

氯化锂作为转基因大豆筛选剂的研究

黄文佳,李永光,王志坤,李维娜,王 涛,王朋朋,李文滨

(东北农业大学 大豆研究所/东北农业大学大豆生物学教育部重点实验室/农业部大豆生物学与遗传育种北方区域重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:以东农 50 大豆子叶节为材料,以大豆子叶节丛生芽黄化率和丛生芽高度为考察指标,确定氯化锂作为转基因大豆筛选剂的最佳浓度和筛选临界观察时间。在此基础上,对转基因大豆丛生芽进行 *GUS* 染色,并对转化植株进行 PCR 检测。通过对受体植株进行氯化锂叶片涂抹,确定适宜的表型筛选浓度。结果表明,延迟 7 d 进行氯化锂筛选,筛选浓度为 $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为宜,最佳筛选天数为 10 d。抗氯化锂丛生芽的 *GUS* 染色阳性率为 80%,确定叶片涂抹法的适宜筛选浓度为 $700 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,并且经氯化锂筛选得到的转基因植株后代可以正常生长发育。

关键词:大豆;转基因植株;氯化锂;*GUS* 染色;PCR

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2012)04-0552-05

Lithium Chloride, an Alternative Selectable Marker for Soybean Transformation

HUANG Wen-jia, LI Yong-guang, WANG Zhi-kun, LI Wei-na, WANG Tao, WANG Peng-peng, LI Wen-bin

(Soybean Research Institute, Northeast Agricultural University/Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education/Key Laboratory of Biology and Genetics & Breeding for Soybean in Northeast China, Ministry of Agriculture, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: The proper concentration of lithium chloride and selection time were determined by the yellowing rate and the height of cluster buds of Dongnong50, treated with different concentration of lithium chloride. The data showed the suitable selective concentration of lithium chloride and treated time were $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and 10 day, respectively. Further analysis revealed that 80% of cluster buds resistant to lithium chloride was positive after *GUS* dying. The transgenic plants were detected by PCR analysis. The result suggested the optimized concentration of lithium chloride was $700 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and the lineages of the transgenic plants could normally grow and develop. Results suggested that the selected marker of lithium chloride could be applied in rapid selection for transgenic soybean plants.

Key words: Soybean; Transgenic plant; Lithium Chloride; *GUS* dying; PCR

Li^+ 在诱导 ACC 合成酶的产生和促进乙烯的合成方面起到主要作用。而高浓度的 ACC 合成酶和乙烯会抑制植株生长,促进植株衰老^[1]。从大豆中分离的耐锂基因 *GmCAX1* 编码一种阳离子/质子反向运输体,从而降低植物对离子的敏感程度,减少 Li^+ 对植株的伤害^[2]。

选择标记基因在植物的遗传转化中起着非常重要的作用,传统的选择标记基因主要有抗生素基因和除草剂基因。大豆转化中较常用的包括新霉素磷酸转移酶基因(*NPT II*),潮霉素磷酸转移酶基因(*HPT*)和 *bar* 基因等^[3],它们分别介导卡那霉素、潮霉素和除草剂反应。其中抗生素基因对一些植物的发育有严重的副作用且选择效率低下;抗除草剂类标记基因可能会导致基因漂流、生态平衡破坏等问题。总之,这两类标记基因均存在着潜在的生物安全性问题^[4]。*GmCAX1* 基因是来自于大豆体内的固有基因,属绿色标记,安全性高。它既能作为

一种新的筛选标记,同时又能增加植物的耐盐能力,具有重要的意义。该试验以大豆 *GmCAX1* 基因为筛选标记基因,氯化锂作为筛选剂,确定氯化锂作为转基因大豆筛选剂的最佳浓度和筛选临界观察时间,为氯化锂作为筛选剂的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大豆为东农 50,由东北农业大学大豆研究所提供;质粒 pROK2-*GmCAX1* 由中国科学院遗传与发育生物研究所陈受宜研究员惠赠;质粒 pBI121 及农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 均为实验室保存;氯化锂(分析纯)、限制性内切酶及连接酶购于 Fermentas 公司;质粒提取试剂盒, DNA 回收纯化试剂盒购于 OMEGA 公司。

