

抗氧化剂在清除活性氧及提高农杆菌介导转化效率中的应用

钟宣伯 何梦迪 周启政 汪桂凤 唐桂香*

(浙江大学农业与生物技术学院作物科学研究所, 杭州 310058)

摘要 组织细胞褐变坏死、芽逃离和转化顽拗是影响农杆菌介导转化效率的三大因素, 研究表明, 这些因素均与活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生有关, 过量ROS会影响植物细胞的全能性。添加抗氧化剂不仅可以减少农杆菌介导转化过程中外植体褐变坏死, 而且可以增强农杆菌活力, 促进外植体生长, 增强农杆菌介导转化效率。该文综述了农杆菌介导转化过程中活性氧的产生及其对转化效率的影响, 尤其是新型抗氧化剂硫辛酸在提高农杆菌介导转化效率中的作用。

关键词 活性氧(ROS); 农杆菌介导; 抗氧化剂; 转化效率

The Application of Antioxidant on Removing Reactive Oxygen Species and Enhancing *Agrobacterium tumefaciens* Mediated Transformation Efficiency

Zhong Xuanbo, He Mengdi, Zhou Qizheng, Wang Guifeng, Tang Guixiang*

(College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract The browning and necrosis of plant cell and tissues, shoot escape and recalcitrant are three major factors to influence transformation efficiency in the *Agrobacterium*-mediated transformation process in many plant species. Recent studies had shown that these phenomena were closely related to reactive oxygen species (ROS). Excessive ROS could affect the plant cell totipotency. Addition antioxidant in the tissue culture media could reduce the explant tissue and cells necrosis during *Agrobacterium*-mediated transformation process, improve the *Agrobacterium* vitality and promote the explant tissue and cells regeneration. This paper reviewed the ROS production during *Agrobacterium*-mediated transformation and its effect on the transformation efficiency, especially the role of new type of antioxidant—lipoic acid to enhance transformation efficiency during *Agrobacterium*-mediated transformation.

Keywords reactive oxygen species (ROS); *Agrobacterium*-mediated; antioxidant; transformation efficiency

农杆菌介导的转基因方法具有低拷贝、低成本和大片段DNA重组率高等优点。因此, 自Zambryski等^[1]利用农杆菌介导法获得转基因烟草以来, 农杆菌被广泛地应用于作物改良和基因功能研究。然而, 农杆菌介导转化过程及植物组织培养过程会出现外植体靶组织细胞褐化、坏死现象。采用新霉素磷酸转移酶(neomycin phosphotransferase II, *NPTII*)基因

作为筛选标记, 易出现大量非转基因苗再生, 即“芽逃离(shoot escape)”现象^[2]。此外, 转化过程中还存在“再生顽拗(recalcitrance)”, 即外植体再生和农杆菌介导转化极依赖于基因型, 某些植物特定基因型难以再生, 且转化细胞难以分化^[3]。组织细胞褐化、芽逃离和再生顽拗是限制农杆菌介导转化效率的三大因素, 其中组织细胞褐化甚至坏死已成为影响农

收稿日期: 2018-04-12 接受日期: 2018-08-15

农业部转基因生物新品种培育重大专项(批准号: 2016ZX08004004-005)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-88982243, E-mail: tanggx@zju.edu.cn

Received: April 12, 2018 Accepted: August 15, 2018

This project was supported by the National Major Special Project for Transgenic Organisms, Ministry of Agriculture in China (Grant No.2016ZX08004004-005)

*Corresponding author. Tel: +86-571-88982243, E-mail: tanggx@zju.edu.cn

网络出版时间: 2018-10-26 10:23:23 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181026.1023.002.html>

杆菌介导转化效率的主要因素。从表面上看, 组织细胞坏死或褐变、芽逃离和再生顽拗之间没有本质的联系, 但实际上这三种现象的产生均与农杆菌介导转化过程中产生ROS有关。

1 ROS的产生及对组织细胞褐化、芽逃离和再生顽拗的影响

ROS是比 O_2 活性更强的含氧分子, 植物中主要的ROS有单线态氧(1O_2)、超氧阴离子(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基($OH\cdot$)等, 其中 O_2^- 和 H_2O_2 是细胞内主要的ROS。在光照下, 绿色植物ROS主要的产生部位是叶绿体和过氧化物酶体; 而在暗环境下, 主要的产生部位则是线粒体、质膜和液泡膜, 位于膜上的NADPH氧化酶(NOX)催化大量ROS产生^[4-5]。在有氧条件下, 电子或能量的传递过程不可避免地将电子或能量泄漏到分子氧(O_2), 使之形成ROS; 另外, 多种酶促反应的初级产物或副产物也为ROS。ROS的快速变化是植物遭受逆境反应的最早症状, 植物可通过一系列酶促或非酶促反应来降低ROS引起细胞损伤的可能性, 使整个植物或组织或特定的亚细胞室内ROS回到稳态^[6]。低浓度ROS可作为信号分子参与植物生长发育和逆境胁迫调控, 而当ROS浓度超出细胞防御机制范围时, 细胞处于氧化胁迫状态, 则会引发各类生物分子包括蛋白质、脂肪以及核酸的损伤, 并诱导细胞自噬损伤细胞功能, 最终导致细胞、组织坏死^[7]。

