

大豆科丰 14 子叶节遗传转化体系的优化

王 伟,姚嘉龙,熊鹤雯,吴志慧,王 程,郭 蓓,谢 皓

(北京农学院 植物科学技术学院/北京农业应用新技术北京市重点实验室,北京 102206)

摘 要:科丰 14 是一个适应性较广的大粒型大豆品种,以农杆菌介导的子叶节法为转化途径,研究农杆菌侵染时间、6-BA 浓度及培养基中添加硫代硫酸钠对转化率的影响,以建立适宜科丰 14 的子叶节遗传转化体系。结果表明:当农杆菌侵染外植体时间为 15 min、丛生芽培养基中 6-BA 的浓度为 1.50 mg·L⁻¹时产生的丛生芽率最高,可达 72.92%;在共培养基中加入 1 mmol·L⁻¹的硫代硫酸钠能有效防止外植体褐化,提高丛生芽率;利用 GUS 基因染色技术检测转化效果,表明在大豆常规转化体系的基础上,上述措施可提高科丰 14 的转化效率。

关键词:科丰 14;子叶节;遗传转化

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2015.03.0389

Optimization on Cotyledonary-node Genetic Transformation System of Soybean Cultivar Kefeng 14

WANG Wei, YAO Jia-long, XIONG He-wen, WU Zhi-hui, WANG Cheng, GUO Bei, XIE Hao

(College of Plant Science and Technology, Beijing University of Agriculture/ Beijing Key Laboratory of New Technology in Agricultural Application, Beijing 102206, China)

Abstract: Kefeng 14 is a big grain type soybean cultivar with a wide adaptability. Based on the genetic transformation system of soybean cotyledonary node mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, the influences of the transformation efficiency were analyzed by infection time, 6-BA concentration and the addition of sodium thiosulfate. The results showed that bud rate was up to 72.92% with the optimal infection combination; *A. tumefaciens* concentration at OD₆₀₀ = 0.6 with 15 min infection time. The perfect 6-BA and sodium thiosulfate concentration was 1.50 mg·L⁻¹ and 1 mmol·L⁻¹ respectively, *GUS* gene staining technique showed that the above optimized soybean cotyledonary node *Agrobacterium-mediated* transformation system could improve the transformation efficiency of Kefeng 14.

Keywords: Kefeng 14; Cotyledonary node; Transformation

自 20 世纪 80 年代 Cheng 等^[1]利用大豆子叶节获得再生植株、Hinchee 等^[2]利用农杆菌介导法遗传转化成功之后,大豆转基因取得了很大的成就,最为突出的是抗除草剂转基因大豆的商业化。但是目前,无论在研究上还是实际应用上,遗传转化率依然较低,影响了大豆转基因的快速发展。为解决大豆遗传转化率低的问题,国内外的研究者^[3-8]做过很多试验探索,试图通过优化大豆子叶节的再生体系和农杆菌的浸染条件,提高转化效率。众多研究^[9-12]表明,不同品种之间再生率差异较大,品种的基因型也是影响农杆菌介导大豆转化的重要因素之一。因此,针对品种选用合适的转化体系是成功转化的前提。

大豆品种科丰 14 是中国科学院遗传与发育研究所选育的国家审定品种,属于大粒、丰产型品种,在北京、天津、河北、河南、山东、安徽、江苏、山西和陕西等地种植面积较大,利用该品种作为转化材料

对于转基因的基础研究和商业化开发都具有一定的代表性。因此,本研究以大豆科丰 14 子叶节为转化材料,在常规转化条件的基础上,从农杆菌浸染时间、激素 6-BA 浓度及抗氧化剂的使用等方面入手,建立其子叶节结合农杆菌转化法的遗传转化体系,旨在为大豆转基因研究提供试验参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 大豆材料 大豆品种科丰 14 由中国科学院遗传与发育研究所选育,北京农学院大豆研究室繁殖。

