

转录调控基因 *GmLEC1* 转化大豆及转化方法的比较

朱红林¹, 沙爱华², 符秀梅¹, 陈银华¹, 单志慧², 周新安²

(1. 海南大学 教育部热带生物资源重点实验室, 海南 海口 570228; 2. 中国农业科学院 油料作物研究所, 湖北 武汉 430062)

摘要:以高油大豆“中豆 30”开花后 30 d 的发育种子为材料, 根据已报道的拟南芥脂肪酸合成相关转录因子 *LEC1* 序列设计简并引物, 采用同源序列法从大豆种子中分离了大小为 850 bp 的 cDNA 片段; 采用 Gateway 技术构建 RNAi 表达载体 pHGlec; 分别利用大豆子叶节和胚尖为外植体进行农杆菌介导的遗传转化; 以抗性芽获得率, PCR 检测阳性率为指标, 对转化系统进行优化。确定了 $6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 6-BA 为胚尖转化法最佳激素配比; 经 PCR 鉴定, 优化后的胚尖转化法阳性苗获得率为 7.58%, 子叶节转化法转化率为 1.86%。

关键词:大豆; *LEC1* 基因; RNA 干扰载体; 转化; 子叶节; 胚尖

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2010)01-0007-06

Cloning and Transformation Study of Transcription Factor *GmLEC1* in Soybean

ZHU Hong-lin¹, SHA Ai-hua², FU Xiu-mei¹, CHEN Yin-hua¹, SHAN Zhi-hui², ZHOU Xin-an²

(1. Key Laboratory of Tropical Biological Resources, Ministry of Education, Hainan University, Haikou 570228 Hainan; 2. Institute of Oil Crops Research, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Wuhan 430062, Hubei, China)

Abstract: The developing seeds of high-oil soybean “Zhongdou 30” were employed in this study. Degenerate primers were designed according to the reported sequence of transcription factor *LEC1* related to fatty acid synthesis in Arabidopsis. A 850 bp cDNA fragment was isolated from soybean seed by homology-based candidate gene method. And RNAi vector pH-Glec was constructed by Gateway technology. And then the vector was delivered into soybean via Agrobacterium-mediated transformation, using cotyledonary nodes and embryonic tips of soybean as explants. The rate of resistant shoots and the positive rate of PCR was used as criteria for selection the proper conditions. The results indicated that the optimal system of shoots elongation was $6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of 6-BA for embryonic tips. The positive rate of PCR by optimized embryonic tips transformation system was 7.58%, and it was 1.86% by cotyledon nodes transformation system.

Key words: Soybean; *LEC1* gene; RNA interference vector; Transformation; Cotyledon node; Embryonic tips

大豆是重要的经济作物,其种子油是人类食用、工业深加工以及医疗保健药品的重要来源。大豆种子油含量一般为 18% ~ 22%, 远远低于其它油料作物种子油含量(40% ~ 60%), 利用现有资源通过常规育种方式提高大豆种子含油量很难有大的突破。随着分子生物学技术的发展,对植物种子油尤其是脂肪酸合成代谢途径及一些关键酶合成的基因有了较清晰的认识,使得通过基因工程手段调控植物种子脂肪酸代谢途径,进而提高种子油含量成为可能,这在拟南芥、油菜、大豆中都有成功的报道^[1-5]。但也有研究表明,没有单个主要的步骤控制着脂肪酸的合成,通过调控脂肪酸合成途径中的单一步骤对种子油脂合成量的影响不大,找出控制脂肪酸合成

的关键调控因子加以调节才是提高种子油含量的关键^[6]。在拟南芥突变体的研究中发现,一些转录因子在种子的发育过程中参与对种子组成成分的调控。其中 *LEC1* 是调控植物胚胎发生的基因,编码 CCAAT 结合因子的 HAP3 亚基,在拟南芥种子胚胎发育过程中起着重要作用。*LEC1* 的缺失突变会导致种子含油量降低,而在营养器官中异位表达 *LEC1* 可诱发胚胎结构的产生并诱导编码油体的胚胎特异 RNA 的表达^[7-8]。为研究大豆中 *LEC1* 的同源基因是否有着类似的功能,采用同源序列法从大豆中克隆了 *GmLEC1* 的全长 cDNA,构建 RNAi 载体后,然后用农杆菌侵染子叶节和胚尖的方法对大豆进行了转化,并对 2 种转化方法进行了比较。