组织细胞褐化与细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)或细胞坏死有关(图1)。农杆菌介导

基因转化在本质上是病原物侵染植物组织或细胞的过程, 当植物受到病原物侵染会快速产生大量的ROS^[8], 这是植物抑制病原物侵染的一种防御机制^[9]。低浓度ROS在外植体细胞与农杆菌间起信号传导作用, 而高浓度ROS则会抑制或杀死农杆菌并使外植体细胞发生过敏反应(hypersensitive response, HR), 进而诱导PCD或细胞坏死, 最终表现为组织细胞褐化。一般情况下, 植物致病菌含有与植物产生过敏反应相关的[10], 与农杆菌介导有关的过敏反应和组织细胞褐化坏死最早在葡萄中发现^[11], 但坏死和过敏反应蔓延到非侵染点较慢。有研究表明, 这种由过敏反应引起的PCD可能受植物细胞自噬调控^[12], 而NOX参与病原体侵染初始阶段自噬激活^[13], 表明细胞自噬可能减少ROS的产生, 从而将PCD信号限制在侵染点, 阻止病原菌进一步侵染。拟南芥中编码锌指蛋白LSD1的基因是与细胞程序性死亡相关最早被克隆的基因, 它通过对超氧化物的调控, 反向调节细胞程序死亡^[14-15]。LSD1还能与AtMC1的类LSD1锌指结构N末端互作, 具有调控AtMC1促进细胞凋亡的作用^[16]。拟南芥叶绿体蛋白EXECUTER1在EXECUTER2的作用下活性发生改变并调节酶促脂质过氧化, 进而激活超氧阴离子诱导PCD, 将胁迫信号从质体传递到细胞核^[17]。其他重要的胁迫信号传导还包括丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs), 其信号网络参与 H_2O_2 传导的PCD^[18]。已有的研究表明, H_2O_2 参与MAPK级联MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4诱导病

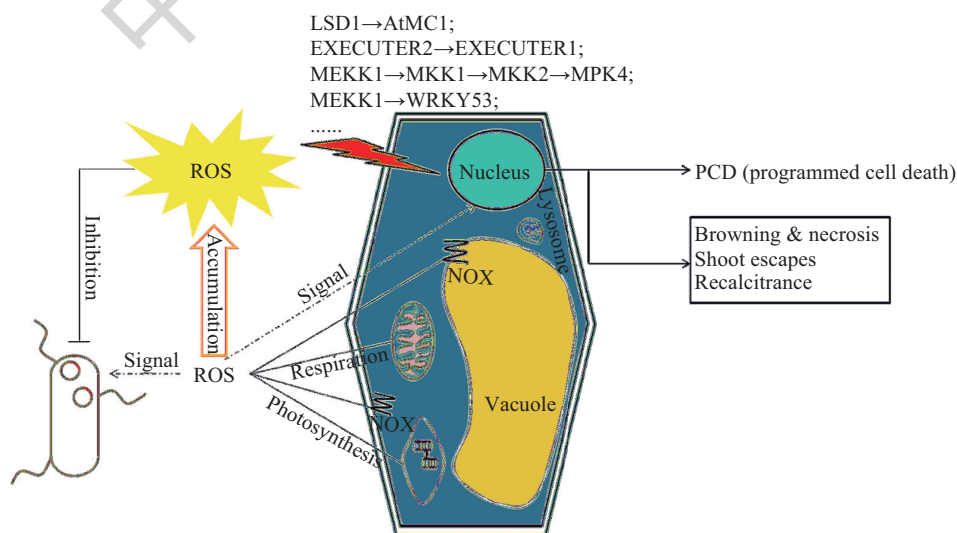


图1 农杆菌介导转化过程中ROS的产生及调控作用

Fig.1 The ROS production and regulation in *Agrobacterium*-mediated transformation process

原相关分子模式的免疫反应, H_2O_2 激活 *MEKK1* 基因且参与诱导 *MPK4* 基因表达, *mekk1*、*mkk1/2* 和 *mpk4* 突变体均表现出自身免疫激活和细胞死亡的表型, 但机制尚不明确, *MEKK1* 也直接与 *WRKY53* 转录因子互作激活 *PCD*^[19]。MAPK 级联反应产生的 H_2O_2 可特异性诱导紫花苜蓿 *OMTK1* 表达, 激活下游 *MMK3* 参与 *PCD*^[20]。烟草中也存在由水杨酸和类似级联反应激活的 *PCD*^[21]。最近在酵母和植物中均发现, 拟南芥 *BCL2* 基因受 H_2O_2 诱导并且能刺激 *PCD*^[22]。杆状病毒抗凋亡基因 *p35* 和 *iap* 在玉米胚性愈伤组织中表达, 可减轻胚性愈伤组织与农杆菌共培养3天后的细胞死亡和组织褐化^[23-24]。

