

## 农杆菌介导法将 *Bt(cry I A)* 基因导入大豆的研究

曲姗姗<sup>1,2</sup>, 刘丽君<sup>1</sup>, 寇坤<sup>1,2</sup>, 唐晓飞<sup>1</sup>, 杨喆<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>黑龙江省农业科学院大豆研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; <sup>2</sup>东北农业大学研究生院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:**构建含有 *Bt(cry I A)* 基因的植物表达载体 pCAMBIA3300-*Bt*, 以大豆子叶节为受体, 通过农杆菌介导法将 *Bt* 基因导入大豆品种黑农 37 中, 获得转基因植株。并进行大豆的再生和遗传转化系统优化的研究, 以获得较高的转化率。结果表明: 在 6-BA 浓度为  $1.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 丛生芽分化率最高。确定该品种大豆在丛生芽分化阶段的草铵膦筛选浓度为  $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。获得转化质粒 pCAMBIA3300-*Bt* 的转基因植株, 其中 T<sub>1</sub> 代 PCR 阳性植株 19 株。采用 real-time PCR 的方法对 T<sub>1</sub> 代抗性植株进行 *Bt* 基因的转录水平的分析, 初步证明 *Bt* 基因已整合到受体大豆的基因组内。

**关键词:**大豆; *Bt* 基因; 遗传转化

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2009)02-0186-05

## Transformation of -*Bt(cry I A)*- Gene into Soybean via *Agrobacterium*-mediated Method

QU Shan-shan<sup>1,2</sup>, LIU Li-jun<sup>1</sup>, KOU Kun<sup>1,2</sup>, TANG Xiao-fei<sup>1</sup>, YANG Zhe<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Soybean Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, Heilongjiang; <sup>2</sup>Graduate School of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

**Abstract:** It is very important for diseases and insect pests controlling to transfer some resistant genes to obtain transgenic resistant varieties. In this study, plant expression vector pCAMBIA3300-*Bt* containing -*Bt(cry I A)*- gene was constructed, and transgenic plants were obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (Heinong 37) cotyledonary nodes. We regenerated plants and optimized the conditions of transformation to increase the efficiency of transformation. It had the optimal rate of shooting when the concentration of 6-BA was  $1.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . The optimal selection concentration of Glufosinate-ammonium for shoot initiation was  $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Transformed plants containing pCAMBIA3300-*Bt* was obtained and 19 positive plants from T<sub>1</sub> generation were tested by PCR. Real-time PCR was used to investigate the transcription level of *Bt* gene in T<sub>1</sub> transgenic plants, it confirmed the integration of *Bt* genes into the genome of soybean.

**Key words:** Soybean; *Bt* gene; Genetic transformation

大豆是重要的粮油作物, 是植物蛋白的主要来源, 是我国主要农作物、经济作物之一, 在国内外市场上占有十分重要的地位。但目前在生产中病虫害成了限制大豆产量, 质量和降低出口等级的重要因素。世界每年因虫害造成的损失约占农作物产量的 15% 以上。导入具有目标性状的抗性基因, 获得转基因抗性品种, 对病虫害的防治具有重要的意义。大豆转基因研究始于 1984 年<sup>[1-2]</sup>, 在 1988 年 Hinchee 等首次获得大豆转基因植株<sup>[3]</sup>。关于大豆遗传转化方面的研究已有较多报道, 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。用此系统获得转化成功的再生植株已有很多报道<sup>[4-6]</sup>。采用农杆菌介导的大豆子叶节转化系统成功地将 *Bt(cry I A)* 导入大豆, 并对该系统进行了优化。

### 1 材料和方法

#### 1.1 受体材料、菌株、质粒

受体材料: 黑农 37, 由黑龙江省农业科学院大豆所提供。

菌株: 根癌农杆菌 LBA4404、根癌农杆菌

收稿日期: 2009-03-04

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2006AA1021F9); 国家转基因重大专项资助项目(2008ZX08004-002)。

作者简介: 曲姗姗(1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物基因工程与分子生物学。E-mail: qss3344@126.com。

