

# 不同大豆基因型对农杆菌敏感性研究及优异种质筛选

郭兵福<sup>1,2</sup>, 马岩松<sup>1,2,3</sup>, 张丽娟<sup>2</sup>, 洪慧龙<sup>1,2</sup>, 常汝镇<sup>2</sup>, 郭勇<sup>2</sup>, 邱丽娟<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030; <sup>2</sup>中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京 100081; <sup>3</sup>黑龙江省农业科学院大豆研究所, 哈尔滨 150086)

**摘要:**大豆遗传转化一直是植物基因工程领域的难点之一, 受体品种对农杆菌的敏感程度以及不同农杆菌菌株对靶组织的侵染能力是影响转化效率的主要因素。本研究利用 GUS 组织瞬时表达技术, 比较了 4 个农杆菌菌株对靶组织子叶节的侵染能力差异, 同时利用筛选到的侵染能力最强的菌株评估了 33 个不同受体基因型对农杆菌的敏感性。结果表明, 超毒农杆菌菌株 Ag10 对靶组织的侵染能力最强, 优于其他 3 个菌株; 地方与野生大豆种质在农杆菌侵染后 GUS 的平均瞬时表达效率显著高于选育品种。此外, 通过鉴定筛选出 6 个对农杆菌敏感性较高的受体材料, 其对农杆菌的敏感性优于前人报道的敏感材料 Peking, 为大豆高效遗传转化体系的建立和新型转化受体的开发提供了参考。

**关键词:**大豆; 农杆菌; 敏感性; GUS 染色

## Assessment of *Agrobacterium* Sensitivity for Different Soybean Genotypes and Suitable Germplasm Screening

GUO Bing-fu<sup>1,2</sup>, MA Yan-song<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Li-juan<sup>2</sup>,

HONG Hui-long<sup>1,2</sup>, CHANG Ru-zhen<sup>2</sup>, GUO Yong<sup>2</sup>, QIU Li-juan<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030; <sup>2</sup> The National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement/Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

<sup>3</sup> Soybean Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

**Abstract:** Soybean is a widely planted transgenic crop all over the world. However, it is still one of the most recalcitrant crops for genetic transformation due to the genotype dependence and the hard infection. In this study, the GUS transient expression technology was used for evaluating infection ability of four *Agrobacterium* strains and the *Agrobacterium* sensitivity of 33 different soybean genotypes. The highest transient expression efficiencies of two soybean genotypes were all acquired when the explants were infected by *Agrobacterium* strain Ag10. Meanwhile, *Agrobacterium* sensitivities of 33 soybean accessions including modern cultivars, landrace and wild soybeans were assessed and six sensitive accessions were identified when compared with a sensitive control Peking. The results also revealed that the *Agrobacterium* sensitivities of landrace or wild soybeans were significant higher than that of modern cultivars. These findings are important to construct or improve the high - efficiency genetic transformation system and develop new receptors for high efficiency genetic transformation in soybean.

**Key words:** soybean; *Agrobacterium*; sensitivity; GUS staining

大豆 (*Glycine max*) 是重要的粮食和经济作物, 是植物蛋白和食用植物油的主要来源, 也是最早大面积商业化种植以及目前种植面积最大的转基因作

物。自 1996 年转基因大豆首次商业化种植以来, 全球转基因作物种植面积持续增加, 至 2013 年转基因作物种植总面积已超过 1.75 亿 hm<sup>2</sup>, 其中转基因大

收稿日期: 2015-01-07 修回日期: 2015-01-26 网络出版日期: 2015-04-22

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150422.1358.010.html>

基金项目: 抗除草剂转基因大豆新品种培育重大专项(2014ZX08004001)

第一作者研究方向为大豆转基因技术及种质资源创新。E-mail: gbfhq@163.com

通信作者: 邱丽娟, 研究方向为大豆基因资源发掘。E-mail: qiulijuan@caas.cn

郭勇, 研究方向为大豆分子遗传学。E-mail: guoyong@caas.cn

豆种植面积达 8450 万  $\text{hm}^2$ , 约占 48%, 转基因技术已成为农业近代史上应用发展最快的生物技术<sup>[1-2]</sup>。大豆虽起源于我国, 但国内大豆年产量仅为 1300 万~1500 万 t, 约占世界大豆年产量的 6%。消费需求的不断增加导致国内大豆生产供不应求, 我国不得不从国外进口转基因大豆且进口总量连年攀升, 近年来进口的转基因大豆已超过年消费量的 80%, 因此迫切需要通过转基因技术提升国产大豆的综合竞争能力<sup>[3-6]</sup>。

