

大豆胚尖再生体系的优化及与子叶节再生体系的比较

王伟¹, 王罡^{1,2}, 季静^{1,2}, 郑丽红², 关春峰¹, 王萍³

(1. 天津大学 农业与生物工程学院, 天津 300072; 2. 天津大学 化工学院, 天津 300072; 3. 淮海工学院 海洋学院, 江苏 连云港 222005)

摘要:研究了浸种时间、诱导时间、6-BA 浓度 3 个因素对吉育 91 胚尖不定芽诱导的影响, 并将优化的胚尖再生体系与子叶节再生体系进行比较。结果表明, 浸种 24 h 最适宜胚尖不定芽的形成, 不定芽诱导率可达到 85.1%, 平均芽数可达到 4.9 个; 诱导培养 48 h 时不定芽诱导率及平均芽数较高, 分别为 84.2% 和 5.3 个; 诱导培养基中 6-BA 浓度为 2.0~3.0 mg·L⁻¹ 时, 不定芽诱导及伸长状况最佳。除了生根率差异不显著外, 吉育 91 胚尖再生体系在再生能力与培养周期上均显著优于子叶节再生体系, 因此更适合作为遗传转化的受体材料。

关键词:大豆; 胚尖; 子叶节; 植株再生

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2012)03-0353-05

Optimization of Embryonic Tip Regeneration System and Comparison with Cotyledonary Node Regeneration System in Soybean

WANG Wei¹, WANG Gang^{1,2}, JI Jing^{1,2}, ZHENG Li-hong², GUAN Chun-feng¹, WANG Ping³

(1. School of Agriculture and Bioengineering, Tianjin University, Tianjin 300072; 2. School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072; 3. School of Marine Science and Technology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, Jiangsu, China)

Abstract: In order to obtain high efficiency soybean regeneration system, the effect of different factors on the shoots induction of embryonic tips was investigated, including soaking time, induction time and 6-BA concentration and compared the optimized embryonic tip regeneration system with cotyledonary node regeneration system. The results indicated that 24 h seed soaking was suitable for adventitious shoots formation, the adventitious shoots induction rate and mean number of shoots could reach 85.1% and 4.9, respectively. The optimum inducing time was 48 h, and the adventitious shoots induction rate and the mean number of shoots were 84.2% and 5.3, respectively. And the optimal concentration of 6-BA in induction medium was 2.0-3.0 mg·L⁻¹. In comparison with cotyledonary node regeneration system, embryonic tip regeneration system was obviously superior in regeneration capacity and culture period, except for rooting rate which had no significant difference. The embryonic tip regeneration system from Jiyu 91 was more suitable for receptor materials in genetic transformation of soybean.

Key words: Soybean; Embryonic Tip; Cotyledonary node; Plant regeneration

由于大豆再生过程中存在再生率低、重复性差、基因型依赖性强、培养条件复杂、再生周期长等缺陷, 在很大程度上限制了大豆遗传转化的发展。因此, 建立高效稳定的大豆再生体系仍是研究的热点。大豆子叶节再生体系是目前大豆组织培养中较成熟的体系, 在大豆组织培养及基因工程中得到广泛的应用^[1]。自刘海坤等^[2]首次报道用胚尖再生系统进行农杆菌介导的遗传转化方法获得转基因植株后, 大豆胚尖再生体系因其取材便捷、再生周期短、操作简便等优点, 已经普遍应用于大豆基因工程研究中^[3-4]。研究人员对大豆胚尖再生的影响因素进行了研究, 建立及优化多个品种的胚尖再生体系^[5-7], 通过对大豆胚尖与子叶节 2 个再生体系比较研究, 确定了多个大豆品种适宜的再生体系^[6-9]。大豆胚尖再生具有品种差异性, 因此针对某一品种的胚尖再生体系进行研究及优化十分

必要。

该文以吉育 91 为材料, 研究了浸种时间、诱导时间和 6-BA 浓度对胚尖不定芽诱导及伸长的影响, 并与其子叶节再生体系进行比较, 旨在建立适宜吉育 91 的高效再生体系, 为其优良基因的导入、品质的改善以及拓宽大豆遗传转化受体材料基因型提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料和培养条件

