

利用花粉管通道法将抗虫基因(*cry V*)转入大豆的研究

武小霞¹, 刘伟婷², 刘琦³, 李静¹, 马永⁴, 李文滨¹

(1. 东北农业大学 农学院, 大豆生物学省部共建教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院 植物脱毒苗木研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 3. 黑龙江省农业科学院 园艺分院, 黑龙江 哈尔滨 150086; 4. 七台河市新兴区长兴乡人民政府农业综合服务中心, 黑龙江 七台河 154532)

摘 要:利用花粉管通道法,在大豆的盛花期将外源抗虫基因(*cry V*)转入到大豆中,转化成活率达 43.88%,成荚率达 33.6%。将收获的的种子种植在大豆所温室中,通过卡那霉素筛选、PCR 鉴定, Southern-blot 检测和 RT-PCR 检测,共检测出 5 株阳性植株,确定外源抗虫基因(*cry V*)已转入到大豆中,转化率达 1.8‰。

关键词:大豆;抗虫基因(*cry V*);花粉管通道法

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2010)04-0565-04

Introduction of Anti-pest Gene (*cry V*) to Soybean via Pollen-Tube Pathway

WU Xiao-xia¹, LIU Wei-ting², LIU Qi³, LI Jing¹, MA Yong⁴, LI Wen-bin¹

(1. Agricultural College of Northeast Agricultural University, Chinese Education Ministry's and Provincial Key Laboratory of Soybean Biology, Harbin 150030; 2. Plant Virus-free Nursery Stock Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086; 3. Horticulture Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086; 4. Government Agricultural Service Center of Xinxing District Changxing Township in Qitaihe, Qitaihe 154532, Heilongjiang, China)

Abstract: Anti-pest gene (*cry V*) was introduced to soybean via pollen-tube pathway during blossom period. 1211 flowers out of 2760 ones survived 3 days after the operation, the survival rate and podding rate was 43.88% and 33.6%, respectively. The harvested seeds were planted in greenhouse and 5 plants with positive result were obtained after Km screening, PCR identification, southern-blot testing and RT-PCR testing. Results suggested that the anti-pest gene (*cry V*) were successfully introduced into those 5 plants and the transformation rate was 1.8‰.

Key words: Soybean; Anti-pest gene(*cry V*); Pollen-tube pathway

大豆食心虫 [*Leguminivora glycinivorella* (Mats.) Obrazsov, Soybean Pod Borer] 属鳞翅目, 小卷蛾科, 是中国东北大豆产区发生严重的一种害虫, 在亚洲东部地区国家均有不同程度的发生。在黑龙江省大豆产区大豆食心虫普遍发生, 危害大豆的豆荚和籽粒, 造成虫口、碎粒, 增加自然脱粒, 降低品质和产量。虫害发生较轻时虫食率一般在 5% ~ 10%, 严重的年份和地区可达到 30% 以上, 有的甚至达到 40% ~ 50%。由于抗原匮乏, 常规育种手段的育种周期过长, 远不能满足农业生产选育抗虫品种的需求^[1-2]。苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 *Bt*) 革兰氏阳性, 是芽孢杆菌属的一个种。 *Bt-cryV* 同时抗鳞翅目和鞘翅目害虫的基因, 对多种害虫有广谱抗性, 是理想的抗源基因。

花粉管通道法 (pollen-tube pathway) 是利用花粉管通道导入外源 DNA 的技术, 它是由周光宇等^[3]建立并在长期科学研究中发展起来的。其主

要原理是授粉后使外源 DNA 能沿着花粉管渗入, 经过珠心通道进入胚囊, 转化尚不具备正常细胞壁的卵、合子或早期胚胎细胞。到目前为止, 利用该技术中国已经成功培育了抗虫转基因棉花和水稻^[4-6]、大豆^[7-15]、小麦及玉米^[15-16]。国外也有相关报道, 如对玉米叶斑病抗性基因的转移、玉米胚乳基因转移和获得了转基因黑麦植株^[17-18]。

该研究采用花粉管通道法将抗虫基因 (*cry V*) 导入受体大豆品种中, 以期得到转基因植株, 使其在保持品种原有特性的基础上具有更强的抗虫性, 以解决大豆生产中的虫害问题。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌种和质粒 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 所用菌株为 pSPUD5, 携带有大豆抗虫相关基因 *cry V* 的质粒由实验室保存 (图 1)。

