

一种简便大豆原位转基因方法研究

郭兵福^{1,2}, 刘杰^{1,2}, 洪慧龙², 邱丽娟²

(1. 南昌大学 生命科学与食品工程学院, 江西 南昌 330031; 2. 中国农业科学院 作物科学研究所/国家农作物基因资源与遗传改良重大科学工程/农业部北京大豆生物学重点实验室, 北京 100081)

摘要:以萌发大豆幼苗顶芽为外植体,经纵切及农杆菌侵染后种植到大田中,转化植株用除草剂进行表型鉴定,存活植株进行PCR验证,并分析目的基因*EPSPS*在T₂代转基因植株中的遗传情况;总计获得草铵膦涂抹表型鉴定阳性T₀植株75株,草甘膦喷雾鉴定阳性T₁植株65个,PCR测序阳性T₁植株6个,PCR测序检测转化效率为0.14%;获得T₂代PCR阳性植株52个,初步证明目的基因*EPSPS*能在子代中遗传;该方法能有效解决基因型依赖及再生植株困难等问题,缩短转化周期,为根癌农杆菌阶段的大豆遗传转化体系的优化与改良提供了参考。

关键词:大豆;根癌农杆菌;顶芽;原位转化

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2012)03-0347-06

A Simple Soybean in Planta Transformation Method

GUO Bing-fu^{1,2}, LIU Jie^{1,2}, HONG Hui-long², QIU Li-juan²

(1. College of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang 330031, Jiangxi; 2. The National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement (NFCRI)/MOA Key Lab of Soybean Biology (Beijing), Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: In this paper, the terminal bud of germinated soybean seedlings were longitudinal cut and infected by *Agrobacterium* firstly, and then transplanted the seedlings into field. Eliminated the seedlings without branches on main stem, transformed plants leaves were painted or sprayed with 100 mg · L⁻¹ glufosinate, 3 days later observed leaves reaction and accounted for the resistant plant number. All alive plants were identified by PCR and analyzed the expression of *EPSPS* gene in T₂ generation. There were 75 and 65 plants with resistance to 100 mg · L⁻¹ glufosinate in T₀ and T₁ generation, respectively; 6 and 52 positive plants in T₀ and T₁ generation by sequencing the PCR product, respectively; the result showed that *EPSPS* gene could inherited in offspring. This transgenic method could short transformation cycle, enhance efficacy and provide reference for the optimization and improvement of *Agrobacterium* transformation.

Key words: Soybean; *Agrobacterium*; Epicotyl tip; In planta transformation

大豆是重要的油料作物和经济作物,是植物蛋白和油脂的主要来源,在我国人民饮食结构中占有重要的地位;也是重要的生物能源及工业原料,与固氮根瘤菌共生的作用机制在维系全球氮循环过程中起着重要的作用^[1],因此,大豆在改善人民的食物结构,满足对植物蛋白、油脂的需求,发展畜牧业、食品业及生物燃油等方面都具有十分重要的意义^[2]。2010年全世界大豆总产量为26 369.3万t,中国为1 520万t,仅占5.8%,因国内大豆生产无法满足市场需求,不得不大量从国外进口大豆。我国虽没有自主研发生产的商业化转基因大豆,但进口的大豆及其产品中,绝大多数含有转基因成分。因此,加强我国转基因大豆的自主研发能力,创制高

产优质的大豆转基因新品种,构建高效、稳定的遗传转化体系对实现我国大豆市场的自供自给,扭转市场需求大量依赖进口这一局面具有重要的意义^[3]。自1988年Hinchee和MaCabe等分别用农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化法和基因枪法成功获得转基因植株以来^[4-5],大豆转基因技术发展迅猛,但突出的研究进展较少;经典的农杆菌介导大豆子叶节遗传转化体系多以Hinchee等报道的转化方法为基础,转化步骤繁琐、组织培养无菌操作要求严格,转化效率低且容易获得嵌合体,1994年Townsend等^[6]用该方法得到品种Pioneer 941的转基因植株;徐香玲等^[7]将*Bt*基因和菜豆几丁质酶基因导入大豆,得到外源基因成功整合到大豆基因组

收稿日期:2012-03-30

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX08004-001)。

第一作者简介:郭兵福(1985-),男,在读硕士,研究方向为大豆转基因。E-mail:gbfhu@163.com。

通讯作者:邱丽娟(1963-),女,研究员,博士生导师,主要从事大豆基因资源挖掘与利用研究工作。E-mail:qiu_lijuan@263.net。

上的转基因材料。在此之后科学工作者尝试了不同的大豆转基因体系,如根癌农杆菌介导的胚尖转化体系^[8-9]、根癌农杆菌介导大豆体细胞胚转化体系^[10-11]、基因枪转化体系^[12-13]等,但遗传转化效率低的难题始终没得到解决,究其原因大豆遗传转化基因型依赖严重,再生植株困难。