芽逃离普遍发生在 *NPTII* 基因作为筛选标记的转化体系且在大多数植物中均有发生。100 mg/L 的卡那霉素能对双子叶植物转化细胞起到筛选作用; 而单子叶植物特别是禾谷类作物对卡那霉素的天然抗性相对较高, 如玉米在 200 mg/L 的筛选压力下才能得到转化植株^[25]。对十字花科植物进行农杆菌介导转化, 采用卡那霉素筛选时芽逃离发生频率高, 在花椰菜转化体系中芽逃离可高达 95%, 在甘蓝型油菜中也可达到 70% 左右^[2]。发生芽逃离的机理目前仍有待于进一步研究, 有可能与高浓度 ROS 抑制转化细胞的再生而促进非转化细胞再生有关。

研究表明, 转化顽拗与 ROS 和自由基产生与类型有关^[26-28]。转化顽拗基因型马铃薯、葡萄及水稻等植物的愈伤组织表现为含有较高浓度的内源 ROS 和自由基^[26], 高浓度内源 ROS 和自由基会导致脂质过氧化程度的增加并影响植物组织培养外植体的再生能力^[27]。愈伤组织的分化再生受到不同内源 ROS 的调控, 相对较高浓度的 H_2O_2 能促进草莓愈伤组织形成拟分生组织及芽原基, 而 O_2^- 则抑制愈伤组织再生。研究表明, 低再生率的草莓愈伤组织中含有高浓度 O_2^- , 低浓度 H_2O_2 并具有较低的超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性; 而高再生率的草莓愈伤组织则有相对 5~9 倍 H_2O_2 含量并具有更高的抗氧化酶活性, 在再生培养基中添加 SOD 抑制剂会导致高再生率草莓愈伤组织再生率降低^[28]。

2 抗氧化剂及在农杆菌介导转化体系中的应用

2.1 农杆菌介导转化中常用抗氧化剂

在农杆菌介导转化过程中常通过利用吸附剂、

增加筛选压、干燥处理和抗氧化剂等^[29]来克服转化障碍提高农杆菌介导的转化效率。吸附剂、增加筛选压和干燥处理在减轻组织细胞褐化、降低芽逃离和促进转化细胞分化再生中有一定效果, 但对提高农杆菌介导转化效率的效果不明显, 而多种抗氧化剂的组合使用是目前农杆菌介导转化中提高转化效率的主要辅助策略。抗氧化剂是一类当其浓度低于氧化底物时仍然可以延迟或抑制底物氧化反应的物质, 氧化底物包括蛋白质、脂肪、碳水化合物和核酸。测定化合物中抗氧化的能力有很多标准, 包括还原能力、自由基清除能力、脂质的氧化降解能力、金属螯合活性及与其他抗氧化剂的相互作用^[30], 另外还包括吸收和生物利用率等。抗氧化剂的主要作用是消除活性氧和自由基, 抑制活性氧的生成, 螯合金属离子, 同时作用于细胞信号传导和基因表达^[31]。在农杆菌介导转化的外植体预处理、共培养、芽诱导和芽伸长等各阶段, 培养基中加入抗氧化剂——去除活性氧的非酶类清除剂, 能有效减轻蛋白质、脂肪、碳水化合物和核酸的氧化, 减少植物组织细胞褐化坏死, 有利于转化后组织的再生^[32]。常用的抗氧化剂包括抗坏血酸 (ascorbic acid, AsA)、半胱氨酸 (cysteine, Cys)、二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT)、交联聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinylpyrrolidone, PVPP)、亚硒酸盐 (selenite)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、生育酚 (α -tocopherol) 和硝酸银 (silver nitrate, $AgNO_3$) 等, 这些抗氧化剂针对不同植物的抗氧化效果都存在差异, 主要原因是其化学性质、抗氧化原理的差异 (表 1)。

2.2 抗氧化剂对单、双子叶植物转化效率的影响

抗氧化剂已经广泛应用于单子叶和双子叶植物的农杆菌介导转化体系中, 对解决转化过程中组织细胞褐化坏死、芽逃离、再生顽拗等起重要作用。不同抗氧化剂的选择和搭配对改善外植体的生理表现不同, 但合理适度地使用抗氧化剂能显著提高农杆菌介导转化效率。抗氧化剂对单、双子叶植物农杆菌介导转化的影响, 可根据生理功能把抗氧化剂划分为两大类: 第一类抗氧化剂能够减少外植体组织细胞褐化坏死, 促进细胞分化和组织再生, 如抗坏血酸、半胱氨酸、二硫苏糖醇 (DTT)、交联聚乙烯吡咯烷酮 (PVPP); 第二类抗氧化剂能提高外植体存活率, 减少外植体玻璃化并提高转化效率, 如谷胱甘肽、亚硒酸盐和生育酚等。

