

籼型稻 V20B 高效遗传转化体系研究初报 *

刘桃李 刘 清 童建华 彭 琼

(湖南农业大学 植物激素与生长发育湖南省重点实验室 湖南 长沙 410128)

摘要 目的 建立籼型杂交稻亲本 V20B 成熟胚愈伤组织培养的高效遗传转化体系。方法 以 V20B 的成熟胚作为外植体,研究比较不同培养基、不同生长物质类型及浓度、不同培养条件对愈伤组织诱导、继代、分化的影响。结果 诱导培养基以 N6 为基本培养基,添加 $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D 和 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA,光照条件下诱导,成熟胚愈伤组织诱导率达到 93.44 % 继代培养基以 MS 为基本培养基,添加 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D,黑暗条件下培养 分化培养基以 DL 为基本培养基,激素配比为 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT、 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA、 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA、 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA 采用农杆菌介导法对该体系获得的愈伤组织侵染后能获得的抗性愈伤组织,经 PCR 检测潮霉素基因转化率为 53.89 %。结论 建立了适宜于籼型稻 V20B 的高效组织培养体系。

关键词 水稻 成熟胚 愈伤组织 分化

中图分类号 S511.21 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2012) 18-3460-04

Preliminary Study on High Efficient System of Genetic Transformation of Indica Rice V20B*

LIU Tao-li, LIU Qing, TONG Jian-hua, PENG Qiong

(Hunan Provincial Key Laboratory of Phytohormones and Growth Development, Hunan Agricultural University, Changsha, China, 410128)

ABSTRACT Objective: To construct a highly efficient system of genetic transformation of hybrids rice of parent V20B using culturing mature embryo callus. **Methods:** Mature embryo of indica rice V20B is used as explants to investigate the influence of different basic mediums (MS, N6, CC, NMB, NB), phytohormones and culture conditions on callus' induction, subcultivation and differentiation. **Results:** When N6 as basic induction medium supplemented with $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D and $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA, the induction rate of mature callus tissue was as high as 93.44 % under light condition. In subculture process, MS were used as basic medium, then supplemented with $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D, under dark condition. DL was used in differentiation, as basic medium, adding different hormones as $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT, $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA, $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA, $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA. Callus was immersed and infected by *Agrobacterium tumefaciens*, and the transformation efficiency was 53.89 % by PCR analysis. **Conclusion:** A highly efficient plant regeneration system was established. It was suitable for indica rice V20B.

Key words: Rice; Mature embryo; Callus; Differentiation

Chinese Library Classification: S511.21 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2012) 18-3460-04

前言

自 1994 年 Hiei 等利用根癌农杆菌介导转化梗稻获得成功^[1],有关水稻转基因研究取得成功的报道很多。建立稳定、高效而可靠的再生体系是进行水稻遗传转化研究的基础。但大多数研究是在梗稻上进行,对以水稻种植品种为主的籼稻而言,其转化的难度远远大于梗稻。1996 年 Rashid 等报道成功获得籼稻转基因植株,但外源 DNA 在籼稻中的转化率极低^[2]。1999 年 Aldemita 等利用农杆菌介导转化籼稻,其稳定转化率极低,仅在 1~5 % 之间,且转化的范围也很有限^[3]。籼稻转化率低,一般认为与籼稻的组织培养特性有关。生长和分裂旺盛的胚性愈伤组织细胞培养是获得转基因植物的最好来源。

水稻转化通常采用来源于幼胚和成熟胚的愈伤组织。幼胚

要在水稻扬花后 10~15 d 内取材,应及时消毒,不耐储藏,因此受季节和环境的限制。成熟胚取材方便,不受季节限制,灭菌容易,愈伤组织转化效率高,被广泛应用^[4]。培育出生长状态良好的胚性愈伤组织是获得高转化率的关键。因此,探索籼稻的组织培养技术以提高籼稻的转化效率和范围,已成为从事籼稻遗传转化研究的共识。

籼型稻 V20B 是长江流域当家杂交稻系列组合母本 V20A 的相应保持系,为三系杂交稻广为利用的制种材料。本试验以 V20B 水稻成熟胚为起始培养材料诱导愈伤组织,并通过筛选适宜的培养基及培养条件,优化胚性愈伤组织分化再生效率,拟找出较佳胚性愈伤组织生长条件,为利用转基因技术对水稻不育性材料进行改造提供前期研究基础。

