

显花植物花器官原位转化技术的研究进展

张巧玲^{1,2}, 位芳^{2,3*}, 胡杰³, 田保明^{2,3}, 臧新²,
赵芳方³, 崔明珠³, 李云玲³

(1. 长江大学 化学与环境工程学院, 湖北 荆州 434023; 2. 郑州市植物分子育种重点实验室,
河南 郑州 450001; 3. 郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450001)

摘要: 采用遗传转化技术将所要求的外源目的基因导入受体植株, 从而创造出人类所需要的新品种是当今科研的一个热点问题, 其中, 转化方法是植物遗传转化的重要环节。建立一套操作简便、快速、有效的遗传转化体系, 是成功获得可遗传性转化植株的关键所在。综述了前人的研究成果, 详细总结了以花器官为转化受体的农杆菌介导的植物遗传转化技术的最新研究成果, 包括该技术的应用原理、形成过程及优化条件等, 并进一步分析了花器官原位转化技术在不同植物中的应用前景。认为, 目前可以通过 floral-spray 改良的 floral-dip 及利用 drop-by-drop 转化方法获得较高的转化率。但每个方法各有不足。总体来说, floral-dip 转化方法可进一步改良并推广应用于多种植物种类。

关键词: 原位转化; 花器官; 显花植物

中图分类号: Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)09-0006-05

Progression of In-planta Transformation of Floral Organs *in Situ*

ZHANG Qiao-ling^{1,2}, WEI Fang^{2,3*}, HU Jie³, TIAN Bao-ming^{2,3},
ZANG Xin², ZHAO Fang-fang³, CUI Ming-zhu³, LI Yun-ling³

(1. College of Chemistry and Environmental Engineering, Yangtze University, Jingzhou 434023, China;
2. Key Laboratory of Plant Molecular Breeding of Zhengzhou, Zhengzhou 450001, China;
3. Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: Successful establishment of a rapid and efficient transformation system is critical to obtain the heritable transformants in the process of genetic engineering. This paper briefly sketched the previous research results and summarized the recent progresses in detail regarding in-planta transformation of floral organs *in situ* mediated by *Agrobacterium* in plants, including the principle of transformation, formation of methods, and optimization of experimental performance as well as analysis of the future application of this in-planta transformation in flowering plants. Floral-spray, floral-dip and drop-by-drop could get a high transformation rate, but each has a deficiency. Floral-dip transformation method could be more available to further improve and applied to other species.

Key words: in-planta transformation; floral organ; flowering plants

随着植物基因工程技术的不断发展, 植物遗传转化技术也日益成熟和完善。目前, 植物遗传转化技术一般包括物理法(如基因枪法)^[1-2]、化学法(PEG 法)^[3]以及生物学法(农杆菌介导法)等, 但是

收稿日期: 2013-03-20

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2010BAD01B02); 国家转基因生物新品种培育科技重大专项(2009ZX08004-002B); 郑州大学研究生科学研究项目(12L00403)

作者简介: 张巧玲(1966-), 女, 河南许昌人, 副教授, 硕士, 主要从事生物化学方面的研究。E-mail: zql6922@163.com

* 通讯作者: 位芳(1981-), 男, 河南项城人, 副教授, 博士, 主要从事植物遗传及育种方面的研究。

E-mail: tianbm@zzu.edu.cn

这些方法一般都建立在植物组织培养及再生体系建立的基础之上。尽管这些方法具有试验重复性好、不受季节限制、适用范围广等特点,但由于植物组织再生耗时长、组织培养技术和设备要求高、试验过程易污染、试验成本较高、需专人操作以及假阳性较高等问题,以植物组织再生为核心的遗传转化体系尚未得到广泛成功应用,尤其是对蔬菜和农作物。

近年来,以花器官为转化受体的农杆菌介导的植物原位转化技术在拟南芥中逐渐建立,并日益成熟与完善。该技术体系是一种较为简便、快速、高效的非组织培养的遗传转化方法,其优点是利用农杆菌直接转化植株花器官,避免了组织培养和再生体系建立等繁琐的试验操作过程,同时也消除了由于试验过程引起的组织细胞变异等不利影响。目前,农杆菌介导的浸花转化已成功应用于大白菜^[4]、芥菜^[5]、盐芥^[6]、小麦^[7]、油菜^[8]、亚麻^[9]、玉米^[10]、大豆^[11]等蔬菜和作物中,并尝试利用真空渗透辅助转化技术,以显著提高转化效率^[12-13]。

