

# 农杆菌介导的苜蓿子叶节转化体系的优化

麻冬梅<sup>1</sup>, 李会文<sup>2</sup>, 郭林娜<sup>2</sup>, 金凤霞<sup>1</sup>, 许兴<sup>1,2</sup>

(1. 宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏大学 生命科学学院, 宁夏 银川 750021)

**摘 要:**以苜蓿品种“金皇后”为试材,以苜蓿子叶节为受体,通过农杆菌介导的转化方法,研究了抑菌浓度、子叶节生理期、侵染时间、共培养时间等因素对苜蓿子叶节遗传转化的影响,进而探索最佳转化条件,为建立高效的苜蓿子叶节遗传转化体系奠定基础。结果表明:用活化的OD<sub>600</sub>为0.6左右的农杆菌菌液进行浸染时,最佳受体材料为生长9日龄的子叶节,最佳浸染时间为20 min,共培养时间为3 d,头孢霉素的抑菌浓度为500 mg/L。

**关键词:**苜蓿子叶节;农杆菌介导法;转化体系

**中图分类号:**S 541<sup>+</sup>.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)15-0109-05

苜蓿(*Medicago sativa*)为世界上分布最广的一种牧草,具有营养丰富、适口性好、蛋白质含量高和易于消化等特点,享有“牧草之王”的美誉<sup>[1]</sup>。作为世界上重要的牧草作物,随着草场的退化和耕地面积的日益减少而日渐匮乏,不断培育优质、高产、多抗的苜蓿新品种成为国内外苜蓿研究工作者关注的热点问题。苜蓿是多年生异花授粉植物,自交结实率低,仅通过常规育种进行品种改良非常缓慢,随着分子生物学的快速发展,结合基因工程技术来培育新品种能加速育种进程,可以更有效地选育出目标品种<sup>[2]</sup>。

植物遗传转化方法有多种,其中农杆菌介导的转化系统,由于具有转化机制比较清楚、操作简单、转化效率高优点,成为当前植物遗传转化中应用最广的转化方法<sup>[3]</sup>。该技术也是苜蓿基因转化中应用较成熟的途径<sup>[4]</sup>。但是农杆菌介导的植物遗传转化是一个复杂的过程,受多种因素影响,转化效率较低一直是限制苜蓿基因改良的一个重要因素。传统的基于愈伤组织再生系统的农杆菌转化系统在紫花苜蓿的遗传转化中由于受基因型的限制,存在着再生困难、转化周期长、不稳定等缺点。该研究以前期所建的苜蓿子叶节器官直接再生体系为转化受体系统<sup>[5]</sup>,具有不受基因型限制、再生

时间短等优点,解决了愈伤组织再生系统中的一些问题。但是在转化系统方面,由于不同的受体和菌种对转化都有影响,而且目前对以子叶节器官直接再生体系为转化受体系统的研究还鲜见报道。因此借鉴农杆菌转化的一般程序对其遗传转化的条件进行优化,以期构建一套高效的紫花苜蓿遗传转化体系,从而为苜蓿基因工程育种奠定技术基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试植物材料为苜蓿品种“金皇后”;农杆菌转化的受体材料为苜蓿子叶节。

质粒载体:农杆菌菌株 COR308(抗性为 G20T5)和目标载体 GY41 由中国农业大学郭岩教授惠赠。



培养基: M: MS + 30 g/L 蔗糖 + 7.5 g/L 琼脂, pH 5.8。M1: MS + 500 mg/L CH + 20 mg/L Hyg + 500 mg/L 头孢霉素(Cef) + 30 g/L 蔗糖 + 7.5 g/L 琼脂, pH 5.8。M2: MS + 500 mg/L CH + 20 mg/L Hyg + 300 mg/L Cef + 30 g/L 蔗糖 + 7.5 g/L 琼脂, pH 5.8。LB 培养基: 10 g/L Bacto-tryptone + 5 g/L Bacto-yeast extract + 10 g/L NaCl + 7 g/L 琼脂, pH 7.0。

