

利用农杆菌介导法转化大豆子叶节的影响因素研究

陈李森^{1,2,3}, 田星星^{1,2}, 单志慧^{1,2}, 沙爱华^{1,2}, 李文滨³, 周新安^{1,2}

(1. 中国农业科学院 油料作物研究所, 湖北 武汉 430062; 2. 农业部油料作物生物学重点开放实验室, 湖北 武汉 430062; 3. 东北农业大学 国家教育部大豆生物学重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:以3个大豆品种为材料,采用GUS瞬时表达的方法,对适合于大豆子叶节和胚尖转化的基因型进行筛选,结果表明:适合大豆子叶节转化的品种为东农50,适合胚尖转化的品种为黑农41。在子叶节转化系统中,摸索了农杆菌侵染浓度与侵染时间的最佳配比组合、乙酰丁香酮浓度和超声波辅助处理对大豆转化效率的影响。优化后的条件为:农杆菌侵染的浓度 $OD_{600}=0.6$,侵染时间30~40 min,乙酰丁香酮浓度 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,超声波辅助转化时间5 s。在上述条件下,成功获得了转基因植株,转化效率为2.3%。

关键词:子叶节;胚尖;基因型;侵染浓度;侵染时间;乙酰丁香酮;超声波

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2012)01-0017-07

Optimization of the Factors Affecting Genetic Transformation of Soybean Cotyledonary Node Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

CHEN Li-miao^{1,2,3}, TIAN Xing-xing^{1,2}, SHAN Zhi-hui^{1,2}, SHA Ai-hua^{1,2}, LI Wen-bin³, ZHOU Xin-an^{1,2}

(1. Oil Crops Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Wuhan 430062, Hubei; 2. Key Laboratory of Oil Crop Biology, Ministry of Agriculture, Wuhan 430062, Hubei; 3. Key Laboratory of Soybean Biology, Ministry of Education, Soybean Research Institute, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: Three soybean genotypes were used for optimal genotype selection in transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. The influences of *A. tumefaciens* concentration, infection time, acetosyringone (AS) concentration and sonication treatment were studied in this research. As a result, the appropriate genotype for cotyledonary node transformation was Dongnong 50 while Heinong 41 was fit for embryo tip transformation. In the cotyledonary node transform system, the optimal infection combination was *A. tumefaciens* concentration at $OD_{600}=0.6$ with 30-40 min infection time. The perfect AS concentration was $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The appropriate sonicate treatment was 5 s under 100 W. The study optimized soybean cotyledonary-node *Agrobacterium*-mediated transformation system and transformation frequency was 2.3%.

Key words: Cotyledonary node; Embryonic tip; Genotype; *A. tumefaciens* concentration; Infection time; Acetosyringone; Sonication

大豆含有丰富的植物蛋白,可制作各种豆制品、提炼豆油,是一种十分重要的粮食作物和油料作物。但是干旱、病、虫害等不利因素会严重影响大豆的产量。由于传统育种方法周期长,效率低,在性状改良上具有一定的局限性,而转基因技术周期短,效率高,是改良大豆农艺性状的有效途径。因此,转基因技术得到了广泛的应用。虽然大豆的转基因技术已经取得了一定的进展,但遗传转化效率低仍然是大豆分子育种面临的主要问题。

目前大豆遗传转化的主要方法有农杆菌介导法、基因枪法、花粉管通道法等。其中农杆菌介导法最常用,该方法能够比较完整的将T-DNA以单拷贝或低拷贝形式插入到植物的基因组中,操作简单。但是,影响农杆菌介导转化大豆的因素有很

多,包括受体基因型、农杆菌菌株、外植体的选择、转化过程中的农杆菌浓度、侵染时间、乙酰丁香酮(AS)、抗氧化剂以及激素种类等。

1988年,Hinchee等^[1]从100多个品种中选出了对农杆菌反应最佳的品种Peking。2000年,Donaldson等^[2]使用了12个大豆品种,而只从品种Accolibri得到了遗传稳定的转基因植株。Meurer等^[3]发现农杆菌菌株KYRT1的转化效果优于过去常用的EHA105和LBA4404。Dang等^[4]研究了3种农杆菌菌株的侵染效率,发现KYRT1和EHA105都有很高的侵染效率,并且优于LBA4404。Olhoft等^[5,6]在共培养基中添加L-半胱氨酸等抗氧化剂降低了大豆组织的褐化现象,提高农杆菌对子叶节区的侵染效率,进而使转化效率平均提高到16.4%。

