

农杆菌介导遗传转化获得转 *CP4* 基因籼稻的研究

胡 欢, 李 媛, 丁 筠, 曹含章, 吕尊富, 李飞飞

(浙江农林大学 农业与食品科学学院 浙江省农产品品质改良技术研究重点实验室, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】建立籼稻‘中恢 161’ *Oryza sativa* subsp. *indica* ‘Zhonghui 161’ 农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 介导的转化体系。【方法】以籼稻‘中恢 161’的成熟胚为材料, 设置了 5 个草甘膦质量浓度 (100、200、300、400 和 500 mg·L⁻¹) 进行胚性愈伤组织的草甘膦敏感性试验。利用农杆菌介导法, 将草甘膦抗性基因 *CP4-EPSPS* 导入‘中恢 161’的胚性愈伤组织中, 转化后的胚性愈伤组织分别在含有 300、350 和 400 mg·L⁻¹ 草甘膦的选择培养基上进行抗性筛选。抗性愈伤组织进一步分化、成苗。【结果】草甘膦质量浓度为 300–400 mg·L⁻¹ 时, 愈伤组织褐化率约 50%, 具有很好的选择效果。经统计, 300、350 和 400 mg·L⁻¹ 草甘膦抗性筛选后, 愈伤组织阳性率分别为 40.16%、61.72% 和 84.04%, 抗性愈伤组织的分化率为 46.43%, 成苗率为 32.84%。共获得 67 株再生小苗, 经 PCR 检测, 43 株成功转入 *CP4* 基因, 再生植株阳性率为 64.18%。【结论】建立了‘中恢 161’农杆菌介导的转化体系。图 5 参 20

关键词: 籼稻‘中恢 161’; 胚性愈伤组织; 农杆菌介导; *CP4* 基因; 草甘膦

中图分类号: S336 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2021)02-0420-06

Agrobacterium-mediated transformation of *CP4* gene into indica rice

HU Huan, LI Yuan, DING Yun, CAO Hanzhang, LÜ Zunfu, LI Feifei

(Key Laboratory for Quality Improvement of Agricultural Products of Zhejiang Province, College of Agriculture and Food Science, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] The objective was to establish the *Agrobacterium*-mediated transformation system of *Oryza sativa* subsp. *indica* ‘Zhonghui 161’. [Method] 5 groups of glyphosate concentrations (100, 200, 300, 400 and 500 mg·L⁻¹) were used to test the sensitivity of embryogenic callus to glyphosate. The glyphosate-resistant gene (*CP4-EPSPS*) was introduced into the embryogenic callus of ‘Zhonghui 161’ by *Agrobacterium*-mediated method. The transformed embryogenic callus was screened for glyphosate resistance on the selective medium containing 300, 350 and 400 mg·L⁻¹ glyphosate. The resistant callus was further differentiated and seeded. [Result] When the concentration of glyphosate was 300–400 mg·L⁻¹, the browning rate of callus was about 50%, showing a good selection effect. The positive rates of callus on 300, 350 and 400 mg·L⁻¹ glyphosate were 40.16%, 61.72% and 84.04%, respectively. The further differentiation rate was 46.43%, and the seedling rate was 32.84%. A total of 67 regenerated plantlets were obtained, and 43 of them were successfully transformed into *CP4* gene by PCR detection. The positive rate of regenerated plantlets was 64.18%. [Conclusion] *Agrobacterium*-mediated transformation system of ‘Zhonghui 161’ was established. [Ch, 5 fig. 20 ref.]