1.1.2 菌株和质粒 农杆菌 EHA105,质粒载体为 pCAMBIA3301(含 GUS 报告基因),由中国科学院植物科学研究所金京波博士馈赠。

1.1.3 基本培养基与试剂

(1)萌发培养基: B₅ 培养基 + B₅ 有机元素 +

收稿日期:2014-08-06
基金项目:国家自然科学基金(31371648);国家高技术研究发展计划“863 计划”(2012AA101106)。
第一作者简介:王伟(1984-),女,硕士,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:wangwei_wang@126.com。
通讯作者:谢皓(1962-),男,博士,教授,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:xiehao126@126.com。

20 g蔗糖 + 8% 琼脂, pH5. 8;

(2) 浸染液: 1/10 B₅ 培养基 + B₅ 有机元素 + 39. 6 mg·L⁻¹ 乙酰丁香酮 + 30 g 蔗糖 + 1. 67 mg·L⁻¹ 6-BA + 0. 25 mg·L⁻¹ GA₃, pH5. 4;

(3) 共培养基: 1/10 B₅ 培养基 + B₅ 有机元素 + 30 g 蔗糖 + 39. 6 mg·L⁻¹ 乙酰丁香酮 + 1. 67 mg·L⁻¹ 6-BA + 0. 25 mg·L⁻¹ GA₃ + 5% 琼脂, pH5. 4;

(4) 诱导培养基: B₅ 培养基 + B₅ 有机元素 + 1. 5 mg·L⁻¹ 6-BA + 30 g 蔗糖 + 500 mg·L⁻¹ 羧苄青霉素钠 + 50 mg·L⁻¹ 头孢霉素 + 8% 琼脂, pH5. 8;

(5) 芽伸长培养基: MS 培养基 + B₅ 有机元素 + 30 g 蔗糖 + 0. 5 mg·L⁻¹ GA₃ + 0. 3 mg·L⁻¹ IAA + 0. 1 mg·L⁻¹ Zt + 50 mg·L⁻¹ ASP/GLU + 500 mg·L⁻¹ 羧苄青霉素钠 + 50 mg·L⁻¹ 头孢霉素 + 8% 琼脂, pH5. 8;

(6) 生根培养基: 1/2MS 培养基 + B₅ 有机元素 + 30 g 蔗糖 + 8% 琼脂, pH5. 8;

含抗生素卡那霉素和利福平的 YEP 液体培养。
GUS 染色液: 50 mmol·L⁻¹ 磷酸缓冲液, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, 0. 4% TritonX-100, 0. 5 mg·mL⁻¹ X-Gluc。硫代硫酸钠等常规试剂。

1. 2 试验方法

1. 2. 1 种子灭菌和外植体的制备 挑选表面光滑无病斑的大豆种子, 用 75% 酒精和 1% 次氯酸钠表面灭菌后, 置于可以密闭的容器中, 并放入 500 mL 烧杯 1 只, 依次在烧杯中倒入 100 mL 次氯酸钠和 4 mL 盐酸, 密闭灭菌 12 h, 然后置于萌发培养基上, 25℃、18 h/6 h 光照和黑暗条件下培养 6 d。取健康萌发的种子, 切取下胚轴留 2 mm 左右, 保留原子叶, 并在子叶节处划伤以备农杆菌浸染。

1. 2. 2 农杆菌的制备和浸染时间 将农杆菌 EHA105 在含抗生素卡那霉素和利福平的 YEP 液体培养基平板上划线培养 2 d, 挑取含有 GUS 基因的农杆菌单菌落, 接种于含 7 mL 抗生素的 YEP 培养基的 50 mL 离心管中, 28℃、200 r·min⁻¹ 震荡过夜, 培养至对数期 OD₆₀₀ 为 0. 8 后, 倒入含 100 mL YEP 培养基的 200 mL 三角瓶中, 大摇至对数期 OD₆₀₀ 到 0. 6~1. 0, 将 100 mL 达到对数期的菌液均等地分装于灭菌的 50 mL 的离心管中, 在 4 000 r·min⁻¹ 室温下离心 10 min, 取 40 mL 浸染液重悬备用。

