

大豆再生体系和遗传转化研究进展

王晓春,刘尚前,罗永华

(河北北方学院农林科技学院,河北 宣化 075131)

摘要:尽管大豆再生与遗传转化取得了一定成果,但是再生率和转化率仍然很低,是公认的难转化作物。从大豆再生体系与遗传转化两个方面阐述其研究进展,并对目前转化中遇到的植株再生频率低和转化率低或得不到转化体的原因及解决方法提出一些看法。

关键词:大豆;植株再生;遗传转化

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2009)04-0731-05

Research Progress on Soybean Tissue Culture System and Transformation

WANG Xiao-chun, LIU Shang-qian, LUO Yong-hua

(Academy of Agriculture and Forest of Hebei North University, Xuanhua 075131, Hebei, China)

Abstract: The soybean is a generally acknowledged crop for transformation, the plant regeneration and transformation frequency still lowed although the plant regeneration system and genetic transformation have made great progress. The article will expound the major obstacle and the new progress on soybean tissue culture system and transformation system.

Key words: Soybean; Plant regeneration; Genetic transformation

大豆是重要的粮食作物、饲料作物和油料作物,同时还是重要的工业原料。长期以来,大豆在生长期间内易遭受病虫害,使产量和品质下降,传统的防治方法存在一定的局限性,通过转基因技术将抗菌、病、虫基因转入大豆,可能成为提高大豆产量和改善品质的有效途径之一。长期以来,大豆的遗传转化研究受到世界各国的普遍重视,任何成功的转化都依赖于高效的受体系统和转化方法的有效结合,即大量获得有再生潜能(全能性)的细胞,且对这些细胞进行有效的转化和筛选,获得转基因植株或种子。因此,建立良好的受体系统是实现基因转化的先决条件,关系到基因转化的成败。下面概述近年来大豆再生体系和遗传转化方面的研究进展,并对目前转化中遇到的植株再生频率低和转化率低或得不到转化体的原因及解决方法提出一些看法。

1 大豆再生体系研究进展

大豆的组织培养于 20 世纪 60 年代开始,一直到 80 年代分别建立了组织、细胞、原生质体水平的植株再生技术,为大豆的外源 DNA 导入提供了有效

的受体系统。

1.1 大豆体细胞胚胎发生再生系统

大豆体细胞胚胎发生本身繁殖快、单细胞起源、两极性等优点,是遗传转化的基础,不会出现嵌合体问题,而且体细胞胚团高密度高质量,遗传上稳定,可以一次获得大量植株;体细胞胚团可以在适宜的条件下保存,仍然具有再生能力,因此是基因枪和农杆菌转化的最适宜的受体系统^[1]。大豆体细胞胚胎发生再生系统采用的外植体主要为未成熟子叶、胚轴、完整幼胚。诱导培养基主要为 Ms 以及改良培养基,生长调节物质主要为 2,4-D 和 NAA。80 年代初期,Christianson 等^[2]以幼胚轴为外植体,诱导体细胞胚胎发生,首先获得再生植株。随后,Ranch 等对 2,4-D 诱导的大豆未成熟胚的体细胞胚胎发生系统进行了较为详细的研究。Lazzeri 等^[4]用 10 mg · L⁻¹ 2,4-D 诱导了大豆幼胚子叶的体细胞胚胎发生。他们认为 2,4-D 诱导大豆体细胞胚胎发生虽然频率高,但形态不正常,难以萌发形成完整植株。NAA 诱导的大豆体细胞胚胎发生虽然频率低,但是形态正常,可以不经过愈伤组织而直接生成子

收稿日期:2008-11-10
基金项目:国家植物转基因技术研究开发与中试基地建设专项课题资助项目(J99-B-001)。
作者简介:王晓春(1972-),女,副教授,硕士,现主要从事作物栽培与遗传育种工作与研究。E-mail:wangxiaochun305@sina.com。

