

农杆菌介导的紫穗槐茎段愈伤组织遗传转化研究^{*}

管清杰, 柳参奎^{**}

东北林业大学盐碱地生物资源环境研究中心, 哈尔滨 150040

摘要: 采用农杆菌介导法对紫穗槐茎段诱导的愈伤组织进行遗传转化研究。确定了卡那霉素临界耐受浓度为 40 mg/L。菌液浓度与侵染时间的正交试验结果表明: 侵染菌液 OD₆₀₀ 为 0.8、侵染时间为 30 min 时转化效率最高, 达 17.95%。GUS 染色检测分析表明: 含 pBI121-GUS 质粒 DNA 农杆菌侵染转化的愈伤组织其抗性不定芽和再生植株根和叶均呈蓝色。转化植株叶 PCR 检测结果表明外源 GUS 基因已整合到紫穗槐基因组中。以上结果表明建立了以茎段诱导愈伤组织为转化受体、农杆菌介导的紫穗槐高效遗传转化体系。为了验证其可重复性, 又进行了 pBI121-GFP 基因的转化, T₀ 代再生植株 PCR 检测整合率达 85%, 在 488 nm 蓝光源激发下转化株的顶芽产生绿色荧光, 说明转入的基因在 35S 启动子下过量表达。此遗传转化体系可应用于转基因育种。

关键词: 紫穗槐; 农杆菌; 茎段; 愈伤组织; 遗传转化

中图分类号: S793.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-5684(2010)06-0644-06

Genetic Transformation through Stem Segments Derived Callus of *Amorpha fruticosa* by *Agrobacterium tumefaciens*

GUAN Qing-jie, LIU Shen-kui

Alkali Soil Natural Environmental Science Center, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Genetic transformation was done to induce callus in stem segment of *Amorpha fruticosa* L. via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer. It was found that critical tolerance concentration of Kanamycin was 40 mg/L; The experiment of orthogonal bacterium concentration and infection time showed that infection concentration of bacterium (OD₆₀₀) was 0.6—0.8, and conversion efficiency peaked 17.95% when infection time was 30 min. The DNA containing pBI121-GUS plasmid in *Amorpha fruticosa* L. infected the invert callus. Gus staining analysis suggested that adventitious buds and regenerated shoots, roots and leaves possessing resistance showed blue; also, the PCR analysis in invert leaves suggested that exogenous GUS gene was integrated into genome of *Amorpha fruticosa* L. We established an efficient transformation system, in which callus of stem segment is transformation acceptor via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer. In order to confirm their repeatability, pBI121-GFP gene was used for transformation. Via PCR analysis of T₀ generation shoots, the integration rate reached 85%. Through blue light stimulation, the apical bud in invert shoot showed green fluorescent, indicating that the invert gene under 35S promoter overexpressed. It was concluded that the conformation system can be used for transgenic breeding, which will lay foundation for improving and cultivating new strains of *Amorpha fruticosa* L.

* 基金项目: 国家林业局“948”项目(2008429), 东北林业大学青年科研基金项目(07049), 哈尔滨市青年科技创新基金项目(RC2007QN002079)

作者简介: 管清杰, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 植物遗传育种、抗性分子生物学。

收稿日期: 2009-12-17 修回日期: 2010-05-14

** 通讯作者

Key words: *Amorpha fruticosa* L.; agrobacterium; stem segment; callus; genetic transformation

