

大豆子叶节和胚尖再生体系的比较及大豆 *SR1* 基因的遗传转化

姚丙晨¹, 沈艳茹¹, 韩雪², 王琳琳¹, 刘春燕², 胡国华^{2,3}, 陈庆山¹

(1. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农垦科研育种中心, 黑龙江 哈尔滨 150090; 3. 国家大豆工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150050)

摘要:以合丰 23 和合丰 35 的子叶节和胚尖为外植体, 通过农杆菌介导对抗大豆疫霉根腐病基因 *SR1* 进行遗传转化。结果表明:合丰 35 胚尖和子叶节体系的出芽率(96.1% 和 79.1%)均显著高于合丰 25(66.45% 和 74.4%);胚尖转化体系的平均再生周期(40 d)低于子叶节转化体系(68 d);在诱导培养基上培养 20 d 时胚尖转化体系的转化效率(96.1%)高于子叶节体系(77.8%)。以合丰 35 胚尖为外植体成功转化大豆抗疫霉根腐病基因 *SR1*, 共获得 6 株转基因植株。

关键词:大豆;子叶节;胚尖;*SR1*;遗传转化

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2012)03-0364-04

Comparison with Cotyledonary Node and Embryonic Tip Regeneration System in Soybean [*Glycine max*(L.) Merrill] and Genetic Transformation of *SR1*

YAO Bing-chen¹, SHEN Yan-ru¹, HAN Xue², WANG Lin-lin¹, LIU Chun-yan², HU Guo-hua^{2,3}, CHEN Qing-shan¹

(1. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang; 2. Crop Research and Breeding Center of Land-Reclamation, Harbin 150090, Heilongjiang; 3. National Research Center of Soybean Engineering and Technology, Harbin 150050, Heilongjiang, China)

Abstract: In this study, the soybean cotyledonary node and embryonic tip were used as explants to transform *SR1* gene into Hefeng 25 and Hefeng 35, which are susceptible to soybean *Phytophthora* root rot. The results showed that the regeneration of Hefeng 35 reached 96.1% and 79.1%, in embryonic tip and cotyledon node system, respectively, which was significantly higher than that of Hefeng 25 (66.45% and 74.4%). The mean regeneration period of Hefeng 35 in embryonic tip and cotyledonary node transformation system was 40 and 68 d, respectively. When the explants of the two systems grew on the SIM or SEM for 20 days, the regeneration frequency of embryonic tip (96.1%) was higher than that in cotyledonary node transformation system (77.8%). The *SR1* gene was transferred into Hefeng 35 by embryonic tip explants, and obtained 6 transgenic plants.

Key words: Soybean; Cotyledonary node; Embryonic tip; *SR1*; Genetic transformation

大豆是世界上重要的油料作物和植物蛋白来源之一,通过基因工程手段改良大豆具有重要的意义^[1]。大豆遗传转化方法主要有农杆菌介导法、基因枪法、电激法、PEG法、显微注射法和花粉管通道法。其中,农杆菌介导法具有操作简单、效率高、周期短和拷贝数低等众多优点,是目前最常用的大豆遗传转化方法。但目前其它双子叶植物上的转化体系在大豆上的应用还存在着一些问题。这主要是因为大豆外植体和农杆菌之间存在互作,农杆菌侵染植物外植体会引起植物的防卫反应,这些反应会引起外植体的褐化,从而影响遗传转化效率^[2]。自 1980 年 Cheng 等^[3]第一次成功的报道了利用大

豆子叶节外植体在 B5 培养基上成功再生以后,研究人员利用未成熟胚^[4],上胚轴和初生叶^[5-6],初生叶节^[7],下胚轴^[8]和整个子叶节^[9]建立了多种再生体系。不同再生体系的转化效率存在较大差异,其中子叶节和胚尖具有较高的遗传转化效率, Liu 等^[10]利用胚尖作为外植体转化效率达到 15.8%; Paz 等^[11]以无菌水浸泡 16 h 的子叶节为外植体进行转化,遗传转化效率达到了 1.4%~7.8%。该研究以合丰 35 和合丰 25 的子叶节和胚尖为外植体,转化抗大豆疫霉根腐病基因 *SR1* 基因,为大豆疫霉根腐病转基因抗病研究奠定基础。

