

## 大豆遗传转化技术研究进展

杨向东, 隋丽, 李启云, 杨静, 邢国杰, 郭东全, 董英山

(吉林省农业科学院 生物技术研究中心, 吉林 长春 130033)

**摘要:** 高效、稳定的遗传转化体系是开展大豆转基因育种及功能基因组学研究的重要前提。自1988年首次建立基因枪和农杆菌介导的大豆遗传转化技术以来, 围绕影响大豆转化效率提高的各种因素, 国内外学者对大豆转化方法进行了多方面的改进, 包括在共培养基中添加抗氧化剂类化合物, 选用强毒农杆菌菌株以及不同的外植体和筛选剂等。经过20多年的发展, 大豆遗传转化效率不断提高, 目前已报道的大豆转化效率最高可达32.6%。文章对近年来大豆遗传转化技术研究进展进行了综述, 并对影响大豆转化效率的主要因素进行了探讨。

**关键词:** 大豆; 遗传转化; 转化效率; 研究进展

**中图分类号:** S565.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-9841(2012)02-0302-09

## Recent Advances in Soybean Transformation

YANG Xiang-dong, SUI Li, LI Qi-yun, YANG Jing, XING Guo-jie, GUO Dong-quan, DONG Ying-shan

(Biotechnology Research Center, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, Jilin, China)

**Abstract:** Efficient and stable transformation is a prerequisite to production of transgenic soybean and soybean functional genomics research. Since the successful transformation of the cultivated soybean by *Agrobacterium*-mediated and microprojectile bombardment methods independently in 1988, soybean transformation efficiency has been greatly improved by modification of many important factors affecting soybean transformation and regeneration, including addition of antioxidant compounds mixture in co-cultivation medium, utilization of super-virulent strains, different explants and selection agents, etc., with the highest transformation efficiency of 32.6% obtained recently. In this paper, recent advances in soybean transformation were reviewed and some factors influencing transformation efficiency were also discussed.

**Key words:** Soybean; Genetic transformation; Transformation efficiency; Recent advances

大豆 [*Glycine max* (L.) Merrill] 是世界上最重要的油料作物和高蛋白粮食作物之一, 也是人类植物性蛋白和油脂的重要来源。大豆籽粒中含有丰富的蛋白质和油脂以及多种对人体有益的生理活性物质如异黄酮、维生素 E 等。作为一种重要的固氮生物, 大豆在维持地球生物圈氮循环也具有重要的作用<sup>[1]</sup>。作为全球四大油料作物之一, 2009 年世界大豆产量约为 2.1 亿 t, 按照目前全球大豆的生产水平, 到 2020 年全球大豆产量将达到 3.11 亿 t<sup>[2]</sup>。转基因大豆是世界上最早引入商业化种植的转基因农作物之一, 也是迄今为止播种面积最大, 商业化程度最高的转基因农作物。仅 2011 年, 全球转基因大豆种植面积就达到 7 540 万 hm<sup>2</sup>, 占大豆总种植面积的 77% 以上, 约占全球转基因作物种植总面积的 50%<sup>[3]</sup>。转基因大豆已成为世界大豆生产的主流品种。许多研究表明, 具有重要应用价值的转基因作物新品种几乎都是从几百、几千甚至上万个转化事件中筛选出来的<sup>[4]</sup>。只有获得大批量的转

化事件群体, 才能在此基础上筛选出可应用于生产的转基因作物新品种。因此, 高效、稳定的遗传转化技术是保障大豆转基因育种研究的重要前提和基础。

随着大豆全基因组序列测序的完成, 大豆基因组学研究已进入了一个新的阶段<sup>[5]</sup>。据估计, 大豆基因组中编码蛋白的基因数量为 46 430 个<sup>[5]</sup>。如何进一步分析这些基因的功能, 挖掘与大豆抗病虫、抗逆、品质及产量相关的重要基因, 以及解析控制这些重要性状的基因调控网络等将是大豆功能基因组学研究的核心问题。功能基因组学研究中的一个重要的手段就是通过高通量的遗传转化获得大量的突变体, 并根据突变表型分析基因的功能; 或是通过遗传转化验证某个基因的功能<sup>[6-7]</sup>。可见, 高效、简便的遗传转化技术是推进大豆功能基因组学研究的重要因素之一。在大豆遗传转化研究方面, Christou 等<sup>[8]</sup> 和 Lin 等<sup>[9]</sup> 最早利用大豆原生质体作为外植体进行遗传转化研究。1988 年

收稿日期: 2012-02-09

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项 (2011ZX08004-004, 2008ZX08004-006B, 2009ZX08009052B)。

第一作者简介: 杨向东 (1976-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为大豆转基因育种。E-mail: xdyang020918@126.com。

通讯作者: 董英山 (1963-), 男, 博士, 研究员, 主要从事植物种质资源和生物技术研究。E-mail: ysdong@cjaas.com。

Hinchee 等<sup>[10]</sup>和 McCabe 等<sup>[11]</sup>分别采用农杆菌介导转化和基因枪轰击法获得了转基因大豆植株,首次证实了这 2 种方法在大豆遗传转化中的可行性。其后,国内外许多学者对大豆转化技术进行了多方面的改进,包括大豆基因型及外植体类型<sup>[12-18]</sup>、超声波或真空抽滤辅助转化<sup>[19-24]</sup>、农杆菌菌株<sup>[25-27]</sup>、抗氧化剂<sup>[28-30]</sup>、筛选剂<sup>[13,29,31-34]</sup>等,目前大豆转化效率最高可以达到 32.6%。尽管经过 20 多年的研究,大豆转化效率不断提高,但与水稻(转化率 30%)、玉米(转化率 41%)等农作物相比较,大豆转化率仍然较低,大豆仍然被认为是较难转化的作物之一<sup>[34]</sup>。如何进一步提高大豆转化效率,以较小的成本获得大量的低拷贝数转基因材料群体,是目前以及将来一段时间内转基因大豆新品种培育及大豆功能基因组研究中的主要难点之一。该文介绍了近年来大豆遗传转化方面的一些主要研究进展,并对影响大豆转化效率提高的一些重要因素及问题进行了探讨。

## 1 大豆遗传转化方法

尽管目前已发展出多种大豆遗传转化方法,如农杆菌介导法、基因枪转化法、PEG 法、花粉管通道法等,但在大豆转基因研究中常用的方法主要是农杆菌介导法和基因枪法<sup>[35]</sup>。实际上目前商业化种植的转基因大豆品种也主要是通过这 2 种方法获得的。对于不同的大豆基因型和外植体来说,2 种方法在转化机制、转化效率、外源基因插入方式等多方面也存在明显的差异。近年来利用这 2 种方法进行大豆遗传转化的一些进展情况见表 1。

