

大豆子叶节丛生芽的诱导研究

孙 昕, 闫 帆, 赵健如, 陈虹地, 翟 莹, 王 英, 李景文, 王庆钰

(吉林大学 植物科学学院, 吉林 长春 130062)

摘 要: 选用吉大豆 1 号、吉大豆 2 号、吉林 47 和东农 42 共 4 个基因型的大豆子叶节作为外植体进行离体再生, 筛选出丛生芽诱导率较高的大豆基因型吉林 47。在此基础上, 以吉林 47 的大豆子叶节为外植体, 研究了外植体消毒时间、发芽时间和条件对大豆子叶节再生的影响, 并设计正交试验对芽诱导及伸长阶段的激素配比进行了研究。得出吉林 47 较适合氯气灭菌时间为 6~10 h, 最适萌发条件为 16 h 光 + 8 h 暗光周期条件下培养 5~7 d。最终确定芽诱导阶段添加 6-BA 浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、IBA 浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 14 d 后继代伸长阶段添加 IAA 浓度 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、GA 浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词: 大豆子叶节; 再生; 丛生芽; 吉林 47

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2012)02-0184-04

Induction of Multiple Shoots from Soybean Cotyledonary Node

SUN Xin, YAN Fan, ZHAO Jian-ru, CHEN Hong-di, ZHAI Ying, WANG Ying, LI Jing-wen, WANG Qing-yu

(College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062, Jilin, China)

Abstract: In order to establish a cotyledonary node regeneration system for soybean (*Glycine max* L.), the cotyledonary node of 4 soybean genotypes were chosen as explants and Jilin 47, which had the maximum induction rate of multiple shoots, was screened out. Then Jilin 47 was used as explants to study the effect of sterilization hours, germination condition, concentration of auxin on induction rate, elongation rate and average shoot. When sterilized for 6-10 h and germinated 5-7 days in 16 h/8 h photoperiod, Jilin 47's germination, shoot induction and elongation rate were higher than other treatments. The best hormone combination for multiple shoots induction were $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA and $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA, and that for shoots elongation were $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA and $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA.

Key words: Soybean cotyledonary node; Regeneration; Multiple shoots; Jilin 47

建立高效、稳定的大豆再生体系是进行大豆遗传转化研究的基础, 常用于遗传转化的大豆再生体系有子叶节、未成熟胚、胚尖等^[1]。大豆子叶节不定芽器官发生体系因具有取材不受季节限制、诱导率高、生长快、不易发生变异、再生植株健壮易成活等优点^[2], 而成为大豆基因工程的一种较为理想的材料。但是子叶节再生体系也存在诸如丛生芽的相互抑制, 不易伸长, 再生困难等缺点^[3]。针对大豆子叶节再生体系的研究较多, 肖刚等^[4]以“黑生 101”大豆子叶节为材料, 对预培养培养基进行了优化, 并选择完整子叶及 1/2 子叶作为外植体研究了子叶节芽诱导率, 建立了黑生 101 大豆子叶节再生体系。曹荣等^[5]以“小粒黄”大豆子叶节为外植体, 研究了萌发天数、6-BA 及 TDZ 浓度对大豆子叶节

丛生芽诱导的影响, 得到在 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ 配比时, 丛生芽诱导率最高可达到 85.7%。李文霞等^[6]针对芽伸长培养基中的激素进行了正交试验, 确定出芽伸长培养基中激素最佳组合。武小霞等^[7]以黑农 35 为材料, 对大豆子叶节再生过程中种子的灭菌方法、萌发培养基中植物生长调节剂的浓度、丛生芽分化、生根培养与驯化等过程中植物生长调节剂的浓度进行了研究。在较适合转化的基因型的研究方面, 韩雪等^[8]筛选了黑龙江省不同经纬度地区 10 个大豆品种, 确定丛生芽分化能力较高的基因型东引小粒豆, 芽诱导率最高可达到 93.8%。

该研究对吉大豆 1 号等 4 种基因型的大豆子叶节再生进行研究, 并在此基础上以吉林 47 为材料

收稿日期: 2011-12-12

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项子课题(2011ZX08004-003); 国家自然科学基金面上项目(30971808); 农村科技成果转化基金项目(2010GB23600676); “十二五”农村领域国家科技计划子任务(2011BAD35B06-2)。

第一作者简介: 孙昕(1988-), 女, 在读硕士, 研究方向为大豆分子育种。E-mail: skipperxin@yahoo.com.cn。

通讯作者: 王庆钰(1963-), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事植物种质资源与利用研究。E-mail: wqy414cn@yahoo.com.cn。

