

## 不同大豆基因型再生性及对农杆菌敏感性的研究

邱波, 王志坤, 孟凡立, 李文滨

(东北农业大学 大豆研究所, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:** 采用农杆菌介导的子叶节遗传转化方法对 16 个大豆基因型进行转化, 以丛生芽分化率和 *GUS* 阳性率作为指标, 比较不同大豆基因型再生性及对农杆菌敏感性的差异。同时对大豆遗传转化再生过程中的种子萌发所需 6-BA 浓度、草丁膦 (PPT) 筛选压力等因素进行研究。结果表明: 萌发培养基中添加适宜浓度的 6-BA 能显著提高丛生芽的分化率; 不同大豆品种对 PPT 的敏感性不同, 最适 PPT 浓度主要集中在  $5 \sim 7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 16 个大豆基因型再生性及对农杆菌敏感性差异较大, 其中合丰 45 和东农 50 的再生率及 *GUS* 表达率最高, 是适合大豆遗传转化的基因型。

**关键词:** 大豆; 再生; 农杆菌; 敏感性

**中图分类号:** S565.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-9841(2011)05-0752-05

## Regeneration and Sensitivity to *Agrobacterium* of Different Soybean Genotypes

QIU Bo, WANG Zhing-kun, MENG Fan-li, LI Wen-bin

(Soybean Institute, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

**Abstract:** Sixteen soybean genotypes had been transformed by *Agrobacterium*-cotyledonary node system in this research. Differentiation ratio of multiple shoots and *GUS* positive rate as indicators, the regeneration of different soybean cultivars and their susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* were compared. Some factors affecting regeneration and genetic transformation such as 6-BA concentration in germination medium and PPT selection pressure were also studied. The result showed that germination medium supplemented with suitable concentration of 6-BA significantly increased the differentiation rate of buds; the sensitivity of PPT was different with varieties, the optimal concentration of PPT mainly concentrated in  $5 \sim 7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; Regeneration and sensitivity to *Agrobacterium* of 16 soybean genotypes were quite different, Hefeng 45 and Dongnong 50 were suitable genotypes for soybean transformation which had the highest regeneration rate and *GUS* expression.

**Key words:** Soybean; Regeneration; *Agrobacterium*; Susceptibility

目前大豆遗传转化效率较低, 主要是因为不同大豆基因型之间的再生频率差异较大<sup>[1-2]</sup>, Donaldson 等<sup>[3]</sup>研究发现不同基因型之间 *GUS* 基因瞬时转化率的变化范围为 27% ~ 92%; 同时大豆对农杆菌的敏感性较低也是限制农杆菌介导子叶节的原因之一<sup>[4]</sup>, 只有筛选出高易感性的基因型才能满足大豆遗传转化的需要。Hinchee 等<sup>[5]</sup>从 100 多个基因型中只筛选到了 3 个转化频率较高的材料。Owens 和 Cress<sup>[6]</sup>通过对 24 个栽培大豆品种和 3 个野生大豆株系活体转化研究, 筛选出 3 个栽培品种 (Biloxi、Jupiter 和 Peking) 及 1 个野生材料 (PI3931693B) 对农杆菌 A348 (pTiA6) 高度易感。其转化频率也受菌株的影响, 不同菌株的转化能力的差异主要是 Ti 质粒的差异所致, 转化中选择对农杆菌敏感的大豆基因型和强毒农杆菌菌系有利于转化效率的提

高<sup>[7]</sup>。随着近年来基因工程技术的迅速发展, 对组培再生频率有了更高的要求, 因此筛选出再生能力强的基因型及外植体类型对大豆遗传转化有着重要的意义。

该研究利用农杆菌介导的子叶节转化系统, 将不同大豆基因型再生性及对 LBA4404 农杆菌敏感性进行了比较研究, 对一些影响大豆转化效率的因素进行了探讨。以期为大豆的遗传转化提供优良的基因型。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试材料

合丰 35、合丰 45、合丰 50、合丰 55、东农 44、东农 47、东农 48、东农 50、东农 53、黑河 38、绥农 28、8004、垦丰 16、黑农 44、黑农 48、黑农 51 共 16 个优

