

转基因技术在大豆育种上的应用与研究

张 洁, 张东旭, 商 蕾

(河北农业大学 生命科学院, 河北 保定 071001)

摘要: 近年来, 转基因技术在大豆上的研究重点主要集中在建立高效再生体系和稳定地遗传转化体系方面, 随着遗传转化技术的发展, 我国已获得了抗病、抗虫转基因的大豆植株并取得突破性进展。笔者就大豆遗传转化在受体系统(器官发生受体系统、体细胞胚胎发生受体系统、原生质体受体系统)以及转化方法(农杆菌介导法、基因枪法)等方面的研究进展情况进行了综述, 并对今后大豆转基因研究方向进行了探讨。

关键词: 大豆; 遗传转化; 农杆菌; 基因枪

中图分类号: Q75 文献标识码: A 文章编号: 1000- 7091(2008) 增刊- 0133- 06

Study and Application of Transgenic Technology in Soybean Breeding

ZHANG Jie, ZHANG Dong xu, SHANG Lei

(Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: In this years, the main emphasis of transgenic technology in soybean has shifted to the establishment of efficient regenerated system and stable descendibility system. With the development of the transgenic technology, there were several disease resistance and insect pest-resistant transgenic soybean had been made in our country. This paper introduced the receptor system used for soybean transgenic technology, which included the receptor system of organ generation, the receptor system of somatic embryogenesis, the receptor system of protoplast and so on. We also introduced the Transgenic method, which included *Agrobacterium*-mediated method and particle gun method. In the end, future research consideration of the soybean transformation was discussed.

Key words: Soybean; Genetic transformation; *Agrobacterium tumefaciens*; Particle gun

大豆[*Glycine max* (L.) Merr] 属于豆科、蝶形花亚科、大豆属的二倍体 ($2n=40$) 植物, 起源于中国, 后传入日本、欧洲、美国等地^[1]。大豆是一种非常重要的农作物, 市场需求量大, 但是在生产过程中经常受病、虫害以及干旱等不利条件的影响, 产量极不稳定。因此, 培育抗病虫、高产、优质大豆新品种, 对促进农业生产、提高人类生活水平等有着重要意义。常规育种技术由于存在育种年限长、难以打破性状连锁、多基因重组几率低、远缘杂交困难等问题难以满足日益增长的对大豆品质和产量的需求^[2]。现代生物工程技术可以打破生物之间的界限, 实现遗传物质的重新组合, 为大豆的育种工作开辟了一条全新的途径。

相对于水稻、烟草等作物而言, 大豆的有效再生体系以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, 近年来随着现代生物技术的飞速发展, 大豆遗传转化的研究取得了较大的突破。大豆遗传转化的主要方法有: 农杆菌介导法、基因枪法、花粉管通道法、子房注射法、电击法、农杆菌介导和基因枪结合转化法、超声波辅助农杆菌介导法等, 应用最为广泛的是农杆菌转化法, 其中根癌农杆菌介导大豆子叶节的遗传转化系统最为有效^[3]。笔者对大豆遗传转化的受体系统、常用转化方法的主要影响因素以及未来大豆遗传转化的发展趋势等方面进行了综述。

1 大豆遗传转化受体系统的研究

大豆高效再生系统是其进行遗传转化的必要前提。大豆组织培养常用的外植体有子叶节、成熟或未成熟胚、胚轴、胚尖、半种子等, 诱导途径主要有器

收稿日期: 2008- 09- 08

基金项目: 河北省科技攻关计划项目(042401116D- 1); 河北省教育厅项目(2008460)

作者简介: 张 洁(1974-), 女, 河北冀州人, 讲师, 硕士, 主要从事大豆遗传转化方面的研究。

官发生途径和体细胞胚胎发生途径两种。

1.1 大豆器官发生途径

1973 年, Kimball 等^[4]以大豆下胚轴为外植体在 B5 和 MILLER 培养基上诱导产生不定芽, 但未能获得再生植株。Cheng 等^[5]最早通过器官发生途径获得了大豆再生植株, 随后不同研究者分别采用不同外植体——未成熟胚^[6, 7]、成熟胚^[8, 9]、真叶^[10-13]、下胚轴^[14-17]、子叶节^[18-21]经过器官发生途径获得了再生植株。近年来, 国内外报道的大豆再生体系多以子叶节为外植体, 通过施加外源细胞分裂素(主要是 6-BA)来诱导子叶节处潜在的分生组织增殖产生不定芽, 再经诱导获得再生植株。刘海坤等^[22]利用胚尖为外植体建立了一种高效的再生体系, 其植株再生率达 87.7%。本实验室也采用胚尖再生体系获得了较高的再生率, 以胚尖作为外植体是目前通过器官发生途径获得植株再生率较高的再生体系。马晓红等^[23]利用整个子叶节为外植体建立了一套大豆再生体系, 其植株再生率高达 94.7%, 并且证明其再生率远远高于以子叶节、胚尖等外植体建立的再生体系, 是一种新的高效再生体系。

