

以基因枪法转化日本结缕草获得转基因植株

齐春辉 韩烈保 梁小红 曾会明 刘 君

(北京林业大学草坪研究所, 省部共建森林培育与保护教育部重点实验室)

摘要: 将含有 *DREB1A* 和 *gus* 基因的双基因载体质粒包裹在金粉上, 以基因枪轰击日本结缕草胚性愈伤组织, 以 *gus* 基因的瞬时表达研究日本结缕草基因枪转化参数. 结果表明, 在 1 100 psi 压力下 6 cm 的轰击距离、每皿轰击 2 次的转化效果最好, 而金粉和质粒用量对转化效率影响不显著; 经过筛选和再生培养, 检测到 *gus* 基因的稳定表达, 并获得日本结缕草潮霉素抗性株系. PCR-Southern 杂交证实外源 *DREB1A* 基因已整合到日本结缕草基因组中.

关键词: 日本结缕草, 基因枪转化, 转基因植株, *DREB1A*, *gus* 基因, 正交设计

中图分类号: S688.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1522(2006)03-0071-05

QI Chun-hui; HAN Lie-bao; LIANG Xiao-hong; ZENG Hui-ming; LIU Jun. **Transgenic *Zoysia japonica* plants obtained by biolistic bombardment transformation.** *Journal of Beijing Forestry University* (2006) 28(3) 71-75 [Ch, 21 ref.] Key Laboratory for Silviculture and Conservation, Ministry of Education, Institute of Turfgrass Science, Beijing Forestry University, 100083, P. R. China.

Embryogenic calli induced from zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.) seeds were bombarded with gold particles coated with double-gene vector plasmid containing *DREB1A* and *gus* gene. Physical bombardment parameters were evaluated by transient expression of *gus* gene, and the best result was obtained by a target distance of 6 cm and twice bombardments under the pressure of 1 100 psi, while the concentration of gold particle and plasmid had no significant effect on the transformation efficiency. Stable *gus* expression was observed in hygromycin-resistant calli, while regenerants survived hygromycin selection and showed *gus*-activity. PCR-Southern blot analysis further indicated that the foreign gene *DREB1A* had been integrated into the genome of recovered zoysiagrass plants.

Key words *Zoysia japonica*, biolistic bombardment transformation, transgenic plants, *DREB1A*, *gus* gene, orthogonal experimental design

日本结缕草 (*Zoysia japonica* Steud.) 是当今世界上公认的优良草坪草, 也是我国草资源中的瑰宝, 但绿期短的缺点已经成为限制其大量应用的瓶颈. 增强日本结缕草耐低温、耐干旱及耐盐等抗逆性, 延长绿期, 对于改变我国草坪草种主要依靠进口的现状具有重要意义. 由于植物抗逆性状本身的复杂性及其与数量性状位点连锁关系的复杂性, 采用传统的育种方法获得优良品种已经十分困难^[1]; 现代生物技术则以其育种周期短、目的性强的优点吸引了草坪草育种学家.

DREB (dehydration responsive element binding

protein) 转录因子由逆境胁迫诱导产生后, 可激活其他多个依赖 DRE 顺式元件的抗逆功能基因, 增强植株对多种逆境(旱、冻和盐)的抵抗力, 从而使植株性状获得综合改良^[2-4]. 至今已从拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中克隆到 5 个 DREB 转录因子——DREB1A、DREB1B、DREB1C、DREB2A 和 DREB2B, 按照诱导条件, 将 DREB 家族分为两个亚家族: DREB1 和 DREB2^[5]. 其中, 已利用基因转化技术将 *DREB1A* 基因转入拟南芥^[5-6]、烟草 (*Nicotiana tabacum*)^[7]、水稻 (*Oryza sativa*)^[3]、小麦 (*Triticum aestivum*)^[8-9] 等植物中, 并提高了转基因植物的抗逆性.

收稿日期: 2005-01-17

http://journal.bjfu.edu.cn

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划、“863”国家高新技术项目(2004AA244080)、国家转基因植物研究与产业化专项(J2002-B-006).