收稿日期:2012-02-23

基金项目:转基因专项(2009ZX08009-013B);公益性行业(农业)科研专项(200903003)。

第一作者简介:姚丙晨(1986-),男,在读硕士,研究方向为大豆遗传育种。E-mail:bchyaog@gmail.com。

通讯作者:陈庆山(1973-),男,教授,博士,研究方向为大豆生物技术。E-mail:qshchen@126.com。

胡国华(1951-),男,研究员,博士,研究方向为大豆遗传育种。E-mail:hugh757@vip.163.com。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 大豆品种为黑龙江省主栽品种合丰 25 和合丰 35,均为疫霉根腐病感病品种。

表 1 农杆菌介导大豆子叶节转化的过程中应用的培养基

Table 1 Culture medium used for *Agrobacterium* - mediated cotyledonary-node transformation in soybean

培养基 Medium	培养基配方 Medium ingredient
YEP	5 g·L ⁻¹ 酵母膏 + 10 g·L ⁻¹ 胰蛋白胨 + 10 g·L ⁻¹ NaCl
萌发培养基 GM ^[12]	B ₅ 无机物 + B ₅ 有机物 + 2% 蔗糖 + 1 mg·L ⁻¹ 6-BA + 0.7% 琼脂, pH 5.8
侵染培养基 LCM ^[13]	1/10B ₅ 无机物 + B ₅ 有机物 + 3% 蔗糖 + 3.9 g·L ⁻¹ MES + 0.25 mg·L ⁻¹ GA3 + 1.67 mg·L ⁻¹ BAP + 40 mg·L ⁻¹ AS, pH 5.4
共培养培养基 CCM ^[13]	1/10B ₅ 无机物 + B ₅ 有机物 + 3% 蔗糖 + 3.9 g·L ⁻¹ MES + 0.25 mg·L ⁻¹ GA3 + 1.67 mg·L ⁻¹ BAP + 40 mg·L ⁻¹ AS + 400 mg·L ⁻¹ Cys + 154.2 mg·L ⁻¹ DTT + 158 mg·L ⁻¹ 0.5% 琼脂, pH 5.4
芽诱导培养基 SIM ^[11]	B ₅ 无机物 + B ₅ 有机物 + 3% 蔗糖 + 0.59·L ⁻¹ MES + 0.7% 琼脂 + 1.67 mg·L ⁻¹ 6-BA + 50 mg·L ⁻¹ 头孢噻肟钠, pH 5.7
芽伸长培养基 SEM ^[12]	MS 无机物 + B ₅ 有机物 + 0.59 g·L ⁻¹ MES + 3% 蔗糖 + 50 mg·L ⁻¹ 天冬酰胺 + 100 mg·L ⁻¹ 焦谷氨酸 + 0.1 mg·L ⁻¹ IAA + 0.5 mg·L ⁻¹ GA3 + 1 mg·L ⁻¹ 玉米素核苷 + 50 mg·L ⁻¹ 头孢噻肟钠 + 0.7% 琼脂, pH 5.7
生根培养基 RM ^[12]	1/2MS 无机物 + 1/2 B ₅ 有机物 + 2% 蔗糖 + 0.59 mg·L ⁻¹ MES + 0.7% 琼脂粉, pH 5.6

表 2 农杆菌介导大豆胚尖转化的过程中应用的培养基

Table 2 Culture medium used for *Agrobacterium* - mediated embryonic tips transformation of soybean

