

农杆菌介导大豆遗传转化技术的研究进展

于洋, 侯文胜, 韩天富

(中国农业科学院作物科学研究所, 国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京 100081)

摘要:农杆菌介导是大豆遗传转化的主要手段。该文从受体基因型及外植体选择、菌株筛选及载体改造、标记基因选用和添加剂应用等方面,介绍了近年来对农杆菌介导大豆遗传转化方法所做的改进,分析了存在问题,展望了近期发展方向。

关键词:大豆;农杆菌介导;转基因

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2010)04-0696-06

Approaches to *Agrobacterium*-mediated Transformation in Soybean

YU Yang, HOU Wen-sheng, HAN Tian-fu

(The National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement (NFCRI), Institute of Crop Science, The Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Genetic transformation of soybean (*Glycine max* (L) Merr.) depends mainly on *Agrobacterium* mediation system.

In this review, the authors introduced the modifications of the technical procedures in this system including the selection of genotypes, explants, strains and makers, plasmid reconstruction, and application of additive agents, etc. We analyzed the disadvantages of this system and took an outlook for the improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation system in soybean in the near future as well.

Key words: Soybean; *Agrobacterium*-mediated; Transformation

自1988年Hinchee等^[1]和McCabe等^[2]率先获得转基因大豆植株以来,转基因技术逐步成为大豆分子育种和基因功能研究的重要手段,转基因大豆品种选育和产业化取得了突破性进展。目前,转基因大豆是应用面积最大的转基因作物,2009年种植面积达到 $6.92 \times 10^7 \text{ hm}^2$,占全球转基因作物种植面积的52%,占大豆种植面积的77%^[3]。

与其它转基因技术相比,农杆菌介导遗传转化系统具有拷贝数低、遗传稳定、基因沉默现象少和成本低等优点,但农杆菌介导大豆遗传转化的频率却一直偏低^[4]。近年来,随着农杆菌介导植物遗传转化的原理日渐清晰,不少研究者对大豆农杆菌介导遗传转化系统进行了改进,使其成为大豆遗传转化的基本方法。现结合农杆菌遗传转化的原理,对该领域的新进展做简要归纳,并对相关问题进行讨论和展望。

1 农杆菌介导植物细胞转化的原理

根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) (以下

简称农杆菌)属于根瘤菌科、农杆菌属,在土壤中普遍存在,其突出特点是可诱导大部分双子叶植物及部分单子叶植物产生冠瘿瘤。农杆菌中决定冠瘿瘤产生的质粒为Ti质粒,天然的Ti质粒由T-DNA区、Vir区、Con区和Ori区4部分组成。T-DNA两端分别为左边界(LB)和右边界(RB),大小均为25bp。T-DNA区内有生长素合成基因、细胞分裂素合成基因和冠瘿碱合成基因,对冠瘿瘤形成起关键作用,而在进行植物遗传转化时,这些基因将被去除,并代之以转化目的基因。T-DNA区在Vir区蛋白作用下分别在左、右边界产生切口,进而以单链形式将整个T-DNA区(含目的基因)运送至植物组织,并最终完成整合过程(图1)。Vir区基因表达产物对整个转化过程起决定性作用。目前已发现有10余种Vir区基因表达产物参与T-DNA的转移过程^[5]。

近年研究发现,植物创伤产生的酚类化合物,特别是乙酰丁香酮(AS),是遗传转化过程中的主要诱导物质。此外,低 PO_4^{3-} 浓度和低pH值的侵染环

收稿日期:2010-05-04

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项资助项目(2008ZX08004-001,2008ZX08010-004-004);农业部财政部现代农业产业技术体系建设专项资助项目(nyeytx-004)。

