

影响花椰菜农杆菌介导转化因素的研究

于 姪^{1,2}, 刘莉莎², 赵永钦², 赵 冰², 郭仰东²

(¹武汉生物工程学院生物工程系, 武汉 430415; ²中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193)

摘要:以花椰菜赛雪的带柄子叶为外植体, 以 MS 为基本培养基, *GUS* 基因为报告基因, 分析了遗传转化过程中的影响因素, 如预培养时间、农杆菌菌液浓度、侵染时间、共培养时间、乙酰丁香酮浓度、延迟筛选时间等对外植体瞬时表达和稳定表达的影响。结果显示, 以花椰菜的带柄子叶为外植体, 预培养 2d, 农杆菌菌液为 OD₆₀₀ 0.3 ~ 0.4, 侵染 8min, 共培养 2d, 乙酰丁香酮浓度为 100 μmol/L, 延迟筛选 7d, 卡那霉素筛选压为 5mg/L 为最优的遗传转化方案, 转化率最高可达 35.7%。另外, *GUS* 瞬时表达率和转化率并不存在绝对的相关性, 但瞬时表达分析仍然可以作为外源基因进入受体细胞的指示。花椰菜农杆菌介导转化方案的优化研究为芸苔属蔬菜高效遗传转化提供了技术保障, 有利于芸苔属蔬菜遗传育种与种质创新研究。

关键词:花椰菜; 农杆菌介导; *GUS* 基因; 瞬时表达

A Study on the Factors Affecting the *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*)

YU Ya^{1,2}, LIU Li-sha², ZHAO Yong-qin², ZHAO Bing², GUO Yang-dong²

(¹Bioengineering Department, Wuhan Bioengineering Institute, Wuhan 430413;

²College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193)

Abstract: An *Agrobacterium*-mediated transformation system, using transient and stable transformation assays, was used to evaluate some factors influencing transformation in cauliflower. These included the precultivation time, the bacterial density, the inoculation duration time with *Agrobacterium tumefaciens*, the concentration of acetosyringone, the delay selection and the concentration of kanamycin in selection. Using cotyledons with 1-2mm petioles as explants, the best transformation parameters were: two-day pre-cultivation, OD₆₀₀ 0.3-0.4 of bacterial density, eight-minute infection with *Agrobacterium tumefaciens*, two-day cocultivation, 100 μmol/L acetosyringone in the cocultivation medium and seven-day delay selection in kanamycin of 5mg/L. By optimizing the parameters on the procedure of *Agrobacterium*-mediated transformation, a high transformation efficiency (35.7%) was demonstrated. The *GUS* transient expression could be an important indicator for cauliflower transformation. The development of an efficient *Agrobacterium*-mediated transformation system opens up new opportunities for the functional characterization of genes and promotes the development of novel germplasm of *Brassica* vegetable genus.

Key words: Cauliflower; *Agrobacterium tumefaciens*; *GUS* gene; Transient expression

花椰菜 (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) 是十字花科芸苔属甘蓝种的一个变种, 其风味清香, 营养丰

富, 含有多多种叫噪衍生物, 具有一定抗癌作用。因此, 在全国栽培比较普遍, 是我国出口创汇的主要蔬

收稿日期: 2009-05-18

修回日期: 2009-08-19

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (2009CB119000); “十一五”科技支撑计划 (2007BAD57B04)

作者简介: 于姪, 博士, 主要从事植物遗传育种与生物技术研究

通讯作者: 郭仰东, 教授, 博士生导师, 主要从事植物遗传育种与生物技术研究。E-mail: yaguo@cau.edu.cn

赵冰, 副教授, 主要从事蔬菜遗传育种研究。E-mail: zhaocau@163.com

菜品种之一。传统的育种技术只能利用有限的资源进行育种,已不能满足现代农业对花椰菜品种改良的需求。现代生物技术的发展,为选育具有优良性状基因的突破性品种提供了可能,利用基因工程技术将外源基因转入花椰菜是其种质资源创新的有效途径。

带柄子叶作为花椰菜遗传转化的外植体材料,能够快速高频再生不定芽^[1-3],然而它对农杆菌的敏感性影响了遗传转化的效率^[4-6]。迄今,花椰菜遗传转化方案优化的相关报道很少。因此,本试验拟以花椰菜带柄子叶为外植体,*GUS* 基因为报告基因,针对预培养时间、农杆菌菌液浓度、侵染时间、共培养时间及添加物乙酰丁香酮的浓度、卡那霉素筛选浓度等影响遗传转化效率的因素进行了研究,旨在提高花椰菜的遗传转化效率,为花椰菜以基因工程手段创造新种质提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为花椰菜品种赛雪,购买于中国农业科学院。所用根癌农杆菌菌株为 EHA105,购自北京鼎国生物有限公司。报告基因为 *GUS* 基因^[7],由中国科学院遗传与发育研究所胡赞民研究员惠赠。