表1 农杆菌介导转化中常用的抗氧化剂

Table 1 Antioxidants used in *Agrobacterium*-mediated transformation

抗氧化剂 Antioxidant	抗氧化原理 The principle of antioxidant	参考文献 Reference
Ascorbic acid	Reductant; reacting with ROS; reduce the internal oxidation of plant cells	[33]
Dithiothreitol	Reductant; reacting with ROS; protecting the reducing radical groups of enzyme	[34]
Silver nitrate	Strong reductant; reacting with ROS; reduce the internal oxidation of plant cells	[35]
Cysteine	Containing active sulfhydryl (-SH); combined with free radicals in plants to directly reduce free radicals into acidic substances	[33]
Glutathione	Containing active sulfhydryl (-SH); combined with free radicals in plants to directly reduce free radicals into acidic substances; participating in a variety of metabolic processes; promoting cell division	[36]
Selenite	Important component of activity center of glutathione peroxidase; preventing lipid peroxidation caused by free radicals	[37]
Polyvinylpyrrolidone	Chelating phenolic substances produced in injured tissues to precipitates	[38]
α -tocopherol	Metabolite of vitamin E; effectively blocking the chain of free radical reaction	[37]

在单子叶植物农杆菌介导转化过程中, 常用的抗氧化剂有抗坏血酸、半胱氨酸、硝酸银、DDT、PVPP等。水稻在不加抗氧化剂的情况下每个外植体约有80%的区域坏死, 但在含有20 mg/L AsA、40 mg/L Cys、5 mg/L AgNO₃的液体培养基中黑暗培养6 h后, 平均每个外植体仅有6%的区域坏死, 同时抗氧化剂的使用将水稻的转化效率由17%提高到30%^[39]; Yezhebayaeva等^[40]在春小麦花药培养中发现, 培养基中添加2~8 mg/L的抗坏血酸有利于增强胚状体发生和再生能力; 王秀红等^[41]比较了农杆菌介导转化玉米培养基中添加不同浓度AgNO₃对愈伤组织诱导及愈伤组织质量的影响, 表明5 mg/L AgNO₃能显著减缓细胞中褐变物质的分泌, 对诱导胚性愈伤组织及改善愈伤组织生活力效果最好; 玉米共培养培养基加入Cys能使GUS阳性率从17%提高到56%, 并且稳定提高转化效率从0.2%~6.2%^[42]; MES(2-morpholinoethanesulfonic acid)、L-Cys和DTT处理可以使大蒜根愈伤组织农杆菌介导转化效率提高至10.6%^[43]; Meziari等^[44]在椰枣器官再生中发现, 添加1.5 g/L PVPP可抑制外植体的褐化增加器官发生频率。

在双子叶植物农杆菌介导转化过程中, 除单子叶植物中常用的抗氧化剂外, 谷胱甘肽、亚硒酸盐、生育酚等也适用于双子叶植物。花生农杆菌介导转化共培养基中加入100 mg/L GSH、50 mg/L 维生素E和20 mg/L亚硒酸钠等, 不仅能限制外植体伤口处H₂O₂的产生和丙二醛(MDA)的形成, 而且还能提高SOD和过氧化氢酶等抗氧化酶的活性, 并能

使转化效率分别从3.9%提高到14.6%及10.3%提高到12.4%^[37]。黄秋葵(*Abelmoschus esculentus* L.)属于锦葵科植物, 离体条件下子叶和下胚轴外植体易褐化, 很难再生。Irshad等^[45]在愈伤组织诱导培养基中添加200 mg/L活性炭、10 mg/L柠檬酸和10 mg/L抗坏血酸, 有效改善了黄秋葵下胚轴和子叶外植体褐化问题。Irshad等^[46]进一步研究认为, 培养基中添加15 mg/L AsA有助于控制黄秋葵子叶外植体酚类产物的释放, 使外植体健康无褐化利于再生。茶树中含有大量茶多酚及多酚氧化物, 不易于农杆菌介导的转化。Rana等^[47]在对茶树组织发根农杆菌转化过程中, 共培养培养基和再生培养基中加入0.1 g/L的谷氨酰胺和5 g/L的PVPP, 可以显著改善外植体褐化并提高毛状根的发生效率。Das等^[48]在培养基中添加1% PVPP和2 mg/L DTT, 抑制了农杆菌介导葡萄叶的褐化和坏死; Olhoff等^[49]通过在共培养培养基中加400 mg/L的Cys使农杆菌介导的大豆子叶节外植体存活率由37%提高到了91%, 而转化效率也从0.9%提高到2.1%。Zeng等^[50]也得到了相似结果, 但转化效率从0.2%提高到5.9%。此外, 在筛选培养基中加入GSH, 可以减少蓝蓟属植物外植体玻璃化, 提高外植体的再生能力, 使农杆菌介导的转化效率从13%提高到45%^[51]。

