

文章编号:1000-8551(2012)03-0444-06

以木糖异构酶基因作为选择标记的花生遗传转化

丁 霄 隋炯明 王晶珊 乔利仙

(青岛农业大学生命科学学院/山东省高校植物生物技术重点实验室, 山东 青岛 266109)

摘要:用木糖异构酶基因 *xylA* 替换掉 pCAMBIA1301 中的潮霉素磷酸转移酶基因 (hygromycin - B - phosphotransferase, *Hpt*), 构建了植物表达载体 pCAMBIA1301-*xylA*。再利用农杆菌介导法将 pCAMBIA1301-*xylA* 导入花生, 转移到添加蔗糖 (5g/L) 和不同浓度木糖 (5, 10, 20, 30g/L) 的体胚诱导及体胚萌发培养基上培养。对外植体成苗率及转基因阳性率进行统计, 结果表明, 当木糖浓度为 10g/L 时, 诱导成苗率为 15.25%, 再生植株生长健壮, 且转基因阳性率高达 77.27%, 最终确定 10g/L 为最适木糖筛选浓度。该筛选方法利用木糖作为筛选剂, 可以避免利用抗生素筛选可能造成的安全隐患, 转化效率高, 是一种安全、高效的筛选方法。

关键词:花生; 木糖异构酶基因; 农杆菌介导法; 遗传转化

THE GENETIC TRANSFORMATION OF PEANUT USING XYLOSE ISOMERASE GENE AS A SELECTION MARKER

DING Xiao SUI Jiong-Ming WANG Jing-Shan QIAO Li-xian

(College of Life Science, Qingdao Agricultural University, Key Lab of Plant Biotechnology in Universities of Shandong Province, Qingdao, Shandong 266109)

Abstract: The xylose isomerase gene (*xylA*) was cloned into pCAMBIA1301 vector from which the hygromycin-B-phospho transferase gene (*Hpt*) had been eliminated, and was designated as the recombinant plasmid pCAMBIA1301-*xylA*. It was transformed into the explants of peanut embryonic leaflet by *Agrobacterium*-mediated method. These embryonic leaflet explants were then transferred to the somatic embryogenesis induction medium and somatic embryogenesis germination medium with sucrose (5g/L) and different concentrations of xylose (5, 10, 20, 30g/L) respectively, under the condition of 25°C, 3000lx, 13h light/11k dark. The results showed that the explants regeneration rate was 15.25%, the regeneration plants were strong and the transgenic positive rate was up to 77.27% at the concentration of 10g/L of xylose, so the 10g/L of xylose was considered to be the optimal screening concentration. The selection method using xylose could avoid the use of antibiotics which might cause security risks. The new developed method was found to be practicable, highly efficient, and safe for the genetic transformation of peanut.

Key words: peanut; xylose isomerase gene(*xylA*); *Agrobacterium*-mediated method; genetic transformation

在植物基因工程中, 目前广泛使用的选择标记基因主要包括抗生素类基因和抗除草剂类基因。这些存在于转基因植物中的抗性标记基因是否对环境及人类

健康有不良影响和损害, 自转基因作物诞生以来就引起人们的广泛关注^[1,2]。因此, 利用无争议的生物安全标记基因构建表达载体逐渐成为新的研究热

收稿日期:2011-11-17 接受日期:2012-02-21

基金项目:山东省中青年科学家奖励基金(BS2009NY028), 国家自然科学基金(31101178, 30871544)

