



蓝碧秀, 吴子恺, 王 凇, 等. *DGAT1-2* 基因在超高油玉米中的转化、表达及对油脂含量的影响[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(5): 43-47.

DGAT1-2 基因在超高油玉米中的转化、 表达及对油脂含量的影响

蓝碧秀^{1†}, 吴子恺^{1†}, 王 凇^{2,3}, 杨丽超³, 阳丽艳³, 何勇强³, 姜伯乐^{3,4}

(1 广西大学农学院, 广西南宁 530004; 2 桂林医学院生物技术学院, 广西桂林 541004;

3 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530004; 4 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西南宁 530004)

摘要:【目的】三酰甘油是油料作物油脂的主要成分,二酰基甘油酰基转移酶(DGAT)是催化三酰甘油合成唯一的关键酶和限速酶.探讨 *DGAT* 基因对超高油玉米 *Zea mays* L. 种子油分含量的影响,以进一步提高超高油玉米的含油率.【方法】采用花粉管通道法将 *DGAT1-2* 基因导入超高油玉米自交系,在盆栽条件下 5~6 叶期对 T₁ 代植株进行 PCR 检测筛选,Southern 杂交进一步验证.成熟时收获 10 株自交授粉的转基因植株(T₂ 代)籽粒,测籽粒平均含油率,通过 *t* 检验进行统计分析.【结果和结论】初步筛选获得假定转化植株 163 株,Southern 杂交获 29 株转基因植株,平均转化率为 1.44%.*t* 检验结果表明,10 株自交授粉的转基因植株(T₂)籽粒平均含油率比非转基因植株籽粒平均含油率提高了 6.19%,差异极显著($P < 0.01$).利用花粉管通道法导入 *DGAT1-2* 基因,可显著提高超高油玉米籽粒含油率,是一种切实有效提高超高油玉米含油量的新途径.

关键词:超高油玉米;花粉管通道法;*DGAT* 基因;油脂含量

中图分类号:S513

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2015)05-0043-05

Transformation and expression of *DGAT1-2* gene and its effect on the oil content of super-high oil corn

LAN Bixiu^{1†}, WU Zikai^{1†}, WANG Lin^{2,3}, YANG Lichao³, YANG Liyan³, HE Yongqiang³, JIANG Bole^{3,4}

(1 College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2 College of Biotechnology,

Guilin Medical University, Guilin 541004, China; 3 College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004,

China; 4 State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Nanning 530004, China)

Abstract:【Objective】Triacylglycerol (TAG) is the main oil ingredient of oil-bearing crops. Diacylglycerol acyltransferase (DGAT) is the sole crucial rate-limiting enzyme in the synthesis process of triacylglycerol. The effect of *DGAT* gene on the oil content of super-high oil corn was investigated to improve the oil content of super-high oil corn.【Method】*DGAT1-2* gene was transferred into super-high oil corn inbred lines by pollen-tube-pathway. Transgenic plants were obtained through screening with PCR among T₁ generation potted plants at the 5-6-leaf stage. Transgenic plants were verified by Southern-blotting. The average oil content of transgenic T₂ seeds was analyzed by the *t*-test.【Result and conclusion】One hundred and sixty-three putative transgenic plants were obtained through screening with PCR among a large number of T₁ generation potted plants at the 5-6-leaf stage. Twenty-nine transgenic plants were verified by Southern-blotting. The average transformation rate was 1.44%. The seeds of 10 transgenic T₂ plants were

收稿日期:2014-10-27 优先出版时间:2015-07-27

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20150727.1455.021.html>

作者简介:蓝碧秀(1970—),女,博士,E-mail:lanbixiu@126.com;吴子恺(1942—),男,教授,E-mail:wuzikai@gxu.edu.cn;

†同等贡献;通信作者:姜伯乐(1971—),男,研究员,E-mail:jbl1971@gxu.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(31260443);广西自然科学基金(2013GXNSFAA019097,2013GXNSFBA019088)

harvested by self-pollination. The average oil content of transgenic T_2 seeds was significantly higher than that of the non-transgenic plants by the t -test ($P < 0.01$), with the increase rate being 6.19%. The results provide a new practical and effective approach to improve the oil content of super high oil corn.