收稿日期:2009-09-25

基金项目:中国农业科学院油料作物研究所资助项目;国家高技术研究发展计划资助项目(2006AA100104)。

第一作者简介:朱红林(1973-),女,硕士,现主要从事大豆转基因研究。E-mail: b980320@yahoo.com.cn。

通讯作者:周新安,研究员。E-mail: xazhou@public.wh.hb.cn; 陈银华,副教授。E-mail: ychenhu@126.com。

1 材料与方法

1.1 供试材料

高油大豆中豆 30 (ZD30) 由中国农科院油料所提供。受体大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 α , 农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 EHA105 为该实验室保存。TA 克隆试剂盒 pUCm-T Vector Kit, Taq Polymerase, 限制性内切酶, 连接酶, DNA 回收纯化试剂盒均购于上海生工生物工程有限公司; 引物合成由上海生工生物工程有限公司完成。

1.2 大豆 *LEC1* 基因的克隆

中豆 30 种子播种于中国农业科学院油料作物所试验田内, 开花后 30 d 将种子从荚果中分离, 液氮冷冻后储藏在 -80°C 冰箱中备用。RNA 采用 Trizol 试剂盒 (Invitrogen) 提取, cDNA 第一链采用 Oligdt (18) 和 M-MLV 逆转录酶 (Promega) 合成, 上述操作均按说明书进行。根据拟南芥中已克隆的转录调控基因 *LEC1* (NM_102046) 序列, 通过 Blast 在大豆 EST 序列库 (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>) 中搜索与这些基因相对应的同源的 Uni-gene, 根据 Uni-gene 的序列设计引物。LEC1L: 5'-CGAGGCTCTTATAATCACACACAC-3'; LEC1R: 5'-ACTCCCTTCCCAGCCCTTA-3'。

以反转录获得的 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增, 反应体系为 20 μL , 内含: 2 μL 10 \times PCR Buffer, 1.2 μL 25 mmol \cdot L $^{-1}$ MgCl $_2$, 0.2 $\mu\text{mol} \cdot$ L $^{-1}$ dNTPs, 0.5 $\mu\text{mol} \cdot$ L $^{-1}$ Primer, 1 U Taq Enzyme, 2 μL 第一链产物。反应条件为: 95°C 5 min; 95°C 1 min, 57°C 1 min, 72°C 1 min, 35 个循环; 72°C 延伸 5 min。反应结束后, 取 10 μL PCR 扩增产物, 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 回收目的条带进行 TA 克隆, BamH I/Sac I 酶切鉴定阳性重组克隆。

1.3 序列测定及同源性分析

阳性重组子由上海生工生物工程有限公司进行序列测定, 测定的序列进行 BLAST 分析比较。

1.4 RNA 干扰载体的构建

根据载体通用序列及噬菌体体外 BP 反应设计 2 对 PCR 引物, 1 对是根据重组位点 attB1 (Forward) 的部分序列 (12 nts) 和 *LEC1* 基因序列的反义链 (19 nts), 重组位点 attB2 (Reverse) 的部分序列 (12 nts) 和 *LEC1* 基因序列的正义链 (24 nts) 设计而成的; 另外 1 对完全基于重组位点 attB1 和 attB2 的通用引

物。

attB1 通用引物: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3'

attB2 通用引物: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'

attB1 + *LEC1*: 5'-AAAAAGCAGGCT-(CGAGGCTCTTATAATCACACACAC)-3'

attB2 + *LEC1*: 5'-AGAAAGCTGGGT-(ACTCCCTTCCCAGCCCTTA)-3'

