

杨杰, 杨子仪, 徐亚莉, 等. 美洲商陆遗传转化体系的构建[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(6): 49–52.

美洲商陆遗传转化体系的构建

杨杰¹, 杨子仪¹, 徐亚莉¹, 张源¹, 郑铁松², 陆长梅¹

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏南京 210023; 2. 南京师范大学金陵女子学院, 江苏南京 210024)

摘要:在已构建高频再生体系的基础上, 研究构建美洲商陆遗传转化体系的条件。结果表明: 250 mg/L 头孢霉素既能有效抑制根癌农杆菌的增殖, 且对不定芽分化影响相对较小; 美洲商陆对潮霉素高度敏感。美洲商陆的遗传转化过程为: 无菌苗上部经增粗培养后, 取茎节在不定芽分化培养基 (ABDM) 中预培养 5 d, 在 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.6 的菌液中感染 3~5 min, 再转接到 ABDM 中黑暗、26 ℃ 共培养 3 d; 然后外植体经冲洗后转接至含 250 mg/L 头孢霉素的 ABDM 中进行脱菌、分化以及不定芽伸长培养; 待不定芽长至 2 cm 以上时, 截取并转接到含 3 mg/L 潮霉素的生根培养基中进行抗性芽筛选, 筛选出的抗潮霉素植株再经 GFP 显色、PCR、分子杂交等方法进一步阳性确认。

关键词:美洲商陆; 遗传转化体系; 外植体; 不定芽; 抗生素; 筛选

中图分类号: Q945.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)06-0049-03

美洲商陆 (*Phytolacca americana* Linn.) 为商陆科商陆属多年生草本植物。我国很早就将美洲商陆应用于医药、病虫害防治、食品着色等领域。近年来, 由于发现以美洲商陆为代表的商陆属植物具有抗病毒^[1]、对重金属尤其是 Mn 的超富集^[2]等作用, 更激发了人们认识和开发利用美洲商陆资源的积极性。但野生美洲商陆具有生长周期较长、有毒等特点^[3], 使美洲商陆资源没有得到合理开发利用。建立一整套美洲商陆再生体系和遗传转化体系, 一方面有利于美洲商陆多种重要次生代谢产物的工业化生产, 并可从美洲商陆体内克隆药物基因提供植物材料; 另一方面可为研究美洲商陆的富集机理、代谢途径以及美洲商陆重金属富集相关功能基因奠定基础, 并对进一步开发利用美洲商陆具有重要意义。高效稳定的再生体系是进行遗传转化的基础和保证, 但良好的再生体系不一定能建立良好的转化体系。这是由于在植物遗传转化过程中, 外植体受到根癌农杆菌、抗生素等诸多影响, 且基因转化位点不一定是不定芽再生位点。因此要获得比较理想的转化系统, 需要在高效稳定再生体系的基础上, 研究影响转化效率的各种因素, 如抗生素种类与浓度、菌液浓度、感染时间、预培养时间、共培养时间、筛选时期等, 找到适合外植体遗传转化及再生的环境条件。本研究在已构建的美洲商陆高频再生体系基础上, 筛选适合根癌农杆菌介导美洲商陆外植体再生的环境条件, 旨在建立美洲商陆的遗传转化体系。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料: 美洲商陆种子于 2010 年 9 月底采自河南省卢