### 1.2 试验方法

1.2.1 表达载体的鉴定 挑取农杆菌单菌落接种于 5 mL 含有 50 mg/L Kan 的 LB 液体培养基中, 28℃ 180 r/min 恒温振荡培养过夜后, 取 1~2 μL 菌液稀释为 100 倍体积, 作为菌液 PCR 的模板 DNA, 进行 PCR 鉴定。PCR 反应体系为: 2 × EcoTaq PCR Super Mix 12.5 μL, 20 μmol/L PI 1.0 μL, 20 μmol/L PII 1.0 μL, 菌液

**第一作者简介:**麻冬梅(1978-),女,宁夏银川人,博士,讲师,现主要从事植物抗逆分子生物学研究工作。E-mail:mdm319@tom.com。

**责任作者:**许兴(1959-),男,博士,教授,博士生导师,现主要从事作物逆境生理及生物技术育种研究工作。

**基金项目:**国家“十一五”科技支撑计划资助项目(2011BAC07B03);国家“973”资助项目(2012CB114204);宁夏自治区农发办资助项目(NTKJ-2012-12)。

**收稿日期:**2013-03-07

2.0  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu\text{L}$ , 总体积 25  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为:95℃预变性 15 min;94℃变性 30 s,57℃退火 48 s,72℃延伸 1 min,30 个循环,72℃延伸 5 min。

1.2.2 抗生素抑菌浓度的确定 配置抗生素梯度浓度液体培养基:该试验中,将头孢霉素设 8 个浓度:100、200、300、400、500、600、700、800 mg/L,将不同浓度的 LB 液体培养基分别分装进小三角瓶中,每瓶 20 mL。无菌的牙签挑取农杆菌单菌落,放入不同浓度的培养基中,放入摇床震荡培养。培养条件:28℃,200 r/min,暗培养 24 h。取经培养后的 LB 液体培养基 2 mL,在波长 600 nm 下紫外分光光度计测定 OD<sub>600</sub> 值。每个处理重复 3 次。以未加菌液的液体 LB 为空白,未加抗生素的液体 LB 为对照。

1.2.3 侵染时间对转化效率的影响 农杆菌过夜培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.5,在室温下 4 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,然后用侵染液体培养基重悬,侵染时间分别为 1、20、40、60、80、100 min,共培养 3 d,转接入 M1 培养基上,10 d 后转入 M2 培养基上,10 d 后统计抗性苗。

1.2.4 不同时期的子叶节对转化效率的影响 取 3、4、5、6、7、8、9、10 日龄(日龄从种子接种开始计算)的子叶节,农杆菌菌液 OD<sub>600</sub> 为 0.5,侵染时间为 20 min,在共培养培养基 M 上共培养 3 d,转入 M1 培养基上,10 d 后转入 M2 培养基上,10 d 后统计抗性苗。

1.2.5 共培养时间对转化效率的影响 取 7 日龄的子叶节,农杆菌菌液 OD<sub>600</sub> 为 0.5,侵染时间为 20 min,在共培养培养基 M 上共培养 1、2、3、4、5、6、7 d,转入 M1 培养基上,10 d 后转入 M2 培养基上,10 d 后统计抗性苗。

1.2.6 抗性苗的获得及生根 子叶节与农杆菌共培养 3 d 后,在子叶节边缘与培养基接触处出现少量肉眼可见的乳白色微菌落时,将子叶节转接入加有抗生素的筛选培养基中,进行脱菌和筛选培养,培养 15 d 后,再次将诱导出芽的子叶节转接到继带培养基(降低抗生素的浓度)上促使芽伸长,筛选培养进行 4 周后,将子叶节上所诱导出来的不定芽切下,小心移入生根培养基中诱导生根(1/2MS 培养基+250 mg/L Cef)。待幼苗长势良好,根系较发达时,取出小苗,洗净根须上粘连的培养基,用营养液水培进行练苗。练苗 3 d 后,移栽至装有营养土的花盆中,备后期检测使用。