紫穗槐 (*Amorpha fruticosa* L.) 作为一种园林观赏植物传入我国已有几十年^[1], 不仅在城市绿化、道路美化、保持水土、降低各种环境污染等方面得到广泛的应用^[2], 而且可作为绿肥和饲料^[3,4], 其果实中所含的异黄酮药用价值也很高^[5]。长期以来, 紫穗槐新品种培育基本上都是采用常规育种方法, 转基因技术的发展为紫穗槐的遗传改良提供了一种很有潜力的手段^[6]。但迄今为止, 还未见对紫穗槐转基因育种的相关研究报道。转基因育种的关键是需要有高效的遗传转化体系。管清杰等^[7]完成了紫穗槐茎段诱导愈伤组织再生体系的建立。对于建立的农杆菌介导的高效遗传转化系统多采用 GUS (β -Glucuronidase: GUS) 基因或 GFP (green fluorescent protein: GFP) 基因进行检测分析。Jefferson 等^[8]从 *E. coli* K-12 中克隆出了 GUS 基因, 植物遗传转化中普遍使用它作为报告基因。GUS 酶 (葡萄糖苷酸酶) 具有稳定性高、pH 适应范围广、耐受性强、活性检测方便等特点, 可催化 X-Gluc (5-溴-4-氯-3-吲哚葡萄糖醛酸苷) 的水解反应, 在植物组织内产生深蓝色的化合物, 表现为蓝色斑点, 由此可判断转化效果或转化效率^[9]。选取合适的报告基因可在转化后随时对受体组织进行检测, 有助于及时改进和优化各个影响因素, 提高农杆菌转化效率。GFP 蛋白是 Shimomura 等^[10]首次从水母属中分离纯化, 因受到紫外光或蓝光激发时能发射绿色荧光而得名。在异源细胞中表达能发射绿色荧光的 GFP 引起学者们的广泛兴趣, 作为报告基因, 正在扩大其应用领域。

本试验通过 GUS 基因对紫穗槐进行遗传转化, 研究了 Kana、菌液浓度、侵染时间等因素对农杆菌介导的紫穗槐茎段愈伤组织的遗传转化的影响; 以 GFP 基因的转化验证试验的可重复性。建立的紫穗槐高效遗传转化体系可为改良和培育紫穗槐新品系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 以紫穗槐茎段诱导的愈伤组织作为遗传转化的受体材料。

1.1.2 菌株 携带质粒 pBI121-GUS、pBI121-GFP

的根癌农杆菌 EHA105 由东北林业大学盐碱地生物资源环境研究中心实验室保存。

1.1.3 试剂 CTAB、dNTP、*Taq* 酶购于大连宝生物公司, 转基因检测引物 (F: 5' CgTAAgggaTgACgCAcAAT3'; R: 5' gATAATCATCgCAAgACCgg3') 由上海生物工程公司合成。X-Gluc 购于 Progema 公司。其他试剂为国产分析纯。

1.1.4 培养基 (1) 紫穗槐茎段愈伤组织诱导培养基为 MS + 6 BA 4.0 mg/L + NAA 2.0 mg/L + 2, 4 D 0.5 mg/L。

(2) 预培养、共培养培养基为愈伤组织分化不定芽的最佳培养基, 即 MS + 6 BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L + KT 2.0 mg/L。

(3) 分化筛选培养基为愈伤组织分化不定芽的分化培养基附加卡那霉素 (Kanamycin, Kana) (临界耐受浓度) + 头孢噻肟钠 (Cefotaxime Sodium, Cef) 500 mg/L。

(4) 生根筛选培养基为 1/2 MS + 酵母提取物 0.5 mg/L + Kana (临界耐受浓度)。

1.2 试验方法

1.2.1 愈伤组织的诱导及再生 选取成熟饱满的紫穗槐种子, 用 70% 乙醇和次氯酸钠消毒灭菌后, 接种到 1/2 MS 培养基上, 长成无菌植株。剪取 0.7 cm 茎段在诱导培养基上诱导愈伤组织。愈伤组织分化不定芽及生根培养参照文献 [7]。

1.2.2 农杆菌接种菌液的准备 挑取含目的质粒 (pBI121-GUS/GFP) 的农杆菌单菌落于 5 mL 含 50 mg/L Kana + 100 mg/L 利福平 (Rifampicin, Rif) 的 YEP 培养基中, 28 °C、180 r/min 培养 48 h。吸取 2 mL 培养物转入 100 mL 含 50 mg/L Kana + 100 mg/L Rif 的 YEP 培养基中, 28 °C、180 r/min 继续暗培养至 OD₆₀₀ = 0.5 ~ 0.8。将菌液转至无菌离心管中, 5 000 r/min 离心 5 min, 菌体沉淀后用 1/2 MS 液体培养基重悬, 使重悬菌液 OD₆₀₀ = 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2。重悬菌液中加入终浓度为 200 μ mol/L 的乙酰丁香酮 (Acetosyringone, AS)、1% 的 Triton X-100, 用于侵染紫穗槐外植体一愈伤组织。

