

· 综 述 ·

## 影响农杆菌介导的植物转基因的因素

张福丽, 李季平, 高 丹, 张慧芳, 李成伟\*

(周口师范学院 生命科学系 植物遗传与分子育种重点实验室, 中国河南 周口 466001)

**摘 要:** 农杆菌介导法是植物转基因研究中应用最多的方法, 具有转化成本低、效率高、可转移较长基因片段等特点. 多种因素影响此遗传转化过程中的转化率, 包括外植体类型、植物基因型、外植体的处理、菌株和质粒载体类型、预培养以及培养基成份等方面.

**关键词:** 农杆菌; 植物; 转基因; 转化率; 影响因素

中图分类号: Q812

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2011)05-0449-06

## Factors Influencing *Agrobacterium*-mediated Plant Transformation

ZHANG Fu-li, LI Ji-ping, GAO Dan, ZHANG Hui-fang, LI Cheng-wei\*

(Key Laboratory of Plant Genetics and Breeding, Department of Life Science, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466001, Henan, China)

**Abstract:** *Agrobacterium*-mediated technique is a kind of methods in transgenic research used mostly for plants, and having some advantages, such as the low transformation cost, the high efficiency, being able to transfer longer gene fragments. Many factors influence transformation efficiency in the transformation process, including explant type, plant genotype, explant processing, type of bacterial strain and plasmid carrier, preculture medium composition and so on.

**Key words:** *Agrobacterium*; plant; transgene; transformation efficiency; influencing factor

(*Life Science Research*, 2011, 15(5): 449~454)

植物基因工程研究始于 20 世纪 70 年代, 它是在体外定向重组的特定外源基因导入到受体植物内, 并能够稳定遗传, 使其获得新的遗传性状. 发展至今, 植物基因工程已成为植物遗传育种以及质量性状改良的有效途径之一. 在这个过程中, 用于遗传转化的方法很多, 但应用最多、最广泛的是农杆菌介导法, 此方法具有效率高、成本低、可转移较长基因片段等优点. 目前, 所得到转基因植株中有 85% 都是通过农杆菌介导法而得到的. 但是, 农杆菌介导的植物遗传转化中转化率仍然是一个需要解决的问题, 有一些理化和生理因素影响着转化率和 T-DNA 进入植物细胞, 主要有

菌株、质粒、组培环境、培养基、外植体类型以及植物基因型等. 不同的植物, 有利于 T-DNA 转移的条件是不同的<sup>[1]</sup>, 通过优化其中的某个或某些因素, 可以大大提高转化率. 本文就影响农杆菌介导遗传转化的因素进行了分析, 以期为提高农杆菌介导的植物转基因的转化率提供科学方法.

### 1 农杆菌的遗传转化机制

根癌农杆菌是一种革兰氏阴性土壤杆菌, 能够诱导大部分双子叶植物及部分单子叶植物产生冠瘿瘤, 其上的 Ti 质粒决定着肿瘤的诱导产生, 天然的 Ti 质粒上由 T-DNA 区、毒性区(Virulence

收稿日期: 2011-05-30; 修回日期: 2011-07-11

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项子任务项目(2008ZX08010-004)

作者简介: 张福丽 (1975-), 女, 河南项城人, 讲师, 博士, 主要从事植物遗传育种方面的研究, E-mail: zhangfl666@yahoo.com.cn; \* 通讯作者: 李成伟(1972-), 男, 河南民权人, 周口师范学院教授, 博士, 主要从事分子植物与病原菌互作方面的研究, E-mail: lichengwei@zknuedu.cn.

