

优良大麦品种花 30 幼胚遗传转化体系的优化

高润红^{1,2}, 杜志钊^{1,2}, 郭桂梅³, 邹磊^{1,2}, 何婷^{1,2}, 陈志伟^{1,2}, 李梁³, 陆瑞菊^{1,2}, 黄剑华^{1,2}

(¹上海市农业科学院生物技术研究所, 上海 201106; ²上海市农业遗传育种重点实验室, 上海 201106;

³上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 以大麦花培基因型花 30 的幼胚为外植体, 设置不同的培养基类型、不同激素配比及碳源, 研究其对幼胚愈伤组织诱导及绿苗分化的影响, 以此建立和优化一个适于优良大麦品种遗传转化的高效组织培养体系。结果表明: 在 N6、MS 和 B5 的组合改良培养基下, 以蔗糖为碳源, 附加 2mg/L 2,4-D、1mg/L ABA 时, 有最高的愈伤组织诱导率, 且愈伤质量最好。Cu²⁺ 的添加具有抑制幼胚直接发芽成苗和改善愈伤组织质量的双重功效。添加 2mg/L 6-BA 对愈伤组织的分化效果比较理想。为了提高农杆菌介导转化大麦外源基因的瞬时表达率和优化遗传转化体系, 利用花 30 幼胚产生的愈伤组织为受体材料, 通过检测 GUS 基因的瞬时表达情况, 研究了农杆菌介导的大麦遗传转化中菌液的浓度、侵染时间以及共培养天数对遗传转化的影响, 结果表明: 当菌液浓度 OD₆₀₀ = 0.5 的条件下, 侵染 15min, 共培养 2d 表现出最佳的 GUS 瞬时表达率。

关键词: 大麦; 幼胚; 愈伤诱导; 分化再生; 遗传转化

Optimization of Genetic Transformation System for Immature Embryos of Improved Barley (*Hordeum vulgare* L.) Variety Hua 30

GAO Run-hong^{1,2}, DU Zhi-zhao^{1,2}, GUO Gui-mei³, ZOU Lei^{1,2}, HE Ting^{1,2}, CHEN Zhi-wei^{1,2},

LI Liang³, LU Rui-ju^{1,2}, HUANG Jian-hua^{1,2}

(¹Biotech Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106;

²Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201106;

³College of Fishery and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract: In order to establish a highly efficient plant regeneration system suitable for gene transformation, the immature embryos of Hua 30, which is an improved barley variety derived from anther culture, was used as explants to study the effects of different medium, hormone combination and carbon sources on callus induction and plant regeneration. The results indicated that the combination medium of modified N6, MS and B5 + 2mg/L 2,4-D + 1mg/L ABA + 30g/L sucrose was optimal for callus induction. The addition of Cu²⁺ had effects on inhibiting immature embryos germination and improving callus quality on callus induction. The highest regeneration frequency could be obtained by adding 2mg/L 6-BA in differentiation medium. Meanwhile, some factors that affect transient expression including bacterial concentrations, infection time and co-culture period were investigated by detecting transient expression of GUS gene to increase the frequency of transient expression of exogenes mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and to optimize the transformation conditions in barley variety Hua 30. The results showed that the higher transient expression frequency of GUS gene could be resulted from *Agrobacterium tumefaciens* bacterial concentration of OD₆₀₀ = 0.5, 15min infection, 2d co-cultivation.

收稿日期: 2011-08-08 修回日期: 2011-10-09

基金项目: 大麦青稞产业技术体系 (CARS-05); 上海市科委基础重点项目 (09JC1412800); 上海市科技兴农重点攻关项目 (沪农科攻字 (2009) 第 2-1 号)

作者简介: 高润红, 实习研究员, 研究方向为植物细胞工程育种。E-mail: gaorunhong2005@163.com

并列第一作者: 杜志钊, 实习研究员, 研究方向为植物细胞工程育种。E-mail: zhao720112zhao@163.com

通讯作者: 黄剑华, 博士, 教授。E-mail: sw1@saas.sh.cn

Key words: Barley; Immature embryo; Callus induction; Plant regeneration; Genetic transformation