1.2 试验方法

1.2.1 工程菌的制备 挑取含有重组质粒的农杆菌 EHA105 单菌落,接种于含卡那霉素 100mg/L 和利福平 100mg/L 的 YEB 液体培养基中,28℃ 振荡培养 48h,活化农杆菌。取活化的农杆菌菌液按 1:100 的比例转至含卡那霉素 50mg/L 的 YEB 液体培养基中,继续培养至适合的 OD₆₀₀ 值作为工程菌用于外植体的遗传转化。

1.2.2 转化方法 无菌苗的获得参见 Qin 等^[3]方法。选择 6~7d 苗龄的无菌苗,以保留 1~2mm 子叶柄的子叶作为外植体进行预培养,再在工程菌中侵染,之后转入共培养培养基中,于暗处共培养,再转入恢复培养基中培养,之后进行抗性筛选培养,每 3 周继代 1 次,直至转化株发生。用于不定芽诱导和农杆菌遗传转化的各种培养基见表 1。

1.2.3 遗传转化过程中重要因子对 *GUS* 基因表达率的影响 针对预培养时间、工程菌浓度、侵染时间、共培养时间、乙酰丁香酮的浓度等设置不同处理水平开展研究,每个处理设 3 次重复,每个重复 60 个带柄子叶。具体试验处理设置如下。

表 1 花椰菜组织培养和遗传转化所用培养基

Table 1 The media used in the regeneration and transformation of cauliflower

培养基名称 Name of medium	培养基成分 Medium components
萌发培养基 (G)	MS 大量元素 + MS 微量元素 + 20g/L 蔗糖 + 7.8g/L 琼脂, pH 6.0
基本培养基 (MS0)	MS 无机盐 + B ₅ 维生素 + 30g/L 蔗糖 + 7.8g/L 琼脂, pH 6.0
不定芽诱导培养基 (SIM)	MS0 + 1mg/L BA + 4mg/L AgNO ₃ , pH 5.8
生根培养基 (RIM)	MS0 + 0.5mg/L NAA, pH 6.0
预培养培养基	MS0 + 1mg/L BA, pH 5.8
共培养培养基	SIM + 4mg/L AgNO ₃ + 100μmol/L Acetosyringone, pH 5.8
恢复培养基	SIM + 4mg/L AgNO ₃ + 400mg/L Carbencillin, pH 5.8
抗性筛选培养基	SIM + 4mg/L AgNO ₃ + 400mg/L Carbencillin + 5mg/L Kanamycin, pH 5.8
继代选择培养基 (首次/2 次继代)	RIM + 400mg/L Carbencillin + 5mg/L Kanamycin, pH 5.8
继代选择培养基 (3 次及之后继代)	RIM + 200mg/L Carbencillin + 5mg/L Kanamycin, pH 5.8

预培养时间 花椰菜带柄子叶分别在预培养基上培养 0d、1d、2d、3d、4d,以 OD₆₀₀ 值为 0.3~0.4 的农杆菌菌液侵染 8min,共培养 2d。

工程菌浓度 花椰菜带柄子叶预培养 2d 后,用不同浓度的菌液 OD₆₀₀ <0.1、0.1~0.2、0.3~0.4、0.5~0.9、>0.9 分别进行侵染,侵染 8min,共培养 2d。

侵染时间 花椰菜带柄子叶预培养 2d,以农杆菌菌液浓度 OD₆₀₀ 为 0.3~0.4 分别侵染 <1min、5min、8min、15min、30min,共培养 2d。

共培养时间 花椰菜带柄子叶预培养 2d,以农杆菌菌液浓度 OD₆₀₀ 为 0.3~0.4 侵染 8min 后,分别共培养 1d、2d、3d、4d、5d、6d、7d。

乙酰丁香酮的浓度 花椰菜带柄子叶预培养 2d,以农杆菌菌液浓度 OD₆₀₀ 为 0.3~0.4 侵染 8min 后,分别转入含乙酰丁香酮浓度为 0、100、200μmol/L 共培养基中,共培养 2d。

以上所有处理在完成上述的试验后,均分别取 1/3 外植体进行组织化学染色,检测 *GUS* 基因瞬时表达率。剩余的 2/3 外植体在适合的培养基培养 2 个月后,待转化植株发生,取转化株的叶片进行组织化学染色,以检测 *GUS* 基因稳定表达率。

