

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.00066

## 蓝细菌血红蛋白基因的克隆及其向甘蓝型油菜中的转化

谭小力<sup>1,2</sup> 孔凡明<sup>1,\*\*</sup> 张丽丽<sup>1</sup> 李娟<sup>1</sup> 陈松<sup>2</sup> 戚存扣<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>江苏大学生命科学研究院, 江苏镇江 212013; <sup>2</sup>江苏省农业科学院经济作物研究所, 江苏南京 210014

**摘要:** 血红蛋白存在于动物、植物、细菌、真菌、酵母、藻类、原生动物等生物体中。利用 PCR 方法克隆了蓝细菌 *Synechocystis* sp. PCC 680 的血红蛋白基因 *SLR2097*, 该基因属于“truncated”血红蛋白家族, 大小为 375 bp, 编码 123 个氨基酸残基。数据库搜索的结果显示所有的血红蛋白都有一个保守基序, 即“F-[L]-x(4)-[G]-G-[T]-x(2)-[Y]-x-[G]-[R]-x-[M]-x(3)-H”, “truncated”血红蛋白家族也有该结构, 表明它们的进化祖先相同。将获得的 *SLR2097* 连接到双元载体 pCambia1300-CaMV35S 上, 并转化甘蓝型油菜品种宁油 12。转基因油菜表型分析表明, 血红蛋白基因 *SLR2097* 在油菜中的表达促进油菜的生长并缩短发育期, 引起早熟, 这些表型对改良油菜的农艺性状有重要的应用价值。

**关键词:** 农杆菌; 甘蓝型油菜; 血红蛋白; *SLR2097*; 转化

## Cloning and Analysis of Hemoglobin Gene in Cyanobacterium and Transformation into *Brassica napus* L.

TAN Xiao-Li<sup>1,2</sup>, KONG Fan-Ming<sup>1,\*\*</sup>, ZHANG Li-Li<sup>1</sup>, LI Juan<sup>1</sup>, CHEN Song<sup>2</sup>, and QI Cun-Kou<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; <sup>2</sup> Institute of Industrial Crop, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 200014, China

**Abstract:** Hemoglobin exists in most organisms including animals, plants, protozoa, algae, bacteria, and fungi. In the study, hemoglobin gene *SLR2097* was cloned from *Synechocystis* sp. PCC 6803, which was 375 bp in size and encoded 123 amino acid polypeptide chains belonging to the truncated hemoglobin family. Hemoglobin can bind oxygen and co-ordinate the heme iron with protein ligation. Database search showed that a motif ‘F-[L]-x(4)-[G]-G-[T]-x(2)-[Y]-x-[G]-[R]-x-[M]-x(3)-H’ occurred in hemoglobins. Therefore, the truncated hemoglobins might evolve from the same ancestor of hemoglobin. The hemoglobin gene *SLR2097* was ligated into binary vector pCambia1300-CaMV35S, and then transformed into rapeseed cultivar Ningyou 12 with *Agrobacterium*-mediated transformation method. Phenotype analysis indicated that the expression of hemoglobin gene *SLR2097* led to the earlier maturity of transgenic rapeseed. These phenotype variations have a potential application in rapeseed production in the future.

**Keywords:** *Agrobacterium tumefaciens*; *Brassica napus*; Hemoglobin *SLR2097*; Transformation

血红蛋白几乎存在于所有的生物体中, 包括动物、植物、细菌、真菌、藻类等生物<sup>[1]</sup>。分析多种生物的血红蛋白氨基酸序列显示, 它们有一个由“three-on-three”三明治式的 $\alpha$ -螺旋组成的保守结构<sup>[2-3]</sup>。这一结果说明几乎所有的血红蛋白均来自一个共同的血红蛋白祖先<sup>[4]</sup>。在所有的血红蛋白中有一个命名为 truncated hemoglobins 的血红蛋白家族, 它们来自植物、细菌、真菌、原生动物、藻类等, 有