收稿日期: 2011-05-28

基金项目: 国家转基因作物新品种培育重大专项资助项目 (2008ZX08004-002); 国家自然科学基金资助项目 (30800625)。

第一作者简介: 邱波 (1985-), 女, 在读硕士, 研究方向为大豆分子育种。E-mail: qiubo\_bo@163.com。

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

良品种。由东北农业大学大豆研究所、黑龙江省农科院和黑龙江省农垦科学院共同提供。

根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404, 质粒 pCAMBIA3301 由东北农业大学大豆生物学教育部重点实验室保存, 该质粒的左右边界序列间含有 1 个 *bar* 抗性基因和 *GUS* 基因。

大豆组培用培养基 MS 培养基与 B5 培养基的配方参照 Paula 等<sup>[8]</sup>。

## 1.2 试验设计

1.2.1 大豆遗传转化 从新鲜的平板挑取单菌落, 接种到含有相应抗生素的培养基上, 28℃、200 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养至 OD<sub>600</sub> = 0.8, 在 4℃、5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 去上清液, 再用液体的 CCM(共培养基) 重悬至 OD<sub>600</sub> = 0.6, 作为农杆菌转化的工程菌液。

取表面光滑无病斑的大豆成熟种子, 放入 NaClO/HCl(24:1) 的滤器中灭菌后, 接种在萌发培养基上, 在 25℃、16 h/8 h 光周期下萌发, 5~6 d 后取出无菌苗, 去掉种皮, 切去大部分的下胚轴, 只留靠近子叶的 3~5 mm 下胚轴, 将 2 片子叶从下胚轴中线处切开, 除去顶芽和腋芽, 用解剖刀在子叶与胚轴交接处直径约 3 mm 的范围内划 5~7 刀。将制备好的子叶节放入重悬后的侵染液中 28℃、120 r·min<sup>-1</sup> 振荡 30 min。倒掉菌液, 用无菌滤纸吸掉多余的菌液。然后将外植体近轴面朝下接种在铺有 1 层无菌滤纸的共培养基培养基上, 黑暗下共培养 3 d。共培养后将外植体转入无菌三角瓶中, 先加入无菌水中洗 2~3 次, 再在液体芽诱导培养基中洗 2~3 次, 然后使子叶近轴面朝上, 将下胚轴插入固体芽诱导培养基中。恢复培养 7 d, 转入含有相应抗性的筛选培养基中, 筛选 10 d 后备用。

1.2.2 6-BA 浓度对大豆萌发及伸长的影响 萌发培养基为 B5 培养基, 在萌发培养基分别添加 0、1、2、3 和 4 mg·L<sup>-1</sup> 的 6-BA, 挑选健康无病害的大豆

种子利用氯气消毒处理后, 接种于萌发培养基上, 每个处理接种 100 粒大豆种子, 3 次重复。

1.2.3 PPT 对大豆选择压力试验 质粒 pCambia3300 含有 1 个 *bar* 抗性基因, 在筛选培养基中分别添加 3、4、5、6、7 和 8 mg·L<sup>-1</sup> PPT, 其中每个梯度接种 25 个子叶, 于 25℃ 下培养 14 d, 计算子叶节的出芽率和再生芽的存活率, 3 次重复, 以此作为考察再生性的方法。出芽率(%) = (出芽的子叶节数/总子叶节数) × 100, 再生芽的存活率(%) = (存活的再生芽数/总再生芽数) × 100。

1.2.4 *GUS* 活性测定 以 *GUS* 活性作为考察不同大豆品种对农杆菌敏感性的指标。将 16 个大豆品种各取 50 个外植体在农杆菌浸染后转至芽诱导培养基, 培养 7 d 后转入各品种适宜草丁膦浓度的芽诱导培养基继续培养 14 d, 待丛生芽长出后, 统计芽的外植体数及丛生芽数, 然后将子叶节处形成的愈伤组织切下, 进行 *GUS* 染色, 统计染色结果。大豆细胞中 *GUS* 基因的表达参照 Jefferson<sup>[9]</sup> 的方法测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 萌发培养基中 6-BA 浓度对丛生芽分化的影响

