

优化农杆菌介导的月季遗传转化系统的研究

高莉萍 包满珠

(园艺植物生物学教育部重点实验室, 华中农业大学园艺林学学院)

摘要: 为了建立月季品种‘萨蔓莎’根癌农杆菌介导的遗传转化系统, 我们通过衡量 GUS 基因瞬间表达水平, 探讨了各因子对基因转化的影响。结果表明: 外植体、光照条件、共培养培养基中无机盐含量及乙酰丁香酮(AS)含量是重要的影响因子; 共培养时间、共培养温度及农杆菌菌液浓度对根癌农杆菌的生长以至基因转化有重要影响。优化后的转化条件为: 将月季胚性愈伤组织与 OD_{600} 值为 0.5~0.8 的农杆菌菌液侵染 20 min, 然后在含 300 $\mu\text{mol/L}$ AS 并且无机盐减半的 MS 培养基上黑暗、23 $^{\circ}\text{C}$ 条件下共培养 3 d。

关键词: 根癌农杆菌, 月季, GUS 基因, 不定芽, 胚性愈伤组织, 瞬间表达

中图分类号: S685.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1522(2005)04-0060-05

GAO Li-ping; BAO Man-zhu. **Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Rosa hybrida*.** *Journal of Beijing Forestry University* (2005) 27(4) 60-64 [Ch., 22 ref.] Key Laboratory of Horticulture Biology, Ministry of Education, College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan, 430070, P. R. China.

To develop a transformation protocol of *Rosa hybrida* ‘Samantha’ via *Agrobacterium tumefaciens*, the authors examined the effect of different factors on T-DNA transfer by measuring transient expression levels of an intron-containing β -glucuronidase gene. The results indicate that explant, light condition, salt concentration and acetosyringone (AS) concentration in co-culture medium are the most important factors, and factors like co-culture temperature, co-culture period and bacteria density also have a important effect on the growth of bacteria and even T-DNA transfer. Optimized co-cultivation was performed by inoculation of embryogenic callus with bacteria at a density of $OD_{600}=0.5-0.8$ for 20 min and co-culture in darkness at 23 $^{\circ}\text{C}$ on medium with 1/2 MS salt and 300 $\mu\text{mol/L}$ AS for 3 d.

Key words *Agrobacterium tumefaciens*, *Rosa hybrida*, GUS gene, adventitious bud, embryogenic callus, transient expression

月季(*Rosa hybrida* L.)是世界上最重要的观赏植物之一, 现代月季是通过杂交育种和芽变选择得到的。尽管传统的育种方法仍将发挥重要作用, 但由于基因资源有限、缺乏纯系和由倍性和染色体数目差异造成的高度不亲和性, 传统方法存在着局限性^[1]。基因工程技术因能保持品种的其他性状相对稳定, 只在外源基因所控制的性状上发生改变, 并能利用来自其他生物类型的基因, 从而为月季品种改良提供了新途径。

高效的植株再生体系是遗传转化成功与否的重要前提条件。目前, 已有许多月季品种通过器官发生

和体细胞胚发生途径成功地获得再生植株^[1], 但关于月季遗传转化的报道还为数不多。除了 Van der Salm 等^[2]采用不定根作为转化受体外, 其他所有转化系统都采用了胚性愈伤组织^[3, 4]或体细胞胚^[5, 6]进行转化。月季植株经转化后在外源基因所控制的性状上发生了改变, 如月季砧木品种‘Moneyway’转化了 Rol 基因后, 其根的发育和未转化接穗腋芽的萌发都得到了促进^[2]; 转化了抗微生物蛋白基因的‘Heckenzauber’、‘Pariser Charme’^[5]和‘Carefree Beauty’^[7]植株对黑斑病的感染率大为下降; 含有几丁质酶基因的‘Glad Tiding’植株抗黑斑病的能力提

收稿日期: 2004-05-22

http://journal.bjfu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目(30170666)。

第一作者: 高莉萍, 博士生。主要研究方向: 观赏植物育种和生物技术。电话 027-87280285 Email: lilygao321@msn.com 地址: 430070 湖北武汉华中农业大学园艺林学学院。