一段 30~40 个氨基酸残基的共同序列。作为能够结合并运输氧的血红蛋白家族的一员, “truncated”家族的血红蛋白也由  $\alpha$ -螺旋组成, 但是, 这种  $\alpha$ -螺旋是由来源于“three-on-three”三明治模式的“two-on-two”三明治模式装配的<sup>[5-6]</sup>。几乎所有的血红蛋白都能够可逆性地结合并运输氧, 从而促进生物的生长与发育。1997 年, Holmberg 等<sup>[7]</sup>将透明颤菌(*Vitreoscilla*)的血红蛋白基因转化烟草后, 发现转基因烟

本研究由江苏大学高级人才基金(05JDG003), 江苏省农业科学院博士后基金, 江苏省博士后基金(0601015B)资助。

\* 通讯作者(Corresponding author): 戚存扣, E-mail: qck@jaas.ac.cn

第一作者联系方式: E-mail: xltan@ujs.edu.cn(谭小力); fmkong@126.com(孔凡明) \*\*共同第一作者

Received(收稿日期): 2008-03-24; Accepted(接受日期): 2008-07-16.

草在干重、叶绿素含量以及尼古丁含量等方面较野生型烟草都有明显的提高。

油菜主要在中国、欧洲、加拿大、澳大利亚等国种植,在油料作物中其产量仅次于大豆与棕榈,位居第三<sup>[8-9]</sup>。油菜籽油含有较低量的饱和脂肪酸,主要用作烹饪油、色拉油以及人造黄油等<sup>[8]</sup>,也是潜在的生物能源的原料。基于油菜在日常生活中的重要性,提高单位面积油菜的产量势在必行。然而传统的作物育种技术在这方面的应用局限性日显突出,因此分子生物学技术为提高单位面积油菜的产量提供了一个新的途径。我们将蓝细菌 *Synechocystis* sp. PCC 6803 的血红蛋白基因克隆并转化进油菜中,以期获得生长发育快、产量高的油菜新材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 PCR 克隆血红蛋白基因 *SLR2097*

根据 NCBI 数据库中的血红蛋白基因的序列设计了 1 对引物,由上海生物工程技术服务有限公司合成。其引物: *HemoglobinF* 为 [5'-tctagaATGTCAA CTTTGTATG-3'], *HemoglobinR* 为 [5'-ctgcagTCAC TGATTAAGCACG-3']。用蓝细菌 *Synechocystis* sp. PCC 6803 的基因组 DNA 作为模板,PCR 体系含 1  $\mu$ L 的 DNA 模板,2  $\mu$ L 的 dNTP(终浓度为 2 mmol L<sup>-1</sup>),2  $\mu$ L 的 10 $\times$ PCR 缓冲液, *HemoglobinF*、*HemoglobinR* 各 2  $\mu$ L,0.3  $\mu$ L 的 *LA Taq* 酶(5 U  $\mu$ L<sup>-1</sup>),用超纯水补足总体积 20  $\mu$ L。反应程序为 94 预变性 5 min; 94 变性 1 min, 60 退火 1 min, 72 延伸 1.5 min; 40 个循环; 最后 72 延伸 10 min。以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,观察并照相。

### 1.2 血红蛋白基因的生物信息学分析

血红蛋白基因的 Blast、开放阅读框的获得以及其编码的多肽的分子质量与等电点的预测都在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)网站上进行;用 DNASTar 软件进行 14 种生物的血红蛋白基因的序列比对以及它们的系统进化树分析;在 ExPASy(<http://au.expasy.org>)网站上进行 14 种生物的血红蛋白基因的保守域的预测。

### 1.3 双元表达载体 pCAMBIA1300-CaMV35S-*SLR2097* 的构建及其转化农杆菌

将质粒载体 pCAMBIA1300 与 CaMV35S-sGFP (S65T)-nos3' 用 *Bam*HI 与 *Xba*I 进行双酶切。用试剂盒回收大约 8 950 bp 与 400 bp 的 DNA 片段,然后用 T4 DNA 连接酶将二者连接。用同样的方法将

