



耐除草剂转基因大豆对花粉生活力的影响

刘来盘^{1,2}, 刘 标²

(1. 南京大学 生命科学学院, 江苏 南京 210023; 2. 生态环境部南京环境科学研究所, 江苏 南京 210042)

摘 要:转基因作物的环境安全评价是其商业化推广前的必要环节, 其基因漂移风险及其可能引起的生态环境效应是安全性评价的重要内容。为了明确转 *EPSPS*、*PAT* 基因抗草甘膦大豆 S4003. 12 和 S4003. 14 外源基因的逃逸风险, 于大豆盛花期选取温室种植的转基因大豆、其受体品种及常规栽培大豆材料花粉, 使用液体培养基培养, 检测其萌发率, 并于带标尺显微镜下观察其花粉粒直径。结果表明: 大豆花粉刚离体后萌发活力最强, 培养 2 h 后花粉萌发率基本达到最大值约 88. 2%, 随离体时间延长萌发活力随之下降, 室温放置 3 h 后, 花粉几近完全失活; 与非转基因对照相比, 转 *EPSPS*、*PAT* 基因耐除草剂大豆 S4003. 12 和 S4003. 14 的花粉离体后的生存能力无显著差异, 对花粉粒直径大小无显著差异。研究表明耐除草剂转基因大豆花粉传播能力与非转基因大豆间无显著差异, 通过设置隔离区可有效规避外源基因逃逸风险。

关键词:转基因大豆; 花粉萌发; 基因漂移

Effects of Transgenic Glyphosate-Tolerate Soybean on Pollen Viability

LIU Lai-pan^{1,2}, LIU Biao²

(1. College of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210023, China; 2. Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Ecology and Environment, Nanjing 210042, China)

Abstract: The risk of gene flow and the possible ecological environmental effects of the transgenic crops are the important contents of the safety assessment which is a necessary link before the commercialization. For assessing the genetic flow risk of Glyphosate-Tolerate Soybean S4003. 12 and S4003. 14, the germination rate of pollen in profuse flowering seasons from transgenic soybean, its receptor and conventional cultivated soybean varieties which selected in the greenhouses were detected by fluid nutrient medium, and the diameter of pollen grains were observed under scale microscope. The results showed that pollen germination rate of soybean was strongest when the pollen just in vitro which approximately 88. 2% after 2 h. The germination vigor of the pollen decreased with the lengthening of the time in vitro, the pollen was almost completely inactivated when put it at room temperature for 3 h. No significant effect on the viability of pollen in vitro and the diameter of pollen grains between the Glyphosate-Tolerate Soybean S4003. 12, S4003. 14 and the normal control. The study showed that there was no significant difference between the pollen transmission ability of glyphosate resistant transgenic soybean and non transgenic soybean and the risk of extraneous gene escape could be effectively avoided by setting the isolation zone.

Keywords: Transgenic soybean; Pollen germination; Gene flow

大豆(*Glycine max* (Linn.) Merr.)原产于中国, 又称“黄豆”, 是重要的粮食作物之一。联合国粮农组织预测, 到 2030 年, 全球对粮食的需求量将增长 40%, 对大豆的需求量将翻倍^[1]。转基因抗除草剂大豆既可增加作物产量亦能减少田间残留物, 可有效提高农民的收入并减少劳动力。1994 年孟山都公司研发的抗草甘膦转基因大豆(Roundup Ready Soybean, RRS)在美国获得商业化生产许可, 并于 1996 年开始商业化种植^[2]。2016 年全球转基因大豆种植面积为 9 140 万 hm^2 , 占全球大豆总种植面积的 78%, 占全球转基因作物总种植面积的一半, 是世界上应用最为广泛的转基因作物^[3]。需要认清的是, 转基因作物为我们带来显著的经济效益和社会效益的同时也存在一定的风险, 其中最受关注的