氏山区。

菌株: 含双元表达载体的根癌农杆菌 EHA105 (CMA-BI1301-GFP), 内含卡那霉素、潮霉素抗性筛选基因和 GFP 报告基因。

试剂: 6-BA、NAA、TDZ、卡那霉素 (Kan)、头孢霉素 (Cef)、青霉素钠 (P. G)、氨苄青霉素 (Amp)、潮霉素 (Hyg)。

培养基。无菌苗培养基: MS; 上茎节增粗诱导培养基: MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA; 不定芽分化培养基 (ABDM): MS + 0.02 mg/L TDZ + 3.0 mg/L 6-BA + 0.01 mg/L NAA; 不定芽伸长培养基: MS + 0.02 mg/L TDZ + 3.0 mg/L 6-BA + 0.01 mg/L NAA + 2.0 mg/L GA₃; 生根培养基: 1/2MS + 0.4 mg/L NAA; 脱菌及生根筛选等培养基是在相应培养基中加入一定浓度抗生素。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗准备与外植体获取 取成熟饱满的美洲商陆种子, 用浓硫酸处理 12 min 后, 再用无菌水冲洗 6~8 次, 接种到 MS 培养基中, 于 (26 ± 1) ℃ 下暗培养 3 d, 待种子萌发后, 置于光强 2 000 lx、光暗周期 14 h/d 下培养。待 2~3 周后长成约 4 cm 高的六叶期无菌苗时, 取无菌苗节间较短的上部接于茎节增粗诱导培养基上培养 15 d, 待节间稍长且茎秆较粗壮时, 再取 5~8 mm 的茎节小段作为外植体备用。

1.2.2 抗生素筛选

1.2.2.1 抑菌剂筛选 参照方宏筠等的方法^[4], 采用滤纸片抑菌圈法从青霉素钠、氨苄青霉素、头孢霉素中筛选能够抑制根癌农杆菌生长的最佳抑菌剂。

1.2.2.2 头孢霉素抑菌浓度和潮霉素筛选浓度选择 在 不定芽分化培养基中分别加入头孢霉素至最终浓度为 0、100、200、250、300、500 mg/L, 或分别加入潮霉素至最终浓度为 0、2.5、5、7.5、10、15 mg/L。接种美洲商陆带腋芽茎节, 于光强 2 000 lx、光周期 14 h/d、(26 ± 1) ℃ 下培养 20 d 后, 观察外植体不定芽分化情况, 确定头孢霉素的最佳抑菌浓度和潮霉素的 最佳筛选浓度。

1.2.3 遗传转化

1.2.3.1 根癌农杆菌的工程菌液制备 取含 50 mg/L 卡那

收稿日期: 2012-12-06

基金项目: 国家“863”计划 (编号: 2007AA021404); 国家基础科学人才培养基金 (编号: J1103507)。

作者简介: 杨杰 (1992—), 男, 江苏海安人, 主要从事植物生物技术研究。

通信作者: 陆长梅, 主要从事植物资源与环境研究。E-mail: luchangmei@njnu.edu.cn。

霉素的 YEB 培养基中振荡培养至 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.6 的菌液,经离心、YEB 液体培养基(无抗生素)重悬并稀释至 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.6 后,加乙酰丁香酮(AS)至最终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.2.3.2 预培养时间的确定 取经诱导增粗的美洲商陆茎节,在不定芽分化培养基中分别预培养 0、1、3、5、7 d 后,取出茎节,置于工程菌液中侵染 5 min,转接于不定芽分化培养基中黑暗共培养 3 d 后,再转入到含 250 mg/L 头孢霉素的 不定芽分化培养基中,30 d 后统计不定芽分化率,确定最适预培养时间。

1.2.3.3 工程菌液浓度和侵染时间的确定 取经预培养的茎节,分别在 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.2、0.4、0.6、0.8 的菌液中分别浸泡 1、3、5、8、10、12 min,期间不断搅拌、振荡,再用无菌滤纸吸掉外植体表面多余菌液,先接种到不含抗生素的不定芽分化培养基上黑暗共培养 1、3、5、7 d 后,用无菌水冲洗 2~3 次,然后用无菌滤纸吸去外植体上多余水分,移至含 250 mg/L 头孢霉素的 分化培养基中进行脱菌和分化培养,30 d 后统计不定芽再生情况,确定最佳侵染时间。

1.2.3.4 共培养时间的确定 将经预培养的茎节在菌液中浸泡 5 min 后取出,吸干多余菌液,再接种到不定芽分化培养基上,26 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下分别共培养 1、2、3、5、7 d,再洗涤并转到含 250 mg/L 头孢霉素的 分化培养基中正常光暗培养,30 d 后统计不定芽再生情况,确定最佳共培养时间。

1.2.3.5 不定芽筛选时期的确定 参照吴丽爽的方法^[5],在 3 个时期对转基因不定芽进行筛选:一是前期选择,将共培养后的外植体直接转入同时含头孢霉素、潮霉素的筛选培养基中诱导转化芽再生;二是中期选择,将共培养后的外植体先在含头孢霉素的 分化培养基中分别培养 3、5、7、14、21 d 后,再转入含潮霉素的 筛选培养基中培养;三是后期选择,将共培养后的外植体接种在只含头孢霉素的 培养基中,直到分化出不定芽;然后将不定芽转移到含头孢霉素的 不定芽伸长培养基上伸长培养至 2.0 cm 左右后,再转到含潮霉素的 生根培养基中进行筛选。