2.3 新型抗氧化剂硫辛酸在农杆菌介导转化体系中的应用

硫辛酸(lipoic acid, LA)亦称 α -硫辛酸(LA), 其化学成分为1,2-二硫戊环三戊酸, 不同于其他非酶类抗氧化剂, LA是一种在植物和动物及原核生物中

广泛存在的辅酶,参与多种多酶复合物的形成^[52],早在1951年由Reed^[53]和他的同事从猪肝中分离出来。实际上,早在20世纪30年代,马铃薯就因含有LA而被作为对一些细菌生长必需的生长因子来使用。LA被誉为“万能抗氧化剂”,是已知天然抗氧化剂中效果最强的抗氧化剂^[54],它有二种主要形式,一种是氧化型 α -硫辛酸(LA),另一种是还原型二氢硫辛酸(DHLA)。LA参与丙酮酸脱氢酶、 α -酮戊二酸脱氢酶、支链酮酸脱氢酶、甘氨酸脱羧化酶等复合物的形成,在能量和物质代谢中起重要作用,通过代谢作用清除大部分ROS,并催化其他抗氧化剂如Vc、Vb等再循环,促进调控正常生长代谢基因的表达^[52]。

LA和DHLA在细胞内相互协调和转换在清除活性氧中起重要作用^[55],目前已在单子叶和双子叶植物中得到广泛应用。Dan等^[56]发现,在以大豆、西红柿、小麦、马铃薯、棉花等为外植体的农杆菌介导转化体系中添加LA能显著增加转基因苗的诱导率从而提高转化效率,甚至是一些再生顽拗基因型的外植体LA也能起到提高农杆菌介导转化效率的作用;而在最佳状况下筛选,芽逃离的频率也大幅下降,其中大豆从92%减少到72%,马铃薯从50%减少到16%;伴随着转化效率的提高和芽逃离的减少,转化马铃薯组织存活率提高了两倍,转基因芽的数量也提高了四倍。Dan等^[57]认为,农杆菌介导转化过程中最大的障碍在于农杆菌转化细胞的死亡(the death of *Agrobacterium*-transformed cells, DATC),DATC限制了转基因植株的产生,而DATC主要与氧爆反应和 H_2O_2 产生有关。在对番茄的农杆菌介导转化实验中发现,农杆菌极显著增加了 H_2O_2 响应转录因子WRKY75和SOD的表达,添加4.4 mol/L H_2O_2 极显著增加WRKY75和2-半胱氨酸过氧化物酶的表达,降低SOD的表达。添加50 μ mol/L LA可显著减少 H_2O_2 的累积和DATC,而增加半胱氨酸过氧化物酶的表达,降低WRKY75和SOD的表达^[56]。墨西哥酸橙被认为是农杆菌介导转化顽拗型品种,Dutt等^[58]以墨西哥酸橙的上胚轴为外植体,在共培养基中加入50 μ mol/L LA,不仅提高上胚轴外植体愈伤组织诱导率,同时也提高了墨西哥酸橙的农杆菌介导转化效率。杨晓凤等^[59]在共培养基中添加0.12 mmol/L LA,显著降低了根癌农杆菌转化大豆子叶节外植体的褐变率,提升了GUS瞬时转化效率以及转化效率,个别

基因型转化效率甚至可达14.2%。Belide等^[60]在高粱基因枪转化研究中发现,培养基中添加1 mg/L LA增加了胚性愈伤组织诱导率和芽增殖和再生能力,同时也增加了转化效率,这可能与LA增加了胚性愈伤组织细胞抗氧化能力有关。这些研究表明,农杆菌介导转化体系中LA不仅能清除ROS,还促进了外植体细胞的代谢和分化,显著解决了组织细胞褐化坏死、芽逃离和再生顽拗等问题。

3 结论与展望

农杆菌介导转化法已经成为目前植物基因工程中研究基因功能和获得转基因植物的最常用手段,已大量应用于大豆、棉花、马铃薯、番茄、小麦、玉米和水稻等重要作物的研究。而外植体在与农杆菌共培养时由于农杆菌的侵染发生应激性防御反应,产生大量ROS。这些ROS一方面抑制了农杆菌活性,阻止其进一步侵染外植体,另一方面外植体由于受到氧化胁迫发生局部的褐化坏死,并可能引发大量芽逃离、离体顽拗等现象,严重限制了农杆菌介导转化的效率。抗氧化剂能够有效地清除外植体内ROS,减轻氧化胁迫,并促进外植体生长、分化。近年来对转化体系中抗氧化剂的研究与合理应用也在极大程度上改善了转化效率低的问题,稳定提高了农杆菌介导转化的效率,然而ROS影响转化效率的具体机制还不明确。随着技术的发展,为了解ROS、抗氧化剂在农杆菌侵染外植体时的作用,有学者将生物信息学应用于这方面的研究,并从转录组的角度明确了农杆菌介导转化过程与外植体激素代谢、防御反应、细胞生物合成、核酸代谢等多个代谢途径有关^[61]。进一步明确植物与农杆菌之间互作机制以及ROS在其中的作用能够为有效提高农杆菌介导基因转化的效率提供理论基础。