* 基金项目 湖南省科技重大专项 (2009FJ1004-2) 湖南省高校创新平台开放基金项目 (09k052)

作者简介 刘桃李(1984-),女,硕士,研究方向 植物学,植物分子生物学,

电话 0731-85114026, E-mail: LingYun1983cn@yahoo.com.cn

(收稿日期 2011-12-28 接受日期 2012-01-21)

1 材料与方法

1.1 供试材料

水稻成熟种子 V20B。

1.2 培养基

1.2.1 水稻愈伤组织诱导的不同培养基及其不同植物生长物质浓度配比 选用 N6、MS、CC、NMB、NB 5 种不同基本培养基类型，其中，NMB 基本培养基为 N6 大量元素、MS 微量元素、B5 有机酸；NB 基本培养基为 N6 大量元素和 B5 有机酸、微量元素。每种培养基附加 0.5 g·L⁻¹ 酪蛋白、0.5 g·L⁻¹ 脯氨酸、3 %蔗糖和 0.8 %琼脂粉。5 种培养基的 2,4-D 浓度均为 2.5 mg·L⁻¹，6-BA 浓度均为 0.2 mg·L⁻¹，pH 值为 5.8。

在最适基本培养基上添加 2,4-D、6-BA。处理 A、B 和 C 的 2,4-D 浓度分别为 2.0 mg·L⁻¹、2.5 mg·L⁻¹、3.0 mg·L⁻¹；处理 A1、A2 在 A 基础上分别添加 6-BA 0.2 mg·L⁻¹、0.4 mg·L⁻¹；处理 B1、B2 在 B 基础上分别添加 6-BA 0.2 mg·L⁻¹、0.4 mg·L⁻¹。处理 C1、C2 在 C 基础上分别添加 6-BA 0.2 mg·L⁻¹、0.4 mg·L⁻¹。

1.2.2 水稻愈伤组织不同继代培养基配方 将愈伤组织分别转移到继代培养基 B1、J0(MS+2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D +0.5 g·L⁻¹ 谷氨酰胺 +0.5 g·L⁻¹ 脯氨酸 +3 %蔗糖 +0.8 %琼脂粉，pH5.8)，确定适宜的继代培养基。

1.2.3 水稻不同分化培养基配方 继代培养后的愈伤组织分别转移到分化培养基(DI)。DL1(MS+0.5 mg·L⁻¹KT+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹NAA +0.5 mg·L⁻¹CH+3.0 %蔗糖 +0.3 %植物凝胶，pH5.9)，DL2(DL+2.0 mg·L⁻¹KT+ 2.0 mg·L⁻¹6-BA+0.2 mg·L⁻¹

NAA+0.2 mg·L⁻¹IAA+0.5 g·L⁻¹ 谷氨酰胺 +0.5 g·L⁻¹ 脯氨酸 +0.8 mg·L⁻¹CH+3.0 %蔗糖 +0.3 %植物凝胶，pH5.9)。

1.3 培养条件

愈伤组织诱导置于 26℃~28℃，分别于黑暗和光照条件下培养，分化培养条件为 26~28℃、14 h 光照培养。

1.4 水稻成熟胚愈伤组织的诱导

成熟种子去壳，70 %酒精消毒 2 min，灭菌蒸馏水清洗 2 次，0.1 %升汞消毒 12~15 min，灭菌蒸馏水清洗 2~3 次，次氯酸钠灭菌 35~50 min，灭菌蒸馏水清洗 3~5 次，平躺接种到诱导培养基上，胚乳接触到培养基。在 26~28℃条件下诱导愈伤组织形成，7 d 后将由胚形成的愈伤组织切下进行继代培养。

1.5 遗传转化

采用农杆菌浸染法将含潮霉素抗性基因(hp)的 pCAMBI-A1300 质粒转化继代培养 7 天后的胚性愈伤组织。

2 结果与分析

2.1 胚性愈伤组织诱导情况及分析

成熟种子消毒后，接种于不同培养基上，2~3 d 开始发芽，盾片部位长出淡黄色愈伤组织，7 d 后盾片部位裂开，露出生长圆润的愈伤组织。

2.1.1 不同培养基对愈伤组织诱导的影响 愈伤组织在不同基本培养基上的诱导情况见表 1。从诱导率和愈伤组织生长情况来看，N6 基本培养基较适合 V20B 愈伤组织的诱导，CC 培养基诱导效果较差。