叶期体细胞胚。最后获得可育再生植株。周思军等通过大豆幼胚培养,经过体细胞胚胎发生和组织培养获得再生植株,并对影响大豆体细胞胚胎发生的因素进行了系统研究。Finer 等^[5]报道了一个体细胞胚胎发生的悬浮培养系统并认为该系统是基因枪和农杆菌转化的理想的靶组织,目前为大豆转化的最适宜的受体系统。周思军、^[6]王萍^[7]、王罡等^[8]详细研究了固体培养的大豆体细胞胚胎发生与增殖的影响因子,认为基因型、低温预处理、激素、取材时间等因子影响再生率;曲桂芹等^[9],王晓春等^[10-11]研究了影响大豆体细胞胚萌发与再生的因子,提出基因型和体细胞胚形态正常是提高再生率的主要因素。

大豆体细胞胚胎发生为原生质体培养、人工种子(体细胞胚外面包上人工胚乳和人工种皮,就可以制备人工种子)制作、优良无性系的繁殖以及植物基因工程和突变体筛选提供良好的试验体系。但是此系统再生频率低,诱导出的体细胞胚畸形很多,不能发育成正常植株,而且体细胞胚多次继代增殖以后,胚性可能丧失以及体细胞变异等问题可能造成再生频率下降。因此有必要建立适合大豆体细胞胚基因转化的高效组织培养体系和遗传转化体系。

1.2 大豆器官发生再生系统

Cheng 等^[12]首次报道用无菌苗的子叶节为外植体,诱导丛生芽获得高频率的再生植株。Karthi等^[13]相继用无菌苗茎尖;Barwale 等^[14]用未成熟胚子叶;Wright^[15]用上胚轴和初生叶;Hinchee 等^[16]用成熟胚子叶;McCabe 等^[17]用幼胚轴;Kim 等以下胚轴^[18]相继通过器官发生获得再生植株。国内最先报道的是中国科学院植物所和黑龙江省农科院从大豆下胚轴诱导出再生幼苗。随后,1983 年陈云召等从大豆下胚轴和小真叶离体培养成再生植株;1994 年薛仁镐等^[19]培养幼胚、幼胚子叶、成熟子叶节、成熟子叶等再次从大豆下胚轴和小真叶离体培养成再生植株。至今已经获得成功的器官发生再生系统的外植体有成熟胚子叶、无菌苗的子叶节和幼胚轴等再生系统。

大豆器官发生再生系统外植体来源广泛,组织培养时间短,仅仅 3 个月就可以得到再生植株,但是此再生系统不经过愈伤组织的继代增殖,转化以后,即使在筛选浓度相对较高的培养基中筛选,部分非转化的不定芽仍然可以存活。所以筛选较难,而且

得到的植株多为嵌合体,增大了鉴定、筛选传代和纯化的工作量。

1.3 原生质体再生系统

Wei 等^[20]首次获得大豆原生质体再生植株。随后,罗希明等^[21]和 Dhir 等^[22]以相似的方法获得不同品种的大豆原生质体再生植株。张贤泽等^[23]和肖文言等^[24]培养大豆原生质体经胚胎发生获得再生植株。

从理论上讲,原生质体再生系统是克服嵌合体问题的最有潜力的系统,但是此系统工作量大,操作复杂,再生不易成功。

2 大豆遗传转化研究进展

大豆的遗传转化方法主要有农杆菌介导、基因枪、电击、花粉管通道与注射、原位转化、PEG 介导等,已经获得转抗虫基因植株。但是,大豆组织培养有一定的难度,是公认的难转化的作物,其主要原因是从转化的细胞或组织分化再生植株困难,尽管许多研究者致力于优化大豆的转化系统,但是大豆转化的频率仍然很低,受基因型限制,重复性很差。另外,大豆的再生系统尚不能与现有的植物转化方法很好的结合。

2.1 农杆菌介导法

Hinchee 等^[16]首次用农杆菌介导法以子叶为受体,经不定芽获得大豆转基因植株。Di 等^[25]以卡那霉素为筛选剂将 *BPMV* 外壳蛋白基因导入大豆。Zhang 等^[26]以 *Bar* 基因作选择标记基因,用除草剂草甘膦进行筛选获得转化植株。1998 年,Trick^[27]发现在外植体接种于农杆菌后进行短暂的超声波处理,使外植体表面产生大量的细小通道,农杆菌易于渗入,从而促进转化。还有与该法类似的真空抽滤或粒子轰击与农杆菌介导相结合等方法,其效果尚无定论。此后,该方法在大豆转化中取得了相当的进展。如周思军等^[28]用农杆菌介导法将 *Bt* 基因导入大豆;吴颖等^[29]以大豆子叶节为材料,王萍等^[30]以大豆幼胚为材料,分别将双价抗虫基因 *Bt* 和 *CpTI* 转入大豆获得双价抗虫转基因植株;2004 年,尹青女等^[31]转化热激转录因子 δ 基因转入大豆;2006 年,李小平等^[32]转化大豆子叶节将受体蛋白激酶基因(*rlpk2*) RNAi 转入大豆获得转基因植株。2007 年,党尉等^[33]利用根癌农杆菌对来自大豆成熟种子的胚尖进行遗传转化,将双价抗虫基因 *cryIA(c)* 和 *pta* 整合到大豆的基因组中,获得了 7 个大豆品系的

