

颜文飞, 张启军, 秦海龙, 等. 运用农杆菌介导的针刺法将外源基因转入水稻[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(4): 718-724.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.04.002

运用农杆菌介导的针刺法将外源基因转入水稻

颜文飞¹, 张启军², 秦海龙¹, 廖慧敏¹, 宗寿余², 夏士健², 吕川根²

(1. 南京农业大学农学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院粮食作物研究所/江苏省优质水稻工程技术研究中心, 江苏 南京 210014)

摘要: 选用含转化质粒 pBI121-*GUS* 的农杆菌为转化载体菌株, 以水稻南粳 45 为转基因受体品种, 用含有外源基因的农杆菌菌液浸蘸接种针, 然后直接侵染受体水稻发芽种子的胚芽生长点, 不进行愈伤组织培养, 直接完成转基因操作。结果表明, 生长成植株的 48 株中, 16 株经 PCR 检测和 GUS 组织化学检测均为阳性, 说明外源基因不仅导入水稻基因组中, 且已在蛋白质水平上表达。与传统的农杆菌介导法相比, 本方法不需诱导愈伤组织以及之后的一系列组织培养过程, 节省了大量的人力和财力, 转化过程所需时间缩短, 具有简单、快速、高效的优点, 是一种改良的水稻转基因新技术。

关键词: 水稻; 转基因; 胚芽生长点; 针刺法

中图分类号: S511 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)04-0718-07

Transforming gene into rice through agrobacterium-mediation assisted by needle puncture

YAN Wen-fei¹, ZHANG Qi-jun², QIN Hai-long¹, LIAO Hui-min¹, ZONG Shou-yu², XIA Shi-jian², LÜ Chuan-gen²

(1. College of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Food Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu High Quality Rice R&D Center, Nanjing 210014, China)

Abstract: The solution of agrobacterium EHA105 containing plasmid pBI121-*GUS* was used to infect the apical meristem of *japonica* rice variety, Nanjing45 through agrobacterium-mediation assisted by needle puncture to transform *gus* gene into rice without callus induction and a series of tissue culture. Among 48 survived seedlings, 16 positive plants were verified by PCR detection and *GUS* histochemical assays, indicating that the *GUS* gene has been transformed into rice genome and expressed on protein level. Compared to the traditional method of agrobacterium-mediated transformation, the present method does not need to induce or culture callus, and can save a large amount of labor, time and costs. It is a simple, quick and efficient way for rice gene transformation.

Key words: rice; transgene; apical meristem; needle puncture

收稿日期: 2014-12-25

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项 (2014ZX08001-004)

作者简介: 颜文飞, (1988-), 女, 福建晋江人, 硕士研究生, 主要研究水稻遗传育种。(E-mail) 2010801171@njau.edu.cn。张启军为共同第一作者。

通讯作者: 吕川根, (E-mail) rb8@jaas.ac.cn

转基因技术作为一种可持续发展方式, 可提高农作物产量、品质和抗性等, 具有良好的发展前景, 将为农业发展注入新的动力^[1]。目前, 在水稻育种上相继开发研究的转基因技术有以农杆菌为主导的载体介导转基因技术, 以基因枪、PEG 等介导的基因直接导入技术和以花粉管通道转化、生殖细胞浸

泡吸收为主的种质系统转化技术,其中农杆菌介导技术约占 64%^[2]。

农杆菌细胞内的 Ti 质粒或 Ri 质粒具有一段 T-DNA,可通过农杆菌侵染植物伤口进入细胞,并插入到植物基因组中。通过将目的基因插入到经过改造的 T-DNA 区,借助农杆菌的感染,可实现外源基因向植物细胞的转移与整合,然后通过细胞和组织培养技术,再生出转基因植株^[3]。自从 1978 年 Chilton 等^[4]第 1 次利用农杆菌的 Ti 质粒为载体将 T-DNA 上的胭脂碱基因转入烟草细胞以来,农杆菌介导法在双子叶植物转化中得到了广泛应用。1986 年, Baba 等^[5]通过 PEG 法将农杆菌原生质球与水稻原生质体融合,获得了能合成胭脂碱的水稻转化组织。之后,科学界开始对农杆菌介导的水稻转化技术进行广泛的研究,试图通过转基因技术提高水稻产量、改良品质和增强抗性^[6-8]。但是,由于国内外不同实验室使用的基因型、受体植株的不同和培养条件的差异,各个转化体系得到的结果不尽相同,转化率也普遍不高。所以,研究人员分别从 Ti 质粒的改造、转化载体的构建和组织培养等方面入手,不断优化农杆菌介导的水稻转化方法,以期提高转化效率。