细胞、组织培养系统的建立,不仅使通过体细胞无性系变异进行作物遗传改良成为可能,同时也为植物的遗传转化提供了较为理想的受体材料^[1]。大麦是较早开展组织培养的禾本科作物之一,戎均康^[2]曾总结提到早在 19 世纪 90 年代, Brown 和 Mortis 就观察了大麦成熟胚离体培养反应,并通过调整培养基氮源种类、微量元素用量,从而发展了大麦胚的无菌培养方法。然而,不同类型的组织和细胞具有不同的脱分化和再分化能力。有研究表明,相对于其他组织、器官而言,以植物未成熟胚作为外植体进行组织培养,具有愈伤组织诱导率高及植株再生率高等优点^[3-5]。因此,以大麦幼胚作为外植体进行组织培养越来越受到人们的重视,并取得了一些进展^[6-9]。然而,大麦幼胚培养对基因型的严重依赖阻碍了使其成为成熟的转基因受体系统。目前,大麦转基因研究主要基于模式品种 Golden Promise^[10-11],而适应于此品种的组织培养体系并不完全适合其他大麦品种,特别是近年来新育成的部分优良大麦品种。因此,本试验选取了通过细胞工程育种育成的,集优质、高产、抗病、抗逆等优点于一身的大麦品种花 30 为试验材料,以适时的种子幼胚为外植体,研究了不同组织培养条件对其愈伤组织诱导及其植株再生的影响;并利用农杆菌介导法对愈伤组织进行转化,探讨了不同菌液浓度、侵染时间和共培养时间对转化频率的影响,旨在突破模式品种的限制,建立和完善适用于大面积推广种植的优秀大麦品种的遗传转化体系。

1 材料与方法

1.1 供试品种

上海农科院细胞工程研究室利用花药培养技术育成的细胞工程大麦品种花 30。

1.2 培养基

愈伤组织诱导分别以 MS、N6 及 N6 大量 + B5 有机 + MS 微量的 3 种基本培养基,添加 2,4-D 和 ABA,并设置不同的碳源及组合(表 1)。分化培养基以 MS 为基本培养基,分别设置不同浓度的 6-BA、NAA 和 KT 的激素配比(表 2)。

1.3 农杆菌菌株及质粒

农杆菌菌株为 EHA105,其中含有经过改造的 pCAMBIA-1301, T-DNA 区含有新霉素磷酸转移酶基因 *npt II* 和葡糖苷酸酶基因 *GUS*,其中 35S 启动

子被 *Ubi* 启动子所取代。

表 1 诱导愈伤 $L_9(3^4)$ 正交试验的因素和水平

Table 1 Factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal test for callus induction

水平	培养基	2,4-D	ABA	C 源(g/L)
Levels	Medium	(mg/L)	(mg/L)	Carbon source
1	MS	1	0.2	蔗糖 30
2	N6 + MS + B5	2	0.5	麦芽糖 30
3	N6	3	1	蔗糖 + 山梨醇(15 + 15)

表 2 愈伤分化 $L_9(3^3)$ 正交试验的因素和水平

Table 2 Factors and levels of $L_9(3^3)$ orthogonal test for regeneration test (mg/L)

水平 Levels	6-BA	NAA	KT
1	2	0	0
2	3	0.2	0.5
3	4	0.5	1

1.4 试验方法

1.4.1 幼胚愈伤组织诱导及分化 晴天取扬花后 12~16d 的大麦穗,剥去种皮后用蒸馏水冲洗 3 遍,经 75% 酒精表面消毒 3min 后,用 0.2% $HgCl_2$ 浸泡 10min,最后用灭菌水冲洗 3~5 遍。超净工作台上用接种针剥取直径 1mm 大小的幼胚,盾片朝上接种至愈伤诱导培养基上,每个三角瓶接种胚 15 枚,每处理重复 10 次,共 150 枚。26℃ 暗培养 10d 左右,之后将胚性愈伤转至分化培养基中进行分化培养,每处理重复 6 次。

1.4.2 农杆菌转化 取预培养 7d 的花 30 的愈伤组织作为受体进行遗传转化,农杆菌菌液浓度分别设置为 $OD_{600} = 0.2, 0.5$ 和 1.0 的 3 个梯度,然后将含有 *GUS* 基因的菌液用于愈伤侵染,侵染的时间分别设为 10、15 和 20min 的 3 个梯度,将侵染过后的愈伤组织挑出来放入无菌的无水滤纸上,25℃ 进行共培养 1、2 和 3d,每个处理 40 块愈伤。