尽管转基因大豆是商业化最早、应用最广的转基因作物, 但大豆遗传转化技术依然是植物基因工程领域的难点之一, 转化效率低和再生植株困难是限制大豆遗传转化的主要瓶颈<sup>[7]</sup>。当前的大豆转基因技术体系主要有农杆菌介导法和基因枪法, 其中农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化技术体系是应用最广、转化效率较为稳定的方法。该体系自 M. A. W. Hinchee 等<sup>[8]</sup> 1988 年建立以来, 体系改良与优化研究常见报道, 但遗传转化效率低和转基因体系不够稳定等问题依然未得到有效的解决, 基因型依赖严重是抑制农杆菌介导大豆转基因技术发展的最主要屏障<sup>[9]</sup>。

双子叶植物虽是农杆菌的天然宿主, 且经改良后的根癌农杆菌几乎能侵染所有的双子叶植物, 但大豆对农杆菌敏感性仍较差<sup>[10]</sup>。农杆菌菌株是影响大豆遗传转化效率的主要因素之一, 常用于大豆转化的菌株主要有 LBA4404、EHA101、EHA105 等<sup>[11]</sup>。王连铮<sup>[12]</sup> 选用 15 个农杆菌菌株对 2759 个大豆品种进行筛选, 发现不同的农杆菌菌株对大豆的侵染能力差异很大, 不同菌株所含 Ti 质粒的差异性是导致其转化能力差异的主要原因。一般而言, 胭脂碱型 Ti 质粒的侵染能力要强于章鱼碱型的 Ti 质粒<sup>[13]</sup>。

高效遗传转化受体基因型的筛选是提高大豆转基因效率的重要途径, M. A. W. Hinchee 等<sup>[8]</sup> 和 E. C. Dean<sup>[14]</sup> 对不同大豆品种对农杆菌的敏感性进行筛选, 发现只有 Peking 对农杆菌较敏感。Z. Y. Song 等<sup>[15]</sup> 从 22 份常规大豆栽培品种中筛选出天隆 1 号对农杆菌较敏感并用该品种构建转基因体系获得转基因植株。然而目前对基因型筛选的研究多数局限于选育品种, 地方品种或 1 年生野生大豆等对农杆菌敏感性研究较少。本研究以国内外报道的易转化品种和对农杆菌敏感品种为对照, 以 GUS 基因瞬时表达效率为指标, 系统评价了不同农杆菌菌株的侵染能力差异以及 33 份不同类型的大豆种质对农杆

菌的敏感性, 为农杆菌介导大豆遗传转化受体基因型的发掘和转基因体系的优化提供了参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**1.1.1 植株材料** 本研究共选用 33 份大豆种质用于试验, 其中选育品种(系) 19 份、地方品种 12 份、野生大豆 2 份(表 1), 这些种质均由中国农业科学院作物科学研究所国家作物种质库提供。其中 Peking 为已报道的对农杆菌较敏感的种质, 天隆 1 号和 Jack 是国内外已报道的较易转化的受体品种。

表 1 33 份参试大豆种质的名称、类型

Table 1 General information of 33 soybean accessions used in this study

序号 No.	种质名称 Name of accessions	统一编号 Uniform code	资源类型 Types
1	Peking	WDD00467	地方品种
2	Jack	WDD01579	选育品种
3	天隆 1 号	ZDD24847	选育品种
4	中品 95-5117	ZDD23895	选育品种
5	中品 03-5373	-	选育品种
6	中品 03-5368	-	选育品种
7	中黄 13	ZDD23876	选育品种
8	中黄 10 号	ZDD23873	选育品种
9	郑 92116	ZDD23277	选育品种
10	文丰 7 号	ZDD02611	选育品种
11	铁丰 8 号	ZDD00738	选育品种
12	绥农 20	ZDD23684	选育品种
13	绥农 14	ZDD22648	选育品种
14	商 951099	ZDD23269	选育品种
15	齐茶豆 2 号	ZDD24039	选育品种
16	冀豆 12	ZDD23040	选育品种
17	冀 NF58	ZDD23945	选育品种
18	合丰 25	ZDD06823	选育品种
19	桂 199	ZDD24239	选育品种
20	白秋 1 号	ZDD14190	选育品种
21	英德褐豆	ZDD16846	地方品种
22	羊眼睛豆	ZDD01514	地方品种
23	下台子磨石豆	ZDD18524	地方品种
24	拓城小红豆	ZDD03533	地方品种
25	水里站	ZDD01669	地方品种
26	青皮平顶香	ZDD01246	地方品种
27	邳县四粒糙	ZDD03737	地方品种
28	灰皮支黑豆	ZDD02315	地方品种
29	黑豆	ZDD01433	地方品种
30	汉源巴利小黑豆	ZDD12910	地方品种
31	长沙泥豆	ZDD14782	地方品种
32	耐盐 279	-	野生大豆
33	ZYD3687	ZYD03687	野生大豆