以 pUlec 质粒为模板, 用 attB1 + *LEC1* 和 attB2 + *LEC1* 进行第一轮 PCR 扩增, 50 μL PCR 反应液中含有引物 10 pmol, 反应条件: 95°C 2 min, 94°C 10 s, 58°C 30 s, 72°C 1.5 min, 5 个循环, 取 10 μL 反应物至含有 40 pmol \cdot L $^{-1}$ attB 通用引物的 40 μL PCR 反应液中进行第二轮扩增, 扩增条件: 95°C 1 min, 94°C 15 s, 45°C 30 s, 68°C 1.5 min, 5 个循环, 94°C 15 s, 55°C 30 s, 72°C 1.5 min, 15 个循环, 72°C 5 min。PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶分离检测, 回收目的片段。

在 5 μL BP 缓冲液中, 依次加入 100 ng 纯化的 PCR 产物和 100 ng pHGRV 质粒 DNA, 混匀, 加入 4 μL BP Clonase, 25°C 反应过夜。加入蛋白酶 K, 37°C 10 min 终止反应。热击法转化大肠杆菌 DH5 α , Spec 50 mg \cdot L $^{-1}$ 的 LB 固体平板筛选阳性克隆。根据载体上 Intron 序列设计左引物, *LEC1* 基因特异序列设计右引物, 对阳性克隆进行 PCR 检测, 测序验证。提取阳性重组子质粒, 电击法转化农杆菌 EHA105, 含 Rif 50 mg \cdot L $^{-1}$ 、Spec 50 mg \cdot L $^{-1}$ 的 LB 平板上筛选阳性克隆, 菌落 PCR 检测验证。

1.5 大豆的遗传转化

1.5.1 农杆菌菌液的制备 挑单克隆于含相应抗生素的 LB 液体培养基中, $26 \sim 28^{\circ}\text{C}$ 过夜培养后, 以 1:100 的比例稀释于含相应抗生素的新鲜 LB 培养基中, 至 OD $_{600}$ = 0.5 ~ 0.6 时, 以 4 000 r \cdot min $^{-1}$ 收集菌体, 用等体积的侵染液重悬菌体, 用于侵染。

1.5.2 外植体的获得 取无病斑, 种皮完好的大豆种子, 75% 乙醇消毒 30 s, 10% 次氯酸钠消毒 15 min, 无菌水冲洗 3 ~ 5 次。

胚尖法将消毒后的种子于无菌水中 28°C 浸泡过夜, 去掉种皮, 将下胚轴连同刚萌动的胚尖与 2 片子叶剥离, 去掉原叶。将胚尖外植体放入预培养培养基, 预培养 1 d。

子叶节法将消毒后的种子接种于 MS 固体培养基, 26℃ 培养 5~7 d 后, 取无菌苗从子叶节处纵向切开, 保留 1~2 mm 下胚轴, 切去萌发的顶芽及侧芽, 放入预培养培养基中。

1.5.3 基因转化及抗性植株的获得 将预培养 1 d 的外植体放入 $OD_{600} = 0.5 \sim 0.6$ 农杆菌菌液中侵染 (子叶节 15 min, 胚尖 20 h)。之后接种在共培养培养基上, 子叶节暗培养 3 d, 胚尖暗培养 5 d。共培养后的外植体转入除菌培养基中。培养 5~7 d 转入筛选培养基, 每 10 d 继代 1 次。当丛生芽长 2 cm 以上时, 将其切下转入生根培养基。培养温度均为 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光周期 18/6 h。待生根后经炼苗转入大棚中。

培养基配方: 预培养基: MS + $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA, pH 5.8; 侵染液: MS + $6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS, pH 5.4; 共培养基: MS + $6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS, pH 5.8; 除菌培养基: MS + $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cef + $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cab, pH 5.8; 筛选培养基: MS + $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cef + $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cab + $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kan, pH 5.8; 生根培养基: MS + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA + $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cef + $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cab, pH 5.8 (AS - 乙酰丁香酮, cab - 羧苄青霉素, cef - 头孢霉素, kan - 卡那霉素)。

1.6 抗性植株的 PCR 检测

CTAB 法提取所获得的 33 株卡那霉素抗性植株基因组 DNA, 以未转化植株 (ZD30) 为阴性对照, 质粒为阳性对照, 利用 NPT II 引物 NPT II - F: $5' - \text{AGACAATCGGCTGCTCTGAT} - 3'$; NPT II - R: $5' - \text{TCATTTCGAACCCAGAGTC} - 3'$ 进行 PCR 扩增, 1.0% 琼脂糖凝胶检测扩增产物。