作者简介:丁 霄(1986-), 男, 山西运城人, 在读硕士生, 研究方向为植物基因工程。E-mail: 80973411@163.com

通讯作者:乔利仙(1973-), 女, 山西太谷人, 博士, 副教授, 研究方向为花生分子育种。E-mail: lxqiao73@163.com

点^[3,4]。木糖是半纤维素的主要组成部分,自然界中存在着某些利用木糖的丝状真菌、酵母菌和细菌(如大肠杆菌)等^[5]。在利用木糖的细菌中,木糖是在木糖异构酶(xylose isomerase, *xylA*)的作用下直接转化形成木酮糖,木酮糖由木酮糖激酶催化形成 5-磷酸木酮糖,然后进入磷酸戊糖途径(PPP 途径),并经糖酵解途径或在厌氧条件下产生乙醇,或在好氧条件下经 TCA 循环彻底氧化^[6,7]。1995 年 Vieille 等成功克隆并表达了 *xylA* 基因^[8]。许多植物细胞不能利用木糖,但在 *xylA* 基因的催化下能将木糖转化为木酮糖(xylulose),再经过磷酸戊糖途径分解代谢,为细胞生长所利用。在以木糖为主要碳源的培养基上,转化细胞因能利用木糖而呈现优势生长,非转化细胞则因碳源供应不足而使生长受到抑制^[9]。Haldrup 等将 *xylA* 基因分别转化到马铃薯、烟草和番茄愈伤组织后,再将愈伤组织置于木糖的培养基上进行筛选,得到能够在该培养基上正常生长的转基因植株^[10]。

本研究克隆了大肠杆菌木糖异构酶基因 *xylA*,并用 *xylA* 替换掉 pCAMBIA1301 中的抗生素选择标记基因“潮霉素磷酸转移酶基因(hygromycin-B-phosphotransferase, *Hpt*)”,构建以木糖作为筛选标记的非抗生素安全标记基因植物表达载体 pCAMBIA1301-*xylA*,将表达载体通过农杆菌介导法转化花生,探究 *xylA* 作为筛选标记基因在花生遗传转化方面应用的可行性,研究在不同木糖浓度的筛选培养基上的筛选效率,旨在建立高效的木糖筛选再生体系,为花生遗传转化研究提供一条安全、高效的筛选途径。

1 材料与方法

1.1 材料

供试花生品种花育 22 号,由青岛农业大学生命科学学院遗传研究室保存。大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 菌株、农杆菌菌种 EHA105、pCAMBIA1301 质粒均由青岛农业大学生命科学学院遗传研究室保存。克隆载体 pMD18-T 以及相关酶类购自大连 TaKaRa 宝生物公司。

1.2 培养基

体胚诱导培养基^[11]:MS-B₅(MS 无机盐 + B₅ 有机成分) + 10mg/L 2,4-D

体胚萌发培养基^[11]:MS-B₅(MS 无机盐 + B₅ 有机成分) + 4mg/L 6-BAP。

1.3 试验方法

1.3.1 *xylA* 基因片段克隆及序列分析 根据 GenBank 中大肠杆菌 *xylA* 基因(X04691)序列设计引物,在上下游引物的 5' 端均引入 *Xho* I 酶切位点(斜体部分):上游引物为 5'-CTCGAGATGGAGTTCAATATGCAAGCCTA-3',下游引物为 5'-CTCGAGATTATTTCTCGAACAGATAATGGTTT-3'。以大肠杆菌 DH-5 α 菌株基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,回收目的片段并将其克隆到 pMD18-T 载体,得到 T-*xylA* 重组质粒。重组质粒经酶切鉴定后测序,测序结果在 NCBI 网站进行 BLAST。

1.3.2 pCAMBIA1301-*xylA* 载体的构建 用 *Xho* I 分别酶切 pCAMBIA1301 和 T-*xylA* 载体,回收 pCAMBIA1301 质粒大片段和 T 载体 1.3kb 小片段,用 T₄ DNA 连接酶将 *xylA* 基因片段连接到切除 *Hpt* 基因的表达载体 pCAMBIA1301 上,得到重组质粒 pCAMBIA1301-*xylA*。

1.3.3 木糖筛选体系的建立

1.3.3.1 基本培养基和培养条件 培养基为 MS-B₅,添加不同浓度的蔗糖/木糖浓度比,0.8% 琼脂,pH 为 5.8,在 121 $^{\circ}$ C、105kPa 条件下灭菌 20min。培养条件为 25 $^{\circ}$ C、3000lx、每日光照 13h。

