

# 简化高效外殖体遗传转化系统的建立

杜杰 范云六

(中国科学院分子生物学研究室, 北京)

本文报道了一种简化的、高效的叶盘、茎盘、叶柄等外殖体的转化方法。利用带 mini-Ti 的致瘤土壤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 与外殖体短时间的共培养, 在含有 100 $\mu$ g/ml 卡那霉素的合适培养基上筛选到频率达 40% 以上的转化植株。转化的细胞再生的植株茎、叶等各部分外殖体均有抗卡那霉素的特性, DNA-DNA 分子杂交的结果表明转化的植株的 DNA 中含有 npt 基因的同源区。转化的植株具有正常的形态, 能够正常开花、结实。自花授粉子一代的植株的特性表明外源基因能够通过种子传递。本文讨论了影响转化的因素。

**关键词** 叶盘; 植物遗传转化; 高效系统

致瘤土壤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 侵染许多双子叶植物的伤口时, 能引起植物冠瘿肿瘤疾病的发生。这是由于在致瘤土壤农杆菌中的 T<sub>1</sub> 质粒上的一段 DNA (T-DNA) 转移并整合到植物染色体中的结果<sup>[1-4]</sup>。因此致瘤土壤农杆菌中存在一种天然的植物遗传转化系统。进一步研究发现转化过程与 T-DNA 本身无关, 但与 T<sub>1</sub> 质粒的 V<sub>1</sub> 区域和 T-DNA 边界序列有关<sup>[5-10]</sup>。基于这一点构建了一系列植物遗传工程载体, 用来转化植物<sup>[11-15]</sup>。在构建的载体中去除了引起肿瘤生长的基因, 保留了整合所需要的边界序列, 在边界序列中间有一段模式外源基因如 npt、CAT 等, 这些基因在 nopaline 合成酶启动子的调节下, 能使植物对卡那霉素、氯霉素呈抗性, 从而便于筛选和鉴定转化细胞。

通过外源基因改良植物的遗传特性, 要有一种简单的、有效的转化系统。关于用致瘤土壤农杆菌转化植物原生质体已有报道<sup>[16-18]</sup>。但转化频率低 (10<sup>-4</sup>)。

也有人研究了整体植物接种转化<sup>[12]</sup>, 但此法实验周期长, 工作量大, 只适于非致瘤菌株。最近, 研究了一种体外组织转化方法<sup>[20]</sup>, 在很大程度上避免了原生质体转化频率低、易突变、重复性差等问题, 是一个很有希望的方法。

我们在植物基因工程的工作中, 利用烟草外殖体为材料, 获得了转化植株, 本文报道了这种简单、有效、快速转化系统, 并讨论影响转化的因素。

## 材料与方 法

### (一) 菌株及培养条件

1. *E. coli* 菌株 HB101 (pEND4K): 由 E. W. Nester 教授惠赠。图 1 示 pEND4K 的限制性图谱。pEND4K 含有在植物中能表达的 nos-npt 基因, 使转化植物呈 Km 抗

本文于 1987 年 3 月 20 日收到。

文本所用的缩写: Km; 硫酸卡那霉素, Cb; 羧苄青霉素, BA; 6-苄基腺嘌呤, 2,4-D; 2,4-二氯环氧乙酸, IAA; 吲哚乙酸

性表型; 除含有广谱复制子外, 还有pUC19的复制子, 在*E. coli*中为多拷贝, 便于操作; 含lambda ( $\lambda$ ) 噬菌体的cos位点, 多个可供外源DNA克隆的限制性酶切位点, 以及整合到植物染色体中所需的T-DNA左、右边界序列。

2. HB101 (pRK2013)<sup>[21]</sup>; D.R. Helinski 教授惠赠。pRK2013 含有帮助pEND4K从*E. coli*向*A. tumefaciens*转移的mob和tra功能并具K<sub>m</sub><sup>R</sup>标记。