将制备好的外植体浸在悬好的菌液中, 浸染时间分别为 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 和 60 min, 每处理 48 个子叶节, 3 次重复。浸染完成后将外植体放在铺有滤纸的共培养基上, 25℃、18 h 光照/6 h 黑暗培养 3 d, 观察后期农杆菌对外植体的影响。

1. 2. 3 共培养阶段加入硫代硫酸钠 在浸染液和共培养基中分别加入 1 mmol·L⁻¹ 的硫代硫酸钠, 以未加入硫代硫酸钠的处理为对照。采用农杆菌浸染 15 min 的外植体为处理材料, 每处理 48 个子叶节外植体, 3 次重复, 共培养 3 d 后观察外植体抗氧化能力。

1. 2. 4 诱导丛生芽培养基中 6-BA 最佳浓度的确定 在诱导丛生芽培养基中加入不同浓度的 6-BA, 浓度分别为 0, 0. 5, 1. 0, 1. 5, 2. 0 mg·L⁻¹ 5 个处理, 采用农杆菌浸染 15 min 的外植体为处理材料, 每个处理 48 个外植体, 3 次重复, 30 d 后统计丛生芽率。

1. 2. 5 转化后的丛生芽和植株鉴定 分别随机选取 20 个丛生芽和转化植株, 采用 GUS 组织化学染色对丛生芽和转化植株进行鉴定, 参照 Jefferson^[13] 的方法, 将丛生芽和转化植株的部分叶片和根浸在 GUS 染色液中, 放置于 37℃ 培养箱中 12 h 左右, 之后用 75% 酒精脱色, 观察染色结果。

1. 2. 6 统计分析 丛生芽获得率(%) = 丛生芽数量/浸染外植体数量 × 100; 丛生芽 GUS 染色率(%) = 染色丛生芽个数/供试丛生芽个数 × 100; 转化植株 GUS 染色率(%) = 染色植株/供试植株数 × 100。

2 结果与分析

2. 1 农杆菌浸染时间对丛生芽率的影响

从表 1 中可以看出, 农杆菌浸染 10 min 时丛生芽率为 33. 33%, 15 min 时丛生芽率达到 72. 92%, 但随后随着浸染时间的延长, 丛生芽率越来越低, 当超过 50 min 的时候, 丛生芽率仅为 5% 以下。表明, 农杆菌浸染时间较长会影响到外植体生活力, 进而影响到丛生芽率。对于科丰 14 子叶节而言, 浸染时间为 15 min 时丛生芽率最高, 与其它处理相比差异显著 ($P < 0. 05$)。

2. 2 硫代硫酸钠对共培养阶段的影响

在子叶节与农杆菌共培养过程中, 子叶节和下胚轴表面容易褐化, 产生一些褐色分泌物质, 这些分泌物多是单宁类物质的积累和植物抗菌素的释放, 在伤口处形成保护层, 影响到丛生芽的诱导。硫代硫酸钠有一定的还原性, 加入 1 mmol·L⁻¹ 的硫代硫酸钠后, 在一定程度上可以防止褐化, 如图 1 所示, 对比未添加硫代硫酸钠(A 和 C)的处理, 加入硫代硫酸钠的外植体边缘、子叶节和下胚轴处的褐色分泌物质明显减少(B 和 D), 甚至没有发生褐变, 不会影响农杆菌的浸染和丛生芽的发生。

