

激素和硝酸银对芥菜型油菜下胚轴再生植株的影响

袁玉辉, 刘显军**, 杨柳, 陆赢, 官春云, 刘忠松*

(湖南农业大学油料作物研究所, 湖南 长沙 410128)

摘要: 为建立芥菜型油菜高效遗传转化体系, 以芥菜型油菜品种‘四川黄籽’的下胚轴为外植体, 采用农杆菌介导法进行遗传转化, 对愈伤诱导、芽分化及生根培养 3 个阶段的激素、硝酸银及其配比进行优化处理。结果表明: 用含 1.0 mg/L 2,4-D 的预培养基诱导愈伤, 愈伤再生率达到 100%; 用含 3.0 mg/L 6-BA + 5.0 mg/L AgNO₃ 的分化培养基诱导芽再生, 芽再生率达 28.33%, 平均芽丛数为 1.73 个; 在含 2.5 mg/L IBA + 0.05mg/L NAA 生根培养基中, 不定芽生长 11 d 后开始生根, 生根率达到 100%; 经 PCR 检测抗卡拉霉素转化苗, 阳性率达到 23.80%, 且 GUS 染色呈阳性, 说明建立的芥菜型油菜遗传转化体系高效可行。

关键词: 芥菜型油菜; 硝酸银; 农杆菌介导; 下胚轴; 激素配比

中图分类号: S634.303.53

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2014)01-0001-07

Effects of hormone and AgNO₃ on regeneration of *Brassica juncea* hypocotyl explants

YUAN Yu-hui, LIU Xian-jun**, YANG Liu, LU Ying, GUAN Chun-yun, LIU Zhong-song*

(Oilseed Research Institute, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Hypocotyls of Sichuan yellow seed of *Brassica juncea* was used as explants to establish an efficient genetic transformation system by *Agrobacterium*-mediated transformation. Different combinations of hormone and silver nitrate for callus induction, bud differentiation and root culture were optimized. The results showed that 100% callus regeneration rate was observed with pre-culture medium containing only 1.0 mg/L of 2,4-D; shoot regeneration rate was 28.33% and the average number of bud bundles was 1.73 when using the differentiation medium with 3.0 mg/L 6-BA and 5.0 mg/L AgNO₃; the shoot begins to root with 100% rooting rate 11 days after culturing on rooting medium with 2.5 mg/L IBA and 0.05 mg/L NAA. The transformant resistant positive rate was 23.80% as determined by PCR detection and GUS staining, which illustrated the feasibility of this *Brassica juncea* genetic transformation system.

Key words: *Brassica juncea*; AgNO₃; *Agrobacterium*-mediated; hypocotyls; hormone combination

农杆菌介导的遗传转化具有简单、快速、高效的特点, 且整合的外源基因多为单拷贝, 转化获得的单拷贝植株遗传稳定性好, 多符合孟德尔遗传定律^[1], 能直接为遗传育种提供新种质, 在植物遗传转化中被广泛应用。油菜遗传转化多采用农杆菌介导法, 适宜的外植体包括下胚轴、子叶柄、茎段、

小孢子等^[2-5]。油菜子叶柄和下胚轴外植体具有取材简便、易于再生、生长快速等优点^[6], 因此子叶柄和下胚轴是油菜遗传转化的首选外植体。目前, 已建立了甘蓝型油菜的相对稳定的遗传转化体系^[6-7], 但还没有建立起相对稳定且高效的芥菜型油菜的遗传转化体系, 原因有玻璃化现象严重和转化阳性率

收稿日期: 2013-05-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101176; 30971799)

作者简介: 袁玉辉(1982—), 湖南株洲人, 主要从事油菜分子育种研究, 398800120@qq.com; *通信作者, zslu48@sohu.com; **并列第一作者

低等^[8-12]问题。本研究拟优化影响芥菜型油菜遗传转化效率的因素,包括愈伤诱导、芽分化及生根培养3个阶段的激素和硝酸银配比,以建立芥菜型油菜高效遗传转化体系,为芥菜型油菜转基因研究提供参考数据。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