Key words: *Oryza sativa* subsp. *indica* ‘Zhonghui 161’; embryogenic callus; *Agrobacterium*-mediated; *CP4* gene; glyphosate

收稿日期: 2020-07-07; 修回日期: 2020-12-10

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (31401461); 浙江农林大学学生科研训练项目 (KX20180017)

作者简介: 胡欢 (ORCID: 0000-0001-6807-1145), 从事水稻转基因研究。E-mail: 1364213853@qq.com。通信作者: 李飞飞 (ORCID: 0000-0002-6233-4204), 副教授, 从事植物基因工程研究。E-mail: lifei-fei@163.com

在遗传转化获得抗性植株时, 转化体的抗性筛选是遗传转化能否取得成功的关键步骤。通常在选择培养基中加入合适种类和浓度的筛选剂, 使其产生一定的筛选压起到抗性筛选的作用。转化体内选择标记基因的表达产物可对特定筛选剂产生抗性, 使转化受体材料继续保持正常的生长发育^[1]。目前的研究中, 卡那霉素、潮霉素等抗生素被普遍作为筛选剂使用^[2-3]。但是由于水稻 *Oryza sativa* 胚性愈伤组织对抗生素具有生理抗性, 以抗生素为选择标记进行抗性筛选, 不能起到很好的筛选效果, 且经抗生素筛选后的转化体在分化和再生阶段易受抑制或产生白化苗^[4-6]。以草甘膦作为筛选剂可以提高选择的灵敏度, 消除转化体生理抗性对筛选结果的影响, 克服了以往研究中抗生素筛选的局限性。可遗传的草甘膦抗性基因突变率低, 并可在后代中稳定表达, 因此进行抗草甘膦作物的培育是可行的^[7]。籼稻 *Oryza sativa* subsp. *indica* 和粳稻 *Oryza sativa* subsp. *japonica* 是栽培稻的 2 个亚种, 随着水稻遗传转化技术的发展, 大部分粳稻品种已经建立了成熟的遗传转化体系, 并成功引入抗虫、抗病、生长发育调控等诸多有利基因^[8]。而大多数籼稻品种组培特性不佳, 愈伤组织诱导率低, 继代过程易褐化且分化再生频率低, 导致籼稻的遗传转化效率低, 有的品种甚至难以转化。尤其是对生产上广泛推广、农艺性状优良的重要品种而言, 其改良与育种进程受到严重限制^[9]。CHAN 等^[10]于 1992 年尝试利用农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 介导法转化籼稻幼根愈伤组织, 对转化体进行 Southern 印记杂交, 结果表明: 目的基因片段已成功转入转化体细胞中。后经酶活性检测, 目的基因可在转化体中稳定表达。1994 年, HIEI 等^[11]为建立高效稳定的农杆菌遗传转化体系, 采用了“双超元”载体, 并通过在菌液添加乙酰丁香酮 (As) 活化 *Vir* 基因提高转化效率等方法, 推进了遗传转化技术在籼稻中的研究应用。目前, 虽然已有转抗草甘膦基因的籼稻遗传转化体系的报道, 但是转化效率低, 还未建立一个高效的转化体系^[12]。基于此, 本研究选取具有成功再生体系的籼稻 ‘中恢 161’ *Oryza sativa* subsp. *indica* ‘Zhonghui 161’ 为材料, 利用农杆菌介导法, 转入草甘膦抗性基因 (CP4), 探索适合的草甘膦质量浓度用于抗性筛选, 并对农杆菌介导的转化过程进行了合理优化, 建立 ‘中恢 161’ 农杆菌介导的转化体系。

1 材料与方法

1.1 材料

籼稻 ‘中恢 161’ 成熟胚; 农杆菌菌株 EHA105; 含 CP4 基因的表达载体 p1300-HC。

1.2 方法

1.2.1 成熟胚胚性愈伤组织的诱导和增殖 将成熟种子去壳, 进行消毒^[13], 接种于诱导培养基 R1[NB(N6+B5)+3.0 mg·L⁻¹2,4-D+0.5 g·L⁻¹脯氨酸+0.1 g·L⁻¹肌醇+0.3 g·L⁻¹水解酪蛋白+30.0 g·L⁻¹蔗糖+4.0 g·L⁻¹Gelrite] 上, 接种 20 粒·皿⁻¹。放入培养条件为 28 ℃, 光照 16 h/黑暗 8 h 的组培室中诱导培养。5~7 d 后, 可观察到幼芽处有淡黄色愈伤组织, 统计每皿的出愈数和出愈率。15 d 后, 剥下色泽鲜黄、结构紧密、生理状态良好的胚性愈伤组织, 分散平铺于新鲜配制的胚性愈伤组织增殖培养基 R1 上进行增殖培养。继代 2~4 次后, 增殖并产生大量的胚性愈伤组织, 可用做后期转化的受体材料。