第一作者简介:于洋(1984-),男,在读硕士,从事大豆遗传转化研究。E-mail: yuyangff@hotmail.com。

通讯作者:韩天富,博士,研究员。E-mail: hantf@mail.caas.net.cn。

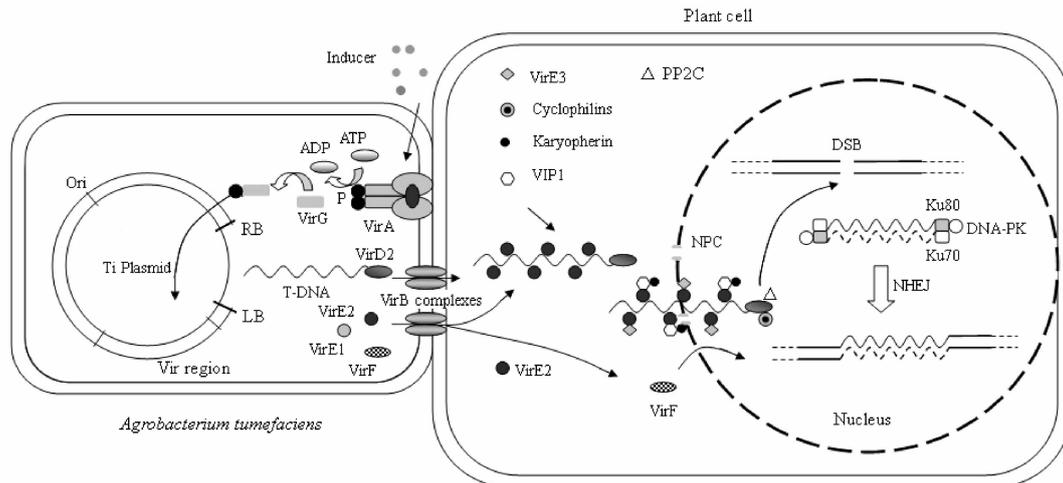


图1 农杆菌介导的植物细胞转化示意图

Fig. 1 Schematic diagram of *Agrobacterium*-mediated transformation in plant cell

境也有利于转化。通过诱导, VirA 蛋白可将 VirG 蛋白进行磷酸化修饰,进而激活 Vir 区基因的表达。VirB 蛋白群和 VirD4 形成的 T4SS 系统可形成跨膜通道,为 VirD2-T-DNA 以及包括 VirE2 和 VirF 蛋白在内的其它蛋白的细胞间运输提供通道。VirD2 可识别 T-DNA 的左、右边界序列并在边界序列产生切口,结合到单链 DNA 5'端,在运输和核定位等过程中行使重要作用^[6]。VirE2 是 T-DNA 单链结合蛋白,起到稳定 T-DNA 单链结构的作用,并在核定位中发挥一定功能。VirE1 对 VirE2 功能的发挥起辅助作用^[7]。

VirD2 在 T-DNA 复合体进入植物细胞后可发挥核定位功能, T-DNA 复合体通过 VIP1 蛋白与核定位蛋白复合体 Karyopherin α/β 互作完成核定位过程。PP2C 通过去磷酸作用,在此过程中起调节作用^[8]。Cyclophilin 作为一种与蛋白成熟过程相关的蛋白,在核定位过程中可与 VirD2 蛋白互作,但机制尚不清楚。核定位 T-DNA 复合体进入植物细胞核后,在 VirF 的作用下通过形成 Cullin/ASK1/VirF 复合体,完成对复合体的卸载^[9]。单链 DNA 通过互补链的合成以双链形式进行整合,整合过程主要通过非同源重组(NHEJ)形式完成。整合过程既具有随机性也具有偏好性,双链 DNA 在 Ku70/Ku80 和 DNA-PK 的作用下,在植物基因组双链缺口(DSB)部分进行整合^[10]。