研究了消毒时间、萌发条件、芽伸长及诱导阶段的激素对丛生芽诱导的影响,旨在建立一种高效稳定的大豆子叶节再生体系,为大豆遗传转化打下良好基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 吉大豆 1 号,吉大豆 2 号,吉林 47,东农 42,由吉林大学植物科学学院植物种质资源与利用研究室提供。

1.1.2 培养基 萌发培养基:MS 大量元素 + MS 微量元素 + B5 有机,0.6 g · L⁻¹ MES,3% 蔗糖,0.8% 琼脂粉,附加 1 mg · L⁻¹ 6-BA,pH 5.7。

芽诱导培养基:MS 大量元素 + MS 微量元素 + B5 有机,0.6 g · L⁻¹ MES,3% 蔗糖,0.8% 琼脂粉,附加 2 mg · L⁻¹ 6-BA,0.1 mg · L⁻¹ IBA,pH 5.7。

芽伸长培养基:同 SIM,附加不同浓度 IAA 和 GA。

1.2 方法

1.2.1 种子的消毒及外植体的获得 挑选颗粒饱满,表面无病斑、褶皱及伤口的大豆种子,置于通风橱内的密闭干燥器中,在干燥器中放置 1 个 100 mL 烧杯,加入 52 mL 蒸馏水,44 mL 次氯酸钠,4 mL 浓盐酸,混合反应均匀,消毒 6 ~ 12 h,然后接入萌发培养基(GM)中培养 3 ~ 7 d。

在萌发培养基中萌发 3 ~ 7 d 的大豆种子,去掉种皮,保留 3 ~ 5 mm 下胚轴,纵切分离 2 片子叶,去掉原叶获得大豆子叶节外植体,将外植体接种于芽诱导培养基(SIM)上。

1.2.2 基因型的筛选 以吉大豆 1 号、吉大豆 2 号、东农 42 和吉林 47 的大豆子叶节为材料,每个处理至少 60 个外植体,2 次重复,在芽诱导培养基上培养 14 d 后统计各基因型产生不定芽的外植体数、芽数,计算丛生芽诱导率、伸长率及平均芽数。

丛生芽诱导率(%) = 出芽外植体数(芽高 ≥ 1 cm)/接种外植体数 × 100

丛生芽伸长率(%) = 抽茎外植体数(芽高 ≥ 3 cm)/接种外植体数 × 100

平均芽数(%) = 总芽数(芽高 ≥ 1 cm)/出芽外植体数 × 100

1.2.3 灭菌时间的确定 以吉林 47 大豆子叶节为材料,使用氯气灭菌方法灭菌,灭菌时间设置为 6、8、10、12 和 14 h,每个灭菌时间 50 个外植体(大豆种子),3 次重复,在萌发培养基中生长 5 d 后统计

萌发率。在芽诱导培养基中生长 14 d 后调查统计出芽数。

1.2.4 萌发时间及萌发条件的确定 以吉林 47 大豆子叶节为材料,设定 3、5 和 7 d 3 个萌发时间,每个萌发时间设置 2 种光照条件,一种是 16 h 光 + 8 h 暗条件,一种是 24 h 暗条件,光照强度为 5 000 lx,共 6 个处理,每个处理 30 个外植体,3 次重复。在芽诱导培养基中生长 14 d 后调查统计出芽数。

1.2.5 芽诱导阶段植物生长调节剂浓度的确定 对影响丛生芽诱导的芽诱导培养基中的激素 6-BA(A)、IBA(B)、IAA(C)、GA(D)进行 L₉3⁴ 正交试验,共 9 个处理,每个处理 30 个外植体,3 次重复。在芽诱导培养基中生长 14 d 后统计调查出芽数(芽高 ≥ 1 cm)。之后接入芽伸长培养基 14 d 后统计伸长丛生芽数(芽高 ≥ 3 cm)。各因素水平详见表 1。

表 1 因素水平表

Table 1 Level and factor(mg · L⁻¹)

水平 Levels	因素 Factors			
	A	B	C	D
1	0.5	0.1	0.1	0.3
2	1.0	0.2	0.3	0.5
3	2.0	0.4	0.5	0.7

