

# 大白菜 *LBD* 基因参与愈伤组织发生及植株再生初探

李 强<sup>1,2</sup>, 苏同兵<sup>2</sup>, 于拴仓<sup>2</sup>, 张凤兰<sup>2</sup>, 余阳俊<sup>2</sup>, 张德双<sup>2</sup>,  
赵岫云<sup>2</sup>, 汪维红<sup>2</sup>, 卢桂香<sup>2</sup>, 朱月林<sup>1</sup>

(1. 南京农业大学 园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 北京市农林科学院 蔬菜研究中心, 北京 100097)

**摘要:**植物离体再生主要经历愈伤组织形成、胚状体或器官发生和不定芽产生等过程, 其中愈伤组织形成是在外源生长素和相关蛋白因子的共同作用下完成的, 是植物离体再生的关键环节。拟南芥 *LBD16*、*LBD17*、*LBD18* 和 *LBD29* 是促进胚性愈伤组织发生的关键转录因子。通过对 37 种白菜高代自交系外植体芽再生频率的统计分析, 选出具有显著差异的材料, 研究了大白菜愈伤组织发生过程中上述同源 *LBD* 基因的表达变化模式, 初步分析了 *LBD* 基因表达对大白菜愈伤组织产生和再生频率的影响。结果显示: 白菜 *LBD* 基因与拟南芥 *LBD* 基因有很高的序列同源性, 共有 8 个上述基因的同源基因; 离体培养的白菜外植体在诱导 7 d 时产生愈伤组织, 而 *LBD* 基因在此时表达量达到最高, 然后开始降低, 在整个愈伤诱导过程中呈现先上升后下降的趋势; 在愈伤诱导各时期中, *LBD* 基因在高再生频率材料中的表达一般都要高于低再生材料。这些结果表明, *LBD* 基因参与大白菜愈伤组织产生并促进离体组织植株再生的关键基因, 这为从分子水平上筛选高效再生材料, 建立高效遗传转化体系奠定了基础。

**关键词:** 大白菜; 愈伤组织; *LBD*; 荧光定量 PCR

中图分类号: S643.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2015)03-0083-07

doi: 10.7668/hbxb.2015.03.016

## Primary Study on *LBD* Genes Involving in Callus Formation and Plant Regeneration of Chinese Cabbage

LI Qiang<sup>1,2</sup>, SU Tong-bing<sup>2</sup>, YU Shuan-cang<sup>2</sup>, ZHANG Feng-lan<sup>2</sup>, YU Yang-jun<sup>2</sup>,  
ZHANG De-shuang<sup>2</sup>, ZHAO Xiu-yun<sup>2</sup>, WANG Wei-hong<sup>2</sup>, LU Gui-xiang<sup>2</sup>, ZHU Yue-lin<sup>1</sup>

(1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing 100097, China)

**Abstract:** Callus formation, embryogenesis and adventitious bud development are major steps of plant regeneration, in which callus formation is a key step. Previous reports demonstrated that exogenous auxin and *LBD* (Lateral organ boundaries domain) genes, *LBD16*, *LBD17*, *LBD18* and *LBD29*, were involved in callus formation in Arabidopsis. Shoot regeneration frequency of 37 high inbred line of Chinese cabbage were analyzed and 2 of them, with significant different regeneration frequency, were selected for further study. Here, we focused on the function of Brassica *LBD* genes in callus formation and plant regeneration by analyzing *LBD* expression level during callus induction of Chinese cabbage with different regeneration capacity. The main results are as follows: *BrLBD* genes are highly homologous to Arabidopsis *LBD* genes, and a total of 8 relevant *LBD* homologous are found in Brassica genome. Visible callus tissue began to appear within 7 days after explant inoculation, and interestingly, Brassica *LBD* genes were detected to reach its highest expression level at the time point and the levels first increased and then decrease in the process of regeneration; At every time point during callus induction, *LBD* genes expressed a higher level in materials with high regeneration frequency than that with low regeneration frequency. All these results revealed that *LBD* genes were involved in callus formation and promoted plant regeneration *in vitro*. This may provide us a new per-

收稿日期: 2014-12-20

基金项目: 科技部“973”项目(2012CB113906); 国家自然科学基金项目(31171970; 31401875); 国家科技支撑计划项目(2012BAD02B01); 大宗蔬菜产业技术体系项目(CARS-25-A-11)

作者简介: 李 强(1988-), 男, 山西太原人, 在读硕士, 主要从事白菜遗传与分子育种技术研究。

通讯作者: 朱月林(1963-), 男, 江苏苏州人, 教授, 博士, 主要从事蔬菜栽培生理和生物技术研究。

spective for large-scale screening of high-frequency regeneration materials to establish efficient genetic transformation system at the molecular level.

