

中国大豆主栽品种遗传转化效率相关性状的比较研究

陈 普^{1,2}, 陈 莉², 韩天富², 东方阳^{1*}, 侯文胜^{2*}

(1. 河北科技师范学院生命科技学院, 河北 秦皇岛, 066004;

2. 中国农业科学院作物科学研究所/国家植物转基因技术研究中心/农业部北京大豆生物学重点实验室, 北京 100081)

摘要:受体基因型依赖是限制根瘤农杆菌介导的大豆遗传转化效率的重要因素, 严重制约优良转基因材料创制和品种选育效率。本实验以适宜我国不同地域种植的 13 个大豆主栽品种为材料, 系统比较了其丛生芽诱导率、芽伸长率和遗传转化效率的差异。结果表明, 在根瘤农杆菌侵染和筛选剂存在的条件下, 供试品种的丛生芽诱导率差异较小, 芽伸长率差异较大, 最终的遗传转化效率差异更大。在供试的 14 个大豆品种中, 有 7 个获得转化植株, 其中 4 个转化效率在 2% 以上。高蛋白品种中黄 42 的转化效率可达 4.1%, 是培育转基因大豆的良好受体材料。

关键词:大豆; 根瘤农杆菌; 丛生芽诱导; 芽伸长; 转化效率

中图分类号: S565.103 文献标识码: A 文章编号: 1007-9084(2016)01-0027-07

Comparative studies on traits related to *Agrobacterium* - mediated transformation efficiency of popular soybean cultivars in China

CHEN Pu^{1,2}, CHEN Li², HAN Tian-fu², DONGFANG Yang^{1*}, HOU Wen-sheng^{2*}

(1. Life Science and Technology College, Hebei Normal University of Science & Technology, Qinhuangdao 066004, China;

2. Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences/ National Center for Transgenic Research in Plants/ MOA Key Laboratory of Soybean Biology (Beijing), Beijing 100081, China)

Abstract: *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of soybean is highly genotype - dependent, which strongly limits the effective progress for transformation. In this study, 13 elite soybean cultivars from different producing region were selected for comparison of their shoot induction, shoot elongation and transformation efficiency. The results showed that there were apparent varietal variation in the shoot induction and significant differences in shoot elongation efficiencies after *Agrobacterium* infection and glufosinate screening, which lead to large varietals variation of transformation efficiency. Transgenic plants were obtained from 7 out of 14 cultivars, with the transformation efficiency over 2% in 4 cultivars. Zhonghuang 42, a high protein cultivar, possessed the highest transformation efficiency of 4.1%, which can be used as a receptor material in transgenic soybean breeding in the future.

Key words: Soybean; *Agrobacterium tumefaciens*; Shoot induction; Shoot elongation; Transformation efficiency

自 1996 年孟山都推出第一个商业化的转基因大豆品种“抗农达 (Roundup Ready) 转基因大豆”以来, 转基因大豆在世界上得到了迅速推广。2014 年, 全球转基因大豆的种植面积已占大豆种植总面积的 82%^[1]。我国虽然尚未批准转基因大豆种植,

但在进口大豆 (2014 年进口量高达 7 140 万吨^[2]) 中, 转基因大豆的比例接近 100%^[1]。2014 年 12 月, 中国宣布批准进口杜邦先锋公司富含油酸的大豆 Plenish 和拜耳作物科学公司的抗除草剂大豆 LL55 Liberty Link 用作加工原料, 使我国允许进口的转基因大豆转化事件增加到 10 个 (其余为抗除草

收稿日期: 2015-06-01

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项 (2014ZX08010-004); 农业部财政部现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-04); 中国农业科学院科技创新工程

作者简介: 陈 普 (1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向为遗传学, E-mail: chenpuok@hotmail.com

* 通讯作者: 侯文胜 (1969-), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向为大豆分子育种与转基因技术, E-mail: houwensheng@caas.cn

东方阳 (1963-), 男, 教授, 研究方向为豆类分子遗传与转基因大豆, E-mail: yang_dongfang@hotmail.com

剂大豆 CV127、抗虫大豆 MON87701、抗虫耐除草剂大豆 MON87701 × MON89788、抗农达大豆 GTS40 - 3 - 2、抗除草剂大豆 A2704 - 12、抗除草剂大豆 MON89788、抗除草剂大豆 356043、品质改良大豆 305423)^[1,3]。作为大豆消费大国和全球最大的转基因大豆进口国,我国急需加强自主研发,提升大豆生物技术育种水平,为本国转基因大豆的产业化做好技术和材料储备^[4]。

