

## 作物研究所におけるパーティクルガン法 を用いた大豆の形質転換技術

藤郷 誠

### 抄 録

パーティクルガン法を用いた大豆の形質転換技術は、海外で大規模な商業的栽培が展開されている除草剤耐性組換え大豆の作出や、様々な大豆遺伝子の機能解析に使われるなど、その有用性が実証されている。日本では既に複数の研究機関がパーティクルガン法を用いた大豆の形質転換体を作成する体制を整えているが、大豆に遺伝子を導入しようとする研究者が新たに容易に取り組むことが出来る普及性の高い技術とはなっていないのが現状である。本報告では、筆者が作物研究所にて実施しているパーティクルガンを利用した大豆の形質転換技術の詳細を紹介する。また、筆者独自の改良点と具体的な実施例を紹介するとともに、今後その発展が期待される手法であるアグロバクテリウム法との比較をとおり、パーティクルガン法を用いた大豆の形質転換技術の展望を述べる。

キーワード：ダイズ、遺伝子組換え、パーティクルガン

# **A particle bombardment-based technique for the development of transgenic soybeans used in NARO Institute of Crop Science**

Makoto TOUGOU

## **Abstract**

A particle bombardment-based technique for soybean transformation has been used to study the function of a number of soybean genes. In addition, this technique was used to produce commercially-planted herbicide-resistant transgenic soybeans. Therefore, it has played an important role in biotechnology research. However, owing to some difficulties and problems inherent in this methodology, it is not necessarily feasible to many researchers who intend to use this technique to produce transgenic soybeans. In this report, the experimental procedure for bombardment-based transformation in soybeans is presented. Our research group in NARO Institute of Crop Science (NICS) routinely uses this technique to produce transgenic soybeans. Some efforts to improve the efficiency of transformation and applications for the development of soybean lines harboring resistance to the soybean dwarf virus are also mentioned. Finally, some merits and problems of the Agrobacterium-based technique, which is considered to be a good alternative to produce transgenic soybeans, are also briefly discussed.

**Key Words:** soybean, transformation, particle bombardment

## I 緒 言

1980年代後半から1990年代初頭にかけて、アメリカの研究機関を中心にパーティクルガンを用いた大豆への物理的な遺伝子導入の成功例が報告され (McCabe *et al.* 1988, Christou *et al.* 1988, Parrott *et al.* 1989, Christou *et al.* 1989, Finer *et al.* 1991, Finer *et al.* 1992, Vain *et al.* 1993, Sato *et al.* 1993)、1990年代後半には、安定的に大豆の形質転換が行われるようになった。2000年代の初頭には我が国でも成功例が報告された (石本 2003, Furutani and Hidaka 2004)。当時、パーティクルガン法による大豆への遺伝子導入は、アグロバクテリウム法 (Baltes *et al.* 1987, Hinchey *et al.* 1988, Chee *et al.* 1989) に比べて、形質転換効率が高く、実験設備と培養条件を整備・確立できれば、簡便かつ安定的に形質転換体を作出できる手法であると認識されていた。筆者らは、既に成功していた国内研究機関の研究者より助言を受け、独自の改変を加え、パーティクルガン法による大豆の形質転換系を確立した。

パーティクルガン法による大豆の形質転換は、世界的に広く栽培されるグリホサート・グルホ

シネート耐性大豆系統の開発や種々の遺伝子機能解析に利用されてきた、言わば一時代を築いてきた技術である。大豆への物理的な遺伝子導入には、エレクトロポレーション法や針状結晶を利用するウイスカ法も適用可能である。しかし、物理的な遺伝子導入法は、いずれも、後述するような共通した欠点をもつ。一方で、パーティクルガン法の問題を回避できる手法の一つであり、近年、大豆を供試した際の形質転換効率が向上しているアグロバクテリウム法 (Olhoft and Somers 2001, Olhoft *et al.* 2001, Olhoft and Flagel 2003, Paz *et al.* 2004, Zeng *et al.* 2004, Paz *et al.* 2006, Sato *et al.* 2007, Yamada *et al.* 2010) の技術的な進展にも注目すべきである。本報告では、複数の大豆形質転換技術が提示される現状で、その黎明期から現在に至るまで有効な手法として活用されるパーティクルガン法について、筆者独自の改良点と具体的な実施例を中心に紹介したい。また、アグロバクテリウム法との比較を通して大豆の形質転換に関わるパーティクルガン法の展望を考察する。