1.2.2 胚性愈伤组织的草甘膦敏感性测试 设置 5 组草甘膦质量浓度 (100、200、300、400 和 500 mg·L⁻¹), 重复 3 次, 设空白对照, 接种 20 块·皿⁻¹。15 d 后, 观察胚性愈伤组织的色泽、是否增殖等外观形态, 统计胚性愈伤组织褐化率, 选出合适的草甘膦质量浓度范围作为筛选压。

1.2.3 胚性愈伤组织的遗传转化和抗性筛选 利用悬浮培养基 R2(NB+0.5 g·L⁻¹脯氨酸+0.1 g·L⁻¹肌醇+0.3 g·L⁻¹水解酪蛋白+30 g·L⁻¹蔗糖+100 μmol·L⁻¹乙酰丁香酮) 将培养好的含 CP4 基因表达载体的农杆菌菌株 EHA105 稀释至 D(600) 为 0.5~0.8, 用其侵染胚性愈伤组织^[14]。将转化好的胚性愈伤组织用无菌滤纸吸干多余的菌液, 适当干燥后, 用灭菌镊子夹取愈伤组织分散地平铺在铺有 1 层无菌滤纸的共培养培养基 R3(NB+0.5 g·L⁻¹脯氨酸+0.1 g·L⁻¹肌醇+0.3 g·L⁻¹水解酪蛋白+30.0 g·L⁻¹蔗糖+100 μmol·L⁻¹乙酰丁香酮+4.0 g·L⁻¹Gelrite) 上, 20 块·皿⁻¹。于 25 ℃ 培养室中暗培养 2~3 d。取出共培养后的愈伤组织, 用含 100 mg·L⁻¹羧苄青霉素的无菌蒸馏水清洗 3~4 次, 直至清洗液澄清透明。适度干燥后, 用镊子夹取愈伤组织整齐均匀地平铺在筛选培养基 R4(NB+3 mg·L⁻¹2,4-D+0.5 g·L⁻¹脯氨酸+0.1 g·L⁻¹肌醇+0.3 g·L⁻¹水解酪蛋白+0.5 g·L⁻¹谷氨酰胺+30.0 g·L⁻¹蔗糖+4.0 g·L⁻¹Gelrite+0.5 g·L⁻¹头孢霉素+不同质量浓度草甘膦) 上。抗性筛选培养基中草甘膦质量浓度分别为 300、350 和 400 mg·L⁻¹。

1.2.4 分化、生根、移栽成活 将抗性愈伤组织系移至分化培养基 R5(NB+0.5 mg·L⁻¹ NAA+3.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 g·L⁻¹ 脯氨酸+0.1 g·L⁻¹ 肌醇+0.3 g·L⁻¹ 水解酪蛋白+0.5 g·L⁻¹ 谷氨酰胺+30.0 g·L⁻¹ 蔗糖+4.0 g·L⁻¹ Gelrite) 上进行分化培养。约 15~25 d, 部分抗性愈伤组织长出绿点。待绿点进一步分化形成小苗, 并长至 2 cm 左右时将其转移至生根培养基 R6(1/2NB+20.0 g·L⁻¹ 蔗糖+0.1 g·L⁻¹ 肌醇+8.0 g·L⁻¹ 琼脂) 上生根培养。待幼苗生长出大量的茁壮根系, 可将其从生根培养基中取出, 小心洗净其根系附着的培养基, 置于培养箱中炼苗, 增强幼苗对环境的适应性, 1 周后将健壮的幼苗移至大棚成活。

1.2.5 转基因植株的分子检测和 CP4 基因试纸条检测蛋白表达 利用 TPS 法提取转基因植株叶片 DNA。利用 CP4 基因引物 (CP4-F: TTCCTTTAGGATTTCAGCATCAGTG, CP4-R: TCCTTCATGTTTCGGC GGTCTC) 进行 CP4 基因的 PCR 扩增, 目的片段大小为 400 bp。扩增后的产物经质量分数为 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 统计阳性率。取阳性植株叶片, 利用 CP4 基因表达检测试纸条进行再生植株抗性检测。

