

基因枪介导红叶石楠遗传转化因素分析

刘翠兰^{1,3}, 燕丽萍^{1,3}, 毛秀红^{1,3}, 孙超^{1,3}, 夏阳^{1,3,*}, 梁慧敏^{2,*}

(¹山东省林业科学研究院, 济南 250014; ²江苏农林职业技术学院, 江苏句容 212400; ³山东省林木遗传改良重点实验室, 济南 250014)

摘要: 以红叶石楠 (*Photinia fraseri*) 的胚性愈伤组织为受体材料, 利用基因枪法导入外源抗寒基因 *rd29A*, 以期建立基因枪转化红叶石楠的技术体系。结果表明, 基因枪转化红叶石楠的最佳组合条件为: 胚性愈伤组织在诱导培养基 MS + 6-BA 2.0 mg · L⁻¹ + NAA 5.0 mg · L⁻¹ + 2,4-D 0.5 mg · L⁻¹ + 琼脂 5.0 g · L⁻¹ + 蔗糖 20 g · L⁻¹ 里, 用 0.3 mol · L⁻¹ 甘露醇处理 15 ~ 16 h; 基因枪轰击时添加 12.5 mol · L⁻¹ 氯化钙 50 μL + 0.1 mol · L⁻¹ 亚精胺 50 μL, 每枪含金粉 300 μg + 质粒 DNA 3.0 μg, 轰击距离 9 cm, 轰击压力 1 100 psi, 轰击次数 1 次。经多次筛选获得了 6 株转基因植株, 转化植株经 PCR 检测和 Southern 分析, 证实了 *rd29A* 已经整合到红叶石楠基因组中。

关键词: 红叶石楠; *rd29A*; 基因枪介导; 转基因植株

中图分类号: S 68

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 11-2280-07

Studies on the Genetic Transformation Factors of *Photinia fraseri* Using Microprojectile Bombardment

LIU Cui-lan^{1,3}, YAN Li-ping^{1,3}, MAO Xiu-hong^{1,3}, SUN Chao^{1,3}, XIA Yang^{1,3,*}, and LIANG Hui-min^{2,*}

(¹Shandong Provincial Academy of Forestry, Ji'nan 250014, China; ²Jiangsu Agriculture and Forestry Profession Technology College, Jurong, Jiangsu 212400, China; ³Shandong Provincial Key Laboratory of Forest Genetic Improvement Tree, Ji'nan 250014, China)

Abstract: The study has transformed the cold resistant gene *rd29A* into the acceptor, the embryo callus derived from *Photinia fraseri* leaf, in order to establish the transformation system by using particle bombardment method. The results indicate that the optimal transformation scheme for *Photinia fraseri* leaf callus using particle bombardment method was treating embryogenic callus tissue within 0.3 mol · L⁻¹ mannitol for 15 - 16 h, in MS medium supplemented with 2.0 mg · L⁻¹ 6-benzy aminopurine, 5.0 mg · L⁻¹ naphthaleneacetic acid, 0.5 mg · L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 5.0 g · L⁻¹ agar powder and 20 g · L⁻¹ glucose. When particle bombardment, in addition of 12.5 mol · L⁻¹ CaCl₂ 50 μL and 0.1 mol · L⁻¹ spermidine 50 μL, and bombarding the samples once a time, at 9 cm bombardment distance, at 1 100 psi heli μm pressure and with the dosage of gold powder 300 μg and plasmid DNA 3.0 μg per bombardment. Six transgenic *Photinia fraseri* plants were obtained in the study and it was confirmed that the *rd29A* gene was integrated into *Photinia fraseri* genomes according to the PCR and Southern analysis of plant DNA.

