

利用“微创刷”法获得抗草甘膦转基因大豆

荣非¹,王罡¹,季静¹,王萍²,董歆²,高海伶¹,曹越平³,邱丽娟⁴

(1. 天津大学 环境科学与工程学院,天津 300072; 2. 淮海工学院 海洋学院,江苏 连云港 222005; 3. 上海交通大学 农业与生物学院,上海 200436; 4. 中国农业科学院 作物科学研究所,北京 100081)

摘要:以发芽3 d的大豆成熟种子胚尖生长点为作用点,利用“微创刷”法将抗草甘膦基因(*EPSPS*)转入绥农22中,对转化植株T₁代进行草甘膦筛选,对筛选后的抗性植株进行PCR检测,得到抗草甘膦转基因大豆。同时研究了不同浓度草甘膦对野生型绥农22与抗草甘膦转基因绥农22大豆植株的影响。结果表明:绥农22 T₀代成株率为97.38%,对T₁代具有草甘膦抗性的植株进行PCR检测,初步证明*EPSPS*基因成功转入大豆中,T₁代转化效率为6.20%;对野生型绥农22与“微创刷”法获得的转基因绥农22大豆在不同浓度草甘膦进行相关生理指标测定,抗草甘膦转基因绥农22大豆在不同浓度草甘膦作用下叶片叶绿素含量指数、光合速率高于野生型绥农22大豆,莽草酸含量低于野生型绥农22大豆,进一步证明了大豆抗性植株对草甘膦的抗性。

关键词:大豆;胚尖生长点;“微创刷”;*EPSPS*基因

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

DOI:10.11861/j.issn.1000-9841.2015.02.0217

Research of “Minimal Wound Brush” to Acquire Genetically Modified Glyphosate – resistant Soybean

RONG Fei¹, WANG Gang¹, JI Jing¹, WANG Ping², DONG Xin², GAO Hai – ling¹, CAO Yue – ping³, QIU Li – juan⁴

(1. School of Environmental Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. School of Marine Science and Technology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 3. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200436, China; 4. Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Growing points of embryonic tips from mature soybeans after 3 days post germination were used as a receiving point of Agrobacteria carrying recombinated vectors for the transformation of glyphosate – resistant gene (*EPSPS*) into soybeans (Suinong 22) by using “minimal wound brush” method, and transformed T₁ plants were screened by glyphosate and tested by PCR. Chlorophyll content index, shikimic acid concentration, and photosynthetic rate of wild – type and transgenic soybean plants were determined. The results showed that surviving rate of T₀ soybean plants was 97.38%, transformation rate for T₁ soybean plants was 6.20%. Measurements of related physiological factors from wild – type and transgenic plants were taken and it was found that chlorophyll content index and photosynthetic rate were higher in transgenic plants than wild types; meanwhile, shikimic acid concentration were much lower in transgenic plants than wild types. The above physiological results confirmed the resistance of glyphosate in transgenic soybeans plants.

Keywords: Soybeans; Embryonic tips apical point; “Minimal wound brush”; *EPSPS* gene

中国是大豆的主产国与消费国^[1],但自1995年起我国开始进口大豆,而且进口量不断攀升。目前我国的传统育种方法在提高大豆产量、改善品质、增强抗性等方面具有选择效率低和育种周期长等缺点,迫切需要大豆育种技术的升级换代^[2]。随着分子生物学理论与技术的不断发展和基因工程技术的不断提高,转基因技术这一新兴领域打破了传统育种的各种局限^[3],并且得到迅猛发展和不断完善,现已成为大豆品种改良普遍认可,且最有前途的技术手段^[4]。

一般来讲,商业化的转基因品种侧重于抗除草剂(herbicide tolerance, HT)和抗虫(insect resistance,

IR)两种性状,还有一部分是同时具有这两种性状叠加的复合性状品种(Stacked)^[5]。对转基因大豆来说,只有抗除草剂一种“输入性状”,所以转基因大豆的总体种植情况就是抗除草剂大豆的种植情况。大豆是美国最主要的农产品之一,种植面积和产量一直居世界前列^[6]。自美国1996年首次种植以来,美国当年的种植面积为40万hm²,仅占该国大豆种植总面积的1.6%,但到1997年仅短短一年时间就增至360万hm²,占14%;至2011年,美国抗草甘膦转基因大豆所占比例已提高到94%,增长了近60倍^[7]。阿根廷是全球第二大转基因大豆生产国,其转基因大豆种植率已接近100%^[8],全球转基因

收稿日期:2014-05-28

基金项目:国家转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08004-001-04)。

第一作者简介:荣非(1990-),男,硕士,主要从事植物转基因研究。E-mail:rongfei19900@gmail.com。

通讯作者:王罡(1964-),男,博导,教授,主要从事植物耐盐碱基因、植物基因工程研究。E-mail:wanggangtjdx@126.com;

季静(1965-),女,博导,教授,主要从事遗传学、基因工程和细胞工程研究。

因大豆的发展正在以前所未有的速度进行着^[9]。目前全世界有不少于 200 个种子出售超过 1 000 个适应于不同气候和地区、不同生育期的抗草甘膦大豆品种^[10]。