经过近 20 多年的发展和优化,农杆菌介导转基因技术的转化效率得到了长足的提高,但与现代农业对转基因产品的需求相比,其步伐仍然不够快,仍存在许多障碍和安全隐患,需进一步加强转化技术的研发,突破核心技术。

利用植物生长点转化的原理是外源 DNA 通过细胞间隙进入茎尖生长点细胞部位,并转化生长点细胞,从而产生转基因后代。近年来,已有一些关于植物生长点用于转化的报道,主要是在小麦、玉米上。1996 年,杜立群等^[9]用小麦的生长点作为外源基因的直接受体,利用基因枪轰击获得转基因小麦。2005 年, Razzaq 等^[10]以小麦为材料,尝试了一种对生长点直接进行转化的方法,并初步证明了这一方法的可行性。2009 年,董福双等^[11]以小麦品种石 4185 为对象,建立了受体制备方法,初步建立了基因枪法转化小麦种子芽生长点的技术。2011 年,孙传波等^[12]以玉米自交系郑 58 的茎尖为受体,通过农杆菌介导法将抗草甘膦 *EPSPS* 基因转入玉米,初步证明外源基因已经整合到玉米基因组中,以玉米茎尖作为受体的转化系统可行、高效。在水稻上,2001 年,林拥军利用农杆菌浸种法将反义 *Wx* 基因

导入水稻品种珍汕 97B^[13]。2005 年, Putu 等^[14]利用农杆菌介导直接侵染粳稻品种越光胚芽生长点也获得转基因植株。

本研究将沾有外源基因的农杆菌菌液的接种针直接刺破侵染受体水稻的胚芽生长点,完成转基因操作,而不需诱导愈伤组织以及之后的一系列组织培养过程,为转化水稻提供一种简单、快速、高效的方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 受体水稻品种 水稻 (*Oryza sativa* L.) 品种南粳 45 由江苏省农业科学院粮食作物研究所仲维功研究员提供。南粳 45 于 2009 年通过江苏省品种审定委员会审定,为江苏省主栽品种,并被农业部列为超级稻推广品种。

1.1.2 载体和菌株 农杆菌菌株 LBA4404 含转化质粒 pBI121-*GUS*, 含 *GUS* 基因 (图 1), 由南京晓庄学院蔡小宁教授馈赠。

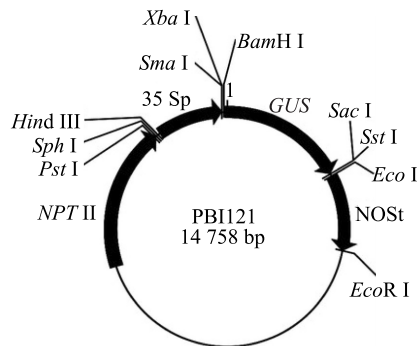


图 1 质粒 pBI121-*GUS* 结构示意图

Fig. 1 Structure diagram of plasmid pBI121-*GUS*

1.1.3 试剂 BU-*Taq* 酶、dNTP、*Taq* Buffer、质粒提取试剂盒均购自南京天为生物科技有限公司, DNA 分子量标准购自天根生化科技 (北京) 有限公司。卡那霉素 (Kan)、利福平 (Rif)、头孢霉素 (Cef)、乙酰丁香酮 (As) 为 Simga 公司产品。X-Gluc、DMF 为 Biosharp 公司产品。其他试剂均为国产分析纯。引物 (表 1) 由上海英骏公司合成。

1.1.4 培养基 LB 培养基 (用于培养农杆菌): 酵母提取物 5 g/L, 胰化蛋白胨 10 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.0 (固体培养基+琼脂 15 g/L)。

表 1 基因位点或连锁标记的引物序列

Table 1 Primer sequence of gene or linkage markers

基因	标记	引物序列(5'→3')	遗传距离(cM)	退火温度(℃)	片段大小(bp)
<i>GUS</i>	<i>GUS</i>	正向 TTACGTCCTGTAGAAACCCCA	0	57	745
		反向 TAGAGATAACCTTCACCCGGT			