2 农杆菌介导大豆遗传转化系统的改进

农杆菌介导大豆遗传转化系统受到多种因素的影响。通过对这些影响因素的深入研究,有利于提高转化系统的稳定性和转化效率,实现对转化体系的优化和改良。

2.1 受体基因型筛选

农杆菌介导的植物遗传转化,是农杆菌和受体植物相互作用的过程^[11]。受体材料不仅必须具有农杆菌易感性,还需有良好的再生能力。大量的研究表明,不同大豆基因型不但在转化效率和再生能力上存在很大差异,而且要求不同的转化条件,如灭菌时间、发芽时间、共培养时间、筛选剂量等。根据不同基因型的特点,在转化系统建立和优化的过程中,需要考虑这些因素带来的影响并及时进行调整。

在大豆遗传转化研究中,研究人员筛选出一些适于转化的大面积推广品种,如 Jack、Williams 82、Peking 等。

2.2 外植体选择

大豆农杆菌介导遗传转化常用的外植体有子叶节、体细胞胚、胚尖、器官愈伤组织以及幼嫩种子、下胚轴、初生叶基等。

2.2.1 子叶节 在以器官再生途径为基础的大豆转化体系中,子叶节是最常用的外植体^[12]。种子经氯气灭菌、发芽后,在距子叶节 3~5 mm 处将下胚轴切去,去除胚芽并对子叶节部位实施创伤处理后进行侵染。常用的方法有直接侵染、划伤后侵染及超声波介导法等,外植体共培养 3~5 d 后转入筛选、诱导阶段。经过筛选的外植体转入芽伸长阶段并保持适当的低浓度筛选剂量,将伸长的芽转入生根培养基诱导生根,筛选获得转基因再生植株。

子叶节转化体系具有操作简便、外植体获得不受季节限制、操作周期较短等特点,是目前使用最为广泛的转化方法,但该方法也具有一定的局限性,如子叶节划伤技术不好把握、再生植株中嵌合体比例偏高等。

2.2.2 体细胞胚 体细胞胚再生体系的简要步骤是,先用70%酒精对未成熟豆荚浸泡灭菌,或用次氯酸钠结合酒精短时浸泡灭菌,选取理想的未成熟籽粒用灭菌水多次漂洗。处理后进行农杆菌侵染或超声波辅助侵染,共培养后再经多次筛选继代,可获得大量的体细胞胚,体细胞胚可进一步形成转基因再生植株。

体细胞胚再生途径具有操作简便、转化嵌合体比例低等优点。该方法既可利用农杆菌介导进行遗传转化,也可利用基因枪进行转基因操作^[13]。其缺点是受基因型和取材季节限制较大,且对外植体质量要求较高,从而在一定程度上限制了这种转化方法的应用。

2.2.3 胚尖分生组织 胚尖转化体系以大豆初生胚尖分生组织作为转化受体^[14],既可借助基因枪轰击进行转化,也可通过农杆菌介导。在农杆菌介导的转化过程中,籽粒采取氯气灭菌,经浸泡后直接剥离出胚、去掉初生幼叶进行培养获取外植体。可通过直接侵染、创伤侵染、超声波辅助侵染等方法对获得的外植体进行农杆菌侵染,共培养后转入筛选培养基进行筛选,继而进行再生芽的诱导、伸长、生根,获得转基因再生植株。

胚尖转化系统具有取材便捷、筛选方便、转化周期短等特点,适合大规模转化,但仍难避免转化再生植株嵌合体的问题,理想外植体的获取也存在较大技术难度。在实际操作中,转化系统受大豆基因型和种子活力影响明显。

2.2.4 器官愈伤组织 目前在大豆中尚难通过愈伤组织进行植株再生。最近,研究人员利用一类特殊的愈伤组织进行大豆遗传转化和植株再生获得成功,从而建立了器官愈伤组织转化体系^[15]。该体系以去除腋芽的初生叶节或子叶节为外植体,诱导器官愈伤组织,再利用菌液对愈伤组织进行侵染,经共培养、恢复培养后,进行筛选和芽诱导,幼芽原基形成时将外植体分成小块,转入伸长培养基中进行进一步筛选,伸长、生根后获得转基因再生植株。