1.2.4 卡那霉素对花椰菜带柄子叶不定芽发生的敏感性测试 取花椰菜带柄子叶 20 个,接种于含卡

那霉素(0.5、10、15、20、30mg/L)的不定芽诱导培养基中,每个处理设3次重复。观察其不定芽再生情况,30d后统计不定芽发生率。

1.2.5 *GUS* 组织化学染色及表达率的计算 共培养后检测 *GUS* 基因瞬时表达和转化植株叶片 *GUS* 基因稳定表达的检测,参照 Jefferson 等^[7]的方法,染色12h后检测,并统计结果。

GUS 瞬时表达率(%) = GUS 阳性外植体数量/总外植体数 $\times 100\%$

GUS 稳定表达率(%) = GUS 阳性转化株数量/总外植体数 $\times 100\%$

1.2.6 转化植株 PCR 检测 DNA 提取参照 Guo 等^[8]的方法。PCR 扩增体系为 20 μ l,扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 1min;94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 45s,30cycles;72 $^{\circ}$ C 7min。引物序列(所扩增片段为 680bp):5'-GCG TCG CAG AAC ATT ACA-3';5'-GCA ACT GGA CAA GGC ACT-3'。

2 结果与分析

2.1 *GUS* 基因瞬时表达和稳定表达的形态表现

GUS 基因瞬时表达组织化学染色的形态表现为点状蓝斑(图 1-a)和片状蓝斑(图 1-b),外植体的片状蓝斑比点状蓝斑意味着更多的植物细胞被转化,或更强的 *GUS* 基因表达。*GUS* 基因稳定表达组织化学染色如图 1-c。

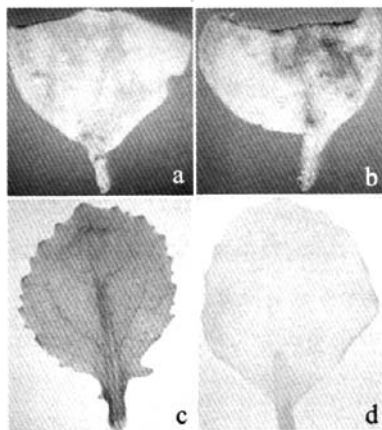


图1 花椰菜带柄子叶 *GUS* 基因瞬时表达和稳定表达的形态表现

Fig.1 *GUS* transient and stable expression in cauliflower

a:花椰菜带柄子叶的 *GUS* 瞬时表达,呈现点状蓝斑;b:花椰菜带柄子叶的 *GUS* 瞬时表达,呈现片状蓝斑;c:花椰菜转化株的子叶 *GUS* 稳定表达,叶片全部呈现蓝色;d:花椰菜未转化株的子叶未见 *GUS* 表达,叶片呈现白色

2.2 预培养时间对瞬间表达率和稳定表达率的影响

图2表明,预培养时间不同,*GUS* 基因瞬间表达率和稳定表达率不同。未进行预培养(0d)而直接用农杆菌侵染,侵染后的外植体容易褐化死亡,仅剩余极少量外植体,瞬间表达率和稳定表达率都最低;在1~2d内,随着预培养时间增加,*GUS* 基因瞬间表达率和稳定表达率均升高,当预培养时间为2d时,两种表达效率均达到最高,瞬间表达率为86.8%,稳定表达率为33.1%;当预培养超过2d后,外植体膨大明显,*GUS* 基因瞬间表达率和稳定表达率都开始下降,*GUS* 基因稳定表达率的变化呈现显著差异。这说明:花椰菜带柄子叶如果预培养时间超过2d,由于其不定芽再生属于直接器官再生,再生时间短;而过长的预培养时间将错过农杆菌侵染外植体细胞的最佳时间,随之再生的不定芽多为假阳性和嵌合体,转化率将极大降低。由此表明,适当的预培养时间对于 *GUS* 转化率是至关重要的,本试验表明:花椰菜带柄子叶外植体预培养2d是最适合的。适当的预培养时间,可以减轻外植体的伤害胁迫,调整细胞状态,以利于农杆菌的感染。其他学者的报道^[9-12]也强调了芸薹属植物预培养因子在遗传转化中的重要性,其原因是预培养处理可以增强细胞的感受态状态^[5],即一定的预培养时间可以减轻农杆菌对其造成的伤害,调整外植体细胞处于最易接受外来信息的状态,有利于农杆菌的转化。

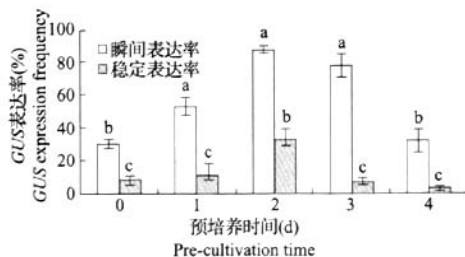


图2 预培养时间对花椰菜 *GUS* 瞬间表达率和稳定表达率的影响 ($P < 0.05$, 下同)

