

硼酸诱导的大豆子叶节转化新方法

李海芬¹, 刘庆梅¹, 杨光宇², 王 洋², 岳 娜¹, 胡倩倩¹, 孟祥勋¹

(1. 苏州大学 基础医学与生物科学学院, 江苏 苏州 215123; 2. 吉林省农业科学院 大豆研究中心, 吉林 长春 130033)

摘 要: 采用农杆菌介导法, 以苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 毒性蛋白基因 *Bt* 为目的基因, 研究了不同硼酸浓度处理对大豆子叶节转基因的影响。结果表明: 200 mg · L⁻¹ 硼酸浓度诱导培养基诱导的大豆丛生芽长势最好, 而且转基因效率高达 3.3%。对获得大豆转化幼苗的根和叶片采用 PCR、逆转录 PCR 和 Southern blotting 等方法进行筛选与鉴定, 结果均有 2 株幼苗呈阳性。

关键词: 大豆; 转基因; 农杆菌; 硼酸; 丛生芽

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2011)02-0194-04

Boric Acid Mediated Transformation of Soybean (*Glycine max*) Cotyledonary Node

LI Hai-fen¹, LIU Qing-mei¹, YNAG Guang-yu², WANG Yang², YUE Na¹, HU Qian-qian¹, MENG Xiang-xun¹

(1. School of Basic Medicine and Biological Science, Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu; 2. Soybean Insititute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, Jilin, China)

Abstract: The agrobacterium-mediated transgenic technique combined with the treatment of boric acid was studied for the transformation of foreign gene *Bt* to soybean cotyledon nodes. The results showed that shoots regenerated from the explants were multiplied best at 200 mg · L⁻¹ of boric acid concentration, and the transformation ratio reached 3.3%. Regenerated seedlings were screened by genomic PCR amplification and two seedlings on inductive medium of 200 mg · L⁻¹ boron acid was obtained and proved to be positive by reverse PCR and Southern blotting. It was demonstrated that the target gene had been transformed into the soybean genome.

Key words: Soybean; Transgene; Agrobacterium; Boron acid; Multiple shoots

随着基因工程技术的发展, 采用遗传转化导入外源基因, 改善大豆品质及抗病抗逆性, 已成为大豆改良的重要方法之一。然而许多研究表明大豆是难转化的作物, 主要因为外植体的愈伤组织单细胞诱导分化获得再生大豆幼苗比较困难, 而采用外植体直接诱导分化形成丛生芽, 虽较容易获得再生植物, 但外源基因转化效率将大大降低, 重复性差, 还远未模式化^[1]。

硼作为植物生长发育必不可少的微量元素, 对生物膜的结构和功能有重要影响, 在维护细胞质膜的结构与功能完整性方面, 如激活质膜离子通道, 参与膜融合过程, 保持质膜的选择透性等有重要作用^[2]。硼在细胞壁上通过与果胶结合影响细胞壁结构, 与细胞壁结构及其代谢的关系是硼在植物体内最基本的生理功能^[3]。研究发现, 在高硼浓度下培养的大豆愈伤组织, 细胞容易松散, 细胞壁会有一定程度的解离损伤, 但在继代培养后可以恢复。这

种现象为采用硼营养作为介质, 介导外源基因的转化提供新的途径^[4]。该研究以农杆菌介导的基因转化法为基础, 采用不同硼酸浓度的诱导培养基处理大豆子叶节, 探讨提高大豆转化率的新方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料

植物材料: 大豆品种吉林 29, 由吉林省农业科学院大豆所提供。

目的基因和菌种: 以苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 毒性蛋白基因 *Bt* 作为目的基因, 转化用载体为携带 *Bt* 基因的 pBI121-Bt, 带有卡那霉素的筛选标记, 由根癌农杆菌携带, 该实验室保存。

1.2 培养基

细菌 LB 固体培养基, YEP 液体培养基。MSB 培养基, 是由 MS 无机培养基和 B5 有机培养基共同组成, 0.8% 琼脂, pH5.8。MS0B 诱导培养基, 是不

