

根癌农杆菌介导的玫瑰茄愈伤组织的遗传转化

谢秀祯¹, 林俏慧², 郭勇^{2*}

(1. 海南师范大学 生物系, 海口 571158; 2. Department of Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology, Iowa State University, Iowa 50011, 美国; 3. 华南理工大学 生物科学与工程学院, 广州 510640)

摘要: 以根癌农杆菌 LBA4404 和 EHA105 为供体菌株, 对玫瑰茄愈伤组织进行了转化条件的研究, 建立了一套玫瑰茄愈伤组织遗传转化体系。利用该转化体系获得了 2 个稳定表达新霉素磷酸转移酶活性的玫瑰茄转化细胞系。GUS 活性组织化学检测和 PCR 扩增鉴定的结果表明, 愈伤组织的转化率为 4%。说明采用农杆菌介导法将外源基因经愈伤组织导入玫瑰茄细胞是可行的。

关键词: 玫瑰茄愈伤组织; 根癌农杆菌; 遗传转化; β -葡萄糖苷酸酶; 新霉素磷酸转移酶 II

中图分类号: Q812, Q943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2007)06-0903-06

A genetic transformation of roselle callus mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

XIE Xiu-Zhen¹, LIN Qiao-Hui², GUO Yong^{2*}

(1. Department of Biology, Hainan Normal University, Haikou 571158, China; 2. Department of Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology, Iowa State University, Iowa 50011, USA; 3. College of Bioscience and Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In present paper, the basic conditions for the genetic transformation of Roselle callus were investigated by using *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 and EHA105, harboring pBI121, as donor strains and a genetic transformation system of Roselle callus was initiatively established, by which two transgenic Roselle cell lines expressed stably NPTII activity were obtained. The results of GUS histochemical assays and PCR amplification demonstrated that the overall transformation rate of Roselle callus was 4%. It is feasible to use *Agrobacterium*-mediated method to introduce exogenous gene into Roselle cells via callus.

Key words: Roselle callus; *Agrobacterium tumefaciens*; genetic transformation; β -glucuronidase; Neomycin phosphotransferase II

玫瑰茄 (*Hibiscus sabdariffa*) 是锦葵科木槿属一年生草本植物, 原产非洲苏丹, 广布于世界各热带、亚热带地区。玫瑰茄是一种具有多种经济用途的作物, 我国西南、华南和华东地区均有栽培。玫瑰茄花萼所含的花青苷色素是一种天然红色食用色素, 在国内外已应用于食品及饮料工业 (李玉萍,

2003); 玫瑰茄细胞产生的花青苷, 具有抗氧化、抗突变作用 (Pi-Jen 等, 2002), 在临床上已用于治疗高血压、心脏病、发烧、发炎、肝脏机能障碍和免疫系统紊乱等疾病 (Dafallah 等, 1996; Haji 等, 1999)。另据报道, 玫瑰茄的提取物具有抗肿瘤、抗白血病和抑制由胆固醇引起的动脉粥样硬化的效果 (Chen 等,

收稿日期: 2006-09-25 修回日期: 2007-02-08

基金项目: 广东省重点科技攻关项目 (A301020201) [Supported by Key Technologies Research and Development Program of Guangdong Province (A301020201)]

作者简介: 谢秀祯 (1960-), 男, 海南儋州市人, 博士, 教授, 主要从事基因工程的研究, E-mail: xiexiuzhen@sina.com.

