

植酸酶基因 *phyA* 转化大豆品种研究

闫瑞叶¹, 李喜焕¹, 李桂兰², 常文锁¹, 张彩英¹

(1. 河北农业大学 教育部华北作物种质资源研究与利用重点实验室, 河北 保定 071001; 2. 河北科技师范学院 生命科技学院, 河北 昌黎 066000)

摘要: 土壤磷多以有机态形式存在, 而植酸磷占一半以上, 分解利用植酸态磷是提高土壤磷利用效率、改善植物磷素营养的新途径。利用大豆农杆菌介导子叶节转化与花粉管通道转化技术, 将含有根特异启动子 *pyk10*、信号肽 *S* 和植酸酶 *phyA* 的嵌和基因 (*KSA*) 转入冀豆 12、冀豆 16、五星 1 号和吉林 35 中。经 PCR 检测, 共获得 T₀ 阳性植株 114 个, T₁ 阳性植株 101 个, T₂ 阳性材料 28 个。通过将 T₄ 代转基因株系和野生型对照在仅含植酸磷的营养液中进行培养发现, 转基因植株在植酸磷条件下生长状况优于对照, 并且 3 个转基因株系根系分泌型植酸酶活性分别比野生型提高 5%、13% 和 24%。

关键词: 大豆; 植酸酶基因; 遗传转化; 农杆菌介导

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2011)-0356-06

Transgenic Soybean (*Glycine max.* L) Plants with *phyA* Gene Improved Phytase Activity

YAN Rui-ye¹, LI Xi-huan¹, LI Gui-lan², CHANG Wen-suo¹, ZHANG Cai-ying¹

(1. North China Key Laboratory of Crop Germplasm Resources, Education Ministry of China, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001; 2. Life Science and Technology College, Hebei Normal University of Science & Technology, Changli 066600, Hebei, China)

Abstract: Organic phosphorus (P) is the main form of phosphorus in soil, of which the phytate accounted for more than 50%. The available way that improves plant P nutrition is to hydrolyze phytate into inorganic phosphorus (Pi) to increase the soil P utilization efficiency. In this study, a phytase gene (*phyA*), driven by the root-specific *pyk10* promoter and directed by a carrot extracellular targeting peptide, was introduced into different soybean varieties (Jidou 12, Jidou 16, Wuxing 1 and Jilin 35) by *Agrobacterium*-mediated and pollen tube pathway transformation method. PCR analysis results showed that the *phyA* was successfully integrated into the soybean genome. Total 114, 101 and 28 PCR positive plants were obtained from T₀, T₁ and T₂ generation, respectively. The results also showed that the T₄ generation plants could grow better than wild-type when cultured under the condition in which phytate was the sole source of phosphorus. And the secreted phytase activities of roots also indicated that three transgenic lines were increased by 5%, 13% and 24% compared to the wild-type plants, respectively.

Key words: Soybean; Phytase gene; Genetic transformation; *Agrobacterium*-mediated

土壤中的磷有 50%~80% 以有机态形式存在, 其中植酸磷占一半以上, 由于植酸磷在水中的溶解度很低, 因而不能被植物直接吸收和利用^[1]。植酸酶是催化植酸及植酸盐水解成肌醇与磷酸 (或磷酸盐) 的一类酶的总称, 该酶可有效水解植酸态、核酸态和磷脂态有机磷, 释放出植物可直接吸收利用的无机磷酸及其盐类^[2]。因此, 通过转基因技术将植酸酶基因转入不同植物中, 从而利用植酸酶来分解利用土壤中的植酸态磷, 是提高土壤磷素利用效率、改善植物磷素营养的重要途径^[3]。