### 1.1 农杆菌介导大豆转化法

土壤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)被认为是双子叶植物的天然宿主,其独特之处在于能够借助于致瘤 Ti 质粒编码的 Vir 蛋白将 T-DNA 导入植物细胞并实现在基因组中的整合。自 1983 年首次利用农杆菌介导法获得转基因烟草植株以来,在目前已获得的 200 多种转基因植物中,大约 85% 均来自于农杆菌介导转化法<sup>[36]</sup>,该方法已成为植物遗传转化的首选方法<sup>[37]</sup>。农杆菌介导转化的过程主要包括几个步骤:农杆菌积聚、*vir* 基因的诱导表达、T-DNA 复合物的形成、T-DNA 转入并整合到植物基因组。其中,农杆菌积聚、*vir* 基因的活化等过程受植物受伤后产生的酚类物质如乙酰丁香 Acetosyringone, AS) 和羧基乙酰丁香酮的诱导。农杆菌的趋化特性以及与植物之间的特异性互作在很大程度上决定了农杆菌适宜转化植物及基因型的范围<sup>[38-40]</sup>。尽管外植体损伤可以诱导 AS 等酚类物质

的产生,但是对于大部分大豆基因型来说,损伤诱导产生的酚类物质并不足以诱导农杆菌 *vir* 基因的活化<sup>[41]</sup>。通过在共培养基中加入适合浓度的酚类物质如 AS,可以有效促进农杆菌积聚和附着以及 T-DNA 复合物的加工和转移。AS 的使用也是农杆菌介导大豆遗传转化获得成功的重要因素之一<sup>[35]</sup>。由于农杆菌介导转化涉及农杆菌与大豆外植体之间的互作,因而筛选对大豆等豆科植物毒性较强的农杆菌菌株以及对农杆菌敏感的大豆基因型或外植体可以有效提高大豆转化效率。如 Yukawa 等<sup>[27]</sup>发现,由野生型农杆菌 KAT23 改造而来的 Soy2 菌株转化效率比 EHA105 提高了 2 倍以上;而由野生型农杆菌 Chry5 改造而来的农杆菌菌株 KYRT1 的转化效率也显著优于 EHA105 和 LBA4404<sup>[25]</sup>。另外,通过在共培养基中添加适合浓度的抗氧化剂,降低大豆外植体对农杆菌的防卫反应,减少外植体的褐化反应和坏死,也可以有效提高大豆转化效率<sup>[30]</sup>。此外,在农杆菌转化时,辅助以适当强度的超声波处理,也可以有效提高大豆未成熟胚<sup>[21]</sup>和子叶节<sup>[20]</sup>的转化效率。最近有报道表明,农杆菌侵染阶段进行真空<sup>[24]</sup>或低盐处理<sup>[42]</sup>也可以促进大豆转化效率的提高。

与其它大豆转化方法相比,农杆菌介导转化法具有多方面的优势。一是可选用的外植体类型广泛。迄今为止,许多研究者对农杆菌介导的各种不同外植体类型如子叶节<sup>[10,16,20,28-29,34,43]</sup>、未成熟胚<sup>[17,19,22,24,44]</sup>、胚尖<sup>[13,15]</sup>、胚轴<sup>[24,45]</sup>、半种子<sup>[16]</sup>、初生叶、花序等<sup>[18]</sup>转化进行了研究,并成功获得了转基因大豆植株。不过由于不同外植体类型对农杆菌敏感性及再生效率不同,其转化效率也存在明显差异。如大豆半种子转化效率(3.8%)要显著高于子叶节转化效率(1.5%)<sup>[16]</sup>。农杆菌介导转化法的另一个优势是 T-DNA 插入拷贝数低,结构简单,外源基因发生沉默的比例较低。Olhoft 等<sup>[46]</sup>对 270 个 T<sub>0</sub>代大豆独立转化事件中 T-DNA 插入结构进行了研究。发现利用农杆菌介导法获得的转基因大豆植株中,T-DNA 插入拷贝数为 1~2 个的比例约为 79.1%,其中单拷贝插入比例为 31.5%,而拷贝数在 3 个以上的比例仅为 12.5%。不过,农杆菌介导转化法也存在易产生嵌合体等方面的问题。就目前已有的报道和作者所在实验室研究的结果(未发表)来看,利用子叶节、半种子、胚尖为外植体获得的转基因大豆植株都有可能产生嵌合体,特别是在共培养基中加入抗氧化剂类化合物(如 L-cysteine, L-cys)时,产生嵌合体的比例可能会更高<sup>[34]</sup>。另外,为了进一步加快大豆功能基因组学的研究,

特别是与大豆根发育及与根瘤固氮相关基因的研究,近年来也发展了利用毛根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)进行大豆遗传转化的方法<sup>[47]</sup>。不过由于外源基因主要是在不定根中表达,不能够稳定遗传到后代。因此,目前该方法在大豆转基因遗传改良研究中尚没有应用。

## 1.2 基因枪转化法

基因枪转化法主要是通过物理介导的方法,将包裹在金粉或其它惰性金属材料上的 DNA 分子导入植物细胞,并实现在植物基因组中的整合。目前基因枪转化法采用的外植体主要是由大豆未成熟子叶诱导产生的体细胞团<sup>[44]</sup>,此外也有利用大豆芽分生组织<sup>[11]</sup>和胚尖<sup>[13]</sup>作为外植体进行基因枪转化的报道。1988年 McCabe 等<sup>[11]</sup>首次利用基因枪法转化大豆芽分生组织,并获得了转基因植株。1991年 Finer 等<sup>[44]</sup>利用基因枪法转化大豆悬浮体细胞团并获得了转基因植株。1996年 Stewart 等<sup>[48]</sup>利用该方法将抗虫基因 *cry1Ac* 导入大豆并获得了抗虫转基因大豆植株。同年, Hadi 等<sup>[49]</sup>利用基因枪法将 12 个基因同时导入大豆体细胞团,并获得了转基因大豆植株。在此基础上, Santarem 等<sup>[50]</sup>, Ponappa 等<sup>[51]</sup>和 Khalafalla 等<sup>[52]</sup>进一步研究了影响基因枪转化效率的因素,并对基因枪转化法进行优化。2000年 Aragão 等<sup>[13]</sup>以大豆胚尖为外植体,利用基因枪转化法获得了转基因植株,转化效率达 20.1%。由于不存在与微生物之间的互作,影响大豆基因枪转化效率的因素可能主要与外植体状态、轰击参数以及转化细胞再生率有关。如 Hazel 等<sup>[53]</sup>发现短时间培养(<6个月)的大豆悬浮体细胞团转化效率极低,而培养6个月后的转化效率则明显提高。王晓春等<sup>[54]</sup>发现利用基因枪轰击球形期体细胞团时,其转化效率(8.0%)要显著高于发育晚期的体细胞胚(0)。另外,在基因枪转化前将体细胞团置于高渗培养基中培养4h以上(或自然失水处理)后,可以有效提高大豆转化效率。关于高渗处理提高转化效率的具体机制目前还不清楚,一个可能的解释是由于高渗处理降低了体细胞胚的膨压,利于包裹外源 DNA 金粉的进入或是减少了金粉对细胞破坏的缘故。

与农杆菌介导转化法相比,基因枪转化技术的一个主要优势是不受大豆基因型限制,多数栽培品种均可以通过该方法进行转化,且操作方法较为简单。另外,基因枪转化法可以同时多个质粒或目的 DNA 片段导入植物基因组,且不需要复杂的载体构建过程和选用不同的筛选标记基因。Hadi