2 结果与分析

2.1 抑菌剂种类和浓度筛选

不同抑菌剂对根癌农杆菌的抑制作用不同^[6-7]。表 1 显示,在 100~500 mg/L 青霉素钠处理下根癌农杆菌未受明显影响,而 200~500 mg/L 氨基青霉素、头孢霉素处理下,抑菌圈直径随处理浓度的升高而增大,表明氨基青霉素、头孢霉素可有效抑制根癌农杆菌的生长。由于头孢霉素与生长素 2,4-D、NAA 等有相似的化学结构,能促进愈伤组织的分化与生长^[8],因此本研究初步选用 200~500 mg/L 头孢霉素为根癌农杆菌抑菌剂。

表 1 不同抑菌剂处理下根癌农杆菌的抑菌圈直径			
浓度 (mg/L)	抑菌圈直径(mm)		
	青霉素钠	氨基青霉素	头孢霉素
0	0	0	0
100	0	0	0
200	0	10~12	10~12
350	0	12~15	12~15
500	0	≥15	≥15

2.2 不同浓度头孢霉素对不定芽分化的影响

头孢霉素可以有效抑制根癌农杆菌,但对不同外植体的分化存在不同影响^[7,9-10]。表 2 显示,0~200 mg/L 头孢霉素处理对美洲商陆不定芽分化没有影响,而更高浓度的头孢霉素能使出芽率下降^[11]。为了既有效抑制根癌农杆菌的生长,又不影响不定芽分化,结合表 1,选择 250 mg/L 头孢霉素作为后续试验中抑制根癌农杆菌生长的浓度。

表 2 不同浓度头孢霉素对不定芽分化的影响			
浓度 (mg/L)	外植体数 (个)	分化外植体数 (个)	出芽率 (%)
0	24	24	100
100	24	24	100
200	24	24	100
250	24	22	91.7
350	24	22	91.7
500	24	21	87.5

2.3 不同浓度潮霉素对外植体生长的影响

潮霉素是转基因植物研究中被广泛应用的筛选剂^[11-12],也是本研究所用工程菌的抗性筛选标记。将美洲商陆茎节在不同潮霉素浓度的分化培养基中培养 20 d 后发现(表 3),2.5 mg/L 潮霉素处理下,虽然外植体能生长,但绿色芽点很少;5.0 mg/L 潮霉素处理下,37.5% 外植体死亡,且部分外植体失水干枯;高于 5 mg/L 潮霉素处理下,外植体全部白化死亡。表明美洲商陆对潮霉素高度敏感,低浓度潮霉素就能抑制不定芽再生。

表 3 不同浓度潮霉素对外植体生长的影响				
浓度 (mg/L)	外植体数 (个)	外植体死亡数(个)	死亡率 (%)	外植体生长状态
0	16	0	0	腋芽处有少量绿色芽点
2.5	16	0	0	膨大,有少量愈伤组织生成
5.0	16	6	37.5	部分干枯,有少量愈伤组织生成
7.5	16	16	100	白化、死亡
10.0	16	16	100	白化、死亡
15.0	16	16	100	白化、死亡

2.4 预培养时间的确定

离体器官在培养初期均有一个细胞分裂不活跃的停滞期,在这一时期细胞接受外源 DNA 能力较差^[13];而预培养时间过长又会使外植体切面细胞开始脱分化,不利于 T-DNA 的转移。美洲商陆茎节经不同预培养时间后,经过正常菌液侵染、共培养、分化培养后发现(表 4):预培养 1 d 或不经预培养的外植体,经根癌农杆菌侵染后,外植体全部褐化死亡;预培养 3 d 处理的外植体褐化率显著降低,外植体部分分化;预培养时间达到 5~7 d 时,外植体不再褐化,且不定芽分化

