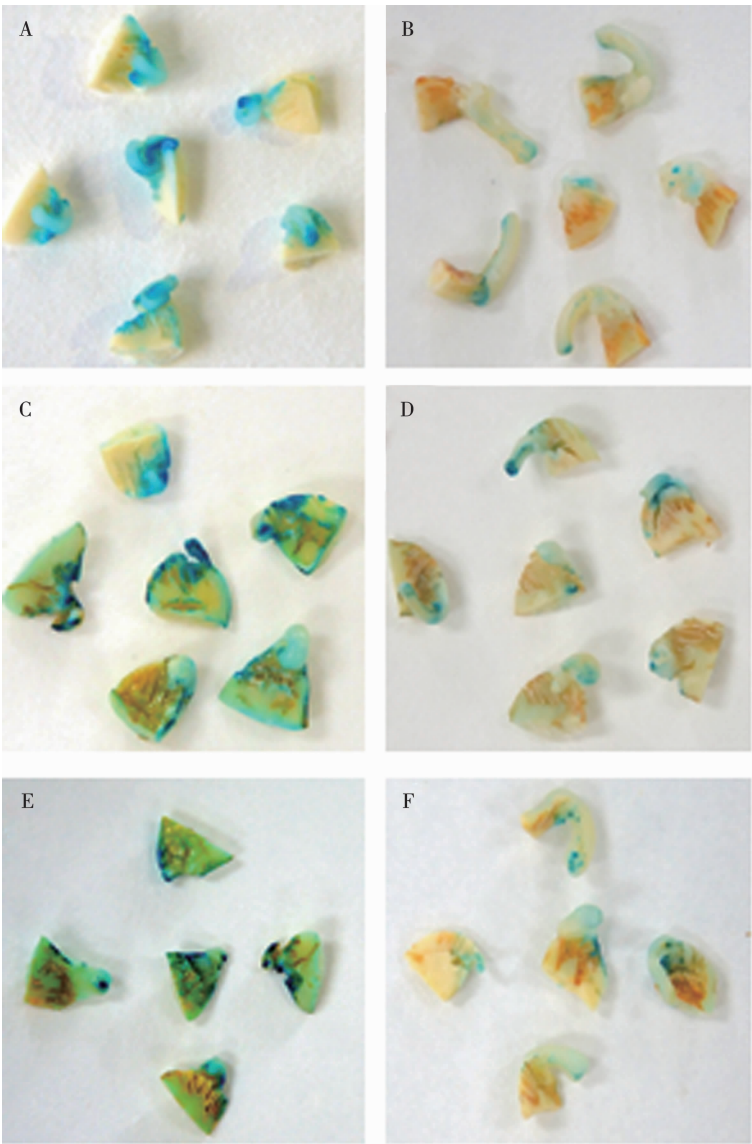
表 2 外植体不同摆放方式下 *GUS* 基因瞬时表达率

Table 2 Transient expression rate of *GUS* gene under different placement conditions of explants

大豆品种 Soybean variety	摆放方式 Placement mode	外植体数目 No. of explants	GUS + 外植体数 No. of GUS + explants	<i>GUS</i> 瞬时表达率 <i>GUS</i> transient expression rate/%
垦农 18 Kennong 18	暗培养伤口朝上	150	111	73.67 ± 6.81 a
	Wound-up dark culture			
	暗培养伤口朝下	150	123	82.00 ± 9.34 ab
	Wound-down dark culture			
	光培养伤口朝上	150	74	49.41 ± 2.40 c
	Wound-up light culture			
	光培养伤口朝下	118	55	46.33 ± 7.02 cd
	Wound-down light culture			