Key words: super-high oil corn; pollen-tube-pathway; *DGAT* gene; oil content

玉米 *Zea mays* L. 是我国第一大粮食作物、主要饲料作物和重要工业原料. 高油玉米是 20 世纪人工创造的玉米新类型, 其营养品质和经济价值居禾谷类作物之首^[1]. 开发探索高油玉米的遗传育种, 尤其是寻找、选育高油玉米新型种质是未来培育特种玉米的重要方向, 也将在调整国内农业种植结构中起着重要作用^[2]. 微胚乳超高油玉米是吴子恺^[3] 选育出的一种新型超高油玉米, 其特性是玉米种子成熟时籽粒油脂含量超过 20%, 胚/种子干质量比 $\geq 40\%$, 能够直接用来榨油. 由于玉米籽粒的营养主要集中在胚上, 因此以大胚为显著特征的特征微胚乳超高油玉米除榨取玉米油之外, 进行深加工提取其他营养物质和开发出相应的功能性新型食品的市场前景极为广阔^[4]. 三酰甘油 (Triacylglycerol, TAG) 是油料作物油脂的主要成分. 二酰基甘油酰基转移酶 (Diacylglycerol acyltransferase, DGAT) 是催化三酰甘油合成最后一步反应的酶, 也是这一合成过程中唯一的关键酶和限速酶^[5-11]. Zheng 等^[12] 在高油玉米中定位了 1 个能够调节种子油分含量和油酸含量的主效高油 QTL (*qHO6*), 它所编码的基因是乙酰辅酶 A: *DGAT1-2* 基因编码蛋白是决定玉米种子油脂含量的关键酶. 本研究采用花粉管通道法将 *DGAT1-2* 基因导入超高油玉米自交系, 探讨 *DGAT1-2* 基因在超高油玉米中的超量表达对玉米种子油脂含量的影响, 为进一步提高超高油玉米的含油率寻找新途径.

1 材料与方 法

1.1 材 料

超高油玉米自交系、大肠埃希菌 *Escherichia coli* 菌株 DH5 α 等相关菌株、植物表达载体 pBI121D 等相关质粒由亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室 (广西大学) 提供. 植物表达载体 pBI121D 含 *DGAT1-2* 目的基因, 带有花椰菜花叶病毒 35S 启动子 (CaMV 35S Promoter)、胭脂碱启动子 (NOS-Promoter)、胭脂碱终止子 (NOS-Terminator)、选择标记卡那霉素抗性基因 NPT II (Kan)、 β -葡糖醛酸酶报告基因 (β -glucuronidase, GUS). 载体图谱见图 1.