3. *A. tumefaciens* C58C1B<sub>5</sub>S<sub>3</sub>Rif<sup>R</sup>; 是利用接合转移将pTiB<sub>5</sub>S<sub>3</sub>引入至消除pTiC58的菌后筛选得到的稳定Rif抗性菌株。

4. *E. coli*菌株: 在LB培养基中, 37℃培养。

5. *A. tumefaciens* 菌株: 在LB (附加2 mmol/L MgSO<sub>4</sub>)中, 28℃培养。

培养基中附加抗菌素的量 ( $\mu\text{g/ml}$ ): Km10, Cm25, Rif100。

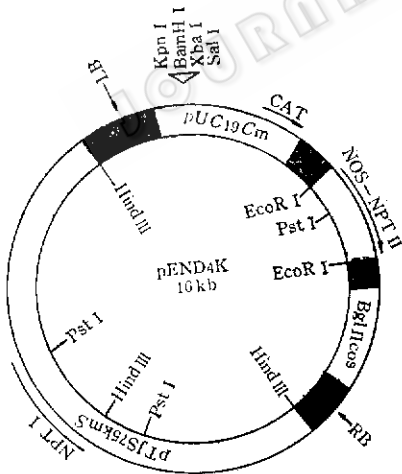


图1 pEND4K限制性内切酶图谱  
Fig. 1. Restriction map of transformation vector pEND4K

## (二) 植物材料、培养基和再生性实验

植物培养基A、B、C的共同成分为: MS无机盐, B<sub>5</sub>维生素, 3%蔗糖, 100

$\mu\text{g/ml}$ 酵母提取物(oxord LT), 200 $\mu\text{g/ml}$ 水解酪素 (Sigma)。

其中A培养基附加的激素为: NAA 1 $\mu\text{g/ml}$ , BA0.2 $\mu\text{g/ml}$ ; B培养基中激素为: 2,4-D 1 $\mu\text{g/ml}$ , BA0.2 $\mu\text{g/ml}$ ; C培养基中激素为: BA 2 $\mu\text{g/ml}$ , IAA0.2 $\mu\text{g/ml}$ 。

植物材料为“革新”烟草(由中国农科院作物育种栽培研究所提供)。

将大田苗叶片经表面灭菌(70%酒精、0.1%升汞处理)切成0.5 $\times$ 0.5cm<sup>2</sup>小块, 分别放于培养基A、B、C上, 28℃光周期16h/8h、1000 lx下培养。

## (三) 通过三亲交配、*E. coli*的pEND4K转移到致癌土壤农杆菌C58C1B<sub>5</sub>S<sub>3</sub>Rif<sup>R</sup>中

从28℃培养的OD<sub>600</sub> 0.8—1.0的C58C1B<sub>5</sub>S<sub>3</sub>; 37℃培养的HB101(pEND4K)和HB101(pRK2013)菌液中各取0.2ml, 涂于LB固体培养基, 28℃培养32h以上。用3ml 20mmol/L MgSO<sub>4</sub>悬浮细菌, 取0.2ml涂于含Rif、Cm的LB固体培养基上, 28℃培养48h。挑取单菌落连续传代几次, 再在含Km、Rif、Cm的LB平板上培养, 把三亲交配所得的三抗接合致癌土壤农杆菌TF14 (Rif<sup>R</sup>, Km<sup>R</sup>, Cm<sup>R</sup>)进行DNA检测。

## (四) 带有pEND4K的C58C1B<sub>5</sub>S<sub>3</sub>菌株DNA检测

HB101(pEND4K)按碱法抽提<sup>[23]</sup>。按改进的Kado法<sup>[24]</sup>进行TF14菌株的DNA检测。取1.5ml过夜培养的TF14 (Rif<sup>R</sup>, Km<sup>R</sup>, Cm<sup>R</sup>)于Eppendorf管, 在离心机上15000rpm离心1min, 用1ml TE buffer(20mmol/L Tris·Cl, 2 mmol/L EDTA, pH8.0)清洗一次, 然后用150 $\mu\text{l}$ 溶菌液(3%SDS、50mmol/L Tris、pH 12.6)温和的充分混匀, 室温下放置30min

