

根癌农杆菌介导的大豆子叶节转化体系的优化

郝荣华¹, 邵群¹, 杨素欣¹, 李继存², 冯献忠¹, 赵彦修¹

(1. 山东师范大学 生命科学学院, 山东省高校系统生物学重点实验室, 山东 济南 250014; 2. 济宁市农业科学院 经济作物所, 山东 济宁 272031)

摘要:以13种不同基因型的大豆为材料,研究了大豆外植体再生过程中不同大豆基因型对丛生芽数目的影响,选取优势基因型为受体材料,比较了在草丁膦和潮霉素筛选压力下外植体的再生情况,并确定其合适的筛选浓度,在对农杆菌介导的子叶节转化体系优化的基础上进行了大豆转化效率的研究。结果显示:在相同的芽诱导条件下,山宁14产生的丛生芽最多,更适合于大豆子叶节转化;与其它筛选剂相比,采用潮霉素的梯度筛选更有利于抗性苗的成活,其最适筛选浓度为 $8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;通过检测GUS基因的表达和分子鉴定证明外源的GUS基因已插入到转基因植株的基因组中,转化效率达到3.2%。

关键词:大豆;农杆菌;子叶节;转化

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2012)02-0167-06

Optimization of *Agrobacterium*-mediated Soybean Transformation using the Cotyledonary Node

HAO Rong-hua¹, SHAO Qun¹, YANG Su-xin¹, LI Ji-cun², FENG Xian-zhong¹, ZHAO Yan-xiu¹

(1. Key Laboratory of Systems Biology in Universities of Shandong, College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014; 2. Economic Plants Institute, Jining Academy of Agricultural Sciences, Jining 272031, Shandong, China)

Abstract: To optimize the system of *Agrobacterium*-mediated soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] transformation, effects of 13 cultivars and 2 selection agents were studied during the process of shoot regeneration and transformation. The results showed that the cultivar ‘Shanning 14’ induced the highest number of multiple shoot among tested 13 cultivars, and hygromycin B was better than glufosinate during transformant selection of cultivar ‘Shanning 14’. The optimal transformant selection scheme was a gradient concentration of hygromycin B from 3 to $8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The integrations of *Uida* (*GUS*) gene into the transformant genome were demonstrated by histological staining, PCR application and sequencing analysis. Transformation efficiency was 3.2% based on the number of transformed events.

Key words: Soybean; *Agrobacterium tumefaciens*; Cotyledonary node; Transformation

大豆是我国重要的粮食、油料和饲料作物,以往大豆新品种的培育主要以常规育种为主。然而,大豆常规育种技术存在育种年限长、难以打破性状连锁、多基因重组率低、远缘杂交困难等问题。而转基因育种可以打破物种界限、克服有性杂交障碍,快速有效地创造遗传变异,大大缩短新品种的培育时间。

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、显微注射法、真空抽滤法和花粉管导入法等;近年来,一些新的、潜在高效的农杆菌转化方法,如超声辅助农杆菌转化法、真空抽滤辅助农杆菌转化完整植株法、微粒轰击与农杆菌综合法得到了快速发展,但实际应用最广泛的是根癌农杆菌介导法和基因枪法^[1-2]。农杆菌成功转

化大豆的首例报道是由 Hinchee 等^[3]在1988年以子叶节为受体材料所完成的,之后的报道大多以 Hinchee 的工作为基础,对该遗传转化系统进行优化和改良。到目前为止,农杆菌介导法因其外源基因整合拷贝数较低且完整,操作简便,一直是大豆转化的重要方法^[4]。与其它转基因技术相比,农杆菌介导遗传转化系统具有拷贝数低、遗传稳定、基因沉默现象少和成本低等优点,但农杆菌介导大豆遗传转化的效率却一直偏低^[5]。大量的研究表明,不同大豆基因型在转化效率和再生能力上存在很大差异,需要转化条件的优化。根据不同基因型的特点,优化适用于不同基因型的遗传转化系统是广泛利用转基因技术改造大豆性状的重要基础。该研究以山宁14, Williams82等13个大豆基因型为材