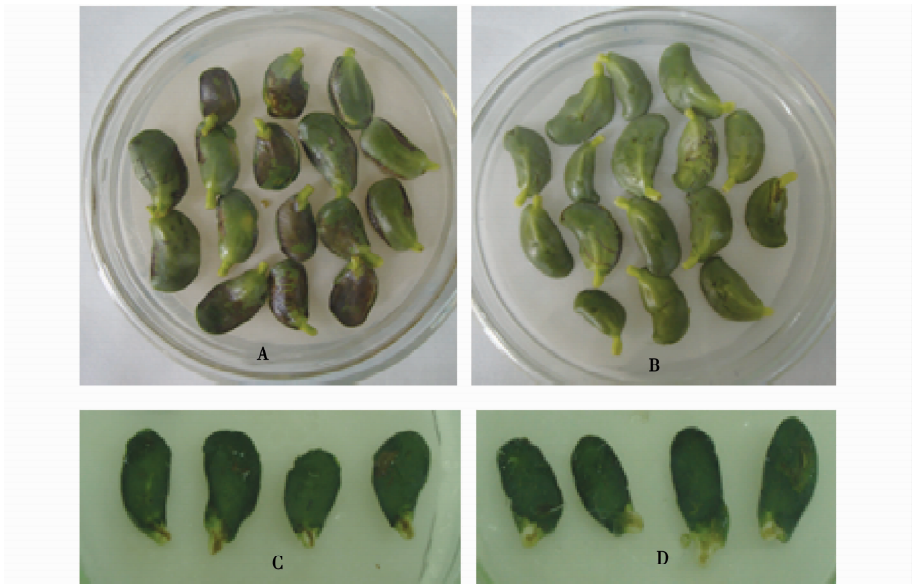
表 1 农杆菌浸染时间对丛生芽的影响

Table 1 Effect of agrobacterium impregnation time on the multiple shoots

| 浸染时间 Impregnation time/min | 外植体数 No. of explants | 丛生芽数 No. of multiple shoots | 丛生芽率 Rate of multiple shoots/% |
|-------------------------------|-------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| 10 | 48 | 16.00 ± 3.61 b | 33.33 ± 7.51 b |
| 15 | 48 | 35.00 ± 4.00 a | 72.92 ± 8.34 a |
| 20 | 48 | 14.00 ± 3.00 b | 29.17 ± 6.25 bc |
| 25 | 48 | 13.00 ± 2.65 b | 27.08 ± 5.51 bc |
| 30 | 48 | 13.67 ± 2.08 b | 28.48 ± 4.34 bc |
| 35 | 48 | 12.00 ± 1.73 b | 25.00 ± 3.61 c |
| 40 | 48 | 6.33 ± 1.15 c | 13.19 ± 2.40 d |
| 50 | 48 | 2.00 ± 1.00 d | 4.17 ± 2.09 de |
| 60 | 48 | 1.33 ± 0.58 d | 2.77 ± 1.21 e |

同列数值的不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

Values within a column followed by different lowercase letters showed significant difference ($P < 0.05$). The same below.



A 和 C:分别为共培养基中未添加硫代硫酸钠的子叶和子叶节;B 和 D:分别为共培养基中添加硫代硫酸钠的子叶和子叶节。

A and C:The cotyledonary and cotyledonary node without sodium thiosulfate in co-medium, respectively; B and D:The cotyledonary and cotyledonary node with sodium thiosulfate in co-medium, respectively.

图 1 硫代硫酸钠对大豆子叶节的影响

Fig. 1 Effect of sodium thiosulfate on cotyledonary and cotyledonary node of soybean

2.3 6-BA 对诱导丛生芽的影响

在诱导丛生芽阶段,植物激素及比例非常重要,一般使用细胞分裂激素 6-BA 诱导丛生芽。本试验采用梯度试验,检验 6-BA 浓度对科丰 14 丛生芽诱导的影响。从表 2 结果看,在诱导丛生芽培养基中加入 $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 时,平均丛生芽最多,为 35 个,丛生芽率也最高,达到 72.92%,与其它处理相比差异显著 ($P < 0.05$),丛生芽的生长状态较好,因此,对于科丰 14 而言,在诱导丛生芽培养基中 6-BA 的浓度为 $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时有利于丛生芽的产生。