在前人研究的基础上,结合最新研究成果,对农杆菌介导的植物花器官原位转化技术的应用原理、建立过程以及优化条件等展开讨论,以期能进一步有效地将其应用于更多的植物种类。

1 花器官原位转化技术的建立及其应用原理

1.1 花器官原位转化技术的提出与建立

Feldmann 等^[14]和 Czako 等^[15]以拟南芥根器官为外植体进行遗传转化,并在一定程度上提高了转化率。随后,众多研究者做了大量农杆菌介导的拟南芥转化体系研究,虽然这些研究成果都可以获得相应的拟南芥突变体,但是大部分研究成果仍依赖于组织培养技术^[16-22]。1987年 Feldmann 等^[23]提出了一种不依赖于组织培养的遗传转化方法,该法通过将拟南芥萌发种子与农杆菌共培养,并最终成功得到嵌入 T-DNA 的突变植株。这种方法避免了繁琐耗时的组织培养和再生体系建立等诸多步骤,是首次通过非组织培养途径成功获得遗传转化材料。然而这种方法的转化率较低,必须通过大量的试验工作才能获得一定数量的转化材料。尽管如此,Feldmann 等提出的非组织培养转化方法为植物遗传转化提供了一个新途径。1990年 Chang 等^[24]在第4届拟南芥研究国际会议上描述了这种新的拟南芥遗传转化技术,即通过损伤性处理带有花序的

嫩枝,然后将伤处与农杆菌菌悬液共培养进行转化试验。1993年 Bechtold 等^[25]报道了真空渗透辅助转化拟南芥的方法(图1),成为拟南芥遗传转化研究史上的一座里程碑,并成为拟南芥遗传转化途径的一个重要转折点。随后,Katavic 等^[26]对该技术进行了详细研究,并分别从不同方面开展转化效率研究,包括转染效率、T-DNA 拷贝数与转化率以及后代转化株来源等。同时,该研究也考虑了温度、光周期和拟南芥生态型等因素对转化结果的影响。

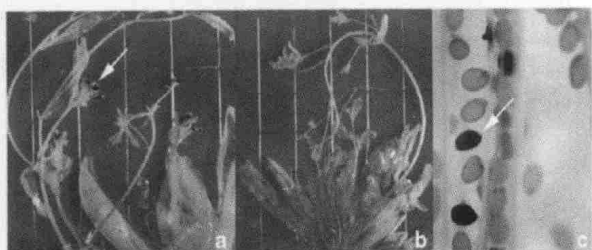


图1 floral-dip 花器官原位转化方法

利用真空渗透辅助转化技术可以显著提高转化效率(约1%),也避免了组织培养中外植体褐化、体细胞变异等现象,不需要大量劳力以及昂贵设备,易于操作。因此,真空渗透辅助遗传转化技术被迅速广泛应用于许多植物的遗传转化研究,例如烟草、菊苣、萝卜、咖啡以及柑橘属果树等^[27-32]。