以上,加入等体积的酚:氯仿(1:1)混匀,于15000rpm离心5min,取上清在0.6%琼脂糖,电泳缓冲液(10mmol/L Tris, 1mmol/L EDTA, pH7.9)60V电泳12—14h,于50 $\mu$ g/ml染色15min,UV下观察。

#### (五) 把带有 pEND4K 和 pT<sub>1</sub>B<sub>3</sub>S<sub>3</sub> 的 TF14 与叶、茎、叶柄外殖体共培养

取大田苗叶片、茎、叶柄外殖体,按下面方法灭菌:先在70%乙醇中浸30—40秒,取出后用无菌水洗一次,放到0.1%升汞中浸5min,用无菌水洗5次,无菌滤纸吸干后,切成0.5 $\times$ 0.5cm<sup>2</sup>的小叶片和5mm长的小茎盘、叶柄。把它与OD<sub>600</sub>为0.8的TF14菌液在9cm平皿中共培养,此时组织浮于菌液上,轻摇5min,用无菌滤纸吸干后,放在B培养基上,25 $^{\circ}$ C培养48h。用500 $\mu$ g/ml的Cb溶液洗组织,吸干后,放到含Cb500 $\mu$ g/ml、Km100 $\mu$ g/ml的B培养基上,置植物光照培养箱中,28 $^{\circ}$ C、16h/8h、1000lx下培养。

#### (六) 愈伤的形成及转化植物的再生

在B培养基上形成愈伤组织后,待长到合适大小,转到诱导分化的C培养基上,培养基中含100 $\mu$ g/ml Km、500 $\mu$ g/ml Cb。培养条件同前。待出现绿色芽点后传一次培养基(即C培养基),出芽后,将芽切下,放到无激素的MS培养基上诱导长根,待小植株长出4片子叶时,移栽到室外,长成大植株。

#### (七) 再生植株各部分抗性检测

取再生植株各个部分:叶(不同部位)、叶柄、茎(不同部分)放在含100 $\mu$ g/ml Km、500 $\mu$ g/ml Cb的C培养基上培养。能直接分化的说明有抗性。

#### (八) 转化植株DNA的提取

取2g新鲜的叶片(及茎),用0.1mol/L EDTA pH8.0溶液洗后,剪碎放入50ml离心管中,放入液氮中3—5min,用玻璃研

钵打碎,加入15ml预热(65 $^{\circ}$ C)的抽提缓冲液(100mmol/L Tris $\cdot$ Cl, 500mmol/L EDTA, 500mmol/L NaCl, 10mmol/L 巯基乙醇)和1ml 20% SDS,温和混匀后,放入65 $^{\circ}$ C水浴保温10min,加入0 $^{\circ}$ C的5ml 5mol/L KAc,置冰上20min,在10000 rpm 4 $^{\circ}$ C下离心30min。将上清转到另一个50ml离心管中(内含10ml-20 $^{\circ}$ C的异丙醇)混匀后放-20 $^{\circ}$ C 30min,用15000 rpm离心15min,取沉淀,溶于1ml 2mol/L NaCl 溶液中,用酚、氯仿分别抽提除去蛋白。

#### (九) DNA-DNA分子杂交

取40 $\mu$ l植物DNA溶液(相当于0.1g植物材料)加入等体积20 $\times$ SSC,再加等体积0.4mol/L NaOH,变性植物DNA,用毛细管将10 $\mu$ l样品点于硝酸纤维素滤膜(MILLIPORE Corporation)上,待室温干燥后,80 $^{\circ}$ C真空烘烤2h,膜放于真空中保存。

按碱法<sup>[2,3]</sup>制备pEND4K,经CsCl密度梯度离心纯化DNA后,按Bio-Rad所描述的标记方法标记,以70 $\mu$ Ci  $\alpha$ -<sup>32</sup>Pd CTP (Amersham 3000  $\mu$ ci/mmol)经Beckman IS-5801液闪仪测得标记比活在5 $\times$ 10<sup>7</sup>cpm/ $\mu$ g DNA。按[24]方法进行分子杂交。-20 $^{\circ}$ C下,X-光片(天津感光胶片厂)曝光、自显影。