但抗除草剂转基因大豆在我国暂时还没有得到推广种植,我国大豆田草害面积平均达到 80% 左右,中等以上的草害面积也在 50% 以上。全国每年因草害而损失的大豆总量达到 15 亿~20 亿 kg, 占总产量的 10%~15%^[11-12]。可以看出,培育出具有完全自主产权的抗草甘膦转基因大豆这一任务迫在眉睫。然而,大豆的遗传转化却受到诸多因素的限制。虽然大豆的遗传转化研究在 1984 年已经首次被报道^[13-14],但是从第一棵转基因大豆的诞生到现在,近 30 年已经过去,大豆的遗传转化效率依旧没有得到显著提高^[15]。目前大豆遗传转化最常用方法是基因枪轰击未成熟子叶法和农杆菌介导子

叶节法,但是这两种方法均存在转化周期长、转化率低、对基因型依赖性强等缺点^[16-17]。

本试验采用河北省农林科学院遗传生理研究所河北省植物转基因中心发明的“一种充分微创大豆种子生长点的转基因方法”,对大豆绥农 22 胚尖生长点进行转化,以期获得具有草甘膦抗性的转基因大豆。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验所用受体为野生型大豆绥农 22,由吉林省农业科学院大豆研究所惠赠。

农杆菌菌株为携带有 pSOY20-EPSPS-Bar 质粒的 EHA101,由浙江大学生命科学院寿惠霞教授惠赠,pSOY20 质粒图谱如图 1 所示。

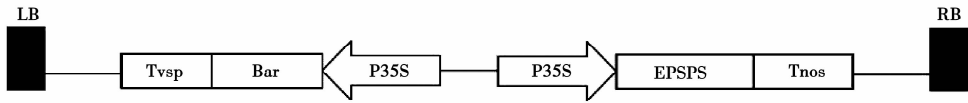


图 1 pSOY20-EPSPS-Bar 质粒图谱

Fig. 1 The map of plasmid pSOY20-EPSPS-Bar

1.2 方法

本试验所采用的方法是由河北省农林科学院遗传生理研究所植物转基因中心王海波课题组所建立大豆遗传转化方法改进而来,具体如下:

1.2.1 外植体的制备 挑选饱满、无病斑、均匀的绥农 22 大豆种子用口杯法灭菌^[18]。将消毒过的大豆种子 20 粒摆放于含 2 层无菌滤纸的 9 cm 培养皿中,加无菌水 10 mL,25~28℃ 暗培养 2 d 左右,待胚芽鞘伸长至 0.4~0.5 cm 时,用镊子将大豆的种皮去掉,去掉一片子叶及真叶,在解剖镜下将分化出来的微小叶片去除干净,暴露生长点,置于无菌的培养皿中,稍微晾干备用。

1.2.2 农杆菌转化液的制备 挑取农杆菌单菌落,接入 20 mL 含有卡那霉素 100 mg·L⁻¹,氯霉素 25 mg·L⁻¹,壮观霉素 50 mg·L⁻¹ 的 LB 液体培养基中,

28℃、200 r·min⁻¹ 过夜培养。次日以 1:100 的比例扩大培养,28℃、200 r·min⁻¹ 培养至 OD₆₀₀ 为 0.5~0.6,4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 收集菌体,弃上清液加入 1/5~1/10 体积的重悬液,重悬菌体制成“农杆菌介导转化液”。

重悬液:MS + 蔗糖 60 g·L⁻¹ + 乙酰丁香酮 (AS)200 μmol·L⁻¹,pH5.4。

1.2.3 转化与共培养 用蘸过农杆菌介导转化液的“微创刷”(“微创刷”为河北省农林科学院遗传生理研究所植物转基因中心研制,刷毛单根直径为 14 μm,刷毛露出长度为 1.5 mm,每刷根数 300,如图 2 所示)对准暴露的胚尖生长点以刺和刷的方式操作 2~3 次,将处理过的外植体子叶近轴面向上,摆放于含 2 层无菌滤纸的 9 cm 培养皿中,加入 2 mL 无菌水,25℃,暗培养 3 d。