## II パーティクルガン法による大豆の形質転換

パーティクルガン法による大豆の形質転換技術の概要を図1に、各種の培地の組成を表1に示す。

### 1 不定胚の誘導と増殖

不定胚形成能が高い大豆 (*Glycine max*) 品種 ‘Jack’ をガラス温室で春期から夏期にかけて栽培する。圃場で育成した大豆は無菌培養に適さない場合が多いので、利用を避ける。開花後約10日の莢を採取し、表面を70%エタノール

処理し、無菌条件で10mm以下の未熟種子を取り出す。滅菌シャーレ上で種皮を除去し、胚軸を切除した子葉の背軸側が培地に接するように不定胚誘導用MSD40固形培地に置床し、25℃、16時間日長、光強度 $5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ で培養する。不定胚の誘導および増殖は光強度に影響されやすく、培養中の光条件を最適化することが重要である。未熟種子の培養3週間後に、子葉片の表面に不定胚が形成されるため、褐変した組織を除き、新しいMSD40固形培地に移植し、3週間培養する。形成された不定胚塊は、不定胚増

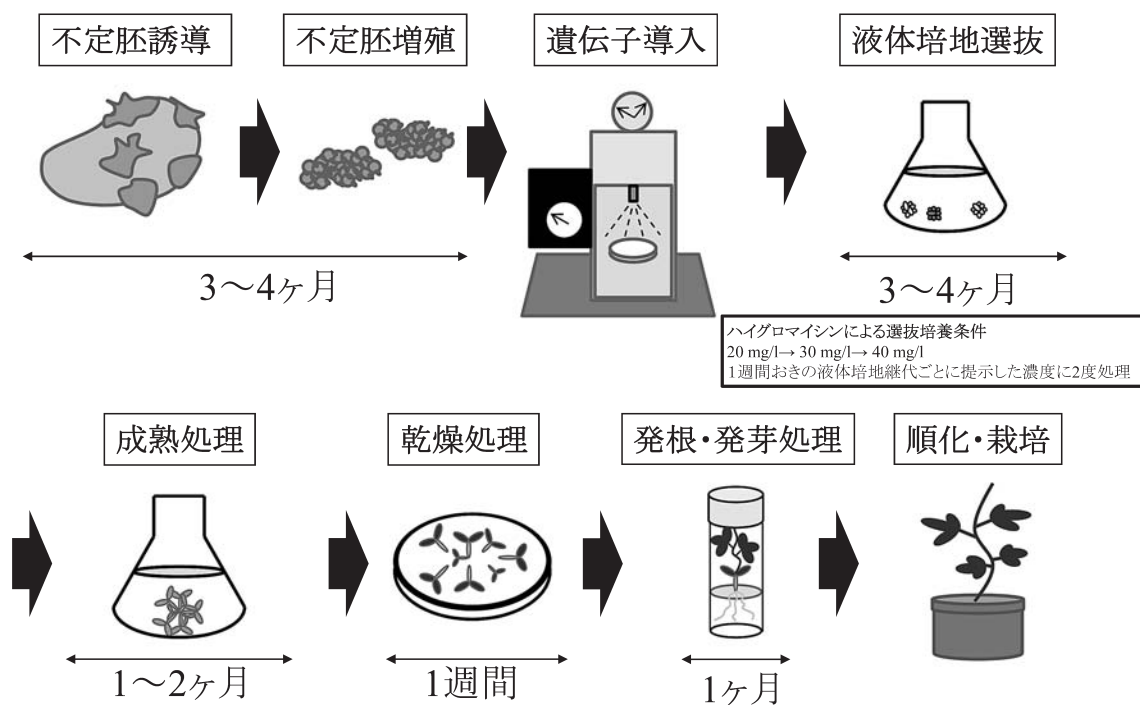


図1 パーティクルガン法による大豆の形質転換技術の概要

表1 パーティクルガン法による形質転換大豆作出に用いる培地一覧

培地名	構成
不定胚誘導用MSD40固形培地	MS無機塩 <sup>(a)</sup> , B5ビタミン <sup>(b)</sup> , スクロース 30 g/l, 2,4-D 40 mg/l, ゲルライト 2 g/l, pH7.0
不定胚増殖用MSD20固形培地	MS無機塩, B5ビタミン, スクロース 30 g/l, 2,4-D 20 mg/l, ゲルライト 2 g/l, pH5.8
FNL液体培地	FNマクロ <sup>(c)</sup> , MSミクロ <sup>(a)</sup> , Fe-EDTA, B5ビタミン, スクロース 10 g/l, 2,4-D 5 mg/l, アスパラギン 1 g/l, pH5.8
胚成熟用0S3SGM液体培地	FNマクロ, MSマイナー, Fe-EDTA, B5ビタミン, スクロース 30 g/l, ソルビトール 30 g/l, アスパラギン 1 g/l, pH5.8
発根・発芽用MS0固形培地	MS無機塩, B5ビタミン, スクロース 30 g/l, ゲルライト 2 g/l, pH5.8

