

农杆菌介导大豆子叶节转化法外植体选择新方法

王爽^{1,2}, 郭兵福², 张丽娟², 郭勇², 金龙国², 杨慧², 邱丽娟²

(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, 北京 100081)

摘要:大豆遗传转化一直是植物转基因领域的难点之一,农杆菌介导的子叶节法是大豆遗传转化最常用的方法,靶细胞与农杆菌的互作是该方法的关键环节,而外植体的状态是影响靶细胞活力进而影响外植体对农杆菌敏感性的重要因素。本研究利用中黄10、Jack 和水利站3个品种材料开展转化试验,根据子叶和下胚轴的颜色和形态变化将外植体划分为6种状态,并以GUS基因瞬时表达效率为指标,比较不同状态外植体靶细胞对农杆菌敏感性,旨在鉴定外植体的最佳制备时期。结果表明:随着萌发时间的增加,外植体状态变化与萌发时间和真叶长度呈正相关,其瞬时表达效率差异显著,且3个受体品种外植体最佳瞬时表达状态存在差异,Jack和中黄10品种的最佳时期为HG、HG+CG、CG这3种状态的外植体,水利站品种的最佳时期YL状态的外植体,研究结果为大豆遗传转化体系的标准化提供了理论依据。

关键词:外植体状态;瞬时表达;萌发时间

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2016.05.0723

New Method for the Selection of Explants in the *Agrobacterium* Mediated Cotyledon Nodes Transformation in Soybean (*Glycine max* L.)

WANG Shuang^{1,2}, GUO Bing-fu², ZHANG Li-juan², GUO Yong², JIN Long-guo², YANG Hui², QIU Li-juan²

(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: The genetic transformation of soybean is one of the difficulties in plant transgenic and *Agrobacterium*-mediated cotyledonary node transformation method is the most commonly used in soybean genetic transformation. Interaction between target cells and *Agrobacterium* is the key of this method and explant status is an important factor that influence sensitivity and regeneration ability. In this study, the explant was divided into 6 types according to the color and status of cotyledon and hypocotyl. Transient transformation was carried out with zhonghuang 10, Jack and Shuilizhan and the index of transient expression efficiency of GUS gene was used to explore the best time to prepare explants. The results showed that the explants status were positively correlated with germination time and leaf length and had effect on transient expression efficiency. The best status of different receptors was different. The best periods of Jack and Zhonghuang 10 were HG, HG + CG and CG, the best periods of Shuilizhan was YL. Those conclusions could provide a reference for the standardization of soybean genetic transformation system.

Keywords: Explant status; Transient expression; Germination time

大豆[*Glycine max* (L.) Merr]是重要的经济作物和油料作物,是食用植物油和植物蛋白的主要来源,在饲料加工和生物能源开发等领域均占有重要位置。转基因大豆产业化生产带来的良好社会效益和巨大经济效益推动了大豆转基因应用的迅猛发展^[1],但受制于基因型依赖,大豆遗传转化依然是植物基因工程领域的难点之一^[2]。当前,农杆菌介导技术是应用于大豆遗传转化和转基因研究的主要技术方法^[3],其中子叶节法因具有操作简单、外植体获得便利、转化周期较短等优点,是当前大豆转基因研究应用最广,转化效率最稳定的

方法^[4]。提高大豆子叶节外植体靶细胞和农杆菌细胞的活力,能增强农杆菌细胞与子叶节分生细胞的相互作用,促进农杆菌 T-DNA 向靶细胞转移,从而提高转化效率,且细胞活力与再生能力紧密相关,因而提高外植体靶细胞活力,进而提高农杆菌侵染效率和转化细胞再生能力是提高农杆菌介导大豆遗传转化效率的主要方向。已有研究表明,选择不同状态的子叶节外植体或微创处理对转化效率均具有显著的影响。Magire 等^[5]利用无菌水浸泡 16 h 的子叶节外植体代替萌发 5 d 的子叶节外植体提高了遗传转化效率;利用“复合针”或超声波等

收稿日期:2016-03-09

基金项目:转基因新品种培育重大专项(2014ZX08004-001)。

第一作者简介:王爽(1990-),女,硕士,主要从事大豆转基因研究。E-mail:675659474@qq.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研究。E-mail:qiliujuan@caas.cn。