原位转化技术(in planta transformation)是在亲代上进行遗传转化而从后代中筛选转基因材料的一种基因转移方法,其最根本的特点是不需要通过组织培养或细胞培养等手段实现植物在活体条件下的转基因^[14],能克服遗传转化组培再生植株困难、基因型依赖严重及农杆菌与创伤部位的感染细胞易产生褐化反应,导致侵染部位褐化或者坏死等问题^[15],原位遗传转化方法最早是由 Feldmann 等提出来的^[16],其用农杆菌侵染萌发的拟南芥种子,从后代材料中筛选获得转基因植株;之后原位遗传转化研究方法得到不断的发展和改良,在玉米、棉花、小萝卜、小麦、拟南芥等作物中得到广泛的应用和发展。大豆原位遗传转化技术相对拟南芥等模式植物研究较少,主要的大豆原位转化方法有萌发种子的农杆菌侵染法^[17]、电击分生组织法^[18]、花粉管通道法^[19-20]及浸花法等^[21]。无论是通过组织培养途径的大豆遗传转化方法还是花粉管通道法等大豆原位遗传转化方法都具有操作繁琐、实验技术性强等缺陷,特别是农杆菌介导的子叶节、胚尖和体细胞胚遗传转化体系具有转化周期长、基因型依赖严重、操作繁琐、无菌要求严格等缺点。该研究在借鉴前人以大豆子叶节、胚尖为转化外植体的基础上,用大豆幼苗顶芽为外植体,拟通过简单的操作及侵染实现农杆菌对大豆的原位遗传转化,构建一种基因型依赖性小且不需要无菌操作和组织培养的大豆原位遗传转化体系。该方法简单便捷、易于掌握,转化周期短,为进一步大范围开展农杆菌介导的大豆遗传转化构建了新的技术平台。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 受体大豆品种 选用2个大豆栽培品种中黄10号和中豆32作为受体,中黄10号由中国农业科学院作物科学研究所大豆基因资源挖掘与利用实验室提供;中豆32由中国农业科学院油料作物

研究所周新安研究员提供。

1.1.2 载体和菌株 选用的载体为 pCambia3300-GR02, 含有除草剂草甘膦抗性基因 *EPSPS* 及筛选报告基因 *Bar*, 由中国农业科学院作物科学研究所金龙国副研究员构建,农杆菌工程菌株为 LBA4404(图1)。

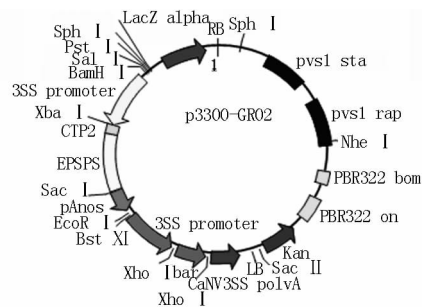


图1 p3300-GR02 载体图

Fig. 1 Scheme of p3300-GR02 vector

1.1.3 抗生素与除草剂 细菌筛选抗生素卡那霉素(Kanamycin)购自北京拜尔迪公司,利福平(Rifampicin)、链霉素(Streptomycin)购自Sigma公司;除草剂草铵膦由拜耳公司生产,有效剂量是 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,由东北农业大学陶波教授提供;草甘膦的有效剂量为41%,购自北京先正达公司。

1.2 原位转化方法

1.2.1 工程菌液的准备 用接种环从LB培养平板上(Rif^+ 、 Kan^+ 、 Str^+)挑取含有 p3300-GR02 质粒的农杆菌单克隆接种于5 mL YEP 液体培养基中(Rif^+ 、 Kan^+ 、 Str^+), 28°C 、 $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下振荡过夜培养活化,再以1/100的比例转至新鲜的YEP培养基中进行第2次活化,直至 $\text{OD}_{600} = 0.6 \sim 1.0$ 备用。