收稿日期: 2010-12-30

基金项目: 吉林省科技发展计划重点资助项目(20060202)。

第一作者简介: 李海芬(1984-), 女, 硕士, 研究方向为植物基因与分子遗传学。E-mail: lihaifen.555@163.com。

通讯作者: 孟祥勋(1955-), 男, 教授, 博士, 从事植物分子遗传与基因工程研究。E-mail: mengxiangxun@suda.edu.cn。

含硼酸的 MSB 培养基。

1.3 硼酸浓度对大豆子叶节转基因效率的影响

1.3.1 无菌外植体的建立 精选大豆种子,自来水冲洗 10 min 后消毒。即 75% 酒精处理 45 s,0.1% 升汞处理 8 min,再无菌水漂洗 5 次,最后接种至萌发培养基(1/2MSB + 1.0 mg · L⁻¹ 6-BA)^[5],26℃,暗培养 4~6 d。

1.3.2 萌发后外植体不同硼酸浓度的处理 萌发种子切去顶芽,剥去种皮,沿种脐纵向切开子叶,保留含有子叶节的一半叶片^[6],在子叶节 3~5 mm 处切去大部分下胚轴。接种至含有不同硼酸浓度的诱导培养基(MSOB + 4.0 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.025 mg · L⁻¹ IBA + 50 mg · L⁻¹ kan + 300 mg · L⁻¹ cef + 200 mg · L⁻¹ carb)。硼酸的浓度设置为 0、100、125、150、175、200、250、300、500、620 和 700 mg · L⁻¹ 共 11 种浓度。26℃,18/6h 光周期培养。观察不同硼酸浓度梯度对大豆丛生芽形成数量的影响。

1.3.3 大豆外植体的侵染 先在子叶节位置划 10 次以利于农杆菌的侵染^[7]。预培养基(1/2MSB + 4.0 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.025 mg · L⁻¹ IBA)培养 1 d,再进行大豆侵染。侵染前 1 d 预培养可以提高转化效率^[8]。采用薛仁镛^[9]的方法制备菌悬液,侵染 20 min,90 r · min⁻¹、28℃ 侵染效果更佳。吸干表面菌液,接种至共培养基(MSB + 4.0 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.025 mg · L⁻¹ IBA + 100 μmol · L⁻¹ AS + 1 000 mg · L⁻¹ L-Cys,0.5% 琼脂,pH5.5),暗培养 3 d。

1.3.4 侵染后外植体的培养 共培养后外植体先用大量无菌水除去表面菌液,再用除菌培养基(液体 MSB + 4.0 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.025 mg · L⁻¹ IBA + 300 mg · L⁻¹ cef + 200 mg · L⁻¹ carb)震荡漂洗。10 d 后从不同硼酸 MSOB 培养基继代至 MSB 培养基(MSB + 4.0 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.025 mg · L⁻¹ IBA + 300 mg · L⁻¹ cef + 200 mg · L⁻¹ carb)。14 d 后转至芽伸长培养基(MSB + 0.5 mg · L⁻¹ GA3 + 0.1 mg · L⁻¹ IAA + 50 mg · L⁻¹ Gln)^[10]。芽至少 2 cm^[11] 转至生根培养基(MSB + 200 mg · L⁻¹ cef)培养。

1.4 转基因幼苗的检测

植物基因组 DNA 提取试剂盒由捷瑞生物工程(上海)有限公司生产;RNA 的提取采用碧云天公司的 Trizol 法;Taq 酶、反转录试剂盒和胶回收试剂盒由宝生物工程(大连)有限公司生产;Southern blotting 试剂盒由 Roche 公司生产。