**1.1.2 载体与菌株** 本研究选用的供试植物表达载体为 pSoy17,由浙江大学寿惠霞教授惠赠。该载体含有  $\beta$ -葡萄糖苷酸酶基因(*GUS* 基因),由 35S 启动子驱动。供试的 4 种农杆菌菌株分别为 Ag10、AGL1、C58C1 和 EHA105,均由本实验室保存,通过电转化的方法将 pSoy17 载体转入上述不同农杆菌菌株中。

**1.1.3 培养基** 发芽培养基(1 L): $B_5$ 粉 3.2 g,蔗糖 30 g,定容至 1 L,再用 5 mol/L KOH 调节 pH 值至 5.85,琼脂粉 8 g;121 °C 高压灭菌 18 min 后分装。

共培养培养基(1 L): $B_5$ 粉 0.32 g, MES 3.9 g,蔗糖 30 g,10 ×  $B_5$ 有机成分 9 mL, DTT 0.15 g,五水合硫代硫酸钠 0.25 g,半胱氨酸 1.07 g,6-BA 1.67 mg,定容至 1 L,再用 5 mol/L KOH 调节 pH 值至 5.45,琼脂粉 5 g,121 °C 高压灭菌 18 min 后添加过滤除菌的  $GA_3$  0.25 mg,乙酰丁香酮 39 mg。

共培养培养液(1 L): $B_5$ 粉 0.32 g, MES 3.9 g,蔗糖 30 g,10 ×  $B_5$ 有机成分 9 mL,6-BA 1.67 mg,定容至 1 L,再用 5 mol/L KOH 调节 pH 值至 5.45,121 °C 高压灭菌 18 min 后添加过滤除菌的  $GA_3$  0.25 mg,乙酰丁香酮 39 mg。

LB 培养基(1 L):蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g, NaCl 10 g,琼脂粉 16 g;121 °C 高压灭菌 18 min 后分装。

YEP 培养基:蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,NaCl 5 g;121 °C 高压灭菌 18 min 后备用。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 无菌外植体的获得** 参照 B. F. Guo 等<sup>[16]</sup>的方法。选取健康、饱满、无病害的大豆种子,用 75% 的酒精表面消毒后再用氯气灭菌 16 h,灭菌后的大豆种子接种于萌发培养基中,置于人工气候箱培养 5 d(24 °C,光照 18 h,黑暗 6 h)。用手术刀将萌发 5 d 的大豆沿下胚轴切下,放入无菌培养皿中,在无菌培养皿中添加适量的共培养液以湿润种皮,再沿子叶下胚轴垂直将胚轴切开,剔除连接在子叶上的胚轴和真叶组织。

**1.2.2 农杆菌的准备** 用接种环蘸取少量的菌种划平板,接菌种于 LB 固体培养基(Kan, 50 mg/L; Rif, 50 mg/L)上,28 °C 培养 36 ~ 48 h。再挑取单菌落,接菌种于 5 mL 的 YEP 培养液中,220 r/min 28 °C 活化培养 12 h,使菌液达到饱和状。再将这 5 mL 菌液移至含有 100 mL YEP 培养液的摇瓶中,在 28 °C、220 r/min 条件下第 2 次活化。待农杆菌菌液充分活化至  $OD_{600}$  达到 1.0 左右时,将菌液于

4000 r/min 离心 10 min,弃上清,收集沉淀,用等体积共培养液悬浮沉淀于管底的菌体备用,此时  $OD_{600}$  约为 0.6 ~ 0.8。

**1.2.3 外植体与农杆菌共培养** 在三角瓶中加入 30 ~ 40 片已制备好的外植体以及 35 ~ 45 mL 重悬的农杆菌菌液,菌液中含有 0.02% 的表面活性剂 Silwet L-77。先超声波处理 2 s 再共侵染 30 ~ 35 min,共侵染时每隔 5 min 轻摇三角瓶 1 次,以使农杆菌和外植体充分接触。侵染后倒去农杆菌菌液,在共培养培养基上平铺一层无菌滤纸,将浸染后的外植体向轴一侧朝下平铺于滤纸上,24 °C、黑暗培养 3 d。