2 结果与分析

2.1 *LEC1* 基因的克隆及其序列分析

以反转录获得的第一链 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, *LEC1* 基因获得了大小约为 850 bp 的特异片段 (图 1), 与预期基因片段条带大小一致。将该片段连接至 pUCm-T 载体, 阳性重组质粒经 *Bam*H I / *Sac* I 双酶切检测, 该质粒命名为 pUlec (图 2)。

测序结果表明, 所分离的目标片段与拟南芥中已克隆的脂肪酸合成酶基因高度同源, 包含完整的读码框。

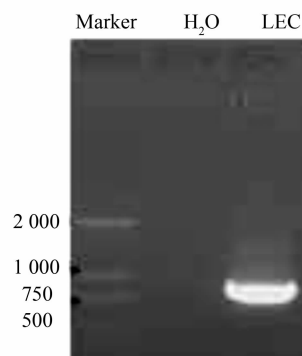


图 1 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 Result of RT-PCR

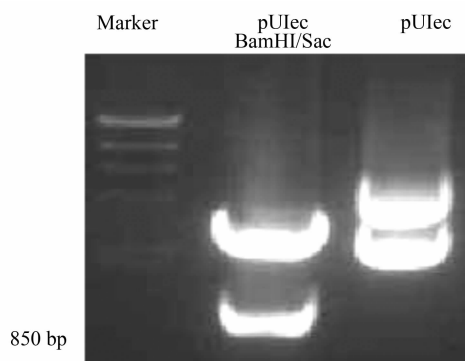


图 2 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Cleavage analysis of recombination plasmid

2.2 RNAi 载体的构建

扩增获得含有 attB 位点的 *LEC1* 基因片段, 与带有 attP 位点的载体质粒 pHGRV 在 BP 克隆酶的作用下, 进行体外重组, 对经过抗生素筛选的阳性克隆进行 PCR、测序均证实成功获得阳性重组克隆。重组子命名为 pHGlec (图 3)。电击法导入农杆菌 EHA105, 获得植物表达载体。



图 3 载体 pHGlec 的 T-DNA 结构图

Fig. 3 T-DNA structure of the pHGlec vector

2.3 选择培养基卡那霉素浓度的确定

结果发现, 大豆对卡那霉素具有一定的抗性。为了找出适宜于筛选转化植株的卡那霉素浓度, 分别用含卡那霉素 0、25、50、75、125、150 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基对未经转化的大豆子叶节和胚尖进行了筛选。15 d 后调查显示, 只有当浓度达到 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时才能有效筛选出非转化和转化的组织、细胞 (表 1)。当卡那霉素浓度低于 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时未经转化的大

豆植株具有抗性,达不到筛选效果;而浓度高于 100 mg·L⁻¹时对筛选也没有更大的帮助,所以最终确定筛选抗性植株的卡那霉素筛选浓度为 100 mg·L⁻¹。

表 1 不同浓度卡那霉素筛选未转化子叶节和胚尖的出芽结果统计
Table 1 Effects of different kanamycin concentration on the budding rates of non-transformed cotyledon node and embryonic tips

卡那霉素浓度 Kanamycin concentration/mg·L ⁻¹		0	25	50	75	100	125	150
子叶节 Cotyledon node	外植体数 Number of explants	28	28	28	28	28	28	28
	出芽外植体数 Number of budding explants	25	17	9	3	1	0	0
	分化率 Differentiation rate/%	89.29	60.71	32.14	10.71	3.57	0	0
胚尖 Embryonic tips	外植体数 Number of explants	10	10	10	10	10	10	10
	出芽外植体数 Number of budding explants	10	9	3	2	1	0	0
	分化率 Differentiation rate/%	100.00	90.00	30.00	20.00	10.00	0	0