器官性愈伤组织转化系统通过对器官性愈伤组织的诱导,可获得大量高效受体细胞,从而扩大了外植体的选择范围,但器官性愈伤诱导的流程复杂,转化系统对愈伤组织状态要求严格,给转化带来了一定困难。

2.2.5 其它外植体 其它一些外植体系统也已在农杆菌介导的大豆转化中应用成功,如半种子法^[16]、下胚轴转化法^[17]、初生叶基转化法^[18]以及其它基于未成熟种子^[19]或其它未成熟器官^[20]的转

化方法,但实际应用较少。

2.3 菌株筛选与载体改造

大豆遗传转化中常用的菌株有 EHA101、EHA105、LBA4404、AGL1、GV3101,近年开发的新菌株有 LBA4404 (pSB1)^[21]、KAT23^[22]、K599 (NCPPB2659)^[23]和 KYRT1^[24]等。这些新菌株有的是经过改造的高毒菌株,如在 LBA4404 (pSB1) 中导入 pTiBo542 的 *VirG*、*VirC* 和 *VirB* 基因,以提高其侵染能力;有的可适应特定的转化系统,如通过对 Chry 5 改造而获得的 KYRT1,在体细胞胚再生转化体系中具有特殊优势。需要指出的是,尽管通过菌株改造可使菌株获得超强毒性,但这些菌株并不一定适用于所有转化系统,应根据具体情况选用。

较之共整合载体,二元载体系统以其高效、便捷等特点得到广泛应用。二元载体系统所使用的载体种类很多,主要有 pBI、pPZP、pBIN、pCAMBIA、pTF 和 pGPTV 等系列载体。这些载体经过诸如多克隆位点修饰、植物筛选标记替换、报告基因选择和外源基因插入等改造后,形成一系列能够更好地满足转化需要的衍生载体。

一些特殊序列会影响转化效果,如 OD 序列、TSS 序列等。将这些序列应用于载体改良,可在一定程度上提高 T-DNA 的转移效率^[25]。还有研究者利用特殊设计的载体,通过事先建立转基因修饰的受体株系、共转化一些特殊外源基因,如: *IPT*、*REP*、*WUS*、*BBM*、*LEC*、*MYB115* 和 *HTA1* 等来提高转化效率^[26-27]。

2.4 标记基因选用

转基因组织或细胞的筛选,是获得转基因植株的关键环节之一,良好的筛选策略可使转基因组织获得更强的竞争优势,减少嵌合体的形成,提高再生植株的比率。

大豆遗传转化过程中的筛选剂有抗生素、除草剂、代谢类似物、选择性碳源等,利用其对应的抗性(或敏感)基因作为筛选标记。目前在大豆遗传转化中常用的筛选剂有卡那霉素、潮霉素、草丁膦和草甘膦等。卡那霉素抗性基因(*nptII*)编码新霉素磷酸转移酶,因其成本低廉、适用范围较广,在大豆遗传转化中应用较早,但对不同受体基因型的筛选效果差别较大。潮霉素抗性基因(*hpt*)编码潮霉素磷酸转移酶。潮霉素在大豆遗传转化中的筛选效果较好^[28],但也有研究显示潮霉素会对一些植物和组织的生长产生抑制作用^[29]。

草丁膦抗性基因(*pat/bar*)和草甘膦抗性基因(*epsps*)均属于除草剂类筛选基因,前者编码草丁膦

乙酰转移酶,后者编码 5-烯醇式丙酮酸-3-磷酸莽草酸合酶。草丁膦因筛选效果明显,在大豆遗传转化中应用广泛^[30]。作为目前种植面积最大的转基因大豆品种的外源目的基因,*epsps* 也可作为筛选标记基因加以应用。