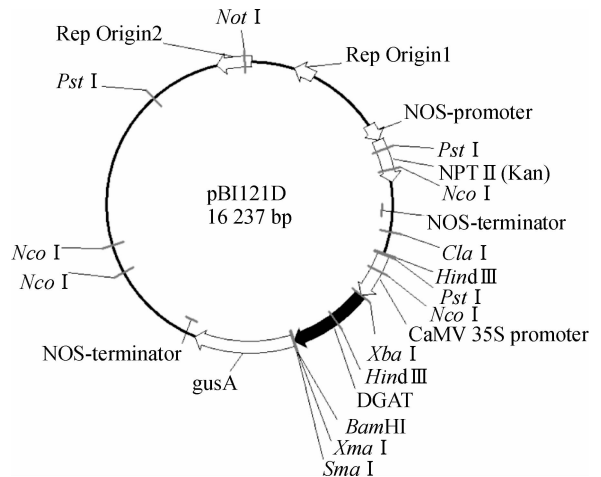


图 1 pBI121D 植物表达载体图谱

Fig. 1 The map of plant expression vector pBI121D

1.2 方 法

1.2.1 碱裂解法提取 pBI121D 质粒 DNA 挑取适量含 pBI121D 的 DH5 α 单菌落于含卡那霉素 (Kan) 10 mL 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 震荡培养过夜至 $D_{600\text{nm}} = 0.5$; 取过夜培养液 5 mL 接种于含 Kan 500 mL 的 LB 培养基的 1 L 锥形瓶中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 震荡培养培养 12 ~ 16 h; 将 500 mL 菌液分次倒入 50 mL 离心管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 收集菌体; 将菌体均匀悬浮于 10 mL 提取液 I; 倒入 20 mL 提取液 II, 充分混和均匀后室温放置 5 ~ 10 min; 加入 15 mL 预冷的提取液 III, 充分混匀后冰上放置 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 把上清液转移至另一个 50 mL 离心管中; 倒入等体积异丙醇, 混和均匀, 室温下放置 30 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃去上清液, φ 为 70% 的乙醇溶液洗 DNA 沉淀 2 ~ 3 次, 室温倒置干燥, 然后溶于适当体积 1 \times TE. 用 ND-1000 分光光度计测定质粒的浓度, 以 1 \times SSC 溶液配制成质量浓度为 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 pBI121D 质粒溶液, 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用.

1.2.2 花粉管通道法转化超高油玉米 在开花期选取套袋自交授粉后 22、24、26 h 且抽丝期一致的超高油玉米自交系雌穗, 取下雌穗的纸袋后, 剪去距穗顶部 1 cm 以上的苞叶和花丝, 用移液枪将 pBI121D 质粒溶液 (500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 滴在切口处, 然后再套上纸袋, 挂好标记牌. 每穗滴注量均在 1 mL, 2 h 后重复

滴注 1 次,共 2 次,同时滴注不含 pBI121D 质粒的 $1 \times \text{SSC}$ 溶液作对照。

1.2.3 改良 CTAB 法提取玉米 DNA 于 5~6 叶期剪取叶片,每株约 300 mg 于 2 mL EP 管,液氮浸泡后振荡粉碎,加入 750 μL 65 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 CTAB 抽提缓冲液,再加入 30 μL φ 为 10% 的 PVP 液,最后于通风橱下加入 10 μL 的 β -巯基乙醇,颠倒混匀;60~65 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴保温 1 h,每隔 10 min 左右摇匀 1 次;水浴后,取出离心管,冷却至室温;通风橱下加入 800 μL 的苯酚+氯仿+异戊醇混和液(体积比 25:24:1),轻轻颠倒摇动约 10 min;12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,将 650 μL 上清液转至 1.5 mL 的灭菌离心管中;通风橱下加入 650 μL 的氯仿+异戊醇混合液(体积比 24:1),轻轻颠倒摇动约 10 min;12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,将 500 μL 上清液转至 1.5 mL 离心管中;加入 0.6~0.8 倍体积的异丙醇,颠倒摇匀,常温放置 30 min;12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取出离心管可见管底有白色沉淀出现,弃上清液;加 900 μL 预冷(-20 $^{\circ}\text{C}$)无水乙醇,轻轻混匀,置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱 1 h;12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,弃上清液;加 φ 为 70% 的乙醇溶液漂洗 1 次,弃上清液;DNA 沉淀干燥后,加入 200 μL $1 \times \text{TE}$ (pH 8.0,含 RNA 酶),置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