续表 2

大豆品种 Soybean variety	摆放方式 Placement mode	外植体数目 No. of explants	GUS + 外植体数 No. of GUS + explants	<i>GUS</i> 瞬时表达率 <i>GUS</i> transient expression rate/%
东农 47 Dongnong 47	暗培养伤口朝上 Wound-up dark culture	150	34	68.00 ± 7.21 a
	暗培养伤口朝下 Wound-down dark culture	150	117	77.67 ± 7.77 ab
	光培养伤口朝上 Wound-up light culture	150	57	38.00 ± 5.29 c
	光培养伤口朝下 Wound-down light culture	150	70	46.67 ± 5.03 cd
B12088	暗培养伤口朝上 Wound-up dark culture	150	107	71.45 ± 3.10 a
	暗培养伤口朝下 Wound-down dark culture	150	128	85.21 ± 6.15 ab
	光培养伤口朝上 Wound-up light culture	150	64	42.66 ± 6.11 c
	光培养伤口朝下 Wound-down light culture	160	98	61.23 ± 5.69 cd



A、B: 垦农 18；C、D: 东农 47；E、F: B12088；A、C、E: 伤口朝向培养基；B、D、F: 伤口背向培养基。
A, B: Kennong 18；C, D: Dongnong 47；E, F: B12088；A, C, E: The wound face to the medium；B, D, F: The wound back to the medium.

图 3 外植体在共培养期间不同摆放方式下 *GUS* 基因染色情况
Fig. 3 *GUS* gene staining of soybean explants in different placements during co-cultivation

2.4 大豆子叶节外植体最佳共培养时间

3 种不同基因型的大豆子叶节在 3 和 5 d 共培养处理后,无显著性差异(表 3)。因此,为缩短转化周期,外植体共培养 3 d 即可。

表 3 不同共培养时间大豆子叶节外植体 *GUS* 基因瞬时表达率

Table 3 Transient expression rate of *GUS* gene in soybean cotyledonary node explants during different co-cultivation time

大豆品种	共培养时间	外植体数目	GUS + 外植体数	<i>GUS</i> 瞬时表达率
Soybean variety	Co-culture time/d	No. of explants	No. of GUS + explants	<i>GUS</i> transient expression rate/%
垦农 18	3	150	137	91.33 ± 5.03 a
Kennong 18	5	150	122	81.66 ± 9.22 ab
东农 47	3	150	102	68.00 ± 2.00 a
Dongnong 47	5	140	112	80.00 ± 4.00 ab
B12088	3	150	126	84.00 ± 6.00 a
	5	150	122	81.33 ± 7.23 ab

2.5 筛选培养后丛生芽诱导率与 *GUS* 染色统计

经过 PPT 筛选,垦农 18、东农 47 和 B12088 的丛生芽诱导率分别为 86%、59% 和 77%,垦农 18 最高,东农 47 偏低。将丛生芽 *GUS* 染色,3 个品种的最合适的转化受体。

表 4 不同品种丛生芽诱导率和丛生芽 *GUS* 瞬时表达率的比较

Table 4 The comparison of shoots induction rate and transient expression rate of *GUS* in different cultivars

大豆品种	外植体数目	丛生芽数目	丛生芽诱导率	GUS + 丛生芽数	丛生芽 <i>GUS</i> 瞬时表达率
Soybean variety	No. of explants	No. of shoots	Shoots induction rate	No. of GUS + Shoots	<i>GUS</i> transient expression rate of shoots/%
垦农 18	85	73	85.88 ± 1.06 a	66	90.41 ± 1.17 a
Kennong 18					
东农 47	86	51	59.30 ± 2.14 b	46	90.19 ± 2.25 ab
Dongnong 47					
B12088	90	69	76.67 ± 1.31 c	64	92.28 ± 2.65 abc

