

引进大豆种质遗传转化适用基因型的筛选

吴 帅,王志坤,蓝 岚,曾 蕊,宋 波,拓 云,刘珊珊

(东北农业大学 大豆研究所,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:以引进种质“越黑”、“越褐”、Moshidou Gong503(半野生种)、日 A、日 B₁、日 B₂的子叶节为受体材料,采用农杆菌介导法转入抗虫基因 *cryI*,筛选组织培养适应性强,转化效率高的引进大豆种质。并对适宜遗传转化的基因型在萌发阶段和芽诱导阶段的适宜 6-BA 浓度进行筛选。结果表明:参试品种中“越褐”为适用于子叶节器官发生途径的基因型;萌发阶段添加浓度为 0.1 mg·L⁻¹ 的 6-BA,可获得最佳轴根比,此时的无菌苗下胚轴粗壮无须根;萌发阶段和芽诱导阶段 6-BA 的最佳浓度分别为 0.1 和 1.7 mg·L⁻¹。

关键词:大豆;引进种质;遗传转化;基因型;筛选

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2012)01-0029-05

Screening of the Optimal Acceptor Genotypes in Introduced Soybean Germplasm

WU Shuai, WANG Zhi-kun, LAN Lan, ZENG Rui, SONG Bo, TUO Yun, LIU Shan-shan

(Soybean Institute, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: *cryI* gene was transformed into soybean cotyledon nodes of 6 foreign soybean germplasm by *Agrobacterium*-mediated method and screened the optimal acceptor genotype by comparing the callus induction, regeneration and etiolate rate. Then the suitable 6-BA concentration for germination and induction mediums of the optimal genotype was studied. The results indicated that the induction, differentiation and etiolation rate were obviously different between soybean genotypes. Among the 6 introduced soybean germplasm, ‘Yuehe’ was optimal for tissue culture and genetic transformation. The best hypocotyl-radicle ratio could be obtained when the concentration of 6-BA was 0.1 mg·L⁻¹. The optimal concentration of 6-BA for ‘Yuehe’ transformation was 0.1 and 1.7 mg·L⁻¹ in germination medium and bud induction medium, respectively.

Key words: Soybean; Introduced germplasm; Genetic transformation; Genotype screening

在遗传转化过程中,基因型是影响转化率的重要因素之一,筛选再生能力较强的基因型是高频率诱导大豆再生植株的先决条件,也是大豆遗传转化高效受体系统建立的前提。大豆组织培养对基因型有明显的依赖性^[1],不同基因型大豆之间由于遗传背景与生理组成的不同,再生频率和植株的转化效率差异很大^[2-3]。外植体的分化能力也具有显著的基因型效应,王萍等^[4]评价了 8 个常见大豆基因型胚尖诱导不定芽的效率,确定基因型间的不定芽诱导率和芽数均存在较大的差异。另外,不同基因型大豆对农杆菌的敏感性也有差别^[5]。可见,不同基因型的外植体对于再生和转化效率均有重要影响^[6]。但以往大豆遗传转化的过程中,所用的外植体材料主要局限于地方品种、品系、近缘野生种等,很少有以引进外来种质作为转化受体的研究。引入国外优良大豆种质资源并改良其遗传组成,是丰

富我国大豆遗传基础,提高育种水平的有效途径^[7]。利用引进优良种质进行大豆遗传转化,可以在转入目的基因的同时引进新的遗传背景,对大豆抗虫转基因研究和转基因种质资源创新均有重要意义。鉴于此,该研究以 6 个引进大豆种质为材料,利用农杆菌介导的子叶节转化系统,通过比较不同基因型子叶节愈伤组织的诱导、分化及黄化率的差异,筛选出组培特性好,综合性状优良,利用潜力大的转基因受体基因型,并对其进行 6-BA 适宜浓度的筛选,为提高抗逆性转基因大豆新品种培育提供了新材料,同时拓宽了大豆遗传转化种质资源的范围。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为东农 50,日本引进品种:日 A,日