培养基 Media	培养基成分 Composition
侵染培养基 LCM ^[10]	1/10B ₅ 无机物 + B ₅ 有机物 + 3% 蔗糖 + 3.9 g·L ⁻¹ MES + 0.25 mg·L ⁻¹ GA3 + 3.5 mg·L ⁻¹ BAP + 40 mg·L ⁻¹ AS, pH 5.4
共培养培养基 CCM ^[10]	1/10B ₅ 无机物 + B ₅ 有机物 + 3% 蔗糖 + 3.9 g·L ⁻¹ MES + 0.25 mg·L ⁻¹ GA3 + 3.5 mg·L ⁻¹ BAP + 40 mg·L ⁻¹ AS + 400 mg·L ⁻¹ Cys + 154.2 mg·L ⁻¹ DTT + 158 mg·L ⁻¹ 0.5% 琼脂, pH 5.4
芽伸长培养基 SEM ^[12]	MS 无机物 + B ₅ 有机物 + 0.59 g·L ⁻¹ MES + 3% 蔗糖 + 50 mg·L ⁻¹ 天冬酰胺 + 100 mg·L ⁻¹ 焦谷氨酸 + 0.1 mg·L ⁻¹ IAA + 0.5 mg·L ⁻¹ GA3 + 1 mg·L ⁻¹ 玉米素核苷 + 50 mg·L ⁻¹ 头孢噻肟钠 + 0.7% 琼脂, pH 5.7
生根培养基 RM ^[12]	1/2MS 无机物 + 1/2 B ₅ 有机物 + 2% 蔗糖 + 0.59 mg·L ⁻¹ MES + 0.7% 琼脂粉, pH 5.6

1.2 方法

1.2.1 工程菌制备 通过冻融法^[14]将质粒转入农杆菌中。采用杜升伟等^[15]的方法制备工程菌。

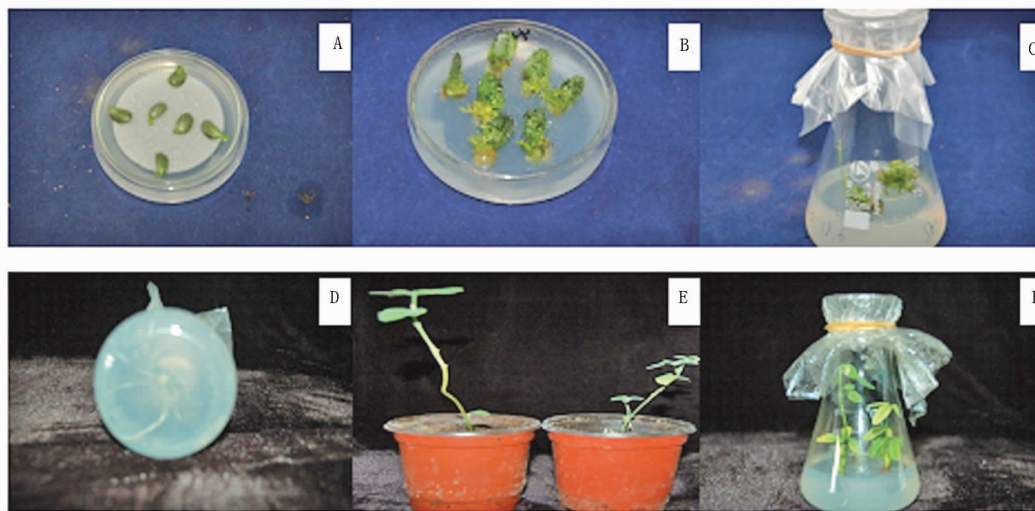
1.2.2 大豆子叶节遗传转化方法 挑选健康无病害的大豆种子,采用氯气消毒法^[16]进行种子消毒,消毒后的大豆种子在萌发培养基中培养 5~7 d。用无菌手术刀去掉种皮,留下 2~3 mm 下胚轴,去掉真叶,在子叶节处纵向划 5~7 刀。将制备好的外植体浸泡在用 LCM 重悬的农杆菌菌液中,28℃,130 r·min⁻¹ 侵染 30 min,用无菌滤纸吸干外植体表面残留菌液后将外植体切口向下置于共培养培养基上,24℃ 暗培养 3 d(图 1A)。用无菌水和液体的 SIM 冲洗外植体各 3 次,滤纸吸干外植体上残留的液体,接种到芽诱导培养基上培养 7 d,再将外植体接种到含卡那霉素浓度为 100 mg·L⁻¹ 的芽诱导培养基上培养 14 d(图 1B)。将长有丛生芽的外植体移至芽伸长培养基,每 14 d 继代 1 次(图 1C)。当