region, Vir 区)、Con 区及 Ori 区四部分组成. T-DNA 区两端为 25 bp 的左右边界重复序列. T-DNA 区内的生长素合成基因、细胞分裂素合成基因和冠瘿碱合成基因, 对冠瘿瘤的形成起着关键作用. 在转化的早期阶段会有大量的蛋白质参与, 涉及几个分子机制. 当植物受到伤害, 农杆菌与植物细胞相互识别后, 诱导 *Vir* 基因, *Vir* 基因编码的多肽类物质就会附着在 T-DNA 上, 促进 T-DNA 的转移和整合进植物染色体中, 同时保护 DNA 免受植物细胞中核酸酶的影响. T-DNA 区在 *Vir* 区蛋白的作用下, 分别在左右边界产生切口, 将 T-DNA 插入到植物的染色体中. *Vir* 区基因表达产物对整个转化过程起决定性作用. 已发现有 10 余种 *Vir* 区的基因表达产物参与 T-DNA 的转移<sup>[2]</sup>. Ti 质粒至少由 6 个能被信号分子诱导的操纵子组成, 这些信号分子主要是一些小的酚醛物质、特定种类的单糖等<sup>[3]</sup>. 农杆菌介导的植物转化以农杆菌与外植体相互识别和附着为开始, 以整合入基因组中的 T-DNA 得以表达为终止.

## 2 转化受体材料的影响

农杆菌介导的植物基因转化过程, 是农杆菌和受体植物相互作用的过程<sup>[4]</sup>, 这就要求受体对农杆菌的侵染比较敏感. 受体对转化的影响主要体现在植物基因型、外植体类型及外植体的处理等方面.

### 2.1 外植体类型对转化的影响

不同生理状况的外植体对农杆菌的敏感性不同. 大豆较幼嫩的愈伤较长期培养的愈伤对农杆菌敏感<sup>[5]</sup>. 这是因为一方面幼嫩的外植体具有较强的细胞分化能力, 对于双子叶植物, 这种能力对于 T-DNA 转移和整合是必须的<sup>[6]</sup>; 另一方面, 外植体的培养过程中会分泌一些抑制细胞分化的物质, 并使细胞结构发生变化, 这些都不利于农杆菌和植物细胞的相互作用. 外植体类型对转化的影响也表现在器官的不同上. 当分别用鹰嘴豆的胚轴、上胚轴和茎作为外植体进行转化时, 以上胚轴的转化率最高<sup>[7]</sup>. 另外, 外植体年龄也影响着农杆菌转化的成功与否. 一般认为, 幼嫩的生长旺盛的组织对农杆菌更敏感, 被感染后, 伤口附近的细胞较易脱分化形成较多的感受态细胞<sup>[8]</sup>. 在用意大利黑麦草的愈伤进行转化时, 9 日龄的愈伤表现了较高的转化率, 超过 9 d, 外植体在共培养后就会褐化和死亡<sup>[9]</sup>. 而有些植物则表现出

与之不同的现象, 用 7~50 d 的愈伤作为外植体时, 随着外植体年龄增长, *GUS* 基因的瞬时表达量增加<sup>[10]</sup>. 在外植体的年龄方面, 同一植物的不同品种对转化的影响仍有差异. 研究粳稻的遗传转化时, 来自成熟胚的胚性愈伤因具有高的细胞分化能力而被认为是农杆菌侵染时的最佳外植体<sup>[11]</sup>. 而对于籼稻而言, 新分离的非成熟胚是转化时的最佳外植体<sup>[12]</sup>. 也有人研究了外植体大小对转化效率的影响. 来自大豆非成熟胚的子叶节小于 4 mm 时, 选择过程中没有或有很少的胚胎发生, 7~8 mm 的外植体与 5~6 mm 的转化率最高, 当外植体大于 9 mm 时, 转化率最低, 这可能是因为来自较大外植体的感受态细胞对农杆菌、2, 4-D 和选择剂不敏感<sup>[13]</sup>.