微创处理外植体,可提高分生细胞被侵染的频率,达到更好的侵染效果^[6-7]。大豆子叶节外植体经器官发生途径获得再生植株,其中经组织培养诱导获得的不定芽源自具有再生能力的分生细胞^[8],Marige等^[5]研究表明种子萌发过程中,子叶节外植体的分生细胞也在不断变化,不同状态的分生细胞其细胞活力存在差异,而细胞活力是影响转化再生的关键因素之一,通常靶细胞活力越强,其分生能力和生命力越旺盛,与农杆菌的互作能力越强,有助于转化细胞的获得。因此,研究不同生长状态子叶节外植体分生细胞的活力及其对农杆菌的敏感性,有助于提高大豆遗传转化的效率。

本研究拟在前人研究的基础上,以常用遗传转化的白色种皮品种 Jack、中黄 10 号以及黑种皮的水里站为受体,建立外植体选择体系,并以瞬时表达效率为指标,比较不同萌发状态外植体对农杆菌的敏感性,挖掘较易于侵染的外植体状态,为农杆菌介导大豆子叶节外植体最佳制备时间的选择及农杆菌介导大豆子叶节遗传转化技术体系的优化提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 本研究共选用中黄 10 号、Jack 和 水里站 3 个品种建立外植体萌发状态划分标准并对不同状态外植体染色效率进行差异显著分析;利用 Jack 品种分析不同状态外植体丛生芽率差异性。

1.1.2 载体和菌株 本研究选用的供试植物表达载体为 pSoy17,该载体含有草甘膦抗性基因(*EP-SPS*)和 β -葡萄糖苷酸酶基因(*GUS*),均由 CaMV35S 启动子驱动,载体抗性为卡纳霉素抗性,由浙江大学寿惠霞教授提供。农杆菌工程菌株为 EHA105,具有利福平抗性。

1.1.3 基本培养基及试剂

萌发培养基: B5 粉 $3.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH5.85, 琼脂 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

共培养培养基: B5 粉 $0.32 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, MES $3.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 6-BA $1.67 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH5.45, 琼脂 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, GA3 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 乙酰丁香酮 $39 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

共培养培养基: B5 粉 $0.32 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, MES $3.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 6-BA $1.67 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH5.45, 琼脂 $5.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, GA3 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 乙酰丁香酮 $39 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

诱导培养基: B5 粉 $0.32 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, MES $0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 6-BA $1.67 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH5.75, 噻孢霉

素 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 羧苄青霉素 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 筛选剂草甘膦 $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 琼脂 $8.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

GUS 染色母液: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $15.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; Na_2EDTA $3.722 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 20% Triton X-100 $5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$, X-Gluc $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH8.0。

1.2 方法

1.2.1 无菌种子获得 挑选饱满成熟无病斑的种子置于玻璃培养皿中,先用 75% 的乙醇擦拭种子表面再置于干燥器中,氯气灭菌 16 h。

1.2.2 外植体制备 分别选取萌发 1, 2, 3, 4, 5 d 的种子制备外植体,制备外植体的方法主要有两种,分别是传统的子叶节划痕方法和超声波与表面活性剂协同处理^[7]制备外植体。

传统的子叶节外植体制备方法:在超净工作台中用手术刀沿下胚轴将大豆切下,保留 3~4 mm 的下胚轴,置于无菌培养皿中,皿中添加适量的共培养液以方便剥离种皮,再沿子叶下胚轴垂直将胚轴切开,剔除干净真叶组织,在子叶和子叶下胚轴的连接处轴向作 5~7 个切口,切口约 3~4 mm。每个外植体由 1 片子叶连着一段下胚轴组成,1 枚种子可以形成两个外植体。

超声波与表面活性剂协同处理制备方法:较传统子叶节外植体制备法,分生区不采用人工划痕制造伤口,用手术刀将大豆沿下胚轴切下,放入无菌培养皿中,添加适量的共培养液以湿润种皮,再沿子叶下胚轴垂直将胚轴切开,剔除连接在子叶上的真叶组织,将外植体浸没在含 0.02% 表面活性剂 Silwet L-77 的农杆菌悬浮菌液中,超声 2 s 制备伤口。

