

不同大豆基因型对大豆遗传转化效率的影响及外源 T-DNA 插入分析

杨 静¹ 邢国杰¹ 杜 茜² 隋 丽² 郭东全¹ 牛 陆¹ 杨向东¹

(1. 吉林省农业科学院 农业生物技术研究所/吉林省农业生物技术重点实验室 吉林 长春 130033; 2. 吉林省农业科学院 植物保护研究所 吉林 公主岭 136100)

摘要:大豆通常被认为是较难转化的豆科作物之一,大豆基因型是影响大豆转化效率的重要因素。采用农杆菌介导大豆子叶节遗传转化方法,对2个国外大豆品种和9个国内品种进行转化研究,对转化再生植株进行 BAR 试纸条和 PCR 检测。结果表明:不同大豆品种再生率及转化效率存在显著差异。国外品种 Jack 和 Bert,南方大豆品种华春6号和东北大豆品种沈农9号具有较高的再生率和转化效率,转化效率分别达到 6.45%、3.80%、3.24% 和 2.86%。对来源于沈农9号的 PCR 阳性植株进行 Southern 杂交检测,结果表明:外源基因已导入受体大豆品种,该受体品种实际转化效率为 2.14%。对外源 T-DNA 插入结构进一步分析表明:低拷贝(1~2个) T-DNA 插入比例为 75%。本研究筛选了4个转化效率较高的大豆品种,为开展高效大豆遗传转化研究提供依据;同时,作为大豆主栽品种,利用华春6号和沈农9号作为受体品种开展转基因研究,对于加快转基因大豆新品种培育研究也具有重要的参考价值。

关键词:大豆基因型;农杆菌介导转化;转化效率;T-DNA 插入

中图分类号: S565.1 文献标识码: A DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2016.04.0562

Effects of Different Soybean Genotypes on the Transformation Efficiency of Soybean and Analysis of the T-DNA Insertions in the Soybean Genome

YANG Jing¹, XING Guo-jie¹, DU Qian², SUI Li², GUO Dong-quan¹, NIU Lu¹, YANG Xiang-dong¹

(1. Agro-Biotechnology Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences/Jilin Provincial Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Changchun 130033, China; 2. Institute of Plant Protection, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: Soybean is usually considered as a recalcitrant leguminous crop to *Agrobacterium*-mediated transformation. Soybean genotypes exert significant effects on the transformation efficiency. In this study, two abroad soybean cultivars and 9 domestic cultivated soybeans were employed for *Agrobacterium*-mediated transformation. PCR and LibertyLink strip analysis on the regenerated plants showed that different soybean genotypes exhibited significant differences in both regeneration and transformation rates. Among them, Jack, Bert, Huachun 6 and Shennong 9 showed higher transformation efficiency than other 7 cultivars with 6.45%, 3.80%, 3.24% and 2.86% of transformation rate. Southern blot analysis was also carried out for the PCR-positive plants derived from Shennong 9. The results showed the integration of T-DNA in the soybean genome with 2.14% of transformation rate obtained for the recipient cultivar. Further analysis showed that 75% of the transgenic plants tested contained low copies(1-2) T-DNA insertions. Taken together, in this study, four soybean cultivars with high transformation rates were selected for *Agrobacterium*-mediated transformation, Huachun 6 and Shennong 9 could be further utilized for development of transgenic soybean cultivars.

Keywords: Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] genotypes; *Agrobacterium*-mediated transformation; Transformation rate; T-DNA insertions

高效、稳定的大豆遗传转化技术是开展转基因大豆研究的核心问题之一^[1]。尽管目前已发展了多种大豆转化及再生技术体系,但农杆菌介导转化方法仍然是大豆遗传转化的主流。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,转化效率相对较高^[1],二是外源 T-DNA 插入拷贝数较低,结构简单,外源基因发生沉默的比例较低^[2]。不过,与水稻、百脉根等作物相比较,大豆转化率仍然较低,仍