根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导法^[5]和基因枪法^[6]是目前最为常用的两种大豆转基因手段。由于农杆菌介导的转基因技术体系具有插入基因拷贝数低、遗传稳定、转化过程相对简单、成本相对较低等优点,得到了更为广泛的应用^[7,8]。1988年 Hinchee 等^[5]首次采用农杆菌介导法获得转基因大豆植株以来,经过不断研究与探讨,该技术体系正在逐渐优化与完善,但受体基因型依赖仍是影响根癌农杆菌介导的大豆遗传转化成败和效率的重要因素之一。目前,国外用于大豆遗传转化的常用基因型有 Williams79、Williams 82、Peking、Thorne 等少数品种^[5,9]。我国一些学者也对大豆转化受体进行了筛选。Song 等^[10]通过不同品种之间的比较,发现天隆一号的转化效率可达 4.59%,具有作为理想转化受体材料的潜力;Liu 等^[11]通过优化转化条件,在合丰 25 等中国大豆主栽品种中获得了转化植株。但是,在上述研究中都较少采用我国各大主产区当前大面积推广的品种,获得的转化植株整体性状水平较低,需要经过多代回交才能获得综合性状优良的转基因材料^[12,13]。目前,需要利用各地当前主推的品种进行遗传转化研究。本研究选取中国不同地区代表性大豆主栽品种,系统比较了其丛生芽诱导能力、再生能力和遗传转化效率的差异,以期筛选出具有良好再生能力和较高转化效率的大豆主栽品种,为创制具有优良农艺性状的转基因大豆材料奠定基础。同时,明确造成不同品种遗传转化率差异的原因,为提高大豆遗传转化效率提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选用适宜在中国不同地区种植的 13 个主要栽培品种,其中,黑河 35、黑河 43、疆莫豆 1 号、绥农 14、吉育 47、晋豆 19、中黄 13、中黄 30 和中黄 35 为北方春大豆品种;中黄 13、中黄 35、中黄 39、中黄 42、晋豆 19 为黄淮海夏大豆品种;中黄 13、中黄 39、桂夏 1 号和桂夏 3 号为南方多作区品种。除黑河 35、中黄 39 和中黄 42 外,其它品种均为农业部推介

的大豆主导品种^[14~18]。上述品种适应区域可覆盖中国大陆最北端到最南端的广大区域(黑河 35 可在黑龙江省漠河县北极镇种植,中黄 39 可在广东南部春播)。对照品种为 Williams 82,引自美国,为根癌农杆菌介导大豆转化体系中常用的受体品种^[3]。转化载体为 pTF102(图 1),含有报告基因 *GUS* 和筛选标记基因 *bar*,用其获得的转基因植株抗草铵膦(Glufosinate)。使用的根癌农杆菌菌株为 EHA101^[19]。

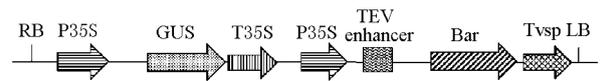


图 1 表达载体 pTF102 的 T-DNA 结构
Fig.1 Schematic representation of T-DNA region in plasmid vector pTF102

1.2 方法

1.2.1 根癌农杆菌介导遗传转化的基本流程 大豆遗传转化体系参考 Zhang 等^[20]方法,并进行了一些调整。基本转化程序为:(1)种子灭菌(氯气法),16~20 h;(2)萌发 5d(B_5 盐 $3.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, GAMBORG BASAL SALT MIXTURE, Phyto Technology Laboratories[®], 蔗糖 2%, 琼脂 $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH5.8, B_5 有机成分 $1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$, GAMBORG B5, Phyto Technology Laboratories[®]);(3)共培养 5d(B_5 盐 $0.31 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蔗糖 3%, 琼脂 $8.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH5.42, 6-BA $1.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, GA_3 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, AS $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, DTT $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, L-cys $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$);(4)芽诱导 15d(B_5 盐 $3.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蔗糖 3%, MES $0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 琼脂 $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH = 5.7, B_5 有机成分 $1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$, Cef $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, Cb $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, TE $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 6-BA $1.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$);(5)芽筛选 15d(B_5 盐 $3.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蔗糖 3%, MES $0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 琼脂 $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH5.7, B_5 有机成分 $1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$, Cef $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, Cb $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, TE $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 6-BA $1.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 草铵膦 $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, Glufosinate - ammonium, Sigma);(6)芽伸长阶段,每 15d 继代一次,共继代 3 次(MS 盐 $4.33 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, MURASHIGE & SKOOG BASAL SALT, Phyto Technology, 蔗糖 3%, MES $0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 植物凝胶 $3.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, Sigma, pH5.7, B_5 有机成分 $1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$, Asp $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, Glu $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, TE $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, Zeatin - R $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, Cef $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, Cb $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, IAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, GA_3 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 草铵膦 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$);(7)生根(MS 盐 $4.33 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蔗糖 3%, MES $0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 琼脂 $7.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH5.7, B_5 有机成分 $1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$, Asp $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, Glu $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, IBA