**1.2.4 GUS 组织化学定位检测** 共培养 3 d 后即进行 GUS 染色分析,GUS 染色参照 R. A. Jefferson 等<sup>[17]</sup>的方法,用手术刀截取包含子叶节在内约 1/3 的外植体,置于 50 mL 无菌离心管,加入适量的 GUS 染色工作液,以完全浸没外植体为准,37 °C 避光孵育 12 h,染色后先用无水乙醇脱色 12 h,再用 75% 乙醇脱色 12 h。每份种质至少 3 次重复,每次重复处理 30 个以上的外植体,调查靶细胞子叶节处成功着色的外植体个数,并统计染色效率[染色率 = (成功染色外植体数/处理外植体数) × 100%]。用 Excel 和 SPSS 18.0 软件对获得的数据进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同农杆菌菌株侵染能力分析

本实验室前期研究发现水里站和齐茶豆 2 号较 Jack 对农杆菌敏感,且水里站和齐茶豆 2 号分别为地方和选育品种,对不同类型的大豆种质具有较好的代表性。因此以水里站和齐茶豆 2 号为受体,分析不同农杆菌菌株 Ag10、AGL1、C58C1 和 EHA105 对这 2 份材料子叶节外植体侵染能力的差异。结果表明,不同农杆菌菌株对靶细胞子叶节侵染能力存在较大差异,农杆菌菌株 Ag10 对 2 份材料的侵染能力都最强。以水里站为受体时,其在靶细胞子叶节处的瞬时表达效率为 50%,优于 EHA105 菌株的 28.5%,显著高于 C58C1 菌株的 26.7%,极显著高于 AGL1 菌株的 21.7%;以齐茶豆 2 号为受体时,Ag10 对靶细胞子叶节的瞬时表达效率为 38.1%,优于 EHA105 菌株的 25.9% 和 C58C1 菌株的 30.7%,显著高于 AGL1 菌株的 19.7% (图 1)。

### 2.2 不同受体品种对农杆菌敏感性分析

利用对靶组织子叶节较敏感的农杆菌菌株 Ag10 分析 33 份不同受体材料对农杆菌的敏感性。

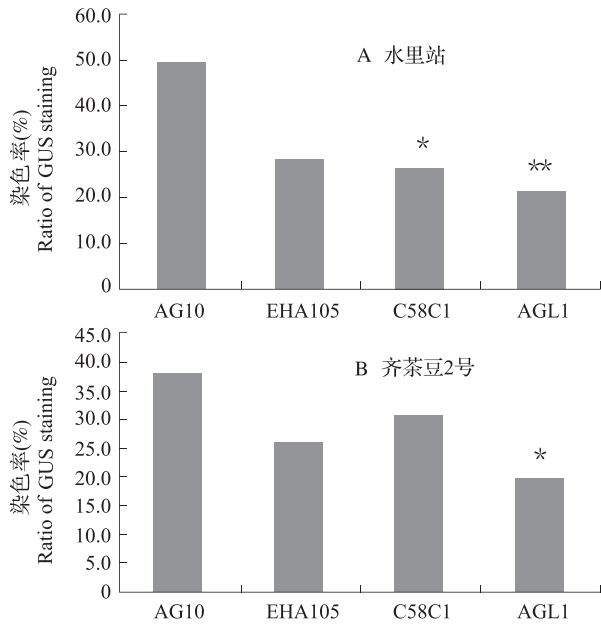


图 1 不同农杆菌菌株对水里站 (A) 和齐茶豆 2 号 (B) 靶细胞子叶节敏感性分析

Fig. 1 The infection ability analysis of four *Agrobacterium* strains to Shuilizhan (A) and Qichadou 2 (B)