苗龄相同的情况下添加 6-BA 的无菌苗没有须根, 子叶节处分生细胞生长旺盛, 更适合作为外植体。与未添加 6-BA 的相比, 添加 1、2 和 3 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA 的萌发培养基上萌发的无菌苗子叶节区及下胚轴相对粗大, 比较幼嫩, 但随着 6-BA 浓度的增加, 子叶节区及下胚轴逐渐变得细小、卷曲, 当 6-BA 增加到 4 mg·L<sup>-1</sup> 时下胚轴出现卷曲变形(图 1)。添加 6-BA 萌发培养基培养的无菌苗子叶节的分化率显著高于未添加 6-BA 萌发培养基, 但当萌发培养基中 6-BA 浓度大于一定浓度后, 子叶节的分化率随着 6-BA 浓度的增加而下降。最适宜 6-BA 浓度因品种而异, 以东农 44 为例, 1 mg·L<sup>-1</sup> 是其无菌苗萌发的最适宜 6-BA 浓度, 低于或高于此浓度则子叶节的分化率有所下降(图 2)。



A~E分别为添加0、1、2、3、4 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA的萌发培养基上萌发的无菌苗  
A-E were the seedlings from germination medium with addition of 0, 1, 2, 3, 4 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA, respectively.

图 1 6-BA 浓度对东农 44 无菌苗萌发的影响

Fig. 1 The effect of 6-BA concentration on germination of Dongnong 44

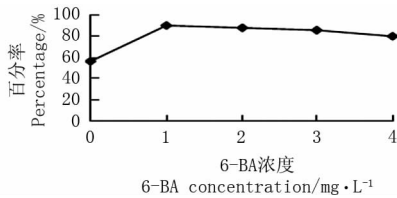


图2 萌发培养基中添加不同浓度6-BA对东农44丛生芽分化的影响

Fig. 2 Effect of 6-BA in germination medium on the differentiation of multiple shoots of Dongnong 44

## 2.2 PPT的选择压力试验

以外植体出芽率和再生苗出芽率2个指标检测大豆品种对不同PPT浓度的敏感性。结果表明随着PPT浓度的增长,各外植体的生长明显受到了抑制,并且随着时间的推移,从外观上可以看到外植体在高浓度PPT的筛选下逐渐褐化死亡。如图3所示,以东农44为例,5 mg · L<sup>-1</sup>是其最适PPT浓度,低于5 mg · L<sup>-1</sup>时外植体出芽率和再生苗出芽率几乎没有受到PPT的影响,高于5 mg · L<sup>-1</sup>外植体出芽率和再生苗出芽率的下降趋势减缓。但不同基因型大豆对PPT的选择压力敏感性也存在一定差异(表1),其中东农44、东农50、垦丰16、黑河38、8004对PPT较敏感,所需要PPT选择压力为5 mg · L<sup>-1</sup>;东农47、黑农44、黑农48、黑农51及合丰45对PPT耐受性较强,所需要PPT选择压力较高,最适PPT工作浓度为7 mg · L<sup>-1</sup>。其它品种最适PPT工作浓度为6 mg · L<sup>-1</sup>。由此可以看出不同基因型大豆对PPT的敏感性不同,多数基因型最适PPT筛选浓度主要集中在5~7 mg · L<sup>-1</sup>。

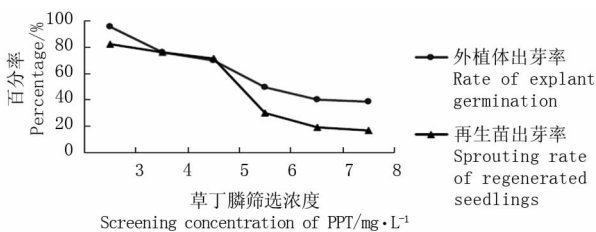


图3 不同PPT浓度下东农44子叶节外植体出芽率和再生芽存活率

Fig. 3 The induction and livability of the buds of Dongnong 44 in different PPT concentrations