1.3 数据分析

采用 Excel 2003 和 SPSS 13.0 对统计出的丛生芽诱导率、丛生芽伸长率和平均芽数进行分析计算、方差分析和 LSD 显著性检验。

2 结果与分析

2.1 不同大豆基因型的丛生芽诱导情况

由表 2 可看出,吉林 47 的丛生芽诱导率最高,为 81.2%,其次为东农 42,为 77.8%,吉大豆 1 号和吉大豆 2 号丛生芽诱导率较低,分别为 5.4% 和 42.7%;经 LSD 分析,除吉林 47 和东农 42 之间差异不显著之外,其余基因型之间均存在极显著差异。平均芽数方面,4 个基因型的平均芽数都为 2 ~ 5 个,东农 42 最高(4.29 个),吉林 47 次之(3.54 个),吉大豆 1 号和吉大豆 2 号较低,分别为 2.75 和 2.82 个,且经 LSD 分析,东农 42 显著高于吉大豆 1 号和吉大豆 2 号;吉林 47 与东农 42 无显著差异。在生长状况方面,吉林 47 丛生芽的生长要好于其余 3 个基因型,且丛生芽数过多对丛生芽的伸长有抑制作用,因此,初步确定吉林 47 为大豆子叶节再生的理想基因型。

表 2 大豆子叶节再生系统的基因型筛选

Table 2 Genotype screening of cotyledon node regeneration system in soybean

基因型 Genotype	总外植体数 No. of explants		出芽外植体数 No. of explants with shoots		平均丛生芽诱导率 Average induction rate of shoots/%	平均芽数 Average shoots
	I	II	I	II		
吉大豆 1 号 Jidadou No. 1	60	80	2	6	5.4 ± 2.97C	2.75 ± 0.35b
吉大豆 2 号 Jidadou No. 2	60	96	23	46	42.7 ± 6.22B	2.82 ± 0.76b
吉林 47 Jilin 47	90	96	72	79	81.2 ± 1.63A	3.54 ± 0.45a
东农 42 Dongnong 42	80	96	61	76	77.8 ± 2.05A	4.29 ± 0.53a

同列数值标以不同大小写字母者分别表示差异达 0.01 和 0.05 显著水平。

Values within a column followed by different capital and lowercase letters are significantly different at 0.01 and 0.05 probability level, respectively.

2.2 最佳灭菌时间

在试验的各个时间段都没有出现染菌的情况。对萌发率进行统计,发现在 8 和 10 h 下萌发率最高为 88%,6、12 和 14 h 的萌发率分别为 84%、82% 和 72% (图 1)。

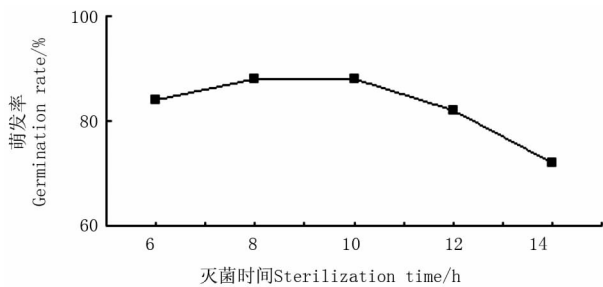


图 1 不同灭菌时间下的大豆种子萌发率

Fig. 1 Germination rate of different sterilization times

由于氯气会对外植体的生长造成一定的影响,因此统计不同灭菌时间下芽诱导 14 d 后的丛生芽诱导率及继代 14 d 后的丛生芽伸长率,并进行方差分析及 LSD 多重分析比较。从图 2 可看出,不同消毒时间下大豆子叶节的丛生芽诱导率存在极显著差异。其中 6~12 h 时发芽率均在 75% 以上,效果较好,随消毒时间增加,丛生芽诱导率下降。丛生芽伸长率方面,6、8 和 10 h 与 12、14 h 之间差异极显著,6、8 和 10 h 之间无显著差异,12 与 14 h 之间差异显著。其中 6、8 和 10 h 丛生芽伸长率均在 70% 以上,效果较好。因此,消毒时间在 6~10 h 较合适。

2.3 萌发天数及条件对吉林 47 大豆子叶节丛生芽诱导的影响

如图 2 所示,吉林 47 无论是在 16 h 光照 + 8 h 黑暗还是 24 h 黑暗条件下,生长 5 d 的丛生芽诱导率最高,分别为 94.3% 和 96.1%,生长 7 d 的大豆种子次之,分别为 91.8% 和 95.7%,生长 3 d 的大豆