结果表明,大豆总体上对农杆菌敏感性较低,不同大豆基因型对农杆菌敏感性差异显著,在 33 份参试材料中,平均瞬时表达效率仅为 26.14%,其中有约 50% 的材料(16 份)瞬时表达效率低于 20%,9 份材料低于 10%,表现出对农杆菌的不敏感或极不敏感。瞬时表达效率高于 50% 的材料有 4 份,分别是长沙泥豆、羊眼睛豆、中黄 10 号 and 灰皮支黑豆。前人研究中已报道的农杆菌易感品种 Peking 在靶组织子叶节处的染色效率为 45.75%,在所有 33 份材料中排第 7 位,对农杆菌 Ag10 敏感性优于 Peking 的 6 份材料分别是长沙泥豆、羊眼睛豆、中黄 10 号、灰皮支黑豆、水里站和英德褐豆。已报道的国内外易转化品种 Jack 和天隆 1 号,其平均瞬时转化效率分别为 23.20% 和 12.34%,均低于本研究供试材料的平均水平(图 2、图 3,表 2)。

### 2.3 地方品种/野生大豆与选育品种对农杆菌敏感性的比较分析

将参试种质分为地方品种/一年生野生大豆和选育品种 2 个亚群,进行农杆菌敏感性比较分析。

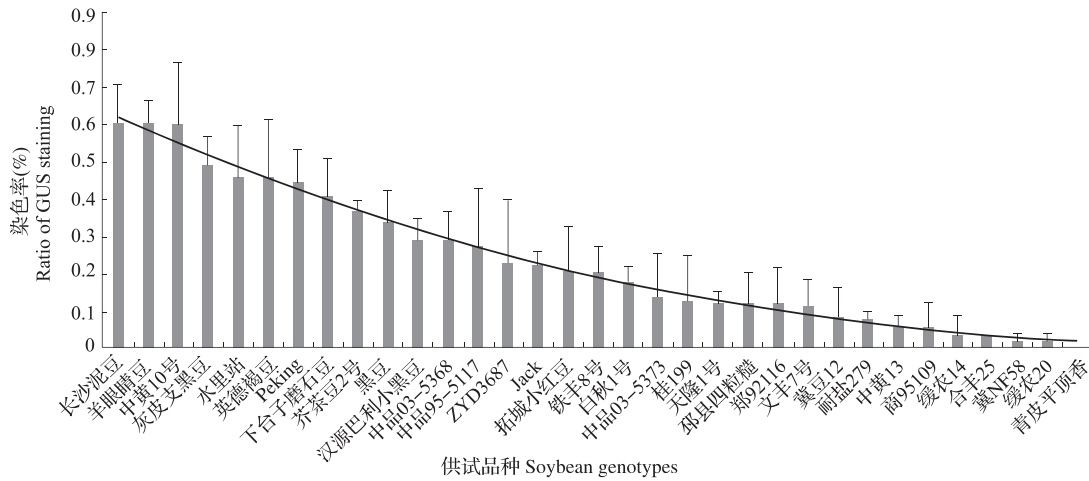


图 2 不同受体品种对农杆菌敏感性分析

Fig. 2 *Agrobacterium* sensitivity analysis of different soybean genotypes

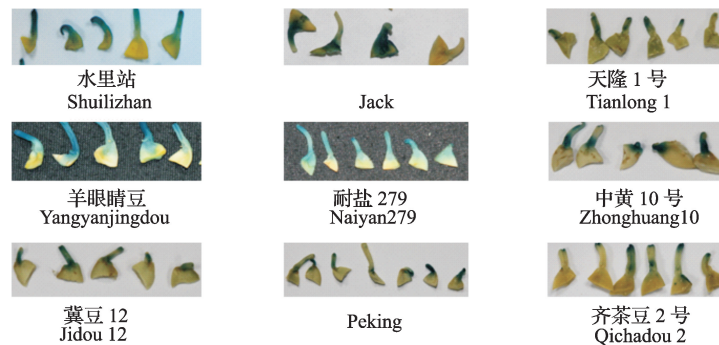


图 3 不同受体品种在农杆菌侵染条件下的 GUS 染色情况

Fig. 3 GUS staining analysis of different soybean genotypes under the infection of *Agrobacterium*

