

## 研究论文

### An Article

# 根癌农杆菌介导遗传转化水稻成熟胚愈伤组织快速获得转化植株

郭刚<sup>1</sup>, 余婧<sup>2</sup>, 赵德刚<sup>1,3</sup>

1. 贵州大学生命科学学院贵州省农业生物工程重点实验室, 贵阳, 550025

2. 贵州烟叶复烤有限责任公司铜仁复烤厂, 铜仁, 554300

3. 贵州大学教育部绿色农药与农业生物工程重点实验室, 贵阳, 550025

✉ 通讯作者: [degangzhao@yahoo.com](mailto:degangzhao@yahoo.com); ✉ 作者

分子植物育种, 2011年, 第9卷, 第4篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0004

收稿日期: 2010年12月09日

接受日期: 2011年01月13日

发表日期: 2011年01月19日

本文首次以英文发表在 *Molecular Plant Breeding* (online) 上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 对其进行授权, 用中文再次发表与传播。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。如果读者对中文含义理解有歧义, 请以英文原文为准。

引用格式:

Guo et al., 2011, Rapid Acquirement of Transgenic Rice Plants Derived from Callus of Mature Embryos Transformed by *Agrobacterium* Mediation, *Molecular Plant Breeding* (online) Vol.2 No.2 (doi: 10.5376/mpb.2011.02.0002)

**摘要** 本研究以含有 *ubi: bar-Gus* 和 *ACT: Bt* 表达元件的质粒 pCAMBIA0390 的根癌农杆菌 EHA105 对台北 309 和日本晴两个水稻品种的成熟胚愈伤组织进行转化, 并研究了影响愈伤组织分化率的因素。结果表明, 在转化过程中, 愈伤经 21 d、28℃、2000 lux、13 h/d 的光照培养、侵染后风干 20 min 和共培养后风干 20 min 再使用吸水纸干燥 8 h 的处理后, 台北 309 和日本晴分化率分别提高到 39% 和 44%。同时, 转化过程不需继代, 转化周期从 105 d 缩短为约 60 d, 经 GUS 组织化学染色和基因组 PCR 检测结果表明, 获得了含 Bt 基因的水稻植株。

**关键词** 水稻; 成熟胚; 农杆菌; 快速转化

## Rapid Acquirement of Transgenic Rice Plants Derived from Callus of Mature Embryos Transformed by *Agrobacterium* Mediation

Guo Gang<sup>1</sup>, Yu Jing<sup>2</sup>, Zhao Degang<sup>1,3</sup>

1. Guizhou Key Laboratory of Agro-Bioengineering, College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang, 550025, P.R.China

2. Guizhou Tongren flue-cured tobacco limited liability company, Tongren, 554300, P.R.China

3. Guizhou Key Laboratory of Green Pesticide and Agricultural Biological Engineering, Ministry of Education, Guiyang, 550025, P.R.China

✉ Corresponding author, [degangzhao@yahoo.com](mailto:degangzhao@yahoo.com); ✉ Authors

**Abstract** In this research we transformed calli of two elite germplasm, Taipei 309 and Nipponbare, derived from mature embryos using the construct of pCAMBIA0390 mediated by *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105. The expression plasmid pCAMBIA0390 was constructed with expressing elements of *ubi:bar-Gus* and *ACT:Bt*. Meanwhile We studied the effects of the factors on the regeneration rates of callus tissues. The results showed that the regeneration frequencies of Taipei 309 and Nipponbare increased up to 39% and 44% respectively, under the procedures as following: Callus was cultured 21 days in the conditions of, 28℃, 2000 Lx, and 13 h/d illumination period. Infected callus air-dried 20 minutes and then co-cultured callus air-dried 20 minutes, finally, the callus desiccated using sterile filter paper of callus 8 hours. It shows that transformation cycle can shortened from 105 days to 60 days in absences of subculture stage. The *GUS* expression and PCR analysis indicated that the exogenous *Bt* gene has been integrated into the rice genome.

