

农杆菌转化的小冠花发状根的诱导及其植株再生

Hairy Root Induction and Plant Regeneration of Crownvetch (*Coronilla varia* L.) Transformed by *Agrobacterium rhizogenes*

韩晓玲, 步怀宇, 郝建国, 赵宇玮, 贾敬芬*

HAN Xiao-Ling, BU Huai-Yu, HAO Jian-Guo, ZHAO Yu-Wei and JIA Jing-Fen*

西北大学生命科学学院, 西安 710069

College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China

摘 要 利用野生型发根农杆菌 15834 菌株感染小冠花 15 日龄无菌苗子叶和下胚轴切段, 建立了高效的发状根培养及其体细胞胚胎发生再生体系: 发状根可直接从受伤的外植体表面产生, 也能在外植体诱导的愈伤组织上发生, 在无外源激素的 MS 固体和液体培养基上, 转化根能自主生长, 表现出典型的发根特征: 用适宜浓度的乙酰丁香酮处理对数生长期的农杆菌菌液 2h, 感染预培养 2d 的子叶获得了最高的转化频率(87.4%)。在附加 0.2mg/L 2,4-D, 0.5mg/L NAA 和 0.5mg/L KT 的 MS 培养基上, 发状根能 100% 形成胚性愈伤组织, 并于含 0.5mg/L KT, 0.2mg/L IBA 和 300mg/L 脯氨酸的 MS 培养基上顺序经过体细胞胚胎发育的各个典型时期, 转换成完整植株。再生植株除具有发达的侧根外, 其它形态特征与未转化植株未见明显的差异, 但在获得的 5 个转化克隆中, 其中 1 个的发状根及其再生植株叶片中有毒物质 3-硝基丙酸的含量显著下降, 分别为未转化对照的 57.68% 和 58.17%。冠瘿碱纸电泳检测和 *rol B* 基因 PCR 扩增检测均证明农杆菌 Ri 质粒上的 T-DNA 已经整合到小冠花转化细胞的基因组中。

关键词 小冠花, 发根农杆菌, 发状根, 体细胞胚胎发生, 植株再生

中图分类号 Q813.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2006)01-0107-07

Abstract An efficient system of genetic transformation and plant regeneration via somatic embryogenesis was established in crownvetch (*Coronilla varia* L.) by infecting the segments of cotyledons and hypocotyls of 15d-old seedlings with *Agrobacterium rhizogenes* strain 15834. Hairy roots were produced directly from the wounded surface of the explants or via calluses on hormone-free Murashige and Skoog (MS) medium after infection by *A. rhizogenes*. Transformed roots grew rapidly either on solid or liquid MS medium, and exhibited typical hairy root phenotypes. The highest transformation frequency (87.4%) was achieved by pre-culturing cotyledons for 2d and pre-treating the *A. rhizogenes* with suitable concentration of acetosyringone at logarithmic phase ($OD_{600} = 0.8$). The embryogenic calluses with 100% induction frequency were induced from hairy roots on MS medium containing 0.2mg/L 2,4-D, 0.5mg/L NAA and 0.5mg/L KT. Globular-, heart-, torpedo-, and cotyledon shaped somatic embryos were produced orderly and developed into plantlets when transferred the embryogenic calluses on MS medium supplemented with 0.5mg/L KT, 0.2mg/L IBA and 300mg/L proline. The transformed plants did not show differences in morphology except abundant lateral root branches compared to the non-transformed plants. However, the contents of 3-

Received: August 11, 2005; Accepted: November 3, 2005.

This work was supported by grant from National Science Foundation of Shaanxi Province(No. 2003C108).

* Corresponding author. Tel: 86-29-88303484; E-mail: Jiajf38@nwu.edu.cn

陕西省自然科学基金项目(No. 2003C108)和省重点实验室重点项目(No. 05JS48)。

nitropropanic acid in hairy roots and leaves of one of 5 transformed clones were 57.68% and 58.17% in roots and leaves of untransformed plants, respectively. Opine paper electrophoresis revealed the integration and expression of TR-DNA. PCR analysis confirmed that the TL-DNA including 654 bp *rol B* sequence was inserted into the genome of transformed hairy roots and their regenerated plants.