表 2 不同大豆种质对农杆菌敏感性比较及差异显著性分析

Table 2 Comparison test of 33 soybean genotypes to the *Agrobacterium* infection

序号 No.	种质名称 Name of accessions	重复数 Repeated number	染色率(%) Ratio of GUS staining	标准差(%) Standard deviation	与对照差异显著性 Significance test compared with controls		
					Peking	Jack	Tianlongl
1	Peking	3	45.75	8.94	-	0.372	0.136
2	Jack	4	23.20	3.01	0.469	-	-0.193
3	天隆 1 号	4	12.34	3.37	0.002	-0.084	-
4	中品 95-5117	3	28.02	15.99	0	0.239	0.022
5	中品 03-5373	3	14.30	11.73	0.022	0.093	-0.016
6	中品 03-5368	3	29.69	7.81	0	0.230	0.122
7	中黄 13	3	6.04	2.90	0.037	0.076	-0.032
8	中黄 10 号	4	61.61	17.01	0	0.313	0.204
9	郑 92116	2	12.06	10.32	0.028	-0.253	-0.362
10	文丰 7 号	3	11.68	6.87	0.62	-0.047	-0.155
11	铁丰 8 号	3	20.90	6.85	0.002	0.160	0.052
12	绥农 20	3	2.12	1.83	0.002	0.164	0.056
13	绥农 14	3	3.33	5.77	0	0.352	0.243
14	商 951099	3	5.49	6.97	0.818	-0.121	-0.230
15	齐茶豆 2 号	6	38.17	2.48	0	0.373	0.265
16	冀豆 12	3	8.54	7.91	0	0.313	0.204
17	冀 NF58	3	2.15	1.87	0	0.288	0.179
18	合丰 25	3	3.30	0.06	0.148	0.027	-0.082
19	桂 199	3	13.23	12.06	0.038	0.076	-0.033
20	白秋 1 号	3	18.18	4.02	0.032	-0.250	-0.359
21	英德褐豆	3	47.10	15.85	0	0.271	0.163
22	羊眼睛豆	4	62.19	5.74	0.859	-0.098	-0.206
23	下台子磨石豆	3	41.98	10.29	0.023	-0.259	-0.368
24	拓城小红豆	3	21.28	12.12	0	0.256	0.148
25	水里站	6	47.27	14.16	0	0.340	0.231
26	青皮平顶香	3	0	0.00	0	0.318	0.210
27	邳县四粒糙	3	12.22	8.39	0.252	-0.030	-0.139
28	灰皮支黑豆	3	50.06	8.23	0	0.352	0.243
29	黑豆	3	34.66	8.92	0.571	-0.127	-0.236
30	汉源巴利小黑豆	3	29.75	5.67	0	0.340	0.232
31	长沙泥豆	3	62.34	10.24	0	0.241	0.132
32	耐盐 279	2	7.91	2.07	0	0.251	0.142
33	ZYD3687	3	23.69	17.02	0.001	0.191	0.083
	总数 Total	107	26.14	20.77			

方差分析结果表明,地方品种/一年生野生大豆亚群的平均瞬时表达效率为 34.6%,显著优于选育品种的 16.6%(图 4)。此外,鉴定出的农杆菌敏感性优

于 Peking 的 6 份材料中,除中黄 10 号为选育品种外,其他材料均为地方品种,为从地方资源中发掘对农杆菌敏感受体基因型提供参考。

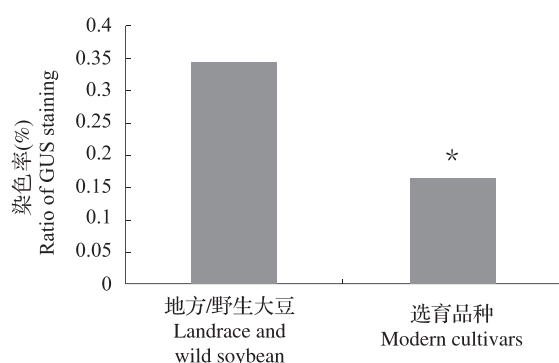


图4 地方/野生大豆与选育品种对农杆菌敏感性比较分析

Fig. 4 Comparison of *Agrobacterium* sensitivities between landrace/wild soybeans and modern cultivars