经筛选获得的吉林 29 大豆幼苗进行基因组 DNA 目的片段的扩增,逆转录 PCR 及 Southern blotting 检测。

1.4.1 基因组 DNA 和 RNA 的提取 取材部位为转基因大豆幼苗的叶片和根组织,DNA 的提取采用捷瑞生物工程(上海)有限公司试剂盒,RNA 采用碧云天公司生产的 Trizol 法提取。

1.4.2 PCR 检测 应用软件 Primer Prieier5.0 针对 Bt 基因设计特异性引物。上游引物:5'-ACGAC-CAACTTGCCCTTCC-3';下游引物:5'-GCTCATTAC-CGCCCTTTT-3'。PCR 扩增产物长度为 697 bp。PCR 反应体系:反应体积为 25 μL(模板 DNA 0.3 μL,10 × PCR Buffer 2.5 μL,dNTP Mixture 2 μL,引物 I 0.5 μL,引物 II 0.5 μL,Taq 酶 0.2 μL,水 19 μL)。扩增条件:94℃ 预变性 8 min + 33 个循环(94℃,40 s;50℃,45 s;72℃,40 s) + 72℃,10 min,4℃ 保温。

1.4.3 逆转录 PCR 检测 提取的 RNA 逆转录,反应体系为 25 μL。先加入 oligo(dT)1 μL,RNA 模板 7 μL 和 DEPC 水 7 μL,混匀后,70℃,5 min,在冰上放置至少 1 min。再依次加入逆转录酶 0.5 μL,RT-buffer 5 μL 和 dNTP 4.5 μL,混匀后,42℃,50 min,最后 65℃,10 min。采用 1.4.2 相同的条件逆转录 PCR。

1.4.4 Southern blotting 检测 质粒 pBI121-BT PCR 后割胶回收目的片段,再用地高辛标记以制备探针。用 HindIII 对转基因大豆和未转化大豆的基因组酶切过夜,酶切产物和 pBI121-Bt 质粒 50 V 电泳。依照 Roche 说明书进行 Southern blotting 操作。

2 结果与分析

2.1 硼酸浓度的选择

2.1.1 硼酸浓度对丛生芽数量的影响 表 1 为 11 种不同硼酸浓度下,在一定数量的外植体上生长的丛生芽的数量。硼酸浓度 200 mg · L⁻¹ 时子叶节丛生芽生长数量最多,达到 76%;大于 500 mg · L⁻¹ 或小于 100 mg · L⁻¹ 时丛生芽数量都会明显减少,620 mg · L⁻¹ 即正常 MSB 培养基和不含有硼酸时所占比例均为 15%;700 mg · L⁻¹ 硼酸形成丛生芽数量最少,仅为 8%。

表 1 不同硼酸浓度对吉林 29 号大豆子叶节丛生芽生长数量的影响

Table 1 Effect of boric acid on the number of multiple shoots in soybean cotyledonry nodes

	硼酸浓度 Boric acid concentration/mg · L ⁻¹										
	0	100	125	150	175	200	250	300	500	620	700
丛生芽数量 Number of multiple shoots	6	13	17	20	22	32	21	17	12	6	3
外植体数量 Number of explants	39	43	42	43	40	42	43	38	40	39	39

