

未成熟种子子叶节转化体系优化及转 *EPSPS/GAT* 基因大豆新材料创制

张宪丽<sup>1,2</sup>, 郭 勇<sup>2</sup>, 金龙国<sup>2</sup>, 张丽娟<sup>2</sup>, 邱丽娟<sup>1,2</sup>

(1. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 中国农业科学院 作物科学研究所/国家农作物基因资源与遗传改良重大科学工程/农业部北京大豆生物学重点实验室, 北京 100081)

**摘 要:**以丛生芽率为指标,将农杆菌介导的大豆未成熟种子子叶节转化与成熟种子转化体系进行比较,明确了诱导过程中草甘膦筛选浓度、未成熟种子生理状态,改进大豆外植体的获得方式并减少了组培环节,建立了未成熟种子子叶节转化体系。利用 Jack 黄熟后期的种子作为受体材料,在 15 mg·L<sup>-1</sup> 的草甘膦筛选浓度下获得了 9 株 PCR 检测阳性植株并且生长正常可育, T<sub>0</sub>代经测序及 Southern Blot 分析,进一步证明外源基因已整合进大豆基因组中,其中 2 个株系的 T<sub>1</sub>代植株经 PCR 检测符合 3:1 的分离比,且表型鉴定筛选出抗性转基因植株,为抗草甘膦转基因大豆育种提供了新材料。

**关键词:**大豆;未成熟种子;子叶节;遗传转化

**中图分类号:**S565. 1      **文献标识码:**A      **DOI:**10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2015. 02. 0199

Optimization of Immature Seed Cotyledon – node Transformation System and Development of Genetically Modified Soybean by Transformation of *EPSPS* and *GAT* genes

ZHANG Xian-li<sup>1,2</sup>, GUO Yong<sup>2</sup>, JIN Long-guo<sup>2</sup>, ZHANG Li-juan<sup>2</sup>, QIU Li-juan<sup>2</sup>

(1. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. The National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement (NFCRI) / MOA Key Lab of Soybean Biology (Beijing), Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** Simple and efficient genetic transformation systems are very important for breeding transgenic soybeans and performing functional genomics study. In order to develop a concise and highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation system in soybean, transformation methods using immature seeds and mature seeds were compared. The effect of different factors on the *Agrobacterium*-mediated transformation of immature seeds was investigated using the rate of resistant bud formation. These factors affecting transformation include selection pressure and the physiological state of the immature seeds. Finally, the *Agrobacterium*-mediated transformation system of immature seed was optimized. Nine transgenic plants were screened with 15 mg·L<sup>-1</sup> glyphosate and they grew normally and fertility. PCR-sequencing and Southern Blot analysis also showed that the foreign genes had been integrated into the genome of the T<sub>0</sub> individuals. PCR analysis of 2 lines from the T<sub>1</sub> generation also showed that the separation ratio fit 3:1. The glyphosate tolerant soybeans obtained in this study by phenotype identification provide new materials for breeding of transgenic soybean with glyphosate tolerance.

**Keywords:** Soybean; Immature seed; Cotyledonary node; Transformation

大豆[*Glycine max* (L.) Merrill]是一种在世界范围内广泛种植的作物,是人类生活中植物蛋白和脂肪的重要来源<sup>[1]</sup>。随着对大豆需求的不断增加,通过遗传转化来改善大豆的品质和产量已成为大豆研究的一个重要的方面<sup>[2]</sup>。目前在大豆中广泛使用的转化方法包括粒子轰击的胚胎发生途径和农杆菌介导的子叶节器官发生途径<sup>[3]</sup>。大豆子叶节通过器官发生途径获得再生植株是最方便和最有效的方法,但由于只有很少的细胞具有转化能力,从而导致最终的转化效率较低<sup>[4]</sup>。同时,外植体的生理状态不同也导致其对外界的应激能力和对农杆菌的感受状态不同。目前在大豆子叶节介