收稿日期: 2010-03-05

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项资助项目 (2008ZX08004-002, 2009ZX08009-089B); 哈尔滨市科技创新人才研究专项资金资助项目 (2008RFQXN013); 东北农业大学博士后基金与博士启动基金资助项目 (2009RC47)。

第一作者简介: 武小霞 (1971-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向为大豆遗传育种及生物技术应用。E-mail: dadousuo@yahoo.com.cn。

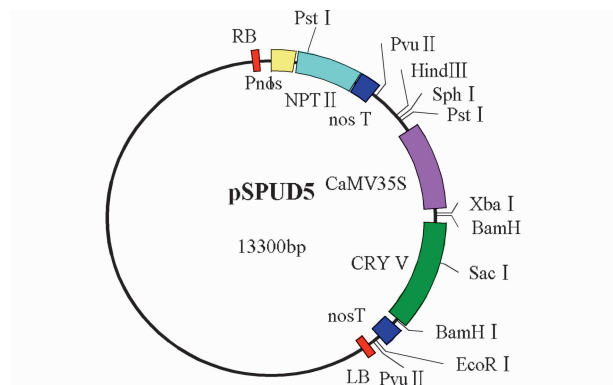


图1 质粒 pSPUD5 图谱

Fig.1 Map of pSPUD5

1.1.2 植物材料 大豆品种为东农 42,东农 48,东农 47,东农 46,东农 44。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 制备及导入 用碱裂解法提取大量质粒 DNA, DNA 浓度大约为 $300 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。大豆盛花期选择开花前花冠比最高花萼高出 $1 \sim 2 \text{ mm}$ 的花^[10] 去掉花瓣,用刀片切去柱头,用 1 mL 的注射器将质粒 DNA 溶液 1 滴(约 $15 \mu\text{L}$)推入由花萼围成的空腔内,使 DNA 溶液完全浸没子房并在其上方形成 1 个液滴。

1.2.2 导入 DNA 花蕾的处理 用导入花附近的叶子将花包住、固定,在标记牌上注明品种名称、转入 DNA 名称、操作花朵数及日期,标记牌挂在该节的基部。处理第 3 天将包住的叶子去掉,调查导入的花是否成活。然后每周检查 1 次,摘去该节上长出的新花蕾,若导入的花已死去,摘去标牌并记录。秋后按组合收获导入一代(D1)的种子,在收获袋上记录好标记牌上的记录,统计结荚率、每荚粒数和收获总量。

1.2.3 D1 代检测方法 将得到的种子(D1)当年秋天播种在温室内, $250 \sim 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素溶液加 0.05% Tween 在第 2 片复叶展开后开始喷洒,隔日喷 1 次,连喷 5 次后选择抗性植株;对卡那霉素筛选后的抗性植株分别进行以 *Npt II* 基因和 *cryV*

基因序列设计的引物扩增,基因 *cryV* 引物序列如下:

P *cryV*:5'-GCTGAAGAACCAAGACAAGC-3'

R *cryV*:5'-CATGTTGCGCTCGATGTGCA-3'

基因 *Npt II* 引物序列如下:

P*npT II* : 5'-GGTCCCCTGAATGAACTG-3'

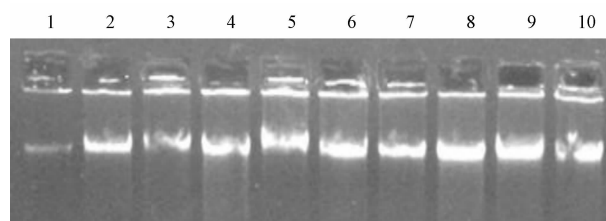
R*npT II* : 5'-TAGCCAACGCTATGTCCT-3'

然后对抗性植株分别进行以 *NptII* 基因和 *cryV* 基因序列设计的引物扩增阳性的植株进行 PCR-Southern 和 RT-PCR 鉴定,确定目的基因的整合及转化率。