收稿日期:2011-10-19

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX08004-005);中国农业科学院公益性院所科研基金(1610172011005)。

第一作者简介:陈李森(1983-),女,博士,研究方向为大豆生物技术,大豆分子克隆与遗传转化。E-mail:ccllmm_008@yahoo.com.cn。

通讯作者:周新安(1963-),男,研究员,博士,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:xazhou@public.wh.hb.cn。

2006年, Xue等^[7]以品种 *Jungery* 为受体, 采用多针法对子叶节造成伤口进行转化, 转化效率可提高到12%。这是目前2例用子叶节做外植体转化最为成功的报道。2004年 Liu等^[8]首次以胚尖做外植体转化大豆获得了转基因植株, 转化效率达到15.8%。以农杆菌介导法转化大豆子叶节和胚尖2种外植体, 转化效率受到基因型、农杆菌菌株、抗氧化剂等多种条件的影响。

乙酰丁香酮(AS)是影响作物遗传转化的重要物质之一, 在大豆遗传转化过程中发现, 添加一定量的乙酰丁香酮可以使 *vir* 基因的表达能力大大增强, 促进 T-DNA 的转移, 提高大豆的转化效率^[9]。李茂福等^[10]的研究表明, 适宜浓度的 AS 可以提高大豆的转化效率。薛仁镐等^[11]在研究大豆萌动种子转化时, 在共培养基中添加 0、50、100、200、400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 AS, 发现随着乙酰丁香酮浓度的增加, *GUS* 瞬时表达效率逐渐提高, 乙酰丁香酮浓度为 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最高。

超声波辅助农杆菌介导法 (Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation, SAAT) 是一种成本低, 操作简单的技术, 该方法将农杆菌介导法与超声波直接转导法相结合, 可有效的提高植物的转化效率。1997年 Trick等^[12]首次采用此方法将外源基因成功转入大豆。赵桂兰等^[13]通过 SAAT 法处理大豆未成熟胚, 大大增强了其 *GUS* 蓝色反应的信号强度, 进而提高了转化率。

该文根据 CaMV35S: *GUS* 基因的瞬时表达情况来研究大豆转化效率的影响因素, 通过统计分析筛选了适合大豆子叶节和胚尖转化的基因型。在子叶节转化系统中, 研究了农杆菌浓度与侵染时间的最佳组合配比, 乙酰丁香酮的浓度, 超声波处理辅助农杆菌转化等对大豆再生芽的生长点侵染效率的影响, 为优化大豆子叶节遗传转化系统提供一定的技术支持。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 植物材料 大豆品种东农 50、天隆一号和黑农 41。其中东农 50 由东北农业大学大豆研究所惠赠, 黑农 41 由黑龙江省农业科学院大豆研究所惠赠, 天隆一号为中国农业科学院油料所育成。

1.1.2 质粒和菌株 采用质粒 pCambia 3301 (图 1), 该质粒带有 *GUS* 报告基因, 以及草胺膦抗性基因。启动子为 CaMV35S, 用于侵染大豆的农杆菌菌株为 EHA105, 均由实验室提供。

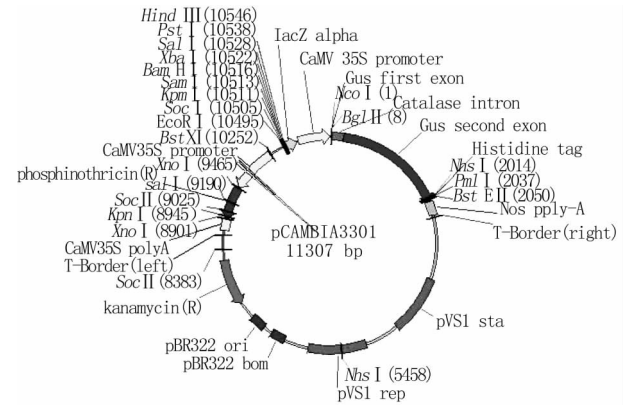


图 1 pCambia3301 图谱

Fig. 1 The map of pCambia3301

1.1.3 培养基 萌发培养基 (GM): B5 培养基; 共培养培养基 (CCM): 1/10 B5 培养基 (pH 5.4) + 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AS + 154 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT + 158 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Sodium thiosulfate + 1 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ L-cys + 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GA₃ + 1.67 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA; 诱导培养基 (SIM): B5 培养基 + 1.67 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA + 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ timentin + 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ cefotaxime; 筛选培养基 (SIM +): SIM + 5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ glufosinate-ammonium。

