

## T<sub>5</sub>代 $\gamma$ -亚麻酸转基因大豆的遗传稳定性分析

陈 晟<sup>1</sup>, 郭丽琼<sup>1,2</sup>, 宋景深<sup>1</sup>, 林俊芳<sup>1,2</sup>

(1. 华南农业大学 食品学院; 2. 华南农业大学 生物质能研究所, 广东 广州 510642)

**摘要:** 利用PCR检测和标记基因抗性检测对表达 $\gamma$ -亚麻酸转基因大豆第5代植株的外源基因遗传稳定性及目的基因和抗性基因的分离情况进行了分析。结果表明: 在20个转基因大豆株系中, 有2个转基因大豆株系(TS824和TS825)只含有 $\Delta 6$ -*fad*基因而没有*bar*基因; 7个转基因大豆株系(TS81、TS83、TS85、TS87、TS811、TS814、TS818)只含有*bar*基因而没有 $\Delta 6$ -*fad*基因; 9个转基因大豆株系(TS88、TS89、TS810、TS813、TS815、TS816、TS817、TS819和TS820)既有 $\Delta 6$ -*fad*基因也有*bar*基因; 2个转基因大豆株系(TS82和TS86)既没有 $\Delta 6$ -*fad*基因也没有*bar*基因。因此,  $\Delta 6$ -*fad*基因在部分株系中获得了稳定的遗传, 同时有2个株系目的基因和抗性基因在后代中分离。

**关键词:** 遗传稳定性; 转基因大豆;  $\gamma$ -亚麻酸;  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2012)01-0024-05

## Genetic Stability Analysis of the Fifth Generation of Transgenic Soybeans Expressing $\gamma$ -linolenic Acid

CHEN Sheng<sup>1</sup>, GUO Li-qiong<sup>1,2</sup>, SONG Jing-shen<sup>1</sup>, LIN Jun-fang<sup>1,2</sup>

(1. College of Food Science, South China Agricultural University; 2. Institute of Biomass, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China)

**Abstract:** The genetic stability of foreign gene and separation of  $\Delta 6$ -*fad* and *bar* gene were observed in the 5th generation of transgenic soybeans expressing  $\gamma$ -linolenic acid. By PCR amplification and resistance testing of selective marker gene, the genome of transgenic soybeans TS824 and TS825 were integrated  $\Delta 6$ -*fad* gene (marker free); TS81, TS83, TS85, TS87, TS814, TS816 and TS818 were integrated *bar* gene; TS88, TS89, TS810, TS813, TS815, TS816, TS817, TS819 and TS820 were integrated both  $\Delta 6$ -*fad* gene and *bar* gene; neither  $\Delta 6$ -*fad* gene nor *bar* gene was detected in TS82 and TS86. The results showed that  $\Delta 6$ -*fad* gene was stably maintained in the genome of part of transgenic soybeans, and  $\Delta 6$ -*fad* and *bar* gene of transgenic soybeans TS824 and TS825 were separated.

**Key words:** Genetic stability; Transgenic soybeans;  $\gamma$ -linolenic acid;  $\Delta 6$ -fatty acid desaturase

$\gamma$ -亚麻酸( $\gamma$ -linolenic acid, GLA)是一种多不饱和脂肪酸, 在人体的激素调节和脂肪酸代谢中发挥重要的生理作用<sup>[1-3]</sup>。 $\gamma$ -亚麻酸是多不饱和脂肪酸代谢 n-6 途径中的第一个中间代谢产物, 由 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶催化亚油酸而来,  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶( $\Delta 6$ -fatty acid desaturase,  $\Delta 6$ -*fad*)是 $\gamma$ -亚麻酸生物合成的关键酶。大豆含有丰富的蛋白质、游离脂肪酸、矿物质等营养成分。大豆游离脂肪酸中油酸、亚油酸含量极高, 而亚油酸是合成 $\gamma$ -亚麻酸的前体。因此将 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因导入大豆中理论上就能利用亚油酸进行脂肪酸代谢产生 $\gamma$ -亚麻酸。