导的遗传转化研究中,主要还是以成熟大豆种子子叶节作为外植体开展遗传转化<sup>[5-8]</sup>,而关于未成熟子叶节再生系统的研究较少,大多是通过幼胚子叶来诱导形成体细胞胚后进行转化<sup>[9-11]</sup>。Franklin等<sup>[12]</sup>研究了不同激素对成熟和未成熟子叶节再生体系的影响,结果表明 3 mg·L<sup>-1</sup> 的 6-BA 与 1 mg·L<sup>-1</sup> 的噻苯隆联合使用时抗性丛生芽诱导效果最好;王卢平等<sup>[13]</sup>以冀豆 12 和中黄 13 为材料,研究了花后最佳取材时间并对不同时间的种子发育程度进行了描述;钟磊等<sup>[14]</sup>报道了冀豆 7 号在花后 60 d 取材,26℃ 共培养,光照 24 h 抗性芽诱导率最高。前人虽然报道了激素水平、取材时间、种子发育程

收稿日期:2014-05-16  
基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08004-001)。  
第一作者简介:张宪丽(1987-),女,硕士,主要从事大豆转基因研究。E-mail:zhang\_xianli2007@163.com。  
通讯作者:邱丽娟(1963-),女,研究员,博导,主要从事大豆基因资源挖掘与利用工作。E-mail:qulijuan@caas.cn。

度、共培养温度及光照时间对未成熟种子为外植体再生芽诱导的影响,但是对于影响遗传转化的因素仍缺乏系统的研究。

本研究以大豆品种中黄 10 号、中豆 32、Williams 82 和 Jack 为受体,在 16 h 光照/8 h 黑暗,24℃ 条件下共培养,1.67 mg·L<sup>-1</sup> 的 6-BA 诱导抗性芽,确定了影响转化效率的关键因素即诱导培养基中草甘膦筛选压力的临界浓度,并进一步阐明了农杆菌介导的未成熟大豆种子子叶节转化中种子取材时的最佳生理状态。通过这些环节的研究建立起了农杆菌介导的大豆未成熟种子子叶节转化体系,并对获得的转化植株 T<sub>0</sub> 及 T<sub>1</sub> 代进行分子及表型

鉴定,为大豆转基因研究中新的外植体来源及提高转化效率提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受体材料 以中黄 10 号、中豆 32、Williams82 和 Jack 四个大豆品种为受体。

1.1.2 菌株和载体 所用农杆菌菌株为 LBA4404,所用载体为含有草甘膦抗性基因 *EPSPS* 和草甘膦降解基因 *GAT* 的载体 pK-GE (图 1),由北京未名凯拓有限公司作物设计中心夏勉博士提供。

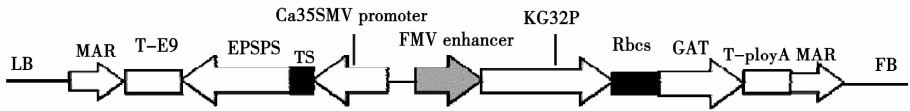


图 1 pK-GE 载体图

Fig. 1 The vector map of pK-GE

1.2 方法

1.2.1 工程菌的制备 在超净工作台上,用接种针从 LB 培养平板上挑取单菌落接种于 YEP 培养液中(含 50 mg·L<sup>-1</sup> 卡那霉素,50 mg·L<sup>-1</sup> 链霉素),于 28℃、220 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养过夜,再以 1/20 的比例转移至 YEP 培养液中重新活化,直到 OD<sub>600</sub> = 0.6 ~ 0.8。然后在 4℃、4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 收集菌体,重悬于共培养液中备用。

