

通过构建三段 T-DNA 载体高频率获得无标记转基因大豆植株的研究 Obtaining Marker-free Transgenic Soybean Plants with Optimal Frequency by Constructing Three T-DNAs Binary Vector

叶兴国^{1*}, 秦 华^{1,2}

YE Xing-Guo^{1*} and QIN Hua^{1,2}

1 中国农业科学院作物科学研究所/国家基因资源与基因改良重大科学工程/农业部作物遗传育种重点实验室,北京 100081

2 宁夏大学农学院,宁夏银川 750021

1 Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/ The National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement/ Agricultural Ministry Key Lab for Crop Genetics and Breeding, Beijing 100081, China

2 Agricultural College, Ningxia University, Yinchuan 750102, China

摘 要 高频率获得无选择标记转基因植株有利于转基因植物的环境释放和安全性生产,农杆菌介导的共转化法是获得无标记转基因植株的方法之一。含二段 T-DNA 载体的共转化法已被人们成功应用,而二段以上 T-DNA 载体的共转化法还未见报道。基于这一目的,通过几个中间质粒构建了含有三段 T-DNA 的双元表达载体 pNB35SVIP1,其中包含 1 个拷贝 *bar* 基因选择标记基因表达盒和 2 个拷贝 *VIP1* 目的基因表达盒。利用 EHA101 农杆菌菌系介导法转化大豆子叶节,经过在含 3 ~ 5mg/L glufosinate 培养基上多次筛选,获得了一定数量抗性再生植株,然后对抗性再生植株进行叶片涂抹除草剂、Southern blot 和 Northern blot 检测,共鉴定出 51 棵 T₀ 代转基因植株,转化频率 0.83% ~ 3.16%,二个基因的共转化频率为 86.4%。在对 T₁ 代群体进行叶片涂抹除草剂检测的基础上,不抗除草剂植株进行 PCR、Southern blot 和 Northern blot 检测,共鉴定出 41 棵无选择标记转基因植株,无标记植株获得率为 7.6%。检测结果还表明,T₁ 代群体中 22.7% 的株系发生了基因丢失现象,27.3% 的株系发生了 *bar* 基因沉默现象,目的基因在 37.1% 的无标记植株中发生了沉默现象。三段 T-DNA 的双元表达载体是获得无标记转基因植株的理想途径。

关键词 大豆,农杆菌,三段 T-DNA 载体,转化,无标记转基因植株

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)01-0138-07

Abstract Obtaining marker-free plants by high efficiency will benefit the environmental release of transgenic crops. To achieve this point, a binary vector pNB35SVIP1 with three T-DNAs was constructed by using several mediate plasmids, in which one copy of *bar* gene expression cassette and two copies of *VIP1* gene expression cassette were included. EHA101 *Agrobacterium* strain harboring the final construct was applied to transform soybean (*Glycine max*) cotyledon nodes. Through 2 ~ 3 months regeneration and selection on 3 ~ 5mg/L glufosinate containing medium, transgenic soybean plants were confirmed to be obtained at 0.83% ~ 3.16%, and co-transformation efficiency of both gene in the same individual reached up to 86.4%, based on southern blot test. By the analysis of PCR, southern blot and northern blot combining with leaf painting of herbicide in T₁

Received: July 31, 2005; Accepted: October 17, 2006.

* Corresponding author. Tel: +86-10-6891-9765; Fax: 86-10-6897-5212; E-mail: yexg@mail.caas.net.cn

progenies, 41 plants were confirmed to be eliminated of *bar* gene with the frequency of 7.6%. Among the T₁ populations tested, the loss of the alien genes happened in 22.7% lines, the silence of *bar* gene took place in 27.3% lines, and *VIP1* gene silence existed in 37.1% marker-free plants. The result also suggested that the plasmid with three T-DNAs might be an ideal vector to generate marker-free genetic modified organism.