2.4 丛生芽和转化植株鉴定

为验证转化体系的可行性,采用 GUS 组织化学

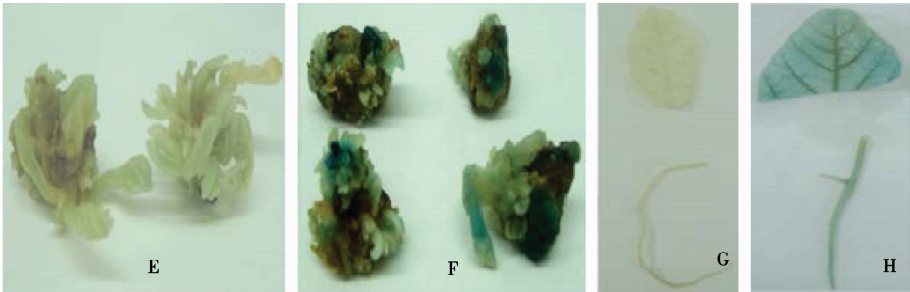
染色对部分诱导 30 d 后的丛生芽和转化植株的部分叶片和根进行染色分析,了解转化体系的可行性。随机选取 20 个外植体 30 d 后产生的丛生芽和 20 株转化植株的叶片与根进行 GUS 染色,同时以未转化的科丰 14 的丛生芽和叶片与根为 GUS 染色对照。如图 3 所示,转化后的科丰 14 的丛生芽、叶片和根均显示蓝色,表明已含有 GUS 报告基因,而未含有 GUS 基因的没被染成蓝色。染色结果表明,丛生芽和叶片与根的 GUS 染色率分别为 20% 和 10%。

综上所述试验结果表明,在常规大豆转化体系基础上,通过对农杆菌侵染时间、加入硫代硫酸钠和

6-BA 浓度的选择,不仅可以增加科丰 14 的丛生芽的诱导率,获得一定的转化植株,而且丛生芽和转化植株中可以检测到 *GUS* 报告基因,说明该体系可以为科丰 14 品种的遗传转化之用。

表 2 6-BA 对丛生芽的影响
Table 2 Effect of 6-BA on the multiple shoots

| 6-BA 浓度 Levels of 6-BA/ mg·L ⁻¹ | 外植体数 No. of explants | 丛生芽数 No. of multiple shoots | 丛生芽率 Rate of multiple shoots/% |
|---|-------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| 0.0 | 48 | 0 ± 0.00 d | 0 ± 0.00 d |
| 0.5 | 48 | 17 ± 6.25 b | 35.42 ± 13.01 b |
| 1.0 | 48 | 15 ± 0.00 cb | 31.25 ± 0.0 bc |
| 1.5 | 48 | 35 ± 2.00 a | 72.92 ± 4.17 a |
| 2.0 | 48 | 10.33 ± 1.53 c | 21.53 ± 3.18 c |



E: *GUS* 染色后的野生型丛生芽; F: *GUS* 染色后的转化丛生芽; G: *GUS* 染色后的野生型叶片和根; H: *GUS* 染色后的 T₀ 代叶片和根。
E: Multiple shoots of wild type after *GUS* staining; F: Multiple shoots of transformation after *GUS* staining; G: Leaf and root of wild type after *GUS* staining; H: Leaf and root of T₀ after *GUS* staining.