1.2.2 农杆菌介导的大豆遗传转化 未成熟种子的转化采用田间应季播种的大豆,待其鼓粒完全,选取豆荚,放入牛皮纸袋,4℃ 储存 2 d,用自来水冲洗 2 ~ 3 遍,75% 酒精表面消毒 1 min,5% 的次氯酸钠消毒 15 min,去掉豆荚,取出种子,剥去种皮,用无菌刀片在两片子叶之间纵向切开,得到两个外植体,在胚轴与子叶连接处切 3 ~ 4 刀。将制备好的外植体转移到备好的农杆菌菌液中,在 28℃ 光照培养箱侵染 30 min 并不时地轻微摇晃,然后将外植体置于铺有滤纸的共培养培养基(0.1 × B<sub>5</sub> 培养基 + 1.67 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.25 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> + 200 mmol·L<sup>-1</sup> AS)上,在 28℃ 培养箱 16 h 光照/8 h 暗培养培养 3 d。把外植体转移至诱导培养基中(B<sub>5</sub> 培养基 + 1.67 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 15 mg·L<sup>-1</sup> 草甘膦)14 d 继代 1 次,丛生芽在伸长培养基(MS 培养基 + B<sub>5</sub> 有机 + 50 mg·L<sup>-1</sup> Asp + 50 mg·L<sup>-1</sup> Glu + 0.3 mg·L<sup>-1</sup> IAA + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>)中诱导再生苗,伸长苗在生根培养基(MS 培养基 + B<sub>5</sub> 有机 + 50 mg·L<sup>-1</sup> Asp + 50 mg·L<sup>-1</sup> Glu)中诱导生根,然后移栽。成熟种子的转化在氯气灭菌后萌发 5 d 后用无菌水浸泡,按

照相同的方法转化,然后与未成熟种子子叶节法比较抗性丛生芽率。

1.2.3 草甘膦筛选浓度对丛生芽率的影响 以中黄 10 号作为受体材料,将制备好的外植体经过农杆菌侵染以及不经过农杆菌侵染(用共培养液代替农杆菌重悬液)共培养 2 d 后,转入草甘膦浓度分别为 5,10,15,20 和 25 mg·L<sup>-1</sup> 的诱导培养基中,诱导 14 d 后统计丛生芽率。

1.2.4 未成熟种子生理状态的选择 中黄 10 号、中豆 32、Williams 82 和 Jack 四个大豆品种为受体材料,外植体在 3 种状态下取材:一是绿熟后期,此时豆荚绿色、种皮绿色,种子已发育到最大体积;二是黄熟中期,豆荚已转黄绿色、种皮嫩黄色;三是黄熟后期<sup>[15]</sup>,豆荚为黄色、种皮呈深黄色并有一定程度的缩水,每个生理状态下每个品种制备 60 个外植体,以抗性芽率为指标进行统计分析。

1.2.5 转化植株的 PCR 检测和 Southern Blot 检测

用 CTAB 法提取植株基因组 DNA。用于扩增 *EPSPS* 基因的引物序列为 EPSPS-F: CAAATCCATTAC-CAACCGTGC 和 EPSPS-R: ACCACCATCAATCTC-GAAACG,扩增片段长度为 430 bp;用于扩增 *GAT* 基因的引物序列为 GAT-F: CTCAGACCAAACCAGC-CGATAG 和 GAT-R: GTGTCGAATACCTCTCCCTGCTC,扩增片段长度为 338 bp。PCR 反应体系为 20 μL,包括大豆基因组 DNA 50 ng, dNTP 200 μmol·L<sup>-1</sup>,上游、下游引物终浓度 5 μmol·L<sup>-1</sup>, *Taq* DNA 聚合酶 2 U。PCR 扩增程序为 94℃ 预变性 210 s;进入循环后 94℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,34 个循环;72℃ 延伸 8 min。扩增产物于 0.8% 琼脂

