

文章编号 1674-7054(2018)02-0176-06

橡胶草悬浮细胞遗传转化体系的建立

刘明乾¹, 吴绍华², 田 郎², 张世鑫², 李 言², 田维敏²

(1. 海南大学 热带农林学院, 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院 橡胶研究所 / 农业部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室 / 海南省热带作物栽培生理学重点实验室, 海南 儋州 571737)

摘 要 橡胶草(*Taraxacum koksaghyz* Rodin), 也称为俄罗斯蒲公英, 是菊科菊苣族蒲公英属多年生宿根型草本植物, 目前被认为是一种潜在的产胶替代植物和研究橡胶生物合成的理想模式植物。为了建立橡胶草悬浮细胞的遗传转化体系, 笔者测定了悬浮细胞对农杆菌抑菌剂替卡西林(Ticarcillin)以及对潮霉素(Hygromycin B)的敏感性; 采用携带 pCAMBIA1302 的根癌农杆菌 GV3101 侵染悬浮细胞, 用绿色荧光蛋白(GFP)和潮霉素来检测转化的成功率。结果表明 10~300 mg·L⁻¹ 的 Ticarcillin 对悬浮细胞的生长和增殖没有影响, 用于进行抗性愈伤筛选的潮霉素适宜质量浓度为 10 mg·L⁻¹。抗性愈伤的绿色荧光镜检(GFP 检测)以及潮霉素和 GFP 基因的 PCR 检测均表明, 将 OD₆₀₀ 值为 0.6 的携带 pCAMBIA1302 农杆菌按照细胞菌液与悬浮细胞的比例为 1:1.2 混合侵染 30 min 后移至共培养基培养 10 d, 再移至选择培养基进行筛选培养可高效获得转基因阳性的愈伤组织。本研究为进一步优化橡胶草悬浮细胞遗传转化体系奠定了基础。

关键词 橡胶草; 悬浮细胞; 遗传转化; 农杆菌

中图分类号 S 576

文献标志码 A

DOI :10.15886/j.cnki.rdsxb.2018.02.008

橡胶草(*Taraxacum koksaghyz* Rodin), 又称俄罗斯蒲公英(*Russian dandelion*)^[1], 原产于哈萨克斯坦和中国的天山区域^[2], 是菊科菊苣族蒲公英属多年生宿根型草本植物。橡胶草是一种产胶替代植物, 与巴西橡胶树、银胶菊一起并称为全球三大产胶植物。橡胶草的橡胶主要从根中提取, 含量在 2.98%~27.89%之间^[3]。其所产的天然橡胶为顺式聚异戊二烯, 结构和性能与巴西橡胶树所产的橡胶相当。而且, 从产胶的生理过程来看, 有相似之处, 因此橡胶草被认为是研究植物产胶机理的理想模式植物, 而且具有很高的科学应用价值和意义^[4]。目前, 橡胶树与橡胶草的基因组序列已被测定^[5-8], 但很多基因的功能有待于进一步的鉴定。转基因技术是证实基因功能的有效手段之一。目前, 橡胶草的遗传转化主要是采用根癌农杆菌介导的叶盘法进行。而植物的悬浮细胞由于具有良好的分散性、均一性, 而且细胞增殖快, 是进行遗传转化的良好材料^[9]。目前, 已在甘薯、水稻、烟草和杨树等多个作物上建立了高效的悬浮细胞遗传转化体系^[10-13]。鉴于悬浮细胞的特点及橡胶草在研究橡胶生物合成与次生代谢调控中的作用, 笔者以橡胶草悬浮细胞为介质, 采用根癌农杆菌介导法进行遗传转化体系的建立, 旨在为进一步构建高效的橡胶草悬浮细胞遗传转化体系奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 试验所用转化材料橡胶草悬浮细胞由中国热带农业科学院热带作物与品种资源研究所乔飞老师提供。根癌农杆菌 GV3101 和植物表达载体 pCAMBIA1302 由本实验室保存。

1.2 悬浮细胞生长曲线的测定 采用鲜质量法进行悬浮细胞生长曲线的测定。将继代 1 次的悬浮细胞每天吸取 1 mL 于 1.5 mL 离心管中, 12 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 弃上清, 称质量, 连续进行 14 d。

收稿日期 2018-03-05 修回日期 2018-04-11

基金项目: 国家天然橡胶产业技术体系育种技术与方法岗位科学家项目(CARS-34-YZ1); 中国热带农业科学院橡胶研究所基本科研业务费项目(1630022016003)