收稿日期:2012-02-03

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(JQ200909);国家自然科学基金资助项目(31171571)。

第一作者简介:郝荣华(1983-),女,在读博士,研究方向为大豆转基因。E-mail:ronghua34@163.com。

通讯作者:赵彦修(1954-),男,教授,从事植物耐盐细胞及分子生物学研究。E-mail:zhaoyx@sdnu.edu.cn。

料,对根癌农杆菌介导的子叶节再生体系和转化体系进行了优化,以此为基础,成功获得了转基因大豆株系,建立了一套稳定高效的大豆转化体系,为大豆转基因技术的利用提供了条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受体大豆材料 13 个大豆基因型:山宁 14、山宁 15、高丰 1 号、齐黄 32、吉育 47、文丰 7 号、7145、吉林 35、吉林小豆粒、Williams82、Williams79、Jack 和 HVE,由济宁市农业科学院提供。

1.1.2 质粒和菌株 所用质粒为 pCAMBIA 1301 (购自 Cambia 公司),含有 *GUS* 基因,*HPT* 基因,启动子 35S 和终止子 NOS。

所用农杆菌菌株为 EHA105,由中山大学罗达教授惠赠。

1.2 植物组织培养基

1.2.1 共培养培养基 $1/10$ (B5 salts + MS iron stock) + B5 Vitamins + $1.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃ + $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ L-Cysteine + $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT + $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na₂S₂O₃ + $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Acetosyringone + $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MES + 0.02% Silwet + 3% Sucrose + 0.5% Agar, pH 5.4。

1.2.2 芽诱导培养基 B5 salts + B5 Vitamins + MS iron stock + $1.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cefotaxime + $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Carbenicillin + $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MES + 3% Sucrose + 0.5% Agar, pH 5.7。

1.2.3 芽伸长培养基 MS salts + MS iron stock + B5 Vitamins + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃ + $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA + $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ L-Asparagine + $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ L-Pyroglutamic acid + $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cefotaxime + $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Carbenicillin + $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MES + 3% Sucrose + 0.5% Agar, pH 5.7。

1.2.4 生根培养基 $1/2$ B5 salts + MS iron stock + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MES + 3% Sucrose + 0.5% Agar, pH 5.7。

1.3 方法

1.3.1 适宜基因型的筛选 选取表面光滑、无破损、无裂痕、无病斑的成熟饱满的大豆种子,以氯气方法灭菌 14 h^[6],将种脐向下接种到 B5 基本培养基中,25℃,16 h 光照/8 h 黑暗, $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的光照强度下培养,5~6 d 后取出无菌苗,去掉种皮,横切去 $1/2$ 的子叶,保留 3~5 mm 下胚轴,纵切

分离两片子叶,切除顶芽及初生芽,用刀片在子叶节部位纵切十余刀,可得子叶与下胚轴之间的分生组织即子叶节外植体。将外植体近轴面向下,下胚轴 45°斜插入芽诱导培养基中,每 15 d 转接至新鲜的培养基中,转接时切去下胚轴的老化组织。每个基因型接种 50 个外植体,各设置 3 次重复,30 d 后统计各基因型大豆的丛生芽诱导数目。

1.3.2 筛选剂筛选浓度的选择 选取山宁 14 大豆材料,进行潮霉素和草丁膦浓度临界浓度的探索,将制备好的外植体分别接种在含有 0、2、4、6、8、10、12 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 潮霉素和 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 草丁膦的芽诱导培养基中,每个筛选浓度接种 31 个外植体,各设置 3 次重复,每 15 d 转接至新鲜的培养基中,转接时切去下胚轴的老化组织,30 d 后统计丛生芽伸长长度。