等<sup>[49]</sup>利用基因枪法将 12 个质粒同时导入大豆悬浮体细胞团,获得了携带多个外源基因的转基因大豆植株。此外,基因枪转化法也可以将外源基因直接导入到细胞器基因组中。这一点与农杆菌介导转化明显不同,由于在叶绿体膜上没有 T-DNA 复合物可以识别的靶蛋白(如 importin 类蛋白)<sup>[55]</sup>, T-DNA 不能进入叶绿体中并和叶绿体基因组发生同源重组。Dufourmantel 等<sup>[56]</sup>首次利用基因枪法获得了同质化的叶绿体转基因大豆植株。2005年他们又获得了高水平表达抗虫蛋白 Cry1Ab 的同质化叶绿体转基因大豆植株<sup>[57]</sup>。由于叶绿体转基因技术的独特优势(如外源蛋白的高水平表达、环境安全等),基因枪法也为叶绿体转基因大豆新品种培育提供一个新的技术途径。

另一方面,基因枪转化法也存在一些缺点,如外源 T-DNA 插入拷贝数较高、结构较为复杂,常常造成外源基因沉默以及目标性状遗传不稳定等问题,因而在一定程度上限制了该方法在转基因研究中的广泛应用。不过,最近有报道表明,减少包裹金粉的 DNA 数量可以有效降低 T-DNA 插入拷贝数<sup>[58]</sup>。另外,利用基因枪转化大豆未成熟子叶的周期一般较长(一般大于6个月),也容易造成转化再生植株出现体细胞变异以及后代不育等问题<sup>[53]</sup>。

## 1.3 其它大豆转化方法

除了上述转化方法外,研究者还发展了诸如电激法、PEG 法、花粉管介导等其它转化方法<sup>[35]</sup>。Dhir 等<sup>[59]</sup>以 Clark 63 为材料,采用电激法获得了抗卡那霉素的转基因植株。Lin 等<sup>[9]</sup>采用 PEG 介导转化法将含有 *npt II* 和 *cat* 基因的质粒导入大豆原生质体,获得了表达外源基因的抗性愈伤组织,但未获得完整的转基因再生植株。上述 2 种方法采用的外植体均为大豆原生质体,由于每个转化原生质体均可以独立发育成为一个完整的再生植株,因而有效避免了转化植株中嵌合体的问题。不过由于原生质体培养技术复杂且转化效率较低,上述 2 种方法在大豆遗传转化中并没有获得广泛应用。另外, Lei 等<sup>[60]</sup>和 Liu 等<sup>[61]</sup>报道了利用大豆花粉管通道法,获得了转基因大豆植株。其原理是利用植物授粉后所形成的天然花粉管通道,将外源 DNA 导入受体植物基因组中。该方法的优点是操作简单,不依赖于复杂的组织培养过程。但是该方法转化效率较低且可重复性不高<sup>[62]</sup>,因此在实际研究中应用并不广泛。此外, Chee 等<sup>[63]</sup>报道了利用农杆菌感染大豆萌发种子获得转基因大豆植株,不过该方法是否具有可重复性还尚待进一步研究。

表 1 近年来大豆遗传转化研究进展情况  
Table 1 Recent advances in soybean transformation

基因型/外植体 Genotypes/Explants	再生方式 Regeneration	转化方法 Transformation	菌株 Strains	筛选基因/筛选剂 Selection gene/ agents	转化效率 Transformation efficiency/%	文献 Reference
A3237/子叶节	器官发生	农杆菌介导	EHA105, EHA101	<i>bar</i> /草丁膦	3.0	[31]
A3237/子叶节	器官发生	农杆菌介导	ABI(来源于 C58)	<i>epsps</i> /草甘膦	3.0	[32]
Bert/子叶节	器官发生	农杆菌介导	LBA4404, EHA105	<i>hpt</i> /Hyg	16.4	[29]
Bert, Harosoy, Jack, Peking, Thorne, Williams, Williams 79, Williams82, Clark, Delsoy5710, Essex, Ogden/子叶节	器官发生	农杆菌介导	EHA101	<i>bar</i> /草丁膦	2.0-6.3	[42]
Nannong 88/子叶节	器官发生	农杆菌介导	EHA105	<i>npt</i> /Km	2.20	[64]
Hefeng 25, Dongnong 42, Hei nong37, Jilin 39, and Jiyu 58/子叶节	器官发生	农杆菌介导	EHA105	<i>hpt</i> /Hyg	3.8-11.7	[65]
Williams82, Magellan, Mustang/子叶节	器官发生	农杆菌介导	EHA101	<i>bar</i> /草丁膦	1.3-14.0	[34]
Thorne, Williams, Williams79 Williams82/半种子	器官发生	农杆菌介导	EHA101	<i>bar</i> /草丁膦	1.4-8.7	[16]
NARC-4/半种子	器官发生	农杆菌介导	LBA4404	<i>npt</i> /Km	5.0-7.0	[66]
BR-16, DokoPC, BR-19, Conquista/胚尖	器官发生	基因枪轰击(质粒)	/	<i>ahas</i> /咪唑盐酸	20.1	[13]
合丰 35, 合丰 29 和东农 42/胚尖	器官发生	农杆菌介导	EHA105	<i>npt</i> /Km	8.0-15.8	[15]
BR-16, BR-91, Celeste, Conquista, Doko RC, Nina, Indiana and Itaipu/胚尖	器官发生	基因枪轰击(DNA 片段)	/	<i>ahas</i> /咪唑盐酸	0.8	[67]
S42HI/上胚轴	器官发生	农杆菌介导	LBA4404	<i>pmi</i> /甘露糖	7.5-20	[33]
Heinong44/下胚轴	器官发生	农杆菌介导	EHA105	<i>npt</i> /Km	9.3	[45]
A3244/胚轴	器官发生	农杆菌介导	ABI	<i>epsps</i> /草甘膦	3.7	[68]
A5403/胚轴	器官发生	农杆菌介导	/	<i>epsps</i> /草甘膦	1.0-3.0	[24]
93061, 98820-33/子叶节、腋芽	器官发生	农杆菌介导	AGL1	<i>bar</i> /草丁膦	0.3-4.3	[69]
Jack/腋芽、花序	器官发生	农杆菌介导	EHA101	<i>bar</i> /草丁膦	3.7	[18]
Jack, Williams82, S42HI/未成熟种子	器官发生	农杆菌介导	EHA101, LBA4404	<i>bar</i> /草丁膦	1.1-32.6	[17]
Jack/未成熟子叶	体细胞胚胎发生	农杆菌介导	EHA105	<i>hpt</i> /Hyg	0.03	[23]
Defiance/未成熟子叶	体细胞胚胎发生	农杆菌介导(SAAT)	EHA105	<i>gfp</i> /-	2.5	[70]
Jack/未成熟子叶	体细胞胚胎发生	基因枪轰击	/	<i>hpt</i> /Hyg	2.2	[52]
Jack/未成熟子叶	体细胞胚胎发生	农杆菌介导	KYRT1, EHA105	<i>hpt</i> /Hyg	1.1-1.7	[25]

## 2 大豆再生途径

大豆遗传转化主要包括 2 个环节,一是利用生物、物理或化学方法将外源基因导入植物细胞;二是转化细胞能够成功再生为完整的大豆植株。因此,除了外源基因导入及整合效率影响大豆转化效率外,转化细胞的再生频率也是影响转化效率提高的关键因素。实际上,外植体细胞能否再生及再生频率的高低也是开展大豆遗传转化的一个基本前提。目前大豆遗传转化中外植体细胞再生的方式