作者简介: 刘明乾(1992-) 男, 海南大学热带农林学院 2015 级硕士研究生, E-mail: lmq1992@163.com

通信作者: 田维敏(1965-) 男, 教授, 研究方向: 植物学, E-mail: wmtian@163.com

1.3 Ticarcillin 对农杆菌的抑菌效果 将农杆菌分别接种于 0,100,200,300 mg·L⁻¹ 的 Ticarcillin 的 LB 平板上,28℃避光培养 2 d 后观察农杆菌的生长状况。

1.4 橡胶草悬浮细胞抗生素敏感性实验 将 500 μL 悬浮细胞分别接种于 0,100,200,300 mg·L⁻¹ 的 Ticarcillin 或不同质量浓度(0,5,10,15 mg·L⁻¹)潮霉素(Hygromycin B)的 MS 固体培养基上,每个质量浓度设 3 次重复,避光培养,观察悬浮细胞的生长情况。

1.5 悬浮细胞的转化体系 (1)携带 pCAMBIA1302 农杆菌的制备:取 50 μL 农杆菌感受态细胞中加入 pCAMBIA1302 质粒 DNA 0.1~1 μg 后冰浴 30 min,放入液氮中 5 min,然后立即放入 37℃水浴中 5 min 后取出,加入 500 μL LB 液体培养基,28℃,220 r·min⁻¹ 振荡培养 3~5 h,取出菌液于含 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素和 25 mg·L⁻¹ 利福平的 LB 平板上涂板,28℃倒置培养 2~3 d。对长出的菌落进行 PCR 检测,将阳性农杆菌培养至 OD₆₀₀=0.8~1.0 侵染备用。(2)侵染:根据 1.2 生长曲线,将悬浮细胞培养至指数生长期。将农杆菌用液体 MS 培养基重悬至 OD₆₀₀=0.6。将农杆菌与悬浮细胞按照(1:1.2)(1:0.8)(1:0.6)(1:0.4)的比例混合进行侵染,侵染 30 min。(3)共培养:侵染后的农杆菌涂共培养平板于 24℃避光培养 10 d。培养至有明显凸起的细胞团长出。(4)筛选培养:挑取第(3)步骤明显长出凸起的细胞团,接种至含有 Ticarcillin(100 mg·L⁻¹)并含有 Hygromycin B(10 mg·L⁻¹)的筛选培养基平板,24℃避光培养。对其中总细胞团,生长起来的细胞团进行计数,按照存活/总细胞团比例计算悬浮细胞的转化率。

1.6 阳性愈伤的检测 将筛选培养基上长出的新细胞团,采用 PCR 的方法检测 Hyg 和 GFP 基因的表达,同时采用荧光显微镜对阳性细胞团进行绿色荧光的检测。Hyg 与 GFP 引物序列 Hyg-F:5'-ATGAAAAGCCTGAACCTACCG-3' Hyg-R:5'-TTTCTTGGCCCTCGGACGAG-3',GFP-F:5'-GGCCA CTCTCT CAAGAGC-3' GFP-R:5'-CTTTTCGTTGGGATCTTTCG-3'。

2 结果与分析

2.1 悬浮细胞生长曲线测定 采用鲜质量法进行悬浮细胞生长曲线的测定。结果表明,悬浮细胞在继代后 7~11 d 呈指数生长,13 d 后开始减缓,在 7~11 d 之间,悬浮细胞生长活力旺盛,此时段侵染可提高悬浮细胞的转化效率(图 1)。

2.2 Ticarcillin 对农杆菌的抑菌效果 将农杆菌接种于不同质量浓度的 Ticarcillin 的 LB 平板上,28℃培养箱培养 2 d 后观察。结果表明,Ticarcillin 对农杆菌的抑菌效果明显,100 mg·L⁻¹ Ticarcillin 已经能抑制农杆菌的生长,因此,筛选培养基中添加的 Ticarcillin 的适宜质量浓度为 100 mg·L⁻¹(图 2)。