Fig.2 Effect of different pre-cultivation time on transient and stable *GUS* expression in cauliflower ($P < 0.05$, the same as below)

2.3 菌液浓度对瞬间表达率和稳定表达率的影响

图3表明,农杆菌菌液浓度能够明显影响 *GUS* 基因瞬间表达率和稳定表达率。随着菌液浓度的升高,*GUS* 基因瞬间表达率和稳定表达率在 OD₆₀₀ 0.3~0.4时,达到最高值,其数值与其他处理表现显著差异。菌液浓度 OD₆₀₀ 值低于0.1时,由于

菌液浓度过低,农杆菌的数目不足以侵染外植体细胞,农杆菌的 T-DNA 向植物细胞的转移率较低,造成转化率低;菌液浓度 OD₆₀₀ 值高于 0.5 后,农杆菌会过度繁殖,对花椰菜带柄子叶造成伤害,由于外植体对农杆菌非常敏感,外植体多出现褐化现象,尽管瞬间表达率仍比较高,但在后期培养过程中,外植体逐渐褐化死亡,再生不定芽数量急剧下降,因此稳定表达率也显著降低。

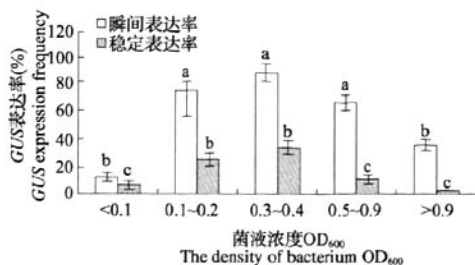


图3 菌液浓度对花椰菜 *GUS* 基因瞬间表达率和稳定表达率的影响

Fig.3 Effect of different bacterium density on transient and stable *GUS* expression in cauliflower

2.4 侵染时间对瞬间表达率和稳定表达率的影响

图4表明,随着农杆菌侵染花椰菜带柄子叶时间的增加,*GUS* 基因瞬间表达率增加;当侵染时间在 5~30min 内,瞬间表达率都比较高,其数值差异不明显。当侵染时间为 8min 时,*GUS* 基因的稳定表达率达到最高值,之后随着侵染时间的增加,稳定表达率急剧下降,呈现显著差异。这一趋势与工程菌菌液浓度增高导致 *GUS* 基因转化率降低类似,因为花椰菜带柄子叶对农杆菌的敏感性,侵染时间长的外植体易发生褐化现象,导致再生不定芽数量降低,因此稳定表达率也骤降。

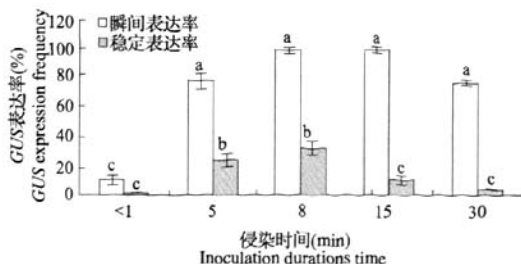


图4 侵染时间对花椰菜 *GUS* 基因瞬间表达率和稳定表达率的影响

Fig.4 Effect of inoculation duration time with *Agrobacterium tumefaciens* on transient and stable *GUS* expression in cauliflower

2.5 共培养时间对瞬间表达率和稳定表达率的影响

图5表明,随着共培养时间的增加(1~7d),1~3d 时,*GUS* 基因的瞬间表达率增加,在共培养 3d 时达到最高,可达 100%;而共培养从第 4 天开始,瞬间表达率开始下降,原因是随着共培养天数的增加,农杆菌大量繁殖生长,很快铺满培养基,并覆盖外植体表面,以致于掩埋了整个外植体,使外植体褐化死亡,因而瞬间表达率降低。*GUS* 基因稳定表达率在共培养 2d 时达到最高值,3~7d 后表达率降低,它们之间呈现显著差异。共培养时间是影响遗传转化的一个重要因素,在这个环节中包含农杆菌的附着,T-DNA 的转移和整合等关键过程。一般认为,农杆菌附着于外植体伤口表面后不能立即转化,附着需要达到 16h 以上,菌株才能进行遗传转化^[13]。理论上讲,农杆菌与植物受体共培养时间越长,农杆菌侵染的几率越大,基因转化的频率就越高。但由于花椰菜带柄子叶对农杆菌的敏感性,如果共培养时间过长,外植体会因为过度感染而褐化死亡,达不到良好的转化效果。本试验表明,花椰菜带柄子叶最佳共培养时间为 2d。Bhalla 等^[4]的试验也表明,花椰菜农杆菌转化中带柄子叶和下胚轴的共培养时间 2d 是最适合的。