转基因植株,转化频率为 4.29% ~ 18%。

在农杆菌介导大豆转化过程中,影响转化的因子许多如基因型、培养条件、农杆菌菌株类型、感受态、再生率等等。农杆菌介导法主要优点是操作方便,可以转移大于 30bp 的外源基因,而且外源基因整合的拷贝数一般比较低,并且完整,有利于外源基因的表达以及遗传。而其他方法(如基因枪法)容易引起多拷贝的整合和变异,从而影响外源基因的表达和遗传。农杆菌转化大豆的主要限制是寄主和组织特异性,即不同大豆品种对农杆菌敏感性不同,农杆菌可能对再生的组织如体细胞胚、芽分生组织的转化频率比较低,低敏感性和低效率可以通过添加乙酰丁香酮或高毒性农杆菌菌株部分加以克服,但是此系统转化频率低。

2.2 基因枪法

此方法是对农杆菌不敏感的物种和基因型转化的常规方法,也是研究瞬时表达的常规技术,McCabe 等^[17]首次用基因枪法转化大豆未成熟胚的生长点,获得大豆转基因植株。Finer 等^[34]用携带 Hpt 和 Gus 基因的 DNA 包裹的钨粒轰击大豆的悬浮胚性细胞团,通过潮霉素筛选获得大量转基因植株。Stewart 等^[35]用合成的 *Bt* (*CryIAC*) 基因,通过基因枪轰击悬浮培养的球形体细胞胚,经过潮霉素筛选获得 3 个转基因株系。1994 年,Maughan 等^[36]用基因枪轰击固体培养的胚性细胞团,并在固体培养基上筛选,将牛酪蛋白基因转入大豆,获大量可育转基因植株。2002 年,王萍等^[37]用基因枪法将双价抗虫基因 *Bt* 和 *CpTI* 转入固体培养的大豆胚性细胞团,获得 *Gus* 的高效率的表达。2007 年,王晓春等^[38]用基因枪法将 *Bt* 基因转入大豆。

基因枪法有许多优点,但是其价格昂贵,转化率低,转化过程中经常发生重排和高拷贝插入现象,容易导致外源基因的失活和后代遗传规律紊乱,后期筛选能够表达目的基因转基因植株比较困难。因此尽量缩短和避免组织培养过程也是所有植物遗传转化的方向。

农杆菌介导和基因枪法以及其他转基因的方法必须经过组织培养过程,而且组织培养过程常常发生变异,既然大豆再生植株难,尽量避免和缩短组织培养过程也是所有植物遗传转化的方向。

2.3 原位转化法

Chee 等^[39]用农杆菌感染大豆发芽种子的腋芽区,获得植株中 0.07% 产生了转化的种子。Bech-

told 等^[40]创立了拟南芥侵染转化法,将组织在含 5% 蔗糖和 0.05% 表面活性剂的菌液中侵一下,可获得 0.5% 转化了的种子,目前已被用于大豆的遗传转化。

2.4 花粉管通道法

雷勃钧等^[41]提取野生大豆的总 DNA,经花粉管导入大豆,获得变异的大豆。刘博林等^[42]用子房微注射法将龙葵的 *Atrazine* 抗性基因导入大豆叶绿体中并得到表达。崔岩^[43]利用花粉管通道法首次将几丁质酶基因转入大豆。刘德璞等^[44]用大豆花粉管通道技术转化雪花莲凝集素(*GNA*)基因获得转基因植株。