(a) Murashige and Skoog 1962 参照 (b) Gamborg *et al.* 1968 参照 (c) Samoylov *et al.* 1998 参照

殖用のMSD20固形培地に移植する。移植に適した「コンパクトで小さな不定胚が密集した不定胚塊」の選定は、Furutani and Hidaka (2004) と古谷 (2007) に詳述されている。3週間毎に同様の継代培養を7回以上行い、形質転換に供試する不定胚を得る。

## 2 プラスミド構築

筆者らは形質転換に、選抜マーカー遺伝子と目的遺伝子を別々のベクターで導入するco-transformation法を採用している。その理由は、

ベクターに挿入する発現カセットを短くすることができ、比較的容易なプラスミド構築で複数の目的遺伝子を同時に導入することが出来るという利点に加え、パーティクルガン法では長い発現カセットの分断化が起きやすいとされるためである。co-transformation法の欠点として、選抜マーカー遺伝子のみ導入された形質転換体を得られる可能性が高いことが指摘される。しかし、筆者の用いる形質転換条件では、co-transformationに供試した異なるベクター由来の導入遺伝子が形質転換不定胚へ同時に導入される場合が多く、ある実験では77不定胚塊のうち54個に、異なる

ベクター由来の選抜マーカー遺伝子と目的遺伝子の導入を確認している。

選抜マーカー遺伝子を含むプラスミドとしては、ハイグロマイシン耐性遺伝子 (hygromycin phosphotransferase, *hpt*) を含むベクタープラスミド「pE2113-HPT」(Furutani and Hidaka 2004) (図2) を用いる。pE2113-HPTはpUC18を骨格に、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35Sプロモーターの上流部にエンハ

ンサーが2個連結されたE12と、その下流部にタバコモザイクウイルス (TMV) の $\Omega$ 配列を有し (Mitsuohara *et al.* 1996)、*hpt*が植物体全体で高発現する。他方、目的遺伝子を含むベクタープラスミドには、pE2113-HPTの*hpt*を目的遺伝子に変更したものをを用いる。部位あるいは組織特異的に発現させる場合は、目的に応じた特異的発現プロモーターに変更する。