2.4 抗性植株的获得

将预培养和侵染的胚尖外植体转入在共培养培养基上进行培养,在共培养过程中给予黑暗条件能保证农杆菌的活力,由于是以胚尖作为外植体材料,为了使农杆菌更好的进入细胞,经多次摸索,5 d 对于这种转基因方法而言是最佳的反应时间。共培养后的外植体转入除菌培养基进行农杆菌筛选,由于除菌培养基含有高浓度的杀菌素和抑菌素,因此经过一段时间的筛选,大部分残留在组织表面的农杆菌都被杀死。再经过选择培养基进行高选择压的筛选发现,大豆对卡那霉素具有一定的抗性,只有当浓度达到 100 mg·L⁻¹时才能有效筛选出非转化和转化的组织、细胞。抗性条件筛选 7 d 左右就能见再生芽的萌动,再经过 14~21 d 的高选择压筛选,大部分再生芽都逐渐白化,直至枯死。只有少量的再生芽能继续生长,当再生芽长到 3~5 cm 时切下转入生根培养基进行根的诱导,一般大约 2~3 周即可见不定根的发生,再经 2~3 周即可开盖炼苗,移栽大田(图 4)。

采用胚尖法和子叶节法进行对比试验,各做了 3 批,每批 100~150 个外植体,总转化结果比较见表 2。胚尖法转化效率和 PCR 阳性检测率都比子叶节法要高。PCR 检测结果证明外源基因已经整合

进大豆基因组中。部分抗性植株的 PCR 扩增结果见图 4。

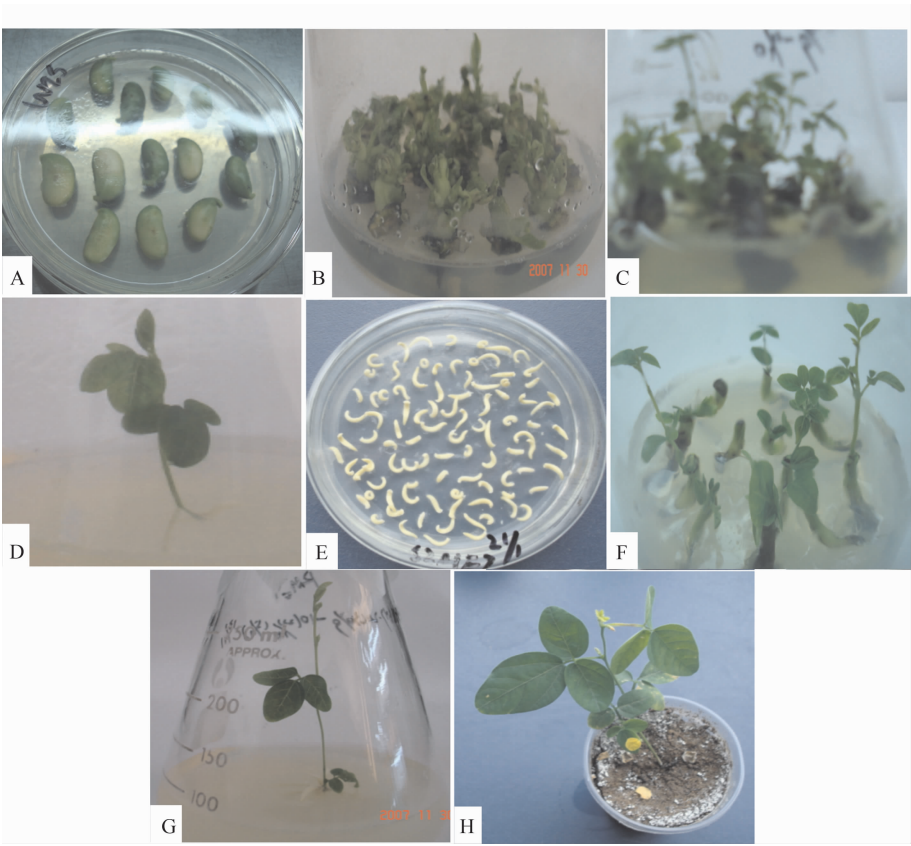
胚尖法共用外植体 356 个,获得卡那霉素抗性植株 33 株,比例为 9.7%。

表 2 子叶节和胚尖转化结果比较
Table 2 Difference between the method of cotyledon node and embryonic tips