1.2 方法

1.2.1 水稻胚生长的观察 将南粳 45 种子浸没在含清水的培养皿里,在 24 ℃ 下培养。每天分别挑取 3~4 粒种子,用解剖刀解剖后,在显微镜下观察胚的形态和结构,确定胚芽生长点的大体位置,共观察 14 d。

1.2.2 植物表达载体农杆菌的培养与检测

1.2.2.1 植物表达载体农杆菌的培养 取农杆菌 LBA4404 菌液(带有转化质粒 pBI121-*GUS*) 200 μl 于 1.5 ml 离心管中,用接种环进行平板划线(Kan, 50 μg/ml; Rif, 50 μg/ml), 28 ℃ 倒置培养 48 h,挑选单菌落接种于 10 ml 的 LB 液体培养基中(含 50 mg/L Rif 和 50 mg/L Kan), 28 ℃, 200 r/min 振荡培养 24 h。

取培养好的检测有阳性质粒的上述菌液 1 ml, 放至 100 ml 液体 LB 培养基(含 100 μmol/L As)中扩大培养, 28 ℃ 200 r/min 振荡培养至 OD_{600} 为 0.3。为了便于观察和使农杆菌生长状态良好,扩大培养液里不加抗生素。

1.2.2.2 植物表达载体农杆菌阴阳性的检测 按照 Biomiga Ezgene 公司生产的 Plasmid Miniprep Kit 试剂盒的使用说明书进行质粒 DNA 的微量提取。PCR 扩增体系: 10×PCR buffer 2.0 μl, dNTP (2 mmol/L) 2.0 μl, Primer (2 mmol/L) 2 μl, *Taq* DNA 聚合酶 1 U, 质粒 DNA 2.0 μl, 补充超纯水至 20 μl。

PCR 扩增程序为: 94 ℃、5 min; 94 ℃、30 s, 57 ℃、30 s, 72 ℃、50 s, 35 个循环; 72 ℃、10 min。扩增产物加指示剂后用 1% 的琼脂糖凝胶进行 1 h 的 110 V 电泳后照相。选取 PCR 扩增结果为阳性的菌液进行扩大培养。

1.2.3 水稻的遗传转化 以下操作均需在无菌条件下进行。

1.2.3.1 水稻种子的培养 将未去颖壳的南粳 45 种子先用 75% 的乙醇浸泡 5 min, 再用 0.1% 的升汞杀菌 15~20 min, 无菌水冲洗 3~4 次。用无菌镊子将消毒后的种子放在铺有 1 层滤纸、盛有 10 ml 无菌水的培养皿中, 每皿 15 粒, 26~28 ℃ 培养 1~2

d, 直至种子微露白。

1.2.3.2 农杆菌侵染水稻种胚 用沾有扩大培养后的农杆菌菌液的接种针刺入水稻种胚, 然后将种子放入植物培养瓶中(内有 2 cm 厚的蛭石, 蛭石上铺有 1 张湿润的滤纸), 每瓶 15 粒, 22~24 ℃ 暗培养 9~14 d, 共侵染 90 粒。

1.2.3.3 水稻转化苗的杀菌与移苗 将暗培养后苗长为 10 cm 左右的转化苗浸泡在浓度为 1 mg/ml 的 Cef 溶液中 1 h, 之后, 将苗移栽到网室中的盆钵中, 盆钵直径 30 cm, 每盆 5 苗。

1.2.4 转基因苗的 DNA 检测 待处理后的苗长至 7~8 叶、株高 40 cm 以上时, 每株取 200 mg 左右嫩叶进行 DNA 检测, 以正常南粳 45 秧苗为阴性对照。用 SDS 法从水稻新鲜叶片中微量提取总 DNA。以正常南粳 45 秧苗为阴性对照, 上述质粒 DNA 检测为阳性的质粒 DNA 为阳性对照, 以水稻基因组 DNA 为模板, 以 *GUS* 基因的序列设计引物进行转基因植株的 PCR 分析。

PCR 扩增体系: 10×PCR buffer 2.0 μl, dNTP (2 mmol/L) 2.0 μl, Primer (2 mmol/L) 2.0 μl, *Taq* DNA 聚合酶 1 U, DNA 2.0 μl, 补充超纯水至 20 μl。PCR 扩增程序为: 94 ℃、5 min; 94 ℃、30 s, 57 ℃、30 s, 72 ℃、54 s, 35 个循环; 72 ℃、10 min。扩增产物加指示剂后用 1% 的琼脂糖凝胶进行 1 h 的 110 V 电泳后照相。

