

梁 芳,王默霏,王洁琼,等. 菊花高效再生体系的建立及抗生素对叶片分化的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(6):40-43.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.010

菊花高效再生体系的建立及抗生素对叶片分化的影响

梁 芳¹,王默霏¹,王洁琼²,袁秀云¹,刘建松³,崔 波¹

(1. 郑州师范学院生物工程研究所,河南郑州 450044; 2. 河南农业大学生命科学学院,河南郑州 450044;
3. 郑州顺达高新农业技术有限公司,河南郑州 450044)

摘要:以菊花的叶片为外植体,研究无菌体系的建立以及不同植物生长调节剂组合对菊花愈伤组织的诱导及分化的影响;同时研究了筛选抗生素 G418 和抑菌抗生素美罗培南对菊花叶片分化的影响。结果表明,以 2% NaClO 为主要灭菌剂,处理 20 min,同时加入 2 滴 Tween-20,灭菌效果最佳。最适的愈伤组织诱导及分化培养基为 MS + 0.1 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA,平均每外植体上可诱导出 5.3 个芽。G418 浓度为 15 mg/L 能完全抑制外植体的分化;低浓度的美罗培南对菊花叶片再生具有明显抑制作用,但是高浓度反而促进叶片的分化。
关键词:菊花;叶片;再生体系;筛选抗生素 G418;抑菌抗生素;美罗培南;愈伤组织;愈伤组织;培养基配方
中图分类号: S682.1+10.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)06-0040-04

菊花[*Dendranthema morifolium* (Ramat.) Tzvel.]是菊科(Compositae)菊属多年生宿根花卉,中国十大传统名花之一,是世界第二大切花,在中国已有三千多年的栽培历史。菊花以其品种繁多、花型各异、花色丰富、多姿多彩而深受世人喜爱。近年来,利用基因工程技术培育新品种已经成为现代遗传育种的重要途径。植物的遗传转化是植物基因工程的核心,其中的农杆菌介导法是最有效、运用最广泛的方法。在菊花的遗传转化过程中,高效再生体系的建立及抗生素种类和浓度的确定是非常重要的内容。关于菊花再生体系的研究源于 20 世纪 60 年代^[1],经过几十年的发展,现已建立了以茎尖^[2]、茎段^[3-4]、叶片^[5-8]及花器官^[9-10]等为外植体的菊花不同品种再生体系。但是,各个品种不同基因型建立的方法不同,再生体系不具有普遍性^[5]。

本研究拟用根癌农杆菌 EHA105 侵染菊花品种“狮子头”的叶盘,该菌株所含质粒携带有能促进植物开花的基因 *API* 及新霉素磷酸转移酶基因(*npt-II*)。*npt-II* 基因的编码产物氨基糖苷-3-磷酸转移酶能使氨基糖苷类抗生素,如新霉素、卡那霉素、庆大霉素、巴龙霉素及 G418 等,发生磷酸化而失活,从而使阳性转化体能够在含此类抗生素的培养基中存活并分化。同时,外植体与农杆菌共培养后,还需要使用抑菌抗生素及时有效地抑制农杆菌的生长,且不能影响外植体的正常生长。本试验利用植物组织培养技术,建立了晚花大菊黄色“狮子头”叶片高效再生体系,并研究了筛选抗生素 G418 及抑菌抗生素美罗培南对菊花叶片再生的影响,以为后续的遗传转化奠定基础。

收稿日期:2015-02-15
基金项目:河南省郑州市重大科技专项(编号:141PZDGG189)。
作者简介:梁 芳(1982—),女,湖北十堰人,博士,讲师,主要从事植物生物技术研究。E-mail:liangfang0801@163.com。
通信作者:崔 波,博士,教授,主要从事植物分子生物学研究。E-mail:laocuibo@163.com。

1 材料与方法

1.1 外植体的消毒

供试材料为菊花品种“狮子头”。在晴天选健康、无病虫害的嫩芽,取前端 3~5 cm 处的嫩叶,置于流水下冲洗 1 h。在超净台中分别用 4 种消毒方法进行消毒(表 1),每种试剂处理后均用无菌水洗涤 3~5 次。用无菌滤纸吸干水分,放在无菌培养皿中,将叶片的边缘切下,剩下的中间部分切成 0.5 cm×0.5 cm 的小块,并在小块中间划一刀伤口,接种在 B1 培养基中(表 2)。