## 2 结果与分析

### 2.1 表达载体的鉴定

由图 1 可知,表达载体进行菌液 PCR 检测,可以得到目的条带,表明含有目的基因 GY1(537 bp)、GY2(786 bp)、GY3(454 bp)、GY4(586 bp)、Hyg(528 bp)的表达载体没有发生丢失现象,可用于遗传转化。

### 2.2 抗生素抑菌浓度的确定

外植体与农杆菌共培养后,其表面及浅层组织中共

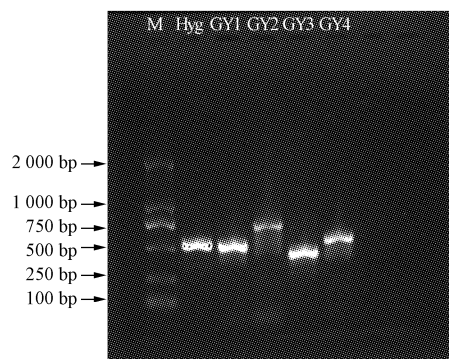


图 1 表达载体的 PCR 鉴定

Fig. 1 PCR identification of expression vector

生有大量农杆菌,为了杀灭和抑制农杆菌的生长必须进行脱菌培养。所谓脱菌培养,就是把共培养后的外植体转移到含抑菌抗生素的培养基上培养的过程,其中必须有一个适合的抗生素浓度范围,保证抗生素在能够有效地抑制农杆菌菌株生长的前提下,最大限度地降低对外植体生长的影响。因此,必须确定抗生素的最低抑菌浓度。

不同浓度头孢霉素培养基中接种农杆菌,28℃培养 24 h 后,阳性对照管变混浊,阴性对照管清亮透明。图 2 抑菌试验结果表明,Cef 浓度在 400 mg/L 以下时,OD 值还很大,不能抑制农杆菌的生长,当 Cef 浓度为 500 mg/L 时,OD 值为 0.052,继续增加头孢霉素的浓度,OD 值的变化不大,说明 Cef 浓度在 500 mg/L 就能抑制农杆菌菌株的生长。因此选用 Cef 浓度为 500 mg/L 做抑菌浓度,后期随着培养时间延长可适当降低浓度。

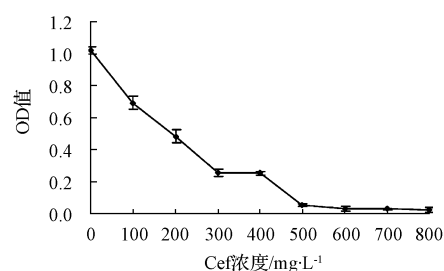


图 2 头孢霉素(Cef)对农杆菌生长的影响

Fig. 2 Effect of cefotaxime on the growth of *Agrobacterium*

### 2.3 侵染时间对转化效率的影响

农杆菌与外植体的接触时间对转化有很大的影响,过短或者过长的接触时间,都不利于转化。侵染过程中侵染时间过短,农杆菌不能很好的与受伤外植体伤口细胞接触,不利于农杆菌附着并进入外植体细胞,因此不能完成 T-DNA 的有效整合,使目的基因不能整合到植物的基因组上。侵染时间过长,大量的农杆菌与外植体伤口细胞接触,过度繁殖,一方面大量的农杆菌对外植体细胞造成毒害而软腐甚至死亡,另一方面不利于后续培养中除菌。寻找一个合适的侵染时间非常重要。由

图3可知,子叶节在 $OD_{600}$  (0.4~0.6)的农杆菌菌液中侵染,在20 min之内随着侵染时间的延长,平均抗性出芽率也增加;但超过20 min,再延长侵染时间,抗性出芽率则开始降低,其中侵染20 min抗性出芽率可高达28.3%,因此,20 min左右是紫花苜蓿子叶节转化的最佳侵染时间。