2 结果和分析

2.1 草甘膦抗性筛选最适质量浓度

图 1 和图 2 所示: ‘中恢 161’ 的胚性愈伤组织在不含草甘膦的培养基中可正常生长且大量增殖, 未发生褐化现象; 在含 100 mg·L⁻¹ 草甘膦的培养基中, 绝大多数胚性愈伤组织可正常生长增殖, 褐化率低, 仅为 5.00%, 未起到选择作用; 在含 200 mg·L⁻¹ 草甘膦的培养基中褐化率为 16.67%, 选择效果不明显; 在含 300 mg·L⁻¹ 草甘膦的培养基中, 褐化率为 41.67%, 且与 200 mg·L⁻¹ 相比差异显著 ($P < 0.05$), 选择效果好, 适合作为筛选压; 在含 400 mg·L⁻¹ 草甘膦的培养基中, 大部分胚性愈伤组织发生褐化, 少部分正常生长, 褐化率为 65.00%, 选择效果明显; 在含 500 mg·L⁻¹ 草甘膦的培养基中, 胚性愈伤组织基本发生褐化, 褐化率为 91.67%, 显著高于其他质量浓度下的褐化率 ($P < 0.05$), 说明选择压过大。结果表明: 草甘膦质量浓度为 300~400 mg·L⁻¹ 时, 胚性愈伤组织褐化率约 50%, 具有很好的筛选效果。

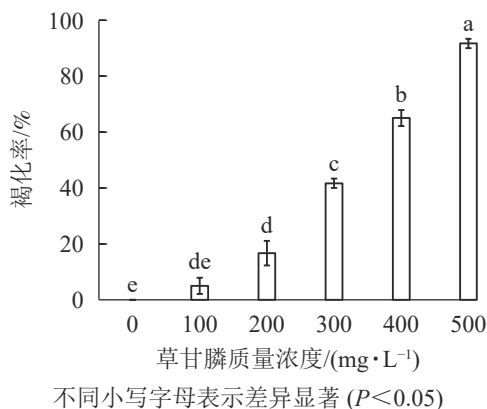


图 1 籼稻 ‘中恢 161’ 胚性愈伤组织在不同质量浓度草甘膦培养基中培养 20 d 后的褐化率

Figure 1 Browning rate of *O.sativa* subsp.*indica* ‘Zhonghui 161’ callus cultured in different concentrations of glyphosate for 20 days

2.2 抗性愈伤组织和转基因植株的分子检测

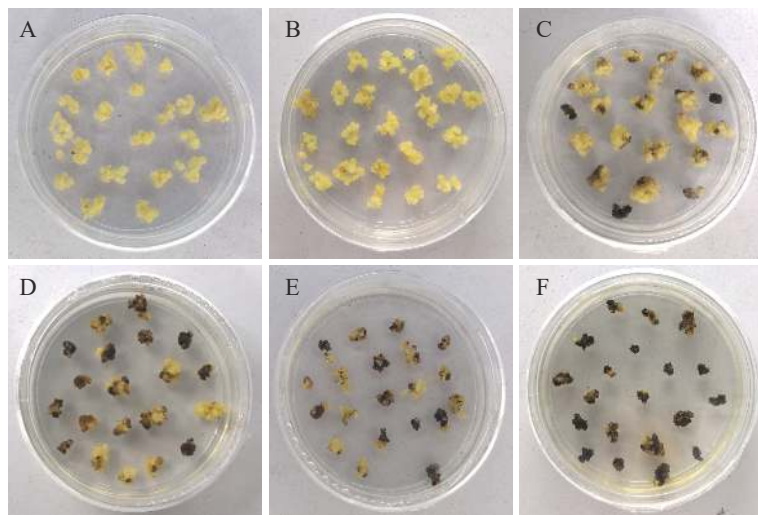
转化后的胚性愈伤组织在含有 300、350 和 400 mg·L⁻¹ 草甘膦的选择培养基上进行抗性筛选, 分别获得 200、113、和 84 块抗性愈伤组织, 提取抗性愈伤组织 DNA 进行 CP4 基因的 PCR 检测, 阳性愈伤组织的 PCR 扩增产物经电泳可获得长度为 400 bp 的条带, 与预期相符, 表明 CP4 基因已成功整合到转化体内。进行 3 个草甘膦质量浓度抗性筛选后愈伤组织阳性率分别为 40.16%、61.72% 和 84.04%。共获得 67 株再生植株, 提取再生植株叶片 DNA 进行 CP4 基因的 PCR 检测。其中阳性植株 43 株, 再生植株阳性率为 64.18%(图 3)。