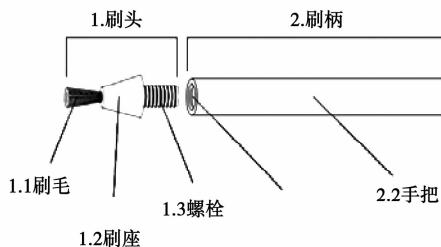
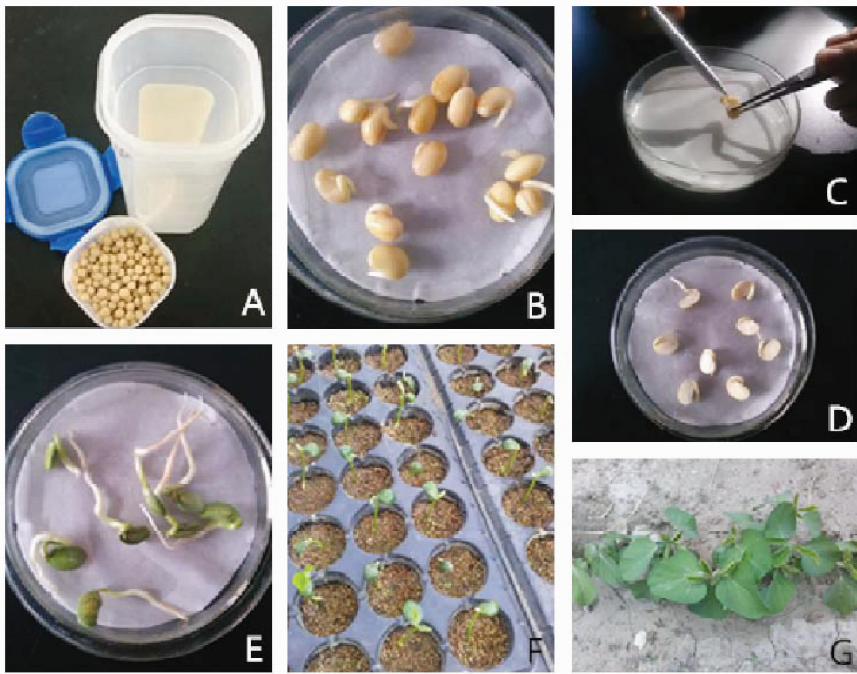


图 2 河北省植物转基因中心制作的“微创刷”

Fig. 2 “Minimal wound brush” invented by Hebei Plant Genetic Engineering Center

1.2.4 转化苗预培养及移栽 共培养后,将平皿中加入 10 mL 无菌水,置于 25℃、光照 12 h/黑暗 12 h 条件下培养 7 d,至大豆再生芽长至 2~5 mm 时,将转化苗移栽插入装满蛭石:营养土为 1:1 的培养钵

中,定期浇水,待大豆苗长至有两三片真叶展开时连同营养基质体移栽到大田中生长。整个转化过程如图 3 所示。



A:氯气消毒大豆种子;B:大豆种子萌发;C:“微创刷”操作大豆生长点;D:黑暗共培养;E:光照预培养;F:移栽到蛭石;G:大田种植。

A:Disinfection of soybean seeds with chlorine; B:Germination of soybean seeds; C:The application of *Agrobacterium* medium carrying recombinant vectors onto growing points of soybean plants using “Minimal wound brush” method; D:Co-culture of soybean plants and *agrobacterium* in darkness; E:Pre-culture with light; F:Transplantation of seedlings to vermiculite; G:Field cultivation.

图 3 利用“微创刷”对大豆生长点转化的过程

Fig. 3 The process of transformation using “Minimal wound brush” method in soybeans

1.2.5 转化苗 T_1 抗性筛选 T_0 代不进行任何草甘膦筛选及分子检测,将 T_0 代植株所结豆荚分株收获、保存。将 T_1 代种植于大田,至大豆苗长至 3~4 片真叶出现时,用有效浓度为 $0.92 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 的草甘膦对叶片进行涂抹,7 d 后观察大豆植株叶片对草甘膦的反应。

1.2.6 PCR 检测 将具有草甘膦抗性的大豆植株提取幼嫩叶片的 DNA,以质粒为阳性对照,野生型绥农 22 大豆植株的 DNA 作阴性对照,进行目的基因 *EPSPS* 的 PCR 扩增。

1.2.7 野生型与抗性植株的相关生理指标的测定

对 PCR 显示阳性的转基因大豆植株及野生型绥农 22 大豆植株各随机选取 30 株用不同浓度的草甘膦异丙铵盐溶液进行茎叶喷施。在喷施时保持药液喷洒均匀,除草剂草甘膦异丙铵盐溶液有效浓度设 4 个水平 ($0.46, 0.92, 1.85, 3.69 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$),其中以喷施清水作为对照。在 41% 草甘膦异丙铵盐溶液中加入适量中性洗衣粉以利于药液粘附在大豆

叶片表面。每一浓度 41% 草甘膦异丙铵盐溶液喷洒转基因大豆及野生型绥农 22 大豆各 6 棵植株,7 d 后试验田取野生型与转基因大豆植株同一叶位的新鲜叶片,置于冰盒,做好标记,迅速拿回实验室,在 -80°C 冰箱保存待测。

叶片叶绿素含量指数的测定采用 CCM-200 Chlorophyll Content Meter (Opti-Sciences, Inc) 测量大豆活体叶片的叶绿素含量。

莽草酸的含量分析采用分光光度法并稍作改动:准确称量 0.1 g 的大豆叶片置于研钵中利用液氮研磨,然后加入 1 mL $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 混匀。将混匀后的提取液转入离心管冷冻离心 15 min ($25\ 000 \text{ g}$),取上清液,以备测莽草酸含量使用。取 $100 \mu\text{L}$ 上述上清液与 2 mL 0.1% 过碘酸混合以氧化莽草酸,3 h 后将试样与 2 mL $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 混匀,之后再加 1.2 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘氨酸再混匀,然后在 380 nm 波长下进行光密度测定。利用不同浓度的莽草酸标样进行光密度测定绘制标准出曲