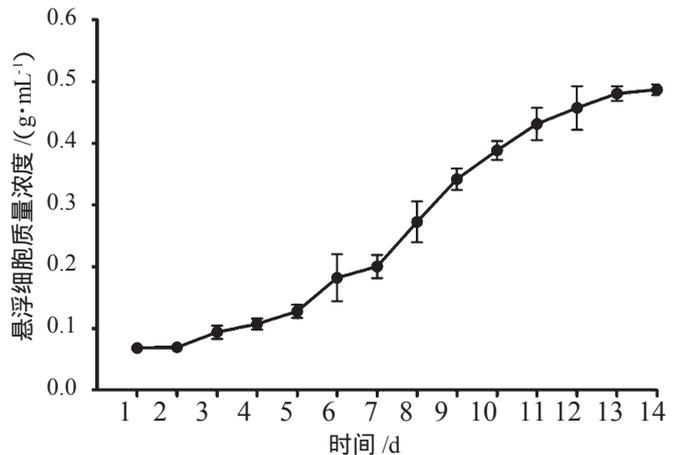


图 1 悬浮细胞的生长曲线
每个点代表 4 个重复鲜质量的平均值和标准差

Fig.1 Growth curve of the cell suspension culture
Each timepoint represents a mean value and SD of the fresh weight of four independent timepoint.

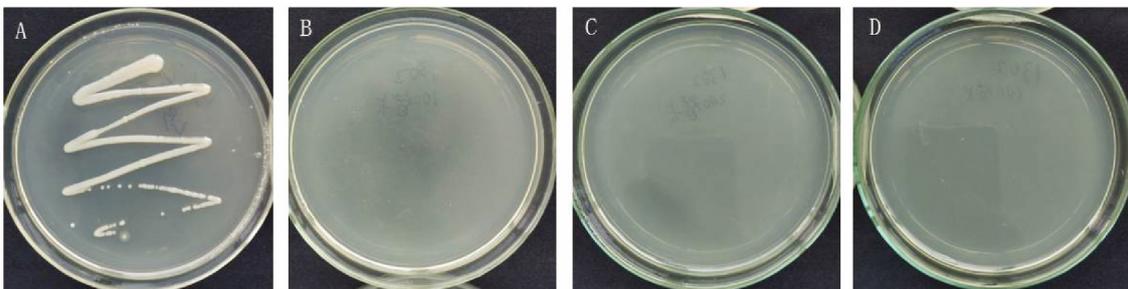


图 2 Ticarcillin 对农杆菌的抑菌效果

A:0 mg·L⁻¹ 替卡西林 B:100 mg·L⁻¹ 替卡西林 C:200 mg·L⁻¹ 替卡西林 D:300 mg·L⁻¹ 替卡西林

Fig.2 Bacteriostasis effect of Ticarcillin on Agrobacterium

A:0 mg·L⁻¹ Ticarcillin B:100 mg·L⁻¹ Ticarcillin C:200 mg·L⁻¹ Ticarcillin D:300 mg·L⁻¹ Ticarcillin

2.3 Ticarcillin 对橡胶草悬浮细胞增殖的影响 将 500 μL 悬浮细胞分别培养在含有不同质量浓度的 Ticarcillin 的固体培养基中,避光培养 10 d 后的结果表明,0~300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Ticarcillin 对橡胶草悬浮细胞的生长和增殖没有影响(图 3)。