1.1.2 菌株和质粒 农杆菌菌株为 LBA4404, CaMV35S 调控的植物表达载体 *pBI121-SR1*,由黑龙江省农垦科研育种中心实验室保存。

1.1.3 培养基 试验所用的培养基及其成分见表 1 和表 2。

芽伸长至 3 cm 时,将其从底部切下在 1 mg·L⁻¹ 的 IBA 中浸泡 1 min 后转移至生根培养基(图 1D);待根长到粗壮后将再生苗转入土壤、蛭石、营养土(1:1:1)的混合基质中生长结实(图 1E)。

1.2.3 大豆胚尖遗传转化方法 消毒后的大豆种子在无菌水中浸泡 16 h(25℃),去掉种皮,去除子叶和原叶,分离得到胚尖外植体,将制备好的外植体浸泡在重悬的农杆菌菌液中,在 28℃,100 r·min⁻¹ 暗培养 16 h,用无菌滤纸吸干外植体表面残留菌液后将外植体切口向下置于共培养培养基上,24℃ 暗培养 5 d。用无菌水洗净转移到芽伸长培养基上,培养 7 d,然后将外植体转移至含有卡那霉素浓度为 100 mg·L⁻¹ 的芽诱导培养基上培养 14 d,每 14 d 继代 1 次(图 1F)。当抗性芽长至 3~5 cm 时将其切下转至生根培养基中,待根足够健壮时移栽到土壤中在人工气候室生长结实。



A: 子叶节体系中的共培养; B: 子叶节体系中的芽诱导; C: 子叶节体系中的芽伸长; D: 生根培养; E: 移栽; F: 胚尖体系中的芽伸长

A: Co-culture in cotyledonary node system; B: Shoot buds induction in cotyledonary node system; C: Shoots elongation in cotyledonary node system; D: Rooting culture; E: Plantlets in greenhouse; F: Shoots elongation in embryonic tip system

图1 大豆遗传转化及植株再生

Fig. 1 Genetic transformation and plant regeneration of soybean

1.2.4 转基因大豆的鉴定 PCR 扩增检测采用杜升伟等^[15]的方法。PCR 扩增引物如下:

Forward; 5'-CCCGGGTGGTCAGTCCCTTATG-3'

Reverse; 5'-ATGGGTAGGGCGAACA-3'

2 结果与分析

2.1 不同大豆品种的再生率的比较

由表3可知,合丰35的出芽率和植株再生率在2种外植体再生体系中均高于合丰25,因此,初步确定合丰35适宜大豆疫霉根腐病抗病基因SR1的遗传转化。

2.2 子叶节和胚尖转化体系的比较

2.2.1 芽诱导率 以合丰35为材料,对大豆胚尖和子叶节外植体进行再生培养,如图2所示,培养20d时胚尖再生体系平均芽诱导率为96.1%,44.2%的外植体可以产生4个以上的芽;子叶节再

生体系平均芽诱导率为79.1%,58.2%的外植体可以产生4个以上的芽,胚尖的芽诱导率一直高于子叶节再生体系。

2.2.2 再生周期 由于胚尖再生体系不需要种子萌发过程,以及芽再生周期相对较短等原因,再生周期为40d,子叶节再生周期为68d。并且具体过程中胚尖不用反复继代,大大简化了操作步骤。