线,计算样品的莽草酸含量。

叶片光合速率的测定选择晴朗无云时利用便携式光合仪 LI-6400(美国 LI-COR 公司)测定田间野生型绥农 22 与抗草甘膦转基因大豆第一复叶的光合速率(P_n)。

1.3 数据分析

统计试验过程中处理种子数、发芽种子数、正常成株数、PCR 阳性植株数,计算种子发芽率、成株率、转化率。发芽率(%) = 发芽种子数/处理种子数 $\times 100$,成株率(%) = 正常成株数/发芽种子数 $\times 100$ 。转化率为转化处理后,所有检测出有阳性种子的 T_0 代植株数占总 T_0 代植株数的百分率,即转化率(%) = 有转化种子的株数/结实总株数 $\times 100$ 。

2 结果与分析

2.1 “微创刷”法转化大豆绥农 22 的植株再生情况

使用“微创刷”法先后做 5 批大豆转化,共转化绥农 22 种子 770 粒,每批次的发芽率及成株率见表 1。由表可知,用本试验提供的种子萌发方法,大豆绥农 22 的发芽率比较高,平均为 96.73%;对发芽种子,使用“微创刷”法处理经转化后,平均成活率达 97.38%。此外,在试验过程中发现,成活后的转化植株结实率达 100%。由此可见,该方法较组织培养方法而言,成活率、结实率高,为子代的筛选奠定了基础。

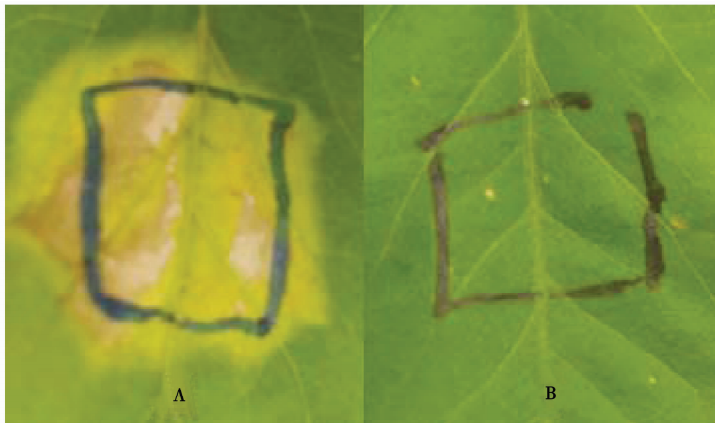
2.2 大豆转 *EPSPS* 基因 T_1 植株的草甘膦涂抹筛选

将 T_0 代成熟的种子播种后,待大豆苗长至三片

复叶出现时,在 T_1 代植株叶片上画取面积为 1 cm^2 的正方形区域,用移液枪吸取有效浓度为 $0.92\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 的 41% 草甘膦异丙铵盐溶液 $2\ \mu\text{L}$ 均匀涂抹于正方形区域内,以保证叶片涂抹草甘膦异丙铵盐溶液用量统一。7 d 后大部分叶片均出现不同程度的药害反应,对药害反应严重即叶片枯死的植株舍弃,对没有出现药害反应或者反应不明显且能恢复的植株再进行第二次涂抹。经过 2 次草甘膦涂抹后仍旧能够正常生长的幼苗初步推断为抗性植株。本试验中种植 T_0 子代种子共 500 粒,萌发成苗 227 株,其叶片涂抹 7 d 后筛选结果如图 4 所示。草甘膦被叶片吸收后抑制了 5-烯醇内酮酰莽草酸-3-磷酸合成酶(EPSP)的活性,导致芳香氨基酸的生物合成受阻,一部分植株叶片表现出明显的药害反应,叶片枯萎变黄(图 4A);另一部分植株叶片药害反应不明显(图 4B)。经草甘膦涂抹试验初步筛选后具有抗性的 T_1 植株共计 75 株。

表 1 T_0 代大豆绥农 22 植株的发芽率与成株率
Table 1 The seed germination rate and surviving rate of T_0 soybean plants

批次 Batch	发芽率 Seed germination rate/%	成株率 Surviving rate/%
1	97.69	96.85
2	97.33	96.58
3	95.63	98.70
4	97.65	97.60
5	95.33	97.20
平均 Average	96.73 ± 1.1514	97.38 ± 0.8257



A: 未转化植株; B: 抗性植株。

A: Plants with failed transformation; B: Plants with successful transformation.