1.2.5 转基因苗 *GUS* 基因的组织化学检测 对上述 DNA 检测有 *GUS* 基因的水稻, 每株取 2 张叶片, 并取 2 张阴性对照水稻叶片, 先用 90% 丙酮在 -20 ℃ 浸泡至少 2 h。将丙酮浸泡后的水稻叶片用无菌水冲洗后转到已过滤除菌的 X-Gluc 染色液中, 37 ℃ 水浴 10 h。水浴后弃染色液, 转入 70%~100% 乙醇中脱色 2~3 次, 至阴性对照材料呈白色(室温下)。肉眼或显微镜下观察, 具有 *GUS* 活性的部位或位点是否呈现蓝色或蓝色斑点。

1.2.6 T_1 代转基因苗的培育和基因检测 对 T_0 代检测有 *GUS* 基因的水稻苗, 待其成熟后单株收获种子, 编号, 包在扎有透气孔的种子袋里, 45 ℃ 下烘 2

d。2 d 后将种子拿出,待其温度退到室温时,随机选取 8 个种子袋,将其泡在 0.5% 的升汞溶液中浸种 24 h,然后经清水冲洗,包在湿布里放在白炽灯管上催芽至露白,期间勤加水,保持布处于湿润状态。将催芽后的种子按编号播种在网室里,盖上保温膜,30 d 后分群体取样,进行 DNA 检测和 GUS 组织化学检测(方法同方法 1.2.4 和方法 1.2.5)。

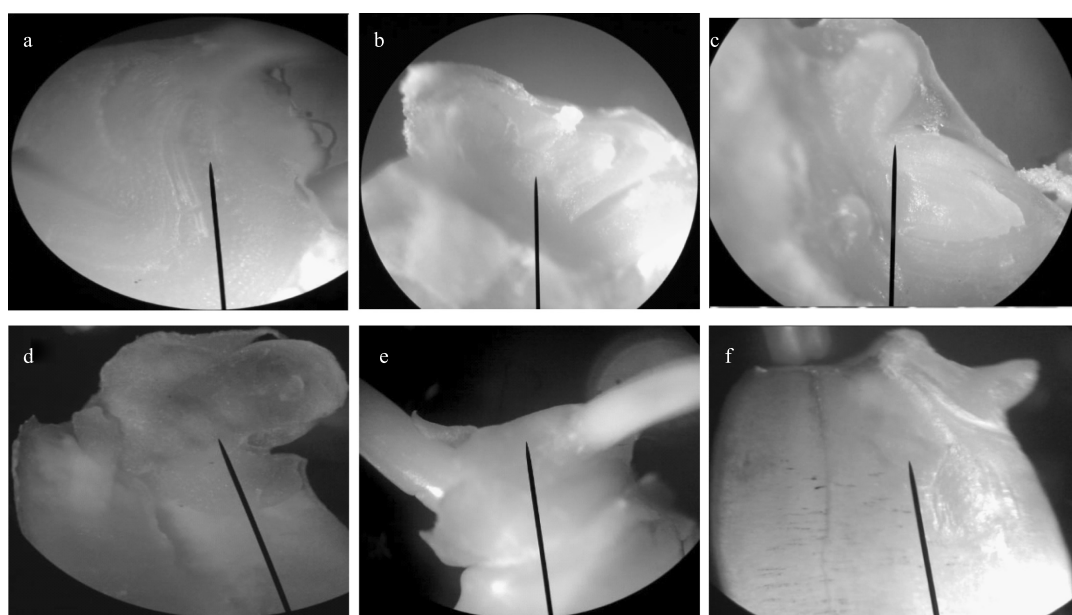
2 结果与分析

2.1 水稻胚的生长

经过 14 d 的反复观察,水稻胚的生长动态及胚

芽胚根露出种孔后的位置如图 2e:胚根位于种孔的中上部,胚芽位于种孔的中下部,二者生长后期呈 $45^{\circ} \sim 180^{\circ}$,这使我们明确了进行下一步侵染转化时针刺生长点的大致位置。

