

以 *bar* 基因为筛选标记转基因大豆的获得及鉴定

卢涛¹, 李红艳¹, 章洁琼¹, 胡小南¹, 寿惠霞², 唐桂香¹

(1. 浙江大学 农业与生物技术学院 作物科学研究所, 浙江 杭州 310058; 2. 浙江大学 生命科学学院 植物研究所, 浙江 杭州 310058)

摘要:在已优化的大豆农杆菌介导转化体系基础上,以发芽1~2 d的成熟大豆子叶节为外植体,以 *bar* 基因作为筛选标记基因,采用农杆菌介导法将胰蛋白酶抑制剂基因(*Sporamin*)和几丁质酶基因(*Chitinase* KDEL)转入大豆品种YC-2中。 T_0 代得到生根苗115株,其中采用除草剂叶片涂抹法和目的基因PCR检测法鉴定出阳性植株45株,其中选取的6个 T_0 代植株中有4个独立株系外源基因在 T_1 代遗传,其中2个 T_1 代株系呈3:1的遗传分离比例,2个 T_1 代株系分离比例大于3:1。 T_0 和 T_1 代经草丁膦叶片涂抹法鉴定为阳性的植株,通过 *bar* 试纸条法和目的基因PCR检测法鉴定也均表现为阳性,因此,135 mg·L⁻¹草丁膦叶片涂抹法可用于草丁膦筛选标记转基因大豆植株的大规模筛选。

关键词:*bar* 基因;转基因大豆;后代鉴定;草丁膦筛选

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2011)06-0895-06

Acquisition and Identification of Transgenic Soybean using *bar* as a Selective Agent

LU Tao¹, LI Hong-yan¹, ZHANG Jie-qiong¹, HU Xiao-nan¹, SHOU Hui-xia², TANG Gui-xiang¹

(1. Institute of Crop Science, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058; 2. Institute of Plant Science, College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China)

Abstract: On the basis of optimized soybean *Agrobacterium-tumefaciens* mediated transformation system, the trypsin inhibitor gene(*sporamin*) and chitinase gene(*chitinase* KDEL) were transformed into soybean cultivar YC-2 using germinated 1-2 days mature cotyledon node as explants and *bar* gene as a selectable agent in this paper. One hundred and fifteen putative transgenic soybean plants had been got and only 45 plants were positive transgenic plants identified by leaf painting 135 mg·L⁻¹ Basta and polymerase chain reaction(PCR) methods. Six T_0 positive plants were chosen, and four independent transgenic plants could be inherited into T_1 progeny and the segregation rate of two T_1 progenies were 3:1, the other two T_1 progenies were more than 3:1. The results suggest that leaf painting 135 mg·L⁻¹ Basta could be an effective and costless method to detect genetically modified soybeans progeny with *bar* gene as a selective agent.

Key words: *bar*; Transgenic soybean; Progeny detection; Glufosinate selection

自1996年全球第一个转基因作物商业化以来,转基因技术在大豆、玉米、棉花和油菜等作物中得到了广泛的应用,转基因大豆种植面积逐年扩大,截至2010年,累积种植面积首次超过了10亿hm²,占全球转基因作物种植面积的50%^[1]。

农杆菌介导是大豆转基因采用的主要方式,与其它作物相比,大豆虽然是农杆菌良好的寄主,但转化效率较低,Donaldson和Simmonds^[2]用农杆菌转化12个短季大豆品种子叶节,感染率可达92%;但仅从品种Accolibri得到了遗传稳定的转基因植株。大豆农杆菌介导的转化体系常以子叶节^[3-4]、半粒种子^[5]和胚尖^[6]等为材料,采用卡那霉素^[2]、潮霉素^[7]、草甘膦^[4]和草丁膦^[8-9]等作为筛选标记,通过在共培养过程中添加硫醇类化合物^[10]、半胱氨酸和 α -硫辛酸^[11]等抗氧化剂来提高农杆菌介导的