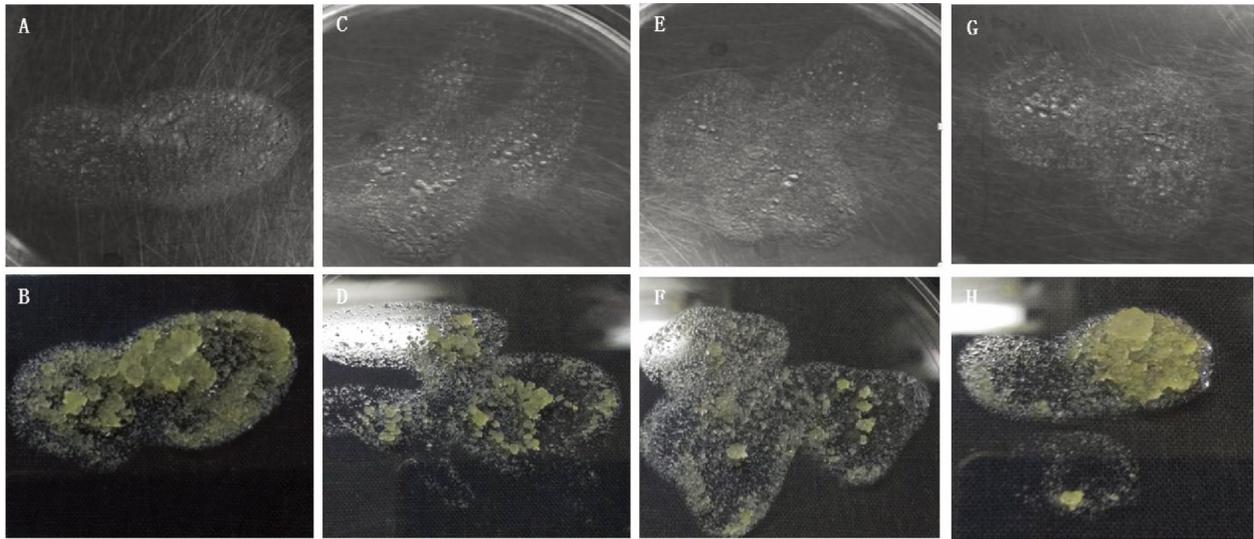


图 3 悬浮细胞 Ticarcillin 敏感度试验

A, C, E, G 分别为刚接种于质量浓度为 0, 100, 200, 300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Ticarcillin 固体培养基中的情况;
B, D, F, H 分别为接种于质量浓度为 0, 100, 200, 300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Ticarcillin 固体培养基中培养 10 d 后的情况

Fig.3 Ticarcillin sensitivity test of the suspension cell culture

A, C, E, G Suspension cells just transferred into the solid medium supplemented with Ticarcillin at the concentrations of 0, 100, 200, 300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively; B, D, F, H Suspension cells cultured for 10 days in the solid medium supplemented with Ticarcillin at the concentrations of 0, 100, 200, 300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively

2.4 橡胶草悬浮细胞潮霉素敏感度试验 将 500 μL 悬浮细胞分别接种在含有不同质量浓度梯度潮霉素的固体培养基中,避光培养 10 d。结果表明,潮霉素质量浓度为 5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,仍有少量悬浮细胞增殖,在 10, 15 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时完全停止增殖(图 4)。由此推断,在筛选培养时,潮霉素适宜筛选的质量浓度为 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

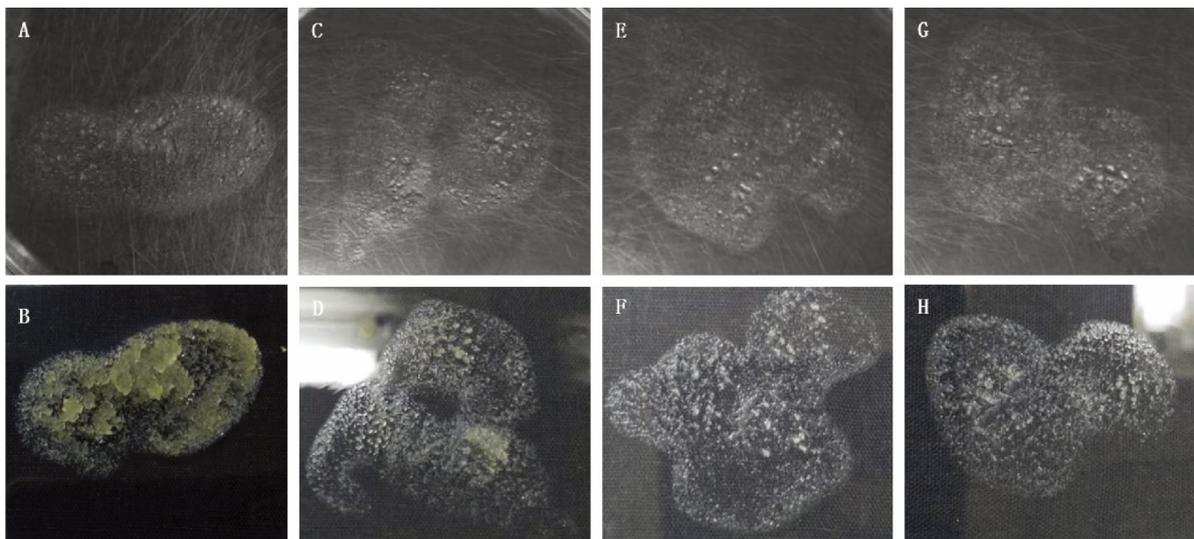


图 4 橡胶草悬浮细胞潮霉素敏感度试验

A, C, E, G 分别为刚接种于质量浓度为 0, 5, 10, 15 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的潮霉素固体培养基中的情况;
B, D, F, H 分别为接种于质量浓度为 0, 5, 10, 15 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的潮霉素固体培养基中培养 10 d 后的情况