图 4 大豆 T_1 植株草甘膦涂抹筛选

Fig. 4 The screening of positively transformed T_1 soybeans after the application of glyphosate

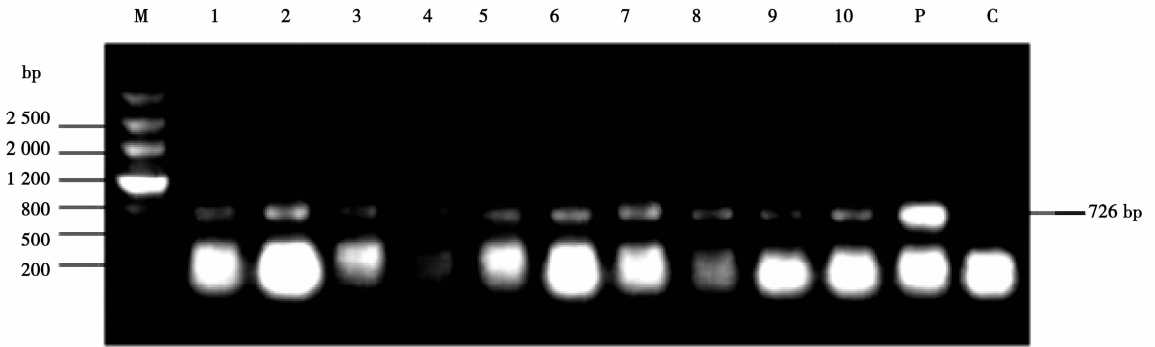
2.3 大豆转 *EPSPS* 基因 T_1 植株的 PCR 检测

取草甘膦涂抹后显示对草甘膦异丙铵盐溶液

具有抗性的 75 株大豆叶片提取 DNA,以 pSOY20 质粒为阳性对照,野生型绥农 22 大豆植株叶片的

DNA 为阴性对照,对 75 株抗性植株进行目的基因 *EPSPS* 的 PCR 扩增,共有 31 株扩增出目的条带。部分检测结果如图 5 所示,部分植株扩增出的目的条

带长度为 726 bp,与阳性对照一致,进一步证明了抗除草剂基因 *EPSPS* 成功转入大豆中。



M: 分子量标记;P:质粒 pSOY20 - *EPSPS* - *Bar* (阳性对照);C:未转化植株 (阴性对照);1 ~ 10:转化植株。

M: Molecular marker III; Lane P: pSOY20 - *EPSPS* - *Bar* plasmid DNAs used as positive controls; Lane C: DNAs from plants with failed transformation used as negative controls; Lane 1 - 10: DNAs from plants with successful transformation.

图 5 大豆转 *EPSPS* 基因 T_1 植株的 PCR 检测结果

Fig. 5 The representative PCR analysis of genomic DNA in putative transgenic soybean plants

2.4 41% 草甘膦异丙胺盐水剂对大豆叶片叶绿素含量的影响

由图 6 可知,随着 41% 草甘膦异丙胺盐水剂剂量的增加,经 PCR 验证的抗草甘膦转基因大豆植株与野生型绥农 22 大豆植株的叶绿素含量指数基本均呈下降趋势。抗草甘膦转基因大豆植株在草甘膦喷施剂量大于 $0.92 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 时,其叶片叶绿素含量均高于野生型绥农 22 大豆,并差异显著。另外,抗草甘膦转基因大豆在 41% 草甘膦异丙胺盐喷施剂量为 $0.92 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 时叶片叶绿素有小幅上升,在超过 $1.85 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 时下降趋势减缓。

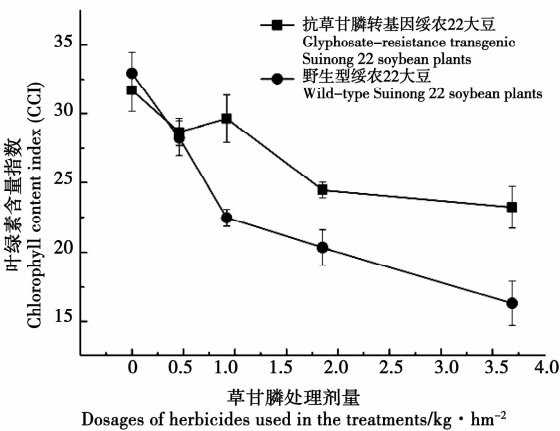


图 6 喷药后两种大豆第一复叶的叶绿素含量指数 (CCI)

Fig. 6 Chlorophyll content index of the first trifoliolate leaf of two soybean varieties after spraying with herbicide

2.5 41% 草甘膦异丙胺盐水剂对大豆叶片莽草酸质量分数的影响

不同浓度草甘膦异丙胺盐水剂均可增加野生

型绥农 22 大豆和抗草甘膦转基因大豆叶片的莽草酸质量分数,但是二者的增加程度却大为不同(图 7)。野生型绥农 22 大豆叶片的莽草酸质量分数随草甘膦喷施浓度的增大而急剧增高,在超过较低剂量时体内莽草酸就大量积累,受害比较严重。而抗草甘膦转基因大豆植株叶片的莽草酸质量分数变化不明显,上升缓慢。由于抗草甘膦转基因大豆转入了 *EPSPS* 基因,其 5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合成酶 (*EPSPS*) 活性较高,可以将体内多余的莽草酸代谢掉,保证芳香族氨基酸的正常代谢,能够忍受较高剂量草甘膦异丙胺盐水剂。