根癌农杆菌菌株GV3101,含有标记基因NPTII和报告基因GUS的双元载体pBI121质粒由湖南农业大学作物基因工程实验室保存。根癌农杆菌在含有50 mg/L利福平(Rif)和50 mg/L卡那霉素(Kan)的YEP固体培养基上划线培养。培养温度为28℃。挑取单菌落接种于50 mL YEP液体培养基(50 mg/L

Rif, 50 mg/L Kan)中,于28℃、200 r/min的摇床上振荡过夜培养(16~24 h),当菌液OD_{600nm}值约为0.6时,4℃、4 000 r/min离心8 min,收集菌体,加入等量的MS培养液重悬菌体,调整OD_{600nm}至0.3~0.6,并添加100 μmol/L 乙酰丁香酮(AS)用于浸染。

1.2 外植体的获取

外植体供体材料为芥菜型油菜(*Brassica juncea* L. Czern and Coss)品种‘四川黄籽’,来源于刘忠松课题组培育的高代自交系^[13]。选取饱满种子,无菌条件下用75%乙醇浸泡30 s后,用0.1%氯化汞浸泡12 min灭菌,用无菌水冲洗3次后接种于发芽培养基(表1)中培养。(22±2)℃暗培养4 d,再光照培养2 d,用解剖刀切下完整的下胚轴(5~10 mm)作为外植体。

表1 芥菜型油菜下胚轴诱导再生各阶段的培养基组成

培养基	成分	处理激素组合
发芽培养基	1/2 MS + 20 g·L ⁻¹ 蔗糖 + 0.8%琼脂	
预培养基	MS + 30 g·L ⁻¹ 蔗糖 + 0.8%琼脂	NAA/IAA/2,4-D + 6-BA
共培养基	MS + 30 g·L ⁻¹ 蔗糖 + 0.8%琼脂	NAA/IAA/2,4-D + 6-BA + 100 μmol/LAS
分化培养基	MS + 30 g·L ⁻¹ 蔗糖 + 0.8%琼脂	6-BA + 5 mg/L AgNO ₃ + 500 mg/L Carb
筛选分化培养基	MS + 30 g·L ⁻¹ 蔗糖 + 0.8%琼脂	6-BA + AgNO ₃ + 500 mg·L ⁻¹ Carb + 25 mg/L Kan
生根培养基	1/2MS + 20 g·L ⁻¹ 蔗糖 + 2.5g/L 植物凝胶	IBA + NAA + 400 mg/L Carb

各种培养基的pH均为5.8。

1.3 外植体预培养条件的优化

将下胚轴接种于含有不同浓度生长素(NAA、IAA、2,4-D)和细胞分裂素(6-BA)组(表2)的预培养基(表1)中预培养3 d,然后转移到与预培养基含相同激素组合的共培养基(添加100 μmol/L AS)上暗培养2 d,再转入含有3 mg/L 6-BA + 5 mg/L AgNO₃的分

表2 芥菜型油菜下胚轴预培养基中处理激素组合

NAA(mg·L ⁻¹)+ 6-BA(mg·L ⁻¹)	IAA(mg·L ⁻¹)+ 6-BA(mg·L ⁻¹)	2,4-D(mg·L ⁻¹)+ 6-BA(mg·L ⁻¹)
0.0+0.0	0.1+0.0	0.1+0.0
0.0+0.5	0.1+0.5	0.1+0.5
0.0+1.0	0.1+1.0	0.1+1.0
0.5+0.0	0.5+0.0	0.5+0.0
0.5+0.5	0.5+0.5	0.5+0.5
0.5+1.0	0.5+1.0	0.5+1.0
1.0+0.0	1.0+0.0	1.0+0.0
1.0+0.5	1.0+0.5	1.0+0.5
1.0+1.0	1.0+1.0	1.0+1.0

化培养基中培养,15 d后统计出愈率,20 d后统计芽再生率。预培养,共培养及分化培养均设3个重复。每个重复含20个下胚轴,结果取平均值。出愈率 = 带绿色愈伤的外植体数/外植体数×100%,芽再生率 = 再生不定芽的外植体数/外植体数×100%。选取芽再生率最高的预培养基配方诱导愈伤组织用于下一步试验。所有的外植体均保持在(22±2)℃下生长、光周期为16 h/8 h(光/暗),光强为2 000 lx(冷白日光灯管)。