**Key words:** *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*; Callus formation; Lateral organ boundaries domain; Real-time quantitative PCR

大白菜是我国种植面积最大、产量最高的蔬菜作物之一,在蔬菜周年供应中起着重要作用。基因工程技术为白菜类作物的性状改良、遗传育种提供了新的手段,但白菜类作物属十字花科 AA 基因组植物,是最难再生和遗传转化的作物之一<sup>[1-2]</sup>。提高离体再生频率,建立高效离体再生体系是利用基因工程改良白菜类作物的关键。植株再生涉及胚性愈伤组织产生、体细胞胚发生和不定芽/根生长等过程,其中胚性愈伤组织产生是关键的起始环节。然而,愈伤组织发生的分子机制目前仍不明确,控制植物愈伤发生过程的关键因子一直没有被发现。

愈伤诱导实质上是植物体细胞的脱分化过程,植物激素、生长素在这个过程中起关键作用<sup>[3-4]</sup>。研究显示,LBD(Lateral organ boundaries domain)/ASL(Asymmetric leaves2-like)<sup>[5-7]</sup>转录因子是生长素诱导愈伤组织形成的关键物质。LBD 基因是高等植物特有的一类基因,参与了侧生器官原基的启动、形态建成<sup>[8]</sup>以及侧生器官与茎尖分生组织之间边界的建立<sup>[9]</sup>,对高等植物地上部、地下部特定器官的形成与发育具有重要影响。研究表明,拟南芥 *LBD16*、*LBD17*、*LBD18* 和 *LBD29* 位于生长素信号通路中 ARFs(Auxin response factors)的下游<sup>[10-11]</sup>,在愈伤诱导的外植体中异位高表达。在拟南芥中高表达上述 *LBD* 基因能够引起器官在无外源生长素的培养基上自发产生愈伤组织,而 *LBD* 基因功能缺失后,严重抑制了生长素诱导愈伤的发生过程<sup>[11-12]</sup>。通过根干细胞特异基因的表达发现,*LBD* 控制的愈伤发生模拟了生长素诱导的愈伤组织发生,这个过程是通过异位激活侧根发生的信号通路实现的。

为明确 *LBD* 基因是否影响大白菜不定芽再生频率,本研究在前人研究基础上,选用优化的 MS 培养基配方<sup>[13-15]</sup>,比较了多种白菜高代自交系不定芽再生率的差异,检测了白菜 *LBD* 同源基因在愈伤形成过程中的表达,探讨了 *LBD* 基因与大白菜外植体愈伤诱导和不定芽再生频率的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 白菜芽再生频率的统计分析

利用带柄子叶培养法对 37 个白菜类高代自交

系(包括大白菜、小白菜)的再生频率进行统计分析。具体方法如下:

1.1.1 无菌苗的培养 挑选颗粒饱满的种子,用 75% 酒精消毒 0.5 min,再用 10% NaClO 溶液(0.01% Tween-20)振荡处理 10 min,无菌水冲洗 3~4 次,无菌滤纸吸干种子表面,接种于 1/2 MS 萌发培养基上(0.8% 琼脂),单皿 20~30 粒。培养条件(通用):MS 培养基(pH 值 5.8、1% 琼脂、3% 蔗糖),16 h/d 光照、光照强度 2 000~3 000 lx、温度(25±1)℃。

1.1.2 不定芽的诱导 在 1/2 MS 培养基上选取萌发 4 d、长势健壮、子叶平展的幼苗,切下带 2~3 mm 叶柄的子叶作为外植体(不可带有生长点),接种于 MS 培养基(MS + 5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 2 mg/L AgNO<sub>3</sub>),每个培养瓶接种 6~8 个外植体。3 次重复,每个重复 40 个外植体。培养 21 d 后统计不定芽再生频率(以单独成芽计数)。选用再生频率有显著差异的大白菜高代自交系 21 和 29 为本研究供试材料。