第一作者: 齐春辉, 博士. 主要研究方向: 草坪草生物技术. 电话: 010-82262903 Email: violachie@sina.com 现工作单位地址: 北京海淀区马甸东路 9 号国家标准化管理委员会.

责任作者: 韩烈保, 教授, 博士生导师. 主要研究方向: 草坪草育种、草坪建植与管理. 电话: 010-62337982 Email: hanlb@163.net 地址: 100083 北京林业大学 116 信箱.

在日本结缕草组织培养方面,目前已有胚性愈伤组织^[10]、原生质体^[11]及悬浮细胞^[12]再生植株.在外源基因转化方面,日本结缕草与禾谷类作物及冷季型草坪草相比发展较迟缓,转化的也多为选择标记基因和报告基因. Inocuma 人^[13]应用 PEG 介导转化法,将 *pat* 和 *hph*、*gus* 基因转入日本结缕草原生质体,从而获得转基因植株;Chai 等人^[14]以农杆菌介导转化法,将 *hpt* 和 *gus* 基因转入结缕草种子诱导的胚性愈伤组织中,得到再生植株,并观测到 *gus* 基因的表达.最近,Toyama 等人^[15]以农杆菌介导转化法实现 *bar* 基因转化,从而获得抗除草剂双丙氨磷(bialaphos)的日本结缕草转基因植株.然而日本结缕草遗传转化体系还远远不能满足要求,而且缺乏系统研究.本研究以 *gus* 基因的瞬时表达优化日本结缕草基因枪转化体系,并以该方法进行 *DREB1A* 基因的转化,以期获得日本结缕草新品系.

1 材料与方法

1.1 试验材料

日本结缕草 'Zenith' 品种种子由美国 TMI 公司 (Turf Merchants, Inc) 提供, 'Liaoning'、'Qingdao' 品种种子由北京市种子公司提供.

1.2 试验方法

1.2.1 愈伤组织的诱导和继代

日本结缕草成熟种子以次氯酸钠溶液(北京化工厂, >5% 活性氯, 加入 1~2 滴吐温 20) 在磁力搅拌器上消毒 1 h, 无菌水冲洗 3~5 次, 4℃ 下浸泡 3 d, 以无菌滤纸吸干多余水分后接种于愈伤组织诱导培养基 IM 上 (MS+2, 4-D 5 mg/L + KT 0.1 mg/L), 黑暗状态下 28℃ 诱导愈伤. 愈伤每月继代 1 次, 继代时挑选白或黄色、颗粒状愈伤组织转接到继代培养基 SM (MS+2, 4-D 2 mg/L) 上.

1.2.2 质粒

植物表达载体 pCAMBIA1301 包含 *DREB1A* 和 *gus* 基因, 分别由 *ubi* 及 CaMV35S 启动子驱动, 筛选基因为 *hph*, 由 35S 启动子调控 (图 1). 该表达载体由作者所在实验室构建并保存. 质粒提取及纯化后, 浓度调至 1 μg/μL.

1.2.3 基因枪转化

转化条件选用金粉和质粒用量、轰击距离和轰击次数 3 个因素进行试验, 每个因素 2 个水平, 选用 L_4 (2^3) 正交表安排试验, 每处理 3 个重复. 表头设计及试验结果见表 1.

转化前 4 h, 将胚性愈伤组织转移到高渗透压培养基 OM (SM 培养基附加甘露醇及山梨醇各 0.2 mol/L) 中心直径 2.5 cm 范围内, 每皿 80~100 块愈伤组

