

## 农杆菌介导的唐菖蒲遗传转化体系的建立

张自由 连青龙 辛海波 钟雄辉 罗弦 义鸣放\*

(中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100193)

**摘要** 在唐菖蒲‘Advanced Red’胚性愈伤组织受体系统的基础上,建立其遗传转化体系。采用根癌农杆菌(GV3101)介导法,研究了侵染液浓度、侵染时间、乙酰丁香酮(AS)浓度、负压和筛选方式等因子对唐菖蒲遗传转化效率的影响。结果表明:在遗传转化过程中,不经预培养,负压处理下,农杆菌菌液 OD<sub>600</sub> 为 0.6~0.8,侵染时间 15~20 min,添加 100 μmol/L AS,共培养 3 d,可获得较高的遗传转化效率。经过 3~4 个月选择培养,部分抗性植株经 PCR 和 Southern 杂交检测表明,目的基因 *gus* 已整合到唐菖蒲基因组中。

**关键词** 唐菖蒲; *gus*; 根癌农杆菌; 遗传转化

中图分类号 S 682.2<sup>+</sup>4

文章编号 1007-4333(2011)06-0070-06

文献标志码 A

## Establishment of agrobacterium-mediated genetic transformation system of *Gladiolus*

ZHANG Zi-you, LIAN Qing-long, XIN Hai-bo, ZHONG Xiong-hui, LUO Xian, YI Ming-fang\*

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract** Genetic transformation system of *Gladiolus* cv. ‘Advanced Red’ was established based on the regeneration system of embryogenic callus. Several factors were studied such as concentration of the infection, infection time, acetosyringone (AS) concentration, negative pressure and screening methods for genetic transformation of *Gladiolus* mediated by agrobacterium tumefaciens(GV3101). The results showed that the highest rate of genetic transformation was obtained under the conditions of non pre-incubation, negative pressure treatment, *agrobacterium* concentration OD<sub>600</sub> = 0.6–0.8, infection time 15–20 min, adding 100 μmol/LAS and 3 ds incubation. Following incubation for 3–4 months, the analysis of the resistant plants with PCR and southern blot indicated that the *gus* had been integrated into the genome of *Gladiolus*.

**Key words** *Gladiolus*; *gus*; *agrobacterium tumefaciens*; genetic transformation

唐菖蒲 (*Gladiolus hybridus*) 是鸢尾科 (Iridaceae) 唐菖蒲属 (*Gladiolus*) 植物, 花色丰富、花姿优美, 为世界四大切花之一, 深受人们喜爱<sup>[1]</sup>。目前我国唐菖蒲主栽品种和生产用种球多数为国产自繁种球, 其品种陈旧和种性退化问题突出, 严重制约了生产切花的品质。随着生物工程技术的不断发展, 转基因技术以其传统育种无法比拟的优越性, 在观赏植物的遗传改良中有着极为广阔的应用前景<sup>[2]</sup>。因此建立唐菖蒲遗传转化体系, 对我国唐菖蒲遗传改良和新品种繁育有着重要的指导意义。

唐菖蒲的转基因研究起步相对较晚, 目前有关报道较少, 且多采用基因枪法<sup>[3-7]</sup>。第一例报道是采用微粒子轰击唐菖蒲的籽球切片, 细胞悬浮物和愈伤组织等, 获得了转基因唐菖蒲植株。在国内, 郑洋等<sup>[8]</sup>以唐菖蒲愈伤组织为转化受体, 将植物 *NPR1* 基因通过农杆菌介导转化唐菖蒲, 获得了经 PCR 检测为阳性的植株。但其试材仅为粉色系品种 ‘Rose Supreme’, 而未对红色系主栽品种 ‘Advanced Red’ 进行研究。

本研究在唐菖蒲品种 ‘Advanced Red’ 胚性愈

收稿日期: 2010-12-30

基金项目: 农业部行业科技项目(200903020)