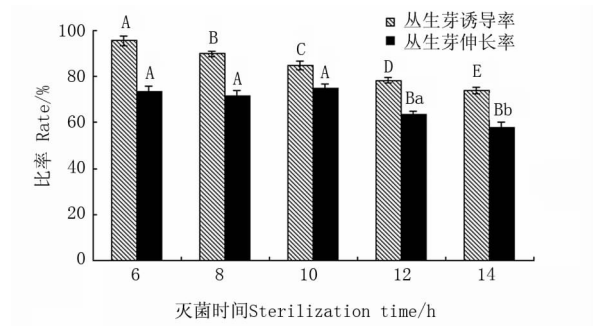


图 2 不同灭菌时间对丛生芽诱导率及丛生芽伸长率的影响

Fig. 2 Effect of different sterilization times on shoot induction rate and elongation rate

种子丛生芽诱导率最低,分别为 72.9% 和 83.9% (图 3)。萌发 5~7 d 后的大豆下胚轴生长状况较好,分生组织分化能力较强。萌发 3 d 的大豆下胚轴较弱,不适于进行后续试验。此外,16 h + 8 h 光周期条件下丛生芽诱导率普遍低于相同天数下的 24 h 暗条件,但 16 h + 8 h 光周期条件下的子叶及下胚轴较绿,生长状况较好。综合考虑,采用 16 h + 8 h 光周期条件下生长 5~7 d 作为吉林 47 大豆种子的萌发条件比较适宜。

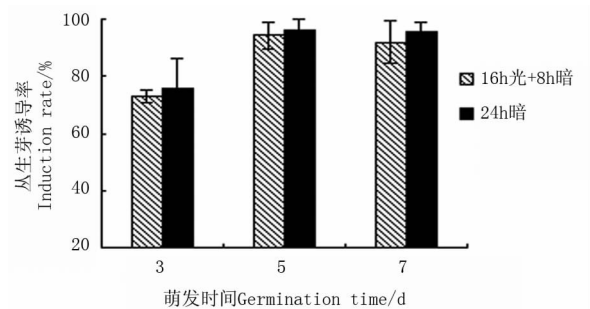


图 3 不同萌发时间及条件对吉林 47 子叶节丛生芽诱导的影响

Fig. 3 The influence of different germination days and conditions on induction of multiple shoots of Jilin 47

2.4 不同激素种类和浓度对大豆子叶节丛生芽诱导、伸长及丛生芽数的影响

研究了不同激素对培养 14 d 后的丛生芽诱导率,28 d 后的丛生芽伸长率及平均芽数的影响,发现 6-BA 对丛生芽诱导率有极显著影响,IBA 对其有显著影响。IAA 及 GA 分别对丛生芽伸长率及平均芽数产生极显著影响(表 3)。

表 3 丛生芽诱导、伸长及平均芽数影响因素的方差分析

Table 3 Analysis of variance for factors that affect induction rate, elongation rate and average shoots

变异来源 Variance source	I		II		III	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
A	10.644 **	0.004	0.374	0.698	1.676	0.241
B	6.121 *	0.021	0.098	0.908	1.279	0.325
C	0.281	0.762	9.623 **	0.006	0.001	0.999
D	0.308	0.742	0.126	0.883	9.007 **	0.007

I. 丛生芽诱导率; II. 丛生芽伸长率; III. 平均芽数; * 代表 5% 的差异显著水平; ** 代表 1% 的差异显著水平。

I. Induction rate of multiple shoots; II. Elongation rate of multiple shoots (≥ 3 cm); III. Average shoots; * means significant difference at 5%; ** means significant difference at 1%.

进一步分析发现,在芽诱导阶段添加 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA、 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 时可得到较高芽诱导率,最高可达 94.4%。由于丛生芽过多不利于后期抽茎,所以确定芽伸长阶段适宜的 IAA 和 GA 浓度分别为 0.3 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,丛生芽伸长率最高可达 52.4%。

3 结论与讨论

基因型是影响大豆遗传转化的一个重要因素^[9],因此筛选再生能力强、丛生芽诱导率高的基因型是建立高效大豆再生体系的关键,也是大豆遗传转化受体系统建立的前提。该试验通过在相同条件下研究 4 种基因型的丛生芽诱导率,筛选出较适合大豆子叶节再生的基因型吉林 47。