1.2 大豆体细胞胚胎发生途径

由于体细胞胚发生途径可以大量获得转基因植株以及大规模提供优良种质, 是目前大豆遗传转化较为理想的受体系统。大豆体细胞胚胎发生途径常用外植体主要有未成熟子叶、未成熟胚和未成熟下胚轴等。1983 年, Christianson 等^[24]首次以未成熟胚的胚轴为材料, 用改良的 MS 培养基附加 2, 4-D 诱导出体细胞胚胎, 并获再生植株。随后, Lazzeri 等^[25]、Ranch 等^[26]、Barwale 等^[27]、Finer 等^[28]分别用大豆未成熟胚和未成熟子叶诱导胚状体获得了再生植株。其中, Finer 等^[28]报道的体细胞胚胎悬浮培养被认为是较好的再生体系。该系统的优点是: (一) 胚性细胞团中可增殖的胚性细胞处于表面或近表面, 且能在许多位点上形成体细胞胚, 这些胚性细胞接受外源基因能力较强, 有利于转化; (二) 在胚性细胞团增殖培养过程中, 由于培养液与胚性细胞团充分接触, 这样在筛选时能更好的解决嵌合体问题。大豆未成熟胚被认为是体细胞胚胎发生途径理想的外植体。

1.3 其他组织培养再生途径

植物原生质体培养也是一种重要的再生体系, 与利用大豆外植体培养再生植株相比, 其优越性在于容易摄取外源遗传物质, 但是获得植株困难, 培养过程繁杂, 工作量大, 再生周期长, 不同基因型差异很大, 再生效率低, 以及相关的遗传转化方法(电击

法、脂质体法、PEG 法)的转化效果也不理想, 所以在一定程度上限制了该研究在遗传转化上的应用^[29]。

植物花药培养研究起始于 20 世纪 50 年代初期, 大豆花药培养目前面临的主要是如何突破由愈伤组织诱导出苗以及如何解决诱导频率低等问题, 如果这些问题得到解决, 将会加速大豆新品种的选育。

2006 年, Franklin G 等^[30]报道了一种新的大豆再生体系——“Florigenesis”, 在 MS 培养基中附加 TDZ 和 NAA 直接诱导成熟子叶外植体开花, 产生种荚、获得种子。该方法不经过体细胞胚或器官等植株再生途径, 在较短的时间内获得种子, 突变体少, 但是存在后代不育的问题。

2 大豆遗传转化方法

植物转基因方法主要有基因枪法、农杆菌介导法、花粉管通道法、PEG 法、电激法、超声波法、碳化硅纤维法等。大豆遗传转化中主要应用的是农杆菌介导法、基因枪法和花粉管通道法。