转化效率。经过对农杆菌介导转化体系的优化,目前该实验室已建立较稳定的草丁膦作为筛选标记的农杆菌介导转化体系,转化效率稳定在2%左右。

随着大豆农杆菌介导转化效率的提高,如何快速有效地从群体中筛选出携带外源基因的个体成为困扰转基因工作者的一个问题。PCR法检测目的基因是检测外源基因最常用的方法^[12],也有用种子萌发法^[15]、浸种法、根吸法和叶面喷雾法鉴定抗草丁膦大豆^[16]。经过对各种检测方法的比较,该试验采用浙江大学生命科学学院植物生理学与生物化学国家重点实验室已优化的农杆菌介导转化体系,用*bar*基因作为筛选标记,将*Sporamin*和*Chitinase* KDEL 2个目的基因转入大豆中,并采用除草剂涂抹法、*bar*试纸条法和PCR法分别鉴定 T_0 代和 T_1 转化大豆植株,并对筛选结果进行比较,为大豆

收稿日期:2011-09-19

基金项目:农业部转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08010-013B,2008ZX08004-0004);国家自然科学基金资助项目(31071443)。

第一作者简介:卢涛(1983-),男,硕士,研究方向为大豆分子育种。E-mail: 124lutao@sina.com。

通讯作者:唐桂香(1966-),女,副教授,博士,从事作物分子育种研究。E-mail: tanggx@zju.edu.cn。

转基因育种研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

受体大豆材料是由华南农业大学资环学院提供的YC-2,基础载体pTF101.1由浙江大学生命科学院植物生理学与生物化学国家重点实验室提供,pM1300-PMSN-PMCN载体由台湾大学叶开温教授提供,所用的质粒为pSOY22(图1),工程菌株EHA101由实验室保存。试验所用的大豆转化试剂和抗生素等均购自美国Sigma公司,bar试纸条购于

美国EnviroLogix公司,叶片涂抹用除草剂(商品名为Basta,主要成分为草丁膦)购自于美国巴斯夫公司。

1.2 试验方法

1.2.1 载体构建 pSOY22载体(图1)是通过对pTF101.1和pM1300-PMSN-PMCN载体改建而成。该载体含Sporamin、Chitinase KDEL及bar基因。Sporamin和Chitinase KDEL是由受伤特异诱导启动子启动,bar基因是受35S启动子启动。采用电激法将重组载体质粒转入农杆菌EHA101菌株中。



图1 pSOY22载体图

Fig. 1 Vector map of pSOY22

1.2.2 农杆菌菌液的制备 取含有重组载体质粒的甘油菌,接种在含有100 mg·L⁻¹壮观霉素,30 mg·L⁻¹卡那霉素和30 mg·L⁻¹氯霉素的5 mL YEP (10 g·L⁻¹蛋白胨,5 g·L⁻¹氯化钠,10 g·L⁻¹酵母提取物,15 g·L⁻¹琼脂,pH 7.0)中,250 r·min⁻¹,28℃震荡培养24 h。然后取200 μL YEP菌液转入上述含有抗生素的250 mL YEP中,250 r·min⁻¹,28℃震荡培养至OD₆₅₀ = 0.6~0.8,在24℃,3 600 r·min⁻¹离心10 min,去除上清液,用液体共培养基(LCCM,1/10 B5为基本培养基,添加30 g·L⁻¹蔗糖,1.67 mg·L⁻¹ BAP,3.9 g·L⁻¹ MES,0.25 mg·L⁻¹ GA₃和200 μmol·L⁻¹乙酰丁香酮,pH 5.7)重悬OD₆₅₀ = 0.6~0.8待用。

1.2.3 大豆农杆菌介导转化法 农杆菌介导法根据Paz等^[5]的方法略有改动。具体方法:成熟大豆种子经氯气灭菌10 h后,播种在发芽培养基(GM,B5培养基为基本培养基添加20 g·L⁻¹蔗糖和3.0 g·L⁻¹植物凝胶,pH 5.8)上,以发芽1 d成熟大豆子叶节为外植体,与农杆菌共侵染30 min;然后外植体在共培养基(CCM,1/10 B5为基本培养基,添加30 g·L⁻¹蔗糖,1.67 mg·L⁻¹ BAP,3.9 g·L⁻¹ MES,0.25 mg·L⁻¹ GA₃和200 μmol·L⁻¹乙酰丁香酮,0.45 g·L⁻¹琼脂,pH 5.7)中与农杆菌共培养,培养条件22℃,光照培养5 d;共培养后的外植体转入含筛选剂的芽诱导培养基(SI,B5为基本培养基,添加30 g·L⁻¹蔗糖,1.67 mg·L⁻¹ BAP,0.59 g·L⁻¹ MES,200 mg·L⁻¹ 替卡西林,100 mg·L⁻¹ 头孢霉素,