1.2.3 农杆菌的准备 从超低温冰箱中取出低温保藏的农杆菌菌株于冰上冻融,用接种环或无菌枪头蘸取少量的菌种接种于 LB 平板上, LB 固体培养基含 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对应的抗生素。置于 28°C 恒温条件下倒置培养 1~2 d 以获得单克隆。2 d 后,挑取单克隆接种于 5 mL YEP 培养液中(含对应抗生素)于 $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 28°C 过夜活化培养(约 12 h)。当菌液第一次活化至饱和状态时,从中抽取 1 mL 菌液接种至含 100 mL YEP(含对应抗生素)的三角摇瓶中,在 28°C 、 $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下第二次活化。待农杆菌充分活化至 $\text{OD}_{600} = 1.0$ 左右时,将菌液于 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 4°C 条件下离心 10 min,弃上清收集沉淀,用等体积共培养液悬浮沉淀于管底的菌体,此时 OD_{600} 约为 0.5~0.8,备用。

1.2.4 外植体与农杆菌共侵染 外植体制备时,每 50 片外植体置于 1 个 100 mL 的三角瓶中,每瓶添

加约 50 mL 重悬的农杆菌菌液,菌液需超过外植体。于黑暗条件下共侵染 30 ~ 35 min,每隔 5 min 轻摇三角瓶 1 次以使农杆菌和外植体充分接触。侵染完成后小心倒掉多余的农杆菌菌液,在共培养培养基上平铺 1 层无菌滤纸,将浸染后的外植体向轴一侧朝下平铺于滤纸上,24℃,黑暗或弱光条件下共培养 3 d。

1.2.5 GUS 组织化学定位检测 共侵染的外植体于 24℃ 暗培养 3 d 后进行 GUS 染色。GUS 染色技术参照 Jefferson^[9]介绍的染色技术,用手术刀截取包含子叶节在内约 1/3 的外植体,置于 50 mL 无菌离心管,加入适量的 GUS 染色工作液,以完全浸没外植体为准,37℃ 避光孵育 12 h,染色后先用无水乙醇脱色 12 h,再用 75% 乙醇脱色 12 h。调查在子叶节处和整个外植体上着色的外植体数目,并统计染色率(瞬时表达率)。

1.2.6 数据获得和分析 分别选择 100 粒 Jack、中黄 10 号以及水里站的种子,于萌发培养基中培养,规定生长状态划分为标准,并分别于萌发 1,2,3,4,5 d 记录不同状态外植体的数量,并利用 SPSS 21.0 软件进行差异显著性分析。

利用不同外植体制备方法和不同受体品种制备各种状态外植体,用于瞬时表达效率分析,每个

处理选取 30 ~ 100 个外植体,并利用 SPSS 软件对所得数据进行方差分析。

2 结果与分析

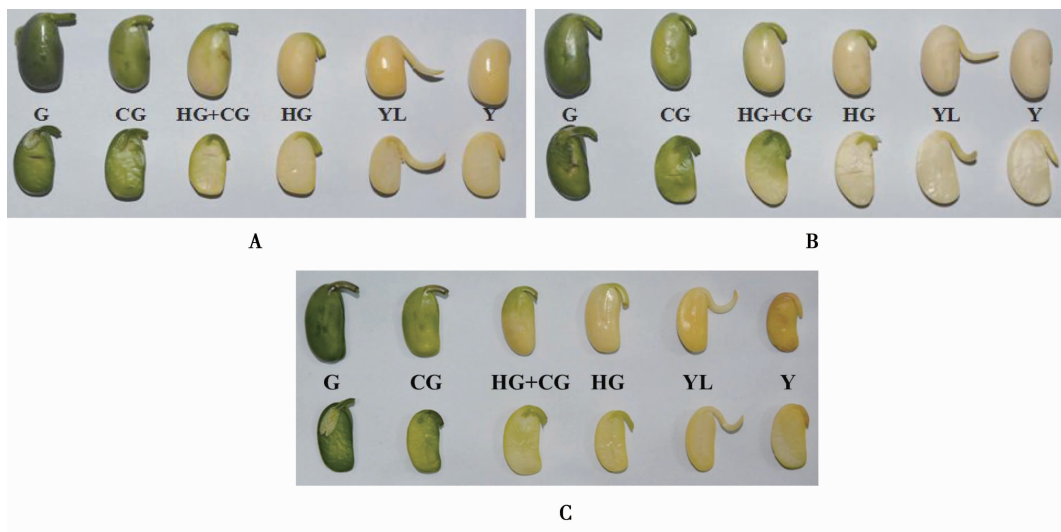
2.1 萌发状态分析

以中黄 10 号、Jack 和 水里站为受体,比较不同萌发时间下外植体状态差异,结果表明,种子的萌发状态如真叶长度、下胚轴长度、子叶颜色等具有形态多样性,本研究根据种子萌发过程中子叶、下胚轴形态和颜色的差异,将萌发种子的生长状态划分为 6 个时期(表 1,图 1),并以该划分为选择标准,用于后续的试验和分析。