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

2003)。最近几年,Chang等(2005)及Lin等(2005)通过研究初步揭示了玫瑰茄提取物诱导人前髓白血病细胞、胃癌细胞发生细胞凋亡的机理,从而为将玫瑰茄提取物开发成肿瘤预防和治疗药物奠定了理论基础。

自20世纪90年代以来,国内外学者对利用玫瑰茄细胞培养技术生产花青苷进行了广泛的研究,并取得了可喜的成果(阮茜等,1999;朱新贵等,1998;郑穗平等,1998),但从目前的研究结果来看,生产周期长(约16d)已经成为制约这一技术走向产业化的瓶颈之一。因此,如何获得快速增殖的玫瑰茄细胞系已成为一个急需研究的课题。一条可供选择的技术路线就是通过植物基因工程技术将诸如拟南芥 *Phytosulfokine- α* 的基因(Yang等,2000;林俏慧等,2005)导入玫瑰茄细胞,以期获得快速增殖的细胞系,在此基础上筛选花青苷高产细胞株。本文作者曾报道了利用根癌农杆菌对玫瑰茄无菌苗的子叶和下胚轴进行遗传转化的技术条件(谢秀贞等,2006),但通过农杆菌介导转化玫瑰茄转愈伤组织以获得转基因细胞系的条件和技术方案至今尚未见报道。玫瑰茄遗传转化技术的研究将为该作物的遗传育种,特别是利用代谢工程培育花青苷高产新品种及提早开花的新品种创造条件。

1 材料与方法

1.1 材料

(1)植物材料:玫瑰茄(*Hibiscus sabdariffa* L.)种子来源于华南植物园引种部,消毒后播于不加激素的B5固体培养基(附加3%蔗糖)上,于 25 ± 1 °C培养箱中萌发,取10~12d龄幼苗为实验材料。(2)农杆菌菌株和质粒:根癌农杆菌菌株为LBA4404(*str^r*)和EHA105(*Cm^r*),均含植物表达载体pBI121,该载体携带有*gus*基因和*npt-II*基因,抗性标记为Kan。(3)酶和试剂:*TaqDNA*聚合酶购自大连宝生物公司;PCR引物由上海Bioasia生物技术有限公司合成;卡那霉素(Km, Sigma公司)、硫酸链霉素(Str, Amresco公司)、乙酰丁香酮(AS, Aldrich公司)、X-Gluc(Genview公司)购自北京鼎国生物技术有限责任公司;头孢霉素(Cefo)、氯霉素(Cm)及其他试剂为国产或进口分装分析纯。(4)培养基:愈伤组织诱导培养基成分为B₅培养基附加1mg/L 2,4-D、0.1mg/L KT和3%蔗糖,pH5.8。

侵染液为B₅培养基附加3%蔗糖,pH5.8。预培养基、共培养基和愈伤组织继代培养基成分相同,其组成为B₅培养基附加2mg/L 2,4-D、0.1mg/L KT和3%蔗糖,pH5.8。细胞悬浮培养基组成为B₅培养基附加1mg/L 2,4-D、0.1mg/L KT和2%蔗糖,pH5.8。

1.2 方法

1.2.1 农杆菌感受态细胞的制备以及质粒在不同农杆菌菌株上的加载 按王关林等(2002)的方法进行操作,获得的单菌落按王关林等(2002)提取质粒进行验证。

1.2.2 农杆菌的活化 农杆菌在含有50mg/L Kan和25mg/L Str或34mg/L Cm的YEP选择培养基上划线暗培养(28 °C)。长出菌落后挑取单菌落在新的选择培养基上涂皿,取适量培养48h后的菌体悬浮于侵染液中,可同时加入终浓度为100 μ mol/L的AS,27~28 °C,180 r/min培养30min后用侵染液调整OD₆₀₀至合适数值即可用于浸染。

1.2.3 玫瑰茄愈伤组织的获得及其预处理 取10~12d龄的玫瑰茄无菌苗的下胚轴,切成0.8~1cm长的切段,置愈伤组织诱导培养基上,25 °C,光照培养(强度为25.2 μ mol \cdot m² \cdot s⁻¹,光周期为16/8 h \cdot d⁻¹)。待长出愈伤组织后,再将其切下并转移到愈伤组织继代培养基上培养,2~3周继代1次。作为比较,当继代4~5次后,取部分愈伤组织进行悬浮培养2代,收集细胞和细胞团转移到固体培养基上培养并每隔2~3周继代1次,获得愈伤组织。从经继代培养的玫瑰茄愈伤组织中,挑选颜色新鲜、生长旺盛的颗粒状愈伤组织在培养皿上适当干燥后,即可用于浸染。