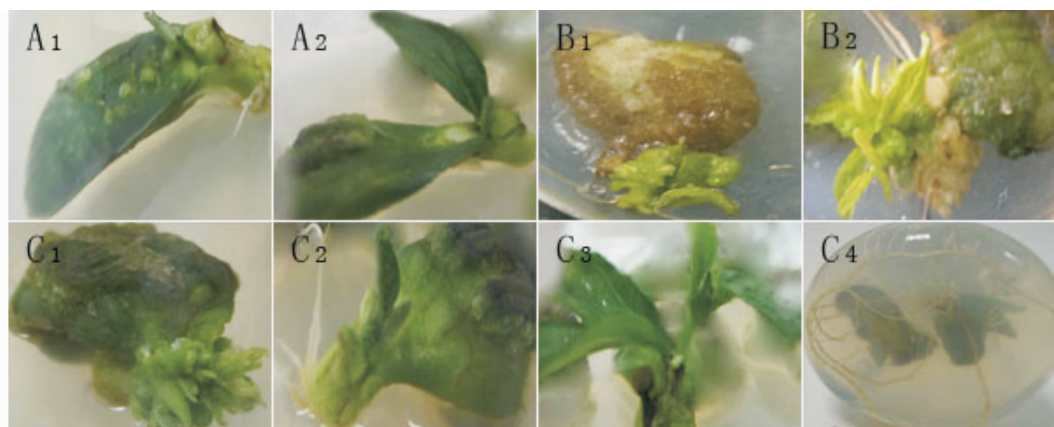
2.1.2 硼酸浓度对丛生芽生长状况的影响 选择 0、200 和 620 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 3 种硼酸浓度进行丛生芽生长发育研究,其中含有 620 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸 MS0B 即正常 MSB 培养基。

图 1A 是硼酸浓度为 0 即未加入硼酸时,子叶节丛生芽生长状况。MS0B 培养 7 d 后在子叶节位置长出丛生芽,但是丛生芽没有形成生长点(图 A1);继代至芽伸长培养基 10 d 后丛生芽长大但生长点仍然没有长出,而且根系生长受到抑制(图 A2)。这与吴静等^[12]的研究结果类似,表现为缺硼症状,如茎尖生长点生长受抑,严重时枯萎,直至死亡;根的生长发育受很大影响,缺硼不仅影响产量,还影响作物品质^[13]。

图 1B 是硼酸浓度为 620 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,即正常的 MSB 培养基子叶节丛生芽生长状况。7 d 后可以看到比较明显的愈伤组织形成,外植体呈黄色(图

B1);继代至芽伸长培养基 10 d 后丛生芽生长萎缩,愈伤组织大多死亡呈白色(图 B2),子叶和丛生芽位置较易断裂分离,极不利于丛生芽长时间的生长发育。硼酸浓度超过一定界限会促进电解质外渗量和丙二醛含量的增加,对大豆的种子萌发和幼苗产生伤害作用^[14]。

图 1C 是硼酸浓度为 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 诱导培养基生长丛生芽及其后期形成幼苗和根的状况。最初形成丛生芽数量较多(图 C1),由于筛选剂卡那霉素的作用,后期形成的抗性苗一般为 1~2 个,而且有多根长出(图 C2),生长状况也非常好;继代至芽伸长培养基后丛生芽可以形成比较健壮幼苗(图 C3),至生根培养基后还有较长较多的根形成(图 C4)。相关研究表明,低浓度的硼有利于大豆种子的萌发,中等浓度的效果最显著,高浓度会产生相反的结果^[14]。



A1、A2: 硼酸浓度为 0; B1、B2: 硼酸浓度为 620 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; C1、C2、C3、C4: 硼酸浓度为 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

A1, A2: Boric acid concentration is 0; B1, B2: Boric acid concentration is 620 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;

C1, C2, C3, C4: Boric acid concentration is 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

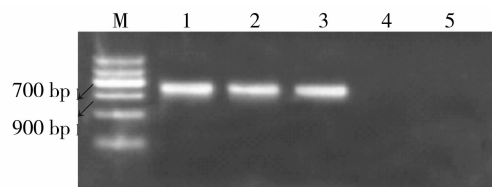
图 1 农杆菌侵染后大豆经过不同硼酸浓度处理后生长状况

Fig. 1 The growth of soybean after agrobacterium infection on medium of different boric acid concentrations

2.2 PCR 和逆转录 PCR 检测结果

通过筛选 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸诱导培养基生长的 60 个大豆丛生芽,得到 7 株抗性苗,提取幼苗叶片和根的 DNA 和 RNA。以质粒 pBI121-Bt 为阳性对照,未转化大豆幼苗叶片基因组为阴性对照,进行 PCR 检测。结果 2 株幼苗的叶片和根扩增出和阳性对照大小相同的的目的片段,为 700 bp 左右,而未转化幼苗叶片未扩增出任何片段(图 2)。结果表明 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸诱导培养基生长的 7 株抗性苗有 2 株阳性苗,转化率达到 3.3%。初步证明 Bt 基因已导入大豆中。