表 1 外植体萌发状态划分

Table 1 The germination status of explants

类型 Type	状态描述 State description
Y	子叶黄色,下胚轴短小,且包裹在种皮中
YL	子叶黄色,下胚轴突破种皮开始弯曲生长
HG	子叶黄色,下胚轴开始变绿
HG + CG	下胚轴绿色,子叶开始变绿
CG	子叶呈均匀的浅绿色
G	子叶呈均匀的深绿色



A: Jack; B: 中黄 10 号; C: 水里站。

A: Jack; B: Zhonghuang 10; C: Shuilizhan.

图 1 外植体萌发状态

Fig. 1 The germination status

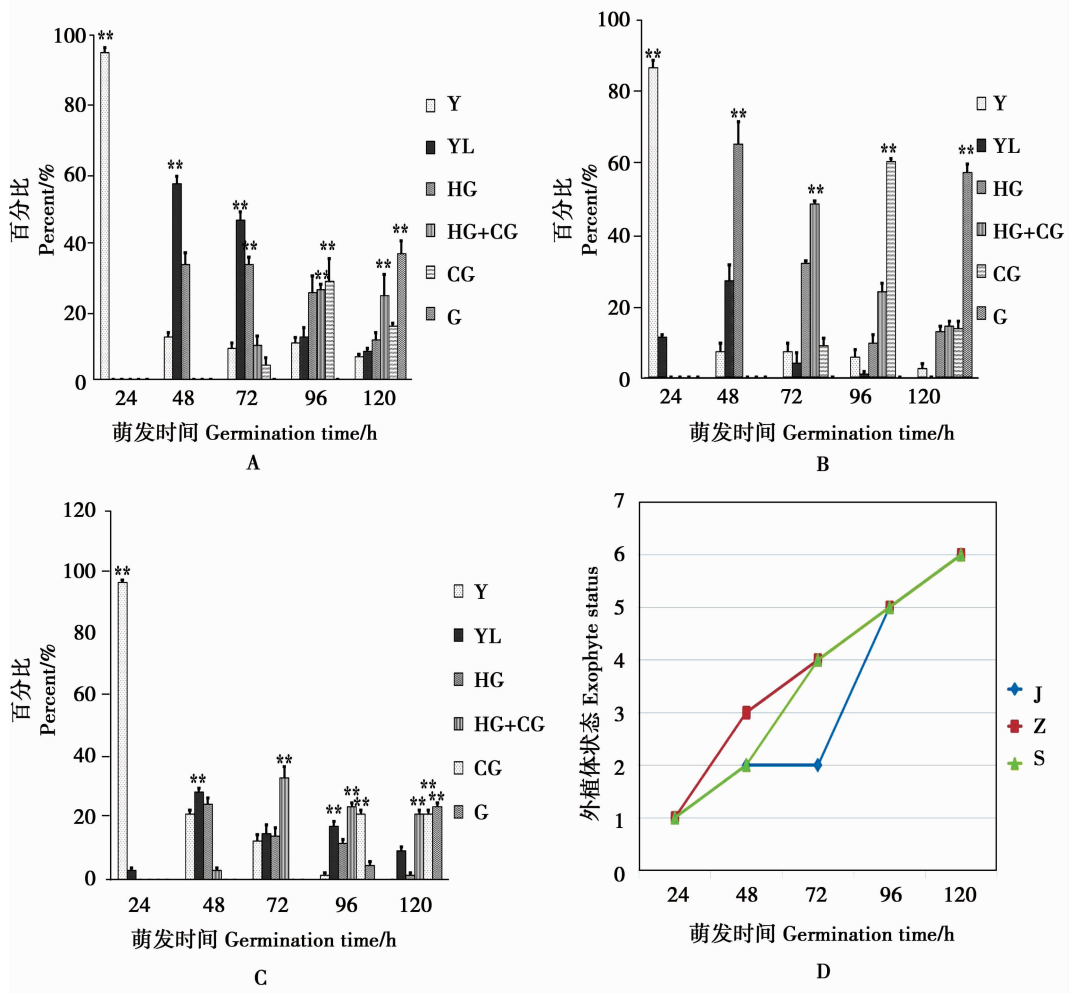
2.2 萌发状态与萌发时间的相关性分析

对 100 个种子的萌发状态进行观察,重复 3 次,对相同萌发时间、不同状态的种子数量进行统计,对外植体状态随萌发时间变化的趋势进行分析(图 2A,2B,2C):虽因品种、种子活力不同,不同状态外