5 mg·L⁻¹草丁膦,0.80%琼脂,pH 5.8)上,外植体每隔14 d更换培养基,共诱导28 d后,将外植体转入含有筛选剂的芽伸长培养基(SE,MS为基本培养基,添加0.1 mg·L⁻¹生长素,0.25 mg·L⁻¹ GA₃,1 mg·L⁻¹玉米素,250 mg·L⁻¹替卡西林,100 mg·L⁻¹头孢霉素,5 mg·L⁻¹草丁膦,30 g·L⁻¹蔗糖,0.80%琼脂,pH 5.8)中,每隔14 d更换培养基,直至芽伸长至3~5 cm为止;将伸长的芽切下,放入生根培养基(RM,以1/2 MS为基本培养基,添加30 g·L⁻¹蔗糖,50 mg·L⁻¹头孢霉素,125 mg·L⁻¹替卡西林,3 mg·L⁻¹草丁膦,3.0 g·L⁻¹植物凝胶,pH 5.8)中诱导生根,约10 d左右伸长的芽开始长出健壮的根,生根苗先在生长室驯化14 d,之后将成活的苗移入温室中。各阶段培养基采用高温(120℃)和高压(0.11 MPa)灭菌,激素、抗生素和筛选剂采用0.22 μm过滤灭菌头灭菌,待培养基冷却到70℃左右时加入到培养基中。大豆培养室温度为(24±1)℃,光周期为16 h光照和8 h黑暗,光照强度7 000 lx。

1.2.4 T₀、T₁转基因后代的种植 T₀和T₁转基因后代均种植在浙江大学紫金港校区农业试验站玻璃大棚温室中。经检测为阳性的转基因T₀代植株自花授粉,单种单收得到T₁代种子;T₁种子先在灭过菌的沙床上发芽,待2片子叶出土展开时将其移栽到直径为22 cm含有丹麦品氏营养土的花盆中,花盆放入自然光照温室中,待2片对生真叶完全展开时,进行T₁代转基因阳性植株的鉴定。种植期间,移栽时在花盆内施入少量复合肥,然后每天人

工浇灌以保证大豆生长期间充足的水分。

1.2.5 转基因后代的鉴定 除草剂涂抹法:将 Basta 原液稀释为浓度 $135 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 在大豆第一对单叶完全展开时, 以主叶脉为分界线, 先用黑色标记笔标记半片叶子, 然后用棉签蘸取草丁膦液体直接擦拭未标记的半片叶子, 6 d 后观察半片叶片对除草剂的反应。如为阳性植株则除草剂涂抹过的叶片与未涂抹的叶片相比没有太大变化, 如为阴性植株则涂抹过除草剂的叶片明显变黄甚至枯萎。

bar 试纸条快速鉴定法: 取稍许叶片 (约半个指甲大小) 放入 1.5 mL 的离心管中, 用研磨棒将叶片研碎, 加入 300 μL 提取液, 搅拌均匀, 将试纸条按规定的方向插入混合液中, 5 min 后观察结果。若试纸条出现 2 条带就表明该植株是阳性植株, 若出现 1 条说明是阴性植株, 如果没有带表明操作有误。

多聚酶链反应法: 根据 Edward 等^[15] 的方法快速提取大豆基因组 DNA 用于 PCR 检测。根据 *bar*、*Sporamin* 和 *Chitinase* KDEL 基因序列设计引物, 检测目的基因是否转入大豆基因组中。*bar* 基因引物: F: 5' CGAGTCGACCGTGTACGTC 3', R: 5' GCAACTGTCCGTCCAATAGAC 3'; *Sporamin* 基因引

物 F: 5' ACACACGAACCCGCCTCCT 3', R: 5' CT-CAACATGGGGTCGTGGAAT 3'; *Chitinase* KDEL 基因引物 F: 5' ACTACGCCGATCTTGGGAC 3', R: 5' CCGTACCAATCAGGCTATCCG 3'。PCR 反应程序为 94°C , 2 min; 94°C , 30 s; 56°C , 30 s; 72°C , 30 s; 共 30 个循环然后 72°C 延伸 10 min。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳和凝胶成像系统观察目的基因产物的扩增情况。