1.2 试验方法

1.2.1 大豆子叶节和胚尖转化方法中基因型的选择 大豆消毒方法为氯气熏蒸, 取表面光滑无病斑的大豆成熟种子, 放入含有 30% NaClO/20% HCl (24:1), HCl 稍过量的滤器中消毒 12 h 后, 种脐向下接种到萌发培养基 (GM) 中, 在光照 26°C、16 h 光照/8 h 黑暗条件下培养 5~7 d。分别参考 Olhoft 等^[6]和 Liu 等^[8]的方法切取并侵染大豆的子叶节和胚尖外植体。取东农 50、天隆一号和黑农 41 共培养 3 d 后的外植体, 用无菌水洗 3 次, 放在滤纸上吸干残留的水分, 进行 *GUS* 染色, *GUS* 染色按 Jefferson 等^[13]的方法进行。

1.2.2 大豆子叶节乙酰丁香酮 (AS) 最佳浓度的确定 以东农 50 为受体, 在共培养基中分别添加 0、50、100、150、200、300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6 个不同浓度的 AS, 每个浓度侵染 30 个外植体, 共培养 3 d 后进行 *GUS* 染色。

1.2.3 大豆子叶节最佳菌液侵染浓度以及侵染时间的确定 以东农 50 为受体, 侵染液和共培养基中乙酰丁香酮浓度为 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 分别将菌液浓

度调至 OD₆₀₀ 为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 共 5 个浓度梯度进行侵染,侵染时间分别设置 10、20、30、40、60 min 5 个梯度,共 25 个组合。

1.2.4 超声波处理对大豆转化效率的影响 以东农 50 为受体,侵染液和共培养基中乙酰丁香酮浓度为 200 μmol·L⁻¹,将子叶节浸泡在侵染液中,分别用超声波处理 0、5、10、20、30、40、60、120 s,功率为 100 W,每个浓度侵染 25 个外植体,转入摇床 200 r·min⁻¹,悬浮 30~40 min 后转入共培养培养基,共培养 3 d 后进行 GUS 染色。

1.2.5 GUS 组织化学染色 按 Jefferson 等^[14]的方法进行 GUS 染色,染色时间为 24 h,在实体显微镜下观察 GUS 瞬时表达情况,根据 GUS 基因的瞬时表达计算 GUS 瞬时表达率。GUS 瞬时表达率 = (GUS 基因瞬时表达的外植体数/外植体总数) × 100%。

1.2.6 大豆子叶节的遗传转化方法 菌液制备:挑取农杆菌单菌落接种于含 Kan 和 Rif 的 YEP 液体培养基中,28℃,200 r·min⁻¹ 培养过夜,然后吸取少量菌液转至 100 mL 新鲜的上述 YEP 液体培养基中摇至 OD₆₀₀ = 0.8,菌体于 4 000 r·min⁻¹,离心 10 min 后重悬于感染液中,OD₆₀₀ 调整至 0.6。

大豆子叶节的制备:将萌发培养 5~7 d 的无菌苗取出去掉种皮,切去大部分的下胚轴,只留靠近子叶的 3~5 mm 下胚轴,将 2 片子叶从下胚轴中线处切开,除去顶芽,得到子叶节外植体。用解剖刀在子叶与胚轴交接处直径约 3 mm 的范围内划 3~5 刀。由此每个无菌苗可得到 2 个用于转化的子叶节外植体。

转化:将制备好的子叶节外植体放入重悬后的感染液中,在 28℃ 恒温摇床中 200 r·min⁻¹ 悬浮 30~40 min 后,倒掉菌液,将外植体放入铺有无菌滤纸的大培养皿内,吸掉多余的菌液。然后将外植体近轴面朝下接种在铺有一层无菌滤纸的共培养培养基上,黑暗条件下共培养 3 d。然后将外植体转入无菌三角瓶中,先用无菌水中洗 2~3 次,再在液体芽诱导培养基中洗 2~3 次,将下胚轴插入固体芽诱导培养基中恢复培养 7 d。然后转入含有 5 mg·L⁻¹ PPT 的筛选培养基中,每 7 d 继代 1 次,28 d 后,将抗性芽进行嫁接,获得转基因植株。

