

农杆菌介导 FT 基因转化嘎拉苹果的研究

孟玉平¹,曹秋芬¹,周 慧¹,杜建中¹,曹尚银²

(1. 山西省农业生物技术研究中心,山西 太原 030031;2. 中国农业科学院 郑州果树研究所,河南 郑州 450009)

摘要:用农杆菌介导法对苹果品种嘎拉转化 FT 基因进行了研究,建立了苹果离体叶片高效再生体系,在含 BA 5 mg/L + IAA 0.5 mg/L 的 MS 培养基上,以离体叶片远轴面(叶背面)向上,经过 14 d 的暗培养获得再生不定芽和再生植株,再生率达 97%。在转基因再生体系中,以头孢噻肟钠 500 mg/L 和卡那霉素 5 mg/L 作为脱菌培养和选择培养的条件,经过感染携带拟南芥 FT 基因的农杆菌,获得了一批转 FT 基因的植株,经 PCR 检测,目的基因已经整合到苹果基因组中。

关键词:苹果;农杆菌;FT 基因;遗传转化

中图分类号:Q785 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2008)06-0041-05

Transformation of Apple Cultivar Gala with a FT Gene Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

MENG Yu-ping¹, CAO Qiu-fen¹, ZHOU Hui¹, DU Jian-zhong¹, CAO Shang-yin²

(1. The Agri-Biotechnology Research Center of Shanxi Province, Taiyuan 030031, China;

2. Zhengzhou Fruit Research Institute, The Chinese Academy of Agriculture Sciences, Zhengzhou 450009, China)

Abstract: In this study, high-frequency regeneration system was founded in leaf blade explants of apple cultivar Gala, which were transformed by *Agrobacterium*-mediated with FT gene. During cultivating, it was important to keep the anti-cous surface of leaf not contact with the surface of MS cultivation, after 14 d dark cultivation, the regeneration buds and shoots were obtained in MS (the MS cultivation contained: 5 mg/L BA, 0.5 mg/L IAA), in this transformation system, the regeneration frequency was up to 97%. Using cefotaxime sodium (500 mg/L) and Kanamycin (5 mg/L) as the inhibitor of *Agrobacterium* overgrowth and selection pressure, the explants were infected with *Agrobacterium* that contained FT gene, then achieved FT gene transgenic plants. The results of PCR amplification suggested that FT gene has integrated into apple plants genomes.

Key words: Apple; *Agrobacterium tumefaciens*; FT gene; Genetic transformation

苹果是我国重要的经济树种,由于其生长周期长、童期长,使得利用常规杂交育种进行新品种选育和性状改良需要耗费大量的人力、物力和财力。而采用外源基因直接进行遗传转化的手段则可克服上述缺点,在向现有品种引入期望性状的同时,不会出现基因的大量重组,也避开由于童期长带来的选择周期长、成本高等问题。自从 James 等^[1]首次报道获得苹果转基因植株以来,在苹果上利用根癌农杆菌介导法进行遗传转化的研究发展迅速。与其他植物遗传转化方法相比,根癌农杆菌介导法具有转化频率高、操作简单、成本低、发生基因沉默率低、导入 DNA 片段较大等优点^[2]。而且,苹果试管苗幼嫩叶

片或茎段取材容易,易于离体再生,可将再生不定芽转化为单细胞起源纯合体等。因此,利用根癌农杆菌介导法进行遗传转化,已经成为苹果重要的一种遗传转化方法。拟南芥 FT 基因是一个决定开花时间的基因。FT 主要在叶片中表达,接收合适的光周期诱导后,FT 产物从叶片移动到顶端组织,FT 蛋白与顶端组织特异表达的 FD 基因的编码产物结合,形成一种蛋白复合体,该复合体的形成会促进开花决定基因的表达,从而最终导致植物开花^[3,4]。目前在苹果品种和砧木上利用根癌农杆菌介导法进行遗传转化的研究报道已有很多,但是转化 FT 基因的成功报道尚未见到。本研究以苹果品种嘎拉为

收稿日期:2008-05-23

基金项目:山西省科技攻关项目(021034)