1.2 方法

1.2.1 表达载体的改造 构建植物表达载体

收稿日期:2012-03-30

基金项目:国家转基因重大专项(2011ZX08004-002);大豆产业技术体系资助项目(CARS-04-PS04)。

第一作者简介:黄文佳(1986-),女,在读硕士,研究方向为芝麻基因克隆和大豆转基因。E-mail:tiantian3012983@163.com。

通讯作者:李文滨(1958-),男,教授,博士生导师,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:wenbinli@neau.edu.cn。

pROK2-GmCAX1-GUS。根据载体序列用限制性内切酶 *Xba*I、*Eco*RI 分别对质粒 pBI121 和质粒 pROK2-GmCAX1 进行双酶切,得到 *GUS* 基因、Nos 终止子和带有粘性末端的载体 pROK2-GmCAX1,用 T4 连接酶将 *GUS* 基因连入 pROK2-GmCAX1 的多

克隆位点中。改造好的质粒带有筛选标记 *Gm*-*CAX1*,报告基因 *GUS*,35S 启动子和 NOS 终止子。质粒载体用冻融法转化农杆菌 EHA105。具体流程如图 1 所示。

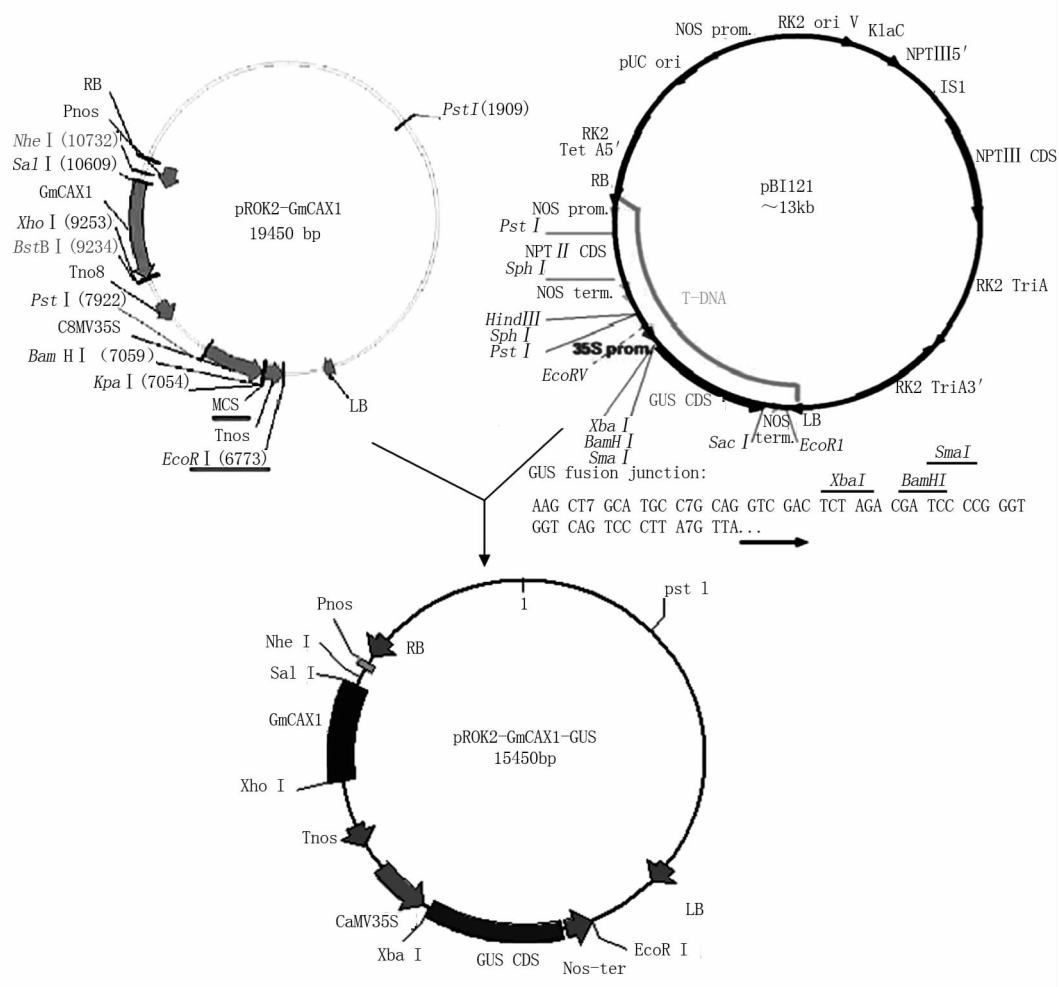


图 1 植物表达载体

Fig. 1 Plant expression vector

1.2.2 外植体的获得 挑选健康无病害的东农 50 大豆种子接种于萌发培养基上,萌发培养基为 B5 盐,MS 铁盐,B5 有机物,3% 蔗糖,0.8% 琼脂粉,pH 5.8,1.67 mg·L⁻¹6-BA。取萌发 5 d 的无菌苗,将 2 片子叶从子叶节处纵向切开,去掉顶芽和侧芽后,在生长点附近用刀尖划 8~10 次,得到的外植体用 OD₆₀₀ 值为 0.5~0.6 的菌液侵染 30 min,切面朝下摆放于共培养培养基中,避光放置 3 d 进行共培养。共培养培养基配方为:1/10 浓度的 B5 大量盐和微量盐,1/10 浓度的 MS 铁盐,B5 维生素,3% 蔗糖,3.9 g·L⁻¹ Mes,40 mg·L⁻¹ AS,0.25 μg·L⁻¹ GA3,1 mmol·L⁻¹ DTT,8.8 mmol·L⁻¹ L-cysteine,1.70 mg·L⁻¹ 6-BA,0.5% 琼脂,pH 5.4。

1.2.3 氯化锂筛选浓度 采用单因素随机试验,根据李文霞等^[5]的延迟筛选法,外植体在无选择压力的丛生芽诱导培养基上培养 7 d 后,转接到氯化