转化方法 Transformation	被浸染的外植体数 Number of infested explants	抗性苗植株数 Number of resistant plants	PCR 检测阳性植株数 Number of positive plants	PCR 检测效率 Positive rate of PCR/%	转化效率 Rate of transformation/%
子叶节法 Cotyledon node	323	13	6	46.15	1.86
胚尖法 Embryonic tips	356	33	27	81.82	7.58

2.5 转基因植株的分子检测

对获得的 33 株转化再生植株进行 PCR 检测,其中 27 株扩增出了预期的 750 bp 的电泳带 9(图 5),阳性率为 81.82%;而阴性对照及未转化植株没有出现此带。表明外源目的基因已整合到大豆植株的基因组中。



A:子叶节外植体;B:侵染后的子叶节在筛选培养基中诱导出芽;C:B 的芽生长;D:切下 C 的芽生根;E:胚尖外植体;F:侵染后的胚尖在筛选培养基中诱导出芽;G:切下 F 的芽生根;H:炼苗后移栽在口杯中。

A: cotyledon node explant; B: infected cotyledon nodes are induced shooting in selection medium; C: shoot of B growth; D: cut off the shoot of C to radicate; E: embryonic tips explants; F: infected embryonic tips are induced shooting in selection medium; G: cut off the shoot of F to radicate; H: transplant the seedling in cup after cultivated

图 4 转基因植株获得过程

Fig. 4 Acquisition of the transgenic soybean plants

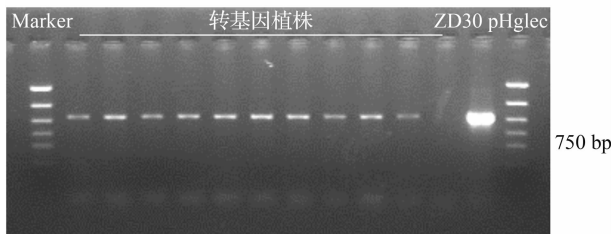


图 5 部分大豆转基因植株的 PCR 检测结果

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

3 讨论

3.1 转录调控基因 *GmLEC1* 转基因植株的获得

与其它油料作物相比,大豆种子含油量相对较低,种质资源最高含量只有 23%^[9],通过常规育种

途径提高大豆种子含油含量比较困难,而通过基因工程手段有可能取得突破,如赵桂兰等通过转反义 *PEP* 获得了含油量达到 25% 的转基因大豆新材料^[5]。由于脂肪酸合成途径有多个基因参与,有时仅仅改变单个脂肪酸合成基因对种子脂肪含量的影响可能不大,只有找出控制脂肪酸合成的关键调控基因加以改变,才有可能改变种子的脂肪含量^[6]。

结果表明,从大豆中克隆了调控种子脂肪酸组成成分的转录调控基因 *GmLEC1*,通过构建 RNAi 载体后进行了遗传转化。经 PCR 检测分析,共获得 33 个阳性植株,为进一步分析 *GmLEC1* 在调控大豆种子脂肪酸合成过程中的作用奠定了基础。

3.2 农杆菌介导的胚尖和子叶节转化方法比较

农杆菌介导的遗传转化因操作程序比较简单,

不需要贵重的仪器设备,一直以来广受研究者推崇。自 Hinchee 等^[10]最早将农杆菌介导的遗传转化在大豆上成功应用以来,这种方法在大豆上开始广泛应用。但是,相对于其它作物如水稻、烟草等,大豆属于较难进行遗传转化的物种,主要表现在组织培养植株再生困难、基因型差异明显和转化效率较低等^[11]。尽管后来的研究者不断加以改进,如用超声处理子叶节^[12],选用不同的农杆菌菌株^[13-14],在培养基中添加硫醇类化合物和 L-半胱氨酸^[15-16],采用不同的转基因受体等^[17],但是大豆的遗传转化仍然相对比较困难,转化效率较低。

为了建立一种合适的遗传转化体系,分别采用胚尖法和子叶节法对 *GmLEC1* 的 RNAi 载体进行了遗传转化,并对转化条件进行了优化。首先是确定了适宜区分转化植株和未转化植株的卡那霉素选择压浓度,其次探索出了分别适宜农杆菌侵染胚尖和子叶节的暗培养时间。