**Keywords** Rice; Mature embryos; Rapid regeneration; Transformation mediated by *Agrobacterium*

### 研究背景

水稻(*Oryza sativa* L.)是最重要的谷类作物, 中国是世界上最大的生产国。2009年11月27日, 中国农业部(MOA)对两个转基因水稻品种恢复系 Bt Hua hui 1 和杂交水稻系 Bt Shan you-63 颁发了转基因生物安全证书, 表明了转基因水稻在我国生产试验的

开始(Clive, 2010)。

对于较早农杆菌介导法转化粳稻愈伤组织的报道见于1994年, 由Hiei等完成。2006年, Seiichi Toki等使用日本晴成熟胚在愈伤诱导培养基中只培养1 d后就使用农杆菌浸染, 最终, 30余天就获得了转基因植株。在国内, 苏益等(2008年)也使用同样

的方法在40 d左右就得到了阳性T<sub>0</sub>代水稻植株。他们的研究证明了农杆菌介导的水稻快速遗传转化方法是可行的。

在农杆菌介导水稻遗传转化的操作中，良好的愈伤组织状态一直是影响遗传转化效率的关键因素之一。围绕这一因素，研究者们研究了胚乳量、光照培养、干燥方式等对愈伤组织分化率的影响，本研究综合了前人的一些研究工作，加入了单蒸水浸泡成熟胚、去除胚乳(林拥军等, 1996)、光照培养(段承俐等, 2005)、干燥处理方式(Masayoshi et al., 1992)、去除继代培养(Seiichi Toki, 2006)，目的旨在根癌农杆菌介导水稻成熟胚愈伤组织的转化过程中提高愈伤组织诱导率与分化率，并最终在较短时间内获得水稻转化植株。

## 1 结果与分析

### 1.1 光照培养、暗培养对愈伤组织分化率的影响

光照培养和暗培养的愈伤分化率如图1所示，两个品种在光照培养和暗培养条件下愈伤分化率的差异极显著(<0.01)，说明光照培养对愈伤组织分化率具有促进作用。实验中发现，约3周的暗培养后，两品种的愈伤组织色泽普遍较暗，很少有颗粒状、表面干燥愈伤出现。并且，愈伤分化率较低，约为18%和21%。在3周的光照培养后，生长出的愈伤组织从色泽、大小等均表现为较整齐的状态。

### 1.2 干燥处理对愈伤组织分化率的影响

梗稻愈伤组织经过适当脱水处理能促进植株

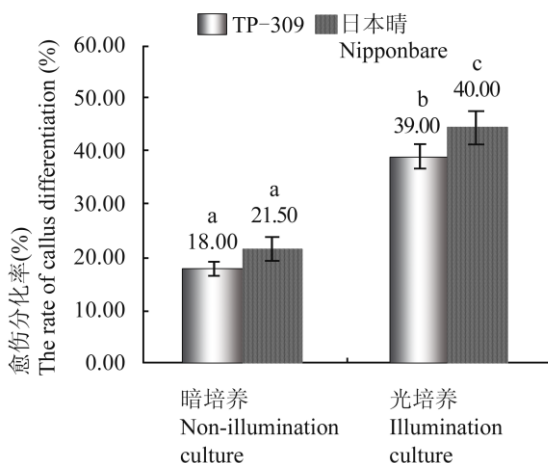


图1 暗培养与光培养对愈伤组织分化率的影响  
Figure 1 Effect of different light culture conditions on the rate of callus differentiation

再生(Masayoshi, 1992)。侵染过后，愈伤组织的含水量较高，之后愈伤组织易褐化，导致分化率降低。而分化率是直接影响整个体系转化率的因素之一。所以，尽可能提高愈伤组织的分化率就显得十分必要。实验以固定干燥时间，探寻侵染后与共培养后干燥处理对愈伤组织分化率的影响。经过干燥处理后的愈伤组织分化率如图2所示。进行多重比较得知，台北309和日本晴的愈伤组织分化率在四种处理方式间差异显著。而在侵染后和共培养后都经过干燥处理能获得较高的愈伤分化率(图3)。