吉育 91 种子由吉林省农业科学院提供。再生体系中使用的基本培养基为 MSB₅, 添加不同浓度及组合的植物生长调节剂、3.0% 蔗糖和 0.7% 琼脂, 用 1.0 mol·L⁻¹ NaOH 调节 pH 至 5.7~5.8, 121℃ 灭菌 20 min。组织培养室温度 26±1℃, 16 h

收稿日期: 2012-03-20

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX08004-001, 2009ZX08010-013B, 2009ZX08003-019B)。

第一作者简介: 王伟(1983-), 女, 在读硕士, 研究方向为植物转基因。E-mail: wangweisosome@163.com。

通讯作者: 王罡(1964-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事植物基因工程研究。E-mail: wanggangtjdx@126.com。

光照/8 h 黑暗光周期,光照强度 2 000 Lx。

1.2 种子的消毒

采用改进的装置较简便的氯气灭菌方法,具体操作如下:挑选完整、饱满、无病斑的大豆成熟种子,在通风橱中将种子放入 300 mL 口杯过滤网中,向口杯内加入 20 mL 次氯酸钠溶液,然后加入 2 mL 浓盐酸,迅速将装有大豆的过滤网放入口杯中,盖紧杯盖,灭菌 5~12 h。

1.3 外植体获得及不定芽诱导

1.3.1 胚尖 灭菌后的大豆种子于 25℃、16 h 光照/8 h 黑暗的光周期条件下无菌水分别浸种 12、24、36 和 48 h,去除种皮、子叶和原叶,分离得到胚尖外植体,然后分别接种到不同 6-BA 浓度的诱导/预培养培养基($MSB_5 + 0.5$ 、 1.0 、 2.0 、 3.0 、 4.0 和 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA)中诱导培养 12、24、36、48、60 和 72 h,转入伸长培养基($MSB_5 + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA),每 14 d 继代 1 次。

1.3.2 子叶节 灭菌后的大豆种子在萌发培养基($MSB_5 + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA)中培养 5 d,切除部分下胚轴,保留 2~3 mm,在 2 片子叶之间纵切,去除已长出的幼芽,得到子叶节外植体。然后接种到诱导培养基($MSB_5 + 0.59 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MES + $1.67 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA)中诱导产生不定芽,转入伸长培养基($MSB_5 + 0.59 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MES + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃ + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ZT + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA),每 14 d 继代 1 次。

1.4 大豆不定根的诱导与再生植株的形成

不定芽伸长到 2~3 cm,切下转入生根培养基($1/2MSB_5 + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA)至产生 3~5 条根,将瓶盖打开炼苗 2~3 d,小心取出小苗,无菌水洗净根部残留琼脂,然后栽于盛有灭菌蛭石的塑料小盆中,放入植物生长培养箱中,浇植物营养液,植株成活并正常生长后移栽至盛营养土的大盆,放入温室培养至开花结实。

1.5 数据分析

数据采用 SPSS 18.0 做方差分析,多重比较采用 Duncan 法。数据计算公式如下:

不定芽诱导率 = (产生不定芽外植体数/接种外植体数) × 100%; 平均芽数 ($\geq 0.2 \text{ cm}$) = 出芽数/产生不定芽外植体数; 平均伸长芽数 ($\geq 1.0 \text{ cm}$) = 伸长芽数/产生不定芽外植体数。

2 结果与分析

2.1 大豆胚尖再生体系的优化

2.1.1 浸种时间对诱导胚尖不定芽的影响 大豆种子灭菌后用无菌水分别浸泡 12、24、36 和 48 h,然后将胚尖接种到诱导培养基中诱导 48 h,转入伸长

培养基。培养 14 d 时浸种时间对大豆胚尖不定芽诱导的影响见表 1。浸种时间 12~36 h 的不定芽诱导率都在 84% 以上,而 48 h 不定芽诱导率仅为 65.3%。浸种时间对胚尖平均芽数的影响较大,浸种时间为 24 h 时,平均芽数最多(4.9 个)。方差分析及多重比较结果表明,浸种时间 12、24、和 36 h 的不定芽诱导率无显著差异,均显著高于 48 h 不定芽诱导率;而不同浸种时间的平均芽数差异显著,浸种 24 h 所诱导不定芽数最多,显著高于其它 3 个浸种时间处理。试验中发现,当浸种时间超过 36 h 时,部分种子因吸水过多变软易烂、胚尖胀大发白无法正常萌发,影响不定芽诱导率和出芽数。