2.3 CP4 基因试纸条检测蛋白表达

抗性检测结果 (图 4) 表明: 检测的 43 株 PCR 阳性植株中, 有 25 株表现为 CP4 基因表达, 表达率为 58.13%。

2.4 ‘中恢 161’ 成熟胚遗传转化体系的建立

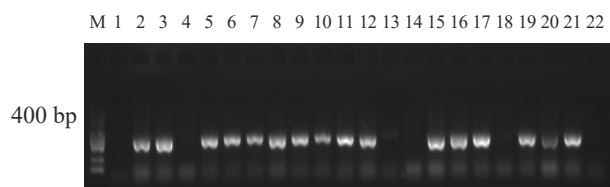
遗传转化再生过程如图 5 所示: 对籼稻 ‘中恢 161’ 成熟胚进行胚性愈伤组织诱导, 约 7 d 可诱导出胚性愈伤组织 (图 5A)。胚性愈伤组织进行 2~4 次继代增殖 (图 5B), 约 40 d 后进行遗传转化。转化后的胚性愈伤组织在选择培养基上进行抗性筛选 (图 5C~D), 一段时间后, 抗性愈伤组织系会出现增殖 (图 5E)。约 50 d 后, 抗性愈伤组织于 R5 培养基上进行分化培养, 约 15~25 d, 长出绿点 (图 5F)。1 个月左右, 长出小苗 (图 5G)。小心取出转移至 R6 培养基进行生根培养 (图 5H)。约 15 d, 幼苗长出大量的苗



A~F 草甘膦质量浓度分别为 0、100、200、300、400 和 500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

图 2 籼稻‘中恢 161’胚性愈伤组织在不同质量浓度草甘膦培养基中培养 20 d 后的褐化情况

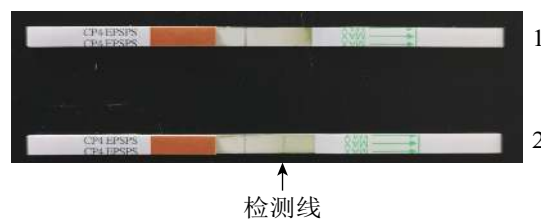
Figure 2 Browning rate of *O. sativa* subsp. *indica* ‘Zhonghui 161’ callus cultured in different concentrations of glyphosate for 20 days



M. DL2000; 1. 未转化植株, 作阴性对照; 2. 含 CP4 基因的质粒, 作阳性对照; 3~22. 检测的再生植株, 其中 3、5~12、15~17 和 19~21 扩增出目的片段, 表明它们对应的植株是 CP4 基因的阳性株, 4、13~14、18 和 22 未扩增出目的片段