不定芽再生频率 = (分化不定芽的外植体数/接种外植体总数) × 100%

### 1.2 取样及 RNA 提取

选用其中再生频率有明显差异且属于大白菜的高代自交系 21 和 29 为供试材料。21 为较难再生的自交系,来源于杂一代品种刑都优丰(河北);29 为较易再生的自交系,来源于杂一代品种夏宝(日本)。以上均由北京市农林科学院蔬菜研究中心白菜课题组提供。

除在 0 d 取样直接切取带柄子叶外,在外植体培养 7,14,21 d 时取样(尽量去除愈伤组织表面附着的培养基以及再生根),样品置于液氮速冻后充分研磨成细粉藏于 -80℃ 备用。

总 RNA 提取使用 Plant Total RNA Purification Kit(Gene Mark)试剂盒,按说明书操作。利用 NaNo Drop 测定 RNA 浓度,OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 为 1.8~2.0 时,说明 RNA 质量较好。再使用 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

反转录使用 FastQuant RT Kit(with gDNase)(TIANGEN)试剂盒,按照试剂盒说明进行反转录,cDNA 稀释至 300 ng/μL 备用。

1.3 Real-time PCR

根据拟南芥 *LBD16* ( At2g42430 )、*LBD17* ( At2g42440 )、*LBD18* ( At2g45420 ) 和 *LBD29* ( At3g58190 ) 的氨基酸序列 ( [http://www. arabidop- sis. org/](http://www.arabidopsis.org/) ) , 通过 BRAD ( <http://brassicadb. org/brad/>

[index. php](http://index.php) ) 同源序列比对 , 获得了与拟南芥 *LBD16*、*LBD17*、*LBD18* 和 *LBD29* 同源的 8 个白菜 *LBD* 基因。利用 DNAMAN-Observed Divergency 方法进行序列比对和系统发育树分析 ; 利用 Primer 5 软件设计 Real-time PCR 引物 ( 表 1 ) 。

表 1 白菜 *LBD* 基因及相应的 Real-time PCR 引物列表

Tab.1 <i>LBD</i> homology genes and primer sequences				
名称 Name	拟南芥基因编号 AGI No.	白菜基因编号 BrID No.	引物序列 Prime sequence	PCR 产物大小/bp Product length
<i>LBD16</i>	At2g42430	Bra016877	F:ACATGACGTGTCAACAACTACTGG R:GAGTCTCTCGCACGTTAGCTGTAGT	189
		Bra004693	F:TCTTCATGATCCTGTTTATGGCTG R:TTGTTGCCAAGTCGTGTATTCCG	178
		Bra000257	F:CGCCGAAGGTACTCACCAATT R:CTCACGCACGTTAGCTGTAGTTGT	205
<i>LBD17</i>	At2g42440	Bra016876	F:TGAGATTCTAAAGCAACAGGCAAC R:ATATTTCTCAGATCGGAGTCGGAC	189
<i>LBD18</i>	At2g45420	Bra040311	F:GTACAAGCCCATTGTGGCATCT R:ACGAAGGAGACGCTGCATG	193
		Bra004910	F:CGCTCTTCTTCACTCCGCCT R:GCAGCGGAAGAAGACGATGA	172
<i>LBD29</i>	At3g58190	Bra014581	F:CATATCTTTGCTCTCCAACAACAGG R:GGTGAATATTTCCATGTTCTTGATG	186
		Bra007385	F:TGAGATTCTAAAGCAACAAGTCCG R:AAGCTTCCGATTTGCTTGACTAGAT	185
<i>GAPDH</i>		AF536826	F:CAGGTTTGGAAATTGTCGAGG R:GAGCTGTGGAAGCACCTTC	175

荧光定量 PCR 使用 Roche Light Cycler 480 , 试剂盒采用罗氏 SYBR Green I Master , 参照基因选用三磷酸甘油醛脱氢酶基因 ( *GAPDH* )<sup>[16]</sup>。PCR 反应体系 10 μL , 包含 : Master Mix ( 2 × ) 5 μL , 上游引物 ( 10 μmol/L ) 0. 5 μL , 下游引物 ( 10 μmol/L ) 0. 5 μL , Water PCR-grade 2 μL , cDNA 2 μL , 每个样品设置 3 个平行 , 并重复 3 次。Real-time PCR 扩增程序 : 95 ℃ 预变性 5 min ; 95 ℃ 变性 10 s , 60 ℃ 退火 12 s , 72 ℃ 延伸 15 s , 40 个循环 ; 在延伸步骤收集荧光信号 ; 温度从 65 ℃ 缓慢递增到 95 ℃ 时测定熔解曲线。