作者简介:孟玉平(1955-),男,山西五台人,副研究员,主要从事果树生物技术研究。

通讯作者:曹秋芬(1962-),女,山西翼城人,研究员,主要从事分子生物学研究。

试材,选用拟南芥的 *FT* 基因,建立苹果离体叶片高效再生体系,采用农杆菌介导法进行转基因研究,并获得了苹果转 *FT* 基因的植株。

1 材料和方法

1.1 材料

植物材料为苹果 (*Malus domestica* Borkh) 皇家嘎拉品种无菌试管苗,由山西省农业生物技术研究中心保存。菌株和质粒为根癌农杆菌菌株 LBA4404,携带 pSMA₁FT 质粒,该质粒的标记基因为 *Npt*,启动子为 CaMV35S,携带拟南芥 *FT* 基因 (GenBank 登录号:AB027504) (该植物表达载体由日本农业生物系研究机构果树研究所提供)。

1.2 苹果离体叶片再生体系

外植体处理方法:选苗龄 28~35 d 的试管苗,剪取顶部幼嫩平展的叶片,每片叶垂直主脉横切 2 刀,置于分化再生培养基上。每个处理重复 3 次 (3 个培养皿),每个培养皿接种 30 个外植体。接种 45 d 后统计不定芽再生率。

增殖培养基为 MS+BA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L,pH 5.8~6.0。分化培养基设计了 10 个激素组合:A1,BA 5 mg/L+IAA 0.5 mg/L;A2,BA 5 mg/L+IAA 1.0 mg/L;A3,BA 6 mg/L+IAA 0.5 mg/L;A4,BA 6 mg/L+IAA 1.0 mg/L;B1,NAA 0.2 mg/L+BA 2 mg/L;B2,NAA 0.2 mg/L+BA 4 mg/L;B3,NAA 0.2 mg/L+BA 6 mg/L;B4,NAA 0.1 mg/L+BA 2 mg/L;B5,NAA 0.1 mg/L+BA 4 mg/L;B6,NAA 0.1 mg/L+BA 6 mg/L。

光培养和暗培养:光周期为 12 h (光)/12 h (暗),光强 2 000~3 000 lx,温度 25℃;暗培养是将培养皿置于暗箱中。设计前期暗培养 0,7,14,21 d,然后转接到新鲜的分化培养基上,移到光下培养。

叶片极性处理:将离体叶片垂直主脉横切 2 刀,分别以远轴面 (叶背面) 和近轴面 (叶正面) 向上置于分化培养基中。再生频率=再生不定芽的外植体数/接种外植体数×100%。

1.3 农杆菌介导苹果转化体系

农杆菌的培养:挑取保存的携带 *FT* 基因农杆菌菌株,接种于含卡那霉素 50 mg/L 的液体 YEB 培养基中,置于 28℃ 恒温水浴摇床,160 r/min 振荡培养过夜,转移至无菌离心管,4 000~5 000 r/min 室温离心 5 min,弃上清液,加入新的培养基悬浮菌体,28℃ 恒温水浴摇床活化培养 2~3 h,OD₆₀₀ 值达到 0.6~0.8 备用。

农杆菌对外植体的侵染:取继代培养嘎拉苹果叶

片,切成 2~4 cm 宽的叶块,放入适量的培养菌液中感染 10 min 后,用滤纸吸净表面菌液接种于培养基上。在 25℃ 黑暗条件共培养 14 d,然后移入含卡那霉素和头孢噻肟钠的选择培养基中,转移到光照条件下培养,然后每 28 d 更换一次新鲜的选择培养基。

抗生素对离体叶片再生频率影响的处理:选用以下 5 种抗生素,分别制成 100 mg/L 母液置于 -20℃ 冰箱贮存备用。叶片的选择及培养条件同上。抗生素及浓度梯度,卡那霉素 (Kanamycin):0,2,4,6,8,10 mg/L;头孢噻肟钠 (Cefotaxime):0,200,400,600,800,1 000 mg/L;头孢唑林钠 (Cefazolin):0,200,400,600,800,1 000 mg/L;羧苄青霉素 (Carbenicillin):0,200,400,600,800 mg/L;氨苄青霉素 (Ampicillin):0,200,400,600,800 mg/L。

抗生素对农杆菌抑制作用的处理:农杆菌的培养同上。取活化的农杆菌 250 μL 加入到 250 mL 已冷却到 50℃ 以下的 YEB 固体培养基中混匀倒入平板,然后用直径为 8 mm 无菌滤纸片蘸取浓度分别为 200,400,600,800 mg/L 的 4 种抗生素溶液置于平板上,28℃ 下培养 2 d 后观察抑菌圈的大小和效果。