2.5 电激和 PEG/电激的基因转化方法

大豆的电激和 PEG/电激的基因转化方法的原理是有电激或 PEG/电激的处理下细胞膜通透性的可逆性,使溶液中的大分子物质进入细胞,并改变细胞的物质构成。黄健秋等^[45]利用改良 PEG 介导法对大豆原生质体进行 *GUS* 基因转化,检测到了 *GUS* 基因的稳定表达。

南相日等^[46]用 PEG 介导法将 *Bt* 毒蛋白基因导入大豆的原生质体,经潮霉素筛选,选择有抗生素的愈伤组织分化获得再生植株。另外,与其相关的电激和 PEG 法与脂质体法,由于效率低,可以转移的外源基因为 6 ~ 8 kb,所以在大豆的转化中不常用。其它外源基因导入方法在大豆基因工程中尚未报道。

3 展望

基因工程技术在大豆育种中尽管取得了很大成就,但是目前大豆的转化率低,分析原因可能有以下几点:(1)外植体细胞表达外源选择抗性基因,从而为其他非转化细胞提供了一道屏障,逃避了选择压力的影响而继续分裂分化;(2)选择压力加的太迟或太少,致使非转化细胞分裂分化。(3)由于目的基因片段较大,在转化过程中发生断裂致使转化率低。(4)转化细胞的存活率可能较低。(5)在长时间的转化和筛选培养过程中,大豆对抗生素产生抗性以及实验的污染等问题使转化率下降。(6)外植体的感受状态及其分化能力可能下降致使转化率较低。因此仍然需要对转化的受体体系及转化体系进行深入研究。

目前,大豆的组织培养体系主要是器官发生即子叶节为外植体的再生和体细胞胚胎发生,前者再

生率高,但是用于遗传转化嵌合体较多,增大了鉴定、筛选传代和纯化的工作量。后者再生频率低,诱导出的体细胞胚畸形很多,不能发育成正常植株,而且体细胞胚多次继代增殖以后,胚性可能丧失以及体细胞变异等问题可能造成再生频率下降。两个体系均存在大豆基因型对组织培养的特异性。因此在今后应深入探讨大豆组织培养的条件,筛选适合多种基因型的培养基配方,减少大豆基因型对组织培养的特异性。

在大豆的遗传转化方面,主要问题是转化率低,重复性差,因此需要更进一步研究影响大豆转化的因素。从转入的目的基因来看,主要是抗虫基因、除草剂基因、几丁质酶基因等单个基因。在转入抗虫基因方面,抗虫范围已经越来越成为科学家感兴趣的研究领域。由于害虫对单个抗虫基因容易产生抗性,因此,同时将两种或两种以上具有不同抗虫机制的基因导入同一植物,试图通过不同基因之间的互补作用扩展抗虫谱和提高抗虫能力,从而达到有效和持久抗虫的目的。近年来,转双基因和多基因以增加作物抗性的报道越来越多,利用多种抗性基因和多种抗性机制可以增加作物抗性的有效性和持久性,例如对蛋白酶抑制剂基因、外凝集素基因等,尤其是豇豆胰蛋白酶抑制剂基因的研究。人们利用 *Bt* 毒蛋白基因与蛋白酶抑制剂基因的抗虫特性,开始尝试将 *Bt* 毒蛋白基因与 *CpTI* 基因同时转入植物,以获得抗虫能力更强的转基因植物,减少害虫对单一 *Bt* 毒蛋白基因植物产生抗性的潜在威胁。如转 *Bt* 和 *CpTI* 双价抗虫基因已经在大豆、烟草、棉花等作物上获得了成功,为将双价抗虫基因转入农作物奠定了基础。由于昆虫对两种独立杀虫剂产生耐受型几率很小,因此使用双价抗虫基因可能是解决这一问题的的重要途径。

以上是大豆生物工程近年来的研究进展,有的尚处于起步阶段,有的获得了突破性进展,有的已经进入大田试验。勿容置疑,生物工程技术即将在大豆育种改良中大显身手。

参考文献

[1] Sato Shirley, Newell Chrustine, Kolacz Kathryn, et al. Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems[J]. Plant Cell Reports, 1993, 12: 408-413.

[2] Christianson M L, Warnick D A, Carlson P S. A morpho-genetically competent soybean suspension culture [J]. Science, 1993, 222 (2): 632-634.