1.2.3 农杆菌介导转化 将愈伤组织接种在预培养基上, 培养温度为 (25 \pm 2) °C, 辅助光照每天 14 h, 光照强度 3 000 lx。用重悬的含目的质粒

(pBI121-GUS/GFP) 农杆菌接种菌液侵染预培养 3 d 的愈伤组织。侵染后取出放在无菌滤纸上吸去多余菌液,置于共培养培养基上, (25 ± 2) °C 黑暗条件下共培养 3 d。取出愈伤组织,接种于选择培养基上,在组织培养室中(条件同上)选择培养,进行不定芽的筛选。将筛选出的抗性芽在生根培养基上进行生根培养,培养成再生植株,经炼苗后,移栽至试验网室内。

1.2.4 适宜不定芽分化的愈伤组织卡那霉素临界耐受浓度筛选 将诱导出的基本一致的白绿愈伤组织接种到含有 0, 20, 30, 40, 50, 60, 70 mg/L 卡那霉素的分化培养基上,每处理接种 30 块愈伤组织,3 次重复。培养在组织培养室中(条件同本文“1.2.3”),每隔 10 d 换一次新培养基。从第 10 d 开始每隔 5 d 调查一次愈伤组织死亡块数,计算死亡率。

1.2.5 菌液浓度及侵染时间对转化效率的影响试验 挑选大致相同的白绿愈伤组织 40 块左右预培养 3 d(3 次重复),然后进行接种侵染。将接种用的含 pBI121-GUS 质粒的菌液配制成 OD₆₀₀ = 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 5 个浓度,将侵染时间设为 15, 30, 45, 60, 90 min 5 个处理。分别侵染后放于共培养基上培养 3 d,洗菌后转移至选择分化培养基上培养,每隔 25 d 继代一次,75 d 后调查统计 Kana 临界耐受浓度下抗性不定芽的分化率。

1.2.6 GUS 染色检测 GUS 组织化学检测参照 Jefferson^[11] 和 Leslie^[12] 的方法进行。先用缓冲液(100 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 7.0; 0.5 mmol/L 亚铁氰化钾; 0.5 mmol/L 铁氰化钾)浸泡受体材料——(pBI121-GUS) 质粒侵染的愈伤组织及对照、分化筛选培养基上的抗性芽及对照、抗性再生植株的根和叶及对照。漂洗后,加入 GUS 染液: 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) 中含有 0.5 mmol/L K₃[Fe(CN)₆]、0.5 mmol/L K₄[Fe(CN)₆]、10 mmol/L Na₂EDTA、0.1% Triton x-100、

20% 甲醇、0.5 mg/mL X-Gluc。37 °C 过夜观察染色情况。

1.2.7 DNA 提取及 PCR 检测 基因组 DNA 提取采用 CTAB 法^[13]。提取转基因的 Kana 抗性植株叶片基因组 DNA,以其 1/100 为模板,野生型紫穗槐基因组 DNA 为对照,应用检测引物进行 PCR 扩增^[14],PCR 产物于 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.8 GFP 基因农杆菌介导对紫穗槐的遗传转化及检测 为了进一步验证建立的外源基因对紫穗槐茎段诱导愈伤组织的高效遗传转化再生体系,应用含目的质粒(pBI121-GFP)的农杆菌对其诱导的愈伤组织进行遗传转化。农杆菌工作液按转 GUS 基因确定的条件配制,侵染浓度和时间及 Kana 选择压均按 GUS 基因侵染紫穗槐外植体一愈伤组织确立的最佳遗传转化再生体系进行。对抗性 T₀ 代无菌苗进行 PCR 扩增检测(引物及方法同本文“1.2.7”)。应用实体显微镜(Olympus)观察抗性 T₀ 代无菌苗的荧光表达。

