

大豆胚尖遗传转化体系优化及 抗逆基因 *GmPK* 转化研究

张洁¹, 商蕾¹, 郑文永¹, 邱丽娟², 王冬梅¹

(¹ 河北农业大学生命科学学院, 保定 071000; ² 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要: 采用 *GUS* 基因瞬时表达检测方法, 通过正交试验以 AS 浓度、侵染菌液 OD 值、侵染时间、共培养时间和恢复培养时间 5 个因素在 4 个水平上进行分析, 优化了农杆菌介导的大豆胚尖遗传转化体系, 并在此基础上进行了抗逆基因 *GmPK* 的遗传转化。结果表明, 采用共培养培养基中添加 100 μmol/L AS、侵染菌液 OD₆₀₀ 值 0.9、侵染 15h、共培养 5d 和恢复培养 3d 的转化条件最佳, *GUS* 阳性率达 74.59%。经 PCR 及 RT-PCR 进一步验证获得了转基因阳性植株。利用优化的最佳条件进行抗逆基因 *GmPK* 的转化, 炼苗移栽成活的再生植株经 PCR 及 PCR-Southern blotting 验证, 初步证明外源基因已经整合至大豆基因组, 转化率为 0.6%。

关键词: 大豆; 胚尖; 遗传转化; 根癌农杆菌; *GmPK* 基因

Optimizing Genetic Transformation System of Soybean Embryonic Tips and Transformation of Stress Resistance Gene *GmPK*

ZHANG Jie¹, SHANG Lei¹, ZHENG Wen-yong¹, QIU Li-juan², WANG Dong-mei

(¹ College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000; ² Institute
of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstracts: The *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation system of soybean embryonic tips was optimized. The experiment was carried out by orthogonal test involving four levels of five terms (Acetosyringone (AS) concentration, *Agrobacterium* OD value, infection time, co-culture time and recovery culture time), and the transgenic events were ascertained by β-glucuronidase assay. The results indicated that the optimum transformation conditions were: 100 μmol/L AS, *Agrobacterium* OD of 0.9, infected for 15 hours, co-cultured for 5 days, recovery cultured for 3 days. In the above condition, *GUS* staining positive rate reached up to 74.59%. And then, transgenic plants were obtained by PCR and RT-PCR. Using the optimized system, a stress-resistant gene *GmPK* was transformed. PCR and PCR-Southern blotting results showed that the *GmPK* gene was integrated into the genome of soybean. The transformation efficiency was 0.6%.

Key words: *Glycine max*; Embryonic tips; Genetic transformation; *Agrobacterium tumefaciens*; *GmPK* gene

大豆是世界上重要的粮食和油料作物,也是植物蛋白的主要来源,而河北省地处华北平原,是全国大豆的主产区之一,但受病虫害、干旱和盐害等不利因素的影响,产量很不稳定。通过转基因技术改造大豆基因型,对培育大豆优质高产新品种有积极作

用^[1]。其中,农杆菌转化法应用最为广泛。自 1988 年 Hinchey 等^[2]首次利用农杆菌介导法获得大豆转基因成熟植株后,不同的研究者对大豆基因型、农杆菌菌株致病能力、酚类物质如乙酰丁香酮(AS)对农杆菌 vir 基因的活化,加入 L-Cys、DTT、AgNO₃ 等对

收稿日期:2011-03-13 修回日期:2011-11-06

基金项目:河北省科技攻关计划项目(042401116D-1);河北省科学技术研究与发展计划子课题(09220103D);河北省教育厅项目(2008460);转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX08004-002-1-5、2009ZX08004-001B)