主要有 2 种,即不定芽器官发生(Organogenesis)和体细胞胚胎发生(Somatic embryogenesis)。其中不定芽器官发生方式是目前大豆转化中主要采用的再生方式。不定芽器官发生方式所用的外植体包括子叶节、半种子、茎尖、下胚轴、初生叶、花序等。最近有报道表明,大豆未成熟胚也可以通过器官发生的方式再生<sup>[17]</sup>。Cheng 等<sup>[71]</sup>首次利用大豆子叶节作为外植体获得再生植株。Hinchee 等<sup>[10]</sup>以大豆子叶节为外植体进行大豆遗传转化研究,并获得了转基因大豆再生植株。之后,国内外多个实验室利

用子叶节均获得了转基因大豆再生植株。大豆子叶节不定芽器官发生体系也被认为是目前较为成熟大豆再生体系。不过,在利用大豆子叶节转化时,在子叶节部位划伤不当通常会显著降低转化细胞再生率。为减少上述情况的出现,Paz等<sup>[16]</sup>发展了一种新转化方法-半粒法,即利用浸泡24h的大豆成熟种子作为外植体进行农杆菌介导转化。由于外植体采用的是萌动的种子,分生组织活动强烈,且不需要精确划伤,其转化效率比常规子叶节转化法提高约1.5倍<sup>[66]</sup>。另外,Aragão等<sup>[13]</sup>以浸泡24h成熟种子的胚尖为外植体,转化效率高达20.1%。Liu等<sup>[15]</sup>采用同样的外植体,利用农杆菌介导法进行转化,其转化效率约为8.0%~15.8%。与子叶节相比,胚尖外植体制备较为简单,且转化效率较高,因此更适用于大豆规模化转化,是一个极有发展潜力的转化外植体类型。此外,Loganathan等<sup>[72]</sup>利用胚尖为外植体,通过体细胞胚胎发生的方式获得了再生植株。Wang等<sup>[45]</sup>利用胚轴作为外植体,获得较高的再生率和转化率。Khan等<sup>[33]</sup>和Martinell等<sup>[24]</sup>利用上胚轴进行了遗传转化研究,也获得较好的效果。Zhong等<sup>[18]</sup>以腋芽、花序等作为外植体,也成功获得了转基因大豆植株。程林海等<sup>[73]</sup>以大豆上胚轴、下胚轴、幼胚和小真叶为外植体,也获得了较高再生频率。Hong等<sup>[69]</sup>报道了利用大豆子叶节和叶节诱导产生愈伤组织,获得了大豆转化再生植株;Joyner等<sup>[74]</sup>、Hwang等<sup>[17]</sup>报道了利用大豆成熟子叶诱导产生愈伤,并通过器官发生的方式再生为完整的大豆植株。总体来说,大豆不定芽再生体系具有多方面的优点如再生率高,再生时间短,通常1~3个月就可获得再生植株;外植体容易获得,不受季节限制;再生过程简单,只需丛生芽分化培养、芽伸长及生根培养3个步骤。不过,大豆不定芽再生系统也存在一些问题,其中一个主要问题是由于不定芽为多细胞起源,转化再生苗中常常出现嵌合体的现象。另外,通过器官发生方式再生时,有时会出现不定芽伸长及生根困难等问题,特别是培养基中筛选剂种类和浓度或培养条件不合适时,这一问题就更为明显。针对大豆再生过程中生根难等问题,刘立侠等<sup>[75]</sup>发展了利用嫁接方式来避开抗性芽生根的过程,并取得了较好的效果。

大豆转化过程中常见的另外一种再生方式为体细胞胚胎发生方式。利用这一方式再生的外植体主要是大豆未成熟子叶。Christionson等<sup>[76]</sup>首先观察到大豆细胞悬浮培养时的体细胞胚胎发生。Parrott等<sup>[77]</sup>首次采用这一体系进行农杆菌介导转

化研究并获得了转基因再生植株。由于新生胚主要分布在旧胚表面,在进行液体培养筛选时转化胚体可以和筛选剂充分接触,因而有效提高了筛选效果<sup>[44,78]</sup>。与不定芽器官发生方式相比,体细胞胚胎发生方式的一个主要优势是由于体细胞胚体为单细胞起源,因此有效避免了嵌合体的产生。体细胞胚胎发生方式也被认为是解决大豆遗传转化中嵌合体问题的最有潜力的再生体系。另外,由于体细胞团可以在含有2,4-D的诱导培养基上不断增殖,其再生率可以达到很高的水平,同时也可以为大豆转化连续提供丰富的外植体材料。此外,体细胞胚胎发生方式的一个重要特点是可以模拟大豆合子胚发育过程,因而对于研究大豆胚体发育、种子形成等重要生理过程具有其独特的意义。其缺点是体细胞团组织培养过程复杂,培养周期较长,易产生体细胞突变及再生苗不结实等情况。

上述2种再生方式都具有各自的优缺点,对于不同的大豆基因型来说,其适合的再生途径可能不同。对于某些大豆品种来说,如“JACK”等可能更适用于体细胞胚胎发生方式。而对于部分大豆基因型如“Williams82”,“Bert”,“吉林小粒豆1号”等可能适合于不定芽器官发生方式。但从实际应用的角度来看,大豆不定芽器官发生方式可能具有更为广泛的应用。从已有的文献报道来看,该方式也是目前多数实验室采用的主要方法。不过需要指出的是,与大豆常规组织培养不同,由于转化细胞处于不同的培养环境(包括农杆菌、筛选剂、抑菌剂等)中,其再生率也会受到这些因素的影响。

### 3 影响大豆转化效率提高的主要因素

#### 3.1 大豆基因型

大豆基因型可能是影响大豆转化效率最重要的因素之一<sup>[79]</sup>。不同大豆基因型转化效率存在明显差异,有些大豆品种甚至无法转化,大豆遗传转化仍然具有一定的基因型特异性,这一点可能对农杆菌介导转化法更为明显<sup>[34]</sup>。基因型对大豆转化效率的影响可能主要表现在2个方面,一是对农杆菌的敏感程度(易感性);二是对组织培养再生的反应程度(再生率)。已有的研究表明,不同大豆基因型对农杆菌的敏感程度存在明显的差异。Hinchee等<sup>[10]</sup>研究了100多个大豆基因型对农杆菌的易感性。结果表明,只有基因型“Peking”对农杆菌反应较为敏感。Donaldson等<sup>[43]</sup>利用12个大豆品种进行了遗传转化研究,结果只有品种“Accolibri”获得了遗传稳定的转基因植株。作者对10个大豆基因型敏感程度进行比较研究发现,“JACK”基因型

*GUS* 基因的瞬时表达水平达 88% 以上,而其它基因型如“吉育 67”等则显著低于这一水平(未发表)。不同大豆基因型对农杆菌反应存在差异的原因可能是多方面的。其中一个重要的方面是外植体和农杆菌之间的复杂互作关系,农杆菌侵染会诱发植物产生防卫反应,从而导致农杆菌不侵染或是侵染效率降低。因此,通过在共培养基中加入抗氧化剂类化合物(如 L-cys 等),降低植物的防卫反应,可以有效提高不同大豆基因型对农杆菌的“敏感度”。Paz 等<sup>[13]</sup>研究表明,当在共培养基中加入 L-cys 时,部分不敏感的基因型的 *gus* 基因瞬时表达率从 10% 提高到 95% 以上。