### 2.2 植物基因型对转化的影响

虽然通过农杆菌介导法得到了大量的转基因植物, 但是农杆菌对不同基因型植物的侵染能力不同. 不同物种的植物对农杆菌的敏感性不同, 甚至同类植物的不同品种之间差别也很大. 有的物种(如烟草)转化效率可高达 90%, 而大多数物种(特别是一些主要农作物品种)的转化效率还普遍很低<sup>[14]</sup>. 基因型的特异性与植物细胞的生理特性有关, 这包括细胞受伤后的生理反应、细胞内源激素的浓度以及细胞结构等<sup>[7]</sup>. 在谷类作物的遗传转化中, 水稻的基因型依赖性最低, 目前为止已成功得到了包括 Japonica、Indica 和 Javonica 水稻在内的超过 40 个基因型的转化植株, 而在其它主要的谷类作物中, 仅有少数典型基因型得以成功转化<sup>[15]</sup>. 基因型的差别主要是因为植物体内抑制系统的存在阻止了植物对农杆菌的感受. 如在玉米幼苗根部分泌的主要有机物质 MDIBOA 抑制剂, 尤其抑制 *Vir* 基因的诱导表达<sup>[16]</sup>, 而农杆菌侵染这些不易转化的外植体的能力是由 *VirA* 决定的<sup>[17]</sup>. 植物感受到农杆菌和外源基因后, 就会启动自身的防御系统阻止转化的进程和外源基因的表达. 有研究表明, 拟南芥 *cep1* 突变体因本身表达与防御有关的基因, 对农杆菌的侵染较为顽固<sup>[18]</sup>. 农杆菌侵染后, 参与 T-DNA 整合的蛋白也影响着转化的成功与否. 如拟南芥 KU80 蛋白, KU80 突变体植株不宜于使 T-DNA 整合进植物体细胞, 而 KU80 过表达植株对农杆菌的侵染较敏感, 并使植物细胞保护 DNA 免受伤害的能力得以增强<sup>[19]</sup>; 拟南芥 VIP1 蛋白与寄主细胞的 H2A 组蛋白形成同聚物和相互作用的能力对肿瘤发生,

以致稳定的基因转化是必须的<sup>[20]</sup>。

### 2.3 外植体的处理对转化的影响

外植体的处理主要是指外植体的损伤处理、抗氧化及干燥等方面的处理。通常认为,植物外植体损伤处理后,可以提高转化效率。这主要是因为外植体受伤后,可以使农杆菌更易于接近植物细胞,或者是损伤刺激了诱导 *Vir* 基因表达的酚类物质(如乙酰丁香酮)的分泌<sup>[21]</sup>,并使细胞的转化能力增强<sup>[22]</sup>。实际中,对外植体作损伤预处理时,不同植物的外植体有不同的表现。人为制造伤口,可以使豌豆(*Lathyrus sativus* L.)的转化率达到36%,而没有受伤的外植体的转化率仅为8%<sup>[23]</sup>。有些植物受伤处理及伤害诱导的细胞分裂不是转化所必需的<sup>[24, 25]</sup>,未受伤的外植体转化率最高<sup>[26]</sup>。超声波处理可使受体材料表皮和深层造成微损伤。当把鹰嘴豆的外植体与农杆菌一起进行超声波处理后,可以提高转化率<sup>[27]</sup>。氧化作用也影响植物的转化率。当把花生的胚轴在转化前用PVP(减少酚类化合物的氧化作用)和1/2MSi(1/2MS基本培养基中加入1g/L肌醇,不加糖)(去除外植体受伤后分泌的酚类化合物)溶液冲洗,用1/2MSi冲洗1h(分3次,每次20min)能提高转化率;当冲洗时间再延长时,转化率开始下降;不用冲洗处理时,得不到转化植株<sup>[28]</sup>。干燥和抗坏死处理影响T-DNA的转移和转化<sup>[29]</sup>。在农杆菌侵染之前或侵染之后是否将外植体进行干燥是影响谷类作物转化率的一个重要因素<sup>[30]</sup>。但是Perl等的研究表明,防止葡萄外植体坏死的各种抗氧化剂对转化率没有影响<sup>[31]</sup>。