农杆菌诱导的防御反应、ROS产生、转化细胞死亡是影响农杆菌介导转化效率的主要因素。了解农杆菌诱导植物组织坏死和抗氧化剂提高植物转化效率的机制有助于提高农杆菌介导的转化效率。ROS是否是引起转化细胞及组织褐变和坏死的关键?抗氧化剂能否直接或间接通过调节NADPH氧化酶等抗氧化酶的基因表达来清除或减少ROS?哪些基因可调节ROS的产生或者激活其他代谢途径从而影响转化细胞的再生?这些问题还将有待于进一步的研究。

参考文献 (References)

- Zambryski P, Joos H, Genetello C, Leemans J, Montagu MV, Schell J. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J* 1983; 2(12): 2143-50.
- Stipic M, Rotino GL, Piro F. Regeneration and genetic transformation attempts in the cauliflower 'Tardivo di Fano'. *Thin Solid Films* 2000; 41(3): 247-59.
- Benson EE. *In vitro* plant recalcitrance: an introduction. *In Vitro Cell Dev-PL* 2000; 36(3): 141-8.
- Møller IM. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu Rev Plant Biol* 2001; 52(4): 561-91.
- Foyer CH, Noctor G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol Plant Arum* 2010; 119(3): 355-64.
- Waszczak C, Carmody M, Kangasjärvi J. Reactive oxygen species in plant signaling. *Annu Rev Plant Biol* 2018; 69: 209-36.
- Huang S, Van AO, Schwarzländer M, Belt K, Millar AH. Roles of mitochondrial reactive oxygen species in cellular signaling and stress response in plants. *Plant Physiol* 2016; 171(3): 1551-9.
- Nanda AK, Andrio E, Marino D, Pauly N, Dunand C, Emons AC, et al. Reactive oxygen species during plant-microorganism early interaction. *Chin J Plant Ecol* 2010; 52(2): 195-204.
- Wu G, Shortt BJ, Lawrence EB, Fitzsimmons KC, Shah DM. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* 1995; 7(9): 1357-68.
- Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, DineshKumar SP. Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 1997; 276(5313): 726-33.
- Deng WY, Pu XR, Gordon MP, Gordon MP, Nester EW. T-DNA genes responsible for inducing a necrotic response on grape vines. *Mol Plant Microbe Interact* 1995; 8(4): 538-48.
- Liu Y, Schiff M, Czymbek K, Tallóczy Z, Levine B, Dinesh-Kumar, SP. Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell* 2005; 121(4): 567-77.
- Chaouch S, Queval G, Noctor G. AtRbohF is a crucial modulator of defence-associated metabolism and a key actor in the interplay between intracellular oxidative stress and pathogenesis responses in *Arabidopsis*. *Plant J* 2012; 69(4): 613-27.
- Dietrich RA, Richberg MH, Schmidt R, Dean C, Dangl AJ. A novel zinc finger protein is encoded by the *Arabidopsis* LSD1 gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell* 1997; 88(5): 685-94.
- Guo J, Bai PF, Yang Q, Liu FR, Wang XD, Huang LL, Kang ZS. Wheat zinc finger protein TaLSD1, a negative regulator of programmed cell death, is involved in wheat resistance against stripe rust fungus. *Plant Physiol Biochem* 2013; 71: 164-72.
- Coll NS, Vercammen D, Smidler A, Clover C, Van Breusegem F, Dangl JL, et al. *Arabidopsis* type I metacaspases control cell death. *Science* 2010; 330(6009): 1393-7.
- Laloi C, Havaux M. Key players of singlet oxygen-induced cell death in plants. *Front Plant Sci* 2015; 6: 39.
- De GL. Redox regulation in plant programmed cell death. *Plant Cell Environ* 2012; 35(2): 234-44.
- Liu Y, He C. A review of redox signaling and the control of MAP kinase pathway in plant. *Redox Biol* 2017; 11: 192-204.