表 1 灭菌剂种类及处理时间

处理	75% 乙醇 30 s	2% NaClO 20 min	0.1% HgCl ₂ 6 min	Tween-20
A1	√	√	-	-
A2	√	√	-	√
A3	√	-	√	√
A4	√	√	√	√

注:“√”为已选,“-”为未选。

1.2 愈伤组织的诱导及分化

以 MS 培养基为基本培养基,分别添加不同浓度不同种类的 6-BA、IBA、NAA、TDZ、2,4-D、KT 等植物生长调节剂,配置成 B1~B8 愈伤组织诱导培养基(表 2)。以菊花无菌苗的叶片为外植体,接种在这 8 种培养基中。每种培养基接 3 瓶,每瓶接 10 块外植体。1 个月后统计愈伤组织的诱导率及分化率,并转接入新鲜培养基中,让诱导出的小芽长大。

1.3 再生苗的壮苗生根

将高大于 3 cm 的再生芽从外植体上切下,接种到壮苗生根培养基 1/2MS + 0.1 mg/L NAA 中,1 个月后统计小苗的生长状况及生根情况,筛选最适合的壮苗生根培养基。

1.4 抗生素对菊花叶片分化的影响

根据菊花叶片愈伤组织诱导及分化试验结果,得到最佳诱导培养基。将菊花无菌苗的叶片切成小块,方法同愈伤组织的诱导试验,接种在分别含有不同浓度筛选抗生素 G418 和

表 2 菊花愈伤组织诱导培养基

培养基编号	培养基主要成分
B1	MS + 1.0 mg/L 6 - BA + 0.5 mg/L IBA
B2	MS + 2.0 mg/L 6 - BA + 0.5 mg/L NAA
B3	MS + 0.1 mg/L TDZ + 0.3 mg/L NAA + 0.2 mg/L KT
B4	MS + 1.0 mg/L 6 - BA + 0.1 mg/L IBA
B5	MS + 1.0 mg/L 6 - BA + 0.1 mg/L NAA
B6	MS + 1.0 mg/L IBA + 0.5 mg/L KT
B7	MS + 0.5 mg/L 2,4 - D + 1.0 mg/L KT
B8	MS + 0.2 mg/L 2,4 - D + 0.5 mg/L 6 - BA

抑菌素 Mer 的培养基中,研究其分别对菊花叶片再生的影响,筛选出菊花叶片遗传转化过程中合适的抗生素使用浓度。抗生素浓度均设为 5 个水平,其中 G418 的使用浓度为 0、5、10、15、20 mg/L;Mer 的使用浓度为 0、10、20、40、60 mg/L。抗生素母液采用过滤除菌的方法配置,当培养基温度降至 50 ~ 60 ℃ 时,加入一定体积的抗生素母液,震荡混匀后待凝固备用。每种抗生素每个浓度处理接 3 瓶,每瓶接 12 个外植体。接种后 25 ℃ 暗培养 2 d 后转入光照培养,1 个月后统计外植体的分化率。

1.5 培养条件

本试验培养条件均为:培养温度(25 ± 1) ℃,光照强度 2500 lx,光暗周期为 12 h : 12 h。所用培养基中均添加蔗糖 0.3%,琼脂 0.9%,pH 值调至 5.8 ~ 6.0。

1.6 结果统计

污染率 = 污染外植体数/接种外植体数 × 100%;存活率 = 存活外植体数/接种外植体数 × 100%;诱导率 = 诱导产生愈伤组织的外植体数/接种总外植体数 × 100%;分化率 = 分化不定芽的外植体数/接种总外植体数 × 100%;增殖倍数 = 产生的总不定芽数/接种总外植体数;生根率 = 生根苗数/接种苗数 × 100%。

利用 SAS 分析软件进行数据处理和差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌方法对菊花叶片的灭菌效果

菊花叶片表面密被绒毛,且叶片柔嫩多汁,因此对其进行合适的消毒是建立菊花叶片无菌体系的前提。根据表 3 可知,外植体用 75% 乙醇表面消毒 30 s,用无菌水冲洗 3 次之后,再用 2% NaClO 消毒 20 min(即 A1 处理),3 d 后可见部