锂筛选浓度为 0、20、60、80 和 100 mmol·L⁻¹ 的丛生芽诱导培养基中,每个处理 12 个外植体,3 次重复。7 d 后记算丛生芽的黄化率。芽诱导培养基配方为: B5 大量盐和微量盐,MS 铁盐,B5 维生素,3% 蔗糖,0.59 g·L⁻¹ Mes,1.7 mg·L⁻¹ 6-BA,100 mg·L⁻¹ cefotaxime,0.8% 琼脂,pH 5.6。

1.2.4 *GUS* 染色法检测转化植株 将最适氯化锂筛选浓度筛选后的丛生芽进行 *GUS* 染色,参照 Jefferson^[6]的方法。取共培养后的子叶节,浸泡在 X-Gluc 溶液(50 mmol·L⁻¹ 铁氰化钾,50 mmol·L⁻¹ 亚铁氰化钾,0.2 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液,0.1% triton 100,7.5 mg X-gluc,用蒸馏水补充到 10 mL)中,37℃ 染色 24 h 后,用 70% 的乙醇脱色,在实体显微镜下观察蓝色丛生芽情况。计算 *GUS* 基因的瞬时表达率,公式如下:

瞬时表达率(%) = 蓝色丛生芽数/总丛生芽数 × 100

1.2.5 转化植株的获得 将筛选得到的阳性外植体移入芽伸长培养基中,得到的不定芽移入生根培养基中,根系发达后移入土中。芽伸长培养基配方为:MS 大量盐和微量盐,MS 铁盐,B5 维生素,3% 蔗糖,0.59 g·L⁻¹ Mes,0.5 mg·L⁻¹ GA₃,0.1 mg·L⁻¹ IAA,1 mg·L⁻¹ ZR,50 mg·L⁻¹ L-asparagine,100 mg·L⁻¹ L-pyrogutamic,100 mg·L⁻¹ cefotaxime,0.8% 琼脂,pH 5.6。生根培养基配方为:1/2 浓度的B5 大量盐和微量盐,MS 铁盐,2% 蔗糖,0.59 g·L⁻¹ Mes,1 mg·L⁻¹ IAB,0.8% 琼脂,pH 5.6。

1.2.6 PCR 检测转化植株 根据 *GmCAX1* 基因序列设计 2 对检测引物,CAX-1 上 5'-AAATCTCGT-GATGGCAGGTTGG-3'; CAX-1 下 5'-GTCTCGAGT-CGACATGGGTTCT-3'; CAX-2 上 5'-AAATCTCGT-GATGGCAGGTTGG-3'; CAX-2 下 5'-TGGCTCGAG-GAGAATGGGAAAC-3'。引物由北京华大基因公司合成。PCR 反应体系:10 × Buffer 2.5 μL,25 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 2.0 μL,10 mmol·L⁻¹ dNTP 0.5 μL,引物 1(1 μmol·L⁻¹)0.5 μL,引物 2(1 μmol·L⁻¹)0.5 μL,模板 DNA 1.0 μL,Taq 酶(5 U·μL⁻¹)0.30 μL,超纯水