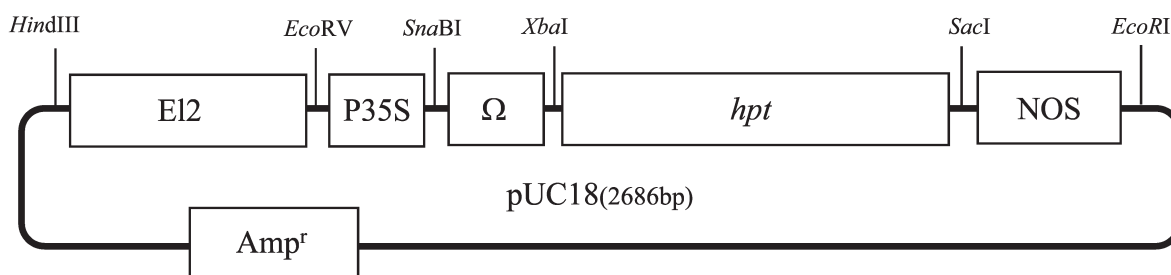


図2 パーティクルガン法による形質転換大豆作出に用いるハイグロマイシン耐性遺伝子導入用ベクター「pE2113-HPT」の構造

‘E12’, カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の5'上流領域を2つ並べた配列、‘P35S’, CaMVの35Sプロモーター、‘Ω’, タバコモザイクウイルス (TMV) の5'非翻訳領域、‘*hpt*’, ハイグロマイシンリン酸転移酵素遺伝子、‘NOS’, *Agrobacterium tumefaciens*のT<sub>1</sub>プラスミドのノバリン合成酵素遺伝子のポリA付加領域

### 3 パーティクルガンによる遺伝子導入

大豆の供試組織としては不定胚を用い、パーティクルガン (Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System, Bio-Rad) を用いて形質転換を行う。金粒子 (直径1.0  $\mu$ m) 懸濁液 (60mg/ml (50%グリセロール)) の調製は機器添付プロトコールに準じて行うが、滅菌水で金粒子を攪拌した際に生じる浮遊物を取り除き、金粒子を可能な限り洗浄する。100  $\mu$ lの金粒子懸濁液あたり0.5  $\mu$ gの目的遺伝子導入用ベクタープラスミドと0.5  $\mu$ gのpE2113-HPTを機器添付プロトコールに準じて塩化カルシウム・スペルミジン法で金粒子にコーティングし、10回分のマクロキャリアを調製する。MSD20固形培地で7回以上継代培養し、増殖した約20個の「コンパクトで小さな不定胚が密集した不定胚塊」を、遺伝子導入操作の7日前にMSD20固形培地を入れたシャーレの中心部分 (直径約5 cm以内) へ置床する。1100psiラプチャーディスクを用いて、

ターゲット距離9 cmで不定胚塊に2回ずつ遺伝子導入操作を行う。MSD20固形培地での培養で効率的に不定胚塊が得られない場合は、後述するFNL液体培地で増殖させた不定胚塊をMSD20固形培地上に置床し、遺伝子導入操作に供試する。

### 4 選抜培養

遺伝子導入操作から7日後に、MSD20固形培地上の不定胚塊20粒から5粒ずつFNL液体培地を50ml入れたカルチャーボトル (CB-1、アズワン) に投入し、80rpmで旋回培養を行う。旋回装置によって回転半径が異なり、また過度の旋回条件では不定胚が予期せず膨張する場合があるため、最適の旋回条件を事前に把握する。温度や光条件は、固形培地での不定胚誘導及び増殖と同様とする。液体培養に供試する容器は問わないが、液体培地の体積に応じて投入する不定胚塊数と液体培地の継代期間を調節する。形質転換不定胚を選抜するためのハイグロマイ