#### (十) F<sub>1</sub>代抗性基因的遗传

取自花授粉的种子,经表面灭菌后接种于MS(加200 $\mu$ g/ml Km)培养基上,于25 $^{\circ}$ C下发芽,三周后计算抗性子代的数目。

## 结 果

#### (一) 植物可再生性实验

烟草“革新3号”的叶片、茎段在B

培养基两周内形成愈伤组织, 此组织在 C 培养基上两周内出芽, 而叶片、茎段组织在 C 培养基上能够直接分化出芽, 但时间要在三周以上。

### (二) pEND4K 从 *E. coli* 转移到致癌土壤农杆菌 C58C1B<sub>6</sub>S<sub>3</sub> 中

当 HB101 (pEND4K)、HB101 (pRK 2013)、C58C1B<sub>6</sub>S<sub>3</sub> 均处在良好的生长时期 (对数生长期) 可获得有效的转移子。实验中, 我们对不同生长状态及培养条件的菌株进行接合转移, 发现液体培养, 对数生长中期的菌接合有效。为了获得高频的转移, 我们还对接合时间进行了研究, 12—14h 接合后筛选, 频率低, 36h 以上有高频接合子出现。

利用改进的 Kado 法检测带有正确表型的接合菌株 TF14, 含 pEND4K 和 pTiB<sub>6</sub>S<sub>3</sub> 两个质粒。

### (三) 外植体与 TF14 的共培养

取 -20℃ 甘油保存的 TF14 菌种在 YEB 中活化 48h, 然后取 0.1ml 到 20ml LB 液体培养基中, 培养 12h 即可用于转化。

用培养过长时间或者不经活化的菌株与组织共培养, 植物转化频率都很低 (约为 5 个愈伤/100 个外植体), 外植体与菌接触的时间在 8 min 以下时较合适, 否则植物叶片将出现褐化, 损伤使转化失败。吸干菌液后, 放到无抗菌素培养基上。为了保证充分的转化, 以及抗性的表达, 要培养 36h 以上。

### (四) 抗性愈伤的形成和抗性植株的再生

共培养后的外植体, 在含 100μg/ml Km 和 500μg/ml Cb 的 B 培养基上 (即附加 2,4-D 1μg/ml, BA 0.2μg/ml) 约两周后, 有白色、毛状的愈伤组织出现, 再过两周后可形成 0.4×0.4×0.4cm<sup>3</sup> 大小的愈伤组织, 图 2 (这种愈伤组织可继续在此培养基上培养 6—8 周, 仍然不失去分化能力), 然后将其转到含相同抗菌素和 BA 2μg/ml, IAA 0.2μg/ml 的 C 培养基上, 两周后有绿色芽点形成, 再在相同培养基上, 在一周内便有大量的丛生芽出现, 长到合适大小, 将芽切下放到含 Km 100