1.3.3 大豆转化体系的构建 农杆菌菌液的准备:挑取含有质粒 pCAMBIA 1301 的农杆菌单菌落接种于 5 mL 含 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Kan 的 YEP 液体培养基中,28℃,180 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡 12 h,然后以 1:100 的比例进行扩大培养至 OD₆₀₀ 为 0.6,菌液在 4℃下 4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,弃上清,收集菌体,用液体共培养培养基重悬,将菌液浓度调整至 OD₆₀₀ = 0.6,28℃,100 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡 0.5 h,使农杆菌充分活化。

共培养:将子叶节外植体放入振荡 0.5 h 的重悬菌液中,浸染 45 min 倒掉菌液,将外植体置于铺有无菌滤纸的大培养皿中,充分吸去多余的菌液,然后将外植体近轴面向下,接种在铺有一层无菌滤纸的固体共培养培养基中,25℃黑暗共培养 3 d。

芽诱导和芽伸长培养:共培养后将外植体转入无菌三角烧瓶中,用无菌水反复清洗 6 次,彻底去除附着在表面的农杆菌,将外植体置于铺有无菌滤纸的大培养皿中,充分吸去附着的菌液,然后将其接种至 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 潮霉素的芽诱导培养基中,15 d 后移至含 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 潮霉素的芽诱导培养基中,转接时切去下胚轴的老化组织。30 d 后待丛生芽可见时,将外植体切除子叶部分转入含有最适潮霉素浓度的固体芽伸长培养基中。

生根及移栽培养:60 d 后,待无菌苗的芽伸长至 3~5 cm 时,转入生根培养基中诱导生根,待主根生长到 4~6 cm,且不定根上长出一些侧根后便可将培养瓶打开,同时在培养瓶中添加刚好没过培养基的无菌水炼苗 3 d,然后将无菌苗从培养瓶中取出,用自来水将根部的培养基冲洗干净,移栽至育

苗基质:蛭石:珍珠岩以4:2:1的比例混合的营养土中,喷水覆膜保湿,放在人工气候培养箱中,25℃,16 h 光照/8 h 黑暗的光周期,50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的光照强度下培养,湿度不低于80%,7 d 后揭膜,待新叶长出后,逐渐降低湿度到70%,缩短光照时间至12 h 光照/12 h 黑暗的生长条件。

1.4 GUS 基因表达活性的检测

GUS 染色参照 Jefferson 等的组织化学染色方法^[7]。

1.5 转基因植株的 PCR 检测

移栽到土壤中的抗性苗,待长出第2个三出复叶后,采用 CTAB 法提取幼嫩叶片的基因组 DNA^[8],在 pCambia 1301 质粒的 GUS 基因序列上设计1对引物,对抗性苗进行外源基因的 PCR 检测。GUS 基因的引物序列为:上游引物序列(OL0672):5'-GCCAAGTCTTTATACCGAAAGGTTG-3';下游引物序列(OL0673):5'-TCAGCTCTTTA-ATCGCCTGTAAGTG-3'。

PCR 反应体系的体积为25 μL ,大豆基因组 DNA 500 ng,dNTP 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,上游、下游引物终浓度0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,Taq DNA 聚合酶1 U。扩增条件为:94℃预变性3 min;94℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸1 min,循环30次;72℃延伸10 min。PCR 产物取15 μL 经1.0%的琼脂糖凝胶电泳,Alpha Imager EP 凝胶成像系统照相,检测 PCR 结果。