1.2.7 转基因植株的 PCR 检测 采用 SDS 法提取大豆叶片的 DNA,人工设计 GUS 基因引物,引物序列:上游引物 5'-CGGCAAAGTGTGGGTC AAT-3',下游引物,5'-AAGGTAATGCGAGGTACGGT-3'。反应体系为 20 μL,PCR 扩增条件为 94℃ 预变性 4 min,94℃ 变性 45 s,55℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min,30 个循环,72℃ 终延伸 10 min。扩增的 GUS 基因片段大小为 750 bp。

1.2.8 转基因植株的 GUS 表达 取嫁接成活的转化植株叶片,放入 2 mL 的管中,加入适量染色液,37℃ 温育 24 h,显微镜下观察 GUS 染色情况。

1.3 数据分析

使用软件 SPSS 17.0 对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 大豆子叶节和胚尖转化方法中基因型的选择

在子叶节转化方法中,东农 50 的 GUS 阳性率

表 1 不同大豆品种对大豆子叶节和胚尖转化效率的影响

Table 1 The influence of genotype on the efficiency of cotyledonary node and embryonic tip transformation

转化方法 Transformation method	大豆基因型 Soybean genotype	外植体数 No. of explants	GUS ⁺ 外植体数 No. of GUS ⁺ explants	GUS 瞬时表达率 GUS transient expression rate/%
子叶节转化法 Cotyledonary node transformation	东农 50 Dongnong50	41	28	68.3 ± 1.26a
	天隆一号 Tianlong NO. 1	41	18	43.9 ± 0.72c
	黑农 41 Heinong41	41	20	48.8 ± 0.75b
胚尖转化法 Embryonic tip transformation	东农 50 Dongnong50	40	16	40.0 ± 2.50b
	天隆一号 Tianlong NO. 1	41	17	41.5 ± 1.32b
	黑农 41 Heinong41	41	28	68.3 ± 2.06a

表中数据为 3 个重复的平均值,同列标以不同小写字母者差异达 5% 显著水平。

Values are means of three replicates. Values within a column followed by different lowercase letters are significantly different at 5% probability level.

高达 68.8%, *GUS* 染色信号最强(图 2), 而天隆一号和黑农 41 *GUS* 阳性率相对较低, 分别为 43.1% 和 48.4%。胚尖转化法中 *GUS* 阳性率最高的为黑农 41, 达到 68.1%, 染色信号最强(图 3)。天隆一号次之, 东农 50 较低, 但二者相差不大。试验同时研究了在筛选的不同生长时期胚尖的 *GUS* 表达情况, 结果发现经过筛选的胚尖的抗性芽多数都是呈阳性的, 但是伸长的叶片并没有全部着色, *GUS* 基因主要在叶柄和叶脉处表达(图 4)。

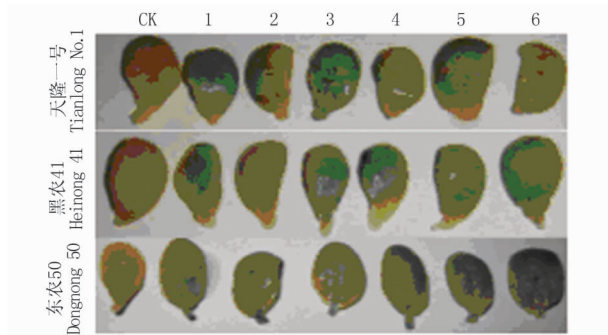


图 2 不同大豆基因型子叶节转化后的 *GUS* 表达
Fig. 2 The *GUS* expression in infected cotyledonary-node of different soybean genotypes

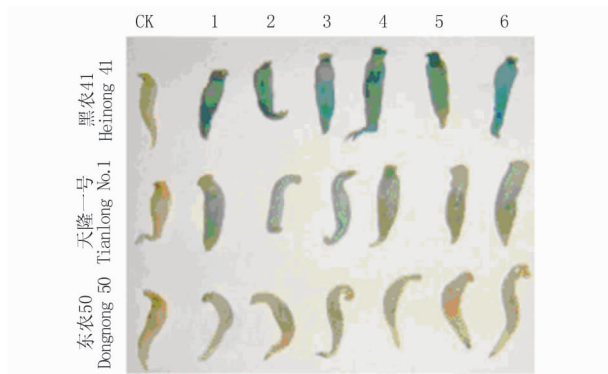


图 3 不同大豆基因型胚尖转化后的 *GUS* 表达
Fig. 3 The *GUS* expression in infected embryonic tips of different soybean genotypes