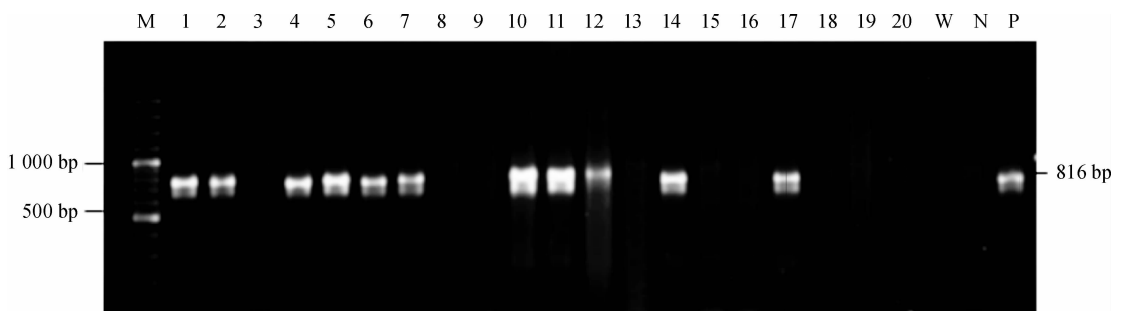
1.2.4 PCR 检测 由于 DGATI-2 基因来源于玉米,所以转基因验证利用标记抗性基因 *NPT II* (Kan) 设计引物和探针。根据 *NPT II* 的基因序列设计 PCR 引物 S1-F/S1-R (5'atgagccatattcaacggga3'/5'ttagaaaaactcatcgagca3') 和 S2-F/S2-R (5'atgctacgttcaagcatgtaatggtgg3'/5'taaaactgcctggcacagcaattgc3'), PCR 反应体系为:总体积 20 μL ,其中 φ 为 50% 甘油 2 μL ,10 \times Buffer 2 μL ,dNTP 1 μL ,引物 S2-F/S2-R 各 0.5 μL 、*Taq* 酶 0.5 μL 、DNA 模板 2 μL ,加 ddH₂O 至 20 μL 。反应条件 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,65 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 50 s 扩增 30 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min PCR 扩增。取 10 μL PCR 扩增产物在 12 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶上进行电泳分离,于凝胶成像系统观察和拍照。

1.2.5 Southern 杂交检测 利用上述选择标记抗性基因 *NPT II* 的引物 S2-F/S2-R 制备探针,依照高效 DNA 地高辛标记和检测试剂盒 II (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 试剂盒,购自 Roche) 的操作方法制备探针,检测探针标记效率。Southern 杂交操作步骤改良自 Ausubel 等^[13] 描述的方法:用 *Xba I/Hind III* 双酶切 PCR 检测呈阳性的转基因超油玉米总 DNA,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温,16 h;加入 NaAc (pH 5.2) 和无水乙醇,混匀,-80 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1 h,离心后,洗沉淀 2 次,沉淀干燥后,用适量 ddH₂O 溶解 DNA 沉淀;用 10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的琼脂糖凝胶电泳,60 V 电压 6 h;电泳后的凝胶经脱嘌呤溶液、变性液和中和液处理过后,搭纸桥转移 DNA 到尼龙膜上 8 h;将转移后的尼龙膜用紫外交联仪交联[强度值:1 200(即 120 000 microjoules $\cdot \text{cm}^{-2}$);时间:3 min]后,预杂交,42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min;加入 68 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 min 的含探针杂交溶液杂交,42 $^{\circ}\text{C}$ 8 h;在杂交炉中,杂交后的尼龙膜经洗膜液 I、洗膜液 II 和洗膜液 III 漂洗过后,进行免疫检测;然后往放在保鲜膜上的尼龙膜加 CSPD 封口,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 10 min;暗室压 X 射线 30 min,经显影和定影后,晾干 X 射线照片,观察杂交效果,相机照相并记录。