2 结果与分析

2.1 外源 DNA 制备

因所需 DNA 量比较大,所以采用碱裂解法提取大量质粒 DNA,将提取后的质粒 DNA 与 λ DNA 浓度进行对比(图 2)。由 DNA 亮度可推断质粒 DNA 浓度大约为 $300 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。分装保存于 -20°C 冰箱备用。

1 为 λ DNA $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$;2-10 为质粒 DNA1: λ DNA $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$;2-10:plasmid DNA图2 质粒 DNA 与 λ DNA 对比图Fig.2 Comparison of plasmid DNA and λ DNA

2.2 *cryV* 基因导入大豆植株

用花粉管通道法将含有 *cryV* 基因的质粒 pSPUD5 导入东农 48、东农 47、东农 46、东农 44 和东农 42 中,共导入 2 760 朵花,获得 926 个荚和 2 159 粒种子(表 1)。

表 1 花粉管通道法转化大豆植株的成荚统计

Table 1 Podding analysis of soybean plant transformed by pollen-tube pathway

品种 Variety	转化株数 Plant No.	荚数 Pod No.	粒数 Seeds No.	成荚率 Podding Rate/%
东农 42 Dongnong 42	230	131	261	56.96
东农 48 Dongnong 48	253	117	230	46.2
东农 46 Dongnong 46	530	227	547	42.8
东农 47 Dongnong 47	540	114	268	21.11
东农 44 Dongnong 44	1207	337	853	27.9

2.3 转基因植株的 PCR 扩增检测

导入含有 *cryV* 基因的质粒 pSPUD5 后,收获的 D1 代大豆种子全部种在温室中,通过卡那霉素筛选

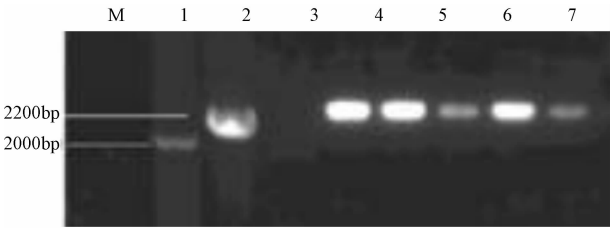
鉴定转基因植株,共获得 17 株卡那抗性植株(表 2),其中东农 42 为 9 株,东农 46 为 5 株,东农 47 为 3 株。对所获得的 17 株 D1 代转基因植株,取其嫩

叶提取总 DNA,分别用 *NptII* 基因和 *cryV* 基因的特异性引物进行 PCR 扩增,以未曾转化材料为阴性对照,以质粒 pSPUD5 为阳性对照。在 17 株卡那霉素抗性材料中,利用 *NptII* 基因的特异性引物扩增,有 7 株扩增出了 500 bp 的条带,其中东农 42 为 5 株,东农 46 为 2 株(图 4)。利用 *cryV* 特异性引物扩增,

有 5 株扩增出 2 200 bp 条带,全部为东农 42(图 3)。利用 *NptII* 和 *cryV* 基因的特异性引物进行的 PCR 扩增,转化植株分别与阳性对照中扩增出的特异性条带一致,而负对照和阴性对照材料的 PCR 扩增电泳结果中均未出现相应的电泳带谱。

表 2 花粉管通道法所得到的种子检测结果
Table 2 Detection results of seeds via pollen-tube pathway

基因型 Genotypes	得到种子 No. of explants	抗性植株 No. of resistant plants	PCR 阳性植株 No. of PCR + plants	Southern 阳性植株 No. of Southern + plants	RT-PCR 阳性植株 No. of RT-PCR + plants	转化频率 Percentage of transformation/%
东农 42 Dongnong 42	261	9	5	5	5	1.8
东农 48 Dongnong 48	230	0	-	-	-	-
东农 46 Dongnong 46	547	5	2	0	-	-
东农 47 Dongnong 47	268	3	-	-	-	-
东农 44 Dongnong 44	853	0	-	-	-	-



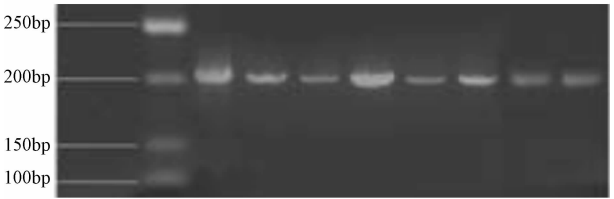
1:阳性质粒;2:阴性对照;3-7:转化植株。

M:DL2 000;1:Positive control;

2:Negative control;3-7: Transgenic plants.