シン添加は、不定胚塊の液体培地投下7日後より開始する。7日ごとに液体培地を交換しハイグロマイシン濃度を徐々に上げる。継代2回目までは20mg/l、次の継代4回は30mg/l、以降は40mg/lで培養を継続し、非形質転換不定胚塊が白化し、緑色のハイグロマイシン耐性不定胚塊が明瞭に目視で選抜できるまで培養をする。選抜過程でハイグロマイシン添加により全ての不定胚が白化した処理区は廃棄する。形質転換不定胚の選抜を、固形培地上で行う例 (Santarém and Finer 1999) もあるが、エスケープ個体が多く出現する傾向があるため、筆者は固形培地上ではなく液体培養条件で形質転換不定胚を選抜する。

## 5 個体再生

ハイグロマイシン添加条件下での液体培養で白化せず緑色を維持した不定胚塊は、1個ずつ胚成熟培地である0S3SGM液体培地に投入し80 rpmで旋回培養する。液体培地は2週間後に1度更新する。成熟した胚は発根促進のため、無菌条件で乾燥処理を7日間行う。その後、MS0固形培地に移植して発根・発芽させる。発根・発芽の旺盛な再生個体は40mlのMS0固形培地を入れた植物培養用試験管 (胴径40mm、全長130mm) に移植し、莖葉を伸育させる。再生個体は、根に付着した培地を丁寧に取り除き、底面に穴を開けたプラントボックス (3-317-790、ケニ

ス) にパーミキュライトを入れて移植する (順化)。順化処理は25℃、16時間日長、光強度100  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  程度で行う。順化による急激な湿度低下は植物生育に悪影響を及ぼす可能性があるため、湿度条件に十分に注意する。順化した再生個体は隔離温室で育成し採種する。筆者らの実験系では、大豆不定胚への遺伝子導入操作以降、再分化個体の採種まで約一年間を要する。

## 6 培養途中での導入遺伝子確認による選抜

胚成熟培地である0S3SGM液体培地にハイグロマイシン耐性の不定胚塊を投入後、増殖効率が良い場合には1ポット当たり50以上の成熟胚が生じることがある。目的遺伝子が導入された成熟胚のみを選抜するため、筆者は0S3SGM液体培地に多数の成熟胚が生じた時点で、一部の成熟胚からゲノムDNAを抽出し、PCRで導入遺伝子の確認を行う。目的遺伝子がPCRで確認されないポットから生じる成熟胚は廃棄する。ただし、DNAの純度によってはPCRで導入遺伝子の増幅が確認できない場合があるため、DNA抽出およびPCRは反復実施する。また、一つのハイグロマイシン選抜FNL液体培地のポットから複数のハイグロマイシン耐性不定胚塊が生じた場合、再生個体がいずれもサザンブロット解析で同一パターンを示すことを、筆者らは確認している。

## III パーティクルガンによる大豆の形質転換の実例と応用

北日本において甚大な被害を起こしているダイズわい化病の病原ウイルスである *Soybean dwarf virus* (SbDV) に対する抵抗性付与を目的とし、筆者らはパーティクルガン法で大豆の形質転換体を作出した (Tougou *et al.* 2006, Tougou *et al.* 2007)。その結果、遺伝子導入操作を実施した不定胚塊数に対する形質転換体数の割合は、SbDVの外被タンパク質 (CP) 遺伝

子の逆位反復配列では0.07%、センスSbDV CP遺伝子では0.1%であった。遺伝子導入操作に対する割合に換算すると、1.4%と2.0%となる。導入遺伝子の長さや配列等種々の要因で形質転換効率は変動するが、上記の形質転換効率は筆者らの解析に必要な形質転換体作出には十分であった。

近年、遺伝子組換え作物の普及と実用化を図

る際の障壁の一つとされる微生物由来の抗生物質耐性遺伝子の代わりに、植物由来の除草剤耐性遺伝子を選抜マーカー遺伝子として利用することが注目される。そこで筆者らは、既に確立したハイグロマイシン耐性遺伝子を利用する大豆不定胚選抜系を基盤として、抗生物質を使用しない不定胚選抜系の検討を行った。

