

根癌农杆菌介导的高效水稻遗传转化影响因素

韩光明¹ 李三和² 陈志军² 向发云³ 游艾青² 陈温福¹

(1. 沈阳农业大学 水稻研究所 农业部作物生理生态与遗传育种重点开放实验室 辽宁省北方粳稻育种重点实验室 辽宁 沈阳 110866;

2. 湖北省农业科学院 粮食作物研究所 湖北 武汉 430064; 3. 湖北省农业科学院 经济作物研究所 湖北 武汉 430064)

摘要: 根癌农杆菌介导的水稻遗传转化影响因素主要有农杆菌菌株和载体、水稻基因型、转化受体、共培养条件、选择标记基因和转化程序等。对影响农杆菌介导水稻基因转化效率的以上各种因素进行了综述,并对转化过程中存在的问题进行了讨论。

关键词: 根癌农杆菌; 遗传转化; 影响因素; 水稻

中图分类号: S511.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)增刊-0046-05

Influencing Factors of High Efficiency *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Rice Genetic Transformation

HAN Guang-ming¹ , LI San-he² , CHEN Zhi-jun² , XIANG Fa-yun³ , YOU Ai-qing² , CHEN Wen-fu¹

(1. Rice Institute , Shenyang Agricultural University , Key Laboratory of Crop Physiology , Ecology , Genetics and Breeding , Ministry of Agriculture , Key Laboratory of Northern Japonica Rice Breeding of Liaoning , Shenyang 110866 , China; 2. Food Crops Institute , Hubei Academy of Agricultural Sciences , Wuhan 430064 , China; 3. Research Institute of Economy Crops , Hubei Academy of Agricultural Sciences , Wuhan 430064 , China)

Abstract: Influencing factors of rice genetic transformation mediated by agrobacterium are as follows , including *Agrobacterium tumefaciens* strains and vectors , rice genotypes , transform receptors , co-culture conditions , selectable marker genes , regeneration procedure and so on. Combined with our experiments , above factors are reviewed and the existing problems in the transformation procedure are discussed in this paper.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*; Genetic transformation; Influencing factors; Rice (*Oryza sativa* L.)

近年来,由于稻属种质资源的局限性及传统育种方法的不足,人们试图通过基因工程与常规育种相结合的手段来提高水稻产量、改善水稻品质。基因重组技术是弥补传统育种不足的有效方法。自根癌农杆菌转化水稻获得转化细胞或转基因植株以来^[1-2],农杆菌转化技术的日渐完善及应用的日渐增多显示出农杆菌在转化禾本科作物方面应用的巨大潜力^[3-5]。如今不仅在粳稻中实现了高频转化,也建立了籼稻的高效转化体系^[6-7]。目前,水稻的2个亚种:籼稻和粳稻都已建立了农杆菌遗传转化体系^[2,8-11]。农杆菌介导的外源基因转化是农杆菌菌株与植物细胞之间相互作用的结果,凡是能够影响植物细胞转化应答能力和农杆菌侵染能力以及转

化子再生能力的各种因素都会对转化效果产生影响。本研究结合试验过程中遇到的实际问题,对影响农杆菌介导水稻基因转化的各种因素加以论述。

1 农杆菌菌株和载体

菌株和载体的组合与选择在水稻的转化中至关重要。不同的根癌农杆菌菌株具有不同的宿主范围,因而不同菌株对同一受体的转化效率存在差别。普通农杆菌菌株 LBA4404 和超毒力菌株 EHA101、EHA105 和 AGL1 等常被用于水稻转化,尹福强等^[12]研究结果表明,农杆菌菌株 EHA105 对水稻愈伤的转化能力优于 EHA101 和 AGL1。在单子叶植物中,应用超毒力农杆菌菌株和超双元载体能增强

收稿日期: 2012-08-10

基金项目: 抗褐飞虱转基因水稻培育(2009zx08001-001B)

