

## 农杆菌介导的大豆子叶节和下胚轴转化方法的比较及优化

段莹莹, 赵琳, 陈李淼, 李文滨

(东北农业大学 大豆研究所, 教育部大豆生物学重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:**以东农50、东农42和黑农44的子叶节和下胚轴为外植体,对农杆菌介导的大豆子叶节和下胚轴2种转化方法进行了比较和优化。结果表明:不同转化方法对大豆的品种要求不同,东农50适合子叶节转化法,而黑农44适合下胚轴转化法。在子叶节转化体系中,卡那霉素的筛选浓度是 $100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,在下胚轴转化体系中,卡那霉素的筛选浓度是 $75\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,可见下胚轴体系比子叶节体系在卡那霉素筛选过程中表现得更为敏感。在子叶节和下胚轴转化体系中,最适乙酰丁香酮浓度均为 $200\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,最适共培养时间均为3 d。在子叶节转化体系中,5 d苗龄时转化率最高,而下胚轴转化体系中,4~6 d苗龄时转化率均较高,以6 d苗龄最高。

**关键词:**大豆;子叶节转化;下胚轴转化

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2010)04-0590-04

## Comparison and Optimization of the *Agrobacterium*-mediated Transformation of Soybean by Using Cotyledonary Node and Hypocotyl Explants

DUAN Ying-ying, ZHAO Lin, CHEN Li-miao, LI Wen-bin

(Soybean Research Institute, Northeast Agricultural University, Key Laboratory of National Educational Department, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

**Abstract:** Soybean cotyledonary node and hypocotyl transformation methods were compared and optimized using three soybean genotypes, Dongnong 50, Dongnong 42 and Heinong 44. The results showed that different transformation methods required different soybean varieties. Dongnong 50 was suitable to cotyledonary node transformation method, while Heinong 44 was suitable to hypocotyl transformation method. In the cotyledonary node transformation system, the screening concentration of Kanamycin was  $100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , while in the hypocotyl transformation system was  $75\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , the hypocotyl transformation system was more sensitive than the cotyledonary node transformation system to kanamycin. The optimal concentration of acetosyringone was both  $200\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , the optimal co-culture time was both 3 d in the cotyledonary node and hypocotyl transformation systems. In the cotyledonary node transformation system, conversion rate was the highest when the seedling age was 5 d, while in the hypocotyl transformation system, conversion rate was higher in 4-6 d, in which the highest was 6 d.

**Key words:** Soybean; Cotyledonary node transformation; Hypocotyl transformation

大豆是重要的粮食和油料作物,也是植物蛋白、脂类、维生素和矿物质等物质的天然资源。大豆的高效遗传转化一直是大豆植物基因工程领域的难点之一<sup>[1]</sup>。目前应用于大豆遗传转化的方法主要有根癌农杆菌介导法、基因枪法、真空抽滤法和花粉管导入法等,但其中获得较为广泛应用的只有根癌农杆菌介导法和基因枪法。农杆菌介导的大豆遗传转化虽然转化效率很低并具有较强的基因型依赖性,但与其它方法比起来具有经济、操作简单、能够准确、完整地以单拷贝或低拷贝的形式插入到受体基因组中等优点,因此仍然是大豆遗传转

化的首选方法。

子叶节是诸多农杆菌介导的大豆遗传转化报告中最为成功的受体材料,Cheng等<sup>[2]</sup>用无菌苗子叶节首次报告成功。但由此转化系统获得的转化植株嵌合体较多,导致后期鉴定、筛选、传代和纯化的工作量大。大豆下胚轴是一种很好的组织培养材料,从20世纪70年代开始就已经陆续由其诱导愈伤并再生植株成功<sup>[3-4]</sup>,这种方法操作简单,并且能够高效诱导出愈伤组织<sup>[5]</sup>,近年来Wang等<sup>[6]</sup>以大豆下胚轴为外植体进行遗传转化并获得成功,因此可能会成为今后大豆转化的主要方法之一。

收稿日期:2010-03-09

**基金项目:**转基因生物新品种培育科技重大专项资助项目(2008ZX08004-005、2009ZX08009-089B);哈尔滨市科技创新人才研究专项资助项目(RC2008QN002017);东北农业大学博士启动基金资助项目;大豆生物学省部共建教育部重点实验室开放基金资助项目(SB08A04);黑龙江省教育厅科学技术研究资助项目(11541029)。