2 结果与分析

2.1 基因型对大豆丛生芽诱导数目的影响

以13种不同的大豆基因型为材料,研究基因型对大豆丛生芽诱导数目的影响,每个基因型接种50个子叶节外植体,各设置3次重复,结果见图1。

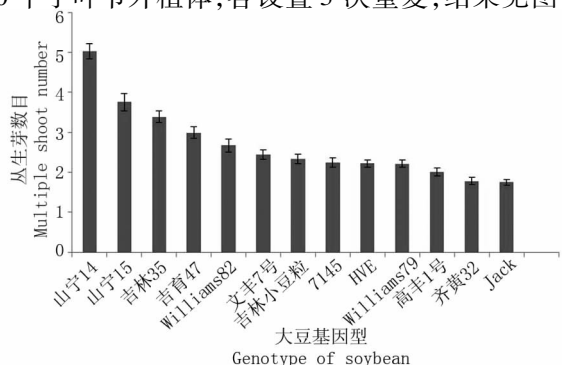


图1 不同基因型大豆对丛生芽诱导数目的影响

Fig. 1 Effects of different genotypes on number of multiple shoot

在1.7 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 的芽诱导条件下,不同大豆基因型的丛生芽诱导率存在一定程度的差异,其中山宁14诱导的丛生芽数目为 5.03 ± 0.19 ,Jack 诱导的丛生芽数目最低,仅为 1.75 ± 0.08 。因此,选取丛生芽诱导数目最多的山宁14作为下一步的供试品系。

2.2 筛选剂的选择

以山宁14子叶节外植体作为材料,在芽诱导培养基上设置了不同的潮霉素和草丁膦浓度梯度来测试子叶节外植体对2种筛选剂的敏感度,以此来确定最适宜的筛选剂和筛选浓度。由图2可知:在草丁膦的筛选压下,其子叶节外植体生长的抑制作用较强,对草丁膦的敏感度过高,当浓度高于1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 后,外植体的褐化率急剧增加,因此可供使用的筛选浓度范围比较窄;而在潮霉素筛选压下,山宁14子叶节外植体生长抑制程度适中,再生植株的比率较高,在2~8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 潮霉素的筛选范围内,外植体的褐化率成接近线性的增加,所以选用潮霉素作为筛选剂来筛选转化植株。

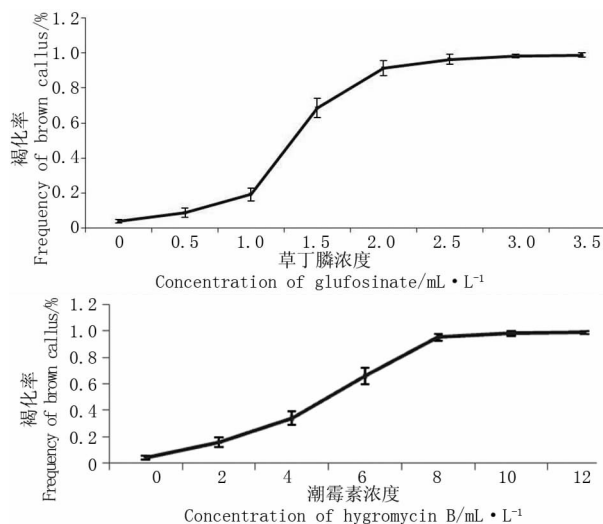


图2 筛选剂浓度对丛生芽褐化率的影响

Fig. 2 Effects of different selective agent concentration on frequency of brown callus

在潮霉素筛选压力下,对照组未添加潮霉素时,30 d 丛生芽长度为 2.82 ± 0.66 mm,随着潮霉素筛选压力的增加,潮霉素对丛生芽伸长的抑制作用逐渐增强,丛生芽较对照生长缓慢且矮小;当潮霉素浓度增加至8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,30 d 丛生芽的长度仅为 0.08 ± 0.04 mm;当潮霉素浓度大于8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,均没有丛生芽的生长(图3)。这表明8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的潮霉素是丛生芽生长的临界浓度。因此,以山宁14子叶节为外植体进行大豆的遗传转化时,8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 是最佳的潮霉素筛选终浓度,此浓度可以有效地抑制非转化外植体的生长。