1.4.3 *GUS* 组织化学染色 *GUS* 组织化学染色检测,按 Jefferson 等^[12]的方法进行。共培养后将愈伤组织浸泡在检测液中,37℃ 恒温箱过夜,然后 70% 酒精中保存,肉眼或显微镜下观察 *GUS* 基因表达情况。

1.5 统计指标和数据处理

愈伤诱导率 = 诱导出愈伤组织的胚数/接种胚总数 × 100%

绿苗分化率 = 分化绿苗数/接种愈伤组织总数 × 100%

GUS 瞬时表达率 = 具有 GUS 活性的愈伤数/侵染愈伤组织总数 $\times 100\%$

所有试验结果采用 Excel 数据处理系统进行统计分析 & 差异显著性比较。

2 结果与分析

2.1 培养基种类及激素配比对花 30 幼胚愈伤组织诱导的影响

试验设置了不同培养基种类、激素配比及不同碳源的处理组合,研究它们对大麦幼胚愈伤组织诱导的影响。结果如表 3 所示,不同处理组合对愈伤组织诱导效果存在一定差异,愈伤诱导率在

73.33% ~ 93.33% 之间,部分处理间差异达到显著水平,且花 30 幼胚在 5 号培养基上有最高的愈伤诱导率。诱导愈伤的质量直接影响其后期的分化再生能力,因此,通过观察愈伤组织质量进行了评估分级,结果发现花 30 幼胚在 3 号、5 号、7 号培养基上诱导出的愈伤质量最佳,大多为胚性愈伤组织(图 1A),4 号培养基不仅愈伤诱导率低,而且形成的愈伤组织质量较差(图 1B)。综合愈伤诱导率及愈伤质量两个因素考虑,可以初步得出,以优化的组合培养基为基本培养基,以蔗糖为碳源,并添加 2mg/L 2,4-D 和 1mg/L ABA,最适合花 30 幼胚愈伤组织的诱导。

表 3 不同处理对花 30 愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effect of different treatment on the callus induction of immature embryo of Hua 30

处理代号 Treatment code	因素 Factors				愈伤组织诱导率(%) Percentage of callus induction	愈伤质量 Quality of callus
	培养基 Medium	2,4-D (mg/L)	ABA (mg/L)	C 源(g/L) Carbon source		
1	MS	1	0.2	蔗糖	88.67 ab	++
2	MS	2	0.5	麦芽糖	92.67 a	+++
3	MS	3	1	蔗糖 + 山梨醇	76.00 bc	++++
4	N6 + MS + B5	1	0.5	蔗糖 + 山梨醇	73.33 c	+
5	N6 + MS + B5	2	1	蔗糖	93.33 a	++++
6	N6 + MS + B5	3	0.2	麦芽糖	92.00 a	+
7	N6	1	1	麦芽糖	86.67 ab	++++
8	N6	2	0.2	蔗糖 + 山梨醇	82.67 b	+++
9	N6	3	0.5	蔗糖	92.67 a	+
K1	85.78	82.89	91.56	87.78		
K2	86.22	89.56	90.44	86.22		
K3	87.33	86.89	77.33	85.33		
R	1.55	6.67	14.23	2.45		

不同小写字母表示处理间差异显著性,下同;愈伤质量:++++ 最好;+++ 较好;++ 一般;+ 最差;K1 ~ K3 为各因素每一水平的均值;R 为 K 值中最大值与最小值之差

Different small letters indicate significant difference, the same as below; Callus quality: ++++ Best; +++ Better; ++ Good; + Worst. K1, K2 and K3: average value of detection result at each level of different factor; R: different between the maximum and minimum K value

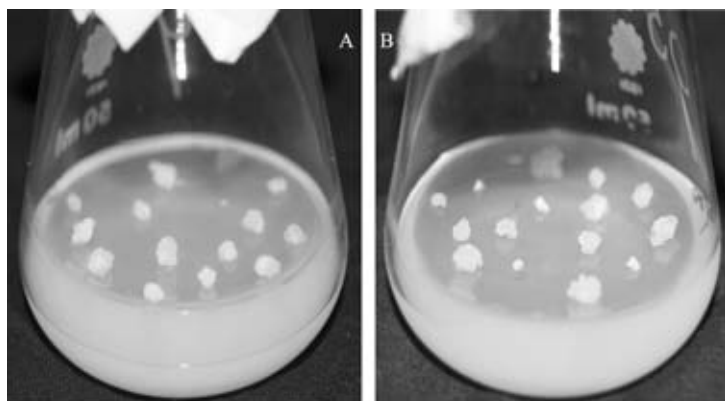


图 1 不同培养基诱导的愈伤质量(培养基编号同表 3)