作者简介: 韩光明(1978-),男,黑龙江齐齐哈尔人,博士研究生,主要从事基因工程和作物遗传育种研究。

通讯作者: 陈温福(1955-),男,辽宁法库人,教授,博士,主要从事水稻超高产育种研究。

游艾青(1965-),男,湖北天门人,研究员,博士,主要从事水稻遗传育种研究。

农杆菌的侵染能力和 T-DNA 的整合能力 较好地克服单子叶植物对农杆菌转化敏感性差的问题^[13]。因此 在载体构建过程中 可考虑应用农杆菌质粒、超驱动序列、内含子和核基质附着区(MAR)等来增加单子叶植物对农杆菌的敏感性 提高转化效率^[13-14]。但也有研究者^[15]认为 主要影响转化效率的不是菌株 而是品种基因型。

2 水稻基因型

粳稻容易被转化成功 苏益等^[16]对粳稻日本晴进行快速转化方法的研究 其转化率和再生率分别达到了 71.3% 和 57%。但由于不同品种及同一品种的不同外植体组培体系有差异 且它们对农杆菌的敏感程度不同 在粳稻中仍有一些品种转化效率低或不能被转化^[17-18]。籼稻转化较困难 其转化频率多数不超过 10%^[16] 这主要与籼稻愈伤组织诱导比较困难以及植株再生率低有关。肖媛等^[19]通过农杆菌介导籼稻的模式品种 93-11 的成熟胚建立了适合转化的高效再生系统 分化率达到 47.0% 阳性植株占 73.0%。本实验室用 LY-籼稻组织培养试剂盒对籼稻进行转化 转化效率达到 45.2%。

3 转化受体

转化用外植体的选择是水稻遗传转化的主要因素之一。转化受体通常采用来源于幼胚或成熟胚的生长和分裂旺盛的胚性愈伤组织。另外 幼穗^[20]、不定芽^[21]、花药^[22]等也用作水稻基因转化的受体。幼胚的转化效率较高 转化效率比成熟胚愈伤组织高 1~2 倍^[23] 是公认的较为理想的基因转化受体 但受取材季节和环境的限制 剥离费时 且易受细菌污染。成熟胚取材方便 不受季节限制 但分化率低 如果能够解决分化的问题 成熟胚会是很好的受体。在分化培养基的筛选和植株再生过程中 综合前人成功的经验 采取在预分化和分化培养基中添加山梨糖醇、提高固化剂浓度^[11 23]、愈伤组织分化前进行 1~2 d 的部分干燥处理^[25] 以及分割愈伤组织块(约 2 mm)等措施^[23] 可进一步提高再生频率 使之高达 80%~100%。

4 共培养

4.1 共培养基的成分

共培养基的成分是影响转化效率的一个非常重要的因素。利于细胞活跃分裂的培养基作为共培养基有利于转化。Hiei 等^[2]报道 用简单的 N6 培养基添加乙酰丁香酮(AS)、2,4-D 和水解酪蛋白很适

合粳稻的共培养。一般认为 在共培养基中添加适宜浓度的 AS 是获取有效转化必不可少的条件。Roberta 等^[25]认为 单子叶植物难以被农杆菌转化可能是不产生酚类化合物或产生的量不足以作为信号分子。许东晖等^[26]认为 单子叶植物能够产生诱导信号分子 但仅在植物特定发育时期的特定部位产生 因而在内源信号分子相对不足的情况下 添加外源信号物质如 AS 等可大大提高转化效率。Hiei 等^[2]在用农杆菌介导转化水稻时添加了 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 AS 获得较高的转化频率。陈秀花等^[27]在共培养过程中添加 300~400 $\mu\text{mol/L}$ 较高浓度的 AS 明显提高了籼稻转化频率。但另一些研究者^[28-29]认为 AS 诱导并不是农杆菌介导转化所必需的 但可提高转化率。在 AS 浓度很低和缺少 AS 的情况下 小分子量的糖类 如葡萄糖和半乳糖等也可促进 *vir* 区基因的表达 葡萄糖与 AS 或没食子酸的混用在一定程度上能提高农杆菌的转化效率^[11 30]。

