

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

杨 喆^{1,2}, 唐晓飞¹, 张 颖¹, 董兴月¹, 王凤义², 刘丽君¹

(1. 黑龙江省农业科学院 大豆研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:以黑农 46、黑农 53 和黑农 56 的子叶节为转化受体, 对农杆菌介导大豆子叶节遗传转化中的 6-BA 浓度、草丁膦浓度、侵染时间、共培养时间以及伸长培养基进行筛选, 确定适合不同基因型的最佳转化条件。结果表明: 黑农 46、黑农 53 和黑农 56 的最佳 6-BA 诱导浓度分别为 1.7、1.6 和 1.7 mg·L⁻¹; 最佳草丁膦筛选浓度分别为 2.0、3.0 和 2.0 mg·L⁻¹; 同时确定了侵染时间、共培养时间和伸长培养基类型的最佳组合是侵染时间 25 min、共培养时间 3 d 和 III 型伸长培养基。

关键词:大豆; 不同基因型; 农杆菌介导; 遗传转化条件

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2012)02-0188-05

Optimization on Genetic Transformation Conditions of *Agrobacterium*-mediated Cotyledonary-nodes from Different Genotype Soybeans

YANG Zhe¹, TANG Xiao-fei¹, ZHANG Ying¹, DONG Xing-yue¹, WANG Feng-yi², LIU Li-jun¹

(1. Soybean Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086; 2. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: Cotyledonary-nodes of Heinnong 46, Heinnong 53 and Heinnong 56 were used as transformation receptors. Culture conditions including 6-BA concentration, glufosinate concentration, infection time, co-culture time and type of elongation medium were screened, in order to find the optimal conditions for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation from different soybean genotypes. Result showed the optimal 6-BA induction concentrations for Heinnong 46, Heinnong 53 and Heinnong 56 were 1.7, 1.6 and 1.7 mg·L⁻¹, respectively; the optimal concentrations of glufosinate for Heinnong 46, Heinnong 53 and Heinnong 56 were 2.0, 3.0, and 2.0 mg·L⁻¹, respectively; the optimal combination of infection time, co-culture time and type of elongation medium was infection time 25 min, co-culture time 3 d and type III of elongation medium.

Key words: Soybean; Different genotype; *Agrobacterium*-mediated; Conditions for genetic transformation

大豆子叶节是诸多农杆菌介导的大豆遗传转化研究中最成功的受体材料^[1-2], 但是由于大豆品种繁多、基因型复杂, 很难使遗传转化各阶段所需的条件相一致, 因此研究适合不同大豆基因型的最佳转化条件是转化能否成功的关键^[3-5]。段莹莹等^[6]研究了农杆菌介导的大豆子叶节转化方法, 对筛选剂浓度、大豆苗龄、乙酰丁香酮浓度和共培养时间等影响转化效率的因素进行优化。赵晓雯等^[7]研究了共培养 pH 值、负压处理时间、共培养时间和预培养时间对农杆菌介导遗传转化效率的影响, 对这 4 个影响因素进行了优化; 同时优化了 6-BA 浓度和筛选剂浓度。王凤敏等^[8]在农杆菌介导的遗传转化的影响因素研究中确定了芽诱导的最适 6-BA 浓度和最适的草丁膦筛选浓度。该研究针

对不同基因型大豆子叶节丛生芽在遗传转化不同时期所需要的最适合生长条件进行研究, 对激素浓度、筛选剂浓度、侵染时间、共培养时间以及伸长培养基类型等影响转化效率的因素进行了优化, 提高了大豆子叶节转化法的转化效率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 黑龙江省主栽大豆品种黑农 46、黑农 53 和黑农 56, 由黑龙江省农科院大豆所育种二室提供。

1.1.2 菌株和质粒 农杆菌菌株为 G3101, 由实验室保存。质粒含有除草剂抗性的 *Bar* 基因, 为筛选标记基因, 由实验室保存。

收稿日期: 2011-10-20

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项资助项目(2008ZX08004003-005)。

第一作者简介: 杨喆(1978-), 男, 在读博士, 研究方向为大豆遗传育种与植物生物技术。E-mail: yz78100@163.com。

通讯作者: 刘丽君(1958-), 女, 研究员, 从事大豆遗传育种工作。E-mail: nkyssbd@126.com。

1.1.3 培养基 大豆组织培养的 B5 和 MSB 培养基^[9-10]。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗的获得 挑取健康成熟饱满的大豆种子平铺于培养皿中,将培养皿放于干燥器中,同时将盛有次氯酸钠的烧杯放入干燥器中并加入浓盐酸,盖上干燥器盖子,通风厨中过夜,灭菌 16 ~ 18 h。消毒后将种子接种于种子萌发培养基(1/2MSB + 1.0 mg·L⁻¹6-BA + 2% Sucrose + 0.8% Agar, pH 5.8)中,培养 5 d,发芽待用。