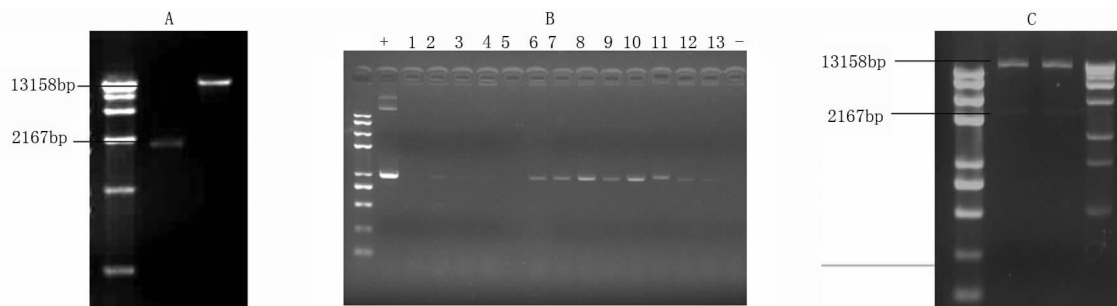
17.7 μL;PCR 反应条件:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,62℃ 复性 30 s,72℃ 延伸 1 min,35 个循环,72℃ 延伸 8 min,4℃ 终止反应。

1.2.7 受体植株的 LiCl 筛选 大豆植株培养 28 d 后,用移液枪取 50 μL 200 ~ 1 000 mmol·L⁻¹ 氯化锂溶液,轻轻滴于三出复叶中间叶片上,并用枪头侧面轻轻摊开,表面活性剂 SilWet-77 的添加使得溶液在叶子表面快速扩散,每个处理 5 株,3 次重复。处理后的植株正常光照培养,观察记录处理 3、5、7 d 后叶片表现^[7]。

2 结果与分析

2.1 载体改造

成功回收目的条带 *GUS* 基因,Nos 终止子和带有粘性末端的载体 pROK2-*GmCAX1* (图 2-A)。PCR 鉴定质粒 pROK2-*GmCAX1*-*GUS* 转化大肠杆菌的阳性克隆。采用 CAX1 引物,扩增出 996 bp 特异条带(图 2-B)。利用冻融法将重组质粒 pROK2-*GmCAX1*-*GUS* 转入农杆菌菌株 EHA105。转化后挑取单菌落摇菌,并提取质粒 DNA,用限制性内切酶 *Xba*I、*Eco*RI 双酶切鉴定阳性克隆(图 2-C)。



A:pROK2-*GmCAX1* 质粒双酶切;B:重组质粒转化大肠杆菌 PCR 电泳图;C:重组质粒双酶切检测电泳图

A:Double digestion products of vector pROK2-*GmCAX1*;B:PCR products of *Eco*RI transformed by pROK2-*GmCAX1*-*GUS* C:PCR products of double digested pROK2-*GmCAX1*-*GUS*

图2 pROK2-*GmCAX1*-*GUS* 重组质粒电泳结果

Fig.2 Reconstruction of pROK2-*GmCAX1*-*GUS*

2.2 筛选时间的确定

观察在含不同浓度氯化锂的丛生芽诱导培养基中大豆子叶节的变化,结果 3 d 内无明显区别,长势与对照相近,丛生芽能够正常分化伸长。6 d 后含 80、100 mmol·L⁻¹ 氯化锂培养基上的丛生芽逐渐变黄。10 d 后含 80、100 mmol·L⁻¹ 氯化锂培养基上的丛生芽有 90% 变黄,停止生长,不再出现新芽;含 60 mmol·L⁻¹ 氯化锂培养基上的丛生芽平均有 67% 开始变黄,衰老。由此认为子叶节的氯化锂临界筛选时间为 10 d。

2.3 筛选浓度的确定

2.3.1 丛生芽表现 在含不同浓度氯化锂的丛生

芽培养基上,大豆子叶节在氯化锂的作用下,丛生芽的伸长生长受到抑制并加速老化。同时,随着氯化锂浓度的增加,丛生芽由强壮变得细弱,并伴有丛生芽失绿,黄化的现象(图 3)。