2 结果与分析

2.1 花粉管转化及转化植株的筛选

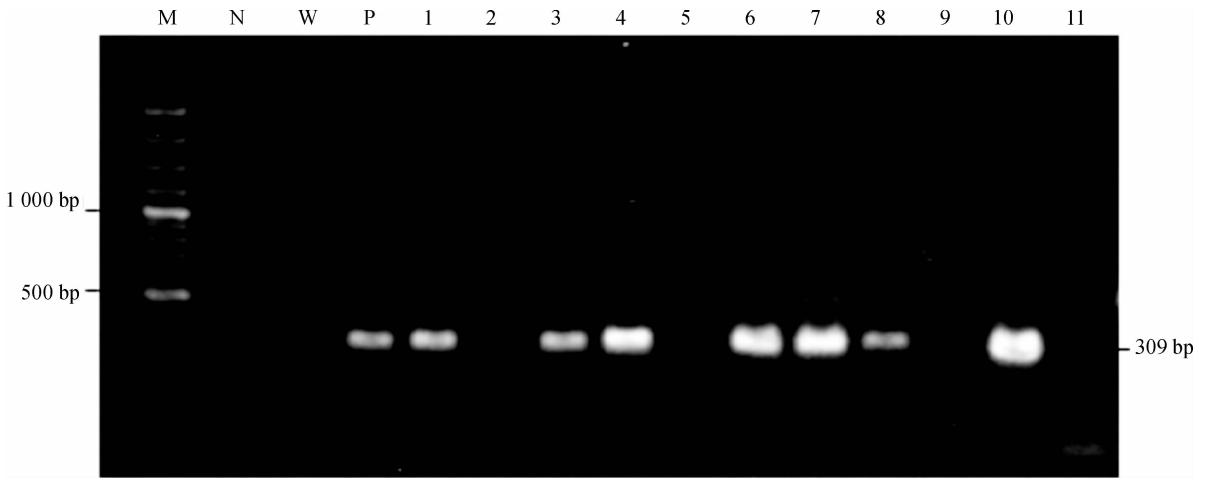
开花期利用花粉管通道法转化超油玉米自交系雌穗 300 苞,玉米籽粒成熟时收获 216 苞玉米,共获得 11 352 颗 T₁ 代超油玉米籽粒。次年盆栽种植 T₁ 代,于 5~6 叶期采用改良 CTAB 法快速小量大规模提取基因组 DNA,进行 PCR 检测,同时以非转基因超油玉米总 DNA、清水为负对照,以 pBI121D 质粒 DNA 为正对照,部分转化植株 PCR 检测结果见图 2 和图 3。形态不正常的变异类型 T₁ 代植株均淘汰掉,初步筛选获得形态正常的 PCR 呈阳性的假定转化 T₁ 代植株 163 株。



M:100 bp DNA 分子质量标记;1~20:转化植株总 DNA 为模板 PCR 产物;W:以水为模板 PCR 产物;N:以非转基因材料的超油玉米总 DNA 为模板 PCR 产物;P:以 pBI121D 质粒 DNA 为模板 PCR 产物。

图 2 利用引物 S1-F/S1-R PCR 验证部分转化植株

Fig. 2 PCR verification of some transgenic plants by primer S1-F/S1-R



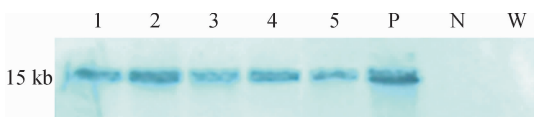
M: 100 bp DNA 分子质量标记; 1~11:转化植株总 DNA 为模板 PCR 产物; W:以水为模板 PCR 产物; N:以非转基因材料的超高油玉米总 DNA 为模板 PCR 产物; P:以 pBI121D 质粒 DNA 为模板 PCR 产物。

图3 利用引物 S2-F/S2-R PCR 验证部分转化植株

Fig. 3 PCR verification of some transgenic plants by primer S2-F/S2-R

2.2 Southern 杂交鉴定

提取 PCR 验证呈阳性的 163 棵转化植株的总 DNA,经 *Xba* I/*Hind* III 双酶切,用 Kan 引物 S2-F/S2-R 制备探针,进一步进行 Southern 杂交鉴定.图 4 呈现的是部分 PCR 呈阳性植株的 Southern 杂交鉴定结果(1~5 号植株来至同一转化事件).结果(图 4)显示,在检测的 163 株抗性植株中有 29 株呈阳性,含有特异杂交条带,且基本是单拷贝插入,揭示在这 29 株转基因植株中,*DGATI-2* 基因已整合到受体基因组中.



W: 水; P:正对照 pBI121D; N:非转基因植株; 1~5:PCR 呈阳性植株.