Fig.4 Hygromycin sensitivity test of the suspension cell culture

A, C, E, G were just transferred in solid medium with concentration of 0, 5, 10, 15 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Hygromycin, respectively;
B, D, F, H were transferred in solid medium with concentration of 0, 5, 10, 15 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Hygromycin after ten days, respectively

2.5 农杆菌与悬浮细胞比例对转化效率的影响 农杆菌与悬浮细胞比例对转化效率的影响见表 1 和图 5 结果表明 农杆菌与悬浮细胞的比例为 1:1.2 时 悬浮细胞的转化效率最高 达到 65%以上。对部分活的细胞团提取 DNA 进行潮霉素基因 *Hygromycin B* 和绿色荧光蛋白基因 *GFP* 的 PCR 检测 筛选培养基上存活的细胞团大部分为阳性, 估计其阳性率为 63.63%(图 6)。由于 pCAMBIA1302 载体带有 GFP 标签 因此 采用荧光显微镜检测阳性愈伤的荧光情况。结果表明 对照组在荧光下未能检出荧光 但抗性愈伤却能在荧光下激发出明显的绿色荧光 进一步证实所得抗性愈伤为转基因阳性愈伤(图 7)。

表 1 悬浮细胞转化效率

Tab. 1 Transformation efficiency of the suspension cell culture

农杆菌 / 悬浮细胞比例 Ratio of agrobacterium to suspension cell	总细胞团数 Total number of cell mass	存活细胞团数 Number of viable cell mass	转化率 / % Transformation rate
1:1.2	588	386	65.65
1:0.8	280	103	36.79
1:0.6	392	50	12.76
1:0.4	689	245	35.56

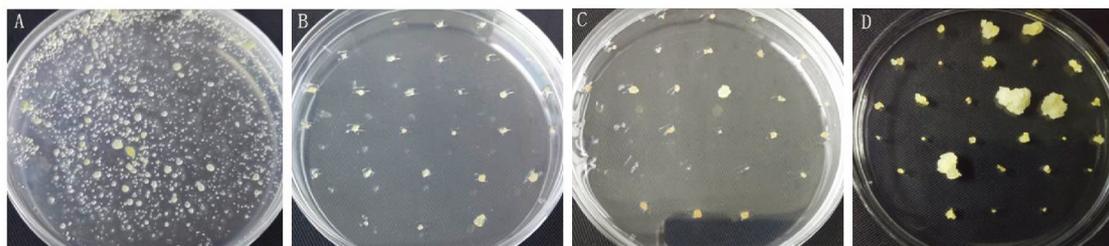
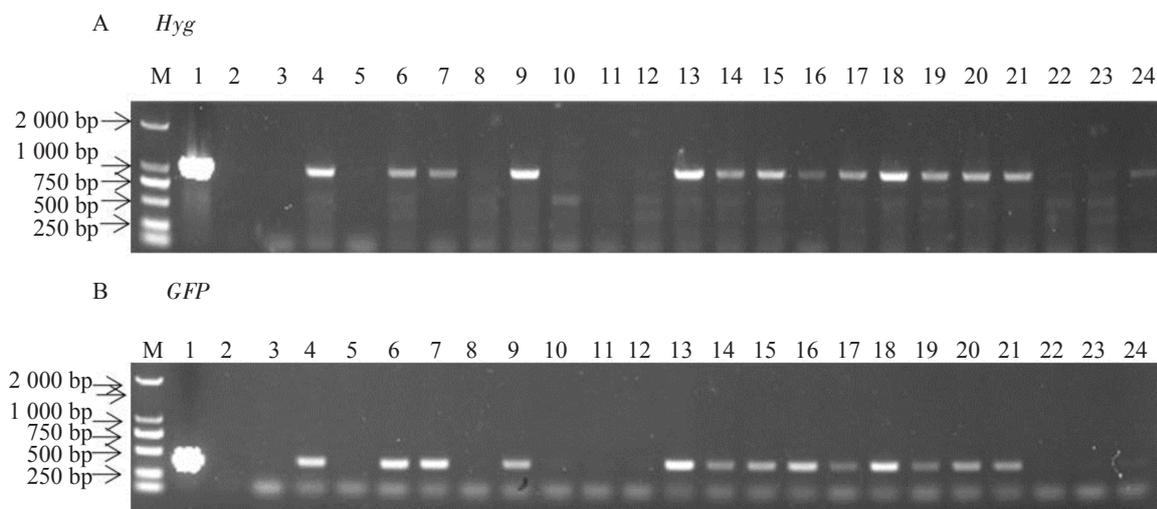