1.4 浸染与共培养

将预培养的下胚轴用农杆菌菌液振荡浸泡5 min,再接种到共培养基中避光共培养2 d。培养基见表1,培养条件同上所述。

1.5 脱菌与分化培养

将经过共培养的下胚轴用无菌水清洗3次,用含500 mg/L羧苄青霉素(Carb)的MS培养液100 r/min

振荡洗涤30 min,转入含有不同浓度配比的6-BA+AgNO₃的分化培养基中培养。为探讨6-BA浓度对芽再生和AgNO₃浓度对下胚轴芽再生的影响,将脱菌后的下胚轴分别接种到含有2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 mg/L 6-BA分化培养基(含500 mg/L Carb)中培养,从中选择芽再生率最高的含6-BA的分化培养基,在此培养基中添加3、4、5、6、7 mg/L AgNO₃,用于下胚轴的下一步培养。

1.6 生根培养

当分化芽长约2 cm时,切下转移到生根培养基中诱导生根。为研究激素对比对生根的影响,使用含以下7种激素组合的生根培养基:①1/2 MS;②1/2 MS+1.5 mg/L IBA;③1/2 MS+2.0 mg/L IBA;④1/2 MS+2.5 mg/L IBA;⑤1/2 MS+2.5 mg/L IBA+0.05 mg/L NAA;⑥1/2 MS+2.5 mg/L IBA+0.10 mg/L NAA;⑦1/2 MS+2.5 mg/L IBA+0.15 mg/L NAA。光周期为12 h/12 h(光/暗)。培养18 d后统计生根率并观察根的形态,每次处理5个再生芽,设3个重复,结果取平均值。生根率=生根的芽数/总芽数×100%。

1.7 PCR 检测

待根生长20 d左右,炼苗5 d,再将试管苗移栽到蛭石里,待根舒展固定后连同蛭石一起移栽到钵

土里。再生苗长到五叶期后,用CTAB法提取单株DNA进行PCR电泳检测。用pBI121表达载体的选择标记基因NPTII特异引物(NPT II F:5'-CGGCTATGACTGGGCACAACAGACAAT-3';NPT II R:5'-AGCGGCGATACCGTAAAGCACGAGGAA-3')进行扩增,预计PCR扩增产物长度为686 bp。10 μL的PCR扩增体系含有1 μL 10×Buffer,正反向引物各1 μL(3.29 mmol/L),0.2 μL dNTP(10 mmol/L),0.2 μL Taq酶(5 U/μL),2 μL模板(50 ng/μL)。PCR扩增程序为94 °C预变性5 min,94 °C变性30 s,60 °C退火30 s,72 °C延伸30 s,36个循环,72 °C延伸10 min。

1.8 GUS 染色检测

将浸染后脱分化培养10 d的下胚轴、抗性芽和PCR检测阳性植株的幼嫩叶片浸泡在GUS染色液中,37 °C温育过夜,再转入70%乙醇溶液中脱色,直到阴性材料呈白色,在体视显微镜下观察,拍照。

2 结果与分析

2.1 预培养基中激素对比对愈伤诱导的影响

当不添加任何生长素时,诱导产生的愈伤组织很小,且出愈率仅为6.67%~13.33%(图1)。当添加0.5或1.0 mg/L NAA时出愈率达到66.67%~100%(图1),但有大量白色根毛生成,呈板状根(图2),愈