分外植体已出现霉菌污染现象,2 周后 57.5% 已污染,1 个月 后外植体存活率为 42.5%。在处理液中加入 2 滴表面活性剂 Tween - 20(即 A2 处理),则污染率降为 10%,表明表面活性剂的添加可大大降低外植体的污染率。用 0.1% HgCl₂ 处理 6 min 代替 NaClO 处理(即 A3 处理),也得到比较理想的效果,污染率仅为 7.5%,但是由于 HgCl₂ 的毒性较强烈,且接种的外植体均为幼嫩的叶片,接种后出现少量外植体变黄并逐渐死亡的现象,1 个月后存活率为 82.5%。为了提高灭菌效果,将 2% NaClO 与 0.1% HgCl₂ 联合使用,外植体没有出现污染,但是死亡现象也加大,接种的 40 个外植体有 11 个变黄或者死亡,最终的存活率显著降低,仅为 72.5%。综合外植体污染率和最终存活率,用 2% NaClO 加入 2 滴表面活性剂 Tween - 20 共处理 20 min(即 A2 处理)最合适。

表 3 不同灭菌方法对菊花叶片外植体污染率及存活率的影响

灭菌方法	接种外植体数(块)	污染外植体数(块)	污染率 (%)	存活外植体数(块)	存活率 (%)
A1	40	23	57.5a	17	42.5d
A2	40	4	10.0b	36	90.0a
A3	40	3	7.5b	33	82.5b
A4	40	0	0.0c	29	72.5c

注:表中同列不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。下同。

2.2 不同培养基对菊花叶片愈伤组织诱导及分化的影响

将菊花无菌苗的叶片切成小块后,接种在 B1 ~ B8 培养基中进行愈伤组织的诱导及分化培养。5 d 后观察发现已有部分外植体膨大,2 周后 B4 和 B5 培养基中的愈伤组织已经开始分化出很多绿色的小芽点。1 个月后的统计结果及愈伤组织生长状况见表 4。在各种培养基中愈伤组织的诱导率均在 90% 以上,表明菊花叶片比较容易诱导出愈伤组织。除了在 B7 和 B8 培养中的愈伤组织为淡黄绿色外,其余均为翠绿色或深绿色。

1 个月后将外植体转接入新鲜培养基中,同时统计产生的小芽个数。由表 4 可知,不同培养基对菊花叶片分化影响很大,愈伤组织在 B3、B4、B5 培养基中的分化率均较高,而在 B2 和 B7 培养基中几乎不进行分化。增殖倍数最高的为 B5 培养基,达到 5.3;其次为 B4,增殖倍数为 3.6。B7 培养基分化率最低,部分在愈伤组织上还出现生根现象,可能是生长素浓度过高所致。

表 4 不同培养基对菊花叶片愈伤组织诱导及分化的影响

培养基	接种外植体数(块)	产生愈伤组织数(块)	愈伤组织诱导率(%)	分化愈伤组织数(块)	愈伤组织分化率(%)	增殖倍数	生长情况
B1	30	30	100	14	46.7	0.53e	绿色,3 周后开始分化,1 月后芽高约 1.0 cm
B2	30	28	93.3	5	16.7	0.27e	绿色,3 周后有少量分化,1 月后芽高约 0.5 cm
B3	30	29	96.7	28	93.3	2.10c	绿色,大,1 个月小芽高约 0.5 cm
B4	30	30	100	27	90.0	3.60b	翠绿色,2 周后开始分化,1 月后芽高约 2.0 cm
B5	30	30	100	26	86.7	5.30a	2 周后分化大量不定芽,1 月后芽高约 2.0 cm
B6	30	29	96.7	21	70.0	1.70d	深绿色,大而厚,1 月后再生芽高约 1.0 cm
B7	30	28	93.3	3	10.0	0.13e	小而薄,黄绿色,有少量生根现象
B8	30	29	96.7	19	63.3	0.73e	小,黄绿色,3 周后少量分化