2.2 不同浓度 AS 对大豆转化效率的影响

在共培养基中添加不同浓度的 AS, *GUS* 染色结果表明, 随着 AS 浓度的增加, *GUS* 表达率逐渐升高, 当浓度为 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 达到最高, 均值为 69.1%。超过 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 表达率又下降(图 5), 说明大豆转化的最佳 AS 浓度为 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3 超声波处理对大豆转化效率的影响

转化时, 将子叶节进行不同时间的超声波处理后, *GUS* 染色结果显示, 随着处理时间的增加, *GUS* 阳性率先升高后降低, 超声波处理 5 s 时最高, 均值

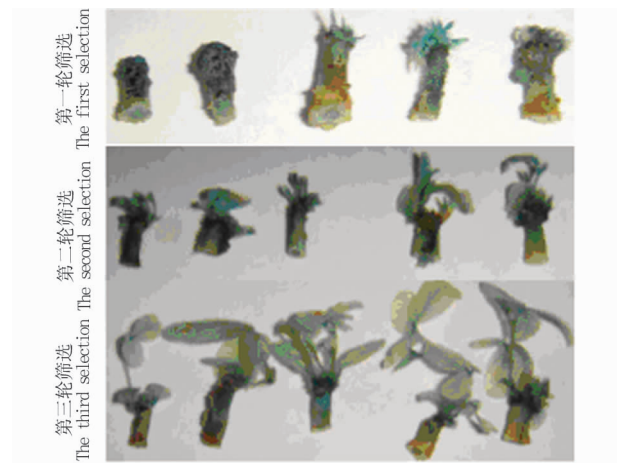


图 4 在不同筛选阶段转化后胚尖的 *GUS* 表达

Fig. 4 The *GUS* expression in embryonic tips at different selection stage

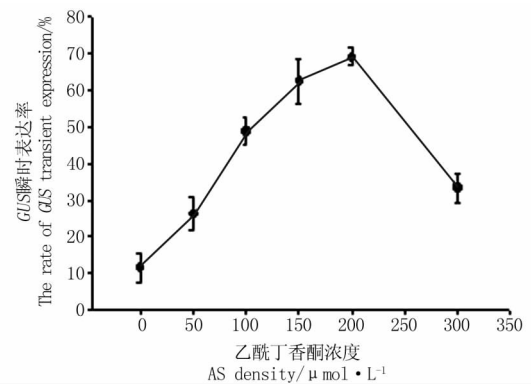


图 5 不同浓度的 AS 处理对 *GUS* 瞬时表达率的影响

Fig. 5 The *GUS* transient expression in cotyledonary-node under different acetosyringone density treatment

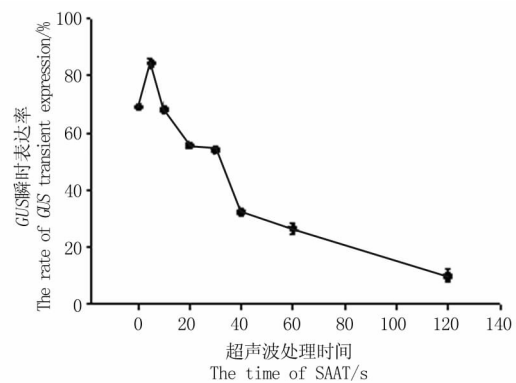


图 6 不同超声波处理时间对 *GUS* 瞬时表达率的影响

Fig. 6 The *GUS* transient expression in cotyledonary-node under different treatment time

为 84.4%(图 6)。说明一定时间的超声波辅助处理可以进一步提高大豆的转化效率。

2.4 大豆子叶节最佳菌液侵染浓度以及侵染时间的确定

试验在不同菌液侵染浓度和侵染时间下, 对

GUS 阳性率进行方差分析(表 2),并研究了这 2 个因素的交互作用对 *GUS* 阳性率的影响。结果表明,当 OD₆₀₀ 为 0.6,侵染时间为 30 min 时,子叶节区的