被认为是较难转化的豆科作物之一^[3]。

影响大豆遗传转化效率的因素包括大豆基因型、农杆菌菌株类型、抗氧化剂、筛选剂、激素类型和浓度等^[1,4-5]。大豆基因型可能是影响大豆转化效率最重要的因素之一^[6]。已有研究表明,农杆菌介导转化法具有一定的基因型特异性,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^[7]。Simmonds 等^[8]对 12 个大豆品种进行了遗传转化,不同基因型之间 *GUS* 基因瞬时转化率的

收稿日期:2016-01-18

基金项目:国家转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08004-004);吉林省科技发展计划项目(20150204011NY);吉林省农业科技创新工程项目。

第一作者简介:杨静(1982-),女,硕士,助理研究员,主要从事大豆转基因育种研究。E-mail: jinggyang@126.com。

通讯作者:杨向东(1976-),男,博士,副研究员,主要从事大豆生物技术育种研究。E-mail: xyang020918@126.com。

变化范围为 27%~92% ,且只有 Accolibri 品种获得了稳定遗传的转基因植株。马晓丽等^[9]利用农杆菌介导的大豆子叶节转化法对 4 种不同的大豆基因型品种转化 *GUS* 基因 ,达到了不同的瞬时表达效率。Owens 和 Cress^[10]通过对 24 个栽培大豆品种和 3 个野生大豆株系进行转化研究 ,筛选出 3 个对农杆菌 A348 高度易感的栽培品种 (Biloxi、Jupiter 和 Peking) 和 1 个野生品种 (PI3931693B) 。贾光蕾等^[11]从 10 个大豆品种中筛选出 1 个转化效率较高的大豆品种东农 50 ,PCR 阳性率达 7.1% 。综合已有的研究报道 ,不同大豆基因型对农杆菌的敏感程度和转化率存在明显的差异。已有的大豆遗传转化研究主要是根据 *GUS* 染色或 PCR 检测结果确定转化效率 ,但转化植株中存在嵌合体 and 农杆菌污染等问题导致假阳性的比例较高 ,难以确定实际大豆遗传转化效率。

本研究选取 11 种不同的大豆品种 ,研究不同大豆基因型对农杆菌介导大豆遗传转化效率的影响 ,并利用 Southern 杂交确定大豆品种的实际转化效率和外源 T-DNA 插入拷贝数 ,以期筛选适合于遗传转化的大豆主栽品种 ,为加快转基因大豆新品种培育提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

农杆菌 EHA105; 植物表达载体 *pTF101-ubi3-HrpZm* (携带目的基因 *hrpZm* ,植物筛选标记为 *bar*) ; 11 个供试品种中 Jack 和 Bert 为国外大豆品种 ,沈农 9 号、沈农 12、合丰 25、合丰 39、绥农 14、吉育 89 和吉育 47 为东北大豆品种 ,中黄 46 为黄淮海大豆品种 ,华春 6 号为南方大豆品种。试验中所用的培养基基础成分、植物激素、抗生素、草丁膦等购自美国 Phyto Technology Laboratories 和 Sigma 公司。试验中使用的培养基成分见表 1 ,萌发培养基为 GM 培养基 ,诱导培养基为 SIM 培养基 ,伸长培养基为 SEM 培养基 ,生根培养基为 RM 培养基。BAR 试纸条 (LibertyLink strips ,Envirologix ,USA) ; Hybood TM-N + 尼龙膜 (Amersham ,USA) ; DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 试剂盒 (Roche) ; DIG 随机引物标记试剂盒 (Roche) ; BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒 (Roche) 。

1.2 农杆菌介导大豆子叶节遗传转化

采用农杆菌介导的大豆子叶节转化方法^[12] ,转化流程见图 1。

1.2.1 外植体制备与共培养 挑选颗粒饱满的成熟大豆种子 ,经次氯酸钠和浓盐酸混合液 (100:3.5)