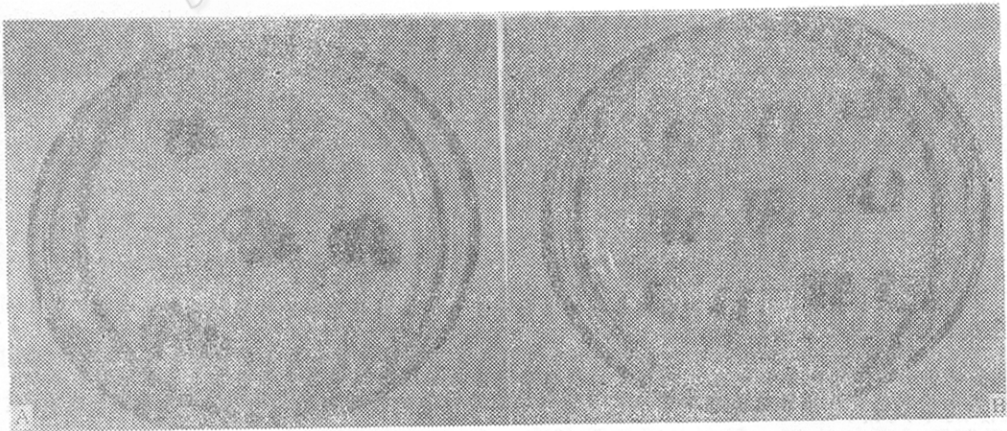


图 2 抗性愈伤组织的形成

Fig.2 Formation of Km resistant callus

A. 用 TF14 转化叶、茎外植体, 在 100μg/ml Km 的 B 培养基上, 形成愈伤组织

Leaf, stem explant transformed by TF14 can form callus on B medium contain 100μg/ml Km

B. 用 C58C1B<sub>6</sub>S<sub>3</sub> 转化的叶盘, 在 100μg/ml Km 的 B 培养基上, 30 天后黄化, 死亡

Leafdisc transformed by C58C1B<sub>6</sub>S<sub>3</sub> browned and died on B medium contain 100μg/ml Km, after 30 days

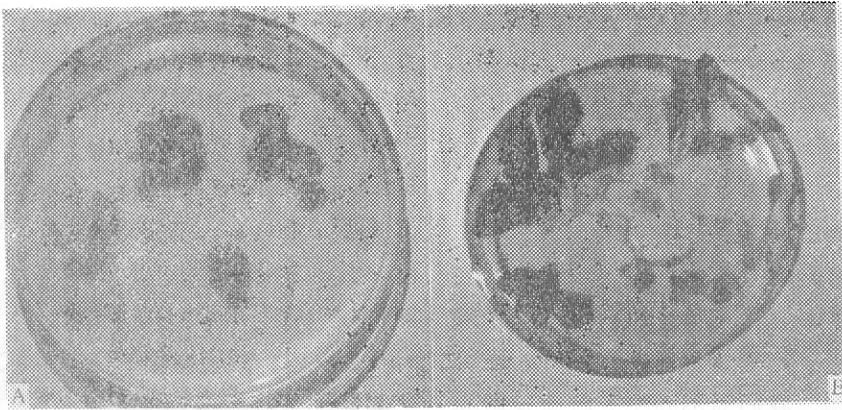


图3 抗性植株的形成

Fig.3 Formation of resistant plantlet

A.用TF<sub>14</sub>转化外殖体,形成愈伤组织后,转到含100µg/ml Km的C培养基上,形成芽  
The callus from explant transformed by TF<sub>14</sub> can shoot on C medium contain Km 100µg/ml  
B.形成的芽,切下后,转到含Km100µg/ml的无激素培养基上,形成根  
Shoot rooting on MSO medium contain Km 100µg/ml

µg/ml, Cb500µg/ml 的无激素培养基上诱导长根,约一周左右有根的形成(见图3)。

在实验中设立了两组对照:(1)没有经pEND4K转化的烟草叶片;(2)只用C58C1B<sub>6</sub>S<sub>3</sub>处理烟草外殖体。

从图2可看出,三周后,(1)、(2)对照组的外殖体均黄化而死亡。

在实验中,研究了一步法转化,即直接把转化的外殖体放到诱导长芽的选择培养基上发现,在60个外殖体中,只有3个外殖体直接出芽,而且出芽的时间在6周左右,与上述的从愈伤到分化的途径相比较,一步法转化筛选效果不理想。

在从愈伤到分化的转化过程中,接种的150个外殖体,有约60个外殖体出现多个抗性愈伤组织。在抗性的愈伤组织中,又有大量的丛生芽出现,这些丛生芽是起源于外殖体的不同部位上的愈伤组织。在培养早期,可见每个外殖体上有多个独立的小愈伤形成,进而又可形成多个芽。可以认为多个独立的愈伤,及随后产生的多个抗性芽,其中每个芽都是独立的转化事件。实验结果表明,如果以接种的100个外殖体