第一作者: 张自由, 硕士研究生, E-mail: ziyou304@gmail.com

通讯作者: 义鸣放, 教授, 主要从事花卉栽培生理研究, Email: ymfang@cau.edu.cn

伤组织再生途径的基础上,通过侵染液浓度、侵染时间、乙酰丁香酮(AS)浓度、负压和筛选方式等影响因素对唐菖蒲遗传转化效率影响的研究,以建立农杆菌介导的遗传转化体系,为进一步运用基因工程手段进行分子育种及品种改良奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

唐菖蒲品种‘Advanced Red’,种球直径 2.5~3.0 cm,购自辽宁金城种球试验基地。2009 年 4 月种球种植于中国农业大学科学园试验基地,2009 年 10 月底收获直径 0.6~0.8 cm 籽球。

试验以唐菖蒲籽球切片经无菌诱导而来的胚性

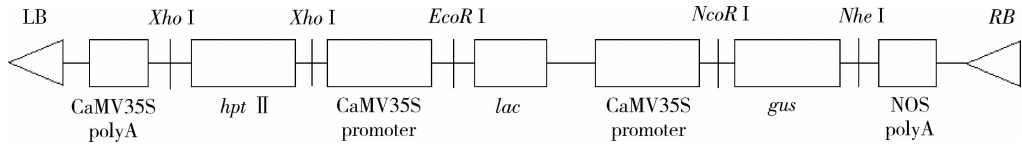


图 1 质粒 pCambia1301 的 T-DNA

Fig.1 T-DNA of plasmid pCambia1301

断转化效率的高低。

取 200  $\mu\text{L}$  保存于  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱的农杆菌,转接到 30 mL 附加卡那霉素和利福平的 YEB 液体培养基中,28  $^\circ\text{C}$  200 r/min 培养至一定  $\text{OD}_{600}$  值。取 10 mL 菌液,4  $^\circ\text{C}$  6 000 r/min 离心 5 min。收集菌体,去上清液,加入新配制的 1/2MS 培养基重悬菌液即成为转化唐菖蒲的侵染液。

选择生长良好,质地疏松均一的胚性愈伤组织,将其切成 0.5 cm 的方块,接种在分化培养基中,预培养 0~5 d。

用  $\text{OD}_{600}$  为 0.2~1.2 的根癌农杆菌 GV3101 菌液侵染预培养后的外植体,以未侵染的外植体为对照。侵染液中添加 0~200  $\mu\text{mol/L}$  乙酰丁香酮(AS),以研究其对转化效率的影响。在侵染时,分别在常压和负压( $-97.3\text{ kPa}$ ,10 min)下进行,以研究压力对转化效率的影响。侵染时间为 5~20 min,用无菌滤纸吸干外植体周围菌液,转接到分化培养基上,光照条件下共培养 0~5 d。

然后采取 3 种不同筛选方式对共培养后的外植体进行筛选培养:1)直接转入含有高浓度潮霉素的筛选培养基上培养;2)在不含潮霉素的培养基上恢复培养,再转入高浓度潮霉素培养基上培养;3)在不

愈伤组织为外植体进行遗传转化。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 唐菖蒲对潮霉素的敏感性试验

将唐菖蒲胚性愈伤组织接种于含有不同质量浓度(0、2.5、5、0.75 和 100 mg/L)潮霉素(Hyg)的分化培养基上,每处理 40 个外植体,重复 3 次,转接周期为 20 d,定期观察并记录愈伤组织的形态变化及不定芽生长情况。

#### 1.2.2 根癌农杆菌的活化与外植体的侵染

选用菌种为根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)GV3101,其内带有含潮霉素抗性基因 *hpt* 和 *gus* 基因的双元载体 pCambia1301(图 1)。该 *gus* 基因含有内含子,其瞬时表达情况可用以判