Key words Crownvetch, *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root, somatic embryogenesis, plant regeneration

小冠花 (*Coronilla varia* L.) 为多年生豆科牧草, 也是优良的水土保持和草坪观赏植物, 具有营养丰富、耐寒、耐旱、耐瘠薄、耐覆土等优良性状, 在我国广泛种植^[1]。小冠花植株含有 3-硝基丙酸^[2], 若采食过量可使单胃动物中毒^[3]。如何使其有毒成份含量降低, 获得低毒小冠花品种是育种的一项主要目标。

农杆菌介导的遗传转化为高等植物品质和性状的改良开辟了广阔的前景^[4], 与根癌农杆菌相比, 发根农杆菌介导的遗传转化有许多优点, 如发状根为单细胞起源, 具激素自主型生长, 不含 *onc* 基因, 易再生完整植株等^[5], 在植物基因工程及生产实际中更具应用价值。目前已有上百种植物获得了发状根转化植株, 这些植株常表现出一些形态或生理生化特性的变异, 如烟草植株的矮化^[6]及多胺代谢的变化^[7], 菊苣开花习性的改变^[8], 天竺葵观赏特性的改良和芳香气味的产生^[9]等。展示出发根农杆菌介导的遗传转化在植物性状改良及新的有益性状发现方面的巨大潜力。

豆科牧草中已有苜蓿^[10]、红豆草^[11]和骆驼刺^[12]等有关发根农杆菌遗传转化并由转化根再生的报道, 然而几乎都是通过器官发生途径再生苗或根的。小冠花是一种体细胞胚胎发生能力较强的植物, 迄今为止, 有关其遗传转化的研究尚未见报道。本文采用野生型发根农杆菌菌株 15834, 转化小冠花无菌苗子叶、下胚轴, 探讨了影响遗传转化的因素, 建立了高效的发状根遗传转化及体细胞胚胎植株再生体系, 为利用转基因技术改良其品质奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 菌株及植物材料

发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 菌株 15834 由本实验室保存。供试小冠花 (*Coronilla varia* L.) 种子由陕西省农科院牧草研究所提供。

1.2 方 法

1.2.1 菌液的制备: 将低温保存的菌株 15834 接种于含 250mg/L 青霉素的 YMB 固体培养基上, 28℃ 培

养。长出新菌落后, 挑取单菌落, 接种于 YMB 液体培养基中, 28℃, 120r/min 振荡培养 14h, 4000r/min 离心 8min, 收集沉淀菌体, 用无激素的液体 MS 培养基^[13]悬浮, 继续培养至一定的 OD_{600} 值备用。同时取 OD_{600} 值为 0.6 的菌液, 分别加入终浓度为 0、20、50、100 μ mol/L 的乙酰丁香酮, 振荡培养 2h 后用于感染。

1.2.2 无菌苗的获得及受体材料的预培养: 选取饱满籽粒, 用浓 H_2SO_4 处理 20min, 自来水冲洗, 70% 乙醇浸摇 30s, 再用 0.1% $HgCl_2$ 灭菌 15min, 无菌水洗涤 6 次, 接种于无激素 MS 培养基上, 在 $(25 \pm 2)^\circ C$, 1200lx 下光照培养。15d 后, 将无菌苗的下胚轴、子叶切成一定大小切段, 置于无激素的 MS 培养基上预培养 0、1、2、4、8d 后用于转化。

1.2.3 发状根的诱导及培养: 将预培养不同天数的外植体浸入菌液中, 15min 后取出, 用无菌滤纸吸干多余菌液, 放于原培养基上共培养 2d。再转入附加 500mg/L 羧苄青霉素的无激素 MS 培养基上, 25℃ 暗培养。同时接种未经感染的外植体于无激素 MS 培养基上, 作为对照。每 7d 转接 1 次, 且逐次降低抗生素浓度。切取除菌完全、生长快速的发状根根段, 接种于无激素的 MS 固体或液体培养基中, 25℃ 散射光培养, 每 20d 转代 1 次。外植体在除菌培养基上培养 25d 后, 统计转化频率。发状根的转化频率 (%) = (诱导产生发状根的外植体数 / 接种的外植体数) $\times 100\%$ 。上述各试验每处理接种 3 瓶, 每瓶接 20 块外植体。