高了13%~43%^[8]。

尽管 GUS^[3, 4] 和 GFP^[6] 报告基因以及可改变农业性状的基因^[2, 5, 7, 8] 已成功转入一些月季品种, 但关于优化农杆菌介导的遗传转化系统的研究还少见报道。此外, 月季直接器官发生途径的再生体系用于遗传转化少见报道, 所有的月季转基因植株都是通过体细胞胚途径再生获得的。本研究旨在利用月季直接器官发生和体细胞胚发生途径的再生体系进行农杆菌介导的遗传转化, 并通过检测 GUS 基因瞬间表达来评价转化的影响因子。

1 材料与方法

1.1 材料

月季‘萨蔓莎’可通过直接器官发生和体细胞胚发生两种途径再生植株。在直接器官发生途径中, 未展开的幼嫩小叶在诱导培养基(1/2 MS + 0.05 mg/L NAA + 1.5 mg/L TDZ + 10 mg/L AgNO₃) 诱导 8 d 后转入发枝培养基(MS + 0.01 mg/L NAA + 0.5 mg/L BAP + 0.1 mg/L GA₃) 培养, 约 2 周后小叶柄基部可再生不定芽^[9]。在体细胞胚发生途径中, 小叶外植体在含 10 mg/L 2, 4-D 的 MS 培养基上诱导愈伤, 15 d 后转入含 1.5 mg/L TDZ 的 MS 培养基, 约 20 d 后可见愈伤组织上有白色子叶状的初级体细胞胚形成。将此体胚继代在保持培养基(MS + 0.25 mg/L NAA + 1.5 mg/L ZT + 1.0 mg/L GA₃)^[10] 上, 经过近 1 年的选择获得颗粒状脆性的胚性愈伤组织。胚性愈伤组织在 TDZ 和 NAA 的诱导下可分化不定芽从而获得再生植株。除了不定芽的直接诱导和胚性愈伤组织的继代培养是在黑暗条件下进行外, 其他培养都是在 16 h/d 的光照条件下进行的, 培养温度为 25℃。根据月季‘萨蔓莎’以上的再生过程, 本研究的材料为其小叶和胚性愈伤组织。

1.2 农杆菌菌株和质粒

实验所用根癌农杆菌菌株为 EHA105, 它含有 pCAMBIA1301 质粒, 该质粒携带 GUS 报告基因和 HPT 选择基因, 其中 GUS 基因中含有一个内含子, 以确保其只在植物细胞中表达, 而不在农杆菌中表达。

1.3 根癌农杆菌的活化和工程菌液的制备

挑取单菌落在 YEB 固体培养基上划线, 然后在 28℃ 下倒置培养 1 d, 使农杆菌增殖。将菌体收集到含 100 μmol/L AS 的 AB 液体培养基中^[11], 220 r/min 振荡 2~3 h, 再将菌液 OD₆₀₀ 值调节到合适值后进行侵染。

1.4 转化条件的优化

小叶外植体侵染 20 min 后, 用无菌纸吸干多余菌液, 接种到添加 100 μmol/L AS 但无 AgNO₃ 的诱导

培养基中进行共培养。本研究试验了预培养天数(0~3 d)、菌液浓度(OD₆₀₀ = 0.2~1.0)、共培养天数(2~5 d)对转化的影响。

对于胚性愈伤组织, 侵染后在无菌纸上适当晾干接入不含 ZT 的保持培养基中共培养。本研究试验了共培养培养基中盐含量(MS 盐类或 1/2MS 盐类)、侵染时间(20 min 或 50 min)、共培养时的光照条件(16 h/d 光照或持续黑暗)、共培养培养基 pH 值(pH 为 5.5、5.8、6.2)、共培养培养基中 AS 浓度(0、50、100、200、300 μmol/L)、菌液浓度(OD₆₀₀ = 0.2、0.5、0.8、1.0)、共培养时间(2、3、4、5 d)和共培养温度(19、23、27℃)对遗传转化的影响。检测其中某个因素时, 其他因素采用括号中黑体字所表述的水平。