目前, 关于植酸酶基因的克隆及其功能研究

开展较多, 据统计, 已获得的转植酸酶基因植物已有 20 多种, 其中包括水稻、小麦、玉米、棉花、大豆、烟草等^[4]。Richardson 等^[5]将黑曲霉植酸酶基因转入拟南芥, 转基因植株在仅含植酸磷的培养基上生长良好, 植株磷素营养状况也优于野生型。Zimmermann 等^[6]将植酸酶基因转入马铃薯中发现, 超表达转基因植株表现出较对照明显增强的植酸盐利用能力。Yan 等^[7]将烟曲霉中的植酸酶基因转入烟草中, 酶活性分析表明, 植酸酶基因可以在烟草中成功表达。张琪等^[8]将黑曲霉 *phyA2* 转入玉米中发现, 超表达转基因玉米在植酸为唯一磷源条件下能够分解利用基质

收稿日期: 2011-04-02

基金项目: 国家转基因重大专项资助项目 (2009ZX08004-004B); 国家自然科学基金资助项目 (31071441); 河北省自然科学基金资助项目 (C2010000749); 河北省教育厅科学研究资助项目 (2009)。

第一作者简介: 闫瑞叶 (1984-), 女, 在读硕士, 研究方向为大豆分子生物学与转基因研究。E-mail: yanruiye85@163.com。

通讯作者: 张彩英 (1960-), 女, 博士, 研究员, 主要从事大豆遗传育种与转基因研究。E-mail: zhangcaiying@hebau.edu.cn。

中的植酸态磷。

李桂兰等^[9]将无花果曲霉植酸酶基因 *phyA* 转入大豆,转基因 T₁ 代大豆分泌植酸酶的能力比对照提高 4.94~9.65 倍。Xiao 等^[10]将苜蓿中的植酸酶基因 *MtPHY1* 转入拟南芥发现,转基因拟南芥在植酸磷条件下的生长状况明显优于对照,植株吸收有机态磷的情况也优于野生型,说明异源表达 *MtPHY1* 可促进拟南芥对培养介质中植酸态磷的吸收与利用。Ma 等^[11]将植酸酶基因 *MtPHY1* 转入白三叶草,超表达植株的磷吸收量、生物产量较野生型有所提高,说明该基因具有改善白三叶草吸收利用有机态磷的作用。由此可见,植酸酶基因在改善植物分解利用有机态磷方面具有重要意义。该研究以植酸酶 *phyA* 为转化基因,利用农杆菌介导子叶节转化以及花粉管通道转化技术,将基因转入不同大豆品种,为获得高表达植酸酶转基因材料、培育磷高效利用转基因大豆奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试品种

大豆品种冀豆 12、冀豆 16、五星 1 号、吉林 35 为遗传转化受体材料,由河北农业大学大豆遗传育种研究室、河北科技师范学院生命科技学院提供。

1.2 转化载体

所用转化载体为 PC-KSA(图 1),由河北科技师范学院李桂兰教授提供^[2]。载体中含有 1 个 KSA 嵌和基因,由植酸酶基因 *phyA*(无花果曲霉)、根特异表达启动子 *Ppyk*(拟南芥)和信号肽 *S*(胡萝卜)组成,然后将其插入到植物表达载体 PC-GENERAL 中。载体中还包含 1 个由 Nos Promoter 启动, *NPTII* 基因和 Nos Terminator 终止的表达框,用作转基因筛选标记。