以未转化大豆幼苗为阴性对照进行逆转录 PCR 检测,结果检测呈阳性转化的幼苗的叶和根也都扩增出 700 bp 左右的片段(图 3),而未转化的大豆基因组没有任何条带,证明 Bt 基因已导入大豆中。



M: Marker C; 1: 叶片; 2: 根; 3: 阳性对照; 4: 未转化幼苗; 5: 水对照。

M: MarkerC; 1: Leaves; 2: Roots; 3: Masculine check; 4: Non-transformed seedlings; 5: Water check.

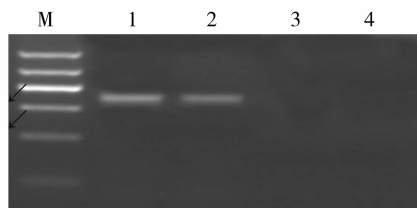
图 2 转基因大豆幼苗 PCR 检测

Fig. 2 PCR identification of soybean transgenic seedlings

2.3 Southern blotting 检测结果

取 PCR 和逆转录扩增均呈阳性大豆幼苗 Southern blotting 检测,以质粒 pBI121-Bt 为阳性对照,未转化的大豆幼苗为阴性对照。结果质粒阳性

对照有杂交条带,PCR 和逆转录 PCR 阳性的幼苗和根也都显示杂交条带,而未转化大豆幼苗没有任何杂交条带(图4)。确定目的基因已经整合到大豆基因组中。

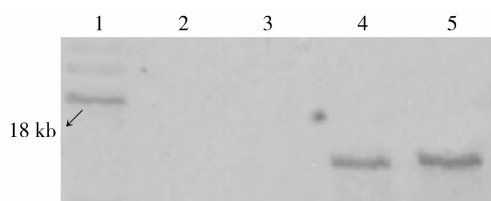


M: Marker C;1:叶片;2:根;3:未转化幼苗;4:水对照。

M: Marker C;1: Leaves;2: Roots;3: Non - transformed seedlings;4: Water check.

图3 转基因大豆幼苗逆转录 PCR 检测

Fig.3 Reverse PCR identification of soybean transgenic seedling



1:阳性对照;2:未转化幼苗;3:水对照;4:叶片;5:根。

1: Masculine check 2: Non - transformed seedlings;3: Water check; 4: Leaves;5: Roots.

图4 转基因大豆幼苗的 southern blotting 检测

Fig.4 Southern blotting of soybean transgenic seedling

3 讨论

硼可以与植物细胞壁中的半乳糖醛酸鼠李聚糖(RG-Ⅱ)组成 B- RG-Ⅱ复合物,此复合物又与果胶多糖构成完整细胞壁必不可少的组成成分之一,所以缺硼会影响植物细胞壁结构的正常形成^[15]。在植物生长过程中,充足的硼能形成大小适宜的细胞壁孔隙,从而调节细胞壁物质前体和其它大分子(如蛋白质)的转运;硼缺乏使植物细胞壁孔隙增大,破坏细胞壁的构建^[16]。硼的累积会对所有生物体造成毒害,可能是通过结合在细胞核糖组分的 ATP、NADH 或 NADPH 上而使代谢紊乱所造成^[17]。

与物理方法击穿膜某些部位形成小孔而使外源 DNA 进入原生质体的电击法相比,硼酸与农杆菌结合的转基因方法更有可行性,其一因为电击法击穿膜可能会造成膜不可恢复性,使细胞膜的完整性丧失而严重影响细胞的功能;硼酸是构成细胞壁的成分之一,浓度适中不会对细胞膜的结构和功能造成太大影响。其二因为电击法需要专门的设备如电击仪,成本相对较高,而且周期长;农杆菌介导法成熟可靠,简便易行,周期短,转化率高,已被广