**第一作者简介:**段莹莹(1985-),女,在读硕士,现主要从事大豆转基因方面的研究。

**通讯作者:**李文滨,教授,博士生导师。E-mail:wenbinli@yahoo.com。

自 Hinchee 等和 McCabe 等分别用农杆菌介导法和基因枪法转化大豆成功得到转基因植株以来<sup>[7-8]</sup>,虽然有许多这方面的报道,但由于遗传转化体系还不完善等原因,并没有取得突破性的进展。因此,只有建立优良的转基因受体系统,并结合适宜的转基因方法,才能使转基因技术在大豆的性状改良、新品种培育中发挥重要作用。笔者系统比较了各种因素如大豆的基因型、筛选剂浓度、大豆的苗龄和共培养时间、乙酰丁香酮浓度等对农杆菌介导的大豆子叶节和下胚轴转化方法转化效率的影响,以此来优化大豆转化条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

1.1.1 大豆品种 选用东农 50、东农 42 和黑农 44 3 个大豆品种;以大豆子叶节和下胚轴为受体材料。

1.1.2 质粒和菌株 pGEM-T 载体购自 Promega 公司,pBI121-GmRAV 为实验室保存的菌种,卡那霉素抗性。农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 由实验室保存。

1.1.3 培养基 子叶节转化法采用 Paula 等<sup>[9]</sup>报道的培养基配方;下胚轴转化法采用 Wang 等<sup>[6]</sup>报道的培养基配方。

### 1.2 试验方法

1.2.1 菌液制备 从新鲜的平板挑取单菌落,接种到含有相应抗生素的培养基上,28℃、200 r·min<sup>-1</sup>振荡培养至 OD<sub>600</sub> = 0.8,在 4℃、5 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,去上清液,再用液体的 CCM(共培养基)重悬至 OD<sub>600</sub> = 0.6,备用。

1.2.2 大豆子叶节的制备及转化 取表面光滑无病斑的大豆成熟种子,放入 NaClO/HCl(24:1),HCl 稍过量的滤器中灭菌后,接种萌发培养基中,在光照 25℃、16 h/8h 光周期下萌发,3~7 d 后,取出无菌苗,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,除去顶芽和腋芽,用解剖刀在子叶与胚轴交接处直径约 3 mm 的范围内划 5~7 刀。将制备好的子叶节放入重悬后的侵染液中 28℃,120 r·min<sup>-1</sup>摇晃 30 min。倒掉菌液,用无菌滤纸吸掉多余的菌液。然后将外植体近轴面朝下接种在铺有一层无菌滤纸的含不同浓度乙酰丁香酮(0、100、200、300、400 μmol·L<sup>-1</sup>)的共培养培养基上。黑暗下

共培养 1~5 d。共培养后将外植体转入无菌三角瓶中,先加入无菌水中洗 2~3 次,再在液体芽诱导培养基中洗 2~3 次,然后使子叶近轴面朝上,将下胚轴插入固体芽诱导培养基中。恢复培养 7 d,转入含有不同卡那霉素浓度(0、50、75、100、125、150 mg·L<sup>-1</sup>)的筛选培养基中,筛选 7 d 后,将外植体转入固体芽伸长培养基中。待抗性苗长约 2~3 cm 时,转入生根培养基中。待抗性植株生根并长出 2 片以上复叶后,将其转入盛有灭菌后的蛭石的小盆中。

1.2.3 大豆下胚轴的制备及转化 大豆种子消毒及培养方法同 1.2.2,萌发 3~7 d 后,取出无菌苗,先切去子叶,然后切去侧芽和部分根,最后得到 1~2 cm 长的下胚轴。将切好的下胚轴浸泡在重悬备用液中,侵染 30 min,然后用无菌滤纸吸干菌液。将其接种到铺有一张无菌滤纸的含不同浓度乙酰丁香酮(0、100、200、300、400 μmol·L<sup>-1</sup>)的固体共培养培养基上,25±1℃暗培养 1~5 d。共培养后将下胚轴先用灭菌水冲洗 2~3 次,再用液体 SIM 冲洗 2~3 次,再将下胚轴接种于恢复培养基上。7 d 后,将下胚轴接种于含有不同卡那霉素浓度(0、50、75、100、125、150 mg·L<sup>-1</sup>)的伸长培养基上培养,每隔 14 d 继代 1 次。待抗性苗长约 2~3 cm 时,转入生根培养基中。待抗性植株生根并长出 2 片以上复叶后,将其转入盛有灭菌后的蛭石的小盆中。