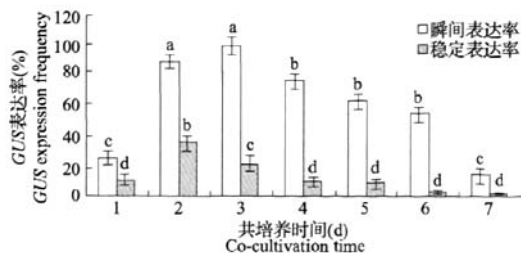


图5 共培养时间对花椰菜 *GUS* 基因瞬间表达率和稳定表达率的影响

Fig.5 Effect of co-cultivation time on transient and stable *GUS* expression in cauliflower

2.6 乙酰丁香酮浓度对瞬间表达率和稳定表达率的影响

图6表明,与乙酰丁香酮浓度 0μmol/L、200μmol/L 相比,附加 100μmol/L 乙酰丁香酮后,*GUS* 基因瞬时表达率和稳定表达率大大提高,它们的数值呈现显著差异。通常情况下,在外植体转化过程中,乙酰丁香酮作为创伤信号或创伤诱导分子诱导农杆菌 *Vir* 基因的活化和表达^[14-16],适当的乙酰丁香酮浓度可显著提高转化效率^[17],而本试验结

果也证实了这一点。但是不同的作物或同一作物不同外植体,其最适宜的乙酰丁香酮浓度不同^[14-16,18],需根据试验来确定。

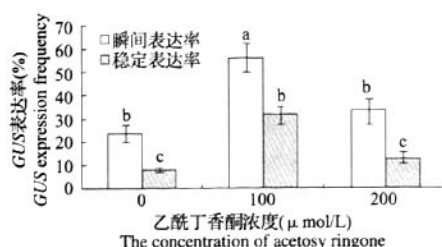


图6 乙酰丁香酮浓度对花椰菜 *GUS* 基因
瞬间表达率和稳定表达率的影响

Fig. 6 Effect of different concentration of acetosyringone in the cocultivation medium on transient and stable *GUS* expression in cauliflower

2.7 筛选时间对瞬间表达率和稳定表达率的影响

在花椰菜带柄子叶农杆菌介导过程中,如果不进行恢复培养,直接加入卡那霉素进行抗性筛选,几乎没有转化植株存活,大部分外植体褐化死亡,转化率极低;而在共培养7d后再附加筛选压,则转化不定芽发生率显著增加,遗传转化率升高,可达26.4%。Toriyama等^[19]和Narasimhulu等^[20]也报道了延迟筛选在芸薹属作物农杆菌介导转化过程中的重要作用。

2.8 花椰菜带柄子叶卡那霉素筛选压的确定

试验结果表明,当卡那霉素浓度为3mg/L时,花椰菜外植体的不定芽再生即受到明显抑制,不定芽再生率仅为10.3%;在5mg/L时,花椰菜外植体不定芽几乎完全受到抑制,仅有0.05%绿色不定芽发生;当卡那霉素浓度>10mg/L时,没有不定芽发生。由于筛选压过高将抑制不定芽的再生,使得转化率降低;过低则容易产生假阳性植株。因此,结合花椰菜带柄子叶对卡那霉素的敏感性,筛选压浓度选用5mg/L比较适宜。DeBlock等^[21]和Metz等^[11]在青花菜抗性筛选中选择卡那霉素筛选浓度分别为50mg/L和25mg/L,这种差异可能是作物品种不同导致。值得注意的是,筛选压临界值的确定,需要兼顾抗性筛选有效性和不定芽再生率的辩证关系。适度的抗生素筛选压,对花椰菜遗传转化率的提高具有促进作用。

2.9 转化植株的分子鉴定

对已获得稳定表达的转化植株进行PCR扩增,结果表明,在680bp处有明显的目的条带。说明*GUS*基因已经整合到了花椰菜基因组中,利用优化的农杆菌转化体系,可以得到稳定的转化植株。