确定筛选剂类型后,需根据转化系统和实验要求采取不同的筛选剂量和筛选程序。

2.5 筛选标记基因的去 除

在植物遗传转化过程中,只有通过有效的筛选才能抑制非转化细胞和组织的生长,从而获得转化细胞和组织的增殖。有效的筛选标记和筛选策略也是减少再生嵌合体的基本条件。然而,在以育种应用为目的的转基因研究中,往往希望获得不含筛选标记基因的转基因植株,因而需要通过特殊手段去除标记基因。目前,获得不含筛选标记基因后代的方法主要有以下几种:

2.5.1 共转化 共转化是指分别将标记基因和目的基因导入外植体,再对后代进行分离筛选获得不含标记基因的转基因后代。农杆菌介导的共转化主要包括 2 种情况:(1)分别用含有目的基因和标记基因的 2 个菌株对同一目标外植体进行共转化;(2)将目的基因和筛选标记置于同一质粒的两段 T-DNA 中,以含有这种质粒的菌株进行共转化^[31]。在大豆中,可利用双 T-DNA 二元载体获得去除筛选标记基因的转基因后代^[32]。

2.5.2 转座子 利用转座子的转座活性可将转化后的标记基因进行移位,进而在分离后代中筛选不含筛选标记基因的材料。植物源转座子的种类很多,如玉米 I 类自主型转座子 *Ac*,金鱼草 I 类自主型转座子 *Tam*,拟南芥 I 类自主型转座子 *dTphl*,玉米 I 类非自主型转座子 *Ds*,水稻反转录转座子 *Tos17* 等。通过构建转座子筛选标记基因进行植物转化,可通过诱导转座子转座,达到分离筛选标记基因的目的。然而,由于转座子系统在不同植物受体中的转座频率具有明显差异、系统构建复杂、转化效率偏低,这种方法的实际应用还不多^[33]。

2.5.3 特异位点重组 该系统的基本原理是:利用重组酶切除携带特异重组序列的筛选标记基因,使筛选标记和目的基因分离。常用的重组系统有 Cre/loxP^[34]、FLP/FRT^[35] 和 R/RS 系统^[36]。特异重组系统便捷、高效,具有较好的应用前景。

2.6 添加剂应用

2.6.1 抑菌剂 在农杆菌介导的植物转化中,为防止农杆菌过度生长,需要使用农杆菌抑菌剂。大豆转化中常用的抑菌抗生素有卡那霉素、头孢噻

肟、羧苄青霉素、羟氨苄青霉素、万古霉素、替卡西林、克拉维酸、替卡西林钠/克拉维酸钾和阿莫西林/克拉维酸钾等。

合适的抑菌剂既要 对农杆菌具有良好的抑制作用,又不能对外植体生长产生较大影响。然而,抗生素类抑菌剂对外植体生长和分化的负面影响往往难以避免。为保证抑菌效果、减轻对外植体的影响,一般采用几种抑菌剂联合使用的方式,常见的联用组合有:头孢噻肟和羧苄青霉素,头孢噻肟和特美汀,头孢噻肟和替卡西林,头孢噻肟、特美汀和万古霉素等。普遍使用的头孢噻肟和羧苄青霉素组合对外植体生长仍有一定抑制作用^[37],可通过替换或配合使用替卡西林、特美汀和万古霉素等减轻其影响^[38]。

2.6.2 侵染相关添加剂 为提高转化效率,在农杆菌介导的大豆转化中广泛使用表面活性剂、酚类化合物和还原剂等,以提高侵染效果和外植体生长状态。

表面活性剂 Silwet L-77 可以增强农杆菌与受体间的接触和相互作用,在拟南芥蘸花转化法中应用较多,在农杆菌介导的豆科植物转化中也有成功案例^[39]。

酚类化合物是农杆菌毒性基因表达的重要诱因,乙酰丁香酮因其对毒性基因有较强诱导作用,已成为农杆菌介导植物遗传转化中活化菌液的重要添加剂。通过酚类化合物诱导毒性基因表达时,需要注意 pH 值、菌株和受体材料的特性等问题,以保证诱导效果^[40]。