图 5 悬浮细胞侵染转化效率实验

A : 共培养 10 d , B : 筛选培养 , C : 筛选培养 10 d , D : 筛选培养 30 d

Fig.5 Infection efficiency test of suspension cell

A : Co- culture 10 days ; B : Selective culture , C : selective culture after 10 days , D : selective culture for 30 days

图 6 转基因愈伤的 Hygromycin B 基因 *Hyg* 和绿色荧光蛋白基因 *GFP* 的 PCR 检测

M , DL2000 Marker ; 1 , 质粒阳性对照 ; 2 , 空白对照 ; 3~24 , 抗性愈伤

Fig.6 The PCR detection of *Hyg* gene encoding hygromycin B and *GFP* in transgenic callus

M , DL2000 Marker ; 1 , Plasmid ; 2 , Control ; 3- 24 , Transgenic callus

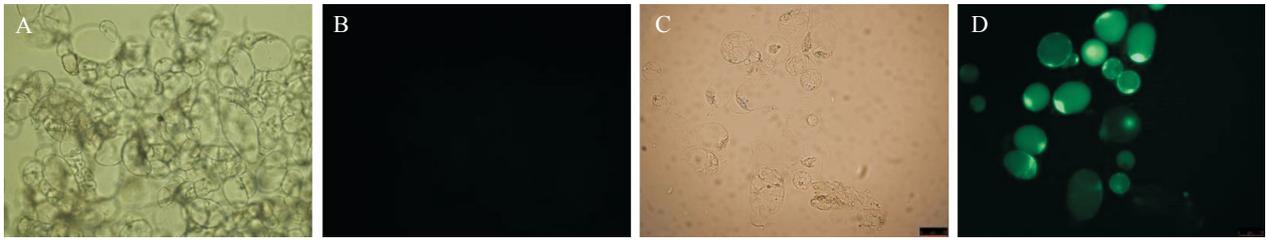


图7 阳性愈伤 GFP 荧光检测

A 未转化悬浮细胞明场(对照) B 未转化悬浮细胞 GFP 荧光检测(对照),
C 抗性愈伤明场 D 抗性愈伤 GFP 荧光检测

Fig.7 GFP detection of positive callus

A :Bright field of the suspension cell (control) , B :GFP detection of suspension cell(control) ,
C :Bright field of the positive callus , D :GFP detection of positive callus