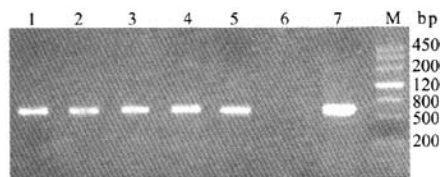


图7 转化植株的PCR鉴定

Fig. 7 PCR analysis of the putative transgenic plants

1~5:转化植株;6:阴性对照;7:阳性对照;M:Marker III

3 讨论

高效遗传转化体系的建立是植物利用基因工程手段获得新种质的基础。本试验中,以花椰菜带柄子叶为外植体,以农杆菌EHA105为转化菌,研究了遗传转化过程中主要影响因子对转化率的影响,发现农杆菌工程菌浓度、侵染时间、共培养时间、延迟筛选等环节对花椰菜的遗传转化具有明显影响。花椰菜农杆菌介导遗传转化中最大的难点是外植体对农杆菌的敏感性^[5],农杆菌侵染后外植体是否容易褐化是遗传转化成功的关键^[22]。本试验将工程菌浓度、侵染时间、共培养时间、延迟筛选等环节进行的“温和”处理,显著缓解了外植体的敏感性,有效降低了外植体的褐化,从而对最终转化率的提高有很大的贡献。这一研究补充了前人的试验方案^[3-4],使得花椰菜带柄子叶的转化率与以前的报道^[4,6]相比有了很大的提高。这一转化体系的优化研究为芸薹属蔬菜高效遗传转化提供了技术保障,有利于芸薹属蔬菜遗传育种与种质创新研究。

汲逢源等^[23]在对农杆菌介导的大豆下胚轴*GUS*基因瞬时表达的影响试验中,指出在共培养基中加入硫代硫酸钠、L-半胱氨酸以及二硫苏糖醇等抗氧化剂,可以有效的抑制大豆下胚轴在组培过程中褐化的发生,并大幅度提高农杆菌在下胚轴的瞬时表达率。刘金华等^[24]的研究表明,在农杆菌转化大豆过程中,辅加化合物脯氨酸和硝酸银,这两种化合物均能明显的提高大豆的转化率。在进一步试验中,也将硫代硫酸钠、L-半胱氨酸、脯氨酸等加入共培养基中,以期筛选出适合花椰菜转化的化合物种类和浓度,从根本上减少组织培养中外植体的褐化现象,试验正在进行中。

关于瞬间表达率和稳定转化率的关系,Jansson等^[25]报道,在矮牵牛叶盘上外源基因的瞬间表达水平可以比稳定转化高1000倍。王艳丽等^[26]发现*GUS*基因瞬间表达率与稳定转化率在草坪草上很不一致,认为这可能取决于不同草坪草品种其细胞内部

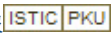
的基因表达调控系统,即虽然部分细胞已被农杆菌感染,但外源基因没有在被转化的细胞中得到及时表达。我们认为农杆菌在受体细胞的瞬间表达和受体细胞再生是两个不同的生理过程,瞬间表达是外源基因进入受体细胞内处于未整合状态下短时间的表达,与稳定表达相比,它没有位置效应,无需受体细胞的培养和再生过程,表达快速,因而表达效率很高。本试验的结果表明,尽管 *GUS* 基因的瞬间表达率和稳定表达率并不存在绝对相关性,*GUS* 瞬间表达率高并不一定意味着转化率一定就高,但瞬间表达分析仍然可以作为外源基因进入受体细胞的指示。在花椰菜的遗传转化中,追求高的瞬间表达率和克服外植体褐化,这两个问题同等重要,这样能够使瞬间表达趋势更加接近转化率趋势。另外,为了使瞬间表达能更有效的发挥对最终转化率的指示作用,量化 *GUS* 基因瞬间表达强弱这一参数,刘栋等^[27] 提出的更为精确的瞬间表达分级是可以借鉴的。