1.2.2 农杆菌的侵染及共培养 选择发芽好的无菌苗剥去种皮,用刀片将下胚轴切断,保留 2 ~ 3 mm 下胚轴。从 2 片子叶中间纵切子叶,将 2 片子叶分开,并切去顶芽及侧芽,保留完整子叶,在子叶的腋窝处划几刀,注意不要切断。将上述切好的 30 ~ 40 个大豆子叶节放入 100 mL 三角瓶中,里面盛有预先活化好的农杆菌,进行侵染。将三角瓶放于水平摇床中,以 140 ~ 160 r·min⁻¹的转速慢摇。侵染完成后,倒掉瓶中的农杆菌液,用长镊子将子叶节以切口向下水平摆放在含有 25 mL 共培养培养基(B5 + 1.7 mg·L⁻¹6-BA + 0.1 mg·L⁻¹IBA + 乙酰丁香酮(1:100) + Na₂S₂O₃(1:1 000) + DTT(1:1 000) + L-半胱氨酸(1:1 000), pH 5.4)的 100 mL 三角瓶中,每瓶 10 ~ 12 个子叶节,然后将摆放好的培养基瓶放入纸箱中,置于 22℃ 室温中无光处暗培养。试验设计侵染时间 10、25 和 50 min, 共培养时间 2、3

和 5 d,考察对农杆菌侵染的影响。

1.2.3 6-BA 浓度对大豆子叶节丛生芽诱导率的影响 共培养后,以每瓶 6 个外植体接种于含有 40 mL 丛生芽诱导培养基(B5 + 6-BA + 0.1 mg·L⁻¹IBA + 4% Agar, pH 5.7)的 100 mL 三角瓶中。设 0.5、1.1、1.6、1.7、1.8 和 2.0 mg·L⁻¹6 个 6-BA 浓度,每个处理每个基因型 50 个外植体,3 次重复,培养 12 d 后记录丛生芽数量,研究不同基因型大豆品种的最适丛生芽诱导浓度,丛生芽诱导率 = 诱导丛生芽数量/浸染外植体数量 × 100%。

1.2.4 草丁膦筛选浓度的确定 将按 1.2.3 方法培养的大豆子叶节在无草丁膦的芽诱导培养基上培养 7 d 后转入含有草丁膦的芽诱导培养基中进行筛选培养。设 0、1、2、3、4 和 5 mg·L⁻¹共 6 个草丁膦浓度。每个处理每个基因型接种 50 个外植体,3 次重复。培养 12 d,记录存活的丛生芽数,研究不同基因型大豆品种的最适筛选浓度,丛生芽存活率 = 抗性丛生芽数量/侵染外植体数量 × 100%。

1.2.5 伸长培养基的选择 将获得的丛生芽放入不同的伸长培养基中培养,培养 12 d 后记录伸长芽数,试验设计了 3 种类型培养基(表 1),同时与侵染时间和共培养时间相组合设计了 3 因素正交试验(表 2),每个处理 50 个外植体,共 3 次重复,受体材料为黑农 46 的子叶节,研究丛生芽抗性伸长芽的最适培养条件,芽伸长率 = 伸长的抗性芽(>5 cm)数量/抗性丛生芽数量 × 100%。

表 1 伸长培养基类型
Table 1 Types of elongation medium

伸长培养基 Elongation medium	培养基组分 Component of medium
I	MsB + 30 g·L ⁻¹ 蔗糖 + 6.5 g·L ⁻¹ 琼脂 + 500 mg·L ⁻¹ 头孢氨苄 + 草丁膦 + 0.75 mg·L ⁻¹ 6-BA + 0.2 mg·L ⁻¹ IBA, pH 5.7
II	MsB + 30 g·L ⁻¹ 蔗糖 + 6.5 g·L ⁻¹ 琼脂 + 500 mg·L ⁻¹ 头孢氨苄 + 草丁膦 + 1 mg·L ⁻¹ 玉米素 + 1 mg·L ⁻¹ IAA + 100 mg·L ⁻¹ 脯氨酸 + 50 mg·L ⁻¹ 天冬氨酸, pH 5.7
III	B5 + 30 g·L ⁻¹ 蔗糖 + 6.5 g·L ⁻¹ 琼脂 + 500 mg·L ⁻¹ 头孢氨苄 + 草丁膦 + 0.75 mg·L ⁻¹ 6-BA + 0.2 mg·L ⁻¹ IBA, pH 5.7

表 2 正交试验因素水平表
Table 2 Factors and levels of the orthogonal test

水平 Level	因素 Factor		
	A	B	C
	侵染时间 Infection time/min	共培养时间 Co-culture time/day	伸长培养基类型 Type of elongation medium
1	10	2	I
2	25	3	II
3	50	5	III