Fig. 1 The callus quality of different treatments (The treatment codes are in agreement with those in Table 3)

(A) 5 号培养基, (B) 4 号培养基

(A) Treatment 5; (B) Treatment 4

利用极差分析,研究了试验中设置的各项因素对花 30 幼胚愈伤诱导的影响程度。从表 3 可以看出,培养基种类、各激素及碳源对愈伤诱导率的影响贡献不同,从大到小依次为 ABA > 2, 4 - D > 碳源 > 培养基。由此看出,激素种类及配比在幼胚愈伤诱导过程中起到十分重要的作用。

2.2 Cu²⁺ 浓度对花 30 幼胚愈伤组织诱导的影响

试验通过在培养基中添加不同浓度 Cu²⁺ 研究其对幼胚愈伤诱导的影响。由表 4 可以看出,花 30 幼胚在未添加 Cu²⁺ 的对照处理下有最高的愈伤诱导率,达到 89.07%,但随 Cu²⁺ 浓度的升高,出愈率逐渐降低,最大降幅达到 21.82%。根据表 4 还可以看出,培养基中 Cu²⁺ 的添加显著地降低了幼胚的直接萌发出芽率,且愈伤组织质量明显优于未添加 Cu²⁺ 对照处理组。由此可见,Cu²⁺ 的添加虽对花 30 幼胚愈伤诱导存在一定的抑制作用,但可显著抑制胚胎的直接发生并有效改善愈伤质量,为后期的分化再生及农杆菌转化奠定了良好的材料基础。

表 4 Cu²⁺ 对花 30 幼胚愈伤组织诱导的影响

Table 4 Effect of additional copper on the callus induction of immature embryo of Hua 30

Cu ²⁺ 浓度 (mg/L)	出愈率 (%)	出芽率 (%)
Copper concentration	Callus induction rate	Shooting rate
CK	89.70 a	10.30 a
0.5	78.79 b	7.27 a
1	78.79 b	1.82 b
1.25	73.33 bc	1.82 b
1.5	67.88 c	1.21 b

2.3 不同激素配比对花 30 幼胚愈伤组织分化的影响

挑选愈伤诱导率最高且愈伤质量最好的 5 号培养基上的胚性愈伤组织,以 MS 为基本培养基,添加不同种类及浓度的激素,研究它们对幼胚愈伤组织分化的影响。由表 5 可以看出,不同激素配比对花 30 愈伤组织的分化影响不同。在培养基中只添加 2mg/L 6-BA 时,绿苗分化率最高,达到 46.67% (图 2A);在添加 4mg/L 6-BA 的培养基上的绿苗分化率与较低浓度的 6-BA 用量下相比较低 (图 2B),由此可以推断较高浓度 6-BA 可能会抑制花 30 幼胚愈伤组织的分化。

表 5 不同处理对幼胚愈伤分化再生的影响

Table 5 Effects of different treatments on the callus regeneration

水平 Levels	因素 Factors			绿苗分化率 (%)
	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	KT (mg/L)	Frequency of green plant regeneration
1	2	0	0	46.67 a
2	2	0.2	0.5	33.33 b
3	2	0.5	1	42.22 ab
4	3	0	0.5	30.00 bc
5	3	0.2	1	40.00 ab
6	3	0.5	0	37.78 ab
7	4	0	1	31.11 bc
8	4	0.2	0	25.56 c
9	4	0.5	0.5	31.11 bc

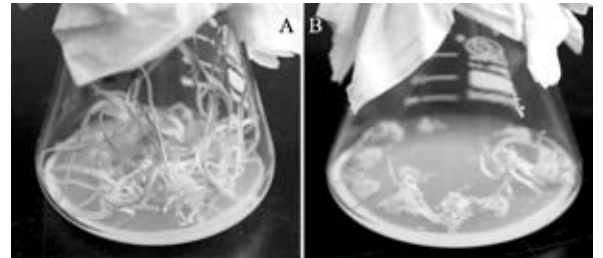


图 2 不同处理的愈伤分化再生情况 (培养基编号同表 5)