2 结果与分析

2.1 白菜高代自交系再生能力的差异比较

对本课题组保存的、具有广泛应用价值的 37 个白菜高代自交系材料的带柄子叶进行培养 , 在优化的激素配比等相同培养条件下 , 不同白菜高代自交系芽再生频率不同。对再生不定芽数目统计结果表明 : 不同基因型白菜高代自交系的再生频率高、低差异显著。其中最低的是 49 , 298 , 157 , 再生频率是 0 , 有 23 个品系再生频率在 0 ~ 30 % , 剩余 11 个品种在 31 % ~ 67. 2 % , 其中 123 再生频率最高 , 达到 67. 2 % ( 表 2 ) 。

表 2 37 个白菜高代自交系芽再生频率

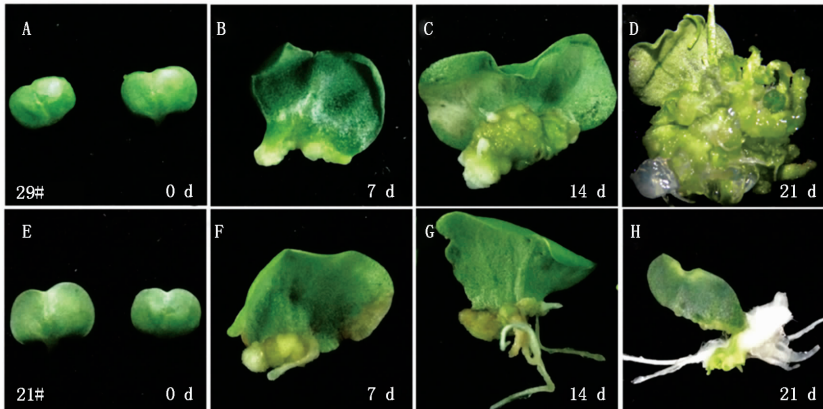
Tab.2 Regeneration frequency of 37 inbred lines of Chinese cabbage			
自交系 编号 Inbred line No.	名称或 来源 Cultivar name	平均再生 频率/% Regeneration frequency	显著性分析 ( <i>P</i> ≤ 0. 05 ) Significance analysis
49	白阳	0	g
298	夏抗 55 早	0	g
157	秋大白菜	0	g
21	刑都优丰	2. 4	g
182	刑都优丰浅小	2. 4	g
268	圣农绿宝叶 70 菜心	3. 0	g
32	胶二叶	4. 7	g
181	郑早 60	4. 7	g
188	秋大白菜	5. 1	fg
67	良庆	6. 5	efg
22	二月白	8. 3	edfg
41	五月-39	9. 1	cdefg
23	大白菜	10. 6	cdefg
50	大白菜	10. 9	bcdefg
45	济南小根	13. 8	bcdefg
33	大白菜	14. 2	bcdefg
6	大白菜	15. 0	bcdefg
70	源于日本	16. 7	bcdefg
47	大白菜	17. 4	bcdefg
5	娃娃菜	17. 9	bcdefg
90	津绿 55c-6	18. 2	bcdefg

续表 2:

自交系 编号 Inbred line No.	名称或 来源 Cultivar name	平均再生 频率/% Regeneration frequency	显著性分析 ( $P\leq 0.05$ ) Significance analysis
43	大白菜	21.9	bcddefg
28	夏王子	23.1	bcddefg
13	二号-1(皱小)	26.7	abcedefg
37	2039-5 胜大	27.3	abcedefg
87	黄籽石特	30.8	abcedefg
54	长小	31.6	abcedefg
261	菜心	31.9	abcedefg
64	春月黄	35.0	abcedefg
14	津秋 1 号	35.5	abcedefg
62	玉青	38.2	abcedefg
202	春白菜	39.4	abcedefg
80	大白菜	48.0	abcedef
299	CR-利民	49.3	abcd
92	大白菜	53.8	abc
29	夏宝	55.7	ab
123	奶白菜	67.2	a