1.2.4 农杆菌侵染及共培养 用于转化的愈伤组织在农杆菌悬浮液中浸泡一定时间后,取出铺在放有无菌滤纸的培养皿上吸干菌液,再转移到含有100 μ mol/L AS的共培养基上(培养基表面铺一张无菌滤纸),适当风干后,于25 °C黑暗培养2~3d。

1.2.5 抗性愈伤组织的筛选 将共培养后的愈伤组织取出放在有3层无菌滤纸的培养皿中干燥2~3d,再转移到含适当浓度Kan和300mg/L Cefo的愈伤组织继代培养基上选择培养。培养条件为25 °C,光照强度为25.2 μ mol \cdot m² \cdot s⁻¹,光周期为16/8 h \cdot d⁻¹,2~3周继代1次。

1.2.6 抗性细胞系的获得 将经2次继代培养的适量愈伤组织转移到含有100mg/L Kan和300mg/L

L Cefo 的悬浮培养基中, 25 °C, 100 r/min, 微光照培养, 2~3 周继代 1 次。最后一次继代时, 培养基中不加 Kan, 培养到第 8 天时取一定细胞密度的培养物作平板培养, 用于检测转化细胞 Kan 抗性的遗传稳定性。

1.2.7 GUS 活性的检测 采用组织化学法检测。将经检测确认无菌的抗性愈伤组织切成小块, 取一块加入 50 μ L X-Gluc 反应液中, 37 °C 保温 12 h, 观察蓝色反应。

1.2.8 转化材料的 PCR 检测 从转化材料中提取植物总 DNA 进行 PCR 扩增鉴定。DNA 粗提液微量制备按王关林(2002)的方法进行。以转化材料的 DNA 为模板, 未转化材料的 DNA 作阴性对照。用 CaMV 35S 启动子引物 5'-ATGACGCACAATCCACTATCCTTCG-3' 和 Nos 终止子引物 5'-GATAATCATCGCAAGACCGCAACAG-3' 对 *gus* 基因进行 PCR 扩增, 扩增条件为: 94 °C 4 min 预变性后, 加入 2.5 U Taq DNA 聚合酶, 94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。预期扩增片段大小为 2 063 bp。另外, 用 *npt II* 基因的两个引物 5'-GACTGGGCAACAGACAATCGG-3' 和 5'-AGCAATATCACGGGTAGCCAACG-3' 对转化细胞系的总 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增条件为: 94 °C 4 min 预变性后, 加入 2.5 U Taq DNA 聚合酶, 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。预期扩增片段大小为 621 bp。

2 结果与分析

2.1 培养方法对愈伤组织生长的影响

为了获得理想的愈伤组织用于转化, 本试验比较了两种不同的培养方法对玫瑰茄愈伤组织生长状况的影响。结果表明, 从玫瑰茄无菌苗下胚轴诱导获得的愈伤组织, 如果一直在固体愈伤组织继代培养基上培养, 经 20 次继代后所得到的愈伤组织结构较紧密, 有的质地较硬, 有的表面湿润呈水浸状, 生长较差, 不适于用作转化材料; 而中间经过 2 代悬浮培养后再进行继代培养得到的愈伤组织结构较疏松, 呈颗粒状, 红黄间色, 表面较干爽, 生长良好。因此, 本试验使用后者作为转化材料。另外, 通过观察发现, 愈伤组织继代培养后第 8~10 天, 生长最快, 适于转化。

2.2 卡那霉素选择压的确定

玫瑰茄愈伤组织对抗生素敏感性的测定结果(图 1)表明, Km 对玫瑰茄愈伤组织的增殖有抑制作用。随着培养基中 Kan 浓度的提高, 它对愈伤组织生长的抑制作用也随着增大。当 Kan 浓度达到 300 mg/L 时, 愈伤组织的生长完全被抑制。因此, 本研究选用 300 mg/L Kan 作为转化愈伤组织的选择压。

