

农杆菌介导 *GUS* 基因对多年生黑麦草转化的研究

张振霞^{1,2}, 刘萍¹, 杜雪玲³, 苏乔⁴, 杨中艺^{1*}

(1. 中山大学生命科学学院, 广州 510275; 2. 韩山师范学院生物系, 广东潮州 521041; 3. 安徽淮北煤炭师范学院生物系, 安徽淮北 235000; 4. 大连理工大学环境与生命学院, 辽宁大连 116024)

摘要: 通过检测愈伤组织中 *GUS* 基因的瞬时表达, 研究农杆菌 LBA4404/pCAMBIA1301 介导多年生黑麦草的转化体系。通过对多年生黑麦草瞬时表达率的比较, 确立了其遗传转化的最佳优化条件。研究发现, 多年生黑麦草不同品种的转化率在 25%~45% 之间变化。多年生黑麦草遗传转化最佳优化条件是预培养 10 d 的胚性愈伤组织、浓度为 0.5~0.8 OD 的农杆菌菌液以及 2 d 共培养时间。在共培养基中添加 100 μmol/L 乙酰丁香酮能有效地提高植物瞬时表达率。两种侵染处理方法比较结果为滤纸滴加法比浸泡法更优。转化后对愈伤组织的干燥处理能抑制农杆菌过度繁殖, 能改善愈伤状态, 有利于提高转化率。

关键词: 多年生黑麦草; 农杆菌转化; *GUS* 基因

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2007)01-0121-06

Study on *Agrobacterium*-mediated *GUS* transformation for *Lolium perenne* L.

ZHANG Zhen-Xia^{1,2} LIU Ping¹, DU Xue-Ling³,
SU Qiao⁴, YANG Zhong-Yi^{1*}

(1. College of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China; 2. Department of Biology, Hanshan Normal College, Chaozhou 521041, China; 3. Department of Biology, Huaibei Coal Industry Normal College, Huaibei 235000, China; 4. School of Environmental and Biological Sciences, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation system of *Lolium perenne* was studied by using *GUS* gene transient expression method. Mature seed derived callus from *L. perenne* was transformed by *GUS* gene containing *A. tumefaciens* LBA4404/pCAMBIA1301. Frequency of the transformation was detected, and the optimal conditions for *L. perenne* genetic transformation were determined. It was found that the transformation frequency varied from 25%~45% according to different genotypes (variety). The optimal conditions to get higher transformation efficiency were 2 days co-cultivation with 0.5~0.8 OD *A. tumefaciens* solution in dark after 10 days pre-culturing. The transformation frequency was significantly improved by adding 100 μmol/L acetosyringone into co-cultivation medium. Adding *A. tumefaciens* solution on surface of filter paper was found to be a better infecting method of *A. tumefaciens* rather than suspending in *A. tumefaciens* solution. The partial desiccation treatment after transformation was beneficial to prevent over-growth of *A. tumefaciens* and increase the transformation efficiency.

Key words: *Lolium perenne*; *Agrobacterium*-mediated transformation; *GUS* gene

多年生黑麦草作为草坪草种, 在国外已经有许多通过常规育种方法育成的品种, 在生态环境改善、水土保持、城市绿化、运动场建设等方面发挥了重要的作用。但是, 由于我国草坪草育种工作起步很晚, 至

收稿日期: 2005-04-11 修回日期: 2005-10-13

基金项目: 国家转基因植物研究与产业化专项 (J2002-B-006) [Supported by the National Special Program for Research and Industrialization of Transgenic Plants (J2002-B-006)]

作者简介: 张振霞(1975-), 女, 甘肃兰州人, 博士, 主要从事生物技术及草业科学方面的研究, (E-mail) zhangzhenxia@yahoo.com.cn.