图 3 籼稻‘中恢 161’再生植株 CP4 基因的 PCR 检测

Figure 3 PCR result of CP4 gene from glyphosate-resistance plants



1. 阴性植株, 不显示检测线, 表明不含 CP4 蛋白;
2. 阳性植株, 可显示检测线, 表明含 CP4 蛋白, CP4 基因成功表达

图 4 CP4 蛋白活性试纸条检测

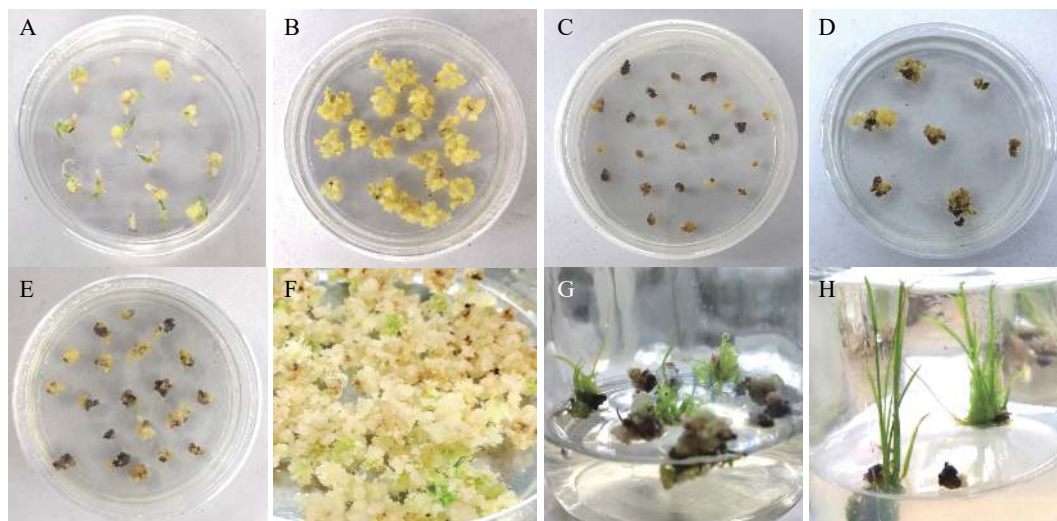
Figure 4 Protein activity of CP4 by strip test

壮根系, 将其从培养基中移出, 小心洗净根部培养基。置于培养箱中炼苗, 炼苗 1 周后可移至大棚成活。对再生植株进行 CP4 基因的 PCR 检测, 保留阳性植株。从诱导胚性愈伤组织至获得抗草甘膦再生植株的整个过程需要 4~6 个月。

3 结论与讨论

3.1 草甘膦抗性筛选及其优势

本研究建立了以草甘膦抗性基因 CP4 为选择标记的‘中恢 161’遗传转化体系。非转化体的 EPSPS 酶活性较低, 草甘膦可与 S3P 形成 EPSPS-S3P-草甘膦复合体而竞争性抑制 EPSPS 酶活性, 植物体内蛋白质合成受阻, 生长受到抑制, 不能正常生长分化^[15]。而转化体抗草甘膦基因 CP4 的表达产物 EPSPS 酶具有高催化活性和低草甘膦亲和力不易与草甘膦结合, 故能够进行正常的生长分化。因此, 通过草甘膦筛选可获得转抗草甘膦基因 CP4 的再生植株。相较于以抗生素抗性基因为选择标记, 草甘膦抗性基因不仅能作为筛选标记也能作为目的基因, 使受体植物获得除草剂抗性, 而且草甘膦比潮霉素等抗生素便宜^[7]。不同植物细胞对草甘膦的抗性存在差异, 选择合适的草甘膦质量浓度作为抗性筛选的筛选压是影响转化效率的关键因素。本研究将转化后的胚性愈伤组织分别在含有 300、350 和 400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 草甘膦的选择培养基上进行抗性筛选, 进一步分化、成苗, 共获得 67 株再生植株, 进行 CP4 基因的 PCR 检测, 其中阳性植株 43 株, 再生植株阳性率为 64.18%, 达到很好的选择效果。



A. 诱导的胚性愈伤组织; B. 增殖的愈伤组织; C. 第1次抗性筛选后的愈伤组织; D. 第2次抗性筛选后的愈伤组织; E. 第3次抗性筛选后的愈伤组织; F. 抗性愈伤组织分化出绿点; G. 绿点分化成小苗; H. 获得的再生植株

图5 CP4基因转化籼稻‘中恢161’胚性愈伤组织的各个阶段

Figure 5 Various stages of transforming CP4 gene into embryonic callus of *O. sativa* subsp. *indica* ‘Zhonghui 161’