作者简介:张洁,副教授,硕士,研究方向为植物抗逆生理及遗传转化。E-mail: zhangjiezhao163@163.com

通讯作者:王冬梅,博士,教授,主要从事植物逆境分子细胞生物学领域的研究。E-mail: dongmeiwang63@126.com

减轻受体材料褐化等方面进行了详细研究^[3-10]。但相对于水稻、烟草等作物而言,大豆的有效再生体系及高效遗传转化系统的建立一直是植物基因工程领域的重点和难点^[11]。2004年,Liu等^[12]建立了根癌农杆菌介导的大豆胚尖遗传转化体系,该体系利用具有较强分生能力的胚尖组织为外植体,降低了转化植株出现嵌合体的频率,并具有转化效率高、操作简便,获得转化体的周期短(约3个月)等特点^[13-14]。本试验在已成功建立河北省优良大豆品种胚尖高效再生体系的基础上^[15],利用GUS基因的稳定性及特异性以及能够在植物体中进行瞬时表达的特点,通过正交试验对农杆菌介导的大豆胚尖转化体系进行了优化,探讨了AS浓度、农杆菌菌液OD₆₀₀值、侵染时间、共培养时间和恢复培养时间对大豆胚尖遗传转化效率的影响,建立了一套高效、简便的大豆遗传转化体系。利用优化条件进行了大豆抗逆基因GmPK的遗传转化研究,GmPK是一个属于SnRK2亚家族的大豆蛋白激酶基因,在模式植物拟南芥中验证该基因能够提高转化植株的抗逆性^[16],利用该基因进行大豆胚尖遗传转化,有望获得优质抗逆新品种。

1 材料与方法

1.1 供试材料

选用河北省优质高蛋白大豆[Glycine max(L.) Merr]品种冀豆16、五星2号等成熟种子为材料(种子由河北省农林科学院张孟臣研究员惠赠)。农杆菌菌株为EHA105,质粒pBI121带有β-葡萄糖苷酶基因(GUS)和卡那霉素抗性基因(NPT II)、pEGAD(该双元载体由中国农业科学院作物科学研究所邱丽娟研究员提供)带有CaMV35S启动的Bar基因和CaMV35S启动的抗逆基因GmPK(图1)。

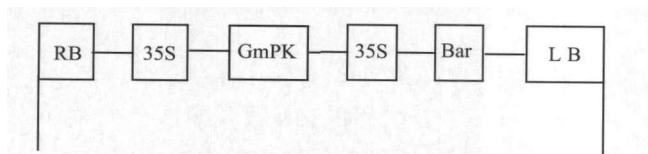


图1 质粒pEGAD的T-DNA区域

Fig.1 Linear map of pEGAD's T-DNA

1.2 试验方法

1.2.1 农杆菌侵染 参考刘海坤等^[17]的方法进行大豆成熟种子消毒处理,消毒后放入无菌水中浸泡过夜,在超净台上去掉种皮,剥离下胚轴连同刚萌动的胚尖,去掉原叶,接种于附加6-BA 3.5mg/L的预培养基中,培养24h。

挑取农杆菌单菌落接种于含卡那霉素50mg/L、利福平50mg/L的YEP液体培养基中,28℃摇床培养至菌液OD₆₀₀值1.0~1.3,于4000 rpm离心10min收集菌体,后重悬于侵染液中(1/2MS+BA 6.0mg/L+AS 100μmol/L+蔗糖20g/L),调菌液OD₆₀₀值。

经预培养后的胚尖接种在上述农杆菌侵染液中侵染。按L₁₆(4⁵)设计的处理方式转化,每个处理外植体100个,设两次重复,最后计算平均值。

1.2.2 转基因植株的获得 经农杆菌侵染后的胚尖外植体首先转入附加抗生素cef 400mg/L和cb100mg/L的恢复培养基中,随后将外植体再转入筛选培养基,每隔20d挑选抗性植株,进行生根培养,最后炼苗移栽得到转化植株。

1.2.3 转化植株的GUS活性测定 按照Jefferson^[18]的方法,对冀豆16号转化植株进行GUS染色,每次任取30个,每个处理重复染色两次,同时以未经侵染的胚尖再生植株为对照。