2.3.2 丛生芽黄化率 在氯化锂浓度为 0 mmol·L⁻¹ 时外植体丛生芽可以正常生长,未有失绿现象发生。筛选培养基中氯化锂浓度为 20 mmol·L⁻¹ 时,黄化率较低,仅为 20% ~ 40%,并且筛选 7 d 时,丛生芽仍正常生长。说明用该浓度筛选时,假阳性率较大;氯化锂浓度为 60 mmol·L⁻¹ 时,丛生芽黄化率为 60% ~ 80%;在氯化锂浓度为 100 mmol·L⁻¹ 时,丛生芽的黄化率达到了 100%。所以将 60 mmol·L⁻¹

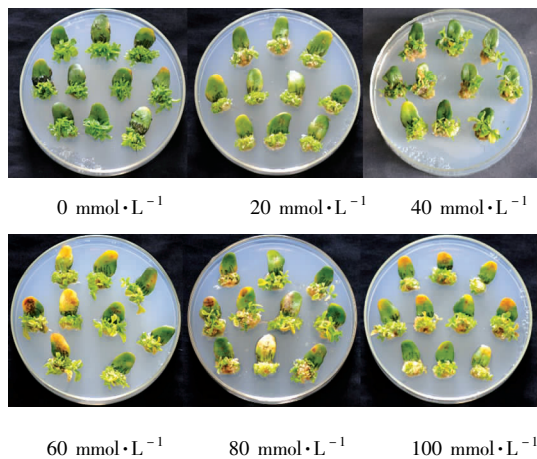


图3 不同浓度氯化锂对大豆丛生芽生长的影响

Fig.3 Effect of different concentration of LiCl on soybean cluster buds

氯化锂作为筛选浓度。

2.3.3 丛生芽高度 筛选7 d后,分别统计不同处理子叶节的丛生芽高度(图4)。当氯化锂浓度为 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,丛生芽最高,可能低浓度的氯化锂对丛生芽的生长具有一定的促进作用,会产生较高的假阳性植株,为后代培养和鉴定增加工作量。而 $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化锂处理时丛生芽高度较低,因此,确定 $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为最佳氯化锂筛选浓度。

2.4 GUS 染色结果

将 $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化锂筛选得到的阳性丛生芽进行GUS染色(图5),结果阳性率达到80%,进一步证明了 $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为氯化锂筛选大豆子叶节的

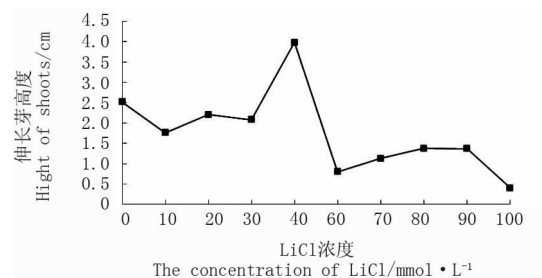


图4 不同浓度氯化锂对大豆丛生芽高度的影响

Fig.4 The influence of different concentration of LiCl on the height of soybean cluster buds

最适浓度。

2.5 转基因植株的获得

如图6所示,将部分筛选得到的阳性丛生芽进行进一步培养,经过伸长、生根、驯化可以生长发育成正常的植株,并在开花结实后得到下一代。用CAX1引物,经PCR检测得到19株阳性的转化植株。说明用*GmCAX1*作为一种新的筛选标记,用氯化锂作为一种新的筛选剂不会对植株生长发育造成破坏性的影响,是切实可行的。

2.6 受体植株的LiCl筛选

当东农50第2片三出复叶完全展开时,利用0、200、300、400、500、600、700、800、900和1000 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的LiCl涂抹东农50叶片,结果表明用浓度大于500 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的LiCl涂抹7 d以后,大豆叶片退绿变黄,700 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ LiCl涂抹的叶片萎蔫,可以选择700 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的LiCl为转基因和非转基因的筛选浓度。