[3] Ranch J P, Oglesby L, Zielinski A C. Plant regeneration from embryo-derived tissue cultures of soybean by somatic embryogenesis [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 1985, 21 (11): 653- 658.

[4] Lazzeri P A, Hildebrand David F, Collins Glenn B. soybean somatic embryogenesis; effect nutritional, physical and chemical factors [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1987, 10: 209-220.

[5] Finer J J, Nagasawa A. Development of an embryogenic suspension culture of soybean [*Glycine max* Merrill] [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1988, 1 (5): 125-136.

[6] 周思军, 尹光初, 雷勃钧, 等. 大豆体细胞胚胎发生影响因素的研究[J]. 植物学通报, 1992, 9 (2): 38-43. (Zhou S J, Yin G C, Lei B J, et al. Studies on the influential factors of the somatic embryogenesis of soybean [J]. Plant Biology, 1992, 9 (2): 38-43.)

[7] 王萍, 王罡, 吕文河, 等. 大豆体细胞胚胎发生影响因素的研究 [J]. 中国农业科学 [J], 2002, 35 (6): 606-609. (Wang P, Wang G, Lv W H, et al. Studies of the factors affecting on somatic embryogenesis in soybean [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2002, 35 (6): 606-609.)

[8] 王罡, 王萍, 吴颖. 生长素诱导大豆未成熟子叶胚胎发生效应的研究 [J]. 吉林农业科学, 2002, 27 (2): 7-10. (Wang G, Wang P, Wu Y, et al. The effect of embryogenesis of immature cotyledon induced by auxins in soybean [J]. Agricultural Science of Jilin, 2002, 27 (2): 7-10.)

[9] 曲桂芹, 张贤泽, 霍俊伟. 大豆体细胞胚的成熟处理及植株再生 [J]. 东北农业大学学报, 2002, 33 (1): 82-89. (Qu G Q, Zhang X Z, Huo J W, et al. Maturation of soybean somatic embryos and the plant regeneration [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2002, 33 (1): 82 - 89.

[10] 王晓春, 刘尚前, 季静, 等. 影响大豆体细胞胚萌发率的因素 [J]. 大豆科学 [J], 2004, 2: 151-154. (Wang X C, Liu S Q, Ji J, et al. The affect factors on the germination frequency of somatic embryos of soybean [J]. Soybean Science, 2004, 2: 151-154.)

[11] 王晓春, 刘尚前, 王罡, 等. 大豆体细胞胚再生植株的研究 [J]. 大豆科学, 2006, 25 (2): 149-152. (Wang X, Liu S Q, Wang G, et al. A study of soybean plant regeneration via somatic tissue cultures [J]. Soybean Science, 2006, 25 (2): 149-152.)

[12] Cheng T Y, H Saka, T H Voqui-Dinh. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture [J]. Plant Science Letters, 1980, 19: 91-99.

[13] Kartha K K, Pahl K, Leung N L, et al. Plant regeneration from meristems of Grain legumes: soybean, cowpea, Peanut, chickpea, and bean [J]. Canadian Journal of Botany, 1981, 59: 1671-1679.

[14] Barwale U B, Kerns H R, Widholm J M. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis [J]. Planta, 1986, 67: 473-481.

[15] Wright M S, Williams M H, Pierson P E, et al. Initiation and propagation of *Glycine max* L. Merr; Plants from tissue-cultured epicotyls [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1987, 8: 83-90.

[16] Hinchey Mau D A, Conner - Ward D Annette V, Newell Christine A, et al. Production of transgenic soybean plants using Agrobacteri-