1.2.4 转基因植株的PCR检测 转基因植株及对照植株的基因组DNA提取采用CTAB法,分别通过PCR扩增卡那霉素抗性基因片段和Bar基因以及CaMV35S启动子部分序列来检测质粒的成功转化。

第一对引物:Primer 1: CAGGATCTCCTGT-CATCTCACC,Primer 2: CAAGCTCCTTCAGCAATAT-CACG,扩增卡那霉素抗性基因,片段大小为400bp。反应条件为:94℃预变性10min,94℃变性1min,62℃退火1min,72℃延伸1min,35次循环。

第二对引物:Primer 1: TACATCGAGACAAG-CACGGT,Primer 2: TAACATAGATGACACCGCGC,扩增CaMV35S启动子和Bar基因的部分序列,片段大小为743bp。反应条件为:94℃预变性5min,94℃变性30s,60.6℃退火1min,72℃延伸1min,35次循环。

1.2.5 GUS基因转化植株的RT-PCR检测 对于GUS染色检测及PCR检测均呈阳性的转基因植株进行RT-PCR检测,利用Invitrogen公司的Trizol试剂于低温下研磨提取大豆叶片基因组总RNA^[19]。用去RNase水溶解RNA,然后以Takara公司的cDNA试剂盒(DRR019A)进行反转录,得到双链cDNA,以cDNA为模板进行RT-PCR,扩增引物,PCR反应体系按反转录试剂盒说明进行设置。

1.2.6 *GmPK* 基因转化植株的 PCR-Southern blotting 检测 以转 *GmPK* 基因 PCR 阳性植株为试验材料,进行 PCR-Southern 杂交鉴定。PCR 产物经琼脂糖电泳后,电转移至尼龙膜上,然后按照罗氏公司的 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 试剂盒的详细说明进行操作,以 DIG 标记的 pEGAD 质粒为阳性对照,以扩增产物为探针进行 Southern blotting 检测。

表 1 遗传转化体系正交分析结果

Table 1 Orthogonal design for genetic transformation system and the results

序号 No.	AS 浓度($\mu\text{mol/L}$) Concentration of AS	OD ₆₀₀	侵染时间(h) Infection time	共培养时间(d) Co-culture time	恢复培养时间(d) Restore culture time	染色率(%) Dyeing rate
1	0	0.3	5	1	3	44.80
2	0	0.5	10	3	5	55.00
3	0	0.7	15	5	7	67.96
4	0	0.9	20	7	9	73.30
5	100	0.3	10	5	9	61.36
6	100	0.5	5	7	7	42.12
7	100	0.7	20	1	5	66.35
8	100	0.9	15	3	3	74.59
9	200	0.3	15	7	5	72.65
10	200	0.5	20	5	3	72.50
11	200	0.7	5	3	9	34.47
12	200	0.9	10	1	7	48.40
13	300	0.3	20	3	7	53.50
14	300	0.5	15	1	9	47.68
15	300	0.7	10	7	3	54.60
16	300	0.9	5	5	5	49.49

2.2 各因素对转化效率的影响

通过软件进行正交分析,结果表明采用共培养基中添加 $100\mu\text{mol/L}$ AS、侵染菌液 OD₆₀₀ 值 0.9、侵染 15h、共培养 5d 和恢复培养 3d 的转化条件最佳, *GUS* 阳性率达 74.59% (表 2)。由 *F* 值可知 5 个主要影响因素中侵染时间、共培养时间、AS 浓度、恢复培养时间以及菌液 OD₆₀₀ 值对遗传转化的影响程度依次递减,侵染时间对遗传转化效率的影响程度达显著水平。