1.3 数据分析

使用 Excel 2003 对试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 6-BA 浓度对大豆子叶节丛生芽诱导率的影响

由表 3 可知,随着 6-BA 浓度的增加 3 个基因型大豆品种的丛生芽诱导率均表现出先升高后降低

的趋势。将 3 个品种的试验数据进行新复极差法 (SSR 法) 分析,黑农 46 和黑农 56 在 6-BA 浓度为 $1.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时有最高的丛生芽诱导率,黑农 53 在 6-BA 浓度为 $1.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时有最高的丛生芽诱导率,因此,黑农 46 和黑农 56 的最佳 6-BA 诱导浓度为 $1.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,黑农 53 为 $1.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 3 不同激素浓度对不同基因型大豆子叶节丛生芽诱导率的影响

Table 3 Influence of 6-BA concentration to the ratio of shoots induction for different genotypes

6-BA 浓度 6-BA concentration/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	丛生芽诱导率 Induction ratio of shoots/%		
	黑农 46 Heinong 46	黑农 53 Heinong 53	黑农 56 Heinong 56
0.5	30.2D	30.1D	31.5D
1.1	43.8C	44.2C	43.3C
1.6	54.3B	77.6A	53.6B
1.7	76.6A	53.4B	77.2A
1.8	52.5B	52.2B	51.2B
2.0	42.8C	41.7C	42.0C

同列数值后不同大写字母代表在 1% 水平差异显著 ($\text{LSR}_{0.01} = 8.008$)。

Values within a column followed by different capital letters indicate the significant difference at the level of 1% ($\text{LSR}_{0.01} = 8.008$).

2.2 草丁膦浓度对大豆子叶节丛生芽存活率的影响

由图 1 可知,随着草丁膦浓度的增加,3 个基因型大豆品种的子叶节丛生芽存活率均表现出逐渐下降的趋势,而且 3 个基因型的分化芽均表现为褐化并逐渐枯萎。同样将 3 个品种的试验数据进行新复极差法 (SSR 法) 分析,黑农 46 和黑农 56 在草丁膦浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时丛生芽存活率最高,黑农 53 在草丁膦浓度为 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时丛生芽存活率最

高。因此,黑农 46 和黑农 56 的最佳草丁膦筛选浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,黑农 53 为 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3 不同因素对丛生芽伸长率的影响

在明确了丛生芽最适生长的 6-BA 和草丁膦浓度基础上,选择侵染时间、共培养时间和伸长培养基类型 3 个因素进行分析。从表 4 方差分析结果可以看出,3 个影响因素的主次顺序是侵染时间 > 共培养时间 > 伸长培养基类型。从丛生芽伸长率平均值可以看出 (表 5),各因素不同水平对芽伸长率影响大小顺序为: $A_2 > A_1 > A_3$, $B_2 > B_1 > B_3$, $C_3 > C_2 > C_1$ 。同时 A 因素的 3 个水平达极显著差异, B 因素和 C 因素的 3 个水平分别达显著差异 (表 4)。因此,在侵染 25 min、共培养 3 d 和使用 III 型伸长培养基时获得了最高抗性伸长芽率,因此 $A_2B_2C_3$ 为适合丛生芽伸长的最佳组合。

3 讨论

大豆是公认的难转化植物之一,每个大豆基因型都有适合其遗传转化的最佳条件,研究并确定这些条件是大豆组织培养工作的重点。任何成功的转化有赖于高效的再生系统,建立良好的大豆再生系统是实现遗传转化的先决条件。目前农杆菌介导法是大豆转基因方法中最为有效的方法^[11],但大豆的转化效率仍然很低。不同大豆基因型的转化效率是不同的,在农杆菌介导的大豆子叶节遗传转

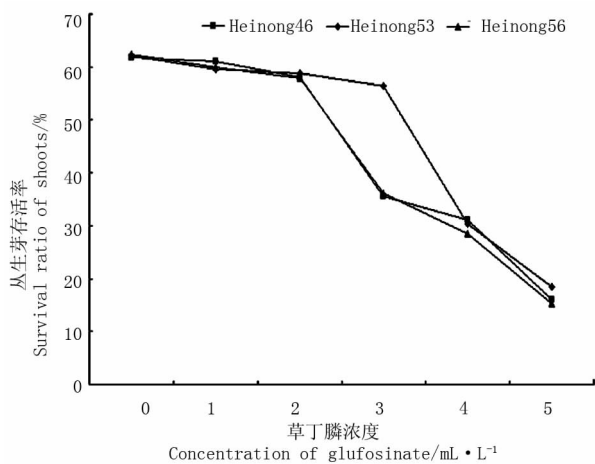


图 1 不同草丁膦浓度对不同基因型大豆子叶节丛生芽存活率的影响

Fig. 1 Influence of glufosinate concentration to the survival ratio of shoots for different genotypes