图4 Southern 杂交鉴定部分 PCR 呈阳性植株

Fig. 4 Southern blotting verification of partial positive transgenic plants by PCR

2.3 转基因超高油玉米种子的收获和含油率分析

29 株转基因超高油玉米植株与对照非转基因植株性状无明显差异.所收获的 341 颗自交授粉的 10 苞转基因超高油玉米 T_2 代籽粒和 306 颗自交授粉的 5 苞对照籽粒均用 MQ-20 型核磁共振仪(德国 Bruker 公司)直接测定油脂含量.将全部转基因植株与非转基因植株平均含油率进行 *t* 检验分析,结果表明,转基因植株平均含油率(w)为 $25.027\% \pm 0.200\%$,非转基因植株平均含油率 $18.839\% \pm 0.887\%$.由于是盆栽种植,没能施放足够肥料,而且楼顶大棚种植温度过高,自交授粉后 1 个月植株就已枯萎,对照植株平均含油率显著低于其品种在大田种植的平均含油率(27% , $P < 0.01$),转基因植株平均含油率

比非转基因植株平均含油率显著提高了 6.19% ($P < 0.01$).

3 讨论

自 1983 年 Zhou 等^[14]将目的基因通过花粉管通道法转入棉花以来,对于该方法全球开展了许多研究工作.利用花粉管通道法,当代就可以获得转基因种子,然后对转基因后代进行筛选,从而得到带有目的基因片段的转基因植株^[15].花粉管通道法不用建成分化再生、原生质体培养及愈伤组织诱导等组织培养体系,也不受基因型的制约,能够选择任意品种作为受体导入目的基因.这项技术操作起来简单快捷,容易掌握;所用成本低廉,无需太多的仪器设备,经济实用,易于操作大规模基因转化.花粉管通道法的缺点是受授粉时间限制,大片段的外源 DNA 很难转化,并且转基因后代会产生很多变异类型^[16].本研究按 10 d 种植 1 批玉米共种植了 3 批,错开玉米的开花时间,延长了授粉时间 1 个月.然后采用花粉管通道法将 *DGATI-2* 基因导入超高油玉米自交系,经 PCR 验证及 Southern 杂交鉴定,*DGATI-2* 基因已整合到受体基因组中.统计分析证明转基因超高油玉米 T_2 种子平均含油率比非转基因植株平均含油率得到极显著提高.说明应用这种方法可以有效地进行超高油玉米 *DGATI-2* 基因的遗传转化并能使 *DGATI-2* 基因成功超量表达,是一种切实有效提高玉米含油率的新途径.

花粉管通道法所具有的种种优势众所周知,在玉米自交系转基因育种中得到了越来越普遍的应用^[17-20],制约其应用的瓶颈是其转化效率低.花粉管通道法一般转化率为 $1.0\% \sim 10.0\%$ ^[16],本研究花

粉管通道法转化率较低,仅为1.44%。花粉管通道法转化率可能与外源DNA片段的长短、纯度、浓度、导入时间、玉米的基因型和导入时的天气情况有关。要提高花粉管通道法的转化率,有待于今后更深入地研究。除此之外,花粉管通道在玉米授粉后形成的生理机制、最佳转化外源DNA的时间以及可能产生的转基因后代变异等,还没有得到完全解决,这些问题在一定程度上限制了花粉管通道法的发展。未来,可以进一步结合分子育种技术的理论和应用研究,充分发挥花粉管通道法简单便捷快速实用的优势,使玉米育种水平进一步提高。

本研究采用PCR进行转化植株的筛选,没有采用卡那霉素筛选。因为超高油玉米籽粒表皮皱缩不易彻底灭菌,组培法容易长菌发霉。盆栽法卡那霉素质量浓度 $1\ 500\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时才达到70%左右的白化率。由于超高油玉米对卡那霉素的抗性较大,因此可以考虑用其他抗生素对其转化种子进行筛选。采用PCR检测转化植株,虽然较为繁琐,增加许多工作量,但结合改良CTAB法快速小量大规模提取超高油玉米基因组DNA,大大提高了超高油玉米大规模群体基因型筛选和研究的工作效率,能在苗期及时筛选出阳性转化植株,不影响后期试验工作。