参考文献

- [1] Bhalla P L, Smith N A. Comparison of shoot regeneration potential from seedling explants of Australian cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) varieties [J]. Aust J Agric Res, 1998, 49: 1261-1266
- [2] Bhalla P L, Weed N D. *In vitro* propagation of cauliflower, *Brassica oleracea* var. *L. botrytis* for hybrid seed production [J]. Plant Cell Rep, 1999, 56: 89-95
- [3] Qin Y, Gao L H, Guo Y D, et al. Shoot differentiation, regeneration of cauliflower and analysis of somaclonal variation by RAPD [J]. Hereditas, 2006, 143: 91-98
- [4] Bhalla P L, Smith N. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of cauliflower, *Brassica oleracea* var. *botrytis* [J]. Mol Breed, 1998, 4: 531-541
- [5] Puddephat I J, Riggs T J, Fenning T M. Transformation of *Brassica oleracea* L.: a critical review [J]. Mol Breed, 1996, 2: 185-210
- [6] Eimert K, Siegmund F. Transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) - an experimental survey [J]. Plant Mol Biology, 1992, 19: 485-490
- [7] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants [J]. EMBO J, 1987, 6: 3901-3907
- [8] Guo Y D, Yli-Matit T, Pulli S. Analysis of timothy (*Phleum pratense* L.) genetic variation with RAPD and UP-PCR [J]. Hereditas, 2003, 138: 101-113
- [9] McHughen A, Jordan M, Feist G. A procedure period prior to *Agrobacterium* inoculation increase production of transgenic plants [J]. J Plant Physiol, 1989, 135: 245-248
- [10] Sangwan R S, Bourgeois Y, Brown S, et al. Characterization of competent cells and early events of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Arabidopsis thaliana* [J]. Planta, 1992, 188: 439-456
- [11] Metz T D, Dixit R, Earle E D. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and cabbage (*B. oleracea* var. *capitata*) [J]. Plant Cell Rep, 1995, 15: 287-248
- [12] Villemont E, Dubois F, Sangwan R S, et al. Role of the host cell cycle in the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Petunia*: evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer [J]. Planta, 1997, 201: 160-172
- [13] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 (第二版) [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 389
- [14] Yu B, Zhai H, Wang Y P, et al. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation using embryogenic suspension cultures in sweetpotato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2007, 90: 265-273
- [15] Nandakumar R, Chen L, Rogers S M D. Factors affecting the *Agrobacterium*-mediated transient transformation of the wetland monocot, *Typha latifolia* [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2004, 79: 31-38
- [16] Guo Y D, Hisano H, Shimamoto Y, et al. Transformation of androgenic-derived *Festulolium* plants (*Lolium perenne* L. *Festuca pratensis* Huds.) by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2009, 96: 219-227
- [17] Henzi M X, Christey M C, McNeil D L. Factors that influence *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) [J]. Plant Cell Rep, 2000, 19: 994-999
- [18] 朱晋云, 许玉娟, 杨丽萍, 等. 小麦组织培养再生系统及农杆菌介导的转基因技术研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9 (1): 84-89
- [19] Toriyama K, Stein C, Nasrallah J B. Transformation of *Brassica oleracea* with an S-locus gene from *B. campestris* changes the self-incompatibility phenotype [J]. Theor Appl Genet, 1991, 81: 769-776
- [20] Narasimulu S B, Kirti P B, Mohapatra T, et al. Shoot regeneration in stem explants and its amenability to *Agrobacterium tumefaciens* mediated gene transfer in *Brassica carinata* [J]. Plant Cell Rep, 1992, 11: 359-362
- [21] De Block M, De Brouwer D, Tenning P. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression bar and new genes in transgenic plants [J]. Plant Physiol, 1989, 91: 694-701
- [22] Sparrow P A C, Dale P J, Irwin J A. The use of phenotypic markers to identify *Brassica oleracea* genotypes for routine high-throughput *Agrobacterium*-mediated transformation [J]. Plant Cell Rep, 2004, 23: 64-70
- [23] 汲逢源, 王戈亮, 许亦农. 抗氧化剂对农杆菌介导的大豆下胚轴 *GUS* 基因瞬时表达的影响 [J]. 植物生态学报, 2006, 30 (2): 330-334
- [24] 刘金华, 王丕武, 武丽敏, 等. 脯氨酸、硝酸银对农杆菌转化大豆的影响 [J]. 大豆科学, 2003, 22 (1): 36-39
- [25] Jansson B J, Gardner R C. Localized transient expression of *GUS* in leaf disc following cocultivation with *Agrobacterium* [J]. Plant Mol Biol, 1989, 14: 61-72
- [26] 王艳丽, 叶兴国, 董芳, 等. 高羊茅和黑麦草农杆菌介导转化体系的研究 [J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27 (1): 22-27
- [27] 刘栋, 石强, 李鹏丽, 等. 利用 *GUS* 基因瞬时表达对大豆子叶节和胚尖转化方法的比较及优化 [J]. 生物学通报, 2008, 43 (12): 35-39

作者: 于娅, 刘莉莎, 赵永钦, 赵冰, 郭仰东, YU Ya, LIU Li-sha, ZHAO Yong-qin, ZHAO Bing, GUO Yang-dong

作者单位: 于娅, YU Ya (武汉生物工程学院生物工程系, 武汉, 430415; 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京, 100193), 刘莉莎, 赵永钦, 赵冰, 郭仰东, LIU Li-sha, ZHAO Yong-qin, ZHAO Bing, GUO Yang-dong (中国农业大学农学与生物技术学院, 北京, 100193)

刊名: 植物遗传资源学报 

英文刊名: JOURNAL OF PLANT GENETIC RESOURCES

年, 卷(期): 2010, 11(3)

参考文献(27条)