1.2.2 转化方法 挑选饱满成熟无病害的大豆种子,用自来水浸泡15~30 min使种子初步浸胀后在滤纸上萌发2~4 d,待下胚轴伸长至2~3 cm时制备外植体。用无菌手术刀片(上海联辉医疗用品有限公司)的刀尖纵切萌发幼苗的顶芽制备伤口,伤口深2~3 mm;制备伤口时尽量将刚萌动的2片真叶从中间切开。用无菌注射器在伤口滴加活化的农杆菌菌液,并浸泡10~15 min后将外植体移栽到大田、温室或者盆栽中种植,注意前期的保湿和温度控制。待移栽到土壤中的幼苗第3片三出复叶完全展开时,淘汰主茎没有分枝的植株,保留主茎有分枝的植株。

1.3 除草剂抗性鉴定

1.3.1 草铵膦抗性鉴定 对主茎有分枝植株完全

展开的第3片三出复叶及其以上的叶片进行草铵膦抗性鉴定;涂抹浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,3 d后观察叶片的颜色变化,统计抗性植株数。

1.3.2 草甘膦抗性鉴定 T_0 代收获转基因种子经整理播种于试验田中,30 cm行距,10 cm株距双粒点播,播种的 T_1 代转基因材料第1片三出复叶完全展开后,对植株进行草甘膦田间除草剂抗性鉴定,喷雾浓度为 $300\text{ mL}\cdot\text{hm}^{-2}$,30 d后统计抗性植株数。

1.4 转基因植株的PCR鉴定

1.4.1 DNA的提取 用Genome DNA purification kit试剂盒提取大豆基因组DNA,取50~100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 叶片于2.0 mL离心管内,粉碎机粉碎,加400 μL Lysis Solution、65℃水浴20 min;加60 μL 氯仿抽提,上下颠倒3~5次,12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心2 min,转移上清液至新的离心管内;加800 μL 稀释10倍的Precipitation Solution,充分混合10 min后12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心2 min,弃上清;加入100 μL NaCl Solution溶液溶解DNA,充分溶解后加300 μL 冰乙醇,−20℃过夜抽提,12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心4 min,弃上清;用70%乙醇再抽提1次,晾干后用100 μL 无菌水溶解DNA备用。

1.4.2 PCR分析 用EPSPS基因特异性引物RR2F和RR2R对草甘膦喷药鉴定存活植株进行PCR分析,上游引物RR2F序列为5'-GATTGATGT-TCCAGGTGATCCAT-3',下游引物RR2R序列为5'-ACCGTTTGCGACAGCAGAAAG-3',扩增片段大小379 bp; PCR反应体系为20 μL (大豆基因组DNA

50 ng, dNTP 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 10×Taq Buffer 2 μL , EX-Taq 2 U,上下游引物1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,补水至20 μL)。PCR反应条件:95℃,4 min;进入循环,95℃,30 s;60℃,30 s;72℃,30 s;35个循环,72℃,10 min;4℃保存。PCR扩增结束后,1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR结果。切胶回收PCR阳性条带,用AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒回收目的DNA片段,连接入pMD18-T载体,连接步骤如下:pMD18-T载体及Solution I溶液冰上冻融;取1个200 μL 离心管,分别加入5 μL Solution I、4 μL 回收的DNA、1 μL pMD18-T Vector,16℃过夜连接;采用冻融法将连接产物转化入大肠杆菌:从低温冰箱中取出大肠杆菌感受态细胞Top 10放冰上融化;将感受态与DNA按10:1的比例均匀混合;42℃热激90 s再冰浴3 min;加入LB液体培养基800 μL ,37℃、200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养1 h;收集菌体均匀涂布于抗性LB平板上,37℃过夜培养;挑单克隆活化,菌液PCR检测后选阳性单克隆菌液送测序,测序结果经DNA star拼接后进行比对。

2 结果与分析

2.1 转基因 T_0 代植株的获得

用该研究建立的技术体系,以含有pCam-bia3300-GR02载体农杆菌侵染纵切后较大的幼苗,侵染幼苗4 300株,获得主茎有分枝植株1 237株;主茎有分枝植株平均得率为28.8%,其中中豆32主茎有分枝植株得率为38.7%,明显高于中黄10号的23.4%(表1)。

表1 不同受体对主茎有分枝植株获得的影响

Table 1 Effect of different receptor genotypes on getting main stem branched plants