收稿日期:2011-10-29

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31071440);黑龙江省普通高等学校青年骨干支持计划项目(1155G12);博士后研究人员落户黑龙江科研启动项目(2009HB009);转基因生物新品种培育重大专项资助项目(2011ZX08004-004-006-002)。

第一作者简介:吴帅(1985-),女,在读硕士,研究方向为大豆遗传育种。E-mail:xiaowulai.0903@163.com。

通讯作者:刘珊珊(1972-),女,教授,博士生导师,研究方向为大豆遗传育种。E-mail:ars336699@yahoo.com.cn。

B₁, 日 B₂, Moshidou Gong503 (半野生种) 和越南引进品种“越黑”和“越褐”。

农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株为 LBA4404, 由东北农业大学大豆研究所提供, 植物表达载体为 pCAMBIA 3301-*cryI*, 含有 CaMV35S 启动子和筛选标记 (*bar*) 基因 (图 1)。

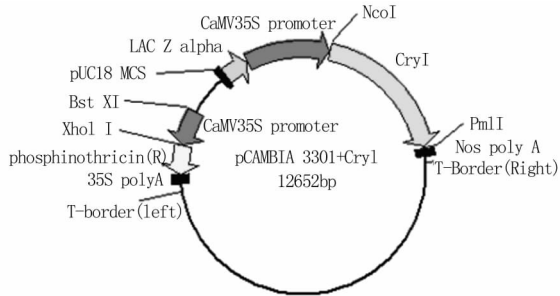


图 1 3301-*cryI* 基因的植物表达载体

Fig. 1 Plant expression vector
pCAMBIA 3301-*cryI*

1.2 试验方法

1.2.1 基因型筛选 以再生体系成熟的东农 50 为标准, 比较不同基因型大豆种质的丛生芽诱导率、分化率及黄化率, 筛选适宜转化的基因型。具体方法如下: 挑选粒大、饱满、无病斑、成熟大豆种子 (每份材料 100 粒, 4 次重复), 经氯气消毒, 接种到萌发培养基 (GM, B5 粉末 $3.21 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蔗糖 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 琼脂粉 $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 6-BA $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.8) 上, 在 24°C 、18 h 光照、6 h 黑暗条件下培养, 5~7 d 后获得无菌苗, 取出无菌苗, 去掉种皮, 保留 3~5 mm 下胚轴, 去掉顶芽和腋芽, 在子叶节处纵向用手术刀制造伤口 5~8 条, 获得外植体, 将含有目的基因 *cryI* 的农杆菌 LBA4404 培养至 OD 值为 0.6~1.0, 离心弃上清, 用液体共培养基将离心后的菌体重悬至菌液 OD 值为 0.5~0.8, 将之前获得的外植体浸泡到重悬的菌液中, 28°C 、 $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、浸染 30 min 后, 无菌滤纸吸干外植体表面残留菌液后接种到固体共培养基 (CCM, B5 粉末 $0.321 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 6-BA $1.67 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, MES $3.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 乙酰丁香酮 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 赤霉素 $0.25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, DTT $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, L-半胱氨酸 $8.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 琼脂粉 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.4) 中, 暗培养 3 d, 然后分别用无菌水和芽诱导液体培养基冲洗子叶节, 各 3 遍, 之后用滤纸吸干, 接种到固体芽诱导培养基 (SIM, B5 粉末

$3.21 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, MES $0.59 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 琼脂粉 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 头孢噻肟钠 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 6-BA $1.67 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.6) 上, 培养时间为 7 d, 记录丛生芽的平均分化率 (丛生芽诱导率 = 出丛生芽的外植体数/外植体总数 $\times 100\%$) 和平均诱导率 (丛生芽分化率 = 丛生芽数/出丛生芽的外植体数 $\times 100\%$), 最后将丛生芽接种到含 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的草铵膦的固体芽诱导培养基上, 筛选 7~15 d, 观察并记录丛生芽的平均黄化率 (丛生芽黄化率 = 黄化丛生芽数/出丛生芽的外植体数 $\times 100\%$)。