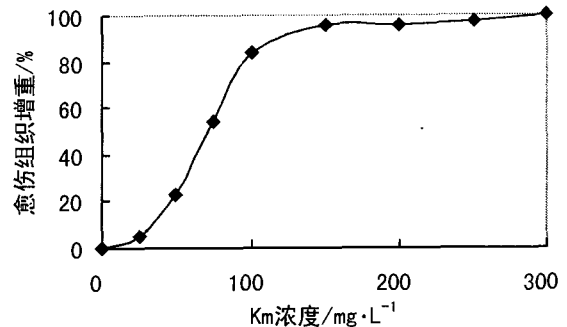


图 1 Kan 浓度对玫瑰茄愈伤组织生长的抑制作用
Fig. 1 Inhibition of Kan concentration on the growth of Roselle callus

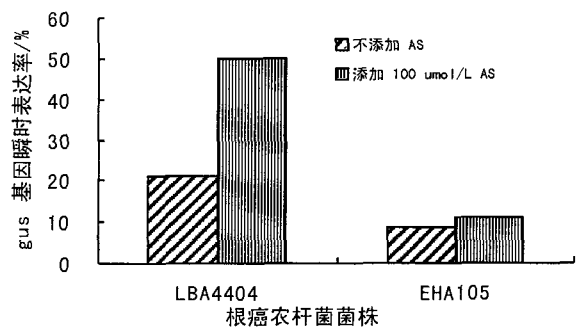


图 2 AS 和农杆菌菌株对愈伤组织转化的影响
Fig. 2 Effects of AS and different *A. tumefaciens* strains on genetic transformation of Roselle callus
TER: 瞬时表达率 Transient expression rate

2.3 农杆菌菌株和 AS 对转化的影响

在本试验中, 采用两种常用的、遗传背景不同的农杆菌菌株(LBA4404 和 EHA105)对玫瑰茄愈伤组织进行转化(两菌株的菌液浓度、侵染时间均为 OD₆₀₀ = 0.5 和 10 min), 并比较添加(添加量为 100 μ mol/L)和不添加乙酰丁香酮(AS)对转化效果的影响。经过 3 d 共培养后, 统计 GUS 组织化学反应呈阳性的愈伤组织所占的比例, 结果见图 2。从图中可以看到, 两种菌株对玫瑰茄愈伤组织的侵染能力存在较大的差异, 无论是否添加 AS, 菌株 LBA4404 的侵染能力都明显强于菌株 EHA105。

另外,在菌株 LBA4404 菌悬液和共培养基中加入 AS 后,受体材料 *gus* 基因的瞬时表达率提高了 1.38 倍,这说明使用愈伤组织作为转化的受体材料时,由于缺少作为信号分子的酚类物质,外源 AS 等信号物质的添加能更有效地促进 T-DNA 向植物细胞转移。但值得注意的是,加入 AS 对菌株 EHA105 的侵染能力没有明显的提高,这可能跟玫瑰茄愈伤组织对这一菌株不太敏感有关。有鉴于此,本试验选用菌株 LBA4404 并在菌悬液和共培养基中添加 100 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰丁香酮对玫瑰茄愈伤组织进行转化。

2.4 pH 值对 AS 作用效果的影响

在本试验中,当在农杆菌 LBA4404 的侵染液和共培养基中都添加 AS 时,pH 值对 GUS 基因的瞬时表达率有很大的影响,pH 为 5.6 时表达率最高,pH 高于或低于 5.6 转化率都明显下降,当 pH 为 6.0 时,转化率几乎为零(图 3)。因此,添加 AS 的侵染液和共培养基,必须严格控制其 pH 值,以 5.6 为最佳。