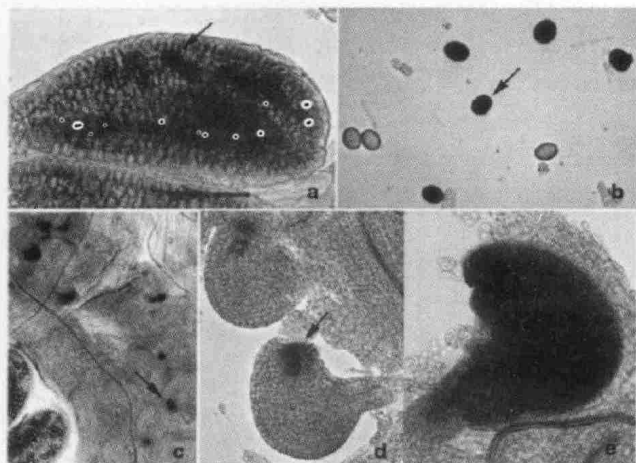
1.2 花器官原位转化技术的应用原理

Ye 等^[12]利用真空渗透辅助转化拟南芥花器官,并证明拟南芥幼龄胚珠(雌配子体)是农杆菌介导并成功转化的花器官的主要部位。首先,该试验利用真空渗透处理拟南芥花器官,以 GUS 作为标记基因检测转化后 3~5 d 拟南芥花器官及其形成的幼嫩种子,均发现 GUS 显著表达(图2)。为了进一步证实真空渗透的转化部位是胚珠,分别检测了转化处理的花粉和胚珠,发现经处理的幼嫩花粉粒在 3~5 d GUS 表达水平较低(约1%),5~11 d 后能达到6%;然而,在转化处理的胚珠中却始终检测到 GUS 的显著表达;通过对转化后形成的种子检测,发现 GUS 活性表达与转化胚珠具有一致性(图3)。此外,以未处理植株为对照,将外源花粉授于转化后的拟南芥植株,同时,也选取处理植株的花粉授于未处理的拟南芥植株。结果发现,只有处理后的拟南芥作为母本时才能得到转化种子或转化植株,进一步证实了只有幼嫩的胚珠才是真空渗透转化的目标部位。



a. 转化 3~5 d 的植株; b. 转化不含 GUS 基因的重组质粒的植株; c. 转化处理 3 周后的种子

图 2 真空渗透辅助 floral-dip 花器官原位转化拟南芥结果



a, b. 分别为表达 GUS 活性的花粉囊及花粉;
c. 包含表达 GUS 活性胚珠的子房;
d. 表达 GUS 活性的未开放花的胚珠;
e. 更加成熟的表达 GUS 活性的胚珠

图 3 floral-dip 原位转化花器官的 GUS 检验

另外, Desfeux 等^[13]利用 LAT52、ACT11 等特异性启动子进一步确认农杆菌介导的花器官转化的目标部位是胚珠, 并通过拟南芥突变体 CRABS-CLAW (该突变体能形成一个心皮顶端不能完全愈合的雌蕊) 转化试验证明, 与野生型相比, 该突变体转化率显著提高。

1.3 花器官原位转化技术的应用

花器官原位转化技术在拟南芥中广泛应用, 在其他作物中的应用也多有报道。Curtis 等^[33]利用农杆菌介导法, 在表面活性剂 silwet L-77 0.05% 条件下, 浸染萝卜的初花期花序, 获得了转化萝卜植株, 其转化频率为 1.4%, 与转化拟南芥频率相近。Mamontova 等^[10]利用该方法转化玉米, 得到了 32.7% 的转化率。Zale 等^[34]在单子叶作物小麦花期前 0~4 d, 利用农杆菌介导的 floral-dip 法得到了 3 株稳定遗传的转化株。Liu 等^[35]利用农杆菌介导的原位子房滴注法转化大豆, 最高获得 11% 的转化率。此外, 该法在番茄、大豆、甘蓝型油菜等^[36-40]多种植物中相继有应用成功的报道。因此, 花器官原位转化技术已经引起科技工作者广泛关注, 并在多种植物遗传

转化中得以成功应用。

2 花器官原位转化技术的优化与发展

2.1 floral-dip 法花器官原位转化技术的优化

1998 年 Clough 等^[16]对真空渗透遗传转化技术做了进一步改进和优化, 在农杆菌悬浮液加入蔗糖溶液与 silwet L-77, 并取代了真空渗透处理; 同时, 系统分析了培养基类型、pH 值以及花器官发育的不同时期对转化率的影响, 结果表明: (1) 剪除拟南芥主茎枝, 促使多级次生分枝充分生长发育至花蕾期, 此时为遗传转化的最佳时期; (2) 浸染液中添加培养基的成分及 pH 值变化对转化效率无明显影响; (3) 加入 5% 的蔗糖和 0.02% silwet L-77 可以达到更理想的转化效果。