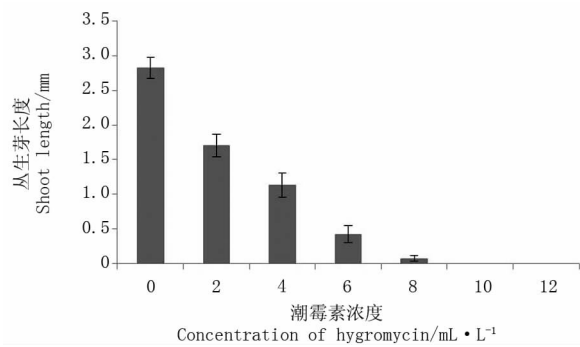


图3 潮霉素浓度对丛生芽伸长的影响

Fig. 3 Effect of hygromycin concentration on shoot elongation length

表1 激素与移栽成活率的关系

Table 1 The relationship between hormone and the rate of survived plants

激素及其浓度 Concentration of phytohormone	总外植体数 Total number of explants	生根成活总数 Number of survived rooting plants	生根成活率 Efficiency of survived rooting plants/%
1.0 mg·L ⁻¹ IBA	1 537	7	0.46
0.5 mg·L ⁻¹ NAA	308	17	5.50

按照优化后的试验方法,以 pCAMBIA 1301 载体转化 308 个大豆子叶节外植体,成功筛选到了 17 株抗性苗,大部分植株长势良好,而且能够正常生长发育(图 4)。

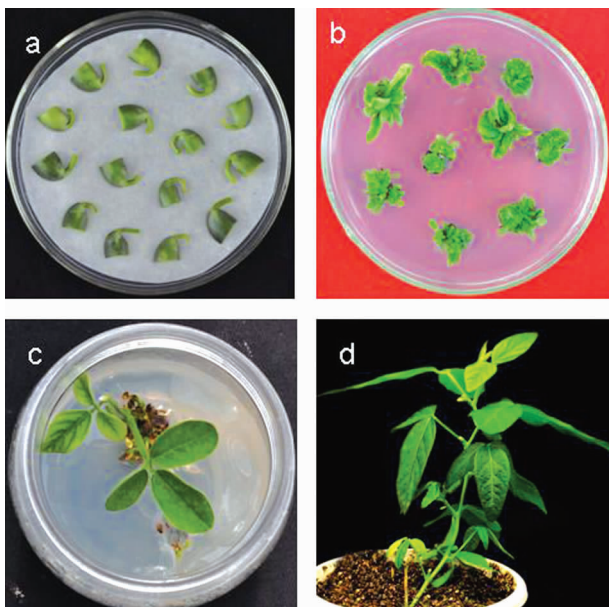
2.4 转基因植株的 GUS 活性检测

为了追踪转基因的情况,分别检测了转基因过

2.3 转基因植株生根培养的优化

参考 Olhoft 等^[9] 和 Liu 等^[10] 的大豆遗传转化方法和上述研究基础,以 pCAMBIA 1301 为载体转化大豆子叶节外植体,分别用 1.0 mg·L⁻¹ IBA 和 0.5 mg·L⁻¹ NAA 来研究激素对生根的影响,结果发现在 1.0 mg·L⁻¹ IBA 生根培养条件下,生根成活率为 0.46%,而在 0.5 mg·L⁻¹ NAA 生根培养条件下,生根成活率达到 5.5%(表 1)。这可能是由于生根培养基中添加 IBA 会诱导幼苗基部愈伤组织的膨大,移栽后常常会因染菌而死亡。