2.2.1 侵染时间对转化的影响 农杆菌对外植体侵染时间的长短直接影响着大豆的转化效率,侵染时间过短,农杆菌与外植体的吸附不够充分,从而降低转化效率;时间过长,会导致外植体坏死。方差分析可知,侵染时间的 *F* 值为 13.545,达显著水平,说明侵染时间是影响胚尖遗传转化的重要因素。从图 2 中可以看出,侵染效率随着侵染时间的增加而增加,并且在 15h 达到最高,20h 后有下降的趋势,所

2 结果与分析

2.1 遗传转化体系正交试验设计分析

以冀豆 16 号为试验材料,按照表 1 设计的 16 个处理进行大豆胚尖的遗传转化试验,筛选培养 2 周后对胚尖进行 *GUS* 染色,检测 *GUS* 基因瞬时表达(表 1,图 6)。采用正交分析软件对表 1 数据进行正交分析。

以 15h 为胚尖遗传转化反应体系中最佳的侵染时间。

表 2 差异显著性分析

Table 2 The analysis significance of difference

因素 Factor	偏差平方和 Deviation sum of square	自由度 df	<i>F</i> 比 <i>F</i> ratio	<i>F</i> 临界值 Critical value
AS 浓度($\mu\text{mol/L}$) Concentration of AS	0.024	3	2.182	9.280
OD ₆₀₀	0.011	3	1.000	9.280
侵染时间(h) Infection time	0.149	3	13.545	9.280*
共培养时间(d) Co-culture time	0.032	3	2.909	9.280
恢复培养时间(d) Restore culture time	0.024	3	2.182	9.280
误差 Relative accuracy	0.010	3		

* 表示差异显著 * means different is significant

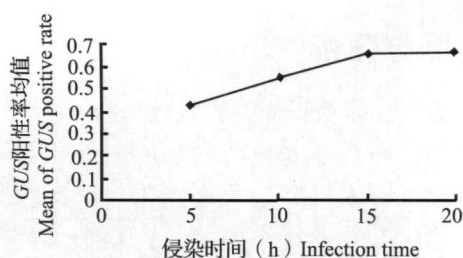


图2 侵染时间的效应曲线图

Fig. 2 The effect of infection time

2.2.2 共培养时间对转化的影响 共培养时间的长短直接影响农杆菌的生长量,共培养时间过短,农杆菌生长量不足,影响转化效率;共培养时间过长,农杆菌过度繁殖,外植体易褐化,影响其对营养物质的吸收,从而导致外植体的死亡。因此,适宜的共培养时间是建立一个高效转化系统所必需的。从本试验结果看,共培养5d为最佳培养时间,培养时间过长或过短均会影响遗传转化的效率(图3)。

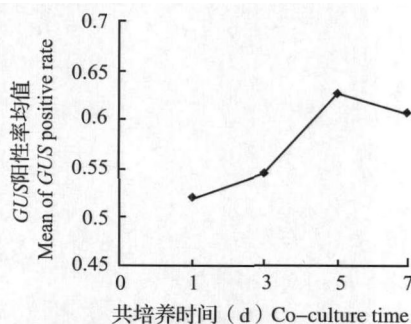


图3 共培养时间的效应曲线图

Fig. 3 The effect of co-culture time

2.2.3 AS 浓度对转化的影响 在农杆菌侵染过程中,外植体不能积累足够量的酚类物质,从而导致难以激活农杆菌的侵染活力,一直被认为是由农杆菌介导的植物遗传转化效率低的原因之一,因此在转化过程中常添加酚类物质以提高转化率。乙酰丁香酮(AS)已经在多种农杆菌介导的植物转化系统中被证明可以提高转化效率^[20-21]。本试验通过方差分析确定AS浓度在100 μ mol/L时,GUS基因的瞬时表达频率较高,随着AS浓度的进一步提高,GUS基因的瞬时表达频率呈下降趋势(图4)。

2.2.4 其他因素对转化的影响 在遗传转化中,共培养后采用恢复培养的方法,可以避免外植体因感染农杆菌生长能力减弱,不能承受筛选压力而导致外植体的死亡。从本试验结果看,恢复培养3d,GUS基因的瞬时表达频率较高。而菌液浓度在5个影响因子中对转化效率影响最小,说明在特定菌株达到一定活力的条件下,其浓度对转化效率的影响较小。