GUS 阳性率最高,达到 69.2%,侵染 40 min 时的 *GUS* 阳性率也高达 68.2%,二者相差不大,但都显著高于其它组合(表 3)。

表 2 不同菌液浓度和侵染时间下 *GUS* 阳性率的方差分析

Table 2 Analysis of variance for percentage of *GUS* positive under different *Agrobacterium* suspension density with different infection time

变异来源 Source	Type III sum of squares	DF	Mean square	F
侵染浓度 × 时间 <i>Agrobacterium</i> concentration × infection time	0.577	16	0.036	826.595 **
侵染浓度 <i>Agrobacterium</i> concentration	0.751	4	0.188	4303.169 **
侵染时间 infection time	0.159	4	0.040	907.903 **
误差 Error	0.002	50	4.365E-5	
总变异 Total variation	11.392	75		

表 3 不同菌液侵染浓度和侵染时间组合对 *GUS* 阳性率的影响

Table 3 Effect for percentage of *GUS* positive under different *Agrobacterium* suspension density with different infection time

侵染时间	侵染浓度	<i>GUS</i> 阳性率	标准误差
Infection time/min	OD ₆₀₀	<i>GUS</i> ⁺ rate/%	Std. error
10.00	0.20	19.1	0.004
	0.40	22.2	0.004
	0.60	42.3	0.004
	0.80	43.2	0.004
	1.00	25.5	0.004
20.00	0.20	22.3	0.004
	0.40	24.3	0.004
	0.60	49.8	0.004
	0.80	57.3	0.004
	1.00	25.8	0.004
30.00	0.20	22.2	0.004
	0.40	35.2	0.004
	0.60	69.2	0.004
	0.80	48.2	0.004
	1.00	45.1	0.004
40.00	0.20	36.2	0.004
	0.40	28.3	0.004
	0.60	68.2	0.004
	0.80	35.3	0.004
	1.00	22.3	0.004
60.00	0.20	41.0	0.004
	0.40	37.4	0.004
	0.60	28.9	0.004
	0.80	40.4	0.004
	1.00	18.6	0.004

2.5 大豆子叶节转化流程

试验采用农杆菌介导的子叶节转化方法,分别经过大豆种子萌发、子叶节与农杆菌菌液共培养、重生芽的诱导及筛选,最后嫁接成苗,获得转基因植株(图 7)。

2.6 转基因大豆植株的 PCR 检测

取嫁接成活的植株叶片,提取 DNA 后,进行

GUS 基因的 PCR 分析,结果表明转化的 85 个大豆外植体嫁接成苗后,有 2 株成功扩增出 *GUS* 基因片段,大小约为 750 bp,如图 8 所示。

2.7 转基因植株的 *GUS* 染色

将 PCR 检测呈阳性的植株进行 *GUS* 染色,发现 *GUS* 基因在大豆叶片中有表达(图 9),并且 *GUS* 蓝色信号位于叶脉附近(左图)、叶尖以及叶毛处(右图)。

3 讨论

在农杆菌侵染过程中,子叶、胚轴、子叶节区均会受到侵染而产生报告基因的表达,但是只有子叶节区是大豆的可再生部分,能够诱导出再生芽。因此,该研究以子叶节区的 *GUS* 表达来统计农杆菌的侵染效率。该研究选择 pCAMBIA 3301 作为目标载体,是因为该载体上的 *GUS* 基因带有内含子,只在植物细胞中表达,而在农杆菌中不表达,理论上可以避免附着在外植体上的农杆菌菌液的干扰,并且在 *GUS* 染色前用无菌水反复清洗外植体,尽可能的去除外植体上的菌液,可以进一步消除农杆菌的影响。

基因型是影响农杆菌介导大豆转化的重要因素之一,对于不同的转化系统,选择合适的基因型尤为重要,该试验研究了大豆子叶节和胚尖 2 种转化系统,发现在子叶节转化系统中,东农 50 的 *GUS* 阳性率显著高于黑农 41 和天隆一号,而在胚尖转化系统中,黑农 41 的 *GUS* 阳性率最高。这说明不仅不同的大豆品种在同一种转化系统中对农杆菌的敏感性不同,而且相同的大豆品种在不同的转化系统中转化效率也具有差异。但是对于 2 种转化