筆者らは、ピリミジニルカルボキシ (pyrimidinyl carboxy, PC) 系の除草剤であるビスピリバック塩酸塩 (bispyribc-sodium, BS) 耐性稲のカルスより単離された2点変異型のALS遺伝子 (*Os-mALS*) に注目した。*Os-mALS*は稲の形質転換に適用可能な選抜マーカー遺伝子とし

て知られる。しかし、大豆の形質転換操作における選抜過程で*Os-mALS*が適用可能か否か確かめられていなかった。そこで、*Os-mALS*を発見・取得したクミアイ化学工業(株)の協力のもと、大豆の形質転換技術への適用可能性を検討した。その結果、*Os-mALS*を選抜マーカー遺伝子としてBS剤で不定胚を選抜する条件の確立に成功した (Tougou *et al.* 2009)。しかし現在のところ、筆者らの培養・選抜条件ではBS剤選抜時にエスケープ個体の出現頻度が高く、今後さらに培養・選抜条件を検討する必要がある。

#### IV パーティクルガン法による大豆の形質転換技術が抱える問題

一般的に、パーティクルガン法に代表される物理的な遺伝子導入法では、導入遺伝子の断片化や、多コピーの遺伝子導入を原因とする導入遺伝子間の相同組換え (Fu *et al.* 2000, Matzke *et al.* 2000, Reddy *et al.* 2003) により、導入遺伝子が予期せぬ発現レベルを示すことが多いとされる。筆者がパーティクルガン法で大豆の形質転換体を作出した際、多コピーの遺伝子導入個体 (図3A) が得られた一方、1コピーの目的遺伝子が導入され (図3B)、予想通りのRNAやタンパク質発現が確認できる個体も得られている。また、国産の大豆品種では不定胚の誘導・増殖効率が概して低く、形質転換が可能な品種は現在のところ‘Jack’と‘Fayette’にほぼ限定されており、実用的な品種を供試した形質転換が困難という問題も残されている。

一方、アグロバクテリウム法は、遺伝子の断片化や多コピーの遺伝子導入の発生頻度がパーティクルガン法と比較して低いとされ、形質転換効率が向上すればアグロバクテリウム法にも優位性がある。近年、再分化効率が非常に高い大豆子葉節を供試し、共存培地にチオール化合物を添加することで、形質転換効率が向上するとの報

告がある (Olhoft and Somers 2001, Olhoft *et al.* 2001, Olhoft and Flagel 2003, Paz *et al.* 2004, Zeng *et al.* 2004, Paz *et al.* 2006)。また、一部の国産大豆品種で形質転換に成功したとの報告もある (Sato *et al.* 2007, Yamada *et al.* 2010)。しかし、アグロバクテリウム法による形質転換には、パーティクルガン法と比較して培養実験操作に熟練が必要であり、形質転換効率など改善に向けた課題点もある。

大豆は国内・国外を問わず様々な形質改良が求められる主要作物の一つであり、海外では遺伝子組換え系統の商業的栽培が拡大している。しかし、形質転換技術に関しては、シロイヌナズナや稲と比較すると改良の余地が大きく、パーティクルガン法、アグロバクテリウム法のいずれにも解決すべき問題が残されている。形質転換が困難な作物の研究支援を行なうために、理化学研究所 植物科学研究センター 植物ゲノム機能研究グループの運営する形質転換ネットワーク (<http://pfgweb.psc.riken.jp/transnetJ.html>) が設立されており、大豆の形質転換体を必要とする研究者が容易に取り組むことが出来る普及性の高い技術の開発への寄与が期待されている。