另一方面,不同大豆基因型对组培再生的反应程度也存在明显差异,并最终影响转化细胞的再生率。研究表明,大豆再生率在在一定程度上表现为基因型特异性,不同基因型之间再生频率存在显著差异<sup>[80]</sup>。Ko 等<sup>[14]</sup>研究了 15 个大豆品种胚胎发生能力。结果发现,其中 3 个大豆品种的胚胎发生率都在 50% 以上,而另外 12 个大豆品种的胚胎发生率则均在 24% 以下。这一结果与非筛选条件下胚胎发生率情况一致<sup>[14]</sup>。进一步分析表明,大豆基因型“Kunitz”和“Cisne”都具有“Williams”血缘,而“Williams”品种本身也具有较高的胚胎发生频率。因此,Ko 等<sup>[14]</sup>认为体细胞胚胎发生率是一类可遗传的性状,胚胎发生率较高的大豆品种可能来源于一个或多个高胚胎发生率的祖先。

### 3.2 农杆菌菌株

农杆菌菌株是影响大豆转化频率的一个重要因素。不同农杆菌菌株对大豆的转化能力存在较大差异。大豆遗传转化中常用的菌株主要有 EHA101、EHA105、LBA4404、GV3101 等<sup>[35]</sup>。这些农杆菌菌株大多都是经过改造且侵染能力较强的菌株。近年来,国外研究者又开发出了多种适合于大豆遗传转化的强毒农杆菌菌株,如 KYRT1(来源于 Chry5)、soy2(来源于 KAT23)等。Meurer 等<sup>[20]</sup>和 Torisky 等<sup>[81]</sup>发现,KYRT1 对大豆体细胞胚状体的侵染效率和转化效率均显著高于常见的农杆菌菌株如 EHA101、EHA105、LBA4404 等。但是,对于大豆子叶节转化来说,KYRT1 和 EHA105 在转化率上没有明显的差别。Ko 等<sup>[25]</sup>发现,500 mg·L<sup>-1</sup> 头孢霉素(cefotaxime, cef)可以有效抑制 KYRT1 农杆菌的生长,而同样浓度的 cef 并不能够抑制 EHA105 和 GV3101 的生长。因此,农杆菌的过度生长也在一定程度上影响了体细胞胚的再生频率和转化效率。除 KYRT1 外,日本科学家最近从桃树根部分离了 1 个新型强毒农杆菌菌株-KAT23<sup>[26]</sup>。研究表

明,KAT23 对大豆和其它豆科植物表现出很强的侵染能力,其致瘤效率比 C58 高 2 倍以上<sup>[26]</sup>。由野生型 KAT23 改造而来的农杆菌菌株 Soy2 去掉了 KAT23 中 Ti 质粒上原有的致瘤基因,同时保留了 KAT23 的高侵染效率特点。Yukawa 等<sup>[28]</sup>研究了 Soy2 对 5 个不同大豆品种的侵染效率。结果表明,Soy2 对大豆基因型“Peking”的侵染效率最高,而对基因型“Suzuyutaka”的侵染效率最低,其侵染效率顺序与 EHA105 一致,但侵染效率则比 EHA105 高 2 倍以上<sup>[27]</sup>。因此,通过筛选强毒性农杆菌菌株,可以有效增强对不同大豆基因型特别是一些较难转化的大豆品种的转化频率,并在一定程度上突破了某些大豆基因型的限制,拓宽大豆遗传转化基因型范围。另外,有报道表明与 EHA105、LBA4404 相比,强毒农杆菌如 KYRT1 对外源 T-DNA 插入结构或拷贝数的影响不大,不过,不同农杆菌菌株可能会影响载体骨架序列插入的比例<sup>[82]</sup>。

### 3.3 抗氧化剂

农杆菌侵染植物外植体后,常会导致外植体褐化或坏死。外植体褐化是植物对外伤和农杆菌侵染防御反应的一种表现。外植体褐化和坏死通常会严重阻碍 T-DNA 进入以及转化细胞的再生。为减少外植体的褐化和坏死,提高转化效率,通常需要在培养基中加入适当浓度的抗氧化剂如 DTT、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、L-cys、抗坏血酸(Vitamin C, Vc)。关于抗氧化剂在大豆遗传转化中的作用,Olhoft 等<sup>[28]</sup>首次报道了在共培养基中加入适合浓度的 L-cys 可以有效提高 *gus* 基因的瞬时表达率,转化效率可以提高 3 倍以上。随后,Olhoft 等<sup>[29]</sup>进一步在共培养基培养基中添加抗氧化剂混合物(DTT, L-cys 和硫代硫酸钠),大豆基因型“Bert”的转化效率平均可以达到 16.4%。他们认为抗氧化剂一方面抑制了外植体的褐化或坏死,另一方面改善了农杆菌和外植体之间的互作,降低了外植体防卫反应的产生。尽管抗氧化剂的使用可以有效提高大豆转化效率,但在试验中发现,抗氧化剂特别是 L-cys 可能会提高非转化再生芽的“逃逸”比率,从而产生高比例的假阳性再生苗。其原因可能是由于 L-cys 具有一定抗筛选剂特性<sup>[34]</sup>。除了上述抗氧化剂外,有报道表明 AgNO<sub>3</sub> 也可以减少外植体褐化的发生,同时可以促进抗性芽更加健壮的生长。Wang 等<sup>[45]</sup>以大豆下胚轴作为转化外植体时,在诱导培养基中加入适量的 AgNO<sub>3</sub> 可以有效提高不定芽的诱导率。不过,Olhoft 等<sup>[46]</sup>发现,AgNO<sub>3</sub> 增加了外源 T-DNA 插入结构的复杂性,但似乎同时也降低了外源基因发生沉默的几率。关于 AgNO<sub>3</sub> 对 T-DNA 整合位点