研究表明, 导入的基因进入受体植株后大多数能稳定遗传<sup>[4-5]</sup>, 但也有一些由于外源基因整合方式和拷贝数不同或者由于损伤、丢失而导致不规则

的遗传<sup>[6]</sup>。同时, 由于基因的分离, 也可培育出无选择标记的植株<sup>[7-8]</sup>, 从而提高转基因植物的食用安全性。课题组在前期工作中已构建含有目的基因 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶和选择标记基因*bar*基因的表达质粒 pLIN60 并导入大豆植株中, 同时检测到该基因已成功整合进大豆的基因组中<sup>[9]</sup>, 之后从 T<sub>3</sub>代中挑选出 $\gamma$ -亚麻酸含量最高的1株进行繁殖, 得到20株 T<sub>4</sub>代植株, 每株大豆又分别生产若干 T<sub>5</sub>代种子, T<sub>5</sub>代按来自不同的 T<sub>4</sub>代植株分别归为不同的株系。该研究对转基因大豆的 T<sub>5</sub>代种子进行种植, 采用PCR法检测外源基因在大豆 T<sub>5</sub>代植株中的遗传稳定性及目的基因和抗性基因的分离情况, 并利用转基因大豆叶片对除草剂的敏感性来验证抗性*bar*基因的分离。

收稿日期: 2011-10-27

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项课题(2009ZX0004-007B); 广东省科技攻关项目(2005B20101009, 2009A020102004)。

第一作者简介: 陈晟(1988-), 男, 在读硕士, 研究方向为转基因大豆及生物技术。E-mail: ngcs1988@126.com。

通讯作者: 林俊芳(1962-), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向为生物活性物质与生物炼制。E-mail: linjf@scau.edu.cn。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 大豆品种  $T_5$  代莆豆 8008 株系 TS81、TS82、TS83、TS85、TS86、TS87、TS88、TS89、TS810、TS811、TS813、TS814、TS815、TS816、TS817、TS818、TS819、TS820、TS824、TS825, 分别来自 20 株  $T_4$  代植株, 转基因大豆种子及非转基因大豆 S8 对照均由课题组张秀春博士提供。

1.1.2 表达质粒 表达质粒 pLIN60 含有目的基因  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因和选择标记基因 *bar* 基因, 分别插在同一质粒的 2 个相互独立的 T-DNA 内, 由课题组构建。

1.1.3 主要试剂 TaqDNA 聚合酶、dNTPs 等 PCR 试剂购自瑞真生物科技有限公司, 寡核苷酸引物由上海生物工程有限公司合成, DNA Marker DL2000 购自北京天为时代科技有限公司, 除草剂 glufosinate 购自广州威佳科技有限公司, 其它各种试剂为国产分析纯。

### 1.2 试验方法

1.2.1 大豆的种植和叶片采集 大豆于 5 月份在华南农业大学实习基地大棚中种植, 试验采用完全随机区组设计, 3 次重复 (I、II 和 III 区), 每株系 1 盘, 每盘 3~8 粒种子。大豆出苗 30 d 以后, 分别从 3 个区组的每盘大豆中摘取大豆顶端叶片 5~8 片, 用蒸馏水洗净后尽快放入  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱, 备用。

1.2.2 PCR 扩增及检测 采用 CTAB 法<sup>[10]</sup>提取转基因大豆和非转基因大豆对照的叶片基因组 DNA, 以其为模版, 进行 PCR 扩增。根据张秀春等<sup>[11]</sup>的报道设计目的基因  $\Delta 6$ -*fad* 的 PCR 扩增引物为 DesatF (5'-TTT TTC ATC CAT GGC FGC TCA AAT C-3') 和 DesatR (5'-TTT TTT CTA GAT TAA CCA TGA GTG TGA AGA GC-3'), PCR 反应条件:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 循环参数:  $94^{\circ}\text{C}$  40 s,  $48^{\circ}\text{C}$  40 s,  $72^{\circ}\text{C}$  90 s, 33 个循环,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。根据张新梅等<sup>[12]</sup>的报道设计标记基因 *bar* 基因的 PCR 扩增引物为 ZH1 (5'-AAG CAC GGT CAA CTT CCG TA-3') 和 ZH2 (5'-GTT TCT GGC AGC TGG ACT TC-3'), PCR 反应条件:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 循环参数:  $94^{\circ}\text{C}$  40 s,  $52^{\circ}\text{C}$  40 s,  $72^{\circ}\text{C}$  60 s, 33 个循环,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。PCR 结束后分别取 5  $\mu\text{L}$  扩增产物用 1% 琼脂糖凝