### 1.3 水稻抗性植株的GUS组织化学染色和基因组PCR检测

对水稻抗性植株的叶片及根进行GUS组织化学染色检测，发现叶片与根均出现明显蓝色，而对照无任何蓝色斑点出现(图4)。在约370株抗性植株中选取其中一株转化水稻植株DNA为模板进行PCR扩增，得到一条约875 bp的条带，与目标条带大小一致，而非转基因对照植株没有扩增出此条带(图5)。

## 2 讨论

对于水稻遗传转化，理想转化材料是幼胚，但获取幼胚受季节、地域、操作耗时和设施等影响较大。而成熟胚有来源不受限制、操作简便的优点。因此，在水稻遗传转化中使用较为普遍。

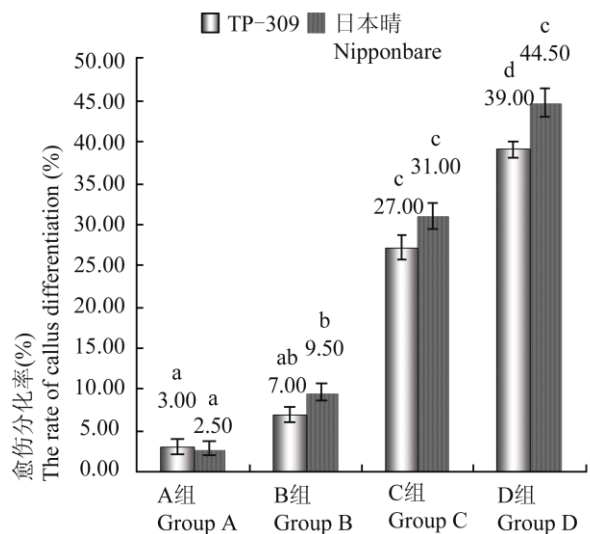


图2 干燥处理对愈伤组织分化率的影响  
Figure 2 Effect of dehydration treatment on the rate of callus differentiation

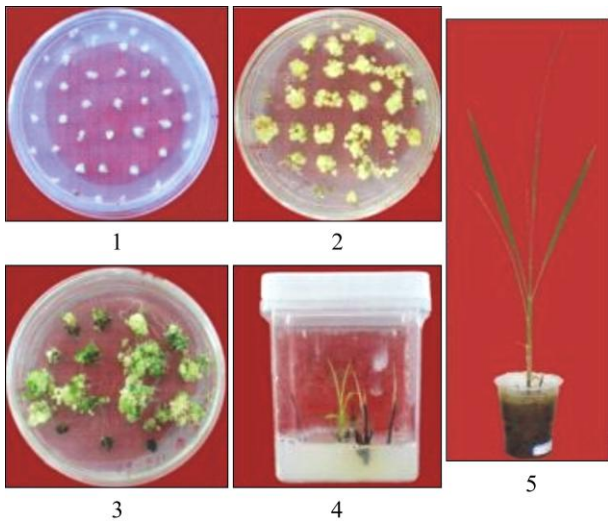


图3 除草剂筛选愈伤组织和植株再生  
注: 1: 稻成熟胚的愈伤组织; 2: 21天光照培养后的愈伤组织; 3: 除草剂筛选分化中的愈伤组织; 4: 抗性苗生根; 5: 再生抗性苗  
Figure 3 Selection of phosphinothricin-resistant callus and plant regeneration  
Note: 1: Callus induced from rice mature embryo; 2: The callus cultured after 21days light culture; 3: The callus screened by PPT resistance; 4: The rooting plant with PPT-resistance; 5: regeneration of PPT-resistant plants