图 3 利用 *cryV* 特异引物 PCR 扩增结果

Fig. 3 PCR results of *cryV* with special primer



1:阳性对照;2-8:转化植株。

M:DL2 000;1:Positive control;2-8: Transgenic plants.

图 4 *NptII* 的特异性引物 PCR 扩增结果

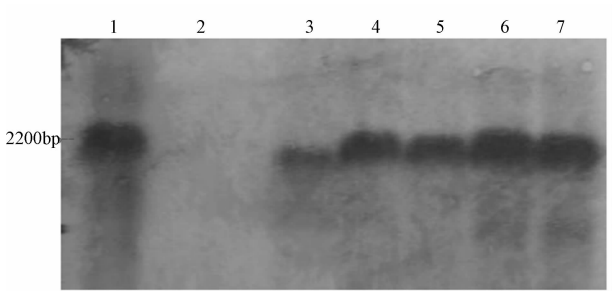
Fig. 4 PCR results of *NptII* with special primer

2.4 转基因植株的 PCR-Southern 杂交检测

以 pSPUD5 质粒为探针,对 PCR 扩增呈现为阳性的植株进行 PCR-Southern 杂交,检测中出现一条 2 200 bp 的条带(图 5),初步证明 *cryV* 基因已整合到大豆植株。

2.5 转基因植株的 RT-PCR 鉴定

将新鲜大豆叶片在液氮中研磨后按照 TRIzol 试剂盒生产商提供的操作指南提取总 RNA(图 6)。以提取的总 RNA 为模板,利用反转录酶将其反转录成 cDNA,然后进行 PCR 扩增,再以 RNA 为模板 PCR 检测 RNA 中是否混有 DNA。PCR-Southern 杂交为阳性的 5 株植株进行 RT-PCR 检测时,扩增出与阳性对照一致的条带(2.2 kb),而未转基因对照植株未能扩增出相应条带。RT-PCR 结果表明(图 7),整合到大豆基因组中的 *cryV* 基因已被



1:阳性质粒;2:阴性对照;3-7:转化植株。

1:Positive control,2:Negative control,3-7: Transgenic plants.

图 5 花粉管通道法转基因植株 PCR-Southern 结果

Fig. 5 PCR-Southern result of transgenic soybean via pollen-tube pathway

CaMv35S 启动子启动,转录为完整的 mRNA,在 RNA 水平上得到了表达。转化频率以 RT-PCR 阳性为指标计算,转化频率在 0 ~ 1.8%。

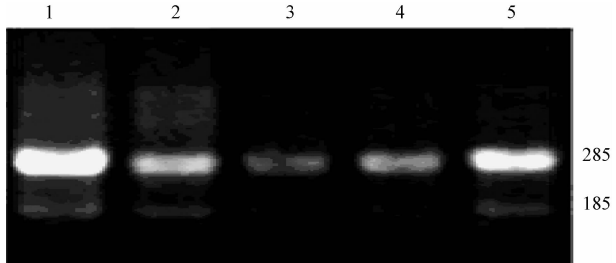
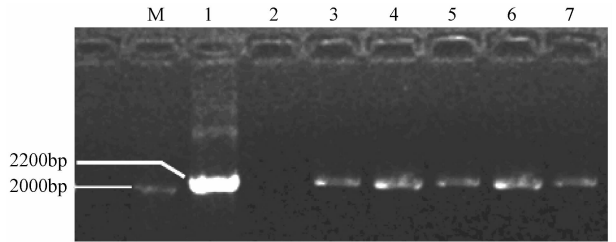