1.5 GUS 基因瞬间表达的检测

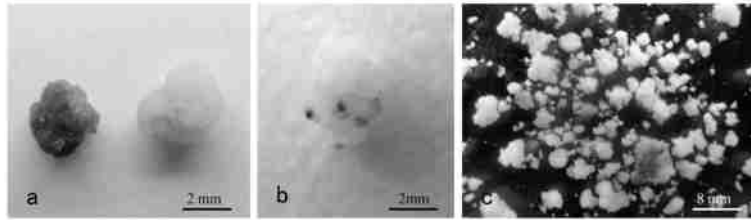
参照 Jefferson^[12] 的方法, 共培养结束后进行 GUS 基因瞬间表达的检测。37℃ 水浴保温过夜后, 胚性愈伤组织可直接观察, 小叶外植体需经 70% 乙醇浸泡数次脱去色素后观察。GUS 基因瞬间表达呈阳性者可肉眼观察到蓝色反应, 然后统计阳性表达率(有蓝色反应的外植体数/外植体总数)。

以上试验均设 3 次重复, 每次重复采用至少 10 片小叶或 700 mg 胚性愈伤组织。将百分数结果换算成正弦后用 ANOVA 进行统计分析, 最小显著性差异水平 $P=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 外植体类型对遗传转化的影响

在本研究中, 月季‘萨蔓莎’可通过叶片直接再生不定芽或通过胚性愈伤组织分化获得再生植株, 因此, 两种不同的外植体被用来进行遗传转化。小叶的植株再生率约为 40%, 但在各种不同转化条件下, 从试验的 5 893 片来自试管苗或田间苗的叶片中随机抽样进行 GUS 瞬间表达检测, 结果未发现任何呈阳性反应的小叶。虽然在含 5 mg/L 潮霉素的发枝培养基上, 一个月后选择获得了 73 个不定芽, 但继续选择培养, 不定芽叶片逐渐变褐并最终死亡, 未得到任何抗性植株。采用胚性愈伤组织进行转化时, 在第一次尝试中便得到 GUS 基因表达的阳性结果。在此后的试验中, 大小从直径 2 mm 块状到针尖点状的蓝色斑点重复出现(见图 1), 并通过转化条件的优化, 其表达率可达到 70% 以上。因此, 本研究结果表明, 转化受体是影响月季遗传转化的重要因子, 胚性愈伤组织相对于叶片具有更强的接受外源 DNA 的能力, 以下的试验都是以胚性愈伤组织为转化受体进行的。



a. 直径约 2 mm 的 GUS 阳性反应愈伤组织(左)和对照愈伤组织(右); b. 点状 GUS 阳性反应的愈伤组织;
c. 共培养 4 d 后胚性愈伤组织的 GUS 基因瞬间表达

图 1 月季‘萨蔓莎’胚性愈伤组织 GUS 基因瞬间表达染色反应

FIGURE 1 Histological assay of transient GUS gene expression in embryonic callus of *Rosa hybrida* ‘Samantha’

2.2 共培养培养基中盐浓度对遗传转化的影响

本研究比较了两种不同盐浓度的共培养培养基对遗传转化的影响,结果表明盐浓度减半可显著提高胚性愈伤组织的 GUS 瞬间表达率(见表 1),此试验独立重复了 3 次均得到相同的结果.我们发现根癌农杆菌 EHA105 在 MS 全盐含量的培养基上生长明显受到抑制,在 25℃ 下培养 6 d 后培养基上仍难见菌落,而在盐浓度减半的培养基上相同条件下培养 3 d 即可见到菌落.因此,我们认为共培养培养基中的高盐浓度对农杆菌生长有抑制作用,从而影响了 T-DNA 的转移效率.

表 1 不同转化条件对月季‘萨蔓莎’胚性愈伤组织遗传转化的影响

TABLE 1 Effects of different co-culture conditions on gene transfer in embryonic callus of *Rosa hybrida* ‘Samantha’

条件	水平	GUS 活性
培养基盐浓度	MS 盐类	1.97±0.02 _a
	1/2 MS 盐类	72.4±0.12 _b
侵染时间/min	20	72.4±0.12 _a
	50	73.5±0.03 _a
光照条件	16 h/8 h (光照/黑暗)	40.7±0.09 _a
	24 h (黑暗)	72.4±0.12 _b
培养基 pH 值	5.5	40.9±0.98 _a
	5.8	43.0±3.01 _a
	6.2	41.8±0.51 _a

注:字母 a、b 所示平均值有显著差异 ($P=0.05$).