收稿日期: 2013 - 05 - 02; **修回日期:** 2013 - 09 - 04

基金项目: 山东省农业良种工程项目 (鲁农良种字 (2010) 117 号); 国家科技部成果转化项目 (2006GB2C600167); 镇江市科技支撑计划项目 (NY2013028); 济南市科技明星计划项目 (20120126)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: lianghuimin0218@126.com; xiayang0506@126.com)

Key words: *Photinia fraseri*; *rd29A*; microprojectile bombardment; transgenic plants

红叶石楠是光叶石楠 (*Photinia glabra*) 和石楠 (*P. serralata*) 杂交选育的栽培品种 (张虎 等, 2003), 其叶片表面光亮, 幼叶鲜红, 观赏性强, 在中国南方地区广泛种植。为适合于全国不同地理环境栽植, 需要在增强观赏性的同时提高其耐寒性。林木上的传统育种是个非常漫长的过程, 植物基因工程的应用克服了传统育种的不足 (Woodson, 1991)。转基因技术已在多种植物上获得了成功 (夏阳 等, 2004; 梁慧敏 等, 2005; 燕丽萍 等, 2009, 2011; 刘翠兰 等, 2011; Yan et al., 2012)。有关红叶石楠的研究也仅限于组织培养方面, 再生植株体系建立和遗传转化的报道极少 (Rafael et al., 1997)。红叶石楠在根癌农杆菌介导下最终转化体极少, 因为农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 侵染红叶石楠叶片后, 农杆菌很难被抑制 (刘翠兰 等, 2010), 再加上内生菌 (*Endophytical bacteria*) 的污染, 导致红叶石楠试管苗移栽困难和死亡 (周俊辉 等, 2003)。而利用基因枪法就可以避免不同菌叠加污染的发生。

本试验中利用基因枪法将抗寒基因 *rd29A* 导入红叶石楠胚性愈伤组织, 对影响基因枪轰击转化的因素进行了探索, 为建立有效、较为完善的红叶石楠基因枪转化体系提供理论依据, 为最终培育出抗寒红叶石楠种质材料奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料与培养基

山东省林木遗传改良重点实验室提供红叶石楠组培苗。以 MS 为基本培养基。胚性愈伤组织诱导培养基 H1: MS + 6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 2,4-D $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 琼脂 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.8 ~ 6.0。预处理培养基 H2: MS + 6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 2,4-D $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 不同浓度甘露醇 (0.1 、 0.3 、 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + 琼脂 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.8 ~ 6.0。分化筛选培养基 H3: MS + 6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + KT $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IBA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + Kan $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 琼脂 $5.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.8 ~ 6.0。生根培养基 H4: $1/2\text{MS}$ + 6-BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IBA $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + Kan $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 琼脂 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.8 ~ 6.0。

1.2 质粒及其制备

质粒 pCAMBIA2300, 长度约 8.7 kb, 含有耐盐、抗寒基因 *rd29A* (约 2.1 kb) 和抗 Kan 基因 *NPTII* (约 0.7 kb) (图 1), 由山东省林木遗传改良重点实验室提供。采用碱裂解法提取质粒 DNA, 并用 PEG 沉淀法进行纯化 (Sambrook et al., 1989)。

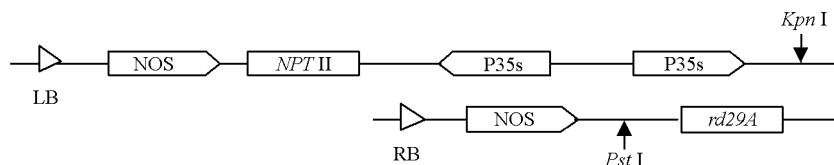


图 1 pCAMBIA2300-*rd29A* 的 T-DNA 区

Fig. 1 The T-DNA region of plasmid pCAMBIA2300-*rd29A*

1.3 基因枪介导的遗传转化

1.3.1 受体的准备

在超净工作台上剪取红叶石楠组培苗叶片, 将其叶片边缘切去, 沿叶脉横切成 1 cm^2 小块, 于

培养基 H1 上预培养。组培室内白天 25 °C、夜间 18 °C，15 d 后叶片边缘长满了致密的胚性愈伤组织，把胚性愈伤组织分成约 0.5 cm³ 小块转移培养基 H2 上，添加不同浓度 (0、0.1、0.3、0.5 mol·L⁻¹) 甘露醇进行渗透处理 15~16 h。每处理重复 3 次，每皿 30 个胚性愈伤组织块，待轰击。