糖凝胶电泳,凝胶成像系统照相,并将扩增产物测序。

Southern Blot 检测按照 Mylab 公司的试剂盒制备 *GAT* 基因探针,用 *Dra* I 和 *Hind* III 酶切 40 μg 的样品,纯化之后用 0.5 × TBE 配制 0.8% 琼脂糖凝胶,在 45 V 电压下电泳,待溴酚蓝移动至胶块的2/3 处时停止电泳。Turboblotter 向下毛细管碱性转移法转膜,中和后预杂交 1 h,然后加入变性的探针杂交 16 h,洗膜显色后照相记录结果。

1.2.6 草甘膦抗性鉴定 当  $T_1$  代植株第 2 片三出复叶展开时,在待检测大豆叶片跨主叶脉画一圆圈作为标记,用移液枪取 1 μL 稀释 10 倍的农达原液点在圆圈内,以草甘膦处理未转化受体植株及草甘膦未处理转化植株作为对照,表型分为抗性植株(存活并生长)和敏感植株(死亡),统计并记录。

1.3 数据分析

利用 SAS 软件作比例适合性检验。数据计算

公式如下：  
丛生芽诱导率(%) = (丛生芽外植体数/接种外植体数) × 100。

2 结果与分析

2.1 未成熟种子与成熟种子两种子叶节转化体系的比较

无论是通过成熟种子萌发还是通过水浸泡的方式获得外植体都需要氯气(100 mL 次氯酸钠和 4 mL 盐酸)消毒种子表面 16 h,而用未成熟种子作为外植体只需要用次氯酸钠消毒豆荚 30 min,成熟种子培养基萌发需要 5 d,无菌水浸泡需要 6 ~ 12 h (表 1)。未成熟种子直接制备外植体省去了萌发或无菌水浸泡处理过程,并且消毒豆荚使种子保持了原有的活力,有利于提高抗性芽率。

表 1 不同来源的外植体转化体系比较

Table 1 Comparison of transformation systems using various explants

比较 Comparison	未成熟种子 Immature seeds	成熟种子萌发 Germinated mature seeds	成熟种子水浸泡 Soaked mature seeds
消毒试剂 Sterilization reagent	次氯酸钠 NaClO	氯气 Cl <sub>2</sub>	氯气 Cl <sub>2</sub>
消毒时间 Sterilization time	30 min	16 h	16 h
消毒方式 Sterilization method	豆荚 Pod	种子 Seed	种子 Seed
萌发 Germination	无 No	5 d	无 No

以中豆 32、中黄 10 号、Williams 82 和 Jack 为受体材料,每个体系每个品种处理外植体 100 个,比较农杆菌介导的大豆成熟种子无菌水浸泡和培养基萌发 5 d 两种子叶节转化系统与未成熟种子转化系

统的抗性丛生芽率。抗性丛生芽率在不同受体品种中表现出一致性,即未成熟种子 > 成熟种子,这表明未成熟种子转化体系丛生芽诱导率高于成熟种子两种转化体系。

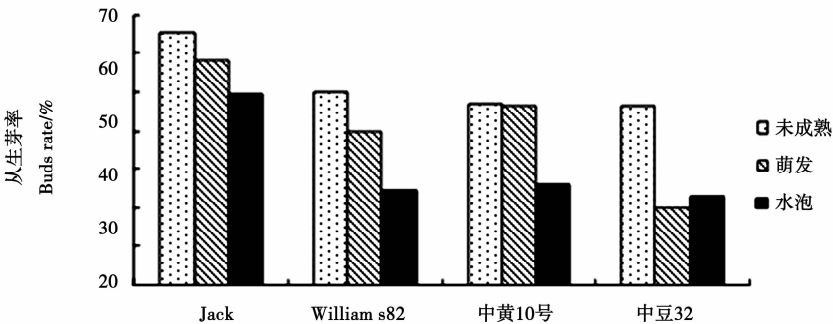


图 2 4 种基因型不同转化体系抗性丛生芽率比较

Fig. 2 Comparison of rate of resistant buds between different transformation systems about four genotypes