植体的比例有所差异,但趋势相同,即随萌发时间增加,外植体状态发生显著变化,依次出现 Y、YL、HG、HG + CG、CG、G 共 6 种状态,且相同时间条件下,存在至少 1 种外植体状态,其数量显著高于其它状态外植体。因此,在一定程度上,可用外植体萌

发状态来指示萌发进程,进而可以作为指标,指示外植体制备的最佳时期。同时,利用该方法判断和比较 Jack、中黄 10 号及水里站的萌发速度(图 2D),结果表明,相同培养条件下,3 个品种的萌发速度由

快至慢依次为中黄 10 号、水里站、Jack,因此,在开展转化试验时应根据不同受体材料的实际萌发情况,选择合适的时期制备外植体。



A: Jack; B: 中黄 10 号; C: 水里站; J: Jack; Z: 中黄 10 号; S: 水里站; 1: Y 状态外植体; 2: YL 状态外植体; 3: HG 状态外植体; 4: HG + CG 状态外植体; 5: CG 状态外植体; 6: G 状态外植体。下同。

A: Jack; B: Zhonghuang 10; C: Shuilizhan; J: Jack; Z: Zhonghuang 10; S: Shuilizhan; 1: Y exophyte; 2: YL exophyte; 3: HG exophyte; 4: HG + CG exophyte; 5: CG exophyte; 6: G exophyte. The same below.

图 2 不同品种外植体状态随萌发时间变化趋势分析(A、B、C)及萌发进程比较(D)

Fig. 2 Analysis of the explants state trend of Jack and zhonghuang 10 and Shuilizhan with the time of germination(A, B, C) and the comparative analysis on germination rate(D)

2.3 外植体状态变化与真叶长度相关性分析

本研究选用子叶及下胚轴的形态和颜色变化来指示萌发状态,而真叶长度变化贯穿于种子萌发的整个时期,因此外植体形态及颜色变化与真叶长度的相关性是该研究的基础。分析结果显示:中黄 10 号(图 3A)品种外植体状态与真叶长度相关系数为 0.888,其外植体状态与真叶长度具有极显著相关性;同理,Jack(图 3B)及水里站(图 3C)品种外植体状态与真叶长度具有极显著相关性。所以,子叶及下胚轴颜色和状态变化在一定程度上可以指示种子萌发进程,进而可作为指标指示外植体的选择。

2.4 影响外植体瞬时表达效率的因素

受体品种、外植体状态、外植体制备方法及其间的交互作用均是影响外植体瞬时表达效率的因素,利用 SPSS 软件分析不同因素对瞬时表达效率的影响,结果表明品种、外植体状态、外植体制备方法及品种与外植体制备方法的交互、品种与外植体状态的交互、外植体制备方法与外植体状态的交互均对外植体瞬时表达效率产生显著影响,在品种、外植体制备方法等因素一定的条件下,不同状态的外植体间的染色效率具有显著性差异,说明该外植体分类方法具有实际意义,可以指示外植体的选择。