1.3.3.2 花生外植体对木糖的利用 将花生胚小叶外植体转移到不含蔗糖,仅以木糖(30g/L)为碳源的培养基上,观察花生胚小叶外植体在木糖培养基上的生长情况。

1.3.3.3 最低蔗糖浓度的确定 取花育 22 号成熟种子 24 粒,分为 4 组,每组 6 粒。将连同胚轴的花生胚小叶切下,在 70% 乙醇中浸泡 10~20s,0.1% 升汞中浸泡 8min,无菌水冲洗后浸泡过夜,次日将胚轴切去分离出胚小叶,然后转移到 MS-B₅ 培养基进行培养,添加蔗糖浓度分别为 5,10,20,30g/L。约 4 个月后统计成苗率。

1.3.3.4 花生遗传转化及最适木糖浓度的确定 利用农杆菌介导法^[12]将重组质粒 pCAMBIA1301-*xylA* 转化花生种胚胚小叶外植体,然后转移到添加蔗糖(5g/L)和不同浓度木糖(5,10,20,30g/L)的体胚诱导培养基上进行培养。诱导出的体胚转到添加蔗糖(5g/L)和不同浓度木糖(5,10,20,30g/L)的体胚萌发培养基上进行培养。约 4 个月后统计成苗率。

1.3.4 转基因植株的 PCR 检测 提取转基因花生植株叶片基因组 DNA,利用 *xylA* 基因引物进行 PCR 扩增检测。PCR 反应程序为:95 $^{\circ}$ C 5min;95 $^{\circ}$ C 50s,56 $^{\circ}$ C 50s,72 $^{\circ}$ C 70s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10min。

1.3.5 转基因阳性植株的嫁接移栽 当转基因植株

长到约2~3cm时,从芽丛基部切下再生小苗做接穗,将其插入到切除主茎部分的砧木中,使砧木和接穗紧密接触,然后用封口膜缠绕接口。将嫁接苗置于MS-B₅培养基中培养3~4d,然后移栽于灭菌的育苗基质中驯化3周,之后移栽田间^[13]。

2 结果与分析

2.1 *xyIA* 基因的克隆及鉴定

以大肠杆菌 DH-5 α 菌株基因组 DNA 为模板,利用 *xyIA* 基因引物进行 PCR 扩增,得到约 1.3kb 的扩增产物(图 1),与预测目标序列大小一致。回收纯化后与 T 载体连接并转化 DH-5 α 菌株,用 *Xho* I 酶切重组质粒(图 2),对酶切片段大小正确的重组质粒进行测序,结果表明该片段长 1334bp,与 NCBI 数据库公布的 *xyIA* 基因序列(X04691)完全一致。

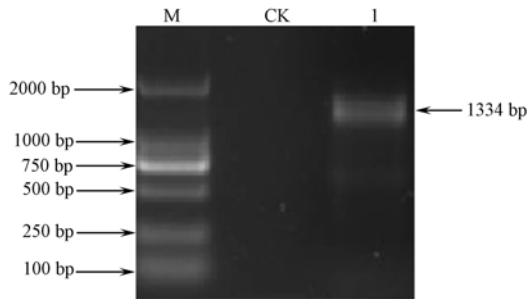


图 1 大肠杆菌 *xyIA* 基因 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR amplification product of *xyIA* gene from *E. coli*

M: DNA marker DL2000; CK: 对照;
1: 大肠杆菌 *xyIA* 基因 PCR 扩增产物
M: DNA marker DL2000; CK: control;
1: PCR amplification product of *xyIA* gene