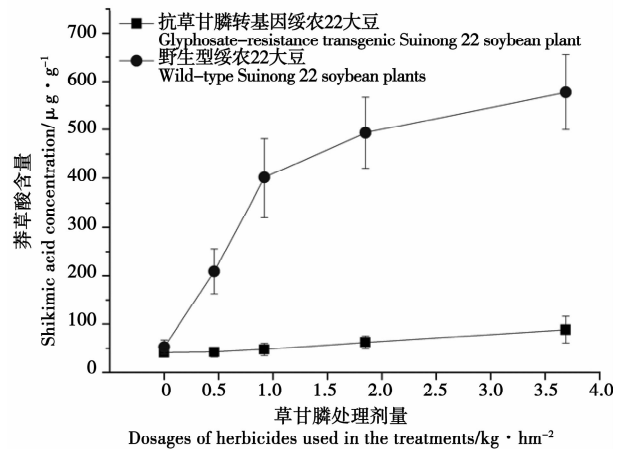


图 7 喷药后两种大豆第一复叶的莽草酸含量

Fig. 7 Shikimic acid content of the first trifoliolate leaf of two soybean varieties after spraying with herbicide

2.6 41% 草甘膦异丙胺盐水剂对大豆叶片光合速率的影响

由图 8 可知,随着除草剂剂量的增加,野生型绥

农 22 大豆和抗草甘膦转基因大豆叶片的光合速率均呈下降趋势,但在不同草甘膦异丙胺盐的使用剂量下,抗草甘膦转基因大豆的光合速率均高于野生型绥农 22 大豆,且差异显著。这说明经 PCR 验证后的抗草甘膦转基因大豆在草甘膦作用下相比野生型大豆有更高的活力。

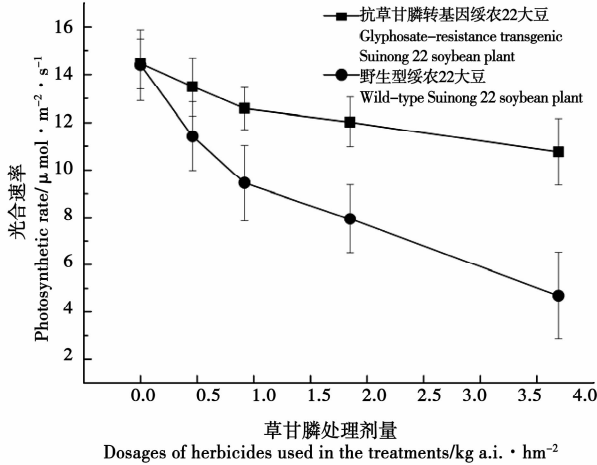


图 8 喷药后两种大豆第一复叶的光合速率

Fig. 8 Photosynthetic rate of the first trifoliolate leaf of two soybean varieties after spraying with herbicide

3 结论与讨论

本试验采用的“微创刷”法是一种较为新颖的转化方法,该方法在小麦的转化中证明了其可行性^[19]。从原理分析,“微创刷”法和电击转化法较为类似,大豆的生长点细胞的直径约为 $50 \mu\text{m}$ ^[20],“微创刷”的刷毛直径为 $14 \mu\text{m}$,在进行刺刷的过程中,可以有效在大豆生长点细胞形成创伤小孔而不完全破坏生长点细胞,从而使刷毛上的农杆菌液进行侵染,达到转化的目的。

经过“微创刷”法转化后的绥农 22 T_1 代大豆草甘膦抗性植株 PCR 检测出了目的基因条带,初步证明 *EPSPS* 基因成功转入大豆中。草甘膦可以专一性地抑制 *EPSPS* 的活性,导致植物体内 *EPSPS* 脱磷酸化底物莽草酸大量积累,从而阻断芳香族氨基酸的生物合成而使植物死亡^[21]。还有研究表明,草甘膦除抑制芳香氨基酸外还抑制叶绿素的生物合成^[22],叶片叶绿素含量可以反映叶片生理活性,光合速率是叶片光合性能的重要指标之一。所以本试验分别测定了草甘膦处理后转基因大豆与野生型绥农 22 大豆叶片的叶绿素含量、莽草酸质量分数、光合速率,抗草甘膦转基因大豆在这 3 个相关生理指标上相比野生型绥农 22 大豆均表现出对草甘膦具有一定的抗性,这表明 *EPSPS* 基因已经在大豆植株内表达。另外,在有效含量 $0.92 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 草甘膦异丙胺盐溶液处理后抗草甘膦转基因大豆的叶