- um mediated DNA transfer [J]. Bio/Technology, 1988, 9:15-22.
- [17] McCabe Dennis E, Swain William F, Martinell Brian J et al. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by Particle acceleration [J]. Bio/Technology, 1988, 6:923-926.
- [18] Kim J, Lamotte C E, Hack E. Plant regeneration In vitro from primary leaf nodes of soybean (*Glycine max*) seedling in Gs [J]. Journal Plant Physiology, 1990, 136:664-669.
- [19] 薛仁镐, 刘淑兰, 韩碧文. 大豆未成熟子叶诱导胚状体发生再生植株 [J]. 延边农学院学报, 1995, 17(3):20-22. (Xue R G, Liu S L, Han B W, et al. Plant regeneration from immature cotyledons culture of soybean via somatic embryogenesis [J]. Yanbian Agricultural College, 1995, 17(3):20-22.)
- [20] Wei Z M, Xu Z H. Plant regeneration from Protoplasts of soybean (*Glycine max* L.) [J]. Plant Cell Reports, 1988, 7:348-351.
- [21] 罗希明, 赵桂兰, 简玉瑜. 大豆原生质体的植株再生 [J]. 植物学报, 1990, 32:616-621. (Luo X M, Zhao G L, Jian Y Y, et al, Plant regeneration from protoplast of soybean [J]. Acta Botanica Sinica, 1990, 32:616-621.)
- [22] Dhir, Sarwan K, Dhir Seema, Widholm J M. Regeneration of fertile Plants from protoplasts of soybean (*Glycine max* L. Merr.) : Genotypic differences in culture response [J]. Plant Cell Reports, 1992, 11(2):85-89.
- [23] 张贤泽. 大豆原生质体经细胞胚再生植株 [J]. 中国科学 (B 辑), 1993, 23(1):54-158. (Zhang X Z. Plant regeneration from from protoplast of soybean embryogenesis [J]. Science In China Series B, 1993, 23(1):154-158.)
- [24] 肖文言, 王连铮. 大豆原生质体培养经胚胎发生高频率再生植株 [J]. 大豆科学, 1993, 12:249-251. (Xiao W Y, Wang L Z, et al. Plant regeneration with high frequency from protoplast of soybean embryogenesis [J]. Soybean Science, 1993, 12:249-251.)
- [25] Di Rong, Purcell Virginia, Collins Glenn B, et al. Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene [J]. Plant Cell Reports, 1996, 15:746-750.
- [26] Zhang Zhan Yuan, Xing Aiqiu, 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, 56:37-46.
- [27] Trick H N, Finer J J. Sonication - assisted Aerobacterium-mediated transformation of soybean (*Glycine max* L. Merrill) embryogenic suspension culture tissue [J]. Plant Cell Reports, 1998, 17:482-488.
- [28] 周思军, 李稀臣, 刘昭军, 等. 通过农杆菌介导法将 *Bt* (*CryIA*) 基因导入大豆 [J]. 大豆科学, 2001, 20(3):157-162. (Zhou S J, Li X C, Liu Z J. Introduction of *Bt* Gene (*CryIA*) into soybean by agrobacterium-mediated transformation [J]. Soybean Science, 2001, 20(3):157-162.)
- [29] 吴颖, 王萍, 季静, 等. 农杆菌转化法将抗虫基因导入大豆获转基因植株 [J]. 吉林农业大学学报, 2003, (4):101-104. (Wu Y, Wang P, Ji J, et al. Put *Bt* gene transfer into somatic via agrobacterium tumefaciens [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2003, (4):101-104.)