化过程中每个因素都会对大豆转化效率产生影响,因此在进行转化过程中要对这些因素进行优化^[12],针对不同基因型会获得不同的结果,最终目的是为了提高转化效率。该试验通过对已知的遗传转化体系进行研究,确定了黑农 46、黑农 53 和黑农 56 转化的最佳条件。

表 4 正交设计方差分析表
Table 4 Analysis of variance table for orthogonal test

因素 Factor	水平 Level			极差 R	自由度 DF	平方和 SS	均方 MS	F 值 F value
	1	2	3					
A 侵染时间 Infection time/min	105.3	106.6	107.6	18.9	2	602.71	301.35	103.8**
B 共培养时间 Co-culture time/d	151	139	110	11.3	2	245.37	122.68	42.26*
C 伸长培养基类型 Type of the elongation medium	94.3	105	133	8.5	2	131.10	65.55	22.58*
误差 Error					2	5.81	2.9	

* 和 ** 分别表示在 5% ($F_{0.05} = 19$) 水平和 1% ($F_{0.01} = 99$) 水平的差异显著性。
* and ** represent the significant difference at the level of 5% ($F_{0.05} = 19$) and 1% ($F_{0.01} = 99$), respectively.

表 5 三因素正交试验结果分析
Table 5 Analysis for 3 factors orthogonal test

处理 Treatment	A	B	C	芽伸长率 Ratio of elongation shoots/%
1	10	2	I	28.6C
2	10	3	II	39.2BC
3	10	5	III	37.5BC
4	25	2	II	45.6B
5	25	3	III	63.1A
6	25	5	I	42.3BC
7	50	2	III	32.4BC
8	50	3	I	36.7BC
9	50	5	II	25.2C

同列数字后大写字母表示在 1% ($LSR_{0.01} = 13.776$) 水平的差异显著性。

Values within a column followed by different capital letters represent significant difference at the level of 1% ($LSR_{0.01} = 13.776$).

大豆基因型差异是影响农杆菌介导大豆转化的重要因素,大豆子叶节丛生芽诱导分化体系受基因型的限制,筛选分化能力强的基因型是大豆遗传转化的先决条件,不同基因型大豆由于遗传背景与生理的差异导致诱导分化频率具有很大的差异^[13]。该研究结果表明,3 个大豆基因型的分化能力以黑农 46 最好,黑农 53 和黑农 56 次之,都可以用于遗传转化的研究。

激素浓度、筛选剂浓度、农杆菌侵染时间、共培养时间以及伸长培养基类型是转化过程中的重要因素。6-BA 被认为可刺激子叶节内源分裂素的产生,促使分生组织分裂并打破顶端优势,促使子叶节膨大及不定芽的形成。添加 6-BA 的萌发培养基上萌发的无菌苗比较幼嫩,这是因为 6-BA 刺激子叶节处潜在的分生细胞,使其不断分裂并打破顶端

优势,因此子叶节区居间分生组织旺盛生长,促使子叶节膨大增粗及以后不定芽的形成,对丛生芽分化有明显的促进作用^[12]。该研究表明 6-BA 在转化的各个阶段都起着重要的作用,其浓度高低直接决定了是否可以获得大量分化的丛生芽,以保证试验顺利进行。

草丁膦浓度对不同大豆基因型存活率的影响不同,能否通过草丁膦筛选是转化成功的关键,因此确定最佳草丁膦筛选浓度直接关系到可以获得抗性芽的数量^[14]。在以 *Bar* 基因为筛选标记基因的转化事件中,草丁膦浓度是成功获得抗性芽的关键,但是草丁膦的浓度不好掌握。该研究表明,随着草丁膦浓度的增加,抗性芽数量急剧减少,并且确定了不同大豆基因型筛选时的最佳草丁膦浓度。

侵染时间和共培养时间同样是决定转化的关键性因素,时间的长短决定了目的基因的插入位置和拷贝数。经过筛选剂筛选并获得大量子叶节丛生芽后,选择合适的伸长培养基类型进行丛生芽伸长是非常重要的,该研究选择了常用的 3 种类型伸长培养基对丛生芽进行培养,设计了 3 因素正交试验研究这 3 个因素的最佳组合,确定最佳农杆菌侵染时间和最佳共培养时间,从而保证了试验可以获得足够数量的子叶节,并选择最佳伸长培养基以获得足够数量的抗性伸长芽。

参考文献

[1] Paz M M, Shou H, Guo Z, et al. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant[J]. *Euphytica*, 2004, 136: 167-179.
[2] 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.)
- [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.)