2 结果与分析

2.1 农杆菌介导法 T_0 和 T_1 代转基因大豆的获得

所优化的适于大豆转化体系为发芽 1 d 的 YC2 品种子叶节外植体 (图 2A), 采用 OD_{650} 0.8 左右的农杆菌菌液共侵染外植体 30 min, 在含有 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫辛酸的共培养基光照培养 5 d (图 2B, 图 2C), 然后在 SI 和 SE 培养基上诱导芽的生长 28 d (图 2D, 图 2E) 和伸长 (图 2F), 伸长的芽再在 RM 上诱导生根 (图 2G), 待根伸长到 3 ~ 5 cm (图 2H) 将生根苗放于组培室炼苗 7 d (图 2I) 左右再转入温室中培养。采用这一转化体系的大豆转化效率平均可以达到 3% 左右, 最短可以在 80 d 得到转基因 T_0 代苗。 T_0 代阳性苗在温室中自花授粉获得 T_1 代苗 (图 2J)。

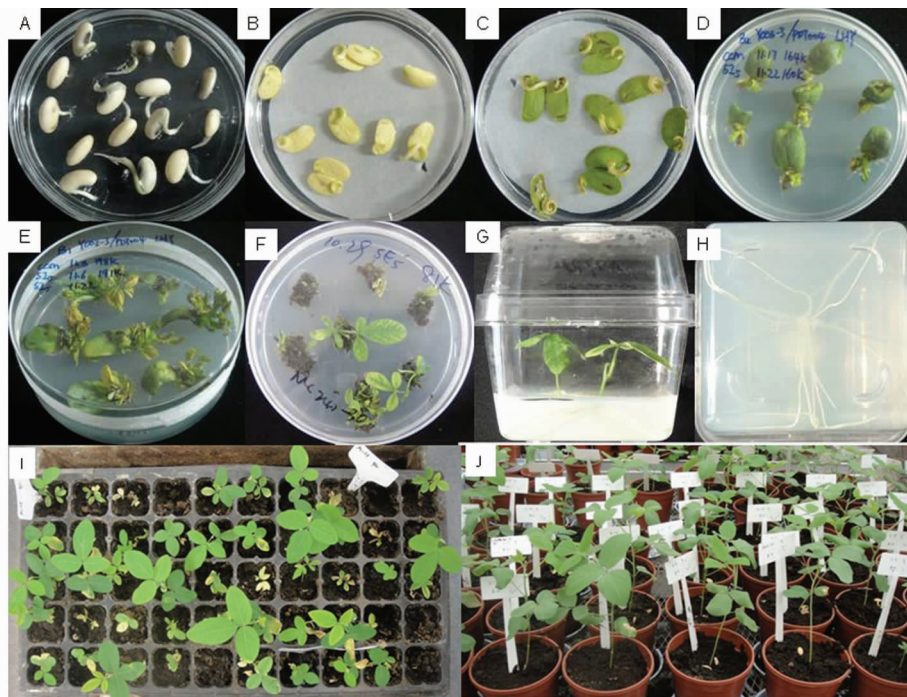


图 2 大豆子叶节农杆菌介导转化过程

Fig. 2 Process of *Agrobacterium*-mediated transformation by soybean cotyledonary nodes

2.2 T₀代转基因大豆的鉴定

采用这一转化体系先后得到 T₀代生根苗 115 株,这些生根苗采用草丁膦涂抹和 PCR 鉴定,鉴定均为阳性的苗 55 株,其中 45 株阳性苗自花授粉得到 T₁代种子。从中随机选取 6 个阳性株系 498, 506, 508, 509, 538 和 549 进一步考察这些株系的 T₁代分离,首先利用 3 种鉴定方法对 6 个株系的 T₀代植株进行再次验证。结果表明:这几个转化株系涂草丁膦半张叶片与未涂草丁膦的半张叶片叶色没有显著差异,说明 *bar* 基因已经转入大豆植株中,叶片表现为草丁膦抗性(图 3A)。目的基因 *bar*, *Sporamin* 和 *Chitinase* KDEL PCR 检测表明这些株系中含有 *bar*, *Sporamin* 和 *Chitinase* KDEL 基因(图 3B)。*bar* 试纸条检测结果显示这 6 个株系中都含有 *bar* 蛋白(图 3C)。