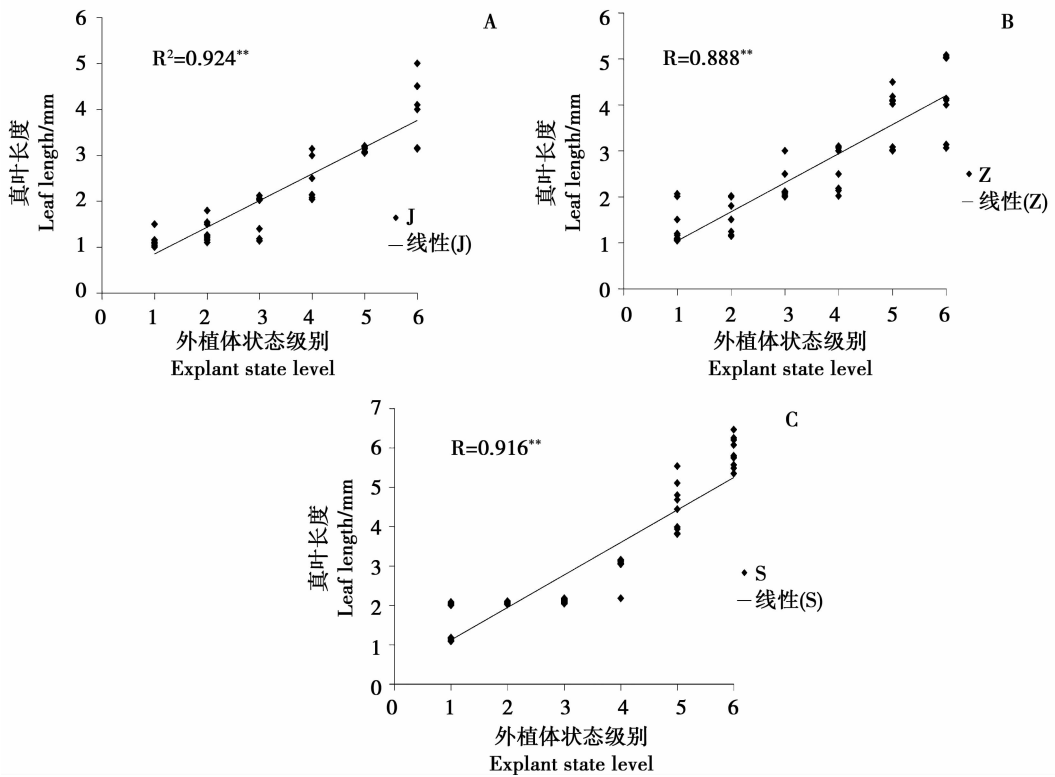


图3 Jack、中黄10号及水里站品种真叶长度与萌发状态相关性分析

Fig. 3 Correlation of leaf length and germination status of Jack and zhonghuang 10 and Shuilizhan

表2 影响外植体瞬时表达效率因素分析

Table 2 Analysis of factors influencing the transient expression efficiency of explants

变异来源 Variation source	平方和 Sum of squares	DF	均方 Mean square	F	Sig.
品种 Cultivars	1.108	2	0.554	742.001	$P < 0.001^{**}$
外植体制备方法 Explant preparation method	0.018	1	0.018	24.108	$P < 0.001^{**}$
外植体状态 Explant status	0.425	5	0.085	113.783	$P < 0.001^{**}$
品种 × 外植体制备方法 Cultivars × Explant preparation method	0.004	2	0.002	2.674	0.075
品种 × 外植体状态 Cultivars × Explant status	0.969	10	0.097	129.709	$P < 0.001^{**}$
外植体制备方法 × 外植体状态 Exophyte preparation × Explant status	0.017	5	0.003	4.514	$P < 0.001^{**}$
误差 Error	0.061	82	0.001		
总计 Total	7.544	108			

** 在 0.05 水平极显著差异。

** Highly significant difference at 0.05 level.

2.5 不同状态外植体对瞬时表达效率的影响

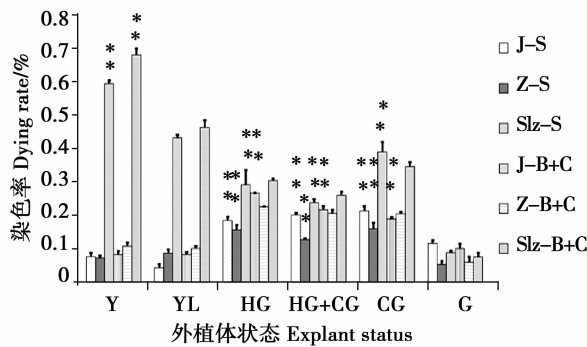
本研究以 Jack、中黄 10 号和水里站为受体,选用传统的创伤划痕法及超声波与表面活性剂协同处理两种方法制备外植体,利用 GUS 组织化学定位表达技术,分析不同外置状态对瞬时表达效率的影响(图 4)。结果表明不同品种外植体染色效率趋势存在差异,其中白色种皮的中黄 10 号和 Jack 品种

具有相似的趋势,当外植体处于 Y 和 YL 状态时,对农杆菌敏感性不足,瞬时表达效率较低,约为 10%;当外植体处于 HG、HG + CG 和 CG 3 种状态时,GUS 基因的瞬时表达效率较约为 15% ~ 30%,且瞬时表达效率在 3 种状态间无显著差异,但较 Y 和 YL 状态时显著提高;当外植体处于 G 状态时,瞬时表达效率较 HG、HG + CG 和 CG 3 种状态时显著降