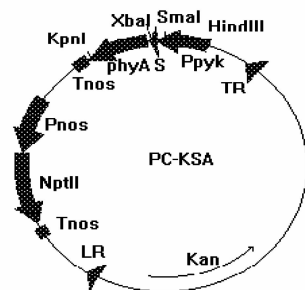


图 1 所用转化载体 PC-KSA 图谱

Fig. 1 Map of expression vector PC-KSA in this study

1.3 试验方法

1.3.1 农杆菌介导大豆遗传转化技术 挑取含有转化载体 PC-KSA 的 EHA105 农杆菌单菌落,接种

于加有 Kan、Str 的 LB 液体培养基中,在 28℃、180 r·min⁻¹ 下振荡培养 48 h。吸取 1 mL 活化菌液,加入 100 mL 无抗生素的 LB 液体培养基,继续振荡培养 24 h 后侵染大豆子叶节,侵染前 2 h 加入 100 μmol·L⁻¹ 的乙酰丁香酮。侵染时间为 30 min,期间不断振荡,随后将子叶节接种在 MS 培养基上进行预培养 1 d,加有 100 μmol·L⁻¹ 乙酰丁香酮的 MS 培养基中(加有 1.7 mg·L⁻¹ 的 6-BA)共培养 3 d。将共培养后的子叶节接种在附加有 60 mg·L⁻¹ Kan 和 250 mg·L⁻¹ Cef 的诱导筛选 B5 培养基上(加有 1.7 mg·L⁻¹ 的 6-BA)诱导不定芽。当不定芽长到 3~4 cm 时,转入 1/2MS 生根培养基中(加有 1.6 mg·L⁻¹ 的 IBA)诱导不定根发生。待植株不定根长至 20 条左右,长约 2~3 cm 时,炼苗 3~5 d,移入蛭石中。

1.3.2 大豆花粉管通道遗传转化技术 选取大豆当天完全展开的花朵,去除同一节位不符合要求花朵。用镊子去除花朵中的旗瓣和龙骨瓣,用剪刀去除部分花柱,将 5 μL 转化载体水溶液滴加在子房伤口处,挂牌注明转化日期。随后每隔 3~5 d 检查花朵,去除该节位新生花蕾。待豆荚成熟后,摘取豆荚。

1.3.3 转化大豆植株及其后代的 PCR 检测 采用 CTAB 法提取植株叶片 gDNA,进行目的基因的 PCR 扩增和电泳检测。扩增所用引物序列为:phyA1:5'-ATGTCTAGACTGGCAGTCCCCGCCTCGAGA-3'; phyA2: 5'-CTAGGTACCCTAAGCAAAACACTCCGCCAATC-3'。PF2:5'-GGGCTTCCAGAGCACTAA-3'; PR2: 5'-ACCAAGACACGGACCAAA-3'。其中,phyA1 与 phyA2 为植酸酶基因 ORF 扩增引物,片段长度在 1 347 bp;PF2、PR2 为植酸酶基因内部扩增引物,片段长度在 753 bp。

1.3.4 转基因后代根系分泌植酸酶活性的检测技术 将转基因大豆(3 个株系)与野生型对照种子催芽,选取发芽整齐一致的材料种于石英砂中(每个材料 10 株),培养 9 d 后,转移至只含有植酸磷的营养液中(0.2 mmol·L⁻¹ 植酸,pH 6.0)。幼苗生长 26 d 后,转移至含有 1 mmol·L⁻¹ 对硝基苯磷酸二钠(p-NPP)酶反应液的三角瓶中,外面用 2 层黑色薄膜包裹。26℃、5 000 Lux 条件下进行培养,分别于培养后 24、48 h 进行酶活检测。酶活检测方法为:收集 1 mL 反应液,加入 5 mL,1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液,混匀,405 nm 测定吸光值。以空白对照调零,空白对照在加入植株根系前已加入 5 mL NaOH。大豆根系分泌植酸酶活性以单位时间、单位根系鲜重所生成的对硝基苯酚的微摩尔数来表示。

2 结果与分析

2.1 农杆菌介导子叶节转化大豆植株及其后代检测

利用农杆菌介导大豆子叶节遗传转化方法(图 2A),将 KSA 嵌和基因(根特异启动子 *pyk* + 信号肽基因 *S* + 植酸酶基因 *phyA*)转入冀豆 12、冀豆 16 和吉林 35 中,对转化植株进行 PCR 检测,结果有 30 个转化植株呈现 PCR 阳性,说明目的基因已初步整合至大豆基因组中。在获得的 30 个 T_0 代植株中,随机选取 11 个株系后代进行 PCR 检测,发现各株系均有一定数量的阳性植株存在,共检测到 72 株呈现阳性(图 3),说明目的基因已遗传给 T_1 代。随后,选取 3 个 T_1 代单株的自交后代(每个单株 20 粒)进行目的基因的 PCR 检测,结果发现有 23 个 T_2 代植株可扩增出目的条带(表 1),表明植酸酶基