2 结果与分析

2.1 转化受体愈伤组织的卡那霉素临界耐受浓度的确定

卡那霉素是植物遗传转化中常用的筛选试剂,适宜的卡那霉素浓度直接影响转化率和成功率,因此,遗传转化体系的建立必须确定转化受体的卡那霉素临界耐受浓度。表 1 中试验结果表明,随着卡那霉素浓度的增加和抑制时间的延长,愈伤组织死亡率增大。转化受体愈伤组织受卡那霉素抑制 25 d 时,死亡率与其浓度相关关系为 $y = 1.0708x + 3.4105$ (图 1),此时的半致死浓度为 38~43 mg/L。含 pBI121-GUS 质粒的菌株其卡那霉素筛选浓度是 50 mg/L。因为不定芽分化要在 20 d 后更换新的培养基,因此在以下的试验中选择 40 mg/L 作为紫穗槐转化受体愈伤组织的卡那霉素临界耐受浓度。

表 1 转化受体愈伤组织的卡那霉素临界耐受浓度

Table 1. Critical tolerance concentration of Kanamycin in transformation acceptor of callus

ρ(卡那霉素)/ (mg·L ⁻¹) Concentration of Kanamycin	接种愈伤组织块数 Number of infected callus pieces	愈伤组织死亡率/% Mortality of callus				
		10 d	15 d	20 d	25 d	30 d
0	87	0	0	0	0	0
20	84	0	0	16.67	27.38	32.14

续表 1

ρ (卡那霉素)/ (mg·L ⁻¹) Concentration of Kanamycin	接种愈伤组织块数 Number of infected callus pieces	愈伤组织死亡率/% Mortality of callus				
		10 d	15 d	20 d	25 d	30 d
30	93	0	2.15	17.20	30.10	62.36
40	91	2.20	5.49	27.47	51.65	63.73
50	90	4.44	13.33	34.44	64.44	87.78
60	88	6.82	12.50	36.64	69.32	96.60
70	87	8.05	21.84	55.17	70.11	97.70

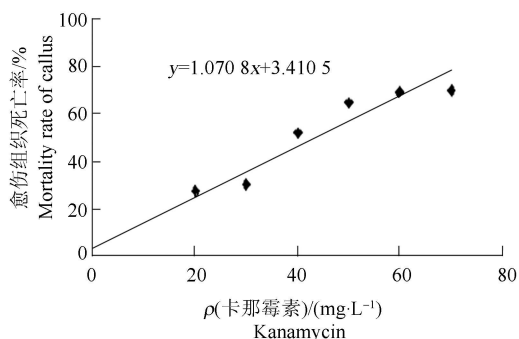


图 1 抑制 25 d 时愈伤组织死亡率与卡那霉素浓度相关关系

Fig. 1. Relationship between mortality rate and concentration in callus acceptor suppressed by Kanamycin for 25 d

2.2 菌液浓度及侵染时间对转化效率的影响

菌液浓度与侵染时间的正交试验结果(表 2)

表明, 菌液浓度与侵染时间对愈伤组织存活和转

化效率有很大的影响。当菌液浓度 (OD_{600}) 为 0.2 ~ 0.8 时转化效率随侵染时间的延长先增加后降低, 随侵染时间的延长愈伤组织存活率下降, 从而减少了抗性不定芽的分化。在菌液浓度 (OD_{600}) 为 0.2 时, 侵染时间达 90 min 后, 接种在分化筛选培养基上的愈伤组织受腐蚀死亡, 转化率为 0。在短时间(15~45 min) 侵染时转化效率随侵染菌液浓度 (OD_{600} 为 0.2 ~ 0.8) 的升高而增加。当菌液浓度 OD_{600} 为 1.0 时, 只有侵染时间 15 min 的处理转化愈伤组织有存活, 转化率为 5.932%。在菌液浓度 OD_{600} 为 0.6、侵染时间为 30 min 时转化率为 15.385%, 达最高, 此后降低; 在菌液浓度 OD_{600} 为 0.8、侵染时间为 30 min 时转化率为 17.949% 达到最高, 此后再降低。从本试验结果看, 在菌液低浓度 (OD_{600} = 0.8)、侵染时间为 30 min 时转化效率最高, 因此以后的试验均在此条件下进行。