的影响的原因和机制目前尚不清楚。

### 3.4 筛选剂

自 Hinchee 等<sup>[10]</sup>首次利用卡那霉素 (Kanamycin, Km) 作为筛选剂获得转基因大豆植株以来, 目前已有多种筛选剂包括潮霉素 (Hygromycin, Hyg)<sup>[28-29]</sup>、草丁膦 (Glufosinate)<sup>[31]</sup>、草甘膦 (Glyphosate)<sup>[32]</sup>、咪唑烟酸 (Imazapyr)<sup>[13]</sup>、甘露糖 (Mannose)<sup>[34]</sup> 等应用于大豆遗传转化中。在大豆转基因研究早期阶段, 所采用的筛选剂多数为 Km。不过有报道表明, 利用氨基糖苷类化合物如 Km 作为筛选剂时, 易造成外植体中酚类化合物的积累, 影响 T-DNA 的转移效率和转化效率<sup>[34]</sup>。Olhoft 等<sup>[28-29]</sup>采用 Hyg 作为筛选剂, 并在共培养基中加入抗氧化剂混合物, 大幅度提高了大豆转化效率, 转化效率可以达到 16.4%。不过利用 Hyg 作为筛选剂时, 只是基因型“Bert”可以获得较高的转化效率, 在其它大豆基因型上尚未获得验证<sup>[34]</sup>。草丁膦是目前大豆遗传转化中常用的筛选剂之一。Zhang 等<sup>[31]</sup>以草丁膦为筛选剂, 大豆转化频率可以提高至 3% 左右。Paz 等<sup>[42]</sup>比较了草丁膦和双丙氨膦 2 种筛选剂对大豆转化效率的影响, 发现利用草丁膦作为筛选剂时, 大豆转化效率为 2.0% ~ 6.3%, 而利用双丙氨膦作为筛选剂时, 转化效率仅为 0% ~ 2.1%。其原因可能是由于 2 种筛选剂在结构上存在差异, 导致转化细胞吸收和转运效率不同, 从而在筛选效率方面表现出明显的差异。草甘膦也是一种有效的筛选剂。较低浓度 (0.05 mmol · L<sup>-1</sup>) 的草甘膦就可以产生明显筛选作用, 大豆转化效率约为 1%<sup>[32]</sup>。此外, Aragão 等<sup>[13]</sup>利用咪唑酮类除草剂为筛选剂进行大豆遗传转化研究, 并取得了较好的结果, 大豆胚尖转化效率可以提高至 20.1%。除了上述负向筛选剂外, 其它一些正向筛选剂也有在大豆遗传转化中应用的报道。Khan 等<sup>[33]</sup>利用甘露糖作为筛选剂 (标记基因为 *pmi*, 编码磷酸甘露糖异构酶), 大豆转化效率达到 7.5% ~ 20.0%。另外, Finer 等<sup>[70]</sup>报道了利用 *gfp* 作为可视标记基因对转化大豆体细胞胚进行筛选, 大豆转化效率为 2.5%。可见, 在大豆遗传转化中不同的筛选剂筛选效果不同, 选择适合的筛选剂对于减少非转化苗逃逸、提高转化效率具有很重要的影响。从已有的报道来看, 草丁膦、咪唑酮类除草剂以及甘露糖等似乎更适合于作为大豆遗传转化中的筛选剂。

## 4 展望

高效、稳定的遗传转化技术是大豆转基因研究的核心问题之一。尽管目前已发展出了多种大豆

转化及再生技术体系, 不过比较来说, 农杆菌介导转化方法是大豆遗传转化的主流, 而不定芽再生方式也将是大豆遗传转化中主要采用的再生系统, 今后大豆遗传转化研究可能需要对该转化方法和再生体系进一步优化和完善。除了上述介绍的主要影响因素外, 由于大豆对组织培养过程较为敏感, 虽然采用的转化方法一样, 但不同生产厂家的化学试剂, 培养光照强度, 光照时间, 培养温度等也是影响大豆遗传转化获得成功的一个重要因素。实际上, 这也可能是造成大豆转化效率在不同实验室之间存在较大差异的重要原因之一。当然, 目前大豆遗传转化中还有一些问题需要进一步改进, 如嵌合体、不定芽伸长和生根困难等问题。通过对转化环节各种因素的优化, 这些问题将有望逐步得到解决。

迄今为止, 大豆转基因研究取得了很大的进展, 转基因大豆新品种在世界范围内种植面积不断扩大, 转基因性状也由最初的抗除草剂、抗虫性状过渡到优质、抗病、抗逆等性状, 并进一步向高产、营养高效、生物反应器等方向发展。特别是随着大豆全基因组序列的测序完成, 大豆功能基因组学研究正在成为国际上大豆研究的热点, 一系列与大豆产量、品质、抗病虫、抗逆以及与共生固氮相关的基因将逐步被鉴定和克隆。大豆功能基因组学研究将进一步推动全球转基因大豆产业的发展, 转基因大豆研究正在面临着一个难得的发展机遇。作为世界第四的大豆主产国, 虽然我国在转基因大豆商业化种植方面尚处空白, 转基因大豆育种研究也尚处于起步阶段, 但随着国家对转基因大豆研究的重视以及投入的逐步加大, 我国转基因大豆研究将有望迎来一个全新的发展时期。

## 参考文献

- [1] Somers D A, Samac D A, Olhoft P M. Recent advances in legume transformation [J]. *Plant Physiology*, 2003, 131: 892-899.
- [2] Masuda T, Goldsmith P D. World soybean production: Area harvested, yield, and long-term projections [J]. *International Food and Agribusiness Management Review*, 2009, 12: 143-162.
- [3] James C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2010 [C]. *The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications Brief No. 42*. ISAAA: Ithaca, NY, 2011.
- [4] 王关林, 孙月剑, 那杰, 等. 中国转基因植物产业化的研究进展及存在问题 [J]. *中国农业科学*, 2006, 39 (7): 1328-1335. (Wang G L, Sun Y J, Na J, et al. Progress and problems of commercial production to transgenic plants in China [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39 (7): 1328-1335.)
- [5] Schmutz J, Cannon S B, Schlueter J, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean [J]. *Nature*, 2010, 463, 178-183.