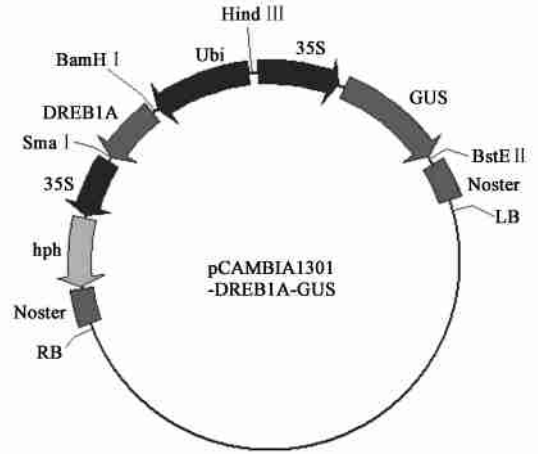


图 1 *DREB1A* 与 *gus* 双基因表达载体

FIGURE 1 Map of double gene vector containing *DREB1A* and *gus* gene

织. 用 Biolistic PDS[™]1000/He System (Bio-Rad 公司) 基因枪进行转化. 载体金粉直径 1 μm (Bio-Rad 公司), 3 mg 金粉经 70% 乙醇消毒后, 悬浮于 50 μL 无菌 50% 甘油中, 依次加入 1 μg/μL DNA 5 μL, 0.1 mol/L 亚精氨 20 μL 及 2.5 mol/L CaCl₂ 50 μL, 混匀后离心, 沉淀重悬于 48 或 96 μL 无水乙醇, 均匀滴加在 8 片或 16 片载体膜上. 可裂膜压力 1 100 psi, 靶材料至载体膜距离为 6 cm 或 9 cm, 每皿轰击 1 次或 2 次.

1.2.4 转化体筛选及植株再生

转化后 16 h, 将轰击过的愈伤组织转至无渗透压的 SM 培养基上, 过渡培养 5 d 后, 转入筛选培养基 HM (SM 培养基添加 50 mg/L 潮霉素), 每月挑选生长旺盛的愈伤组织继代到相同的培养基上. 2 个月, 将潮霉素抗性愈伤组织转到 RM 培养基上 (1/2 MS + KT 0.2 mg/L + 潮霉素 20 mg/L), 诱导体胚发生和植株再生. 约 1 个月, 待小植株出现, 将其转入不含潮霉素的 1/2 MS 培养基中壮苗. 根系强壮后, 炼苗 3 d, 然后小心洗去植株根部琼脂, 移栽入砂 (0.25~0.5 mm) 与草炭土的混合基质 (混合比例 9:1) 中.

1.2.5 *gus* 基因表达的检测

转化后 40 h, 观测愈伤组织中 *gus* 基因的瞬时表达, 在 Olympus 体视显微镜下观察染色情况; 2 个月, 对潮霉素抗性愈伤组织进行组织化学染色, 观测 *gus* 基因的稳定表达; 对于潮霉素抗性植株, 取其根部进行组织化学染色. 染色方法参考 Jefferson 等人^[16]的方法, 以未转化愈伤或植株做对照.

1.2.6 抗性植株的分子检测

参考闫新甫^[17]以 SDS 法从日本结缕草叶片中少量提取植物基因组 DNA, 以 *DREB1A* 基因 PCR 扩增引物用于抗性植株 PCR 检测及 Southern 分析, 引物序列如下:

5' > AAAGGATCCTTACCCGGGTTCTGATCAATGAACT

CATTTTCTG<3',
5' > AAAGGTACCAATCCCGGGGTTTTAATAACTCCAT
AACGATACG<3'.

PCR 反应体系为 25 μL:模板 DNA 1 μL, 两种引物混合物 2 μL, dNTP 2 μL, 10×buffer 2.5 μL, Taq 酶 0.5 μL, ddH₂O 17 μL. 反应程序:94℃ 2 min 预变性, 94℃ 30 s 变性, 55℃ 30 s 退火, 72℃ 45 s 延伸, 30 次循环, 72℃ 10 min.

PCR 呈阳性的植株叶片 DNA 和未转化植株 DNA, PCR 产物电泳后, 以毛细管原理转移到尼龙膜 (Hybond-N⁺) 上, 用 DREB1A 基因引物扩增质粒 pCAMBIA1301 DNA 回收产物 (约 700 bp) 做探针, Roche 地高辛试剂盒做 PCR-Southern 杂交.