2.3 侵染时间对遗传转化的影响

农杆菌侵染植物外植体首先是进行农杆菌细胞与植物细胞间的相互作用,足够的侵染时间有利于农杆菌充分吸附到植物外植体表面.一般农杆菌的侵染时间为 5 min 到 1 h 之间,本研究试验了 20 min 和 50 min 两个水平.结果表明,胚性愈伤组织在 2 种侵染时间下的 GUS 瞬间表达率没有显著差异(见表 1),因此 20 min 的侵染时间可以满足 OD 值为 0.5 以上菌液的月季愈伤组织的遗传转化.

2.4 共培养时光照条件对遗传转化的影响

我们比较了在持续黑暗条件下共培养和在每天 16 h 光照条件下共培养时胚性愈伤组织的 GUS 瞬间表达率.如表 1 中所示,在持续黑暗条件下共培养

可显著提高 GUS 瞬间表达率.月季‘萨蔓莎’的胚性愈伤组织是在黑暗条件下培养获得并继代增殖的,将其放到光下培养,愈伤组织生长不良.因此黑暗条件更适合月季‘萨蔓莎’的胚性愈伤组织生长,同时也更适合农杆菌介导的遗传转化.

2.5 共培养培养基的 pH 值对遗传转化的影响

在高压灭菌之前将共培养培养基的 pH 值调到 5.5、5.8 和 6.2,以了解酸碱度对转化的影响,两次独立重复试验均得到相同的结果.从表 1 中可知,尽管 GUS 瞬间表达率在 pH 值为 5.8 时最高,但在 3 个水平之间不存在显著差异.培养基的 pH 值对其凝固性影响很大,当 pH 值为 6.2 时,培养基很硬,而当 pH 值为 5.5 时,培养基几乎很难凝固.因此,我们选择 pH 值为 5.8 的培养基进行共培养.

2.6 共培养培养基中 AS 浓度对遗传转化的影响

AS 常常被加到农杆菌预培养或共培养培养基中用来诱导 vir 基因的表达,促进 T-DNA 转移到植物细胞.本研究结果表明共培养培养基中添加 AS 对保证 T-DNA 的转移非常必要,当加入 50~200 $\mu\text{mol/L}$ AS 时,GUS 瞬间表达率达到 31.8%~43%;当 AS 浓度达到 300 $\mu\text{mol/L}$ 时,GUS 瞬间表达率显著提高,达到 69.2%(如图 2).但如果继续提高 AS 的含量,出现了农杆菌的过量生长,对愈伤组织的生长非常不利.100 $\mu\text{mol/L}$ 是许多农杆菌介导的转化系统所采用的浓度,但本研究结果表明月季共培养培养基中添加 300 $\mu\text{mol/L}$ AS 能获得更好的转化效果.

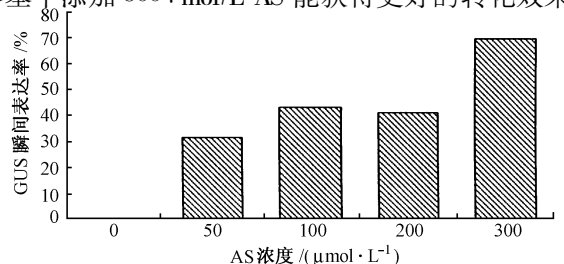


图 2 共培养培养基中 AS 浓度对月季胚性愈伤组织遗传转化的影响

FIGURE 2 Effect of AS concentration in co-culture medium on gene transfer in rose embryonic callus