- [6] Somerville C, Somerville S. Plant functional genomics [J]. Science, 1999, 285:383-385.
- [7] Kaiser J. From genome to functional genomics [J]. Science, 2000, 288:1715-1716.
- [8] Christou P, Murphy J E, Swain W F. Stable transformation of soybean by electroporation and root formation from transformed callus [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987, 84:3962-3966.
- [9] Lin W, Odell J T, Schreiner R M. Soybean protoplast culture and direct gene uptake and expression by cultured soybean protoplasts [J]. Plant Physiology, 1987, 84:856-861.
- [10] Hinchey M A W, Connor-Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated gene transfer [J]. Nature Biotechnology, 1988, 6:915-922.
- [11] 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.
- [12] Sato S, Newell C, Kolacz K, et al. Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems [J]. Plant Cell Reports, 1993, 12:408-413.
- [13] Aragão F J L, Sarokin L, Vianna G R, et al. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 101:1-6.
- [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, 44:1825-1831.
- [15] 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.
- [16] Paz M 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] Hwang Y, Dawson J, Sigareva M, et al. Transformation of immature soybean seeds through organogenesis: US Patents, US 2008/0229447 A1 [P]. 2008-9-18.
- [18] Zhong H, Que Q. Method for transforming soybean (*Glycine max*): US Patents, US 2009/0023212 A1 [P]. 2009-1-22.
- [19] Trick H N, Finer J J. SAAT: Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation [J]. Transgenic Research, 1997, 6:329-336.
- [20] Meurer C A, Dinkins R D, Collins G B. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation [J]. Plant Cell Reports, 1998, 18:180-186.
- [21] Trick H N, Finer J J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue [J]. Plant Cell Reports, 1998, 17:482-488.
- [22] Santarem E R, Trick H N, Essig J S, et al. Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression [J]. Plant Cell Reports, 1998, 17:752-759.
- [23] Yan B, Reddy M S 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, 19:1090-1097.
- [24] Martinell B J, Julson L S, Emler C A, et al. Soybean transformation method: US Patents, US 8030076 B2 [P]. 2011-10-4.
- [25] 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 explants [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107 (3): 439-447.
- [26] Yukawa K, Kaku H, Tanaka H, et al. Characterization and host range determination of soybean super virulent *Agrobacterium tumefaciens* KAT23 [J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2007, 71 (7):1676-1682.
- [27] Yukawa K, Kaku H, Tanaka H. Enhanced soybean infection by the legume 'super-virulent' *Agrobacterium tumefaciens* strain KAT23 [J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2008, 72 (7): 1809-1816.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] Cao D, Hou W, Song S, et al. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean [J]. Euphytica, 2004, 136:167-179.
- [31] Zhang Z Y, Xiang A Q, Staswick Q. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1999, 56:37-46.
- [32] Clemente T E, LaVallee B J, Howe A R, et al. Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation [J]. Crop Science, 2000, 40 (3): 797-803.
- [33] Khan R. Method of transforming soybean: US Patents, US 2004/0034889 A1 [P]. 2004-2-19.
- [34] Zhang Z J, Chen X, Nguyen H T. Auto-regulated expression of bacterial isopentenyl transferase gene promotes T-DNA transformation in soybean: US Patents, US 2008/0184393 A1 [P]. 2008-7-31.
- [35] 刘海坤, 卫志明. 大豆遗传转化研究进展 [J]. 植物生理与分子生物学报, 2005, 31 (2):126-134. (Liu H K, Wei Z M. Recent advances in soybean genetic transformation [J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2005, 31 (2):126-134.)
- [36] 余永亮, 梁慧珍, 王树峰, 等. 中国转基因大豆的研究进展及其产业化 [J]. 大豆科学, 2010, 29 (1):143-150. (Yu Y L, Liang Z H, Wang S F, et al. Research progress and commercialization on transgenic soybean in china [J]. Soybean Science, 2010, 29 (1): 143-150.)
- [37] Gelvin S B. The introduction and expression of transgenes in plants [J]. Current Opinion in Biotechnology, 1998, 9:227-232.
- [38] Vergunst A C, Schrammeijer B, Den Dulk-Ras A, et al. VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells [J]. Science, 2000, 290:979-982.
- [39] Hwang H H, Gelvin S B. Plant proteins that interact with VirB2, the *Agrobacterium tumefaciens* pilin protein, mediate plant transfor-

- mation[J]. *Plant Cell*,2004,16:3148-3167.
- [40] Abu-Arish A, Frenkiel-Krispin D, Fricke T, et al. Three-dimensional reconstruction of *Agrobacterium* VirE2 protein with single-stranded DNA [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279: 25359-25363.
- [41] Godwin I, Todd G, Ford-lord 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.
- [42] Paz M M, Shou H X, Guo Z B, et al. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium* mediated soybean transformation using the cotyledonary node explants [J]. *Euphytica*, 2004, 136 (2): 167-179.
- [43] Donaldson P A, Simmonds D H. Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean[J]. *Plant Cell Reports*, 2000, 19:478-484.
- [44] Finer J J, McMullen M D. Transformation of soybean *via* particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue [J]. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1991, 27:175-182.
- [45] Wang G L, Xu Y N. Hypocotyl based *Agrobacterium* mediated transformation of soybean (*Glycine max*) and application for RNA interference[J]. *Plant Cell Reports*, 2008, 27(7):1177-1184.
- [46] Olhoft P M, Fligel L E, Somers D A. T-DNA locus structure in a large population of soybean plants transformed using the *Agrobacterium*-mediated cotyledonary-node method[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2004, 2:289-300.
- [47] Kereszt A, Li D, Indrasumunar A, et al. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology[J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(4):948-952.
- [48] Stewart C N J, Adang M J, All J N, et al. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene[J]. *Plant Physiology*, 1996, 112:121-129.
- [49] Hadi M Z, McMullen M D, Finer J J. Transformation of 12 different plasmids into soybean *via* particle bombardment [J]. *Plant Cell Reports*, 1996, 15:500-505.
- [50] Santarem E R, Finer J J. Transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using proliferative embryogenic tissue maintained on semi-solid medium [J]. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1999, 35:451-455.
- [51] Ponappa T, Brzozowski A E, Finer J J. Transient expression and stable transformation of soybean using the jellyfish green fluorescent protein[J]. *Plant Cell Reports*, 1999, 19, 6-12.
- [52] Khalafalla M M, Rahman S M, El-Shemy H A, et al. Optimization of particle bombardment conditions by monitoring of transient sGFP (S65T) expression in transformed soybean[J]. *Breeding Science*, 2005, 55(3):257-263.
- [53] Hazel C B, Klein T M, Anis M, et al. Growth characteristics and transformability of soybean embryogenic cultures [J]. *Plant Cell Reports*, 1998, 17, 765-772.
- [54] 王晓春, 王罡, 季静. 农杆菌介导的大豆体细胞胚遗传转化影响因素的研究[J]. *大豆科学*, 2005, 24(1):21-26. (Wang X C, Wang G, Ji J. The factors influencing genetic transformation system in somatic embryos of soybean mediated by *Agrobacterium* [J]. *Soybean Science*, 2005, 24(1):21-26.)
- [55] Pitzschke A, Hirt H. New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation [J]. *The EMBO Journal*, 2010, 29:1021-1032.
- [56] Dufourmantel N, Pelissier B, Garcon F, et al. Generation of fertile transplastomic soybean [J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 55: 479-489.
- [57] Dufourmantel N, Tissot G, Goutorbe F, et al. Generation and analysis of soybean plastid transformants expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protoxin [J]. *Plant Molecular Biology*, 2005, 58: 659-668.
- [58] Lowe B A, Prakash N S, Way M, et al. Enhanced single copy integration events in corn *via* particle bombardment using low quantities of DNA [J]. *Transgenic Research*, 2009, 18(6):831-840.
- [59] Dhir S K, Dhir S, Savka M A, et al. Regeneration of transgenic soybean (*Glycine max*) plants from electroporated protoplasts [J]. *Plant Physiology*, 1992, 99:81-88.
- [60] Lei B J, Li X C, Lu C H, et al. Introduction of wild soybean DNA into cultivar soybean and molecular RAPD confirmation [J]. *Science in China Series B*, 1994, 24:596-601.
- [61] Liu J F, Su Q, An L J, et al. Transfer of a minimal linear marker-free and vector-free *smGFP* cassette into soybean *via* ovary-drip transformation [J]. *Biotechnological Letters*, 2009, 31(2): 295-303.
- [62] Shou H X, Palmer R G, Wang K. Irreproducibility of the soybean pollen-tube pathway transformation procedure [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2002, 20:325-334.
- [63] Chee P P, Fober K A, Slightom J L. Transformation of soybean (*Glycine max*) by infecting germinating seeds with *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Physiology*, 1989, 91:1212-1218.
- [64] Yi X P, Yu D Y. Transformation of multiple soybean cultivars by infecting cotyledonary-node with *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2006, 5(20):1989-1993.
- [65] Liu S J, Wei Z M, Huang J Q. The effect of co-cultivation and selection parameters on *Agrobacterium*-mediated transformation of Chinese soybean varieties [J]. *Plant Cell Reports*, 2008, 27: 489-498.
- [66] Zia M, Mirza B, Malik S A, et al. Expression of *rol* genes in transgenic soybean (*Glycine max* L.) leads to changes in plant phenotype, leaf morphology, and flowering time [J]. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 2010, 103:227-236.
- [67] Vianna G R, Aragão F J L, Rech E L. A minimal DNA cassette as a vector for genetic transformation of soybean (*Glycine max*) [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2011, 10(1):382-390.
- [68] Dan Y H, Armstrong C L, Dong J, et al. Lipoic acid-a unique plant transformation enhancer [J]. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2009, 45:630-638.
- [69] Hong H P, Zhang H Y, Olhoft P, et al. Organogenic callus as the target for plant regeneration and transformation via *Agrobacterium* in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] [J]. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2007, 43:558-568.
- [70] Finer K R, Finer J J. Use of *Agrobacterium* expressing green fluorescent protein to evaluate colonization of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation-treated soybean cotyledons [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2000, 30, 406-410.