2 结果与分析

2.1 gus 基因的瞬时表达及基因枪轰击参数的优化

日本结缕草胚性愈伤组织在 SM 培养基上继代 20 d 后, 在原来的愈伤组织旁边长出大量分散的、颗粒状胚性愈伤组织, 以同一个克隆(由同一种子诱导

的愈伤组织, 命名为 Line 3) 的愈伤组织作为基因枪转化的靶材料, 轰击 40 h 后观测 gus 基因的瞬时表达, 统计并计算瞬时表达率, 试验结果见表 1. 对试验数据做反正弦变换后进行方差分析(表 2)发现: A 因素 2 水平间差异不显著, B 因素和 C 因素差异均显著 (P<0.05). A、B 两因素多重比较结果显示, B 因素第 1 水平显著好于第 2 水平, C 因素第 2 水平显著好于第 1 水平. 即轰击距离为 6 cm、轰击次数为 2 次的条件下, 愈伤的 gus 瞬时表达率最高, 效果最好(图 2).



图 2 gus 基因的瞬时表达
FIGURE 2 Instantaneous expression of gus gene

表 1 试验设计及结果

TABLE 1 Orthogonal experimental design and results

试验号	因素			瞬时表达率/%				均值
	A(金粉+DNA 用量)/ μg	B(轰击距离)/ cm	C(轰击次数)/ 次	重复			累计	
	I	II	III					
1	250+0.5	6	1	25.00	21.84	51.35	98.19	32.73
2	250+0.5	9	2	23.08	43.14	20.00	86.22	28.74
3	500+1	6	2	70.83	54.29	100.00	225.12	75.04
4	500+1	9	1	9.52	25.00	24.00	58.52	19.51

表 2 试验结果方差分析表

TABLE 2 Variance analysis of experimental results

变异来源	自由度	离差平方和	均方平方和	F 值	F _{0.05}	F _{0.01}
区组	2	0.140 4	0.070 2	5.99	13.7	
处理	3	0.835 2	0.278 4			
金粉+DNA 用量	1	0.132 0	0.132 0	2.777 7		
轰击距离	1	0.395 2	0.395 2	8.316 1*		
轰击次数	1	0.308 1	0.308 1	6.483 7*		
机误	6	0.285 1	0.047 5			
总计	11	1.260 7	0.114 6			

2.2 gus 基因稳定表达及抗性植株的获得

以日本结缕草 'Zenith' 品种同一克隆(Line 3) 的愈伤组织作为试验材料, 在优化了基因枪转化体系的基础上, 选择(250+0.5) μg 的金粉和质粒用量、6 cm 的轰击距离轰击 2 次, 转化日本结缕草 'Zenith'、'Liaoning'、'Qingdao' 3 个品种经 4 h 渗透处理的胚性愈伤组织, 16 h 后将轰击过的愈伤转至无渗透压的 SM 培养基上, 恢复培养 5 d 后, 转至含 50 mg/L 潮霉素的 HM 培养基上, 每月继代 1 次, 筛选 2 次. 抗性愈伤组织生长旺盛, 非抗性愈伤组织生长明显

受抑制, 甚至褐化. 随机挑选筛选 2 个月后的抗性愈伤组织化学染色, 观测到 gus 基因的稳定表达(图 3). 将抗性愈伤组织转移到含 20 mg/L 潮霉素的 RM 培养基上, 抗性胚性愈伤得以分化从而得到抗性植株, 取其根部进行组织化学染色, 初步证明为转化植株(图 4、5). 日本结缕草的转化情况见表 3. 在已检测的 14 个抗性株系中, PCR 检测 10 株为阳性, PCR-Southern 杂交结果进一步证明全部为转基因植株. 品种 'Liaoning' 转化效率最高(7.62%), 'Zenith' 次之(5.6%), 而品种 'Qingdao' 转化效率最低(2.08%).