Clough 等^[16]进一步研究了 silwet L-77、蔗糖浓度、菌悬液的 OD₆₀₀ 以及浸花间隔时间等因素对转化率的影响, 结果表明, 在对拟南芥花器官处理过程中, silwet L-77 为 0.2 mL/L、蔗糖为 10% (m/V) 以及最佳菌悬液 OD₆₀₀ 为 0.8~1.0 时转化效率较高, 并且反复浸染, 每间隔 5~6 d 处理 1 次, 可以明显提高转化效率, 于是把这个方法正式命名为 floral-dip 法。floral-dip 法在应用过程中不断完善优化^[36-37], 已经成为拟南芥遗传转化的主要方法。floral-dip 法虽然对 Col-0、Ws-0 等不同生态型拟南芥的转化很成功, 却尚未有 Ler 生态型转化成功的报道。

2.2 floral-spray 花器官喷雾遗传转化法

2000 年 Chung 等^[41]对拟南芥花器官 floral-dip 转化法进行了改进, 并尝试了拟南芥花器官喷雾遗传转化法 (floral-spray), 该方法可以说是对 floral-dip 法的一种演变。这种方法选择苗龄约 6 周的拟南芥植株为转化对象, 此时已形成部分角果, 每隔 8 h 喷施 1 次浸染液, 反复喷施 3 次, 每次喷施结束后, 用塑料罩将整个植株密封以保持较高的湿度 (约 12 h)。与 floral-dip 转化法相比, 该转化方法具有较高的转化效率, 反复处理可以显著提高转化效率, 如喷施 3 次, 平均转化率约为 2.41%。此外, 其优点在于工作效率高、节约劳力、对材料无损伤, 并可以用于其他花器官较大的植物, 以及部分木本开花植物。

2.3 drop-by-drop 花蕾滴注遗传转化法

Desfeux 等^[13]证明了浸花法转化的目标是胚珠, 在子房形成过程中, 存在一个开放结构, 这个开放结构会在开花前 3 d 被柱头封闭。随后, Wang 等^[38]、Martinez-Trujillo 等^[42]、Chhikara 等^[43]对 floral-dip 法进行了优化, 即 drop-by-drop 花蕾滴注遗传转化法, 通过微量吸液管直接对未开放的花蕾滴注取代浸染

过程(图4)。基本操作过程如下:在花序长至大约5 cm时,用微量移液管滴注每一个未开放的花蕾,每隔4 d滴注1次,连续进行3次或更多。花蕾滴注转化法遗传转化率可以达到 $(1.12 \pm 0.26)\%$,比floral-dip法转化率 $[(0.57 \pm 0.18)\%]$ 提高近1倍。同时,也减少了浸染过程对植株造成的伤害。这个方法的最大优点在于极大提高了转化效率,比较适合在筛选抗逆突变体时运用。但是,由于处理过程中需要对每个未开放的花蕾进行多次共培养处理,较为消耗劳力,不适于大量材料处理。

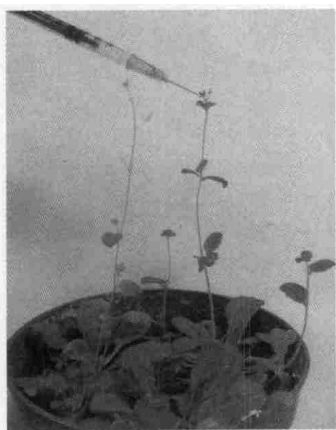


图4 drop-by-drop转化方法

3 展望

目前,可以通过floral-dip、优化的floral-dip、floral-spray及drop-by-drop转化方法获得较高的转化率。虽然这些方法的操作步骤有些不同,导致了转化率的高低差异,但是基本上都有一个共同的特点,即转化条件为:对拟南芥生长阶段的选择基本都是6周左右大小,剪去主枝,二级侧枝为5 cm;silwet L-77的最适浓度为0.02%;菌体生长至稳定期,即 OD_{600} 为2.0时转化效率最高;浸花最适间隔时间为5 d、浸染2次;浸染液的蔗糖浓度为5%时转化效率较好。

但是,每个方法都有不足之处。第一,floral-dip转化方法相对来说操作过程比较简单,可以大批量处理试验材料,但转化的浸入过程可能也会对处理的植物茎叶产生很大影响,导致获得的种子数量减少,在一定程度上会影响转化种子的筛选;第二,虽然floral-spray法方便、不需要耗费大量劳力,但是这种方法有可能形成交叉污染,所以在大量应用方面受到限制;第三,利用drop-by-drop转化方法目前可以获得相对较高的转化率,可以有效应用于目的基因筛选、功能基因研究,但是由于需要对每一朵花分时间段进行滴注,需要消耗大量的劳动力和时间,试验过程的操作也需要极其专注小心,所以