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: adszy@zsu.edu.cn)

今尚无真正的草坪草育成品种,因此,与发达国家相比,我国的草坪草育种工作极其落后,有必要通过非常规手段加快新品种的培育工作。其中,通过转基因技术导入优良性状是培育新品种的较快速的途径,尤其是对于多年生的草坪草种而言,这一育种方法有着传统育种方法不可比拟的优势(闫新甫,2003)。在草坪草的转基因技术方面,国内外已经开展了一些研究,也取得了一些成果,但在所查的文献中尚未见应用该技术手段育成的品种。其中,在多年生黑麦草的转基因技术研究方面已有人开展了一些工作,大多数采用基因枪转化方法(Dalton 等,1999),在农杆菌遗传转化方面的研究很少(Devereaux 等,2002)。为此,有必要在多年生黑麦草农杆菌遗传转化体系方面开展更多的研究,为建立稳定而有效的多年生黑麦草转基因育种技术体系奠定基础;同时本研究还使用了多个品种开展试验,以探讨农杆菌介导 GUS 基因对多

年生黑麦草转化的方法及基因型对转化效率的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试的多年生黑麦草(*Lolium perenne* L.)品种旋风(cv. Pirouette)、百宝(cv. Barball)及和平(cv. Peace)种子由美国百绿有限公司北京代表处和北京克劳沃草业技术开发中心提供。其中品种旋风和百宝是草坪型,品种和平是牧草型。

1.1.2 农杆菌菌株及质粒 根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 LBA4404/pCAMBIA1301 由大连理工大学安利佳教授提供。载体 pCAMBIA1301 的 T-DNA 区含有潮霉素抗性(HYG)基因和 β -葡萄糖苷酸酶(GUS)基因,在 GUS 基因编码区内有一内含子,因此 GUS 基因只能在植物中表达而不能在细

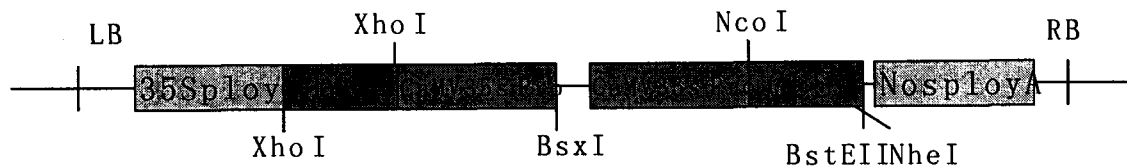


图 1 pCAMBIA 1301 质粒图谱

Fig. 1 The plasmid map of pCAMBIA 1301

菌中表达(图 1)。

1.1.3 供试培养基 植物培养基:MS 基本培养基+5 mg/L 2,4-D+0.05mg/L BAP+2 mg/L ABA+30 g/L 蔗糖+3~4 g/L Phytegal, pH5.8;农杆菌培养基:胰蛋白胨 5 g/L,牛肉浸膏 5 g/L,酵母提取物 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.493 g/L,蔗糖 5 g/L, pH 值 7.0。

2 实验方法

2.1 农杆菌培养和植物转化

挑取-70℃保存的农杆菌转化子在 YEB 培养基上划线,28℃下暗培养;挑取单菌落于 YEB 液体培养基中,28℃下 200 rmp 摇床振荡培养。在波长 600 nm 下用分光光度计测定农杆菌菌液紫外吸收值 OD 达到 0.8 时,重悬培养。当菌液 OD 值达到 0.5~0.6 时,用于转化。将转化材料浸没于菌液中,28℃下 100 rmp 振荡 20 min,再静置 10 min。再将转化材料在无菌滤纸上吹干,转移到共培养基上,在 25℃下共培养后,进行 GUS 组织化学染色以检测 GUS 基因瞬间表达,并计算瞬间表达率。其计算方法是:GUS 阳