胶电泳检测。

### 1.3 除草剂抗性检测

选择大豆植株比较鲜嫩的叶子 1~2 片用蒸馏水冲洗干净, 轻轻擦干以免损伤叶片, 然后用灭菌的棉签将除草剂 (glufosinate, 浓度  $100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 均匀地涂抹到叶片上。涂抹后第 7 天观察并记录大豆叶片的枯死情况。不含 *bar* 基因或 *bar* 基因没有得到表达的大豆叶片对除草剂敏感, 涂抹过除草剂后会出现黄色枯斑; 含 *bar* 基因并且 *bar* 基因得到表达的大豆叶片会对除草剂产生抗性, 不会出现黄色枯斑。

## 2 结果与分析

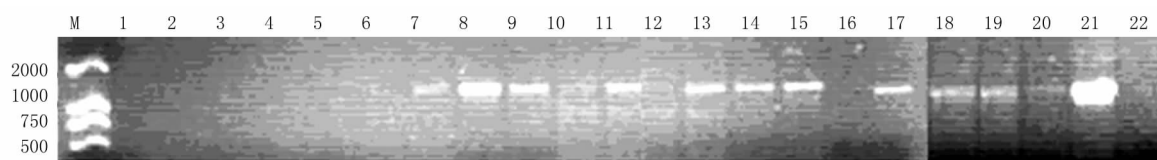
### 2.1 转基因大豆的 PCR 鉴定

2.1.1 目的基因  $\Delta 6$ -*fad* 的 PCR 检测 分别用引物 desatF 和 desatR PCR 扩增目的基因  $\Delta 6$ -*fad*, 由表 1 可知, 3 个区组的 TS88、TS89、TS810、TS813、TS815、TS816、TS817、TS819、TS824、TS825 号和 I 区的 TS820 大豆株系 (TS820 在 II、III 区植株缺失) 扩增出与阳性质粒 pLIN60 相同的大小约为 1.3 kb 的目的基因  $\Delta 6$ -*fad* 的特异条带, 这说明目的基因  $\Delta 6$ -*fad* 能在这些大豆植株中稳定遗传, 而其它植株则没有扩增出目的条带。部分结果 (I 区) 如图 1 所示。

2.1.2 选择标记基因 *bar* 的 PCR 检测 分别用引物 ZH1 和 ZH2 PCR 扩增选择标记基因 *bar*, 由表 1 可知, 3 个区组的 TS81、TS83、TS85、TS87、TS88、TS89、TS810、TS811、TS813、TS814、TS815、TS816、TS817、TS818、TS819 株系和 I 区 TS820 株系扩增出与表达载体 pLIN60 相同的大小为 400 bp 左右的选择标记基因 *bar* 的特异条带, 而 3 个区组的 TS82、TS86、TS824、TS825 株系没有扩增出这样的特异条带。部分结果 (I 区) 如图 2 所示。

### 2.2 选择标记基因 *bar* 基因抗性检测

除草剂涂抹结果表明: TS82、TS86、TS824、TS825 和 S8-CK 株系不具有除草剂抗性, 而 TS81、TS83、TS85、TS87、TS88、TS89、TS810、TS811、TS813、TS814、TS815、TS816、TS817、TS818、TS819 株系和 I 区 TS820 株系具有除草剂抗性。3 个区组的检测结果完全一致。图 3 分别为 TS824、TS818 和非转基因 S8-CK 植株的检测结果, 箭头所指为除草剂涂抹位置。



M:DL2000;泳道 1 ~ 20: TS81、TS82、TS83、TS85、TS86、TS87、TS88、TS89、TS810、TS811、TS813、TS814、TS815、TS816、TS817、TS818、TS819、TS820、TS824、TS825 株系的 PCR 产物;泳道 21:以质粒 pLIN60 为模板的 PCR 产物;泳道 22:非转基因 S8-CK 的 PCR 产物;下同。

M:DL2000 DNA ladder;Lane1-20:PCR product derived from TS81,TS82,TS83,TS85,TS86,TS87,TS88,TS89,TS810,TS811,TS813,TS814,TS815,TS816,TS817,TS818,TS819,TS820,TS824,TS825; Lane21: PCR product derived from plasmid pLIN60 template; Lane22:PCR product derived from non-transgenic S8-CK;the same below.