图 2a:胚尚未露出种孔,胚的形态结构尚未清晰;图 2b:胚已微露出种孔,胚芽胚根已可区分;图 2c:胚微露出种孔,胚芽胚根形态结构分明;图 2d:胚已几乎全露出种孔,胚芽胚根形态结构分明,胚芽胚根分化明显。由此我们确定,在水稻浸泡 24 ~ 36 h,胚芽胚根已可区分但尚未完全分化时,进行转基因的针刺侵染最为合适。



a:浸泡 12 h 的水稻种子胚剖面;b:浸泡 24 h 的水稻种子胚剖面;c:浸泡 36 h 的水稻种子胚剖面;d:浸泡 48 h 的水稻种子胚剖面;e:浸泡 96 h 的水稻种子胚;f:浸泡 24 ~ 36 h 的水稻种子。

图 2 水稻胚的生长

Fig.2 Growth of rice embryo

2.2 侵染转化后的秧苗生长

侵染转化后的秧苗生长见图 3,待转化苗长至 10 cm 左右,用 Cef 溶液进行杀菌消毒后转至网室盆栽。其中侵染了 90 粒南粳 45 种子,成苗 48 株,成苗率达 53.3 %。

2.3 转基因 T_0 代的 PCR 检测

对 48 棵 T_0 代转化植株进行 PCR 检测,凝胶电泳显像结果中,由于有些 DNA 扩增条带较模糊,本试验把它们归为阴性植株。保守确定,PCR 检测中有 16 棵植株扩增条带为阳性(图 4),转化率

达 33.3 %,初步证实 *GUS* 基因已导入水稻基因组中。

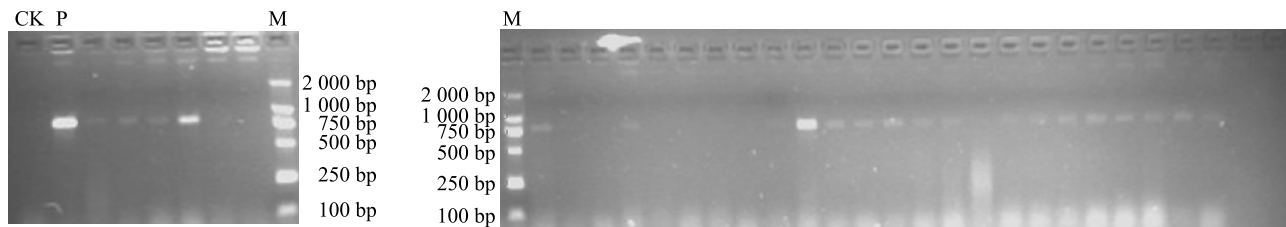
2.4 转基因 T_0 代 *GUS* 基因的组织化学检测

取未针刺转化的南粳 45 叶片 2 张作阴性对照(CK),对于上述 DNA 检测为阳性的水稻,每个单株取 2 张叶片,共 34 张叶片,进行 *GUS* 基因的组织化学检测。经酒精脱色后对照呈白化颜色,而 32 张转 *GUS* 阳性 T_0 代叶片均有不同程度的蓝色斑点显现(图 5),再次验证了 *GUS* 基因已导入南粳 45 基因组中,并在蛋白质水平上表达。

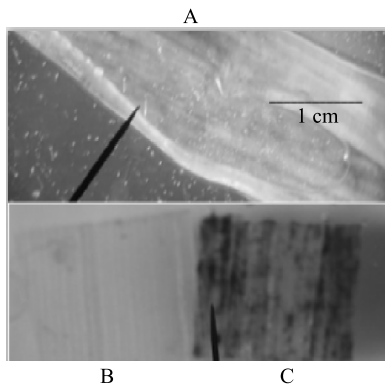


图 3 侵染转化后水稻苗的生长

Fig. 3 Growth of rice after genetic transformation



M: DL2000 DNA Marker; P: 阳性质粒 DNA; CK: 未转化植株 DNA。

图 4 转基因 T_0 代植株的 PCR 检测Fig. 4 PCR assays of T_0 transgenic plants

A 和 C: 转基因 T_0 代植株叶片; B: 阴性对照 (CK) 叶片。

图 5 部分转基因 T_0 代植株 *GUS* 基因的组织化学检测Fig. 5 Histochemical assay of *GUS* gene in some T_0 transgenic plants