两大问题是食品安全和环境安全, 目前环境安全关注的焦点主要集中在外源基因逃逸的风险、对大豆田生物多样性的影响、对非靶标生物的影响、对大豆重要生理过程如固氮作用的影响以及超级杂草等^[4]。大豆属于自花传粉植物, 外源基因逃逸的风险较低。已有研究表明, 在合适的生境条件下, 一些栽培大豆间仍存在较高的异交率^[5-9]; 同时通过切叶蜂等传粉昆虫, 栽培大豆可以将基因传递至野生大豆^[10-11]。表明不同大豆品种间存在着广泛的基因交流, 而这种交流大多是通过有性生殖实现的。

花粉是种子植物的雄性器官, 是在雄蕊的花药中产生的生殖器官, 单独个体成为“花粉粒”。在植物的有性生殖过程中, 花粉粒包含着来自于父本的

收稿日期: 2018-06-25

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08012-005)。

第一作者简介: 刘来盘(1989-), 男, 博士, 主要从事转基因生物安全研究。E-mail: liulaipan@163.com。

通讯作者: 刘标(1969-), 男, 博士, 研究员, 主要从事转基因生物安全研究。E-mail: liubiao@nies.org。

遗传信息,通过虫媒或风媒落在包含母本遗传信息的柱头上。花粉通过花粉管从柱头经花柱到子房,再进入胚珠和胚囊,将来自于雄配子的两个精子及全部内含物释放到胚囊中以完成受精作用^[12]。有活力的花粉、花粉管在雌性结构上的萌发、花粉管生长及花粉管之间的竞争是产生足量的有潜在适应能力子代个体的前提^[13]。离体的花粉可以在合适的培养条件下生长出花粉管,而花粉的萌发率是衡量花粉生活力的主要标志^[14]。

目前关于转基因大豆的基因漂移试验主要通过大田试验同心圆法进行,现有研究结果表明转基因大豆与栽培大豆和野生大豆也可以进行基因漂移,尽管基因漂移的频率较低^[15-17]。但大田试验具有周期长,投入人力物力成本较大等缺点,因此在已有研究的基础上可通过检测比较转基因大豆与其受体及常规非转基因大豆花粉形态及花粉萌发活力的差异对其基因逃逸风险进行评估,可有效提高工作效率、大大降低检测成本。本研究通过对新研发的转 *EPSPS*、*PAT* 基因耐除草剂大豆、其受体对照以及常规大豆的花粉形态及萌发活力进行测定,评估转基因大豆中外源基因的逃逸风险,从而为转基因大豆的田间安全种植,保护我国大豆品种遗传多样性提供依据,为转基因大豆新品种田间应用推广前的评价工作提供重要的数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验所用转基因大豆材料为大北农集团生物技术中心提供的转 *EPSPS*、*PAT* 基因耐除草剂大豆 S4003.12 和 S4003.14、其受体对照 JACK 以及常规大豆栽培品种吉育 47、中黄 13 和铁丰 13。

1.2 试验设计

进行两批次试验以确保花期一致,第一批大豆种植日期为 2017 年 7 月 7 日;第二批种植时间为 2017 年 7 月 14 日。花粉活力测定时间为 2017 年 8 月 9 日至 13 日。试验地点为环境保护部南京环境科学研究所国家生物安全重点实验室温室。

于大豆盛花期采集 S4003.12、S4003.14、受体对照 JACK、吉育 47、中黄 13 和铁丰 13 花粉并观察其花粉粒直径;将不同材料花粉直接在培养基(约 26℃)中培养 30 min、1、2 和 3 h,分别统计萌发率,观察恒温培养时间对花粉活力的影响;花粉材料分别室温(约 26℃)放置 0 和 30 min、1 和 2 h 后,置于培养基培养,由于培养 2 h 后萌发率已基本稳定,因此在培养 2 h 后检测各大豆材料花粉的最终萌发情况,研究室温放置时间对花粉萌发的影响。