1.2.4 发状根愈伤组织的诱导及其体细胞胚胎发生和植株再生: 切取长约 3cm 的发状根, 转入附加 0.2mg/L 2, 4-D, 0.5mg/L NAA 和 0.5mg/L KT 的 MS 培养基 (蔗糖浓度 3%, 琼脂 0.65%, pH 值 5.8 ~ 6.2) 上。20d 后, 挑取质地松软的愈伤组织于相同培养基上继代培养, 并在 Olympus 实体解剖镜下定期取样观察培养物的形态, 待愈伤组织表面分化出浅黄色、颗粒状、排列紧密的胚性愈伤组织后, 转移到诱导体细胞胚发生和植株再生的 MS + KT 0.5 mg/L + IBA 0.2mg/L + 脯氨酸 300mg/L + 蔗糖 4g/L

培养基上。苗高长至 6cm 以上,形成发达的根系后,敞开瓶盖练苗 3d,移至营养钵中保湿培养。

1.2.5 发状根的冠醚碱检测:分别称取 0.1g 鲜重的发状根、发状根产生的体细胞胚及其再生苗叶片,加入 0.1mL 0.1mol/L HCl,充分研磨后,转入 1.5mL 离心管中 4℃ 浸提 2h。12 000r/min 离心 5min,取上清液 4μL 点样于新华 1 号滤纸上。以未转化苗的根为阴性对照,甘露碱(mannopine)标准品(1mg/mL)为阳性对照。参考 Tanaka 等的方法^[14]并稍加改进,进行纸电泳分析。300V 电压电泳 90min,小心取出滤纸,热风吹干,碱性 AgNO₃ 染色拍照。

1.2.6 发状根 rolB 基因的 PCR 检测:按 CTAB 法^[15]分别提取小冠花转化发状根、发状根来源的体细胞胚及其再生植株叶片和未转化植株根中的总 DNA。采用华美公司研制的裂解液提取质粒 DNA。提取方法:20μL 菌液中加入 40μL 裂解液,混匀后 94℃ 裂解 15min,14 000r/min 离心 5min,上清液备用。Ri 质粒 rolB 基因 PCR 检测的上游引物为 rol-CGA (5'GATATATGCCAAATTTACTAG 3'),下游引物为 rol-CGT (5'GTTAACAAAGTAGGAAACAGG 3')^[16],由大连宝生物技术公司合成。预期扩增产物大小为 564 bp。PCR 反应条件为 94℃ 变性 45s,45℃ 退火 30s,72℃ 延伸 45s,循环 35times,72℃ 延伸 10min。扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳和 EtBr 染色检测。标准分子量 marker 为 100 bp Ladder。

1.2.7 发状根及其转化植株叶片中 3-硝基丙酸含量的检测:选取 5 个转化克隆培养 28d 的发状根及其 55d 龄再生苗的叶片,蒸馏水冲洗干净,精密称取 1.0g,置于 50mL 具塞三角瓶中,加入 1mol/L HCl 15mL,25℃ 振荡提取 2h,过滤,滤液于 4000r/min 下离心 5min,准确吸取 1mL 上清液,按汪傲^[1]等的方法,在 530nm 波长下测定 3-硝基丙酸含量。以未转化外植体诱导的根及其再生苗的叶片为对照。每样品重复测定 3 次。

2 结果与分析

2.1 发状根的诱导及培养

感染后的外植体接种于无激素的 MS 培养基上培养 4~5d 后,有的外植体开始膨大,并在伤口处产生白色愈伤组织。10 d 后,从这些愈伤组织上陆续长出发状根(图 1 A,B)。出根部位多在外植体的形态学下端,这可能与生长素的极性运输与分布有关^[17]。有的发状根也能从感染外植体的伤口处直接发生(图 1 C)。未经感染的子叶、下胚轴在无外

源激素的培养基上不能产生发状根。将 4cm 以上的发状根切下,培养于无激素的 MS 固体培养基上,5d 后发状根上产生分枝,生长速度明显加快;次级发状根生长一段时间后,又产生很多分枝。旺盛生长的发状根 20d 可布满培养瓶的底部(图 1 D)。将发状根转入无激素的液体培养基中振荡培养,亦表现出良好的生长状态(图 1 E)。

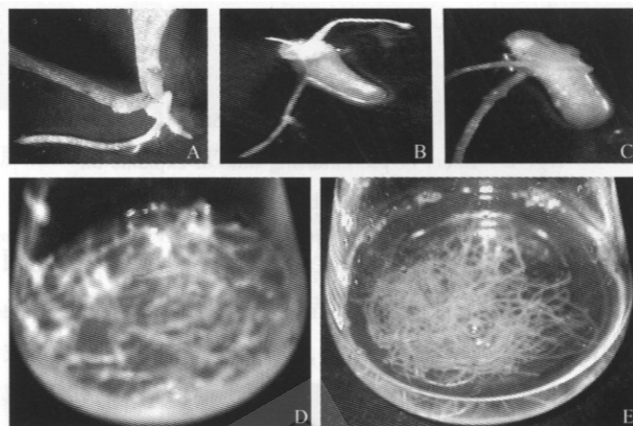


图 1 小冠花发状根的诱导及培养

Fig. 1 Induction and culture of hairy roots of *C. varia* L.