表 3 日本结缕草各品种基因枪转化实验结果

TABLE 3 Genetic transformation results of different zoysiagrass varieties by biolistic bombardment

品种	靶组织	抗性愈	抗性愈	抗性株	抗性植株
	块数	伤数	伤率/%	系数	获得率/%
'Zenith'	162	46	28.40	9	5.6
'Liaoning'	105	33	31.43	8	7.62
'Qingdao'	96	24	25.00	2	2.08

注: 抗性愈伤率=抗性愈伤数/靶组织块数×100%; 抗性植株获得率=抗性株系数/靶组织块数×100%.

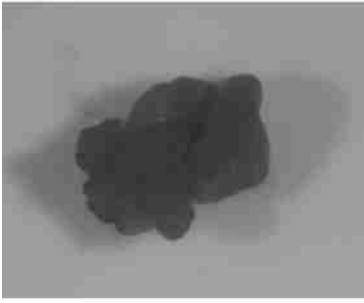
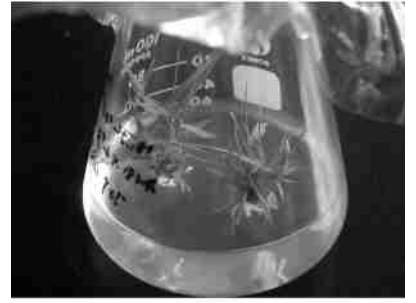
图3 愈伤组织中 *gus* 基因的稳定表达FIGURE 3 Stable expression of *gus* gene in callus图4 *gus* 基因在抗性植株根中的表达FIGURE 4 *Gus* activity in roots of regenerated plants

图5 抗性植株

FIGURE 5 Hygromycin-resistant plants

2.3 抗性植株的分子检测

取抗性植株的叶片提取基因组 DNA, 以 *DREB1A* 基因 PCR 扩增引物用于抗性植株及对照植株的 PCR 检测, 图 6 中的 5 株抗性植株中, 4 株 PCR 扩增出与 *DREB1A* 扩增产物相同的约 700 bp 的片断, 而未转化植株未扩增出相应的条带. 以阳性植株及对照植株 DNA PCR 产物电泳转膜后, 用 *DREB1A* 基因引物扩增回收产物为探针, 做 Southern 杂交, PCR 阳性植株全部出现杂交信号, 证明 *DREB1A* 基因已整合入植物基因组 DNA 中(图 7).



1~5. 转化植株 6. 未转化植株 7. 质粒 8. 分子量标准 DL2000

图6 抗性植株的 PCR 分析

FIGURE 6 PCR analysis of hygromycin-resistant plants



1. 阳性对照 2. 未转化植株 3~12. 抗性植株

图7 抗性植株的 PCR-Southern 杂交结果

FIGURE 7 PCR Southern blot analysis of putative transgenic plants

3 结论与讨论

1) 利用 *DREB1A* 培育的转基因拟南芥、烟草及小麦植株, 其抗逆性都比野生型显著增强^[5-9]. 因此, 我们选用适于单子叶植物的 *ubi* 启动子驱动 *DREB1A*, 将其与由 35S 启动子调控的 *gus* 报告基因共同构建于迄今转化效率最高的植物遗传转化载体 pCAMBIA 上, 并以适合草坪草的 *hph* 基因作为选择标记基因, 以此双基因载体转化日本结缕草.

2) 影响基因枪转化频率的因素主要来自受体细胞的内在因素和基因枪转化参数两个方面, 其中获得大量具有潜在分裂与再生能力的胚性细胞是取得转化成功的关键^[18]. 日本结缕草胚性愈伤组织在继代培养 20 d 后, 在原愈伤旁边出现淡黄色、分散的