因已经遗传至 T_2 代大豆植株。

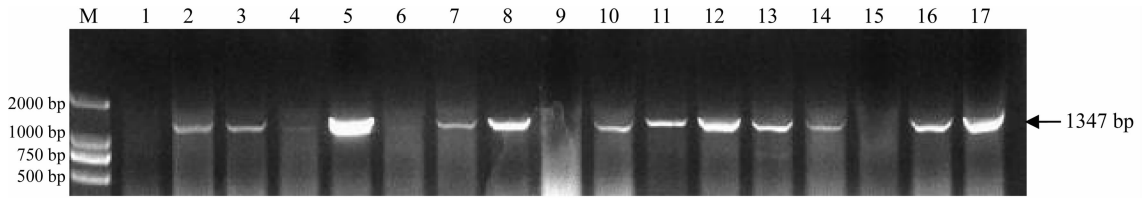
2.2 花粉管通道转化大豆植株及其后代检测

利用大豆花粉管通道遗传转化方法(图 2B),将含有 KSA 嵌和基因(*pyk* + *S* + *phyA*)的 PC-KSA 载体以及只含有 KSA 嵌和基因的 PCR 片段(无载体无标记的 KSA 基因)转入冀豆 12,五星 1 号中。将转化植株所结种子(T_0)播种于温室,经 PCR 检测发现,有 39 个含载体的 KSA 阳性植株和 45 个无载体 KSA 阳性植株可扩增出目的条带,即呈现 PCR 阳性。对 T_0 阳性植株的自交后代(T_1 代)进行 PCR 检测,结果发现有 29 株材料呈现 PCR 阳性,说明 KSA 基因已整合至基因组中(图 4)。随后选取 3 个 T_1 代单株的自交后代(每个单株 20 粒)进行目的基因 PCR 检测发现,有 5 个 T_2 代植株呈现 PCR 阳性(表 1)。



图 2 试验所用大豆遗传转化技术

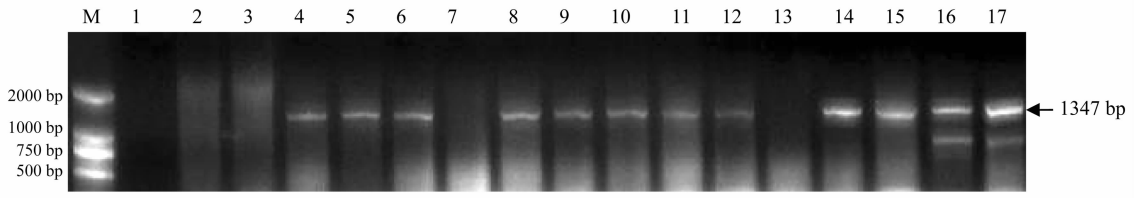
Fig. 2 Soybean genetic transformation methods in this study



M: DNA Marker DL2000; 1: 野生型对照; 2~16: T₁ 代植株; 17: 质粒对照
M: DNA Marker DL2000; 1: Wild type gDNA; 2~16: T₁ soybean gDNA; 17: Plasmid DNA

图 3 农杆菌介导转化大豆 T₁ 代植株的 PCR 检测

Fig. 3 PCR assay of T₁ transformed plants via *Agrobacterium*-mediated system



M: DNA Marker DL2000; 1: 野生型对照; 2~16: T₁ 代植株; 17: 质粒对照
M: DNA Marker DL2000; 1: Wild type gDNA; 2~16: T₁ soybean gDNA; 17: Plasmid DNA

图 4 花粉管通道转化大豆 T₁ 代植株的 PCR 检测

Fig. 4 PCR assay of T₁ transformed plants via pollen tube pathway

表 1 大豆转化植株的 T₂ 代 PCR 检测结果
Table 1 PCR detection results of T₂ generation transformed plants