1. [McHughen A;Jordan M;Feist G A procedure period prior to Agrobacterium inoculation increase production of transgenic plants](#) 1989
2. [Guo Y D;Yli-Mattil T;Pulli S Analysis of timothy\(Phleum pretense L.\)genetic variation with RAPD and UP-PCR\[外文期刊\]](#) 2003(2)
3. [Jefferson R A;Kavangh T A;Bevan M W GUS fusions: \$\beta\$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants](#) 1987
4. [Eimert K;Siegemund F Transformation of cauliflower\(Brassica oleracea L.vat.botrysis\)-an experimental survey\[外文期刊\]](#) 1992
5. [Puddephat I J;Riggs T J;Fenning T M Transformation ofBrassica oleracea L.:a critical review\[外文期刊\]](#) 1996(3)
6. [Bhalla P L;Simth N Agrobacterium tumefaciens mediated transformation of cauliflower,Brassica oleracea var.botrytis\[外文期刊\]](#) 1998(6)
7. [Qin Y;Gao L H;Guo Y D Shoot differentiation and generation of cauliflower and analysis of somaclonal variation by RAPD\[外文期刊\]](#) 2006(2006)
8. 刘栋;石强;李鹏丽 利用GUS基因瞬时表达对大豆子叶节和胚尖转化方法的比较及优化[期刊论文]-[生物学通报](#) 2008(12)
9. 王艳丽;叶兴国;董芳 高羊茅和黑麦草农杆菌介导转化体系的研究[期刊论文]-[中国生物工程杂志](#) 2007(01)
10. [Jansson B J;Gardner R C Localized transient expression of GUS in leaf disc following cocultivation with Agrobacterium](#)[外文期刊] 1989
11. 刘金华;王丕武;武丽敏 脯氨酸、硝酸银对农杆菌转化大豆的影响[期刊论文]-[大豆科学](#) 2003(01)
12. 汲逢源;王戈亮;许亦农 抗氧化剂对农杆菌介导的大豆下胚轴GUS基因瞬时表达的影响[期刊论文]-[植物生态学报](#) 2006(02)
13. [Sparrow P A C;Dale P J;Irwin J A The use of phenotypic markers to identify Brassica oleracea genotypes for routine highthroughput Agrobacterium-mediated transformation](#) 2004
14. [De Block M;De Brouwer D;Tenning P Transformation ofBrassica napus and Brassica oleracea using Agrobacterium tumefaciens and the expression bar and new genes in transgenic plants\[外文期刊\]](#) 1989
15. [Narasimhulu S B;Kiwi P B;Mohapatra T Shoot regeneration in stem explants and its amenability to Agrobacterium tumefaciens mediated gene transfer in Brassica carinata](#) 1992
16. [Toriyama K;Stein C;Nasrallah J B Transformation of Brassica oleracea with an S-locus gene from B. campestris changes the selfincompatibility phenotype](#) 1991

17. [朱晋云;许玉娟;杨丽萍](#) [小麦组织培养再生系统及农杆菌介导的转基因技术研究](#)[期刊论文]-[植物遗传资源学报](#) 2008(01)
18. [Henzi M X;Christey M C;McNeil D L](#) [Factors that influence Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of broccoli \(Brassica oleracea L.var.italica\)](#) 2000
19. [Guo Y D;Hisano H;Shimamoto Y](#) [Transformation of androgenic-derived Festulolium plants\(Lolium perenne L.Festuca pratensis Huds.\)by Agrobacterium tumefaciens](#)[外文期刊] 2009(2)
20. [Nandakumar R;Chen L;Rogers S M D](#) [Factors affecting the Agrobacterium-mediated transient transformation of the wetland monocot,Typha latifolia](#) 2004
21. [Yu B;Zhai H;Wang Y P](#) [Efficient Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation using embryogenic suspension cultures in sweetpotato,pomoea batatas\(L.\)Lam](#) 2007
22. [王关林;方宏筠](#) [植物基因工程](#) 2002
23. [Villemont E;Dubois F;Sangwan R S](#) [Role of the host cell cycle in the Agrobacterium-mediated genetic transformation of Petunia:evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer](#)[外文期刊] 1997(2)
24. [Metz T D;Dixit R;Earle E D](#) [Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of broccoli\(Brassica oleracea vat.italica\)and cabbage\(B.oleracea var.eupitata\)](#) 1995
25. [Sangwan R S;Bourgeois Y;Brown S](#) [Characterization of competent cells and early events of Agrobacterium-mediated genetic transformation in Arabidopsis thaliana](#) 1992
26. [Bhalla P L;Weed N D](#) [In vitro propagation of cauliflower.Brassica oleracea vat.L.botrytis for hybrid seed production](#) 1999
27. [Bhalla P L;Smith N A](#) [Comparison of shoot regeneration potential from seedling explants of Australian cauliflower\(Brassica oleracea var.botrytis\)varieties](#) 1998

引证文献(1条)

1. [魏利斌. 马琴. 据铭. 张体德. 王慧丽. 苗红梅](#) [芝麻子叶基因转化受体系统的建立](#)[期刊论文]-[分子植物育种](#) 2011(6)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201003013.aspx