系统而言,各有优势,该文以子叶节转化系统为主,进行后续的大豆遗传转化研究。

农杆菌的浓度和侵染时间直接影响了 T-DNA 向植物细胞转移的机率。农杆菌生长到对数期时活力最高、侵染能力最强。侵染时间也是影响转化效率的一个重要因素^[15]。侵染时间过短,农杆菌不能充分吸附到外植体上,使得 T-DNA 不能有效地转移,从而降低了转化效率;相反,如果农杆菌侵染时

间过长,由于农杆菌过度繁殖而造成抑菌困难或因农杆菌毒性过强而使外植体褐化死亡,二者均可导致转化效率下降。因此,对侵染时间进行研究,确定最佳侵染时间是十分必要的。该研究的结果表明,当农杆菌 OD₆₀₀ 为 0.6,侵染时间以 30 ~ 40 min 的配比组合最佳。试验采用的侵染浓度比李文霞等^[16]报道的结果略高,这可能是由于选用的基因型不同造成的。

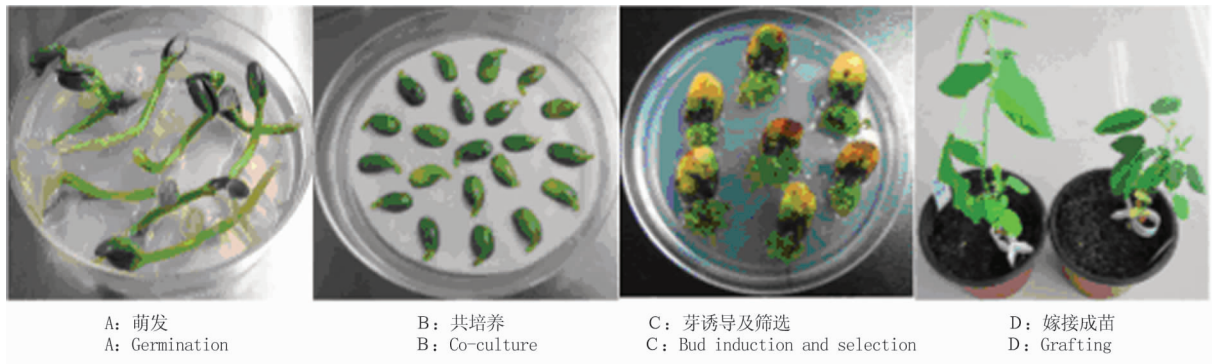
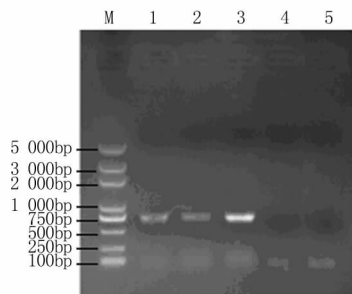


图7 子叶节转化流程示意图

Fig. 7 The process of soybean cotyledonary node transformation



M; DNA 分子量标准; 1-2: 转化植株; 3: 质粒 Pcambia3301 (阳性对照); 4: 未转化植株 (阴性对照); 5: 水对照

M; DNA marker; 1-2: Transformed plants; 3: Pcambia3301 plasmid DNA (positive control); 4: Untransformed plant (negative control); 5: Water control

图8 转基因大豆植株的 PCR 检测

Fig. 8 PCR analysis of transformed plants

乙酰丁香酮 (AS) 是双子叶植物细胞壁合成的前体, 单子叶植物转化时不产生 AS, 在转化过程中添加 AS 能够促进农杆菌转化单子叶植物, 而双子叶植物由于外植体受创伤后就会有酚类物质形成, 因而不必外加酚类物质就可以产生转化, 不过加入适量的 AS 会提高双子叶植物的转化效率。AS 的添加之所以会提高转化效率是因为其可诱导农杆菌 *Vir* 基因的活化, 可以部分克服农杆菌介导大豆转化的组织特异性, 是农杆菌介导的大豆转化成功的重要因素^[7,17], 从而有利于外源基因整合到植物的基因组中。该试验结果表明, 添加 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的乙酰丁香酮能够更有效提高大豆的转化效率, 这与薛仁镐等^[11]的研究结果相一致。