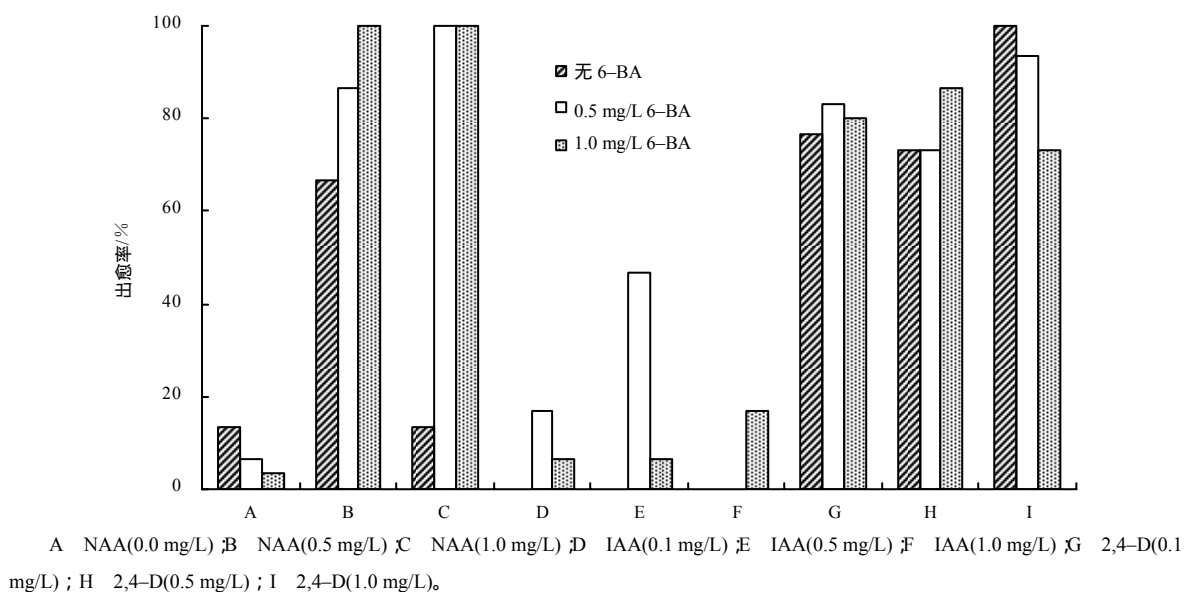
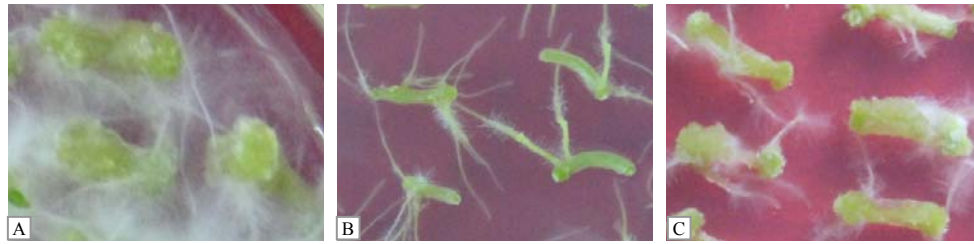


图 1 预培养基中不同激素对比对芥菜型油菜下胚轴愈伤诱导的影响

Fig.1 Effects of different hormone combinations in pre-culture medium on callus induction for hypocotyls of *Brassica juncea*



A 板状根; B 发状根; C 正常愈伤。

图2 预培养基中芥菜型油菜下胚轴愈伤组织的形态

Fig.2 The morphology of callus on pre-culture medium induced from hypocotyls of *Brassica juncea*

伤疏松膨大,抑制了芽的形成。添加 0.5 和 1.0 mg/L 6-BA 能促进下胚轴的生长及愈伤生成(图 2)。当用 IAA 处理时,单独使用 IAA 导致大量发状根的生成(图 2),且出愈率为 0。如果添加 6-BA,仅 0.5 mg/L IAA + 0.5 mg/L 6-BA 组合有 46.67%外植体生成愈伤,且伴随有板状根;其余的激素组合愈伤率仅为 6.67%~13.33%,且愈伤很小,不转绿。2,4-D 的诱导愈伤的效果优于 NAA 和 IAA,添加 2,4-D 后出愈率达到 73.33%~100%,且愈伤多呈黄绿色,疏松程度适中,易分化成芽,当 2,4-D 的质量浓度为 1.0 mg/L 时,愈伤再生率达到 100%(图 1)。6-BA 的添加导致根毛的增多,而出愈率反而减少(图 1),因此,预培养基中添加 1.0 mg/L 的 2,4-D 适合下胚轴分化形成愈伤组织。