图 2 *GUS* 染色鉴定
Fig. 2 Identification of *GUS* staining

3 结论与讨论

在大豆利用子叶节为外植体进行的转化过程中,农杆菌的浓度和侵染时间对丛生芽产生有很大的影响^[14]。杜升伟等^[15]曾报道,农杆菌的浓度为 OD₆₀₀ = 0.6, 浸染时间 20 ~ 30 min 有利于转化;李桂兰等^[16]的试验表明农杆菌浸染 30 min 时转化率最高,60 min 的浸染时间次之,浸染 15 min 转化率最低。在本试验中,农杆菌浸染科丰 14 子叶节的适宜时间为 15 min,获得的丛生芽率最高,可能与外植体的基因型相关。

在农杆菌介导的大豆遗传转化过程中,植物外植体对农杆菌的侵染会产生防卫反应,防卫反应中产生的分泌物质(多为单宁类和植物抗菌素),能在伤口处形成保护层,使之褐化。阻挡农杆菌的浸染效率,降低 T-DNA 的转移效率。添加抗氧化剂能有效抑制分泌物的产生,促进丛生芽的分化。Olhoft 等^[17]的方法是在共培养基中添加二巯基苏糖醇 1 mmol·L⁻¹ + 硫代硫酸钠 1 mmol·L⁻¹ + 半胱氨酸 8.8 mmol·L⁻¹,可使转基因植株的频率达到 9.4% ~ 26.2%;孙昕等^[18]认为在重悬液和共培养基中添加 400 mg·L⁻¹ 的 L- Cys、248 mg·L⁻¹ 的硫代硫酸钠和

300 mg·L⁻¹ 的 DTT 组合对于褐化的抑制效果较好。本试验中,在浸染液和共培养阶段只加入 1 mmol·L⁻¹ 的硫代硫酸钠即可有效抑制有害分泌物的形成,方法简单实用。

植物激素对丛生芽的诱导影响较大,但只有合适的浓度出芽率才会高。在一些报道中^[15-16,19],经常采用 6-BA 和 IBA 组合促进不定芽的分化,刘金华等^[19]除使用 6-BA 和 IBA 组合外,又添加了 KT 诱导芽的分化。另有报道^[20-24]在萌发阶段和诱导阶段分别使用不同浓度的 6-BA 诱导芽的分化,本试验中,针对 6-BA 的浓度对科丰 14 丛生芽分化的影响,进行不同梯度试验,表明 6-BA 的浓度在 1.5 mg·L⁻¹ 水平时,产生的丛生芽率最高。

GUS 基因作为报告基因在转化受体组织中表达,可以辅助转化植株的检测。通过 *GUS* 染色证明科丰 14 可以作为大豆遗传转化的受体,优化后的转化体系转化效果较好。上述试验结果对于科丰 14 转化体系而言,在常规转化条件的基础上,农杆菌侵染子叶节的时间为 15 min、丛生芽培养基中 6-BA 的浓度水平为 1.50 mg·L⁻¹,在共培养基中加入 1 mmol·L⁻¹ 的硫代硫酸钠,能够有效地提高丛生芽率和转化水平。