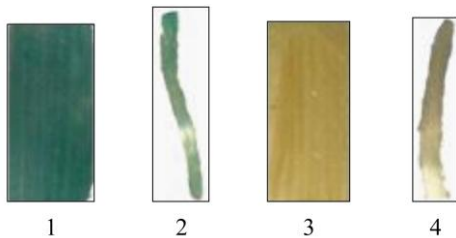


图4 转基因植株的GUS组织化学检测  
注: 1: 转化植株叶片; 2: 转化植株根部; 3: 非转化植株叶片; 4: 非转化植株根部  
Figure 4 GUS active transgenic plant by histochemical staining  
Note: 1: GUS active transgenic leaf; 2: GUS active transgenic root; 3: Negative control of untransformed leaf; 4: Negative control of the untransformed root

关于使用单蒸水浸泡和去除胚乳处理, 林拥军等(1996)认为水稻成熟种子内部具有一套休眠的具缓冲作用的调节系统。去除水稻成熟种子的胚乳部分, 则打破了该系统的稳定缓冲能力, 进而吸收培养基中大量生长素, 促使其系统内各细胞脱分化为愈伤组织。使用单蒸水浸泡, 可能是促进成熟种子

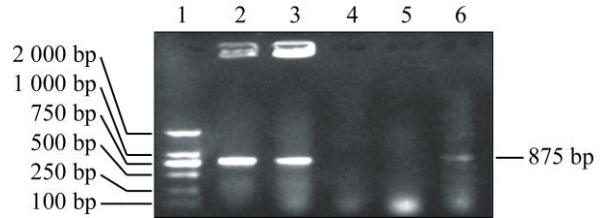


图5 转基因植株的PCR检测  
注: 1: DL2000 marker; 2-3: 质粒pCAMBIA0390; 4: 空白对照(ddH<sub>2</sub>O); 5: 非转化植株; 6: 转化植株  
Figure 5 The transgenic plant identified by PCR  
Note: 1: DL2000 marker; 2-3: Plasmid pCAMBIA0390; 4: Blank (ddH<sub>2</sub>O); 5: The non-transformed control; 6: Transgenic plant

系统内各细胞从原有的休眠状态恢复到积极的分化状态。另外, 笔者认为也有可能是使用升汞消毒后汞对外植体造成了一定的毒害, 到后期会影响外植体的愈伤诱导, 使用单蒸水浸泡和去除胚乳处理后, 外植体的毒害程度降低, 愈伤诱导率得到了提高。

分化前的光照培养是提高愈伤组织分化率的方法之一(段承俐等, 2001)。本实验的遗传转化过程中除去了继代步骤, 而且研究也发现愈伤组织经过继代会降低其分化率。最终结果证明除去继代步骤在短时间内也可获得转化植株。侵染前愈伤组织最好选取颜色鲜黄、呈颗粒状、表面干燥的胚性愈伤组织, 并且培养皿内已有个别愈伤产生了绿点。这样的愈伤组织胚性很好, 很易分化。

饥饿处理和轻微失水等干燥处理有利于愈伤组织分化(鲁玉柱等, 2008; Masayoshi et al., 1992), 该过程中可能引起了愈伤细胞的一些生理、生化变化, 促进对外源激素的吸收。采用在超净工作台内风干时间不宜过长, 应根据愈伤组织状态而定, 时间最好控制在30分钟以内, 因为在此环境中愈伤的脱水速度很快, 时间稍长, 绝大部分愈伤就会因失水死亡。另外, 有报道显示, 在培养基的内部形成高渗环境也能对水稻愈伤组织进行有效的干燥。比如, 通过提高培养基琼脂糖浓度、加入一定浓度的甘露醇、山梨糖醇等。

本研究使用的选择标记Bar基因来自土壤吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*), 编码膦丝菌素乙酰转移酶(Phosp-hoinothricin), 乙酰转移酶在植物的氮代谢过程中抑制谷氨酰胺合成酶的活性, 破坏植物的光合作用, 导致植物氨积累, 最终中毒死亡(赵