Key words *Glycine max*, *Agrobacterium tumefaciens*, transformation, marker-free plants, three T-DNAs vector

20 世纪以来, 基因工程育种一直被认为是改良植物产量、品质和抗逆性的有效途径。事实上, 利用基因工程育种技术已经培育了一些转基因植物新品种, 如转基因大豆、棉花、玉米和油菜等, 并在生产实践中得到了大面积应用^[1-3]。尤其近 5 年来, 植物转基因研究的发展非常迅速, 利用转基因方法培育的植物品种逐年增加^[4]。同时, 由于很多国家政府和消费者对转基因植物安全性的重视, 以及转基因植物内在的安全性障碍, 多数转基因植物品种难以获准商业化生产。其中, 筛选标记基因的存在是转基因植物安全性的最大隐患之一。目前为止, 人们先后提出了几种获得无筛选标记转基因植物的技术, 包括共转化法(co-transformation)^[5-7], 定位重组体系(site-specific recombination)^[8,9], 多元自动转化载体系统(multi-auto-transformation vector)^[10], 转座子系统(transposition system)^[11] 和同源重组体系(homologous recombination)^[12]等, 但只有共转化法应用最为成功。利用基因枪介导法将分别携带目的基因和标记基因的二个质粒载体混合转入细胞, 可以在 T₁ 代或 T₂ 代分离后代中获得无标记转基因植株, 但无标记植株获得频率比较低^[13]。利用分别含有不同双元表达载体的农杆菌混合侵染植物细胞^[5-7]、同时含有 2 个不同双元表达载体的农杆菌侵染植物细胞^[14]或含有二段 T-DNA 双元表达载体的农杆菌侵染植物细胞^[5,15-17], 由于目标基因和选择标记基因位于不同载体或不同 T-DNA 上, 后代中能够获得无标记转基因植株, 无标记植株获得频率同样比较低。本研究构建了包含三段 T-DNA 的双元表达载体, 其中的一段 T-DNA 区域含标记基因, 另外二段 T-DNA 区域含目标基因, 用其转化大豆 (*Glycine max*) 后较高频率获得了无标记转基因植株。

1 材料与方法

1.1 载体和菌系

本研究利用的 pRTL2、pZP100 和 pPTN200 表达载体由美国内布拉斯加州立大学提供, Topo 克隆载

体购自有关生物技术公司, 用于构建分别包含 VirE 互作结合蛋白编码基因(VirE interaction protein, *VIP1*) 和 *bar* 选择标记基因的多段 T-DNA 载体。

大肠杆菌菌系 DH5 α 和农杆菌菌系 EHA101^[18] 由本实验室保存, DH5 α 用于载体扩增和鉴定, EHA101 用于大豆转化。

1.2 大豆材料及其农杆菌转化

用于本研究的大豆品种 Thorne 再生性能优良, 对农杆菌感染比较敏感, 由美国内布拉斯加州大豆协会提供。成熟大豆种子置于密闭容器中, 同时在容器中放入一盛有 100mL 次氯酸钠和 3.3mL 浓盐酸(12mol/L)的小烧杯, 用氯气灭菌 24h 左右, 更换次氯酸钠和浓盐酸后用新产生的氯气再灭菌 24h 左右。然后将种子接种在 B5 基本培养基上, 光照条件下培养 5d, 无菌苗 4℃低温处理 1d。

从大豆无菌苗上切取 0.5 ~ 1.0cm 长的子叶节连同完整子叶, 将子叶节沿子叶方向均匀切开, 小心切去小真叶, 沿子叶节长度方向将芽点划伤 5 ~ 6 刀, 按照 Hinchee 等^[19]描述的方法对大豆子叶节进行农杆菌转化, 其中, 利用 glufosinate 作为 *bar* 标记基因的筛选剂^[16,17,22,23]。大豆外植体与农杆菌经过 3d 光照培养, 转移到含 6-BA 1.67mg/L、glufosinate 5.0mg/L、Cefotaxime 50mg/L、ticarcillin 50mg/L、vancomycin 50mg/L 的 B5 培养基上光照条件下培养 4 周诱导丛生芽, 然后将丛生芽转移到含 ZA 1.0mg/L、GA₃ 0.5mg/L、IAA 0.1mg/L、glufosinate 3.0mg/L、Cefotaxime 50mg/L、ticarcillin 50mg/L、vancomycin 50mg/L 的 MS 培养基上光照培养 4 ~ 6 周促进丛生芽伸长。抗性再生芽高度 3 ~ 4cm 时, 从基部切断, 转移到含 NAA 1.0mg/L 的 MS 培养基上诱导根, 2 ~ 3 周后及时移栽到花盆中。