2.1 农杆菌介导法

根癌农杆菌介导的遗传转化法是利用根癌农杆菌侵染受伤植物时, 可将其质粒上的一段 DNA(T-DNA)整合到受体植物基因组中, 并能够稳定地在植物体内进行遗传表达的一种转化方法。从 Horsch 等^[31]首次使用该方法获得转基因植物报道以来, 已有众多利用此方法获得转基因植物的报道。主要适合于大多数双子叶植物和一些单子叶植物, 其技术简单成熟, 耗资少, 转化率相对较高, 可以转化较大的外源基因片段(≥ 50 kb), 外源基因多以单拷贝形式存在, 没有明显的基因重排现象, 后代分离遵循孟德尔遗传规律等诸多优点。Hinchee 等^[32]首次以子叶为外植体利用农杆菌侵染法获得转基因大豆。他们从 100 个大豆栽培品种中筛选出 3 个对农杆菌敏感的大豆基因型 Maple Presto, Peking 和 Dolmat, 他们用含有 *NPT II* 和 *GUS* 基因或 *NPT II* 和 *Glyphosate* 基因进行转化, 经过检测证明得到转基因大豆, 转化率为 6%。对其后代进行遗传学分析表明, 分离规律符合孟德尔遗传分离规则。随后 Owens 等^[33]、Kudirka 等^[34]、Byrne 等^[35]研究者们对大豆基因型、农杆菌菌株致瘤能力、转化条件等做了大量的研究, 这一时期国内学者王连铮等^[36]利用农杆菌的 15 个菌株对 2 759 个大豆品种的致瘤能力进行了研究, 筛选出 7 个致瘤能力较强的菌株和 858 份作为外源基因转化受体材料。近年来, 大量的研究者^[37-48]进一步对大豆敏感型、农杆菌的转化能力、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 等对减轻受体材料褐化等方面进行了详细地研究, 均获得了转基因大豆。实践证明, 根癌农杆菌介导大豆子叶节的遗传转化体系, 具有在大约 3 个月的时间内获得再生植株、外植体不受时间、季节限制的优点, 但是由于外植体经过激素诱导产生的不定芽起源于多细胞, 易产生嵌合体植株。2006 年, Wang 等^[49]报道了一种农杆菌介导半种子的遗传转化系统, 将消毒的大豆种子用无菌水浸泡 24 h, 直接取子叶节外植体进行农杆菌转化, 共培养时间延长为 5 d, 其转化率达到了 1.4% ~ 7.8%。Liu 和党尉等^[48, 50]以大豆胚尖为外植体, 最高转化率分别达到了 15.8% 和 18%, 是现有报道中效率较高的转化体系。由于胚尖体积小, 表面光滑, 胚尖顶端处有较强的分生能力, 使得共培养时间由 3 d 延长至 5 d, 农杆菌还能被有效的抑制, 并且胚尖对卡那霉素较敏感, 从而有效地解决了嵌合体问题, 是一种较为理想的转化系统。

另外, 也有研究将农杆菌转化方法辅以其他方法, 如超声波辅助农杆菌转化法(SAAT)、真空抽滤辅助农杆菌转化法、甘露醇处理与农杆菌结合法、基因枪与农杆菌结合法等也得到了发展, 这些方法的应用将会进一步提高农杆菌介导的转化效率。

2.2 基因枪法

基因枪转化法是利用被加速的、包被着 DNA 的微金属颗粒轰击植物组织细胞, 从而将外源基因转移至几乎所有的植物细胞、组织、器官或原生质体的一种转化方法, 广泛应用于对农杆菌不敏感的植物转化^[51, 52]。这种转化方法对外植体的基因型没有依赖性, 具有相对高的转化率, 而且可以转移多拷贝的重组 DNA 或者 DNA 片段。但是与农杆菌转化法相比耗资大, 转移的外源基因片段小(≥ 10 kb), 易发生基因重组, 引起基因沉默。

Klein 等^[53]首次在洋葱上证明了基因枪转化法的可行性。McCabe 等^[54]以叶芽分生组织为靶细胞进行轰击, 首次获得了转基因植株。Christou 等^[55]利用电击转化法获得了 *Gus* 基因和 *HPT* II (潮霉素磷酸转移酶) 基因同时稳定表达的转化细胞系。Finer 等^[56]轰击胚性悬浮细胞获得转基因植株, Sato 等^[57]用带有 *Gus* 基因的质粒轰击大豆未成熟胚尖和大豆悬浮细胞获得转基因植株, Falco 等^[58]、Stewart 等^[59]、苏彦辉等^[60]、Aragao 等^[43]、Ponappa 等^[60]、王萍等^[62]、Keito 等^[63]都通过基因枪法获得了转基因大豆植株。

2.3 花粉管通道法

大豆离体再生以及遗传转化困难性高, 不经过离体组织培养的转化系统对解决大豆遗传转化具有重要价值。20 世纪 70 年代, 我国学者周光宇提出了花粉管通道法, 利用植物在授粉后, 花粉在雌蕊柱头上萌发形成的花粉管通道, 使外源 DNA 或基因进入胚囊, 转化尚不具备正常细胞壁的卵、合子或早期胚胎细胞。