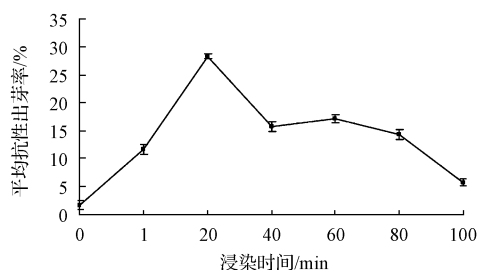


图3 侵染时间对转化率的影响

Fig. 3 Effect of infection time on transformation frequency

#### 2.4 不同时期的子叶节对转化效率的影响

苜蓿子叶节离体再生能力和对农杆菌的感受能力受到苜蓿子叶节所处的发育时期及生理状态的影响。由图4可知,随着子叶节苗龄的增加,获得的平均抗性芽率增加,以9 d的子叶节为外植体进行遗传转化,获得的平均抗性芽率最高。超过9 d,随着苗龄时间的延长,子叶节平均抗性丛生芽诱导率下降,可能是子叶节分生组织能力变弱导致了丛生芽诱导困难。

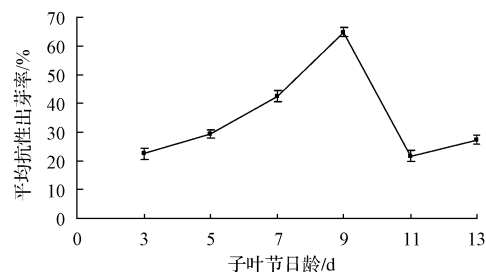


图4 不同时期的子叶节对转化效率的影响

Fig. 4 Effect of seedling age of alfalfa cotyledonary node on transformation frequency

#### 2.5 共培养时间对转化效率的影响

由图5可知,共培养时间为3 d左右的转化率最高,可获得最多的平均抗性芽。在试验中还观察到,共培养时间超过4 d,将会有大量的农杆菌在培养基中繁殖,在后续的除菌阶段很难抑制农杆菌的繁殖,导致一些子叶节软腐,不能诱导出丛生芽,降低转化效率。虽然共培养为1 d和不进行共培养也能获得抗性芽,但只有较少子叶节诱导出抗性芽。

#### 2.6 抗性苗的获得

从生长9日龄的无菌种苗上切去子叶节,进行农杆菌侵染,然后经共培养、选择培养后,获得状态良好的抗性芽,等芽长到2 cm高时进行生根等过程。该试验最

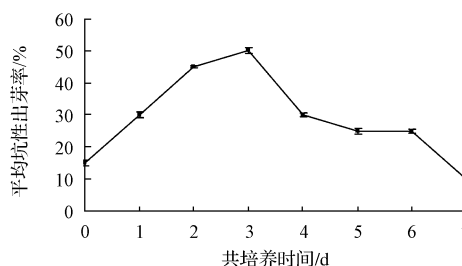


图5 共培养时间对转化效率的影响

Fig. 5 Effect of co-culture time on transformation rate

终获得了100余株抗性再生植株,整个农杆菌介导的紫花苜蓿子叶节离体遗传转化的流程图见图6。

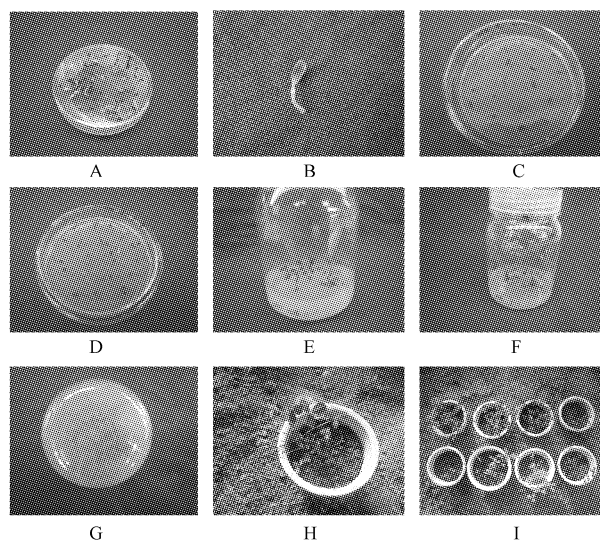


图6 转基因苜蓿抗性植株的再生

注:A:无菌苗;B:子叶节;C:农杆菌与子叶节共培养;D:抗性芽的筛选;E:伸长的抗性芽;F:抗性植株;G:抗性植株的生根;H~I:抗性植株的盆栽。

Fig. 6 Regeneration of transgenic resistant alfalfa plants

Note: A: Aseptic seedling; B: Cotyledonary nodes; C: Co-culture of *Agrobacterium* and cotyledonary nodes; D: Screening of resistant shoots; E: Stretched-out resistant shoots; F: Resistant plants; G: Rooting of resistant plants; H~I: Potted resistant plants.