转基因植株的 PCR 扩增鉴定:采用改良的 CTAB 法提取植物总 DNA^[5],碱裂解法提取农杆菌质粒 DNA^[6]。PCR 扩增分别以被检植物总 DNA、阴性对照植物总 DNA、阳性对照 (质粒) DNA 为模板进行 PCR 扩增反应。按试剂盒说明,建立 20 μL 的 PCR 反应体系,各试剂分别为:10×Buffer 2.0 μL;dNTP (2.5 mmol/L) 0.5 μL;上游引物 (10 pmol) 0.5 μL;下游引物 (10 pmol) 0.5 μL;Taq DNA 聚合酶 0.4 μL;模板 1.0 μL (质粒 0.01~0.1 μg,或植物 DNA 0.05~0.5 μg);加灭菌超纯水使总体积为 20 μL。

PCR 扩增程序为:94℃ 变性 5 min;94℃ 变性 45 s,55℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min,30 个循环;72℃ 延伸 10 min。扩增反应后,取各样品反应液 5 μL,用 1% 的琼脂糖在 100 V/cm 条件下电泳检测,GD8000 凝胶成像系统观测结果并照相。

两对引物用于检测转基因植株中 *FT* 基因的存在,一对是 35 S 启动子特异性引物 S1,S2,另一对是 35 S 启动子与 *FT* 基因特异性引物,引物均由上海生工合成,引物序列如下:S1 5'-GCT CCT ACA AAT GCC ATC A-3';S2 5'-GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA-3';35S 5'-GAT GTG ATA TCT CCA CTG ACG TAA G-3';FT 5'-GAC GAA CCT TCG TGG GAA CAT ACC AC-3'。

2 结果与分析

2.1 不同激素对比对离体叶片再生频率的影响

在苹果离体叶片再生不定芽试验中,BA、IAA、

NAA 是最为常用的激素。本试验以 MS 为基本培养基,添加了 10 种激素组合,结果如表 1 所示。这 10 种激素组合对皇家嘎拉离体叶片再生不定芽的诱导都有一定作用,但有差异。在 BA 与 IAA 的组合中,当 IAA 为 1.0 mg/L 和 0.5 mg/L 时,BA 为 5 mg/L 对不定芽的诱导有较高的效果(A1,A2),BA 为 6 mg/L 时对不定芽的诱导效果降低(A3,A4)。在 BA 与 NAA 的组合中,NAA 为 0.2 mg/L 和 0.1 mg/L 时,BA 2,4,6 mg/L 对皇家嘎拉离体叶片再生不定芽的诱导都不高(B1~B5),只有 B3 组合相对较高。

同时表明 IAA、NAA 对叶片的再生也有显著的影响。在 BA 浓度相同的条件下,极少量的 IAA 就对叶片再生有极显著的影响。随 IAA 浓度的增加,叶片再生呈由低到高再到低的变化。BA 浓度为 5 mg/L,IAA 浓度由 0.5 mg/L 增加到 1.0 mg/L 时,叶片的再生率由 97 % 下降到 81 %。但只有 BA 而不加 IAA 的情况下,叶片根本不能再生。在 BA 浓度相同的条件下,NAA 浓度由 0.1 mg/L 增加到 0.2 mg/L 时显著提高了叶片的再生率。因此,苹果叶片的再生需要有较高的细胞分裂素水平,且不定芽的诱导对激素要求较严,不仅表现在对某种激素浓度的要求,而且也表现在对激素间配比的要求。本试验在 BA 5 mg/L + IAA 0.5 mg/L 时,再生效率最佳,离体叶片再生频率可达 97 %,显著高于其他处理。

表 1 不同激素配比对不定芽分化频率的影响

Tab.1 Effect of hormone combination on inducing adventitious shoots			
培养基序号 Culture medium	外植体数 No. of explants	再生芽数/个 No. of adventitious shoots	再生频率/ % Regeneration frequency
A1	60	58	96.7
A2	59	48	81.4
A3	61	29	47.5
A4	56	40	71.4
B1	60	32	53.3
B2	62	45	72.6
B3	61	50	82.0
B4	62	29	46.8
B5	61	36	59.0
B6	63	46	73.0