1.2.2 萌发培养基中 6-BA 浓度的确定 萌发培养基配方为 B5 粉末 $3.21 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蔗糖 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 琼脂粉 $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.8, 激素 6-BA 设 0、0.1 和 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 共 3 个浓度, 以“越褐”为试验材料, 每个处理播种 6 瓶, 每瓶 16 粒, 2 次重复, 7 d 后统计每个处理的萌发情况。

1.2.3 芽诱导培养基中 6-BA 浓度的确定 丛生芽诱导培养基配方为 B5 粉末 $3.21 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, MES $0.59 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 琼脂粉 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 头孢噻肟钠, pH 5.6, 激素 6-BA 设 0、0.1 和 $1.67 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 3 种浓度, 以“越褐”为试验材料, 与萌发培养基设计的 3 个梯度交互配比, 完全随机设计, 每个处理 2 次重复, 7 d 后统计丛生芽的平均诱导率和平均分化率。

1.3 数据分析

采用 Excel 2003 和 DPS 7.05 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 引进种质中适于遗传转化大豆基因型的筛选

如图 2 所示, 在相同的萌发培养条件下, 日 B₁ (图 2-3)、日 B₂ (图 2-4) 和“越褐” (图 2-7) 的萌发水平与东农 50 (图 2-1) 相当; Moshidou Gong503 (图 2-5) 的萌发率很低, 仅有 46% 左右; “越黑” (图 2-6) 和日 A (图 2-2), 只是吸水膨胀, 略微萌发。

如图 3 所示, $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的草铵膦对供试种质有筛选作用, 丛生芽能够承受该选择压力, 并且产生的嵌合体较少, 日 A (图 3-2), 日 B₁ (图 3-3)、日 B₂ (图 3-4) 的外植体黄化水平相当; Moshidou Gong503 (图 3-5) 和“越褐” (图 3-6) 部分外植体严重褐化死

亡,黄化水平与东农 50 相当。

从表 1 中可以看出,在 6 个品种中,“越褐”丛生芽的平均诱导率和平均分化率最高,平均诱导率为 51.14%,其它基因型的平均诱导率在 25% ~ 35% 之间,“越褐”和其它品种(系)的平均诱导率,平均分化率达到显著水平差异;“越黑”没有丛生芽

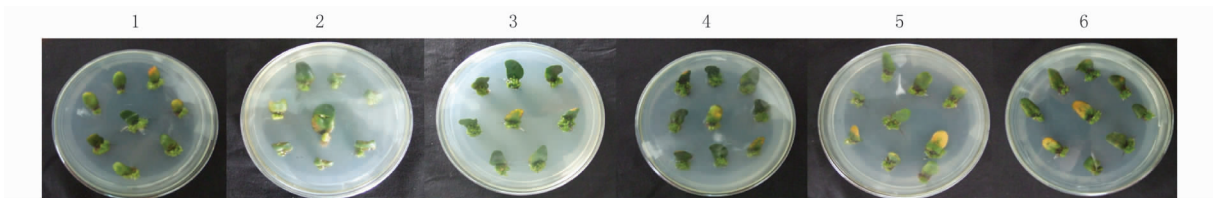
的分化,为不能再生的基因型。在不影响筛选的同时,“越褐”的平均黄化率最低,为 51.04%。以上结果表明:不同基因型种子的萌发情况及子叶节的丛生芽分化能力、黄化程度均明显不同,6 份引进种质中,“越褐”为适用于子叶节器官发生途径的基因型。



1. 东农 50; 2. 日 A; 3. 日 B₁; 4. 日 B₂; 5. Moshidou-Gong503; 6. 越黑; 7. 越褐
1. Dongnong50; 2. RiA; 3. RiB₁; 4. RiB₂; 5. Banyesheng; 6. Yuehei; 7. Yuehe

图 2 供试种质萌发情况的比较

Fig. 2 Germination comparison of test germplasm



1. 东农 50; 2. 日 A; 3. 日 B₁; 4. 日 B₂; 5. Moshidou-Gong503(半野生种); 6. 越褐
1. Dongnong50; 2. RiA; 3. RiB₁; 4. RiB₂; 5. Banyesheng; 6. Yuehe