1.3.2 DNA 金粉子弹的制作

称取颗粒大小为 1.0 μm 的金粉 3 mg 放于 1.5 mL 离心管中，加入 1 mL 70% 的酒精，剧烈涡旋 3~5 min，静止 15 min；14 000 r·min⁻¹ 离心 10 s，去上清液；加入 1 mL 无菌水，剧烈涡旋 1 min，静止 1 min；14 000 r·min⁻¹ 离心 10 s，去上清液，重复清洗 3 次；加入 500 μL 无菌甘油，剧烈涡旋 5 min，打破凝集，分成每管 50 μL，金粉量每管 300 μg；金粉分散后依次加入 *rd29A* 质粒 DNA 3 μL (浓度 1 000 μg·L⁻¹)，不同 DNA 沉淀剂：CaCl₂ (12.5 mol·L⁻¹) 50 μL、亚精胺 (0.1 mol·L⁻¹) 50 μL、CaCl₂ (12.5 mol·L⁻¹) 50 μL + 亚精胺 (0.1 mol·L⁻¹) 50 μL，边涡旋边加样；继续涡旋 2~3 min，静止 1 min；14 000 r·min⁻¹ 离心 2 s 后去除上清液，加 140 μL 70% 乙醇，静止沉淀，14 000 r·min⁻¹ 离心 2 s 后去除上清液；加 48 μL 无水乙醇，轻弹管壁数次，低速下涡旋 2~3 s，然后取样加在微弹载体上，即每枪含金粉 300 μg + 质粒 DNA 3.0 μg。

1.3.3 基因枪轰击

采用高速氦气基因枪 PDS-1000/He (Bio-Rad) 进行轰击。轰击参数为真空度大于 28 inHg，气体压力 1 100 psi，每皿轰击 1 次，轰击距离分别设为 6、9 和 12 cm，重复 3 次。轰击后的材料转入不加甘露醇的培养基 H₁ 上继续黑暗培养，有助于修复金粉颗粒造成的损伤，并促使胚性愈伤组织继续发育，5 d 后转入抗性培养基 H3 上，于组培室内白天 25 °C、夜间 18 °C、光强为 2 000 lx 的条件下进行分化筛选培养，在上述步骤中均设有未轰击的材料作对照。

1.4 转基因植株的分子检测方法

1.4.1 PCR 检测

取抗性植株叶片，按 CTAB 法提取总 DNA (王关林和方宏筠，1998)，未转化植株 DNA 为阴性对照，以 *rd29A* 基因的引物进行扩增。上游引物序列为 F: 5'-CGAGGATCCTCTCTTAAAGCTCCTT-3'，下游引物序列为 R: 5'-TCTAGGGTACC GTGGAAAATGGATC-3' (上海生工)，扩增片段为长度 2 100 bp。PCR 反应体系为 2× *Taq* PCR MasterMix 12.5 μL (天根生化科技有限公司)，F (10 mmol·L⁻¹) 1 μL，R (10 mmol·L⁻¹) 1 μL，模板 DNA (20 ng) 2 μL，ddH₂O 8.5 μL 总体积为 25 μL。扩增程序为：95 °C 预变性 4 min；94 °C 变性 30 s，58 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 2 min，循环 44 次，72 °C 延伸 10 min。取 8 μL 扩增产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳，GeneGenius 全自动凝胶成像分析系统观察结果并照相。

1.4.2 Southern 分析

对 PCR 阳性株进行 Southern 杂交，以 pCAMBIA2300-*rd29A* 质粒作模板进行 PCR 扩增，回收的 PCR 产物即作为 Southern 杂交的探针。Southern Blot 采用 Boehringer Mannheim 公司生产的 Dig High Prime Labeling and Detection Starter Kit I，具体操作过程依据试剂盒使用说明书，限制性内切酶选用 *EcoR* I 和 *Pst* I。