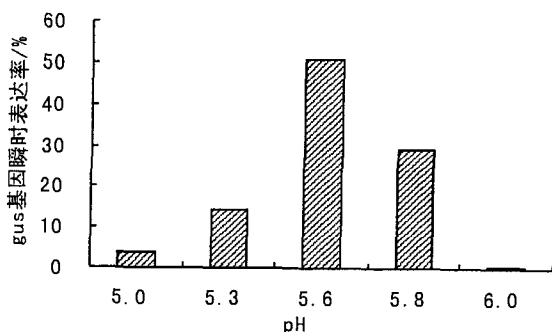


图 3 pH 值对 AS 诱导玫瑰茄愈伤组织转化的影响
Fig.3 Effects of pH value on genetic transformation of Roselle callus induced with 100 $\mu\text{mol/L}$ AS

2.5 农杆菌菌液浓度对转化率的影响

分别用 5 种不同菌液浓度的农杆菌 LBA4404 侵染玫瑰茄愈伤组织 10 min,然后分别测定 *gus* 基因的瞬时表达率,结果(图 4)表明,菌液浓度在 OD₆₀₀ 小于 0.73 时,随着菌液浓度的提高,*gus* 基因的瞬时表达率也随着增加,并在 OD₆₀₀ 0.73 左右达到最高值(70.6%)。菌液 OD₆₀₀ 超过 0.73 后,不仅 *gus* 基因的瞬时表达率有所降低,而且愈伤组织的褐化死亡加剧。尽管在 OD₆₀₀ 为 0.73 时,*gus* 基因的瞬时表达率最高,但愈伤组织的褐化死亡率也较高。因此,综合考虑,用 OD₆₀₀ 为 0.55 左右的菌液侵染 10 min 进行玫瑰茄愈伤组织的转化。

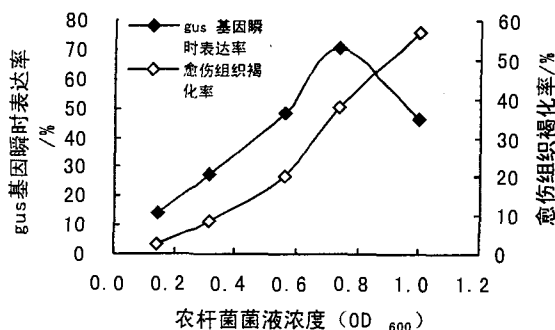


图 4 菌液浓度对愈伤组织遗传转化的影响
Fig.4 Effects of *A. tumefaciens* concentration on the genetic transformation of Roselle callus

2.6 共培养时间对转化率的影响

用 OD₆₀₀ 约为 0.55 的农杆菌 LBA4404 菌液侵染玫瑰茄愈伤组织 10 min,在不同的共培养时间取样进行 GUS 染色鉴定,统计 GUS 基因瞬时表达率和愈伤组织褐化率,结果如图 4 所示。由图可见,开始时,随着共培养时间的延长,愈伤组织的 GUS 基因瞬时表达率也随着提高,3 d 时达到最高值,此后 GUS 基因瞬时表达率有所下降,同时愈伤组织的褐化率急剧增大,到 6 d 时褐化率达到 38%。因此,在本实验中,共培养时间选择 3 d 为宜。

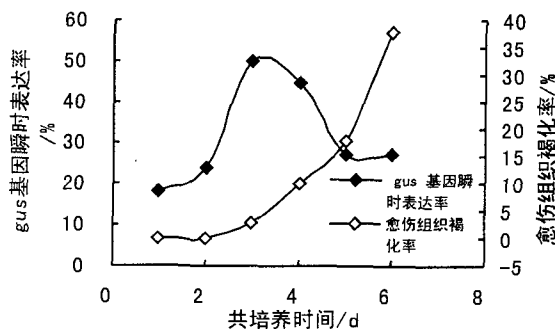


图 5 共培养时间对愈伤组织遗传转化的影响
Fig.5 Effects of co-cultivation time on genetic transformation of Roselle callus