通讯作者: 刘丽君, 研究员。E-mail: nkyssbd@126.com。

GV3101 为本实验室保存。

质粒:含有 *Bt(cry I A)* 基因的质粒 pGBI4A2B 质粒由黑龙江省农科院生物技术研究中心提供, pBI121-Hsf8 和植物表达载体 pCAMBIA3300 为本实验室保存。

## 1.2 植物表达载体的构建

质粒 DNA 提取、酶切与连接,大肠杆菌感受态制备,质粒转化大肠杆菌等,参照《分子克隆实验指南》。

## 1.3 农杆菌介导的遗传转化

1.3.1 6-BA 浓度对子叶节丛生芽分化的影响 以每瓶 5 个外植体接种于含有不同浓度 6-BA 的丛生芽分化培养基上,培养 15 d。3 次重复。计算分化率,分化率按分化的子叶节数占总子叶节的比率计算。

1.3.2 草铵膦筛选浓度确定 采取延迟筛选方式,将切取的子叶节在无筛选剂的芽诱导培养基中培养 3 d 左右,待子叶节上分化的芽点可见时,将其转到添加有不同浓度草铵膦的芽诱导培养基中对其进行筛选培养。草铵膦的浓度分别设置为 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mg·L<sup>-1</sup>。每种处理浓度接种 30 个外植体,培养 14 d,计算子叶节分化率。

### 1.3.3 遗传转化

菌液制备:从新鲜平板上挑单菌落接种于含有相同抗生素的液体 YEB 培养基中,28℃,200 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养 12~24 h。取出菌液,按 1:20 比例进行二次活化,28℃,200 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养 3~6 h,至 OD<sub>600</sub> 为 0.6 左右。以 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,弃上清,用 YEB 重悬菌液,用其进行侵染植物。

外植体制备:挑选无病、饱满的大豆种子进行氯气消毒。消毒后的种子接种于发芽培养基(1/2MSB + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> BA, pH 5.8)。发芽 5~6 d 后在离子叶节 2~3 mm 处切去下胚轴,在 2 片子叶中间纵切子叶节,去掉顶芽,在子叶的叶腋处划几刀。放入预培养培养基(B5 培养基 + 1.7 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> IBA, pH 5.7)。

遗传转化及筛选:将制备好的子叶节外植体放入重悬后的菌液中侵染 25~30 min。倒掉菌液,将外植体接近轴面朝下接种在共培养培养基(B5 + 1.7 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> IBA + 100 mg·L<sup>-1</sup> 阿魏酸, pH 5.2) 上,暗培养 3~4 d 后,用含 500 mg·L<sup>-1</sup> 头孢噻肟钠灭菌水漂洗 4~5 次,接种到除菌培养基(B5 + 1.7 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> IBA +

600 mg·L<sup>-1</sup> Cef, pH 5.7)。当子叶节部位有幼芽长出时将外植体接种到含草铵膦的筛选培养基(B5 + 1.7 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> IBA + 600 mg·L<sup>-1</sup> Cef, pH 5.7), 10 d 继代一次。待芽可见时,将外植体转入芽伸长培养基,培养基成分与不定芽诱导培养基大体相同,其中含草铵膦的浓度为筛选培养基中的一半。待丛生芽长至 3~4 cm 时,从芽基部将芽切下,并将芽的基部在过滤的 IBA(1 mg·mL<sup>-1</sup>) 中浸 1 min,再将芽接入生根培养基 MSB,诱导生根。

驯化移栽:待根系发达并长出两片以上复叶后,将封口膜逐渐打开,在培养瓶中驯化 5~7 d,洗净根部培养基,然后移入灭菌土(蛭石:草炭土:黑土 = 1:2:1) 的花盆中,遮光、保湿,逐渐降低湿度、增加光强直至正常栽培。

## 1.4 转基因植株的分子生物学检测

1.4.1 PCR 检测 应用软件 Primer Prieier 5.0 针对 35s-bar 基因设计特异性引物,引物序列为:

35s-bar S:5' - TTCGCAAGACCCTTCCTC -3'

35s-bar AS:5' - ACCCACGTTCATGCCAGTT -3'