2 结果与分析

2.1 轰击前的渗透处理对转化效率的影响

在培养条件相同的情况下，添加不同浓度的甘露醇进行渗透处理 15~16 h，结果表明：随着甘

甘露醇浓度的加大, 转化率也呈增加趋势, 但增加比率与加大浓度不成正比。红叶石楠胚性愈伤组织在未进行甘露醇处理时转化率为 0, 在添加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甘露醇处理时转化率为 1.4%, 添加 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时转化率为 1.8%, 添加 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时转化率为 1.5% (图 2, A)。高渗处理浓度的加大同时也增加了胚性愈伤组织的损伤, 变得软而疏松, 加上微弹的轰击, 在筛选分化过程中容易引起细胞的死亡, 从而降低了转化效率。所以在基因枪转化时高渗处理浓度不宜太大, 添加甘露醇浓度为 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 较为合适。

2.2 DNA 沉淀剂对转化效率的影响

在制备轰击微弹时, 添加不同 DNA 沉淀剂: 氯化钙、亚精胺、氯化钙 + 亚精胺, 转化效果不同。经 60 ~ 90 d 抗性筛选统计, 添加 $12.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钙 $50 \mu\text{L}$, 转化率为 1.6%, 添加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚精胺 $50 \mu\text{L}$, 转化率为 1.7%, 添加 $12.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钙 $50 \mu\text{L}$ + $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚精胺 $50 \mu\text{L}$, 转化率为 2.1% (图 2, B)。

2.3 基因枪轰击距离对转化效率的影响

基因枪轰击时, 采用不同的轰击距离, 经过分化筛选后统计转化率。由图 2, C 可见, 当轰击距离为 6、9、12 cm 时, 转化率分别为 1.1%、1.7%、1.5%。研究表明, 真空度大于 28 inHg, 气体压力 1 100 psi, 轰击距离为 9 cm, 轰击 1 次时, 转化效率最高为 1.7%。

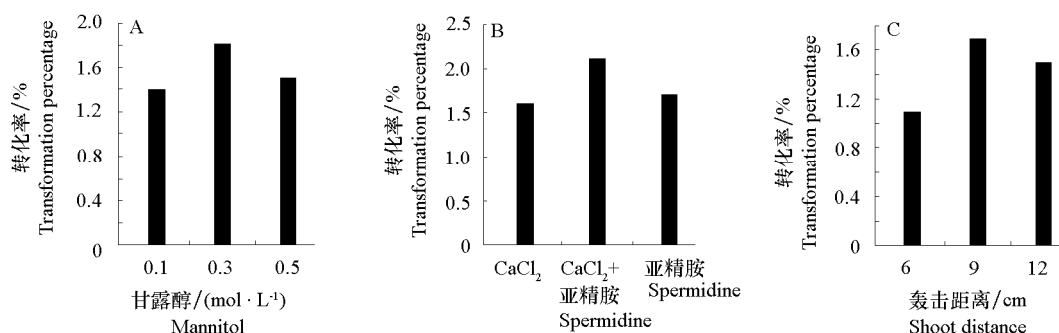


图 2 渗透处理 (A)、不同沉淀剂 (B) 和轰击距离 (C) 对转化效率的影响

Fig. 2 Effects of osmotic treatment (A), different precipitant (B), shoot distance (C) on calli transformation efficiency

2.4 转基因植株的获得

经上述试验确定最佳的基因枪转化参数为: 胚性愈伤组织在诱导培养基 H1 里, 用浓度为 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇处理 15 ~ 16 h, 基因枪轰击时添加 $12.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钙 $50 \mu\text{L}$ + $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚精胺 $50 \mu\text{L}$, 每枪含金粉 $300 \mu\text{g}$ + 质粒 DNA $3.0 \mu\text{g}$, 轰击压力 1 100 psi, 轰击距离 9 cm, 轰击次数 1 次。轰击后的胚性愈伤组织在筛选培养基上生长 6 周后, 分化成小植株。