不同基因型最适萌发时间也不同,李凤玉等^[10]研究表明大豆子叶离体诱导不定芽、不定根的发生和植株再生最适宜的苗龄为 3 d。刘艳芝等^[11]认为 3~5 d 苗龄的子叶节都可以诱导出丛生芽,且诱导率差别不大。种子萌发过程中,幼苗的生理状况影响再生时的丛生芽诱导率,当培养时间过久,子叶节居间分生组织的分生能力降低,影响再生率。该试验通过研究吉林 47 的丛生芽诱导率,确定萌发条件为 16 h 光照/8 h 黑暗条件下培养 5~7 d。

由于氯气灭菌方法在灭菌的同时也会对种子本身造成损害,故应当在保持低污染率及高萌发率的基础上选择适当时间,该研究确定最适吉林 47

的氯气灭菌时间为 6~10 h。

从理论上讲 6-BA 浓度越高,分化率越高,每个外植体的丛生芽数越多,再生率及转化率也就越高,但丛生芽之间的相互抑制作用导致丛生芽不易伸长,叶片生长一段时间就黄化脱落^[7]。6-BA 的作用是促进子叶节分化不定芽,GA 的作用是促进再生苗伸长,二者浓度的适宜配比直接关系到大豆子叶节丛生芽的诱导和芽的伸长。IBA 可影响出芽率,IAA 会产生顶端优势,促进茎的伸长,低浓度下促进植株生长,而高浓度则会产生抑制作用。该研究通过 $L_9(3^4)$ 正交试验探究了芽诱导阶段的激素浓度,最终确定芽诱导阶段添加 6-BA 浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、IBA 浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,14 d 后继代伸长阶段添加 IAA 浓度 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、GA 浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

参考文献

- [1] 王萍,王罡,吴颖,等. 大豆组织培养的研究进展[J]. 大豆科学,2003,22(2):142-145. (Wang P, Wang G, Wu Y, et al. Current progress on tissue culture of soybean[J]. Soybean Science, 2003,22(2):142-145.)
- [2] 刘博林,徐新民. 两个栽培大豆品种的体细胞胚胎发生和植株再生研究[J]. 中国油料作物学报,1999,21(2):11-13. (Liu B L, Xu X M. Study on somatic embryogenesis and plant regeneration of two commercial soybean cultivars[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 1999,21(2):11-13.)
- [3] 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.)
- [4] 肖刚,逯慧,王帆. “黑生 101”大豆子叶节再生体系的建立[J]. 上海师范大学学报,2008,37(4):420-424. (Xiao G, Lu H, Wang F. The establishment of cotyledon node regeneration system for soybean Heisheng101[J]. Journal of Shanghai Normal University, 2008,37(4):420-424.)
- [5] 曹荣,芦琳琳,朱保葛. “小粒黄”大豆子叶节丛生芽的诱导[J]. 大豆科学,2010,29(5):747-750. (Cao R, Lu L L, Zhu B G. Induction of multiple shoots from cotyledonary nodes of Xiaoli Huang soybean[J]. Soybean Science, 2010,29(5):747-750.)
- [6] 李文霞,李文滨,吕文河. 农杆菌介导大豆子叶节系统的两个问题突破[J]. 大豆科学,2008,27(1):173-175. (Li W X, Li W B, Lü W H. Breakthrough of two questions on the *Agrobacterium*-mediated soybean cotyledonary node systems[J]. Soybean Science, 2008,27(1):173-175.)
- [7] 武小霞,李静,姜成涛. 大豆子叶节再生中植物生长调节剂浓度及基因型筛选[J]. 中国油料作物学报,2011,33(2):123-129. (Wu X X, Li J, Jiang C T. Optimization of regeneration system from soybean cotyledonary node[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2011,33(2):123-129.)

(下转第 192 页)