泛应用于双子叶植物的遗传转化^[18]。

试验设计了 11 种硼酸浓度梯度,结果表明硼酸浓度 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,即虽为正常 MSB 硼酸浓度 ($620 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 30%,但是大豆丛生芽形成数量最多,诱导的丛生芽长势最好,转化率也高,达到 3.3%,一般转基因效率仅为 1.0%~2.0%^[1]。这可能因为 $620 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸抑制转基因大豆组织脱分化,使子叶节丛生芽无法得到正常生长发育造成。该研究表明硼不仅可以提高大豆幼苗丛生芽的诱导率,还提高了转化率,这为进一步提高植物转基因效率提供了一定的参考依据。

总之,转化率的提高在于建立完善高效的再生系统、遗传转化体系以及合理的筛选策略。有报道称,通过一些辅助转化措施可以提高转化率,如超声波辅助农杆菌介导法(SAAT)^[19],它是一种对农杆菌介导法的发展,可以显著提高大豆的转化率。

参考文献

- [1] 潘川芝,李凤,戴良英.大豆子叶节离体再生体系优化研究[J].湖南农业科学,2006(5):31-36. (Pan C Z, Li F, Dai L Y. Regeneration system of soybean cotyledonary nodes [J]. Hunan Agricultural Sciences, 2006(5):31-36.)
- [2] Loomis W D, Durst R Y. Chemistry and biology of boron[J]. Bio-Factors, 1992,3:229-239.
- [3] 施益华,刘鹏.硼在植物体内生理功能研究进展[J].亚热带植物科学,2002,31(2):64-69. (Shi Y H, Liu P. A review of advances in physiological function of boron in plants[J]. Subtropical Plant Science, 2002,31(2):64-69.)
- [4] 葛正珍,杨光宇,仲艳,等.硼对大豆愈伤组织的细胞结构及形态的影响[J].大豆科学,2009,28(2):225-228. (Ge Z Z, Yang G Y, Zhong Y, et al. Effect of boron on cell structure and shape in soybean (*Glycine max*) callus [J]. Soybean Science, 2009, 28 (2):225-228.)
- [5] 李凤.大豆子叶节高效再生体系的建立与 *GmCOII* 基因的遗传转化[D].长沙:湖南农业大学,2006. (Li F. Establishment of effective regeneration system of soybean cotyledonary nodes and genetic transformation of *GmCOII* gene in soybean [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2006.)
- [6] Annette D, Giancarlo P, Maria H, Integrated bombardment and agrobacterium transformation system: an alternative method for soybean transformation [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2000,18:51-59.
- [7] 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.
- [8] 邱承祥.大豆茎尖再生系统的研究及农杆菌介导的 *Bt* 基因的转化[D].上海:上海交通大学,2003. (Qiu C X. Study on shoot tip regeneration system of soybean and agrobacterium-mediated *bt* gene transformation [D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2003.)

