

## MYB 转录因子 *AtPHR1* 转化大豆研究

赵莉莉, 李喜焕, 李文龙, 常文锁, 张彩英

(河北农业大学/教育部华北作物种质资源研究与利用重点实验室, 河北 保定 071001)

**摘要:**以 MYB 转录因子 *AtPHR1* 表达载体为转化对象, 采用农杆菌介导子叶节转化技术将其转入栽培大豆, 研究不同萌发时间、预培养时间、菌液和侵染液浓度、大豆基因型以及筛选剂浓度对转化效率的影响。结果表明: 以萌发 5 d 大豆幼苗制备子叶节外植体, 预培养 1 d, 农杆菌菌液 OD<sub>600</sub> 为 0.7, 侵染液 OD<sub>600</sub> 为 0.5 或 0.7 进行转化, 100 mg·L<sup>-1</sup> 卡那霉素进行筛选的抗性芽诱导率最高; 5 个供试品种中, 以五星 2 号的转化率最高, 约为 2.0%; 经 PCR 检测转化后的大豆植株, 获得了含有转录因子 *AtPHR1* 的 5 个大豆新材料。

**关键词:** MYB 转录因子; 农杆菌介导; 大豆; 遗传转化

**中图分类号:** S565.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-9841(2013)02-0154-06

## Genetic Transformation of Transcription Factor *AtPHR1* into Soybean by *Agrobacterium*-Mediated Method

ZHAO Li-li, LI Xi-huan, LI Wen-long, CHANG Wen-suo, ZHANG Cai-ying

(North China Key Laboratory of Crop Germplasm Resources, Education Ministry of China/Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China)

**Abstract:** In this study, a MYB transcription factor *AtPHR1* was introduced into soybean varieties by *Agrobacterium*-mediated cotyledonary-node transformation method to study the influence factors on transformation efficiency. The studied factors included seedling age, pre-incubation period, strain density, infectious concentration, kanamycin concentration and soybean genotype. The results showed that a much higher induction rate of resistant shoots was obtained when the seedling age was 5 d from germination with 1 d pre-culture, the strain density (OD<sub>600</sub>) was 0.7 and infectious concentration was 0.5 or 0.7, and also the kanamycin concentration was 100 mg·L<sup>-1</sup>. The soybean variety, Wuxing 2, with the highest transformation efficiency was about 2.0%. Finally, five new PCR positive transgenic materials with transcription factor *AtPHR1* were gained.

**Key words:** MYB transcription factor; *Agrobacterium*-mediated method; Soybean; Genetic transformation

大豆起源于中国, 是重要粮食和油料作物。同时, 大豆是需磷量较大作物, 但土壤中的磷多以植物不能直接吸收利用的有机态形式存在, 其有效态磷严重缺乏<sup>[1]</sup>。近年来, 大豆单产不断提高, 植株需磷量与土壤供磷间的矛盾更为突出。随着植物生物技术发展和应用日益深入, 通过转基因手段对大豆耐低磷性状进行改良, 创新磷高效新种质和培育磷高效新品种成为提高土壤磷利用率, 解决磷资源匮乏的有效途径<sup>[2]</sup>。

转录因子在植物生长发育各阶段及适应多种逆境胁迫过程中发挥着重要作用<sup>[3]</sup>。近几年通过对拟南芥和水稻两种模式植物低磷芯片数据分析发现, 植物对低磷反应的适应性调控机制主要发生在转录水平<sup>[4]</sup>。*AtPHR1* 属于 MYB 转录因子, 被认为是高等植物中重要的磷信号调控体系核心转录因子, *AtPHR1* 发生突变, 可导致一系列磷代谢相关基因表达量降低, 且转基因拟南芥耐低磷能力随之

下降<sup>[5]</sup>。随后, 不同学者分别从水稻<sup>[6]</sup>、菜豆<sup>[7]</sup>、大豆<sup>[8]</sup>等作物中克隆得到了该基因的同源基因, 并证实与植物磷代谢调控密切相关。