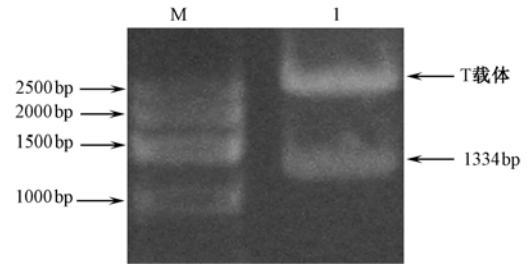


图 2 T-*xyIA* 载体 *Xho* I 酶切图谱

Fig. 2 T-*xyIA* vector digested by *Xho* I

M: DNA marker Marker-G; 1: T-*xyIA* 载体酶切结果
M: DNA marker Marker-G; 1: T-*xyIA* vector digested by *Xho* I

2.2 pCAMBIA1301-*xyIA* 表达载体的构建及鉴定

重组质粒 pCAMBIA1301-*xyIA* 重组区域如图 3 所示, pCAMBIA1301 载体上 *Hpt* 基因被 *xyIA* 基因所替换。对 pCAMBIA1301-*xyIA* 进行 *Xho* I 酶切,得到表达载体大片段和 1.3kb 的小片段(图 4)。将经酶切验证正确插入的 pCAMBIA1301-*xyIA* 重组质粒送上海生工测序,根据测序结果筛选出正向插入的表达载体,如图 3 所示。

2.3 培养基中最低蔗糖浓度的确定

将花生胚小叶外植体转移到不含蔗糖,仅以木糖(30g/L)为碳源的培养基上,花生自身无法利用木糖正常生长,在体胚诱导培养基上培养 4 周后全部褐化死亡(图 5)。

外植体在不同浓度蔗糖培养基上的生长情况有所区别(图 6):当蔗糖浓度为 10g/L 及以上浓度时,外植体可以分化成苗(图 6-A);当蔗糖浓度为 5g/L 时,外植体停留在胚性愈伤组织阶段,不能分化成苗(图 6-B)。最终确定 5g/L 为蔗糖最低临界浓度。

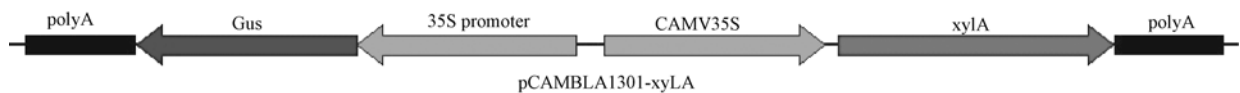


图 3 pCAMBIA1301-*xyIA* 重组区域结构示意图

Fig. 3 Diagram of the recombinant plasmid pCAMBIA1301-*xyIA*

2.4 木糖筛选浓度的确定

经农杆菌侵染转化的花生胚小叶外植体接种含蔗糖(5g/L)和不同浓度木糖(5, 10, 20, 30g/L)的筛选培养基上,培养 4 个月后,统计成苗率。结果表明:木糖浓度为 5g/L 时,诱导成苗率最高,达到 17.54%,随着木糖浓度的增加,成苗率反而下降(表 1)。木糖浓度为 10g/L 时,成苗率虽有所下降(15.25%),但植株

生长较为健壮。故以 10g/L 为最佳木糖筛选浓度。

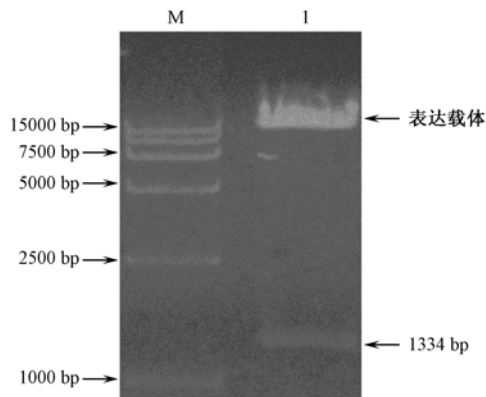
2.5 再生植株的 PCR 检测

从 10g/L 木糖浓度筛选出的再生植株中提取幼叶基因组 DNA,利用 *xyIA* 基因引物进行 PCR 扩增。由图 7 可以看出转基因植株在 10g/L 的木糖浓度下扩增出了目标条带,大小为 1.3kb,而水对照及非转基因植株均未扩增出相同的条带。表明目的基因已转入花生