2.2 叶片极性对不定芽分化频率的影响

为了提高不定芽的再生频率,本试验做了叶片极性的对比,结果证明,皇家嘎拉苹果离体叶片的极性对再生不定芽有显著影响。离体叶片叶背面向上比叶正面向上发生不定芽时间略早,再生频率高。叶背面向上再生频率为 93 %,叶正面向上的再生频率为 49 %。再生芽多从叶片中部及靠近叶柄部位的受伤切割面形成。另外,由于叶片分化不定芽多

数从叶背面形成,如叶片正面向上,从叶背面形成的不定芽将整个叶片顶起,导致不定芽曲折向上生长,进而影响不定芽的形成和生长。

2.3 暗培养时间对不定芽分化频率的影响

研究结果表明,前期暗培养对离体叶片再生不定芽是必要的,暗培养可极大促进不定芽的再生频率。苹果离体叶片再生效率随暗培养时间的延长,呈现由低到高再低的趋势。由表 2 可以看出,皇家嘎拉暗培养时间以 14 d 为宜,再生频率可达 91 %,显著高于其他处理。另外,如果暗培养时间过长,则离体叶片形成的愈伤组织数量,随暗培养天数的增加而增多,但转移到光下后形成的不定芽数量将减少。

表 2 暗培养时间对不定芽分化频率的影响

Tab.2 Effect of dark culture on inducing adventitious shoots			
暗培养天数/ d Days of dark culture	外植体数 No. of explants	再生芽数/个 No. of adventitious shoots	再生频率/ % Regeneration frequency
0	60	0	0.0
7	57	30	52.6
14	66	60	90.9
21	56	42	75.0

2.4 卡那霉素浓度对离体叶片再生频率的影响

用不同浓度卡那霉素(Kan)筛选抗性不定芽的试验结果表明,皇家嘎拉苹果离体叶片对 Kan 极其敏感。在不含 Kan 培养基中,外植体叶片在暗培养结束时,切口及叶柄处有黄白至淡绿色愈伤,随着培养基中 Kan 浓度的增加,叶片失绿、折皱、坏死的现象加重,叶片再生不定芽频率下降,再生不定芽的白化率升高(表 3),Kan 浓度增加到 6 mg/L 时即可完全抑制皇家嘎拉叶片再生不定芽。

表 3 Kan 浓度对离体叶片再生频率的影响

Tab.3 Effect of kanamycin concentrations on the regeneration of explants			
Kan 浓度/ (mg/L) Concentration of Kan	外植体数 No. of explants	再生芽数/个 No. of adventitious shoots	再生频率/ % Regeneration frequency
0	60	58	96.7
2	60	28	46.7
4	60	5	8.3
6	60	0	0.0
8	60	0	0.0
10	60	0	0.0

2.5 抑菌抗生素对再生频率的影响

头孢噻肟钠和头孢唑林钠是常用的抑菌抗生素,它们对农杆菌都有杀伤和抑制作用,同时对植物细胞也有一定的生物效应。试验结果表明(表 4),头孢噻肟钠在 200 ~ 500 mg/L 和头孢唑林钠在 200 ~ 600 mg/L 浓度范围内,显著促进叶片不定芽再

生,而且随着浓度的升高叶片不定芽的分化频率也升高。羧苄青霉素诱导叶片愈伤组织的形成而抑制其不定芽的再生,随着羧苄青霉素浓度的升高不定芽的再生率降低,当浓度达到 400 mg/L 时,不定芽的再生率已很低。

2.6 抗生素对农杆菌的抑制作用

头孢噻肟钠、羧苄青霉素对农杆菌 LBA4404,都

有较好的抑制作用。头孢噻肟钠在 200 mg/L 时对菌株 LBA4404 有一定的抑菌作用,在 400 mg/L 时抑菌圈最大,并且这些抑菌圈透亮,此时的抑菌效果最好;羧苄青霉素的抑菌效果和头孢噻肟钠类似,在 600 mg/L 时抑菌圈达到最大,抑菌效果最佳。而头孢唑林钠对 LBA4404 的效果不明显,基本上没有抑菌作用。氨苄青霉素的抑菌效果最差。