消毒灭菌 10~12 h 后 ,放入萌发培养基 GM 中 ,23℃ 黑暗培养 8~12 h。用解剖刀沿中轴线将大豆种子分成两瓣完整的子叶 ,并将胚芽去掉 ,放入用 CCM 液体培养基重悬的农杆菌菌液中 ,60 r·min⁻¹ 震荡 30 min ,去种皮 ,放于 CCM 固体培养基中 (琼脂粉浓度为 5 g·L⁻¹) ,于 23℃ 条件下暗培养 5 d。

1.2.2 丛生芽的诱导 将外植体胚轴前端切去 ,留 1~2 cm ,近轴面朝上转移至含有 5 mg·L⁻¹ 草丁膦的诱导培养基 SIM 中 ,25℃ ,16 h/8 h 光暗条件下培养。14 d 继代 1 次 ,28 d 后统计丛生芽诱导率。丛生芽诱导率 (%) = (产生丛生芽的外植体数 / 接种外植体数) × 100。

1.2.3 丛生芽的伸长及再生 将诱导产生丛生芽的外植体接种到含有 5 mg·L⁻¹ 草丁膦的 SEM 伸长培养基中培养 ,培养条件为 25℃ ,16 h/8 h 光暗周期。待丛生芽伸长 2 cm 以上时切下 ,放入 RM 生根培养基中继续培养。待主根及侧根长出后 ,取上部叶片 (1 × 1) cm² 进行 BAR 试纸条检测 ,计算再生率及转化效率。再生率 (%) = 生根苗数 / 接种外植体数 × 100 ,转化效率 (%) = BAR 试纸条阳性数 / 接种外植体数 × 100。每个品种 3 次重复 ,每次重复大约 50 块外植体。

1.3 PCR、BAR 试纸条及草丁膦涂抹检测

对移栽至温室的 T₀ 代转化苗采用 PCR 和 BAR 试纸条检测。采用 DNA 快速提取法提取转化植株叶片 DNA^[13] ,进行 PCR 扩增。根据植物表达载体 *pTF101-ubi3-HrpZm* 中目的基因 *hrpZm* 及上游启动子 *Gmubi3* 序列设计特异性检测引物。上游引物 5'-CGCATTATCAGCAGACGCTCC-3' ; 下游引物 5'-AT-TACCCGTGTCATAGGCACCAAG-3'。大豆内源基因 *Gmactin* 检测的上游引物 5'-TTGACTGAGCGTGCT-TATTCC-3' ,下游引物 5'-GATCTTCATGCTGCTGGGTG-3'。PCR 程序为: 95℃ 5 min ; 94℃ 45 s ,58℃ 45 s ,72℃ 2 min ,共 35 个循环 ; 72℃ 延伸 10 min。BAR 试纸条检测方法参照产品说明书 ,对检测结果呈阳性的植株使用 500 mg·L⁻¹ 的草丁膦涂抹叶片。

1.4 转基因大豆植株 Southern blot 检测

选取 T₁ 代 PCR 和试纸条检测阳性大豆植株进行 Southern 杂交检测。采用高盐 CTAB 法提取转基因大豆和非转化大豆叶片总 DNA^[14]。利用 *Hind* III 酶切总 DNA (50 μg)。采用高盐转移法纯化酶切片段 ,将酶切片段转移至带正电荷的 Hybood TM-N⁺ 尼龙膜上。根据载体质粒 *HrpZm* 基因序列设计引物 ,上游引物 5'-GCACCATCGTCAACCACTA-CATCGAG-3' ,下游引物 5'-TGAAGTCCAGCTGC-CAGAAACCCAC-3' ,并扩增探针模板。利用 DIG 随