2.3 T₁代转基因大豆的鉴定和分离

T₀代自花授粉得到 T₁代,选取的 6 个 T₀代阳性

苗中只有 4 个独立的 T₀代转基因阳性株系(508, 509, 538, 549)外源基因能稳定遗传到 T₁代,其余转基因株系均表现为阴性,外源基因表现为沉默不遗传。3 种方法鉴定 498, 506, 508, 509, 538 和 549 株系的 38 株 T₁代植株表明(表 1),所有草丁膦涂抹为阳性的植株, *bar* 试纸条和 3 个目的基因 PCR 鉴定都为阳性;所有草丁膦涂抹为阴性的植株, *bar* 试纸条鉴定和 3 个目的基因 PCR 鉴定都为阴性。由表 1 可知, T₁代大豆转化植株开始分离, T₀代为阳性的 498 和 506 株系, T₁代分别得到 5 株和 6 株大豆植株,但全为阴性植株,转基因没有能够稳定的遗传; 538 因为只收到 1 粒 T₁代种子,这 1 粒种子在 T₁代表现为阳性; T₀代为阳性的 508 和 509 株系, T₁代阳性植株接近 3:1 的遗传分离比例; T₀代为阳性的 549 株系, T₁代阳性植株遗传分离比例为 5:1。

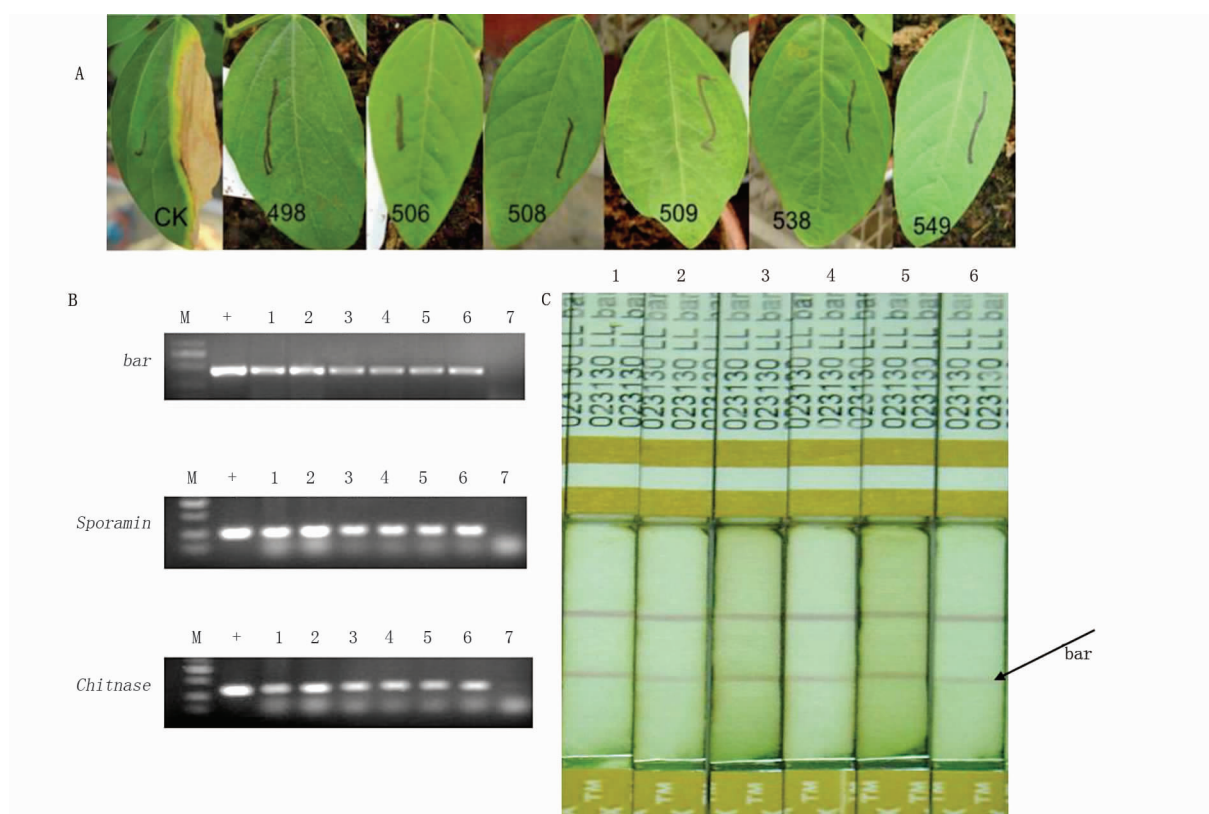


图 3 T₀代转基因大豆株系鉴定图

Fig.3 Identification of T₀ putative transgenic soybean plants

3 讨 论

自 20 世纪 50 年代,人们就已经开始大豆组织培养方面的研究,但是由于大豆组织培养技术难以掌握,因此该领域的研究进展十分缓慢^[17-18]。该试验中采用优化的农杆菌介导体系能够获得转化植株,但阳性率较低,115 株 T₀代生根苗 45 株为阳性植株,选取的 6 株 T₀代植株中能稳定遗传到 T₁代的只有 4 个株系。如何提高大豆阳性转化率和外源遗传率,还有待于进一步的研究。大豆阳性转化率和外源遗传率可能与转化过程中所用的载体、基因型、农杆菌菌株等因素有关,Olhoft 等^[19]研究表明添加银离子可以增加外源基因的遗传整合效率和