目前, 在大豆转基因研究中, 农杆菌介导是较为普遍的基因转化方法<sup>[9-11]</sup>。农杆菌介导子叶节转化体系具有培养时间较短, 不易产生体细胞突变体和不育植株, 外源基因拷贝数较低、遗传行为较为简单稳定等特点<sup>[12-13]</sup>。但该转化方法也存在一些问题<sup>[14-15]</sup>, 如受基因型限制, 再生体系困难及嵌合体多等。因此, 进一步优化转化体系, 搭建良好的转基因平台, 对快速实现转基因新品种培育具有重要实际意义。现以 MYB 转录因子 *AtPHR1* 表达载体为转化对象, 研究大豆农杆菌介导子叶节遗传转化过程中的萌发时间、预培养时间、菌液和侵染液浓度、大豆基因型以及筛选剂浓度对转化效率的影响, 进一步优化转化体系, 为进一步培育磷高效转基因大豆新品种提供中间材料。

收稿日期: 2013-01-13

基金项目: 农业科技成果转化资金 (2012GB2A200032); 国家转基因重大专项 (2009ZX08004-004B); 河北省自然科学基金 (C2010000749)。

第一作者简介: 赵莉莉 (1987-), 女, 在读硕士, 主要从事大豆分子生物学与转基因研究。E-mail: zhaolili2919@126.com。

通讯作者: 张彩英 (1960-), 女, 研究员, 博士生导师, 主要从事大豆遗传育种与转基因研究。E-mail: zhangcaiying@hebau.edu.cn。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

*AtPHR1* 表达载体由南开大学李明刚教授提供;转化受体材料包括中豆 32、冀豆 12、五星 2 号、保豆 3 号、鲁冠豆 1 号、冀豆 7 号、中黄 41、合丰 35、绿 75 和冀豆 17,由河北农业大学大豆遗传育种研究室提供。

### 1.2 方法

1.2.1 农杆菌介导大豆子叶节遗传转化技术 挑选无病、饱满、无破损的成熟种子,氯气消毒 10~12 h 后接种到萌发培养基,24℃、18 h/6 h 光周期条件下培养,获得无菌苗用于制备子叶节外植体。挑取含有 *AtPHR1* 表达载体的农杆菌单菌落,接种于加有壮观霉素(Spe)、链霉素(Str)各 50 mg·L<sup>-1</sup> 的 LB 液体培养基中,28℃、180 r·min<sup>-1</sup> 下振荡培养 36 h。吸取 1 mL 活化菌液,加入 100 mL 含有 Spe、Str 各 50 mg·L<sup>-1</sup> 的 LB 液体培养基,继续培养至对数生长期,3 500 r·min<sup>-1</sup>, 10 min 离心菌液,重悬至加有 100 μmol·L<sup>-1</sup> 乙酰丁香酮(As)液体培养基中,振荡培养 2 h,进行子叶节侵染。

子叶节侵染时间控制在 30 min,随后将子叶节近轴面向下接种于 1/10 MSB 共培养基(含 As 100 μmol·L<sup>-1</sup>, 6-BA 1.7 mg·L<sup>-1</sup>),23℃ 暗处或弱光处共培养 3 d。共培养后的子叶节经无菌水冲洗,滤纸吸干,接种到恢复培养基,培养 7~10 d。随后接种到含有 100 mg·L<sup>-1</sup> 卡那霉素的 MSB 筛选培养基,15 d 继代一次。不定芽长到 2~3 cm 时转入 MSB 伸长培养基(含 GA<sub>3</sub> 1.0 mg·L<sup>-1</sup>, 50 mg·L<sup>-1</sup> 天冬酰胺, 50 mg·L<sup>-1</sup> 谷氨酰胺)。待芽伸长到 4~5 cm,将伸长芽切下,1 mg·mL<sup>-1</sup> 吲哚乙酸(IBA)中浸泡 1~2 min,转移到 1/2 MSB 生根培养基(含 1.6 mg·L<sup>-1</sup> IBA)诱导不定根。待不定根长约 2~3 cm,且有数条侧根发生时,炼苗 3~5 d,洗净根部的培养基,移入营养土中。