表 1 浸种时间对不定芽诱导的影响

Table 1 Effect of soaking time on adventitious shoots induction

浸种时间 Soaking time/h	不定芽诱导率 Adventitious shoots induction rate/%	平均芽数/个 Mean number of shoots
12	84.2a	2.5c
24	85.1a	4.9a
36	84.8a	3.2b
48	65.3b	1.7d

同列数值的不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$),下表同。

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

2.1.2 诱导时间对诱导胚尖不定芽的影响 胚尖在诱导培养基上分别预培养 12、24、36、48、60 和 72 h,转入伸长培养基中。培养 14 d 的胚尖不定芽诱导率和平均芽数见表 2,可以看出,不定芽诱导率和平均芽数都随着诱导时间的增加先增高后降低,诱导 48 h 时不定芽诱导率和平均芽数达到最大值,分别为 84.2% 和 5.3 个。方差分析表明,诱导时间为 48、60、72 h 时不定芽诱导率差异不显著,但均显著高于 12、24、36 h 时的不定芽诱导率;诱导 48 h 的平均芽数显著高于其它处理,综合考虑不定芽诱导率与平均芽数这 2 个指标,诱导时间以 48 h 最佳。

表 2 诱导时间对不定芽诱导的影响

Table 2 Effect of induction time on adventitious shoots induction

诱导时间 Induction time /h	不定芽诱导率 Adventitious shoots induction rate/%	平均芽数/个 Mean number of shoots
12	72.6d	1.2e
24	74.2c	2.5d
36	76.1b	3.7bc
48	84.2a	5.3a
60	83.9a	4.0b
72	83.5a	3.3c

2.1.3 6-BA 浓度对胚尖不定芽诱导的影响 大豆浸种萌发 24 h 后的胚尖接种到添加不同浓度 6-BA

(0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 和 5.0 mg·L⁻¹) 的诱导培养基,预培养 48 h 后转入伸长培养基培养,14 d 时统计不定芽诱导率及平均芽数;21 d 时统计平均伸长芽数。结果由表 3 可知,随着 6-BA 浓度的增加,不定芽诱导率、平均芽数及平均伸长芽数呈先升高后降低的趋势。当 6-BA 浓度为 3.0 mg·L⁻¹ 时不定芽诱导率、平均芽数及平均伸长芽数均达到最高,分别为 85.0%、6.1 个和 3.6 个。经方差分析得知,6-BA 浓度对这 3 个指标影响显著,不定芽诱导率和平均伸长芽数在 2.0 和 3.0 mg·L⁻¹ 处理下差异不显著,但均显著高于其它浓度处理,即 2.0 和 3.0 mg·L⁻¹ 6-BA 较其它浓度处理更适于不定芽的诱导及伸长;平均芽数在 2.0~4.0 mg·L⁻¹ 处理下差异不大但显著高于其它浓度处理。实验中还观察到 6-BA 浓度为 2.0 和 3.0 mg·L⁻¹ 处理下,14~21 d 阶段老芽在伸长的同时不断有新芽长出,由此说明适宜浓度的 6-BA 不仅促进不定芽的诱导还利于不定芽伸长。因此确定吉育 91 的胚尖诱导培养基中 6-BA 最佳浓度为 2.0~3.0 mg·L⁻¹。

表 3 不同浓度 6-BA 对不定芽诱导及伸长的影响

Table 3 Effect of different 6-BA concentrations on adventitious shoots induction and elongation

6-BA 浓度 Concentration of 6-BA/mg·L ⁻¹	不定芽诱导率 Adventitious shoots induction rate/%	平均芽数/个 Mean number of shoots	平均伸长芽数/个 Mean number of elongation shoots
0.5	40.5e	4.5b	2.6b
1.0	47.5c	4.6b	2.7b
2.0	83.9a	5.8a	3.5a
3.0	85.0a	6.1a	3.6a
4.0	73.6b	5.6a	1.8c
5.0	45.6d	4.8b	1.5c

2.2 吉育 91 胚尖与子叶节再生体系的比较

实验优化了吉育 91 胚尖再生体系,其再生过程如图 1 所示,大豆浸种 24 h 后,剥取胚尖,接种到含 2.0~3.0 mg·L⁻¹ 6-BA 的不定芽诱导培养基上诱导培养 48 h,然后转接到不定芽伸长培养基上培养,每 14 d 继代 1 次,继代期间老芽伸长的同时,新芽不断长出。当不定芽伸长到 2~3 cm 时,切下转入生根培养基,待根长出 3~5 条时便可炼苗、移栽。