本研究检测的自交授粉的转基因超高油玉米 T_2 代籽粒平均含油率比对照非转基因植株平均含油率提高6.19%,差异极显著。尽管 T_2 籽粒是分离的,所获结果至少3/4来源于转基因玉米,说明转DGAT基因能够显著提高玉米籽粒含油率,是一种切实有效提高玉米含油量的新途径。关于转DGAT基因对于玉米含油量的提高程度,还需进一步检测后代纯合系的玉米籽粒含油率。

致谢:感谢中国农业科学院生物技术研究所徐荣旗博士和广西大学生命科学与技术学院李有志博士对于论文的修改和指导!

参考文献:

- [1] 戴忠民,郑延海,李华,等.高油玉米育种的研究进展[J].河南职业技术学院学报,2004(3):25-27.
- [2] 林必博,周济铭,党占平,等.高油玉米品质研究进展[J].山西农业科学,2014,42(10):1144-1147.
- [3] 吴子恺.新型超高油玉米种质的选育[J].作物学报,2004,30(8):739-744.
- [4] 戴罗杰,郭春雨,李飞宇,等.微胚乳超高油玉米的研究进展[J].安徽农业科学,2009,37(19):8925-8927.
- [5] CASES S, SMITH S J, ZHENG Yaowu, et al. Identification of a gene encoding an acyl CoA: Diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(22):13018-13023.
- [6] LARDIZABAL K D, MAI J T, WAGNER N W, et al. DGAT2 is a new diacylglycerol acyltransferase gene family: Purification, cloning and expression in insect cells of two polypeptides from *Mortierella ramanniana* with diacylglycerol acyltransferase activity[J]. J Biol Chem, 2001, 276(42):38862-38869.
- [7] MEEGALLA R L, BILLHEIMER J T, CHENG Dong. Concerted elevation of acyl-coenzyme A: Diacylglycerol acyltransferase (DGAT) activity through independent stimulation of mRNA expression of DGAT1 and DGAT2 by carbohydrate and insulin[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 298(3):317-323.
- [8] YU Yihao, GINSBERG H N. The role of acyl-CoA: Diacylglycerol acyltransferase (DGAT) in energy metabolism[J]. Ann Med, 2004, 36(4):252-261.
- [9] 唐桂英,柳展基,单雷,等.二酰基甘油酰基转移酶(DGAT)研究进展[J].中国油料作物学报,2010,32(2):320-328.
- [10] 刘凯,江泽鹏,叶航,等.油茶DGAT1基因植物表达载体的构建[J].林业科技开发,2014(1):92-94.
- [11] 李书霞.玉米和棉花DGAT基因家族的全基因组分析[D].杭州:浙江大学,2014.
- [12] ZHENG P, ALLEN W B, ROESLER K, et al. A phenylalanine in DGAT is a key determinant of oil content and composition in maize[J]. Nat Genet, 2008, 40(3):367-373.
- [13] AUSUBEL F M, BRENT R, KINGSTON R E, et al. Short Protocols in Molecular Biology[M]. 5ed. New York: John Wiley and Sons, Inc., 2002:32-37.
- [14] ZHOU Guangyu, WENG Jian, ZENG Yishen, et al. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos[J]. Meth Enzymol, 1983, 101:433-481.
- [15] 王秀芹,刘希桂,曲建平,等.农杆菌介导的玉米转基因研究进展[J].安徽农业科学,2006,34(18):4546-4548.
- [16] 王关林,方宏筠.植物基因工程[M].2版.北京:科学出版社,2002:481-496.
- [17] 于海波,张玲.转基因玉米的研究进展[J].玉米科学,2011,19(5):64-66.
- [18] 董春水,才卓.现代玉米育种技术研究进展与前瞻[J].玉米科学,2012,20(1):1-9.
- [19] 刘小丹,李淑华,徐国良,等.转基因玉米育种研究进展[J].玉米科学,2012,20(6):1-8.
- [20] 任魁.玉米育种技术研究进展探析[J].福建农业,2014(10):101.

【责任编辑 周志红】