PCR 扩增产物长度为 594bp

PCR 反应体系:反应体积为 20 μL(模板 DNA 1.0 μL, Taq 酶 0.12 μL, 10 × Buffer 2 μL, dNTP 1.6 μL, Mg<sup>2+</sup> 0.8 μL, 引物 10.8 μL, 引物 2 0.8 μL, 水 12.88 μL)。反应程序为 94℃, 5 min + 30 个循环(94℃, 30s; 55℃, 30s; 72℃, 30s) + 72℃, 10 min, 4℃ 保温。

1.4.2 T<sub>1</sub> 代抗性植株的 Real-Time PCR 检测 在温室中培养 T<sub>1</sub> 代转基因大豆植株与非转基因对照植株,分别提取转 *Bt* 的大豆植株与非转基因对照植株的叶片总 RNA,并将总 RNA 反转录成 cDNA。以大豆 lectin 基因为内参<sup>[7-8]</sup>,目的基因 *Bt* 及内参各设计 1 对引物。检测 *Bt* 基因的引物:F:5' - TG-GAGAACGCATTGAAAC -3' ; R:5' - GATGGAC-CAAAGATACCC-3'。检测 lectin 基因的引物:F:5' - CTTCGCCGCTTCCTTCAA-3' ; R:5' - GCCCATCTG-CAAGCCTTTT-3'。Real-Time PCR 反应在 Mx3000p·实时荧光定量 PCR 仪上进行。反应条件:95℃ 预变性 10 min; 95℃ 变性 30s 60℃ 复性 1 min, 40 个循环。

设置看家基因为 Normal, 黑农 37 叶片 cDNA 为 Calibrator, T07 I 的 T<sub>1</sub> 代植株叶片 cDNA 为 Unknow, 3 次重复,设目的基因和看家基因 NTC 各一个。绘

制扩增曲线,溶解曲线。

## 2 结果与分析

### 2.1 植物表达载体 pCAMBIA3300-Bt 的构建

质粒 pGBI4A2B 用 *BamH I* 和 *Sac I* 双酶切,回收大小约 1.8kb 的片段,含有 *Bt* 基因。质粒 pBI121-HSF8 用 *BamH I* 和 *Sac I* 双酶切,回收大小约 12kb 的片段,连接两个回收片段,构建出载体质粒 pBI121-Bt,见图 1,酶切鉴定见图 2。载体质粒 pBI121-Bt 用 *EcoR I* 和 *Hind III* 双酶切,回收大小约 2.8kb 的片段,含有 35S + *Bt* + NOS 完整表达结构。载体质粒 pCAMBIA3300 用 *EcoR I* 和 *Hind III* 双酶切,回收大小约 8.5kb 的片段,连接两个回收片段。构建出载体 pCAMBIA3300-Bt,见图 3。将连接产物

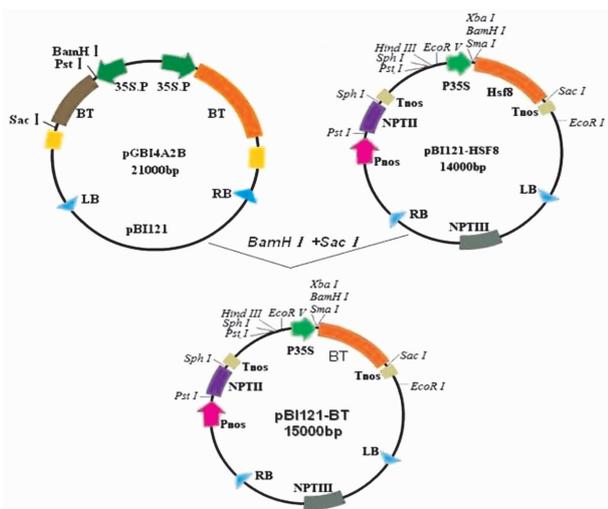
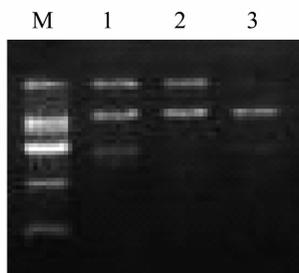