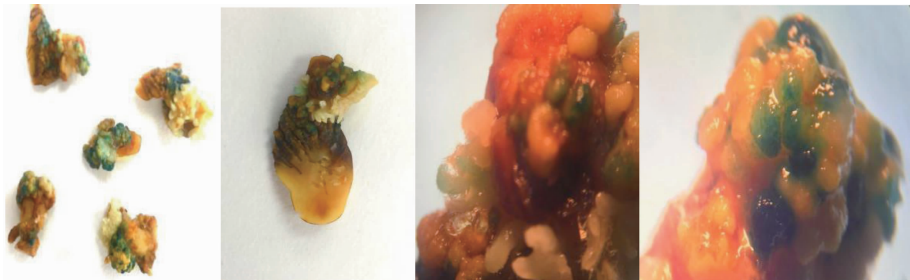


图 4 垦农 18 丛生芽 *GUS* 染色

Fig. 4 *GUS* staining of Kennong 18 shoots

3 讨论

农杆菌介导大豆子叶节转化具有转化操作简单、重复性较好、拷贝数少的优点,是大多数植物转化的最佳选择。同时也是大豆转化的优选方法^[12],约 85% 的转基因植物使用农杆菌介导的转化方法而获得^[14]。但是,此方法目前主要的瓶颈仍然是转化效率低,在操作时间上仍然是一种浪费。因此本研究通过改良萌发和共培养时间等条件来增强农杆菌的感染效率,为提高大豆的转化效率做出贡献。

随着近些年来研究人员对遗传转化体系的优化,种子萌发的最适时间的研究也不断推陈出新,由 Olhoft 等^[6-7]报道的 5~7 d 向 Li 等^[12]报道的 1 d

过渡。本研究结果显示,垦农 18 和 B12088 的最适萌发时间约为 12 h,且随着萌发时间的增加有下降的趋势,东农 47 的 *GUS* 基因瞬时表达表明 1 d 为最适宜的萌发时间。因此,每个品种有不同的最适萌发时间。结合近些年来研究人员的研究以及本研究结果,最适萌发时间大体呈现出减小的趋势,猜测较短的萌发时间是增加侵染效率的关键。切豆方式上,本研究对比蘸取菌液制造伤口的方式与不蘸取菌液的方式,3 个基因型的 *GUS* 基因的染色结果表明,蘸菌切豆的方式 *GUS* 基因瞬时转化效果显著高于不蘸菌切豆的方式,蘸菌切豆的方式可能将菌液在制造伤口的同时转入子叶伤口内,降低褐化对于侵染效率的影响,加大了侵染效率。

对侵染时间、共培养光暗处理和共培养时间的研究表明,3 个基因型均表现出了相同的规律,均以在侵染 30 min、暗处共培养、共培养 3~5 d 最为合适即 *GUS* 基因瞬间表达率较高。3 个处理的结果与前人^[9-10,15]研究的结果相接近,可应用于大多数的大豆遗传转化中,能取得较高的 *GUS* 基因瞬时表达率。

共培养期间子叶节摆放方式并没有太多的报道,以往的研究中子叶朝向的描述不尽相同,本研究对比伤口朝向培养基和朝向皿盖摆放的暗培养方式,结果显示 3 个基因型在染色率上无显著差异,均有较高的 *GUS* 基因瞬时表达率,但是值得关注的是在染色程度上,伤口朝下摆放的子叶染色程度明显高于相反的摆放方式。结果表明共培养期间子叶的伤口朝向培养基的放置更有利于遗传转化。

筛选培养基中 PPT 的浓度很大程度上决定伸长培养中伸长苗的阳性率,PPT 浓度过低会使未转有 *GUS* 基因的丛生芽成活,造成后期过多假阳性苗的出现,其浓度过高更不利于芽的伸长。本研究在 8 mg·L⁻¹ PPT 的筛选培养基中直接进行筛选培养,染色结果表明,在 8 mg·L⁻¹ PPT 的筛选压力下,呈现 90% 以上的 *GUS* 染色效率并有一定数目的芽伸长。因此,3 种不同基因型大豆选用 8 mg·L⁻¹ PPT 浓度可以在筛选阶段减少假阳性的出现,增强基因的瞬时表达,加快遗传转化的进程。