2.3 不同培养基对菊花再生苗壮苗生根的影响

将高大于 3 cm 的芽(图 1、图 2)接种在生根培养基中,10 d

后在茎基部周围产生少量白色毛壮细根。1 个月 后长出 10 ~ 15 cm 的根,生根率 100%,且苗长势健壮,茎叶粗大(图 3、图 4)。



图1 菊花叶片分化的不定芽

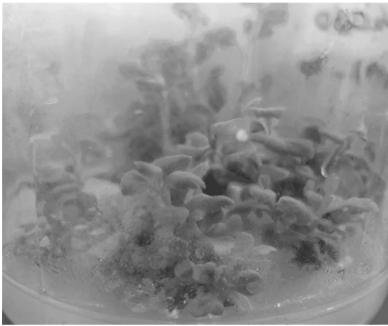


图2 菊花叶片分化的不定芽长大

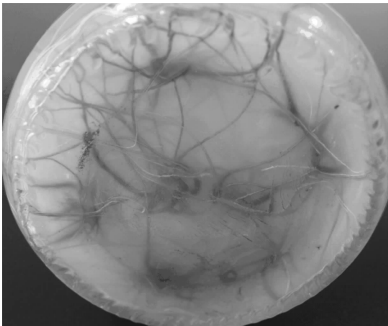


图3 菊花叶片分化的再生苗生根



图4 菊花叶片分化的再生苗

2.4 不同浓度抗生素对菊花叶片再生的影响

筛选抗生素 G418 对菊花叶片分化的影响 1 个月后的统计结果如表 5 所示。随着抗生素浓度升高,分化率表现出不断下降的趋势。与对照相比,5 mg/L 的 G418 使分化率从 86.1% 降到 61.1%;增加 G418 浓度至 10 mg/L 时,分化率继续降为 41.6%;当 G418 浓度升高到 15 mg/L 时,有部分外植体逐渐黄化死亡,存活的外植体多为黄绿色,仅有少量能进行

分化,分化率仅为 16.7%;当浓度升为 20 mg/L 时,接种 12 d 时观察发现接种的外植体已有一半发白变透明,1 个月后接种的 36 个外植体仅有 5 个存活且为黄绿色,不形成愈伤组织也不分化,完全抑制了外植体的生长。

表 5 抗生素 G418 对菊花叶片分化的影响

质量浓度 (mg/L)	接种外植体 数(块)	分化外植体 数(块)	死亡外植体 数(块)	分化率 (%)
0	36	31	0	86.1a
5	36	22	0	61.1b
10	36	13	0	36.1c
15	36	0	9	0.0d
20	36	0	31	0.0d

抑菌素美罗培南对菊花叶片分化的影响 1 个月后的统计结果见表 6。在 5 个浓度水平下,外植体均没有出现死亡现象,表明用美罗培南作为抑菌剂对外植体的伤害不大。随着美罗培南使用浓度的升高,分化率呈现先降再升的规律。当美罗培南浓度为 10 mg/L 时,分化率与对照相比有所下降,由 86.1% 降为 80.5%;浓度升高到 20 mg/L 时分化率达到最低,为 69.4%,与对照差异显著;但是,当浓度升高到 60 mg/L 时,反而显著促进外植体的分化及不定芽的生长。

表 6 抑菌素美罗培南对菊花叶片分化的影响

质量浓度 (mg/L)	接种外植体 数(块)	分化外植体 数(块)	死亡外植体 数(块)	分化率 (%)
0	36	31	0	86.1b
10	36	29	0	80.5c
20	36	25	0	69.4d
40	36	30	0	83.3b
60	36	34	0	94.4a

3 结论与讨论

植物再生体系的成功建立需要一定种类和浓度的细胞分裂素及生长素的合适配比,基因型决定了生长调节剂种类和浓度的选择^[11]。较高浓度的细胞分裂素和较低浓度的生长素配比,有利于菊花叶片先形成愈伤组织而后分化出芽^[12]。李秋杰等报道菊花叶片在 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L NAA 培养基中分化效果最好^[13];周洲等报道在 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA(与本试验中的 B5 相同)培养基中诱导出的菊花“绿鹦哥”愈伤组织最好,但是未诱导出芽^[14]。而在本试验中 B5 培养基诱导效果最好,表明外植体基因型不同,所需的激素浓度具有较大差异。由于基因型不同,较高浓度的细胞分裂素与较高浓度的生长素也会诱导出不定芽。姜宁宁等建立了菊花品种“小林静”的再生体系,叶盘最适不定芽分化培养基为 2.0 mg/L 6-BA + 1.5 mg/L NAA,平均每外植体可诱导不定芽 2.4 个^[15]。菊花“铺地金”和“北林红”的叶片再生最适培养基中细胞分裂素与生长素的比值为 2:1,且浓度较大^[16]。本试验最适培养基与品种“寒红”和“杭白菊”的相同,“日本黄”在培养基 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA 中分化最好,可在本试验培养基中外植体不分化,可能是基因型不同所致^[17]。