*SLR2097* 连接到载体 pCAMBIA1300-CaMV35S 上。用热激法将双元表达载体 pCAMBIA1300-CaMV35S-*SLR2097* 转化进农杆菌菌株 LBA4404 中。

### 1.4 农杆菌介导的油菜转化

用甘蓝型油菜宁油 12 进行转化实验。首先,将种子用 75% 乙醇处理 2 min,再用 15% “84” 消毒液含 0.2% Tween-20 处理 6 min,最后用无菌水冲洗 3~5 次。将无菌的油菜种子播种在 1/2MS<sup>[10]</sup> 固体培养基上。先黑暗培养 2 d,再于 25 光照培养箱中培养 2 d。从萌发 4 d 的油菜苗上切取约 1 cm 长的子叶节作为外植体,用  $OD_{600}$  为 0.4,含有 200  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> 的乙酰丁香酮与 0.04% silwet L77 的农杆菌侵染液侵染子叶节 10 min,然后将子叶节转移到共培养基 (MS+30 g L<sup>-1</sup> 蔗糖+4 mg L<sup>-1</sup> 6-BA+0.04 mg L<sup>-1</sup> NAA+5 mg L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>+8 g L<sup>-1</sup> 琼脂)上黑暗培养 2 d。将共培养过的外植体转移到筛选培养基 (MS+30 g L<sup>-1</sup> 蔗糖+4 mg L<sup>-1</sup> 6-BA+0.04 mg L<sup>-1</sup> NAA+500 mg L<sup>-1</sup> 羧苄青霉素+5 mg L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>+20 mg L<sup>-1</sup> 潮霉素+8 g L<sup>-1</sup> 琼脂)上筛选培养 2 周,然后将具有抗性的绿色小苗转移到生长培养基 (MS+30 g L<sup>-1</sup> 蔗糖+2 mg L<sup>-1</sup> 6-BA+500 mg L<sup>-1</sup> 羧苄青霉素+5 mg L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>+8 g L<sup>-1</sup> 琼脂)上培养 1 周。将生长到一定大小的绿色小苗转移到生根培养基 (MS+10 g L<sup>-1</sup> 蔗糖+1 mg L<sup>-1</sup> IBA+500 mg L<sup>-1</sup> 羧苄青霉素+5 mg L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>+8 g L<sup>-1</sup> 琼脂)上进行 2 周生根培养,再将带根的绿色小苗转移到土壤中生长至成熟。

### 1.5 PCR 鉴定

用 CTAB 法<sup>[10]</sup> 提取潮霉素筛选呈阳性的油菜植株的基因组 DNA,用 *HemoglobinF*: 5'-tctagaATGTCAA CTTTGTATG-3' 与 *HemoglobinR*: 5'-ctgcagTC ACTGATTAAGCACG-3' 作为引物,1  $\mu$ L 的 DNA 模板,2  $\mu$ L 的 dNTP(终浓度为 2 mmol L<sup>-1</sup>),2  $\mu$ L 的 10 $\times$ PCR 缓冲液, *HemoglobinF*、*HemoglobinR* 各 2  $\mu$ L,0.3  $\mu$ L 的 *LA Taq* 酶(5 U  $\mu$ L<sup>-1</sup>),用超纯水补足总体积 20  $\mu$ L; PCR 反应程序为 94 预变性 5 min; 94 1 min, 60 1 min, 72 1.5 min; 30 个循环; 最后在 72 下延伸 10 min。以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,观察并照相。

### 1.6 Southern blotting 分析

用 CTAB 法<sup>[11]</sup> 提取 PCR 鉴定呈阳性的油菜植株的基因组 DNA。每个油菜植株取 10  $\mu$ g 基因组 DNA 样品,用 *Hind*III 酶切过夜。将酶切好的基因组 DNA 用 0.8% 的琼脂糖凝胶进行电泳。用碱性转移法<sup>[12]</sup> 将基