A: hairy roots induced from white callus of a cotyledon explant; B: hairy roots induced from white callus of a hypocotyl explant; C: hairy roots directly emerging from a hypocotyl explant; D: 20d old hairy roots in solid MS medium without hormone; E: hairy roots cultured for 20d in hormone-free liquid MS medium.

2.2 影响发状根转化频率的因素

2.2.1 外植体预培养时间对发状根转化频率的影响:预培养不同天数的子叶和下胚轴在 OD₆₀₀ 值为 0.8 的菌液中浸染 15min,培养 25d 后统计结果如图 2 所示,外植体预培养时间与转化频率有密切关系。预培养 2d 的子叶和下胚轴转化频率最高,分别为 58% 和 41.2%,未经预培养或预培养时间超过 4d 转化频率均较低。子叶外植体似乎对预培养更敏感,转化效果较好。可见适当时间的预培养,能启动外植体细胞分裂,使其处于良好的感受状态,有利于农杆菌感染及 T-DNA 的整合与表达^[18]。这在其他一些植物如骆驼刺^[12]和新疆雪莲^[19]的遗传转化研究中也有类似的效果。

2.2.2 菌液浓度对发状根转化频率的影响:将预培养 2d 的子叶和下胚轴分别浸入不同 OD₆₀₀ 值的农杆菌菌液中感染 15min,培养 25d 后统计转化结果。如图 3 所示,菌液侵染浓度对子叶和下胚轴转化频率的影响均很大。在 OD₆₀₀ 值为 0.0~0.8 范围内,随着菌液浓度的增加,转化频率几乎呈直线上升。当 OD₆₀₀ 为 0.8 时,子叶和下胚轴的转化频率最高,分

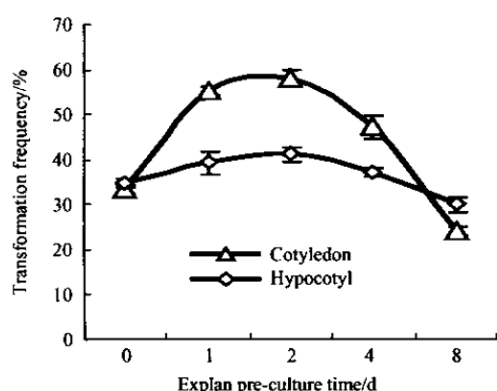


图2 外植体预培养时间对发根农杆菌 15834 转化效率的影响

Fig. 2 Effect of pre-culturing time of explants on transformation frequency by *A. rhizogenes* 15834

别为 58.6% 和 42.4%。而 OD_{600} 高于 0.8 时, 转化频率逐渐下降, 外植体褐化程度加剧。农杆菌的侵染活力对转化效率影响很大, 采用适宜的菌液感染浓度, 即对数生长期的农杆菌 (OD_{600} 0.8 左右) 进行感染对提高转化频率是至关重要的。

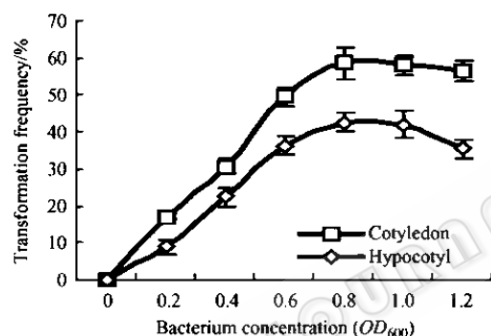


图3 发根农杆菌 15834 菌液浓度对转化频率的影响

Fig. 3 Effect of concentration of *A. rhizogenes* 15834 on transformation frequency