### 3 讨论

#### 3.1 表达载体的鉴定

农杆菌在培养或保存的过程中会发生质粒丢失的现象,因此在农杆菌侵染植物之前需进行表达载体的鉴定。PCR鉴定方法是一种比较简便的方法,它是根据目的基因设计引物来扩增目的条带。使用PCR鉴定所需质粒的量极少,甚至根本无需提取,而直接用转化菌的菌体作模板,同样能做出效果非常好的PCR结果。该试验应用菌液PCR方法鉴定转化农杆菌,扩增出特异性条带,表明目的基因没有发生丢失。

#### 3.2 抗生素对转化的影响

共培养后常常需要将外植体转移到含有抗生素的



培养基上进行脱菌培养,以除去外植体表面及浅层组织中共生的大量农杆菌,这对提高农杆菌介导的基因转化率非常重要。为了有效杀死和抑制农杆菌的生长,选择合适的抗生素类型以及确定其最佳的抑菌浓度是农杆菌介导的遗传转化过程中必不可少的一个环节。抗生素对农杆菌的抑制能力,因抗菌素的种类及菌株类型不同而异,同时对植物细胞也有一定的影响,且对不同植物的不同外植体影响不同。常用的抗生素有羧苄青霉素、头孢霉素、羧噻吩青霉素等,其中头孢霉素的使用最多<sup>[3]</sup>。余密密<sup>[6]</sup>研究了 Cef 对胚性愈伤组织的诱导的影响和抗菌素筛选试验,结果表明,在侵染转化中 Cef 的最低抑菌浓度为 400 mg/L。该研究也发现,Cef 对苜蓿子叶节再生的影响不大,在侵染转化中 Cef 的最低抑菌浓度为 500 mg/L。

### 3.3 侵染时间对转化效率的影响

侵染的目的就是将农杆菌接种到所转化的外植体上。农杆菌介导的转化中,常常将外植体造成一定的伤口,然后浸泡在农杆菌悬浮液中,浸泡一定时间后将外植体取出,再用无菌滤纸吸干,进行共培养。掌握浸泡的时间对转化非常重要,浸泡时间过短农杆菌不能接种到外植体伤口上,在其培养时无农杆菌生长,不能完成转化;侵染时间过长,在后续的培养中农杆菌大量繁殖可能造成污染,还会对植物细胞造成毒害;所以协调好侵染时间对转化率的提高有重要意义。该研究也证实过长或过短的侵染时间都不利于抗性植株的获得,对苜蓿子叶节以侵染 20 min 最好。

### 3.4 共培养时间对转化效率的影响

农杆菌与外植体共培养是整个转化过程中非常重要的环节,因为农杆菌附着,T-DNA 的转移及整合都在共培养时期内完成,研究表明,农杆菌转化时,并不侵入到植物细胞中,而是把 T-DNA 转移到植物细胞。一般认为由于农杆菌 Ti 质粒上一系列识别信号的活化需要一定时间,至少为 16 h,因而共培养的目的是为 Ti 质粒的活化、转移提供充足的时间。但另一原因可能是对于植物外植体而言,共培养过程本身也是一个接受选择 Ti 质粒的过程。在这个过程中,有些外植体对农杆菌的接触较敏感,有的不敏感,有些外植体甚至发黄枯死,这在共培养时间过长情况下尤为多见。另外,共培养过程中,植物切口细胞本身也处于修复,恢复生长的状态,可