1.5 mg · L⁻¹);(8) 移苗等步骤。培养条件做了如下改变:共培养阶段的培养条件改为 22℃ 培养 5d,共培养结束后直接转移到芽诱导培养基中,取消了外植体的清洗步骤。共培养时使用的琼脂为 Sigma 产品,其余阶段的琼脂为上海生工产品。所有供试大豆品种均在相同的实验条件下进行处理,其中,在进行非侵染条件下的实验时,对外植体进行划伤处理但不使用农杆菌进行侵染,不涉及共培养和再生芽筛选两个阶段,伸长培养基中不添加筛选剂;进行农杆菌侵染实验时,再生芽筛选阶段的草铵膦的浓度为 8 mg · L⁻¹,芽伸长阶段为 4 mg · L⁻¹。制备共培养所用菌种时,农杆菌在含有相应抗生素的 YEP 培养基中(28℃, 220r/mim) 培养到 OD₆₀₀ = 1.0 ~ 1.2 时进行离心(5 000r/mim, 10min),重悬至 OD₆₀₀ = 0.6 ~ 0.8 时用于侵染。外植体选用萌发 5d 的大豆子叶节。在芽诱导 15d 时统计产生丛生芽的外植体数,在伸长阶段,每 15d 更换一次培养基,并统计高度大于或等于 2cm 的再生苗数量。

1.2.2 外植体数量 每个品种、每个处理至少保证 3 次有效重复。萌发阶段每批次用约 100 粒种子,共培养阶段和诱导阶段每批次用于数据统计的外植体数为 120 ~ 140 个(每粒种子经切豆划伤后产生两个子叶节外植体),芽筛选阶段外植体数为 80 ~ 100 个,芽伸长阶段每批次外植体数为 50 ~ 70 个。在培养的过程中,随时去除发生污染的外植体。

1.2.3 再生植株的 PCR 鉴定 利用康为世纪生物科技有限公司植物基因组 DNA 提取试剂盒提取再生苗 DNA,进行 *bar* 基因和 pTiBo542 质粒^[21] *vir* 区片段的 PCR 检测,pTiBo542 质粒为 EHA101 本身所携带质粒,通过扩增其片段来验证材料中是否有农杆菌残留,统计 *bar* 基因检测呈阳性并且 pTiBo542 质粒片段呈阴性的再生苗数。*bar* 基因 PCR 检测采用 10 μL 的 PCR 反应体系,引物由华大基因公司合成。F 序列为 5' - GCACCATCGTCAACCACTACATC - 3', R 序列为 5' - CAGAAACCCACGTCATGC -

CAGTT - 3'。PCR 程序为:94℃ 预变性 5min;94℃ 变性 30s,59℃ 退火 30s,72℃ 延伸 30s,30 个循环;72℃ 加固延伸 5min。pTiBo542 质粒检测引物 F 序列为 5' - ATTCGTTGAGAGTATTCCGA - 3', R 序列为 5' - CATTTTCATAGGCTGCTTCA - 3'。PCR 程序为:94℃ 预变性 5min;94℃ 变性 30s,51℃ 退火 30s,72℃ 延伸 50s;30 个循环,72℃ 加固延伸 5min。

1.2.4 数据分析 丛生芽诱导率(%) = (产生丛生芽的外植体数/芽诱导阶段外植体总数) × 100;芽伸长率(%) = (芽伸长总数/芽诱导阶段外植体总数) × 100;转化效率(%) = (PCR 阳性苗数/芽诱导阶段外植体总数) × 100。采用 SAS9.0 对实验数据进行方差分析和多重比较(Duncan 法)^[22]。