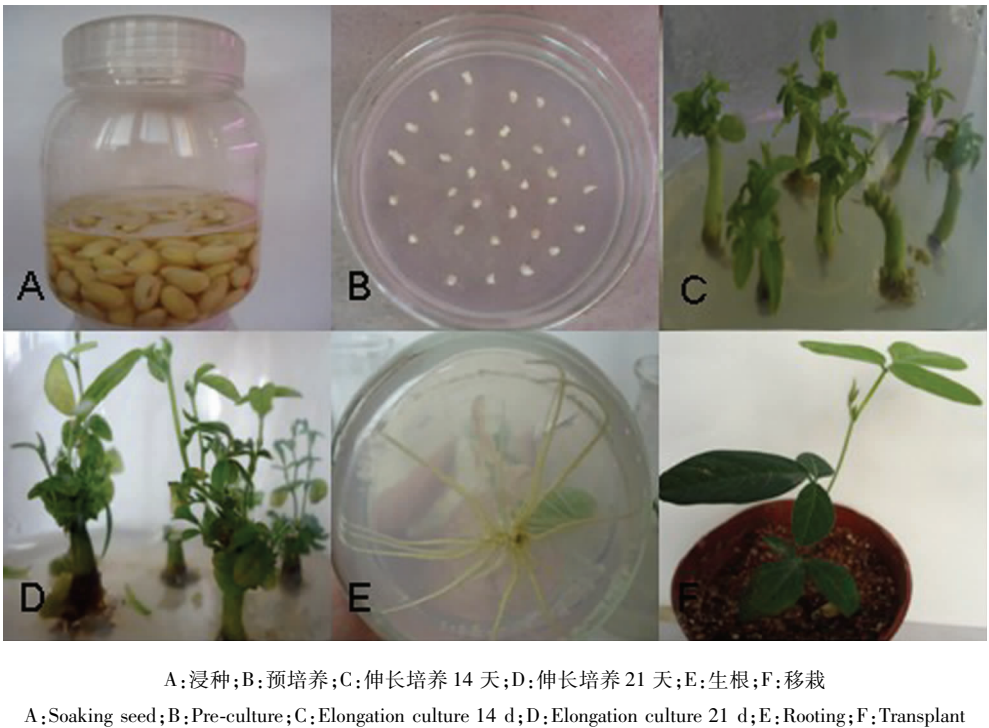


图 1 大豆胚尖再生体系

Fig. 1 Embryonic tip regeneration system of soybean

将优化的吉育 91 胚尖再生体系与子叶节再生体系进行比较,2 种外植体不定芽诱导及伸长情况见表 4,经 *t* 检验得知吉育 91 胚尖的不定芽诱导率、平均芽数和平均伸长芽数均显著高于子叶节再生体系。理想的再生体系需要在较短的时间内得到较多的可生根不定芽,从表 4 还可以看出,2 种再生体系生根率均达到 95% 以上,差异不显著,且生根

所用时间差异不大。由于子叶节再生体系需要经过 5 d 的种子萌发过程,并且芽诱导及伸长相对较慢,从种子萌发到炼苗之前周期为 64.8 d,显著长于以胚尖为外植体的再生周期 48 d。综合考察,不定芽的诱导与生根情况可知吉育 91 的胚尖再生体系优于子叶节再生体系。

表 4 吉育 91 胚尖与子叶节两种再生体系的比较

Table 4 Comparison of two regeneration systems from embryonic tip and cotyledonary node of Jiyu 91

项目 Items	不定芽诱导率 Adventitious shoots induction rate/%	平均芽数/个 Mean no. of shoots	平均伸长芽数/个 Mean no. of elongation shoots	生根率 Rooting rate/%	再生周期 Regeneration period/d
胚尖 Embryonic tip	85.1 *	6.0 *	3.6 *	95.1	48.0 *
子叶节 Cotyledonary node	67.8	3.3	1.7	95.6	64.8

* 表示在 0.05 水平上差异显著。

* showed significant difference at 0.05 probability level.