1.3 方法

1.3.1 花粉采集 大豆盛花期,早晨 9:00 - 10:00 于发育正常的植株上选取花蕾,花蕾大小尽量一致,用镊子取下后置于干净离心管内。

1.3.2 花粉培养 大豆花粉采用液体培养基培养。培养基配方:蔗糖 19.2%,GA3 浓度 68.9 mg·L⁻¹,H₃BO₄ 0.015%,CaCl₂ 0.05%,PEG4000 7.5%,初始 pH6.47^[18]。用移液器滴 1 滴在凹形载玻片上。将花蕾的萼片、花瓣剥开,用镊子夹取花药在液滴表面快速轻蘸一下,使花粉在培养基上分散开即可。为保持湿度,将载玻片放在铺有湿滤纸的培养皿中,置于恒温培养箱内 25℃ 静置培养,观察花粉萌发情况。

1.3.3 花粉粒直径的测定 大豆花蕾取下后,将花粉散落至培养基,于带标尺的莱卡 DM750 型体式镜下观察花粉粒并记录花粉粒直径。每个大豆材料设置 3 个重复,每个重复统计 100 粒花粉粒直径。

1.3.4 花粉萌发率的测定 培养后使用 Olympus bx41 型显微镜进行观测。当花粉管的长度大于花粉粒的直径时计为萌发。统计萌发、未萌发的花粉粒数,萌发率计算公式如下:萌发率(%) = 萌发的花粉数/总的花粉数 × 100。每个试验材料挑取 4 个花朵,每个试验处理随机选取 3 个视野,每个视野所统计的花粉粒不少于 50 粒。

1.4 数据分析

使用 SPSS 20 软件,采用方差分析方法 LSD 对试验数据进行统计,分析比较转基因大豆和常规非转基因大豆花粉的萌发率及花粉粒直径。

2 结果与分析

2.1 花粉粒直径的测定

在带标尺显微镜下观察统计转基因、受体及常规大豆材料花粉粒直径。结果显示,S4003.12、S4003.14、JACK、吉育 47、中黄 13、铁丰 29 的花粉粒直径分别为 22.9 ± 1.5,22.7 ± 0.7,23.0 ± 1.0,22.5 ± 0.9,22.8 ± 1.6 和 23.1 ± 1.5 μm,经 LSD 法分析相互间不存在显著差异。表明与非转基因对照相比,转基因大豆对花粉粒直径大小无显著影响。

2.2 恒温培养下大豆花粉活力的比较

6 个大豆材料在相同的培养时间内花粉萌发率均不存在显著差异(表 1)。培养 2 h 后,S4003.12、S4003.14、JACK、吉育 47、中黄 13、铁丰 29 的花粉萌发率分别为 85.9%、86.4%、89.5%、86.4%、90.0% 和 87.4%;在培养 3 h 后,S4003.12、S4003.14、JACK、吉育 47、中黄 13、铁丰 29 的花粉萌发率分别为 86.7%、86.8%、90.1%、88.0%、

89.1%、88.3%,大豆花粉在培养2 h后花粉萌发率基本达到最大值,6个材料萌发率平均值为88.2%±1.32%。转基因大豆和受体大豆及常规大豆间花粉活力不存在显著差异。

表1 转基因大豆和非转基因大豆花粉培养不同时间后的萌发率

Table 1 Germination rate of transgenic soybean and non transgenic soybean after different time of pollen culture (%)				
大豆材料 Soybean materials	培养时间 Culture time			
	30 min	1 h	2 h	3 h
S4003. 12	68. 1 ± 9. 3 a	77. 0 ± 3. 8 a	85. 9 ± 3. 1 a	86. 7 ± 2. 2 a
S4003. 14	72. 0 ± 9. 3 a	79. 0 ± 3. 6 a	86. 4 ± 3. 3 a	86. 8 ± 1. 2 a
JACK	74. 5 ± 4. 5 a	80. 9 ± 4. 1 a	89. 5 ± 4. 1 a	90. 1 ± 3. 2 a
吉育 47 Jiyu 47	72. 4 ± 4. 9 a	77. 2 ± 2. 6 a	86. 4 ± 3. 0 a	88. 0 ± 1. 7 a
中黄 13 Zhonghuang 13	68. 7 ± 5. 5 a	81. 2 ± 4. 1 a	90. 0 ± 3. 1 a	89. 1 ± 3. 2 a
铁丰 29 Tiefeng 29	69. 5 ± 5. 5 a	81. 0 ± 2. 5 a	87. 4 ± 1. 8 a	88. 3 ± 1. 8 a

同列字母相同表示同列各材料萌发率无显著性差异($P>0.05$)。下同。
The same letter showed no significant difference in the pollen germination rate of the materials($P>0.05$). The same below.