## 3 外源因素对转化的影响

外源转化供体对植物转基因的影响主要体现在:农杆菌菌株类型、质粒载体类型、预培养和培养基成份等方面。

### 3.1 菌株和质粒载体类型对转化的影响

农杆菌侵染植物外植体时,农杆菌的吸附数目与菌株类型有关,同一菌株对不同种外植体的侵染能力也不同。农杆菌EHA101较C58能更好地促进外源基因进入植物细胞<sup>[32]</sup>。LBA4404适于豆科植物中的*Cajanus cajan*<sup>[33]</sup>、*Cicer arietinum*<sup>[34, 35]</sup>、*Lathyrus sativus*<sup>[36]</sup>,而EHA105在印度黄檀(*Dalbergia sissoo*)<sup>[37]</sup>、大豆(*Glycine max*)<sup>[38]</sup>和木豆(*Cajanus cajan*)<sup>[39]</sup>中的转化是有效的。在对花生和苹果的转化中,菌株EHA101较C58更能促进基因的转化<sup>[40, 41]</sup>。

载体质粒类型也对农杆菌介导的植物转化率

有影响。以鹰嘴豆ICCC37上胚轴为外植体,分别用载体质粒pB1121、pHS102和pHS101进行转化,其中以pHS102载体的转化率最高,其次是pB1121和pHS101<sup>[7]</sup>。转化水稻时,pRKJ108较pJ-DW53具有高的转化频率<sup>[42]</sup>,这可能是因为pR-KJ108具有MAR序列(matrix attachment regions),能够降低基因沉默和位置效应,提高低拷贝转化株的转化频率<sup>[43, 44]</sup>。

### 3.2 预培养对转化的影响

预培养是指在对外植体进行侵染之前,在含有外源激素的、适合外植体再生的培养基上培养一段时间。预培养对遗传转化有以下几方面的作用:一是促进细胞分裂,一般来说处于分裂状态的细胞更容易整合外源DNA,因而有可能提高外源基因的瞬时表达和转化率<sup>[45, 46]</sup>,同时可以减轻农杆菌对外植体的伤害<sup>[47]</sup>;另外还有利于侵染接种的外植体与培养基平整接触,以利于充分吸收营养和提高筛选效率<sup>[48, 49]</sup>。不同植物对预培养的反应不同。预培养可以提高木豆的转化率<sup>[50]</sup>。在花生的遗传转化中,外植体是否经过预培养对转化没有影响<sup>[51]</sup>。而有些植物进行转化时,经过预培养后,转化率反而会下降,不经预培养转化率最高<sup>[52]</sup>。这可能是由于经过预培养后,损伤得以愈合,而损伤诱导酚类物质(如:乙酰丁香酮)的产生,这些信号分子可以诱导*Vir*基因的表达和使T-DNA发生转移<sup>[6]</sup>。

### 3.3 培养基成份对转化的影响

农杆菌介导的植物转基因还受激素、培养基成份和培养条件的影响。降低预培养基中钙的含量可以促进农杆菌的侵染。Montoro等的研究发现,橡胶树愈伤组织在无CaCl<sub>2</sub>的培养基上预培养一段时间后,可以提高转化效率<sup>[53]</sup>。在固体培养阶段添加硝酸银以及用羧苄青霉素代替头孢噻肟钠可以提高Hi-II胚的转化率<sup>[54]</sup>。再生培养基中附加AgNO<sub>3</sub>可促进芽原基的产生和伸长;没有AgNO<sub>3</sub>时,芽原基逆向发育成非器官性的愈伤组织,从而难以分化成芽<sup>[55, 56]</sup>。当把培养未成熟胚的N6培养基换成MS培养基时,玉米自交系B104、B114和Ky21的转化率都得到了提高<sup>[57]</sup>。在共培养基中加入半胱氨酸可以提高大豆子叶节的转化率<sup>[58]</sup>。侵染培养基中添加表面活性剂(如:Tween-20、普朗尼克酸F-68)有利于农杆菌吸附在外植体的表面,易于T-DNA转移<sup>[59]</sup>,提高转化率。培养基中激素的种类和浓度也影响转化率。在对大豆的遗传