表 1 不同木糖浓度下外植体的成苗率及再生苗生长情况

Table 1 Seedling rate of explants and growth of transgenic plants with different concentration of xylose

木糖浓度 xylose concentration	外植体数 number of explants	成苗数 number of seedling	成苗率 seedling rate	再生苗生长情况 growth of regenerated plants
5g/L	285	50	17.54%	生长较弱 weak growth
10g/L	282	43	15.25%	生长正常 normal growth
20g/L	272	29	10.66%	生长正常 normal growth
30g/L	302	18	5.96%	褐化死亡率高 high browning mortalit

图 4 pCambia1301-xyIA 载体的 *Xho* I 酶切图谱Fig. 4 PCAMBIA1301-xyIA vector digested by *Xho* I

M; DNA marker DL15000;

1; pCambia1301-xyIA 载体 *Xho* I 酶切结果

M; DNA marker DL15000;

1; PCAMBIA1301-xyIA vector digested by *Xho* I

中,阳性率为 77.27%。

2.6 转基因植株生长情况

通过嫁接方法将转基因再生苗移栽田间^[13],转基因植株在田间生长正常(图 8-A),开花及果针生长(图 8-B)也均表现正常。



图 5 花生胚小叶外植体在碳源为木糖(30g/L)的培养基上的生长情况

Fig. 5 Peanut cotyledon leaflet explants growth on medium added 30g/L xylose

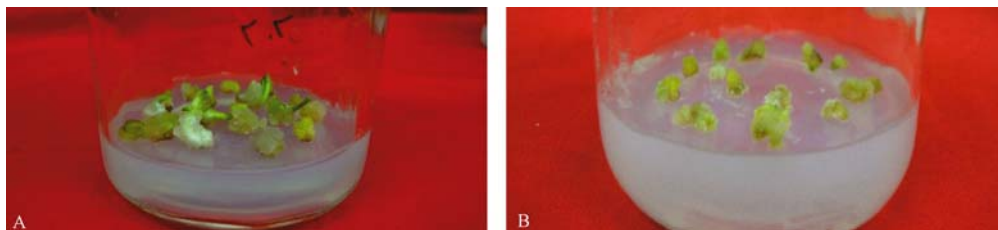


图 6 花生胚小叶外植体在添加 10g/L (A) 和 5g/L (B) 蔗糖培养基上的生长情况

Fig. 6 Peanut cotyledon leaflet explants growth on medium added 10g/L (A) and 5g/L (B) sucrose respectively

4 讨论

本研究初步建立了一套以木糖异构酶基因作为筛选标记的花生遗传转化体系,确定了筛选培养基中最低蔗糖浓度为 5g/L,最佳木糖浓度为 10g/L,培养基中木糖浓度占总糖浓度的 66.67%,这与 Haldrup 等报道的在烟草中的筛选浓度相同^[11],与玉米中报道的 50%~100% 适宜木糖筛选浓度一致^[14]。但在马铃薯中报道的适宜筛选浓度为蔗糖 7.5g/L、木糖 3.75g/L

^[11,15],表明不同作物对木糖的筛选浓度有所差别。在蔗糖浓度为 5g/L、木糖浓度为 5~30g/L 的筛选培养基中,随着木糖浓度的升高,外植体成苗率表现下降趋势。当木糖浓度为 30g/L 时,外植体褐化死亡率高,成苗率仅有 5.96%,表明高浓度木糖对植物有害,该结果同样在马铃薯中得到证实^[16]。当木糖浓度为 5g/L 时,再生率最高(17.54%),但植株生长较弱;当木糖浓度为 10g/L 时,再生率虽略有降低(15.25%),但植株生长较为健壮。本研究还检测到当木糖浓度为 5g/L 时,再生苗的转基因阳性率为 64%。表明随着木糖