Fig. 2 Comparison of the callus regeneration in different treatments (The treatment codes are in agreement with those in Table 5)

(A) 1 号培养基; (B) 8 号培养基

(A) Treatment 1, (B) Treatment 8

2.4 农杆菌介导的大麦愈伤组织遗传转化体系的优化

在农杆菌介导的遗传转化试验中,农杆菌侵染液浓度及侵染时间是影响遗传转化的重要因素,从表 6 中可以看出不同的菌液浓度以及侵染时间对花 30 幼胚愈伤的 GUS 的瞬间表达率有明显的影响,浓度过高或过低、时间过长或过短都会使表达率降低。当菌液浓度 OD₆₀₀ = 0.5, 侵染时间为 15min 时,花 30 幼胚愈伤表现出最高的 GUS 瞬间表达率 (图 3)。

农杆菌和外植体的共培养过程是整个转化体系的重要环节,农杆菌在外植体上的附着、T-DNA 的转移及整合都在这一时期完成。因此,对共培养时间的控制是决定转化试验成功与否的重要因素之一。从表 6 中可以看出在共培养 2d 时, GUS 基因瞬时表达频率最高,当共培养时间延长至 3d 时,瞬间表达率下降。

表 6 菌液浓度、侵染时间及共培养时间对大麦愈伤组织中 *GUS* 基因瞬时表达频率的影响

Table 6 Effects of bacterial concentrations, infection time and co-culture period on transient expression frequency of *GUS* gene in callus of barley

	梯度 Levels	<i>GUS</i> 基因瞬时表达率 (%)
		Transient expression frequency of <i>GUS</i> gene
菌液浓度 (OD ₆₀₀)	0.2	25
Bacterial concentrations	0.5	42.5
	1	27.5
侵染时间 (min)	10	15
Infection time	15	42.5
	20	7.5
共培养天数 (d)	1	22.5
Co-culture period	2	42.5
	3	27.5

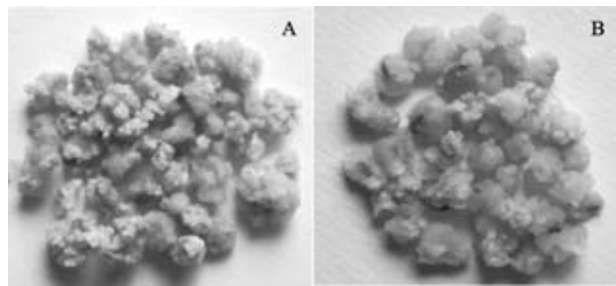


图 3 花 30 愈伤组织经农杆菌转化后 *GUS* 基因的表达

Fig. 3 *GUS* transient express in the immature embryo of

Hua 30 infected by *Agrobacterium tumefaciens*

(A) OD₆₀₀ = 0.5, 侵染 15min, 共培养 2d;

(B) OD₆₀₀ = 0.5, 侵染 20min, 共培养 2d

(A) OD₆₀₀ = 0.5, infection for 15min, co-culture for 2d,

(B) OD₆₀₀ = 0.5, infection for 20min, co-culture for 2d

3 讨论

大量研究表明,禾谷类作物幼胚培养过程中对基因型的依赖已成为限制其作为成熟转基因受体系统的壁垒^[13]。大麦幼胚转基因系统的建立和优化主要基于诱导分化能力均较强的模式品种 Golden promise,如何在此基础上不断改进和完善培养手段,规避基因型限制,建立适合优良大麦品种的遗传转化受体系统对大麦的定向遗传改良显得至关重要。本研究对大麦品种花 30 幼胚愈伤组织诱导及分化过程中的各项参数条件进行优化,使得其愈伤组织诱导率及绿苗分化率分别达到 93.33% 和 46.67%,因此有条件成为较好的遗传转化受体材

料。推测这可能与花 30 作为花培品种的选育背景有关,这是否意味着同一品种在单倍体细胞水平上较强的诱导及再生能力在二倍体细胞水平上同样有所表现,值得进一步研究和探讨。