为了进一步减少假阳性, 在含 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素抗性分化筛选培养基上再连续筛选 60 ~ 90 d。把连续筛选后的抗性苗接种到不添加 Kan 的分化培养基 H3 上, 进行快繁壮苗生长 (图 3), 当苗高 3 ~ 5 cm 时接种在含 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素生根培养基 H4 上诱导生根, 生根的植株即为转基因抗性植株。

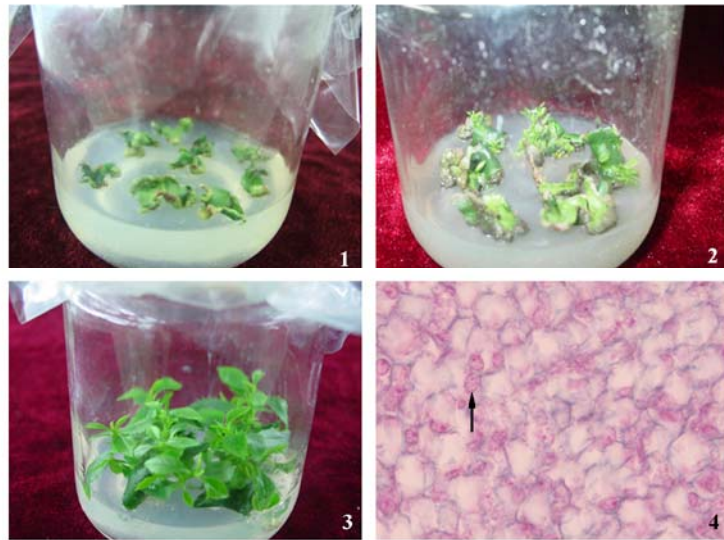


图 3 基因枪受体材料筛选与分化

1: 叶片诱导胚性愈伤组织; 2: 抗性苗筛选与分化; 3: 转基因抗性植株快繁; 4: 石蜡切片胚性细胞 (箭头所示)。

Fig. 3 Selecting and disintegrating of the acceptors

1: Somatic embryo; 2: Resistance plant; 3: Rapid propagation; 4: Embryo cell (the direction of the arrow) .

2.5 转基因植株分子鉴定

选取长势良好的抗性再生苗 9 株, 分别提取叶片基因组 DNA, 以含 *rd29A* 基因的质粒作为阳性对照, 未转化株的基因组 DNA 为阴性对照, PCR 扩增电泳检测结果见图 4。由图 4 可见, 在反复检测的 9 株抗性植株中, 有 6 株在分子量大小约 2 100 bp 处有一条与质粒扩增产物一致的特异带, 有 3 株未能扩出目的片段, 为未转化植株。对 PCR 检测为阳性的 2 号和 6 号植株进行 Southern 杂交检测 (图 5), 转化植株出现明显的杂交带, 而野生型植株 (WT) 无杂交信号, 表明外源 *rd29A* 基因已整合到红叶石楠基因组中。

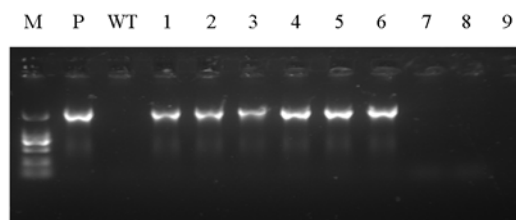


图 4 转基因植株 PCR 分析

M: DNA 分子量; P: 质粒 (阳性对照); WT: 阴性对照; 1~6: 转基因植株; 7~9: 未转化植株。

Fig. 4 PCR analysis on transgenic plants

M: DNA marker; P: Plasmid as positive control; WT: As negative control; 1-6: Transgenic plants; 7-9: Untransformed plants.