性发生率(%)=目测到的 GUS 斑数/检测的外植体数 \times 100。

2.2 GUS 活性的组织化学染色分析

经与农杆菌共培养后的愈伤组织中 GUS 基因的瞬间表达按 Jefferson 的组织化学染色法进行(Jefferson,1987)。

染色方法:取待检测的植物组织于 1.5 mL 离心管中,加入 GUS 缓冲液 1 mL 以浸没组织块,再加入 5%(V/V)用量的 GUS 染色液,混匀后 37℃下保温 16~24 h,用 70%乙醇固定后取出组织置解剖镜下观察染色结果。

2.3 实验处理

不同共培养时间对黑麦草转化率的影响实验设置了 1、2、3、4 d 四个处理;在转化过程中,通过添加和不添加乙酰丁香酮(AS,100 μ mol/L)处理,测定 AS 对黑麦草愈伤转化率的影响;比较了转化后干燥处理与没有干燥处理的愈伤转化率,干燥处理是将农杆菌转化后的愈伤放在铺有一层无菌滤纸的培养皿中,1 d 后再移至培养基;比较了两种侵染方式的转化率:一种是菌液直接浸染愈伤,另一种是培养基上铺一层

无菌滤纸,愈伤转至滤纸上,然后将菌液滴加到愈伤;将转化受体转至高渗培养基(继代培养基+30 mg/L 甘露醇),进行 10 d 的预培养后进行农杆菌转化,观察预培养时间对转化效率的影响。在农杆菌菌液浓度对转化效率的影响实验中,设置了四个农杆菌 OD0.5、OD0.8、OD1.0 和 OD1.5 浓度;研究两种不同侵染处理方法(浸泡法和滤纸滴加法)对多年生黑麦草转化率的影响;共培养时不同光照条件对黑麦草转化频率的影响,采用了全黑暗和 12 h 光照/12 h 黑暗两种培养条件。以上实验处理都是经过共培养 2 d 后,进行 GUS 组织化学染色分析。每个实验重复 3 次,数据采用 SAS 8.0 软件作差异显著性检测。

表 1 共培养时间对不同黑麦草愈伤组织
转化瞬间表达率的影响

Table 1 Effect of the days for co-culture with
A. tumefaciens on GUS transient expression
in callus of *L. perenne*

品种 Variety	共培养 天数 Co- culture days	转化愈伤数 No. of transforma- tion callus	瞬间表达 愈伤数 No. of transient expression callus	瞬间转 化率 ¹⁾ Transient expression rate (%)	
和平	1d	42	9	21.43 c	
Peace	2d	33	15	45.45 aA	
	3d	32	13	40.63 b	
	4d	38	16	42.11 ab	
百宝	1d	46	6	13.04 c	
	2d	44	11	25.00 aC	
	3d	48	10	20.83 b	
Barball	4d	50	10	20.00 b	
	旋风	1d	51	8	15.69 c
		Pirouette	2d	46	17
3d			51	14	27.45 b
4d	49		14	28.57 b	

¹⁾根据 LSD 检验结果,同品种内不同小写字母表示共培养时间处理间差异显著($P < 0.05$);不同品种间不同大写字母表示相同共培养时间(2 d)处理下不同品种间差异显著($P < 0.01$);下同。

¹⁾Different small letters within the same variety indicate the difference between the Co-culture time treatments being significant at $P < 0.05$ level according to ANOVA and LSD test. Different capital letters among different varieties indicate significant difference between varieties under the 2d Co-culture treatment, at $P < 0.01$ level according to ANOVA and LSD test. The same as follows.