2.7 菌液浓度、共培养温度和时间对遗传转化的影响

本研究试验了 19、23、27℃ 3 种共培养温度, 2~5 d 4 种共培养时间以及 OD 值为 0.2、0.5、0.8 和 1.0 共 4 种菌液浓度, 进行完全随机组合, 以了解这 3 个因素对 T-DNA 转化的影响. 统计分析结果表明共培养温度和共培养时间之间存在极显著相关性, 菌液浓度和共培养时间之间存在显著相关性, 菌液浓度与共培养温度之间不存在相关性. 如果将共培养温度为 19℃, 或菌液 OD 值为 0.2 或共培养时间为 2 d 中任何一个处理的数据排除在外, 各因素间的相关性则不复存在. 由图 3 还可看出, 3 因素中如果任何两个处于最低水平则只能获得非常低甚至不能获得 GUS 基因瞬间表达. 在一定范围内, 菌液浓度越高, 或共培养时间越长, 或共培养温度越高, T-DNA 的转移率越高. 但当菌液浓度 OD 值超过 0.8, 共培养温度超过 23℃, 并且共培养时间超过 3 d 时, 会导致农杆菌的过量生长, 使愈伤组织变褐坏死从而降低表达率. 此外, 我们还观察到, GUS 瞬间表达率越高, 愈伤组织中被染成块状蓝斑的比率也越高. 块状斑比点状斑意味着更多的植物细胞被转化, 或更强的 GUS 基因表达, 这对后期的抗生素选择更加有利. 可见, 在一定范围内提高这 3 因素的水平, 有利于农杆菌的生长和提高其侵染能力, 当农杆菌达到一定量时, 各因素的作用开始减弱, 而过多的农杆菌反而对外植体的生长不利. 因此, 为了取得良好的 T-DNA 转移效果, 对这 3 个因素进行优化是非常有必要的. 本研究结果表明, 月季‘萨蔓莎’胚性愈伤组织与 OD 值为 0.5~0.8 的农杆菌菌液侵染后, 在 23℃ 下共培养 3~4 d 最有利于 T-DNA 的转化.

3 讨论

Firoozabady 等^[3]报道月季‘Royalty’的茎段、叶柄、叶片和花器官都能被转化, 但转化后形成的愈伤组织无法再生. Li 等^[4]也试验了月季‘Carefree Beauty’的叶片、胚性愈伤组织和无分化能力的愈伤组织, 尽管 3 种外植体都能被转化, 但转化植株只能从胚性愈伤组织获得. 本研究结果表明月季‘萨蔓莎’小叶无法被转化, 这种差异可能与试验所采用的品种和再生体系不同有关. 小叶在黑暗诱导 8 d 后分化不定芽, 其间未有明显愈伤组织发生. Montoro 等^[13]认为脱分化过程是遗传转化所必须的, 月季小叶可能因缺乏脱分化过程和分裂细胞而无法被转化. 到目前为止, 月季叶片转化成功的例子还未见报道, 小叶直接再生途径可能不适合于农杆菌的遗传转化. 此外, 试管苗叶片小, 操作困难, 而胚性愈伤组织不仅接受外源基因的能力强, 并且一次可大量操