转化中, 毒莠定诱导的愈伤较用 2, 4-D 诱导的愈伤具有较高的 *GUS* 瞬时表达率<sup>[10]</sup>。用 2, 4-D 诱导愈伤或在共培养基中添加 2, 4-D 能提高水稻和小麦的转化率<sup>[1, 60]</sup>。但也有研究表明, 共培养基中因添加 2, 4-D 降低了水稻中 *GUS* 表达的比率<sup>[61]</sup>。对于培养基中激素的浓度而言, 高浓度激素诱导的愈伤更易于被农杆菌侵染。高浓度激素毒莠定诱导的香蒲愈伤较低浓度诱导的愈伤具有高的 *GUS* 表达率<sup>[10]</sup>。选择培养基中加入  $\text{AgNO}_3$  可以提高油菜的转化率<sup>[62]</sup>。

#### 4 结束语

农杆菌介导的植物转基因受多种因素的影响, 想要建立一个高效的遗传转化体系, 需要针对特定植物种类和特定组织, 从以上方面对各个因素进行优化, 以使农杆菌介导的转化方法在更多的植物中得以高效、成功地应用。

#### 参考文献(References):

- [1] WU H, SPARKS C, AOA H B, *et al.* Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat[J]. *Plant Cell Reports*, 2003, 21(7): 659-668.
- [2] MCCULLEN C A, BINNS A N. *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2006, 22(1): 101-127.
- [3] da la RIVA G A, CABRERA J G, PADRON R V. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation [J]. *European Journal of Biotechnology*, 1998, 1(3): 1-18.
- [4] BYRNE M C, MCDONNELL R E, WRIGHT M S, *et al.* Strain and cultivar specificity in the *Agrobacterium*-soybean interaction[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1987, 8(1): 3-15.
- [5] HONG H P, ZHANG H Y, OLHOFT P, *et al.* Organogenic callus as the target for plant regeneration and transformation via *Agrobacterium* in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) [J]. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2007, 43(6): 558-568.
- [6] ZAMOBRYSKI P C. Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1992, 43(1): 465-490.
- [7] INDURKER S, MISRA H S, EAPEN S. *Agrobacterium*-mediated transformation in chickpea (*Cicer Arietinum* L.) with an insecticidal protein gene: optimisation of different factors[J]. *Physiology and Molecular Biology Plants*, 2010, 16(3): 273-284.
- [8] 杨慧洁, 杨世海. 发根农杆菌介导的药用植物遗传转化研究[J]. *生物技术通报*(YANG Hui-jie, YANG Shi-hai. Study on genetic transformation of medicinal plants mediated by *Agrobacterium rhizogenes*[J]. *Biotechnology Bulletin*), 2009, (1): 16-21.
- [9] LEE K W, CHOI G J, KIM K Y, *et al.* Genotypic variation of *Agrobacterium*-mediated transformation of Italian ryegrass [J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2010, 13(3): 1-10.
- [10] NANDAKUMAR R, CHEN L, ROGERS S M D. Factors affecting the *Agrobacterium*-mediated transient transformation of the wetland monocot, *Typha latifolia*[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2004, 79(1): 31-38.
- [11] HIEI Y, KOMARI T, KUBO T. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, 35(1-2): 205-218.
- [12] ALDEMITA R R, HODGES T K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of japonica and indica rice varieties [J]. *Planta*, 1996, 199(4): 612-617.
- [13] KO T S, KORBAM S S. Enhancing the frequency of somatic embryogenesis following *Agrobacterium*-mediated transformation of immature cotyledons of soybean (*Glycine Max*(L.) Merrill.) [J]. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2004, 40(6): 552-558.
- [14] 邹智, 卢长明. 影响农杆菌介导遗传转化的植物因子研究进展[J]. *生物技术通报*(ZOU Zhi, LU Chang-ming. An overview of plant factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. *Biotechnology Bulletin*), 2008, (1): 1-9.
- [15] KARAMI O, EANA-ASARI M, KARIMIKURDISTANI G, *et al.* *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: the role of host[J]. *Biologia Plantarum*, 2009, 53(2): 201-212.
- [16] MARESH J, ZHANG J, LYNN D G. The innate immunity of maize and the dynamic chemical strategies regulating two-component signal transduction in *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *ACS Chemical Biology*, 2006, 1(3): 165-175.
- [17] HEATH J D, BOULTON M L, RAINERI D M, *et al.* Discrete regions of the sensor protein VirA determine the strain-specific ability of *Agrobacterium* to agroinfect maize[J]. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 1997, 10(2): 221-227.
- [18] ZHU Y, NAM J, CARPITA N C. *Agrobacterium*-mediated root transformation is inhibited by mutation of an *Arabidopsis* cellulose synthase-like gene[J]. *Plant Physiology*, 2003, 133(3): 1000-1010.
- [19] LI J X, VAIDYA M, WHITE C, *et al.* Involvement of KU80 in T-DNA integration in plant cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102(52): 19231-19236.
- [20] LI J X, KRICHEVSKY A, VAIDYA M, *et al.* Uncoupling of the functions of the *Arabidopsis* VIP1 protein in transient and stable plant genetic transformation by *Agrobacterium*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102(16): 5733-5738.
- [21] STACHEL S E, MESSENS E, MONTAGU M V, *et al.* Identification of signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Nature*, 1985, 318(6047): 624-629.
- [22] BINNS A N, THOMASHOW M F. Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1988, 42(1): 575-606.
- [23] BARIK D P, MOHAPATRA U, CHAND P K. Transgenic grasspea (*Lathyrus sativus* L.): Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration[J]. *Plant Cell Reports*, 2005, 24(9): 523-531.
- [24] MCGRANAHAN G H, LESLIE C A, URATSU S L, *et al.* *Agrobacterium*-mediated transformation of walnut somatic embryo and regeneration of transgenic plants[J]. *Nature Biotechnology*, 1988, 6(7): 800-804.