为基础,那么所得抗性芽有600—1200个抗性芽/100外殖体。

### (五)再生的抗性植株各个部分的外殖体的抗性检测

为了进一步验证抗性植株是转化的结果,并了解转化细胞能否在有丝分裂中稳定地保持抗性基因,我们取转化植株的不同部位进行了抗性检测,在每毫升含 Km 100µg、Cb 500µg、BA 2µg、IAA 0.2µg 的培养基上,两周内,转化植株的各种部分的外殖体(叶、茎)约有数十个芽出现。芽的生长速度比在不含抗菌素的相同培养基上的未转化叶片的速度更快。Km 和 Cb 是否有植物激素的作用,有待于进一步的研究。另外,大量的芽的出现,为快繁提供了可能。

### (六)DNA-DNA分子杂交

快速提取的植物DNA片段在50kb以上,取约0.5µg DNA点于硝酸纤维素滤膜上进行杂交。杂交的结果表明,在非转化的植物中没有新霉素磷酸转移酶基因的同源区,而转化的植株中,呈杂交阳性。从图4可见,不同个体的杂交强度不同,说明外源基因拷贝数不同,拷贝数的多少与

基因表达的关系的研究正在进行中。

### (七) F<sub>1</sub> 代抗性的检测

将自花授粉形成子一代，种在200μg/ml Km的培养基上。共作了二个转化植

株的子一代，A植株400粒种子都有Km抗性，另一植株B接种500粒种子，有400粒种子形成小植株，100粒左右没有出芽（见图5）。

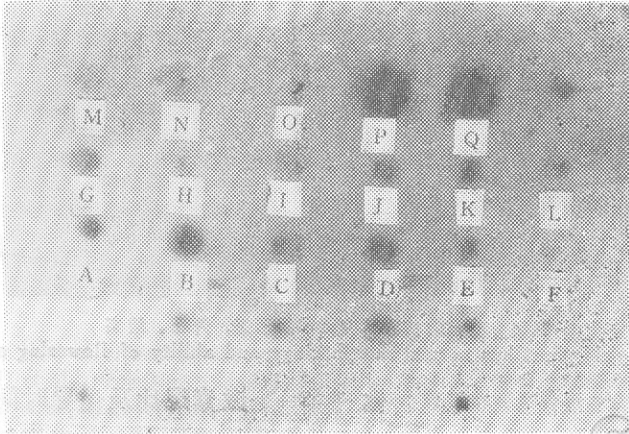


图 4 pEND<sub>4</sub>K为探针，DNA-DNA分子杂交结果

Fig.4 Dotting hybridization between pEND<sub>4</sub>K DNA and transgenic plant DNA

对照 1: M, N, O (未转化植物 Non-transgenic plant)

对照 2: P, Q (0.1μg pEND<sub>4</sub>K)

不同的转化植株 Different transgenic plant: A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L

6)，转化频率达 600—1200 个转化植株/1000个外植体。

Horsch 等 1985 年成功地报道了叶盘转化矮牵牛的结果。最近又报道了番茄叶盘转化。他们在实验中使用饲喂细胞的预培养以及利用共整合系统(SEV系统)。我们在实验中对他们的方法进行了简化。首先，我们使用了双元载体系统这样对于克隆在 mini-Ti 上的外源基因，可以有效地进入不同的土壤致瘤农杆菌中，以实现不同的宿主植物转化。因为不同致瘤土壤农杆菌有一定的侵染宿主范围。野生型的 Ti 质粒的 T-DNA 与 mini-Ti 共转移到植物细胞中的频率是低的，而共整合系统（如 pGV3850）则是 100% 的共转移。所以本实验所采取的途径，不必对具有不同侵染宿主范围的土壤致瘤农杆菌的 Ti 质粒进行“解除武装”（即去除致癌性）就可有效地把所克隆的外源基因转移到各种作物中去。另外由于我们采用的是二元载体系