2.3 抗性植株的获得及转基因植株的检测

2.3.1 抗性植株的获得 用含pBI121-SR1质粒的农杆菌LBA4404,采用改进的胚尖遗传转化体系对合丰35进行遗传转化。获得移栽成活植株13棵。

2.3.2 转基因植株的PCR检测 提取抗性植株的DNA,以pBI121-SR1质粒DNA为阳性对照,同一基因型未转化植株的DNA为阴性对照,以无菌水代替模板DNA为负对照。以pBI121质粒设计一段引物,进行PCR扩增,经1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR

表3 合丰25和合丰35子叶节和胚尖体系中的再生率

Table 3 Regeneration frequency of Hefeng 25 and Hefeng 35 in cotyledonary node and embryonic tip system

基因型 Genotypes	外植体类型 Types of explants	外植体数 No. of explants		出芽率 Bud regeneration rate/%			植株再生率 Plant regeneration rate/%		
		I	II	I	II	平均 Average	I	II	平均 Average
合丰25 Hefeng 25	子叶节	100	98	64.4	66.5	66.45	1	2	1.5
	胚尖	97	95	78.6	70.2	74.4	0	0	0
合丰35 Hefeng 35	子叶节	102	94	80.4	77.8	79.1	8	10	9
	胚尖	92	91	96.4	95.8	96.1	24	31	27.5

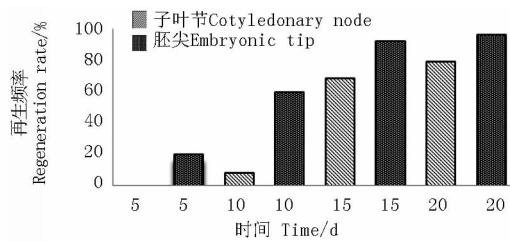
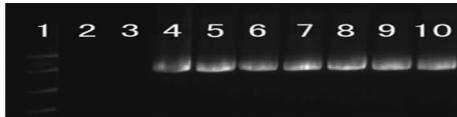


图2 2种再生体系在相同时间再生频率的比较

Fig.2 Comparison of regeneration frequency between the two regeneration systems

扩增产物。结果有6株转化植株呈现出与阳性对照一致的带型,阴性对照和负对照没有相应的带型(图3)。初步证明 *SR1* 基因整合到大豆基因组中。



1: DL5000 DNA 分子质量标准;2:阴性对照;3:负对照;4~9:转化植株;10 阳性对照

1: DL5000 DNA Maker; 2: Wild type; 3: Negative control; 4-9: PCR positive plants; 10: Positive control

图3 转基因大豆的 PCR 检测结果

Fig.3 PCR amplification of transgenic soybean

3 讨论

采用改进的胚尖遗传转化体系转化合丰35获得了较高的再生效率,也显著缩短了大豆再生周期,同时具有操作简便、重复性好,再生率高等优点。张东旭认为^[17]胚尖和子叶节2种外植体产生差异的原因有以下2个:(1)激素吸收方式不同:胚尖具有胚根和胚轴,其运输系统完善,有利于吸收激素和营养物质,而子叶节主要通过细胞表面扩散进入,效率可能较低;(2)胚尖在接种到SEM阶段加入激素,这个时期胚尖处于细胞萌动状态,胚尖分生能力较强,而子叶节在萌发培养基上接种5~7d,细胞已经形成了锥形的芽组织,不易引起丛生芽,袁鹰等^[18]也认为激素配合使用对丛生芽诱导有利。

农杆菌对外植体的感染时间直接影响遗传转化效率,感染时间过长会对外植体产生伤害,这种伤害会导致外植体坏死。而胚尖转化系统可以承受较长的培养时间,一方面,胚尖系统外植体表面光滑,比较容易除去农杆菌,而子叶节系统外植体表面褶皱较多,农杆菌不易除去;另一方面,胚尖外植体有较强的分生能力,感染后期生长能够抑制农杆菌的生长,从而明显降低了坏死的可能。

参考文献

[1] 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):373-390. (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):373-390.)