- [25] DUCROCQ C, SANGWAN S R, SANGWAN-NORREEL S B. Production of *Agrobacterium*-mediated transgenic fertile plants by direct somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Datura innoxia*[J]. Plant Molecular Biology, 1994, 25(6): 995-1009.
- [26] MONDAL T K, BHATTACHARYA A, AHUJA P S, et al. Transgenic tea [*Camellia sinensis* (L.) O Kuntze cv. Kangra-jat] plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos[J]. Plant Cell Reports, 2001, 20(8): 712-720.
- [27] SANYAL I, SINGH A K, KAUSHIK M, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) with *Bacillus thuringiensis cryIAc* gene for resistance against pod borer insect *Helicoverpa armigera*[J]. Plant Science, 2005, 168(4): 1135-1146.
- [28] EHNIN M, MORA A, PRAKASH C S. Factors enhancing *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer in peanut (*Arachis hypogaea* L.)[J]. In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 1998, 34(4): 310-318.
- [29] OPABODE J T. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency[J]. Biotechnology and Molecular Biology Review, 2006, 1(1): 12-20.
- [30] CHENG M, LOWE B A, SPENCER T M, et al. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species[J]. In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2004, 40(1): 31-45.
- [31] PERL A, LOLAN O, ABU-ABJED M, et al. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): the role of antioxidants during grape-*Agrobacterium* interactions[J]. Nature Biotechnology, 1996, 14(11): 624-628.
- [32] AKAMA K, SHIRAIISHI H, OHTA S, et al. Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana*: comparison of the efficiencies with various organs, plant ecotypes and *Agrobacterium* strains[J]. Plant Cell Reports, 1992, 12(1): 7-11.
- [33] SHRIVASTAVA D K, SANYAL I, SINGH B D, et al. Endogenous GUS-activities in *Cajanus cajan* L. and some grain legumes: selective suppression for expression of GUS reporter gene[J]. Journal of Plant Biology, 2001, 28(1): 243-250.
- [34] FONTANA G S, SANTINI L, CARETTO S, et al. Genetic transformation in the grain legume *Cicer arietinum* L. (Chickpea) [J]. Plant Cell Reports, 1993, 12(4): 194-198.
- [35] KAR S, JOHNSON T M, NAYAK P, et al. Efficient transgenic plant regeneration through *Agrobacterium*-mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.)[J]. Plant Cell Reports, 1996, 16(1-2): 32-37.
- [36] BARNA K S, MEHTA S L. Genetic transformation and somatic embryogenesis in *Lathyrus sativus*[J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 1995, 4(2): 67-71.
- [37] PRADHAN C. Plant regeneration from tissue and cell cultures and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Dalbergia* species[D]. Vanivihar, Bhubaneswar, Orissa, India: Utkal University, 2000.
- [38] HINCHEE M A W, CONNOR-WARD D V, NEWELL C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer[J]. Nature Biotechnology, 1998, 6(8): 912-922.
- [39] SINGH N D, SAHOO L, SONI A, et al. In vitro shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledonary node and leaf explants of pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Mills)[J]. Physiology Molecular Biology-Plant, 2002, 8(1): 113-140.
- [40] KENTLY A H, MOORE G A, DOOTSDAR H, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of peanut (*Arachis hypogaea*) embryo axes and the development of transgenic plants[J]. Plant Cell Reports, 1995, 14(11): 699-703.
- [41] BONDT A, EGGERMONT K, DRUART P, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps[J]. Plant Cell Reports, 1994, 13(10): 587-593.
- [42] KANT P, KANT S, JAIN R K, et al. *Agrobacterium*-mediated high frequency transformation in dwarf recalcitrant rice cultivars[J]. Biologia Plantarum, 2007, 51(1): 61-68.
- [43] HOLMES-DAVIS R, COMAI L. Nuclear matrix attachment regions and plant gene expression[J]. Trends in Plant Science, 1998, 3(3): 91-99.
- [44] ALLEN G C, SPIKER S, THOMPSON W F. Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing[J]. Plant Molecular Biology, 2000, 43(2-3): 361-376.
- [45] FEUILLET C, LAUVERGEAT V, DESWARTE C, et al. Tissue and cell specific expression of a cinnamyl alcohol dehydrogenase promoter in transgenic poplar plants[J]. Plant Molecular Biology, 1995, 27(4): 651-667.
- [46] BONDT A, EGGERMONT K, DRUART P, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps[J]. Plant Cell Reports, 1994, 13(10): 587-593.
- [47] FRARY A, EARLE E D. An examination of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato[J]. Plant Cell Reports, 1996, 16(3-4): 235-240.
- [48] SRISKANDARAJAH S, GOODWIN P. Conditioning promoters regeneration and transformation in apple leaf explants[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1998, 53(1): 1-11.
- [49] BONDT A, EGGERMONT K, DRUART P, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting regeneration of transgenic[J]. Plant Cell Reports, 1996, 15(7): 549-554.
- [50] GEETHA N, VENKATACHALAM P, LAXMI-SITA G. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) and development of transgenic plants via direct organogenesis[J]. Plant Biotechnology, 1999, 16(3): 213-218.
- [51] SHARMA K K, ANJIAH V. An efficient method for the production of transgenic plants of peanut (*Arachis hypogaea* L.) through *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation[J]. Plant Science, 2000, 159(1): 7-19.
- [52] JANSSEN B J, GARDNER R C. The use of transient GUS expression to develop an *Agrobacterium*-mediated gene transfer system for kiwifruit[J]. Plant Cell Reports, 1993, 13(1): 28-31.
- [53] MONTORO P, RATTANA W, PUJADE-RENAUD V, et al. Production of *Hevea brasiliensis* transgenic embryogenic callus lines by *Agrobacterium tumefaciens*: roles of calcium[J]. Plant