1.3 分子检测

参照 Dellaporta 等^[20]和 Sambrook 等^[21]描述的方法分别从转基因植株叶片中提取基因组 DNA 和总 RNA, 对 T₀ 代、T₁ 代转基因植株进行 PCR、Southern blot 和 Northern blot 等检测。VIP1 基因上游 PCR 引物为 5'-TCATGACATGTTGATTCGCAAGAAACC-3', 下游

PCR 引物为 5'-TCTAGATCAGCCTCTCTTGGTAAAAT-3'。bar 基因上游 PCR 引物为 5'-AAGCACGGTCAAC TTCCGTA-3', 下游 PCR 引物为 5'-GAAGTCCAGCT GCCAGAAAC-3'。PCR 扩增体系为 25 μ L, 包括 2.5 μ L buffe(10 \times), 2.0 μ L dNTPs(2mmol/L), 2.0 μ L primers(0.1 μ g/ μ L) 0.2 μ L Taq(5u/ μ L)。扩增条件为先 94 $^{\circ}$ C 变性 5min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 55 $^{\circ}$ C 复性 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2min, 共计 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段。以从相应克隆载体上酶切、回收的 VIP1 基因和 bar 基因片段作为探针, 用³²P 进行标记, 按照 Zhang 等^[22]描述的方法对经 Sst I 酶切 16~17h 的基因组 DNA 进行 Southern blot 分析, 利用相同探针按照 Xing 等^[16]和 Sato 等^[17]描述的方法对 RNA 进行 Northern blot 分析。

1.4 叶片涂抹除草剂检测

用棉签蘸取 0.1% 的 Liberty 除草剂溶液涂抹 T₀ 代和 T₁ 代转基因植株幼嫩叶片, 3d 后调查涂抹植株对除草剂的反应。

2 结果与分析

2.1 含三段 T-DNA 载体的构建和鉴定

将从拟南芥 cDNA 文库中克隆的 VIP1 基因(783bp)连接到 Topo 载体(3.9kb)上装备酶切位点。用 EcoR I 酶切一级重组质粒 pTopo-VIP1, 回收 810bp 的 VIP1 基因片段, 将其连接到 pRTL2(3.9kb)载体上以获得花椰菜花叶病毒 35S 基因启动子和终止子。用 Pst I 酶切二级重组质粒 pE35S-VIP1, 回收 2.2kb 的 VIP1 基因完整表达盒, 连接到 pZP100(6.6kb)双元表达载体上装备 T-DNA 左、右边界序列。用 Sca I 酶切三级重组质粒 pZP100-VIP1, 回收 3.7kb 的包含 VIP1 基因完整表达盒的 T-DNA 区段, 连接到另外一个双元表达载体 pPTN200(8.7kb)上获得 bar 基因筛选标记独立 T-DNA 表达框, 并最终构建含多个 T-DNA 的载体。连接产物转化大肠杆菌, 共获得了 12 个克隆, 其中一个克隆经 Pst I 酶切片段大小分别为 0.6kb、2.2kb、2.8kb 和 8.5kb, 经 Hind III 酶切片段大小分别为 0.5kb(3 个相同片段)、6.2kb 和 8.5kb, 经 BamH I 酶切片段大小分别为 2.9kb、3.9kb 和 9.4kb, 经 Sca I 酶切片段大小分别为 3.8kb(2 个相同片段)和 8.6kb, 经 Sst I 酶切片段大小分别为 2.7kb、4.3kb 和 9.2kb, 经 EcoR V 酶切片段大小分别为 4.5kb 和 11.7kb, 经 EcoR I 酶切片段大小分别为 0.8kb(2 个

相同片段)、1.3kb、4.2kb 和 9.1kb。经分析确认, 该克隆为含有三段 T-DNA 的重组载体, 其中, 一段 T-DNA 上含有 bar 基因表达盒, 另二段 T-DNA 上含有 VIP1 基因表达盒, 命名为 pNB35SVIP1(图 1)。