彬等, 1999), 而谷氨酰胺(Gln)会抑制乙酰转移酶的作用方式。所以, 在筛选培养基中谷氨酰胺应当除去。筛选阶段选择在绝大部分愈伤出现绿点后筛选。

大学转基因植物试验示范基地温室中。植物培养基根据文献报道进行部分改动(林拥军等, 2008; 向阳等, 2004; 余婧等, 2008)。改动为重悬液加入了36 g/L的葡萄糖, 灭菌方式为: 高温高压121℃, 15分钟(表1)。

### 3材料与方法

#### 3.1植物及细菌培养基

实验所用材料台北309和日本晴均种植于贵州

表 1 培养基成分

Table 1 The composition of culture medium used in this study

培养基名称 The name of medium	培养基组分及含量 The composition of medium
愈伤组织 Callus induction	NB (N <sub>6</sub> macro+B <sub>5</sub> micro+B <sub>5</sub> vitamine)+CH; 300 mg/L+Pro; 500 mg/L+Gln; 500 mg/L+2,4-D; 2 mg/L+sucrose; 30 g/L+Agar; 8 g/L, pH: 5.8
共培养 co-culture	NB+CH; 300 mg/L+Pro; 500 mg/L+Gln; 500 mg/L+2,4-D; 2 mg/L+AS; 100 umol/L+sucrose; 65 g/L+Agar; 8 g/L, pH: 5.2
脱菌 Sterilization	NB+CH; 300 mg/L+Pro; 500 mg/L+Gln; 500 mg/L+2,4-D; 2 mg/L+Timentin; 300 mg/L+sucrose; 30 g/L+Agar; 8 g/L, pH: 5.8
筛选 Selection	NB+6-BA; 2 mg/L+KT; 0.5 mg/L+NAA; 0.5 mg/L+Timentin; 300 mg/L+PPT; 4 mg/L+sucrose; 30 g/L+Agar; 8 g/L, pH: 5.8
分化 Differentiation	NB+CH; 300 mg/L+Pro; 500 mg/L+Gln; 500 mg/L+6-BA; 2 mg/L+KT; 0.5 mg/L+NAA; 0.5 mg/L+Timentin; 300 mg/L+sucrose; 30 g/L+Agar; 8g/L, pH: 5.8
生根 Rooting	1/2MS+ NAA; 0.5 mg/L+sucrose; 30 g/L+Cef; 150 mg/L+Agar; 8 g/L, pH: 5.8
重悬液 Resuspension liquid	NB+CH; 300 mg/L+Pro; 500 mg/L+Gln; 500 mg/L+2,4-D; 2 mg/L+AS; 100 umol/L+sucrose; 68.5 g/L+glucose; 36 g/L+Agar; 8 g/L, pH: 5.2
YEP	Peptone; 5 g/L+Yeast extract; 10 g/L+Nacl; 5 g/L+Km ;50 mg/L+Rif; 100 mg/L, pH: 7.2

#### 3.2农杆菌菌株、质粒

单子叶植物表达质粒pCAMBIA0390的T-DNA区含玉米泛素启动子*Ubi1*启动筛选报告融合基因*Bar::GUS*。水稻肌动蛋白启动子*Actin1*驱动的*Bt*功能基因和终止子序列*nos*。LF分别为重组酶Cre和Flp的识别位点*loxP*和*frt*, 该位点可被FLP识别, 并将其间的外源基因定点删除(赵德刚等, 2008; 罗克明等, 2005)。其T-DNA区域见图6。

#### 3.3外植体的获得和愈伤组织诱导

实验采用台北309、日本晴成熟胚作为愈伤组织诱导的外植体。将成熟种子去掉颖壳, 除去色泽不正常的种子, 消毒处理方法为75%酒精消毒1 min, 0.1% HgCl<sub>2</sub>消毒10 min, 之后单蒸水冲洗5至6次。