为明确适宜的萌发和预培养时间,以冀豆 12 为试材,分别设置萌发 3、4、5、6、7 d(处理号记为 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、…、A<sub>5</sub>)的幼苗进行子叶节外植体制备,随后在高渗培养基上进行预培养,时间设置为 0、1、2 d(处理号记为 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>),最后在筛选培养基上诱导抗性芽,并计算抗性芽诱导率(产生抗性芽的外植体数/总外植体数);为明确适宜的菌液和侵染液浓度,以五星 2 号为试材,设置 5 个菌液浓度,OD<sub>600</sub> 分别为 0.3、0.5、0.7、0.9、1.1,同时设置 4 个

侵染液浓度,OD<sub>600</sub> 为 0.3、0.5、0.7、0.9。其中,每个处理采用 30 个外植体,2 次重复,以抗性芽诱导率为鉴定指标。

为探讨不同大豆基因型对转化率的影响,以冀豆 12、五星 2 号、冀豆 17、保豆 3 号、鲁冠豆 1 号、冀豆 7 号、绿 75、合丰 35、中豆 32 和中黄 41 为试验材料,分析其抗性芽诱导率,每个品种采用 100 个外植体,3 次重复。

为研究适宜的卡那霉素筛选浓度,以五星 2 号为试材,恢复培养 7 d 后,转移到卡那霉素为 0、25、50、75、100、125、150 mg·L<sup>-1</sup> 的培养基中,每个处理 30 个外植体,3 次重复,并计算丛生芽诱导率(分化外植体/接种外植体)和丛生芽死亡率(丛生芽死亡数/丛生芽个数)。

1.2.2 转化大豆植株及其后代 PCR 检测 采用 CTAB 法提取植株叶片基因组 DNA,进行目的基因 PCR 检测。所用引物序列为: AtPF: 5'-ATGGAG-GCTCGTCCAGTTCATAGATC-3', AtPR: 5'-GAGAT-TCTAGTTCCTCACAATTCCTGGT-3', 扩增片段长度 1 198 bp。PCR 反应程序: 94℃ 10 min, 94℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min。

### 1.3 数据分析

采用 DPS3.01 软件进行数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 农杆菌介导子叶节遗传转化影响因素分析

2.1.1 萌发时间和预培养时间对抗性芽诱导率的影响 由表 1 可知,不同萌发时间和预培养时间对子叶节抗性芽诱导率具有较大影响。其中,以萌发 5 d 的抗性芽诱导率最高(67.2%),显著高于其它处理,萌发 3 d 的抗性芽诱导率最低,仅为 18.7%。以预培养 1 d 的抗性芽诱导率最高,达到 52.7%,且与其他处理差异达到显著水平,以没有预培养的抗性芽诱导率最低,仅为 44.9%。

由表 2 可知,以萌发 5 d,预培养 1 d 的抗性芽诱导率最高,可达 74.0%,且差异达到显著水平;其次为 A<sub>4</sub>B<sub>2</sub> 组合,即萌发 6 d,预培养 1 d 的抗性芽诱导率较高(67.7%);以萌发 3 d 且不经预培养处理的抗性芽诱导率最低,仅为 11.0%,故后续试验均采用萌发 5 d,预培养 1 d 的组合进行处理。

表 1 萌发时间和预培养时间对抗性芽诱导率的影响

Table 1 Effects of soybean seedling age and pre-incubation time on the induction rate of resistant shoots

处理 Treatment	苗龄 Seedling age/d	抗性芽诱导率 Induction rate of resistant shoots/%	处理 Treatment	预培养时间 Pre-incubation time/d	抗性芽诱导率 Induction rate of resistant shoots/%
A <sub>1</sub>	3	18.7 d	B <sub>1</sub>	0	44.9 c
A <sub>2</sub>	4	49.0 c	B <sub>2</sub>	1	52.7 a
A <sub>3</sub>	5	67.2 a	B <sub>3</sub>	2	50.7 b
A <sub>4</sub>	6	63.2 b			
A <sub>5</sub>	7	49.0 c			

不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),下同。  
Different lowercase letters mean significant difference at 0.05 level. The same below.