2 结果与分析

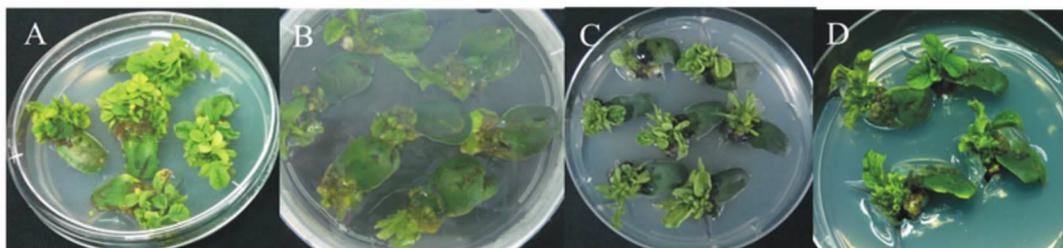
2.1 不同大豆品种丛生芽诱导率的差异

统计芽诱导 15d 时产生丛生芽的外植体数发现,在农杆菌侵染及非侵染条件下,不同品种之间丛生芽诱导率存在一定差异,但多数品种在两种条件下的丛生芽诱导率差异未达到显著水平(表 1),图 2 为部分品种芽诱导 15d 时产生的丛生芽。中黄 35 和 Williams 82 在农杆菌侵染与非侵染条件下的差异显著(P < 0.05),其中,中黄 35 在根癌农杆菌侵染后,丛生芽诱导率上升,而 Williams 82 则下降,说明农杆菌侵染只会对少数大豆基因型的丛生芽诱导率产生影响,本实验采用的芽诱导培养条件适合供试的大多数品种。

2.2 不同大豆品种芽伸长率的差异

在芽伸长阶段,分别统计农杆菌侵染和非侵染两种处理条件下各大豆品种所产生的伸长芽总数,并计算芽伸长率。

在农杆菌侵染条件下,供试的 14 个品种有 12 个获得了伸长苗(图 3 为部分再生苗),但多数品种的芽伸长率较低。疆莫豆 1 号和中黄 42 获得的再生苗数量相对较多,其芽伸长率与其余品种之间差



注:A:Williams 82;B:黑河 35;C:桂夏 1 号;D:中黄 35
Note:A:Williams 82;B:Heihe 35;C:Guixia 1;D:Zhonghuang 35

图 2 部分品种的丛生芽

Fig. 2 Multiple shoot of tested cultivars

表 1 不同大豆主栽品种丛生芽诱导率
Table 1 Shoot induction rate of 14 widely - planted soybean cultivars

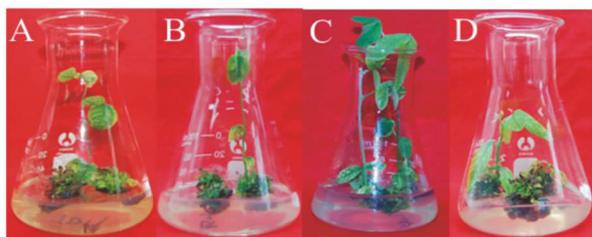
品种 Cultivar	丛生芽诱导率 Shoot induction rate/%		F 值 F - value
	农杆菌侵染 Infected with <i>A. tumefaciens</i>	非侵染 Without <i>A. tumefaciens</i> infection	
中黄 13 Zhonghuang 13	75.5 ± 3.9Aa	86.0 ± 10.8Aa	2.7
疆莫豆 1 号 Jiangmodou 1	73.0 ± 14.6Aa	63.3 ± 1.3ABCDabcd	1.1
中黄 35 Zhonghuang 35	72.7 ± 13.4Aa	31.3 ± 3.9Dde	18.5 *
桂夏 1 号 Guixia 1	69.2 ± 8.7Aab	74.3 ± 5.9ABCDab	0.3
中黄 39 Zhonghuang 39	67.7 ± 11.5ABab	79.0 ± 6.6ABCa	0.7
绥农 14 Suinong 14	63.4 ± 4.3ABCab	53.1 ± 11.3ABCDabcde	0.3
黑河 35 Heihe 35	61.4 ± 6.3ABCab	69.5 ± 7.5ABCDabc	0.9
Williams 82	58.3 ± 5.0ABCabc	84.5 ± 6.6ABa	10.9 *
吉育 47 Jiyu 47	57.4 ± 13.7ABCabc	62.3 ± 10.3ABCDabcd	0.1
中黄 42 Zhonghuang 42	57.3 ± 7.2ABCabc	36.0 ± 6.6CDcde	3.0
晋豆 19 Jindou 19	51.5 ± 7.1ABCabcd	63.8 ± 10.6ABCDabcd	2.6
黑河 43 Heihe 43	44.6 ± 8.7ABCbcd	28.3 ± 9.1De	1.4
桂夏 3 号 Guixia 3	35.9 ± 10.1BCcd	40.3 ± 7.2BCDcde	0.2
中黄 30 Zhonghuang 30	31.1 ± 3.4Cd	44.5 ± 5.9ABCDbcde	0.6