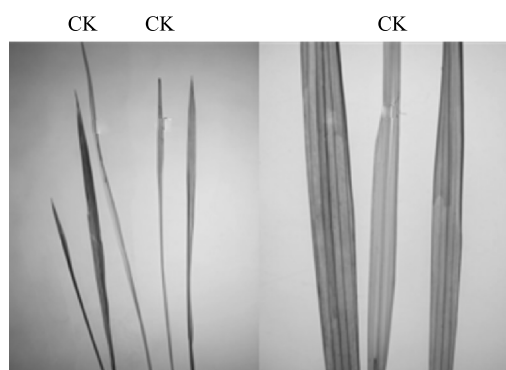
2.5 转基因 T_1 代的 PCR 检测

对 8 个 T_1 代转基因群体进行 PCR 检测, 发现

其中 4 个 T_1 代群体中 99% 植株可检测到 *GUS* 基因, 其群体植株总数分别为 32 株、37 株、46 株和 15 株。而其余 4 个 T_1 代群体 (植株总数分别为 24 株、64 株、52 株和 66 株) 中, 只有部分植株检测到 *GUS* 基因, 呈分离现象, 阳性植株与阴性植株的分离比依次为 1.0 : 3.0、1.0 : 1.5、1.0 : 2.4、1.0 : 10.0。说明 *GUS* 基因已从 T_0 代传递到 T_1 代, 但后代分离并不符合孟德尔遗传分离比例。

2.6 转基因 T_1 代 *GUS* 基因的组织化学检测

对种植的 8 个 T_1 代群体均随机在 4 株苗上各取 1 张叶片, 阴性对照叶片 2 张, 共 34 张叶片, 进行 *GUS* 基因的组织化学染色检测。结果如图 6, 对照 CK 经酒精脱色后呈白化颜色, 而转 *GUS* 阳性 T_1 代苗经酒精脱色后均显蓝色。进一步说明 T_1 代植株中存在 *GUS* 基因, 且已在蛋白质水平上表达。



CK: 未转化植株。

 图6 部分转基因 T_1 代植株 *GUS* 基因的组织化学检测

 Fig. 6 Histochemical assay of *GUS* gene in some T_1 transgenic plants

3 讨论

本方法中南梗 45 T_0 代转化率保守达 33.3%, 即在生长成植株的 48 株中, 16 株经 PCR 检测和 *GUS* 基因的组织化学染色检测均为阳性, 说明外源基因不仅导入水稻基因组中, 且已在蛋白质水平上表达。利用愈伤进行遗传转化的转化率表示的是基因检测为阳性的抗性植株/进行共培养的愈伤总数。据不完全调查, 近年来, 对植株转化成功率进行统计的结果有: 1994 年, Hiei 等^[15] 实现对梗稻的高频转化, 转化率达到 28.6%; 2003 年, 殷丽青等^[16] 以 15 个籼稻、梗稻栽培品种为材料, 梗稻遗传转化频率为 3.9% ~ 11.4%, 籼稻遗传转化频率为 0.2% ~ 8.1%; 2005 年, 刘元凤等^[17] 对 4 个籼稻品种进行遗传转化, 平均稳定转化率为 23.6%; 2005 年, 任永霞等^[18] 对植物遗传转化方法进行概述, 统计出利用农杆菌转化梗稻和籼稻的遗传转化率分别为 29.0% 和 22.0%; 2007 年, 胡丽华等^[19] 利用农杆菌介导法将柠檬酸合成酶基因导入籼稻明恢 86, 获得抗性植株转化率为 6.0%; 2007 年, 宁约瑟等^[7] 在对农杆菌介导水稻遗传转化研究进展中提到籼稻转化较困难, 多数籼稻转化率不超过 10.0%; 2008 年, 刘永巍等^[20] 以梗稻品种空育 131、垦鉴稻 7 号愈伤组织为材料进行遗传转化, 平均转化率仅为 3.0%。

综上所述, 运用常规农杆菌介导法转化水稻, 梗稻的平均转化率一般在 3% ~ 29%, 籼稻的平均转化率不高于 10%。本研究方法获得了较高的转化

效率, 且导入的基因均已在蛋白质水平上表达。而且, 本方法不需诱导愈伤组织以及之后的一系列组织培养过程, 即不需配制各种培养基、控制各种培养条件并对其进行不断优化调整。利用传统农杆菌介导法获得转基因植株的周期至少为 2 ~ 4 个月, 而应用本方法只需 10 ~ 15 d。本方法大大缩短培养周期, 节省了大量的财力物力, 简化了农杆菌介导转化法的流程, 提高了转化的工作效率。