表 2 不同萌发时间和预培养时间组合对抗性芽诱导率的影响

Table 2 Effect of the combination of soybean seedling age and pre-incubation time on the induction rate of resistant shoots

处理 Treatment	抗性芽诱导率 Induction rate of resistant shoots/%	处理 Treatment	抗性芽诱导率 Induction rate of resistant shoots/%
A <sub>1</sub> B <sub>1</sub>	11.0 j	A <sub>3</sub> B <sub>3</sub>	65.0 bc
A <sub>1</sub> B <sub>2</sub>	17.7 i	A <sub>4</sub> B <sub>1</sub>	61.3 cd
A <sub>1</sub> B <sub>3</sub>	27.3 h	A <sub>4</sub> B <sub>2</sub>	67.7 b
A <sub>2</sub> B <sub>1</sub>	42.7 g	A <sub>4</sub> B <sub>3</sub>	60.7 d
A <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	51.0 e	A <sub>5</sub> B <sub>1</sub>	46.7 f
A <sub>2</sub> B <sub>3</sub>	53.3 e	A <sub>5</sub> B <sub>2</sub>	53.3 e
A <sub>3</sub> B <sub>1</sub>	62.7 cd	A <sub>5</sub> B <sub>3</sub>	47.0 f
A <sub>3</sub> B <sub>2</sub>	74.0 a		

2.1.2 菌液和侵染液浓度对抗性芽诱导率的影响  
由表 3 可知,随菌液和侵染液浓度的增加,抗性芽诱导率呈现先升高后降低的趋势。以菌液浓度为 0.7 时的抗性芽诱导率最高(70.0%),且差异达到显著水平;以侵染液浓度为 0.7 或 0.5 时的抗性芽诱导率最高,分别为 59.9% 和 59.0%,差异亦达显著水平。故后续试验均采用菌液浓度 0.7,侵染液浓度 0.7 或 0.5 的组合进行处理。

表 3 不同菌液浓度和侵染液浓度对抗性芽诱导率的影响

Table 3 Effect of different bacterial concentration and infect concentration on the induction rate of resistant multiple shoots

菌液浓度(OD <sub>600</sub> ) Bacterial concentration	抗性芽诱导率 Induction rate of resistant shoots/%	侵染液浓度(OD <sub>600</sub> ) Infect concentration	抗性芽诱导率 Induction rate of resistant shoots/%
0.3	48.0 c	0.3	50.3 c
0.5	57.4 b	0.5	59.0 a
0.7	70.0 a	0.7	59.9 a
0.9	55.4 b	0.9	54.2 b
1.1	48.5 c		

表 4 卡那霉素对子叶节丛生芽诱导率的影响

Table 4 Effect of kanamycin on the induction rate of multiple shoots of cotyledon node

Kan 浓度 Kan concentration /mg · L <sup>-1</sup>	接种外植体数 Inoculated explants	分化外植体数 Differentiation explants	丛生芽诱导率 Induction rate of shoots/%	丛生芽死亡率 Mortality rate of shoots/%
0	80	64.8	81.0 a	0 e
25	79	61.9	78.4 b	21.5 d
50	80	59.2	74.0 c	40.5 c
75	80	54.4	68.0 d	74.5 b
100	80	50.8	63.5 e	99.7 a
125	79	43.3	54.9 f	100.0 a
150	80	37.0	46.3 g	100.0 a