表 1 基本培养基中愈伤组织诱导情况
Table 1 Callus induction in the basic mediums

培养基 (Medium)	诱导率(%) (Inductivity)	愈伤组织生长情况 (Growth of callus)
MS	66.763±0.321	淡黄色、松散、较小 (Light yellow, loose, smaller)
N6	91.310±0.417	淡黄色、圆润、紧凑、较大 (Light yellow, well-stacked, compact, smaller, larger)
CC	56.310±0.293	黄褐色、生长较慢、松散、较小 (Tawny, slower, loose, smaller)
NMB	66.320±1.006	生长较慢、较小(Slower, smaller)
NB	76.360±0.248	生长较慢(Slower)

2.1.2 不同外源植物生长物质对水稻愈伤组织诱导的影响 V20B 以 N6 为基本培养基，加 0.5 g·L⁻¹ 酪蛋白、0.5 g·L⁻¹ 脯氨酸、3 %蔗糖、0.8 %琼脂粉。不同植物生长物质的种类与配比的培养基上愈伤组织的诱导情况(图 1)，图中 B1、C1、B2、C2 四种培养基诱导的愈伤诱导率高。2,4-D 对愈伤组织诱导起到关键性作用，但浓度过高或过低对诱导产生胚性愈伤组织均不利。6-BA 对愈伤组织诱导有一定的促进作用，而且对以后的分化也有一定的辅助作用，但过高会导致愈伤组织提前进入分化阶段。因此，本研究选择 B1 2.5 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.2 mg·L⁻¹ 6-BA 配方作为诱导培养基。

光是愈伤组织生长的一个影响因子，不同的培养基中光照

条件下培养的愈伤组织诱导率均高于黑暗条件下的愈伤组织诱导率。黑暗条件下培育出的愈伤组织生长较慢，芽为白色，愈伤组织颜色淡黄，圆润，较小。光照条件下长出的愈伤组织生长速度较快，芽为绿色，愈伤组织黄色结实，较大，因此在诱导阶段选取光照培养(图 2)。

2.2 不同继代培养基对愈伤组织生长的影响

诱导 7 d 后的愈伤组织在无菌条件下切下，分别置于 B1、J0 两种不同培养基中继代培养。在两种培养基中，愈伤组织生长速度大致相同，但是在 B1 培养基中愈伤组织开始变白，而且有一部分开始分化长出白色须根。在 J0 培养基中，愈伤组织黄色，光泽亮，愈伤组织紧致(图 3)。

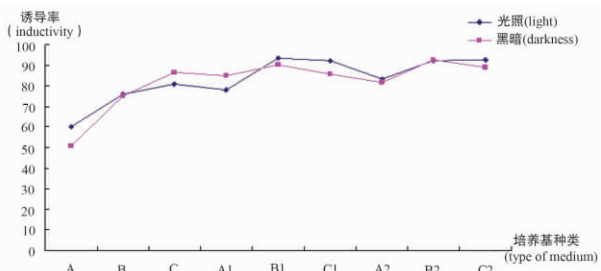


图 1 不同植物生长物质配比与光照条件对成熟胚愈伤组织诱导的影响

Fig.1 Effect of different plant growth substances and light conditions on induction of mature embryo callus