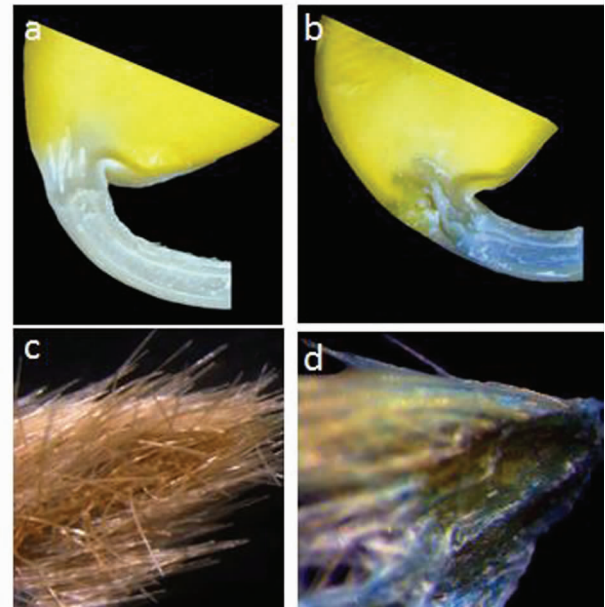
程中外植体 GUS 基因的瞬时表达和抗性苗的 GUS 基因稳定表达,从图 5 可见,农杆菌侵染后子叶节外植体经共培养 3 d 后,可以检测到子叶节部位的 GUS 基因瞬时表达(图 5b),而非转化外植体无显色反应。同时对于潮霉素筛选到的抗性苗进行 GUS 活性检测发现,GUS 基因可以在幼嫩的叶尖中稳定



a. 共培养;b. 丛生芽诱导;
c. 芽伸长后生根;d. 移栽后的抗性植株
a. Co-cultivation;b. Shoot induction;c. Shoot elongation and rooting;d. Transgenic soybean plant

图4 利用优化的农杆菌介导的转化体系获得的大豆抗性植株

Fig. 4 Transgenic soybean plants obtained from optimal *Agrobacterium*-mediated soybean transformation system



a. 未侵染的子叶节;b. 侵染 3 天后的子叶节;
c. 野生型幼叶尖;d. 抗性幼苗叶尖
a. Non-transformed cotyledonary-node;b. Transformed cotyledonary-node after 3 days infection;c. Young leaf tip of wild type plant;d. Young leaf tip of hygromycin resistance plant

图5 转化后的子叶节外植体和幼叶尖 GUS 染色

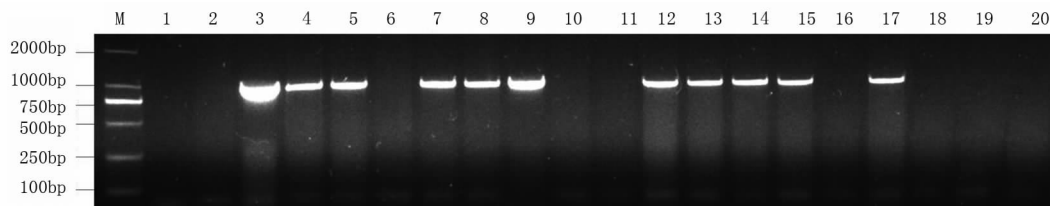
Fig. 5 Assays for GUS activity in cotyledonary-node and young leaf tip

表达(图 5d),表明 T-DNA 已经整合到基因组 DNA 中,*GUS* 基因得到了有效的表达。

2.5 转基因植株的 PCR 检测

对筛选到的 17 株 T_0 代抗性苗进行了 DNA 水平的分子鉴定,通过 PCR 扩增检测外源 *GUS* 基因是否插入到抗性苗的基因组中,以野生型大豆和水

为阴性对照,质粒为阳性对照。1% 的琼脂糖凝胶电泳结果显示:阳性对照和 10 株 T_0 代抗性苗均可以扩增到 975 bp 的目的条带,而阴性对照均没有此条带,另外的 7 株抗性苗为假阳性植株(图 6);目的条带的测序结果表明,所扩增的条带为外源 *GUS* 基因。根据分子鉴定结果,试验的转化效率为 3.2%。



M: DNA 分子量标准物 D; 1: 水阴性对照; 2: 野生型阴性对照; 3~20: 转基因植株
M: DNA Marker DL2000; 1: Water negative control; 2: Wild type negative control; 3-20: Transgenic plants