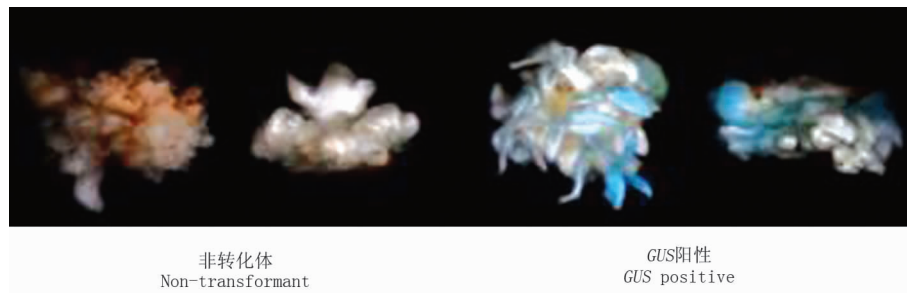


图5 氯化锂抗性丛生芽的GUS染色

Fig.5 GUS dying of resistant plants to $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ LiCl

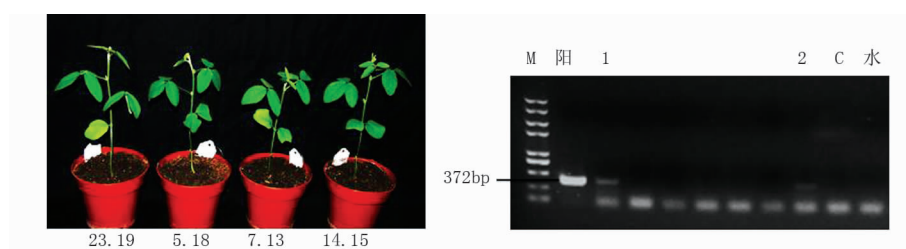


图6 经氯化锂筛选的转*GmCAX1*基因的大豆植株

Fig.6 Transgenic soybean plants with *GmCAX1* gene after LiCl selection

3 结论与讨论

在大豆遗传转化的过程中,区别转化细胞和非转化细胞是一个非常重要的步骤,一般选择携带一种对大豆较敏感的筛选剂作为标记基因^[8]。氯化锂因其成本低、使用方便、来源绿色安全,有望被作为遗传转化研究的筛选剂。直接筛选法是在细胞水平上选择,有利于转化细胞对非转化细胞的竞争,但是方式不够温和,可能因缺少恢复培养的阶

段而不能承受选择压力,并且转化细胞生长能力太弱难于生长形成转化体。Olhoft 等^[9]认为大豆子叶节区再生芽萌动是在无筛选剂的丛生芽在诱导培养基上培养 7 d,此时丛生芽刚好萌动,处于过渡阶段。因此,本研究采用李文霞等^[5]的延迟筛选法考察氯化锂对丛生芽黄化率的影响。丛生芽外植体在芽诱导培养基上培养 7 d,丛生芽刚萌动,对氯化锂较敏感,此时转移培养到筛选培养基最为适宜。

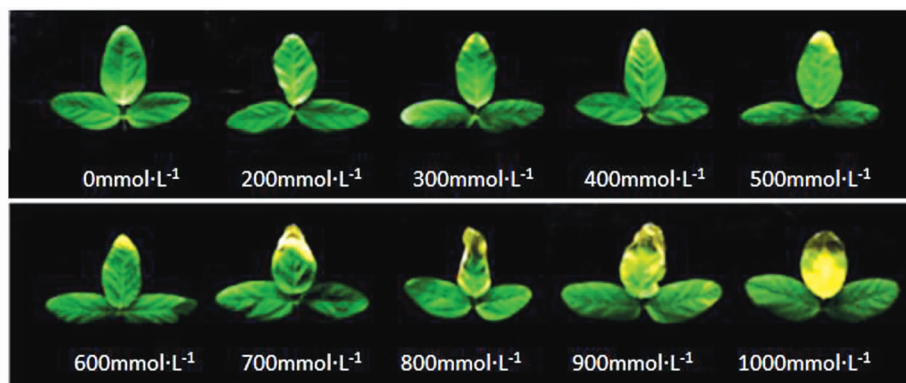


图 7 不同氯化锂筛选浓度处理大豆叶片

Fig. 7 The leaves of soybean treated with different concentrations of LiCl

通过观察大豆外植体在不同浓度氯化锂筛选培养基中培养 7 d 的变化,可以看出大豆本身对氯化锂有一定抗性。随着氯化锂浓度增加,大豆子叶节丛生芽的伸长受到抑制,伴有黄化现象出现,衰老加速。虽然理论上筛选剂浓度越高,选择效率也会越高,从而减少假阳性和嵌合体的出现^[10-11]。但是高浓度的筛选剂会对转化细胞产生副作用并抑制其生长^[12]。