图 3 草铵膦对供试大豆种质丛生芽的影响

Fig. 3 Effect of glufosinate on tested soybean buds

表 1 供试大豆基因型的诱导率,分化率,黄化率比较

Table 1 Comparison of induction, differentiation and etiolation rate of tested soybean genotypes

基因型 Genotypes	外植体总数 No. of total explants	分化丛生芽的外植体数 No. of explants with shoots	平均诱导率 Average of induction rate/%	每个外植体芽数 Shoot No. per cotyledonary node	平均分化率 Average of differentiation rate/%	黄化外植体总数 No. of etiolation explants	平均黄化率 Average of etiolation rate/%
东农 50 Dongnong50	704	627	88.88 ± 0.02a	3-4	3.33 ± 0.19a	308	48.30 ± 0.01d
日 A RiA	400	118	29.05 ± 0.03de	0-1	0.45 ± 0.03d	75	62.50 ± 0.02b
日 B ₁ RiB ₁	680	239	35.22 ± 0.01c	2-3	2.16 ± 0.02c	148	62.35 ± 0.02b
日 B ₂ RiB ₂	694	230	33.17 ± 0.02cd	2-3	2.13 ± 0.06c	170	73.92 ± 0.02a
Moshidou Gong503	414	103	24.84 ± 0.01e	1-2	1.98 ± 0.08c	57	55.56 ± 0.02c
越黑 Yuehei	378	0	0 ± 0f	0	0 ± 0e	0	0 ± 0e
越褐 Yuehe	719	363	51.14 ± 0.03b	2-3	2.72 ± 0.06b	185	51.04 ± 0.01cd

数据为 4 次重复的平均数,同列数字后面的不同字母表示在 0.05 水平上差异显著。

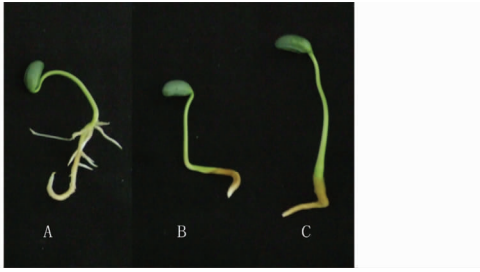
Data represented means of four replicates. Values within the same column followed by different letter indicates the significance at 0.05 level.

2.2 “越褐”遗传转化体系的优化

2.2.1 萌发培养基中 6-BA 浓度的确定

将“越褐”播种在不同浓度的 6-BA 萌发培养基中,结果如图 4 所示,未添加 6-BA 萌发培养基中萌发的无菌

苗,下胚轴细长且有大量须根(图 4-A);添加 6-BA 萌发培养基上萌发的无菌苗,下胚轴粗壮且无须根(图 4-B 和 C),当 6-BA 的浓度为 0.1 mg·L⁻¹时,可获得最佳轴根比(图 4-B)。



A. $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; B. $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; C. $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

图4 不同浓度6-BA萌发培养基上“越褐”无菌苗萌发情况

Fig. 4 'Yuehe' seedlings germinated on mediums with different 6-BA concentrations

表2 不同6-BA浓度对“越褐”不定芽形成的影响

Table 2 Effect of 6-BA on the differentiation of multiple shoots from cotyledonary nodes 'Yuehe'