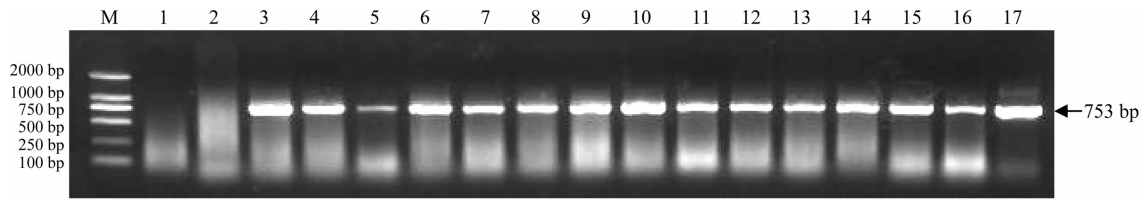
转化方法 Transformation method	株系代号 Plant code	植株数量 Plant numbers	PCR 阳性 PCR positive	PCR 阴性 PCR negative
农杆菌介导转化 <i>Agrobacterium</i> -mediated	A1	20	6	14
	A2	20	9	11
	A3	20	8	12
花粉管通道转化 Pollen tube pathway	S1	20	3	17
	S2	20	1	19
	S3	20	1	19

2.3 转 *phyA* 基因的 T₄ 代大豆植株根系植酸酶活性检测

对农杆菌转化获得的转 *phyA* 基因 T₂ 植株进行连续自交,并结合 PCR 检测来确定目的基因的整合。随后将已鉴定的转基因 T₄ 代植株(3 个株系)

与野生型对照培养在只含有植酸磷(0.2 mmol · L⁻¹ 植酸)的营养液中,转基因植株的 PCR 检测结果见图 5。植株培养 26 d 后发现,3 个转基因株系在植酸磷条件下的生长情况明显优于对照,且植株根系发育也明显好于对照,说明转基因材料可以在植酸磷的条件下生长良好(图 6)。

通过对转基因株系和野生型对照进行植株根系分泌型植酸酶活性检测,结果发现,3 个转基因株系的根系分泌型植酸酶活性分别比对照提高了 5%、13% 和 24%,且株系 2 和 3 的植酸酶活性增加水平与对照相比,分别达到显著和极显著水平;说明所转入的植酸酶基因 *phyA* 能够在根特异启动子的驱动下,在转基因大豆根系正常表达,且可在信号肽的引导下,分泌到根系周围,分解利用培养基质中的植酸态磷,供大豆植株正常生长发育所需。



M: DNA Marker DL2000; 1: 空白对照; 2: 野生型对照; 3~16: T₄ 代植株; 17: 质粒对照
M: DNA Marker DL2000; 1: Blank control; 2: Wild type gDNA; 3~16: T₄ soybean gDNA; 17: Plasmid DNA

图 5 转 *phyA* 基因 T₄ 代大豆植株 PCR 检测

Fig. 5 PCR assay of T₄ plants transformed by *Agrobacterium*-mediated system



1: 野生型对照; 2~4: 转 *phyA* 大豆 T_4 代材料

1: Wild type; 2-4: Transgenic soybean plants of T_4 generation

图 6 转 *phyA* 大豆与野生型对照在植酸磷中的根系生长情况

Fig. 6 The roots of transgenic soybean and wild type cultured in phytate

3 讨 论

磷素极易被固定,因而在土壤中的有效性非常低;一直以来,人们通常采用外施磷肥的方法来满足植物对磷素的吸收和利用^[12]。然而,外施磷肥由于存在长年累积固定、磷矿资源短缺和水资源磷污染等问题,很难满足农业可持续性发展的需求^[13-14]。有研究认为,土壤中存在大量的有机态磷,已成为潜在磷库,如何开发利用这一潜在资源已成为众多植物营养学家和育种学家亟需解决问题之一^[15]。近年来,许多学者开始利用基因工程手段来提高植物分解有机态磷的能力,并取得较好结果^[16-19]。该研究利用 2 种遗传转化方法,将无花果曲霉中的植酸酶基因转入了不同大豆品种中,并获得高代 PCR 阳性植株,为大豆高效植酸态磷利用新种质创制及转植酸酶基因大豆新品种的培育提供了基础材料。