本研究以一种比较方便快捷的筛选方法——丛生芽 *GUS* 瞬时表达^[13] 为指标。共培养结束后,大豆丛生芽外植体用 X-gluc 染色液浸泡前要用无菌水冲洗,从而尽量避免农杆菌附着于子叶节外植体上。因为当代外植体无法完全消除农杆菌的附着,但 *GUS* 基因的内含子使初始 mRNA 在农杆菌内无剪切过程,所以 *GUS* 基因理论上在农杆菌内部无法表达。所以蓝色反应是 *GUS* 基因在植物细胞中的表达,不是在附着于外植体的农杆菌中的表达^[5]。

叶片涂抹法较快捷省力^[14],因此得到合适的筛选浓度可以初步区分转基因和非转基因植株^[15]。

综上所述,氯化锂作为大豆子叶节转化法中的一种新型筛选标记是可行性的,最适筛选浓度为 60 mmol·L⁻¹,最适观察时间为 7 d,且转化植株及后代可以正常生长发育。

参考文献

- [1] Eduardo B. The lithium tolerance of the *Arabidopsis cat2* mutant reveals a cross-talk between oxidative stress and ethylene [J]. Plant Journal, 2007, 52: 1052-1065.
- [2] Luo G Z. A putative plasma membrane cation/proton antiporter from soybean confers salt tolerance in *Arabidopsis* [J]. Plant Molecular Biology, 2005, 59: 809-820.
- [3] Zhang Z Y, Xiang A Q, Staswick Q, et al. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1999, 56: 37-46.
- [4] 李俊. 转基因植物中标记基因研究概况 [J]. 植物学报, 2009, 44(4): 497-505. (Li J. The research situation of transgenic plants marker genes [J]. Chinese Bulletin of Botany, 2009, 44(4): 497-505.)
- [5] 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): 971-977. (Li W X, Ning H L, Lü W H, et al. Optimization of the *Agrobacterium*-mediated transformation systems of soybean cotyledonary node [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(4): 971-977.)
- [6] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. *GUS* fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants [J]. EMBO Journal, 1987, 6: 3901-3907.
- [7] 李永光, 黄文佳, 周失, 等. 大豆对除草剂(草丁膦)的敏感性研究 [J]. 大豆科学, 2011, 30(5): 749-751. (Li Y G, Huang W J, Zhou S, et al. The study on the sensitivity of soybean treated with PPT [J]. Soybean Science, 2011, 30(5): 749-751.)
- [8] 袁鹰, 刘德璞, 王玉民, 等. 卡那霉素对大豆生长的抑制及筛选试验研究 [J]. 大豆科学, 2003, 22(4): 261-263. (Yuan Y, Liu D P, Wang Y M, et al. Study on critical and screen soybean grow of kanamycin [J]. Soybean Science, 2003, 22(4): 261-263.)
- [9] 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, 5: 723-735.

(下转第 567 页)