**2.2 愈伤组织的产生和发育显著影响大白菜再生频率**

以再生频率高的 29 和再生频率低的 21 为试材,观察了离体培养中愈伤组织的形成。由图 1 可见,带柄子叶外植体于分化培养基培养 2~3 d 后开始膨大,愈伤组织首先发生在切口处,不定芽在愈伤组织产生 14 d 时开始分化产生,但是不同基因型发生时间略有差异(图 1-C、G)。外植体培养 7 d 后,两者在叶柄切口处都有愈伤组织产生。其中 29 的愈伤细胞团在切口处整齐排列,细胞色泽透亮,暗示细胞高度液泡化,分裂能力强;而 21 愈伤细胞团在切口处不规则产生,有轻微褐化现象,分裂能力较弱。在培养 14 d 后,两者差异更加明显:29 愈伤组织细胞团持续变大,表层有芽原基产生,而 21 的愈伤细胞团生长缓慢,且有根产生。在培养 21 d 时,29 有更多芽原基发生,且有成熟芽长出,而 21 则有更多根产生,偶有芽发生。培养 21 d 时,统计了二者不定芽再生频率,29 的再生频率达 55.7%,而 21 仅为 2.38%。由此可见,愈伤组织状态的好坏在很大程度上决定植株外植体再生频率的高低,愈伤产生是植物再生的关键环节。



A、E. 带柄子叶;B、F. 培养 7 d 的子叶外植体;C、G. 培养 14 d 的子叶外植体;D、H. 培养 21 d 的子叶外植体。

A, E. Leaves with petiole; B, F. Cotyledon explant cultured 7 d; C, G. Cotyledon explant cultured 14 d; D, H. Cotyledon explant cultured 21 d.

图 1 不同材料愈伤组织的发生、发育和最终形态比较

Fig. 1 Callus occurrence, development and final tissue formation of different materials with different regeneration frequency

**2.3 大白菜 LBD 基因序列的获得及系统发育树分析**

LBD 转录因子是诱导愈伤组织形成的关键因子。利用拟南芥 LBD 基因的氨基酸序列进行同源序列比对,共获得了 8 个大白菜 LBD 基因:LBD16 同源基因 Bra016877、Bra004693、Bra000257;LBD17 同源基因 Bra016876;LBD18 同源基因 Bra040311、Bra004910 和 LBD29 同源基因 Bra014581 和 Bra007385。对上述基因进行同源分析并构建系统发育树,如图 2 所示,大白菜 LBD 基因可以分为 2

大分支,4 个小分支。其中 LBD16、LBD17、LBD29 聚为一个分支,LBD18 自成一分支,2 个大分支间的序列相似度仅有 48%,这暗示其功能可能有所不同。在各小分支内的比对中,大白菜 LBD 基因与其对应的拟南芥同源基因有着很高的序列相似度,其功能可能类似。其中 LBD16 同源基因间亲缘关系最近,序列相似度高达 92%;LBD29 同源基因间序列相似度达 89%;而 LBD17 同源基因间相似度则为 73%。