2.2 T₀ 代转基因大豆植株的获得和鉴定

利用三亲交配法将所构建的含三段 T-DNA 的载体 pNB35SVIP1 转入 EHA101 农杆菌菌系, 进行大豆子叶节农杆菌转化。经过在含 Glufosinate 除草剂培养基上 3~4 个月的筛选, 从 12 批转化实验中共获得了 84 棵抗性再生植株, 移栽成活后进行叶片涂抹 Liberty 除草剂检测, 其中的 59 棵表现抗性。先后以 bar 基因和 VIP1 基因作探针对抗性植株进行 Southern blot 检测, 全部 59 棵确认为 bar 基因阳性植株, 其中的 51 棵确认为 VIP1 基因阳性植株, 二个基因的共转化率为 86.4%, 阳性植株分别含有 1~9 拷贝的转入基因片段, 杂交片段大小为 2.7kb~19.0kb, 转化效率 0.83%~3.16%(图 2, 表 1)。Northern blot 检测结果表明, VIP1 基因在 24 棵阳性植株中得到了表达, 如 SV5-2、SV4-4、SV3-9、SV2-3、SV9-1 等, 在另外 27 棵阳性植株中没有表达, 如 SV4-2、SV6-1、SV1-9、SV1-10、SV4-8、SV12-2 等, 发生 VIP1 基因沉默现象的植株占 52.9%(图 3)。

2.3 无标记转基因植株筛选

T₁ 代植株 3~4 周大小时先进行叶片涂抹除草剂筛选(图 4), 除草剂敏感植株进行 VIP1 基因 PCR 检测(图 5), 初步筛选可能的无标记转基因植株。进一步对可能的无标记转基因植株进行 bar 基因和 VIP1 基因双引物 PCR 扩增检测(图 6), 并分别以 bar 基因和 VIP1 基因为探针进行 Southern blot 检测(图 7)。对来自于 22 个独立转化子的 539 棵 T₁ 代转基因植株先后进行了叶片涂抹除草剂、PCR 和 Southern blot 检测, 共筛选出 41 棵无标记转基因植株(VIP1⁺ bar⁻, 表 2), 如 V7-6、V7-10、V7-13 和 V7-16(图 7), 无标记转基因植株获得率为 7.6%。在鉴定出的 41 棵无标记转基因植株中, 20 棵来自于 SV3-17 株系, 10 棵来自于 SV4-2 株系, 5 棵来自于 SV4-4 株系, 4 棵来自于 SV4-8 株系, 1 棵来自于 SV1-11 株系, 1 棵来自于 SV2-2 株系。同时, 鉴定出 82 棵植株含有 bar 基因而不含有 VIP1 基因(VIP1⁻ bar⁺), 149 棵植株同时含有二个基因(VIP1⁺ bar⁺), 267 棵植株既不含 VIP1 基因也不含 bar 基因(VIP1⁻ bar⁻)。结果表明, T₁ 代群体中标记基因和目的基因发生分离的频率为 22.6%, 标记基因和

目的基因均丢失的频率为 49.5% 标记基因和目的基因连锁遗传的频率为 27.6%。SV5-2、SV2-3、SV9-1 和 SV12-2 株系中的全部植株,以及 SV3-6、SV5-1、SV2-2 和 SV6-1 株系中的多数植株,发生了外源转入基因丢失现象。在 SV1-14、SV2-10、SV1-2、SV4-4、

SV2-1、SV3-9、SV4-2 和 SV4-8 株系中的多数植株中,标记基因和目的基因紧密连锁遗传。另外,SV1-1、SV1-5、SV3-6、SV5-1、SV1-9 和 SV6-1 株系中的全部阳性植株只含标记基因而不含目的基因。