## 2.3 不同大豆基因型的再生率及转化率

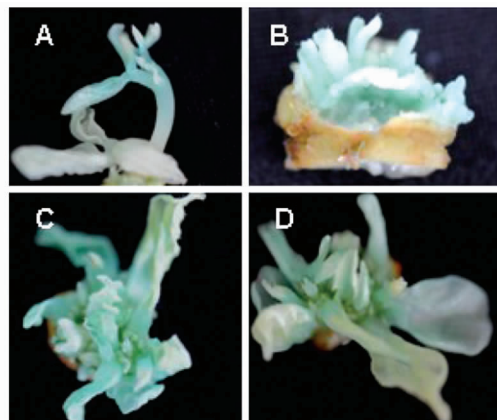
如表2所示,测试的16个品种再生率与GUS表达率差异较大。合丰45与东农50的再生率分别为90.70%和88.60%,GUS表达率分别为88.40%和86.40%,是大豆遗传转化理想的基因型。品种再生率在70%以上的基因型还有合丰50、绥农28和垦丰16,垦丰16的GUS阳性率为61%,合丰50和绥农28均为50%,8004为35%,东农53为

29%,说明这5个品种对农杆菌LBA4404的敏感性较高(图4),而黑农44、黑农48、黑农51、合丰55、东农47的再生率与GUS表达率均低于10%,说明这5个品种的再生性低,对农杆菌LBA4404易感性差,不适宜作为转化的受体。GUS检测结果表明不同基因型对农杆菌的敏感性存在较大差异。王连铮等<sup>[10]</sup>认为在分化的组织中GUS阳性芽应高于4%,未分化的组织中阳性组织的GUS表达应多于40%。综合再生率与GUS表达率可以看出合丰50、垦丰16、绥农28、8004较适合作为大豆遗传转化的基因型。不同基因型的试验结果差异较大,说明在大豆子叶节再生系统中,大豆品种的选择至关重要。

表1 不同基因型大豆最适PPT浓度的比较

Table 1 Comparison of optimum PPT concentration for different genotypes

大豆品种 Soybean varieties	最适草丁膦浓度 Optimal concentration of PPT / mg · L <sup>-1</sup>
东农44 Dongnong 44	5
东农47 Dongnong 47	7
东农48 Dongnong 48	6
东农53 Dongnong 53	6
黑农44 Heinong 44	7
黑农48 Heinong 48	7
黑农51 Heinong 51	7
东农50 Dongnong 50	5
合丰35 Hefeng 35	6
合丰45 Hefeng 45	7
合丰50 Hefeng 50	6
合丰55 Hefeng 55	6
垦丰16 Kenfeng 16	5
绥农28 Suinong 28	6
黑河38 Heihe 38	5
8004	5



A: 合丰45 B: 8004 C: 垦丰16 D: 绥农28  
A: Hefeng 45 B: 8004 C: Kenfeng 16 D: Suinong 28

图4 GUS基因在丛生芽区的表达

Fig. 4 Expression of GUS gene in bud area

表 2 农杆菌易感性大豆基因型的筛选  
Table 2 Screening of soybean genotypes susceptible to *Agrobacterium tumefaciens*

品种 Cultivars	再生率 Regeneration rate/%	GUS 表达率 Frequency of GUS expression/%	丛生芽 GUS 表达率 GUS expression rate of shoot/%
合丰 45 Hefeng 45	90.70	88.40	60.36
合丰 55 Hefeng 55	2.56	0	0
合丰 50 Hefeng 50	84.09	50.00	22.75
合丰 35 Hefeng 35	22.73	9.09	9.52
东农 44 Dongnong 44	20.00	8.89	13.91
东农 47 Dongnong 47	2.22	0	0
东农 48 Dongnong 48	20.45	4.55	6.14
东农 53 Dongnong 53	28.57	28.57	54.37
黑河 38 Heihe 38	13.04	8.70	23.08
绥农 28 Suinong 28	100.00	50.00	18.44
8004	43.48	34.78	55.56
垦丰 16 Kenfeng 16	95.65	60.87	826.19
黑农 48 Heinong 48	4.44	4.44	47.06
黑农 44 Heinong 44	7.89	5.26	9.52
黑农 51 Heinong 51	0	0	0
东农 50 Dongnong 50	88.60	86.40	59.83

### 3 结论与讨论

萌发阶段的培养条件对子叶节出芽有一定的影响,这是由于细胞分裂素 6-BA 刺激子叶节处潜在的分生细胞,使其不断分裂并打破顶端优势,因此子叶节区居间分生组织旺盛生长,促使子叶节膨大增粗及以后不定芽的形成,对丛生芽分化有明显的促进作用<sup>[11]</sup>。以东农 44 为例,通过研究发现  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 6-BA 是适宜的浓度,高于  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  则外植体的分化率有所下降,而分化率下降则会使丛生芽数减少,再生率降低,因此适宜的 6-BA 浓度是比较重要的。