研究所采用的转化载体 PC-KSA,是由 KSA 表达框和 NPT II 表达框所组成,其中 KSA 表达框中含有 1 个来源于拟南芥黑芥子酶基因的根特异表达启动子 *pyk10*、1 个来源于胡萝卜伸展蛋白的信号肽 S 编码序列和 1 个源自无花果曲霉的植酸酶 *phyA*。据报道,*pyk10* 启动子只在拟南芥的根和下胚轴中特异表达,而在植株其它部位表达量很低;胡萝卜伸展蛋白是一种胞外基质蛋白,其信号肽编码序列在转基因植株中能成功地引导曲霉植酸酶分泌到根外^[2]。该研究将该表达载体转入不同大豆品种中,通过测定 T_4 代转基因植株的根系植酸酶活性发现,基因能够在根特异启动子的驱动下,在大豆根

系正常表达,并能够在信号肽的引导下分泌到根际周围,显著提高了大豆植株分解利用营养液中植酸态磷的能力。

另外,在大豆遗传转化体系中,农杆菌介导子叶节转化与花粉管通道转化是目前常用的 2 种转化方法^[20-21]。不同学者利用这 2 种转化方法已分别获得许多相应的转基因材料,并且关于二者转化效率、遗传稳定性的研究也较多。由于外源基因在受体植物内的整合、遗传和稳定是一个非常复杂的过程,而外源基因能否在受体植物中稳定遗传和表达是开展转基因育种工作的关键所在^[22]。该研究不同转化方法所得转基因后代的遗传表明,农杆菌转化所获得的 T_2 代阳性比率(A1、A2、A3 株系)明显高于花粉管通道转化技术(S1、S2、S3 株系),这可能也与农杆菌转化目的基因拷贝数较少,转化基因易于稳定遗传等因素有关。

参考文献

- [1] Lung S C, Lim B L. Assimilation of phytate-phosphorus by the extracellular phytase activity of tobacco (*Nicotiana tabacum*) is affected by the availability of soluble phytate[J]. Plant and Soil, 2006, 279:187-199.
- [2] 李桂兰,祝建洪,孙建,等. 无花果曲霉植酸酶基因 *phyA* 的克隆、序列分析及表达[J]. 农业生物技术学报,2003,11(5): 520-524. (Li G L, Zhu J H, Sun J, et al. Cloning, sequence analysis and expression of the phytase *phyA* gene from *Aspergillus ficuum* [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2003, 11(5): 520-524.)
- [3] 乔亚科,李桂兰. 作物耐低磷机制及耐低磷育种研究进展[J]. 河北科技师范学院学报,2007,21(1):67-73. (Qiao Y