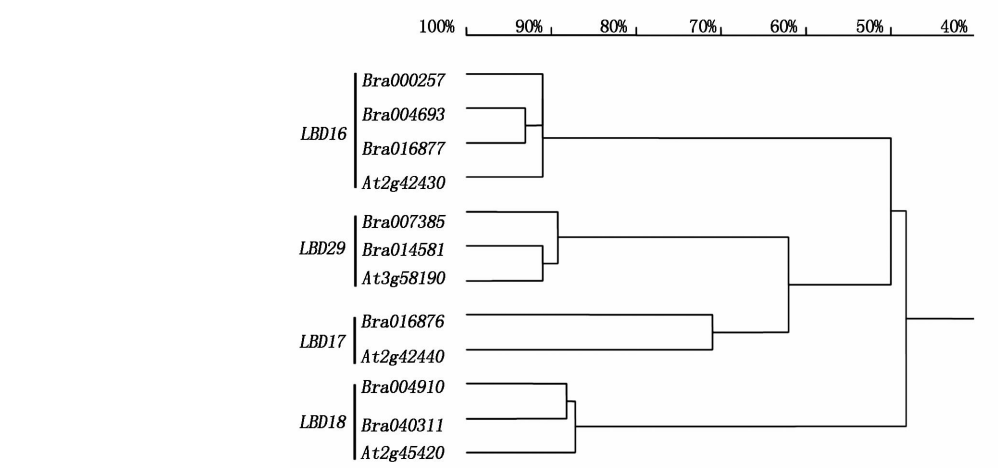
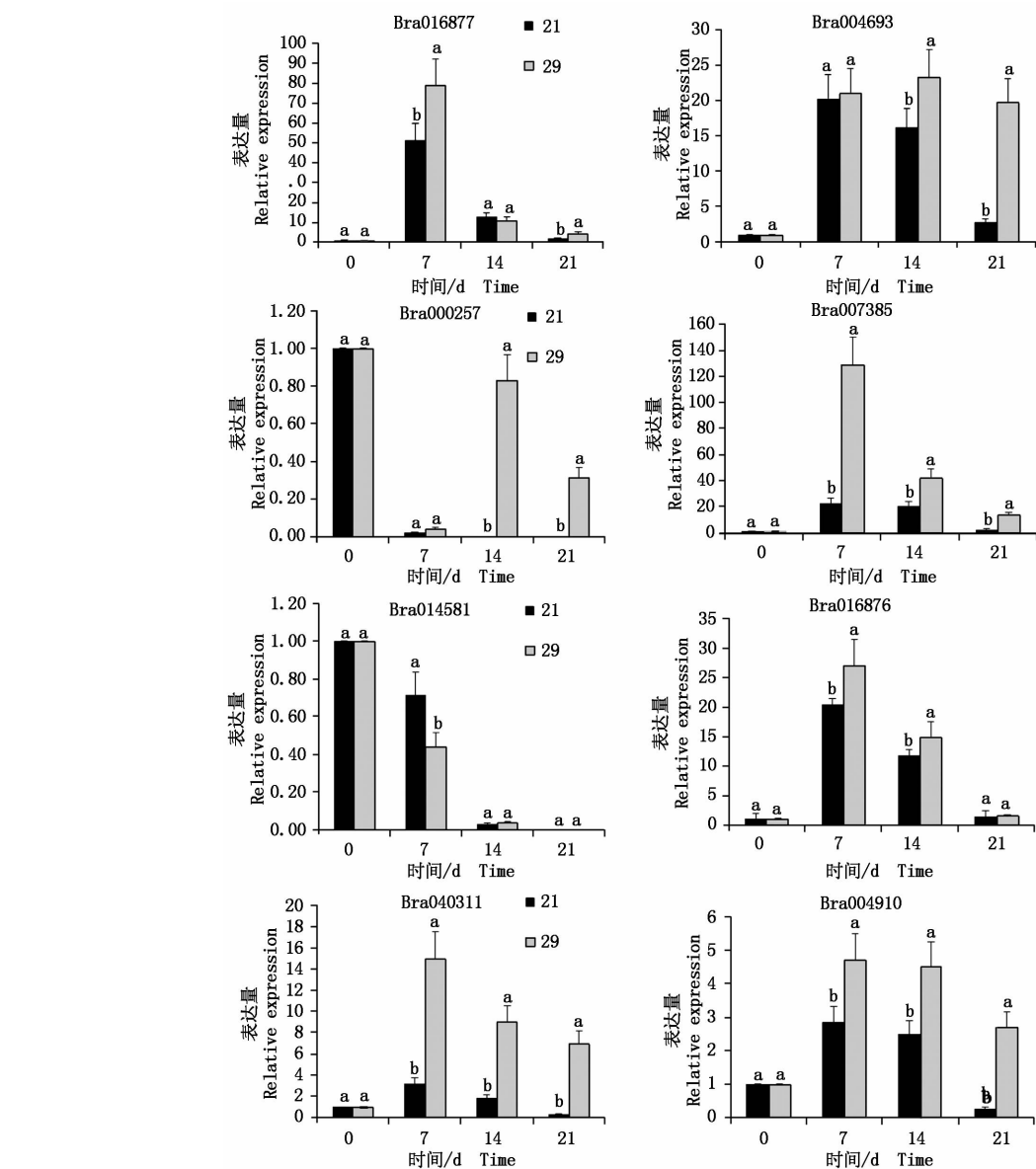


图2 白菜LBD基因的进化树分析

Fig.2 Phylogenetic tree of LBD genes of *Brassica rapa*



图柱上不同小写字母表示差异显著 ( $\alpha = 0.05$ )。

Different lowercase letters on figure column indicate significant difference ( $\alpha = 0.05$ ).