- [30] 王萍, 王罡, 季静, 等. 农杆菌介导大豆未成熟子叶的遗传转化 [J]. 大豆科学, 2004, 23(2):86-89. (Wang P, Wang G, Ji J, et al. Genetic transformation of immature cotyledon via agrobacterium tumefaciens in soybean [J]. Soybean Science, 2004, 23(2):86-89.)
- [31] 尹青女, 吕慧颖, 朱保葛, 等. 农杆菌介导法将热激转录因子 *8* 基因转入大豆 [J]. 分子植物育种, 2004, (6):28-30. (Yin Q N, Lü H Y, Zhu B G, et al. Heat shock factor 8 (*hsf8*) introduced into soybean mediated-agrobacterium transformation [J]. Molecular Plant Breeding, 2004, (6):28-30.)
- [32] 李小平, 邓楠, 马媛媛, 等. 大豆类受体蛋白激酶基因 (*rpk2*) RNAi 双元表达载体的构建及其转基因 [J]. 分子细胞生物学报, 2006, (1):55-60. (Li X P, Deng N, Ma Y Y, et al. Construction of rai binary vector of soybean receptor-like kinase gene (*rpk2*) and its soybean transformation [J]. Journal of Molecular Cell Biology, 2006, (1):55-60.)
- [33] 党尉, 卫志明. 根瘤农杆菌介导的高效大豆遗传转化体系的建立 [J]. 分子细胞生物学报, 2007, (3):85-96. (Dang W, Wei Z M. Efficient agrobacterium-mediated transformation of soybean [J]. Journal of Molecular Cell Biology, 2007, (3):85-96.)
- [34] Finer J J, McMullen M D. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 1991, 27:175-182.
- [35] Stewart C N, Adang M J, All J N, et al. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic bacillus thuringiensis *cry1Ac* gene [J]. Plant Physiology, 1996, 112:121-129.
- [36] Maughan P J, Philip R, Cho M-J, et al. Biolistic transformation, expression and inheritance of bovine B-casein in soybean [J]. In Vitro Cell Biology, 1999, 35P:344-349.
- [37] 王萍, 王罡, 季静, 等. 影响大豆基因枪遗传转化因子的研究 [J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(3):36-37. (Wang P, Wang G, Ji J, et al. Studies on the factors affecting on genetic transformation by particle bombardments in soybean [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2002, 10(3):36-37.)
- [38] 王晓春, 王罡, 季静, 等. 用基因枪法将 *Bt* 基因转入大豆的研究 [J]. 大豆科学, 2007, 26(2):140-143. (Wang X C, Wang G, Ji J, et al. A study of *bt* gene transformation into somatic microprojectile bombardment [J]. Soybean Science, 2007, 26(2):140-143.)
- [39] Chee P P, Fober K A, Slightom J L. Transformation of soybean (*Glycine max*) by infecting germinating seeds with Agrobacterium tumefaciens [J]. Plant Physiology, 1989, 91:1212-1218.
- [40] Bechtold N, Ellis J, Pelletier G. In planta Aerobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants [J]. C. R. Acad. Sci. Paris, Life, Science. 1993, 316:1194-1199.
- [41] 雷勃钧, 尹光初, 卢翠华, 等. 外源 DNA 直接导入大豆的研究 [J]. 大豆科学, 1991, 10(1):58-62. (Lei B J, Yin G C, Lu C H, et al. Study of exogenous dna directly transferred into soybean [J]. Soybean Science, 1991, 10(1):58-62.)