颗粒状愈伤组织, 这种愈伤组织具高度胚性, 再生能力强, 在继代 25 d 左右大量生长, 细胞处于旺盛分裂期. 本研究中选择此时期的胚性愈伤组织作为转化受体, 易于引发细胞“感受态”; 而且在基因枪转化参数的优化试验中, 选用同一克隆的胚性愈伤组织, 保证了优化试验材料的一致性. 在轰击压力一定的情况下, 基因枪转化受轰击距离、轰击次数、金粉及 DNA 用量等多个因素的综合影响, 提高基因枪转化效率的另一个重要方面则是要尽量减少轰击对材料产生的物理损伤. 轰击次数太多、金粉用量太大对受体材料产生的机械损伤及震动伤害也会增大, 而质粒 DNA 用量过多容易使金粉结块, 既减少了轰击范围, 又增大了细胞受伤程度; 但是如果这些参数都设置的太小, 通过基因枪轰击转入受体中的外源基因也少, 导致转化效率的降低. 以前的研究往往只是对单个因素的考察, 本研究运用正交设计对日本结缕草基因枪转化系统进行了优化, 结果表明 1 100 psi 压力下 6 cm 的轰击距离、每皿轰击 2 次的转化效果最好, 而金粉和质粒用量对转化效率影响不显著, 与有些报道^[18-19] 结果不同. 渗透处理使植物细胞处于质壁分离的状态, 细胞内渗透压增加, 在细胞受伤后其内含物不易流出, 利于细胞的存活, 从而提高植物转化效率^[20-21]. 因此, 在日本结缕草转化中, 对受体材料进行轰击前和轰击后的渗透处理, 采用延迟筛选的方式, 使轰击后的材料在正常继代培养基上恢复培养 5 d 后再进行筛选.

3) 虽然 ‘Zenith’ 品种转化效率较高, 但抗性小, 植株在移至无筛选压的壮苗培养基上后, 很大一部分出现植株基部褐化, 而整个植株慢慢枯萎死亡的现象, 在得到的 9 个抗性株系中, 只有 4 个正常生长并移栽到土壤中. 分析原因, 我们认为有以下几点可能性: ① 基因型的差异: 品种 ‘Zenith’ 与品种 ‘Liaoning’、‘Qingdao’ 的植株相比较, 在叶片质地更加纤细, 观赏性更高, 但抗性随之有所下降, 可能在愈伤组织经过基因枪轰击后植株再生的恢复上也体现出相对较弱的品质; ② 插入突变: 由于外源基因

的插入,可能导致'Zenith'部分再生植株中某种基本功能基因的失活,影响了植株的生存能力;③ DREB1A 的超表达:会产生转基因植物比野生型生长缓慢、结实率低等农艺性状^[5-6]。这可能是因为所用的启动子是植物组成型强启动子,在驱动 DREB1A 转基因时,非胁迫条件下,即在植物不需要的情况下,DREB1A 蛋白控制的胁迫诱导基因仍可以超表达,这对转基因植物来说是一个很大的消耗,甚至使植株的代谢大于合成,从而导致植株不能维持正常的生存需要而死亡。