- Cell Reports, 2003, 21(11): 1095-1102.
- [54] ZHAO Z Y, GU W, CAI T, *et al.* High throughput genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in maize[J]. Molecular Breeding, 2001, 8(4): 323-333.
- [55] ROUSTAN J P, LATCHE A, FALLOT J. Inhibition of ethylene production and stimulation of carrot somatic embryogenesis by salicylic acid[J]. Biologic Plantarum, 1990, 32(4): 273-276.
- [56] RADKE S E, TURNER J C, FACCIOTTI D. Transformation and regeneration of *Brassica napus* using *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Plant Cell Reports, 1992, 11(10): 499-505.
- [57] FRAME B R, MCMURRAY J M, FONGER T M, *et al.* Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts[J]. Plant Cell Reports, 2006, 25(10): 1024-1034.
- [58] OLHOFT P, SOMERS D. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells[J]. Plant Cell Reports, 2001, 20(8): 706-711.
- [59] MANJU S, ADITI K C, SWATI J C, *et al.* Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of *Eleusine coracana*(L. ) Gaertn[J]. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 2011, 105(1): 93-104.
- [60] RASHID H, YOKOI S, TORIYAMA K, *et al.* Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in Indica rice[J]. Plant Cell Reports, 1996, 15(10): 727-730.
- [61] KHANNA H K, RAINA S K. *Agrobacterium*-mediated transformation of Indica rice cultivars using binary and superbinary vectors[J]. Australian Journal of Plant Physiology, 1999, 26(4): 311-324.
- [62] 林良斌, 官春云, 李恂, 等. 子房注射法与农杆菌介导法转化甘蓝型油菜的比较研究[J]. 生命科学研究(LIN Liang-bin, GUAN Chun-yun, LI Xun, *et al.* Comparative studies on the genetic transformation of *Brassica napus* by using *Agrobacterium*-mediated and ovary-injection technique[J]. Life Science Research), 2000, 4(3): 231-236.