2.2 分化培养基中激素配比对芽再生的影响

下胚轴转移到分化培养基中1周后切口处开始膨大并转绿,愈伤组织继续生长,在第12天左右长出不定芽。当分化培养基中6-BA质量浓度低于3 mg/L时,随着6-BA浓度的升高芽再生率和芽丛数

都增加(表3);当6-BA质量浓度为3 mg/L 时,芽再生率最高,达20%,平均芽丛数为1.72个(芽丛形态见图3);但随着6-BA质量浓度的进一步升高,芽再生率反而降低,而6-BA质量浓度为2.5、3.0、4.0 mg/L时芽丛数的差异没有统计学意义。综合分析认为,分化培养基中最适宜芥菜型油菜‘四川黄籽’下胚轴芽分化的6-BA质量浓度为3 mg/L。

表3 芥菜型油菜下胚轴愈伤组织在含不同浓度6-BA的分化培养基中芽的再生率及芽丛数

Table 3 The shoot regeneration rate in differentiation medium with different concentration of 6-BA from hypocotyls of *Brassica juncea*

6-BA/(mg·L ⁻¹)	芽再生率/%	芽丛数/个
2.0	11.67deCD	1.66bAB
2.5	18.33abAB	1.70abA
3.0	20.00aA	1.72abA
3.5	16.67abcABC	1.34dC
4.0	15.00bcdABCD	1.78aA
4.5	13.33cdeBCD	1.66bAB
5.0	10.00eD	1.55cB



A 1个芽丛; B 2个芽丛; C 3个芽丛。

图3 芥菜型油菜下胚轴再生芽的芽丛形态

Fig.3 The bud morphology of shoot regenerated from hypocotyls of *Brassica juncea*

2.3 AgNO₃ 浓度对芽再生的影响

由表4可知,在含有3 mg/L 6-BA的分化培养基中添加AgNO₃能提高芽再生率。当AgNO₃质量浓度为5 mg/L 时,芽再生率达28.33%,比没有添加AgNO₃时提高了41.65%,并与其他浓度的处理差异

有统计学意义。芽丛数则在AgNO₃质量浓度为3 mg/L时差异显著,达到最大值(2.28个),其余组合芽丛数约为1.70个。综合比较,分化培养基中适宜的6-BA和AgNO₃的组合为3 mg/L 6-BA + 5 mg/L AgNO₃。在此组合下,有25%以上的愈伤能分化成

芽，且有1~2个健壮芽，而不添加AgNO₃的组合诱导不出健壮芽。

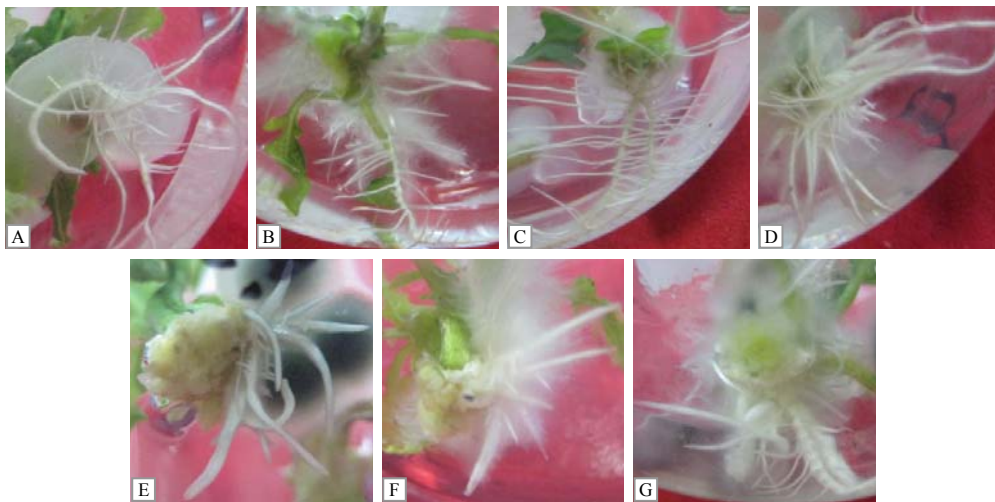
表 4 芥菜型油菜下胚轴在含不同浓度 AgNO₃ 的分化培养基中芽的再生率及芽丛数