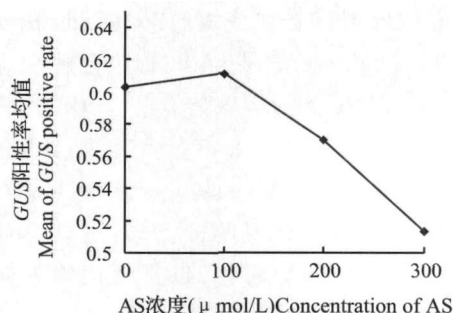


图4 AS 浓度的效应曲线图

Fig. 4 The effect of concentration of AS

2.3 GUS 基因转化植株的检测

本试验获得了大量冀豆16号胚尖的转化植株,转化材料在不同阶段的生长情况见图5。通过对再生植株叶片进行GUS染色检测结果表明,农杆菌侵染48h,在胚尖的伤口处有明显的蓝色;经卡那霉素筛选两周后,转化植株的新生叶片显蓝色而阴性对照的叶片没有显色;另外,通过对转化植株根系的GUS染色还发现在转化植株的根尖部分显蓝色而对照未见蓝色(图6)。上述结果表明筛选两周后T-DNA已被转移到外植体组织中,并且GUS基因得到了表达。

用CTAB法提取再生转化植株叶片中的总DNA,以非转化大豆作为阴性对照,质粒作为阳性对照通过PCR扩增检测npt II基因的表达情况。经1%琼脂糖凝胶电泳,结果如图7所示,阳性对照及转基因植株均扩增出了长度为400bp的目的条带(npt II基因部分序列长度),而非转化的阴性对照则无此条带,说明外源基因已经整合到大豆基因组中。在此基础上,以部分再生转化植株为试验材料进行转录水平的分子检测,RT-PCR结果显示,转化再生植株中检测到GUS基因(片段大小为900bp)的特异性条带,同时也证明外源基因已经稳定整合到大豆基因组中,并已在转录水平表达(图8)。

2.4 GmPK 基因转化植株的PCR及PCR-Southern 验证

以2.2中优化的转化方法,对冀豆16号、五星2号、五星3号3个大豆品种进行了抗逆基因GmPK的转化,其中五星2号获得了转化成活的植株。将五星2号阳性植株进行移栽炼苗后在温室培养4周,对移栽成活的120个再生植株取样(以新长出的3片叶为取材对象),利用CTAB法提取大豆基因组DNA,进行PCR及PCR-Southern验证(图9、图10),有3棵再生植株检测到目的片段,转化率为0.6%(起始侵染胚尖数为500),初步证明外源基因已经整合至大豆基因组中。

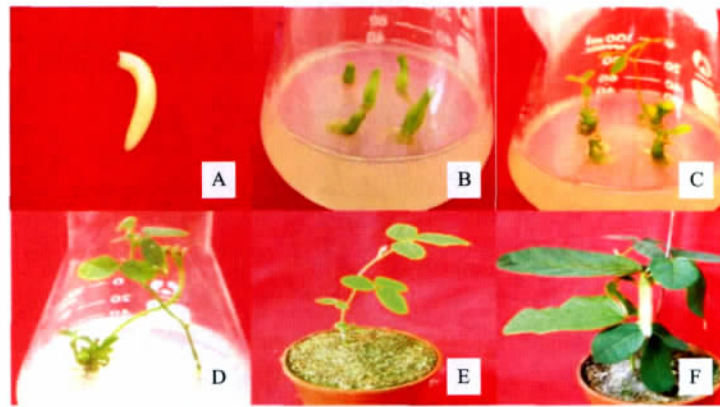


图 5 冀豆 16 胚尖转化获得再生植株

Fig. 5 Regenerated soybean plants of transgenic embryonic tips

A: 大豆成熟种子切取的胚尖外植体; B: 经农杆菌侵染后恢复培养的胚尖; C: 转入筛选培养基的胚尖再生幼苗;