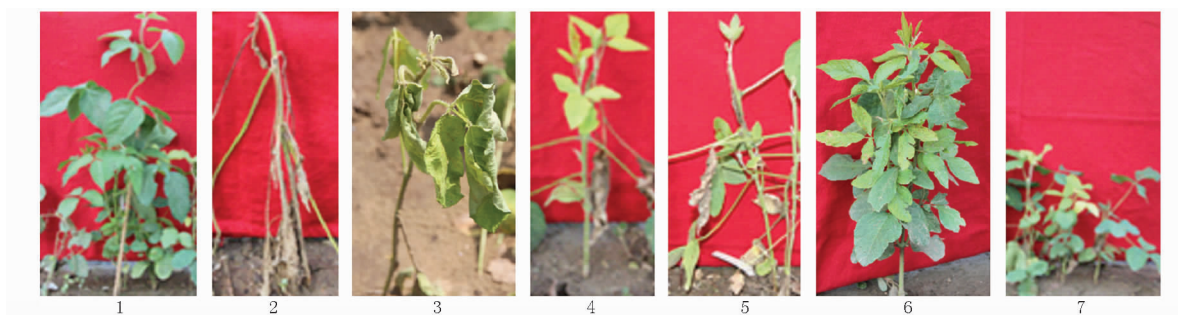
载体	受体	侵染幼苗	主茎分枝数	主茎分枝得率
Vector	Receptor	Infected seeding No.	Main stem branches No.	Efficiency of main stem branches/%
p3300-RR2y	中黄10	2800	656	23.4
	中豆32	1500	581	38.7
共计 Total	—	4300	1237	28.8

2.2 T_0 代植株草铵膦抗性鉴定

播种的 T_0 代主茎有分枝转基因材料的第3片三出复叶完全展开后,从第3片三出复叶往上,逐叶涂抹 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的草铵膦稀释液,3 d后统计叶片表型鉴定结果,经初步鉴定获得含草铵膦抗性叶片的主茎有分枝植株75株。

2.3 T_1 代植株田间播种及草甘膦抗性鉴定

总计草甘膦喷雾处理5 400株p3300-GR02-ZH10/ZD32 T_1 代植株,存活65株;大豆植株对草甘膦的药害症状具有表型多样性,主要有单株枯死、叶片卷曲、新叶变黄、生长点坏死、株型改变、株高抑制等药害症状(图2)。



1:抗性植株;2:枯死植株;3:叶片卷曲;4:新叶变黄;5:生长点坏死;6:株型改变;7:株高抑制

1: Resistant plants; 2: Dead plants; 3: Leaves curl; 4: New leaves turn yellow; 5: Growing point necrotic; 6: Plant type change; 7: Inhibition of plant height

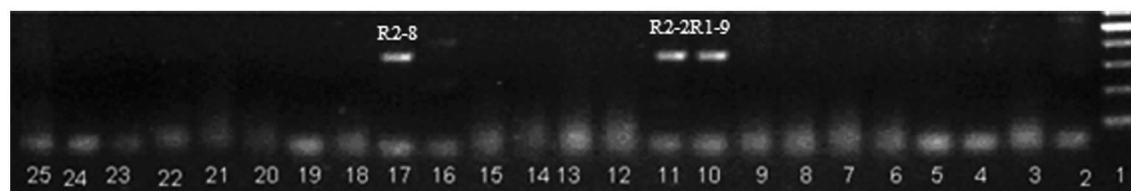
图2 草甘膦药害症状

Fig. 2 Glyphosate phytotoxicity symptoms

2.4 T₁代草甘膦抗性鉴定存活植株的PCR分析

用RR2F、RR2R引物对65株经草甘膦喷雾鉴定存活植株进行PCR分析,获得PCR-阳性植株7株,切胶回收PCR目的片段,经测序分析获得PCR

测序阳性转基因植株6株,除R2-2外,PCR检测结果与测序的结果完全吻合,PCR测序转化效率为0.14%,初步证明除草剂抗性基因*EPSPS*已转化到大豆基因组中(图3)。



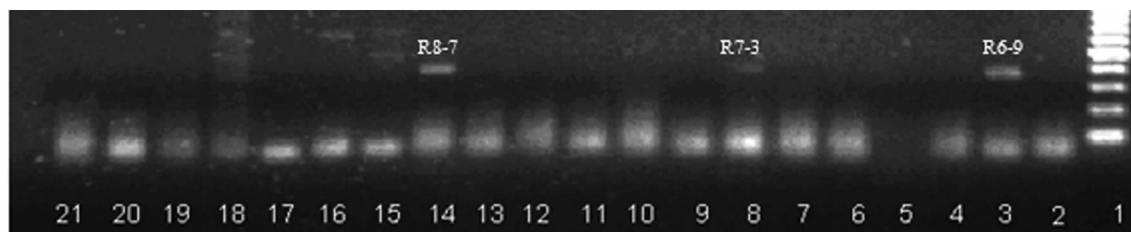
1: 100 bp ladder; 2-10: R1-1-R1-9; 11-21: R2-2-R2-12; 22-23: R3-1-R3-2; 24: 水对照; 25: 阴性对照