2.2.3 不同浓度乙酰丁香酮处理菌液对转化频率的影响: 在 OD_{600} 为 0.6 的菌液中, 添加终浓度分别为 0, 20, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ 的乙酰丁香酮 (As), 振荡培养 2h 后, 感染预培养 2d 的子叶和下胚轴切段, 结果 (图 4) 表明: 20 $\mu\text{mol/L}$ As 处理能显著提高子叶外植体的转化频率 (87.4%), 是未经 As 处理的 1.49 倍; 50 $\mu\text{mol/L}$ As 处理下胚轴效果最好, 转化频率为 72.0%, 为对照的 1.68 倍; 高浓度 As 处理并未进一步提高转化频率。表明 As 对小冠花遗传转化的促进作用有一适宜的浓度范围。而且外植体的种类不同, 所需的适宜浓度亦有所差异。农杆菌侵染植物细胞, 首先要求 *vir* 基因的活化。As 是一些双子叶植物受伤细胞释放的酚类物质, 能诱导 *Vir* 区基因的活化表达, 促进 T-DNA 转移^[20]。当受伤外植体细胞产生的酚类物质不足以诱导 *Vir* 基因活化时, 添

加适量乙酰丁香酮能显著提高发状根的转化效率, 但是过量的 As 对外植体有毒害作用, 影响转化效果^[21]。

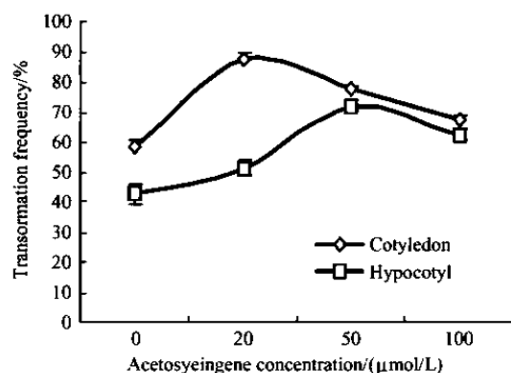


图4 乙酰丁香酮 (As) 浓度对转化频率的影响

Fig. 4 Effect of acetosyringene concentration on transformation frequency

2.3 发状根愈伤组织的诱导及其体细胞胚胎发生和植株再生

将发状根各克隆切段分别在附加 1mg/L 2,4-D 和 0.2mg/L 6-BA 的 MS 培养基上培养, 生长速度明显减缓, 根段的各部位脱分化形成乳白色松软的愈伤组织, 最后整个根段肿胀并愈伤组织化 (图 5 A)。继续培养, 愈伤组织的颜色逐渐转为浅黄色或黄绿色。20d 后, 其表面及内部形成米黄色颗粒状的胚性愈伤组织 (图 5 B)。这些胚性愈伤组织细胞小, 排列紧密, 呈球形, 诱导频率为 100%。将其转入附加 0.5mg/L KT、0.2mg/L IBA、300mg/L 脯氨酸和 4g/L 蔗糖的 MS 培养基上, 5d 左右可分化出球形胚 (图 5 C), 随后依次观察到心形胚 (图 5 D)、鱼雷胚 (图 5 E)、子叶胚 (图 5 F), 25d 后子叶胚转换成完整的再生小苗 (图 5 G), 每克愈伤组织再生植株的平均数为 21 棵。不断长高的植株, 根部产生浓密的侧根分支, 表现出明显的发根特征, 但其茎叶形态正常, 与未转化植株相比未见明显差异 (图 5 H)。

2.4 发状根及其转化植株的冠瘿碱分析

发根农杆菌 TR-DNA 中存在冠瘿碱合成酶基因, 当 TR-DNA 在植物细胞基因组中整合和表达后, 能够在植物细胞中合成冠瘿碱。利用高压纸电泳技术检测转化组织中冠瘿碱的存在, 即可判断冠瘿碱合成酶基因的转入^[22]。小冠花发状根、发状根再生植株叶片及其体细胞胚纸电泳分析结果均检测到甘露碱的存在 (图 6-2, 3, 4), 而未经转化的对照根中没有检测出阳性斑点 (图 6-5), 说明发根农杆菌 15834 质粒 TR-DNA 上的冠瘿碱合成酶基因已转入发状根组织中。