图3 白菜LBD基因在愈伤诱导过程中的表达模式分析

Fig.3 Expression analysis of LBD genes during callus regeneration

## 2.4 大白菜 *LBD* 基因的表达与再生频率的关系分析

为探索大白菜 *LBD* 基因是否参与愈伤组织形成,利用低再生频率材料(21)和高再生频率材料(29)对上述基因在愈伤形成过程中的表达进行分析。如图3所示,在同种材料中,除 *Bra000257*、*Bra014581* 外,其余 *LBD* 基因在愈伤形成过程中均呈现先上调、再下调的表达趋势,大部分基因在诱导7 d 后表达量达到最高,而后逐渐减低。这种表达模式与拟南芥 *LBD* 基因在愈伤组织形成过程中的表达模式类似<sup>[12]</sup>,这说明白菜 *LBD* 基因可能参与了愈伤组织的产生及调控。此外,从表达量来看, *Bra016877*、*Bra007385*、*Bra016876* 和 *Bra040311* 的表达高于其他 *LBD* 基因,这说明在白菜愈伤组织产生过程中,这4个基因可能起主要作用。

为进一步探讨 *LBD* 基因对愈伤组织产生的影响,比较了再生频率显著不同的2个材料(21和29)中 *LBD* 基因的表达变化情况。如图3所示,在愈伤诱导过程中,所有 *LBD* 基因在高再生频率材料(29)中的表达量一般都高于低再生频率材料(21, *Bra014581* 除外)。根据2.1结果,外植体诱导7 d 时是愈伤组织产生的关键时间节点(图1),Real-time PCR 结果显示在所有 *LBD* 基因中, *Bra007385* 和 *Bra040311* 在诱导7 d 时,高再生频率材料(29)的表达量显著高于低再生频率材料(21),说明这2个基因可能是4个基因( *Bra016877*、*Bra007385*、*Bra016876* 和 *Bra040311*)中参与愈伤组织形成的关键基因。

## 3 讨论

基因型是限制白菜类作物再生的主要因素<sup>[14-16]</sup>,筛选出优良基因型是建立白菜高效遗传转化体系的关键。目前,关于大白菜再生及遗传转化方面研究已有很多<sup>[14-15]</sup>,但多数仍停留在基本数据测定上,如再生频率、再生系数等的统计,很少深入分子层面。植物再生实质上是植物体细胞通过体细胞胚发育成完整植株的过程,而愈伤组织产生是体细胞胚发生的关键前提,然而此方面的研究报道很少。最近的研究显示,拟南芥 *LBD16*、*LBD17*、*LBD18* 和 *LBD29* 基因受到生长素信号激活,调控愈伤组织生成和体细胞胚胎发生。在拟南芥中过量表达上述 *LBD* 基因能够显著促进愈伤组织的形成,而其缺失则会抑制这一过程<sup>[12]</sup>。拟南芥是目前已知的与白菜亲缘关系最近的物种,这为利用模式物种信息进行白菜类作物的研究奠定了良好基础。

本研究通过对多个白菜高代自交系不定芽再生

率的统计分析,显示不同基因型自交系在相同的培养条件下芽再生能力差异明显,并选出具有显著差异的2个大白菜高代自交系材料29(夏宝)和21(刑都优丰)。进一步的研究结果表明,不同基因型白菜,其愈伤组织产生、发育和最终形态发生方式不同,愈伤组织的状态可以直接决定再生频率。研究中 *LBD* 基因的表达量与愈伤组织产生、再生频率呈正相关,这与拟南芥中的研究结果相一致<sup>[12]</sup>。

不定芽形成需要经过愈伤组织产生与发育、体细胞胚发生及生长2个阶段,因此愈伤组织形成的相关基因表达,一定程度上可以反映愈伤后期不定芽形成的能力,即再生频率的高低。研究显示共有6个 *LBD* 基因在愈伤诱导的过程中基本都出现先增加、后降低的趋势,其表达量一般都在培养7 d 或14 d 出现最高值,这与试验所观察到的大量愈伤组织发生及生长的时间相一致。另一方面,系统发育树将这8个 *LBD* 同源基因分成4支,而每一个分支中均有1个 *LBD* 的表达量明显高于其余同支同源基因(如: *Bra016877*、*Bra000257* 和 *Bra004693*),暗示这几个基因可能起主效作用,这也从侧面印证了在白菜遗传进化过程中,染色体的加倍化使得同源基因之间的表达调控与功能已经有所不同。进一步分析表明, *LBD* 基因在愈伤诱导过程中,不定芽再生频率高的自交系的表达量要远高于再生频率低的自交系。因此初步认为,白菜 *LBD* 基因的表达与愈伤组织发生和不定芽再生频率呈正相关。