含潮霉素的培养基上恢复培养,转入含低浓度潮霉素培养基上培养,再转入含高浓度潮霉素培养基上培养。

当抗性植株长到 3~5 cm 时,转入生根培养基上进行生根培养。

在以上处理中,每个处理外植体 40 个,重复 3 次,转接周期为 20 d。除筛选方式试验以获得抗性植株数为判定指标外,其余各处理转化效率的对比均以共培养后 *gus* 的瞬时表达率为依据。

#### 1.2.3 抗性植株的分子生物学检测

1)PCR 检测:采用 CTAB 法<sup>[9]</sup>提取抗性唐菖蒲基因组 DNA,扩增 T-DNA 区域内一段 595 bp 的 *gus* 基因片段。引物序列

*gus*1: 5'-GACTCTTGACCATGGTAGATCTG-3';  
*gus*2: 5'-CAATAACAT-ACGGCGTGACATC-3'。  
20  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系:模板 DNA 20 ng,2 种引物浓度各 0.25  $\mu\text{mol/L}$ ,*Taq* 酶 0.5 U,dNTP 200  $\mu\text{mol/L}$ 。PCR 反应程序为:94  $^\circ\text{C}$  变性 5 min,94  $^\circ\text{C}$  变性 30 s,51  $^\circ\text{C}$  退火 45 s,72  $^\circ\text{C}$  延伸 45 s,35 个循环,最后在 72  $^\circ\text{C}$  延伸 7 min。PCR 反应结束后取 10  $\mu\text{L}$  产物进行电泳检测。

2)Southern 杂交检测:对 PCR 扩增为阳性植株

的基因组 DNA,经 PCR、电泳和转膜,入烘箱内,80℃烘烤 2 h 进行固定。探针的标记和 NBT/BCIP 显色采用 DIG DNA Labeling and Detection Kit(Roche 公司)试剂盒,操作步骤按照试剂盒说明书进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 潮霉素对唐菖蒲胚性愈伤组织分化芽的影响

唐菖蒲胚性愈伤组织对潮霉素较为敏感,由表

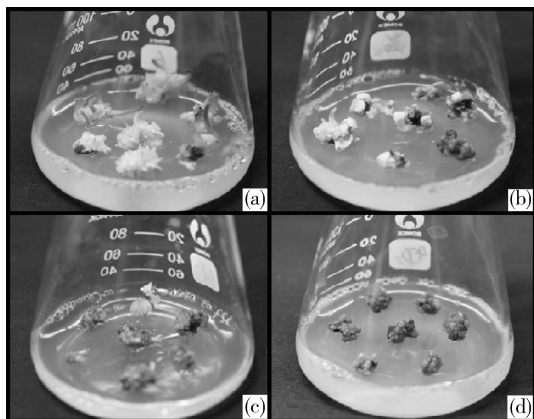
1 看出,在含不同质量浓度的潮霉素培养基上培养 2 个月后,5.0 mg/L 的潮霉素对唐菖蒲胚性愈伤组织有较明显的抑制作用,大部分愈伤组织出现褐化,不能继续生长。潮霉素质量浓度为 7.5 mg/L(图 2 (c))时,胚性愈伤生长强烈受抑,芽分化率仅为 2.4%,且均为黄化畸形芽。潮霉素质量浓度达到 10.0 mg/L 以上时,胚性愈伤全部褐化死亡。因此,7.5 mg/L 的潮霉素为适宜的筛选压力。

表 1 不同质量浓度潮霉素对唐菖蒲胚性愈伤组织分化不定芽的影响

Table 1 Effects of different concentration Hyg on adventitious buds from calli of *Gladiolus*

潮霉素质量浓度/(mg/L)	外植体个数	芽分化率/%	生长状况
0	40	89.0 a	正常生长
2.5	40	74.0 b	生长受抑
5.0	40	28.3 c	生长受抑、周边褐化
7.5	40	2.4 d	生长受抑、周边褐化、逐渐死亡
10.0	40	0	褐化死亡
15.0	40	0	褐化死亡