图 1 I 区转基因大豆  $\Delta 6$ -*fad* 基因的 PCR 鉴定

Fig. 1 PCR identification of  $\Delta 6$ -*fad* gene of transgenic soybeans in region I

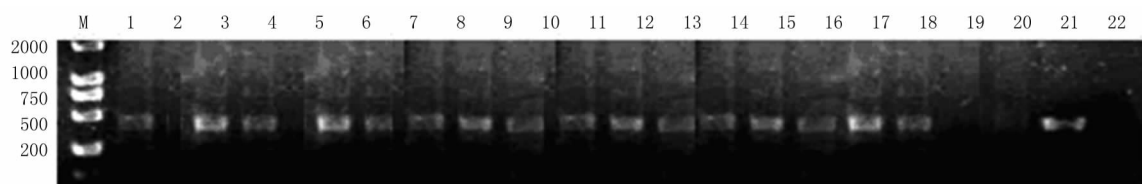


图 2 I 区转基因大豆 *bar* 基因的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR indentification of *bar* gene of transgenic soybeans in region I



a. TS824 b. TS818 c. S8-CK

图 3 大豆抗除草剂检测结果

Fig. 3 Herbicide resistance testing of soybeans

### 2.3 $T_5$ 代转基因大豆的目的基因遗传与分离分析

如表 1 所示,转基因大豆对除草剂 glufosinate 抗性检测结果与 *bar* 扩增检测结果一致,而且除 TS820 外,3 个区组的  $\Delta 6$ -*fad* 扩增检测结果也一致,具有重复性。综上所述,分离得到 TS824 和 TS825 株系为只含有  $\Delta 6$ -*fad* 基因而没有 *bar* 基因的转基因大豆。而 TS88、TS89、TS810、TS813、TS815、TS816、TS817、TS819、TS820 株系为既有  $\Delta 6$ -*fad* 基因也有 *bar* 基因的大豆;TS81、TS83、TS85、TS87、TS811、TS814 和 TS818 株系只含有 *bar* 基因而没有

$\Delta 6$ -*fad* 基因;TS82 和 TS86 既没有  $\Delta 6$ -*fad* 基因也没有 *bar* 基因。

## 3 讨论

外源基因导入植株后在后代能否稳定遗传是研究人员普遍关注的问题,常规杂交育种的大量试验已确定整合到受体细胞染色体的基因大部分能够稳定遗传。转化的外源基因在理论上和常规杂交实现基因的转移一样,大多数整合一旦发生,插

表 1   Δ6-*fad* 扩增、*bar* 扩增以及除草剂抗性检测结果

Table 1   Identification of Δ6-*fad* and *bar* gene amplification and resistance testing of herbicide

大豆株系 Soybean lines	Ⅰ 区 Region I			Ⅱ 区 Region II			Ⅲ 区 Region III		
	Δ6- <i>fad</i> 扩增 Δ6- <i>fad</i> gene amplification	<i>bar</i> 扩增 <i>bar</i> gene amplification	除草剂抗性 Herbicide resistance	Δ6- <i>fad</i> 扩增 Δ6- <i>fad</i> gene amplification	<i>bar</i> 扩增 <i>bar</i> gene amplification	除草剂抗性 Herbicide resistance	Δ6- <i>fad</i> 扩增 Δ6- <i>fad</i> gene amplification	<i>bar</i> 扩增 <i>bar</i> gene amplification	除草剂抗性 Herbicide resistance
TS81	—	+	+	—	+	+	—	+	+
TS82	—	—	—	—	—	—	—	—	—
TS83	—	+	+	—	+	+	—	+	+
TS85	—	+	+	—	+	+	—	+	+
TS86	—	—	—	—	—	—	—	—	—
TS87	—	+	+	—	+	+	—	+	+
TS88	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TS89	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TS810	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TS811	—	+	+	—	+	+	—	+	+
TS813	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TS814	—	+	+	—	+	+	—	+	+
TS815	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TS816	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TS817	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TS818	—	+	+	—	+	+	—	+	+
TS5819	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TS820	+	+	+	/	/	/	/	/	/
TS824	+	—	—	+	—	—	+	—	—
TS825	+	—	—	+	—	—	+	—	—
S8-CK	—	—	—	—	—	—	—	—	—

表中“+”表示检测结果阳性,“—”表示检测结果为阴性,“/”表示结果缺失。

“+”indicates positive testing results, “—” indicates negative testing results, “/” indicates losing results.