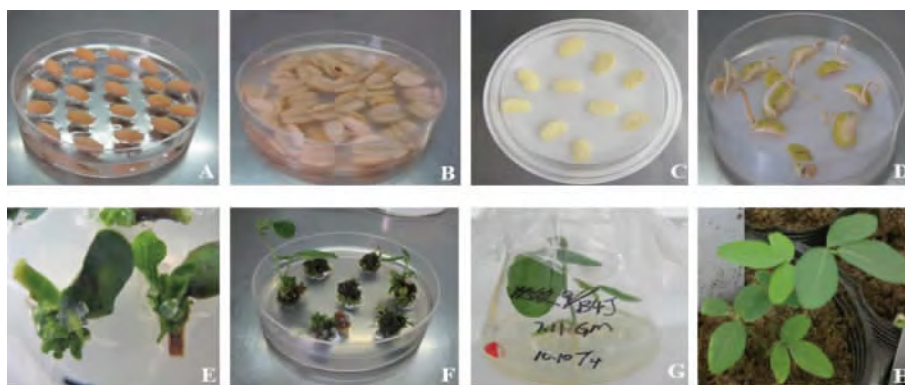
机引物标记试剂盒标记 *hrpZm* 基因探针进行检测。探针制备及杂交程序根据 DIG High Prime DNA Labeling and Detection StarterKit II 试剂盒说明书进行。杂交温度为 42℃,洗膜条件为 2 × SSC (0.1%

SDS) 37℃洗膜 2 次,每次 5 min; 0.5 × SSC(0.1% SDS) 66℃洗膜 2 次,每次 15 min。然后利用 BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒在杂交膜上化学显色。

表 1 大豆子叶节遗传转化培养基

Table 1 Culture mediums used in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean

	GM	CCM	SIM	SEM	RM
MS 合成盐 MS salt mixture	-	-	-	1 ×	1/2 ×
B ₅ 合成盐 B ₅ salt mixture	1 ×	1/10 ×	1 ×	-	-
2-(4-吗啉)乙磺酸 MES/g·L ⁻¹	-	3.90	0.59	0.59	0.59
6-苄基腺嘌呤 6-BAP/mg·L ⁻¹	-	1.67	1.67	-	-
赤霉素 GA ₃ /mg·L ⁻¹	-	0.25	-	0.50	-
乙酰丁香酮 AS/mg·L ⁻¹	-	39.24	-	-	-
L-半胱氨酸 L-Cys/mg·L ⁻¹	-	400.00	-	-	-
二硫苏糖醇 DTT/mg·L ⁻¹	-	154.20	-	-	-
替卡西林 Tic/mg·L ⁻¹	-	-	250.00	250.00	250.00
头孢霉素 Cef/mg·L ⁻¹	-	-	100.00	100.00	100.00
L-天冬酰胺 L-Asp/mg·L ⁻¹	-	-	-	50.00	50.00
谷氨酰胺 Glu/mg·L ⁻¹	-	-	-	50.00	50.00
草丁膦 Glufosinate/mg·L ⁻¹	-	-	5.00	5.00	-
吲哚乙酸 IAA/mg·L ⁻¹	-	-	-	0.10	-
玉米素 ZR/mg·L ⁻¹	-	-	-	1	-
吲哚丁酸 IBA/mg·L ⁻¹	-	-	-	-	1
蔗糖 Sucrose(w/v)	2.00	3.00	3.00	3.00	2.00
琼脂 Agar/g·L ⁻¹	-	4.50	8.00	8.00	-
植物凝胶 Phytagar /g·L ⁻¹	3.00	-	-	-	3.00
pH	5.80	5.40	5.70	5.70	5.60



A: 种子萌发; B: 农杆菌侵染; C: 共培养; D: 共培养 5 d 后; E: 丛生芽诱导; F: 丛生芽伸长; G: 转化苗再生; H: 移栽。

A: Germinated soybean seeds; B: Infection with *A. tumefaciens*; C: Co-cultivation; D: Co-cultivation after 5 days; E: Induced green shoots; F: Elongated shoots; G: Regenerated plantlets; H: The plants transported in greenhouse.