### 3 讨论

根癌农杆菌介导的大豆遗传转化存在明显的受体基因型依赖和农杆菌菌株特异性,筛选对农杆菌敏感的受体品种和对靶细胞侵染能力较强的农杆菌菌株,并以此为基础构建高效的转基因技术体系是解决大豆遗传转化困难的重要途径。自 M. A. W. Hinchee 等<sup>[8]</sup>首次利用农杆菌介导法获得转基因大豆植株以来,高效受体基因型的发掘一直是大豆转基因体系优化研究的重点, M. M. Paz 等<sup>[11]</sup>和 P. A. Donaldson 等<sup>[18]</sup>利用不同的品种和菌株进行研究,发现只有 Thorne、Peking、Williams82 等少数品种经诱导能够获得转基因植株;在国内经筛选获得的适合于农杆菌介导遗传转化的受体品种有合丰 25、吉林 35、合丰 35、东农 50、黑农 37、黑农 51、天隆 1 号等<sup>[13,19-21]</sup>。目前大豆遗传转化受体基因型的筛选研究主要局限于高产优质的选育品种,利用这些品种构建的遗传转化体系还有待进一步完善,转基因效率还有待提高。地方品种和野生大豆中存在着较大的遗传变异,本研究比较分析了 14 份地方品种/一年生野生大豆和 19 份选育品种对农杆菌的敏感性,结果表明,地方/一年生野生大豆农杆菌侵染后的平均染色效率显著优于选育品种,同时,筛选出的 6 份瞬时转化效率优于农杆菌敏感对照 Peking 的材料中有 5 份是地方品种,说明从大豆地方或野生大豆中进行筛选可能会获得更多的高效转化受体。此外,抗胞囊线虫大豆资源 Peking 和灰皮支黑豆,及具有 Peking 血缘的选育品种齐茶豆 2 号均表现出对农杆菌较高的敏感性,推测在人工选育或驯化的过程中,大豆对农杆菌敏感性状可能与某些和高产优质无关的性状相偶联,在选育的过程中被逐渐

淘汰,导致选育品种对农杆菌的平均敏感性显著低于地方/野生大豆。

农杆菌菌株的侵染能力是影响遗传转化效率的主要因素之一,超毒农杆菌菌株 EHA105 因对大豆敏感性较高,是当前大豆遗传转化研究中使用最广的工程菌株。一般而言,农杆菌毒性越强,对靶组织的侵染能力越强。本研究评价了 4 个不同农杆菌菌株对水里站和齐茶豆 2 号的敏感性,结果表明经 EHA105 改造且具有更强毒性的 Ag10 菌株对靶组织的侵染能力高于其他 3 个菌株。相似的研究结果在前人的研究中亦见报道,毒性更强的农杆菌菌株 KYRT1 介导所获得的遗传转化效率和对靶组织的敏感性均优于 EHA105<sup>[9,22]</sup>。因此选用毒性更强、对靶组织更敏感的菌株用于遗传转化研究,有助于提高转化效率。

以不同组织为靶细胞进行遗传转化时,同一受体品种获得的转化效率可能具有较大的差异,黑农 51 用于子叶节转化时相对容易,而以胚尖为外植体时,获得转化植株相对困难<sup>[23]</sup>。本研究以传统子叶节为靶组织,Jack 对子叶节的敏感性显著优于天隆 1 号,而在 Z. Y. Song 等<sup>[15]</sup>以无菌水浸泡萌发的子叶节为靶组织时,天隆 1 号的 GUS 染色效率显著优于 Jack。B. F. Guo 等<sup>[16]</sup>以中黄 10 号和 Jack 子叶节为靶组织时,比较了 4 种不同外植体处理方式对瞬时表达效率的影响,发现超声波与表面活性剂协同处理在 2 个品种中所获得的 GUS 瞬时表达效率均明显优于其他 2 个处理和传统对照处理。表明大豆受体品种对农杆菌的敏感性具有组织特异性或转化方法特异性。

尽管农杆菌侵染后短时间内外源基因的瞬时表达是未整合的外源基因的表达,瞬时表达效率不能代表稳定的遗传转化效率;但瞬时表达是一种在水稻、玉米、大豆等几乎所有的单双子叶植物中普遍存在的正常表达方式,农杆菌侵染后,外源 DNA 首先进入细胞核内转录成 RNA,转录后的 RNA 再输出至细胞质能完成反应和表达<sup>[24]</sup>。因此瞬时表达效率一定程度上能反映了农杆菌 T-DNA 向靶细胞的转运能力, B. F. Guo 等<sup>[16]</sup>以中黄 10 号和 Jack 为受体进行转化研究时发现,中黄 10 号的瞬时表达效率约 2 倍于 Jack,其经转化、再生后获得的稳定转化效率亦 2 倍于 Jack;这表明遗传转化效率与瞬时表达效率存在一定的正相关关系,发掘对农杆菌敏感的受体品种有助于提高遗传转化效率。本研究评价了不同类型的受体品种对农杆菌的敏感性,所发掘的