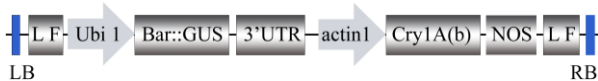


图6 质粒pCAMBIA0390的T-DNA区结构

Figure 6 The T-DNA Region of plasmid pCAMBIA0390

外植体消毒后使用无菌单蒸水浸泡8-12小时, 然后切除胚乳, 接种于愈伤诱导培养基上。浸泡时单蒸水与外植体体积比约为4: 1 (每次处理50个水稻外植体, 一共处理250个, 除去污染愈伤组织, 只统计200个水稻外植体的愈伤诱导率, 愈伤诱导率(%)=出愈胚数/接种幼胚数×100%)。

#### 3.4光照培养条件

28℃暗培养, 约3至4天长出芽, 用解剖刀将芽完全切去, 再将成熟胚接至愈伤组织诱导培养基, 然后采用下面方式处理: (1)28℃、21 d的光照培养, 光照强度为2000 lux, 13 h/d。 (2)28℃、21 d的暗培养(每次处理50个愈伤组织, 一共处理250个, 除去污染愈伤组织, 只统计200个愈伤组织的分化率, 愈伤分化率(%)=长出芽的愈伤数/愈伤组织总数×100%)。

#### 3.5愈伤组织饥饿处理及侵染

在侵染开始前, 将愈伤组织进行饥饿处理(鲁玉

柱等, 2008)。将经过饥饿处理的愈伤组织置于农杆菌菌液中( $OD_{600} \approx 0.4$ )侵染15 min, 侵染完后倒出愈伤组织并用干燥无菌纸吸去多余菌液。

### 3.6 侵染后与共培养后干燥处理

侵染后对愈伤组织进行如下处理: A组: 不经过干燥处理, 直接进行共培养, 然后进行分化培养。B组: 侵染后进行干燥处理。干燥处理方式: 在超净工作台内, 将愈伤组织置于吸水纸上风干20分钟。共培养时在共培养基上垫一张滤纸, 再将愈伤组织置于滤纸上(Hamid Rashid et al., 1996), 28℃暗培养3 d。共培养后使用甘露醇溶液冲洗4-5次至清亮(甘露醇0.1 mol/L, 内含头孢噻肟钠 Cef 300 mg/L)。共培养后对愈伤组织进行如下处理: C组: 对侵染后未经干燥处理的愈伤组织进行干燥处理。D组: 对侵染后经干燥处理的愈伤组织进行干燥处理。干燥处理方式: 风干20分钟, 再将愈伤组织置于垫有2层吸水纸的培养皿中, 光照条件下干燥8小时(每次处理50个愈伤组织, 一共处理250个, 除去污染愈伤组织, 只统计200个愈伤组织的分化率, 愈伤分化率(%)=长出芽的愈伤数/愈伤组织总数×100%)。

### 3.7 愈伤组织分化及抗性植株的获得

将共培养后的愈伤组织接至分化培养基上进行约7 d的分化。光照条件为2 000 lux、13 h/d, 温度26℃。然后进入约14 d的筛选分化, 将获得的抗性苗转移至生根培养基中。约14 d后, 将根系发育良好的再生水稻植株炼苗、移栽。

### 3.8 转基因水稻的GUS组织化学检测

具体方法参照Jefferson方法(1987)所述。

### 3.9 基因组PCR检测

提取除草剂抗性水稻植株的基因组DNA (TIANGEN公司的植物基因组提取试剂盒提取)。根据*UbiI*启动子序列, 设计合成一对引物, 上游引物序列为: 5'-CATCTCTGTCGCTGCCTCTG-3'; 下游引物序列为: 3'-CTGAAGTCCAGCTGCCAGAA-5'。PCR反应体系为25  $\mu$ l, 上下游引物各1.5  $\mu$ l, 2  $\mu$ l Template DNA, 2.5  $\mu$ l 10×*EX Taq* Buffer, 4  $\mu$ l dNTPs (2.5 mmol/L,  $Mg^{2+}$  plus), 0.15  $\mu$ l *TaKaRa EX Taq* DNA聚合酶, 11.35  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O。PCR扩增程序为: 94℃

变性2分钟, 94℃ 30秒, 55℃ 40秒, 72℃ 40秒, 35个循环; 72℃延伸3分钟, 4℃保存。用1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