图 1 植物表达载体 pBI121-Bt 的构建

Fig. 1 Construction of plant expression vector pBI121-Bt



M: DL15000

1: pGBI4A2B BamH I + Sac I

2: pBI121-HSF8 BamH I + Sac I

3: pBI121-Bt BamH I + Sac I

图 2 植物表达载体 pBI121-Bt 的酶切鉴定

Fig. 2 Characterization of plant expression vector pBI121-Bt with endonucleases

转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,用 100 mg · L<sup>-1</sup> 的 Km 筛选重组子。对得到的重组子用 *EcoR I* 和 *Hind III* 双酶切鉴定(图 4),能切出与 pBI121-bt/*EcoR I* 和 *Hind III* 和 pCAMBIA3300/*EcoR I* + *Hind III* 同样大小两条带。pCAMBIA3300-bt 含有 35S 启动子,目标基因 *Bt* 和 NOS 终止子的完整表达结构,同时带有选择标记基因 *bar*。

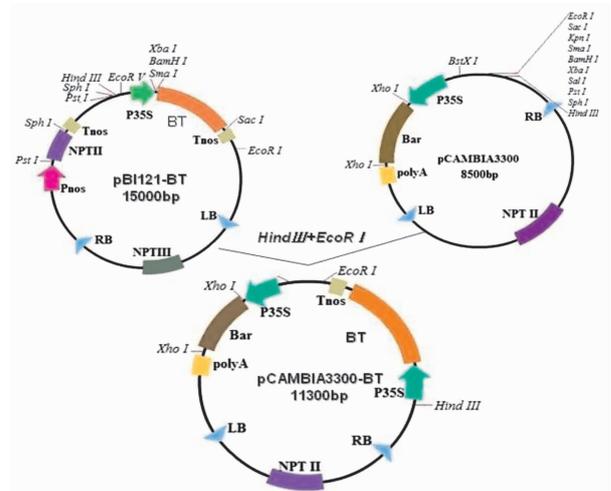
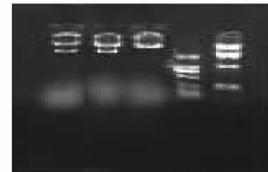


图 3 植物表达载体 pCAMBIA3300-Bt 的构建

Fig. 3 Construction of plant expression vector pCAMBIA3300-Bt

1 2 3 M



1: pBI121-Bt *EcoR I* + *Hind III*

2: pCAMBIA3300-Bt *EcoR I* + *Hind III*

3: pCAMBIA3300 *EcoR I* + *Hind III*

图 4 植物表达载体 pCAMBIA3300-Bt 的酶切鉴定

Fig. 4 Characterization of plant expression vector pCAMBIA3300-Bt with endonucleases

表 1 6-BA 浓度对子叶节丛生芽分化的影响

Table 1 6-BA on shoot regeneration

6-BA /mg · L <sup>-1</sup>	外植体数 Total explants	丛生芽数 Total shoots	分化率 Rate of shooting/%
1.0	30	14	46.7
1.3	30	19	63.3
1.7	30	24	80.0
2.0	30	12	40.0

表中数值为 3 次重复的平均数。

Values represent the mean of three replicate samples.

## 2.2 6-BA 浓度对子叶节丛生芽分化的影响

在前人基础上将 6-BA 设计了 4 个浓度梯度,分别为 1.0、1.3、1.7、2.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,进行丛生芽分化,结果表明,在 6-BA 浓度为 1.7  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,分化率最高。

## 2.3 草铵膦筛选浓度确定

9 个浓度的草铵膦对黑农 37 大豆子叶节外植体出芽率的影响如图 5 所示。当草铵膦浓度为 3.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,的子叶节分化率为 6.9%,显著低于对照,而且分化芽表现为白化。最终选择了 3.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的草铵膦浓度作为该大豆品种的选择压力。