2.7 抗性愈伤组织的检测和鉴定

从本试验获得的 Kan 抗性愈伤组织中随机挑取 8 块,用组织化学法测定细胞 GUS 表达活性,其中 4 块得到阳性结果,而阴性对照无蓝色反应。进一步用 CaMV 35S 启动子和 Nos 终止子特异性引物对有 GUS 活性的愈伤组织总 DNA 进行 PCR 扩增,均得到预期分子量约 2 060 bp 的条带,与质粒 DNA 扩增出的条带大小相同,而未转化的愈伤组织

的 DNA 中未扩增出相应的条带(图 6)。这表明通过愈伤组织—农杆菌共培养法已将外源 *gus* 基因导入了玫瑰茄细胞并获得表达,愈伤组织总转化率为 4%。

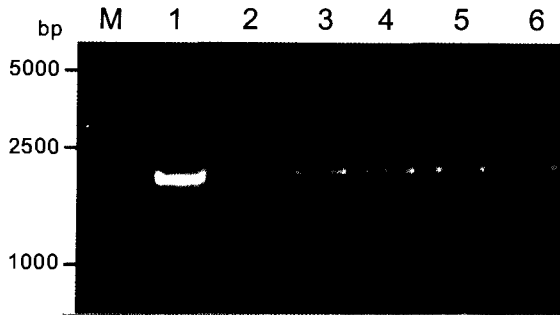


图 6 转化愈伤组织的 PCR 扩增结果

Fig. 6 PCR amplification result of transgenic calli

M. DNA Marker; 1. 阳性对照 Positive control; 2. 阴性对照 Negative control; 3-6. 转化愈伤组织 Transgenic calli.

2.8 抗性细胞系的获得及其检测

抗性愈伤组织经过原代和继代悬浮选择培养后得到的抗性细胞系,再经无选择压力下继代培养 2 次,培养物在含 Kan 和不含 Kan 的平板中培养,其植板率没有明显差别,进一步用 *npt II* 基因特异引物进行 PCR 扩增,均得到预期扩增片段,大小约 620 bp(表 1 和图 7)。说明转化细胞系的 NPT II 活性能稳定表达和遗传。

表 1 Kan 抗性细胞系的遗传稳定性检测

Table 1 Detection of genetic stability of Kan resistant cell lines

抗性细胞系 Kan-resistant cell lines	有 Kan 时的植板率 Plating rate selected by Kan (%)	无 Kan 时的植板率 Plating rate without Kan (%)
KRS-3	8.08	8.11
KRS-4	8.14	8.20

3 讨论

利用基因工程技术将外源基因导入植物细胞是现代遗传育种的重要途径。目的基因转化并整合到受体植物细胞基因组中是植物基因工程地主要环节。根癌农杆菌 Ti 基因转化系统是目前研究最多、理论机理最清楚、技术方法最成熟的基因转化途径。但相对而言,这条途径的影响因素也是最多的,其中关键的是用于转化的农杆菌菌株、目标植物受感染的部位和共转化的方法。

农杆菌作为植物遗传转化的工具,其属性对转化的成功有决定性的影响。有研究表明(Kazuhito 等,1992),不同植物对农杆菌侵染的敏感性不同,而同一种植物对不同的农杆菌菌株也具有不同的敏感性。在本研究中,普通株 LBA4404 的转化率明显高于超毒株 EHA105,这可能与植物细胞的内源激素及细胞壁的结构等有关。

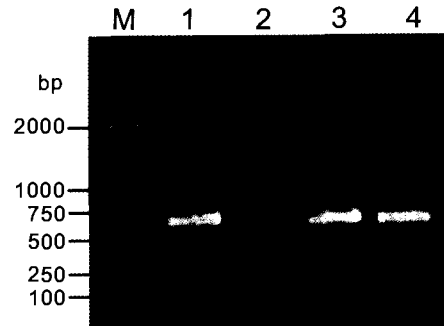


图 7 转化细胞系的 PCR 扩增结果

Fig. 7 PCR amplification result of transgenic cell lines

M. DNA Marker; 1. 阳性对照 Positive control; 2. 阴性对照 Negative control; 3-4. 转化细胞系 Transgenic cell lines.

在本研究中,还发现玫瑰茄的生理状态对转化效果影响是比较大的。因此,在进行愈伤组织继代培养时,除了改变培养方法外,通过调整继代培养基中植物激素的浓度和配比(使用 2 mg/L 2,4-D 和 0.1 mg/L KT),发现愈伤组织的生长状态得到明显改善,愈伤组织变得更加干爽、颗粒性好,略呈淡黄色,转化后褐化率有了很大的降低。