能越是修复、生长所需时间短的植物与农杆菌的亲合力越高。所以不同的受体共培养的时间不同,过长或过短的共培养时间都会减低转化效率,一般共培养 3~5 d 能取得较高的转化率<sup>[7]</sup>。该研究发现苜蓿子叶节与农杆菌的最佳共培养时间是 3 d,此时子叶节的污染率较低,可获得较多抗性芽。

### 3.5 子叶节的生长期对转化效率的影响

Meyer 在研究农杆菌介导的基因转化机理后认为,T-DNA 的插入发生在细胞分裂的一个较短的时期内,可能处于细胞分裂周期的 S 期,此时核基因组正在复制,有利于外源 DNA 的插入。因此处于发育早期具有很强分裂能力的细胞,具有很强的转化能力。有研究报道,植物材料的敏感性(易侵染性)也受其生理状态和发育阶段控制<sup>[8-9]</sup>。Schlappi 等<sup>[10]</sup>对玉米幼胚不同发育阶段对农杆菌的敏感性研究发现,不同阶段的胚的感染率不同。选择最佳的发育时期,即对农杆菌敏感期的外植体作为受体,将是农杆菌介导的基因转化的最佳外植体。因此该试验研究了不同时期子叶节对农杆菌的敏感性,发现生长 9 d 的子叶节是最佳外植体。

### 参考文献

- [1] 黄文惠,刘自学. 概论苜蓿的分布和发展[M]//耿华珠. 中国苜蓿. 北京:中国农业出版社,1995:2-7.
- [2] 杨青川,孙彦. 中国苜蓿育种的历史、现状与发展趋势[J]. 中国草地学报,2011,33(6):95-101.
- [3] 王关林,方宏钧. 植物基因工程[M]. 2 版. 北京:科学出版社,2002:346.
- [4] 李会文,麻冬梅,许兴. 苜蓿耐盐碱转基因研究进展与展望[J]. 北方园艺,2012(19):183-187.
- [5] 李会文,麻冬梅,许兴. 抗生素对苜蓿子叶节再生的影响[J]. 北方园艺,2013(4):96-98.
- [6] 余密密. 农杆菌介导的果聚糖合成酶基因转化紫花苜蓿影响因素的研究[D]. 北京:北京林业大学,2006.
- [7] 熊焕英,钟伟光,张寿文. 农杆菌介导的植物遗传转化影响因素研究进展[J]. 安徽农业科学,2012,40(17):9214-9217,9287.
- [8] 李宝健. 应用农杆菌 Ti 质粒系统将外源基因导入水稻的研究[J]. 中国科学,1990(2):144-149.
- [9] Jesus E, Glinther N, Michael S, et al. T-DNA transfer in meristematic cells of maize Provided with intracellular Agrobacterium[J]. Plant Journal, 1996,10:355-360.
- [10] Schlappi M, Hohn B. Competence of immature maize embryos for Agrobacterium mediated gene transfer[J]. The Plant Cell, 1992,4:7-16.

## Optimization of *Agrobacterium*-mediated Transformation Systems of Alfalfa Cotyledonary Node

MA Dong-mei<sup>1</sup>, LI Hui-wen<sup>2</sup>, GUO Lin-na<sup>2</sup>, JIN Feng-xia<sup>1</sup>, XU Xing<sup>1,2</sup>

(1. College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021; 2. College of Life Science, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

# 农杆菌介导的人白细胞介素-4 基因转化甘蓝的研究

金晓霞, 于海凤, 于丽杰

(哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院, 哈尔滨 黑龙江 150025)

**摘要:**以结球甘蓝‘92-1012-3-11’自交系种子转白细胞介素-4(IL-4)基因 T<sub>0</sub> 代材料为试材, 研究了通过农杆菌介导法将人 IL-4 基因导入甘蓝后代的遗传转化情况。结果表明:共得到抗草铵磷(PPT)抗性再生植株 396 株, 聚合酶链式反应(PCR)阳性植株 137 株, 其中带柄子叶转化率为 8.1%, 下胚轴分化率为 5.8%。通过对转基因阳性株 T<sub>0</sub> 代的 PPT 抗性筛选、PCR、PCR-Southern 杂交检测获得 IL-4 阳性甘蓝植株, 表明 IL-4 基因已转入甘蓝受体中。经 ELISA 和 Western 检测, 说明 IL-4 基因已整合到甘蓝基因组, 但表达量很低(0.23~2.81 ng/mL), 且各植株间的表达量差异极大。