- Nakagami H, Kiegerl S, Hirt H. OMTK1, A novel MAPKKK, channels oxidative stress signaling through direct MAPK interaction. *J Biol Chem* 2004; 279(26): 26959-66.
- Liu Y, Ren D, Pike S, Pallardy S, Gassmann W, Zhang S Q, et al. Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by a mitogen-activated protein kinase cascade. *Plant J* 2007; 51(6): 941-54.
- Dat JF, Pellinen R, Beeckman T, Langebartels C Kangasjärvi J, Inze D, et al. Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *Plant J* 2003; 33(4): 621-32.
- Hansen G. Evidence for *Agrobacterium*-induced apoptosis in maize cells. *Mol Plant Microbe Interact* 2000; 13(6): 649-57.
- Fomicheva AS, Tuzhikov AI, Beloshistov RE, Trusova SV, Galullina RA, Mochalova LV, et al. Programmed cell death in plants. *Biochemistry (Mosc)* 2012; 77(13): 1452-64.
- 魏开发, 刘逸萍, 林子英, 杨雅芳, 张泽宏, 贾文锁. 农杆菌介导单子叶植物遗传转化问题与对策(Wei Kaifa, Liu Yiping, Lin Ziyang, Yang Yafang, Zhang Zehong, Jia Wensuo, et al. Problems and solutions in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Genetic transformation of monocotyledons. *Chinese Bulletin of Botany*) 2008; 25(4): 491-6.
- Bailey E, Deighton N, Clulow SA. Changes in free radical profiles during the callogenesis of responsive and recalcitrant potato genotypes. *P Roy Soc Edinb A* 1994; 102(1): 243-6.
- Petřivalský M, Vaníčková P, Ryzi M, Navrátilová B, Piterková J, Sedlářová M, et al. The effects of reactive nitrogen and oxygen species on the regeneration and growth of cucumber cells from isolated protoplasts. *Plant Cell Tiss Org* 2012; 108: 237-49.
- Tian M, Gu Q, Zhu MY. The involvement of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes in the process of shoot organogenesis of strawberry callus. *Plant Sci* 2003; 165(4): 701-7.
- Polin L D, Liang H, Rothrock R E, Nishii M, Diehl D L, Newhouse A E, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of American chestnut [*Castanea dentata*, (Marsh.) Borkh.] somatic embryos. *Plant Cell Tiss Org* 2006; 84(1): 69-79.
- 王晓宇, 杜国荣, 李华. 抗氧化能力的体外测定方法研究进展. *食品与生物技术学报*(Wang Xiaoyu, Du Guorong, Li Hua. Progress of analytical methods for antioxidant capacity *in vitro*. *Journal of Food Science and Biotechnology*) 2012; 31(3): 247-52.
- Halliwell B, Aeschbach R, Löliger J, Aruoma OI. The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxicol* 1995; 33(7): 601-17.
- Dan Y. Biological functions of antioxidants in plant transformation. *In Vitro Cell Dev-PL* 2008; 44(3): 149-61.
- Enriquez GA, Trujillo LE, Menéndez C, Vazquez RI, Tiel K, Dafnis F, et al. Sugarcane (*Saccharum hybrid*) genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: production of transgenic plants expressing proteins with agronomic and industrial value. *Dev Plant Genet Breed* 2000; 5: 76-81.
- Olhoft PM, Flagel LE, Donovan CM, Somers DA. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta* 2003; 216(5): 723-35.
- 赵巧阳, 赖钟雄. 硝酸银在离体培养和转化中的作用及其机理. *亚热带农业研究*(Zhao Qiaoyang, Lai Zhongxiong. The roles and mechanisms of AgNO₃ in plant *in vitro* culture and genetic transformation. *Subtropical Agriculture Research*) 2008; 4(1): 62-6.