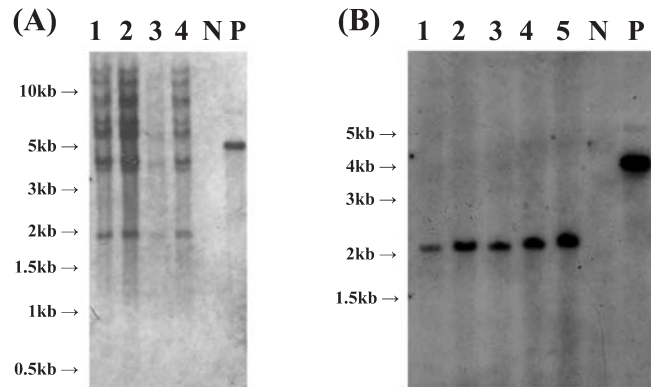


図3 パーティクルガン法によってSbDVのCP遺伝子を導入した大豆のザンブロット解析

(A)と(B)のSbDVのCP遺伝子を導入した大豆の各同一クローンから抽出したゲノムDNA (2.5  $\mu$ g) を制限酵素で処理した。(A)はSacI、(B)はXbaI処理した。プローブはSbDV CP遺伝子のPCR増幅断片 (591bp) を用いた (Tougou *et al.* 2006)。1~5:SbDV CP遺伝子を導入した同一クローンの個体番号、N:非形質転換体 (品種Jack)、P:ポジティブコントロール (pE12 $\Omega$ -SbDV CPプラスミド、Tougou *et al.*2007)

## 謝 辞

(独)東北農業研究センター 日高操博士には研究推進全般にわたりご支援とご助言を頂いた。同センター (現所属 岩手大学) 山岸紀子博士には導入遺伝子の解析手法のご指導を頂いた。

京都府農業資源研究センター応用研究部 古谷規行博士にはパーティクルガンによる大豆遺伝子導入法にご指導とご教示を頂いた。ここから感謝を申し上げる。

## 引用文献

- Baldes, R., M. Moos and L. Geider (1987) Transformation of soybean protoplasts from permanent suspension cultures by cocultivation with cells of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.*, 9, 135-145.
- Chee, P.P., K.A. Fober, and J.L. Slightom (1989) Transformation of soybean (*Glycine max*) by infecting germinating seeds with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.*, 91, 1212-1218.
- Christou, P., D.E. McCabe and W.F. Swain (1988) Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particle. *Plant Physiol.*, 87, 671-674.
- Christou, P., W.F. Swain, N. Yang and D.E. McCabe (1989) Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86,7500-7504.
- Finer, J.J. and M.D. McMullen (1991) Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 27, 175-182.
- Finer, J.J., P. Vain, M.W. Jones and M.D. McMullen (1992) Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Rep.*, 11, 323-328.
- Fu, X., L.T. Duc, S. Fontana, B.B. Bong, P. Tinjuangjun, D. Sudhakar, R.M. Twyman, P. Christou, A. Kohli (2000) Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences



- generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. *Transgenic Res.*, 9, 11-19.
- Furutani N. and S. Hidaka (2004) Efficient production of transgenic soybean using a co-transformation method. *Breed Sci.*, 54, 91-98.
- 古谷規行 (2007) 外被タンパク質遺伝子を用いたモザイク病抵抗性ダイズの育成に関する研究 京都農研報, 28, 1-32.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller, K. Ojima (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 50, 151-158.
- Hinchee, M.A.W., D.V. Connor-Ward, C.A. Newell, R.E. McDonnell, S.J. Sato, C.S. Gasser, D.A. Fischhoff, D.B. Re, R.T. Fraley and R.B. Horsch (1988) Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Bio/technology*, 6, 915-922.
- 石本政男 (2003) ダイズにおける遺伝子組換え技術の確立とその利用 農業および園芸, 78, 8-13.
- Matzke, M.A., M.F. Mette, A.J. Matzke (2000) Transgenic silencing by the host genome defence: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant Mol. Biol.*, 43, 401-415.
- Olhoft, P.M. and D.A. Somers (2001) L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Rep.*, 20, 706-711.
- Olhoft, P.M., K. Lin, J. Galbraith, N.C. Nielsen, D.A. Somers (2001) The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Rep.*, 20, 731-737.
- Olhoft, P.M., L.E. Flagel, C.M. Donovan, D.A. Somers (2003) Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta*, 216, 723-735.
- Parrott, W.A., L.M. Hoffman, D.F. Hildebrand, E.G. Williams and G.B. Collins (1989) Recovery of primary transformation of soybean. *Plant Cell Rep.*, 7, 615-617.
- Paz, M.M., H. Shou, Z. Guo, Z. Zhang, A.K. Banerjee and K. Wang (2004) Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. *Euphytica*, 136, 167-179.
- Paz, M.M., J. C. Martinez, A. B. Kalvig, T. M. Fonger and K. Wang (2006) Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. *Plant Cell Rep.*, 25, 206-213.
- Reddy, M.S.S., R.D. Dinkins, G.B. Collins (2003) Gene silencing in transgenic soybean plants transformed via particle bombardment. *Plant Cell Rep.*, 21, 676-683.
- Samoylov, V.M., D.M. Tucker, F. Thibaud-Nissen, W.A. Parrott (1998) A liquid-medium-based protocol for rapid regeneration from embryogenic soybean cultures. *Plant Cell Rep.*, 18, 49-54.
- Santarém, E., J. Finer (1999) Transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using proliferative embryogenic tissue maintained on semi-solid medium. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 35, 451-455.
- Sato, S., C. Newell, K. Kolacz, L. Tredo, J. Finer and M. Hinchee (1993) Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems. *Plant Cell Rep.*, 12, 408-413.
- Sato H, T. Yamada, Y. Kita, M. Ishimoto, K. Kitamura (2007) Production of transgenic plants and their early seed set in Japanese soybean variety. *Plant Biotechnol.*, 24, 533-536.
- Tougou, M., N. Furutani, N. Yamagishi, Y. Shizukawa, Y. Takahata, S. Hidaka (2006) Development of resistant transgenic soybeans

- with inverted repeat-coat protein genes of soybean dwarf virus. *Plant Cell Rep.*, 25, 1213-1218.
- Tougou, M., N. Yamagishi, N. Furutani, Y. Shizukawa, Y. Takahata, S. Hidaka (2007) Soybean dwarf virus-resistant transgenic soybeans with the sense coat protein gene. *Plant Cell Rep.*, 26, 1967-1975.
- Tougou, M., N. Yamagishi, N. Furutani, K. Kaku, T. Shimizu, Y. Takahata, J. Sakai, S. Kanematsu, S. Hidaka (2009) The application of the mutated acetolactate synthase gene from rice as the selectable marker gene in the production of transgenic soybeans. *Plant Cell Rep.*, 28, 769-776.
- McCabe, D.E., W.F. Swain, B.J. Martinell and P. Christou (1988) Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/technology*, 6, 923-926.
- Mitsuhara I., M. Ugaki, H. Hirochika, M. Ohshima, T. Murakami, Y. Gotoh, Y. Kato, S. Nakamura, R. Honkura, S. Nishimiya, K. Ueno, A. Mochizuki, H. Tanimoto, H. Tsugawa, Y. Otsuki, Y. Ohashi (1996) Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol.*, 37:49-59.
- Murashige T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15, 473-497.
- Vain P., M.D. McMullen and J.J. Finer (1993) Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Rep.*, 12, 84-88.
- Yamada Y., S. Watanabe, M. Arai, K. Harada and K. Kitamura (2010) Cotyledonary node pre-wounding with a micro-brush increased frequency of *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean. *Plant Biotechnol.*, 27, 217-220.
- Zeng, P., D.A. Vadnais, Z. Zhang, J.C. Polacco (2004) Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Rep.*, 22, 478-482.