## 《生命科学研究》2011年征稿征订启事

《生命科学研究》是由中华人民共和国新闻出版署、科技部批准创办的,国内外公开发行的反映生命科学领域中最新研究成果的综合性学术期刊。本刊是被中国科学引文数据库(CSCD)核心库及中国科技论文统计源期刊数据库全文收录的中国科技核心期刊,双月刊,国内公开刊号为CN43-1266Q,国际标准刊号为ISSN1007-7847, CODEN:SKYAFL。本刊主要刊登国内外生命科学领域中的具有创造性的学术论文及少量反映国内外重大进展或热点问题的快讯或综述性文章,覆盖的主要学科是:生物化学与分子生物学、发育生物学、细胞生物学、生物技术、遗传学、植物学、动物学、微生物学、解剖学、生理学、基因工程、农业工程、病理学、毒理学、药理学、免疫学、基础医学等等。开设“研究进展与综述”、“研究论文”等栏目。本刊诚邀反映国内外生命科学相关领域最新研究成果的中英文论文,国家自然科学基金等国家级科研课题资助论文将优先发表。

### 投稿要求:

1)文稿内容具有创新性、科学性或实用性。要求论点明确,条理清晰,设计合理,结果可靠,文字精炼,用词规范,图表清晰。文稿请用A4版型纸5号字体通栏排版,用字规范,计量单位符合国家标准。

2)请以word格式将稿件通过E-mail附件的方式发送至本刊编辑部电子信箱。在来稿的首页,请写明以下内容:文章标题、作者单位、作者个人信息(内容包括:姓名(出生年)、性别、民族、籍贯、职称、学位及研究方向)、作者详细通讯地址、邮编、手机号码、办公电话、传真号码及E-mail。

3)单位介绍信,加盖单位公章,注明无一稿两投,所有作者对署名的顺序无异议,请邮寄至本刊编辑部。

4)本刊稿件审稿费为80元(请在收到稿件回执后通过邮局汇款,并在留言栏注明第一作者姓名)。

### 通讯方式:

地 址:长沙市湖南师范大学《生命科学研究》编辑部,邮编:410081

投稿 E-mail: life@hunnu.edu.cn; smkxyj@gmail.com 咨询 E-mail: sky@hunnu.edu.cn

网 址: <http://smky.chinajournal.net.cn>

咨询电话: 0731-88872616; 传 真: 0731-88872616

《生命科学研究》承诺“特快通道”修回稿件3个月内出版,一般稿件修回后6个月内出版。热诚欢迎国内外各大专院校、科研院所生命科学相关领域的研究人员投稿。

《生命科学研究》2011年每册定价18元,全年108元。国内邮发代号:42-172,国外发行代号:DK43008。

**欢迎订阅! 欢迎投稿! 欢迎发布广告!**