2.1.3 不同卡那霉素浓度对丛生芽诱导率和死亡率的影响 以五星 2 号为试材,研究了不同浓度卡那霉素对子叶节丛生芽诱导率和死亡率的影响。由表 4 可知,在卡那霉素浓度为  $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时,丛生芽死亡率达到  $99.7\%$ ,而卡那霉素浓度为  $0,25,50,75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时的丛生芽死亡率分别为  $0,21.5\%,40.5\%,74.5\%$ ,预示着仍有一部分丛生芽存在逃匿现象,易出现假阳性,故采用  $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  卡那霉素为抗性芽适宜筛选浓度。

2.1.4 不同大豆基因型对抗性芽诱导率的影响 由图 1 可知,大豆基因型对抗性芽诱导率的影响存在显著差异,在供试品种中,以中豆 32 的抗性芽诱导率最高 ( $71.3\%$ ),其次为冀豆 12,其诱导率为  $67.3\%$ ,二者差异不显著;以绿 75 与合丰 35 的抗性芽诱导率最低,与其它品种差异达到显著水平;而五星 2 号、冀豆 17、冀豆 7 号、中黄 41 和鲁冠豆 1 号的芽诱导率居中,且差异不显著。

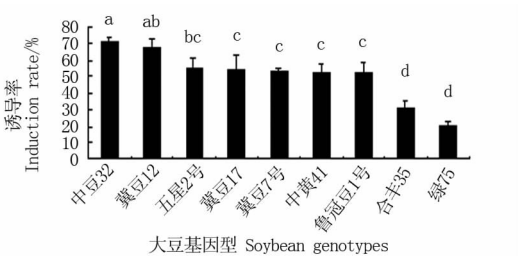
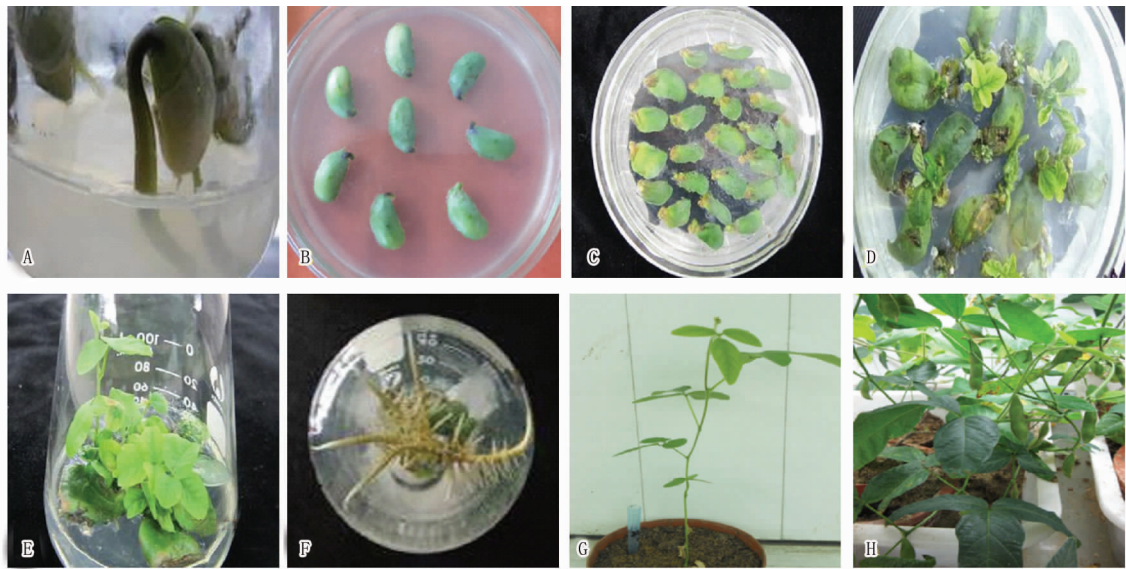


图 1 不同大豆基因型对抗性芽诱导率的影响  
Fig.1 Effect of different soybean genotypes on the induction rate of resistant multiple shoots