Table 4 The shoot regeneration rate on differentiation medium of different concentration AgNO₃ from hypocotyls of *Brassica juncea*

6-BA/(mg·L ⁻¹)+AgNO ₃ /(mg·L ⁻¹)	芽再生率/%	芽丛数/个
3+3	21.67bA	2.28aA
3+4	23.33abA	1.62dC
3+5	28.33aA	1.73bcBC
3+6	26.67abA	1.79bB
3+7	25.00abA	1.69cdBC

2.4 生根培养基中激素比对根再生的影响

不定芽转移到不含任何激素的生根培养基中培养15 d后能生根，生根率为20%，主根为6条左右；而在含1.5和2.0 mg/L IBA的培养基中，不定芽培养12、13 d便开始生根，但主根少、不粗壮；在含2.5 mg/L IBA的培养基中，不定芽培养12 d开始生根，生根率达到100%，且根多、粗壮。添加不同浓度NAA的含有2.5 mg/L IBA的培养基中的主根比不加NAA的培养基中的根粗壮，且当 NAA质量浓度为0.05 mg/L时，生根所需时间缩短至11 d，且生根率为100%。芥菜型油菜再生芽在不同激素配比生根培养基中培养18 d后根的形态见图4，添加2.5 mg/L IBA和0.05 mg/L NAA的生根培养基诱导生根的效果较好。



A 1/2MS 生根培养基诱导的根；B 1/2MS +1.5 mg/L IBA 生根培养基诱导的根；C 1/2MS +2.0 mg/L IBA 生根培养基诱导的根；D 1/2MS +2.5 mg/L IBA 生根培养基诱导的根；E 1/2MS +2.5 mg/L IBA+0.05mg/L NAA 生根培养基诱导的根；F 1/2MS +2.5 mg/L IBA+0.10 mg/L NAA 生根培养基诱导的根；G 1/2MS +2.5 mg/L IBA+0.15mg/L NAA 生根培养基诱导的根。

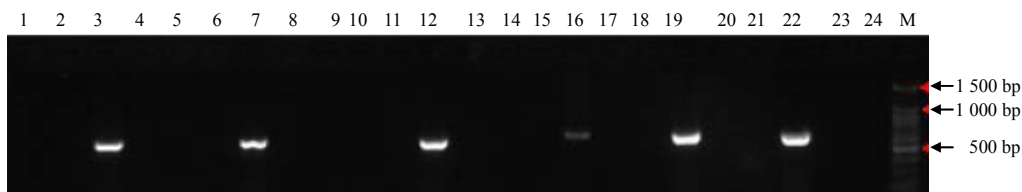
图 4 芥菜型油菜再生芽在不同生根培养基中培养 18 d 后根的形态

Fig.4 The root morphology of regenerated shoot of *Brassica juncea* after 18 days of cultivation in different rooting medium

2.5 再生苗检测

特异性PCR检测结果(图5)表明，21株卡那霉素抗性苗中有5株呈阳性，阳性率为23.80%。GUS染

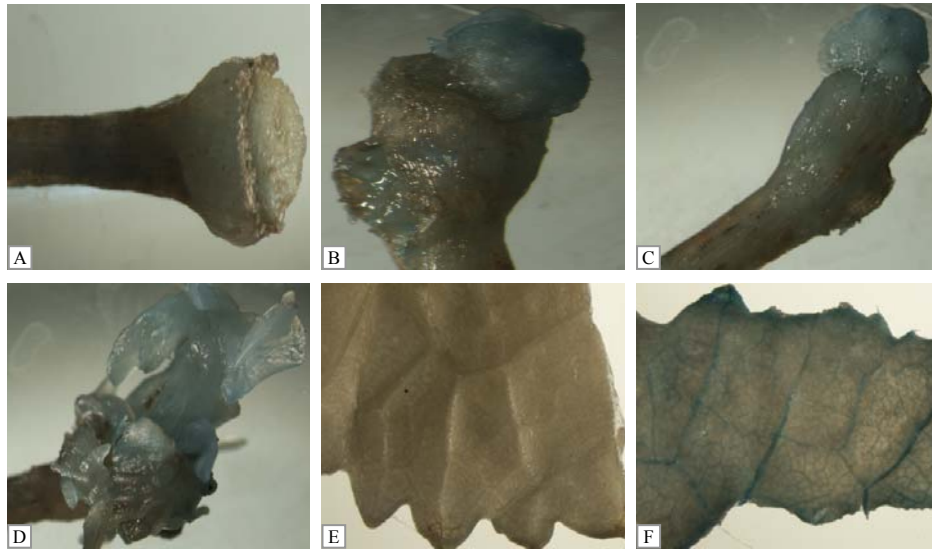
色结果表明，大部分的愈伤、抗性芽及5株PCR检测呈阳性的再生苗叶片GUS染色都呈阳性(图6)，说明这5株再生苗为转基因阳性植株。