在植物遗传转化过程中,为防止因外植体伤面防卫性褐化导致的细胞死亡,可添加使用生理还原剂类试剂,如硝酸银、抗坏血酸、L-半胱氨酸^[41]、硫代硫酸钠、二硫苏糖醇及其它硫醇类化合物^[42]。在大豆中,这些化合物的添加可显著改善外植体的生长状态、提高转化效率。

温度、湿度、光照和透气性等因素也会对菌液侵染效率、外植体生长状态、转基因组织再生等产生不同程度的影响,只有综合协调好这些因素,才能获得较高和稳定的转化效率。

3 存在问题与发展趋势

3.1 存在问题

尽管农杆菌介导的大豆遗传转化技术日趋成熟,但转化周期长、转化效率低、嵌合体比率高等瓶颈问题仍未彻底解决^[4]。因此,优化转化系统,提高转化效率,降低嵌合体比例仍将是农杆菌介导大

豆遗传转化技术改进的重要任务。

此外,农杆菌介导的植物转基因系统还存在其它一些问题,如载体骨架的整合、农杆菌基因组片段向植物基因组的平移、整合基因的不稳定性等。

3.2 发展趋势

近年来,随着转基因技术的发展,转基因的目标性和安全性日益受到重视,去除筛选标记、减少载体骨架整合、定点整合基因等技术已成为转基因技术研究的新热点,必对大豆遗传转化研究的发展产生重要影响。

3.2.1 减少载体骨架整合率 在某些情况下,T-DNA 的转移和整合带有部分载体骨架序列。虽然可以通过侧翼序列分析的办法筛选出不含载体骨架的转化事件,但这会导致后期工作量大幅度增加。近几年,研究人员建立了骨架整合标签法^[43]、骨架整合型抑制法^[44]、R/Rs 重组整合系统^[45]以及农杆菌基因组 T-DNA 整合技术^[46]等方法,可以降低载体骨架整合率,减少转基因后代筛选工作量。

3.2.2 外源基因的定点整合 在农杆菌介导的植物转化中,外源基因通过非同源重组形式整合,具有相对随机性,难以预测基因位置效应对转基因植株目的基因表达和非目标性状的影响。当外源基因的插入位点导致自身基因沉默或破坏其它基因功能时,这一问题尤为突出。近年开发出重组位点介导定点整合技术和定点酶切介导定点整合技术,有助于提高转基因的目的性和可控性。在重组位点介导的定点整合中,最常用的是 Cre/lox 重组整合系统^[47];在定点酶切系统中既有通过 DSBs 直接导入的方法^[48],也有通过锌指核酸酶介导的定点整合技术^[49]。

在未来一段时间内,随着转化效率的提高,无标记、无载体骨架、定点整合等技术及具有诱导性、发育期特异性和组织表达特异性的启动子^[50]将广泛应用于农杆菌介导的大豆遗传转化,使大豆转基因育种进入一个全新的时代。