2.2 *AtPHR1* 转基因阳性植株检测与新材料获得

根据上述研究结果,建立适宜的农杆菌介导子叶节转化技术,具体流程见图 2。利用该技术将 *AtPHR1* 转入不同大豆品种,其中冀豆 12、五星 2 号、冀豆 17、鲁冠豆 1 号和冀豆 7 号均可扩增出目的条带,说明目的基因已整合至大豆基因组中(图 3)。将阳性植株进行自交纯合,结合目的基因检测,已获得转基因  $T_1$  植株 29 个, $T_2$  植株 24 个(表 5)。



A: 种子萌发;B: 共培养;C: 恢复培养;D: 芽诱导;E: 芽伸长;F: 生根培养;G: 植株移栽;H: 植株结荚  
A: Seed germination; B: Co-culture; C: Recovery training; D: Bud induction; E: Shoot elongation; F: Rooting culture; G: Plants transplanting; H: Plants pod

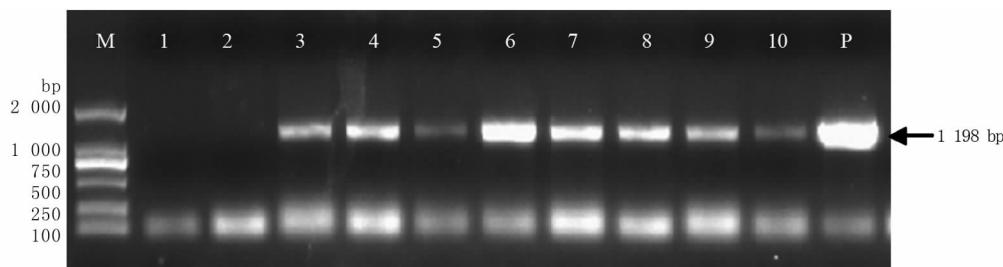
图 2 农杆菌介导大豆子叶节遗传转化

Fig.2 Soybean cotyledonary node genetic transformation by *Agrobacterium*-mediated system

表 5 *AtPHR1* 转基因阳性植株及其后代检测结果

Table 5 PCR detection of transformed plants and their generations

基因型 Genotype	感染外植体数 Infection explants	T <sub>0</sub> 阳性单株个数 T <sub>0</sub> positive plants	转化率 Transformation frequency/%	T <sub>1</sub> 阳性单株个数 T <sub>1</sub> positive plants	T <sub>2</sub> 阳性单株个数 T <sub>2</sub> positive plants
五星 2 号 Wuxing 2	400	8	2.0	10	14
冀豆 12 Jidou 12	600	9	1.5	7	—
冀豆 17 Jidou 17	100	1	1.0	2	10
鲁冠豆 1 号 Luguandou 1	500	4	0.8	6	—
冀豆 7 号 Jidou 7	300	2	0.7	4	—



M: DNA Marker DL2000; 1: 空白对照; 2: 野生型; 3 ~ 10:  $T_2$  代转化植株; P: 质粒对照

M: DNA Marker DL2000; 1: Negative control; 2: Wild type control; 3 ~ 10:  $T_2$  transformed soybean plants; P: Positive control

图3 农杆菌介导转化大豆  $T_2$  代植株 PCR 检测

Fig. 3 PCR assay of  $T_2$  transformed plants via *Agrobacterium*-mediated system

### 3 讨论

在农杆菌介导遗传转化过程中,影响转化效率的因素很多,如基因型、培养条件、农杆菌类型、菌液浓度、筛选剂浓度及植株再生率等<sup>[16-17]</sup>。因此,为探讨适宜的农杆菌转化条件,对萌发时间、预培养时间、菌液和侵染液浓度、大豆基因型以及筛选剂浓度进行了分析,优化了转化体系,并实现了目的基因向5个大豆品种的遗传转化。