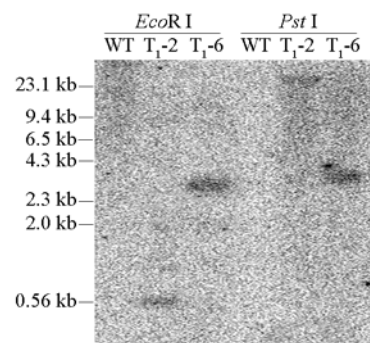


图 5 转基因植株 Southern 杂交分析

WT: 未转基因植株; T₁-2、T₁-6: 转基因植株。

Fig. 5 Southern analysis on transgenic plants

WT: Non-transgenic plant;
T₁-2 and T₁-6: Transgenic plant.

3 讨论

在影响基因枪转化的因素中, 外植体的预处理和 DNA 沉淀剂是影响转化频率的关键因素。Vain 等 (1993) 在玉米胚性细胞基因枪转化时, 用 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的渗透压在轰击前处理 4 h 和轰击后处理 16 h, 可将其 GUS 基因的稳定表达增加 6 ~ 7 倍。梁辉等 (1998) 在小麦幼胚的基因枪转化中, 也得到相同的结论。本研究在转化前利用 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇高渗处理叶片愈伤组织 15 ~ 16 h 可以获得较高的转化率, 较未处理的受体材料转化率提高 1.8 倍左右 (图 2, A)。但高渗处理时间不宜太长, 否则愈伤组织将变得松软而死亡, 不能分化成植株, 从而对转化产生较大的影响。DNA 沉淀剂可使 DNA 能更好的附着在微弹上, 有效的提高转化频率。从图 2, B 中可以看出: DNA 沉淀剂的最佳浓度组合氯化钙和亚精胺的组合使用, 转化率最高, 可能的原因是二者能联合促进质粒 DNA 对金粉微粒的包被, 如单独使用, 转化率明显降低, 其中亚精胺有学者 (王鸿鹤 等, 2000) 认为在微弹载体制备过程中容易引起金粉的凝结, 对细胞还有一定的毒害作用, 从而影响转化效率。

轰击距离和轰击压力也是转化成功与否的重要因素。轰击距离和轰击压力影响微弹速度的大小, 轰击距离越近, 轰击压力越大, 微弹对受体组织的穿透力越强, 对转化受体产生的损伤也越大。相反, 微弹对受体的穿透力越弱, 有时甚至没有穿透受体。轰击次数越多对受体的损伤也会越大, 研究者通常采用的方式是轰击次数为 2 次, 对于不同的植物材料和不同的外植体, 轰击参数也会不同 (马生健 等, 2004; 郭丽琼 等, 2005)。万丙良和张献龙 (2001) 以质粒 pBI121 作外源 DNA, 对基因枪介导转化水稻花药愈伤的有关参数进行了优化, 射程 9 cm、枪膛氦气压力 1 100 psi、真空度 3 600 ~ 3 733 Pa、轰击次数两次可提高转化效率。本试验分别对主要参数做了比较研究, 确定了基因枪转化红叶石楠愈伤组织最佳的参数组合: 胚性愈伤组织在诱导培养基 H1 里, 用浓度为 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甘露醇处理 15 ~ 16 h, 基因枪轰击时添加 $12.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钙 50 μL + $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚精胺 50 μL , 每枪含金粉 300 μg + 质粒 DNA 3.0 μg , 轰击压力 1 100 psi, 轰击距离 9 cm, 轰击次数 1 次, 获得了 6 株转化植株, 但外源基因能否稳定遗传以及在染色体上的整合位点如何, 还有待于进一步的研究。