这个方法适用于少量的试验。因此,综合比较以上转化方法,floral-dip花器官原位转化法由于操作简便和适用于批量处理,且转化效率较高,更适合进一步改良并推广应用于其他更多植物种类。

参考文献:

- [1] 黄群策. 离子束介导技术在实际应用中所存在的问题及研究对策[J]. 郑州大学学报:理学版, 2007, 39(2): 166-176.
- [2] 吴丽芳, 李红, 宋道君, 等. 建立低能离子束介导小麦转基因方法并获得转GUS基因植株[J]. 遗传学报, 2000, 27(11): 982-991.
- [3] 杨仲南, 许智宏, 白永延, 等. 外源GUS基因在PEG介导的花椰菜原生质体中的瞬间表达[J]. 植物生理学报, 1994, 20(3): 272-276.
- [4] Chhikara S, Chaudhary D, Yadav M, et al. A non-tissue culture approach for developing transgenic *Brassica juncea* L. plants with *Agrobacterium tumefaciens* [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2012, 48(1): 7-14.
- [5] Shin J, Cho H, Park M C, et al. Transformation of rice *OsMADS1* gene causes homeotic mutations in floral organs of chinese cabbage (*Brassica campestris*) [J]. Journal of Plant Biology, 2003, 46(1): 46-51.
- [6] Li H, Xu J, Chen L, et al. Establishment of an efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated leaf disc transformation of *Thellungiella halophila* [J]. Plant Cell Reports, 2007, 26(10): 1785-1789.
- [7] Zale J M, Agarwal S, Loar S, et al. Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Cell Reports, 2009, 28(6): 903-913.
- [8] Verma S S, Chinnusamy V, Bansa K C. A simplified floral dip method for transformation of *Brassica napus* and *B. carinata* [J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2008, 17(2): 197-200.
- [9] Liu X, Brost J, Hutcheon C, et al. Transformation of the oilseed crop *Camelina sativa* by *Agrobacterium*-mediated floral dip and simple large-scale screening of transformants [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2012, 48(5): 462-468.
- [10] Mamontova E M, Velikov V A, Volokhina I V, et al. *Agrobacterium*-mediated in planta transformation of maize germ cells [J]. Russian Journal of Genetics, 2010, 46(4): 501-504.
- [11] Jiang N, Jeon E, Pak J, et al. Increase of isoflavones in soybean callus by *Agrobacterium*-mediated transformation [J]. Plant Biotechnology Reports, 2010, 4(4): 253-260.
- [12] Ye G N, Stone D, Pang S Z, et al. *Arabidopsis* ovule is the target for *Agrobacterium* in planta vacuum infiltration transformation [J]. Plant J, 1999, 19(3): 249-257.
- [13] Desfeux C, Clough S J, Bent A F. Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method [J]. Plant Physiol, 2000, 123(3): 895-904.