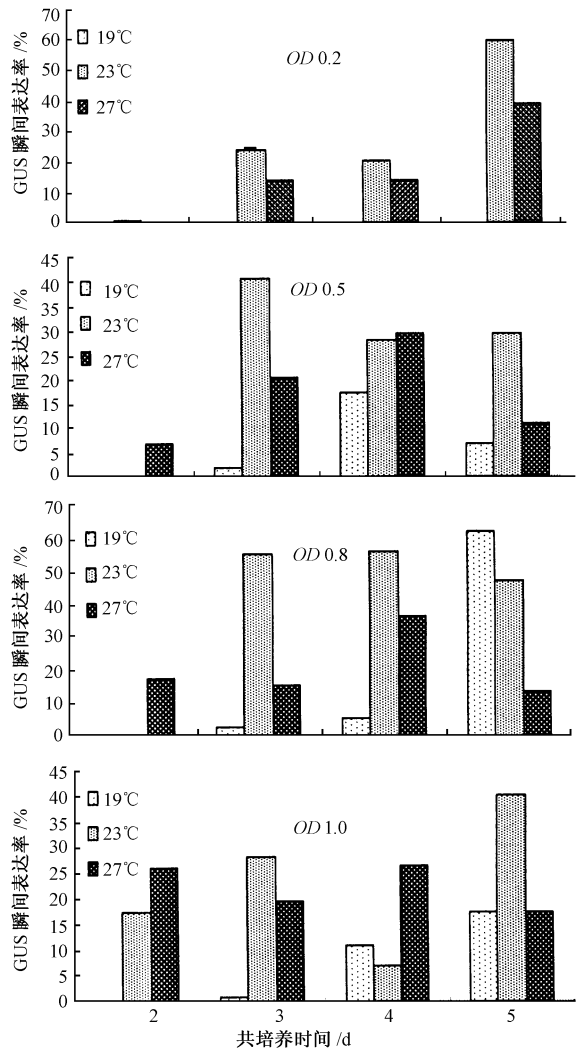


图3 菌液浓度、共培养温度和时间对月季胚性愈伤组织遗传转化的影响

FIGURE 3 Effects of cell density, co-culture temperature and period on gene transfer in rose embryogenic callus

作, 重复性好, 是理想的转化受体材料.

在双子叶植物中, Fry 等^[14]报道降低侵染液和共培养培养基中盐浓度有助于农杆菌介导的油菜 (*Brassica napus*) 遗传转化, 然而更多转化系统都采用了 MS 全盐含量的培养基. 在本研究中, 月季胚性愈伤组织在盐量减半的培养基上 GUS 瞬间表达率提高了 36 倍. 高盐浓度可能对农杆菌的生长不利, 我们曾将菌液滴到全盐和盐类减半的共培养培养基中培养, 结果前者农杆菌的生长受到明显抑制. 因此, 盐浓度过高可能通过抑制农杆菌的生长势和数量而降低了 T-DNA 导入植物细胞的效率.

光照和温度一般被认为是影响生物活动的重要因素. 在光照条件下, 菜豆属 *Phaseolus acutifolius* 植物的遗传转化得到明显促进, 而在黑暗中, 由于愈伤组织的生长受到严重影响, 几乎无法检测到 GUS 活性^[15]. 然而对大蒜 (*Allium sativum*) 而言, 黑暗或光照条件下对其遗传转化的影响没有显著差异^[16]. 本研

究的结果与前二者都不同,黑暗条件因适合愈伤组织的生长而更有利于月季胚性愈伤组织的转化。

在共培养培养基中添加 AS 被报道提高、不影响或降低转化效率。没有伤口的转化受体,如胚性愈伤,通常需要或需要高水平的 AS^[3, 13, 17];有伤口的外植体或本身酚类分泌物多的物种需要低水平或不需要外加 AS^[18, 19]。本研究结果表明,共培养培养基中添加 AS 为月季胚性愈伤组织转化所必需,AS 浓度在 50~200 $\mu\text{mol/L}$ 时可获得较为满意的 T-DNA 转化效果,300 $\mu\text{mol/L}$ 时的转化效率最高。酸性 pH 值通常被认为是农杆菌 vir 基因活化所必需的^[20],然而,本研究结果表明当 pH 值为 5.5~6.2 时,月季的遗传转化对培养基 pH 值的要求并不严格,这与 Becker 等^[21]的研究结果一致。

许多试验研究了共培养温度^[15, 16]、菌液浓度^[5, 15]和共培养时间^[5, 16]对 T-DNA 转化的影响,尽管最适的条件依据特定的外植体和菌株而不同,但一般认为共培养温度为 22~25 $^{\circ}\text{C}$,共培养 2~5 d,菌液浓度为 $OD_{600} = 0.5 \sim 1.0$ 是比较合适的。本研究得到与此一致的结果,并观察到这 3 个因素对农杆菌的生长势和生长量有重要影响,当农杆菌的生长达到一定量后各因素的影响减弱。

要高效获得转化植株有 3 个关键步骤:①T-DNA 高效转移到植物细胞,②T-DNA 整合到植物染色体并高效选择转化细胞,③从转化细胞高效再生植株^[22]。目前利用本研究优化的转化系统,在 70 mg/L 潮霉素的选择压力下已获得了稳定转化的愈伤组织,并且我们认为在 T-DNA 转移到植物细胞的这个步骤中,选择合适的外植体、诱导 vir 基因的表达,并寻找到农杆菌适量和过量生长间的平衡是非常重要的。