3.2 籼稻遗传转化体系的优化

3.2.1 受体材料的选择及胚性愈伤组织的代龄 能否成功进行遗传转化的重要前提是选择适合的植物材料作为转化受体。水稻幼胚分裂能力强, 易形成大量优质胚性愈伤组织, 但受季节的影响, 水稻幼胚利用不便, 且在组织培养过程中易受微生物污染, 转化效率不高, 因此作为转化体存在一定的困难^[16]。成熟胚方便储存与利用, 不受季节限制和胚性愈伤组织诱导率较高, 通常被作为遗传转化和再生的良好的外源体材料。苏军^[17]比较了不同代龄的胚性愈伤组织, 发现第4、5代的胚性愈伤组织转化效率较高, 并且分化能力也较强。早代愈伤组织不易接受外源遗传物质。但晚代愈伤组织容易出现质地软、水渍化等现象, 影响遗传转化成功率。本研究选择胚性愈伤组织代龄为3~4代, 可有效减少愈伤组织老化、色泽暗黄、结构松散和褐化率高等问题, 有效提高了遗传转化效率。

3.2.2 转化过程的优化 为提高遗传转化效率, 本研究采取一系列措施对转化过程进行合理优化。①转化阶段选用色泽鲜黄、外观形态良好、结构紧致的愈伤组织与农杆菌共培养, 淘汰外观发白发软发褐的愈伤组织。②在共培养基 R2 和悬浮培养基 R3 中加入 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮, 可诱导农杆菌 *Vir* 基因的活化, 从而促进外源基因的整合, 极大提高转化效率^[18]。③农杆菌菌液经悬浮培养液 R3 稀释后, $D(600)$ 为 0.5~0.8。此时为最适菌液浓度, 既不会使农杆菌在转化体表面过多繁殖影响其正常生长, 又具有一定的侵染能力, 提高了转化效率。④黑暗条件下共培养 2~3 d 为适合的共培养时长。共培养时间过短, 目的基因不能成功整合至转化体细胞内^[19-20]。

4 参考文献

- [1] 李俊, 刘翠琼, 尹伟伦, 等. 转基因植物中标记基因研究概况[J]. *植物学报*, 2009, **44**(4): 497 - 505.
LI Jun, LIU Cuiqiong, YIN Weilun, *et al.* A survey of marker genes in transgenic plants [J]. *J Bot*, 2009, **44**(4): 497 - 505.
- [2] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 214 - 218.
- [3] 贾士荣. 转基因植物食品中标记基因的安全性评价[J]. 中国农业科学, 1997, **30**(2): 1 - 15.
JIA Shirong. Safety evaluation of marker genes in transgenic plant food [J]. *Agric Sci China*, 1997, **30**(2): 1 - 15.
- [4] MULLINS M G, TANG F C A, FACCIOITTI D. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of grapevines: transgenic plants of *Vitisrupestris* Scheele and buds of *Vitis vinifera* L. [J]. *Biotechnology*, 1990, **8**: 1041 - 1045.
- [5] NEHRA N S, CHIBBAR R N, LEUNG N, *et al.* Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissues following microprojectile bombardment with two distinct gene constructs [J]. *Plant J*, 1994, **5**(2): 285 - 297.
- [6] ZHOU H, ARROWSMITH J W, FROMM M E, *et al.* Glyphosate-tolerant CP4 and GOX genes as a selectable maker in wheat transformation [J]. *Plant Cell Rep*, 1995, **15**: 159 - 163.