图 1 农杆菌介导大豆遗传转化流程

Fig. 1 *Agrobacterium*-mediated transformation process of soybean

2 结果与分析

2.1 不同大豆基因型丛生芽诱导率和再生率的比较

转化细胞能否再生及再生频率是影响大豆转化效率提高的关键因素^[1]。在农杆菌侵染条件下, 转化细胞的再生率更是直接影响转化效率的高低。在农杆菌侵染及 5 mg·L⁻¹ 草丁膦的筛选条件下, 研究 11 种不同大豆基因型诱导率和再生率, 结果表明: 11 种大豆基因型均可以被诱导, 但只有 6 种基因型可以再生为完整的小植株(图 2)。合丰 25 和

中黄 46 诱导率较低, 分别为 30.16% 和 45.99%, 诱导率较高的品种有 Jack、Bert 和沈农 9 号, 分别达到 92.93%、82.68% 和 84.28%, 其余 6 个大豆品种的诱导率均在 70% 左右。从再生率上看, 沈农 9 号、沈农 12、吉育 47、华春 6 号、Jack 和 Bert 6 个品种可以获得再生苗, 再生率分别达到 7.08%、2.86%、5.45%、8.59%、18.87% 和 21.11%。其中 Jack 和 Bert 两个品种的再生率相对较高, 其次是华春 6 号和沈农 9 号。诱导率相对较高的大豆品种其再生率也相对较高。

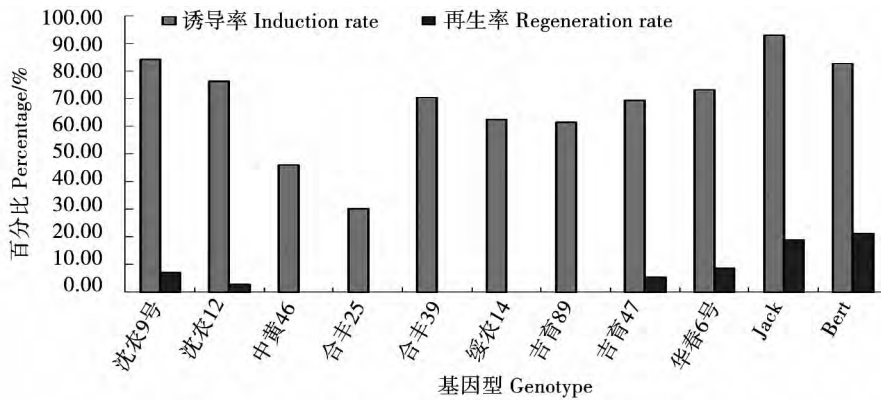


图 2 不同基因型的诱导率及再生率

Fig. 2 Induction and regeneration rates of 11 soybeans

2.2 不同大豆基因型对农杆菌介导大豆转化效率影响

农杆菌对大豆子叶节的侵染及其组织再生性都存在很大的品种依赖性^[15], 因而基因型成为大豆遗传转化技术中的关键因素, 并直接影响转化效率。在转化的 11 个品种中, 沈农 9 号、沈农 12、吉育 47、华春 6 号、Jack 和 Bert 可以再生。对可以再生的转化苗, 采用简单快捷的 BAR 试纸条检测方法进行检测并计算其转化效率, Jack 和 Bert 的转化效率相对较高, 分别为 6.45% 和 3.80%, 其次是北方品种沈农 9 号和南方品种华春 6 号, 分别为 2.86% 和 3.24%, 沈农 12 和吉育 47 没有获得 BAR 试纸条检测阳性转化植株(图 3)。对检测结果呈阳性的植株使用草丁膦涂抹叶片, 叶片涂抹结果与 BAR 试纸条检测结果均呈阳性的植株 13 份(图 4A 和 B)。对其中 BAR 试纸条检测比较明显的 12 份材料进行 *hrpZm* 基因的 PCR 检测, 获得 PCR 阳性材料 10 份(图 4C)。从检测结果可以看出 BAR 试纸条的检测方法与 PCR 检测结果并不完全一致。

基因型的报道^[15], 沈农 9 号为东北地区的优良主栽品种, 作为大豆受体基因型进行遗传转化还未有过报道, 因此进一步以沈农 9 号为基因型扩大外植体数量进行转化, 最终确定其稳定的转化效率。