参 考 文 献

- [1] ROUT G R, SAMANTARAY S, MOTTLELY J, et al. Biotechnology of the rose: a review of recent progress[J]. *Scientia Horticulturae*, 1999, 81: 201-228.
- [2] Van der SALM T P M, Van der TOORN C J G, BOUWER R, et al. Production of Rol gene transformed plants of *Rosa hybrida* L. and characterization of their rooting ability[J]. *Molecular Breeding*, 1997, 3: 39-47.
- [3] FIROOZABADY E, MOY Y, COURTNEY-GUTTERSON N, et al. Regeneration of transgenic rose (*Rosa hybrida*) plants from embryogenic tissue[J]. *Bio/technology*, 1994, 12: 609-613.
- [4] LI X Q, KRASNYANSKI S F, KORBAN S S. Optimization of the uidA gene transfer into somatic embryos of rose via *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2002, 40: 453-459.
- [5] DOHM A, LUDWIG C, SCHILLING D, et al. Transformation of roses with genes for antifungal proteins[J]. *Acta Horticulturae*, 2001, 547: 27-34.
- [6] KIM C K, CHUNG J D, PARK S H, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Rosa hybrida* using the green fluorescent protein (GFP) gene[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2004, 78: 107-111.
- [7] LI X Q, GASIC K, CAMMUE B, et al. Transgenic rose lines harboring an antimicrobial protein gene, *Ace-AMP1*, demonstrate enhanced resistance to powdery mildew (*Sphaerotheca pannosa*)[J]. *Planta*, 2003, 218: 226-232.
- [8] MERCHANT R, DAVEY M R, LUCAS J A, et al. Expression of a chitinase transgene in rose (*Rosa hybrida* L.) reduces development of black disease (*Diplocarpon rosae* Wolf)[J]. *Molecular Breeding*, 1998, 4: 187-194.
- [9] DUBOIS L A M, de VRIES D P, KOOT A. Genetic variation of rose cultivars for direct shoot organogenesis[J]. *Acta Horticulturae*, 1997, 447: 79-83.
- [10] NORIEGA C, S NDAHL M R. Somatic embryogenesis in hybrid tea roses[J]. *Bio/technology*, 1991, 9: 991-993.
- [11] CHITON M D, CURRIER T C, FARRAND S K, et al. *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors[J]. *Proceedings of National Academy Sciences USA*, 1974, 19: 3 672-3 676.
- [12] JEFFERSON R A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system[J]. *Plant Mol Biol Repr*, 1987, 5: 387-405.
- [13] MONTORO P, TEINSEREE N, RATTANA W. Effect of exogenous calcium on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer in *Hevea brasiliensis* (rubber tree) friable calli[J]. *Plant Cell Reports*, 2000, 19: 851-855.
- [14] FRY J, BARNASON A, HORSH R B. Transformation of *Brassica napus* with *Agrobacterium tumefaciens* based vectors[J]. *Plant Cell Reports*, 1987, 6: 321-325.
- [15] De CLERCQ J, ZAMBER M, Van MONTAGU M, et al. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation procedure for *Phaseolus acutifolius* A. Gray[J]. *Plant Cell Reports*, 2002, 21: 333-340.
- [16] KONDO T, HASEGAWA H, SUZUKI M. Transformation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by *Agrobacterium*-mediated gene transfer[J]. *Plant Cell Reports*, 2000, 19: 989-993.
- [17] SUZUKI S, NAKANO M. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic plants of *Muscari armeniacum* Leichtl. ex Bak[J]. *Plant Cell Reports*, 2002, 20: 835-841.
- [18] MONDAL T K, BHATTACHARYA A, AHUJA P S. 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: 712-720.
- [19] TANG W, SEDEROFF R, WHEITEN R. Regeneration of transgenic Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) from zygotic embryos transformed with *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Planta*, 2001, 213: 981-989.
- [20] TURK S C H J, MELEHERS L S, den DULK-RAS H, et al. Environmental conditions differentially affect vir gene induction in different *Agrobacterium* strains: Role of the VirA sensor protein[J]. *Plant Molecular Biology*, 1991, 16: 1 051-1 059.
- [21] BECKER I, VOGEL T, IQHAL J, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phaseolus vulgaris*: Adaption of some conditions[J]. *Ann Rep Bean Improv Coop*, 1994, 37: 127-128.
- [22] BIRCH R G. Plant transformation: problems and strategies for practical application[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1997, 48: 297-326.