References

- Guo Li-qiong, Yang Fei-yun, Xiong Sheng, Lin Jun-fang. 2005. The transformation system for *Volvariella volvacea* by particle bombardment. *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (5): 828 - 833. (in Chinese)
- 郭丽琼, 杨飞芸, 熊盛, 林俊芳. 2005. 草菇基因枪法遗传转化体系的建立. *园艺学报*, 32 (5): 828 - 833.
- Liang Hui, Zhao Tie-han, Li Liang-cai, Ouyang Jun-wen, Tian Wen-zhong, Jia Xu. 1998. Studies on some factors affecting transformation of wheat immature embryos by biolistic bombardment. *Acta Genetica Sinica*, 25 (5): 443 - 448. (in Chinese)
- 梁辉, 赵铁汉, 李良材, 欧阳俊文, 田文忠, 贾旭. 1998. 影响基因枪法转化小麦幼胚的几个因素的研究. *遗传学报*, 25 (5): 443 - 448.
- Liang Hui-min, Xia Yang, Sun Zhong-xu, Wang Tai-ming, Liu De-xi, Wang Guo-liang, Huang Jian, Chen Shou-yi. 2005. Establishment of genetic transformation system of *Medicago sativa* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 13 (2): 152 - 156. (in Chinese)
- 梁慧敏, 夏阳, 孙仲序, 王大明, 刘德玺, 王国良, 黄剑, 陈受宜. 2005. 根瘤农杆菌介导苜蓿遗传转化体系的建立. *农业生物技术学报*, 13 (2): 152 - 156.
- Liu Cui-lan, Xia Yang, Yan Li-ping, Mao Xiu-hong, Li Li, Pang Cai-hong, Li Shuang-yun. 2010. The studies on sensitivity of tetraploid black locust, *Sophora japonica* and *Davidson photinia* to strains of *Agrobacterium tumefaciens* and antibiotics. *Shandong Forestry Science and Technology*, 190 (5): 20 - 23. (in Chinese)
- 刘翠兰, 夏阳, 燕丽萍, 毛秀红, 李丽, 庞彩红, 李双云. 2010. 四倍体刺槐、国槐和红叶石楠对根瘤农杆菌菌株及不同抗生素敏