### 1.3 数据分析

以出芽率、再生频率、抗性丛生芽获得率为指标,进行分析比较。

出芽率 = 丛生芽数量/外植体数量 × 100%

再生率 = 再生植株数量/外植体数量 × 100%

抗性丛生芽获得率 = 抗性丛生芽数量/侵染外植体数量 × 100%

## 2 结果与分析

### 2.1 不同品种对子叶节和下胚轴转化效率的影响

选择不同外植体时需要选择相应的再生频率高的大豆品种来提高大豆转化效率。对 3 个大豆品种子叶节和下胚轴外植体进行再生培养,培养 14 d 后对其再生频率进行统计,结果见表 1。在子叶节再生体系中,东农 50 的再生率最高;在下胚轴再生体系中,黑农 44 的再生率最高。因此在后续试验中分别选用东农 50 和黑农 44 为子叶节和下胚轴转化法的相应试验品种。

表1 大豆基因型的筛选  
Table 1 Screening of soybean genotype

外植体 Explant	品种 Varieties	外植体数 Explants	丛生芽数 Multiple shoot	出芽率 Frequency/%	再生植株数 Regeneration shoot	再生率 Frequency/%
子叶节 Cotyledonary Node	东农 50 Dongnong 50	135	119	88.1	86	63.7
	东农 42 Dongnong 42	132	78	59.1	34	25.8
	黑农 44 Heinong 44	134	81	60.4	37	27.6
下胚轴 Hypocotyl	东农 50 Dongnong 50	132	72	54.5	32	24.2
	东农 42 Dongnong 42	132	90	68.2	41	31.1
	黑农 44 Heinong 44	131	115	87.8	69	52.7

2.2 大豆最佳卡那霉素筛选浓度的确定

选择延迟 7 d 筛选法比较了子叶节和下胚轴 2 种外植体对卡那霉素的敏感性(表 2)。子叶节在 Kan 浓度为 100 mg · L<sup>-1</sup> 时全部褐化死亡,下胚轴

在 Kan 浓度为 75 mg · L<sup>-1</sup> 时全部褐化死亡,可见下胚轴体系比子叶节体系在卡那霉素筛选过程中表现得更为敏感,在一定的抗性筛选条件下,下胚轴体系能够更有效的获得抗性植株。

表 2 大豆子叶节和下胚轴对卡那霉素敏感性的比较

Table 2 Comparison of cotyledonary node and hypocotyl for the sensitivity to kanamycin

品种 Varieties		卡那霉素浓度 Kanamycin concentration/mg · L <sup>-1</sup>					
		0	50	75	100	125	150
东农 50 Dongnong 50	子叶节褐化率 Percentage of etiolation	0	31	59	100	100	100
黑农 44 Heinong 44	下胚轴褐化率 Percentage of etiolation	0	47	100	100	100	100

2.3 乙酰丁香酮对大豆子叶节和下胚轴转化效率的影响

乙酰丁香酮(AS)已经在多种农杆菌介导的植物转化系统中被证明可以提高转化效率<sup>[10]</sup>,通过在共培养培养基中添加不同浓度 AS(0、100、200、300、400 μmol · L<sup>-1</sup>),用抗性丛生芽获得率来计算其对大豆子叶节和下胚轴转化频率的影响。大豆子叶节和下胚轴转化率均随着 AS 浓度的升高呈先增后减趋势,最适 AS 浓度均为 200 μmol · L<sup>-1</sup>(图 1)。

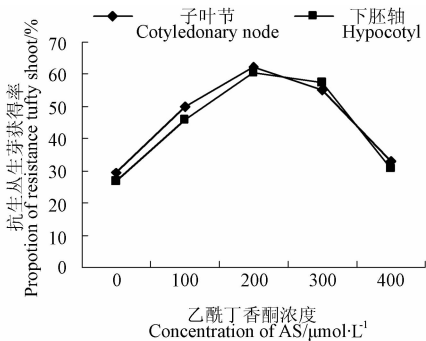


图 1 乙酰丁香酮对大豆子叶节和下胚轴转化效率的影响  
Fig. 1 Effect of acetosyringone on the transformation frequency of cotyledonary-nodes and hypocotyl

2.4 苗龄对大豆子叶节和下胚轴转化效率的影响

3~7 日龄无菌苗来源的子叶节和下胚轴均可产生较多不定芽,因此,设置 3、4、5、6、7 d 5 个外植体苗龄水平,用抗性丛生芽获得率来计算其对大豆子叶节和下胚轴转化频率的影响。大豆子叶节和下胚轴转化率均随着苗龄的增加呈先增后减趋势,