- [7] 王和勇. 植物转化体草甘膦筛选技术平台的建立[D]. 广州: 中山大学, 2004.
WANG Heyong. *Establishment of Screening Technology Platform for Glyphosate in Plant Transformation* [D]. Guangzhou: SunYat-sen University, 2004.
- [8] 苏军, 胡昌泉, 翟红利, 等. 农杆菌介导籼稻明恢 86 高效稳定转化体系的建立[J]. *福建农业学报*, 2003, **18**(4): 209 – 213.
SU Jun, HU Changquan, ZHAI Hongli, *et al.* Establishment of a highly efficient and stable transforming system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in indica rice [J]. *J Fujian Agric*, 2003, **18**(4): 209 – 213.
- [9] 童普国, 欧阳解秀, 阎新, 等. 1 个组培特性优良的籼稻品种的发现及其农杆菌转化体系的建立[J]. *湖南农业大学学报 (自然科学版)*, 2016, **42**(3): 225 – 230.
TONG Puguo, OUYANG Jiexiu, YAN Xin, *et al.* Discovery of an indica rice variety with excellent tissue culture characteristics and establishment of its *Agrobacterium* transformation system [J]. *J Hunan Agric Univ Nat Sci Ed*, 2016, **42**(3): 225 – 230.
- [10] CHAN Mingsair, LEE Tsemin, CHANG Hsinhsung. Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Cell Physiol*, 1992, **33**(5): 577 – 583.
- [11] HIEI Y, OHTA S, KOMARI T, *et al.* Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA [J]. *Plant J*, 1994, **6**(2): 271 – 282.
- [12] 温莉娴, 周菲, 邹玉兰. 抗除草剂转基因水稻的研究进展[J]. *植物保护学报*, 2018, **45**(5): 954 – 960.
WEN Lixian, ZHOU Fei, ZOU Yulan. Research progress of herbicide resistant transgenic rice [J]. *J Plant Prot*, 2018, **45**(5): 954 – 960.
- [13] 张秀香. 水稻成熟种子组织培养体系的优化及建立[J]. *安徽农学通报*, 2012, **18**(12): 39 – 40, 42.
ZHANG Xiuxiang. Optimization and establishment of tissue culture system for mature rice seeds [J]. *Bull Anhui Agric*, 2012, **18**(12): 39 – 40, 42.
- [14] 马永光, 于翠梅, 杨巍, 等. 水稻农杆菌转化体系中共培养方法的优化[J]. *园艺与种苗*, 2011(4): 26 – 28.
MA Yongguang, YU Cuimei, YANG Wei, *et al.* Optimization of co-cultivation methods in the transformation system of *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Hortic Seedlings*, 2011(4): 26 – 28.
- [15] 王慧, 闫晓红, 徐杰, 等. 我国抗草甘膦基因的发掘现状[J]. *农业生物技术学报*, 2014, **22**(1): 109 – 118.
WANG Hui, YAN Xiaohong, XU Jie, *et al.* Current status of glyphosate resistant genes in China [J]. *Acta Agric Biotech*, 2014, **22**(1): 109 – 118.
- [16] 邱萍. 籼稻浙恢 7954 遗传转化体系的优化及其应用[D]. 金华: 浙江师范大学, 2012.
QIU Ping. *Optimization and Application of Genetic Transformation System of Indica Rice Zhehui 7954* [D]. Jinhua: Zhejiang Normal University, 2012.
- [17] 苏军. 淀粉合成相关基因转化籼型杂交稻亲本及育种利用研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2005.
SU Jun. *Studies on the Transformation of Starch Synthesis Related Genes into Indica Hybrid Rice Parents and Their Breeding Utilization* [D]. Fuzhou: Fujian Agricultural and Forestry University, 2005.
- [18] 董喜才, 杜建中, 王安乐, 等. 乙酰丁香酮在植物转基因研究中的作用[J]. *中国农学通报*, 2011, **27**(5): 292 – 299.
DONG Xicai, DU Jianzhong, WANG Anle, *et al.* The role of acetosyringone in plant transgenic research [J]. *China Agron Bull*, 2011, **27**(5): 292 – 299.
- [19] SAHOO K K, TRIPATHI A K, PAREK A, *et al.* An improved protocol for efficient transformation and regeneration of diverse indica rice cultivars [J]. *Plant Methods*, 2011, **7**(1): 49.
- [20] 刘元风, 刘彦卓, 王金花, 等. 根癌农杆菌介导籼稻遗传转化影响因素研究[J]. *分子植物育种*, 2005, **3**(5): 737 – 743, 748.
LIU Yuanfeng, LIU Yanzhuo, WANG Jinhua, *et al.* Study on the influencing factors of *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation of indica rice [J]. *Mol Plant Breed*, 2005, **3**(5): 737 – 743, 748.