表 4 不同预培养时间对不定芽分化的影响					
预培养时间 (d)	外植体数 (个)	外植体分化数(个)	外植体褐化数(个)	分化率 (%)	褐化率 (%)
0	72	0	72	0	100
1	72	0	72	0	100
3	72	14	5	19.4	6.9
5	72	28	0	33.8	0
7	72	33	0	45.8	0

率逐步较高。考虑到预培养时间延长会导致后续假阳性植株机率增大,因此选择预培养时间为 5 d。

2.5 菌液侵染浓度的确定

在农杆菌介导的遗传转化中,菌液浓度被认为是转化成败的关键问题之一,只有旺盛生长期的根癌农杆菌才对外植体有良好的侵染作用^[14]。常用根癌农杆菌菌液浓度在 0.3~0.8($D_{600\text{ nm}}$)。本研究发现,在外植体与不同菌液浸染 5 min 后,再于黑暗中共培养,随着菌液浓度的升高,外植体表面出现零星菌落时间提前,当菌液浓度为 0.8($D_{600\text{ nm}}$)时,2 d 后即有零星菌斑出现,所有处理在 7 d 时整个外植体表面均布满菌落;当菌液浓度为 0.6($D_{600\text{ nm}}$)的处理共培养 3 d 时外植体上有零星菌落,但培养基上无菌落。鉴于后续试验中

以共培养 3 d 为佳,因此后续试验中将以浓度为 0.6($D_{600\text{ nm}}$)的菌液作为侵染菌液。

2.6 侵染时间的确定

侵染时间过短不利于菌体在伤口附着并进入外植体^[15],而侵染时间过长又会导致菌体过度繁殖,不仅增加后续除菌难度,也增加对外植体的毒害,一般侵染时间控制在数 s 至数 min 内^[4]。表 5 显示,美洲商陆外植体在经不同时间菌液侵染处理,并培养 1 d 后,各处理的外植体外观没有明显变化;随着侵染时间和培养时间延长,外植体和培养基表面菌体量增加,外植体逐渐腐化甚至死亡。参考有关文献和后续试验结果,将共培养时间确定为 3 d,初步确定侵染时间为 1~5 min。

表 5 不同侵染时间对外植体的影响

侵染时间 (min)	外植体状态				
	培养 1 d	培养 2 d	培养 3 d	培养 5 d	培养 7 d
0~1	无变化	基本无变化	切口处有少量菌体	表面附有菌体	外植体周围培养基上菌体增多
1~3	无变化	切口处有少量菌体	表面附有菌体	与外植体接触的培养基上有少量菌体	培养基上有大量菌体
3~5	无变化	切口处有少量菌体	与外植体接触的培养基上有少量菌体	外植体周围培养基上菌体增多	外植体腐化变软
5~8	无变化	表面附有菌体	外植体周围培养基上菌体增多	培养基上有大量菌体	外植体腐化变软
8~10	无变化	表面附有菌体	培养基上有大量菌体	外植体腐化变软	外植体死亡

外植体表面的菌量不仅会影响外植体生长,还可能会影响不定芽再生。经不同侵染时间处理后的美洲商陆外植体共培养 3 d 后,继续在含头孢霉素的芽分化培养基上分化,结果见表 6。随着侵染时间的延长,不定芽分化率逐步下降。综合考虑表 5、表 6、假阳性率和外植体死亡率,确定根癌农杆菌侵染美洲商陆外植体时间为 3~5 min。

表 6 侵染时间对外植体不定芽分化率的影响

侵染时间 (min)	外植体数 (个)	分化外植 体数(个)	分化率 (%)	外植体状态
0~1	70	66	94.3	大量愈伤组织,有较多绿色芽点
1~3	70	59	84.3	大量愈伤组织,有较多绿色芽点
3~5	70	31	44.3	切口处有少量愈伤组织,绿色芽点数量减少
5~8	35	3	8.6	多数外植体褐化死亡
8~10	35	0	0	全部外植体褐化死亡