- 36 Gupta SD, Datta S. Antioxidant enzyme activities during *in vitro*, morphogenesis of gladiolus and the effect of application of antioxidants on plant regeneration. *Biol Plant Arum* 2003; 47(2): 179-83.
- 37 Zheng Q, Bao J, Liang L, Xiao X. Effects of antioxidants on the plant regeneration and GUS expressive frequency of peanut (*Arachis hypogaea*) explants by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tissue Org* 2005; 81(1): 83-90.
- 38 Figueiredo SF, Viana VR, Albarello N. Micropropagation of *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. *In Vitro Cell Dev-PL* 2001; 37(4): 471-5.
- 39 Enríquez-Obregón GA, Prieto-Samsónov DL, Riva GA, Pérez M, Selman-Housein G, Vázquez-Padrón RI, et al. *Agrobacterium*-mediated Japonica rice transformation: a procedure assisted by an antinecrotic treatment. *Plant Cell Tissue Org* 1999; 59(3): 159-68.
- 40 Yezhebayeva RS, Abekova AM, Ainebekova BA, Urazaliyev KR, Bazylova TA, Daniyarova AK, et al. Influence of different concentrations of ascorbic and gibberellic acids and pH of medium on embryogenesis and regeneration in anther culture of spring triticale. *Cytol Genet* 2017; 51(6): 448-54.
- 41 王秀红, 白建荣, 孙毅, 史向远, 任志强. 农杆菌介导抗草甘膦基因(EPSPS)的玉米转化及相关因子的影响研究. 山西农业科学(Wang Xiuhong, Bai Jianrong, Sun Yi, Shi Xixiangyuan, Ren Zhiqiang. Study on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated glyphosate-resistant gene (EPSPS) transformation and correlation factors in maize. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*) 2010; 38(1): 11-4, 8.
- 42 Frame BR, Shou H, Chikwamba RK, Xiang C, Zhang Z, Fonger TM, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. *Plant Physiol* 2002; 129(1): 13-22.
- 43 Ahn YK, Yoon MK, Jeon JS. Development of an efficient *Agrobacterium*-mediated transformation system and production of herbicide-resistant transgenic plants in garlic (*Allium sativum* L.). *Mol Cell* 2013; 36(2): 158-62.
- 44 Meziani R, Jaiti F, Mazri MA, Hassani A, Salem SB, Anjarne M, et al. Organogenesis of *Phoenix dactylifera* L. cv. Mejhoul: influences of natural and synthetic compounds on tissue browning, and analysis of protein concentrations and peroxidase activity in explants. *Sci Hort Amsterdam* 2016; 204: 145-52.
- 45 Irshad M, He B, Liu S, Mitra M, Debnath B, Li M, et al. *In vitro* regeneration of *Abelmoschus esculentus* L. cv. Wufu: influence of anti-browning additives on phenolic secretion and callus formation frequency in explants. *Hortic Environ Biote* 2017; 58(5): 503-13.
- 46 Irshad M, Rizwan HM, Debnath B, Anwar M, Li M, Liu S, et al. Ascorbic acid controls lethal browning and pluronic F-68 promotes high-frequency multiple shoot regeneration from cotyledonary node explant of okra (*Abelmoschus esculentus* L.). *Hortscience* 2018; 53(2): 183-90.
- 47 Rana MM, Han Z X, Song DP, Liu GF, Li DX, Wan XC, et al. Effect of medium supplements on *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction from the callus tissues of *Camellia sinensis* var. *sinensis*. *Int J Mol Sci* 2016; 17(7): pii: E1132.
- 48 Das D, Reddy M, Upadhyaya K, Sopory S. An efficient leaf-disc culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Rep* 2002; 20(11): 999-1005.
- 49 Olhoft P, Somers D. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Rep* 2001; 20(8): 706-11.
- 50 Zeng P, Vadrnais DA, Zhang Z, Polacco JC. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max* L.). *Plant Cell Rep* 2004; 22(7): 478-82.
- 51 Toldi O, Tóth S, Pónyi T, Scott P. An effective and reproducible transformation protocol for the model resurrection plant *Craterostigma plantagineum*, Hochst. *Plant Cell Rep* 2002; 21(1): 63-9.
- 52 Packer L, Tritschler HJ, Wessel K. Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radical Biomed* 1997; 22(1/2): 359-78.
- 53 Reed LJ, Debusk BG, Gunsalus IC, Hornberger CS. Crystalline alpha-lipoic acid: a catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. *Science* 1951; 114(2952): 93-4.
- 54 Navari-Izzo F, Quartacci MF, Sgherri C. Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiol Bioth* 2002; 40(6/7/8): 463-70.
- 55 Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Bio Med* 1995; 19(2): 227-50.
- 56 Dan Y, Zhang S, Matherly A. Regulation of hydrogen peroxide accumulation and death of *Agrobacterium*-transformed cells in tomato transformation. *Plant Cell Tissue Org* 2016; 1-8.
- 57 Dan YH, Armstrong CL, Dong J, Feng X, Fry JE, Keithly GE, et al. Lipoic acid—an unique plant transformation enhancer. *In Vitro Cell Dev-PL* 2009; 45(6): 630.
- 58 Dutt M, Vasconcellos M, Grosser JW. Effects of antioxidants on *Agrobacterium*-mediated transformation and accelerated production of transgenic plants of Mexican lime (*Citrus aurantifolia* Swingle). *Plant Cell Tissue Org* 2011; 107(1): 79-89.
- 59 杨晓凤, 卢涛, 周正剑, 寿惠霞, 唐桂香. α -硫辛酸对大豆农杆菌介导GUS瞬时表达和芽诱导的影响. 大豆科学[Yang Xiaofeng, Lu Tao, Zhou Zhengjian, Shou Huixia, Tang Guixiang. Effect of α -lipoic acid on the *Agrobacterium tumefaciens* mediated GUS transient expression rate and shoot induction percentage in soybean (*Glycine max* L.). *Soybean Science*] 2011; 30(4): 552-6.
- 60 Belide S, Vanhercke T, Petrie JR, Singh SP. Robust genetic transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) using differentiating embryogenic callus induced from immature embryos. *Plant Methods* 2017; 13(109): 1-12.
- 61 Duan KX, Willig CJ, De Tar JR, Spollen WG, Zhang ZY. Transcriptomic analysis of *Arabidopsis* seedlings in response to *Agrobacterium*-mediated transformation process. *Mol Plant Microbe Interact* 2018; 31(4): 445-59.