3 结果与分析

3.1 共培养时间对多年生黑麦草瞬间表达率的影响

多年生黑麦草与农杆菌分别共培养 1、2、3、4 d 后的瞬间转化频率见表 1。转化受体与农杆菌共培养 1 d 后的表达率较低;共培养 2 d 后表达率明显提

高;经 3 d 共培养后,瞬间表达率出现轻微的降低;继续延长共培养时间,即受体材料与农杆菌共培养 4 d 或 4 d 以上,由于细菌生长过度抑制了植物细胞的生长,使得转化受体的瞬间表达率出现下降。以最高值计,多年生黑麦草的和平、百宝和旋风品种的 GUS 基因转化率依次为 45.45%、25% 和 36.96%,均出现在共培养 2 d 的处理;差异显著性分析结果表明,在大多数情况下,共培养 2d 的处理所得结果显著高于其它处理,且品种和平的转化率极显著高于其他品种。

3.2 AS 对多年生黑麦草转化率的影响

在转化农杆菌菌液和共培养过程中添加 100 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰丁香酮(AS)对多年生黑麦草愈伤转化率的影响如表 2 所示。添加 AS 大大提高了多年生黑麦草各品种转化受体的转化频率,GUS 在旋风的瞬间表达率显著增加了 61.3%;在和平则显著增加了 40.3%;在百宝只增加了 18.8%,差异不显著。

表 2 乙酰丁香酮(AS)对 GUS 基因瞬间表达率的影响
Table 2 Effect of acetosyringone(AS) on efficiency of
GUS transient expression in callus of *L. perenne*

品种 Variety	处理 Treat- ments	转化愈 伤数 No. of trans- forma- tion callus	瞬间表 达数 No. of transient expression callus	瞬间转 化率 Transient expression rate (%)	增加率 Incre- ment rate (%)
和平	-AS	71	23	32.39 b	40.3
Peace	+AS	33	15	45.45 a	
百宝	-AS	57	7	21.05 b	18.7
Barball	+AS	44	11	25.00 ab	
旋风	-AS	48	11	22.92 b	61.3
Pirouette	+AS	46	17	36.96 a	

3.3 不同侵染处理方法对多年生黑麦草转化率的影响

不同侵染处理方法对转化效率的影响如表 3 所示。和平和百宝两个品种在采用铺滤纸滴加法的情况下,其 GUS 瞬间表达率均高于采用浸泡法的结果,和平和百宝 GUS 阳性瞬间表达率分别显著增加了 37.88% 和 20.25%。

3.4 干燥处理对多年生黑麦草转化率的影响

经干燥处理和未干燥处理的黑麦草转化受体的 GUS 瞬间表达率如表 4 所示。两种处理后 GUS 瞬间表达率的差异很明显,旋风品种的 GUS 瞬间表达率从未干燥的 27.08% 提高到经吹干的 36.96%,增加了 36.48%;和平则从 28.95% 提高到 45.45%,增加了 57.17%。经过吹干处理的转化受体经过 2~4 d 共培养后没有观察到农杆菌的生长,而没有经过干燥

表3 不同侵染处理方法对黑麦草愈伤转化瞬间表达率的影响

Table 3 Effect of infecting methods on GUS transient expression in callus of *L. perenne*

品种 Variety	方法 Method	转化愈伤数 No. of transformation callus	瞬间表达愈伤数 No. of transient expression callus	瞬间转化率 Transient expression rate (%)	增加率 Increment (%)
和平 Peace	浸泡法 Suspending	58	20	34.48 b	37.88
	滤纸滴加法 Adding in filter paper	61	29	47.54 a	
百宝 Barball	浸泡法 Suspending	47	24	51.06 b	20.25
	滤纸滴加法 Adding in filter paper	57	35	61.4 a	

表4 预培养、干燥处理对黑麦草转化 GUS 基因瞬间表达率的影响

Table 4 Effect of preculture and dryness on efficiency of transient expression of GUS in callus of *L. perenne*

项目 Items	旋风 Pirouette				和平 Peace			
	不干燥 Un-drying	干燥 Drying	预培养 Pre-culture	无预培养 Without preculture	不干燥 Un-drying	干燥 Drying	预培养 Precul- ture	无预培养 Without preculture
转化愈伤数 No. of transformation callus	48	46	46	39	38	33	33	34
瞬间表达愈伤数 No. of transient expression callus	13	17	17	8	11	15	12	6
瞬间转化率 Transient expression rate (%)	27.08 b	36.96 a	36.96 a	20.51 b	28.95 b	45.45 a	36.36 a	17.65 b
增加率 Increment (%)	36.48	78.45	57.17	106.00				