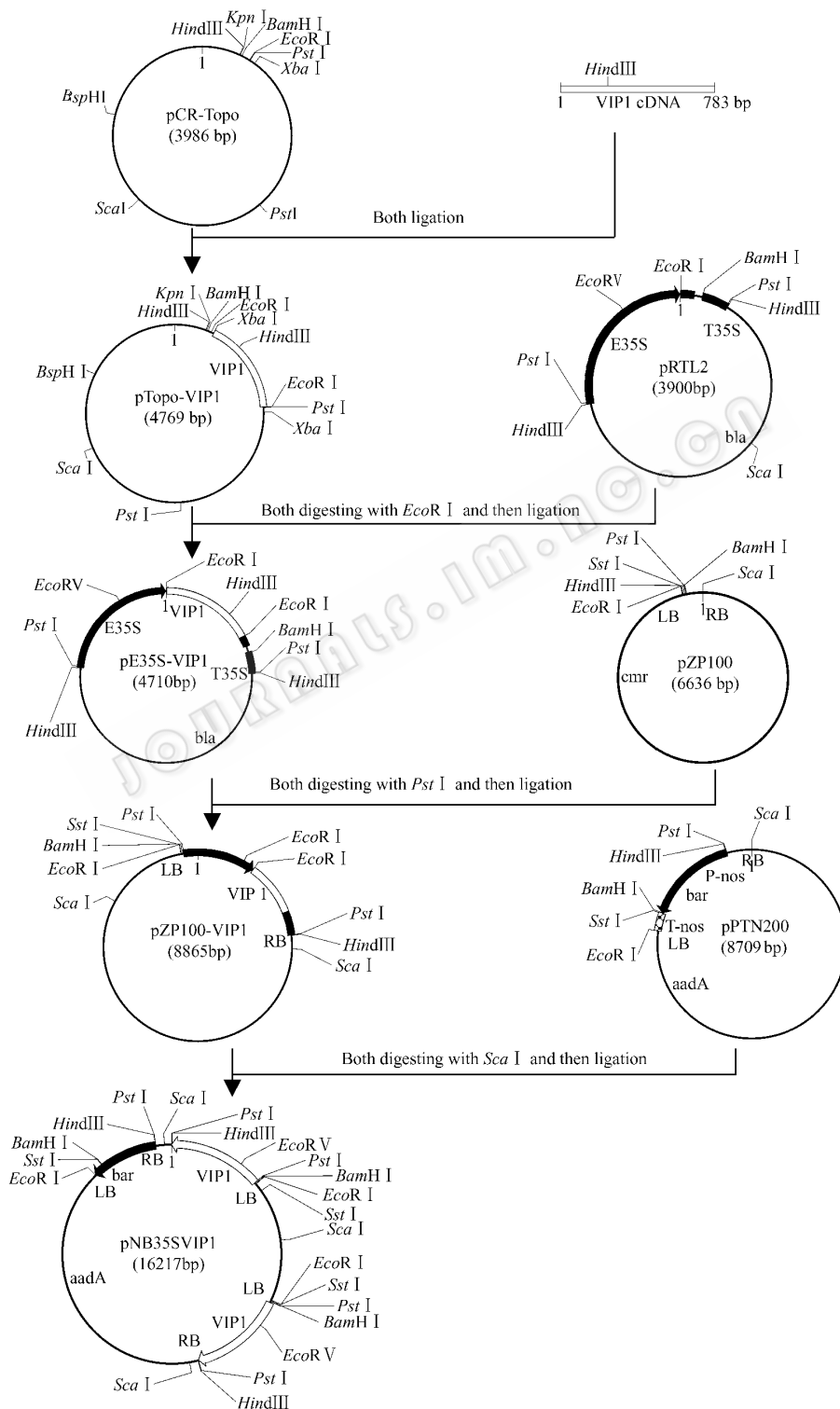


图 1 三段 T-DNA 载体 pNB35SVIP1 构建过程

Fig. 1 Constructing process of pNB35SVIP1 vector with three T-DNAs

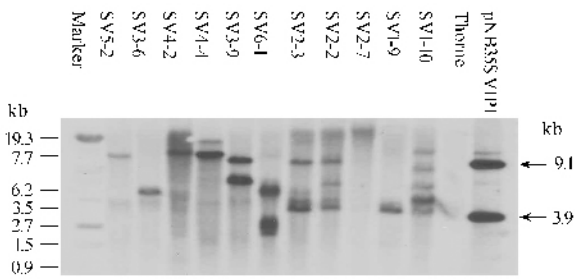


图2 T₀代植株 Southern blot 检测分析

Fig. 2 Southern blot analysis of putative primary T₀ transformants
* pNB35SVIP 1 : positive control ; Thorne : negative control ; Probe : VIP1 gene.