入的外源基因在减数分裂中能保持下来,并稳定地通过有性过程传递到后代,保持高度的减数分裂稳定性<sup>[13]</sup>。但由于整合的随机性和复杂性,也有外源基因在减数分离中丢失的现象<sup>[14]</sup>。该研究在前期工作中虽已将Δ6-脂肪酸脱氢酶基因导入大豆中并证实整合到大豆染色体上,但经过多次的传代,发现有将近一半的外源目的基因Δ6-*fad* 在后代中由于基因的分离丢失。

由于多数转基因系统采用抗生素基因、抗除草剂基因等作为选择标记,这些转基因植物的生物安全性越来越被人们所质疑。因此,去除转基因植株中标记基因是提高植株生物安全性的重要途径之一,也易被人们所接受。目前,培育无选择标记基因植物的方法主要有共转化系统、特异重组酶转化系统及转座子系统。其中共转化系统是将目的基因和标记基因整合到 2 个 T-DNA 中,并构建于 1 个或分别构建于 2 个载体中进行转化,在遗传过程中通过减数分裂使 2 个基因得到分离。此方法是研究最早且最成熟的技术,应用广泛,转化效率相对

较高。Komari 首次采用共转化转化植物,发现后代的选择标记与目的基因约有 40% 能独立分离<sup>[7]</sup>。目前关于共转化的报道已涉及小麦、烟草、玉米、水稻、大豆等多种作物<sup>[12,15-18]</sup>。课题组前期工作中将目的基因Δ6-*fad* 和筛选标记基因 *bar* 分别插入到同一质粒的 2 个相互独立的 T-DNA 内,构建成共转化表达载体 pLIN61 并转化大豆,并经过数次的遗传传代,Δ6-*fad* 基因和 *bar* 基因在后代中逐渐得到分裂,结果发现 T<sub>5</sub> 代植株中有 2 株只含有 Δ6-*fad* 基因而没有 *bar* 基因,成功获得了无选择标记基因的转基因大豆植株。

参考文献

[1] 赵鹏,姚思宇,刘荣珍,等. γ-亚麻酸降血脂的动物实验研究[J]. 中国热带医学,2004,4(5):722-723. (Zhao P, Yao S Y, Liu R Z, et al. Experimental study on the effect of γ-linolenic acid in reducing blood lipids in animals[J]. China Tropical Medicine, 2004,4(5):722-723. )  
[2] Hrelia S, Bordoni A, Biagi P, et al. Gamma-linolenic acid supplementation can affect cancer cell proliferation via modification of