- [2] 赵晓雯,吴芳芳,狄少康,等.农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化技术流程及操作要点[J].大豆科学,2011,30(6):363-368. (Zhao X W, Wu F F, Di S K, et al. Technique flow and key operation points of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of soybean cotyledonary node [J]. Soybean Science, 2011, 30(6): 363-368.
- [3] Cheng T Y, Saka H, Voqui-Dinh T H. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture[J]. Plant Science Letters, 1980, 19:91-99.
- [4] Barwale U B, Keans H R, Widholm J M. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis[J]. Planta, 1986, 167:473-481.
- [5] Wright 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.
- [6] Wright M S, Williams M H, Pierson P E, et al. Initiation and propagation of (*Glycine max* L. Merr.); Plants from tissue-cultured epicotyls[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1987, 8:83-90.
- [7] Kim J H, LaMotte C E, Hack E. Plant regeneration *in vitro* from primary leaf nodes of soybean (*Glycine max*) seedlings [J]. Journal of Plant Physiology, 1990, 136:664-669.
- [8] Dan Y, Reighceri N A. Organogenic regeneration of soybean from hypocotyls explants[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 1998, 34:14-21.
- [9] Ma X H, Wu T L. Rapid and efficient regeneration in soybean [*Glycine max*(L.) Merrill] from whole cotyledonary node explants [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2008, 30(2):209-216.
- [10] 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(6):1042-1049.
- [11] Paz M M, Martinez J C, Kalvig A B, et al. Improved cotyledonary node method using an alternative explants derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation [J]. Plant Cell Reports, 2006, 25:206-213.
- [12] Zhang Z Y, Xiang A Q, Staswick Q, et al. The use of glufosinate-ammonium as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1999, 56:37-46.
- [13] Olthoff P M, Somer D A. L-cysteine increases *Agrobacterium* mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary node cells [J]. Plant Cell Reports, 2001, 20:706-711.
- [14] Hfgen R, Willmitzer L. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation [J]. Nucleic Acids Research, 1988, 16:987.
- [15] 杜升伟,刘业丽,姚丙晨,等.大豆转化体系的优化和 *Dof4* 基因转入大豆的研究 [J]. 大豆科学, 2010, 29(6):398-402. (Du S W, Liu Y L, Yao B C, et al. Optimization of soybean transformation system and transferring *Dof4* gene into soybean [J]. Soybean Science, 2011, 30(6):363-368.

(下转第373页)