2.2 不同草甘膦浓度筛选

未转化外植体在不同的草甘膦浓度处理条件下诱导 7 d 时均没有长出明显的丛生芽,诱导 14 d 之后在草甘膦浓度为 5 和 10 mg · L<sup>-1</sup> 的低浓度培养基中,丛生芽率分别为 34.48% 和 22.22%,当草甘膦浓度达到 15 mg · L<sup>-1</sup> 及以上时均没有诱导出丛生

芽。转化外植体在 5 种筛选浓度下均能诱导出丛生芽,随着草甘膦浓度的增加,丛生芽诱导率降低,在筛选浓度为 15 mg · L<sup>-1</sup> 时丛生芽率仍达到 50% (图 3)。因此,本研究确定诱导过程的草甘膦筛选浓度为 15 mg · L<sup>-1</sup>。

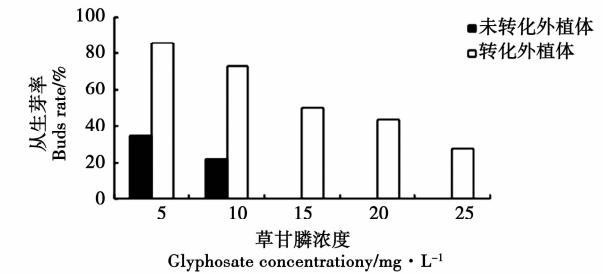


图3 不同草甘膦筛选浓度丛生芽率比较  
Fig. 3 Rate of bud formation under different screening concentration

2.3 未成熟种子生理状态对丛生芽诱导的影响

未成熟种子4个大豆品种的3个生理状态的外植体进行转化,其抗性芽诱导率表现出一致性,以外植体在黄熟后期的诱导率最高,其次是黄熟中期,绿熟后期诱导率最低(图5)。在黄熟后期生理状态下,中豆32、中黄10号、Williams82和Jack的丛生芽率分别为61%、67%、84%和98%,这表明未成熟种子在黄熟后期再生能力最高,大豆品种Jack丛生芽率最高。

2.4 农杆菌介导的未成熟种子子叶节遗传转化及检测

通过对大豆遗传转化体系的优化,本研究建立

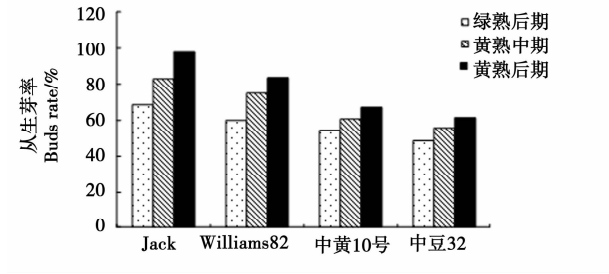


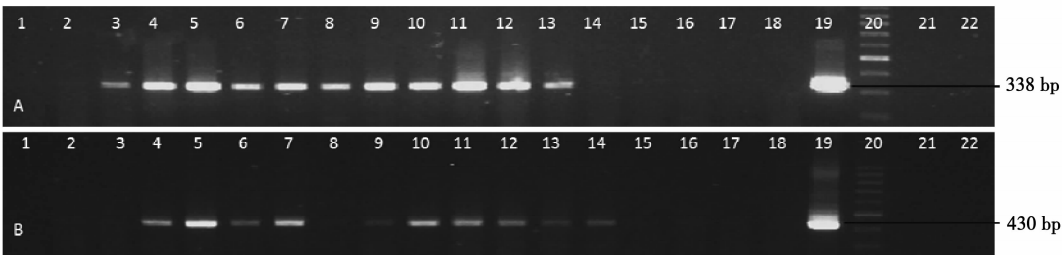
图4 4种基因型未成熟种子3种生理状态的抗性芽诱导率比较  
Fig. 4 Comparison of rate of resistant buds between development stage about four genotypes

了农杆菌介导的未成熟种子子叶节转化体系。基于这一系统,以大豆品种Jack为受体材料,在黄熟后期取材,共转化了266个外植体,获得 $T_0$ 代再生植株18个。对这些再生植株进行EPSPS和GAT基因的PCR检测,结果表明有9个再生植株中均能检测到这两个基因的目标片段(图6)。同时,对目标片段进行序列测定,证明与两个外源基因的已知序列相同。



A:绿熟后期;B:黄熟中期;C:黄熟后期。  
A: Later green ripening; B: Middle yellow ripening; C: Later yellow ripening.