- thesis[J]. FEBS Letters, 2001, 499: 15-20.
- [17] Sattler S E, Cahoon E B, Coughlan S J, et al. Characterization of tocopherol cyclases from higher plants and cyanobacteria. Evolutionary implications for tocopherol synthesis and function[J]. Plant Physiology, 2003, 132: 2184-2195.
- [18] Porfirova S, Bergmuller E, Tropf S, et al. Isolation of an Arabidopsis mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for all tocopherol biosynthesis[J]. Proceedings of National Academy of Sciences USA, 2002, 99: 12495-12500.
- [19] Provencher L M, Miao L, Sinha N, et al. Sucrose export defective1 encodes a novel protein implicated in chloroplast-to-nucleus signaling[J]. Plant Cell, 2001, 13: 1127-1141.
- [20] Shintani D, DellaPenna D. Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering[J]. Science, 1998, 282: 2098-2100.
- [21] Traber M G, Arai H. Molecular mechanisms of vitamin E transport[J]. Annual Review of Nutrition, 1999, 19: 343-355.
- [22] Grusak A A. Genome-assisted plant improvement to benefit human nutrition and health[J]. Trends in Plant Science, 1999, 4: 164-166.
- [23] Collakova E, Della Penna D. The role of homogentisate phytyltransferase and other tocopherol pathway enzymes in the regulation of tocopherol synthesis during abiotic stress[J]. Plant Physiology, 2003, 133: 930-940.
- [24] 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.)
- [25] Kozak M. Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs[J]. Nucleic Acids Research, 1984, 12(2): 857-872.
- [26] 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.
- [27] 张德礼, 丁培国, 凌伦奖, 等. 人类新基因 C17orf32 的电子克隆和编码区序列 RT-PCR 验证[J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(4): 543-549. (Zhang D L, Ding P G, Ling L J, et al. In silico cloning of C17orf32, a novel human gene and verification of its coding region by RT-PCR[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2002, 29(4): 543-549.)
- [28] 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.)
- [29] 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.)
- [30] 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(Database issue): D5-15.
- ~~~~~
- (上接第 197 页)
- [9] Xue R G, Xie H F, Zhang B. A multi-needle-assisted transformation of soybean cotyledonary node cells[J]. Biotechnology Letters, 2006, 28: 1551-1557.
- [10] Margie M P, Juan C M, Andrea B K, et al. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient Agrobacterium-mediated soybean transformation[J]. Plant Cell Reports, 2006, 25: 206-213.
- [11] Margie M P, Shou H X, Guo Z B, et al. Assessment of conditions affecting agrobacterium-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant[J]. Euphytica, 2004, 136: 167-179.
- [12] 吴静, 李春俭, 江荣凤, 等. 缺硼对大豆幼苗形成和根瘤固氮活性的影响[J]. 华北农学报, 1999, 14(2): 96-101. (Wu J, Li C J, Jiang R F, et al. Effects of boron-deficiency on soybean growth and nitrogenase activity[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 1999, 14(2): 96-101.)
- [13] 屈红征, 王丽萍, 吴国良. 植物硼素营养研究进展[J]. 山西农业大学学报, 2001, 21(2): 173-176. (Qu H Z, Wang L P, Wu G L. Progress of the study on boron nutrition of plant[J]. Journal of Shangxi Agricultural University, 2001, 21(2): 173-176.)
- [14] 刘鹏, 杨玉爱. 钼、硼浸种对大豆幼苗生理特性的影响[J]. 浙江大学学报, 2003, 30(1): 83-88. (Liu P, Yang Y A. Effect of soaking of molybdenum and boron on physiological characteristics of soybean seedling[J]. Journal of Zhejiang University, 2003, 30(1): 83-88.)
- [15] 黄益宗. 植物对硼素不足的反应及其成因探讨[J]. 土壤与环境, 2002, 11(4): 434-438. (Huang Y Z. Plant response to boron deficiency and origin of formation[J]. Soil and Environmental Sciences, 2002, 11(4): 434-438.)
- [16] 石磊, 徐芳森. 植物硼营养研究的重要进展与展望[J]. 植物学通报, 2007, 24(6): 789-798. (Shi L, Xu F S. Main progresses in boron nutrition research in plants and its prospects[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2007, 24(6): 789-798.)
- [17] Takano J P, Kyoko M W, Toru F W. Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters[J]. Trends in Plant Science, 2008, 13(8): 451-457.
- [18] 邓向阳, 卫志明. 大豆转化技术[J]. 植物生理学通讯, 1998, 34(5): 381-387. (Deng X Y, Wei Z M. Technique of transformation of soybean[J]. Plant Physiology Communications, 1998, 34(5): 381-387.)
- [19] Meurer C A, Dinkins R D, Collins G B. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation[J]. Plant Cell Reports, 1998, 18: 180-186.