1: 100 bp ladder; 2-10: R1-1-R1-9; 11-21: R2-2-R2-12; 22-23: R3-1-R3-2; 24: Water control; 25: Negative control



1: 100 bp ladder; 2-23: R4-1-R6-7; 24: 水对照; 25: 阴性对照

1: 100 bp ladder; 2-23: R4-1-R6-7; 24: Water control; 25: Negative control



1: 100 bp ladder; 2-5: R6-8-R6-11; 6-8: R7-1-7-3; 9-19: R8-2-R8-12; 20: 水对照; 21: 阴性对照

1: 100 bp ladder; 2-5: R6-8-R6-11; 6-8: 24: R7-1-7-3; 9-19: R8-2-R8-12; 20: Water control; 21: Negative control

图3 T₁代抗性材料PCR-测序检测

Fig. 3 The PCR-sequencing detection of glyphosate resistance in T₁ plants

2.5 T₂材料的PCR分析

用RR2特异性引物对T₂代植株进行PCR分析,总计对3个株系的99株T₂代材料进行PCR鉴定,获得PCR阳性植株52株,经 χ^2 检测,R6-7 T₂

代材料PCR阳性与阴性的比例符合3:1的孟德尔遗传分离比例(表2,图4),证明除草剂抗性基因*EPSPS*能够在后代中遗传且R6-7可能为单拷贝插入。

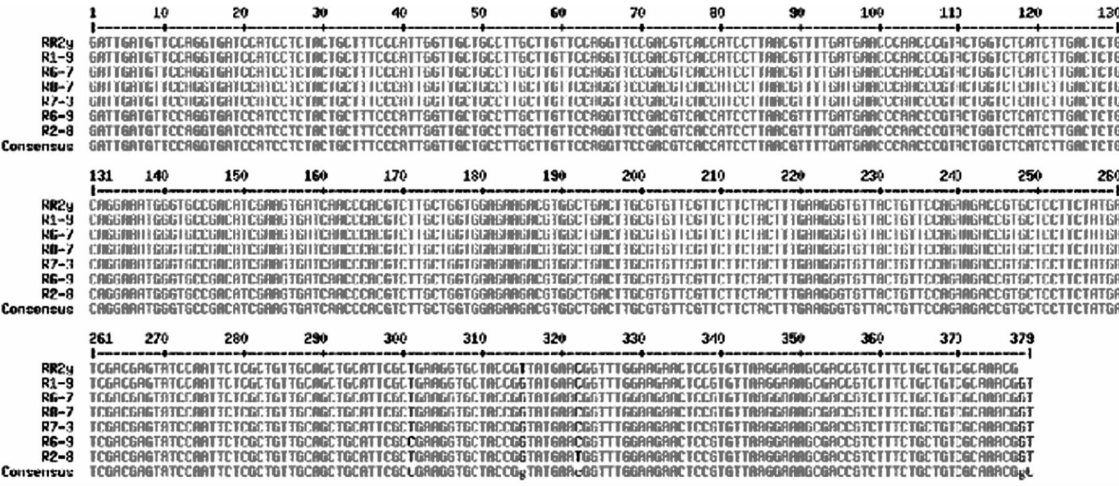


图3 T₁代抗性材料 PCR-测序检测

Fig. 3 The PCR-sequencing detection of glyphosate resistance in T₁ plants

表2 T₂代材料的 PCR 检测

Table 2 The PCR detection of T₂ transgenic plants

载体 Vector	受体 Receptor	T ₁	检测株数 Detection No.	T ₂		$\chi^2(3:1)$	P(3:1)
				PCR positive	PCR negative		
GR02	中黄 10	R2-8	52	23	29	26.256	2.990×10^{-7}
GR02	中黄 10	R6-7	36	26	10	0.148	0.700
GR02	中豆 32	R8-7	11	3	7	10.800	0.001

$\chi^2_{0.05} = 3.841, \chi^2 < \chi^2_{0.05}$ 符合 3:1; $P > 0.05$ 符合 3:1。



1~19、26~32:R6~7 子代 PCR 检测阳性植株; 20~21、33~34: R6~7 子代 PCR 检测阴性植株; 22、35:水对照; 23、36 受体对照; 24、37:阳性对照; 25、38:100 bp Marker
1-19、26-32:PCR detection positive plants of R6-7 offspring plants; 20-21、33-34:PCR detection negative plants of R6-7 offspring plants; 22、35:Water control; 23、36:Negative control; 24、37:Positive control; 25、38:100 bp Marker