单拷贝率。

3 种方法检测草丁膦作为筛选标记的转化植株,结果较一致。其中 PCR 方法是传统的鉴定方法比较可靠,但试验步骤比较繁琐,需要一定的工作量和时间;*bar* 试纸条法简单快速,但是成本比较高;叶片草丁膦涂抹法操作简单,成本低且工作效率高,T₀代选择幼嫩的叶片,T₁代在大豆出苗后 2 片单叶展开时,135 mg·L⁻¹草丁膦涂抹 6 d 就可明确试验结果,因此这种方法在转基因后代鉴定过程中值得推广使用。值得注意的是草丁膦涂抹法要选择合适的叶片,叶片如果太老或者受病虫害影响,则草丁膦涂抹后叶片不能反映真实情况而造成试验误差。

表 1 T₁代转基因大豆鉴定结果

Table 1 T₁ putative transgenic soybean identification using three methods

T ₀ 植株编号 T ₀ plant No.	T ₁ 植株编号 T ₁ plant No.	除草剂抗性 Herbicide tolerance	<i>bar</i> 试纸条鉴定结果 <i>bar</i> stick assay	PCR- <i>bar</i>	PCR-Sporamin	PCR-Chitinase
T ₀ -498	T ₁ -498-1	-	-	-	-	-
	T ₁ -498-2	-	-	-	-	-
	T ₁ -498-3	-	-	-	-	-
	T ₁ -498-4	-	-	-	-	-
	T ₁ -498-5	-	-	-	-	-
T ₀ -506	T ₁ -506-1	-	-	-	-	-
	T ₁ -506-2	-	-	-	-	-
	T ₁ -506-3	-	-	-	-	-
	T ₁ -506-4	-	-	-	-	-
	T ₁ -506-5	-	-	-	-	-
	T ₁ -506-6	-	-	-	-	-
T ₀ -508	T ₁ -508-1	+	+	+	+	+
	T ₁ -508-2	+	+	+	+	+
	T ₁ -508-3	+	+	+	+	+
	T ₁ -508-4	+	+	+	+	+
	T ₁ -508-5	+	+	+	+	+
	T ₁ -508-6	+	+	+	+	+
	T ₁ -508-7	-	-	-	-	-
	T ₁ -508-8	-	-	-	-	-
	T ₁ -508-9	-	-	-	-	-
T ₀ -509	T ₁ -509-1	+	+	+	+	+
	T ₁ -509-2	+	+	+	+	+
	T ₁ -509-3	+	+	+	+	+
	T ₁ -509-5	+	+	+	+	+
	T ₁ -509-6	+	+	+	+	+
	T ₁ -509-7	+	+	+	+	+
	T ₁ -509-8	+	+	+	+	+
	T ₁ -509-9	-	-	-	-	-
	T ₁ -509-10	-	-	-	-	-
	T ₁ -509-11	-	-	-	-	-
T ₀ -538	T ₁ -538-1	+	+	+	+	+
T ₀ -549	T ₁ -549-1	+	+	+	+	+
	T ₁ -549-2	+	+	+	+	+
	T ₁ -549-3	+	+	+	+	+
	T ₁ -549-4	+	+	+	+	+
	T ₁ -549-5	+	+	+	+	+
	T ₁ -549-6	-	-	-	-	-