## 2.4 $T_1$ 代植株目的基因检测

2.4.1 PCR 检测 以质粒 pCAMBIA3300-*Bt* 为阳性对照,非转基因再生苗黑农 37 为阴性对照,以无菌水代替模板 DNA 为负对照,以抗性植株总 DNA

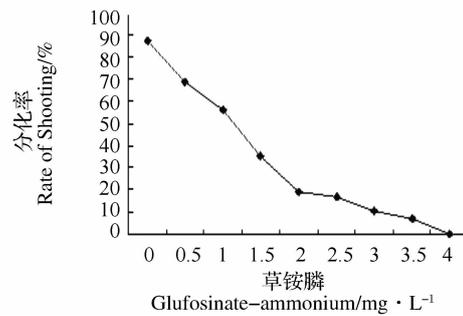
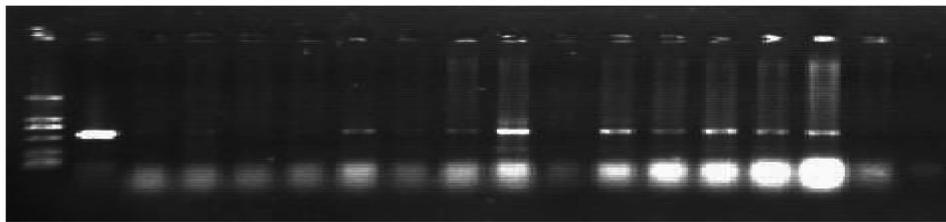


图 5 草铵膦对黑农 37 大豆子叶节丛生芽分化的影响

Fig. 5 Effect of Glufosinate-ammonium on the shoot regeneration of HeiNong 37 soybean cotyledonry

为模板,用检测 *35s-bar* 的引物进行 PCR 扩增。结果如图 6 所示,表明有 15 株抗性植株呈现 PCR 阳性,初步证明 *Bt* 基因已整合到大豆基因组中。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



M: DL2000; 1: 质粒 pCAMBIA3300-*bt* (阳性对照); 2~15: 部分  $T_1$  转化植株; 16: 黑农 37 (阴性对照); 17: 水对照

M: Marker DL2000; 1: positive control of pCAMBIA3300-*bt*; 2 to 15: DNA of  $T_1$  generation from independently transformed plants; 16: DNA from untransformed plant heinong 37 (negative control); 17: negative control of distill deionized water

图 6  $T_1$ 代大豆转基因植株的 PCR 检测部分结果

Fig. 6 The PCR analysis of genomic DNA in putative transgenic soybean plants  $T_1$  generation

2.4.2  $T_1$ 代转基因植株 *Bt* 表达量的 real-time PCR 检测 对转基因  $T_1$  植株 T08 I -001-1、T08 I -001-2、T08 I -002-1、T08 I -002-2、T08 I -002-3、T08 I -003-1、T08 I -003-2、T08 I -004-1、T08 I -004-2、T08 I -005-1、T08 I -005-2、T08 I -006-1、T08 I -006-2、T08 I -007-1、T08 I -007-2 进行 real-time PCR 检测。由图 7 可以看出,含有 *Bt* 基因的质粒 pCAMBIA3300-*Bt* 在 12 个循环时出现荧光信号,11 株植株基因组分别在 24-32 个循环时出现荧光信号,表明这些植株基因组中整合了外源基因,因此确定  $T_1$ 代植株 T08 I -001-2、T08 I -002-2、T08 I -002-3、T08 I -003-1、T08 I -003-2、T08 I -004-1、T08 I -004-2、T08 I -005-2、T08 I -006-2、T08 I -007-1、T08 I -007-2 为转基因植株。经溶解曲线分析基因的扩增的特异性和重复性良好,见图 8。下代转基因大豆植株 *Bt* 定量检测的 Ct 值如表 2 所示。

表 2  $T_1$ 代转基因大豆植株 *Bt* 定量检测的 Ct 值

Table 2 The Ct value of quantitative detection for *Bt* of transgenic soybean plants  $T_1$  generation