参考文献

- [1] Hinchee M A W, Connor Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer[J]. *Nature Biotechnology*, 1988, 6: 915-922.
- [2] McCabe D E, Swain W F, Martinell B J, et al. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration[J]. *Nature Biotechnology*, 1988, 6: 923-926.
- [3] James C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009[R]. ISAAA Brief No. 39. ISAAA: Ithaca, NY, USA. 2009.
- [4] Somers D A, Samac D A, Olhoft P M. Recent advances in legume transformation[J]. *Plant Physiology*, 2003, 131: 892-899.
- [5] McCullen C A, Binns A N. *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2006, 22:101-27.
- [6] Gelvin S B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "genejockeying" tool[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, 67: 16-37.
- [7] Sunberg C, Meek L, Carroll K, et al. VirE1 protein mediates export of the single-stranded DNA-binding protein VirE2 from *Agrobacterium tumefaciens* into plant cells[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178:1207-1212.
- [8] Tao Y, Rao P K, Bhattacharjee S, et al. Expression of plant protein phosphatase 2C interferes with nuclear import of the *Agrobacterium* T-complex protein VirD2[J]. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101: 5164-5169.
- [9] Tzfira T, Vaidya M, Citovsky V. Involvement of targeted proteolysis in plant genetic transformation by *Agrobacterium*[J]. *Nature*, 2004, 431:87-92.
- [10] Lacroix B, Li J, Tzfira T, et al. Will you let me use your nucleus? How *Agrobacterium* gets its T-DNA expressed in the host plant cell[J]. *Canada Journal of Physiology and Pharmacology*, 2006, 84: 333-345.
- [11] Byrne M C, McDonnell R E, Wright M S, et al. Strain and cultivar specificity in the *Agrobacterium*-soybean interaction[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1987, 8:3-15.
- [12] Cho H J, Widholm J M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the legume *Astragalus sinicus* using kanamycin resistance selection and green fluorescent protein expression[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2002, 69: 251-258.
- [13] Martinell B J, Julson L S, Emler C A, et al. Soybean transformation method. United States Patent: US 7002058B2[P]. 2006-2-21.
- [14] Liu H-K, Yang C, Wei Z-M. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system[J]. *Planta*, 2004, 219: 1042-1049.
- [15] Hong H P, Zhang H, Olhoft P, et al. Organogenic callus as the target for plant regeneration and transformation via *Agrobacterium* in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2007, 43: 558-568.
- [16] Paz M, Martinez J C, Kalvig A B, et al. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation[J]. *Plant Cell Reports*, 2006, 25: 206-213.
- [17] Wang G, Xu Y. Hypocotyl-based *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max*) and application for RNA interference[J]. *Plant Cell Reports*, 2008, 27: 1177-1184.
- [18] Khan R. Method of transformation soybean. United States Patent: US 2004/0034889 A1[P]. 2004-2-19.
- [19] Hwang Y J, Dawson J, Sigareva M, et al. Transformation of immature soybean seeds through organogenesis. United States Patent: US 20080229447 [P]. 2008-9-18.
- [20] Zhong H, Que Q. Method for transforming soybean (*Glycine*