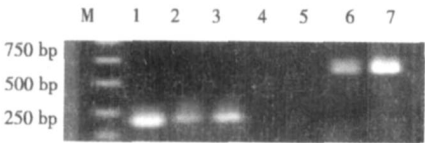
表 4 几种抗生素对离体叶片再生频率的影响

Tab. 4 Effect of several antibiotics on the regeneration of explants

抗生素 Antibiotics	浓度/ (mg/L) Concentration	外植体数 No. of explants	再生芽数/ 个 No. of adventitious shoots	再生频率/ % Regeneration frequency
CK	0	80	60	75.0
头孢噻肟钠 Cefotaxime	200	80	67	83.8
	400	80	74	92.5
	500	80	76	95.0
	600	80	53	66.3
	800	80	52	72.1
	1 000	80	47	58.8
羧苄青霉素 Carbenicillin	200	80	43	53.8
	400	80	13	16.3
	600	80	0	0.0
	800	80	0	0.0
头孢唑林钠 Cefazolin	200	80	62	77.5
	400	80	52	65.0
	500	80	60	75.0
	600	80	74	92.5
	800	80	44	55.0

2.7 农杆菌的转化结果

经农杆菌感染后,在含有 500 mg/L 头孢噻肟钠和 5 mg/L 卡那霉素的诱导培养基上培养,大约 35 d 后有抗性芽形成,随着芽的生长,抗性芽叶片仍呈绿色,非抗性芽叶片褪绿、变白。提取抗性芽 DNA,进行检测,电泳结果如图 1 所示。根据 35 S 启动子和 FT 基因的碱基序列可知:用 35 S 特异性引物 S1 和 S2 扩增片段大小应为 200 bp 左右;用 35 S 特异性引物和 FT 基因特异性引物扩增片段大小应为 700 bp 左右;图 1 结果表明,转化抗性芽的 PCR 产物与质粒的 PCR 产物的条带大小一致,对照非转化芽和空白样都没有扩增出该基因片段。由此可以初步鉴定出 FT 基因已经整合到皇家嘎拉苹果基因组中。我们从得到的 300 个抗性芽中获得了一批转化植株试管苗及其生根苗。



M. 分子量标记; 1, 2. 35 S 启动子特异性引物 S1 和 S2 的检测的阳性植株; 3. 阳性对照; 4. 空白对照; 5. 阴性植株; 6, 7. 35 S 启动子特异性引物 S1 和 FT 基因特异性引物检测的阳性植株。
M. DL2000 Marker; 1, 2. Transformed shoots by S1, S2; 3. Plasmid; 4. CK; 5. Non-transformed shoot; 6, 7. Transformed shoots by 35 S, FT.

图 1 转基因植株的 PCR 检测结果

Fig. 1 PCR analysis of transformed shoots

3 讨论与结论

采用农杆菌介导法进行遗传改良时,都要对转化体进行选择,并要求用抗生素来除去共培养后外植体上残留的农杆菌,这就需要研究植物对抗生素的敏感性和抗性水平等问题,卡那霉素作为一种有效的选择抗生素而广泛应用到苹果的遗传转化。高浓度的 Kan 不仅对非转化细胞存在极大的抑制作用,而且也极大的阻碍了转化细胞的再生,为了降低 Kan 对再生不定芽的抑制,可通过降低选择压和缩短选择时间来降低抗生素的抑制作用。James 等^[1]认为用 21 d 的选择时间合适; Yao 等^[6]采用 10 d 的选择时间获得极高的再生频率; 达克东等^[5]降低选择压,用 5 mg/L Kan 作为选择压使得转化频率大大提高。本研究的结果与以上报道基本相似,选用 5 ~ 6 mg/L 卡那霉素作为选择压,获得抗性芽的频率最高,但转化频率非常低,这还需要进一步探讨。

在植物遗传转化中常用的杀菌抗生素有头孢噻肟钠 (Cefotaxime, Cef)、头孢唑林钠 (Cefazolin)、头孢新霉素 (Mefoxin, Mef) 和羧苄青霉素 (Carbenicillin, Carb)。由于抗生素对叶片是有毒性的,因此筛选适宜浓度的抗生素对转化体是至关重要的。有研究表明,在一定浓度范围内 Cef 能促进不定芽的分化,而 Carb 则刺激愈伤的增殖,抑制不定芽的形成^[7]。关