比较 2 种转化方法,胚尖法无论是再生率还是转化效率,都要优于子叶节法。其原因大致如下:(1)胚尖有原分生组织和原形成层,因而对农杆菌更敏感;(2)长时间浸染可以提高 T-DNA 的转化效率;(3)长期的共培养也可以提高 T-DNA 转化效率。

参考文献

- [1] Zou J T, Katavic V, Giblin E M, et al. Modification of seed oil content and acyl composition in the brassicaceae by expression of a yeast sn-2 acyltransferase gene[J]. *Plant Cell*, 1997, 9: 909-923.
- [2] Taylor D C, Katavic V, Zou J T, et al. Field testing of transgenic rapeseed cv. Hero transformed with a yeast sn-2 acyltransferase results in increased oil content, erucic acid content and seed yield[J]. *Molecular Breeding*, 2002, 8: 317-322.
- [3] Roesler K, Shintani D, Savage L, et al. Targeting of the Arabidopsis homomeric acetyl-coenzyme A carboxylase to plastids of rapeseeds[J]. *Plant Physiology*, 1997, 113: 75-81.
- [4] 陈锦清,郎春秀,胡张华,等.反义 *PEP* 基因调控油菜籽粒蛋白/油脂含量比率的研究[J]. *农业生物技术学报*, 1999, 7(4): 316-320. (Chen J Q, Lang C X, Hu Z J, et al. Antisense *PEP* gene regulates to ratio of protein and lipid content in Brassica Napus seeds[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 1999, 7(4): 316-320.)
- [5] 赵桂兰,陈锦清,尹爱萍,等.获得转反义 *PEP* 基因超高油大豆新材料[J]. *分子植物育种*, 2005, 3(6): 792-796. (Zhao G L, Chen J Q, Yin A P, et al. Transgenic soybean lines harbouring Anti-*PEP* gene express super-high oil content[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2005, 3(6): 792-796.)
- [6] Ramli U S, Baker D S, Quant P A, et al. Control analysis of lipid biosynthesis in tissue cultures from oil crops shows that flux control is shared between fatty acid synthesis and lipid assembly[J]. *Biochemistry Journal*, 2002, 364: 393-401.
- [7] Meinke D W, Franzmann L H, Nickle T C, et al. Leafy cotyledon mutants of *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 1994, 6: 1049-1064.
- [8] Lotan T, Ohto M, Yee K M, et al. *Arabidopsis* leafy cotyledon1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells[J]. *Cell*, 1998, 93: 1195-1205.
- [9] 盖钧镒.发展我国大豆遗传改良事业解决国内大豆供给问题[J]. *中国工程科学*, 2003, 5(5): 1-6. (Gai J Y. Expanding and enhancing the research allocation on soybean breeding and genetics for the establishment of market supply based on domestic production[J]. *Engineering Science*, 2003, 5(5): 1-6.)
- [10] Hinchee M A W, Connor-Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer[J]. *Biological Technology*, 1988, 6: 915-922.
- [11] 王昌陵,赵军,李英慧,等.转录因子 ABP9 转化大豆(*Glycine max* L.)及遗传转化条件优化[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(7): 1908-1916. (Wang C L, Zhao J, Li Y H, et al. Transforming transcription factor ABP9 into soybean and optimization of the transformation system[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(7): 1908-1916.)
- [12] Meurer C A, Dinkins R D, Collins G B. Factors affecting soybean cotyledon node transformation[J]. *Plant Cell Report*, 1998, 18: 180-186.
- [13] Ko T S, 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: 439-447.
- [14] Ko T S, Nelson R L, Korban S S. Screening multiple soybean cultivars(MG 00 to MG VIII) for somatic embryogenesis following *Agrobacterium*-mediated transformation of immature cotyledons[J]. *Crop Science*, 2004, 44(5): 1825-1831.
- [15] Olhoft P M, Somers D A. L- Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary- node cells[J]. *Plant Cell Report*, 2001, 20(8): 706-711.
- [16] 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, 5: 723-735.
- [17] 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.