图5 未成熟种子的不同生理状态  
Fig. 5 Development stages of immature seeds

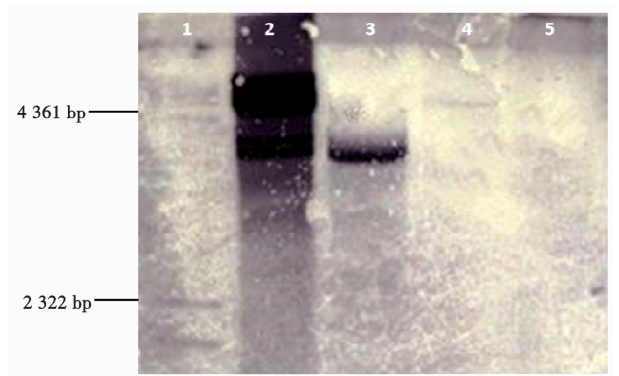


A:PCR检测GAT基因;B:PCR检测EPSPS基因;1~18: $T_0$ 代植株;19:质粒;20:Maker;21:水对照;22:阴性对照。  
A:The PCR of GAT; B:The PCR of EPSPS; 1-18:  $T_0$  plants; 19: plasmid; 20: Maker; 21: water control; 22: negative control.

图6 转化植株 $T_0$ 代植株PCR检测结果  
Fig. 6 PCR analysis of  $T_0$  plants

为了检测目的基因的拷贝数,对其中一个  $T_0$  代转基因植株进行 Southern Blot 检测(图 7),结果表明 *GAT* 基因已经整合到大豆基因组中,并且为单拷贝插入。3 个  $T_0$  植株后代个体用 PCR 检测 *GAT* 基因,其中 J1 和 J2 种子量较多,PCR 阳性和阴性个体分离比例经适合性检验符合 3:1(表 2)。

为了研究外源基因在转基因植株后代中的表型遗传,3 个株系的  $T_1$  代植株生长至第 2 个三出复叶时用草甘膦处理进行抗性鉴定。草甘膦处理后第 7 天调查,非转基因受体对照与 PCR 检测阴性植株及部分阳性植株因不抗草甘膦而死亡,抗感植株表型明显,分离比例符合 3:1(表 3)。



1: DNA Marker; 2: *Hind* III 酶切质粒; 3: *Dra* I 酶切样品; 4: *Hind* III 酶切样品; 5: *Dra* I 酶切阴性对照。

1: DNA Marker; 2: Plasmid digested with *Hind* III; 3: Transgenic plantlet digested with *Dra* I; 4: Transgenic plantlet digested with *Hind* III; 5: Non-transgenic plantlet digested with *Dra* I.

图 7 Southern Blot 检测结果

Fig. 7 Southern Blot analysis

表 2  $T_1$  代材料 PCR 检测分离鉴定

Table 2 Segregation analysis of  $T_1$  plants by PCR

事件 Events	$T_1$ 株数 $T_1$ plants	PCR 阳性 PCR positive	PCR 阴性 PCR negative	$\chi^2(3:1)$	$P(3:1)$
J1	49	35	14	0.3333	0.5637
J2	25	22	3	2.2533	0.1333
J3	13	7	6	—	—

$\chi^2_{0.05} = 3.841, \chi^2 < \chi^2_{0.05}$  符合 3:1;  $P > 0.05$  符合 3:1; J3 由于样本数较少未进行检验。

$\chi^2_{0.05} = 3.841, \chi^2 < \chi^2_{0.05}$  fit 3:1;  $P > 0.05$  fit 3:1; J3 not tested due to small sample size.