表 2 菌液浓度和侵染时间对转化效率的影响

Table 2. Effect of cell density and inoculation time on efficiency of transformation

t/min	$OD_{600} = 0.2$			$OD_{600} = 0.4$			$OD_{600} = 0.6$			$OD_{600} = 0.8$			$OD_{600} = 1.0$		
	a	b	c/%	a	b	c/%	a	b	c/%	a	b	c/%	a	b	c/%
15	105	3	2.857	118	5	4.237	118	12	10.169	118	13	11.070	118	7	5.932
30	103	5	4.854	117	7	5.983	117	18	15.385	117	21	17.949	117	0	0
45	106	5	4.717	121	10	8.264	121	17	14.050	121	15	12.397	121	0	0
60	108	2	1.852	116	0	0	116	5	4.310	116	0	0	116	0	0
90	104	0	0	121	0	0	121	0	0	120	0	0	122	0	0

注: a. 接种愈伤数目; b. 抗性不定芽数目; c. 转化率(抗性不定芽数目/接种愈伤数目 × 100%)

Note: a. No. of callus; b. No. of resistant adventitious bud; c. Rate of transformation (No. of resistant adventitious bud/No. of callus × 100%)

2.3 转基因植株的 PCR 检测结果

为了验证遗传转化再生植株 (T_0) 基因组整合了 GUS 基因, 随机提取 46 株遗传转化抗性再生植株的基因组 DNA, 应用检测引物进行 PCR 扩

增, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果 38 株扩增得到目的片段, 转化率为 82.61% (部分结果见图 2)。由图中可以看出, 在 2~8 (2 为阳性对照) 泳道中都扩增出大小约 1 800 bp 的特异性片段, 而

阴性对照没有扩增产物,证明在转化植株中有GUS基因的插入。

2.4 抗性愈伤、不定芽和转化植株的GUS染色鉴定结果

选取经含质粒(pBI121-GUS)农杆菌(OD₆₀₀=0.6)工作液侵染转化后培养25 d的愈伤组织20块、未经转化处理的愈伤组织5块,37℃过夜GUS染色。观察染色结果表明,在实体显微镜下转化的愈伤组织表面呈蓝色,细胞由十几个到数十个不等,而未经农杆菌侵染转化的对照愈伤组织则呈黄白色。转化的愈伤呈现蓝色证明瞬时转化表达成功。对遗传转化抗性不定芽和分化的野生型不定芽进行GUS染色,抗性不定芽呈蓝色,而野生型芽无颜色变化,表明抗性不定芽表达了GUS基因。抗性不定芽经生根培养长成的再生植株的根和叶经GUS染色后呈蓝色,证明了农杆菌侵染紫穗槐茎段诱导的愈伤组织遗传转化体系的可行。

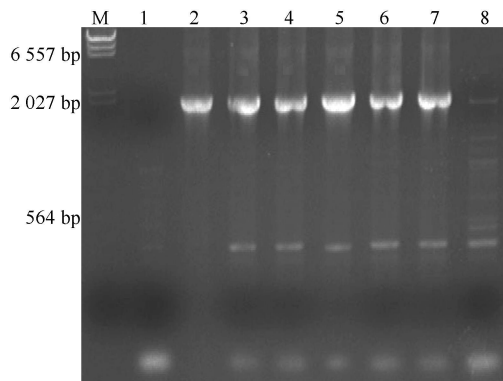


图2 转GUS基因植株的PCR检测结果
M. DNA Marker; 1. 阴性对照, 模板为非转化植株 DNA Negative control, template is DNA of shoot which was not transformed; 2. 阳性对照, 模板为质粒 DNA Positive control, template is DNA of plasmid; 3~ 8. 转化植株的 DNA DNA of transformed shoot