样品	引物	Ct	样品	引物	Ct
Sample	Primer	(dRn)	Sample	Primer	(dRn)
H <sub>2</sub> O	<i>lectin</i>	No Ct	T08 I -003-2	<i>Bt</i>	39.42
H <sub>2</sub> O	<i>Bt</i>	No Ct	T08 I -004-1	<i>lectin</i>	29.86
Heinong 37	<i>lectin</i>	38.05	T08 I -004-1	<i>Bt</i>	39.86
Heinong 37	<i>Bt</i>	No Ct	T08 I -004-2	<i>lectin</i>	28.65
T08 I -001-1	<i>lectin</i>	34	T08 I -004-2	<i>Bt</i>	No Ct
T08 I -001-1	<i>Bt</i>	No Ct	T08 I -005-1	<i>lectin</i>	37.2
T08 I -001-2	<i>lectin</i>	35.5	T08 I -005-1	<i>Bt</i>	39.57
T08 I -001-2	<i>Bt</i>	39.44	T08 I -005-2	<i>lectin</i>	31.29
T08 I -002-1	<i>lectin</i>	34.21	T08 I -005-2	<i>Bt</i>	No Ct
T08 I -002-1	<i>Bt</i>	No Ct	T08 I -006-1	<i>lectin</i>	37.2
T08 I -002-2	<i>lectin</i>	37.57	T08 I -006-1	<i>Bt</i>	39.57
T08 I -002-2	<i>Bt</i>	38.84	T08 I -006-2	<i>lectin</i>	31.29
T08 I -002-3	<i>lectin</i>	31.33	T08 I -006-2	<i>Bt</i>	No Ct
T08 I -002-3	<i>Bt</i>	39.56	T08 I -007-1	<i>lectin</i>	38.76
T08 I -003-1	<i>lectin</i>	32.96	T08 I -007-1	<i>Bt</i>	38.67
T08 I -003-1	<i>Bt</i>	38.33	T08 I -007-2	<i>lectin</i>	31.7
T08 I -003-2	<i>lectin</i>	39.9	T08 I -007-2	<i>Bt</i>	30.26

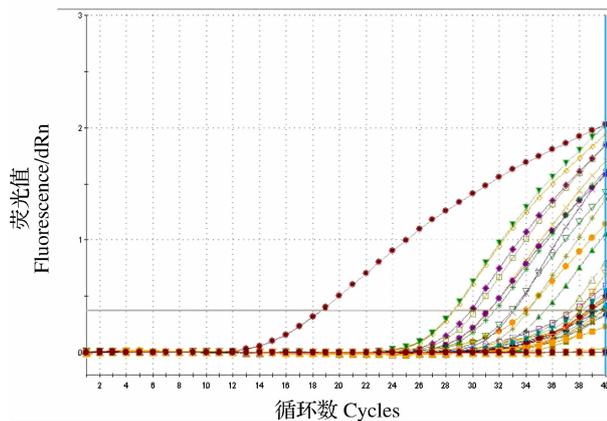


图7 转基因大豆  $T_1$  代植株 *Bt* 和 *lectin* 基因的  
real-time PCR 检测扩增曲线

Fig.7 The amplification plots of real-time PCR of *Bt* and *lectin* gene of transgenic soybean plants  $T_1$  generation

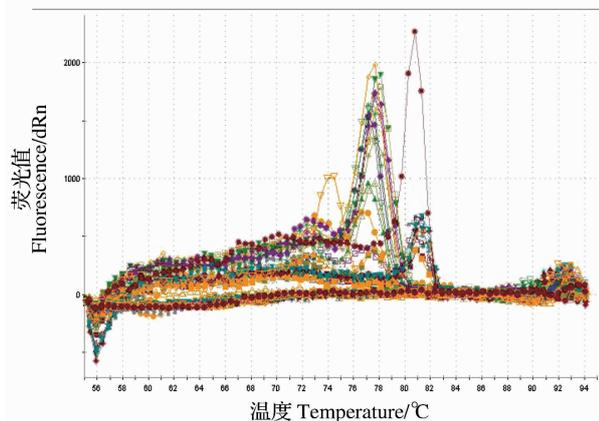


图8 转基因大豆  $T_1$  代植株 *Bt* 和 *lectin* 基因的  
real-time PCR 检测溶解曲线

Fig.8 The dissociation curve of real-time PCR of *Bt* and *lectin* gene of transgenic soybean plants  $T_1$  generation

### 3 结论与讨论

大豆的遗传转化系统效率低且重复性差,在转化过程中,要充分考虑各因素的影响,优化组合条件,以最大限度地提高转化效率。大豆子叶节分化率的诸多因素中,激素水平的选择至关重要。6-BA 的作用是促进子叶节分化不定芽<sup>[9-10]</sup>,试验设计了 6-BA 的 4 个浓度梯度,结果表明,在 6-BA 浓度为  $1.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,分化率最高。通过草铵膦对大豆选择压力试验,确定了  $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的草铵膦浓度作为该大豆品种的选择压力。