基因组 DNA 转移到尼龙膜(Hybond N<sup>+</sup>)上, 用 [<sup>32</sup>P]-dCTP 标记试剂盒(TaKaRa)标记 *SLR2097* 基因作为探针, 在杂交炉中 65℃ 杂交 16 h。洗膜后, 根据膜上的放射强度, 在 -70℃ 下对 X 胶片曝光 24~48 h。

## 2 结果与分析

### 2.1 *SLR2097* 基因的克隆

用蓝细菌 *Synechocystis* sp. PCC 6803 的基因组 DNA 为模板进行 PCR, 克隆出 *SLR2097* 基因, 用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳。电泳检测如图 1 所示。回收测序的结果与 GenBank 数据库中血红蛋白基因的序列一样。

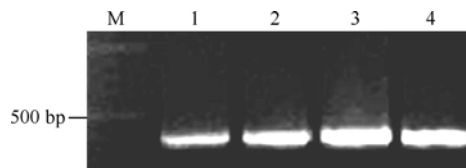


图 1 蓝细菌 *Synechocystis* sp. PCC 6803 中的 *SLR2097* 的扩增  
Fig. 1 PCR amplification of the hemoglobin gene from *Synechocystis* sp. PCC 6803

M: marker; 1~4: 血红蛋白 DNA 片段的扩增。

M: marker; 1~4: amplification of the 375 bp DNA fragments of the hemoglobin gene.

### 2.2 *SLR2097* 基因的生物信息学分析

序列分析表明 *SLR2097* 基因的开放阅读框为 375 bp, 编码 123 个氨基酸残基。*SLR2097* 基因的开放阅读框编码的多肽分子质量为 13.9 kD, *pI* 为 5.27。蓝细菌血红蛋白基因与其他 13 种生物的血血红蛋白基因的比对结果表明各个物种的血血红蛋白基因的序列同源性是比较低的, 一般小于 50%。但是, 它们都有一个共同的基序, 即 F-[LF]-x(4)-[G]-G-[PAT]-x(2)-[YW]-x-[GSE]-x(1,5)-[LW]-x(3)-H(图 2)。对 14 种生物的血血红蛋白基因进行系统进化树分析表明各个物种的血血红蛋白可能来自同一个血红蛋白祖先(图 3)。14 种生物的血血红蛋白基因分成两组, 一组是由植物与细菌的血血红蛋白基因组成; 另一组是由藻类与原生动物的血血红蛋白基因组成。有趣的是分支菌的血血红蛋白基因分到了后一组。

### 2.3 表达载体 pCambia1300-CaMV35S-*SLR2097* 的构建及农杆菌转化

如图 4-a 所示, 用 *Xba* I 与 *Bam* H I (第 1 泳道)、*Xba* I 与 *Sac* I (第 2 泳道)、*Xba* I 与 *Kpn* I (第 3 泳道) 双酶切载体 pCambia1300-CaMV35S, 得到大约 8 950 bp 载体片段与 400 bp 的 CaMV35S 片段。这

些结果显示 CaMV35S 启动子已经插入到表达载体 pCambia1300 中, 构建成载体 pCambia1300-CaMV35S。如图 4-b 所示, 用 *Pst* I 与 *Xba* I (第 1 泳道)、*Pst* I 与 *Sac* I (第 2 泳道)、*Pst* I 与 *Kpn* I (第 3 泳道) 双酶切载体 pCambia1300-CaMV35S-*SLR2097*, 得到大约 9 350 bp 与 375 bp、8 950 bp 与 775 bp 的 DNA 片段。这些结果显示外源基因 *SLR2097* 已经成功插入载体 pCambia1300-CaMV35S。图 4-c 中的泳道 1、2、3 表明载体 pCambia1300-CaMV35S-