注:同列不同字母表示  $P < 0.05$  显著性差异。下表同。



(a)为CK;(b)为潮霉素,2.5 mg/L;

(c)为潮霉素,7.5 mg/L;(d)为潮霉素,15 mg/L

图 2 不同质量浓度潮霉素对唐菖蒲胚性愈伤组织分化芽的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of Hyg on adventitious buds from different embryonic calli of *Gladiolus*

## 2.2 转化条件的研究

### 2.2.1 预培养时间

表 2 可见,未经预培养的唐菖蒲胚性愈伤组织 *gus* 瞬时表达率最高,达到 3.25%。随预培养时间

的延长,*gus* 瞬时表达率呈下降趋势,预培养 5 d 时 *gus* 瞬时表达率仅为 1.10%。说明预培养时间延长,细胞对于转化愈加不敏感,不利于农杆菌的侵染和 T-DNA 的整合。因此,唐菖蒲胚性愈伤组织的转化不需要预培养。

表 2 预培养时间对 *gus* 瞬时表达率的影响

Table 2 Effects of preculture on transient expression of *gus* gene

预培养时间/d	外植体数	<i>gus</i> 瞬时表达率/%
0	116	3.25 a
1	114	2.79 b
2	115	2.67 b
3	116	2.01 c
4	118	1.15 d
5	115	1.10 d

### 2.2.2 菌液 OD 值和侵染时间

由表 3 的结果可知,农杆菌菌液浓度和侵染时间均对唐菖蒲胚性愈伤组织的转化有明显的影响。当农杆菌  $OD_{600}$  为 0.2 时,仅在侵染时间为 20 min 的情况下有 *gus* 染色现象,*gus* 瞬时表达率很低,为 0.92%;随着 OD 值的增加 ( $OD_{600} = 0.2 \sim 0.8$ ) 和

侵染时间 (10~20 min) 的延长, 转化率呈上升趋势 (OD<sub>600</sub> 为 0.8, 侵染 20 min 的除外), 但是随侵染浓度和侵染时间进一步升高和延长, 外植体周围则附着过多农杆菌, 导致其褐化死亡率迅速增高。OD<sub>600</sub> 为 1.0 时, 随侵染时间 (10~20 min) 的延长, 转化率呈现显著下降的趋势; 在 OD<sub>600</sub> 为 1.2 时, 无任何

*gus* 染色现象发生。由此可见, 菌液 OD 值过低 (OD<sub>600</sub> = 0.2) 或过高 (OD<sub>600</sub> = 1.2) 均对转化不利。当根癌农杆菌 OD<sub>600</sub> = 0.6~0.8 时, 浓度高时适当缩短侵染时间, 浓度低时适当延长侵染时间均可以得到较高的转化率, 其中 OD<sub>600</sub> 为 0.6, 侵染时间为 20 min 时, *gus* 瞬时表达率最高, 为 4.15%。

表 3 不同菌液 OD 值和侵染时间对 *gus* 瞬时表达率的影响

Table 3 Effects of different concentration of Agrobacterium and infected time on transient expression of *gus* gene

菌液 OD <sub>600</sub>	侵染时间/ min	<i>gus</i> 瞬时表达率/ %	菌液 OD <sub>600</sub>	侵染时间/ min	<i>gus</i> 瞬时表达率/ %	菌液 OD <sub>600</sub>	侵染时间/ min	<i>gus</i> 瞬时表达率/ %
0.2	5	0	0.6	5	0	1.0	5	1.73 d
0.2	10	0	0.6	10	2.54 c	1.0	10	2.15 cd
0.2	15	0	0.6	15	3.90 a	1.0	15	0.86 e
0.2	20	0.92 e	0.6	20	4.15 a	1.0	20	0
0.4	5	0	0.8	5	1.79 d	1.2	5	0
0.4	10	1.00 e	0.8	10	3.87 a	1.2	10	0
0.4	15	2.06 d	0.8	15	4.00 a	1.2	15	0
0.4	20	3.16 ab	0.8	20	2.22 c	1.2	20	0