实时荧光定量 PCR 技术,是近几年发展起来的

一项分子生物学检测技术,由于使用了荧光标记,提高了检测的准确性和灵敏度,也提高了检测速度和自动化程度。利用荧光信号的变化实时检测 PCR 扩增反应中每一个循环扩增产物量的变化,通过 Ct 值和标准曲线的分析对起始模板进行定量分析,其检测的敏感性比常规 PCR 技术高 100 倍左右<sup>[11]</sup>。实时荧光定量 PCR 能检测各种组织细胞中基因的表达丰度,从而分析基因的表达调控、监控 mRNA 表达模式、检测组织中少量存在的基因、跟踪细胞群体中克隆、定量分析基因在不同组织中的转录水平等。

构建了含有 *Bt* 基因的双子叶植物表达载体 pCAMBIA3300-*Bt*,以大豆子叶节作为受体,通过农杆菌介导法介导 *Bt* 基因转入品质性状优良的高产品种黑农 37 中,获得转基因植株。在遗传转化过程中,进行了大豆组培再生影响因素研究,优化转化条件。经过抗性筛选、PCR 及 real-time PCR 检测 *Bt* 基因在  $T_1$  代转基因植株中的整合与表达情况,初步证明 *Bt* 基因已转入到大豆植株基因组中。

### 参考文献

- [1] De Block M, Herrera Estrillas L, Van Montagu M, et al. Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny[J]. EMBOJ, 1984, 3 :1681 - 1689.
- [2] Horsch R B, Fraley R T, Rogers S G, et al. Inheritance of functional foreign genes in plants[J]. Science, 1984, 223 :496 - 498.
- [3] Hinchey M A, Connerward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using Agrobacterium mediated DNA transfer[J]. Biotechnology, 1988, 6 :915 - 922.
- [4] Rong Di, 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 Reports, 1996, 15(10) :746-750.
- [5] 刘北东,朱延明,李海燕,等.大豆子叶节再生影响因素的研究[J].大豆科学,2002,2(21):88-92. (Liu B D, Zhu Y M, Li H Y, et al. Study on actors affecting the soybean cotyledonary node regeneration[J]. Soybean Science, 2002, 2(21) :88-92. )
- [6] 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. Study on plant regeneration from soybean culture[J]. Soybean Science, 2001, 20(1) :9-13. )
- [7] Terry Catherine F, Shanahan Della J, Ballam Lydia D, et al. Real-time detection of genetically modified soya using lightcycle and ABI 7700 platforms with TaqMan, Scorpion, and SYBR Green I Chemistries[J]. AOAC International, 2002, 85 :938 - 944.

(下转第 194 页)

结果表明外源 *GUS* 基因表达框以低拷贝的形式整合到大豆基因组中,与作者转 *GFP* 报告基因的转化率(3.0%)基本一致<sup>[4]</sup>。对 T<sub>1</sub>代植株的检测结果表明外源 *GUS* 基因表达框以低拷贝的形式整合到大豆基因组中,转基因已经遗传给了后代,其中 S2 株系后代分离情况符合孟德尔遗传规律。研究中部分转基因株系后代的分离出现了非孟德尔遗传方式,这在其他转化方法如农杆菌介导与基因枪转化中也有相关报道<sup>[12-15]</sup>。研究表明转基因植物后代分离会受到转化方法、外界环境和植物自身生物学特性等诸多因素的影响<sup>[11]</sup>。综上,大豆子房滴注转化方法具有可重复性与遗传稳定性,为实现目的基因的转化,改良大豆品种奠定了基础。