2.3 室温放置下大豆花粉的活力比较

随着室温放置时间的延长,大豆花粉的活力显著下降;在相同的处理时间内,转基因大豆和常规大豆花粉活力没有显著差异(表2)。在室温处理3 h后,S4003. 12、S4003. 14、JACK、吉育47、中黄13、铁丰29的花粉萌发率分别为4.4%、5.0%、3.2%、3.0%、6.6%和4.1%,花粉几近完全失活,与未室温处理时存在显著差异(表2)。说明刚离体的花粉活力最强,随着离体时间延长,大豆花粉的活力随之下降。

表2 室温放置不同时间后培养各大豆材料花粉的萌发情况

Table 2 Pollen germination of soybean materials after treatment at room temperature (%)					
大豆材料 Soybean materials	室温放置时间 Processing time				
	0 min	30 min	1 h	2 h	3 h
S4003. 12	85. 9 ± 3. 1 a	63. 1 ± 5. 7 b	41. 8 ± 4. 9 c	25. 4 ± 3. 1 d	4. 4 ± 4. 1 e
S4003. 14	86. 4 ± 3. 3 a	63. 4 ± 5. 7 b	37. 1 ± 4. 4 c	22. 4 ± 3. 0 d	5. 0 ± 1. 3 e
JACK	89. 5 ± 4. 1 a	61. 7 ± 4. 0 b	36. 1 ± 2. 8 c	24. 8 ± 3. 8 d	3. 2 ± 3. 2 e
吉育 47 Jiyu 47	86. 4 ± 3. 0 a	64. 8 ± 3. 5 b	40. 6 ± 5. 8 c	25. 9 ± 3. 8 d	3. 0 ± 3. 6 e
中黄 13 Zhonghuang 13	90. 0 ± 3. 1 a	59. 0 ± 3. 8 b	36. 1 ± 5. 7 c	21. 1 ± 3. 4 d	6. 6 ± 2. 5 e
铁丰 29 Tiefeng 29	87. 4 ± 1. 8 a	65. 3 ± 4. 9 b	39. 4 ± 2. 2 c	23. 8 ± 5. 2 d	4. 1 ± 3. 6 e

3 讨论

花粉粒的萌发生长包括很多复杂的生理活动^[13]。花粉的活力受自身的遗传特性、温度、湿度等多种因素的影响^[14]。多种植物花粉的体外萌发试验表明:花粉的萌发需要必要的碳源、矿物元素和生长调节物质的参与^[19-21]。王昌龄等^[22]采用单因素试验筛选出大豆花粉萌发培养基最佳碳源为蔗糖,Ca²⁺源为CaCl₂,有效植物生长调节剂为GA₃。采用响应面法优化大豆花粉离体萌发的最优条件组合,发现当蔗糖19.2%、GA₃68.9 mg·L⁻¹、初始pH6.47、H₃BO₄0.015%、CaCl₂0.05%、PEG40007.5%时,25℃下培养3 h,大豆花粉管长度达到最大值^[18]。本试验采用相同培养基室温培养不同材料大豆花粉,培养2 h时6种大豆材料花粉萌发率平均值为87.6%(85.8%~89.4%);培养3 h时6种大豆材料花粉萌发率平均值为88.2%(86.8%~