图7 10g/L木糖浓度筛选的转基因花生的PCR检测

Fig. 7 PCR amplification results of transgenic plants screened by 10g/L xylose

M: DL2000 marker; 1: 水对照; 2: 非转基因植株; 3~24: 转基因植株

M: DL2000 marker; 1: water control; 2: non transgenic plants; 3~24: transgenic plants

图8 转基因再生苗田间生长(A),
开花及果针生长(B)情况Fig. 8 Growth of seedling, flower and fruit
needle of transgenic plants in the field

筛选浓度的升高,转基因阳性率表现为上升趋势。在烟草木糖筛选体系中表现同样结果,当木糖浓度从10g/L升高到20g/L时,转基因阳性率从6.7%提高到13.3%^[11]。这表明高浓度的木糖有利于转基因阳性苗的筛选,但不利于植物的生长。所以在不同的作物中需要探索既利于筛选,又不会对植物生长产生明显不良效应的蔗糖/木糖浓度比。本研究确定了花生遗传转化过程中适宜的浓度配比为5g/L蔗糖和10g/L木糖。经转化得到的转基因植株阳性率高达77.27%,嫁接移栽田间后植株生长、开花及下针结实均表现正常,因此木糖异构酶基因可以作为筛选标记基因用于花生的遗传转化。

本研究还检测到利用潮霉素筛选 pCAMBIA1301 转化植株,转基因阳性率不足7%,这表明利用木糖筛选体系得到的转基因阳性率远高于抗生素筛选体系,这与 Haldrup 等在马铃薯中报道的木糖筛选体系的转基因阳性率是抗生素筛选的9倍相吻合^[11]。并且木糖异构酶在食品工业被普遍认为是安全的,在基因遗传转化过程中也被认为是一种安全的筛选标记^[4,16]。

本研究首次在花生中建立了适宜的木糖筛选体系,相对于正常的花生胚小叶再生体系,该木糖筛选体系还存在一些不足,譬如体胚诱导率低,分化率低,以及转基因植株生长矮小缓慢,再生周期长等问题。这些都需要进一步对培养条件进行优化,比如木糖浓度的进一步细化,2,4-D以及6-BA浓度的摸索以及培养方法的进一步改进。此外还可对木糖异构酶基因植物表达载体进行改造,如增强启动子的驱动效率以提高木糖异构酶的表达活性,进而提高转基因作物利用木糖的效率。

参考文献:

- [1] 李文凤,季静,王罡,王海勇,牛宝龙. 提高转基因植物标记基因安全性策略的研究进展[J]. 中国农业科学, 2010, 43(9): 1761-1770
- [2] 赵艳. 植物转化中的安全标记基因[J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(3): 352-354
- [3] 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
- [4] 马连杰,刘海峰,王志强,代丽丽,丁新华,储昭辉. 利用 Cre/lox 特异位点重组系统获得无选择标记转 *AtMYB12* 基因的马铃薯[J]. 核农学报, 2011, 25(6): 1117-1122
- [5] Hahn-Hagerdal B, Hallborn J, Jeppsson H, et al. Pentose fermentation to alcohol[A]. In: Saddle (red.), Bioconversion of Forest and Agricultural Plant Residues[C]. Wallingford, UK: CAB International, 1993: 231-290
- [6] Dekker K, Yamagata H, Sakaguchi K, et al. Xylose (glucose) isomerase gene from the thermophile *Clostridium thermohydrosulfuricum*; cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(10): 3078-3083
- [7] Walfridsson M, Hallborn J, Penttila M, et al. Xylose-metabolizing *saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing the TKL1 and TAL1 genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61: 4184-4190

(下转第483页)