1987 年, 雷勃钊^[64]等以半野生大豆龙 793433-1 为供体, 提取其总 DNA, 以黑农 35 为受体, 通过花粉管通道将外源 DNA 导入, 获得高产、高蛋白、抗病转基因大豆新品种黑生 101, 这是我国通过花粉管通道法育成的第一个大豆品种。1997 年, 刘德璞等^[65]通过花粉管通道法获得了生育期、生长习性、株高、节数、分支数等均倾向供体的抗大豆花叶病毒(SMV)的转基因植株。1999 年, 徐香玲等^[40]将几丁质酶基因转入到栽培大豆品种中, 通过分子水平检测证明获得了转基因植株。2006 年, 刘德璞等^[66]以吉林 20 号、吉林 30 号、吉林 45 号为供试材料, 通过花粉管通道法, 将雪花莲凝集素(*Galanthus nivalis* agglutinin, GNA) 基因进行转化, 通过接蚜鉴定和 PCR 检测, 从中筛选出转基因植株, 后代分离符合孟德尔规律, 转化率约为 1%。但是, 迄今为止, 用这些方法所得到的转基因植物只经过 DNA 斑点杂交、RAPD 和同工酶分析鉴定, 而没有经 DNA Southern blotting 验证。

其他非组培遗传转化方法, 如利用农杆菌介导的植物整体转化法也取得了一定进展。2008 年, 王全伟等^[67]以大豆幼苗的顶端生长点和叶腋生长点为靶点, 利用注射法进行转录因子 DREB1C 基因的遗传转化, 最终获得 6 株 T₀ PCR 阳性转基因植株, 转化率为 9.2%。T₁ 植株的 PCR、Southern blotting 和 RT-PCR 鉴定结果表明获得 1 株阳性植株。该方法克服了大豆组织培养再生难、转化率低的缺点, 是一种简单、快捷的非组培遗传转化途径。

2.4 其他转化方法

电激法是利用高压脉冲在原生质体膜上形成瞬间通道来摄取外源 DNA 的一种转化方法。由于原生质体培养技术复杂, 所以与原生质体结合的电激法研究的较少。以此法进行研究报告的有 Christou 等^[68]、Jones 等^[69]、Dhir 等^[70], 转化的基因多以报告基因或选择标记基因, 未见以其他目的基因获得转基因大豆再生植株的报道。

聚乙二醇介导法(PEG)是利用生物生理功能来实现外源基因的导入。该方法在水稻、高粱、小麦等重要粮食作物中获得了转基因植株。在国内, 卫志

明等^[71]用 PEG 法将外源基因导入到大豆的原生质体中获得了 27 棵转基因植株,转化效率为 0.6%,这是首例通过原生质体转化途径获得再生植株的报道。南相日等^[72]通过 PEG 法将 BT (*Bacillastharrirgiensis* CryIAC) 毒蛋白基因导入到大豆主栽品种黑农 35、黑农 37、合丰 25 和合丰 35 的原生质体中,经 PCR 检测, Southern 杂交分析,证明 BT 毒蛋白基因已整合到大豆基因组中。

碳化硅纤维是一种无机结晶光纤须状物,一般试验所用直径约 0.1~1 μm,长度范围为 10~200 μm。1991 年,Asano 等^[73]用碳化硅纤维法对小糠草进行了研究,其过程是:将消毒处理的碳化硅纤维与受体悬浮细胞混合,离心后去掉上清,加入带有目的基因的质粒溶液后重悬离心,反复数次,再用超声波处理,获得了转基因植株。2006 年,Khalafalla 等^[74]用碳化硅纤维法将 GFP 基因导入到大豆悬浮细胞中,通过 PCR 扩增和 Southern blotting 杂交检测,证明外源基因已经稳定整合到大豆基因组中,与基因枪法比较,碳化硅纤维法具有转化效率高、成本低、操作简单等优点。

3 大豆转基因的发展趋势

最近几十年来大豆遗传转化技术获得了一定的发展,部分转基因大豆也已经商业化,但是总体来说大豆的遗传转化技术尚未成熟。高效的组织培养再生体系是大豆遗传转化的重要前提,至今还没有建立一种高效、稳定、快捷、简便的应用于大豆转化的再生体系,现有的再生系统往往不能与植物遗传转化方法很好的结合,这是限制大豆遗传转化技术发展的关键因素之一。目前,农杆菌介导的大豆子叶节转化法是大豆遗传转化中最常用的体系,但易产生嵌合体,后期的筛选工作量大;而大豆未成熟胚经体细胞胚胎发生途径与基因枪结合的转化体系,利用未成熟胚形成体细胞胚胎,虽然可以克服嵌合体现象,但存在着体细胞胚培养时间较长,再生率低,容易突变,转化率低,再生植株不育,转化植株易产生基因沉默等缺点。同时,这两个体系均存在基因型依赖性。因此,需要进一步优化大豆组织培养条件和遗传转化体系。此外,研究外源基因在植物体中的稳定表达和遗传,也是大豆遗传转化技术的一个重要课题。目前,用于大豆遗传转化的目的基因主要是抗除草剂、BT、几丁质酶以及一些报告基因和筛选基因,而与大豆品质相关的外源基因应用较少,所以改善大豆品质相关基因的研究可能是今后大豆遗传转化研究的热点。