- K, Li G L. Research advance in mechanism of plant tolerance to low phosphorous and breeding[J]. Journal of Hebei Normal University of Science & Technology, 2007, 21(1): 67-73.)
- [4] Greiner R, Konietzny U. Phytase for food application[J]. Food Technology and Biotechnology, 2006, 44(2): 125-140.
- [5] Richardson A E, Hadobas P A, Hayes J E. Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate[J]. The Plant Journal, 2001, 25(6): 641-649.
- [6] Zimmermann P, Zardi G, Lehmann M, et al. Engineering the root-soil interface via targeted expression of a synthetic phytase gene in trichoblasts[J]. Plant Biotechnology Journal, 2003, 1(5): 353-360.
- [7] Yan B, Reddy M S S, Collins G B, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.] using immature zygotic cotyledon explants[J]. Plant Cell Reports, 2000, 19(11): 1090-1097.
- [8] 张琪,陈茹梅,杨文竹,等. 组成型表达转植酸酶基因(*phyA2*)玉米的获得[J]. 农业生物技术学报,2010,18(4):623-629. (Zhang Q, Chen R M, Yang W Z, et al. The obtaining of transgenic Maize plants with *PhyA2* gene constitutive express phytase [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2010, 18(4): 623-629.)
- [9] Li G L, Yang S H, Li M G, et al. Functional analysis of an *Aspergillus ficuum* phytase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its root-specific, secretory expression in transgenic soybean plants [J]. Biotechnology Letters, 2009, 31(8): 1297-1303.
- [10] Xiao K, Zhang J H, Harrison M, et al. Ectopic expression of a phytase gene from *Medicago truncatula* barrel medic enhances phosphorus absorption in plants[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2006, 48(1): 35-43.
- [11] Ma X F, Wright E, Ge Y X, et al. Improving phosphorus acquisition of white clover (*Trifolium repens* L.) by transgenic expression of plant-derived phytase and acid phosphatase genes[J]. Plant Science, 2009, 176(4): 479-488.
- [12] Yan X L, Wu P, Ling H Q, et al. Plant nutriomics in China: An overview[J]. Annals of Botany, 2006, 98(3): 473-482.
- [13] 严小龙,张福锁. 植物营养遗传学[M]. 北京:中国农业出版社,1997:8-9. (Yan X L, Zhang F S. Plant nutrition genetics [M]. Beijing: China Agricultural Press, 1997: 8-9.)
- [14] 周志高,汪金舫,周健民. 植物磷营养高效的分子生物学研究进展[J]. 植物学通报,2005,22(1):82-91. (Zhou Z G, Wang J F, Zhou J M. Current advances in the molecular biology of high efficient phosphorus nutrition in plants[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2005, 22(1): 82-91.)
- [15] 刘建中,李振声,李继云. 利用植物自身潜力提高土壤中磷的生物有效性[J]. 生态农业研究,1994,2(1):16-23. (Liu J Z, Li Z S, Li J Y. Utilization of plant potentialities to enhance the bio-efficiency of phosphorus in soil [J]. Eco-Agriculture Research, 1994, 2(1): 16-23.)
- [16] 韩胜芳,谷俊涛,肖凯. 高效表达黑曲霉 *PhyA* 基因改善白三叶草对有机态磷的利用[J]. 作物学报,2007,33(2):250-255. (Han S F, Gu J T, Xiao K. Improving organic phosphate utilization in transgenic white clover by over expression of *PhyA* gene from *Aspergillus niger* [J]. Acta Agronomica Sinica, 2007, 33(2): 250-255.)
- [17] 李进,侯海军,黄复深,等. 基因枪介导获得转植酸酶基因水稻研究[J]. 应用与环境生物学报,2008,14(1):6-10. (Li J, Hou H J, Huang F S, et al. Transformation of phytase gene into rice by particle bombardment[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2008, 14(1): 6-10.)
- [18] 刘欣芳,高晓蓉,苏乔,等. 转植酸酶基因玉米的获得及其后代的初步鉴定[J]. 玉米科学,2008,16(1):15-19. (Liu X F, Gao X R, Su Q, et al. Transconduct *phyAII* gene into maize inbred lines and the elementary apprise of transgenic progeny[J]. Journal of Maize Sciences, 2008, 16(1): 15-19.)
- [19] Lung S C, Chan W L, Yip W K, et al. Secretion of beta-propeller phytase from tobacco and *Arabidopsis* roots enhances phosphorus utilization[J]. Plant Science, 2005, 169(2): 341-349.
- [20] 刘海坤,卫志明. 大豆遗传转化研究进展[J]. 植物生理与分子生物学报,2005,31(2):126-134. (Liu H K, Wei Z M. Recent advances in soybean genetic transformation[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2005, 31(2): 126-134.)
- [21] 于洋,侯文胜,韩天富. 农杆菌介导大豆遗传转化技术的研究进展[J]. 大豆科学,2010,29(4):696-701. (Yu Y, Hou W S, Han T F. Approaches to *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean[J]. Soybean Science, 2010, 29(4): 696-701.)
- [22] Casas A M, Kononowicz A K, Bressan R A, et al. Cereal transformation through particle bombardment [J]. Plant Breeding Reviews, 1995, 13: 235-264.