首先,良好再生体系是实现遗传转化的基础<sup>[18-19]</sup>。大豆萌发时间过短(萌发3 d),制备的外植体较稚嫩,不足以抵抗农杆菌的侵染,共培养后外植体生长力弱从而诱导出的丛生芽较少;而萌发时间较长(萌发7 d),大豆幼苗的顶芽和侧芽生长较大,有真叶从两片子叶中长出,制备的外植体老化,且再生能力下降。一般认为<sup>[20]</sup>,外植体预培养可使伤口周围的细胞得以修复,而伤口愈合过程中产生的酚类物质则是诱导农杆菌 *vir* 基因启动的前提,并且预培养还可促进细胞分裂,而处在分裂状态的细胞更有利于外源 DNA 整合。有研究表明<sup>[20]</sup>,在高渗培养基上进行外植体预培养还可以减少伤口处的细胞伤流液,使细胞内的液泡减小,促使细胞发生一定程度质壁分离,提高农杆菌接触伤口周围细胞的几率,从而提高转化效率。本研究分析了不同预培养天数对子叶节抗性芽诱导率的影响,结果发现,以预培养1 d效果最佳,这也进一步验证了上述理论。

其次,农杆菌侵染效率一直被认为是影响植物转化效率的另一重要因素<sup>[17]</sup>。一般认为,农杆菌侵染效率主要与菌株种类、菌液浓度、侵染液浓度和侵染时间有关<sup>[20]</sup>。其中,农杆菌菌液浓度代表着菌液生长时期,而处于对数生长期的菌液被认为是侵染能力最强、侵染效率最高的状态。本研究通过分

析发现,以菌液  $OD_{600}$  为 0.7 的抗性芽诱导率最高,而此时正是农杆菌增殖的对数生长期。同时,侵染液浓度代表着一定体积内菌体的含量,浓度过低则没有足够的外源 DNA 进入外植体,达不到侵染效果,而侵染液浓度过高,则会使多余的菌体附着在外植体伤口周围,影响细胞呼吸作用,从而导致后期农杆菌生长过旺、无法抑制。本研究通过分析不同侵染液浓度发现,以  $OD_{600}$  为 0.5 或 0.7 的处理效果最佳,这与武小霞等<sup>[21]</sup>的研究结果基本一致。

第三,在植物遗传转化过程中,区分转化和非转化细胞非常重要,这直接影响着转化植株的真伪。因而,适宜的抗生素筛选浓度对于遗传转化成功与否起关键作用。它不仅能够有效淘汰非转化细胞,从而得到较多的转化材料,同时还能够有效地减少后期继代工作量,这对于大批量的转基因工作来说非常重要。本研究通过分析7个不同浓度抗生素筛选结果发现,以卡那霉素浓度为  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  效果最佳。

最后,基因型限制问题也是制约当今植物转基因育种的重要因素之一<sup>[22]</sup>。多年来,众多研究者致力于筛选易于转化的大豆基因型,本研究通过对9个大豆栽培品种进行抗性芽诱导率以及其中部分品种的转化率进行统计发现,以中豆32的芽诱导率最高,五星2号的转化率最高。

### 参考文献

- [1] Yan X L, Wu P, Ling H Q, et al. Plant nutrionomics in China: An overview[J]. *Annals of Botany*, 2006, 98(3): 473-482.
- [2] 乔亚科, 李桂兰. 作物耐低磷机制及耐低磷育种研究进展[J]. 河北科技师范学院学报, 2007, 21(1): 67-73. (Qiao Y K, Li G L. Research advance in mechanism of plant tolerance to low phosphorous and breeding[J]. *Journal of Hebei Normal University of Science & Technology*, 2007, 21(1): 67-73.)
- [3] 李喜焕, 常文锁, 张彩英. 提高植物磷营养效率(候选)基因研