3 结论与讨论

3.1 适合于吉育 91 的胚尖再生体系

适宜的浸种时间可以保证大豆种子充分吸水,促使种子体内的酶活性增强,促进种子萌发以及不定芽的形成^[5]。该研究中浸种时间 12、24 和 36 h 的不定芽诱导率都在 84% 以上(且三者差异不显著),均显著高于浸种 48 h 的不定芽诱导率;不同浸种时间对平均芽数有显著影响,浸种 24 h 的不定芽数最高,因此最佳浸种时间为 24 h。

大豆胚尖在适宜的诱导时间内,有利于不定芽的分化形成。该研究结果表明诱导时间对大豆胚尖不定芽诱导率和平均芽数都有显著影响,胚尖诱导培养 48 h,不定芽诱导率和平均芽数最高,因此确定为最佳诱导时间。这与林树柱等^[10]认为的最佳预培养时间不同,可能是由于基因型差异所致。

6-BA 是大豆组培常用的细胞分裂素,可以促进不定芽的形成。胚尖再生培养中不同浓度 6-BA 处理对不定芽的诱导及伸长具有影响,2.0 ~ 3.0 mg·L⁻¹ 的 6-BA 时胚尖不定芽诱导率高,出芽数量多,芽长势较快且整齐,因此为诱导培养中 6-BA 的最佳浓度。这稍低于已报道的 3.0 ~ 6.0 mg·L⁻¹ 的结果^[2,7,11-12]。

3.2 大豆 2 种再生体系的比较

吉育 91 胚尖和子叶节 2 种再生体系的比较试验中发现,胚尖再生培养中除剥取胚尖工作量稍大外,操作较便捷;其培养基成分简单,影响因素少;不定芽诱导率高,出芽数多,伸长快且整齐,短时间内可以得到较多可以生根的伸长芽,而且未伸长的芽继代培养后可继续伸长,封顶芽现象少。相对于胚尖外植体,子叶节再生培养不定芽生长缓慢,伸长生长不整齐,多数芽后期易成为封顶芽,难以伸长。张艳等^[13]研究表明黑农 51 的胚尖丛生芽分化率为 75.3%,低于子叶节分化率 89.4%。李海燕等^[8]对合丰 35 和北京小黑豆子叶节和茎尖的出芽情况进行研究,证实为获得高分化率,选择子叶节

作为外植体较适合。该研究中吉育 91 的胚尖不定芽诱导率为 85.1%,高于子叶节分化率,与以上研究结果相反,这可能是由于不同的基因型及培养条件对大豆组培的影响造成的。孙文丽等^[14]对吉林小粒 1 号的子叶节和胚尖进行了研究,结果胚尖再生频率为 95%,子叶节再生频率为 81%。马晓红等^[15]以合丰 46 等为材料,以胚尖为外植体,出芽数一般为 3 ~ 6 个,该试验结果与之基本相一致。该研究中除生根率差异不显著外,胚尖再生体系在不定芽诱导及伸长和再生周期方面均优于子叶节再生体系,因此吉育 91 的胚尖更适合作为遗传转化的受体材料。

参考文献

- [1] 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):27-32. (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): 27-32.)
- [2] 刘海坤,卫志明. 利用根癌农杆菌介导转化大豆成熟种子胚尖获得转基因植株[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2004, 30(6):631-636. (Liu H K, Wei Z M. Transgenic soybean obtained with *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryonic tip of soybean mature seeds[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2004, 30(6): 631-636.)
- [3] Dang W, Wei Z M. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation for soybean for expression of binary insect resistance genes [J]. Plant Science, 2007, 173:381-389.)
- [4] 宋雯雯,刘宝辉,杨明亮,等. 农杆菌介导法将 *SPS* 基因导入大豆的研究[J]. 大豆科学,2008,27(3):387-390. (Song W W, Liu B H, Yang M L, et al. Transformation of *SPS* gene into soybean via *Agrobacterium*-mediated method [J]. Soybean Science, 2008, 27(3): 387-390.)
- [5] 王萍,张艳君,管娟娟,等. 大豆胚尖不定芽诱导影响因子的研究[J]. 作物杂志,2011(1):17-20. (Wang P, Zhang Y J, Guan J J, et al. Induction of adventitious buds from embryonic tip in soybean [J]. Crops, 2011(1): 17-20.)
- [6] 张东旭,张洁,商蕾,等. 大豆胚尖再生体系的研究[J]. 河北农业大学学报,2008,30(4):7-13. (Zhang D X, Zhang J, Shang L, et al. Study on the regeneration system of soybean embryonic tips [J].

- 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] 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.)
- [17] 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.)
- [18] 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.)
- [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)