外源植物生长调节剂是影响植物组织培养的重要因素之一,在愈伤组织诱导和分化再生过程中具有重要作用。本研究结果也表明,培养基中激素种类及配比对大麦幼胚再生的影响超过碳源及培养基。细胞分裂素 2,4-D 一直被认为是愈伤组织诱导中的最关键的激素之一^[14-15]。不同研究对其最适浓度说法不一^[16-17]。本研究结果表明,培养基中添加 2~3mg/L 2,4-D 对大麦幼胚愈伤诱导效果较好,这与 Akula 等^[18]的研究结果相一致。王秀红等^[19]的研究结果表明,适量的 ABA 能提高水稻胚性愈伤组织的形成,于晓红等^[20]在小麦幼胚培养过程中也得出相同的结论。本研究结果表明 ABA 在影响幼胚愈伤诱导的各因素中超过一直被认为在激素中占主导地位的 2,4-D,且在诱导培养基中添加 1mg/L ABA 能极为有效地改善愈伤质量。由此可以看出,ABA 在幼胚愈伤诱导中的作用不容小觑。而也有研究对其作用机理进行了较为深入的探讨,结果表明 ABA 对愈伤组织诱导的影响是因为它能诱导多种特异蛋白的表达,而这些蛋白与植物对逆境反应有关^[21-22]。

Cu²⁺ 是细胞色素氧化酶、多酚氧化酶等参与植物体内重要氧化还原过程的关键酶类的重要组分。以往大量研究认为 Cu²⁺ 含量高于正常水平会干扰植物体内的物质代谢,从而对植物造成毒害^[23],但在组织培养过程中适时、适量的添加 Cu²⁺ 可促进培养物的形态发生^[24-25]。本研究中 Cu²⁺ 的添加虽一定程度降低了愈伤诱导频率,但同时却显著地降低了幼胚直接发芽成苗的比例,并改善了愈伤组织质量,从而提高了绿点率和分化成苗比率。最适合大麦幼胚愈伤组织诱导的 Cu²⁺ 浓度有待进一步研究。

影响农杆菌介导法转化效率的因素,不仅包括受体材料自身的基因型及其再生频率,农杆菌菌液的浓度与侵染时间也是影响遗传转化成败的关键所在,侵染液浓度过高,侵染时间过长易导致外植体组织褐化死亡,且在后期继代筛选培养过程中造成农杆菌的污染,难于控制;侵染液浓度过低,时间过短则没有足够的农杆菌吸附在愈伤表面,大大降低转化效率;还有研究表明,不同的外植体材料对农杆菌敏感程度不同^[26-27],因此,根据不同侵染受体选择适宜的侵染浓度和恰当的侵染时间将有助于提高转

化效率,并降低污染的概率。本研究结果表明在农杆菌菌液浓度为 $OD_{600} = 0.5$, 侵染时间为 15min 时有最高的转化效率。李静雯等^[28] 研究结果表明预培养 1d 的大麦幼胚在菌液浓度 $OD_{600} = 0.5$, 侵染时间为 30min 时转化效率最高, 与本研究中最适的侵染时间不一致, 这是否与材料的预培养时间不同从而导致侵染时幼胚的生理状态的差异有关, 需要进一步研究。农杆菌与外植体共培养在整个转化过程中至关重要, 本研究发现农杆菌与外植体共培养 2d 后得到较高的瞬时表达率, 这与李明浩等^[29] 对农杆菌介导的小麦遗传转化条件的研究以及赵伶俐等^[30] 对农杆菌介导的地被菊遗传转化体系的研究结果相一致。