4.2 农杆菌菌液浓度

共培养过程中细菌的状态和浓度对转化效率的影响很大。如果菌液浓度过高 菌体本身易相互聚结 影响其在外植体上的附着;浓度过低时 不利于基因的转入^[31]。目前文献报道中使用的农杆菌菌液 OD_{600} 为 0.6~1.5 但本文作者在试验中发现使用 OD_{600} 为 0.8 以上浓度的农杆菌存在两个问题:一是共培养后农杆菌不能被有效抑制 而造成共培养的愈伤组织大量损失;二是筛选培养基中加入的抑制农杆菌的抗生素的量要大大增加 这不仅提高了试验成本 而且控菌效果也不太好 因为农杆菌在平板上有时会形成生长速度很快的菌落。本课题组研究结果表明 共培养所用农杆菌菌液的 OD_{600} 以 0.4~0.6 之间为宜 在这种浓度下 使用 400 mg/L 的特美汀(Timentin)即可有效地控制农杆菌。

4.3 农杆菌悬浮培养基

农杆菌转化中常用的共培养缓冲介质有农杆菌培养基(如 YEB 培养基等)和植物组织培养基(如 AAM、MS^[32]培养基等)。在共培养阶段 用 YEB 悬浮的农杆菌感染愈伤组织时 农杆菌生长过旺 因此 在 YEB 培养基中培养的细菌不宜用于转化实验。细菌需经离心收集并用植物组织培养基重新悬浮 这不仅可除去培养物中残存的抗生素和细菌代谢物 而且由于在培养过程中保持了培养基成分的基本稳定 从而有利于细胞的旺盛生长 提高了转化频率^[33-36]。考虑到对于功能正常的农杆菌 限制它与植物细胞相互作用的因子主要是由植物细胞本身引起的 在兼顾农杆菌生长的同时 主要考虑了水稻

愈伤组织感受态的保持,用(2/3 MS + 1/3 YEB) 重悬农杆菌,可获得较高的转化频率^[28]。林拥军等^[37]使用添加酸水解酪蛋白(CH)的低盐培养基作为共培养的缓冲介质也获得了较高的转化率。

4.4 共培养时间

以3 d作为愈伤组织与农杆菌共培养的时间可能是较为适宜的。时间过短,T-DNA转移过程不能完成;延长共培养时间,农杆菌在培养基及愈伤组织表面会过分生长,不利于愈伤组织的存活和随后抗性愈伤筛选时对农杆菌的抑制,故在铺有一层无菌滤纸的培养基上进行共培养,可有效抑制农杆菌的过量生长^[38]。本课题组在共培养过程中未铺滤纸,洗菌时根据共培养过程长出的菌的多少,适当调整用无菌水冲洗的次数,待无菌水清亮时,加入400 mg/L 特美汀,浸泡10 min,能有效控制菌斑的出现。

4.5 共培养温度

农杆菌生长最适宜温度为28~30℃之间^[39],但是Ti质粒上*vir*基因诱导表达最有效的温度在15~25℃之间^[40],而T-DNA的转移则在19℃时最活跃^[42]。因此,选择合适的共培养温度对农杆菌介导转化效率有很大影响。Willy等^[42]发现在较低的共培养温度(22℃)条件下,农杆菌对愈伤组织的转化率最高,农杆菌介导转化过程中最适共培养温度可能因植物的种类(或基因型)而异。农杆菌具有最强侵染力的生长温度并不是其最适生长温度,而是在较缓慢生长温度条件下,因而共培养温度多控制在19~25℃之间^[37]。