注:邓肯氏新复极差法测验在同一感染条件不同品种之间进行。无相同小写、大写字母的平均数间分别存在显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$)差异;F 测验在同一品种不同感染条件下进行,*表示显著差异($P < 0.05$)。下同

Note;Duncan tests were conducted among the different cultivars under the same infection condition. The means followed by different lowercase and capital letters have significant difference at 0.05 and 0.01 probability levels, respectively. The F - tests were conducted between the two infection conditions of the same cultivar. * represents significant difference at 0.05 probability level. Same as below

异显著($P < 0.05$),疆莫豆 1 号获得的伸长苗最多,与中黄 42 之间的差异性也达到了极显著水平($P < 0.01$)(表 2)。

值得注意的是,即使在非侵染和非标记筛选的条件下,不同品种的芽伸长率差异也很大,说明不同品种对伸长阶段培养条件的要求差异较大,通过对芽伸长阶段培养条件的优化,有可能降低培养条件在芽伸长过程中产生的不利影响,进而提高在侵染条件下获得转基因伸长苗的数量。



注:A:晋豆 19;B:疆莫豆 1 号;C:桂夏 1 号;D:中黄 42

Note:A:Jindou 19;B:Jiangmodou 1;C:Guixia 1;D:Zhonghuang 42

图 3 4 个代表性品种的转化再生苗

Fig. 3 Transformed regenerated seedlings of 4 representative cultivars

2.3 不同品种遗传转化效率的比较

采用 PCR 方法对再生苗进行外源基因检测,将扩增出筛选标记基因 *bar* 目标条带且农杆菌 pTi-Bo542 质粒片段扩增呈阴性的植株,确定为 PCR 阳性转基因植株,以排除再生苗中农杆菌残留造成的假阳性现象(图 4 为部分材料的验证结果)。

实验结果显示,在供试的 14 个品种中,有 7 个

品种均获得了阳性转化植株。其中,4 个主栽品种转化效率在 2% 以上,且优于受体对照品种 Williams 82,是具有较大应用价值的受体品种,可用于农艺性状优良的转基因材料创制工作,其中,中黄 42 的转化效率达到了 4.1% (表 3)。实验中还发现,疆莫豆 1 号形成伸长苗的比例较高,但 PCR 阳性伸长苗的比例较低,说明该品种可能对实验所采用的筛选剂的耐受性较高,造成非转基因再生苗逃逸率较高,通过改变筛选策略,有望降低其再生苗中的非阳性率,提高后期检测的工作效率。

3 讨论

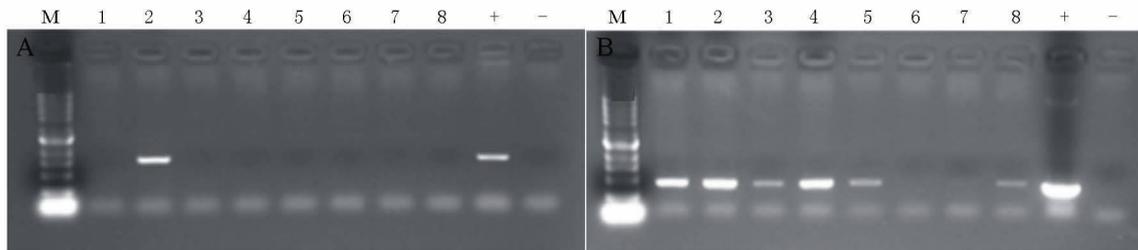
大豆是公认的难以进行遗传转化的作物之一,不同基因型之间遗传转化效率也存在很大区别。目前,在大豆转化中常用的品种主要为 Jack、Williams79、Williams 82、Peking、Thorne 等^[5,9,23],然而由于这些品种的农艺性状与当前大豆生产需求差距较大,获得的转化体需要多代回交、自交,才能获得生产需要的品种。以现有大豆主栽品种作为转基因受体,更易提高转基因大豆的综合农艺性状水平,培育出新的大面积种植品种,加快品种选育步伐^[24]。研究发现,在根癌农杆菌介导的遗传转化中,影响不同大豆品种转化效率的因素存在于不同阶段,如不同品种对不同菌种侵染的敏感性不同^[25],不同品种表现出不同的丛生芽诱导率和芽伸长率^[26],对筛选剂耐受程度不同而导致的非阳性植株的逃逸率不同等^[27]。