组合 Combination	萌发培养基 6-BA 浓度 6-BA concentrations in GM/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	芽诱导培养 基6-BA 浓度 6-BA concentrations in SIM/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	外植体数 No. of total explants		分化丛生芽 的外植体数 No. of explants with shoot		平均诱导率 Average of induction rate/%	每个外植体芽数 No. of shoot per cotyledonary node	平均分化率 Average of differentiation rate /%
			I	II	I	II			
A	0	0	113	128	31	11	$18.01 \pm 0.09\text{e}$	0-1	$0.73 \pm 0.10\text{c}$
B	0	0.1	129	109	29	21	$20.87 \pm 0.02\text{de}$	1-3	$2.50 \pm 0.50\text{b}$
C	0	1.7	117	142	44	30	$29.37 \pm 0.08\text{de}$	2-3	$2.75 \pm 0.38\text{ab}$
D	0.1	0	123	138	70	86	$59.61 \pm 0.03\text{bc}$	2-3	$2.49 \pm 0.18\text{b}$
E	0.1	0.1	129	155	89	92	$64.17 \pm 0.05\text{b}$	2-3	$2.37 \pm 0.07\text{b}$
F	0.1	1.7	158	134	142	124	$91.21 \pm 0.01\text{a}$	3-4	$3.57 \pm 0.20\text{a}$
G	1	0	142	131	36	51	$32.14 \pm 0.07\text{de}$	2-3	$2.93 \pm 0.13\text{ab}$
H	1	0.1	132	154	64	41	$37.55 \pm 0.11\text{de}$	2-4	$3.06 \pm 0.16\text{ab}$
I	1	1.7	147	117	62	49	$40.32 \pm 0.02\text{cd}$	2-3	$2.47 \pm 0.31\text{b}$

数据为2次重复的平均数,同列数字后面的不同字母表示在0.05水平上差异显著。

Data represented means of two replicates. Values within a column followed by different letter indicates the significance at 0.05 level.

3 结论与讨论

以往的研究表明,不同大豆基因型之间的诱导、继代、增殖和分化等特性均表现出较大差异^[8]。该研究筛选了6个引进大豆种质,其中,不同基因型引进大豆种质之间的萌发程度,诱导、分化能力及黄化水平等特性表现出明显差异,其中,日A和“越黑”萌发状态不佳,无法获得遗传转化的外植体;Moshidou Gong503只有少数种子萌发后可以获得外植体,且外植体个体较小,不利于实际操作;日B₁和日B₂萌发状态良好,但黄化率相对较高,丛生芽大量褐化死亡,不是遗传转化理想的基因型;在同样的培养条件下,“越褐”无论从丛生芽的诱导率,分化率,还是黄化率上都明显优于其它几个品种。另外,课题组对该种质进行综合鉴定分析表

2.2.2 “越褐”芽诱导培养基中6-BA浓度的确定

如表2所示,组合F的平均诱导率显著高于其它组合;组合F的平均分化率高于其它组合,且与组合A、B、D、E和I差异均达显著水平。在种子萌发阶段6-BA浓度为 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,在芽诱导阶段6-BA浓度为 $1.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,不定芽的诱导率和分化率分别达到最高值,且每个外植体上生长3~4个芽,有利于不定芽分化,此浓度配比组合适合于引进种质“越褐”的不定芽诱导。

明,“越褐”的根瘤成瘤能力强,豆荚抗食心虫抗性好而且种子异黄酮含量高^[9-12],将“越褐”应用于转基因抗虫大豆育种,可以在转入目的基因的同时引进新的遗传背景及优良特性,有利于转基因抗虫新品种的选育。

尽管6-BA对植物萌发及生长的调节机理尚未明晰,但目前的研究表明,适宜的6-BA浓度对大豆种子萌发和丛生芽分化均有明显的促进作用^[13],而且6-BA在种子萌发和芽分化2个时期存在激素的平衡,随着6-BA浓度的增大,诱导的丛生芽数越多,分化的芽也越多,当芽数过多时就会出现相互抑制现象,丛生芽之间的相互抑制作用导致丛生芽不易伸长,生长一段时间会出现黄化、脱落等现象。刘莉等^[14]认为一般以丛生芽数少于5个为好。鉴于以上原因,该研究在确认可保证“越褐”获得最佳

轴根比的 6-BA 浓度的基础上,进一步通过交互配比试验,对其在萌发及芽诱导阶段的最佳 6-BA 浓度配比进行了筛选。结果表明:适宜浓度的 6-BA 可以促进“越褐”种子的萌发,提高芽诱导阶段的诱导率和分化率。另外,在萌发阶段添加浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA,芽诱导阶段添加浓度为 $1.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 时,“越褐”的诱导率最高,每个外植体分化的芽数为 3~4 个,且长势良好,此浓度配比对其它外植体类型是否适用,还有待于进一步的研究验证。