图 6 大豆叶片总 RNA 的分离

Fig. 6 Isolation of total RNA from soybean leaves



M:DL2000;1:阳性质粒;2:阴性对照;3-7:转化植株

M:DL2000; 1:Positive control ;2:Negative control;3-7: Transgenic plants

图 7 转基因植株的 RT-PCR 检测

Fig. 7 RT-PCR result of transgenic plants

3 讨论

3.1 卡那霉素抗性筛选存在的问题

通过卡那霉素抗性筛选和目的基因的 PCR 检测,发现卡那霉素抗性筛选率要高于目的基因 PCR 检测的阳性率,这表明利用卡那霉素鉴定法进行转化体筛选时只能起到指示性作用,而不能明确其真实性。在转化过程中个别植株始终具有较强的卡那霉素抗性,然而却不能检测到目的基因,这表明在基因转化过程中选择标记基因和目的基因可能出现断裂,不能真正转化成功。这也是一直以来通过选择标记基因筛选阳性转基因植株存在的问题。这种筛选方法可能致使某些转 *NptII* 基因的阳性植株由于 *cryV* 基因未整合或整合后基因保持沉默,而未能被筛选出来。

3.2 影响花粉管通道法转化效率的因素

DNA 浓度、DNA 片段、质粒 DNA 的纯度均影响转化效率,前 2 种影响因素逐渐被研究者接受,DNA 浓度过大则外源基因很难通过花粉管通道到达胚囊,无法与受体基因组接触实现转化;DNA 片段过大也会影响其导入的运输过程使其无法实现转化;而关于质粒 DNA 纯度对转化的影响往往被忽视,有人误认为花粉管通道法简单粗放,对质粒 DNA 纯度的要求可以放宽。与农杆菌介导的专一性很强的 T-DNA 不同,通过花粉管通道导入植物胚囊的 DNA 片段插入和整合到的机会是均等的,而不经纯化的质粒 DNA 溶液中含有大量细菌染色体 DNA 的片段,这就相当于降低了目的基因的浓度,减少目的基因插入和整合到受体基因组的机会。为了保持 DNA 片段的完整性,在操作过程中装有 DNA 的 EP 管要一直放在冰盒中,防止 DNA 片段降解。花粉管通道法是利用植物授粉后所形成的天然的花粉管通道(又叫花粉管引导组织),经珠心通道将外源 DNA 携带入胚囊,以达到遗传转化目的的方法。只有进入到胚囊的 DNA 才有机会整合至受体植物基因组中。而碱基数量多、结构复杂的 DNA 在通过花粉管通道进入到植物细胞的过程中受到的阻力较大,不容易转化。

花粉管通道法转化大豆,操作的经验性强、难度较大。微注射操作过程既要保证子房获得足够纯度的 DNA 又要求对子房的机械损伤最小,就需要熟练的操作技巧,否则即使 DNA 导入到胚囊中也会因结实率低而影响转化效率。

3.3 花粉管通道法的优缺点

花粉管通道法属于种质转化系统,转化过程依赖植物自身的种质系统。在整体植物上转化,转移

的 DNA 可为质粒 DNA 或裸露 DNA。与农杆菌介导法转化大豆相比较,这一技术的最大优点是省略了组织培养的过程。此外,花粉管通道法还具有简单、方便、育种时间短、任何基因源都可用来基因转化等优点。然而花粉管通道法只能在大豆的盛花期进行转化操作,受季节影响严重。花粉管通道法整合的 DNA 片段随机性很强,被整合基因片段的完整性不同,因此其转化频率较低。