2.7 共培养时间的确定

根癌农杆菌在共培养阶段完成 T-DNA 的转移及整合过程,因此共培养阶段对最终的基因转化效率至关重要^[16],而共培养时间是可以调控的主要因素^[17]。一般认为,共培养时间必须大于 16 h,但共培养时间过长又会因农杆菌生长过盛而使外植体毒害而亡。表 7 显示,经 5 min 侵染的外植体共培养 1~2 d 后,外植体边缘菌落量不丰富;后续分化培养发现,不定芽分化早(7~10 d)且分化率高;共培养 3 d 时,外植体周围培养基有少量菌落,不定芽分化时间延迟至 15 d,分化率降低至 44.4%;共培养超过 5 d 时,外植体边缘菌落生长旺盛,不定芽分化率急剧降低,绝大多数外植体褐化死亡。考虑到既要给予充足时间供 T-DNA 转化,以降低假阳性率,又要

保证外植体存活率和分化率,综合考虑表 7 和相关文献,在后续转化试验中选择 3 d 作为共培养时间。

表 7 培养时间对外植体不定芽分化率的影响

共培养时 间(d)	外植体数 (个)	分化外植 体数(个)	死亡外植 体数(个)	分化率 (%)	死亡率 (%)	最早出芽 时间(d)
0	36	36	0	100	0	7
1	36	33	1	91.6	2.8	7
2	36	30	3	83.3	8.3	10
3	36	16	5	44.4	13.9	15
5	36	2	29	5.6	80.6	15
7	36	0	36	0	100	-

2.8 筛选时期对美洲商陆转化效率的影响

表 8 显示,不论是在前期(不顶芽诱导前,共培养结束时),还是中期(不顶芽诱导时,分化培养基中培养不同时间后)加入潮霉素,虽然中期 14、21 d 处理有少量芽点出现,但所有外植体均开始在切口处褐化腐烂,进而整个外植体腐烂,不定芽也褐化死亡^[18];如果在不定芽分化过程中不加潮霉素,在外植体培养一段时间后,有 44% 外植体能够存活,并产

表 8 不同筛选时期对美洲商陆转化效率的影响

筛选时期	培养时间 (d)	接种外植 体数(个)	分化外植 体数(个)	筛选 30 d 后 外植体状态
前期	0	36	0	褐化死亡
	3	70	0	褐化死亡
	5	70	0	褐化死亡
	7	70	0	褐化死亡
	14	70	2	褐化死亡
	21	70	2	褐化死亡
无选择压力	30	70	31	大量绿色芽点出现

生大量芽点。因此对于美洲商陆而言,如果选用潮霉素作为抗性筛选标志,只能待不定芽长出后对不定芽进行后期筛选。

2.9 生根筛选

当美洲商陆不定芽长至 2 cm 时,截取并分别接种于含不同浓度潮霉素的生根培养基(1/2MS + 0.4 mg/L NAA)中进行生根筛选。由表 9 可知,1.2 mg/L 潮霉素处理下,分别有 22%、5% 的不定根再生率,比以往报道的转基因效率大得多,推测其中假阳性率较高;当潮霉素浓度大于 4 mg/L 时,未见不定根再生,可能是因为潮霉素浓度过高,抑制了不定根再生,也可能是因为供筛选的不定芽均未能成功导入基因所致。为减少假阳性比率,并成功筛选出抗性芽,可以利用 3 mg/L 潮霉素先筛选出一定抗性植株,再经 GFP 显色、PCR 或分子杂交等方法进一步鉴定。

表 9 不同浓度潮霉素对美洲商陆不定芽生根的影响

浓度 (mg/L)	接种数 (个)	生根数 (个)	最早生根 时间(d)	生根率 (%)	根系特征
0	100	91	5	91	根长,健壮,多须根
1	100	22	7	22	根健壮,须根较少
2	100	5	8	5	根细长,稀疏
3	100	1	9	1	根长,一定量须根
4	100	0	—	0	—
5	100	0	—	0	—

3 结论

为建立美洲商陆的遗传转化体系,本研究在已建成的美洲商陆高频再生体系的基础上,探讨了抗生素种类与浓度、预培养时间、菌液浓度、侵染时间、共培养时间、筛选时期等条件对美洲商陆遗传转化的影响,建立了适合于根癌农杆菌[EHA105(CMABI1301-GFP)]介导的美洲商陆转化体系。

结果表明,头孢霉素既能有效抑制根癌农杆菌的增殖,又对美洲商陆不定芽分化率影响较小,有效浓度为 250 mg/L。美洲商陆对潮霉素高度敏感,低浓度潮霉素就能抑制不定芽再生。