大豆遗传转化技术目前面临的另外一个重要问题是生物安全性问题。大豆遗传转化中常用的筛选基因主要是抗生素基因和除草剂抗性基因,然而这些基因存在可能影响人类身体健康,破坏生态环境,因此,去除转基因大豆中筛选基因显得尤为重要,如何去除筛选标记基因将是大豆遗传转化研究的一个必然趋势。

参考文献:

- [1] 刘海坤,卫志明.大豆遗传转化研究进展[J].植物生理与生物学报,2005,31(2):126-134.
- [2] 刘圣君,黄健秋,卫志明.影响农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化的因素[J].分子细胞生物学报,2007,40(5):286-292.
- [3] 王萍,王罡,季静.大豆转基因体系的研究进展[J].遗传,2004,26(6):969-976.
- [4] Kimball S L, Bingham E T. Adventitious bud development of soybean hypocotyl sections in culture[J]. Crop Science, 1973, 13: 758-760.
- [5] Cheng T Y, Saka T, Voqui Dinh T H. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture[J]. Plant Sci Lett, 1980, 19: 91-99.
- [6] Barwale U B, Kerns H R, Widholm J M. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis[J]. Planta, 1986, 167: 473-481.
- [7] 周思君,尹光初,雷勃钧,等.从大豆幼胚诱导器官发生再生植株[J].大豆科学,1990,9(4):285-291.
- [8] Seth Mante, Ralph Scorza, John Cordis. A simple, rapid protocol for adventitious shoot development from mature cotyledons of (*Glycine max*) cv Bragg[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 1989, 25(4):385-388.
- [9] Gai Jinyi, Guo Zhibiao. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from germinated cotyledon of the soybean[J]. Soybean Genetics Newsletter, 1997, 24(3):41-44.
- [10] 陈云昭,王玉国.大豆外植体培养再生植株的研究[J].山西农业大学学报,1983,3(1):41-45.
- [11] 杨振棠,陈泽光.大豆叶片的离体培养及再生植株的诱导[J].科学通报,1984(16):1012-1016.
- [12] Weight M S, Ward D V, Hinchee M A, et al. Regeneration of soybean (*Glycine max* L. Merr.) from cultured primary leaf tissue[J]. Plant Cell Reports, 1987, 6: 83-89.
- [13] JooHag Kim, Clifford E, LaMotte, et al. Plant regeneration in vitro from primary leaf nodes of soybean (*Glycine max*) seedlings[J]. Plant Physiol, 1990, 136: 664-669.
- [14] 吉林省农业科学院作物育种所大豆组织培养组.从大豆下胚轴愈伤组织诱导植株成功[J].植物学报,1976,18(3):258-262.
- [15] 杜娟,田立国,母秋华,等.大豆体细胞胚胎发生及植株再生[J].吉林农业科学,1995,3:13-14.