1~21 卡那霉素抗性植株的 PCR 产物；22 载体 pBI121 质粒的 PCR 产物(阳性对照)；23 非转化‘四川黄籽’的 PCR 产物(阴性对照)；24 水的 PCR 产物；M 100 bp DNA Ladder Marker。

图 5 T₀代芥菜型油菜四川黄籽转基因苗中 NPTII 基因的 PCR 电泳检测

Fig.5 Detection of *NPTII* gene in T₀ generation transgenic Sichuan yellow seed *Brassica juncea* by PCR



A 下胚轴阴性愈伤对照; B、C 脱菌 10 d 的愈伤; D 转化抗性芽; E 未转化的四川黄籽叶片;
F PCR 检测呈阳性的转化苗叶片。

图 6 GUS 检测结果

Fig.6 Results for GUS staining

3 结论与讨论

农杆菌介导转化效率受多重因素的影响,如植物基因型、外植体类型、浸染浓度与时间、激素的配比等^[14]。本研究探讨了芥菜型油菜‘四川黄籽’下胚轴遗传转化体系中激素和硝酸银比对愈伤诱导、芽再生和生根的影响。结果表明,在基本培养基上添加1 mg/L 2,4-D进行预培养、添加3 mg/L 6-BA和5 mg/L AgNO₃进行分化培养、添加2.5 mg/L 6-BA和0.05 mg/L NAA进行生根培养的效果较好。

芥菜型油菜‘四川黄籽’下胚轴预培养基中添加1 mg/L 2,4-D效果较好,这与Ali等^[15]研究结果不同。他们认为甘蓝型油菜下胚轴在含0.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA的培养基中出愈率可达95%~96%。在分化培养基中添加AgNO₃能促进芽分化。本研究结果是当分化培养基中含有3 mg/L 6-BA + 5~6 mg/L AgNO₃最适宜芥菜型油菜芽再生,而Zhang等^[9]的研究表明含3 mg/L 6-BA + 2 mg/L NAA的MS培养基培养芥菜型油菜芽再生率最高,而5 mg/L 6-BA + 5 mg/L AgNO₃最适合甘蓝型油菜芽分化^[16],说明较低浓度的6-BA更有利于芥菜型油菜芽再生。Mehra等^[10]和Deepak等^[11]在诱导芥菜型油菜芽分化时,AgNO₃的使用浓度为20 μmol/L,而Barfield等^[8]使用质量浓度为3.3 mg/L,这可能与品种不同有关。Sharma等^[17]认为在添加0.2 mg/L IAA的培养基中,芥菜型油菜Pusajaisan芽分化较好;

Kong^[18]、Kamal^[19]等认为甘蓝型油菜诱导芽分化时培养基中添加少量的NAA效果更好。但本研究结果表明,培养基中一旦添加NAA或IAA就会导致大量根毛的生成,抑制了芽的再生,其原因还有待进一步探究。前人一般用含2.0 mg/L IBA的培养基诱导芥菜型油菜生根^[10-11],本研究结果表明,芥菜型油菜在含2.5 mg/L IBA + 0.05 mg/L NAA的生根培养基中再生芽100%生根,而甘蓝型油菜在含0.5 mg/L IBA的培养基培养一周后再生芽100%生根^[3],甚至在不含任何激素的1/2 MS培养基中培养12 d后也可100%生根^[14],说明再生芽诱导生根对培养基的要求可能存在基因型、外植体苗龄的影响。