美洲商陆无菌苗上部经增粗培养后,取茎节在不定芽分化培养基(ABDM)中预培养 5 d,会使后续侵染菌液后外植体的存活率和分化率维持在一定水平。

工程菌菌液最佳浓度为 0.6($D_{600\text{nm}}$),侵染经预培养 5 d 的外植体 3~5 min 后,吸干外植体上的多余菌液,并转接到 ABDM(无抗生素)中在黑暗中 26 ℃ 共培养 3 d。该条件既能保证工程菌侵染能力较强,又能保证适量工程菌有足够侵染时间,同时还能避免工程菌过量或侵染和共培养时间过长伤害外植体。

共培养结束后,通过无菌水冲洗、滤纸吸去多余水分以及将外植体转移至含 250 mg/L 头孢霉素的 ABDM 中进行脱菌和分化培养,既可以有效地抑制培养基中菌体生长,又可以将在不定芽分化率保持在一定水平。

由于美洲商陆对潮霉素的高度敏感性,早期和中期筛选外植体均死亡,只能对抗性芽进行后期筛选,即在不定芽生根阶段,采用 1/2MS + 0.4 mg/L NAA + 3 mg/L 潮霉素进行抗性筛选。筛选出抗潮霉素植株,可以再经 GFP 显色、PCR、分子杂交等方法进一步阳性确认。

参考文献:

- [1] 陈国菊,石 丽,雷建军,等. 中国商陆抗病毒蛋白基因的克隆及其转化辣椒[J]. 园艺学报,2008(6):847-852.
- [2] 薛生国,陈英旭,骆永明,等. 商陆(*Phytolacca acinosa* Roxb.)的锰耐性和超积累[J]. 土壤学报,2004(6):889-895.
- [3] 刘 庆,刘慧君. 商陆的应用及毒副作用[J]. 新疆中医药,2002(1):40-42.
- [4] 方宏筠,王关林. 植物基因工程[M]. 2 版. 北京:科学出版社,2002.
- [5] 吴丽爽. 三种水草植株再生及遗传转化研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨师范大学,2009.
- [6] 杨美株. 根癌农杆菌介导的植物基因转化[J]. 植物生理学报,1998,24(3):258-271.
- [7] 郑 进,康 薇,洪华珠. 抗生素在农杆菌介导植物转基因中的应用[J]. 林业科技开发,2006(3):8-11.
- [8] Lin J J, Assad - Garcia N, Jonathan K. Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissue by *Agrobacterium tumefaciens* cells[J]. Plant Science, 1995, 109(2):171-177.
- [9] Holford P, Newbury H J. The effects of antibiotics and their breakdown products on the in vitro growth of *Antirrhinum majus* [J]. Plant Cell Reports, 1992, 11(2):93-96.
- [10] Ling H Q, Kriseleit D, Ganai M W. Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium* - mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) [J]. Plant Cell Reports, 1998, 17(11):843-847.
- [11] 陈 珍,朱 诚. 农杆菌介导的番茄遗传转化体系优化研究[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2008,34(6):615-620.
- [12] 黄天带,李 哲,孙爱花,等. 抗生素对巴西橡胶树花药愈伤组织生长与分化的影响[J]. 热带作物学报,2008,29(6):673-677.
- [13] 孙 磊. 利用双 T-DNA 载体系统获得无选择标记转基因菊花[D]. 北京:北京林业大学,2009.
- [14] 张 宁. 农杆菌介导的花椰菜遗传转化体系构建与应用研究[D]. 福州:福建农林大学,2009.
- [15] 郝霞霞,朱 祯,朱之悌. 杨树基因工程进展[J]. 生物工程进展,2000,20(4):6-10.
- [16] 丁 焱. DFL 基因在甘菊中的转化与表达研究[D]. 北京:北京林业大学,2009.
- [17] Renou P, Broehard P, Jalouzot R. Recovery of transgenic *Chrysanthemum* (*Chrysanthemum gradiflora* Tzvelev) after hygromycin resistance selection[J]. Plant Science, 1993, 89:185-197.
- [18] 谢鑫星. 高效的农杆菌介导紫花苜蓿遗传转化体系的建立[D]. 兰州:兰州大学,2010.