- [16] Kaneda Y, Tabei Y, Nishimura S. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.) [J]. Plant Cell Reports, 1997, 17: 8– 12.
- [17] 程林梅, 孙 毅. 大豆不同外植体植株再生的研究 [J]. 中国油料作物学报, 1998, 20(2) : 21– 24.
- [18] 张晓娟, 方小平, 罗丽霞, 等. TDZ 和 BA 对诱导大豆胚轴植株再生的影响 [J]. 中国油料作物学报, 2000, 22 (1) : 24– 26.
- [19] Tsai Ying Cheng, Hitoshi Saka, Thanh H Voquir dinh. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture [J]. Plant Science Letters, 1980, 19: 91– 99.
- [20] Yue Sheng Yang, Kiyomi Wada, Yuzo Futsuhara. Comparative studies of organogenesis and plant regeneration in various soybean explants [J]. Plant Science, 1990, 72: 101– 108.
- [21] 袁 鹰, 刘德璞, 郑培和, 等. 大豆组织培养再生植株研究 [J]. 大豆科学, 2001, 20(1) : 9– 13.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] Christianson M L, Warnick D A, Carlson P S. A morphogenetically competent soybean suspension culture [J]. Science, 1983, 222: 632– 634.
- [25] Lazzeri P A, Hildebrand D F, Collins G B. A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean [J]. Plant Mol Biol Rep, 1985, 3: 160– 167.
- [26] Ranch J P, Oglesby L, Zielinski A C. Plant regeneration from embryo derived tissue cultures of soybeans [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 1985, 21 (11) : 653– 658.
- [27] Barwale U B A R Kems, Widholom J M. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis [J]. Planta, 1986, 167: 473– 481.
- [28] Finer J. Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean (*Glycine max* L. Merrill) [J]. Plant Cell Rep, 1988, 7: 238– 241.
- [29] 王昌陵, 李英慧, 吕淑霞, 等. 农杆菌介导的大豆遗传转化研究进展 [J]. 杂粮作物, 2007, 27(3) : 195– 198.
- [30] Franklin G, Sheeba C J. “Florigenesis”: a novel pathway of plant regeneration in soybean [J]. Plant Cell Reports, 2006.
- [31] Horsch R B, Fry J E, Hoffman N L, et al. A simple and general method for transferring genes into plants [J]. Science, 1985, 227: 1229– 1234.
- [32] Hinchee M A W, Connor Ward A V, Newell C A. Production of transgenic soybean plant using *Agrobacterium* mediated gene transfer [J]. Bio Technol, 1988, 6: 915– 922.
- [33] Owens Lowell D, Cress Dean. Genotypic variability of soybean response to *Agrobacterium* strains harboring the Ti or Ri plasmids [J]. Plant Physiol, 1985, 77(1) : 87– 94.
- [34] Kudinka 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.
- [35] Byme Michael C, McDonnell Rymond E, Wright Martha S, et al. Strain and cultivars specificity in the *Agrobacterium* soybean interaction [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1987, 8: 3– 15.
- [36] 王连铮, 尹光初, 罗教芬, 等. 大豆致瘤及基因转移研究 [J]. 中国科学(B), 1984, 2: 137– 141.
- [37] Parrott W A, Hoffinan L M, Hildebrand D F, et al. Recovery of primary transformants of soybean [J]. Plant Cell Reps, 1989, 7: 615– 617.
- [38] Di R, Purcell V, Collins G B, et al. Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene [J]. Plant Cell Reps, 1996, 15: 746– 750.
- [39] 徐香玲, 李兴华, 刘伟华, 等. Ri 质粒介导大豆花叶病毒外壳蛋白基因转化的研究 [J]. 大豆科学, 1996, 15 (4) : 284– 287.
- [40] 徐香玲, 邹联沛, 刘伟华, 等. 向大豆导入几丁质酶基因初步的研究 [J]. 大豆科学, 1999, 18(2) : 101– 107.
- [41] Zhang Z Y, Xing A Q, Staswick Paul, 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.
- [42] Yan B, Srinivasa Reddy M S, Collins G B, et al. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using immature zygotic cotyledon explants [J]. Plant Cell Reps, 2000, 20: 1090– 1097.
- [43] Aragao F J L, Sarokin L, Vianna G R, et al. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency [J]. Thero Appl Genet, 2000, 101: 1– 6.
- [44] Paula M Olhoft, Lex E Flagel, Christopher M Donovan, et al. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary node method [J]. Plant Cell Reps, 2002, 20: 101– 109.
- [45] Schmid M A, Parrott W A. Quantitative detection of transgenes in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] and peanut (*Arachis hypogaea* L.) by real time polymerase chain reaction [J]. Plant Cell Reps, 2002, 17: 752– 759.
- [46] 卜云萍, 王广科, 胡国武. 深黄被孢酶 Δ 6 脂肪酸脱氢酶基因导入大豆 [J]. 生物技术, 2003, 13(3) : 6– 8.
- [47] 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, 5 (7) : 23– 35.