本试验在前人研究的基础上,初步分析了 *LBD* 基因表达和白菜愈伤组织的产生以及再生频率的关系,推测 *LBD* 基因可能是影响白菜作物再生频率的重要基因。这为从分子水平上筛选再生频率高的材料,建立高效遗传转化体系奠定了基础。此外,我们在研究中观察到的愈伤组织小、褐化或者提前生根均可能导致不定芽再生频率低的现象发生,可为我们快速筛选合适材料提供借鉴。

## 参考文献:

- [1] Zhang F L, Takahata Y, Watanabe M, et al. Agrobacterium-mediated transformation of cotyledonary explants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) [J]. Plant Cell Rep, 2000, 19(6): 569-575.
- [2] Lee M K, Kim H S, Kim J S, et al. Agrobacterium-mediated transformation system for large-scale production of transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) plants for insertional mutagenesis[J]. J Plant Biol, 2004, 47(4): 300-306.
- [3] Birnbaum K D, Sánchez Alvarado A. Slicing across king-

- doms;regeneration in plants and animals[J]. *Cell*,2008, 132:697 – 710.
- [4] Skoog F, Miller C O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro* [J]. *Symp Soc Exp Biol*,1957,54:118 – 130.
- [5] Husbands A, Bell E M, Shuai B, *et al.* LATERAL ORGAN BOUNDARIES defines a new family of DNA-binding transcription factors and can interact with specific bHLH proteins[J]. *Nucleic Acids Res*,2007,35:6663 – 6671.
- [6] Majer C, Hochholdinger F. Defining the boundaries: structure and function of LOB domain proteins [J]. *Trends Plant Sci*,2011,16:47 – 52.
- [7] Yordanov Y S, Regan S, Busov V. Members of the LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN transcription factor family are involved in the regulation of secondary growth in *Populus*[J]. *Plant Cell*,2010,22:3662 – 3677.
- [8] Iwakawa H, Ueno Y, Semiarti E, *et al.* The ASYMMETRIC LEAVES2 gene of *Arabidopsis thaliana*, required for formation of a symmetric flat leaf lamina, encodes a member of a novel family of proteins characterized by cysteine repeats and a leucine zipper[J]. *Plant Cell Physiol*,2002, 43(5):467 – 478.
- [9] Shuai B, Reynaga-Pena C G, Springer P S. The lateral organ boundaries gene defines a novel, plant-specific gene family[J]. *Plant Physiol*,2002,129(2):747 – 761.
- [10] Lee H W, Kim N Y, Lee D J, *et al.* LBD18/ASL20 regulates lateral root formation in combination with LBD16/ASL18 downstream of ARF7 and ARF19 in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*,2009,151:1377 – 1389.
- [11] Okushima Y, Fukaki H, Onoda M, *et al.* ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2007,19:118 – 130.
- [12] Mingzhu Fan, Chongyi Xu, Ke Xu1, *et al.* LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN transcription factors direct callus formation in *Arabidopsis* regeneration[J]. *Cell Res*,2012,22:1169 – 1180.
- [13] 刘任源, 于拴仓, 魏佑营, 等. 白菜类作物子叶高频再生体系的建立[J]. *西北农业学报*,2012,21(6):118 – 123.
- [14] 范爱丽, 张鲁刚, 武云霞, 等. 大白菜子叶段高频再生体系的建立[J]. *核农学报*,2009,23(4):581 – 586.
- [15] Zhang F L, Takahata Y, Xu J B. Medium and genotype factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) [J]. *Plant Cell Rep*,1998,17:780 – 786.
- [16] Qi J, Yu S, Zhang F, *et al.* Reference gene selection for real-time quantitative polymerase chain reaction of mRNA transcript levels in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2010, 28(4):597 – 604.