低,约为5%~15%。而黑色种皮的水里站品种的外植体的染色效率具有不同的趋势,6种状态外植体间的染色效率具有显著性差异,染色效率由高至低依次为Y、YL、CG、HG、HG+CG、G。萌发初期,分生区细胞活力较高,但分生区细胞数量较少,种子良莠不齐,且外植体制备困难,随萌发时间增加,分生区细胞数量增加,但其活力开始下降,同时,可根据萌发状态筛选掉萌发质量较差的种子,且外植体制备方便,因此,不同品种在分生区细胞活力、分生区细胞数量、萌发速度等方面存在的差异导致其外植体的最佳状态存在差异。且上述结果在不同转化方法间具有类似的规律,表明不同外植体状态对农杆菌侵染效率和瞬时表达效率具有显著的影响,

外植体状态作为萌发的指示指标,有助于精确外植体制备时期的选择,从而提高农杆菌对外植体的侵染效率,有助于提高转化效率。

以GUS基因瞬时表达效率为指标,筛选出各品种瞬时表达效率较高的外植体状态,在受体品种和制备方法不同的条件下,对其染色率进行差异显著性分析(图5),结果表明不同组合间存在一定的差异,其中组合Y状态—水里站—B+C法具有显著较高的染色效率,组合Y状态—水里站—S法次之,其它组合染色效率较低且之间无显著性差异,因此,选用Y状态的水里站外植体,且利用超声波与表面活性剂协同处理法制备外植体时染色效率最高。



J: Jack; Z: 中黄 10; Slz: 水里站; S: 划痕法; B + C: 超声波和表面活性剂协同处理法。下同。

J: Jack; Z: Zhonghuang 10; Slz: Shuilizhan; S: Scratch method; B + C: Coordination treatment of ultrasonic and surface active agent. The same below.

图4 不同状态外植体对瞬时表达效率的影响

Fig. 4 Effect of different state explants on the transient expression efficiency

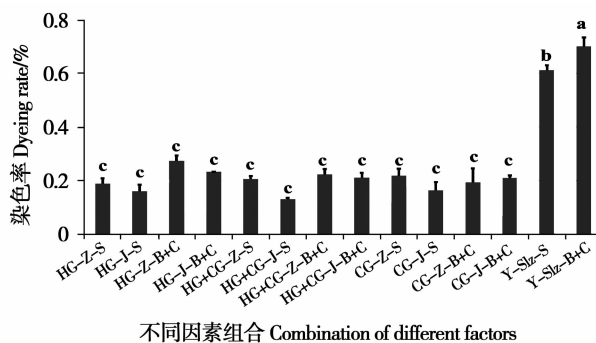


图5 不同因素组合瞬时表达效率差异分析

Fig. 5 Analysis on the difference of transient expression efficiency of different factors

3 结论与讨论

在农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化体系中,外植体与农杆菌的互作是关键,如何提高农杆菌与外植体作用效率一直是研究的关键,本研究选择外植体的颜色及状态变化这一适宜的、直观可见的指标来指示萌发进程,并探究不同状态外植体的瞬时表达效率,得到不同受体材料染色效率显著较高的

外植体状态。

外植体的侵染效率与基因型、外植体类型、外植体年龄和生长调节剂有关^[10],分生组织位于子叶~茎连接部的上方,长度约5~7 mm,直径400~420 nm^[11],随萌发时间增加,分生区细胞的再生潜力和数量发生变化,选择合适的时期(数量和活力较高的时期)进行外植体制备,可极大的提高转化效率。Baker等^[12]在农杆菌介导的向日葵子叶节转