- Doritaenopsis* [J]. Plant Science, 2003, 164: 919 - 923
- [51] Naing A H, Chung J D, Park I S, Lim K B. Efficient plant regeneration of the endangered medicinal orchid, *Coelogyne cristata* using protocorm-like bodies [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2011, 33: 659 - 666
- [52] Sarathum S, Hegele M, Tantivivat S, Nanakorn M. Effect of concentration and duration of colchicine treatment on polyploidy induction in *Dendrobium scabrilingue* L. [J]. European Journal of Horticultural Science, 2010, 75 (3): 123 - 127
- [53] 柴明良, 金斗焕. 农杆菌介导的蝴蝶兰基因转化系统的建立 [J]. 园艺学报, 2004, 31 (4): 537 - 539
- [54] Zhang L, Chin D P, Mii M. *Agrobacterium* - mediated transformation of protocorm - like bodies in *Cattleya* [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2010, 103: 41 - 47
- [55] 秦自清, 赵婷, 邱婧, 林毅, 蔡永萍. 霍山石斛人工种子包埋繁殖体和萌发 [J]. 生物工程学报, 2008, 5: 803 - 809
- [56] Hao Y J, Deng X X. Stress treatments and DNA methylation affected the somatic embryogenesis of citrus callus [J]. Acta Botanica Sinica, 2002, 44 (6): 673 - 677
- [57] Quiroz-Figueroa F R, Rojas-Herrera R, Galaz-Avalos RM, Loyola-Vargas V M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 2006, 86: 285 - 301
- [58] 彭晓英, 周朴华, 蒋道松, 王晶莹, 赵黎明. 盾叶薯蓣类原球茎的细胞结构及薯蓣皂苷的组织化学定位 [J]. 电子显微学报, 2009, 28 (6): 579 - 584
- [59] Xu Kedong, Liu Qinglin, Yang Huifang, Zeng Li, Dong Lili, Liu Fengluan, Bi Ling, Ma Nan, Zhao Liangjun. Isolation and molecular characterisation of *RcSERK1*: a *Rosa canina* gene transcriptionally induced during initiation of PLBs [J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10 (20): 4011 - 4017

(责任编辑 王媛媛)



(上接第 448 页)

- [8] Vieille C, Hess J M, Kelly R M, et al. xylA cloning and sequencing and biochemical characterization of xylose isomerase from *Thermotoga neapolitana* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61 (5): 1867 - 1875
- [9] Nancy H, Zhengdao C, Adam P B. Genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64 (5): 1852 - 1859
- [10] Haldrup A, Petersen S G, Okkels F T. The xylose isomerase gene from *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* allows effective selection of transgenic plant cells using D - xylose as the selection agent [J]. Plant Molecular Biology, 1998, 37: 287 - 296
- [11] 王莉莉, 赵明霞, 乔利仙, 王晶珊, 隋炯明, 刘录祥. 快中子辐射对花生胚小叶体细胞胚胎发生的影响 [J]. 核农学报, 2011, 25 (4): 652 - 656
- [12] 张力凡, 王斌, 盖伟玲, 王晓杰, 乔利仙. 农杆菌介导的几丁质酶基因转化花生的研究 [J]. 青岛农业大学学报 (自然科学版), 2008, 25 (2): 84 - 87
- [13] 郝世俊, 隋炯明, 乔利仙, 王晓杰, 王晶珊. 花生组培苗嫁接技术的研究 [J]. 青岛农业大学学报 (自然科学版), 2010, 27 (2): 110 - 113
- [14] 郭新梅, 张晓东, 梁荣奇, 张立全, 陈耀锋. 以木糖异构酶基因为筛选标记的玉米遗传转化 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2007, 33 (6): 547 - 552
- [15] Haldrup A, Petersen S G, Okkels F T. Positive selection: a plant selection principle based on xylose isomerase, an enzyme used in the food industry [J]. Plant Cell Reports, 1998, 18: 76 - 81
- [16] Haldrup A, Noerremark M, Okkels F T. Plant selection principle based on xylose merse [J]. In Vitro Cell Dev Biol—Plant, 2001, 37: 114 - 119

(责任编辑 王媛媛)