绿素含量有小幅上升,这与原向阳等^[23]的研究结果类似,其变化可以看作是抗草甘膦转基因大豆对草甘膦的适应过程。

“微创刷”法与传统组织培养转化方法相比,打破了传统组织培养转化方法的局限,具有周期短、操作简便、基因型适应性强、移栽成活率高、缓苗快等特点,是一种简易、高效、易规模化大豆遗传转化技术体系。但是,“微创刷”法也有其缺点,如得到的 T_1 代大豆的萌发率只有 45.40%,存在种子活力低、染菌率高等特点。出现这一现象可能有以下几个原因,一是在 T_0 代操作过程中“微创刷”的刺刷对大豆造成了损伤,可能影响了其生理结构;二是此种方法 T_0 代大豆并不是正常的大田生长,由温室转移至大田的过程中光照、温度的突然变化也可能导致大豆的花期提前,影响到种子的活力。当然,该方法是否受基因型、农杆菌菌株、农杆菌浓度等因素的影响还有待进一步研究。尽管无论国内还是国外都对大豆的再生体系和遗传转化体系做了很多研究,但大豆遗传转化仍然是植物基因工程领域的挑战之一,大豆在组织培养过程中形成再生植株较困难,因此,探索新的转化方法来避开组织培养这一限制过程是十分有必要的。

参考文献

- [1] 钟金传, 吴文良, 夏友富. 转基因大豆发展及中国大豆产业对策[J]. 中国农业大学学报, 2005, 10(4): 43-50. (Zhong J Z, Wu W L, Xia Y F, et al. Development of genetically modified soybean and strategy for soybean industry of China[J]. Journal of China Agricultural University, 2005, 10(4): 43-50.)
- [2] 邱丽娟, 王昌陵, 周国安, 等. 大豆分子育种研究进展[J]. 中国农业科学, 2007, 40(11): 2418-2436. (Qiu L J, Wang C L, Zhou G A, et al. Soybean molecular breeding[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(11): 2418-2436.)
- [3] 杨桂英, 马绍宾, 何瀚. 大豆的遗传特点、品质改良与育种难点[J]. 贵州农业科学, 2002, 30(6): 57-60. (Yang G Y, Ma S B, He H. Genetic characters, quality amelioration and difficulties in breeding of soya [J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2002, 30(6): 57-60.)
- [4] Cahoon E B. Genetic enhancement of soybean oil for industrial uses: Prospects and challenges[J]. Ag Bio Forum, 2003, 6(1-2): 11-13.
- [5] 杜艳艳. 全球转基因作物商业化发展趋势[J]. 浙江农业科学, 2010(6): 1177-1181. (Du Y Y. Trends of global commercial development of GM crops[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2010(6): 1177-1181.)
- [6] 苏少泉. 草甘膦述评[J]. 农药, 2005, 44(4): 145-149. (SU S Q. Glyphosate review[J]. Chinese Journal of Pesticides, 2005, 44(4): 145-149.)
- [7] 余文哲, 杜艳艳. 美国主要转基因作物发展现状及启示[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(1): 129-133. (Yu W Z, Du Y Y. Status and enlightenment of major genetically engineered crops