参考文献

- [1] Clive J. 2010 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(3): 1-12. (Clive J. Global biological technology & commercial development situation of genetically modified crops in 2010[J]. China Biotechnology, 2011, 31(3): 1-12.)
- [2] Hinchey M A W, Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer[J]. Nature Biotechnology, 1988, 6: 915-922.
- [3] 李文霞, 宁海龙, 吕文河, 等. 农杆菌介导大豆子叶节转化系统的优化[J]. 中国农业科学, 2008, 41(4): 971-97. (Li W X, Ning H L, Lv W H, et al. Optimization of the *Agrobacterium*-mediated transformation systems of soybean cotyledonary node[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(4): 971-97.)
- [4] Clemente T, LaValle B J, Howe A R, et al. Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. Crop Science, 2000, 40: 797-803.
- [5] Paz M M, Martinez J C, Kalvig A B, et al. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation[J]. Plant Cell Reports, 2004, 25: 206-213.
- [6] 刘海坤, 卫志明. 利用根瘤农杆菌介导转化大豆成熟种子胚尖获得转基因植株[J]. 植物生理与分子生物学报, 2004, 30(6): 631-636. (Liu H K, Wei Z M. Transgenic soybean obtained with *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryonic tip of soybean mature seeds[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2004, 30(6): 631-636.)
- [7] Olhoft P M, Lin K, Galbraith J, et al. The role of thiol compounds increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells[J]. Plant Cell Reports, 2001, 20: 731-737.
- [8] Zeng P, Vadenais D A, Zhang Z, et al. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill][J]. Plant Cell Reports, 2004, 22: 478-482.
- [9] Zhang Z Y, Xing A Q, Staswick P. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean[J]. Plant Cell, Tissue and Organize Culture, 1999, 56: 37-46.
- [10] Olhoft P M, Somers D A. Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells[J]. Plant Cell Reports, 2001, 20: 706-711.
- [11] 杨晓凤, 卢涛, 周正剑, 等. α -硫辛酸对大豆农杆菌介导 *GUS* 瞬时表达和芽诱导的影响[J]. 大豆科学, 2011, 30(4): 552-556. (Yang X F, Lu T, Zhou Z J, et al. Effect of α -lipoic acid on the *Agrobacterium-tumefaciens* mediated *GUS* transient expression rate and shoot induction percentage in soybean (*Glycine max* L.)[J]. Soybean Science, 2011, 30(4): 552-556.)
- [12] Coyenechea B, Moram R, Gutierrez C. Screening of transgenic plants by PCR[J]. Biotechnology Application, 1991, 8: 237-241.
- [13] 徐传祥, 蒯本科, 王文东, 等. 简便实用的转抗除草剂基因后代植株鉴定方法—种子萌发测定法[J]. 复旦学报(自然科学版), 2000, 30(3): 318-321. (Xu C X, Kuai B K, Wang W D, et al. Seed germination test a simple but effective way of analyzing transgenic progenies transformed with the *bar* gene[J]. Journal of Fudan University (Natural Science Edition), 2000, 30(3): 318-321.)
- [14] 孙磊, 韩俊友, 李宏宇. 大豆再生植株抗草铵膦的筛选方法研究[J]. 大豆科学, 2010, 29(6): 1019-1023. (Sun L, Han J Y, Li H Y. Comparison on methods screening of transgenic soybean resistant to glufosinate[J]. Soybean Science, 2010, 29(6): 1019-1023.)
- [15] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis[J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19(6): 1349.
- [16] 张宏军, 崔海兰, 倪汉文, 等. 抗草胺膦转基因水稻品种的快速检测方法的比较[J]. 生物技术通报, 2003(1): 45-48. (Zhang H J, Cui H L, Ni H W, et al. Comparison of the methods of detecting glufosinate-tolerant transgenic rice seeds[J]. Biotechnology Bulletin, 2003(1): 45-48.)
- [17] 王晓春, 王罡, 季静, 等. 农杆菌介导的大豆体细胞胚遗传转化影响因子的研究[J]. 大豆科学, 2005, 24(1): 21-25. (Wang X C, Wang G, Ji J, et al. The factors influencing genetic transformation system in soymatic embryos of soybean mediated by *Agrobacterium*[J]. Soybean Science, 2005, 24(1): 21-25.)
- [18] 王萍, 王罡, 季静. 大豆体细胞胚胎发生与农杆菌介导的遗传转化[J]. 遗传, 2004, 26(5): 695-700. (Wang P, Wang G, Ji J. Studies of somatic embryogenesis and genetic transformation by *Agrobacterium*-mediated in soybean[J]. Hereditas, 2004, 26(5): 695-700.)
- [19] Olhoft P M, Fligel L E, Somers D A. T-DNA locus structure in a large population of soybean plants transformed using the *Agrobacterium*-mediated cotyledonary-node method[J]. Plant Biotechnology Journal, 2004, 2: 289-300.