参 考 文 献

- [1] 王少峡,王振英,彭永康. DREB 转录因子及其在植物抗逆中的作用[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(1): 7-13.
WANG S X, WANG Z Y, PENG Y K. Dehydration responsive element binding (DREB) transcription activator and its function in plant tolerance to environmental stresses [J]. *Plant Physiology Communications*, 2004, 40(1): 7-13.
- [2] 韩兆雪,曹墨菊,朱祯,等. DREB 基因双 T-DNA 植物表达载体的构建及验证[J]. 分子植物育种, 2004, 2(1): 7-12.
HAN Z X, CAO M J, ZHU Z, et al. Construction and verification of double T-DNA plant expression vector of the DREB gene [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2004, 2(1): 7-12.
- [3] 刘强,赵南明,YAMATUCH-SHINOZAKI K,等. DREB 转录因子在提高植物抗逆性中的作用[J]. 科学通报, 2000, 45(1): 11-16.
LIU Q, ZHAO N M, YAMATUCH-SHINOZAKI K, et al. Regulatory role of DREB transcription factors in plant drought, salt and cold tolerance [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2000, 45(1): 11-16.
- [4] QIN F, LI J, ZHANG G Y, et al. Isolation and structural analysis of DRE-binding transcription factor from maize (*Zea mays* L.) [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45(3): 331-339.
- [5] LIU Q, KASUGA M. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 1998, 10: 1 391-1 406.
- [6] KASUGA M, LIU Q, MIURA S, et al. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor[J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17: 287-292.
- [7] KASUGA M, MIURA S, SHINOZAKI K, et al. A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible *rd29A* promoter improved drought and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2004, 45(3): 346-350.
- [8] 刘录祥,赵林妹,梁欣欣,等. 基因枪法获得逆境诱导转录因子 DREB1A 转基因小麦的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(11): 53-56.
LIU L X, ZHAO L S, LIANG X X, et al. Study on production of transgenic wheat with a stress-inducible transcription factor gene DREB1A by microprojectile bombardment [J]. *China Biotechnology*, 2003, 23(11): 53-56.
- [9] PELLEGRINESCHI A, REYNOLDS M, PACHECO M, et al. Stress-induced expression in wheat of the *Arabidopsis thaliana* DREB1A gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions [J]. *Genome*, 2004, 47(3): 493-500.
- [10] AL-KHARYI J M, HUANG F H, THOMPSON L F, et al. Plant regeneration of zoysiagrass from embryo-derived callus [J]. *Crop Science*, 1989, 29(5): 1 324-1 325.
- [11] ASANO Y. Somatic embryogenesis and protoplast culture in Japanese lawnggrass (*Zoysia japonica*) [J]. *Plant Cell Reports*, 1989, 8(3): 141-143.
- [12] INOCUMA C, SUGIURA K, CHO C, et al. Plant regeneration from protoplasts of Japanese lawnggrass [J]. *Plant Cell Reports*, 1996, 15(10): 737-741.
- [13] INOCUMA C, SUGIURA K, IMAIZUMI N, et al. Transgenic Japanese lawnggrass (*Zoysia japonica* Steud.) plants regenerated from protoplasts [J]. *Plant Cell Reports*, 1998, 17(5): 334-338.
- [14] CHAI M L, KIM D H. *Agrobacterium*-mediated transformation of Korean lawnggrass (*Zoysia japonica*) [J]. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*, 2000, 41:5, 455-458.
- [15] TOYAMA K, BAE C H, KANG J G, et al. Production of herbicide-tolerant zoysiagrass by *Agrobacterium*-mediated transformation [J]. *Molecules and Cells*, 2003, 16(1): 19-27.
- [16] JEFFERSON R A, KAVANAGH T A, BEVAN M W. GUS fusions; β glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants [J]. *European Molecular Biology Organization Journal*, 1987, 6: 3 901-3 907.
- [17] 闫新甫. 转基因植物[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
YAN X P. *Transgenic plants*[M]. Beijing: Science Press, 2003.
- [18] 易自力,王力,曹守云,等. 提高水稻基因枪转化频率的研究[J]. 高技术通讯, 2000(11): 12-15.
YI Z L, WANG L, CAO S Y, et al. Studies of improving the frequency of Indica rice transformation by biolistic bombardment [J]. *High Technology Letters*, 2000(11): 12-15.
- [19] 周淼平,沈晓蓉,章静娟,等. 小麦基因枪法转化技术的改进[J]. 江苏农业学报, 1999, 15(1): 62-64.
ZHOU M P, SHEN X R, ZHANG J J, et al. Improvement of wheat transformation by particle bombardment [J]. *Jiangsu Journal of Agriculture Science*, 1999, 15(1): 62-64.
- [20] 郑宏红,何懿洁,戴顺洪,等. 提高水稻基因枪转化效率的研究[J]. 生物工程学报, 1996, 12(增刊): 111-115.
ZHENG H H, HE S J, DAI S H, et al. Some improvements of the biolistic transformation system for *Oryza sativa*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1996, 12(Supp.): 111-115.
- [21] VAIN P, MCMULLEN M D, FINER J J. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize [J]. *Plant Cell Reports*, 1993, 12(2): 84-88.