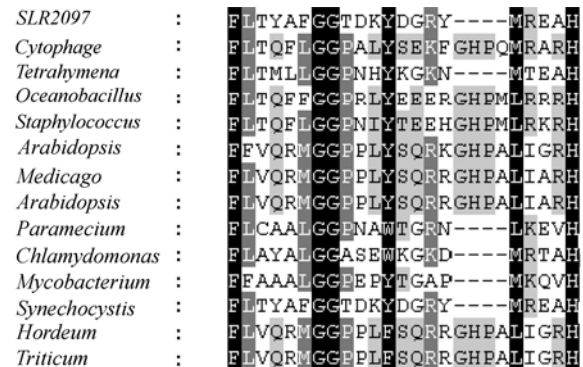


图 2 蓝细菌 *Synechocystis* 的血血红蛋白基因与其他 13 种生物血血红蛋白基因的序列比对分析

Fig. 2 Multiple sequence alignment of the hemoglobin gene of *Synechocystis* with other trHbs gene

*Synechocystis* sp. PCC 6803 (*SLR2097*, GenBank acc. No. 1MWB\_A); *Cytophaga hutchinsonii* (ZP\_00118553); *Tetrahymena pyriformis* (P17724); *Oceanobacillus iheyensis* HTE831 (NP\_692139); *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Mu50 (NP\_371527); *Arabidopsis thaliana* (BAD95217); *Medicago truncatula* (ABE93362); *Arabidopsis thaliana* (ABD59106); *Paramecium caudatum* (1DLW\_A); *Chlamydomonas eugametos* (1DLY\_A); *Mycobacterium tuberculosis* (1DLR\_A); *Hordeum vulgare* (AAK55410), and *Triticum aestivum* (AAN85433).

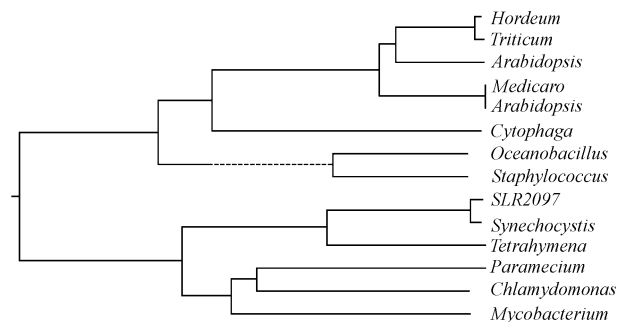


图 3 14 种生物血血红蛋白基因系统发生树

Fig. 3 Phylogenetic relationships of trHbs of non-vertebrate *Hordeum vulgare* (AAK55410); *Triticum aestivum* (AAN85433); *Arabidopsis thaliana* (BAD95217); *Medicago truncatula* (ABE93362); *Arabidopsis thaliana* (ABD59106); *Cytophaga hutchinsonii* (ZP\_00118553); *Oceanobacillus iheyensis* HTE831 (NP\_692139); *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Mu50 (NP\_371527); *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*SLR2097*, GenBank acc. No. 1MWB\_A); *Tetrahymena pyriformis* (P17724); *Paramecium caudatum* (1DLW\_A); *Chlamydomonas eugametos* (1DLY\_A); *Mycobacterium tuberculosis* (1DLR\_A).

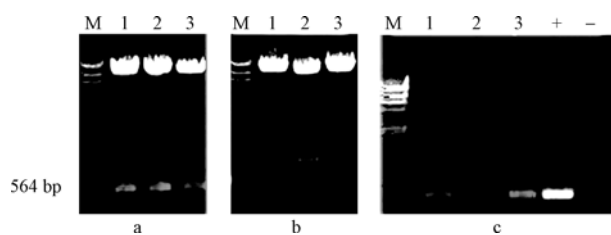


图 4 获得含有载体 pCambia1300-CaMV35S-SLR2097 的农杆菌鉴定

Fig. 4 Electrophoretogram of identification of *A. tumefaciens* harboring pCambia1300-CaMV35S-SLR2097

a: 限制性酶消化 pCambia1300-CaMV35S; b: 限制性酶消化 pCambia1300-CaMV35S-SLR2097; c: 含有 pCambia1300-CaMV35S-SLR2097 农杆菌鉴定。

a: Vector pCambia1300-CaMV35S was digested with restriction endonucleases, M: marker, 1: *Xba* I and *Bam* H I, 2: *Xba* I and *Sac* I, 3: *Xba* I and *Kpn* I; b: pCambia1300-CaMV35S-SLR2097 was digested with restriction endonucleases, M: marker, 1: *Pst* I and *Xba* I, 2: *Pst* I and *Sac* I, 3: *Pst* I and *Kpn* I; c: M: marker, 1-3: *A. tumefaciens* harboring pCambia1300-CaMV35S-SLR2097, +: the plasmid of pCambia1300-CaMV35S-SLR2097, -: the non-transformation *A. tumefaciens*.