- [48] 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.
- [49] Margie M Paz, Juan Carlos Martinez, Andrea B Kalvig, *et al.* Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium* mediated soybean transformation [J]. *Plant Cell Rep*, 2006, 25: 206– 213.
- [50] 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– 193.
- [51] 郭志江, 丁在松, 王金明, 等. 农杆菌介导遗传敏感基因型小麦的筛选鉴定 [J], *华北农学报*, 2008, 23(4): 81– 84.
- [52] 王晓春, 李 静, 王 萍, 等. 基因枪法对大豆进行 CpTI 基因的遗传转化 [J]. *华北农学报*, 2007, 22(2): 10– 14.
- [53] Klein T M, Wolf E D, Wu R, *et al.* High velocity micro projectiles for delivering nucleic acids into living cells [J]. *Nature*, 1987, 327(7): 70– 73.
- [54] McCabe D E. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration [J]. *Bio Technology*, 1988, 6: 923 – 926.
- [55] Christou P, Swain W F. Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1989, 86: 7500– 7504.
- [56] Finer J J, McMullen M D. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue [J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1991, 27: 175– 182.
- [57] Sato S, Newell C, Kolacz K, *et al.* Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems [J]. *Plant Cell Rep*, 1993, 12: 408– 413.
- [58] Falco S C, Cuisa T, Locke M, *et al.* Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine [J]. *Bio Technol*, 1995, 13: 577– 587.
- [59] Stewart C N, Adang M J, All J N, *et al.* Genetic transformation, recovery, and characterization of soybean (*Glycine max* L. Merrill) transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis* CRYIAC gene [J]. *Plant Physiol*, 1996, 112: 121– 129.
- [60] 苏彦辉, 王慧丽, 俞梅敏, 等. 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因导入大豆的研究 [J]. *植物学报*, 1999, 41 (10): 1046– 1051.
- [61] Ponappa T, Brzozowski A E, Finer J J. Transient expression and stable transformation of soybean using the jellyfish green fluorescent protein [J]. *Plant Cell Reps*, 1999, 19: 6– 12.
- [62] 王 萍, 王 罡, 吴 颖, 等. 影响大豆基因枪遗传转化因子的研究 [J]. *农业生物技术学报*, 2002, 10(3): 36 – 37.
- [63] Keito N Y. A red fluorescent protein, DsRed2, as a visual reporter for transient Expression and stable transformation in soybean [J]. *Plant Cell Rep*, 2006, 1, 122– 127.
- [64] 雷勃钧, 卢翠华, 钱 华, 等. 高产抗病高蛋白大豆新品种黑生 101 [J]. *大豆通报*, 1998, 1: 17.
- [65] 刘德璞, 廖 林, 袁 鹰, 等. 导入外源 DNA 获得抗 SMV 大豆品系 [J]. *大豆科学*, 1997, 16 (4): 277– 282.
- [66] 刘德璞, 袁 鹰, 唐克轩, 等. 大豆花粉管通道技术转化雪花莲凝集素 (GNA) 基因 [J]. *分子植物育种*, 2006, 4(5): 663– 669.
- [67] 王全伟, 张海玲, 白 晶, 等. 农杆菌介导的大豆植株整体转化 [J]. *大豆科学*, 2008, 27(2): 190– 193.
- [68] Chirstou P, Swain W F. Cotransformation frequencies of foreign genes in soybean an cell cultures [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1990, 79: 337– 341.
- [69] Jones B, Davey M R. Direct gene up take and regeneration of transgenic shoots from protoplasts of *Glycine argyrea* Tind [J]. *Soybean Genetics Newsletter*, 1991, 18(4): 183– 186.
- [70] Dhir S K. Cotransformation frequencies of foreign genes in soybean an cell cultures [J]. *Plant Cell Reports*, 1991, 10: 97– 101.
- [71] 卫志明, 黄健秋, 徐淑萍, 等. 植物遗传国家重点实验室年报 [R]. 1996: 36– 37.
- [72] 南相日, 刘文萍, 刘丽艳, 等. PEG 介导 BTA 基因转化大豆原生质体获得转基因植株 [J]. *大豆科学*, 1998, 17 (4): 326– 329.
- [73] Asano Y, Otsuki Y, Ugaki M. Electroporation mediated and silicon carbide fiber mediated DNA delivery in *Agrostis alba* L (Redtop) [J]. *Plant Sci*, 1991, 79: 247– 252.
- [74] Mutasin M, Khalafalla, Hany A Et Shemy *et al.* Efficient production of transgenic soybean (*Glycine max* [L] Merrill) plants mediated via whisker supersonic (WSS) method [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2006, 5 (18): 1594 – 1599.