- max). United States Patent: US 20090023212[P]. 2009-1-22.
- [21] Ishida Y, Saito H, Ohta S, et al. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Nature Biotechnology*, 1996, 14: 745-750.
- [22] Yukawa K, Kaku H, Tanaka H, et al. Characterization and host range determination of soybean super virulent *Agrobacterium tumefaciens* KAT23 [J]. *Biosciences, Biotechnology and Biochemistry*, 2007, 71 (7): 1676-1682.
- [23] Mankin S L, Hill D S, Olhoft P M, et al. Disarming and sequencing of *Agrobacterium rhizogenes* strain K599 (NCPPB2659) plasmid pRi2659 [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2007, 43: 521-535.
- [24] Ko T S, Lee S, Farrand S K, et al. A partially disarmed vir helper plasmid, pKYRT1, in conjunction with 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid promotes emergence of regenerable transgenic somatic embryos from immature cotyledons of soybean [J]. *Planta*, 2004, 218(4): 536-41.
- [25] Larry G, Ye X. Use of multiple transformation enhancer sequences to improve plant transformation efficiency. United States Patent Application 20080064107 [P]. 2008-1-24.
- [26] Tenea G N, Spantzel J, Lee L-Y, et al. Overexpression of several *Arabidopsis* histone genes increases *Agrobacterium*-mediated transformation and transgene expression in plants [J]. *The Plant Cell*, 2009, 21: 3350-3367.
- [27] Wang X, Niu Q-W, Teng C, et al. Overexpression of PGA37/MYB118 and MYB115 promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis* [J]. *Cell Research*, 2009, 19(2): 224-35.
- [28] 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, 216: 723-735.
- [29] Brasileiro A C M. Neomicina Fosfotransferase II (NPT II). In: Brasileiro ACM, Carneiro VTC (eds). *Manual de Transformação Genética de Plantas* [M]. Brasília, Brazil: Embrapa-SPI/ Embrapa Cenargen, 1998, 143-154.
- [30] Zeng P, Vадnais A, Polacco Z C. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium* mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] [J]. *Plant Cell Reports*, 2004, 22: 478-482.
- [31] Afolabi A S, Worland B, Snape J, et al. Multiple T-DNA co-cultivation as a method of producing marker-free (clean gene) transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plant [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2005, 4: 531-540.
- [32] Xing A, Zhang Z, Sato S, et al. The use of two T-DNA binary system to drive marker-free transgenic soybeans [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2000, 36: 156-463.
- [33] Darbani B, Eimanifar A, Stewart C N, et al. Methods to produce marker-free transgenic plants [J]. *Biotechnology Journal*, 2007, 2: 83-90.
- [34] Hoess R H, Abremski K. The Cre/lox recombination system [J]. *Nucleic Acids and Molecular Biology*, 1990, 4: 99-109.
- [35] Huang L C, Wood E A, Cox M M. A bacterial model system for chromosomal targeting [J]. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19: 443-448.
- [36] Matsuzaki H, Nakajima R, Nishiyama J, et al. Chromosome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* by using site-specific recombination system of a yeast plasmid [J]. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172: 610-618.
- [37] Öz M T, Eyidogan F, Yucel M, et al. Optimized selection and regeneration conditions for *Agrobacterium* mediated transformation of chicken pea cotyledonary nodes [J]. *Pakistan Journal of Botany*, 2009, 41(4): 2043-2054.
- [38] Ling H-Q, Kriseleit D, Ganai M W. Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) [J]. *Plant Cell Reports*, 1998, 17: 843-847.
- [39] Kong F, Li J, Tan X, et al. A new time-saving transformation system for *Brassica napus* [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2009, 8 (11): 2497-2502.
- [40] Godwin I, Todd G, Ford-Lloyd B, et al. The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated transformation vary according to plant species [J]. *Plant Cell Reports*, 1991, 9: 671-675.
- [41] Olhoft P M, Somers D A. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells [J]. *Plant Cell Reports*, 2001, 20: 706-711.
- [42] Olhoft P M, Lin K, Galbraith J, et al. The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells [J]. *Plant Cell Reports*, 2001, 20: 731-737.
- [43] Richael C M, Kalyaeva M, Chretien R C, et al. Cytokinin vectors mediate marker-free and backbone-free plant transformation [J]. *Transgenic Research*, 2008, 17: 905-917.
- [44] Ye X, Williams E J, Shen J J, et al. Plant development inhibitory genes in binary vector backbone improve quality event efficiency in soybean transformation [J]. *Transgenic Research*, 2008, 17: 827-838.
- [45] Kondrák M, van der Meer I M, Bánfalvi Z. Generation of marker- and backbone-free transgenic potatoes by site-specific recombination and a bi-functional marker gene in a non-regular one-border *Agrobacterium* transformation vector [J]. *Transgenic Research*, 2006, 15: 729-737.
- [46] Oltmanns H, Frame B, Lee L-Y, et al. Generation of backbone-free, low transgene copy plants by launching T-DNA from the *Agrobacterium* chromosome [J]. *Plant Physiology*, 2010, 152: 1158-1166.
- [47] Vergunst A C, Jansen L E T, Hooykaas P J J. Site-specific integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Arabidopsis thaliana* mediated by Cre recombinase [J]. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26 (11): 2729-2734.
- [48] Tzfira T, Frankman L, Vaidya M et al. Site-specific integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA via double-stranded intermediates [J]. *Plant Physiology*, 2003, 133: 1011-1023.
- [49] Shukla V K, Doyon Y, Miller J C, et al. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases [J]. *Nature*, 2009, 459: 437-443.
- [50] Anne K I, Keith B R. Plant tissue/stage specific promoters for regulation expression of transgenes in plants. WO 1997027308 19970731 [P]. 1997-7-31.