- 感性研究. 山东林业科技, 190 (5): 20 - 23.
- Liu Cui-lan, Yan Li-ping, Mao Xiu-hong, Liang Hui-min, Xia Yang. 2011. Breeding of new alfalfa cultivar Shanmu No. 3(SLM07) by transformation of the betaine aldehyde dehydrogenase gene. Chinese Journal of Grassland, 33 (3): 6 - 11. (in Chinese)
- 刘翠兰, 燕丽萍, 毛秀红, 梁慧敏, 夏 阳. 2011. 转 BADH 基因山苜 3 号 (SLM07) 紫花苜蓿新品种选育. 中国草地学报, 33 (3): 6 - 11.
- Ma Sheng-jian, Zeng Fu-hua, Xu Bi-yu, Lu Xiang-yang, Wu Zhi-hua. 2004. Protocol establishment of tall fescue transgene by biolistics. Acta Horticulturae Sinica, 31 (5): 691 - 693. (in Chinese)
- 马生健, 曾富华, 徐碧玉, 卢向阳, 吴志华. 2004. 基因枪介导的高羊茅基因转化体系的建立. 园艺学报, 31 (5): 691 - 693.
- Rafael Ramirez-Malagoni, Anatoli Borodanenko, Jose Luis Barrera-Guerrero, Neftali Ochoa-Alejo. 1997. Micropropagation for fraser photinia (*Photinia fraseri*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 48: 219 - 222.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Vain P, McMullen M D, Finer J J. 1993. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. Plant Cell Rep, 12 (2): 84 - 88.
- Wan Bing-liang, Zhang Xian-long. 2001. Production of transgenic rice plants resistant to bacterial blight. Journal of Huazhong Agricultural University, 20 (1): 1 - 6. (in Chinese)
- 万丙良, 张献龙. 2001. 基因枪介导转化水稻花药愈伤获得抗白叶枯病转基因植株. 华中农业大学学报, 20 (1): 1 - 6.
- Wang Guan-lin, Fang Hong-jun. 1998. Principle and technology of plant gene engineering. Beijing: Science Press: 598 - 599. (in Chinese)
- 王关林, 方宏筠. 1998. 植物基因工程原理与技术. 北京: 科学出版社: 598 - 599.
- Wang Hong-he, Huang Xia, Qiu Guo-hua, Huang Xue-lin, Tan Zhao-ping, Huang Wei-ru. 2000. Optimization of the biological and physical parameters of bombardment-mediated transformation of micro-cross section explants of banana. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatsent, 39 (2): 87 - 91. (in Chinese)
- 王鸿鹤, 黄 霞, 邱国华, 黄学林, 谭兆平, 黄伟如. 2000. 基因枪法转化香蕉薄片外植体的参数优化. 中山大学学报: 自然科学版, 39 (2): 87 - 91.
- Woodson W R. 1991. Biotechnology of floricultural crops. HortScience, 26 (8): 1029 - 1033.
- Xia Yang, Liang Hui-min, Chen Shou-yi, Sun Zhong-xu, Wang Tai-ming, Li Xiao-yu, Fu Ling-ling, Huang Jian, Yan Li-ping, Liu De-xi. 2004. Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) gene transformation of tetraploid clone of black locust mediated by *Agrobacterium*. Scientia Agricultura Sinica, 37 (8): 1208 - 1211. (in Chinese)
- 夏 阳, 梁慧敏, 陈受宜, 孙仲序, 王太明, 李小玉, 付玲玲, 黄 剑, 燕丽萍, 刘德玺. 2004. 四倍体刺槐转甜菜碱醛脱氢酶基因的研究. 中国农业科学, 37 (8): 1208 - 1211.
- Yan Li-ping, Liu Cui-lan, Liang Hui-min, Mao Xiu-hong, Wang Fei, Pang Cai-Hong, Shu Jing, Xia Yang. 2012. Physiological responses to salt stress of T2 alfalfa progenies carrying a transgene for betaine aldehyde dehydrogenase. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 108: 191 - 199.
- Yan Li-ping, Xia Yang, Liang Hui-min, Wang You-ping, Liu Cui-lan, Wang Zhen-meng, Li Li. 2009. Study on the field screening for transgenic alfalfa by smearing kanamycin on the leaves. Chinese Agricultural Science Bulletin, 25 (14): 22 - 26. (in Chinese)
- 燕丽萍, 夏 阳, 梁慧敏, 王友平, 刘翠兰, 王振猛, 李 丽. 2009. 卡那霉素叶片涂抹法田间筛选转基因苜蓿的研究. 中国农学通报, 25 (14): 22 - 26.
- Yan Li-ping, Xia Yang, Mao Xiu-hong, Liu Cui-lan, Liang Hui-min. 2012. Breeding and salt resistance evaluation of BADH transgenic alfalfa cultivar Shanmu 2. Chinese Bulletin of Botany, 46 (3): 293 - 301. (in Chinese)
- 燕丽萍, 夏 阳, 毛秀红, 刘翠兰, 梁慧敏. 2011. 转 BADH 基因紫花苜蓿山苜 2 号品种的抗盐性鉴定及系统. 植物学报, 46 (3): 293 - 301.
- Zhang Hu, Wang Run-xian, Qiu Guo-jin, Wang Kai-dong, Liu Guo-hua. 2003. Tissue culture and rapid propagation of *Photinia fraseri*. Plant Physiology Communications, 39 (1): 34. (in Chinese)
- 张 虎, 王润贤, 邱国金, 王开冻, 刘国华. 2003. 紫叶石楠的组织培养与快速繁殖. 植物生理学通讯, 39 (1): 34.
- Zhou Jun-hui, Zhou Hou-gao, Liu Hua-quan. 2003. Endophytic bacterial contamination in plant tissue culture. Guihaia, 23 (1) : 41 - 47. (in Chinese)
- 周俊辉, 周厚高, 刘花全. 2003. 植物组织培养中的内生细菌污染问题. 广西植物, 23 (1): 41 - 47.