[1] Eduardo B. The lithium tolerance of the *Arabidopsis cat2* mutant

- [17] 韩天富, 常汝镇. 关于我国大豆产业发展途径的探讨[J]. 中国食物与营养, 2007, (8): 11-13. (Han T F, Chang R Z. Discussion of pathways for soybean industry development in China [J]. Food and Nutrition in China, 2007, (8): 11-13.)
- [18] 韩天富, 盖钧镒, 陈风云, 等. 生育期结构不同的大豆品种的光周期反应和农艺性状[J]. 作物学报, 1998, 24(5): 550-557. (Han T F, Gai J Y, Chen F Y, et al. Photoperiod response and agronomic characters of soybean varieties with different growth period structures [J]. Acta Agronomica Sinica, 1998, 24(5): 550-557.)
- [19] 陈学珍, 李欣, 杨建宇, 等. 夏播大豆生育期结构和农艺性状的遗传参数研究[J]. 中国农学通报, 2004, 20(1): 9-13. (Chen X Z, Li X, Yang J Y, et al. Studying on genetic parameter of the bearing term structure and agronomic characters of the summer seeding soybean[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2004, 20(1): 9-13.)
- [20] 韩天富, 盖钧镒, 邱家驹. 中国大豆不同生态类型代表品种开花前、开花后光周期反应的比较研究[J]. 大豆科学, 1998, 17(2): 35-40. (A comparative study on pre-and post-flowering photoperiod response in various ecotypes of soybeans [J]. Soybean Science, 1998, 17(2): 35-40.)
- [21] 程艳波, 江炳志, 蔡史欣, 等. 不同播期对华南夏大豆品种产量和品质的影响[J]. 大豆科学, 2010, 29(1): 37-40. (Cheng Y B, Jiang B Z, Cai S X, et al. Effects of sowing sate on yield and quality of summer-sown soybean in south China[J]. Soybean Science, 2010, 29(1): 37-40.)
- [22] 王芳, 刘鹏, 蔡妙珍, 等. 硼、锰对大豆主要农艺性状的影响[J]. 浙江师范大学学报(自然科学版), 2005, 28(1): 70-74. (Wang F, Liu P, Cai M Z, et al. Effect of boron and manganese application on the agronomic characters of soybean[J]. Journal of Zhejiang Normal University (Natural Sciences), 2005, 28(1): 70-74.)
- [23] 董友魁, 李子升, 徐娣. 混施微肥对不同类型大豆产量性状的影响[J]. 大豆科技, 2010(3): 7-10. (Dong Y K, Li Z S, Xu D. Effects of mixed applying microelement fertilizers on yield characters of different types of soybean cultivars[J]. Soybean Science & Technology, 2010(3): 7-10.)
- [24] 刘玉平, 李志刚, 李瑞平, 等. 不同密度与施氮水平对大豆产量及产量性状的影响[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 2011, 26(2): 173-176. (Liu Y P, Li Z G, Li R P, et al. Effects of different planting densities and N - fertilizer levels on the yield and yield characteristics of soybean[J]. Journal of Inner Mongolia University for Nationalities (Natural Sciences), 2011, 26(2): 173-176.)
- [25] 农业部科技教育司, 财政部教科文司. 中国农业产业技术发展报告(2010 年度)[R]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 16-18. (Department of Science, Technology and Education, Ministry of Agriculture of the People's Republic of China, Department of Education, Science and Culture, Ministry of Finance of the People's Republic of China. Chinese Agricultural Industry Technology Development Report (2010) [R]. Beijing: China Agriculture Press, 2011: 16-18.)
- [26] 全国农业技术推广服务中心. 中国大豆新品种动态, 2010 年国家大豆品种试验报告[R]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2010: 11-336. (National Agricultural Technology Extension and Service Center. Dynamic of Soybean New Varieties in China, 2010 National Soybean Variety Test Report[R]. Beijing: China Agricultural Science and Technology, 2010: 11-336.)

(上接第 556 页)

- [10] 林树柱, 曹越平, 卫志明. 根瘤农杆菌介导的大豆遗传转化[J]. 生物工程学报, 2004, 20(6): 817-820. (Lin S Z, Cao Y P, Wei Z M. Genetic transformation of soybean mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2004, 20(6): 817-820.)
- [11] Yan B, Srinirasa Reddy M 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: 1090-1097.
- [12] 贾会勇. *CGSI*、*DHDPS* 基因克隆及其作为转基因植物筛选标记的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2008. (Jia H Y. Cloning of *CGSI* and *DHDPS* and their use as selectable maker of transgenic plant [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2008.)
- [13] 吴刚, 崔海瑞, 舒庆尧, 等. *GUS* 组织化学染色法——一种快速筛选抗二化螟转 *Bt cry1Ab* 基因水稻的方法[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2000, 26(2): 141-143. (Wu G, Cui H R, Shu Q R, et al. *GUS* histochemical assay: a rapid way to screen striped stem borer (*Chilo suppressalis*) resistant transgenic rice with *acry1Ab* gene from *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) [J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Science), 2000, 26(2): 141-143.)
- [14] Cheng T Y, Saka H, Voqui D T H. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture [J]. Plant Cell Reports, 1980, 19: 91-99.
- [15] 刘斌, 吴迪, 侯文胜. 卡那霉素叶片涂沫法筛选转基因大豆植株的有效性[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2006, 34(12): 79-82. (Liu B, Wu D, Hou W S. The effectiveness of scrawling leaves with kana to select transgenic soybean [J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry (Natural Science Edition), 2006, 34(12): 79-82.)