*Bar* 基因作为农杆菌介导的子叶节转化目前常用的选择标记,存在的问题是选择压力过低会导致非转化细胞的逃逸再生,抑制转化的细胞增长或造成假阳性,选择压力高容易导致转基因芽褐化甚至

死亡。该研究对 16 个大豆品种的 PPT 筛选浓度进行测试,结果表明不同品种最适 PPT 浓度不同,最适 PPT 浓度主要集中在  $5 \sim 7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,浓度过高则会使外植体褐化死亡,无法得到丛生芽,浓度过低则 GUS 阳性率显著降低。说明在大豆子叶节系统中不同的大豆品种对选择剂的敏感性存在着一定差异,因此针对不同的品种选择适宜的筛选浓度十分必要。

大豆是公认的难转化植物,主要是因为农杆菌介导的大豆转化系统具有较高的基因型依赖性,而且不同的转化方法导致转化率差异较大。因此只有将良好的再生系统与适宜的转化方法相结合,才能大幅度提高转化频率。目前农杆菌介导的大豆转化仍然存在一定程度的种和组织的特异性<sup>[12]</sup>,因此基因型是制约大豆转化效率的主要因素之一。该研究共筛选了 16 个大豆栽培品种,基因型之间差异显著,与卜云萍等<sup>[13]</sup>和王岚等<sup>[14]</sup>的结果一致,这可能是由于不同区域遗传背景的差异而导致不同大豆基因型之间再生频率的差异较大。

该研究采用实验室成熟的子叶节介导法转化大豆,利用 GUS 染色这一快速、简单易行的方法筛选 16 个不同大豆基因型,以期得到再生率与转化率均理想的基因型。结果表明合丰 45 与东农 50 不仅再生率高,而且对农杆菌的易感性强,是适合遗传转化的基因型。同时合丰 45 是黑龙江省的主栽品种,为超高产、优质、抗病型品种,是大豆遗传转化的优良受体,具有广阔的应用前景。

**致谢:**该研究得到农业部大豆产业技术研发中心和黑龙江省教育厅创新团队项目资助,在此表示衷心感谢。

### 参考文献

- [1] 王升吉,吴元华,王洪岩,等.大豆不同外植体组织培养及再生研究[J].沈阳农业大学学报,1999,30(3):255-259. (Wang S J, Wu Y H, Wang H Y, et al. Studies on the regeneration of tissue culture of different explants in soybean[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 1999, 30(3): 255-259.)
- [2] 袁鹰,刘德璞,郑培和,等.大豆组织培养再生植株研究[J].大豆科学,2001,20(2):9-13. (Yuan Y, Liu D P, Zheng P H, et al. Study on plant regeneration from soybean culture[J]. Soybean Science, 2001, 20(2): 9-13.)
- [3] Donaldson P A, Simmonds D H. Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean[J]. Plant Cell Reports, 2000, 19: 478-484.
- [4] Christou P. Philosophy and practice of variety-independent gene transfer into recalcitrant crops[J]. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 1983, 29P: 119 - 124.
- [5] Hinchey M A W, Ward D V C, Newell C A, et al. Production of

- transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer[J]. *Bio/Technology*, 1988, 6:92-99.
- [6] Owens L D, Cress D E. Genotypic Variability of soybean response to *Agrobacterium tumefaciens* strains harboring Ti or Ri plasmids [J]. *Plant Physiology*, 1985, 77:87-94.
- [7] 许智宏. 植物生物技术[M]. 上海:上海科学技术出版社. 1998:321. (Xu Z H. *Plant biotechnology*[M]. Shanghai: Science and Technology Press of Shanghai, 1998:321.)
- [8] Paula M, Olhoft L E, Fligel C M, et al. Efficient soybean transformation using Hygromycin B selection in the cotyledonary node method[J]. *Planta*, 2003, 216:723-735.
- [9] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1987, 5: 387-405.
- [10] Wang L Z, Pei Y L, Fu Y Q, et al. Soybean mutation breeding and tumor formation by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. IAEA SM340/202p, FAO/IAEA International Symposium on the Use of Induced Mutations and Molecular Techniques for Crop Improvement. 1995, 7:19-23.
- [11] 李文霞, 宁海龙, 李文滨, 等. 6-BA 对大豆子叶节再生的影响 [J]. *核农学报*, 2007, 21(5):502-505. (Li W X, Ning H L, Li W B. Effect of 6-BA on regeneration of soybean cotyledonary node [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2007, 21(5):502-505)
- [12] Harold N T, Randy D D, Elian R S, et al. Recent advances in soybean transformation[J]. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 1997, 3:9-26.
- [13] 卜云萍, 李明春, 胡国武, 等. 大豆子叶节组培再生系统与农杆菌介导的基因转化系统的比较研究[J]. *南开大学学报(自然科学版)*, 2003, 36(1):103-108. (Bu Y P, Li C M, Hu G W, et al. The study of comparing the transformation system of *Agrobacterium*-mediated and regeneration system of cotyledon nod of soybean culture [J]. *Journal of Nankai University (Nature Science Edition)*, 2003, 36(1):103-108.)
- [14] 王岚, Clemente T, 王连铮, 等. 大豆品种的再生性能及对 EHA 101 农杆菌的敏感性[J]. *作物学报*, 2003, 29(5):664-669. (Wang L, Clemente T, Wang L J, et al. Regeneration study of soybean cultivars and their susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2003, 29(5):664-669.)

(上接第 751 页)

- (Zhang H J, Ni H W, Zhou Z Q, et al. Major progress on biosafety of glufosinate resistant transgenic crops[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2002, 7(5):54-56.)
- [2] 张宏军, 刘学, 张佳, 等. 草铵膦的作用机理及其应用[J]. *农药科学与管理*, 2004(4):23-27. (Zhang H J, Liu X, Zhang J. Mechanism and utilization of glufosinate-ammonium [J]. *Pesticide Science and Administration*, 2004(4):23-27.)
- [3] 刘洪艳, 弭晓菊, 崔继哲. *bar* 基因、PAT 蛋白和草丁膦的特性与安全性[J]. *生态学杂志*, 2007(6):938-942. (Liu H Y, Mi X J, Cui J Z. Characteristics and safety of *bar* gene, PAT proteins and glufosinate [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2007(6):938-942.)
- [4] 段发平, 染承邺, 黎垣庆. *Bar* 基因和转 *bar* 基因作物的研究进展[J]. *广西植物*, 2001(2):166-172. (Duan F P, Liang C Y, Li Y Q. Research advances of *bar* gene and its transgenic crops [J]. *Guihaia*, 2001(2):166-172.)
- [5] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京:科学出版社, 1998. (Wang G L, Fang H J. *Plant genetic engineering*[M]. Beijing: Science Press, 1998.)
- [6] 薛仁镐, 谢宏峰. 利用改良的草丁膦筛选系统快速而有效筛选转基因大豆[J]. *大豆科学*, 2006, 25(4):373-378. (Xue R G, Xie H F. Rapid and efficient selection for transgenic soybean plants with the improved glufosinate selection system [J]. *Soybean Science*, 2006, 25(4):373-378.)
- [7] 浦惠明, 高建芹, 戚存扣. 油菜抗草丁膦性状的遗传与利用 [J]. *江苏农业科学*, 2003(2):15-18. (Pu H M, Gao J Q, Qi C K. Heredity and use of resistance to phosphinothricin in rape seed [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2003(2):15-18.)
- [8] 陈浩, 陈社员, 官春云. 转 *bar* 基因油菜对非选择性除草剂草丁膦的抗性研究[J]. *作物研究*, 2010(3):160-163. (Chen H, Chen S Y, Guan C Y. Resistance of *bar*-transgenic rape seed (*Brassica napus* L.) to herbicide PPT [J]. *Crop Research*, 2010(3):160-163)
- [9] 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 ZM. Recent advances in soybean genetic transformation [J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2005, 31(2):126-134.)
- [10] 梁雪莲, 王引斌. 作物抗除草剂转基因研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2001(2):17-21. (Liang X L, Wang Y B. The progress of studies on herbicide resistance gene of crop [J]. *Biotechnology Information*, 2001(2):17-21.)