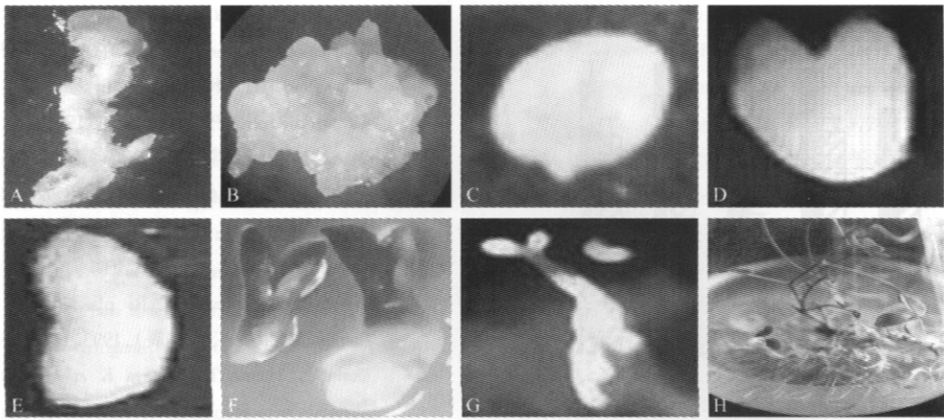


图 5 小冠花发状根的体细胞胚胎发生及其植株再生。

Fig. 5 Somatic embryogenesis and plant regeneration from *A. rhizogenes* transformed hairy roots of *C. varia* L. A: callusing of a hairy root; B: an embryogenic callus derived from a hairy root; C: a globular embryo differentiated from embryogenic callus; D: a heart-shaped embryo; E: a torpedo somatic embryo; F: cotyledon somatic embryo; G: a plantlet derived from cotyledon embryo of hairy root; H: regenerated plants with abundant lateral branch roots.

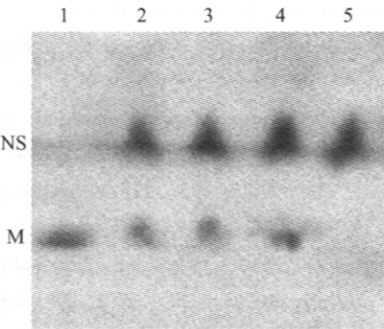


图 6 小冠花发状根转化体中冠瘻碱的检测

Fig. 6 Detection of opine in hairy root transformants of *C. varia* L.

1: standard mannopine; 2: fresh hairy root extracts; 3: extracts from regenerated plant leaves of hairy roots; 4: extracts from somatic embryos derived from hairy roots; 5: extracts of non-transformed plant root; NS: neutral sugars; M: mannopine.

2.5 发状根转化组织 *rol B* 基因的 PCR 检测

Rol B 基因是发根农杆菌 Ri 质粒 TL-DNA 上与发状根形成密切相关的基因^[23], 利用 *rol B* 基因序列设计的引物, 能够从农杆菌 15834 质粒 DNA、小冠花发状根及其体细胞胚和再生植株的总 DNA 中扩增出 564bp 的预期特异性片段(图 7-1,2,3,4), 而未经转化的植株根总 DNA 中无此特异条带出现(图 7-5)。证明 TL-DNA 上的 *rol B* 基因已整合进小冠花毛状根转化细胞的核基因组中。

2.6 发状根及其转化植株叶片中 3-硝基丙酸含量的变化

对冠瘻碱检测呈阳性和 *rol B* 基因 PCR 扩增检测呈阳性的 5 个转化克隆发状根及其再生植株叶片中 3-硝基丙酸含量测定结果如图 8 所示。与未转化

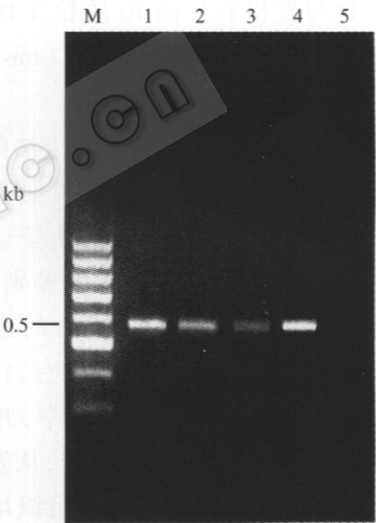


图 7 小冠花发状根转化体 *rolB* 基因 PCR 产物的电泳分析

Fig. 7 Profile of agarose gel electrophoresis of PCR products of *rolB* gene transformed by *A. rhizogenes* in *C. varia* L. M: marker, 1kb DNA ladder; 1: fragment from Ri plasmid; 2: fragment from hairy roots; 3: fragment from somatic embryos derived from hairy roots; 4: fragment from transformed plant; 5: non-transformed roots.