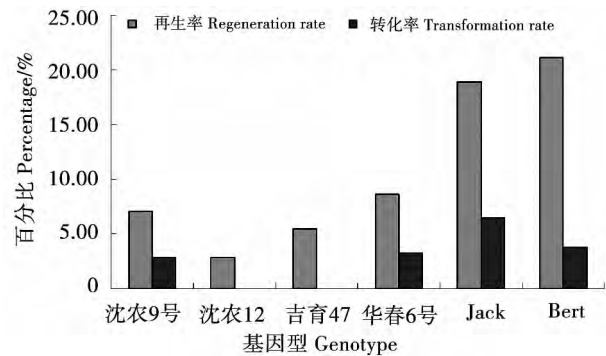


图 3 不同基因型的再生率及转化率

Fig. 3 Regeneration and transformation rates of 6 soybean genotypes

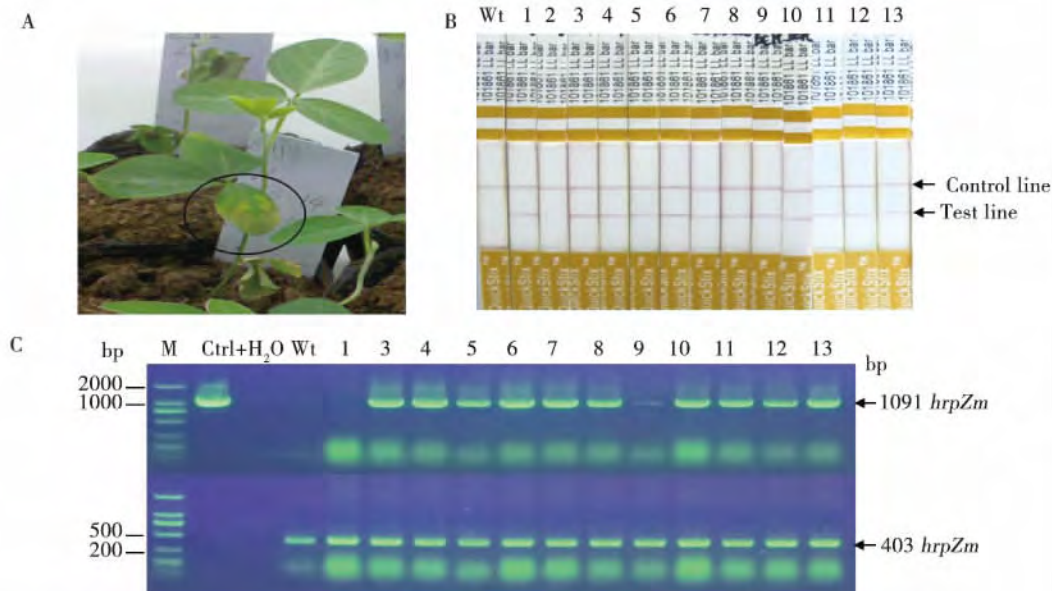
2.3 Southern 杂交检测转化效率和拷贝数

为进一步明确 PCR 和 BAR 试纸条检测 T₀ 代阳性植株是否为转基因植株以及大豆实际转化效率, 采用 Southern 杂交进一步确定鉴定结果。共转化沈农 9 号外植体 561 块, 获得 BAR 试纸条与 PCR 阳性植株 15 株, 转化率为 2.67%, 与除草剂涂抹筛选试验中沈农 9 号 2.86% 的转化率十分接近。在检测

通过对转化效率的比较, 本试验从 11 种不同大豆基因型中初步筛选了沈农 9 号、华春 6 号、Jack、Bert 4 种转化效率较高的大豆基因型。Jack 和 Bert 为大豆遗传转化的常用品种, 也有筛选出华春 6 号

的 T_0 代 15 株阳性植株中,有 12 个为 T_1 代 Southern 杂交阳性株系, Southern 杂交阳性率为 80% (图 5)。表明在本试验条件下,并不是所有的 T_0 代 PCR 和 BAR 试纸条检测阳性的植株,都能获得 Southern 杂交阳性的 T_1 代株系。在 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 草丁膦筛选条件下,部分再生植株出现逃逸和假阳性现象,其原因可能是由于再生植株中存在嵌合体现象,或是由于