图 2 愈伤组织在光照下诱导 7 d

Fig. 2 Callus induction under light condition for 7 d

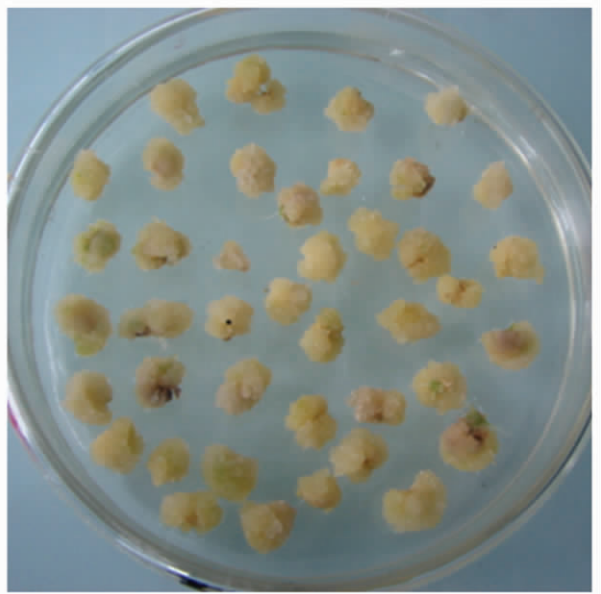


图 3 愈伤组织继代培养

Fig. 3 Callus subculture

2.3 不同分化培养基对愈伤组织分化的影响

继代培养后，愈伤组织分别转入 DL1、DL2 两种分化培养

基上进行分化培养，放置于 DL1 培养基中的愈伤组织未分化，置于 DL2 分化培养基中的愈伤组织，10 d 后开始变绿，进入分化阶段(图 4、5)。在 DL2 分化培养基中愈伤组织 10 d 左右开始变绿进入分化阶段，在 DL1 分化培养基中愈伤组织一个月后仍呈分裂状况。

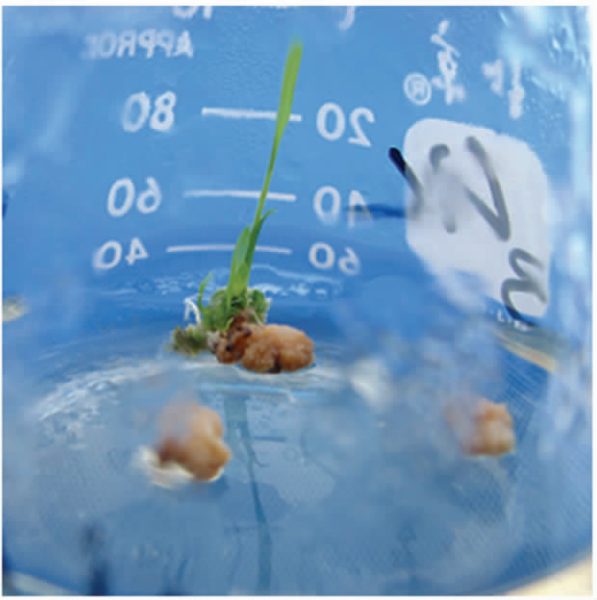


图 4 DL1 分化培养中愈伤组织分化情况

Fig. 4 Callus differentiation in DL1

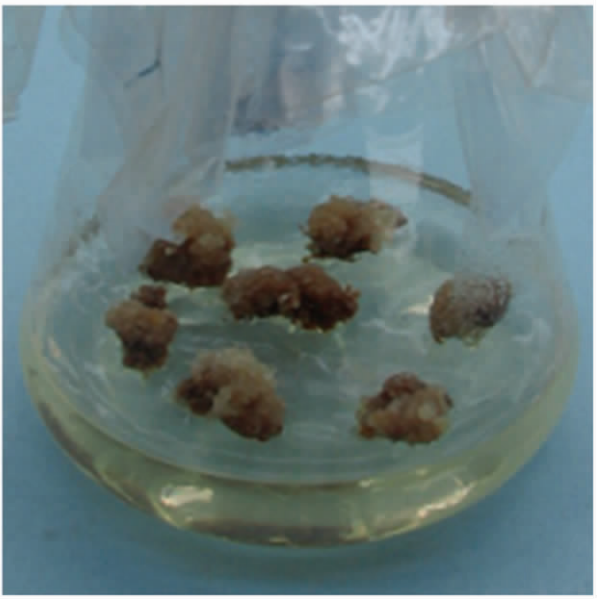


图 5 DL2 分化培养基中愈伤组织分化情况

Fig. 5 Callus differentiation in DL2

2.4 遗传转化效率分析

光照条件下获得的愈伤组织用于遗传转化，经抗性筛选后，根据潮霉素抗性基因(hpt)设计引物对正常生长的抗性愈伤组织进行 PCR 检测，结果表明愈伤转化百分率为 53.89%。