表 2 不同大豆基因型的芽伸长率
Table 2 Shoot elongation rate of 14 soybean cultivars

品种 Cultivar	芽伸长率 Shoot elongation rate/%		F 值 F - value
	农杆菌侵染和草铵膦筛选 Infected with <i>A. tumefaciens</i> and screened with glufosinate	非侵染和非筛选条件 Without infection and screening	
疆莫豆 1 号 Jiangmodou 1	22.6 ± 3.7Aa	64.2 ± 10.5Aa	9.2*
中黄 42 Zhonghuang 42	9.6 ± 2.7Bb	31.2 ± 4.0BCbc	65.0**
桂夏 3 号 Guixia 3	7.6 ± 1.9Bbc	3.3 ± 1.6Ddef	7.2
晋豆 19 Jindou 19	5.3 ± 1.6Bbc	6.2 ± 6.2Ddef	0.1
Williams 82	5.3 ± 4.6Bbc	15.3 ± 1.5CDcdef	15.0*
中黄 39 Zhonghuang 39	4.5 ± 4.3Bbc	20.5 ± 4.7CDcde	4.2
中黄 35 Zhonghuang 35	4.2 ± 1.1Bbc	0.0 ± 0.0Df	48.0**
桂夏 1 号 Guixia 1	3.6 ± 4.1Bbc	17.3 ± 3.9CDcdef	1.6
绥农 14 Suinong 14	2.3 ± 3.9Bbc	1.0 ± 0.9Df	0.3
黑河 35 Heihe 35	1.2 ± 1.1Bbc	44.8 ± 5.1ABb	30.7**
中黄 13 Zhonghuang 13	0.7 ± 1.2Bc	44.1 ± 9.0ABb	70.1**
黑河 43 Heihe 43	0.6 ± 1.0Bc	21.4 ± 4.5CDcd	8.2*
吉育 47 Jiyu 47	0.0 ± 0.0Bc	7.8 ± 1.8CDdef	40.7**
中黄 30 Zhonghuang 30	0.0 ± 0.0Bc	2.0 ± 0.6Def	25.0**

注: * 表示显著差异 ($P < 0.05$), ** 表示极显著差异 ($P < 0.01$)

Note: * and ** represent significant difference at 0.05 and 0.01 levels, respectively.



注:A:pTiBo542 质粒 *vir* 区片段检测;B:*bar* 基因片段检测。M: marker, +: 阳性对照, -: 阴性对照, 1-8: 中黄 42、中黄 42、Williams 82、桂夏 1 号、桂夏 1 号、中黄 35、桂夏 3 号、桂夏 3 号

Note:A: plasmid *vir* region fragment detection of pTiBo542; B: *bar* gene fragment detection. M: marker, +: positive control,

-: negative control, 1-8: Zhonghuang 42, Zhonghuang 42, Williams 82, Guixia 1, Guixia 1, Zhonghuang 35, Guixia 3, Guixia 3

图 4 再生植株的 PCR 验证

Fig. 4 PCR verification of regenerated plants

表 3 不同大豆品种的遗传转化效率的比较

Table 3 Comparison of transformation efficiency among 14 soybean cultivars under mediation of *A. tumefaciens*

品种 Cultivar	侵染外植体数 Number of infected explants	伸长苗数 Number of elongated seedlings	PCR 阳性苗数 Number of PCR positive transformants	转化率 Transformation efficiency/%
中黄 42 Zhonghuang 42	246	11	10	4.1
桂夏 3 号 Guixia 3	244	16	7	2.9
疆莫豆 1 号 Jiangmodou 1	393	53	9	2.3
中黄 39 Zhonghuang 39	325	11	7	2.2
Williams 82	420	14	7	1.7
桂夏 1 号 Guixia 1	427	7	7	1.6
中黄 35 Zhonghuang 35	353	8	2	0.6
晋豆 19 Jindong 19	341	12	0	0.0
黑河 35 Heihe 35	427	2	0	0.0
黑河 43 Heihe 43	280	1	0	0.0
绥农 14 Suinong 14	366	4	0	0.0
中黄 30 Zhonghuang 30	274	0	0	0.0
吉育 47 Jiyu 47	321	0	0	0.0
中黄 13 Zhonghuang 13	242	2	0	0.0

注: 将扩增出筛选标记基因 *bar* 目标条带且农杆菌 pTiBo542 质粒片段扩增呈阴性的植株, 确定为 PCR 阳性转基因植株

Note: The plants which are positive in *bar* gene and negative in *Agrobacterium* pTiBo542 PCR amplifications were identified as transformants