表5 农杆菌菌液浓度和光照培养条件对黑麦草(和平)转化 GUS 基因瞬间表达率的影响

Table 5 Effect of concentration of *A. tumefaciens* solution and light period on efficiency of GUS transient expression in callus of *L. perenne* var. *peace*

项目 Items	农杆菌菌液浓度(OD值)OD Concentration				共培养光条件 Light condition	
	0.5	0.8	1.0	1.5	黑暗 Dark	光照 Light
转化愈伤数 No. of transformation callus	33	45	41	49	33	26
瞬间表达愈伤数 No. of transient expression callus	15	20	13	6	15	6
瞬间转化率 Transient expression rate (%)	45.45 a	44.44 a	31.71 b	12.45 c	45.45 a	23.08 b

的愈伤在 2 d 共培养后便长出了农杆菌。

3.5 预培养对多年生黑麦草转化率的影响

农杆菌侵染前对经过长时间培养的愈伤组织进行 10 d 预培养,可以明显地改善愈伤的转化状态,提高转化率(表 4)。预培养后多年生黑麦草旋风和平的 GUS 瞬间表达率要比没有经过预培养的增加 78.45%和 106%。

3.6 农杆菌菌液浓度对多年生黑麦草愈伤转化率的的影响

用不同浓度(OD0.5、OD0.8、OD1.0 和 OD1.5)的农杆菌转化品种和平的 GUS 瞬间表达率如表 5 所示。农杆菌菌液浓度在 OD0.5 和 OD0.8 时 GUS 瞬间转化率最高,且差异不显著,都在 40%左右;OD1.0 时的瞬间转化率有所下降,为 31.71%,而 OD1.5 时 GUS 瞬间表达率明显降低到 12.45%,均显著低于 OD0.5~0.8 处理。因此,农杆菌菌液浓度应以不超过 OD0.8 为宜。

3.7 共培养时不同光照条件对黑麦草转化频率的影响

全黑暗条件和 12 h 光照/12 h 黑暗培养条件下

共培养和平转化体后的检测结果见表 5。全黑暗培养下愈伤组织的转化频率显著高于 12 h 光照/12 h 黑暗培养条件下的,显示在黑暗条件下农杆菌对植物受体的浸染更容易些。

4 讨论

4.1 基因型对转化效率的影响

影响农杆菌转化禾本科植物的因素有很多,包括转化材料的基因型(品种)、外植体种类、农杆菌菌株和质粒载体、培养基组分、共培养时间、浸染方式、菌液浓度、转化前预培养等等,凡是影响农杆菌 Vir 基因活化和愈伤组织生长和再生的因素都可能影响到多年生黑麦草的成功转化(黄霞等,2002)。

翟文学等(2000)认为,转化效率的差异反应了受体品种遗传背景的不同,例如在水稻各品种间,籼稻的转化效率明显低于粳稻。但以往在这一方面的研究是比较欠缺的。品种的差异性与细胞的生理状态有关,具体说来与细胞受体的生理反应(如小分子

信号物质的分泌)、细胞内源激素水平(影响细胞的生长、分化)、细胞壁的结构(影响细菌吸附)等有关(Rashid 等, 1996)。本研究中不同多年生黑麦草品种对农杆菌转化的响应在效率上有明显的差异, 在相同条件下获得的不同品种的转化率范围为 25%~45%, 表明多年生黑麦草遗传转化所用材料的选择对于提高转化效率是很有意义的。所以在进行转化时有必要对受体材料进行考虑和选择。与此同时, 不同品种所适用的愈伤组织培养基成分也应有所不同, 因此, 应该通过筛选研究作出适当的调整。