图 6 PCR 检测转基因植株的 *GUS* 基因片段

Fig. 6 PCR amplification of DNA fragments of *GUS* gene in transgenic plants

3 讨论

利用转基因技术,将优良农艺性状的相关基因转入普通栽培大豆,进而获得综合性状优良的转基因大豆品种,不但可以丰富栽培大豆的基因资源,拓宽栽培大豆相对狭窄的遗传背景,而且还可使大豆在产量、品质等性状上得到明显改善^[11]。自 Hinchee 等^[3]首次报道大豆转化成功以来,有关农杆菌介导的大豆遗传转化的研究已经很多,但是,长期以来农杆菌介导的大豆遗传转化效率一直维持在较低的水平,重复性较差,转化还远远没有常规化,大豆仍然是世界上公认的难转化作物之一。

目前大豆的转化方法有许多成功的报道,子叶节、胚轴、胚尖、幼胚、原生质体悬浮培养等转化体系相继建立,其中应用最为广泛的方法是子叶节法。大豆子叶节诱导不定芽产生再生植株的器官发生途径是由愈伤组织产生单极性的不定芽,然后再在芽的下方产生不定根,并在二者间分化出维管组织,形成完整的再生植株。对于转化来说,外源 DNA 可被导入分生组织或具有可再生的组织中。子叶节是大豆遗传转化经常采用的效率较好的外植体,因为该受体具有再生频率高,再生时间短等优点,但这种转化系统也存在转化频率低、重复性差,转化不经过愈伤组织的继代增殖容易产生嵌合体及依赖于特定的基因型和农杆菌菌株类型等问题,因此仍然需要对大豆转化的受体系统及其转化体系进行深入的研究。

该试验主要对农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化体系中的重要因素如基因型以及筛选压等进行了研究和改进,旨在提高农杆菌介导的不同基因

型大豆转化效率。结果表明,农杆菌介导的大豆转化存在一定程度基因型的特异性,基因型是影响大豆子叶节外植体诱导丛生芽数目的重要因素,这与以前的研究结果相一致^[5,12-13]。丛生芽诱导数目是直接影响转化效率的关键因素之一,在所选的 13 个大豆基因型中,山宁 14 是诱导丛生芽最多的品种,是测试品种中用于大豆转化的最佳基因型。

抗性苗的筛选依赖于最适宜的筛选压力,筛选压力过高往往得不到转化植株,筛选压力过低又会得到很多假阳性植株,这些都会影响到遗传转化的效率。不同报道中所使用筛选压的剂量不同,这可能由于不同大豆基因型对于筛选压的敏感度不同,因此选择合适的筛选压对成功进行遗传转化具有至关重要的作用^[14-15],在采用新品种做转化时应先探索筛选剂对于试验的影响。通过研究山宁 14 子叶节外植体对不同筛选剂的耐受性和敏感性发现,在草丁膦筛选压下,山宁 14 子叶节外植体对草丁膦的敏感度过高,外植体易褐化,因此不适宜用作此品种的转化筛选;而在潮霉素筛选压下,潮霉素对子叶节外植体的生长抑制程度适中,再生植株的频率较高,3 ~ 8 mg·L⁻¹ 的潮霉素梯度筛选既有利于抗性丛生芽的生长,又可以有效的克服转化过程中出现的假阳性问题。利用优化后的农杆菌转化体系,对获得的抗性苗进行 *GUS* 基因的表达检测和分子鉴定,结果证明,外源的 *GUS* 基因已经插入到转基因植株的基因组中,转化效率达到 3.2%。