6 份对农杆菌敏感的种质,除中黄 10 号外,均为首次报道,为农杆菌介导大豆遗传转化受体基因型的选择和转化体系的改良提供了参考。

#### 参考文献

- [1] James C. Global status of commercialized biotech/GM crop [J]. International Service for the Acquisition of Agri - biotech Applications; Ithaca, NY, 2013, Brief No. 46
- [2] James C. 2013 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势 [J]. 中国生物工程杂志, 2014, 34 (1): 1-8
- [3] Ainsworth E A, Yendrek C R, Skoneczka J A, et al. Accelerating yield potential in soybean: Potential targets for biotechnological improvement [J]. Plant Cell Environ, 2012, 35: 38-52
- [4] 中国种植业信息网. 农作物数据库. <http://202.127.42.157/maozzys/nongqing.aspx>
- [5] China farming information network. Crops database. <http://202.127.42.157/maozzys/nongqing.aspx>. (in Chinese)
- [6] 中华人民共和国海关总署. 2013 年 12 月全国进口重点商品量值表. <http://www.customs.gov.cn/publish/portal0/tab49666/info690427.htm> General Administration of Customs of the People's Republic of China. The national key value of goods imported in December 2013. <http://www.customs.gov.cn/publish/portal0/tab49666/info690427.htm>. (in Chinese)
- [7] Homrich M S, Wiebke - Strohm B, Weber R L, et al. Soybean genetic transformation: a valuable tool for the functional study of genes and the production of agronomically improved plants [J]. Genet Mol Biol, 2012, 35: 998-1010
- [8] Hinchee M A W, Connor D V, Newell CA, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium* - mediated DNA transfer [J]. Nat Biotechnol, 1988, 6: 915-922
- [9] Tae S K, Sangman L, Sergei K, et al. Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars; *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explant [J]. Theor Appl Genet, 2003, 107: 439-447
- [10] Newell C A. Plant transformation technology, developments and applications [J]. Mol Biotechnol, 2000, 16: 53-65
- [11] Paz M M, Shou H X, Guo Z B, et al. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium* - mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant [J]. Euphytica, 2004, 136: 167-179
- [12] 王连铮. 大豆致瘤及基因转移研究 [J]. 中国科学: B 辑, 1984 (2): 137-141
- [13] Michael C B, Raymond E M, Martha S W, et al. Strain and cultivar specificity in the *Agrobacterium* - soybean interaction [J]. Plant Cell Tiss Org, 1987, 8: 3-15
- [14] Dean E C. Genotype variability of soybean response to *Agrobacterium* strains harboring the Ti or Ri plasmids [J]. Plant Physiol, 1985, 77: 87-94
- [15] Song Z Y, Tian J L, Fu W Z, et al. Screening Chinese soybean genotypes for *Agrobacterium* - mediated genetic transformation suitability [J]. J Zhejiang Uni Sci B, 2013, 14: 289-298
- [16] Guo B F, Guo Y, Wang J, et al. Co - treatment with surfactant and sonication significantly improves *Agrobacterium* - mediated resistant bud formation and transient expression efficiency in soybean [J]. J Integr Agric, 2014, Doi: 10. 1016/S2095 - 3119 (14) 60907-2
- [17] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan N W. GUS fusions:  $\beta$  - glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants [J]. EMBO J, 1987, 6: 3901-3907
- [18] Donaldson P A, Simmonds D H. Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short - season soybean [J]. Plant Cell Rep, 2000, 19: 478-484
- [19] Liu S J, Huang J Q, Wei Z M. Factors influencing *Agrobacterium* - mediated cotyledonary - node transformation of soybean (*Glycine max* L.) [J]. J Mol Cell Biol, 2007, 40 (5): 286-294
- [20] Yan F, Sun X, Zhai Y, et al. Effect of different 6 - BA concentration and genotypes on shoots induced from embryonic tips [J]. Soybean Sci, 2011, 30 (1): 29-32
- [21] Zhang Y, Man W Q, Nan X R, et al. Establishment and improvement on regeneration systems of 'Heinong51' cotyledonary nodes and embryonic tips [J]. Chinese Agri Sci Bull, 2011, 27 (9): 148-151
- [22] Dang W, Wei Z M. An optimized *Agrobacterium* - mediated transformation for soybean for expression of binary insect resistance genes [J]. Plant Sci, 2007, 173: 381-389
- [23] Wang P, Zhang S Z, Li W B, et al. Induction of adventitious shoots from embryonic tip of different soybean genotypes and their sensibility to antibiotics [J]. Crops, 2010 (2): 50-53
- [24] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 北京: 科学出版社, 2009