4.2 AS 对多年生黑麦草转化效率的影响

绝大多数单子叶植物不是农杆菌的天然寄主, 主要原因是由于其不能积累足够的酚类物质, 从而难以激活农杆菌的侵染能力, 因此通过添加酚类诱导物可以促进农杆菌的转化效率(Vain 等, 1993; Hiei 等, 1994), 其中 AS 已被证明是诱导效果最好的酚类化合物(Moore 等, 1992)。尽管这种诱导作用并不是农杆菌介导转化所必需的, 但可提高转化效率(王力等, 1999)。例如, 在水稻转化中添加 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 AS 可大大提高转化效率(Hiei 等, 1994)。然而也有研究结果表明, 对于某些植物, 如草莓、芹菜等的转化, AS 的使用则是无效甚至有害的(James 等, 1990)。在本研究不添加 AS 的情况下, 多年生黑麦草的 GUS 瞬间转化率只有 20~30%, 说明多年生黑麦草对农杆菌转化体系的敏感性不是很强。在农杆菌浸染液和共培养基中加入了 100 $\mu\text{mol/L}$ AS 后, 多年生黑麦草的 GUS 瞬间转化率最高提高了 61%, 证明了多年生黑麦草可以通过 AS 提高农杆菌的侵染能力。

4.3 共培养时间对多年生黑麦草农杆菌转化体系转化效率的影响

农杆菌和外植体的共培养在整个转化过程中是非常重要的环节, T-DNA 的转移及整合都在共培养时间内完成。很多实验表明农杆菌细胞的生长状态和菌液的浓度是转化成功的关键因素(Hiei 等, 1997), 当浓度过低时, 不利于基因的转入, 但如果菌液浓度过高, 菌体本身易相互聚结, 从而影响其在外植体上的附着, 同时还可能引起以下问题: 一是共培养后农杆菌不能被有效抑制; 二是筛选培养基中加入的抑制农杆菌的抗生素的量要大大增加, 不仅提高了实验成本, 而且控菌效果也不会太好。共培养时间对转化率有很大影响, 不同物种、外植体种类, 最佳共培养时间是有差异的(农友业等, 2005)。在多年生

黑麦草愈伤组织与农杆菌的共培养中, 2 d 培养时间和相对较低的菌液浓度看来是比较有利的。

4.4 影响多年生黑麦草农杆菌转化体系的转化效率的其他因素

本研究结果还表明, 预培养、培养温度、光周期等也影响多年生黑麦草的农杆菌转化效率, 这与以往许多研究结果是相吻合的。例如, 对于预培养和高渗培养, 黄益洪等(2003)认为预培养 10~15 d 的水稻幼胚愈伤组织具有较高的瞬间表达率和再生能力。另外, 添加 30mg/L 甘露醇的高渗处理还可以使细胞失水形成内高外低的渗透压梯度, 有利于植物细胞在极短时间内吸收其周围的农杆菌, 对转化有利(黄霞等, 2002)。

在干燥处理方面, 周玲艳等(2003)在农杆菌转化水稻的研究中, 对干燥处理和非干燥处理后的抗性愈伤组织获得率进行了对比。经干燥处理后, 抗性愈伤组织转化平均获得率为 4.13%, 而不经干燥处理, 抗性愈伤组织获得率仅为 0.18%, 结果表明干燥处理不仅可以有效杀死农杆菌, 而且可以改善愈伤组织状态, 提高转化率(田文忠等, 1994)。可见, 影响多年生黑麦草农杆菌转化效率的许多因素具有与农杆菌转化水稻时相似的作用效应。

不同侵染处理方法对黑麦草转化率的影响中, 铺滤纸滴加法获得的 GUS 瞬时表达率明显要高于采用浸泡法, 可能是浸泡法转化植物受体时要经过摇床振荡、清洗、干燥等过程, 这会对受体细胞造成一定的损伤, 而铺滤纸滴加法则不需要这些过程, 避免了这些操作对转化受体的伤害。