- 究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(1): 83-97. (Li X H, Chang W S, Zhang C Y. Research progress to improve the efficiency of plant phosphorus nutrition (candidate) genes [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2012, 13(1): 83-97. )
- [4] Wu P, Ma L, Hou X, et al. Phosphate starvation triggers distinct alteration of genome expression in *Arabidopsis* roots and leaves[J]. Plant Physiology, 2003, 132(3): 1260-1271.
- [5] Rubio V, Linhares F, Solano R, et al. A conserved myb transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae [J]. Genes & Development, 2001, 15(16): 2122-2133.
- [6] Zhou J, Jiao F C, Wu Z C, et al. *OsPHR2* is involved in phosphate-starvation signaling and excessive phosphate accumulation in shoots of plants[J]. Plant Physiology, 2008, 146(4): 1673-1686.
- [7] Oswaldo V L, Catalina A H, Mario R, et al. Essential role of MYB transcription factor: *PvPHR1* and microRNA: *PvmiR399* in phosphorus-deficiency signaling in common bean roots[J]. Plant, Cell and Environment, 2008, 31: 1834-1843.
- [8] 王运杰. 大豆 MYB 转录因子 *GmPHR1* 的基因克隆与功能研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2010. (Wang Y J. Molecular cloning and function analysis of MYB transcription factor *GmPHR1* in Soybean[D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2010. )
- [9] Trick H N, Dinkins R D, Santarem E R, et al. Recent advances in soybean transformation[J]. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 1997, 3(1): 9-26.
- [10] 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. )
- [11] 于洋, 侯文胜, 韩天富. 农杆菌介导大豆遗传转化技术的研究进展[J]. 大豆科学, 2010, 29(4): 696-701. (Yu Y, Hou W S, Han T F. Approaches to *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean[J]. Soybean Science, 2010, 29(4): 696-701. )
- [12] Hiei Y, Komari T, Ishida Y. Development of *Agrobacterium*-mediated transformation for monocotyledonous plants [J]. Breed Research, 2000, 2(2): 205-213.
- [13] Clemente T E, Lavalle B J, Howe A R. Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium* mediated transformation[J]. Crop Science, 2000, 40(3): 797-803.
- [14] 林树柱, 曹越平, 卫志明. 根瘤农杆菌介导的大豆遗传转化[J]. 生物工程学报, 2004, 20(6): 817-820. (Lin S Z, Cao Y P, Wei Z M. Genetic transformation of soybean mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2004, 20(6): 817-820. )
- [15] Yan B, Srinirasa Reddy M S, Collins G B, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybean (*Glycine max* (L) Merrill.) using immature zygotic cotyledon explants[J]. Plant Cell Reports, 2000, 19(11): 1090-1097.
- [16] 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): 590-597. (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): 590-597. )
- [17] 应珊, 何晓薇, 王秀荣, 等. 影响农杆菌介导的大豆转化效率的因素研究[J]. 分子植物育种, 2008, 6(1): 32-40. (Ying S, He X W, Wang X R, et al. Research of factors affect the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [J]. Molecular Plant Breeding, 2008, 6(1): 32-40. )
- [18] 袁鹰, 刘德璞, 郑培和, 等. 大豆组织培养再生植株研究[J]. 大豆科学, 2001, 20(1): 9-13. (Yuan Y, Liu D P, Zheng P H, et al. Study on plant regeneration from soybean culture [J]. Soybean Science, 2001, 20(1): 9-13. )
- [19] 王晓春, 刘尚前, 罗永华. 大豆再生体系和遗传转化研究进展[J]. 大豆科学, 2009, 28(4): 731-735. (Wang X C, Liu S Q, Luo Y H. Research progress of soybean regeneration system and genetic transformation [J]. Soybean Science, 2009, 28(4): 731-735. )
- [20] 周思军, 李希臣, 刘昭军, 等. 大豆农杆菌介导转化系统的优化研究[J]. 东北农业大学学报, 2001, 32(4): 325-331. (Zhou S J, Li X C, Liu Z J, et al. Optimization of soybean *Agrobacterium*-mediated transformation system [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2001, 32(4): 325-331. )
- [21] 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. )
- [22] Song Z Y, Tian J L, Fu W Z, et al. Screening Chinese soybean genotypes for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation suitability [J]. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B, 2013, 14(4): 289-298.