表 3  $T_1$  代材料草甘膦处理表型分离鉴定

Table 3 Segregation analysis of  $T_1$  transgenic plants by glyphosate treatment

事件 Events	$T_1$ 株数 $T_1$ plants	抗性植株 Resistant plants	敏感植株 Sensitive plants	$\chi^2(3:1)$	$P(3:1)$
J1	46	29	17	3.5072	0.0611
J2	22	14	8	1.5152	0.2184
J3	10	7	3	—	—

$\chi^2_{0.05} = 3.841, \chi^2 < \chi^2_{0.05}$  符合 3:1;  $P > 0.05$  符合 3:1; J3 由于样本数较少未进行检验。

$\chi^2_{0.05} = 3.841, \chi^2 < \chi^2_{0.05}$ ; J3 not tested due to small sample size.

3 结论与讨论

大豆作为一种较难转化的作物,不同的外植体、处理方法、筛选系统等都影响了转化效率。已有报道表明,种子活力与灭菌时间呈负相关,而种子活力与再生能力呈正相关<sup>[16]</sup>。以大豆未成熟种子作为外植体的子叶节转化体系是一种新型的转化体系<sup>[13]</sup>,带豆荚消毒保持了种子原有活力,其抗性丛生芽率显著地高于以成熟种子作为外植体的转化方式。未成熟种子可直接制备外植体,省去了培养基萌发及无菌水浸泡时间,因此更加快速、简便。

在农杆菌介导的未成熟种子子叶节转化系统中,不同发育程度的外植体的再生能力和对农杆菌的感受能力不同。本研究表明,未成熟种子外植体的生理状态对抗性芽的诱导具有显著影响,大豆未成熟种子最佳取材时间是在黄熟后期,即豆荚嫩黄,种皮深黄,未成熟种子轻微缩水的状态下获得的抗性芽率最高。本研究以 GUS 瞬时表达效率为指标,进一步验证了黄熟后期为最佳取材时间(未发表数据)。钟磊等<sup>[14]</sup>报道已经开始缩水变小的外植体较未缩水状态的外植体抗性芽率较低。其原因可能是此时外植体缩水过多,而难于恢复生长状态。由于适当失水的外植体能够更好地吸收农杆

菌液及营养物质进行生长,因此,掌握好最佳取材时机至关重要。

在遗传转化中筛选系统是影响转化效率的重要因素<sup>[17]</sup>,直接筛选方法获得的转化植株对草甘膦具有相对较高的抗性<sup>[18]</sup>。本研究确定了未成熟种子在丛生芽诱导阶段草甘膦的筛选浓度为  $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,此浓度高于受体品种的临界浓度。转 *EPSPS/GAT* 基因大豆的抗性鉴定是创制抗草甘膦大豆新种质必不可少的环节。传统鉴定是用喷雾器喷洒草甘膦稀释液,因叶片面积大小及重叠程度不同及人为操作等原因易造成每株所接受的草甘膦有效剂量不同,导致鉴定结果的不准确性。马林等<sup>[19]</sup>报道了适用于后代鉴定的种子萌发法以及叶片离体培养检测方法,其操作较复杂。本研究在待测植株生长至第2个三出复叶完全展开时,用移液枪吸取  $1 \mu\text{L}$  稀释10倍的农达原液点在叶片上,14 d即可准确区分抗感植株,此鉴定方法能保证不同植株个体上施用相同剂量的草甘膦,可更加灵敏地对每个单株进行草甘膦抗性表型鉴定。