3 讨论

水稻是一种重要的粮食作物，由于其基因组较小、生长周期较短等特点，是单子叶植物中的模式植物^[5]。目前通过转基因

手段来提高水稻品质方面的研究受到人们的青睐。水稻胚性愈伤组织诱导是水稻遗传转化中的重要环节,胚性愈伤组织的状态直接影响着遗传转化的频率,所以提高良好生长状态的胚性愈伤组织的数量和质量是提高转化频率的关键。影响水稻胚性愈伤组织形成和植株再生能力的因素包括基因型、外源植物生长物质、渗透压、外植体来源、固化剂、培养基其它成份以及温度、光周期和继代时间等多个方面^[6,7],其中材料的基因型和外源激素的种类、浓度和配比是主要因素^[8-11]。不同品种的基因型差异主要表现在它们对外源植物生长物质的敏感性不同和作用效果的差异上。植物体细胞转化为胚性细胞的一个重要前提是这些细胞必须脱离整体的约束而进行离体培养,并有相应的植物生长物质来诱导其细胞的分化。由于离体细胞缺乏合成生长素类物质和细胞分裂素类物质的能力,而这些细胞的分化和分裂又必须依靠这两类激素的共同作用,因此在培养基中添加不同种类或不同浓度的外源植物生长物质是诱导胚性愈伤组织形成的必要条件,对愈伤组织质量和再生频率的影响极大^[6]。

2,4-D 是生长素类生长调节剂,对愈伤组织的形成和生长起着重要的作用。普遍认为,随着 2,4-D 浓度的提高,愈伤组织的生长速度会相应加快,但是生长速度的加快未必能提高愈伤组织的质量。相反,2,4-D 浓度增加过多会导致愈伤组织的质量显著下降,如愈伤组织长出须根,甚至最终失去分化能力^[12]。因此选择合适的 2,4-D 浓度,对诱导和继代培养有着至关重要的作用。但不同基因型植物对 2,4-D 浓度要求不同。本研究发现,V20B 愈伤组织诱导适宜的 2,4-D 浓度为 $2.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在继代培养过程中,以往研究采用的 2,4-D 浓度自始至终保持不变,这样的培养流程往往造成愈伤组织褐化,愈伤组织上长出须根^[7]。本研究将 V20B 继代过程中的 2,4-D 浓度适当降低,愈伤组织生长状态更好,更利于后期的转化试验,而且能保证后期的分化。

6-BA 对愈伤组织的出芽和增殖有重要作用,同时对愈伤组织诱导有一定的促进作用,与 2,4-D 联合使用能提高水稻成熟胚愈伤组织诱导率。但在前期愈伤组织诱导中加入过多的 6-BA,不但会促使愈伤组织提前分化,而且不利于后期愈伤组织的分化^[13-15]。本研究发现 $2.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D 配以 $0.2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA,愈伤组织诱导率较高,达到了 93.44%,且生长状况最好。虽然 $2.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D 配以 $0.4\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 愈伤组织诱导率最高,达到了 92.75%,但愈伤组织质量不好。细胞分裂素的主要功能是促进细胞分裂。为了后期遗传转化试验,需要延长愈伤组织的分裂期,使基因转化率提高^[16]。本研究在继代过程中去除了 6-BA,将 2,4-D 浓度降低到了 $2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

光作为影响植物生长发育的重要因素之一,在植物体的形态建成和发育分化过程中起着重要的作用。在植物离体过程中,也有一些关于光对植物愈伤组织的生长和次生代谢产物产生影响的研究。本文在愈伤组织诱导过程,置于光照下培养其诱导率高于黑暗培养,且生长状况良好。但在后期继代培养中其生长速率与黑暗条件下培养的相差不大。鉴于在光照培养下易于染菌,且较易使愈伤组织提前进入分化阶段,因此,本研究认为,V20B 愈伤组织在光照培养下诱导后,转入黑暗下培养,对愈伤组织培养较好。

参考文献(References)

[1] Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. Efficient transformation of rice mediated by agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the