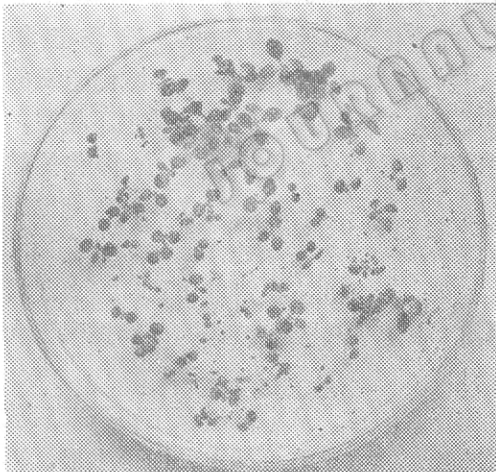


图 5 转化植株子一代在 Km200μg/ml 培养基的生长

Fig.5 F<sub>1</sub> of transgenic plant growth on the medium contain Km200μg/ml

## 讨 论

本文报道 nos-npt 基因通过土壤致瘤农杆菌转移到烟草细胞中，并快速筛选出转化植株。转化植株有正常生长能力（图



图 6 转化的植株具有正常的形态, 开花、结实

Fig. 6 Transgenic plant has normal morphorlogy and ability of flowering and seedling

统, 不需要象共整合体系统那样, 对转化菌株需作分子杂交才可鉴定。二元载体系统只需对 DNA 质粒图谱的简单操作 (证明出现了 Ti 带和 mini-Ti 带) 即可鉴定, 方法简便, 简化了实验操作。另外 pGV3850 系统中含有内源的  $\beta$ -内酰胺酶, 对 Cb 具有不同程度的抗性, 因此实验中采用 Cb 不能有效地杀死细菌, 是实验中的问题。现在国外在用 pGV3850 系统时, 不用 Cb 而代之以 cefotaxim, 可是目前国内尚不能生产这种药品。在本实验中, 我们没有采用 pGV3850 系统, 在国内工作条件下, 采用二元载体系统, 具有优越性。

我们在实验中把茎盘、叶盘与致癌土壤农杆菌共培养后, 没有放到饲养平板上, 而是把它放到不含抗菌素的植物培养基上, 诱导细胞脱分化, 进入有丝分裂状态, 然后, 在选择培养基上筛选转化细胞。我们的实验结果表明, 对烟草来讲, 饲养细胞不是必需的, 这些细胞之间就存在着喂饲。对于一个可再生的品种, 培养基的养分及激素配比和诱导的时间对分化的快慢有很大的影响。在紫花苜蓿和马铃薯等植物组织培养中, 我们已发现类似情况 (未发表资料)。

激素配比及诱导时间合适则转化的细胞分化很快 (未发表资料)。

我们在实验中发现, 利用致癌的 C58 C1B<sub>6</sub>S<sub>3</sub> 菌株作为 Helper, 转化频率比利用不能致癌的 B<sub>6</sub>S<sub>3</sub>SE 菌株作为 Helper 时要高 (未发表的资料)。

在转化外殖体形成的抗性愈伤组织上, 有大量的丛生芽出现。由于愈伤组织的出现位置彼此相隔, 芽的出现也不相联, 所以可能是每个细胞受到独立转化的结果。丛生芽是否为多个独立转化细胞的综合结果, 有待利用染色体原位杂交等技术来鉴定。大量的丛生芽的出现, 增大了转化频率, 为遗传工程植株的分析提供了大量材料。

分化的芽, 从愈伤组织上切下来后放到无激素的抗性培养基上, 即可生根, 再生的植株各个部分, 在含 Km 的分化培养基上, 均可分化具有抗 Km 的表型, 说明 nos-npt 基因在有丝分裂中是稳定的。