参考文献

- [1] 杜志钊, 陆瑞菊, 黄剑华, 等. 以单倍体材料为转化受体的植物转基因研究进展[J]. 核农学报, 2010, 24(2): 302-306
- [2] 戎均康. 大麦组织培养研究进展[J]. 大麦科学, 1992, 30(1): 6-9
- [3] 蔡润, 中田和男, 平井八十一. 小麦根愈伤组织诱导再生植株[J]. 上海农业学报, 1999, 15(4): 13-17
- [4] 王万军, 王文芳, 曹建军, 等. 小麦叶片愈伤组织及其再生植株的诱导[J]. 西北植物学报, 1998, 18(3): 401-405
- [5] 柳建军, 于洪欣, 冯兆礼. 小麦成熟胚愈伤组织诱导及分化的研究[J]. 山东农业大学学报, 1996, 27(4): 451-456
- [6] 阎永荣, 张正英, 李静雯, 等. 甘啤 4 号大麦幼胚愈伤组织诱导及植株再生的研究[J]. 分子植物育种, 2010, 8(1): 89-93
- [7] 刘雷, 尹钧, 任江萍, 等. 基因枪轰击后大麦幼胚的组织培养及植株再生研究[J]. 华北农学报, 2003, 18(4): 1-4
- [8] Halamkove E, Vagera J, Ohnoutkova I. Regeneration capacity of calli derived from immature embryos in spring barley cultivars[J]. Biol Plant, 2004, 48(2): 313-316
- [9] Castillo A, Egana B, Sanz J M, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain[J]. Plant Cell Rep, 1998, 17: 902-906
- [10] Bartlett J G, Alves S C, Smedley M, et al. High-throughput Agrobacterium-mediated barley transformation[J]. Plant Method, 2008, 4: 22-33
- [11] Obert B, Middlefell-Williams J, Millam S. Genetic transformation of barley microspores using anther bombardment[J]. Biotech Lett, 2008, 30: 945-949
- [12] 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
- [13] Hanzel J J, Miller J P, Brinkmann M A, et al. Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley[J]. Crop Sci, 1985, 25: 27-31
- [14] 郭晓琳, 张红伟, 刘欣洁, 等. 大麦成熟胚愈伤组织的诱导和植株再生的研究[J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(4): 418-422
- [15] 高艳明, 高建设, 李晓娟. 非洲菊花托组织培养的研究[J]. 西北农业学报, 2006, 15(4): 200-202
- [16] 王睿辉, 陈耀锋, 高秀武, 等. 激素对小麦幼胚胚性无性系高频率诱导的影响[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2001, 29(1): 33-36
- [17] 王亚馥, 崔凯荣, 陈克民, 等. 小麦幼胚培养中体细胞胚发生和植株再生[J]. 植物学通报, 1992(S1): 29
- [18] Akula C, Akula A, Henry R. Improved regeneration efficiency from mature embryos of barley cultivars[J]. Biol Plant, 1999, 42(4): 505-513
- [19] 王秀红, 史向远, 吴先军, 等. 内源激素对水稻不同外植体培养力的影响[J]. 中国农业科学, 2004, 37(12): 1819-1823
- [20] 于晓红, 朱祯, 付志明, 等. 提高小麦愈伤组织分化频率的因素[J]. 植物生理学报, 1999, 25(4): 388-394
- [21] Yazaki J, Shimatani Z, Hashimoto A, et al. Transcriptional profiling of genes responsive to abscisic acid and gibberellin in rice: phenotyping and comparative analysis between rice and *Arabidopsis*[J]. Physiol Genom, 2004, 17(2): 87-100
- [22] Takahashi H, Hotta Y, Hayashi M, et al. High throughput metabolome and proteome analysis of transgenic rice plants (*Oryza sativa* L.)[J]. Plant Biotech, 2005, 22(1): 47-50
- [23] Strange J, Macbaur M R. Evidence for a role for the cell membrane in copper tolerance[J]. New Phytol, 1991, 119: 383-388
- [24] 陈耀锋, 王丽敏, 丁云娇, 等. Cu^{2+} 对小麦幼胚脱分化和高频再生特性的影响[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(10): 1-4
- [25] Savita T, Kothri S L. Increased copper content of the medium improves plant regeneration from immature embryo derived callus of wheat (*Triticum aestivum*) [J]. J Plant Biochem Biotech, 2004, 13(1): 85-88
- [26] 崔广荣. 影响农杆菌转化水稻的主要因素[J]. 种子, 2003(3): 43-46
- [27] 黄益洪, 周森平, 叶兴国, 等. 农杆菌介导法获得小麦转基因植株的研究[J]. 作物学报, 2002, 28(4): 510-515
- [28] 李静雯, 张正英. 根瘤农杆菌介导的大麦幼胚遗传转化影响因素研究[J]. 大麦与谷类科学, 2010(2): 1-6
- [29] 李明浩, 陈炜, 邢莉萍, 等. 农杆菌介导小麦遗传转化条件的优化[J]. 分子植物育种, 2010, 8(2): 388-392
- [30] 赵伶俐, 石少川, 张启翔, 等. 农杆菌介导的地被菊遗传转化体系的优化[J]. 分子植物育种, 2011, 9(1): 74-80