### 3.10 统计分析

实验数据使用统计软件SPSS 13.0作差异显著性分析, 采用LSD法作多重比较分析。

### 作者贡献

赵德刚是项目的构思者及负责人, 指导实验设计和论文写作与修改。郭刚参与本研究实验设计、实验研究、数据分析、论文初稿的写作和试验结果分析。余靖参与完成研究中载体设计。试验植物材料来源于贵州省农业生物工程重点实验室。全体作者都阅读并同意最终的文本。

### 致谢

本研究由科技部国际科技合作项目: 基因删除技术在转基因水稻和油菜上的应用及安全性评价(项目编号: 2007DFA31260); 科技部国家科技支撑计划项目: 喀斯特山区特有作物优异基因资源发掘与转基因安全关键技术研究与应用(项目编号: 2007BAD59B06); 科技部国家科技支撑计划项目: 国家转基因新品种培育重大专项-安全转基因技术研究(项目编号: 2008ZX08010-003)资助。

### 参考文献

- Cao M.X., Wei Z.M., and Huang J.Q., 2002, Progress on Transformation of Rice Mediated by *Agrobacterium Tumefaciens*, *Zhiwu Shenglixue Tongxun* (Plant Physiology Communications), 38(5): 423-427 (曹明霞, 卫志明, 黄健秋, 2002, 根瘤农杆菌介导的水稻遗传转化, 植物生理学通讯, 38(5): 423-427)
- Clive J., 2010, Global Status of Commercialized Biotech/ GM Crops: 2009, *Zhongguo Shengwu Gongcheng Zazhi* (China Biotechnology), 30(2): 1-22 (clive james, 2010, 2009年全球生物技术 / 转基因作物商业化发展态势—第一个十四年 1996-2009, 中国生物工程杂志, 30(2): 1-22)
- Duan C.L., Xiao F.H., Carl R., and Lan G., 2001, Establishment of tissue culture system for the transformation of paddy rice via *Agrobacterium*, *Xinan Nongye Daxue Xuebao* (Journal of Southwest Agricultural University), 23(6): 528-531 (段承俐, 萧凤回, Carl Rathus, Ian Godwin, 2001, 农杆菌介导转化为目的的水稻组培体系的建立, 西南农业大学学报, 23(6): 528-531)
- He C.X., and Xia G.M., 1999, Recent Advances in Gene Transformation of Monocotyledons Mediated by *Agrobacterium Tumefaciens*, *Zhiwuxue Tongbao* (Chinese