### 参考文献

- [1] Olhoft P M, Somers D A. l-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary- node cells[J]. Plant Cell Report, 2001, 20:706-711.
- [2] Droste A, Pasquali G, Bodanese-Zanettini M H. Transgenic fertile plants of soybean [*Glycine max* (L). Merrill] obtained from bombarded embryogenic tissue[J]. Euphytica, 2002, 127:367-376.
- [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] Liu J F, Su Q, An J L, et al. Transfer of a minimal linear marker-free and vector-free *smGFP* cassette into soybean via ovary-drip transformation[J]. Biotechnology Letters, 2009, 31(2):295-303.
- [5] Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue[J]. Focus, 1990, 12:13-15.
- [6] 雷勃钧,尹光初,卢翠华,等. 外源 DNA 直接导入大豆的研究[J]. 大豆科学, 1991, 10:58-62. (Lei B J, Yin G C, Lu C H, et al. Introduction of DNA into soybean[J]. Soybean Science, 1991, 10:58-62.)
- [7] 雷勃钧,卢翠华,钱华,等. 导入外源总 DNA 获得优质高蛋白和双高大豆新品系[J]. 大豆科学, 1995, 14:203-208. (Lei B J, Lu C H, Qian H, et al. New soybean strains of high protein and double high content obtained from introduction of exogenous total DNA[J]. Soybean Science, 1995, 14:203-208.)
- [8] 赵丽梅,刘德璞,孙寰,等. 外源 DNA 导入大豆获得一不育材料[J]. 大豆科学, 1995, 14:83-87. (Zhao LM, Liu D P, Sun H, et al. A sterile material of soybean gained by introducing exogenous DNA[J]. Soybean Science, 1995, 14:83-87.)
- [9] 徐香玲,邹联沛,刘伟华,等. 向大豆导入几丁质酶基因的初步研究[J]. 大豆科学, 1999, 2:101-108. (Xu X L, Zou L P, Liu W H, et al. A preliminary study on transferring chitinase gene into soybeans[J]. Soybean Science, 1999, 2:101-108.)
- [10] 刘德璞,李长有. 导入外源 DNA 获得抗 SMV 大豆品系[J]. 松辽学刊(自然科学版), 1995, 3:40-43. (Liu D P, Li C Y. Obtaining anti-SMV soybean lines by introduction foreign DNA[J]. Song Liao Journal(Natural Science Edition), 1995, 3:40-43.)
- [11] 华志华,黄大年. 转基因植物中外源基因的遗传学行为[J]. 植物学报, 1999, 41:1-5. (Hua Z H, Huang D N. Genetic mode of exogenes in transgenic plants[J]. Acta Botanica Sinica, 1991, 41:1-5.)
- [12] 胡张华,吴关庭,金卫,等. 农杆菌介导的水稻转化及 *bar* 基因稳定遗传[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2005, 31:126-134. (Hu Z H, Wu G T, Jin W, et al. *Agrobacterium* mediated transformation of rice and stable inheritance of *bar* gene[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2005, 31:126-134.)
- [13] Peng J, Wen F, Lister R L, et al. Inheritance of *gusA* and *neo* genes in transgenic rice [J]. Plant Molecular Biology, 1995, 27:91-104.
- [14] Romano E, Soares A, Proite K, et al. Transgene elimination in genetically modified dry bean and soybean lines[J]. Genetic Molecular Research, 2005, 4:177-184.
- [15] Casas A M, Kononowicz A K, Bressan R A, et al. Cereal transformation through particle bombardment[J]. Plant Breeding Reviews, 1995, 13:235-264.
- [8] Vollenhofer S, Burg K, Schmidt J, et al. Genetically modified organisms in food - screening and specific detection by polymerase chain reaction [J]. Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47:5038-5043.
- [9] 王萍,王军军,商德虎. 影响大豆子叶节丛生芽形成的诱导因子研究[J]. 吉林农业科学, 2001, (3):45-49. (Wang P, Wang J J, Shang D H. Effect of induce factors on multiple bud formation of cotyledonary node in soybean[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2001, (3):45-49.)
- [10] 李明春,蔡易,赵桂兰,等. 改良大豆子叶节再生体系的研究[J]. 作物学报, 2006, 32(2):223-227. (Li M C, Cai Y, Zhao G L, et al. Improvement of cotyledon node regeneration system in soybean (*Glycine max*) [J]. Acta Agronomica Sinica, 2006, 32(2):223-227.)
- [11] 吴影,宋丰顺,陆徐忠,等. 实时荧光 PCR 技术定量检测转基因大豆方法的研究[J]. 作物学报, 2007, 33(10):1733-1737. (Wu Y, Song F S, Lu X Z, et al. Detecting genetically modified soybean by Real-time quantitative PCR technique[J]. Acta Agronomica Sinica, 2007, 33(10):1733-1737.)

(上接第 190 页)