T-DNA[J]. Plant Journal, 1994, 6: 271-282

- [2] Eashid H, Yokoi S, Toriyama K. Transgenic plant production mediated by agrobacterium in indica rice[J]. Plant Cell Rep, 1996, 15: 727-773
- [3] Aldemita RR, Hodges TK. Agrobacterium tumefaciens mediated transformation of japonica and indica rice varieties [J]. Planta, 1999 (4): 612-615
- [4] 陶丽莉,殷桂香,叶兴国,等.小麦成熟胚组织培养及遗传转化研究进展[J].麦类作物学报,2008,28(4):713-718
- Tao Li-li, Yin Gui-xiang, Ye Xing-guo, et al. Progress outline of wheat tissue culture and genetic transformation by using wheat mature embryos as explants[J]. Journal of Triticeae Crops, 2008, 28(4): 713-718
- [5] Lin YJ, Zhang Qi-fa. Optimising the tissue culture conditions for high efficiency transformation of indica rice [J]. Plant Cell Rep, 2005, 23: 540-547
- [6] 吴建国,陈双燕,石春海,等.籼稻基因转化中的组织培养系统研究[J].中国农学通报,2002,18(1):36-40
- Wu Jian-guo, Chen Shuang-yan, Shi Chun-hai, et al. Study on culture system in gene transformation of indica rice [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2002, 8(1): 36-40
- [7] 郭晓丽.水稻愈伤组织培养研究 [J].衡水学院学报,2009,11(1): 48-49,70
- Guo Xiao-li. Study on callus inducing of rice[J]. Journal of Hengshui University, 2009, 11(1): 48-49, 70
- [8] 刘香玲,王玉珍,罗景兰,等.水稻成熟胚愈伤组织的诱导和分化因素的研究[J].山东农业科学,2005,5:7-9
- Liu Xiang-ling, Wang Yu-zhen, Luo Jing-lan, et al. Study on callus induction and regeneration from rice mature embryo scutum[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2005, 5: 7-9
- [9] 王子斌,潘学彪,唐克轩,等.提高籼稻品种组织培养效果的研究[J].扬州大学学报,2001,2(4):37-41
- Wang Zi-bin, Pan Xue-biao, Tang Ke-xuan, et al. Studies on tissue culture of indica rice varieties [J]. Journal of Yangzhou University Natural Science Edition, 2001, 2(4): 37-41
- [10] 吕孟雨,赵和,王海波,等.水稻愈伤组织生长速率研究[J].中国农学通报,2005, 12(21): 53-55
- Lu Meng-yu, Zhao He, Wang Hai-bo, et al. Study on the Growth Rate of Rice Callus [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 12 (21): 53-55
- [11] 石太渊,陈伟.水稻成熟胚培养及其影响因素的研究[J].辽宁农业科学,1995,4:17-20
- Shi Tai-yuan, Chen Wei. Study on Rice Mature Embryo Culture and its influence factors[J]. Liaoning agricultural science, 1995, 4: 17-20
- [12] 李玉静,陈彦龙,王玲玲,等.2,4-D 和 6-BA 对水稻愈伤组织培养力的影响[J].河北师范大学学报,2005, 4: 395-403
- Li Yu-jing, Chen Yan-long, Wang Ling-ling, et al. The Influence of 2,4-D and 6-BA on culture ability of rice callus [J]. Journal of Hebei Normal University, 2005, 4: 395-403
- [13] 卢泳全,吴为人.水稻遗传转化研究进展[J].福建农林大学学报,2003,32(1):27-32
- Lu Yong-quan, Wu Wei-ren. Improvements in the technology for transformation of rice [J]. Fujian Journal of Kasetsart University, 2003, 32(1): 27-32

(下转第 3482 页)