对于子叶节转化法,东农 50 在 5 d 苗龄时转化率最高,对于下胚轴转化法,黑农 44 在 4~6 d 苗龄时转化率均较高,以 6 d 苗龄最高(图 2)。

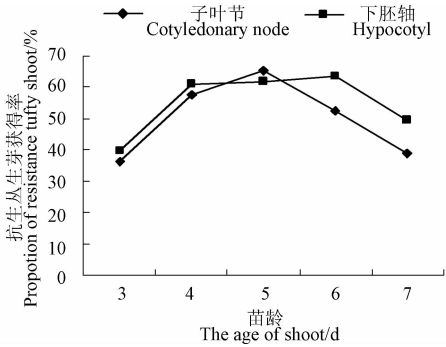


图 2 苗龄对大豆子叶节和下胚轴转化效率的影响  
Fig. 2 Effect of the age of shoots on cotyledonary-nodes and hypocotyl transformation frequency

2.5 共培养时间对大豆子叶节和下胚轴转化效率的影响

共培养时间是影响大豆转化效率的重要因素。研究了共培养时间对大豆子叶节和下胚轴转化效率的影响,进而确定合适的共培养时间。大豆子叶节和下胚轴转化率均随着共培养时间的增加呈先增后减趋势,最适共培养时间均为 3 d(图 3)。

3 讨论

农杆菌介导的大豆转化系统有较高的基因型依赖性,转化频率既受菌株的影响,也与受体基因型有关,只有较高再生频率的再生系统与适宜的转

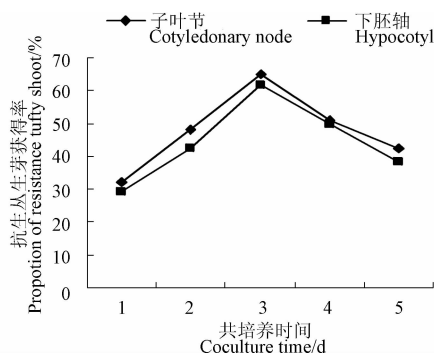


图3 共培养时间对子叶节和下胚轴转化效率的影响

Fig. 3 Effect of co-culture time on cotyledonary-nodes and hypocotyl transformation frequency

化方法相结合,才有可能获得转化的成功和转化频率的提高。对栽培大豆东农 50、东农 42 和黑农 44 的子叶节和下胚轴为外植体的 2 种转化方法进行了比较和优化。发现在子叶节再生体系中,东农 50 的再生率最高;在下胚轴再生体系中,黑农 44 的再生率最高。结果表明,不同品种在同一外植体间的再生能力相差很大,而且相同品种在不同的外植体间的再生能力也有差异。

根据 Paula 等<sup>[9]</sup>、刘海坤<sup>[11]</sup>的研究结果,共培养后先采用恢复培养,待外植体恢复正常的生长活力后再进行筛选。这样可以避免因感染和共培养期间植物生长能力减弱不能承受筛选压力而致死,易于获得转基因植株,同时提高转化效率。他们还认为在无选择压力的丛生芽诱导培养基上培养 7 d 时丛生芽刚好萌动,此时进行选择,丛生芽既能承受选择压力又不至于因压力过大而受到伤害,选择模式比较温和,产生的嵌合体较少。因此,研究选用卡那霉素的延迟筛选法,结果发现子叶节在 Kan 浓度为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时全部褐化死亡,下胚轴在 Kan 浓度为  $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时全部褐化死亡,可见下胚轴体系比子叶节体系在卡那霉素筛选过程中表现得更为敏感,在一定的抗性筛选条件下,下胚轴体系能够更有效的获得抗性植株。

根癌农杆菌侵染植物细胞,首先要求 *vir* 基因的活化。农杆菌 *vir* 区的活化是通过 *virA/virG* 双组分系统调节的<sup>[12]</sup>。酚类物质如乙酰丁香酮可以诱导农杆菌 *vir* 基因的活化,首先是 *virA* 受到酚类诱导物的诱导后激活 *virG*,然后进一步激活 *vir* 区基因的表达。*vir* 基因的表达控制着 T-DNA 的转移。在大豆转化的共培养培养基中添加乙酰丁香酮可以部分克服农杆菌介导的大豆转化的种和组织的特异性<sup>[13]</sup>,是农杆菌介导的大豆转化成功的重要因素<sup>[14]</sup>。乙酰丁香酮(AS)已经在多种农杆菌介导的植物转化系统中被证明可以提高转化效率<sup>[10]</sup>,通过该试验的研究发现,不论是大豆子叶节还是下胚轴