图4 R6-7 T₂代植株 PCR 分子检测

Fig. 4 The PCR detection of glyphosate resistance in T₂ plants

3 讨论

自 1988 年第一例转基因大豆成功获得以来,大豆的转基因体系多以 Hinchee 等的农杆菌介导子叶节体系为基础,外植体多选用大豆胚尖^[8-9,22]、子叶节^[23]及幼胚^[24]等。农杆菌介导的大豆子叶节、胚尖及体细胞胚转化体系以组织培养为基础,经器官发生途径或体胚诱导途径获得再生植株,一般情况下从制备外植体至获得转基因植株的周期为 6 个月左右,具有操作步骤复杂、无菌要求严格,周期长且基因型依赖严重等缺点;该研究建立的原位转化方法避免了组织培养和诱导再生植株的繁琐过程,使转化周期接近于受体材料的生育期,节省了时间和

劳动力,缩短了转化周期。同时,该转化方法不需要乙酰丁香酮、6-BA、GA₃、MES、Carbenicillin、光照培养箱、药品储存柜等昂贵的转基因试剂和耗材,可节约科研经费。该研究方法虽然存在一定程度上的农杆菌侵染基因型特异性,但避免了植株再生的问题,供试的 2 个受体基因型都成功获得转基因植株,一定程度上能够解决或缓解基因型依赖的问题。与常用的大豆原位遗传转化方法 Floral dip 法^[25]、花粉管通道法^[26]相比,该方法外植体制备简单,无需对花蕾进行选择和处理,不需要构建线性转化元件,技术难度相对较小。

该方法应用时需考虑如下因素:(1)制备外植体时,需要提高纵切的准确度,增加获得双主茎植

株的频率;(2)转化 T_0 代植株是嵌合体,应加大 T_0 植株表型筛选的力度,从第 3 片三出复叶开始逐叶往上进行表型鉴定,淘汰假阳性植株、节茎及其对应的种子,减小后期纯合植株筛选的工作量;(3)因 T_0 代能获得大量的转化植株和种子,所以构建载体时,应考虑选择表型明显或便于筛选的标记基因,如除草剂抗性基因,花色基因等,以提高工作效率。

应用该研究方法,共获得 PCR-测序阳性 T_1 植株 6 株,阳性率为 0.14%;通过对 3 个株系 T_2 代材料进行分子鉴定,初步证明目的基因 *EPSPS* 能够在子代中遗传,说明该研究建立的原位转化体系应用于大豆遗传转化具有可行性。同时充分地利用了广谱型除草剂草铵膦触杀不传导、作用时间短及草甘膦广谱抗生,内吸传统等优点,为从嵌合原位转化植株中快速筛选得到有抗性的转基因材料提供了可能,为遗传转化体系的优化特别是原位遗传转化体系的改良提供了参考。

致谢:感谢北大未名凯拓公司夏勉博士对实验方法和技术给予的指导!