D: 抗生素筛选阳性植株生根; E: 移栽后在温室成活的转化植株; F: T₀ 代植株结荚

A: Explants of soybean embryonic tip; B: Embryonic tips in the restore medium after infected by *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 with PBII21 plasmid; C: Regenerated shoots of soybean embryonic tips in the selective medium; D: Regenerated roots of soybean embryonic tips after selective-cultivated; E: Regenerated plants growing in the greenhouse; F: Pods of transgenic T₀ plant



图 6 再生转化植株的 GUS 检测

Fig. 6 GUS test of regenerated plants

A: 农杆菌侵染 48h 的胚尖 GUS 染色 (bar 0.5mm); B: 卡那霉素筛选两周后胚尖再生植株 GUS 染色, 左: 阴性对照,

右: GUS 在胚尖再生叶片中表达; C: 胚尖再生植株根系 GUS 染色 (bar 0.5mm),

左: 阴性对照, 右: GUS 在转化植株的根尖表达

A: GUS expression on the embryonic tip after infected 48h (bar 0.5mm); B: GUS expression on regenerated shoots after selective-cultivated two weeks. left: Negative control; right: GUS expression on regenerated shoots; C: GUS expression on regenerated roots (bar 0.5mm). left:

Negative control; right: GUS expression on regenerated roots



图 7 再生转化植株的 PCR 检测

Fig. 7 Detection of regenerated plants by PCR

M: Marker; P: 阳性对照 (pBII21 质粒); N: 阴性对照 (非转化植株基因组 DNA);

1~4、6~10 及 12: 阳性转化再生植株; 5、11: 阴性转化再生植株

M: Marker (DL2000); P: Positive control (plasmid pBII21); N: Negative control (non-transformed soybean genomic DNA from jidou16); 1-4、6-10 and 12: Positive generated plants; 5 and 11: Negative regenerated plants



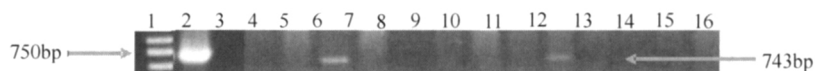
图 8 再生转化植株的 RT-PCR 检测

Fig. 8 Detection of regenerated plants by RT-PCR

P: 阳性对照 (pBII21 质粒); N: 阴性对照 (非转化植株); 1~7: 阳性再生转化植株; 8: 阴性转化再生植株

M: Marker (DL2000); P: Positive control (plasmid pBII21); N: Negative control (non-transformed Soybean jidou16);

1-7: Positive regenerated plants; 8: Negative regenerated plants

图9 T₀转基因植株中 *GmPK* 的 PCR 验证Fig. 9 PCR analysis for detecting the *GmPK* gene in transgenic T₀ plants

1: Marker; 2: 阳性对照; 3: 阴性对照; 4~16: 五星 2 号的转化植株

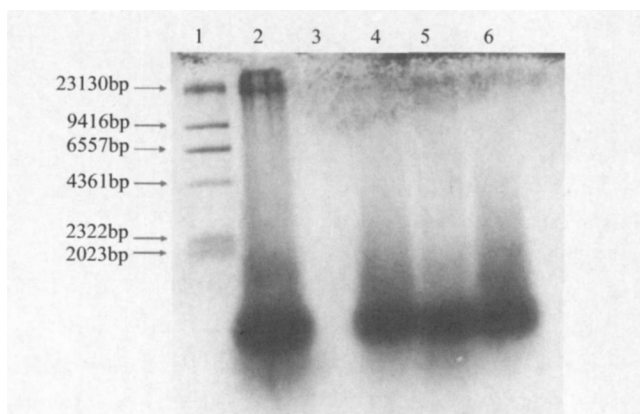
1: Marker; 2: Plasmid pEGAD *GmPK*; 3: Control; 4-16: Transgenic plants derived from wuxing 2