本研究发现,经根癌农杆菌侵染后,多数品种的丛生芽诱导率与未侵染处理相比未发生显著变化,说明本研究采用的芽诱导条件可以满足大部分品种产生丛生芽的要求。然而,在伸长培养阶段,经过农杆菌侵染和筛选剂筛选后,多数品种的芽伸长率与非侵染条件下相比,都有较大降幅,且不同品种间的差异性有所缩小。可能原因是多数丛生芽对筛选剂无抗性,即未被转化。可见,影响不同品种之间转化效率的关键因素主要存在于农杆菌侵染和芽伸长阶段,而通过对上述阶段培养条件的适当调整,有可能提高大豆的转化效率。

在本研究中,通过分析各品种在农杆菌侵染后的丛生芽诱导率和伸长率发现,桂夏 1 号、中黄 39、绥农 14、黑河 35 和吉育 47 的丛生芽诱导率都在 50% 以上,然而其芽伸长率不到 5%,甚至不伸长,即使在无选择压力的条件下,部分品种的芽伸长率也很低,因此,通过芽伸长阶段培养条件的优化可能会提高转基因再生苗的数量。中黄 42 和晋豆 19 虽然丛生芽诱导率并不高,但却表现出相对较高的伸长率,所以,通过对其丛生芽诱导阶段培养条件的调整,将提高总体的转化效率;而对于中黄 30 和黑河 43 这些丛生芽诱导率和芽伸长率均较低的品种,则需要整体改变转化条件。此外,在实验中也发现,无论是在丛生芽诱导阶段还是在芽伸长阶段,经过根癌农杆菌侵染后,中黄 35 的丛生芽诱导率和芽伸长率均表现出显著上升的现象,这与其它品种显著下降的现象相反,该品种转化效率还高于其它一些丛生芽率和芽伸长率较高的品种,可能原因是外源基因的整合改变了其原有再生相关基因的表达所引起的^[28]。所以,在进行农杆菌介导的转化实验时,并不能通过某一培养阶段的单一指标来判断该品种是否是良好的转基因受体。

有研究认为绥农 14 适合作为大豆转基因的受体^[29],但是在本研究所采用的转化及培养条件下,该品种伸长率偏低,说明组培条件的选择以及不同人员的操作对大豆转化效率也具有很大影响。疆莫豆 1 号在经过农杆菌侵染和筛选剂筛选后仍可产生较多的再生苗,但其转化效率却不高,这可能是本实验中所使用的筛选策略并不适合该品种,从而导致非转基因苗“逃逸”^[30]。不同大豆品种对不同筛选剂的敏感度不同,从而影响再生率和转化效率。由此可见,建立统一的不依赖基因型的大豆转基因平台面临较大困难。然而,另一方面,虽然不同品种之间的转化效率存在较大差异,但是在本研究所采用的转化及培养条件中,14 个供试品种中有 7 个获得

了阳性苗,其中 4 个转化效率达 2% 以上,说明本研究所采用的大豆转基因平台可以推广使用。

在先前的研究中,利用本实验所用的方法在南方晚熟大豆品种自贡冬豆^[31~33]和东北中早熟品种吉林小粒 1 号^[33]中获得了转基因植株。可见,通过本研究所用转化平台获得的转基因大豆包括了北方春大豆、黄淮夏大豆、南方春大豆、南方夏大豆和南方秋大豆主栽品种,可为不同地区提供较为理想的受体基因型。黄淮海夏大豆品种中黄 42 转化效率达到 4.1%,该品种蛋白质含量高,食味、口感俱佳,是开展大豆优质转基因育种的良好受体材料。

参考文献:

- [1] James C. Global status of commercialized biotech/GM crops;2014[M]. ISAAA Brief No. 49.
- [2] 中华人民共和国海关总署. 2014 年 12 月全国进出口重点商品量值表[OL]. <http://www.customs.gov.cn/publish/portal0/tab49666/info729731.htm>.
- [3] 转基因权威关注[OL]. http://www.moa.gov.cn/ztlz/zjyqwgz/zxjz/201306/t20130614_3492457.htm.
- [4] 侯文胜,林抗雪,陈普,等. 大豆规模化转基因技术体系的构建及其应用[J]. 中国农业科学,2014,47(21):4 198-4 210.
- [5] 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.
- [6] Klein T M, Jones T J. Methods of genetic transformation: the gene gun[A]. Vasil I K. Molecular improvement of cereal crops[C]. Kluwer Academic Publishers,1999. 21-42.
- [7] Hu T, Metz S, Chay C, et al. *Agrobacterium* - mediated large - scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection[J]. Plant Cell Reports, 2003,21(10):1 010-1 019.
- [8] Homrich M S, Wiebke - Strohm B, Weber R L M, et al. Soybean genetic transformation: A valuable tool for the functional study of genes and the production of agronomically improved plants[J]. Genetics and Molecular Biology,2012,35(4):998-1 010.
- [9] Paz M M, Shou H, Guo Z, et al. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium* - mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant[J]. Euphytica,2004,136(2):167-179.
- [10] Song Z, Tian J, Fu W, et al. Screening Chinese soybean genotypes for *Agrobacterium* - mediated genetic transformation suitability[J]. Journal of Zhejiang University - Science B (Biomedicine & Biotechnology),