3 讨论

橡胶草被认为是一种潜在的产胶替代植物和用于研究橡胶生物合成的理想模式植物。李家洋团队对橡胶草基因组序列进行了解析, 研究结果表明, 橡胶草基因组大小为 1.29 Gb, 包含 46 731 个基因。李家洋团队还鉴定了橡胶草中橡胶合成途径和菊糖合成途径, 阐述了橡胶链延长过程中 CPT/CPTL 和 REF/SRPP 2 个重要基因家族的进化历程^[8]。但是, 很多橡胶合成途径的关键酶的功能并未得到验证。转基因技术是进行基因功能的验证的有效手段之一。目前, 橡胶草的基因转化主要是通过叶盘转化法进行。袁彬青等建立了农杆菌介导的橡胶草遗传转化体系, 转化率为 17.1%^[14]。赵丽娟等利用该系统进行了橡胶树橡胶延伸因子 REF 转化橡胶草的研究, 并发现 REF 基因可在橡胶草中稳定表达, 显著提高橡胶草中合成天然橡胶的生物量^[15]。曹新文等将橡胶草法尼基焦磷酸合酶基因 *FPS* 过表达转化橡胶草, 获得了 6 株转基因植株, 橡胶质量分数平均比野生型增加了 3.92%, 证明 *FPS* 在橡胶草产胶过程中发挥重要功能^[16]。因此, 进行橡胶草的遗传转化研究对于鉴定橡胶树和橡胶草基因功能研究具有重要的意义, 但是大批量基因功能的鉴定, 需要更高效的遗传转化体系。植物悬浮细胞具有良好的分散性、均一性、生长迅速等特点, 对于侵染实验^[17]、原生质体的制备^[18]、相关胁迫的实验^[19]及次生代谢产物的研究^[20], 都是一种不错的载体, 已被广泛应用于细胞学、生理学、生物化学及分子生物学等研究领域。相比较传统的愈伤侵染的转化方法, 用悬浮细胞为载体进行的侵染方法具有侵染个体多、速度快、转化率高等的优点, 可以加速转基因愈伤的获得。于波等采用农杆菌介导巴西橡胶树胚性悬浮细胞的遗传转化, 结果表明, OD_{600} 值为 0.4~0.6 农杆菌菌液与胚性细胞团进行侵染后共培养 3 d, *GUS* 的瞬时表达率达到 94.3%~98.3%^[21]。本研究中笔者建立了农杆菌介导的橡胶草悬浮细胞转化体系。在悬浮细胞系继代培养 7~11 d, 将 OD_{600} 值为 0.6 的携带 pCambia1302 农杆菌按照一定的比例与悬浮细胞混合侵染 30 min 后移至共培养基培养 10 d, 再移至选择培养基进行筛选培养可高效获得转基因阳性的愈伤组织。其中农杆菌与悬浮细胞的比例为 1:1.2 时, 转化效率达到 65%以上, 高于香蕉胚性悬浮细胞 *GUS* 瞬时表达率(25.30%)^[22], 与水稻悬浮细胞农杆菌浸泡侵染法得到阳性植株率(70%)接近^[11], 低于甘薯胚性悬浮细胞 *GUS* 瞬时表达率^[10]。而橡胶草叶盘法的转化率只有 17.1%。因此, 本研究为采用橡胶草悬浮细胞遗传转化体系进行次生代谢关键酶的鉴定及橡胶合成相关基因的功能鉴定提供了研究平台。不足的是, 本研究所用的悬浮细胞为非胚性悬浮细胞, 已经证实不能对抗性愈伤进行诱导植株的再生, 但是悬浮细胞可用于次生代谢产物的研究。本研究室下一步的研究, 将利用悬浮细胞转化效率高的特点, 对橡胶草或橡胶树茉莉酸信号途径及橡胶合成途径相关基因家族进行批量转化橡胶草悬浮细胞, 分析转化基因对其介导的信号途径相关基因及其对相关次生代谢产物的影响, 由此缩小转化靶标基因的范围, 筛选差异明显的成员采用橡胶草叶盘转化法进行基因的转化并获得再生植株, 进一步研究其基因的功能。

参考文献:

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 45-46.