表1 T₀代转基因大豆植株获得情况

Table 1 Transgenic soybean plants obtained from each experiment

Experiment	Explants cultured	Positive plants obtained	Transformation frequency/%
SV1	285	9	3.16
SV2	250	5	2.00
SV3	270	7	2.59
SV4	300	6	2.00
SV5	245	4	1.63
SV6	285	3	1.01
SV7	240	2	0.83
SV8	250	3	1.20
SV9	280	4	1.43
SV10	140	2	1.43
SV11	100	2	2.00
SV12	200	4	2.00
Total	2845	51	1.79



图4 T₁代无标记植株的叶片涂抹除草剂筛选

Fig. 4 Possible marker-free plants screened out in T₁ progenies by leaf painting

* Herbicide sensitive plant was pointed by arrow , which was marker-free or alien gene empty.

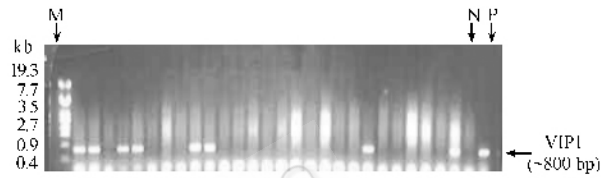


图5 T₁代无标记植株植株 VIP1 基因的 PCR 筛选

Fig. 5 PCR analysis of herbicide sensitive T₁ plants for VIP1 gene

* M : marker ; N : negative control ; P : positive control.

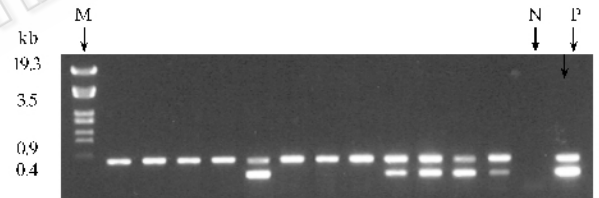


图6 T₁代无标记植株植株 VIP1 基因和 bar 基因的 PCR 筛选

Fig. 6 PCR analysis of herbicide sensitive and VIP1 positive T₁ plants for both genes

* M : marker ; N : negative control ; P : positive control.

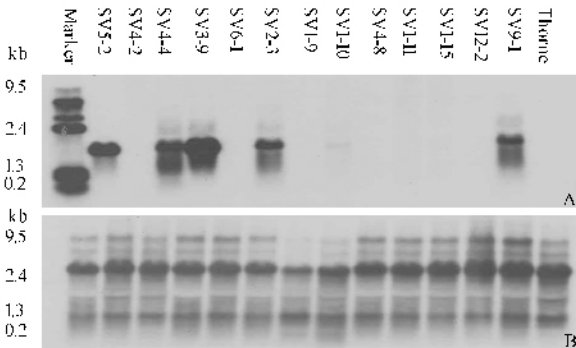


图3 T₀代植株 Northern blot 检测分析

Fig. 3 Northern blot analysis of putative primary T₀ transformants

A : probed with VIP1 gene ; B : probed with rDNA.

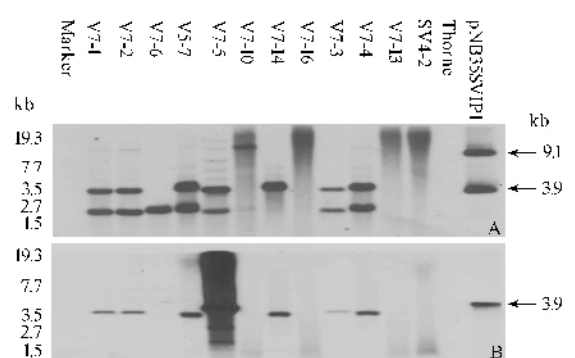


图7 T₁代无标记植株 Southern blot 鉴定分析

Fig. 7 Southern blot analysis of putative primary T₁ marker-free plants

A : probed with VIP1 gene ; B : probed with bar gene ; pNB35SVIP1 : positive control ; Thorne : negative control.