参考文献

- [1] 王继安,罗秋香. 大豆食心虫抗性品种鉴定及抗性性状分析[J]. 中国油料作物学报, 2001, 23(2):57-59. (Wang J A, Luo Q X. Evaluation of soybean pod borer resistance and analysis of resistance characteristics in soybean[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2001, 23(2):57-59.)
- [2] 杨文郁,由冬梅,曲沈海. 大豆食心虫食率及对产量影响计算方法的探讨[J]. 内蒙古农业科技,1997(6):27-28. (Yang W Y, You D M, Qu S H. Pod borer insect eating rate and yield calculation method of soybean[J]. Inner Mongolia Agricultural Science and Technology,1997(6):27-28.)
- [3] 周光宇,曾以申,杨晚霞. 远缘分子杂交—高粱与水稻基因组 DNA 整合[J]. 中国科学 A 辑(英文版), 1981(5):701-709. (Zhou G Y, Zen Y S, Yang W X. The molecular basis of remote hybridization—an evidence for the possible integration of sorghum DNA into rice genome[J]. Science in China, Ser. A, 1981(5):701-709.)
- [4] Luo Z X, Wu R. A simple method for the transformation of rice via the pollen-tube pathway[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1988,6(3):165-174.
- [5] 谢道昕,范云六,倪万潮,等. 苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)杀虫晶体蛋白基因导入棉花获得转基因植株[J]. 中国科学 B 辑, 1991(4):367-373. (Xie D X, Fan Y L, Ni W C, et al. *Bacillus thuringiensis* transferred into cotton and obtained transgenic plant[J]. Science in China, Ser. B, 1991(4):367-373.)
- [6] 段晓岚,陈善葆. 外源 DNA 导入水稻引起性状变异[J]. 中国农业科学, 1985(3):6-11. (Duan X L, Chen S B. Variation of the characters in rice (*Oryza sativa*) induced by foreign DNA uptake[J]. Scientia Agricultura Science, 1985(3):6-11.)
- [7] 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(1):58-63. (Lei B J, Yin G C, Lu C H, et al. Study of exogenous DNA directly transferred into soybean[J]. Soybean Science, 1991,10(1):58-63.)
- [8] 胡张华,黄锐之,刘智宏,等. 利用花粉管导入法获得转反义 PEP 基因大豆植株[J]. 浙江农业学报,1999,11(2):99-100. (Hu Z H, Huang R Z, Liu Z H, et al. Gaining of transgenic soybean plants through pollen tube passage[J]. Acta Agriculturae of Zhejiangensis, 1999, 11(2):99-100.)
- [9] 周思军. 大豆抗虫基因转移及其转化系统优化研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2000. (Zhou S J. Soybean insect-resistant gene transfer and optimization of transformation system[D]. Harbin:Northeast Agricultural University, 2000.)