对转基因 T_1 代进行 PCR 检测发现, 部分转基因后代群体 99% 的个体为 *GUS* 阳性, 而有 4 个转基因后代群体发生基因分离, 分离比并不符合孟德尔 3 : 1 的分离比。根据前人转基因遗传研究的结果, 外源基因一般作为 1 个显性基因传递给后代, 遵循孟德尔遗传分离规律, 自交结实后代表现 3 : 1 分离比例, 与非转化亲本杂交后代表现 1 : 1 分离比^[21]。

对于后代群体发生分离但又不符合孟德尔式遗传规律的现象, 猜想其原因可能有 2 个, 一是由于转化针刺生长点的位置不够精确, 使得转化受体为嵌合体, 所以其后代不符合 3 : 1 的分离比。二是 T-DNA 多拷贝地整合到宿主染色体中或部分单株转入基因丢失等。对于这 2 种情况, 可行的解决办法是, 利用 Southern 印迹选择单拷贝植株, 繁殖至高世代, 直到获得目标基因纯合的株系。

参考文献:

- [1] 杨长青, 王凌健, 毛颖波, 等. 植物转基因技术[J]. 科学, 2011, 63(3): 21-24.
- [2] JAMES C. 2009 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J]. 生物工程学报, 2010, 30(2): 1-22.
- [3] 万建民. 我国转基因植物研发形势及发展战略[J]. 生命科学, 2011, 23(2): 157-167.
- [4] CHILTON M D, SAIKIR K. Highly conserved DNA of Ti plasmids overlaps T-DNA maintained plant tumors [J]. Nature, 1978, 275: 147-149.
- [5] BABA A, HASEZAWA S, SYONO K. Cultivation of rice protoplasts and their transformation mediated by Agrobacterium protoplasts [J]. Plant Cell Physio, 1986, 27: 463-468.
- [6] 郑 腾, 陆承平. 转基因技术对粮食生产的影响[J]. 生物学通报, 2004, 39(1): 6-9.
- [7] 宁约瑟, 刘雄伦. 根瘤农杆菌介导水稻遗传转化研究进展及展望[J]. 中国农学通报, 2007, 23(3): 47-51.
- [8] 李 卫, 郭光沁, 郑 钊. 根瘤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.
- [9] 杜立群, 李银心, 麻 密, 等. 小麦生长点转化法初报[J]. 植

- 物学报,1996,38(11):921-924.
- [10] RAZZAQ A,张艳敏,杨帆,等.小麦茎生长点转化研究初报[J].华北农学报,2005,20(1):17-22.
- [11] 董福双,张艳敏,杨帆,等.小麦芽生长点的基因枪转化技术研究[J].华北农学报,2009,24(5):1-6.
- [12] 孙传波,李海华,郭嘉,等.农杆菌介导法向玉米茎尖导入抗草甘膦 *EPSPS* 基因的研究[J].生物技术通报,2011(3):91-93.
- [13] 林拥军.农杆菌介导的水稻转基因研究[D].武汉:华中农业大学,2001.
- [14] PUTU S, TSUTOMU S, HIDEHARI S, et al. Development of simple and efficient in plant-a transformation method for rice (*Oryza sativa* L.) using *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Bioscience and Bioengineering, 2005, 100(4):391-397.
- [15] HIEI Y, OHTA S, KOMARI T, et al. Efficient transformation of rice mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA [J]. Plant J, 1994, 6(2):271-282.
- [16] 殷丽青,张建军,王慧梅,等.提高根癌农杆菌介导水稻遗传转化频率的研究[J].上海交通大学学报:农业科学版, 2003, 21(增):43-47.
- [17] 刘元凤,刘彦卓,王金花,等.根癌农杆菌介导水稻遗传转化影响因素研究[J].分子植物育种, 2005, 3(5):737-743.
- [18] 任永霞,季静,王昱,等.植物遗传转化方法概述[J].河北北方学院学报:自然科学版, 2005, 21(6):38-42.
- [19] 胡丽华,吴慧敏,周泽民,等.利用农杆菌介导法将柠檬酸合成酶基因(*CS*)导入水稻品种明恢86[J].分子植物育种,2006, 4(2):160-166.
- [20] 刘永巍,田红刚,李玉华,等.根癌农杆菌的水稻遗传转化[J].牡丹江师范学院学报:自然科学版, 2008(1):30-32.
- [21] 吴金平.利用离体培养技术筛选魔芋软腐病抗源材料的研究[D].武汉:华中农业大学, 2004.

(责任编辑:陈海霞)