89.6%),两者间差异不显著($P=0.54$),表明大豆花粉萌发率在培养2 h后即到达最大值。新鲜花粉离体培养相同时间时,6种大豆材料花粉萌发率无显著差异。表明与非转基因受体对照JACK和常规大豆材料吉育47、中黄13、铁丰29相比,转EPSPS、PAT基因耐除草剂大豆S4003.12和S4003.14对大豆花粉活力没有显著影响。
花粉的寿命(pollen viability)是指植物的花粉离开花药后保持受精能力时间的长短,是影响花粉生活力的重要因子,在自然环境下,花粉室温贮藏的时间即为花粉的寿命^[14],但是绝大多数植物花粉的寿命都比较短。花粉的生活力主要受自身遗传特性和外界环境如温度和湿度的影响。不同物种其花粉的寿命不同,如水稻花粉在自然条件下的寿命为10~15 min,玉米花粉为24 h,而一些果树的花粉寿命较长,如苹果花粉,寿命可7~8 d^[23]。其中温度是影响花粉生活力的重要因素,一定温度范围

内,花粉的贮藏寿命与温度呈负相关^[24]。将大豆花粉室温处理 1,2 和 3 h 后 6 种材料大豆花粉萌发率平均值分别为 38.5% (35.9% ~ 41.1%)、24.0% (21.9% ~ 26.1%) 和 4.4% (3.0% ~ 5.8%),随着处理时间的延长,花粉的萌发率显著下降,室温处理 3 h 时,大豆花粉的萌发率几近为零。在相同的处理时间内,转基因大豆和常规大豆花粉活力没有显著差异。表明与非转基因对照相比,转基因耐除草剂大豆 S4003.12 及 S4003.14 对花粉离体后的萌发活力无显著影响。因此转基因大豆的花粉传播能力与非转基因对照相比无显著变化。

虽然大豆属于自花传粉作物,但是在不同大豆品种间仍存在不同程度的基因交流现象。栽培大豆间基因交流的频率一般低于 3.0%,在隔行种植条件下平均自然异交率为 1.8%,超过 10 m 自然异交率低于 0.01%^[25-26];野生大豆间由于传粉昆虫经常性的访问其种群间的多位点异交率可达 2.7% ~ 19.0%^[8,27];栽培大豆亦可通过花粉的基因流将其基因传递至野生大豆,在 0.5 m 时的异交率为 0.73%,在 5 ~ 25 m 异交率为零^[9-10]。本研究中转基因耐除草剂大豆 S4003.12 和 S4003.14 花粉活力和传播能力与其受体及常规栽培大豆无显著差异,表明 S4003.12 和 S4003.14 外源基因同样有较低可能逃逸至其周边常规非转基因大豆及野生豆。

已有大田试验结果表明转基因大豆可以向野生大豆和常规栽培大豆发生基因漂移。Abud 等^[28]在巴西大田条件下研究转 *EPSPS* 基因大豆向非转基因大豆基因漂移的情况,当距离转基因大豆花粉源 1 m 处,平均花粉漂移率为 0.52%,2 m 处为 0.12%,距离为 10 m 时即检测不到基因漂移;吕晓波等^[29]研究发现在自然条件下抗草甘膦转基因大豆(RRS)在黑土生态系统中花粉漂移几乎是不可能的,在加大虫媒传播力度(大于 10 头·m⁻²)条件下,外源基因的漂移频率接近 0.05%,漂移距离为 0.7 m;张彬彬等^[15]研究表明转 *TaDREB3* 基因大豆在自然条件下基因漂流距离为 1 m,基因漂流频率为 0.034 8%;刘杰等^[16]研究表明抗草甘膦转 *EPSPS* 大豆在 5 m 处漂移率为 0.03%,在 29 m 处漂移率下降至 0.001%,几近忽略不计。以上研究均表明随着转基因花粉源小区与缓冲区距离的增加,基因漂移率随之递减,在距离足够远时基因漂移的几率即可忽略不计^[15-16, 28-29]。

4 结 论

与非转基因受体对照 JACK 及常规对照吉育 47、中黄 13、铁丰 29 相比,转 *EPSPS*、*PAT* 基因耐除

草剂大豆 S4003.12 和 S4003.14 花粉离体后的生存能力无显著差异,花粉粒直径大小无显著差异。因此 S4003.12 和 S4003.14 花粉的传播能力与本试验中非转基因对照相比亦无显著差异,参照已有大田试验结果,在转基因大豆种植区外设置一定面积的隔离区即可有效规避转基因大豆外源基因的逃逸风险。本研究结果可为 S4003.12 和 S4003.14 的应用推广提供参考依据。

参考文献

[1] Bruinsma J. World agriculture: Towards 2015/2030: An FAO perspective[M]. London: Earthscan Publications Ltd, 2003, 20 (4).