转化体系,AS 的浓度在  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时二者的转化效率都达到最高。

大豆子叶节不定芽的再生能力和对农杆菌的感受能力受大豆苗龄的影响很大。Meyer 等<sup>[15]</sup>研究农杆菌转化机理时指出,转化细胞只发生在细胞分裂的一个较短的时期内,因为核基因组 DNA 只有在复制时才能使外源 DNA 整合,所以可能只处于细胞分裂周期的 S 期(DNA 合成期)才具有外源基因的转化能力。因此,不同发育时期的组织细胞的转化能力有着很大的差别,发育晚期的组织细胞转化能力较差,发育早期的组织细胞转化能力较强。结果发现 5 d 苗龄的大豆子叶节转化效率最高,苗龄的缩短或延长转化率都会降低,而在下胚轴转化体系中,萌发 4~6 d 内取材时对转化率的影响不大。

农杆菌对植物进行侵染时,必须在创伤部位生存 16 h 以上,才能将 T-DNA 转移到植物细胞中,因此,共培养时间必须大于 16 h。但是,共培养时间也不宜太长,如果共培养时间过长,农杆菌会过度生长,不仅造成除菌困难,还会导致植物细胞受毒害而死亡<sup>[16]</sup>。因此,研究发现大豆子叶节和下胚轴转化体系中的最适共培养时间都是 3 d。

## 参考文献

- [1] Singh R J, Hymowitz T. Soybean genetic resources and crop improvement[J]. *Genome*, 1999, 42: 605-616.
- [2] Cheng T Y, Saka T, Voqui-Dinh T H. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture[J]. *Plant Sciences*, 1980, 19: 91-99.
- [3] Kaneda Y, Tabei Y, Nishimura S. Combination of thidiazuron and basal medium with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.) [J]. *Plant Cell Reports*, 1997, 17: 8-12.
- [4] 张晓娟, 方小平, 罗丽霞, 等. TDZ 和 BA 对诱导大豆胚轴植株再生的影响[J]. *中国油料作物学报*, 2000, 22(1): 24-26. (Zhang X J, Fang X P, Luo L X, et al. Influence of TDZ and BA on efficiency of plant regeneration via organogenesis in soybean [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2000, 22(1): 24-26.)
- [5] Liu Z H, Wang W C, Yan S Y. Effect of hormone treatment on callus formation and endogenous indoleacetic acid and polyamine contents of soybean hypocotyl cultivated *in vitro* [J]. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 1997, 38: 171-176.
- [6] Wang G L, Xu Y N. Hypocotyl-based Agrobacterium-mediated transformation of soybean (*Glycine max*) and application for RNA interference[J]. *Plant Cell Reports*, 2008, 25: 535-539.
- [7] Hinchey M A W, Conner-Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using Agrobacterium-mediated DNA transfer[J]. *Nature Biotechnology*, 1988, 6: 915-922.
- [8] McCabe D E, Swain W F, Martinell B J, et al. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration[J]. *Nature Biotechnology*, 1988, 6: 923-926.

于 SYBR green I 能与所有的双链 DNA 模板结合,因而引物二聚体或其它非特异性扩增产物均能对定量结果产生干扰,所以能否设计到合适引物是荧光定量 PCR 能否正常进行和准确定量的关键<sup>[7]</sup>。该文中目的基因 *CO* 和内参基因 *ACTIN* 的引物特异性用融解曲线分析,均为单一峰型,无非特异性扩增,可用来进行荧光定量 PCR 检测<sup>[8]</sup>。同时,选择适合的内参基因对获得的数据进行归一化处理,对获得精确可靠的结果也是必需的。*ACTIN* 基因在生物发育的不同阶段、各种逆境以及激素处理下均能持续稳定表达,选其作为荧光定量 PCR 的内参基因,可较好的排除总 RNA 提取过程造成的差异及 PCR 效率的影响,能在较广的范围内定量研究基因的表达水平。

目前对于光周期调控植物开花分子机理的研究主要集中在拟南芥和水稻中。由于拟南芥属于长日植物而水稻是单子叶植物,二者机制的差别不能揭示长日与短日机制的真正差别。而大豆是严格的短日植物,同时又是双子叶植物,大豆光周期机制的研究将印证长日与短日、单子叶与双子叶的真正异同之处,进一步完善植物光周期反应机制的理论体系。