参考文献

- [1] Kereszt A, Li D G, Arife I, et al. *Rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology[J]. *Nature Protocols*, 2007, 2:948-952.
- [2] 吴颖,王萍,刘海学,等.农杆菌介导的大豆遗传转化[J].内蒙古民族大学学报(自然科学版),2003,18(3):235-240. (Wu Y, Wang P, Liu H X, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean[J]. *Journal of Inner Mongolia University for Nationalities*, 2003, 18(3):235-240.)
- [3] 强胜,宋小玲,戴伟明.抗除草剂转基因作物面临的机遇与挑战及其发展策略[J].农业生物技术学报,2010,18(1):114-125. (Qing S, Song X L, Dai W M. The opportunity and challenge faced by transgenic herbicide-resistant crops and their development strategy[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2010, 18(1):114-125.)
- [4] Hinchey M A W, Connor D D, Newen C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated genetic transfer[J]. *Biotechnology*, 1988, 6:915-922.
- [5] Macabe D E, Swain W F, Martinen B J, et al. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration[J]. *Biotechnology*, 1988, 6:923-929.
- [6] Townsend J A, Thomas L A. An improved method of *Agrobacterium*-mediated transformation of cultured soybean cells; USA, WO94/02620[P]. 1993.
- [7] 徐香玲,高晶,刘伟华,等. Ti 质粒介导的 Bt δ -内毒素蛋白基因转化大豆的初步研究[J]. 大豆科学, 1997, 16(1):6-11. (Xu X L, Gao J, Liu W H, et al. Studies on transferring Bt δ -endotoxin gene into soybean with Ti-plasmid pmrml[J]. *Soybean Science*, 1997, 16(1):6-11.)
- [8] 党尉,卫志明.根瘤农杆菌介导的高效大豆遗传转化体系的建立[J]. 分子细胞生物学报, 2007, 40(3):185-195. (Dang W, Wei Z M. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2007, 40(3):185-195.)
- [9] Dang W, Wei Z M. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation for soybean for expression of binary insect resistant genes [J]. *Plant Science*, 2007, 173:381-389.
- [10] 王晓春,王罡,王萍,等.农杆菌介导法转化大豆体细胞胚获得转基因植株[J]. 中国农学通报, 2006, 22(4):40-43. (Wang X C, Wang G, Wang P, et al. Genetic transformation of somatic embryos via *Agrobacterium tumefaciens* in soybean [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2006, 22(4):40-43.)
- [11] 王晓春,刘尚前,季静,等.农杆菌介导的大豆体细胞胚遗传转化体系的优化研究[J]. 大豆科学, 2006, 25(3):200-204. (Wang X C, Liu S Q, Ji J, et al. Optimization of genetic transformation system in somatic embryos of soybean mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Soybean Science*, 2006, 25(3):200-204.)
- [11] 王萍,郭永来,高世庆,等.基因枪法将 *GmDREB* 基因导入大豆的研究[J]. 大豆科学, 2007, 26(3):315-318. (Wang P, Guo Y L, Gao S Q, et al. Transformation *GmDREB* gene into soybean via particle bombardment [J]. *Soybean Science*, 2007, 26(3):315-318.)
- [13] Yang S H, Li G L, Li M, et al. Transgenic soybean with low phytate content constructed by *Agrobacterium* transformation and pollen-tube pathway[J]. *Euphytica*, 2011, 177:375-382.
- [14] Li S L, Redei G P. Estimate of mutation rate in autogamous diploids[J]. *Radiation Botany*, 1969, 9(2):125-131.
- [15] Mysore K S, Kumar C T R, Gelvin S B. *Arabidopsis* ecotypes and mutants that are recalcitrant to *Agrobacterium* root transformation are susceptible to germ-line transformation[J]. *The Plant Journal*, 2000, 21(1):9-16.
- [16] Feldman K A, Marks M D. *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: A non-tissue culture approach[J]. *Molecular and General Genetics*, 1987, 208:1-9.
- [17] Chee P P, Fober K A, Slightom J L, et al. Transformation of Soybean (*Glycine max*) by infecting germinating seeds with *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Physiology*, 1989, 91:1212-1218.
- [18] Chowrira G M, Akella V, Fuerst P E, et al. Transgenic grain legumes obtained by in planta electroporation-mediated gene transfer [J]. *Molecular Biotechnology*, 1996, 5(2):85-96.

(下转第 357 页)