化方面的研究表明随着再生时间增加,向日葵种子子叶节分生区细胞再生潜力降低,且萌发 1 d 的子叶节外植体最适合开展转化试验,而 Chraibi 等^[13]认为培养 2 d 的子叶节外植体转化潜力最大,Knittel 等^[14]研究发现萌发 4 d 后子叶节细胞再生能力降低,这种随着种子年龄增加再生力下降的情况在不同向日葵品种和不同物种之间存在差异^[15]。目前,对于大豆农杆菌介导的子叶节转化法外植体的选择的讨论主要集中在半粒法^[5]制备的外植体和萌发 5~7 d 的种子^[16]制备的外植体间的比较,而产生二者间差异的原因至今仍不清楚,Margie 等^[5]推测可能因为不同年龄的外植体对基因的选择不同导致。Yang 等^[17]利用萌发 1 d 的子叶节外植体和优化的转化条件,使转化效率提高至 14.71%,但萌发 1 d 的子叶节外植体的状态并不一致,含有 YL 和 HG 两种状态。在常规农杆菌介导的大豆子叶节转化法^[16]流程中,一般选取萌发 5~7 d 的种子制备外植体,以萌发时间作为外植体选择的标准,但是同一萌发条件下,不同品种萌发相同时间其状态存在一定的差异,所以该标准存在一定的缺陷和不足。也有研究中利用真叶长度指示萌发状态,但细微的真叶长度差别很难通过肉眼直观辨别。所以,本研究寻找了新的可靠的衡量指标,直观有效,为农杆菌介导的子叶节转化法提供新的思考和方向,利于农杆菌介导的大豆子叶节转化法的规范化和标准化,对提高转化效率具有重要的意义。

参考文献

[1] Jams C. 2014 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35(1): 1-14. (Jams C. Global biotechnology/GM crops commercialization development trend in 2014[J]. China Biotechnology, 2015, 35(1): 1-14.)

[2] Singh R J, Hymowitz T. Soybean genetic resources and crop improvement[J]. Genome, 1999, 42: 605-616.

[3] 于洋, 侯文胜, 韩天富. 农杆菌介导大豆遗传转化研究进展[J]. 大豆科学, 2010, 29(4): 696-701. (Yu Y, Hou W S, Han T F. Approaches to *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean[J]. Soybean Science, 2010, 29(4): 696-701.)

[4] 潘川芝, 李凤, 戴良英. 大豆子叶节离体再生体系优化研究[J]. 湖南农业科学, 2006, 36(5): 31-32. (Pan F Z, Li F, Dai L Y. Regeneration system of soybean cotyledonary nodes[J]. Human Agricultural Sciences, 2006, 36(5): 31-32.)

[5] Paz M M, Martinez J C, Kalving 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(3): 206-213.

[6] Xue R G, Xie H F, Zhang B. A multi-needle-assisted transformation of soybean cotyledonary node cells[J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(19): 1551-1557.

[7] Guo B F, Guo Y, Wang J, et al. Co-treatment with surfactant and sonication significantly improves *Agrobacterium*-mediated resistant bud formation and transient expression efficiency in soybean[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2015, 14(7): 1242-1250.

[8] Miroslav O, Milan B, Jozef S. A comparative structural analysis of direct and indirect shoot regeneration of *Papaver somniferum* L. in vitro[J]. Journal of Plant Physiology, 2000, 157(3): 281-289.

[9] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: The *GUS* gene fusion system[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1987, 5(4): 387-405.

[10] Cheng M, Chang Y F, Olhoft P M, et al. Cells/tissues conditioning for facilitating T-DNA delivery[G]. USA: Bentham Science Publishers, 2011: 77-107.

[11] 赵丽辉, 王立军. 大豆幼苗初生维管系统的解剖学研究[J]. 吉林农业大学学报, 1988, 20(1): 42-45. (Zhao L H, Wang L J. Anatomical studies on the primary vascular system of seedling of *Glycine max* (L.) Meer[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 1988, 20(1): 42-45.)

[12] Baker C M, Muñoz-Fernandez N, Carter C D. Improved shoot development and rooting from mature cotyledons of sunflower[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1999, 58(1): 39-49.

[13] Chraibi K M B, Castelle J C, Latche A, et al. Enhancement of shoot regeneration potential by liquid medium culture from mature cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.) [J]. Plant Cell Reporter, 1992(b), 10(12): 617-620.

[14] Knittel N, Escandon A S, Hahne G. Plant regeneration at high frequency from mature sunflower cotyledons[J]. Plant Science, 1991, 73(91): 219-226.

[15] Pugliesi C, Cecconi F, Mandolfo A, Baroncelli S. Plant regeneration and genetic variability from tissue cultures of sunflower (*Helianthus annuus* L.) [J]. Plant Breeding, 1990, 106(2): 114-121.

[16] Hinchee M A W, Connor-Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer[J]. Biotechnology, 1988, 6(8): 915-922.

[17] Yang X F, Yu X Q, Zheng Z, et al. A high-efficiency *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation system using cotyledonary node as explants in soybean (*Glycine max* L.) [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2016, 38: 60.