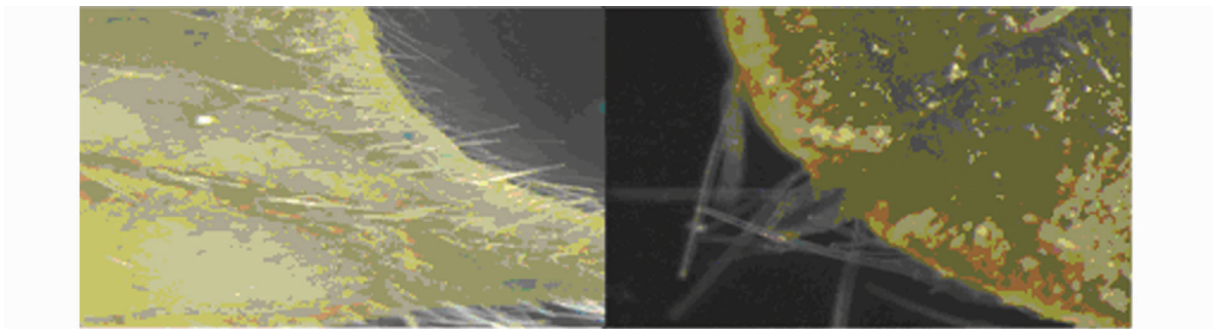


图9 转基因大豆叶片的 GUS 组织化学染色

Fig. 9 GUS expression in transformed soybean leaves

超声波辅助农杆菌转化的方法已经在多种植物中逐渐应用,其原理是通过超声波处理,在植物的表面和内层组织造成数以千计的微小伤口,使农杆菌更易进入到组织中,提高侵染植物细胞的可能性。该试验结果表明,在 100 W 条件下,超声处理 5 s 的转化效率最高。有研究表明,不同功率对转化效率也有很大影响^[18],因此有必要探讨功率与时间的最佳组合。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Donaldson 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.
- [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] 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.
- [5] Olhoft P M, Somers D A. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells [J]. *Plant Cell Reports*, 2001, 20:706-711.
- [6] 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, 5:723-735.
- [7] 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.
- [8] Liu H K, Yang C, Wei Z M. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system [J]. *Planta*, 2004, 219(6):1042-1049.
- [9] 董喜才, 杜建中, 王安乐, 等. 乙酰丁香酮在植物转基因研究中的作用 [J]. *中国农学通报*, 2011, 27(5):292-299. (Dong X C, Du J Z, Wang A L, et al. Role of acetosyringone in plants transformation researcher [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(5):292-299.)
- [10] Li M F, Li R, Fu Y F, et al. Influencing factors on the efficiency of *Agrobacterium*-mediated soybean transformation [J]. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 2006, 25(4):283-286.
- [11] 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 Sciences*, 2008, 36(7):2666.
- [12] Trick H N. SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation [J]. *Transgenic Research*, 1997, 6:329-336.
- [13] 赵桂兰, 李望丰, 刘莉, 等. 超声波辅助农杆菌介导法在大豆转化上的研究 [J]. *中国生物工程学会第三次全国会员代表大会暨学术讨论会论文摘要集*, 2001. (Zhao G L, Li W F, Liu L, et al. Application of Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation (SAAT) in soybean [C]. *Abstracts of the Third Symposium of Chinese Society of Biotechnology*, 2001.
- [14] 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 EMBO Journal*, 1987, 6(13):3901-3907.
- [15] 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 Organ Culture*, 1999, 56:37-46.
- [16] 李文霞, 宁海龙, 吕文河, 等. 农杆菌介导大豆子叶节转化系统的优化 [J]. *中国农业科学*, 2008, 41(4):971-977. (Li W X, Ning H L, Lü W H, et al. Optimization of the *Agrobacterium*-mediated transformation systems of soybean cotyledonary node [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(4):971-977.)
- [17] Xue R G, Zhang B, Xie H F. Overexpression of a NTR1 in transgenic soybean confers tolerance to water stress [J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2007, 89:177-183.
- [18] 杜鹃, 赵峰, 曹越平. 超声波辅助农杆菌介导转化大豆 *gus* 基因在不同外植体中的瞬时表达 [J]. *上海交通大学学报*, 2010, 28(5):339-441. (Du J, Zhao F, Cao Y P. Effects of sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation (SAAT) on transient expression of *gus* gene in explants of soybean [J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University*, 2010, 28(5):339-441.)