在整个转化过程中农杆菌与外植体共培养是非常重要的环节,因为农杆菌的附着、T-DNA 的转移及整合都在共培养时期内完成,因此,除了共培养时间外,共培养方法对转化率也有较大影响。在本研究中,发现在共培养前后愈伤组织的适当干燥是遗传转化操作中的一个关键环节,因为农杆菌在愈伤组织表面的适当生长是遗传转化所必需的,但又要抑制其过度生长,以免引起愈伤组织的活性降低甚至死亡,同时还要保证共培养后的除菌效果。如何把握干燥的程度还是一个问题。太干会使愈伤组织本身生理状态降低,太湿又为农杆菌提供生长环境。另外,尽管对是否在共培养基上加无菌滤纸还有争论,但在本研究中我们发现在共培养基上加一张无菌滤纸,有利于控制愈伤组织上农杆菌过度增殖。

在愈伤组织与农杆菌共培养后,为了提高脱菌

效果,李东栋等(2002)用无菌水将愈伤组织轻轻漂洗数次,直至洗液变清为止,然后再加入含有400 mg/L 头孢霉素的无菌水浸泡20 min。我们也采用过这一方法,尽管脱菌效果不错,但一直没有获得转化愈伤组织,可能是跟所用的愈伤组织的质地有关。对于一些结构稍微疏松的愈伤组织,经过多次洗涤后,其表面上生长活跃而易受侵染的细胞已被洗掉,剩下的只是一些结构致密而没被侵染的愈伤组织。因此,后来我们改用共培养后将愈伤组织置于无菌滤纸上适当干燥就直接转到脱菌培养基上培养。

通过研究,我们初步建立了一套根癌农杆菌介导的玫瑰茄愈伤组织遗传转化体系。该体系的操作程序如下:①挑选颜色新鲜、生长旺盛的颗粒状愈伤组织在继代培养基上培养8~10 d,置培养皿上适当干燥后;②浸泡在OD₆₀₀约为0.55的根癌农杆菌LBA4404的菌液(内含100 μmol/L AS, pH5.6)中10 min,取出,用无菌滤纸吸干菌液;③置含100 μmol/L AS的共培养基上,于黑暗条件下25℃共培养3 d;④转移到附加300 mg/L Kan和300 mg/L Cefo的愈伤组织继代培养基上,于25℃选择培养,2~3周继代一次;⑤取适量抗性愈伤组织接入悬浮培养基中,25℃,100 r/min培养2~3周后,继代培养获得抗性细胞系;⑥用组织化学法或/和PCR扩增法鉴定转化愈伤组织和细胞系。

利用上述转化体系,我们成功地将外源基因导入玫瑰茄细胞,获得稳定表达GUS活性的转化愈伤组织和稳定表达NPT II活性的转化细胞系。抗性愈伤组织生成率达8%,其中GUS活性阳性率为50%,总转化率为4%。相对于用玫瑰茄下胚轴作受体材料的转化系统(谢秀祯等,2006)来说,这一转化率是比较低的,但由于得到的抗性愈伤组织嵌合体较少,而且由转化愈伤组织获得悬浮培养细胞系所需时间较短,因此这一转化方法不失为玫瑰茄品种改良和细胞株选育的一条可供选择的途径。

参考文献:

- 王关林,方宏筠. 2002. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社的:739-740;776-777;742
- Chang Y C, Huang H P, Hsu J D, et al. 2005. Hibiscus anthocyanins rich extract-induced apoptotic cell death in human promyelocytic leukemia cells[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **205**:201-212
- Chen C C, Hsu J D, Wang S F, et al. 2003. Hibiscus sabdariffa extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits[J]. *J Agric Food Chem*, **51**:472-477
- Dafallah A A, al-Mustafa Z. 1996. Investigation of the anti-inflammatory activity of *Acacia nilotica* and *Hibiscus sabdariffa* [J]. *Am J Chin Med*, **24**:263-269
- Haji FM, Haji TA. 1999. The effect of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on essential hypertension[J]. *J Ethnopharmacol*, **65**:231-236
- Kazuhiro A, Hideaki S, Shozo O, et al. 1992. Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana*: comparison of the efficiencies with various organs, plant ecotypes and *Agrobacterium* strains [J]. *Plant Cell Rep*, **12**:7-11
- Li DD(李东栋), Shi W(石玮), Deng XX(邓秀新), et al. 2002. Influence of different strains on *Agrobacterium*-mediated callus transformation efficiency in Citrus(不同根癌农杆菌菌株对柑橘愈伤组织遗传转化效率的影响)[J]. *J Huazhong Agric Univ*(华中农业大学学报), **21**(4):379-381
- Lin H H, Huang H P, Huang C C, et al. 2005. Hibiscus polyphenol-rich extract induces apoptosis in human gastric carcinoma cells via p53 phosphorylation and p38 MAPK/FasL cascade pathway[J]. *Molecular Carcinogenesis*, **43**(2):86-99
- Lin QH(林俏慧), Xie XZ(谢秀祯), Guo Y(郭勇). 2005. Study on the amplification and sequencing of AtPSK3 from *Arabidopsis*(拟南芥 AtPSK3 基因的克隆及序列分析)[J]. *Guihaia*(广西植物), **25**(7):349-352
- Li YP(李玉萍). 2003. *Hibiscus sabdariffa* and its utilizations(玫瑰茄及其利用)[J]. *Tropical Agriculture Information in the World*(世界热带农业信息), (11):24-26
- Pi-Jen Tsaia, John McIntoshb, Philip Pearceb, et al. 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in roselle (*Hibiscus Sabdariffa*) extract[J]. *Food Research International*, **35**:351-356
- Ruan Q(阮茜), Guo Y(郭勇). 1999. Dynamics on the growth of *Hibiscus sabdariffa* cell and the formation of anthocyanin in phosphorus-limited culture(磷限制培养中玫瑰茄细胞生长及花青苷形成动力学)[J]. *J South China Univ Tech (Nat Sci Edi)*(华南理工大学学报(自然科学版)), **27**(1):86-90
- Xie XZ(谢秀祯), Lin QH(林俏慧), Guo CS(郭成栓), et al. 2006. Genetic transformation of roselle cell mediated by *Agrobacterium tumefaciens*(根癌农杆菌介导的玫瑰茄细胞遗传转化)[J]. *J South China Univ Tech (Nat Sci Edi)*(华南理工大学学报(自然科学版)), **34**(5):43-47
- Yang H, Matsubayashi Y, Hanai H, et al. 2000. Phytosulfokine- α , a peptide growth factor found in higher plants: its structure, functions, precursor and receptors[J]. *Plant Cell Physiol*, **41**(7):825-830
- Zheng SP(郑穗平), Guo Y(郭勇). 1998. Effects of staple nutrient on cell growth and anthocyanin production in suspension culture of *Hibiscus sabdariffa*(主要营养成分对悬浮培养玫瑰茄细胞生长和花青素合成的影响)[J]. *Guihaia*(广西植物), **18**(1):70-74
- Zhu XG(朱新贵), Guo Y(郭勇). 1998. Monochromic effects on anthocyanin synthesis in roselle (*Hibiscus sabdariffa*)(单色光对玫瑰茄悬浮细胞合成花青素的影响)[J]. *Guihaia*(广西植物), **18**(4):322-324