- fatty acid composition[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1996, 225(2): 441-447.
- [3] Jiang W G, Hiscox S, Horrobin D F, et al. Gamma linolenic acid regulates expression of maspin and the motility of cancer cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, 237(3): 639-644.
- [4] 王清连, 张宝红, 郭腾龙, 等. 转基因棉花外源基因的遗传(英文)[J]. 生命科学研究, 2001, 5(4): 345-350. (Wang Q L, Zhang B H, Guo T L, et al. Inheritance of exogenous genes in transgenic cotton[J]. Life Science Research, 2001, 5(4): 345-350.)
- [5] 马炳田, 李平, 朱祯, 等. 转抗虫基因优良籼型恢复系的获得及其外源基因的遗传稳定性研究[J]. 中国水稻科学, 2002, 16(3): 211-215. (Ma B T, Li P, Zhu Z, et al. Obtaining transgenic elite indica restorer line and study on genetic stability of transgenes[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2002, 16(3): 211-215.)
- [6] 玉瑜, 陈远玲, 李静, 等. 转基因水稻外源基因的遗传和表达初步研究[J]. 华南农业大学学报, 2001, 22(1): 56-59. (Yu Y, Chen Y L, Li J, et al. Primary studies on inheritance and expression of foreign gene in transgenic rice[J]. Journal of South China Agricultural University, 2001, 22(1): 56-59.)
- [7] Komari T, Hiei Y, Saito Y, et al. Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers[J]. Plant Journal, 1996, 10(1): 165-174.
- [8] Lu H J, Zhou X R, Gong Z X, et al. Generation of selectable marker-free transgenic rice using double right-border(DRB) binary vectors[J]. Australian Journal of Plant Physiology, 2001, 28(3): 241-248.
- [9] 张秀春, 彭明, 吴坤鑫, 等. 利用双 T-DNA 载体系统培育无选择标记转基因大豆[J]. 大豆科学, 2006, 25(4): 369-372. (Zhang X C, Peng M, Wu K X, et al. Generating marker-free transgenic soybean plants by *Agrobacterium*-mediated transformation with double T-DNA binary vector[J]. Soybean Science, 2006, 25(4): 369-372.)
- [10] 闫苗苗, 魏光成, 潘效红, 等. 一种适用于动物与植物总 DNA 提取的方法—改良 CTAB 法[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(20): 8488, 8558. (Yan M M, Wei G C, Pan X H, et al. A method suitable for extracting genomic DNA from animal and plant—modified CTAB method[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(20): 8488, 8558.)
- [11] 张秀春, 林俊芳, 郭丽琼.  $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因克隆及其共转化表达载体的构建[J]. 热带作物学报, 2004, 25(4): 63-67. (Zhang X C, Lin J F, Guo L Q. Cloning of  $\Delta 6$ -desaturase gene and construction of its co-transformation expression vector[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2004, 25(4): 63-67.)
- [12] 张新梅, 徐惠君, 杜丽璞, 等. 共转化法剔除转基因小麦中的 *bar* 基因[J]. 作物学报, 2004, 30(1): 26-30. (Zhang X M, Xu H J, Du L P, et al. Excision of *bar* gene from transgenic wheat obtained by biolistic co-transformation[J]. Acta Agronomica Sinica, 2004, 30(1): 26-30.)
- [13] 唐祚舜, 李良才, 田文忠, 等. 基因枪法转基因水稻中 *hpt* 基因稳定遗传[J]. 遗传学报, 2000, 27(1): 26-33. (Tang Z S, Li L C, Tian W Z, et al. Stable inheritance of *hpt* gene in transgenic rice plants mediated by biolistic bombardment[J]. Acta Genetica Sinica, 2000, 27(1): 26-33.)
- [14] Uze M A, Wunn J A, Puonti-Kaerlas J A, et al. Plasmolysis of pre-cultured immature embryos improves *Agrobacterium* mediated gene transfer to rice(*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Science(Shannon), 1997, 130(1): 87-95.
- [15] 魏兵强, 赵长增, 陆璐, 等. 无选择标记的甜瓜 *a-ACO1* 基因植物表达载体的构建及对烟草的共转化效果[J]. 甘肃农业大学学报, 2007, 42(5): 68-72. (Wei B Q, Zhao C Z, Lu L, et al. Construction of the *a-ACO1* gene of sweet melon expression vector with marker-free and its co-transformation to tobacco [J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2007, 42(5): 68-72.)
- [16] 谭登峰, 韩兆雪, 曹墨菊, 等. 可去除选择标记的 *DREB* 基因双 T-DNA 载体共转化玉米[J]. 四川农业大学学报, 2008, 26(1): 15-19. (Tan D F, Han Z X, Cao M J, et al. Co-transforming maize with double T-DNA vector of *DREB* gene[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2008, 26(1): 15-19.)
- [17] 刘峰, 赵伊英, 苏永昌, 等. 双农杆菌共转化获得无标记转 *pepc* 基因的水稻植株(英文)[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(4): 393-398. (Liu F, Zhao Y Y, Su Y C, et al. Production of marker-free transgenic rice with *pepc* gene by *Agrobacterium*-mediated co-transformation[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2005, 11(4): 393-398.)
- [18] 张秀春, 郭丽琼, 吴坤鑫, 等. 双 T-DNA 表达载体转化大豆的研究[J]. 大豆科学, 2005, 24(4): 291-295. (Zhang X C, Guo L Q, Wu K X, et al. *Agrobacterium*-mediated transforation of soybean with the expression vector carrying two separate T-DNAs[J]. Soybean Science, 2005, 24(4): 291-295.)