- plants through metabolic engineering[J]. Science, 1998, 282: 2098-2100.
- [20] 黄骥,张红生,曹雅君,等. 水稻功能基因的电子克隆策略[J]. 中国水稻科学, 2002, 16(4): 295-298. (Huang J,Zhang H S,Cao Y J,et al. Strategy of in silico cloning of functional genes in rice (*Oryza sativa*) [J]. Chinese Journal of Rice Science, 2002,16(4): 295-298.)
- [21] O'Brien K P, Tapia-Paez I, Stahle-Backdahl M, et al. Characterization of five novel human genes in the 11q13-q22 region[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 273(1): 90-94.
- [22] 张德礼,孙晓静,凌伦奖,等. 人类 SR 蛋白超家族新成员——*SFRS12* (*SRp508*) 的基因克隆和特性分析[J]. 遗传学报, 2002, 29(5): 377-383. (Zhang D L,Sun X J,Ling L J,et al. Molecular cloning, characterization, chromosomal assignment, genomic organization and verification of *SFRS12* (*SRp508*), a novel member of human SR protein superfamily and a human homolog of rat *SRp86*[J]. Acta Genetica Sinica, 2002,29(5):377-383.)
- [23] 李晓晓,李蕊,李雅轩,等. 大豆脱氢抗坏血酸还原酶基因的电子克隆[J]. 大豆科学, 2007, 26(1): 45-50. (Li X X, Li R, Li Y X, et al. In silico cloning and evolution analysis of dehydroascorbate reductase cDNA from *Glycine max* [J]. Soybean Science, 2007, 26(1): 45-50.)
- [24] 孟宪萍,李晓晓,李雅轩,等. 日本百脉根 γ -生育酚甲基转移酶基因的电子克隆及进化分析[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(24): 6457-6459. (Meng X P, Li X X, Li Y X, et al. In silico cloning of Gamma-tocopherol methyltransferase gene from *Lotus corniculatus* var. *japonicus* [J]. Anhui Agricultural Sciences, 2006, 34(24): 6457-6459.)
- [25] 孟宪萍,李晓晓,李雅轩,等. 大豆尿黑酸叶绿基转移酶基因的克隆与进化分析[J]. 华北农学报, 2007, 22(4): 14-18. (Meng X P, Li X X, Li Y X, et al. In silico cloning of homogentisate phytyltransferase gene from soybean [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2007, 22(4): 14-18.)
- [26] 李雅轩,李蕊,孟凡臣,等. 大豆吡哆醛激酶基因的克隆与表达分析[J]. 华北农学报, 2009, 24(3): 23-27. (Li Y X, Li R, Meng F C, et al. In silico cloning and expression analysis of Glycine max pyridoxal kinase gene [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2009, 24(3): 23-27.)
- [27] Sayers E W, Barrett T, Benson D A, et al. Database resources of the national center for biotechnology information [J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37: 5-15.
- [28] 林元震,张志毅,刘纯鑫,等. 甜杨抗冻转录因子 *ICE1* 基因的 *in silico* 克隆及其分析[J]. 分子植物育种, 2007, 5(3): 424-430. (Lin Y Z, Zhang Z Y, Liu C X, et al. in silico Cloning and analyzing of *PsICE1* from *Populus suaveolens*, A freezing-resistant transcription factor [J]. Molecular Plant Breeding, 2007, 5(3): 424-430.)
- [29] 黄耀江,黎燕,王关林,等. 生物信息技术克隆并分析新基因 *STRF7* [J]. 大连理工大学学报, 2001, 41(4): 446-450. (Huang Y J, Li Y, Wang G L, et al. Molecular cloning and analysis of novel *STRF7* gene by bioinformatics strategy [J]. Journal of Dalian University of Technology, 2001, 41(4): 446-450.)
- [30] 陈香宇,段芳龄,李建生,等. 肝细胞癌中差异表达 EST 的生物信息学分析和功能预测[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2004, 13(1): 43-48. (Chen X Y, Duan F L, Li J S, et al. Analysis and function prediction of ESTs differentially expressed in HCC by Bioinformatics strategy [J]. Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2004, 13(1): 43-48.)
- ~~~~~
- (上接第 568 页)
- [10] 雷勃钧,尹光初,卢翠华,等. 外源 DNA 导入大豆的适宜时期与相应方法[J]. 中国油料作物学报, 1991(1): 88-89. (Lei B J, Yin G C, Lu C H, et al. Appropriate methods and period of exogenous DNA directly transferred into soybean [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 1991(1): 88-89.)
- [11] 雷勃钧,李希臣,卢翠华,等. 外源野生大豆 DNA 导入栽培大豆及 RAPD 分子验证[J]. 中国科学 B 辑, 1994(6): 596-601. (Lei B J, Li X C, Lu C H, et al. DNA transferred into cultivated soybean and RAPD molecular authentication [J]. Science in China, Ser. B, 1994(6): 596-601.)
- [12] 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(3): 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(3): 203-208.)
- [13] 岳绍先. 生物技术在我国作物改良中的应用[J]. 植物学通报, 1990(2): 18-23. (Yue S X. The application of biotechnology in crop improvement in china [J]. Chinese Bulletin of Botany, 1990(2): 18-23)
- [14] 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 (Liu D P, Liao L, Yuan Y, et al. Gaining of soybean lines resistant to SMV by introducing exogenous DNA [J]. Soybean Science, 1997, 16(4): 277-282.)
- [15] 曾君祉,王东江,吴有强,等. 用花粉管途径获得小麦转基因植株[J]. 中国科学 B 辑, 1993(3): 256-262. (Zen J Z, Wang D J, Wu Y Q, et al. Transgenic wheat plants obtained with pollen tube pathway [J]. Science in China, Ser. B, 1993(3): 256-262.)
- [16] 丁群星,谢友菊,戴景瑞,等. 用子房注射法将 Bt 毒蛋白基因导入玉米的研究[J]. 中国科学 B 辑, 1993(7): 707-713. (Ding Q X, Xie Y J, Dai J R, et al. Bt gene transfer into maize With ovary injection [J]. Science in China, Ser. B, 1993(7): 707-713.)
- [17] Ohta Y, Shimosaka M, Murata K, et al. Molecular cloning of the N-acetylneuraminidase gene in *Escherichia coli* K-12 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1986, 24: 386-391.
- [18] Datta S K, Datta K, Potrykus I, et al. Fertile *Indica* rice plants regenerated from protoplasts isolated from microspore derived cell suspensions [J]. Plant Cell Reports, 1990, 9: 253-256.