图10 转基因植株的 PCR-Southern 验证

Fig. 10 PCR-Southern blotting of transgenic plants

1: Marker; 2: 阳性对照; 3: 阴性对照; 4~6: 五星 2 号的转化植株

1: Marker; 2: Plasmid pEGAD *GmPK*; 3: Control;

4-6: transgenic plants derived from wuxing 2

3 讨论

与其他双子叶植物相比,大豆是公认的难转化植物,分析其原因主要有以下两个方面:一是缺少适于农杆菌介导的遗传转化高效再生体系,本试验在成功建立河北省优良大豆品种胚尖高效再生体系的基础上进行转化,为获得高效转化系统提供了必要前提;二是有关遗传转化体系还未得到系统的优化,其转化效率的提高依赖于对各种因素的优化和转化条件的改善。本试验在单因素分析研究的基础上,利用正交试验设计法进一步研究了影响农杆菌介导的大豆胚尖遗传转化的主要影响因素,结果表明侵染时间最为关键,其次是共培养时间以及 AS 浓度,为进一步利用该体系进行大豆品质的遗传改良提供了技术支持。

农杆菌介导法的转化效率受农杆菌接种强度的影响,接种强度主要取决于农杆菌细胞的密度、侵染时间和共培养时间。在一定范围内,增加接种强度可以提高转化瞬时表达率。本试验发现侵染时间是农杆菌介导大豆胚尖遗传转化的关键因素,侵染 15~20h GUS 瞬时表达率相对较高,这与 Liu 等^[12]、党尉等^[14]的结果相对一致。在子叶节为外植体的转化系统中,农杆菌的侵染时间为 30min 左右^[22],

与之相比胚尖外植体耐受农杆菌侵染的时间更长。农杆菌与外植体共培养时间的长短直接影响转化的频率,感染时间过短,农杆菌生长量不够,时间过长时容易导致外植体坏死。Liu 等^[12]以胚尖为外植体与农杆菌共培养时间达到 5~6d,本试验的正交分析结果进一步证明胚尖转化过程中共培养 5d 效率最高。说明胚尖外植体能够更好的耐受农杆菌侵染,有利于提高转化效率,是一种良好的遗传转化受体。

乙酰丁香酮(AS)可以诱导农杆菌 Vir 基因的活化,促进外源 DNA 与植物基因组的整合^[23],是农杆菌介导的大豆转化成功的重要因素^[24]。在大豆子叶节^[22-24]、大豆愈伤组织^[25]为转化受体的试验中,均发现加入一定浓度的 AS(100~200 μ mol/L)明显提高农杆菌介导的遗传转化效率。Liu 等^[12]在大豆胚尖遗传转化过程中添加 100~200 μ mol/L 的 AS 可以明显提高转化效率,本研究的正交分析结果表明 100 μ mol/L 的 AS, *GUS* 基因的瞬时表达频率最高,随着 AS 浓度的提高, *GUS* 基因的瞬时表达频率呈下降趋势,进一步证明在农杆菌介导的大豆胚尖遗传转化中添加 100 μ mol/L 的 AS 更为适宜。

在转基因研究中,筛选培养基再生一定比例的假阳性植株较为常见,其原因可能是外植体对筛选剂不太敏感,从而逃脱了选择压力。虽然 PCR 扩增方法十分灵敏,但有时也会出现假阳性现象,因此许多研究对抗性筛选成功的植株进一步采取 PCR-Southern blotting 验证,初步证实外源基因整合至植物基因组中^[26-28]。本试验利用 PCR-Southern blotting 对所获得的 3 棵 PCR 阳性再生植株进行验证,结果均呈阳性,初步证明外源基因整合到了大豆基因组中。但要确证目的基因的遗传稳定性,还需要对其后代进行 Southern blotting 等分子水平上的验证,通过田间试验分析转基因植株对盐碱等逆境环境的耐受性,同时进行相关农艺性状的分析,以确保所获得的阳性植株为转 *GmPK* 基因的抗逆大豆新品系。