图2 转GUS基因植株的PCR检测结果

Fig. 2. PCR analysis of GUS gene in transgenic shoots

2.5 遗传转化紫穗槐T₀代植株的PCR和GFP表达检测结果

应用含质粒(pBI121-GFP)农杆菌工作液(OD₆₀₀=0.6)对紫穗槐茎段诱导愈伤组织侵染转化30 min,经共培养、分化筛选培养75 d,得到40 mg/L Kana选择压下的抗性不定芽,在生根培养基上培养得到抗性植株(T₀代)。采用CTAB法提取T₀代无菌苗基因组DNA,应用检测引物PCR扩增,0.8%琼脂糖凝胶电泳检测,部分PCR电泳

检测结果见图3。可以看出在2(阳性对照)、3~8泳道都扩增出大约700 bp的特异性片段,说明无菌苗基因组中整合了外源GFP基因,而且整合率达85%,此高效转化的遗传转化体系具有重复性。

对T₀代无菌苗顶芽进行GFP表达检测,应用实体显微镜(Olympus)对遗传转化得到的T₀代再生植株顶芽和野生型进行观察。将实体显微镜调节到GFP通道(488 nm),目镜观察到遗传转化的芽叶呈绿色,说明芽叶在35S启动子操纵下过量表达了整合的GFP基因,而野生型的芽叶呈红色,是叶绿体自发荧光显色。

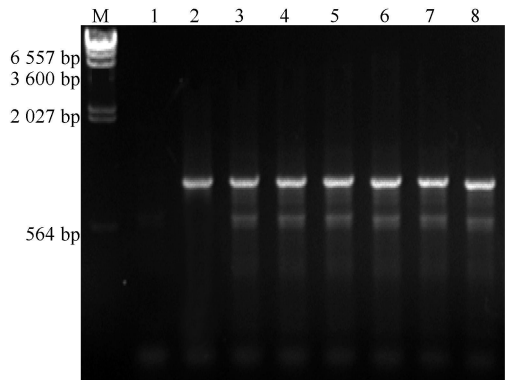


图3 转GFP基因植株的PCR检测结果
M. Marker; 1. 阴性对照, 模板为非转化植株 DNA Negative control, template is DNA of shoot which was not transformed; 2. 阳性对照, 模板为质粒 DNA Positive control, template is DNA of plasmid; 3~ 8. 模板为转化植株的组 DNA DNA of transformed shoot

图3 转GFP基因植株的PCR检测结果

Fig. 3. PCR analysis of GFP gene in transgenic shoots

3 结论

随着分子生物学的发展以及基因工程技术的进一步完善^[15],园林树木转基因育种也将得到快速发展。高效稳定的再生能力、选择性抗生素的敏感程度适当、农杆菌侵染有一定的敏感性的遗传转化受体系统是完成转基因育种的先决条件。本研究依据转化受体愈伤组织在Kana选择压下25 d抗性愈伤率与浓度的相关关系 $y = 1.0708x + 3.4105$,计算出半致死浓度为38~43 mg/L,确定40 mg/L为紫穗槐转化受体愈伤组织的Kana临界耐受浓度,即:分化筛选培养基为MS+ 6BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L + KT 2 mg/L+ Kana 40 mg/L+ Cef 500 mg/L。菌液浓度与侵染时间的正交试验表明,当菌液OD₆₀₀为

0.2~0.8 时转化效率随侵染时间的延长先增加后降低, 随侵染时间的延长愈伤组织存活下降, 从而减少了抗性不定芽的分化, 菌液侵染浓度 (OD_{600}) 为 0.8、侵染时间为 30 min 时, 转化效率最高达 17.95%。试验结果表明转化愈伤组织 GUS 瞬时转化表达成功, 建立了农杆菌侵染紫穗槐茎段诱导的愈伤组织遗传转化的体系。GFP 基因对紫穗槐遗传转化的抗性 T_0 代植株 PCR 检测结果表明转化植株中外源基因达 85%, 说明建立的农杆菌转化紫穗槐的转化体系转化率较高而且较稳定。