表 2 T₁ 代株系中 4 种基因型植株的检测结果
Table 2 Genetic analysis of T₁ populations by molecular tests

ID of T ₀	Plants tested	VIP1 ⁺ bar ⁺	VIP1 ⁺ bar ⁻	VIP1 ⁻ bar ⁺	VIP1 ⁻ bar ⁻
SV1-1	30	0	0	13	17
SV3-6	28	0	0	7	21
SV1-10	4	0	0	0	4
SV1-2	29	19	0	2	8
SV4-4	25	16	5	2	2
SV5-1	30	0	0	8	22
SV4-2	29	13	10	2	4
SV2-1	26	18	0	3	5
SV5-2	28	0	0	0	28
SV2-3	28	0	0	0	28
SV3-9	27	18	0	0	9
SV1-5	28	0	0	19	9
SV1-9	18	0	0	9	9
SV2-2	28	0	1	6	21
SV6-1	25	0	0	5	20
SV4-8	18	13	4	1	0
SV1-11	7	5	1	0	1
SV9-1	22	0	0	0	22
SV12-2	25	0	0	0	25
SV1-14	28	25	0	3	0
SV2-10	28	22	0	2	4
SV3-17	28	0	20	0	8
Total	539	149	41	82	267

3 讨论

重组表达载体 pNB35SVIP1 上的 VIP1 基因来源于拟南芥,由 783 个核苷酸组成。根据 Tzfira 等^[24,25]研究,VIP1 基因编码的蛋白质与 VirE2-T-DNA 复合体结合,促进 T-DNA 从植物细胞质向细胞核的运输,以及向染色体上的整合。转 VIP1 反义基因烟草植株与未转基因对照烟草植株相比,被野生型农杆菌侵染后冠瘿瘤形成数目明显减少。RT-PCR 分析结果表明,转基因植株这种对农杆菌敏感性的降低与其体内 VIP1 基因转录水平的减弱密切相关。相反,转 VIP 基因烟草植株与对照烟草植株相比,对农杆菌侵染的敏感性明显增强,GUS 基因瞬间表达率和稳定转化率明显提高^[24,25]。将 VIP1 基因转入大豆,培育无筛选标记的转 VIP1 基因大豆材料,势必会有助于大豆转化率的提高。基于上述目的,我们构建了包含三段 T-DNA 的植物表达载体,以获得无筛选标记的转 VIP1 基因大豆植株。研究结果表明,T₁ 代群体中只含 VIP1 目的基因而不含 bar 标记基因的植株(VIP1⁺ bar⁻)占 7.6%,在一些株系中 VIP1⁺ bar⁻ 植株的比率达 14.3% 以上,如 SV4-8 株系达 22.2%,SV4-2 株系达 34.5%,SV3-17 株系达 71.4%。在所检测的 22 个 T₁ 代株系中,6 个

株系中获得了无筛选标记转基因植株(占 27.3%),8 个株系中目的基因和标记基因紧密连锁(占 36.4%)6 个株系中目的基因和标记基因全部丢失(占 27.3%)。目的基因和标记基因在 15 个株系中发生了分离,占 68.2%。证明包含三段 T-DNA 的质粒是利用农杆菌转化法获得无筛选标记转基因植株的理想表达载体。本研究获得的无标记转 VIP1 基因大豆植株正在自交纯合,然后将用于再转化的受体材料,验证 VIP1 基因在大豆遗传背景中的功能。

本研究除了发现 T-DNA 在 T₁ 代群体中较高频率丢失现象外,还发现 VIP1 基因在 T₀ 代和 T₁ 代,以及 bar 在 T₁ 代较高频率的沉默现象。其中,VIP1 基因在 52.9% 的 T₀ 代阳性植株中发生了沉默,在 36.1% 的 T₁ 代无标记转基因植株中发生了沉默。在检测的 22 个独立 T₁ 代转基因株系中,bar 基因在 6 个株系的全部阳性植株中发生了沉默(占 27.3%),在 2 个株系的部分阳性植株中发生了沉默(占 9.1%)。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Crawley MJ, Brown SL, Hails RS, et al. Biotechnology-transgenic
© 中国科学院微生物研究所编印 2001 年 4 月 409/682-683. im. ac. cn