的对照(CK)相比, TC1、TC2、TC4 和 TC5 四个转化克隆中 3-硝基丙酸含量虽有一定的变化, 但统计分析未达显著、极显著水平; 而 TC3 转化克隆的发状根及其再生植株叶片中 3-硝基丙酸含量却大幅度降低, 分别为未转化根和再生植株叶片中 3-硝基丙酸含量的 57.68% 和 58.17%。

3 讨论

迄今为止, 有关小冠花遗传转化的研究尚未见报道。本文采用野生型发根农杆菌 15834 菌株感染小冠花无菌苗子叶、下胚轴, 诱导产生了发状根。发

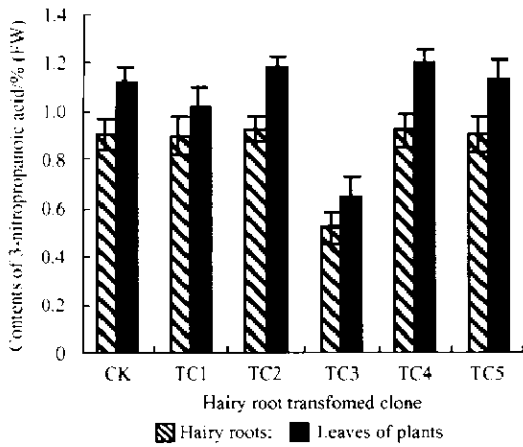


图8 小冠花发状根及其再生植株叶片中3-硝基丙酸含量
Fig. 8 The contents of 3-nitropropanoic acid in hairy roots and leaves of transformed plants in *C. varia* L.

状根在无激素培养基上能自主生长,表现出典型的发根特征。这与发根农杆菌 Ri 质粒 T-DNA 上携带的 *rol* 基因和生长素合成酶基因 (*tms1*, *tms2*) 有关^[24]。

高再生能力的受体系统与转化方法的匹配是遗传转化成功的关键^[25]。多数研究者把组培再生系统和遗传转化系统孤立起来研究,由于这两个系统在对外植体的处理上存在着很大的差别,因此一个良好的组培系统不一定是一个优秀的遗传转化系统^[26]。本试验直接以转化系统为平台,优化了转化条件,获得了高达 87.4% 的转化频率,并且通过高频率(100%)的体细胞胚胎发生途径,从发状根中再生出大量转基因植株,克服了以往组织培养再生体系与遗传转化体系不能很好匹配的障碍,建立了农杆菌介导的小冠花高效遗传转化体系。