参考文献:

- [1] 侯宽昭. 中国种子植物科属词典[M]. 北京: 科学出版社, 1982: 261.
- [2] 赵淑梅, 张从景. 紫穗槐的综合利用及栽培技术[J]. 防护林科技, 2005, 66(3): 125-126.
- [3] DeHaan L R, Ehlke N J, Shear C C, et al. Evaluation of diversity among North American accessions of false indigo (*Amorpha fruticosa* L.) for forage and biomass[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2006, 53: 1463-1476.
- [4] Papanastasis V P, Platis P D, Dini Papanastasi O. Productivity of deciduous woody and fodder species in relation to air temperature and precipitation in a Mediterranean environment [J]. Agroforestry Systems, 1997, 37: 187-198.
- [5] 姜泓, 白丽萍, 康廷国, 等. 紫穗槐果实化学成分[J]. 中药材, 2005, 28(1): 192-201.
- [6] Jauhar P P. Cytogenetics of the *Festuca Lolium* complex. Relevance to breeding[C] // Frankel R, Grossman M, Linskens H F, et al. Monographs on theoretical and applied genetics. New York: Springer Berlin Heidelberg, 1993.
- [7] 管清杰, 罗秋香. 紫穗槐茎段愈伤组织诱导及再生体系的建立[J]. 辽宁林业科技, 2009(6): 8-11.
- [8] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusion: β glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. EMBO J, 1987, 6: 3901-3907.
- [9] 王瑾, 唐益苗, 赵昌平, 等. 转基因植物检测技术研究进展[J]. 科技导报, 2008, 26(23): 88-93.
- [10] Shimomura O, Johnson F H, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, aequorea [J]. J Cell Comp Physiol, 1962, 59: 223-239.
- [11] Jefferson R A. GUS fusions: β glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. EMBO Journal, 1987, 6: 3901-3907.
- [12] Leslie E Sieburth, Meyerowitz E M. Molecular dissection of the AG AMOUS control region shows that cis elements for spatial regulation are located intragenically[J]. Plant Cell, 1997, 9(3): 355-365.
- [13] Sambrook J, Russell D W, Huang P T, et al. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002: 461-509.
- [14] 关淑艳, 王丕武, 刘广娜, 等. 玉米淀粉分支酶 *be2a* 基因反义载体的构建及其转基因初步研究[J]. 吉林农业大学学报, 2009, 31(4): 360-363.
- [15] 杨英军, 周鹏. 转基因植物中的标记基因研究新进展[J]. 遗传, 2005, 27(3): 499-504.
- [11] 吕长平, 石雪晖, 徐艳, 等. 刺葡萄原生质体分离研究[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2005, 31(4): 392-395.
- [12] 黄枝英, 赖钟雄. 荔枝转基因胚性愈伤组织原生质体分离条件的优化[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2006, 35(3): 266-271.
- [13] 李敬阳, 张建斌, 徐碧玉, 等. 香蕉愈伤组织原生质体分离研究[J]. 分子植物育种, 2008, 6(4): 819-824.
- [14] 刘晓光, 刘孟军, 宁强, 等. 冬枣花药愈伤组织的诱导及原生质体分离[J]. 中国农学通报, 2009, 25(2): 100-104.
- [15] 张学英, 葛会波, 刘艳萌, 等. 草莓原生质体分离条件的研究[J]. 分子植物育种, 2006, 4(6): 147-152.
- [16] 王义, 杨晶, 张颖, 等. 人参原生质体的分离培养[J]. 吉林农业大学学报, 2009, 31(3): 268-272.
- [17] 赵维峰, 孙光明. 毛叶枣与冬枣原生质体分离体系的建立[J]. 热带作物学报, 2006, 27(3): 51-54.
- [18] 潘增光, 邓秀新. 苹果原生质体分离培养及植株再生[J]. 园艺学报, 2000, 27(2): 95-101.

(上接第 643 页)