[2] Sibel R, Harlander S. Genetic modification in the food industry: A strategy for food quality improvement[M]. London: Boston Springer, 1998: 3-26.

[3] James C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2016 ISAAA briefs: No. 49-199[R]. New York: ISAAA, 2017: 36-37.

[4] 赵波, 张鹏飞. 抗除草剂转基因大豆的生态安全评价进展[J]. 山地农业生物学报, 2012, 31(1): 70-76. (Zhao B, Zhang P F. Progress in ecological safety evaluation of herbicide resistant transgenic soybean[J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2012, 31(1): 70-76.)

[5] Lemes E S, Barros A C S A, Peske S T, et al. Estimate of the gene flow between transgenic and non transgenic soybean cultivars[J]. Revista Brasileira De Tecnologia Aplicada Nas Ciências Agrárias, 2014, 7(1): 97-102.

[6] Ray J D, Kilen T C, Abel C A, et al. Soybean natural cross-pollination rates under field conditions[J]. Environmental Biosafety Research, 2003, 2(2): 133-138.

[7] Wang K J, Li X H. Interspecific gene flow and the origin of semi-wild soybean revealed by capturing the natural occurrence of introgression between wild and cultivated soybean populations[J]. Plant Breeding, 2011, 130(2): 117-127.

[8] Fujita R, Ohara M, Okazaki K, et al. The extent of natural cross-pollination in wild soybean (*Glycine soja*) [J]. Journal of Heredity, 1997, 88(2): 124-128.

[9] Kuroda Y, Kaga A, Tomooka N, et al. Gene flow and genetic structure of wild soybean (*Glycine soja*) in Japan[J]. Crop Science, 2008, 48(3): 1071-1079.

[10] Nakayama Y, Yamaguchi H. Natural hybridization in wild soybean (*Glycine max* ssp. *soja*) by pollen flow from cultivated soybean (*Glycine max* ssp. *max*) in a designed population[J]. Weed Biology & Management, 2002, 2(1): 25-30.

[11] Yoshimura Y. Wind tunnel and field assessment of pollen dispersal in Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] [J]. Journal of Plant Research, 2011, 124(1): 109-114.

[12] 刘忠松, 官春云, 陈社员. 植物雄性不育机理的研究及应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 12-18. (Liu Z S, Guan C Y, Chen S Y. Study and application of the mechanism of male sterility in plants [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2001:

12-18.)

[13] 孙颖, 孙大业. 花粉萌发和花粉管生长发育的信号转导[J]. 植物学报, 2001, 43(12): 1211-1217. (Sun Y, Sun D Y. Signal transduction of pollen germination and pollen tube growth and development[J]. Bulletin of Botany, 2001, 43(12): 1211-1217.)

[14] 尹佳蕾, 赵惠恩. 花粉生活力影响因素及花粉贮藏概述[J]. 中国农学通报, 2005, 21(4): 110-113. (Yin J L, Zhao H E. An overview of the factors affecting pollen viability and the storage of pollen[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(4): 110-113.)

[15] 张彬彬, 李永光, 盖江南, 等. 转 *TaDREB3* 基因大豆基因漂流距离及频率的研究[J]. 大豆科学, 2011, 30(4): 563-565. (Zhang B B, Li Y G, Gai J N, et al. Distance and frequency of gene flow in transgenic soybean overexpressing *TaDREB3* [J]. Soybean Science, 2011, 30(4): 563-565.)

[16] 刘杰, 周波, 杨春燕, 等. 抗草甘膦转 *EPSPS* 大豆的基因漂移研究[J]. 大豆科学, 2012, 31(4): 517-521. (Liu J, Zhou B, Yang C Y, et al. Gene flowing of genetically modified glyphosate-resistant soybean with *EPSPS*[J]. Soybean Science, 2012, 31(4): 517-521.)