- [2] Keller B , Carabias EH. Transgenic plants for sustainable crop production. In *Crop Sciences : Progress and Prospects* , pp. 351 – 367 , 2001 .
- [3] James C. Global status of commercialized transgenic crops. ISAAA Briefs No. 27. ISAAA , Ithaca , NY , 2005 .
- [4] Conner AJ , Glare TR , Nap TP. The release of genetically modified crops into the environment. *Plant Journal* , 2003 , **33** : 19 – 46 .
- [5] Depicker G , Herman L , Jacobs A , *et al.* Frequencies of simultaneous transformation with different T-DNAs and their relevance to *Agrobacterium*/plant cell interaction. *Mol Gen Genet* , 1985 , **201** : 477 – 484 .
- [6] McKnight T , Lillis M , Simpson R. Segregation of genes transferred to one plant cell from two separate *Agrobacterium* strains. *Plant Mol Biol* , 1987 , **8** : 439 – 445 .
- [7] De BM , Debrouwer D. Two T-DNAs co-transformed into *Brassica napus* by a double *Agrobacterium* infection are mainly integrated at the same locus. *Theor Appl Genet* , 1991 , **82** : 257 – 263 .
- [8] Dale E , Ow D. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1991 , **88** : 10558 – 10562 .
- [9] Gleave A , Mitra D , Mudge S , *et al.* Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing : transient expression of cre recombinase and use of a conditional lethal dominant gene. *Plant Mol Biol* , 1999 , **40** : 223 – 235 .
- [10] Ebinuma H , Sugita K , Matsunaga E , *et al.* Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1997 , **94** : 2117 – 2121 .
- [11] Goldsbrough A , Lastrella C , Yoder J. Transposition mediated repositioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato. *Bio/Technology* , 1993 , **11** : 1286 – 1292 .
- [12] John I , Andrew Y , Goldsbrough P. Transformation system for generating marker-free transgenic plants. *Bio/Technology* , 1994 , **12** : 263 – 267 .
- [13] Yohichi W , Motoyasu O , Koh I , *et al.* Co-integration , co-expression and co-segregation of an unlinked selectable marker gene and NtFAD3 gene in transgenic rice plants produced by particle bombardment. *Genes Genet Syst* , 1998 , **73** : 219 – 226 .
- [14] Daley M , Knauf V , Summerfelt K , *et al.* Co-transformation with one *Agrobacterium tumefaciens* strain containing two binary plasmids as a method for producing marker-free transgenic plants. *Plant Cell Rep* , 1998 , **17** : 489 – 496 .
- [15] Komari T , Hiei Y , Saito Y , *et al.* Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J* , 1996 , **10** : 165 – 174 .
- [16] Xing AQ , Zhang ZY , Shirley S , *et al.* The use of the two T-DNA binary system to drive marker-free transgenic soybeans. *In vitro Cell Dev Biol- Plant* , 2000 , **36** : 456 – 463 .
- [17] Shirley S , Xing AQ , Ye XG , *et al.* Production of γ -linolenic acid and stearidonic acid in seeds of marker-free transgenic soybean. *Crop Sci* , 2004 , **44** : 646 – 652 .
- [18] Hood E , Helmer G , Fraley R , *et al.* The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J Bacteriol* , 1986 , **168** : 1291 – 1301 .
- [19] Hinchee M , Ward D , Newell C , *et al.* Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Bio/Technology* , 1988 , **6** : 915 – 922 .
- [20] Dellaporta S , Wood J , Hicks J. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol Biol Rep* , 1983 , **1** : 19 – 21 .
- [21] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor , 1989 .
- [22] Zhang ZY , Xing AQ , Tom C. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. *Plant Cell , Tissue and Organ Culture* , 1999 , **56** : 37 – 46 .
- [23] Clemente T , LaVallee B , Howe A , *et al.* Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybean derived from *Agrobacterium*-mediated transformation. *Crop Sci* , 2000 , **40** : 797 – 803 .
- [24] Tzfira T , Vaidya M , Citovsky V. VIP1 , an Arabidopsis protein that interacts with *Agrobacterium* VirE2 , is involved in VirE2 nuclear import and *Agrobacterium* infectivity. *EMBO J* , 2001 , **20** : 3596 – 3607 .
- [25] Tzfira T , Vaidya M , Citovsky V. Increasing plant susceptibility to *Agrobacterium* infection by overexpression of the Arabidopsis nuclear protein VIP1. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2002 , **99** : 10435 – 10440 .