5 结论

本研究中, 用农杆菌 LBA4404/pCAMBIA1301 转化多年生黑麦草的和平、百宝和旋风品种, 检测 GUS 的瞬间表达, 以优化多年生黑麦草的农杆菌转化体系。获得的主要结论如下: 以 2 d 作为最佳共培养时间, 滤纸滴加法比浸泡法更优, 黑暗条件下的高; 农杆菌菌液的 OD₆₀₀ 以 0.5 之间为宜; 转化后对愈伤的干燥处理有利于改善愈伤状态, 提高转化率, 降低农杆菌污染程度; 预培养 10 d 左右的胚性愈伤组织是较好的转化受体; 100 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰丁香酮的施加有利于提高植物的瞬间表达率。优化条件下获得的多年生黑麦草和平、百宝和旋风品种最高 GUS

瞬间转化表达率依次为 45.45%、25%和 36.96%。

参考文献:

- 闫新甫. 2003. 转基因植物[M]. 北京: 科学出版社, 512—515
- 翟文学, 李晓兵, 田文忠, 等. 2000. 由农杆菌介导将白叶枯病抗性基因 Xa21 转入我国的 5 个水稻品种[J]. 中国科学(C 辑), 30(2): 200—206
- Dalton SJ, Bettany AJE, Timmis E, et al. 1999. Co-transformed, diploid *Lolium perenne*, *L. multiflorum* and *L. temulenrum* plants produced by microprojectile bombardment[J]. *Plant Cell Rep*, 18: 721—726
- Devereaux A. 2002. Transformation and over expression of a MnSOD gene in perennial ryegrass[J]. *Plant Cell Tiss Org*, 95: 111—116
- Hiei Y, Komari T, Kubo T. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Plant Mol Biol*, 35: 205—218
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. 1994. Efficient transformation of rice mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA[J]. *Plant*, 6(2): 271—282
- Huang X(黄霞), Huang XL(黄学林), Li Z(李哲). 2002. Factors affecting the early phase of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of banana(影响根癌农杆菌介导的香蕉基因转化早期的主要因素)[J]. *Acta Sci Nat Univ Sun-yatseni* (中山大学学报自然科学版), 41(5): 68—72
- Huang YH(黄益洪), Zhou MP(周森平), Ye XG(叶兴国). 2003. Study on the development of transgenic wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*(农杆菌介导法获得小麦转基因植株的研究)[J]. *Acta Agron Sin*(作物学报), 28(4): 510—515
- James DJ, Uratsu S, Cheng J, et al. 1993. Acetosyringone and osmoprotectants like betaine or proline synergistically enhance *Agrobacterium*-mediated transformation of apple[J]. *Plant Cell Rep*, 12: 559—563
- Jefferson RA. 1987. Assaying chime rice genes in plants: The GUS gene fusion system plant[J]. *Mol Biol Rep*, 5: 387—405
- Moore GA, Jacono CC, Neidigh JL, et al. 1992. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plant[J]. *Plant Cell Rep*, 11: 238—242
- Nong YY(农友业), He YQ(何勇强), Qin Y(覃燕), et al. 2005. Study of influence factors on transformation of maize embryogenic callus by *Agrobacterium*(影响农杆菌介导玉米愈伤组织遗传转化因素的研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 25(2): 142—144
- Rashid H, Yokoi S, Toriyama K, et al. 1996. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in indica rice[J]. *Plant Cell Rep*, 15: 727—730
- Tian WZ(田文忠), Iann R, Elunialai S, et al. 1994. Factors influencing the plant regeneration frequency in indica rice callus cultures(提高籼稻愈伤组织再生频率的研究)[J]. *Acta Genet Sin*(遗传学报), 21(3): 215—18
- Vain P, Michael D, John J. 1993. Osmotic treatment enhances particle bombardment mediated transient and stable transformation of maize[J]. *Plant Cell Rep*, 12: 84—88
- Wang L(王力), Zhang YS(张云孙), Chen Q(陈屹). 1999. Study on the influence factors of the frequency of *Agrobacterium*-mediated transformation in rice(*Oryza sativa* L.) (影响根癌农杆菌转化水稻频率的因素研究)[J]. *J Yunnan Univ*(云南大学学报), 21(2): 116—119
- Zhou LY(周玲艳), Jiang DG(姜大刚), Wu H(吴豪). 2003. Optimization of the conditions of *Agrobacterium*-mediated transformation in *Oryza sativa*(农杆菌介导水稻转化条件的优化)[J]. *J South China Agric Univ*(Nat Sci Edi)(华南农业大学学报自然科学版), 24(3): 43—45
- Tenhunen JD, Percy RW, Lange OL. 1987. Diurnal variations in leaf conductance and gas exchange in natural environments [M]//Zeiger F, Farquhar GD, Cowan IR (eds). Stomatal Function. Stanford: Stanford University Press: 323—351
- Tyree MT, Sperry JS. 1989. Vulnerability of xylem to cavitation and embolism[J]. *Ann Rev Plant Physiol*, 40: 19—38
- Valladares F, Percy R. 2002. Drought can be more critical in the shade than in the sun: a field study of carbon gain and photoinhibition in a Californian shrub during a dry El Nino year [J]. *Plant Cell Environ*, 25: 749—759
- Walker L. 1989. Automated measurement of leaf photosynthetic O₂ evolution as a function of photon flux density[M]. Philosophical transactions of the Royal Society, London B, 323: 313—326
- Whitehead D. 1998. Regulation of stomatal conductance and transpiration in forest canopies[J]. *Tree Physiol*, 18: 633—644
- Xiang WS(向悟生), Li XK(李先琨), Lu SH(吕仕洪), et al. 2004. The daily dynamics of primary microclimatic factors in the different successional of karst vegetation in Guangxi(广西岩溶植被演替过程中主要小气候因子日变化特征)[J]. *Ecol Sci*(生态科学), 23(1): 25—31
- Xu DQ(许大全). 1997. Some problems in stomatal limitation analysis of photosynthesis(光合作用气孔限制分析中的一些问题)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), 4: 241—244