参考文献

- [1] 罗振锋, 李启云. 转基因大豆产业化现状及展望[J]. 大豆科学, 2005, 24(3): 220-223
- [2] Hinchee M A W, 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] Owens L D, Cress D E. Genotypic variability of soybean response to *Agrobacterium* strains harboring the Ti or Ri plasmids[J]. Plant Physiol, 1985, 77(1): 87-94
- [4] Kudirka D T, Colburn S M, Hinchee M A, et al. Interactions of *Agrobacterium tumefaciens* with soybean leaf explants in tissue culture[J]. Can J Genet Cytol, 1986, 28: 808-817
- [5] Byrne M C, McDonnell R E, Wright M S, et al. Strain and cultivars specificity in the *Agrobacterium* soybean interaction[J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 1987, 8: 3-15
- [6] Aragão F J L, Sarokin L, Vianna G R, et al. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency[J]. Theor Appl Genet, 2000, 101: 1-6
- [7] 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 Org Tiss Cult, 1999, 56(1): 37-46
- [8] Yan B, Reddy M S S, Collins G B, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using immature zygotic cotyledon explants[J]. Plant Cell Rep, 2000, 20: 1090-1097
- [9] Olhoft P M, Lin K, Galbraith J, et al. The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells[J]. Plant Cell Rep, 2001, 20: 731-737
- [10] 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
- [11] 张洁, 张东旭, 商蕾. 转基因技术在大豆育种上的应用与研究[J]. 华北农学报, 2008, 23(s): 133-138
- [12] Liu H K, Yang C, Wei Z M. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system[J]. Planta, 2004, 219: 1042-1049
- [13] 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
- [14] 党尉, 卫志明. 根癌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): 185-194
- [15] 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, 31(4): 7-13
- [16] 周国安. 大豆抗逆基因 *GmUBC2*、*Gmpk* 和 *GmNHX2* 分离与功能研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009
- [17] 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
- [18] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system[J]. Plant Mol Biol, 1987(5): 387-405
- [19] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Anal Biochem, 1987, 162: 156-159
- [20] 朱晋云, 许玉娟, 杨丽萍, 等. 小麦组织培养再生系统及农杆菌介导的转基因技术研究[J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(1): 84-89
- [21] 于娅, 刘莉莎, 赵永钦, 等. 影响花椰菜农杆菌介导转化因素的研究[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(3): 320-325
- [22] 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 Rep, 2008, 27: 489-498
- [23] Ishida Y, Saito H, Ohta S, et al. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Nat Biotechnol, 1996, 14(6): 745-50
- [24] Clemente T E, LaVallee B J, Howe A R, et al. Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. Crop Sci, 2000, 40(3): 797-803
- [25] 张毅, 李弘剑, 张俊辉, 等. 根癌农杆菌介导 β -1,4-半乳糖苷转移酶基因转化大豆及其转基因植株再生[J]. 药物生物技术, 2001, 8(3): 131-134
- [26] 戚元成, 张世敏, 王丽萍, 等. 谷胱甘肽转移酶基因过量表达能加速盐胁迫下转基因拟南芥的生长[J]. 植物生理与分子生物学报, 2004, 30(5): 517-522
- [27] 荣红颖, 张立全, 杨凤萍, 等. DREB1B 基因在转基因小麦后代的稳定表达[J]. 分子植物育种, 2009, 7(3): 437-443
- [28] 林世锋, 张淑珍, 杨秀红, 等. 大豆抗病相关基因 SR1 正反义植物表达载体的构建及遗传转化研究[J]. 大豆科学, 2005, 24(2): 90-94