农杆菌污染造成的。结合 Southern 杂交检测结果,本研究确定沈农 9 号实际转化频率为 2.14%,另外,本试验结果也表明,外源 T-DNA 插入拷贝数均较低,其中 1~2 拷贝的转基因植株为 9 个,占 Southern 杂交阳性植株的 75%,与 Olhoft 等^[16]报道的结果一致。

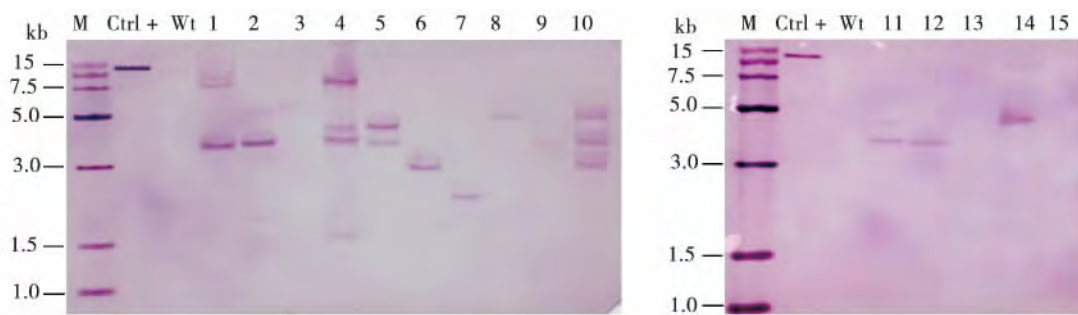


A: 除草剂 ($500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BASTA) 涂抹筛选; B: BAR 试纸条检测; C: PCR 检测; M: DNA 标准分子量; Ctrl+: 阳性质粒对照; Wt: 未转化植株; 1~2: 沈农 9 号转化植株; 3~7: Jack 转化植株; 8~10: Bert 转化植株; 11~13: 华春 6 号转化植株。

A: Herbicide spraying with $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BASTA; B: Detected by LibertyLink strips; C: Detected by PCR; M: DNA marker; Ctrl+: Positive control; Wt: Untransformed plants; 1-2: Plants derived from the soybean cultivar Shengnong 9; 3-7: Plants derived from Jack; 8-10: Plants derived from Bert; 11-13: Plants derived from Huachun 6.

图 4 T_0 代转化再生植株 BAR 试纸条和 PCR 检测

Fig. 4 T_0 regenerated plants detected by LibertyLink strips and PCR



M: DNA 标准分子量; Ctrl+: 阳性对照质粒; Wt: 非转化植株; 1~15: T_1 代转基因株系。

M: DNA marker; Ctrl+: Positive control; Wt: Wild type; 1-15: The T_1 transgenic plants.

图 5 T_1 代转基因大豆 Southern 杂交检测

Fig. 5 Southern blot analysis of the T_1 transgenic plants

3 结论与讨论

转基因育种技术已经成为培育大豆新品种的一种重要方式,近年来商业化的转基因大豆品种主要是由农杆菌介导法转化而来。而农杆菌介导的

大豆转化体系具有较高的基因型依赖性。本研究选用 2 个国外大豆品种和 9 个国内品种进行农杆菌介导转化研究,在转化过程中,诱导率较高的基因型,其再生率也相对较高,但再生率较高的,其转化效率不一定高。共筛选出了 Jack、Bert、华春 6 号和

沈农 9 号 4 种适宜转化的大豆基因型,其中沈农 9 号为东北地区的大豆品种,其再生率达到 7.08%,转化率达到 2.86%,均为相对较高的水平。沈农 9 号作为我国东北地区主栽大豆品种,利用其作为受体品种进行遗传转化,可以不经过杂交或回交转育,直接选育目标性状突出、综合性状优良的转基因大豆事件,从而大大加快转基因大豆新品种选育进程。