植物 *CO* 基因是一个古老的基因家族,其家族成员的异化早于单子叶和双子叶植物进化上的分离。在拟南芥中的研究显示,*CO* 基因在控制植物开花中的途径与功能是保守的,只是由于其它因子的调控作用,导致产生不同的开花习性<sup>[9]</sup>。

东农 49 和东农 42 中 *CO* 基因在 24 h 的表达峰值均在光暗交界处,证实了其表达受光周期调控,而东农 42 在 48 h 的长日和短日照重复试验,又进一步证实了 *CO* 基因其强烈的昼夜节律性;*CO* 基因在早熟品种东农 49 比晚熟品种东农 42 中 mRNA 表达水平较高,作为植物开花的关键基因,大豆的 *CO* 基因是开花促进因子,其表达丰度与品种的熟期直接相关,不同品种的熟期不同,推测是由于 *CO*

基因受品种自身其它基因调控调节开花,进而产生不同光敏感类型的品种;无论是东农 49 还是东农 42,短日照下均比长日照下表达上调,并且东农 42 在完全暗下比完全光下表达量剧增,推测 *CO* 基因以此为基础调节大豆适应不同的光暗条件,在短日照下促进开花,长日照下抑制开花。

## 参考文献

- [1] Garner W, Allard A. Effect of the relative length of day and night other factors of the environment on growth and reproduction in plants [J]. Journal of Agricultural Research, 1920, 18: 553-606.
- [2] Putterill J, Robson F, Lee K, et al. The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors [J]. Cell, 1995, 80(6): 847-857.
- [3] Samach A, Nouchi H, Gold S E, et al. Distinct roles of *CONSTANS* target genes in reproductive development of *Arabidopsis* [J]. Science, 2000, 228, 1613-1616.
- [4] Hayama R, Yokoi S, Tamaki S, et al. Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice [J]. Nature, 2003, 422: 719-722.
- [5] 孙昌辉, 邓晓建, 方军, 等. 高等植物开花诱导研究进展 [J]. 遗传, 2007, 29(10): 1182-1190. (Sun C H, Deng X J, Fang J, et al. An overview of flowering transition in higher plant [J]. Hereditas, 2007, 29(10): 1182-1190.)
- [6] Ben-Naim O, Eshed R, Parnis A, et al. The CCAAT binding factor can mediate interactions between *CONSTANS*-like proteins and DNA [J]. The Plant Journal, 2006, 46(3): 462-476.
- [7] Yin J L, Shackel N A, Zekry A, et al. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I [J]. Immunology and Cell Biology, 2001, 79(3): 213-221.
- [8] Heid C A, Stevens J, Livak K J, et al. Real-time quantitative PCR [J]. Genome Research, 1996, 6(10): 986-994.
- [9] Nemoto Y, Kisaka M, Fuse T, et al. Characterization and functional analysis of three wheat genes with homology to the *CONSTANS* flowering time gene in transgenic rice [J]. The Plant Journal, 2003, 36(1): 82-93.
- [10] Paula M, Olhoft Lex E, Flagel Christopher M, et al. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary node method [J]. Planta, 2003, 216: 723-735.
- [11] Ishida Y H, Satto S, Ohta Y, et al. High efficiency transformation of maize mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Nature Biotechnology, 1996, 14(6): 745-750.
- [12] 刘海坤, 卫志明. 大豆遗传转化研究进展 [J]. 植物生理与分子生物学报, 2005, 31(2): 126-134. (Liu H K, Wei Z M. Recent advances in soybean genetic transformation [J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2005, 31(2): 126-134.)
- [13] 王翠亭, 卫志明. 重要禾谷类粮食作物的遗传转化 [J]. 植物生理学通讯, 2001, 38(2): 105-110. (Wang C T, Wei Z M. Genetic transformation of important cereal crops [J]. Plant Physiology Communication, 2001, 38(2): 105-110.)
- [14] Harold N T, Randy D D, Eliane R S, et al. Recent advances in soybean transformation [J]. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 1997, 3: 9-26.
- [15] Clemente T E, LaValle B J, Howe A R, et al. Progeny analysis of glyphosate-selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation [J]. Crop Sciences, 2000, 40: 797-803.
- [16] Meyer P. Repeat-induced gene silence: common mechanisms in plant and fungi [J]. Biology Chemistry Hoppe-Seyler, 1996, 277: 87-95.
- [17] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 220. (Wang G L, Fang H Y. Plant genetic engineering theory and technology [M]. Beijing: Science Press, 1998: 220.)

(上接第 593 页)