- [14] Feldmann K A, Marks M D. Rapid and efficient re-generation of plants from explants of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Sci, 1986, 47(1): 63-69.
- [15] Czako M, Wilson J, Xiaodan Y, et al. Sustained root culture for generation and vegetative propagation of transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell Rep, 1993, 12(11): 603-606.
- [16] Clough S J, Bent A F. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant J, 1998, 16(6): 735-743.
- [17] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels [J]. Anal Biochem, 1971, 44(1): 276-287.
- [18] Schmidt R, Willmitzer L. High efficiency *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* leaf and cotyledon explants [J]. Plant Cell Reports, 1988, 7(7): 583-586.
- [19] Valvekens D, Montagu M V, Van Lijsebettens M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85(15): 5536-5540.
- [20] Marton L, Browse J. Facile transformation of *Arabidopsis* [J]. Plant Cell Rep, 1991, 10(5): 235-239.
- [21] Akama K, Shiraishi H, Ohta S, et al. Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana*: Comparison of the efficiencies with various organs, plant ecotypes and *Agrobacterium* strains [J]. Plant Cell Rep, 1992, 12(1): 7-11.
- [22] Clarke M C, Wei W, Lindsey K. High-frequency transformation of *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Mol Biol Rep, 1992, 10(2): 178-189.
- [23] Feldmann K A, Marks M D. *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana* [J]. Mol Gen Genet, 1987, 208: 1-9.
- [24] Chang S S, Park S K, Nam H G. Transformation of *Arabidopsis* by *Agrobacterium* inoculation on wounds [C]//Abstracts of the fourth international conference on *Arabidopsis* research. Vienna, 1990: 28.
- [25] Bechtold N, Ellis J, Pelletier G. In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants [J]. C R Acad Sci Ser III Sci Vie Life Sci, 1993, 316: 1194-1199.
- [26] Katavic V, George W, Haughn Darwin Reed, et al. In planta transformation of *Airabidopsis thaliana* [J]. Mol Gen Genet, 1994, 245: 363-370.
- [27] Maggio A, D'Urzo M P, Abad L R, et al. Large quantities of recombinant PR-5 proteins from the extracellular matrix of tobacco: Rapid production of microbial-recalcitrant proteins [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1996, 14(3): 249-260.
- [28] Joh L, Wroblewski T, Ewing N, et al. High-level transient expression of recombinant protein in lettuce [J]. Biotechnol Bioeng, 2005, 91(7): 861-871.
- [29] Vermeulen A, Vaucheret H, Pautot V, et al. *Agrobacterium* mediated transfer of a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene confers resistance to chlorsulfuron in chicory (*Cichorium intybus* L.) [J]. Plant Cell Reports, 1992, 11(5/6): 243-247.
- [30] Park B, Liu Z, Kanno A, et al. Transformation of radish (*Raphanus sativus* L.) via sonication and vacuum infiltration of germinated seeds with *Agrobacterium* harboring a group 3 LEA gene from *B. napus* [J]. Plant Cell Reports, 2005, 24(8): 494-500.
- [31] Canche-Moo RLR, Ku-Gonzalez A, Burgeff C. Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2006, 84(3): 373-377.
- [32] de Oliveira M L P, Febres V J, Costa M G C, et al. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus via sonication and vacuum infiltration [J]. Plant Cell Reports, 2009, 28(3): 387-395.
- [33] Curtis I S, Nam H G. Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. *longipinnatus* Bailey) by floral-dip method plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency [J]. Transgenic Research, 2001, 10(4): 363-371.
- [34] Zale J M, Agarwal S, Loar S, et al. Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Cell Reports, 2009, 28(6): 903-913.
- [35] Liu Ming, Yang Jun, Cheng Yun-qing, et al. Optimization of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] in planta ovary transformation using a linear minimal gus gene cassette [J]. Journal of Zhejiang University-Science B, 2009(12): 870-876.
- [36] Yasmeen A, Mirza B, Inayatullah S, et al. In planta transformation of tomato [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2009, 27(1): 20-28.
- [37] 王翠艳, 丁东风, 于晓菊, 等. Floral dip 法在大豆遗传转化中的应用研究 [J]. 南开大学学报: 自然科学版, 2010, 43(1): 34-38.
- [38] Wang W C, Menon G, Hansen G. Development of a novel *Agrobacterium*-mediated transformation method to recover transgenic *Brassica napus* plants [J]. Plant Cell Rep, 2003, 22(4): 274-281.
- [39] Hong J K, Kim S Y, Kim K S. Over expression of a *Brassica rapa* MADS-box gene, *BrAGL20*, induces early flowering time phenotypes in *Brassica napus* [J/OL]. Plant Biotechnology Reports, <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11816-012-0254-z>
- [40] Labra M, Vannini C, Grassi F, et al. Genomic stability in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants obtained by floral dip [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109(7): 1512-1518.
- [41] Chung M, Chen M, Pan S. Floral spray transformation can efficiently generate *Arabidopsis* [J]. Transgenic Research, 2000, 9(6): 471-486.
- [42] Martinez-Trujillo M, Limones-Briones V, Cabrera-Ponce J L, et al. Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2004, 22(1): 63-70.
- [43] Chhikara S, Chaudhary D, Yadav M, et al. A non-tissue culture approach for developing transgenic *Brassica juncea* L. plants with *Agrobacterium tumefaciens* [J]. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 2012, 48: 7-14.