本研究采用了 BAR 试纸条、PCR 和 Southern 杂交 3 种检测方式,对转化沈农 9 号的再生植株进行检测,BAR 试纸条检测快速方便,但是其只能确定 *bar* 基因的表达却不能代表目的基因的导入情况,通过 PCR 初步检测了目的基因的导入,但在 T_0 代的检测中,可能会由于农杆菌菌液的污染而导致假阳性,因而进一步对 T_1 代转基因株系的单株进行了 Southern 杂交检测,确定了其实际的转化效率 2.14%,并不是所有的 T_0 代转基因阳性植株在 T_1 代都能获得阳性转基因株系。本研究检测的 Southern 杂交阳性率为 80%,同时确定了外源 T-DNA 的整合情况和拷贝数。

Olhoft 等^[16]对 270 个 T_0 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%。本研究利用 Southern 杂交鉴定确定外源 T-DNA 插入拷贝数均较低,其中 T-DNA 插入拷贝数为 1~2 个的比例为 75%,与 Olhoft 等报道一致。结合已有的研究结果,可见农杆菌介导大豆遗传转化外源 T-DNA 插入拷贝数较低,结构简单。另一方面,低拷贝 T-DNA 插入可以大大加快优异转化事件的纯合,降低外源基因或片段在转基因植株中易出现目的基因发生丢失或沉默,并导致转基因后代遗传不稳定现象的发生^[17]。

参考文献

- [1] 杨向东,隋丽,李启云,等. 大豆遗传转化技术研究进展[J]. 大豆科学,2012,31(2): 302-310. (Yang X D, Sui L, Li Q Y, et al. Recent advances in soybean transformation[J]. Soybean Science, 2012, 31(2): 302-310.)
- [2] Olhoft P M, Flagel 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 李艳超,赵青松,王凤敏,等. 大豆遗传转化技术研究进展[J]. 大豆科学,2015,34(1): 156-161. (Li Y C, Zhao Q S, Wang F M, et al. Research progress on soybean genetic transformation technology[J]. Soybean Science, 2015, 34(1): 156-161.)
- [6] 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.
- [7] Jurgen 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.
- [8] Simmonds D H, Donaldson P A. Genotype screening for proliferative embryogenesis and biolistic transformation of short-season soybean genotypes[J]. Plant Cell Reports, 2000, 19(5): 485-490.
- [9] 马晓丽,冯小锋,杨清华,等. 影响大豆遗传转化主要因素及相关条件优化[J]. 浙江农业学报,2013,25(6): 1183-1188. (Ma X L, Feng X F, Yang Q H, et al. Optimization of main factors and relevant conditions affecting soybean *Agrobacterium*-mediated transformation system[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2013, 25(6): 1183-1188.)
- [10] Owens L D, Cress D E. Genotypic variability of soybean response to *Agrobacterium tumefaciens* strains harboring Ti or Ri plasmids[J]. Plant Physiology, 1985, 77: 87-94.
- [11] 贾光蕾,曹越平. 一种高效的农杆菌介导大豆子叶节转化体系的建立[J]. 上海交通大学学报(农业科学版),2012,30(4): 43-46. (Jia G L, Cao Y P. Optimization of *Agrobacterium*-mediated soybean transformation of cotyledonary-node[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University(Agricultural Science), 2012, 30(4): 43-46.)
- [12] Paz M, Shou H, Guo Z, et al. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant[J]. Euphytica, 2004, 136: 167-179.
- [13] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis[J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19(6): 1349.
- [14] Tel-Zur N, Abbo S, Myslabodski D, et al. Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of the genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae)[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1999, 17: 249-254.
- [15] 翟锐,高乐,丁雪妮,等. 农杆菌介导大豆子叶节遗传转化体系的优化[J]. 大豆科学,2015,34(5): 768-774. (Zhai R, Gao L, Ding X N, et al. Optimization of cotyledonary-node *Agrobacterium*-mediated soybean transformation system[J]. Soybean Science, 2015, 34(5): 768-774.)
- [16] Olhoft P M, Flagel 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.
- [17] Meyer P. Transcriptional transgene silencing and chromatin components[J]. Plant Molecular Biology, 2000, 43: 221-234.