在工作中发现, 把抗性的外殖体放到有抗菌素的培养基上时, 分化速度比正常的外殖体在不含抗菌素的培养基上分化快, 推测 Km 或 Cb 可能有类似激素的作用。

DNA 分子杂交确切地表明, 在转化的植株中有 *npt* 基因的存在, 外源基因通过本方法可以引入到植物的基因组中去。

再生植株 DNA 分子杂交的强度不同, 说明在植物个体中外源 DNA 的拷贝数不同, 进一步的实验还在进行中。

再生的转化植株, 具有正常的形态, 并能开花、结实。

转化植物自花授粉子一代的遗传表型鉴定表明, 在 A 植株中, 可能有多个 *Cop-*

*ies* 的外源 DNA, 因为它的子代均表现 Km 抗性。推测这可能是由于多次转化或者基因扩增的结果。B 植株中, 有典型的孟德尔式 3:1 遗传, 这些结果表明, 外源基因可以通过有性繁殖稳定地传到后代。

本文描述的转化方法具有简便、可靠、有效等特点, 此法为外源基因导入植物以及外源基因在植物中的表达等提供了有效的转化系统。

### 参 考 文 献

- [1] Van Larebeke, N, et al., *Nature*, 252:169—170, 1974.
- [2] Chilton, M.-D, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 77:4060—4064, 1980.
- [3] Chilton, M.-D, et al., *Cell*, 11:263—371, 1977.
- [4] Kahl, G, et al., *Molecular Biology of Plant Tumors*, pp.615, 1982.
- [5] Shaw, C.H, et al., *Nucleic Acids Res.*, 12:6031—6041, 1984.
- [6] Yadav, N.S, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 79:6322—6326, 1982.
- [7] Zamobryski, P, et al., *Mol. Gen. Genet.*, 1:361—370, 1982.
- [8] Hoekema, A, et al., *Nature*, 303:179—180, 1983.
- [9] Klee, H.J, et al., *J. Bacteriol.*, 153:878—883, 1983.
- [10] Klee, H.J, et al., *J. Bacteriol.*, 150:327—331, 1982.
- [11] An, G, et al., *EMBO*, 4:277—288, 1985.
- [12] Zambryski, P, et al., *EMBO*, 2:2143—2150, 1983.
- [13] Klee, H.J, et al., *Bio. Technology*, 3:637—642, 1985.
- [14] Fraley, R.T, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 80:4803—4807, 1983.
- [15] Bevan, M., *Nucleic Acids Res.*, 12:8711—8721, 1984.
- [16] Marton, L, et al., *Nature*, 277:129—131, 1979.
- [17] Horson, R.B, et al., *Science*, 223:496—498, 1984.
- [18] DeBlock, M, et al., *EMBO*, 3:1681—1689, 1984.
- [19] Wullems, G.J, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 78:4344—4348, 1981.
- [20] Horsch, R.B, et al., *Science*, 227:1229—1231, 1985.
- [21] Ditta, G, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 77:7347—7351, 1980.
- [22] Birnboim, H.C, and Doly, J., *Nucleic Acids Res*, 7:1513, 1979.
- [23] 王璋瑜, 范云六, *生物工程学报*, 3:230—232, 1987.
- [24] Maniatis, T, et al., *Molecular Cloning*, pp.387, 1982.



# ESTABLISHMENT OF SIMPLIFIED EFFICIENT GENETIC TRANSFORMATION SYSTEM OF PLANT EXPLANT

Du Jie Fan Yunliu

*(Lab. of Molecular Biology, Biotechnology Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing)*

A modified, simple and efficient leaf disc and stem disc transformation of plant explant is reported. The *Agrobacterium tumefaciens* strains C58ClB<sub>6</sub>S<sub>3</sub> carrying mini-Ti plasmid is co-cultivated with explant for five minutes. On modified plant medium with 100ug per milliliter kanamycin sulfate, transgenic tobacco up to 40% is obtained. The different parts of the plant leaves and stems regenerated from transformed cells are also resistant to kanamycin. There are DNA(npt gene) homology between mini-Ti and total DNA from transformed plants is confirmed by DNA-DNA molecular hybridization. Transgenic plants have normal morphology and ability of flowering. Obtained kanamycin resistant self-pollinate progeny suggests that foreign gene inherited to progeny through meiosis. Factors affected transformation have been discussed in this report.

## Key words

Leaf disc; plant genetic transformation; high efficiency system