参考文献

- [1] 李军,李霞,陈杭.大豆茎尖离体培养再生植株[J].植物生理学通讯,2001,37(2):134. (Li J, Li X, Chen H. In vitro culture and plantlet regeneration of shoot tip of soybean[J]. Plant Physiology Communications, 2001, 37(2):134.)
- [2] 王升吉,吴元华,王洪岩,等.大豆不同外植体组织培养及再生研究[J].沈阳农业大学学报,1999,30(3):255-259. (Wang S J, Wu Y H, Wang H Y, et al. Studies on regeneration of culture of different exophytes in soybean[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 1999, 30(3):255-259.)
- [3] 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. (Yuan Y, Liu D P, Zheng P H, et al. Regeneration of soybean tissue culture [J]. Soybean Science, 2001, 20(1):9-13.)
- [4] 王萍,张淑珍,李文滨,等.大豆不同基因型胚尖不定芽的诱导及对抗生素的敏感性[J].作物杂志,2010(2):50-53. (Wang P, Zhang S Z, Li W B, et al. Induction of adventitious shoots from embryonic tip of different soybean genotypes and their sensibility to antibiotics[J]. Crops, 2010(2):50-53.)
- [5] 林树柱,曹越平,卫志明.根瘤农杆菌介导的大豆遗传转化[J].生物工程学报,2004,20(6):817-820. (Lin S Z, Cao Y P, Wei Z M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of soybean [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2004, 20(6):817-820.)
- [6] 武小霞,李静,姜成涛,等.大豆子叶节再生中植物生长调节剂浓度及基因型筛选[J].中国油料作物学报,2011,33(2):123-129. (Wu X X, Li J, Jiang C T, et al. Optimization of regeneration system from soybean cotyledonary node [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2011, 33(2):123-129.)
- [7] 葛玉君,高丽辉,田福东,等.7S 球蛋白亚基含量变异大豆种质的性状鉴定[J].中国油料作物学报,2008,30(2):174-178. (Ge Y J, Gao L H, Tan F D, et al. Agronomic and quality characteristics of soybean germplasm identification by various subunit deficiency of 7S globulin [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2008, 30(2):174-178.)
- [8] 成丹,孔肖菡,杨梦,等.6-BA 对种子萌发和幼芽生长的作用研究[J].安徽农业科学,2009,37(33):16725-16726. (Cheng D, Kong X H, Yang M, et al. Study on the effects of 6-BA on the seed germination and sprout growth [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(33):16725-16726.)
- [9] Fischer D C, Kogan M, Paxton J. Effect of glyceollin, a soybean phytoalexin, on feeding by three phytophagous beetles (*Coleoptera*: *Coccinellidae* and *Chrysomelidae*): dose versus response [J]. Environmental Entomology, 1990, 19(5):1278-1282.
- [10] Huang A S, Hsieh O A L, Chang S S. Characterization of the nonvolatile minor constituents responsible for the objectionable taste of defatted soybean flour [J]. Food Science, 1982, 47(1):19-23.
- [11] Rivera-Vargas L I, Schmitthenner A F, Graham T L, et al. Soybean flavonoid effects on and metabolism by *Phytophthora sojae* [J]. Phytochemical Analysis, 1993, 32(4):851-857.
- [12] 刘珊珊,刁桂珠,王志坤,等.中国和越南大豆种质资源贮藏蛋白亚基组成的鉴定[J].中国油料作物学报,2008,30(4):511-513. (Liu S S, Diao G Z, Wang Z K, et al. Characterization and evaluation for subunit composition of storage protein in soybean germplasm [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2008, 30(4):511-513.)
- [13] 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.)
- [14] 刘莉,赵桂兰.大豆子叶节组织培养再生研究[J].吉林农业科学,1999,24(5):16-19. (Liu L, Zhao G L. Soybean cotyledon node tissue culture regeneration [J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 1999, 24(5):16-19.)