- [2] Kirschner J, Štěpánek J, Černý T, et al. Available exsitusgermplasm of the potential rubber crop *Taraxacum koksaghyz* belongs to a poor rubber producer, *T. brevicorniculatum* (Compositae- Crepidinae)[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2013, 60: 455- 471.
- [3] 罗士苇. 橡胶草——橡胶植物的介绍之一[J]. 科学通报, 1950, 1(8): 559- 564.
- [4] 罗成华. 橡胶草再生体系的建立及遗传转化的研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2013.
- [5] Tang C, Yang M, Fang Y, et al. The rubber tree genome reveals new insights into rubber production and species adaptation [J]. Nature Plants, 2016, 2(6): 16073. doi: 10.1038/nplants.2016.73.
- [6] Lau N S, Makita Y, Kawashima M, et al. The rubber tree genome shows expansion of gene family associated with rubber biosynthesis [J]. Scientific Reports, 2016(6): 28594. doi: 10.1038/srep28594.
- [7] Rahman A Y, Usharraj A O, Misra B B, et al. Draft genome sequence of the rubber tree *Hevea brasiliensis* [J]. BMC Genomics, 2013, 14: 75. doi: 10.1186/1471- 2164- 14- 75.
- [8] Lin T, Xu X, Ruan J, et al. Genome analysis of *Taraxacum koksaghyz* Rodin provides new insights into rubber biosynthesis. [J] National Science Review, 2018, 5: 78- 87. doi.org/10.1093/nsr/nwx101
- [9] 孙敬三. 植物细胞工程实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1995: 35- 83.
- [10] 翟红, 刘庆昌. 甘薯胚性悬浮细胞遗传转化的研究[J]. 中国农业科学, 2003, 36(5): 487- 491.
- [11] Prommee W, Wang MZ, Zhu D Y, et al. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of rice suspension cells [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 2009, 25(11): 1010- 1016.
- [12] Kobylińska A, Posmyk M M. Melatonin restricts Pb-induced PCD by enhancing BI-1 expression in tobacco suspension cells:[J]. Biometals, 2016, 29(6):1059- 1074.
- [13] 谢华永. 杨树胚性悬浮细胞系建立与原生质体融合研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2004.
- [14] 袁彬青, 王秀珍, 罗成华, 等. 农杆菌介导的橡胶草遗传转化体系的建立[J]. 西北农业学报, 2014, 23(9): 98- 105.
- [15] 赵丽娟, 袁彬青, 王秀珍, 等. 橡胶延伸因子 *REF* 基因的克隆转化及功能分析[J]. 西北农业学报, 2015, 24(1): 144- 150.
- [16] 曹新文, 王秀珍, 李永梅, 等. 橡胶草法尼基焦磷酸合酶基因的克隆与功能分析[J]. 中国农业科学, 2016, 49(6): 1034- 1046.
- [17] Tai F, Lv S, Jiang P, et al. Establishment of a gene function analysis system for the euhalophyte *Salicornia europaea* L. [J]. Plant Cell Reports, 2017, 36(8): 1251- 1261. doi: 10.1007/s00299- 017- 2150- z.
- [18] Shen W, Xiao Z, Shen J, et al. Analysis of golgi- mediated protein traffic in plant Cells [J]. Methods in Molecular Biology, 2017, 1662: 75- 86. doi: 10.1007/978- 1- 4939- 7262- 3- 6.
- [19] Li B, Takahashi D, Kawamura Y, et al. Plasma membrane proteomics of *Arabidopsis suspension*- cultured cells associated with growth phase using Nano- LC- MS/MS[J]. Methods in Molecular Biology, 2018, 1696: 185- 194. doi: 10.1007/978- 1- 4939- 7411- 5_12.
- [20] Pech-Kú R, Muñoz-Sánchez J A, Monforte-González M, et al. Relationship between aluminum stress and caffeine biosynthesis in suspension cells of *Coffea arabica* L. [J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2018, 181: 177- 182. doi: 10.1016/j.jinorgbio. 2017.07.032.
- [21] 于波, 吴华玲, 黄天带, 等. 根癌农杆菌介导的巴西橡胶树胚性悬浮细胞的遗传转化[J]. 中国农学通报, 2012, 28(31): 15- 20.
- [22] 霍妙娟, 魏岳荣, 胡家金, 等. 影响根癌农杆菌介导香蕉胚性悬浮细胞遗传转化的因素[J]. 果树学报, 2008, 25(4): 597- 600.

Establishment of Genetic Transformation System for Suspension Cells of *Taraxacum koksaghyz* Rodin

LIU Mingqian¹, WU Shaohua², TIAN Lang², ZHANG Shixin², LI Yan², TIAN Weimin²

(1. Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Rubber Research Institute, CATAS /Ministry of Agriculture Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree / Hainan Key Laboratory for Cultivation & Physiology of Tropical Crops, Danzhou, Hainan 571737, China)

Abstract *Taraxacum koksaghyz* Rodin, belonging to the genus *Taraxacum* F. H. Wigg. and the family Composite, is a perennial herb. It is considered to be a potential alternative source of natural rubber and an ideal model plant for the study of rubber biosynthesis. In order to establish a genetic transformation system for suspension cells of *T. koksaghyz* Rodin, the sensitivity of suspension cells of *T. koksaghyz* Rodin to Ticarcillin (a fungicide for *Agrobacterium tumefaciens*) and Hygromycin B were determined. The suspension cells were infected with *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 which carried the vector pCAMBIA1302, and then the gene expression of GFP and Hyg in the suspension cells was detected to observe the success of the genetic transformation. The result showed that Ticarcillin at a concentration range of 0- 300 mg·L⁻¹ had no effect on the suspension cells, and that the suitable concentration of Hygromycin for selective calli was 10 mg·L⁻¹. GFP fluorescent detection and PCR detection of the Hyg and GFP gene showed that transgenic positive calli were efficiently produced when *A. tumefaciens* at OD₆₀₀=0.6, carrying the vector pCAMBIA1302, was mixed with the suspension cells at a ratio of 1:1.2 for 30 mins, transferred into a co-culture medium for culture for 10 days, and then to a selective culture medium for culture. This study lays the foundation for further optimization of the genetic transformation system for the suspension cells of *T. koksaghyz* Rodin.

Keywords: *Taraxacum koksaghyz* Rodin; suspension cells; genetic transformation; *Agrobacterium tumefaciens*

(责任编辑:钟云芳)