[17] 刘琦, 李希臣, 刘昭军, 等. 抗草甘膦转基因大豆基因漂移的研究 I 大豆风媒介传粉的基因漂移研究[J]. 黑龙江农业科学, 2008, 2008(1): 14-16. (Liu Q, Li X C, Liu Z J, et al. Study on roundup ready soybean's round up ready gene flowing study on round up ready gene move to soybean by anemophily [J]. Heilong jiang Agricultural Sciences, 2008, 2008(1): 14-16.)

[18] 王昌陵, 曹永强, 张立军, 等. 响应面法对大豆花粉离体萌发主要影响因子的优化[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(3): 94-98. (Wang C L, Cao Y Q, Zhang L J, et al. Optimization of main factors affecting soybean pollen germination *in vitro* by response surface methodology [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2016, 44(3): 94-98.)

[19] Zhang H, Liang W, Yang X, et al. Carbon starved anther encodes a MYB domain protein that regulates sugar partitioning required for rice pollen development[J]. Plant Cell, 2010, 22(3): 672.

[20] 程云清, 张奇, 刘剑锋, 等. 外源乙烯调控大豆花粉育性的研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2014, 40(1): 25-32. (Cheng Y Q, Zhang Q, Liu J F, et al. Study on the regulation of soybean pollen fertility by exogenous ethylene[J]. Journal of Zhejiang University(Agriculture and Life Sciences), 2014, 40(1): 25-32.)

[21] 张绍铃, 陈迪新, 康琅, 等. 培养基组分及 pH 值对梨花粉萌发和花粉管生长的影响[J]. 西北植物学报, 2005, 25(2): 225-230. (Zhang S L, Chen D X, Kang L, et al. Effects of medium components and pH value on pear pollen germination and pollen tube growth[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2005, 25(2): 225-230.)

[22] 王昌陵, 宋书宏, 孙旭刚, 等. 应用 Plackett-Burman 设计法筛选大豆花粉萌发的主要影响因素[J]. 大豆科技, 2014(3): 3-6. (Wang C L, Song S H, Sun X G, et al. Application of plackett-burman design in indentifying the main factors influencing the germination of soybean pollen [J]. Soybean Science & Technology, 2014(3): 3-6.)

[23] 孟金陵. 植物生殖遗传学[M]. 北京: 科学出版社, 1995. (Meng J L. Plant reproductive genetics [M]. Beijing: Science Press, 1995.)

[24] 刘芳, 周蕴薇. 花粉的保存及生活力测定方法的探讨[J]. 南方农业, 2007, 1(3): 70-71. (Liu F, Zhou Y W. Study on the preservation of pollen and determination of its viability[J]. Guangxi Agricultural Sciences, 2007, 1(3): 70-71.)

[25] Caviness C E. Estimates of natural crosspollination in Jackson soybeans in arkansas[J]. Cropence, 1966, 6(2): 211.

[26] Ahrent D K, Caviness C E. Natural cross-pollination of twelve soybean cultivars in Arkansas [J]. Crop Science, 1994, 34(2): 376-378.

[27] Kiang Y T, Chiang Y C, Kaizuma N. Genetic diversity in natural populations of wild soybean in Iwate prefecture, Japan[J]. Journal of Heredity, 1992, 83(5): 325-329.

[28] Abud S, Souza P I M de, Vianna G R, et al. Gene flow from transgenicnon transgenic soybean plants in the Cerrado region of Brazil [J]. Genetics and Molecular Research, 2007, 6(2): 445-452.

[29] 吕晓波, 王宏燕, 刘琦, 等. 抗草甘膦转基因大豆(RRS)在黑土生态系统种植的安全性研究[J]. 大豆科学, 2009, 28(2): 260-265. (Lyu X B, Wang H Y, Liu Q, et al. Biosafety of roundup ready soybean (RRS) planted in black soil ecosystem [J]. Soybean Science, 2009, 28(2): 260-265.)