参考文献

- [1] 王文真,刘兴媛,曹水生,等. 中国大豆种质资源的蛋白质含量研究[J]. 作物品种资源,1998,(1):35-36. (Wang W Z,Liu X Y,Cao S S,et al. Research on protein content of Chinese soybean seed source[J]. Crop Varieties Source,1998(1):35-36.)
- [2] 王连铮,王金陵. 大豆遗传育种学[M]. 北京:科学出版社,1992:54--60. (Wang L Z,Wang J L. Soybean genetics and breeding [M]. Beijing:Science Press,1992:54-60.)
- [3] 王新风,富健,孟凡钢,等. 影响大豆籽粒蛋白质含量因素及其改良途径[J]. 大豆科学,2008,27(3):515-520. (Wang X F,Fu J,Meng F G,et al. Factors influencing seed protein content in soybean and its improving ways[J]. Soybean Science,2008,27(3):515-520.)
- [4] 邱丽娟,王金陵,孟庆喜. 大豆种子发育过程中蛋白质和脂肪积累特点的初步研究[J]. 中国农业科学,1990,23(5):28-32. (Qiu L J,Wang J L,Meng Q X. A preliminary study on accumulation characteristics of protein and fat in developing soybean seeds [J]. Agricultural Sciences in China,1990,23(5):28-32.)
- [5] 孟祥勋,王曙明,李爱萍,等. 不同年份及地点对大豆籽粒蛋白质和脂肪含量的影响[J]. 吉林农业科学,1990,(4):17-20. (Meng X X,Wang S M,Li A P,et al. Protein and oil contents of soybean seeds as influences by years and locations[J]. Jilin Agricultural Sciences,1990(4):17-20.)
- [6] Sale, Campbell. Changes in physical characteristics and composition soybean seed during crop development [J]. Field Crop Research,1980,3:147-151.
- [7] 张恒善,付艳华,孙太石. 大豆种子脂肪和蛋白质积累规律的研究[J]. 大豆科学,1993,12(4):296-301. (Zhang H S,Fu Y H,Sun T S. Study on the rule of accumulation of oil and protein soybean seed[J]. Soybean science,1993,12(4):296-301.)
- [8] 周顺启,张代军,栾怀海. 高油大豆品种蛋白质和脂肪积累规律初探[J]. 中国油料作物学报,2006,28(2):214-216. (Zhou S Q,Zhang D J,Luan H H. Primary study on protein and lipid accumulation in high oil content soybean varieties[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences,2006,28(2):214-216.)
- [9] 陈丽华,李杰,刘丽君. 大豆蛋白质的积累动态及其与产质量形成的关系[J]. 东北农业大学学报,2002,33(2):116-124. (Chen L H,Li J,Liu L J. The relationship between protein accumulation regulation and yield formation in soybean[J]. Journal of Northeast Agricultural University,2002,33(2):116-124.)
- [10] 刘中奇,李志刚,谭巍巍. 不同大豆品种籽粒体积、含水量、脂肪和蛋白质积累动态分析[J]. 大豆科学,2007,26(2):194-197. (Liu Z Q,Li Z G,Tan W W. Dynamic analysis of accumulation of volume, water content, fat and protein of different soybean seeds[J]. Soybean Science,2007,26(2):194-197.)
- [11] 赵晋忠,吴慎杰,杜维俊. 不同生育期大豆品种蛋白质、脂肪积累的变化规律及其与品质的关系[J]. 华北农学报,2004,19(4):33-35. (Zhao J Z,Wu S J,Du W J. The relationship between variation and quality and the accumulation of protein and fat with different maturing soybean cultivars[J]. Acta Agriculture Breai-Sinica,2004,19(4):33-35.)
- [12] 辛大伟,陈庆山,单继勋. 不同大豆品种品质性状的动态积累[J]. 东北农业大学学报,2006,37(5):592-595. (Xin D W,Chen Q S,Shan J X. Research on quality dynamic accumulation of different soybean varieties[J]. Journal of Northeast Agricultural University,2006,37(5):592-595.)
- [13] 刘晓冰,王光华,金剑,等. 大豆籽粒蛋白质与脂肪积累方式研究[J]. 中国生态农业学报,1999,7(4):5-8. (Liu X B,Wang G H,Jin J,et al. Accumulation patterns of grain protein and fat during reproductive development of soybean[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture,1999,7(4):5-8.)
- [14] Rubel A,Rinne R W,Canvin D T. Protein, oil and fatty acid in developing soybean seeds[J]. Crop Science,1972,12(6):739-741.
- (上接第 735 页)
- [42] 刘博林,岳绍先,胡乃璧,等. 龙葵 Atrazine 抗性基因向大豆叶绿体的转移及在转基因植株中的表达[J]. 中国科学(B 辑)1989,19:699-705. (Liu B L,Yue S X,Hu N B,et al. Transferring resistance against Atrazine gene to chloroplast of soybean and express in transgenic soybean plants[J]. Science In China(Series B),1989,19(7):699-705.)
- [43] 崔言. 大豆利用花粉管通道技术导入抗病虫目的基因的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2000. (Cui Y. The study on the technique of pollen tube path way used to introduce insect-resistant and disease-resistant gene into soybeans [D]. Harbin: Northeast Agricultural University,2000.)
- [44] 刘德璞,袁鹰,唐克轩,等. 大豆花粉管通道技术转化雪花莲凝集素(GNA)基因[J]. 分子植物育种,2006(5):68-71. (Liu D P,Yuan Y,Tang K X,et al. Transforming the snowdrop lectin (Galanthus nivalis agglutinin, gna) gene to soybean by pollen tube pathway technique [J]. Molecular Plant Breeding,2006(5):68-71.)
- [45] 黄健秋,卫志明,许智宏. PSBA 基因在大豆未成熟子叶原生质体中的表达[J]. 植物学报,1992,34:26-30. (Huang J Q,Wei Z M,Xu Z H. Gene PSBA expressed in the protoplast of immature cotyledon of soybean[J]. Acta Botanica Sinica,1992,34:26-30.)
- [46] 南相日,刘文萍,刘丽艳,等. PEG 介导 Bt 基因转化大豆原生质体获得转基因植株[J]. 大豆科学,1998,17(4):326-329. (Nan X R,Liu W P,Liu L Y et al. Peg-mediated transformation and regeneration of soybean protoplast with bacillus thuringiensis crgiac gene[J]. Soybean Science,1998,17(4):326-329.)