(上接第 61 页 Continue from page 61)

[M]//Woody Plant Communities, vol. VI. New York: Academic Press Inc: 582

- Leitsch J, Schnettger B, Critchley C, et al. 1994. Two mechanisms of recovery from photoinhibition in vivo: reactivation of photosystem II related and unrelated to D1-protein turnover [J]. *Planta*, 194: 15—21
- Li YB(李阳兵), Tan Q(谭秋), Wang SJ(王世杰). 2005. Current status, problems analysis and basic framework of karst rocky desertification research(喀斯特石漠化研究现状、问题分析与基本构架)[J]. *Sci Soil Water Conserv*(中国水土保持科学), 3(3): 27—34
- Long SP, Humphries S, Falkowski PG. 1994. Photoinhibition of photosynthesis in nature[J]. *Ann Rev Plant Physiol*, 45: 633—662
- Somersalo S, Krause GH. 1989. Photoinhibition at chilling temperature: uorescence characteristics of unhardened and cold-acclimated spinach leaves[J]. *Planta*, 177: 409—416
- Sparks J P, Black RA. 1999. Regulation of water loss in populations of *Populus trichocarpa*: the role of stomatal control in preventing xylem cavitation[J]. *Tree Physiol*, 19(7): 453—459
- Takahiro E, Toshinori O, Masasyuki T, et al. 2002. Estimation of net photosynthetic rate based on in-situ hyperspectral data [J]. *Agric Fore Methodol*, 41: 564—570