**致谢:**本研究所用载体由北京未名凯拓有限公司作物设计中心夏勉博士提供。

## 参考文献

- [1] Sairam R V, Franklin G, Hassel R, et al. A study on the effect of genotypes, plant growth regulators and sugars in promoting plant regeneration *via* organogenesis from soybean cotyledonary nodal callus [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003, 75(1): 79-85.
- [2] Wang G, Xu Y. Hypocotyl-based *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max* L. Merrill.) and application for RNA interference [J]. *Plant Cell Reports*, 2008, 27(7): 1177-1184.
- [3] Cheng M, Lowe B A, Spencer T M, et al. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2004, 40(1): 31-45.
- [4] Donaldson P A, Simmonds D H. Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean [J]. *Plant Cell Reports*, 2000, 19(5): 478-484.
- [5] Ke J, Khan R, Johnson T, et al. High-efficiency gene transfer to recalcitrant plants by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Cell Reports*, 2001, 20(2): 150-156.
- [6] 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(5): 723-735.
- [7] Xue R, Xie H, Zhang B. A multi-needle-assisted transformation of soybean cotyledonary node cells [J]. *Biotechnology Letters*, 2006, 28(19): 1551-1557.
- [8] Yamada T, Watanabe S, Arai M, et al. Cotyledonary node pre-wounding with a micro-brush increased frequency of *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean [J]. *Plant Biotechnology*, 2010, 27: 217-220.
- [9] Ko T, Lee S, Krasnyanski S, et al. Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explant [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107(3): 439-447.
- [10] Yan B, 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(11): 1090-1097.
- [11] Mariashibu T S, Subramanyam K, Arun M, et al. Vacuum infiltration enhances the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in Indian soybean cultivars [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2013, 35(1): 41-54.
- [12] Franklin G, Carpenter L, Davis E, et al. Factors influencing regeneration of soybean from mature and immature cotyledons [J]. *Plant Growth Regulation*, 2004, 43(1): 73-79.
- [13] 王卢平,乔亚科,李桂兰,等. 大豆未成熟种子子叶节不定芽再生的初步研究[J]. 大豆科学, 2011, 30(3): 369-373. (Wang L P, Qiao Y K, Li G L, et al. Shoots regeneration of cotyledon node from soybean immature seed [J]. *Soybean Science*, 2011, 30(3): 369-373.)
- [14] 钟磊,王林红,乔亚科,等. 农杆菌介导大豆未成熟子叶节的遗传转化[J]. 河北科技师范学院学报, 2013, 27(1): 1-4. (Zhong L, Wang L H, Qiao Y K, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean in immature seed cotyledon node [J]. *Journal of Hebei Normal University of Science and Technology*, 2013, 27(1): 1-4.)
- [15] 胡晋. 种子生物学[M]. 北京:高等教育出版社, 2005. (Hu J. *Seed biology* [M]. Beijing: Higher Education Press, 2005.)
- [16] Paz M M, Shou H, Guo Z, et al. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant [J]. *Euphytica*, 2004, 136(2): 167-179.
- [17] Joyce P, Kuwahata M, Turner N, et al. Selection system and co-cultivation medium are important determinants of *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane [J]. *Plant Cell Reports*, 2010, 29(2): 173-183.
- [18] 陆玲鸿,韩强,李林,等. 以草甘膦未筛选标记的大豆转基因体系的建立及抗除草剂转基因大豆的培育[J]. 中国科学:生命科学, 2014, 44(4): 406-415. (Lu L H, Han Q, Li L, et al. Establishment of an efficient transformation protocol for soybean using glyphosate as selective agent and the development of glyphosate-tolerant transgenic soybean lines [J]. *China Science, Life Science*, 2014, 44(4): 406-415.)
- [19] 马林,周练,周正剑,等. 抗除草剂转基因水稻和大豆快速准确检测技术研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2012, 38(6): 647-654. (Ma L, Zhou L, Zhou Z J, et al. Establishment of methods for identifying rapidly and precisely transgenic rice and soybean containing herbicide-resistant gene *Bar* and *EPSPS* [J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 2012, 38(6): 647-654.)