参考文献:

- [1] 陈英,黄敏仁,王明.植物遗传转化新技术和新方法[J].中国生物工程杂志,2005,25(9):94-98.
- [2] Mukhopadhyay A, N Arumugam, P Nandakumar, et al. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of oilseed *Brassica campestris*: Transformation frequency is strongly influenced by the mode of shoot regeneration. *Plant cell reports*, 1992, 11(10): 506-513.
- [3] Cardoza V, Stewart C N. Increased *Agrobacterium*-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyl segment explants [J]. *Plant Cell Rep*, 2003, 21(6): 599-604.
- [4] Wang Y, K Sonntag, E Rudloff, et al., Production of fertile transgenic *Brassica napus* by *Agrobacterium*-mediated transformation of protoplasts. *Plant Breeding*,

- 2005, 124(1): 1-4.
- [5] Swanson E and L Erickson, Haploid transformation in *Brassica napus* using an octopine-producing strain of *Agrobacterium tumefaciens*. *Theoretical and Applied Genetics*, 1989, 78(6): 831-835.
- [6] Khan M R, Rashid H, Ansar M, et al. High frequency shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer in Canola (*Brassica napus*)[J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2003, 75(3): 223-231.
- [7] Akasaka-Kennedy Y, Yoshida H, Takahata Y. Efficient plant regeneration from leaves of rapeseed (*Brassica napus* L.): The influence of AgNO₃ and genotype[J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 24(11): 649-654.
- [8] Barfield D G, Pua E C. Gene transfer in plants of *Brassica juncea* using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation[J]. *Plant Cell Rep*, 1991, 10(6/7): 308-314.
- [9] Zhang Y X, Xu J, Han L, et al. Efficient shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica juncea*[J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2006, 24(2): 255.
- [10] Mehra S, Pareek A, Bandyopadhyay P, et al. Development of transgenics in Indian oilseed mustard (*Brassica juncea*) resistant to herbicide phosphinothricin [J]. *Curr Sci*, 2000, 78(11): 1358-1364.
- [11] Deepak P, Akshay K P, Yaspal S S, et al. Variation amongst *Brassica juncea* cultivars for regeneration from hypocotyl explants and optimization of conditions for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation[J]. *Plant Cell Rep*, 1993, 12(7/8): 462-467.
- [12] 曹必好, 雷建军, 宋洪元, 等. 芥菜农杆菌高效遗传转化体系初步建立[J]. *华南农业大学学报*, 2003, 24(4): 48-51.
- [13] 刘显军, 袁谋志, 官春云, 等. 芥菜型油菜黄籽性状的遗传, 基因定位和起源探讨[J]. *作物学报*, 2009, 35(5): 839-847.
- [14] Tsukazaki H, Kuginuki Y, Aida R, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of a doubled haploid line of cabbage[J]. *Plant Cell Rep*, 2002, 21(3): 257-262.
- [15] Ali H, Ali Z, Ali H, et al. In vitro regeneration of *Brassica napus* L. cultivars (Star, Cyclone and Westar) from hypocotyls and cotyledonary leaves [J]. *Pak J Bot*, 2007, 39(4): 1251-1256.
- [16] Maheshwari P, Selvaraj G, Kovalchuk I. Optimization of *Brassica napus* (Canola) explant regeneration for genetic transformation[J]. *New Biotechnol*, 2011, 29(1): 144-155.
- [17] Sharma M, Sahni R, Kansal R, et al. Transformation of oilseed mustard *Brassica juncea*(L.) Czern & Coss cv. Pusajaikisan with snowdrop lectin gene[J]. *Ind J Biotech*, 2004, 3(1): 97-102.
- [18] Kong F M, Li J, Tan X L, et al. A new time-saving transformation system for *Brassica napus*[J]. *Afr J Biotechnol*, 2009, 8(11): 2497-2502.
- [19] Kamal G B, Illich K G, Asadollah A. Effects of genotype, explants type and nutrient medium components on canola(*Brassica napus* L.) shoot *in vitro* organogenesis[J]. *Afr J Biotechnol*, 2007, 6(7): 861-867.

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维