- Bulletin of Botany), 16(5): 567-573 (贺晨霞, 夏光敏, 1999, 农杆菌介导单子叶植物基因转化研究进展, 植物学通报, 16(5): 567-573)
- Hiei Y., Ohta S., and Komari T., 1994, Efficient transformation of rice mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA, *Plant J.*, 6(2): 271-282
- Jefferson R.A., 1987, A ssaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system, *Plant Molecular Biology Report*, 6: 387-405
- Lin Y.J., Chen H., Cao Y.L., Wu C.Y., Wen J., Li Y.F., and Hua H.X., 2002, Establishment of high-efficiency *Agrobacterium*-mediated genetic transformation system of mudanjiang 8, *Zuowu Xuebao* (*Acta Agronomica Sinica*), 28(3): 294-300 (林拥军, 陈浩, 曹应龙, 吴昌银, 文静, 李亚芳, 华红霞, 2002, 农杆菌介导的牡丹江8号高效转基因体系的建立, 作物学报, 28(3): 294-300)
- Lin Y.J., Zou Y.L., Wan H., Lv Q., and Li J.Z., 1996, The effect of endosperm on the mature rice seeds cultured in vitro, *Jian-gxi Nongye Daxue Xuebao* (*Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*), 18(3): 259-263 (林拥军, 邹玉兰, 万骅, 吕琴, 黎洁珍, 1996, 水稻成熟胚组培过程中胚乳影响的研究, 江西农业大学学报, 18(3): 259-263)
- Lu Y.Z., Feng Z., Bian L.Y., and Liang J.S., 2008, Optimization in rice transformation system and regeneration of transgenic plants with *os-miR 398* gene, *Xibei Zhiwu Xuebao* (*Acta Bot.Boreal.-Occident.Sin.*), 28(12): 2552-2557 (鲁玉柱, 封振, 边黎英, 梁建生, 2008, 水稻转化体系的改进及转 $os-miR 398$ 基因植株的获得, 西北植物学报, 28(12): 2552-2557)
- Luo K.M., Zhao D.G., Li Y., and Pei Y., 2005, The application of a novel recombination system for removing foreign genes from transgenic plants, *Gaojishu Tongxun* (*High Technology Letters*), 15(7): 61-66 (罗克明, 赵德刚, Li Yi, 裴炎, 2005, 一个新的重组酶系统在转基因植物外源基因删除中的应用, 高技术通讯, 15(7): 61-66)
- Masayoshi T., and Takayasu H., 1992, Simple dehydration treatment promotes plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L) callus, *Plant Cell Rep*, 11: 550-553
- Rashid H., Yokoi S., Toriyama K., and Hinata K., 1996, Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in *indica* rice, *Plant Cell Rep.*, 15: 727-730
- Seiichi T., Naho H., Kazuko O., Haruko O., Akemi T., Seibi O., and Hiroshi T., 2006, Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice, *The Plant Journal*, 47, 969-976
- Su Y., Huang S.J., Lin W.H., and Xiao L.T., 2008, Study of rice high-speed transformation by *Agrobacterium* Infecting, *Zhongguo Nongxue Tongbao* (*Chinese Agricultural Science Bulletin*), 24(5): 83-86 (苏益, 黄善金, 蔺万煌, 萧浪涛, 2008, 根癌农杆菌介导的水稻快速转化方法研究, 中国农学通报, 24(5): 83-86)
- Xiang Y., Zhao D.G., Zhu D.X., and Yu X.Q., 2004, Callus induction and adventitious buds differentiation from mature embryos in *indica* rice, *Shandi Nongye Shengwu Xuebao* (*Journal of Mountain Agriculture and Biology*), 23(3): 193-197 (向阳, 赵德刚, 朱冬雪, 余显权, 2004, 籼稻成熟胚愈伤组织诱导及不定芽分化, 山地农业生物学报, 23(3): 193-197)
- Yu J., Jiang J., Guo G., and Zhao D.G., 2008, Studies on the tissue culture and plant regeneration from mature embryos in black sticky rice, *Zhongzi(Seed)*, 27(11): 53-56 (余婧, 蒋杰, 郭刚, 赵德刚, 2008, 黑糯米成熟胚愈伤组织培养及植株再生研究, 种子, 27(11): 53-56)
- Zhao B., Ma B.J., and Xue Q.Z., 1999, Studies and utilization of Bar gene and its transgenic rice, *Zhajian Shuidao* (*Hybrid Rice*), 14(2): 1-2 (赵彬, 马伯军, 薛庆中, 1999, Bar基因及转Bar基因水稻的研究和利用, 杂交水稻, 14(2): 1-2)
- Zhao D.G., Lv L.T., He A.G., Luo K.M., Duan H., Zheng X.L., Deng W., Chen Y.Q., An X.M., and He M.Y., 2008, The GeneDeletor technology: principle and potential application in genetically engineered agriculture, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (*Molecular Plant Breeding*), 6(3): 413-418 (赵德刚, 吕立堂, 贺爱公, 罗克明, Hui Duan, 郑雪莲, 邓伟, 陈永勤, 安新民, 贺明阳, 2008, “外源基因清除”技术 (Gene-Deletor)原理、特点及其潜在应用前景, 分子植物育种, 6(3): 413-418)

 5<sup>th</sup>Publisher是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5<sup>th</sup>Publisher上发表论文, 任何人都可以免费在线阅读您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>