- in the U. S. [J]. *China Biotechnology*, 2012, 32(1):129-133.)
- [8] 叶汉英,杨伟华. 转基因大豆的发展及其安全性评价[J]. 粮油加工, 2007(4): 45-48. (Ye H Y, Yang W H. The development and safety evaluation of transgenic soybean[J]. *Cereals and Oils Processing*, 2007(4): 45-48.)
- [9] 叶增民, 潘婕. 转基因大豆及其制品的安全性研究现状[J]. 生物技术通报, 2009(2): 26-28. (Ye Z M, Pan J. Current situation in safety of transgenic soybean and its products[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2009(2): 26-28.)
- [10] Owen M D K. Current use of transgenic herbicide-resistant soybean and corn in the USA[J]. XIVth International Plant Protection Congress, 1999, 7: 25-30.
- [11] 潘良文, 陈家华, 沈禹飞, 等. 进口转基因抗草甘膦油菜籽和大豆中 CP4-EPSPS 基因的检测比较研究[J]. 生物技术通讯, 2001, 21(3): 175-177, 207. (Pan L W, Chen J H, Shen Y F, et al. Detection comparison of CP4-EPSPS gene from genetically modified Roundup-Ready rapeseed and soybean[J]. *Letters in Biotechnology*, 2001, 21(3): 175-177, 207.)
- [12] 向文胜. 抗除草剂草甘膦转基因作物[J]. 东北农业大学学报, 1998, 29(1): 92-98. (Xiang W S. Glyphosate resistant transgenic crops [J]. *Journal of Northeast Agriculture University*, 1998, 29(1): 92-98.)
- [13] de Block M, Herrera-Estrella L, van Montagu M, et al. Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny[J]. *The EMBO Journal*, 1984, 3: 1681-1689.
- [14] Horsesh R B, Fraley R T, Rogers S G. Inheritance of functional foreign genes in plants[J]. *Science*, 1984, 223: 496-498.
- [15] 王振华, 杨德光, 张辉, 等. 大豆遗传转化技术在转基因大豆研究中的应用[J]. 生物技术通报, 2010(10): 60-66. (Wang Z H, Yang D G, Zhang H, et al. Research progress of transgene method in transgenic soybean (*Glycine max L.*) [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010(10): 60-66.)
- [16] Zhang Z, Guo Z, Shou H, et al. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation and routine recovery of transgenic soybean [J]. *Plant Genetic Engineering*, 2000(5): 88-94.
- [17] 王萍, 张淑珍, 李文滨, 等. 大豆不同基因型胚尖不定芽的诱导及对抗生素的敏感性[J]. 作物杂志, 2010(2): 50-53. (Wang P, Zhang S Z, Li W B, et al. Induction of adventitious shoots from embryonic tip of different soybean genotypes and their sensibility to antibiotics [J]. *Crop*, 2010(2): 50-53.)
- [18] 王罡, 季静, 郑丽红, 等. 口杯法便捷外植体灭菌的方法[P]. 中国; 201110202739.7. (Wang G, Ji J, Zheng L H, et al. A convenient method to sterilize explants use cups [P]. China; 201110202739.7.)
- [19] 张艳敏, 杨帆, 游颜杰, 等. 小麦茎生长点转化研究初报[J]. 华北农学报, 2005, 20(1): 17-22. (Zhang Y M, Yang F, You Y J, et al. In planta transformation of wheat apical meristem: A preliminary study [J]. *Acta Agriculturae Boreali-sinica*, 2005, 20(1): 17-22.)
- [20] 郭华, 罗军武, 周建平, 等. 几种油料的子叶细胞形态与主要化学成分分析[J]. 现代食品科技, 2006, 22(4): 33-36. (Guo H, Luo J W, Zhou J P, et al. The morphology of cotyledon cells and chemical components of some oil raw stuff [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2006, 22(4): 33-36.)
- [21] 原向阳, 郭平毅, 张丽光, 等. 不同时期喷施草甘膦对大豆生理指标的影响[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2009, 48(2): 90-94. (Yuan X Y, Guo P Y, Zhang L G, et al. Impact of spraying glyphosate on physiological index of soybean at different growth stages [J]. *Journal of Sun Yat-sen University (Natural Science)*, 2009, 48(2): 90-94.)
- [22] 陈虎保, 陈国海. 草甘膦的作用机理及部位[J]. 林业科技通讯, 1997(1): 23-25. (Chen H B, Chen G H. Mechanism and site of action of glyphosate [J]. *Forest Science and Technology*, 1997(1): 23-25.)
- [23] 原向阳, 郭平毅, 张丽光, 等. 第三复叶期喷施草甘膦对转基因大豆和普通大豆生理指标的影响[J]. 中国农业科学, 2008, 41(11): 3886-3892. (Yuan X Y, Guo P Y, Zhang L G, et al. Impact of glyphosate on physiological index of transgenic and conventional soybean on three-trifoliolate leaf stage [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(11): 3886-3892.)

(上接第 216 页)

- [8] Xiao H Y, Christopher A M, Hong M, et al. The *Arabidopsis* MALE MEIOCYTE DEATH1 gene encodes a PHD-finger protein that is required for male meiosis [J]. *Plant Cell*, 2003, 15: 1281-1295.
- [9] Wang Y J, Li Y D, Luo G Z, et al. Cloning and characterization of an HDZip I gene *GmHZ1* from soybean [J]. *Planta*, 2005, 221: 831-843.
- [10] Qin Y F, Li D D, Wu Y J, et al. Three cotton homeobox genes are preferentially expressed during early seedling development and in response to phytohormone signaling [J]. *Plant Cell Reporter*, 2010, 29: 1147-1156.
- [11] Ma H C, McMullen M D, Finer J J, et al. Identification of a homeobox-containing gene with enhanced expression during soybean (*Glycine max L.*) somatic embryo development [J]. *Plant Molecular Biology*, 1994, 24: 465-473.
- [12] Wang L Q, Ma H, Song L R, et al. Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of pre-harvest seed deterioration of soybean under high temperature and humidity stress [J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 75(7): 2109-2127.
- [13] Scofield S, Murray J A. *KNOX* gene function in plant stem cell niches [J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, 60: 929-946.
- [14] Hay A, Craft J, Tsiantis M, et al. Plant hormones and homeoboxes: Bridging the gap [J]. *Bioessays*, 2004, 26: 395-404.
- [15] 王洋, 柏锡. 大豆 NAC 基因家族生物信息学分析[J]. 大豆科学, 2014, 33(3): 325-333. (Wang Y, Bai X. Bioinformatics analysis of NAC gene family in *Glycine max L.* [J]. *Soybean Science*, 2014, 33(3): 325-333.)
- [16] 王志坤, 常健敏, 李丹丹, 等. 大豆 *GmWR1a* 基因克隆及生物信息学分析[J]. 东北农业大学学报, 2013, 44(7): 11-16. (Wang Z K, Chang J M, Li D D, et al. Cloning and bioinformatics analysis of *GmWR1a* in soybean [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2013, 44(7): 11-16.)
- [17] Schmutz J, Cannon S B, Schlueter J, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean [J]. *Nature*, 2010, 463(7278): 178-183, 120.