参考文献

- [1] 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.)
- [2] 王振华, 杨德光, 张辉, 等. 大豆遗传转化技术在转基因大豆研究中的应用[J]. 生物技术通报, 2010(10): 60-66. (Wang Z H, Yang D G, Zhang H, et al. Research progress of transgene method in transgenic soybean(*Glycine max*) [J]. Biotechnology Bulletin, 2010(10): 60-66.)
- [3] Hinchey M A W, Connor-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.
- [4] 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.)
- [5] Somers D A, Samac D A, Olhoft P M. Recent advances in legume transformation[J]. Plant Physiology, 2003, 131: 892-899.
- [6] 刘海坤, 卫志明. 一种大豆成熟种子的消毒方法[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(3): 260-261. (Liu H K, Wei Z M. A method for sterilizing mature seeds of soybean[J]. Plant Physiology Communications, 2002, 38(3): 260-261.)
- [7] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. *GUS* fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. EMBO Journal, 1987, 6: 3901-3907.
- [8] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 438-440. (Wang G L, Fang H J. Plant gene engineering[M]. Beijing: Science Press, 2009: 438-440.)
- [9] 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, 216(5): 723-735.
- [10] 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.
- [11] 马丽萍, 张辉. 一种快速、高效的大豆农杆菌转化技术[J]. 中国农业科学, 2008, 41(3): 661-668. (Ma L P, Zhang H. A fast and high efficient technique for *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean[J]. Scientia Agriculture Sinica, 2008, 41(3): 661-668.)
- [12] Bailey M A, Boerma H R, Parrott W A. Inheritance of tumorformation in response to *Agrobacterium tumefaciens* in soybean[J]. Crop Science, 1994, 34: 514-519.
- [13] Mauro A O, Pfeiffer T W, Collins G B. Inheritance of soybean susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and its relationship to transformation[J]. Crop Science, 1995, 35: 1152-1156.
- [14] Margie M P, Shou H X, Guo Z B, et al. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant[J]. Euphytica, 2004, 136: 167-179.
- [15] 叶美, 张敏, 杨素欣, 等. 大豆成熟种子胚尖基因枪法转化体系的优化[J]. 大豆科学, 2011, 30(1): 20-23. (Ye M, Zhang M, Yang S X, et al. Optimization of biolistics transformation of embryonic tips of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] mature seeds[J]. Soybean Science, 2011, 30(1): 20-23.)

(上接第 166 页)

- [2] 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. (Wang G L, Fang H J. Plant genetic engineering [M]. Beijing: Science Press, 1998.)
- [3] 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.)
- [4] 李永光, 黄文佳, 周失, 等. 大豆对草丁膦敏感性研究[J]. 大豆科学, 2011, 30(3): 749-756. (Li Y G, Huang W J, Zhou S, et al. Sensitivity of soybean to herbicide glufosinate [J]. Soybean Science, 2011, 30(3): 749-756.)
- [5] Jefferson R. Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system [J]. Plant Molecular Biology Reports, 1987, 5: 387-405.
- [6] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 2001.
- [7] 薛仁镐, 谢宏峰. 利用改良的草丁膦筛选系统快速而有效筛选转基因大豆[J]. 大豆科学, 2006, 25(4): 373-378. (Xue R G, Xie H F. Rapid and efficient selection for transgenic soybean plants with the improved glufosinate selection system[J]. Soybean Science, 2006, 25(4): 373-378.)
- [8] Butaye K M J, Cammue B P A, Delaur S L, et al. Approaches to minimize variation of transgene expression in plants[J]. Molecular Breeding, 2005, 16: 79-91.
- [9] 孙磊, 韩俊友, 李宏宇. 大豆再生植株抗草铵膦的筛选方法研究[J]. 大豆科学, 2010, 29(6): 1019-1023. (Sun L, Han J Y, Li H Y. Comparison on methods screening of transgenic soybean resistant to glufosinate [J]. Soybean Science, 2010, 29(6): 1019-1023.)
- [10] Zeng P, Vадnais DA, Zhang Z, et al. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] [J]. Plant Cell Reports, 2003, 22: 478-482.