参考文献

- [1] Cheng T Y, Saka H., Voqui-Dinh T H. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture [J]. Plant Science Letters, 1980, 19: 91-99.
- [2] Hinchee M A, Connor-Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer [J]. BioTechnology, 1988, 6: 915-922.
- [3] Olhoft P M, Flagel L E, Donovan C M, et al. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method [J]. Planta, 2003, 5: 723-735.
- [4] 刘金华, 王丕武, 武丽敏, 等. 大豆子叶节丛生芽的诱导[J]. 吉林农业大学学报, 2001, 23(4): 15-17 (Liu J H, Wang P W, Wu L M, et al. The induction of multiple shoots *via* cotyledon nodes of soybean [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2001, 23(4): 15-17).
- [5] 李明春, 蔡易, 赵桂兰, 等. 改良大豆子叶节再生体系的研究[J]. 作物学报, 2006, 32(2): 223-227. (Li M C, Cai Y, Zhao G L, et al. Improvement of cotyledon node regeneration system in soybean (*Glycine max*) [J]. Acta Agronomica Sinica, 2006, 32(2): 223-227).
- [6] 韩雪, 韩岚岚, 宋雯雯, 等. 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, 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).
- [7] 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).
- [8] 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, Lyu W H, et al. Optimization of the *Agrobacterium*-mediated transformation systems of soybean cotyledonary node [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(4): 971-977).
- [9] 刘思言, 高玮, 夏海丰, 等. 大豆子叶节再生体系的建立[J]. 作物杂志, 2013(6): 41-45. (Liu S Y, Gao W, Xia H F, et al. Establishment of the cotyledon node regeneration system [J]. Crops, 2013(6): 41-45).
- [10] 杨喆, 唐晓飞, 张颖, 等. 农杆菌介导不同基因型大豆品种子叶节遗传转化条件的研究[J]. 大豆科学, 2012, 31(2): 188-192. (Yang Z, Tang X F, Zhang Y, et al. Optimization on genetic transformation conditions of *Agrobacterium*-mediated cotyledonary-nodes from different genotype soybeans [J]. Soybean Science, 2012, 31(2): 188-192).
- [11] Donaldson P A, Simmonds D H. Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean [J]. Plant Cell Report, 2000, 19: 478-484.
- [12] 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).
- [13] Richard A J. Assaying chimeric genes in plants: The *GUS* gene fusion system [J]. Plant Molecular Biology Reporter. 1987, 5(4): 387-405].
- [14] 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, 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).
- [15] 杜升伟, 刘业丽, 姚丙晨, 等. 大豆转化体系的优化和 Dof 4 基因转入大豆的研究[J]. 大豆科学, 2010, 29(3): 398-402. (Du S W, Liu Y L, Yao B C, et al. Optimization of soybean transformation system and transferring Dof 4 gene into soybean [J]. Soybean Science, 2010, 29(3): 398-402).
- [16] 曹荣, 芦琳琳, 朱保葛, 等. “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, et al. Induction of multiple shoots from cotyledonary nodes of “Xiaoli Huang” soybean [J]. Soybean Science, 2010, 29(5): 747-750).
- [17] Olhoft P M, Flagel L E, Donovan C M, et al. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method [J]. Planta, 2003, 5: 723-735.
- [18] 孙昕, 赵健如, 闫帆, 等. 吉林 47 大豆子叶节遗传转化体系的优化[J]. 大豆科学, 2013, 32(3): 291-294. (Sun X, Zhao J R, Yan F, et al. Optimization on cotyledonary-node genetic transformation system of soybean cultivar Jilin 47 [J]. Soybean Science, 2013, 32(3): 291-294).
- [19] 刘金华, 王丕武, 武丽敏, 等. 大豆子叶节丛生芽的诱导[J]. 吉林农业大学学报, 2001, 23(4): 15-17. (Liu J H, Wang P W, Wu L M, et al. The induction of multiple shoots *via* cotyledon nodes of soybean [J]. Journal of Jilin Agricultural University. 2001, 23(4): 15-17).
- [20] 杨微, 覃金花, 唐兴富, 等. 大豆子叶节高效再生系统的研究[J]. 西南农业学报, 2012, 25(4): 1181-1186. (Yang W, Qin J H, Tang X F, et al. Study on high frequency cotyledonary nodes regeneration system of soybean [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2012, 25(4): 1181-1186).
- [21] 赖冰冰, 韩阳, 李春风, 等. 大豆子叶节植株再生体系的研究[J]. 大豆科学, 2011, 30(2): 303-305. (Lai B B, Han Y, Li C F, et al. Research on cotyledonary nodes regeneration system of soybean [J]. Soybean Science, 2011, 30(2): 303-305).
- [22] 林树柱, 曹越平, 卫志明, 等. 6-BA 诱导大豆子叶节和茎尖出芽的研究[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2005, 23(2): 138-142. (Liu S Z, Cao Y P, Wei Z M, et al. Studies on shoots induced by 6-BA from cotyledonary nodes and embryonic tips of soybean [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science), 2005, 23(2): 138-142).
- [23] 武小霞, 李静, 姜成涛, 等. 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, et al. Optimization of regeneration system from soybean cotyledonary node [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2011, 33(2): 123-129.)