4.6 共培养方式

农杆菌介导的水稻转化中共培养法使用普遍,共培养前农杆菌浸染水稻愈伤组织大致有3种方式:①将整块愈伤组织浸泡于菌液中静置培养^[43];②将整块愈伤组织浸泡于菌液中摇动培养;③将菌液加至愈伤组织上^[44]。通常使用的是第一种方式,而易自力等^[17]认为第2种方式转化效果最好,这可能是浸泡并摇动能使细菌与组织块更充分地接触而有利于感染作用的进行。黄健秋等^[23]研究了不同共培养方式对农杆菌介导水稻转化率的影响。他们选择了A(共培养过程不加AS)、B(共培养过程固体培养基中加入100 μmol/L的AS)、C(共培养过程固体培养基中加入100 μmol/L的AS、并在上面铺一张无菌滤纸)、D(共培养过程固体培养基中加入100 μmol/L的AS、并在愈伤周围滴加1~2 μL的农杆菌悬浮培养基AAD₁-AS,不铺滤纸)、E(共培养过程固体培养基中加入100 μmol/L的AS、在固体培养基上铺一张无菌滤纸,在愈伤周围滴加

1~2 μL的农杆菌悬浮培养基AAD₁-AS)。结果表明,共培养中不加AS,未得到抗性愈伤,而在固体培养基上铺无菌滤纸,并在愈伤周围滴加1~2 μL农杆菌悬浮培养基(AAD₁-AS),抗性愈伤率最高。

5 筛选标记基因以及筛选剂的选择

选择标记基因可赋予转化细胞除草剂或抗生素抗性,它常与目的基因共同转化,以区分转化和非转化细胞。在植物基因转化中,不同的抗生素对于处于敏感的转化状态的细胞会有不同的伤害作用,从而影响转化频率及再生频率。因此,如何选择适当的筛选标记以准确、有效地区分转化和非转化细胞,且干扰细胞的正常生长与植株的再生是转化成功的关键。一般选择对敏感细胞伤害大而对转化细胞伤害小的抗生素作为筛选剂,从而保证较高的转化率和较高的筛选效率。在农杆菌介导的水稻转化中,潮霉素磷酸转移酶基因(HPT)已被广泛使用。水稻品种间潮霉素(Hyg)的内源抗性存在差异,在用潮霉素抗性标记进行筛选之前,需对特定的品种进行梯度试验,以确定合适的选择压力。Hyg筛选浓度过大,造成转化细胞的生长受到抑制;过小,不能有效抑制愈伤组织生长。因此,既能不抑制愈伤组织的生长,又不至于造成细胞迅速死亡的浓度是比较理想的筛选浓度。林拥军等^[37]将筛选后阳性愈伤比例为70%~80%的选择剂浓度或在受体敏感性试验中受体材料在培养4 d左右开始变褐的选择剂使用浓度定为筛选浓度。出于转基因安全的考虑,人们研制出了一种替代抗生素和除草剂的以糖类为筛选剂的正筛选系统,这种系统区分转化和非转化细胞的机制是通过碳水化合物饥饿,使非转化组织或细胞被淘汰。甘露糖不能维持外植体的生长,在培养细胞中它只能转化为6-磷酸甘露糖,不能进一步参与代谢,以至积累至毒性水平。6-磷酸甘露糖异构酶(PMI)基因作为标记基因,该基因表达产生的酶能将6-磷酸甘露糖转化为易于糖酵解的6-磷酸果糖。以来源于*E. coli*的PMI作为标记基因,甘露糖作为筛选剂已成功应用于水稻的遗传转化^[36],PMI要比潮霉素抗性HPT的转化率高1倍以上。以糖类为筛选剂的正筛选系统标记基因产物安全,筛选剂价格低廉,在转基因研究中具有广泛的应用前景^[46]。