在农杆菌介导的遗传转化中,由于 T-DNA 插入植物基因组的位置、长度和拷贝数千差万别^[27],植物感染部位就会产生在形态、生理生化特性和次生代谢产物含量等方面各异的发状根克隆^[7,8,9,28],这些单细胞起源的变异克隆为新的优良性状的发现和筛选提供了方便和可能。本实验所获得的有毒物质 3-硝基丙酸含量显著降低的发状根克隆,有望为低毒小冠花品种的选育提供种质资源。但其变异的机理尚待进一步探讨。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Wang J (汪敬), Lei ZY (雷祖玉), Feng XQ (冯学勤). The contents of 3-nitropropanoic acid in different varieties and morphology of *Coronilla varia* L. *Acta Prataculturae Sinica* (草业学报), 1994, 2(1): 89-94
- [2] Gustine DJ, Shenk JS, Moyer BG. Isolation of 3-nitropropanoic acid from crownvetch. *Agron*, 1974, 66: 636-639
- [3] Matsumoto, H., Hylin JW, Miyahara A. Methemoglobinemia in *Coronilla varia*. *Phytochemistry*, 1961, 16: 375-377
- [4] Wang JX (王景雪), Sun Y (孙毅). Progress of plants genetic transformation by *Agrobacterium*. *Biotechnol Inform* (生物技术通报), 1999, 15(1): 7-13
- [5] Li JL (李集临), Xu XL (徐香玲), Chen JS (陈金山). *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid and its application. *Prog Biotechnol* (生物工程进展), 1993, 14(2): 8-14
- [6] Oono Y, Handa T, Kanaya K et al. The TL-DNA gene of Ri plasmids responsible for dwarfness of tobacco plants. *Japan J Genet*, 1987, 62: 501-505
- [7] Mengoli M, Chiriqui D, Bagni N. Putrescine biosynthesis and oxidation in normal and hairy root tobacco plants. *J Plant Physiol*, 1992, 140: 153-155.
- [8] Sun LY, Touraud C, Charbonnier C et al. Modification of phenotype in *Belgian endive* (*Cichorium intybus*) through genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes*: conversion from biennial to annual flowering. *Transgenic Res*, 1991b, 1: 14-22
- [9] Pellegrineschi A, Damon JP, Valtorta N et al. Improvement of ornamental characters and fragrance production in lemon-scented geranium through genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. *Biotechnology*, 1994, 12: 64-68
- [10] Jin H, Jia JF, Hao JG. Hairy root regeneration from protoplasts of *Agrobacterium rhizogenes* transformed cell line of *Medicago sativa* L. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2003, 39(2): 208-209
- [11] Xu ZQ (徐子勤), Jia JF (贾敬芬). Transformation of *Onobrychis viciifolia* hypocotyls with *Agrobacterium rhizogenes* A4 and plant regeneration of transforming tissues. *Journal of Lanzhou University* (Natural Sciences) (兰州大学学报(自然科学版)), 1994, 30(2): 96-100
- [12] Bu HY (步怀宇), Jing JZ (景建洲), Jia JF (贾敬芬). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and the regeneration of transformants in *Alagi pseudalaghi*. *Acta Biologine Experimentalis Sinica* (实验生物学报), 2001, 34(20): 81-87
- [13] Murashige T, Skoog F. Revised media for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 1962, 15: 473-497
- [14] Tanaka N, Hayawa M, Mano Y et al. Infection of turnip and radish storage roots with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports*, 1985, 4: 74-77
- [15] Clark MS. Plant Molecular Biology-A Laboratory Manual (植物分子生物学实验手册). Translated by Gu Hong-Ya et al. (顾红雅等译) Beijing: China Higher Education Press, 1998, pp. 4-7
- [16] Zhou YQ (周延清). ISSR and RAPD-based genetic diversity detection, *fad* gene cloning and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in three economic plants (*Rehmannia glutinosa* Libosch, *Dioscorea opposita* Thunb and *Glycine max* Merr). Ph.D. Dissertation (博士论文), Supervisor: Prof. Jingfen Jia. 2005
- [17] Shi HP (施和平), Li L (李玲), Pan RC (潘瑞炽). Effects of polity and NAA concentration on transformation of cucumber cotyledons by *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Tropical and Subtropical Botany* (热带亚热带植物学报), 1997, 5(3): 43-47

- [18] Zhang GY(张根义), Xu W(徐武), Li M(李鸣) *et al.* The primary research of plant cell competence. *Journal of Agricultural Biotechnology*(农业生物技术学报), 1997, 5(1):100-104
- [19] Fu CX(付春祥), Jin ZP(金治平), Yang R(杨睿) *et al.* Establishment of *Saussurea involucrata* hairy roots culture and plantlet regeneration. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2004, 20(3):366-371
- [20] Katia H, Ipp J, Brown TA. Enhanced transformation of tomato co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* C58 C1 Rif^r:pGSFR1161 in the presence of acetosyringene. *Plant Cell Reports*, 1993, 12:422-425
- [21] Yoshikawa T, Furuya T. Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.* 1987, 6(6):449
- [22] Dessaux Y, Petit A. Opines as screenable for plant transformation. *Plant Molecular Biology Manual*, 1994, C3:1-12
- [23] Di CA, Costantino P, Spano L. Cell commitment and *rolB* gene expression in the induction of root differentiation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1996, 46:203-209
- [24] Liang J(梁机), Chen XY(陈晓阳), Lin SZ(林善枝) *et al.* Advance of studies on *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid *rol* genes and their applications for forest tree genetic improvement. *Chinese Bulletin of Botany*(植物学通报), 2002, 19(6):650-658
- [25] Lin SZ(林树柱), Cao YP(曹越平), Wei ZM(卫志明). Genetic transformation of soybean mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2004, 20(6):817-820
- [26] Liu YZ(刘艳芝), Liu L(刘莉), Li JB(李俊波) *et al.* Analysis of tissue culture system and gene transformation receptor system of soybean. *Jilin Agricultural Science*(吉林农业科学), 2000, 25(6):12-14
- [27] David C, Petit A, Tempe J. T-DNA length variability in mannopine hairy root: more than 50 kilobase pairs of pRi T-DNA can integrate in plant cells. *J Plant Cell Reports*, 1988, 7:92-95
- [28] Ooms G, Atkinson J, Bossen M *et al.* TL-DNA from *Agrobacterium rhizogenes* plasmid pRi1855 reduces osmotic pressure in transformed plants grown *in vitro*. *Planta*, 1986, 168: 106-112