SLR2097 已经转化进农杆菌 LBA4404 中。

## 2.4 转基因油菜的 PCR 鉴定

用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳。结果显示大部分的绿色植株呈现 PCR 阳性, 只有少部分表现为 PCR 阴性, 而负对照也呈 PCR 阴性(图 5)。

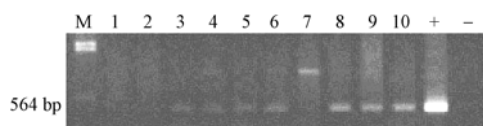


图 5 PCR 鉴定转基因油菜植株

Fig. 5 PCR analysis to detect the presence of the hemoglobin gene of *Synechocystis* in transgenic plants

M: marker; 3~6 和 8~10: 血红蛋白 DNA 片段的扩增产物; 1, 2 和 7: 非转基因; +: 连接质粒的 PCR 产品作模板; -: 非转基因的基因组作模板。

M: marker; 3~6 and 8~10: the amplification product of the 375 bp DNA fragment of the hemoglobin gene; 1, 2, and 7: non-transgenic; +: PCR product with plasmid as template; -: PCR product with genomic DNA of non-transgenic plant as template.

## 2.5 Southern blot 分析转基因油菜

提取阳性的转基因植株的基因组 DNA, 进行 Southern blot 分析, 图 6 显示 1、2、4 泳道的植株有 SLR2097 基因的插入。2、4 单杂交带的泳道表明此油菜植株样品只转化进一个基因的拷贝, 而双杂交带的 1 泳道则表明此油菜植株样品转化进了 2 个基因的拷贝。杂交片段大小的差异表明外源基因插入油菜基因组的位置不同, 也说明了所得到的是相互独立的转基因植株。



图 6 转基因油菜中 SLR2097 基因的 Southern blot 分析  
Fig. 6 Southern blot of the integration of gene SLR2097 in the host genome and the copy number of it in transgenic plants

2~4: 单杂交带; 1: 双杂交带; 3: 没有杂交带。  
2-4: single hybridizing bands; 1: double hybridizing band;  
3: no hybridizing band.

## 2.6 血红蛋白基因对转基因油菜的影响

在转基因植株的生长过程中, 转 SLR2097 基因油菜与野生型油菜和 GFP 转基因油菜相比幼苗生长更壮, 叶子更绿, 推测转 SLR2097 基因油菜叶绿素含量得到提高。将转化 SLR2097 基因油菜移栽土壤中生长成熟以后, 转 SLR2097 基因油菜植株比野生型油菜植株早熟(图 7)。



图 7 成熟阶段的转基因油菜与野生型油菜的表型比较  
Fig. 7 Phenotype of transgenic plant and non-transgenic plant at mature stage

a: 转基因油菜; b: 转基因油菜。

a: non-transgenic wild rapeseed; b: transgenic rapeseed.