- Journal of Hebei Agricultural University, 2008, 30(4): 7-13.)
- [7] 朱红林, 沙爱华, 符秀梅, 等. 转录调控基因 *GmLEC1* 转化大豆及转化方法的比较[J]. 大豆科学, 2010, 29(1): 8-12. (Zhu H L, Sha A H, Fu X M, et al. Cloning and transformation study of transcription factor *GmLEC1* in soybean [J]. Soybean Science, 2010, 29(1): 8-12.)
- [8] 李海燕, 武小霞, 刘森, 等. 大豆子叶节、胚尖再生植株的研究[J]. 大豆科学, 2007, 26(5): 709-712. (Li H Y, Wu X X, Liu M, et al. Plant regeneration from cotyledonary nodes and embryonic tips of soybean [J]. Soybean Science, 2007, 26(5): 709-712.)
- [9] 刘栋, 石强, 李鹏丽, 等. 利用 *GUS* 基因瞬时表达对大豆子叶节和胚尖转化方法的比较及优化[J]. 生物学通报, 2008, 43(12): 35-39. (Liu D, Shi Q, Li P L, et al. Comparison and optimization of soybean cotyledonary node and the embryonic tips transformation method using the transient expression of *GUS* gene [J]. Bulletin of Biology, 2008, 43(12): 35-39.)
- [10] 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. (Lin 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 Edition), 2005, 23(2): 138-142.)
- [11] 闫帆, 孙昕, 翟莹, 等. 6-BA 浓度及基因型对大豆胚尖诱导丛生芽的影响[J]. 大豆科学, 2011, 30(1): 29-32. (Yan F, Sun X, Zhai Y, et al. Effect of different 6-BA concentration and genotypes on shoots induced from embryonic tips [J]. Soybean Science, 2011, 30(1): 29-32.)
- [12] 邱承祥, 武天龙. 6-BA 对大豆茎尖诱导再生植株的研究[J]. 大豆科学, 2003, 22(1): 32-35. (Qiu C X, Wu T L. Study on 6-BA to the regeneration of tip shoot of soybean [J]. Soybean Science, 2003, 22(1): 32-35.)
- [13] 张艳, 满为群, 南相日, 等. “黑农 51”子叶节和胚尖再生体系的建立及优化[J]. 中国农学通报, 2011, 27(9): 148-151. (Zhang Y, Man W Q, Nan X R, et al. Establishment and improvement on regeneration systems of ‘Heinong51’ cotyledonary nodes and embryonic tips [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(9): 148-151.)
- [14] 孙文丽, 刘昱辉, 吴元华, 等. 大豆胚芽尖再生体系的建立及转基因初步研究[J]. 湖北农业科学, 2008, 47(6): 615-618. (Sun W L, Liu Y H, Wu Y H, et al. A pilot study of on soybean embryonic tip regeneration system [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2008, 47(6): 615-618.)
- [15] 马晓红, 姚陆铭, 武天龙. 大豆整个子叶节外植体再生体系的建立及与子叶节、胚尖再生体系的比较[J]. 大豆科学, 2008, 27(3): 373-378. (Ma X H, Yao L M, Wu T L. High frequency plant regeneration from whole cotyledonary node explants and comparison with cotyledonary node and embryonic tip regeneration system in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] [J]. Soybean Science, 2008, 27(3): 373-378.)
- [16] 王翠艳, 丁东风, 于晓菊, 等. Floral dip 法在大豆遗传转化中的应用研究[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2010, 43(1): 34-43. (Wang C Y, Ding D F, Yu X J, et al. Application of floral dip on the transformation of soybean [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis (Natural Science), 2010, 43(1): 34-43.)
- [17] 胡张华, 黄锐之, 刘智宏, 等. 利用花粉管导入法获得转反义 *PEP* 基因大豆植株[J]. 浙江农业学报, 1999, 11(2): 99-100. (Hu Z H, Huang R Z, Liu Z H, et al. Gaining of transgenic soybean plants through pollen tube passage [J]. Acta Agriculture Zhejiang Genesis, 1999, 11(2): 99-100.)
- [18] 王翠艳, 丁东风, 于晓菊, 等. Floral dip 法在大豆遗传转化中的应用研究[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2010, 43(1): 34-43. (Wang C Y, Ding D F, Yu X J, et al. Application of floral dip on the transformation of soybean [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis (Natural Science), 2010, 43(1): 34-43.)
- [19] Liu M, Yang J, Cheng Y Q, et al. Optimization of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] in planta ovary transformation using a linear minimal *GUS* gene cassette [J]. Zhejiang University Science B, 2009, 10(12): 870-876.
- [20] Liu D P, Yuan Y, Tang K X, et al. Transforming the snowdrop lectin (galanthus nivalis agglutinin, *GNA*) gene to soybean by pollen tube pathway technique [J]. Molecular Plant Breeding, 2006, 4(5): 663-669.
- [21] Hu C Y, Wang L Z. In planta soybean transformation technologies developed in China: Procedure, confirmation and field performance [J]. In Vitro Cell, 1999, 35: 417-420.
- [22] David A S, Deborah A S, Olhoft P M. Recent advantages in legume transformation [J]. Plant Physiology, 2003, 131: 892-899.
- [23] 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.
- [24] McCabe D E, Swain W F, Martinell B J, et al. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration [J]. Nature Biotechnology, 1988, 6: 923-926.
- [25] 王翠艳, 丁东风, 于晓菊, 等. Floral dip 法在大豆遗传转化中的应用研究[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2010, 43(1): 34-43. (Wang C Y, Ding D F, Yu X J, et al. Application of floral dip on the transformation of soybean [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis (Natural Science), 2010, 43(1): 34-43.)
- [26] 胡张华, 黄锐之, 刘智宏, 等. 利用花粉管导入法获得转反义 *PEP* 基因大豆植株[J]. 浙江农业学报, 1999, 11(2): 99-100. (Hu Z H, Huang R Z, Liu Z H, et al. Gaining of transgenic soybean plants through pollen tube passage [J]. Acta Agriculture Zhejiang Genesis, 1999, 11(2): 99-100.)

(上接第 352 页)