- try Press, 1994. )
- [23] 刘钟栋. 微波技术在食品工业中的应用[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1998. (Liu Z D. Adhibition of microwave technique on food industry[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1998. )
- [24] 高福成. 现代食品工程高新技术[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2006. (Gao F C. Advanced technology on modern food engineering[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2006. )
- [25] 李里特, 李秀婷, 张友龙. 微波加工果蔬脆片的研究[J]. 食品科学, 1995(1):20-23. (Li L T, Li X T, Zhang Y L. Research of microwave machining on fruit vegetable chips[J]. Food Science, 1995(1):20-23. )
- [26] 蒋家新, 邓建军, 张宁. 米饼微波膨化工艺的研究[J]. 粮油学报, 2000(5):45-48. (Jiang J X, Deng J J, Zhang N. Research of rice cake Microwave craft[J]. Chinese Cereals and Oils Association, 2000(5):45-48. )
- [27] 刘欣, 冯杰. 大豆抗原蛋白的研究进展[J]. 中国饲料, 2004(20):14-15. (Liu X, Feng J. Research progress of soybean antigen protein[J]. China Feed, 2004(20):14-15. )
- [28] 张建云, 易中华, 马秋刚, 等. 饲料抗营养因子对单胃动物的影响[J]. 饲料研究, 2009(8):10-12. (Zhang J Y, Yi Z H, Ma Q G, et al. Effect of feed anti nutrition factors on monogastric animal[J]. Feed Research, 2009(8):10-12. )
- [29] 石慧, 罗璇, 刘艳, 等. 两步发酵法降解大豆抗原蛋白的研究[J]. 饲料工业, 2011, 32(3):22-25. (Shi H, Luo X, Liu Y, et al. Research of two step yeast approach on degrading soybean antigen protein[J]. Feed Industry, 2011, 32(3):22-25. )
- [30] 王之盛, 况应谷, 周安国, 等. 酶解去除大豆产品抗原蛋白的效果研究[J]. 饲料博览, 2004(11):1-4. (Wang Z S, Kuang Y G, Zhou G A, et al. Research on the effect of enzymolysis clearing off soybean antigen protein[J]. Feed Review, 2004(11):1-4. )
- [31] 赵洪亮, 刘志敏. 蛋白质糖基化工程[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(9):18-23. (Zhao H L, Liu Z M. Protein glycosylation engineering[J]. Journal of Chinese Biotechnology, 2003, 23(9):18-23. )
- [32] Kohata A. Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins[J]. European Journal of Biochemistry, 1992, 209:483-501.
- [33] 王家红, 童玥, 朱玥, 等. 蛋白质糖基化的研究进展[J]. 药物生物技术, 2011, 18(1):77-80. (Wang J H, Tong Y, Zhu Y, et al. Research progress on protein glycosylation[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2011, 18(1):77-80. )
- [34] Jürgen V D L, Manuel J, Javier M F, et al. In vitro glycation and antigenicity of soy proteins[J]. Food Research International, 2007, 40:153-160.
- [35] 郑文华, 许旭. 美拉德反应的研究进展[J]. 化学进展, 2005, 17(1):122-129. (Zheng W H, Xu X. Research progress of Maillard reaction[J]. Progress in Chemistry, 2005, 17(1):122-129. )
- [36] 尹红. 美国科学家首次成功培育过敏性低大豆品种[J]. 粮食与油脂, 2003(1):22. (Yin H. American scientist firstly successfully breed soybean variety which contain low irritability[J]. Journal of Cereals and Oils, 2003(1):22. )
- [37] 张可喜. 日本研究出不易引起过敏的大豆[J]. 大豆通报, 2002(3):30. (Zhang K X. Japanese research the soybean which difficult to lead allergy[J]. Soybean Bulletin, 2002(3):30. )
- [38] 林化成, 姬洪波. 大豆抗原蛋白的致敏作用及其缓解机制的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(7):38-42. (Lin H C, Ji H B. Research progress of soybean protein's allergization and remission mechanism[J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2011, 38(7):38-42. )
- ~~~~~
- (上接第 310 页)
- [8] [71] Cheng T Y, Saka T, Voqui-Dinh T H. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture[J]. Plant Science Letters, 1980, 19:91-99.
- [72] Loganathan M, Maruthasalam S, Shiu L Y, et al. Regeneration of soybean (*Glycine max* L. Merrill) through direct somatic embryogenesis from the immature embryonic shoot tip[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2010, 46:265-273.
- [73] 程林海, 孙毅, 王立国. 大豆不同外植体植株再生的研究[J]. 中国油料作物学报, 1998, 20(2):25-24. (Cheng L H, Sun Y, Wang L G. Study on the regeneration of various explants of soybean. [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 1998, 20(2):25-24. )
- [74] Joyner E Y, Boykin L S, Lodhi M A. Callus induction and organogenesis in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cv. Pyramid from mature cotyledons and embryos[J]. Plant Science Journal, 2010, 4, 18-21.
- [75] 刘立侠, 李望丰, 王德利, 等. 应用嫁接技术提高转基因大豆的遗传转化效率的方法: 中国, CN1926961 [P]. 2007-03-14. (Liu L X, Li W F, Wang D L, et al. The method for improving the genetic transformation efficiency of transgenic soybean by grafting technique; China, CN1926961 [P]. 2007-03-14)
- [76] Christianson M L, Warnick D A, Carlson P S. A morphogenetically competent soybean suspension culture[J]. Science, 1983, 222:632-634.
- [77] Parrott W A, Hoffman L M, Hildebrand D F. Recovery of primary transformants of soybean [J]. Plant Cell Reports, 1989, 7:615-617.
- [78] Finer J J, Nagasawa A. Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill) [J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1988, 15:125-136.
- [79] Bailey M A, Boerma H R, Parrott W A. Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 1993;29:102-108.
- [80] Dan Y, Reichert N A. Soybean transformation and regeneration methods: US Patents, 5968830 [P]. 1999-10-19.
- [81] Torisky R S, Kovacs L, Avdiushko S, et al. Development of a binary vector system for plant transformation based on the super-virulent *Agrobacterium tumefaciens* strain Chry5 [J]. Plant Cell Reports, 1997, 17:102-108.
- [82] Yin Z, Wang G L. Evidence of multiple complex patterns of T-DNA integration into the rice genome [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 100:461-470.