6 转化程序

农杆菌介导的基因转化基本上都涉及到愈伤组织诱导、继代、共培养和分化再生等几个环节。每一

个环节对转化效率的影响都很重要。

6.1 愈伤组织诱导

2,4-D 对愈伤组织的诱导和生长非常有效,培养基中加入适宜浓度的 2,4-D 对愈伤组织的形成有促进作用,过大则抑制愈伤组织的产生,不利于愈伤组织的生长^[45],一般认为 2 mg/L 的 2,4-D 对于诱导水稻愈伤组织最适宜。籼稻成熟胚诱导愈伤组织比较困难,针对这一问题,王莉江等^[46]将籼稻成熟种子先接种在不含附加营养成分的 2,4-D 培养基(2 mg/L)上,预诱导 3 周得到愈伤组织,然后再转接到 3 mg/L 2,4-D 的 N6 培养基上,结果得到了大量的愈伤组织。李永春等^[47]对不同成熟度种子,即饱黄、饱绿和半饱绿种子的愈伤诱导效果进行了研究,认为开花后 20 d 收获的半饱绿种子出愈率最高,其 *GUS* 基因转化率也明显高于其他 2 种类型种子来源的愈伤组织。于恒秀等^[48]认为,愈伤组织的诱导培养时间为 7~8 d,当愈伤组织诱导培养时间少于 7 d 时,共培养后在筛选培养基上大部分愈伤组织不能继续生长而渐渐褐化死亡,当愈伤组织诱导培养时间超过 9 d 时,共培养后,虽然愈伤组织并不马上褐化,但随着筛选时间的延长,愈伤组织又会慢慢的褐化死亡,最终不能分化成苗。郑杰^[49]研究结果表明,继代培养 6~7 d 时转化率最高,培养时间太短,愈伤组织表面粗糙、粒小,不利于转化;培养时间过长则愈伤组织变软、发黏,胚性变差,转化后易褐化死亡。

6.2 分化

在分化时对愈伤组织进行干燥处理是非常必要的^[30]。在预分化时,采用山梨醇高渗处理 1~2 周或使用甘露醇配合使用蔗糖来调节培养基的渗透压,能够使抗性愈伤变得十分干燥,胚性更强,有利于提高分化率。另外,分化时加入一定浓度的抗褐化物质,如脯氨酸、DMSO、AgNO₃和活性炭等也可降低愈伤组织的褐化率,从而促进分化^[50,51]。随着对农杆菌转化机理研究的深入以及转化技术方法的提高和改进,农杆菌介导的水稻基因转化的优越性将得到更充分的表现。

结合我们的实际工作,笔者认为在农杆菌介导的基因转化过程中应注意以下几点:①应选择合适的农杆菌类型、组培性能好的水稻基因型以及合适的外植体;②改良共培养条件,调整菌液的浓度、共培养的时间和温度;③采用合适的选择标记基因和合适的抗生素及其浓度进行转化体的筛选。本课题组在试验中选择组培性能好的水稻品种 R7272 及 E09-2075 等的成熟种子作为外植体,所得愈伤与毒

力菌株 EHA105 进行共培养,在共培养过程中使用 OD₆₀₀ 为 0.4~0.6 的菌液进行浸染,在提高瞬时表达的同时也防止了农杆菌的过度生长,从而得到了较高的转化效率。

总之,水稻从愈伤组织的诱导到遗传转化受到多种因素的影响,要建立一个高效的农杆菌介导的植物转化系统需要针对特定品种(品系)、特定组织、组培条件等诸多因素进行优化。只要我们通过改进转化中的某些主要环节,达到改善愈伤生长状态、提高愈伤质量、增加抗性愈伤率和愈伤分化率的目的,就可以建立一套高效适用的基于农杆菌转化为目的水稻愈伤组织转化体系。

参考文献:

- [1] Khush G S, Brar D S, Hardy B. Rice genetics from Mendel to functional genomics [C]//Khush G S, Brar D S, Hardy B. Rice Genet IV. Science Publishers, Inc 2001: 3-25.
- [2] Hiei Y, Ohta S, Komari T *et al.* Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA [J]. Plant J, 1994(6): 271-282.
- [3] 刘巧泉, 张景六, 王宗阳, 等. 根癌农杆菌介导的水稻高效转化系统的建立 [J]. 植物生理学报, 1998, 24(3): 259-271.
- [4] 杜娟, 王萍, 王罡. 植物遗传转化的育种技术的研究进展及评价 [J]. 吉林农业科学, 2000, 25(5): 23-27.
- [5] 程磊, 周根余, 沈革志. 根癌农杆菌介导的水稻遗传转化(综述) [J]. 上海农业科技, 2000, 16(4): 43-51.
- [6] Lin Y J, Zhang Q F. Optimising the tissue culture conditions for high efficiency transformation of indica rice [J]. Plant Cell Rep 2005, 23: 540-547.
- [7] Hiei Y, Komari T. Improved protocols for transformation of indica rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Cell Tiss Org Cult 2006, 85: 271-283.
- [8] Aldemita R R, Hodges T K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Japonica and Indica rice varieties [J]. Planta, 1996, 199: 612-617.
- [9] Chan M T, Chang H H, Ho S L *et al.* *Agrobacterium* mediated production of transgenic rice plant expressing achimetic- α -amylase promoter β -glucuronidase gene [J]. Plant Mol Biol, 1993, 22: 491-506.
- [10] Dong J, Teng W, Buchholz W G. *Agrobacterium* mediated transformation of Japonica rice [J]. Molecular Breeding, 1996, 1(2): 267-276.
- [11] Rashid H, Yokoi S, Hinata K *et al.* Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in *Indica* rice [J]. Plant Cell Reports, 1996, 15: 727-730.
- [12] 尹福强, 刘铭, 蔡光泽, 等. 农杆菌介导转化水稻成熟胚影响因素研究 [J]. 西昌学院学报: 自然科学版, 2005, 19(4): 37-40.
- [13] 李卫, 郭光沁, 郑国昌. 根癌农杆菌介导遗传转化研究的若干新进展 [J]. 科学通报, 2000, 45(8): 798-807.
- [14] 侯丙凯, 夏光敏, 陈正华. 植物基因工程表达载体的改进和优化策略 [J]. 遗传, 2001, 23(5): 492-497.
- [15] 曹孟良. 农杆菌介导的水稻高效遗传转化体系的建立 [J]. 湖南农业大学学报, 1999, 25(5): 349-356.