在培养基中添加 TDZ(B3),大大增加了不定芽的诱导率,每个外植体上分化出的芽点可达 15~20 个,但是芽点长

不大,最大仅约 0.5 cm 高。在以后的研究中可在添加 TDZ 的基础上,进一步调节各激素的含量和比例。本试验以晚花大菊“狮子头”的叶片为外植体,以 MS 培养基为基本培养基,在含有 1.0 mg/L 6-BA 及 0.1 mg/L NAA 的培养中叶片可直接诱导出愈伤组织并分化出不定芽,再生率可达到 86.1%,平均每个外植体产生 5.3 个芽。菊花试管苗的生根相对容易,大多报道在 1/2MS+0.1 mg/L NAA 培养基中生根最好^[18,14],本研究结果也表明在此培养基中长出的根多而粗壮,试管苗的长势也好。本研究建立了菊花“狮子头”叶片再生体系,满足了高效遗传转化的要求。

大量研究表明抗生素对不同品种菊花再生的影响差异显著^[18]。筛选菊花转基因植株使用较多的抗生素是卡那霉素^[18-21]。G418 作为筛选抗生素多见于单子叶植物的遗传转化^[22-23],在双子叶植物中尚不多见。新西伯利亚黑杨对 G418 最敏感,其次为卡那霉素,叶片转化筛选的 G418 最适浓度为 3~4 mg/L^[24]。刘晓东等的研究表明 G418 浓度为 5 mg/L 时即可有效抑制非洲紫罗兰非转化体的再生^[25]。据报道,菊花叶片对 G418 十分敏感,10 mg/L 的 G418 即可完全抑制地被菊“北林黄”外植体的分化,而羧苄青霉素则需要 250 mg/L 才可起到抑制作用^[26]。本研究结果表明,菊花“狮子头”叶片对筛选抗生素 G418 也很敏感,G418 浓度为 15 mg/L 可完全抑制叶片的再生。

目前,最常用的抑菌抗生素为羧苄青霉素和头孢霉素^[18,20],一般使用浓度较高。周小梅等研究了 9 种抗生素对根癌农杆菌 EHA105 的抑制效果,结果表明只有羧苄青霉素在 500 mg/L 时效果较好,其他 8 种无明显抑菌作用^[27]。已有研究表明羧苄青霉素和头孢霉素对愈伤组织的诱导及芽的分化具有负面影响^[28]。本研究以美罗培南代替传统的抑菌剂,结果表明低浓度的美罗培南对菊花叶片的分化具有一定的抑制作用,但是高浓度反而促进叶片的分化,这个结果与曹颖等的报道^[29]相似,可能是美罗培南的分解产物在培养基中起了植物激素或是营养来源的作用^[30]。据报道,美罗培南对农杆菌的抑制作用要强于羧苄青霉素和头孢霉素,0.2 mg/L 即可完全抑制农杆菌 EHA105 的生长^[30]。因此,结合本试验结果,美罗培南浓度大于 40 mg/L 时,就可以完全抑制 EHA105 的生长,又不影响菊花外植体的分化,甚至会促进叶片的分化。

参考文献:

- [1] Hill G P. Shoot formation in tissue cultures of *Chrysanthemum* ‘Bronze Pride’ [J]. *Physiology Plant*, 1968, 2: 386-389.
- [2] 姚 鹏, 顾昌华, 谢光新, 等. 菊花-绿美人组织培养的快速繁殖技术[J]. 铜仁职业技术学院学报: 自然科学版, 2007, 5(3): 13-14, 47.
- [3] 汪晓沙, 曾 丽, 彭勇政, 等. 不同菊花品种的组培扩繁技术[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2013, 31(2): 19-24.
- [4] 齐向英, 郑 丹, 张 超, 等. 菊花组织培养研究[J]. 江苏农业科学, 2009(5): 63-64.
- [5] 晨 卉, 王艳芳, 陈苏梅, 等. 五种菊花近缘植物组织培养研究[J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(3): 30-35.
- [6] 袁成志, 李 波, 杨蔚然. 菊花组织培养技术研究[J]. 北方园艺, 2010(16): 154-156.
- [7] 袁成志, 李 波, 杨蔚然, 等. 激素对菊花愈伤组织诱导和丛生芽分化的影响[J]. 北方园艺, 2010(1): 162-164.
- [8] 于红芳, 许 刚, 李永华, 等. 菊花品种唐宇金秋组织培养研究[J]. 河南农业科学, 2009(11): 114-117.
- [9] 李 平, 李庆伟, 贺爱莉, 等. 菊花花瓣的组织培养技术研究[J]. 北方园艺, 2009(9): 68-70.
- [10] 丁世民, 王泽宇, 宋健云, 等. 不同品种菊花组织培养比较研究[J]. 北方园艺, 2011(23): 101-104.
- [11] 吕晋慧, 吴月亮, 孙 磊, 等. 菊花叶片不定芽再生体系的研究[J]. 北京林业大学学报, 2005, 27(4): 97-100.
- [12] 李辛雷, 陈发棣, 王 红, 等. 菊花外植体再生体系的研究[J]. 上海农业学报, 2004, 20(2): 13-16.
- [13] 李秋杰, 陈春燕, 张 吉. 6-BA 和 NAA 对菊花叶片离体再生的影响[J]. 长江大学学报: 自然科学版·农学卷, 2007, 4(3): 31-34.
- [14] 周 洲, 李永丽, 姜 玲, 等. 菊花‘绿鹦哥’的组织培养和快速繁殖[J]. 北方园艺, 2009(10): 110-112.
- [15] 姜宁宁, 付建新, 戴思兰. 中国传统菊花品种‘小林静’再生及转化体系的建立[J]. 生物技术通报, 2012(4): 87-92.
- [16] 吴月亮, 蒋细旺, 孙 雷, 等. 菊花 2 个品种高效再生体系的建立[J]. 西南林学院学报, 2007, 27(2): 50-52.
- [17] 蒋细旺, 刘国锋, 包满珠. 菊花 9 个品种叶片和茎段快速高效再生体系的建立[J]. 华中农业大学学报, 2003, 22(2): 162-166.
- [18] 张传义, 曹秋芬, 周 慧, 等. 抗生素对菊花叶片再生及农杆菌生长的影响[J]. 生物技术通报, 2007(3): 127-130.
- [19] 刘 鹏, 陈素梅, 房伟民, 等. 利用卡那霉素筛选菊花转基因植株的方法研究[J]. 南京农业大学学报, 2013, 36(5): 45-50.
- [20] 王 沛, 周 洲, 尹新明, 等. 不同质量浓度抗生素对菊花‘绿鹦哥’茎段组织培养的影响[J]. 河南农业大学学报, 2010, 44(1): 96-99.
- [21] 赵伶俐, 石少川, 张启翔, 等. 农杆菌介导的地被菊遗传转化体系的优化[J]. 分子植物育种, 2011, 9(1): 74-80.
- [22] 林美娟, 薛志平, 陈平华, 等. 抗生素 G418 在甘蔗组织培养中的最佳筛选浓度[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2006, 35(1): 6-10.
- [23] 押辉远, 谷运红, 焦 真. 豫麦 18 再生系统的建立及愈伤对抗生素 G418 抗性的研究[J]. 河南科技大学学报: 自然科学版, 2008, 29(2): 86-91.
- [24] 王 成, 王义军, 李慧玉, 等. 抗生素对根癌农杆菌的抑菌作用及对新西伯利亚黑杨组培叶片再生的影响[J]. 东北林业大学学报, 2009, 37(9): 4-7.
- [25] 刘晓东, 王婷婷, 刘群录, 等. 抗生素对非洲紫罗兰不定芽再生的影响[J]. 北方园艺, 2014(3): 80-82.
- [26] 孙 雷, 张启翔. 地被菊‘北林黄’再生体系的建立及其抗生素敏感性研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(19): 4883-4884, 4905.
- [27] 周小梅, 李君剑, 赵军良, 等. 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.
- [28] Ogawa Y, Mii M. Evaluation of 12 beta-lactam antibiotics for *Agrobacterium*-mediated transformation through in planta antibacterial activities and phytotoxicities[J]. *Plant Cell Reports*, 2005, 23: 736-743.
- [29] 曹 颖, 胡尚连, 孙 霞, 等. 农杆菌介导转化石斛兰-蝴蝶兰杂交种类圆球茎体的研究[J]. 福建林业科技, 2007, 34(3): 27-31.
- [30] 曹 颖, 胡尚连. 碳青霉烯类抗生素抑菌效果及对植物愈伤组织影响[J]. 福建林业科技, 2008, 35(2): 129-132.