- Medicinal Chemistry and Synthetic Methods [J]. Bioorg. Med. Chem, 2002, 10: 3379-3393
- [2] L. V. Myznikov, A. Hrabalek, G. I. Koldobskii. Drugs in the tetrazole series [J]. Chem. Heterocycl. Compd, 2007, 43(1): 1-9
- [3] Bernhard Gutmann, Jean-Paul Roduit, Dominique Roberge, et al. Synthesis of 5-Substituted 1H-Tetrazoles from Nitriles and Hydrazoic Acid by Using a Safe and Scalable High-Temperature Microreactor Approach [J]. Angew. Chem. Int. Ed, 2010, 49: 7101-7105
- [4] Mathias Alterman, Anders Hallberg. Fast Microwave-Assisted Preparation of Aryl and Vinyl Nitriles and the Corresponding Tetrazoles from Organo-halides [J]. J. Org. Chem, 2000, 65: 7984-7989
- [5] Blaise W. LeBlanc, Branko S. Jursic. Preparation of 5-Alkylthio and 5-Arylthiotetrazoles from Thiocyanates Using Phase Transfer Catalysis [J]. Synth. Commun, 1998, 28(19): 3591-3599
- [6] William G. Finnegan, Ronald A. Henry, Robert Lofquist. An Improved Synthesis of 5-Substituted Tetrazoles [J]. J. Am. Chem. Soc, 1958, 80: 3908-3911
- [7] Mats Larhed, Anders Hallberg. Microwave-Promoted Palladium-Catalyzed Coupling Reactions [J]. J. Org. Chem, 1996, 61: 9582-9584
- [8] Eugene Lieber, Takashi Enkoji. Synthesis and Properties of 5-(Substituted) Mercaptotetrazoles [J]. J. Org. Chem, 1961, 26: 4472-4479
- [9] Valentina Aureggi, Gottfried Sedelmeier. 1,3-Dipolar Cycloaddition: Click Chemistry for the Synthesis of 5-Substituted Tetrazoles from Organoaluminum Azide and Nitriles [J]. Angew. Chem. Int. Ed, 2007, 46: 8440-8444
- [10] Zachary P. Demko, K. Barry Sharpless. A Click Chemistry Approach to Tetrazoles by Huisgen 1,3-Dipolar Cycloaddition: Synthesis of 5-Sulfonyl Tetrazole from Azide and Sulfonyl Cyanides [J]. Angew. Chem. Int. Ed, 2002, 41: 2110-2113
- [11] Fernando Blanco, Ibon Alkorta, Jose Elguero. A theoretical study of the effect of copper (I) chloride on the azido/tetrazole isomerism [J]. Tetrahedron, 2011, 67: 8724-8730
- [12] Hartmuth C. Kolb, K. Barry Sharpless. The growing impact of click chemistry on drug discovery [J]. DDT, 2003, 8(24): 1128-1137
- [13] Hartmuth C. Kolb, M. G. Finn, K. Barry Sharpless. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions [J]. Angew. Chem. Int. Ed, 2001, 40(11): 2004-2021
- [14] Jean-Francois Lutz. 1,3-Dipolar Cycloadditions of Azide and Alkynes: A Universal Ligation Tool in Polymer and Materials Science [J]. Angew. Chem. Int. Ed, 2007, 46(7): 1018-1025
- [15] Victoria D. Bock, Henk Hiemstra, Jan H. Van Maarseveen. CuI-Catalyzed Alkyne-Azide "Click" Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective [J]. Eur. J. Chem, 2006: 51-68
- [16] Vsevolod V. Rostovtsev, Luck G. Green, Valery V. Fokin, et al. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective 'ligation' of azides and terminal alkynes [J]. Angew. Chem. Int. Ed, 2002, 41: 2596-2599
- [17] Christian W. Tornøe, Caspar Christensen, Morten Meldal. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of terminal Alkynes to Azide [J]. J. Org. Chem, 2002, 67: 3057-3064
- [18] Lutz Ackermann, Harish K. Potukuchi, Dirk Landsberg, et al. Copper-Catalyzed "Click" Reaction/Direct Arylation Sequence: Modular Syntheses of 1,2,3-Triazoles [J]. Organic Letters, 10(14): 3081-3084
- [19] Zachary P. Demko, K. Barry Sharpless. Preparation of 5-Substituted 1H-Tetrazoles from Nitriles in water [J]. J. Org. Chem, 2001, 66: 7945-7950
- [20] National Committee for Clinical Laboratory standard. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 5th ed. Approved standard, M7-A6. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards [C]. 2003

(上接第 3463 页)

- [14] 曾晓珊,戴良英,刘雄伦,等. 籼稻成熟胚遗传转化体系影响因素的优化[J]. 江西农业学报, 2007, 19(8): 1-3
Zeng Xiao-shan, Dai Liang-ying, Liu Xiong-lun, et al. Optimization of transformation mediated by agrobacterium tumefaciens in indica rice[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2007, 19(8): 1-3
- [15] 易自力,严钦泉,邓启云,等. 几种水稻籼型恢复系和不育系离体培养和遗传转化的研究[J]. 湖南大学学报. 自然科学版, 2002, 29(1): 1-7
Yi Zi-li, Yan Qin-quan, Deng Qi-yun, et al. Studies on in vitro culture and genetic transformation of several indica restorer lines and sterile line[J]. Journal of Hunan University(Natural Science), 2002, 29(1): 1-7
- [16] 刘巧泉, 张景六, 王宗阳, 等. 根癌农杆菌介导的水稻高效转化系统的建立 [J]. 植物生理学报, 1998, 24(3): 259-271
Liu Qiao-quan, Zhang Jing-liu, Wang Zong-yang, et al. A highly efficient transformation system mediated by agrobacterium tumefaciens in rice[J]. Acta Photophysiological Sinica, 1998, 24(3): 259-271