**关键词:**甘蓝; 白细胞介素-4(IL-4); 遗传转化

**中图分类号:**S 635 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)15-0113-04

利用转基因植物生产药用蛋白及疫苗被称为植物医药基因工程。植物医药基因工程是指把重组的编码药用活性多肽和疫苗基因导入植物, 使转基因植物大量生产活性多肽和疫苗。目前已在转基因植物中表达成功的有麻疹<sup>[1]</sup>、乙型肝炎<sup>[2]</sup>、破伤风<sup>[3]</sup>等疫苗, 表皮生长因子<sup>[4]</sup>、人生长激素<sup>[5]</sup>、人胰岛素<sup>[6]</sup>、人血清白蛋白<sup>[7]</sup>等药用多肽。转基因植物作为生物反应器生产药用蛋白的研究成果丰硕, 展现出了诱人的魅力。

甘蓝(*Brassica oleracea* L.)属十字花科芸苔属 2 a 生植物, 地上近地面处结有叶球, 可供食用, 世界各地广泛种植, 是人们日常生活中不可或缺的一种蔬菜, 其作为基因转化受体具有自身的优势。白细胞介素(interleukin, IL)是介导白细胞间相互作用的一类细胞因

子, 白细胞介素家族至今得到公认的成员有 26 个。其中, IL-4 是 T 细胞产生的一种淋巴因子, 主要对免疫活性细胞起作用, 即对 B 细胞、T 细胞及 LAK(淋巴因子活化杀伤细胞)细胞等起作用, 而且可以抑制人体肿瘤细胞的生长, 具有预防和治疗肿瘤的作用<sup>[8-10]</sup>。将白细胞介素-4 基因转化到甘蓝再生植株, 使甘蓝作为一种生物反应器来生产 IL-4, 有利于降低相关药物的成本, 使之能够应用于更多的人群。

该试验在甘蓝高效再生体系及遗传转化体系建立的基础上, 通过农杆菌介导法将人 IL-4 基因导入甘蓝, 通过抗草铵磷(PPT)抗性、聚合酶链式反应(PCR)、PCR-Southern 杂交检测 IL-4 基因的整合情况, 并利用 ELISA 和 Western 技术, 检测 IL-4 基因是否表达出蛋白, 并为甘蓝作为生物反应器生产药用蛋白 IL-4 提供理论和实践依据, 同时也为转基因能否在遗传转化体内稳定遗传和表达提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试结球甘蓝品种为东北农业大学园艺学院惠赠

**第一作者简介:**金晓霞(1980-), 女, 博士, 讲师, 现主要从事植物分子生物学研究工作。E-mail: xiaoxia6195@126.com

**责任作者:**于丽杰(1961-), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 现主要从事植物基因工程研究工作。E-mail: yulijie1961@126.com

**基金项目:**黑龙江省自然科学基金资助项目(C0014)。

**收稿日期:**2013-04-12

**Abstract:** Taking *Medicago sativa* ‘Jin Queen’ as material, taking cotyledonary nodes of alfalfa as transformation receptors, the effects of transformation of alfalfa cotyledonary node of factors, the cotyledon sections physiological period, infection time, the co-culture time on transformation frequency via *Agrobacterium*-mediated transformation method were investigated. The object was to optimize transformation procedure, and lay a foundation for establishing the efficient alfalfa cotyledon node genetic transformation system. The results showed that infection with *Agrobacterium* ( $OD_{600} = 0.6$ ), the optimal receptor material was 9-day-old cotyledon node, infection time 20 min, co-culture time 3 d. The inhibitory concentration of cefotaxime was 500 mg/L.

**Key words:** cotyledonary nodes; *Agrobacterium*-mediated; transformation system