参考文献

- [1] 董英山. 中国野生大豆研究进展[J]. 吉林农业大学学报, 2008,30(4):394-400. (Dong Y S. Advances of research on wild soybean in China[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2008,30(4):394-400.)
- [2] 王志友,王昌陵,董丽杰,等. 辽宁省野生大豆种质资源及利用现状[J]. 杂粮作物,2008(4):241-243. (Wang Z Y, Wang C L, Dong L J, et al. Germplasm resources and utilization of wild soybean in Liaoning province[J]. Rain Fed Crops, 2008(4):241-243.)
- [3] Lee J D, Yu J K, Hwang Y H, et al. Genetic diversity of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. And Zucc.) accessions from south Korea and other countries crop [J]. Crop Science, 2008, 48(2):606-616.
- [4] 董英山,庄炳昌,赵丽梅,等. 中国野生大豆遗传多样性中心[J]. 作物学报,2000,26(5):521-527. (Dong Y S, Zhuang B C, Zhao L M, et al. The genetic diversity centers of annual wild soybean in China[J]. Acta Agronomica Sinica, 2000, 26(5):521-527.)
- [5] 丁艳来,赵团结,盖钧镒. 中国野生大豆的遗传多样性和生态特异性分析[J]. 生物多样性,2008,16(2):133-142. (Ding Y L, Zhao T J, Gai J Y. Genetic diversity and ecological differentiation of Chinese annual wild soybean (*Glycine soja*) [J]. Biodiversity Science, 2008, 16(2):133-142.)
- [6] 关媛,鄂文弟,王丽侠,等. 以湖南和湖北大豆为例分析影响遗传多样性评价的因素[J]. 作物学报,2007,33(3):461-468. (Guan Y, E W D, Wang L X, et al. Analysis of factors influencing the genetic diversity evaluation using two soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] collections from Hunan and Hubei [J]. Acta Agronomica Sinica, 2007, 33(3):461-468.)
- [7] 王果,胡正,张保缺,等. 山西省野生大豆资源遗传多样性分析[J]. 中国农业科学,2008,41(7):2182-2190. (Wang G, Hu Z, Zhang B Q, et al. Genetic diversity analysis of Shanxi's wild soybean (*Glycine soja*) [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(7):2182-2190.)
- [8] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8(19):4321-4325.
- [9] Xie H, Chang R Z, Cao Y S, et al. Selection of core SSR loci by using Chinese autumn soybean [J]. Scientia Agriculture Sinica, 2003, 36(4):360-366.
- [10] 高慧. 北方沿海滩涂野生大豆资源的收集与其遗传多样性的SSR分析[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2008;22. (Gao H. Collection and genetic diversity of the northern coastal wild soybean by SSR [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2008;22.)
- [11] 李建东,燕雪飞,董思言,等. 辽宁省野生大豆种质资源的SSR遗传多样性分析[J]. 大豆科学,2010,29(1):28-32. (Li J D, Yan X F, Dong S Y, et al. Analysis of genetic diversity of *Glycine soja* germplasm resources in Liaoning province [J]. Soybean Science, 2010, 29(1):28-32.)
- [12] 严茂粉,李向华,王克晶. 北京地区野生大豆种群SSR标记的遗传多样性评价[J]. 植物生态学报,2008,32(4):938-950. (Yan M F, Li X H, Wang K J, et al. Evaluation of genetic diversity by SSR markers for natural populations of wild soybean growing in the region of Beijing, China [J]. Journal of Plant Ecology, 2008, 32(4):938-950.)
- [13] 王丹,乔亚科,韩粉霞,等. 河北东部沿海地区野生大豆SSR多样性分析[J]. 大豆科学,2010,29(4):555-558. (Wang D, Qiao Y K, Han F X, et al. Genetic diversity of *Glycine soja* in eastern coastal area of Hebei province [J]. Soybean Science, 2010, 29(4):555-558.)
- [14] 李向华,田子罡,李福山,等. 考察新收集野生大豆与已保存野生大豆的遗传多样性比较[J]. 植物遗传资源学报,2003,4(4):345-349. (Li X H, Tian Z G, Li F S, et al. Genetic analysis of newly collected wild soybean materials and conserved germplasm collected from the same places [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2003, 4(4):345-349.)
- [15] 海林,王克晶,杨凯. 半野生大豆种质资源SSR位点遗传多样性分析[J]. 西北植物学报,2002,22(4):751-757. (Hai L, Wang K J, Yang K, et al. Genetic diversity of semi-wild soybean using SSR markers [J]. Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica, 2002, 22(4):751-757.)
- [16] 陈辉,张磊,张文明,等. 安徽省新收集野生大豆种质资源的SSR分析[J]. 中国农学通报,2008,24(3):345-349. (Chen H, Zhang L, Zhang W M, et al. SSR analysis of newly collected wild soybean germplasms from Anhui province [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008, 24(3):345-349.)
- [16] 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, 216:723-735.
- [17] 张东旭. 大豆胚尖再生体系的建立及E2基因遗传转化[D]. 保定:河北农业大学,2008;16. (Zhang D X. Establishment of an efficient plant regeneration system via embryonic tips of soybean and *Agrobacterium*-mediated E2 gene transformation using the embryonic tips explants [D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2008;16)
- [18] 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):129-131. (Yuan Y, Liu D P, Zheng P H, et al. Study on plant regeneration from soybean culture [J]. Soybean Science, 2001, 20(1):129-131.)

(上接第367页)