- [16] 苏 益,黄善金,蔺万煌,等.根癌农杆菌介导的水稻快速转化方法研究[J].中国农学通报,2008,24(5):83-85.
- [17] 易自力,曹守云,王 力,等.提高农杆菌转化频率的研究[J].遗传学报,2001,28(4):235-258.
- [18] 叶松青,储成才,曹守云,等.提高农杆菌转化水稻频率研究[J].遗传学报,2001,28(10):933-938.
- [19] 肖 媛,李落叶,徐孟亮,等.根癌农杆菌介导籼稻93-11遗传转化体系的建立[J].湖南师范大学自然科学学报,2008,31(3):77-82.
- [20] 王世全,李 平,刘焰山.农杆菌介导的水稻基因转化[J].西南农业学报,1999,(高新专辑):86-90.
- [21] 杨长登,唐克轩,吴连斌,等.农杆菌介导将雪花莲凝集素(GNA)基因转入籼稻单倍体微芽的初步研究[J].中国农业科学,1998,32(3):129-133.
- [22] 傅亚萍,斯华敏,朱正歌,等.农杆菌转化花粉愈伤组织获取纯合的转基因水稻植株[J].浙江大学学报,2001,27(4):407-410.
- [23] 黄健秋,卫志明,安海龙,等.根癌农杆菌介导的水稻高效转化和转基因植株的高频再生[J].植物学报,2000,42(11):1172-1178.
- [24] Masayoshi T, Takayasu H. Simple dehydration treatment promotes plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) callus[J]. Plant Cell Rep, 1992, 11: 550-553.
- [25] Roberta H S, Hood E E. *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons [J]. Crop Sci, 1995, 35: 301-309.
- [26] 许东晖,李宝健,刘 煜,等.对根癌农杆菌 vir 基因具诱导作用的水稻信号分子的分离和确定[J].中国科学(C辑),1996,26(6):535-541.
- [27] 陈秀花,刘巧泉,王宗阳,等.根癌农杆菌介导转化籼稻影响因素的研究[J].江苏农业研究,2001,22(1):1-6.
- [28] 刘巧泉,张景六,王宗阳,等.根癌农杆菌介导的水稻高效转化系统的建立[J].植物生理学报,1998,24(3):259-271.
- [29] 陈 屹,张云孙,王 力,等.农杆菌介导的 GLc⁺TM 基因在水稻中的遗传转化[J].西南农业学报,2000,13(1):1-7.
- [30] 高振宇,黄大年.影响籼稻幼胚愈伤组织形成和植株再生的若干因素[J].植物生理学通讯,1999,35(2):113-115.
- [31] 朱常香,宋云枝,卞苏伟,等.农杆菌介导水稻幼胚转化获转基因植株[J].山东农业大学学报,2000,31(1):1-7.
- [32] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture [J]. Physis Plantg, 1962, 15: 473-479.
- [33] Hoque M E, Mansfield J W, Bennett M H. *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice genotypes: an assessment of factors affecting the transformation efficiency [J]. Plant Cell, 2005, 82: 45-55.
- [34] He R F, Pan J, Zhu L L *et al.* *Agrobacterium*-mediated transformation of large DNA fragments using a BIBAC Vector system in rice [J]. Plant Mol Biol Rep, 2010, 28: 613-619.
- [35] Hiei Y, Komari T. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed [J]. Nature, 2008, 3(5): 824-834.
- [36] Hiei Y, Ishida Y, Kasaoka K *et al.* Improved frequency of transformation in rice and maize by treatment of immature embryos with centrifugation and heat prior to infection with *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 87, 2006, 233-243.
- [37] 林拥军,陈 浩,曹应龙,等.农杆菌介导的牡丹江 8 号高效转基因体系的建立[J].作物学报,2002,28(3):294-300.
- [38] 陈 惠,赵 原,种 康.一种改进的水稻成熟胚愈伤组织高效基因转化系统[J].植物学通报,2008,25(3):322-331.
- [39] Amitabh M, Sarma N P, Akhilesh K T. *Agrobacterium*-mediated high frequency transformation of an elite indica rice variety Pusa Basmati 1 and transmission of the transgenes to R2 progeny [J]. Plant Science, 1999, 147: 127-137.
- [40] Alt-Moeb J, Neddermann P, Von Lintig J *et al.* Temperature-sensitive steps in Ti plasmid vir region induction and correction with cytokinin secretion by *Agrobacterium* [J]. Mol Gen, 1998, 213-218.
- [41] Fullner K J, Stephens K M, Nester E W. An essential virulence protein of *Agrobacterium tumefaciens*, VirB4, requires an intact mononucleotide binding domain to function in transfer of T-DNA [J]. MGG, 1994, 245(6): 704-715.
- [42] Willy D, Jannick D C, Jyoti K *et al.* The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens* mediated gene transfer to plant [J]. The Plant Journal, 1997, 12(6): 1459-1463.
- [43] 王敬乔,李根泽,曾黎琼,等.用农杆菌共培养法将雄性不育基因导入水稻的研究[J].西南农业学报,2001,14(1):13-15.
- [44] Daniell H, Muthukumar B, Lee S B. Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection [J]. Current Genetics, 2001, 39(7): 109-116.
- [45] 赵 艳,王慧中,于彦春,等.转基因植物中标记基因的安全性新策略[J].遗传,2003,25(1):119-122.
- [46] 王莉江,明小天,安成才,等.籼稻明恢 63 成熟种子愈伤组织的诱导及转基因水稻的抗性检测[J].生物工程学报,2002,18(3):323-326.
- [47] 李永春.利用 Cry1Ac 和 CpTI 双价基因及组织培养特异启动子增强转基因水稻对虫的抗性[D].杭州:浙江大学,2002.
- [48] 于恒秀,刘巧泉,陈秀花,等.根癌农杆菌介导的水稻转化系统的优化及转基因植株的获得[J].植物学报,2002,164:302-310.
- [49] 郑 杰.农杆菌介导的高效水稻遗传转化体系的研究[J].湖南农业科学,2008,(2):6-7,10.
- [50] 朱 诚,吴运荣,金维正,等.胚乳对籼稻成熟胚愈伤组织诱导及分化的影响[J].浙江农业学报,2001,13(1):13-15.
- [51] 田文忠, Rance I, Sivamani E, 等.提高籼稻愈伤组织再生频率的研究[J].遗传学报,1994,21(3):215-221.