于 Carb 刺激愈伤组织形成的原因,有研究认为,Carb 的分解产物为生长素及苯乙酸,因此,可刺激愈伤组织的形成^[8]。本试验也证明了这一点,在一定浓度范围内,头孢噻肟钠和头孢唑林钠显著促进叶片再生不定芽,而羧苄青霉素可刺激愈伤组织的形成而抑制不定芽的分化。

农杆菌的侵染能力与转化效率有直接关系,也是影响遗传转化成功与否的主要因素之一。不同植物体对农杆菌侵染的敏感性不同,不同农杆菌对植物体的侵染能力也不同,它们之间的相互作用直接影响转化效率的高低^[9-11]。目前,在苹果上应用的农杆菌菌株类型主要有章鱼碱型的 LBA4404,琥珀碱型的 EHA101,胭脂碱型的 C58 等。在转化初期如何有效抑制农杆菌的生长对于转化成功与否非常重要。试验表明,对于我们所用菌株 LBA4404 抑制细菌细胞壁合成类的羧苄青霉素和头孢噻肟钠的抑菌效果较好。

通过分析培养基中激素、暗培养、叶片放置方式对苹果品种嘎拉叶片再生的影响,确立了苹果离体叶片高效再生体系,在含 BA 5 mg/L + IAA 0.5 mg/L 的 MS 培养基上,以离体叶片远轴面(叶背面)向上,经过 14 d 的暗培养获得再生不定芽和再生植株,再生率达 97%。在转基因再生体系中,头孢噻肟钠、羧苄青霉素对农杆菌 LBA4404 都有较好的抑制作用,头孢噻肟钠在 400 mg/L 时抑菌效果最好,羧苄青霉素在 600 mg/L 时抑菌效果最佳,而头孢唑林钠对 LBA4404 的抑菌作用甚微,羧苄青霉素的抑菌效果最差。作为选择压的卡那霉素在 5 mg/L 时即可完全抑制苹果叶片再生不定芽。头孢噻肟钠 500 mg/L 叶片再生频率最高。因此,本研究在皇家嘎拉苹果转化体系中,用 500 mg/L 的头孢噻肟钠和 5

mg/L 卡那霉素,作为脱菌培养和选择培养的条件,经过感染携带拟南芥 FT 基因的农杆菌,获得了一批转 FT 基因的植株,PCR 检测目的基因已经整合到苹果基因组中,并且转基因植株现在已经生根。

参考文献:

- [1] James D J, Passey A J, Derek D J. Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector [J]. Plant Cell Rep, 1989, 7: 658 - 661.
- [2] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 194 - 317.
- [3] Laurent C, Coral V, Seonghof J, et al. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis* [J]. Science, 2007, 316(5827): 1030 - 1033.
- [4] Mitsutomo A, Yasushi K, Sumiko Y, et al. A bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex [J]. Science, 2005, 309(5737): 1052 - 1056.
- [5] 达克东, 崔德才, 张松, 等. 超强表达介导豇豆胰蛋白酶抑制剂基因 (*CpTI*) 转化苹果的研究 [J]. 园艺学报, 2001, 28(1): 57 - 58.
- [6] Yao J L, Cohem D. Atkinson of transgenic plant from the commercial apple cultivar Royal Gala [J]. Plant Cell Rep, 1995, 14: 407 - 412.
- [7] 秦玲, 李明. 根癌农杆菌介导苹果遗传转化研究进展 [J]. 西北农林科技大学学报, 2002, 30(4): 135 - 140.
- [8] 刘丹, 章镇. 农杆菌介导苹果遗传转化研究进展 [J]. 长江果树, 2003, 3: 33 - 39.
- [9] 周小梅, 李君剑. 抗生素对农杆菌的抑制和对油菜外植体分化的影响 [J]. 西北植物学报, 2005, 25(1): 52 - 56.
- [10] 郭蓉, 李霞, 张金文, 等. 农杆菌介导胡萝卜遗传转化体系的建立与转基因胡萝卜栽培试验 [J]. 华北农学报, 2006, 21(6): 6 - 10.
- [11] 王玉珍, 罗景兰, 徐进, 等. 农杆菌介导的水稻遗传转化与植株再生 [J]. 华北农学报, 2008, 20(1): 8 - 11.