- (Han X, Han L L, Song W W, et al. Optimization of regeneration system from cotyledonary nodes of soybean and *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2010, 41(2):1-5.)
- [3] 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: 489-498.
- [4] 李文霞, 李文滨, 吕文河, 等. 农杆菌介导大豆子叶节系统的两个问题突破[J]. 大豆科学, 2008, 27(1):173-175. (Li W X, Li W B, Lü W H, et al. Breakthrough of two questions on the *Agrobacterium*-mediated soybean cotyledonary node systems[J]. Soybean Science, 2008, 27(1):173-175.)
- [5] 武小霞, 李静, 刘伟婷, 等. 大豆农杆菌子叶节转化菌株适宜生长时期及浸染浓度的研究[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(1):1-6. (Wu X X, Li J, Liu W T, et al. Optimization study on strain cultivation period and infectious concentration on soybean cotyledonary node via *Agrobacterium*-mediated transformation system[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2010, 41(1):1-6.)
- [6] 段莹莹, 赵琳, 陈李森, 等. 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[J]. 大豆科学, 2010, 29(4):590-593. (Duan Y Y, Zhao L, Chen L M, et al. Comparison and optimization of the *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean by using cotyledonary node and hypocotyl explants[J]. Soybean Science, 2010, 29(4):590-593.)
- [7] 赵晓雯, 吴芳芳, 狄少康, 等. 农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化技术流程及操作要点[J]. 大豆科学, 2011, 30(3):363-368. (Zhao X W, Wu F F, Di S K, et al. Technique flow and key operation points of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of soybean cotyledonary-node[J]. Soybean Science, 2011, 30(3):363-368.)
- [8] 王凤敏, 李涛, 王云杰, 等. 影响农杆菌介导大豆子叶节遗传转化因素的研究[J]. 大豆科学, 2011, 30(4):557-562. (Wang F M, Li T, Wang Y J, et al. Assessment of factors affecting soybean cotyledonary-node *Agrobacterium*-mediated genetic transformation [J]. Soybean Science, 2011, 30(4):557-562.)
- [9] Zhang Z Y, Xing A Q, 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.
- [10] 唐晓飞, 刘丽君, 张小明, 等. 高产大豆新品系哈交 5337 和哈交 5489 再生条件的优化[J]. 大豆科学, 2008, 27(2):203-207. (Tang X F, Liu L J, Zhang X M, et al. Improvement of regeneration system in high-yield soybean lines Hajiao 5337 and Hajiao 5489[J]. Soybean Science, 2008, 27(2):203-207.)
- [11] 卜云萍, 李明春, 胡国武, 等. 大豆子叶节组培再生系统与农杆菌介导的基因转化系统的比较研究[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2003, 36(1):103-108. (Bu Y P, Li M C, Hu G W, et al. The study of comparing the transformation system of *Agrobacterium*-mediated and regeneration system of cotyledon nod of soybean culture[J]. Journal of Nankai University (Natural Science Edition), 2003, 36(1):103-108.)
- [12] 姬月梅, 陈受宜, 李英慧, 等. 农杆菌介导大豆子叶节遗传转化体系的优化研究[J]. 大豆科学, 2008, 27(1):26-32. (Ji Y M, Chen S Y, Li Y H, et al. Optimization of genetic transformation system from soybean cotyledon mediated by *Agrobacterium*[J]. Soybean Science, 2008, 27(1):26-32.)
- [13] 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.)
- [14] 范红军, 李敏, 周延清, 等. 农杆菌介导的大豆反义 *fad2-1* 基因转化烟草研究[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2010, 38(2):152-155. (Fan H J, Li M, Zhou Y Q, et al. Transfer of antisense fatty acid desaturase gene from soybean to tobacco plantlets (*Nicotiana tabacum*) via *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. Journal of Henan Normal University (Natural Science), 2010, 38(2):152-155.)
-
- (上接第 187 页)
- [8] 韩雪, 韩岚岚, 宋雯雯. 大豆子叶节再生体系的优化与农杆菌转化的研究[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(2):1-5. (Han X, Han L L, Song W W. Optimization of regeneration system from cotyledonary nodes of soybean and *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2010, 41(2):1-5.)
- [9] 袁鹰, 刘德璞, 郑培和, 等. 大豆组织培养再生植株的研究[J]. 大豆科学, 2001, 20(1):9-12. (Yuan Y, Liu D P, Zheng P H, et al. Study on plant regeneration from soybean culture[J]. Soybean Science, 2001, 20(1):9-12.)
- [10] 李凤玉, 杨婉芬, 梁海曼. BA 对大豆子叶培养物器官分化的影响极其与子叶离体时苗龄的关系[J]. 杭州大学学报, 1999, 26(1):76-78. (Li F Y, Yang W F, Liang H M. Relationship between the effect of BA on the organ differentiation of the cultured soybean cotyledons and the seedling ages of the detached cotyledons[J]. Journal of Hangzhou University, 1999, 26(1):76-78.)
- [11] 刘艳芝, 刘莉, 李俊波, 等. 浅析大豆组培系统与基因转化受体系统[J]. 吉林农业科学, 2000, 25(6):12-14. (Liu Y Z, Liu L, Li J B, et al. Analysis on tissue culture system and receptor system on genetic transformation of soybean[J]. Jilin Agricultural Sciences, 2000, 25(6):12-14.)