4 结 论

本研究以 3 种不同基因型的高油大豆品种的子叶节为外植体,以子叶节和丛生芽的 *GUS* 基因染色率为标准,优化大豆遗传转化。垦农 18 和 B12088 培养 12 h、东农 47 培养 1 d 的萌发时间最适宜。3 种基因型均以蘸取菌液切豆、菌液侵染 30 min、暗处共培养和子叶伤口朝向培养基放置染色情况较好,最适共培养时间为 3~5 d。同时在筛选阶段的培养基中加入 8 mg·L⁻¹ 的 PPT 对于筛选和后续伸长具有重要作用。增加农杆菌侵染效率的同时,较高的丛生芽的诱导率也会使转化效率得到改善。综合 3 个品种各处理的最适时间和方式与丛生芽诱导率,垦农 18 为 3 个品种中最佳的转化受体。本研究不仅优化了已有的农杆菌侵染大豆子叶节遗传转化方法,而且筛选出大豆遗传转化的较好受体材料垦农 18。

参考文献

[1] 王志坤,李文滨. 转基因科普系列—转基因大豆[J]. 大豆科

技, 2017(2):52-53. (Wang Z K, Li W B. Genetically modified popular science series-genetically modified soybeans[J]. Soybean Technology, 2017(2):52-53.)

[2] 常健敏,李丹丹, Arun S, 等. 转 SiDGAT1 高油大豆 T-3 株系的鉴定[J]. 作物杂志, 2014(5): 219-259. (Chang J M, Li D D, Arun S, et al. Identification of transgenic SiDGAT1 high oil soybean T-3 strain[J]. Crops, 2014(5):219-259.)

[3] Yang X. Analysis of the copy number of exogenous genes in transgenic cotton using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method[J]. African Journal of Biotechnology, 2012, 11(23), 6226-6233.

[4] Somers D A, Samac D A, Olhoft P M. Recent advances in legume transformation[J]. Plant Physiology, 2003, 131: 892-899.

[5] Hinchee M A, Connor Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using Agrobacterium-mediated DNA transfer[J]. Biotechnology, 1988, 6(8): 915-922.

[6] Olhoft P M, Flagel L E, Donovan C M. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method[J]. Planta, 2003, 216(5):723-735.

[7] Olhoft P M, Somer D A. L-cysteine increases Agrobacterium mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary node cells[J]. Plant Cell Reports, 2001, 20(8): 706-711.

[8] Xue R G, Xie H F, Zhang B. A multi-needle-assisted transformation of soybean cotyledonary node cells[J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(19):1551-1557.

[9] 陈李森,田星星,单志慧,等. 利用农杆菌介导法转化大豆子叶节的影响因素研究[J]. 大豆科学, 2012, 31(1):17-23. (Chen L M, Tian X X, Shan Z H, et al. Optimization of the factors affecting genetic transformation of soybean cotyledonary node mediated by agrobacterium tumefaciens[J]. Soybean Science, 2012, 31(1):17-23.)

[10] 翟锐,高乐,丁雪妮,等. 农杆菌介导大豆子叶节遗传转化体系的优化[J]. 大豆科学, 2015, 34(5):768-775. (Zhai R, Gao L, Ding X N, et al. Optimization of cotyledonary-node agrobacterium-mediated soybean transformation system[J]. Soybean Science, 2015, 34(5):768-775.)

[11] Dang W, Wei Z M. An optimized agrobacterium-mediated transformation for soybean for expression of binary insect resistance genes[J]. Plant Science, 2007, 173(4): 381-389.

[12] Li S X, Cong Y H, Liu Y P, et al. Optimization of agrobacterium-mediated transformation in soybean[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8:246.

[13] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. *GUS* fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. The EMBO Journal, 1987, 6(13): 3901-3907.

[14] 余永亮,梁慧珍,王树峰,等. 中国转基因大豆的研究进展及其产业化[J]. 大豆科学, 2010, 29(1): 143-150. (Yu Y L, Liang H Z, Wang S F, et al. Research progress and commercialization on transgenic soybean in China[J]. Soybean Science, 2010, 29(1): 143-150.)

[15] 应珊,何晓薇,王秀荣,等. 影响农杆菌介导的大豆转化效率的因素研究[J]. 分子植物育种, 2008, 6(1): 32-40. (Ying S, He X W, Wang X R, et al. Assessment of factors affecting the transformation efficiency of soybean cotyledonary-node agrobacterium-mediated transformation system [J]. Molecular Plant Breeding, 2008, 6(1): 32-40.)