## 3 讨论

血红蛋白可以分为脊椎动物血红蛋白与非脊椎动物血红蛋白<sup>[1]</sup>。后者主要来自非脊椎动物、植物、原生动物、藻类、细菌以及真菌等, 它还包括一类

重要的血红蛋白家族,即“truncated”血红蛋白。本研究中14种血红蛋白基因的序列对比表明非脊椎动物血红蛋白基因的序列同源性比较低,这可能与不同物种的血红蛋白要适应各自不同的环境而进化有关<sup>[13]</sup>。

血红蛋白在可逆性的结合与运输氧、一氧化氮的解毒、末端氧化酶作用等过程中起着非常重要的作用<sup>[13]</sup>。透明颤菌血红蛋白能够在低溶氧的环境中提高菌体结合并运输溶氧效率<sup>[15]</sup>。透明颤菌血红蛋白能够影响烟草的一些性状,例如,转基因烟草的平均干重提高80%~100%,叶绿素含量提高30%~40%,尼古丁含量提高34%<sup>[7]</sup>。许多血红蛋白的结构与作用机制已研究得非常清楚,但它们在农业生产上的应用研究却很少。我们克隆了蓝细菌的血红蛋白基因并将其转化进甘蓝型油菜中,观察到了转基因油菜生长茁壮、早熟的现象,这一性状具有潜在的应用价值。我们将在获得大量转基因植株的基础上,进一步研究蓝细菌血红蛋白基因对油菜生长发育过程中叶绿素的含量,种子品质及产量性状的影响,这将为血红蛋白基因在农业生产上的应用研究奠定基础。

#### 4 结论

克隆出了蓝细菌 *Synechocystis* sp. PCC 6803 的血红蛋白基因;构建了植物二元表达载体 pCAMBIA 1300-CaMV35S,并将其与克隆的 SLR2097 连接并转化到农杆菌菌株 LBA4404 中。用农杆菌介导的方法将血红蛋白基因转化进甘蓝型油菜宁油 12 中,携带该基因的宁油 12 与原品种相比生长茁壮、早熟。

#### References

- [1] Hardison R C. A brief history of hemoglobins: Plant, animal, protist, and bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 5675–5679
- [2] Perutz M F. Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron. *Ann Rev Biochem*, 1979, 48: 327–386
- [3] Perutz M F. Structure and function of hemoglobin. *Harvey Lect*, 1969, 63: 213–261
- [4] Scott N L, Lecomte J T. Cloning, expression, purification and preliminary characterization of a putative hemoglobin from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Protein Sci*, 2000, 9: 587–597
- [5] Pesce A, Couture M, Dewilde S, Guertin M, Yamauchi K, Ascenzi P, Moens L, Bolognesi M. A novel two-over-two  $\alpha$ -helical sandwich fold is characteristic of the truncated hemoglobin family. *Embo J*, 2000, 19: 2424–2434
- [6] Moens L, Vanfleteren J, Van de Peer Y, Peeters K, Kapp O, Czeluzniak J, Goodman M, Blaxter M, Vinogradov S. Globins in non-vertebrate species: Dispersal by horizontal gene transfer and evolution of the structure-function relationships. *Mol Biol Evol*, 1996, 13: 324–333
- [7] Holmberg N, Lilius G, Bailey J E, Bulow L. Transgenic tobacco expressing *Vitreoscilla* hemoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolite production. *Nat Biotechnol*, 1997, 15: 244–247
- [8] Cardoza V, Stewart C N. Increased *Agrobacterium*-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyl segment explants. *Plant Cell Rep*, 2003, 21: 599–604
- [9] Block M, Brouwer D, Tenning P. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the bar and neo genes in the transgenic plants. *Plant Physiol*, 1989, 91: 694–701
- [10] Murashige T, Skong F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 1962, 15: 473–497
- [11] Doyle J J. Isolation of plant DNA from fresh tissues. *Focus*, 1990, 12: 13–15
- [12] Chomczynski P. Solubilization in formamide protects RNA from degradation. *Nucl Acids Res*, 1992, 20: 3791–3792
- [13] Weber R E, Vinogradov S N. Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. *Physiol Rev*, 2001, 81: 569–628
- [14] Lecomte J T J, Scott N L, Vu B C, Falzone C J. Binding of ferric heme by the recombinant globin from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry*, 2001, 40: 6541–6552
- [15] Khosla C, Curtis J E, DeModena J, Rinas U, Bailey J E. Expression of intracellular hemoglobin improves protein synthesis in oxygen-limited *Escherichia coli*. *Biotechnology*, 1990, 8: 849–853