- 2013,14(4):289-298.
- [11] Liu S J, Wei Z M, Huang J Q. The effect of co-cultivation and selection parameters on *Agrobacterium*-mediated transformation of Chinese soybean varieties[J]. *Plant Cell Reports*,2008,27(3):489-498.
- [12] 杨保新,李保军,刘淑红,等.转基因杂交抗虫棉邯棉646的选育[J].*河北农业科学*,2010,14(4):79-80.
- [13] 刘雨芳,王 锋,尤民生,等.转基因水稻及其杂交后代对稻纵卷叶螟的田间抗性检测[J].*中国农业科学*,2005,38(4):725-729.
- [14] 邱丽娟,王曙明.中国大豆品种志(1993-2004)[M].北京:中国农业出版社,2007.
- [15] 中华人民共和国农业部.农业部办公厅关于推介发布2014年主导品种和主推技术的通知[OL].http://www.moa.gov.cn/zwillm/tzgg/tfw/201403/t2014-0317_3815613.htm.
- [16] 韩天富.大豆科技入户指南[M].北京:中国农业出版社,2011.
- [17] 王连铮.大豆研究50年[M].北京:中国农业科学技术出版社,2010.
- [18] 董水仙,姚先玲.大豆新品种—晋豆19号[J].*中国农技推广*,1999(1):43.
- [19] Paz M M, Martinez J C, Kalvig A B, et al. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation[J]. *Plant Cell Reports*, 2006,25(3):206-213.
- [20] 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 and Organ Culture*, 1999, 56(1): 37-46.
- [21] Chen C Y, Wang L, Winans S C. Characterization of the supervirulent virG gene of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiBo542[J]. *Molecular and General Genetics*,1991,230:302-309.
- [22] Duncan D B. Multiple range and multiple F tests[J]. *Biometrics*,1955,11(1):1-42.
- [23] Yamada T, Takagi K, Ishimoto M. Recent advances in soybean transformation and their application to molecular breeding and genomic analysis[J]. *Breeding Science*, 2012,61(5):480-494.
- [24] 王彩洁,孙 石,吴宝美.20世纪40年代以来中国大面积种植大豆品种的系谱分析[J].*中国油料作物学报*,2013,35(3):246-252.
- [25] 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.
- [26] 谢宏峰.影响农杆菌介导大豆遗传转化效率因素的研究[D].青岛:青岛农业大学,2007.
- [27] 岳岩磊,于丽杰,孙 石,等.利用草甘膦作为大豆子叶节遗传转化筛选剂的可行性分析[J].*大豆科学*, 2012,31(4):538-541.
- [28] 李 艳,李 毅,陈章良.转基因植物内源基因与外源基因共抑制问题研究进展[J].*生物工程学报*, 1999,15(1):1-5.
- [29] 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.
- [30] Hoque M E, Mansfield J W, Bennett M H. *Agrobacterium*-mediated transformation of Indica rice genotypes: an assessment of factors affecting the transformation efficiency[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*,2005, 82(1):45-55.
- [31] Sun H, Jia Z, Cao D, et al. *GmFT2a*, a soybean homolog of *FLOWERING LOCUS T*, is involved in flowering transition and maintenance[J]. *PLOS ONE*, 2011, 6(12):29238.
- [32] Cao D, Hou W, Liu W, et al. Overexpression of *TaN-HX2* enhances salt tolerance of 'composite' and whole transgenic soybean plants[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*,2011,107(3):541-552.
- [33] Song S, Hou W, Godo I, et al. Soybean seeds expressing feedback-insensitive cystathionine γ -synthase exhibit higher content of methionine[J]. *Journal of Experimental Botany*,2013,64(7):1917-1926.

(责任编辑:王丽芳)