2.2.3 乙酰丁香酮(AS)浓度

表 4 结果表明, 在农杆菌侵染液中加入 AS 可以明显提高 *gus* 瞬时表达率, 当 AS 浓度为 100 μmol/L 时, *gus* 瞬时表达率为 5.26%。但是随着 AS 浓度的进一步升高 (150 和 200 μmol/L), 转化效率并无明显变化。因此, 侵染液中 AS 最佳浓度为 100 μmol/L。

表 4 乙酰丁香酮浓度对 *gus* 瞬时表达率的影响

Table 4 Effects of different concentration of AS on transient expression of *gus* gene

乙酰丁香酮浓度/(μmol/L)	外植体数	<i>gus</i> 瞬时表达率/ %
0	116	3.93 b
100	119	5.26 a
150	118	5.33 a
200	116	5.19 a

2.2.4 负压侵染

负压处理是农杆菌侵染的一个重要影响因素, 而不同的外植体对负压的反应不一。 *gus* 染色结果表明, 负压处理下的转化率 [*gus* 瞬时表达率 (6.08% ± 0.9%)] 显著 ( $P < 0.05$ ) 高于常压处理 (5.12% ± 1.1%), 约比后者增加 18.8%。因此认

为, 负压处理下的侵染效果优于常压处理。

2.2.5 共培养时间

共培养时间的长短也是影响转化效率的一个重要因素。由表 5 可见, 在相同的菌液浓度和侵染时间下, 共培养 3 d 时, 唐菖蒲胚性愈伤组织的 *gus* 瞬时表达率随共培养时间的延长而增加, 且达到最高值 6.74%, 共培养 3 d 后, 则随着共培养天数的延长 *gus* 瞬时表达率逐渐降低。因此, 共培养 3 d 为宜。

表 5 共培养时间对 *gus* 瞬时表达率的影响

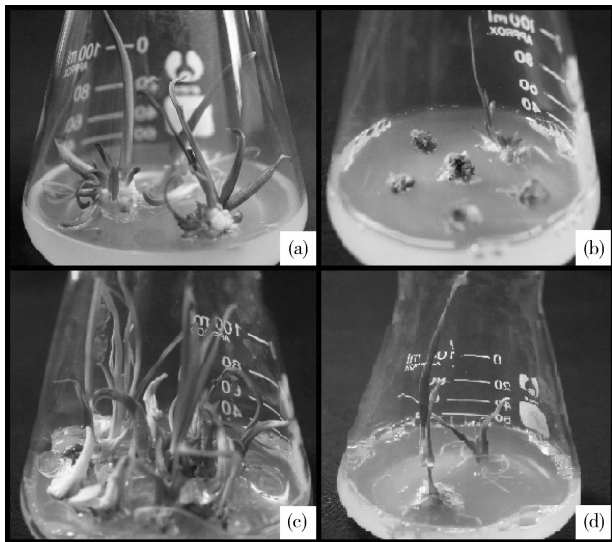
Table 5 Effects of co-culture on transient expression of *gus* gene

共培养时间/d	外植体数	<i>gus</i> 瞬时表达率/ %
0	115	0
1	113	0
2	115	2.86 b
3	118	6.74 a
4	116	2.10 c
5	114	0.92 d

2.2.6 筛选方式

本试验对 3 种筛选方式的研究结果表明, 第 3

种筛选方式即在不含潮霉素的培养基上恢复培养,转入含低浓度潮霉素培养基上培养,再转入含高浓度潮霉素培养基上培养,可以有效降低抗性愈伤的褐化死亡率,有利于抗性植株(图3(d))的获得。



(a)为唐菖蒲胚性愈伤组织不定芽再生;(b)为潮霉素抗性植株;(c)为再生不定芽的继代培养;(d)为抗性植株生根。

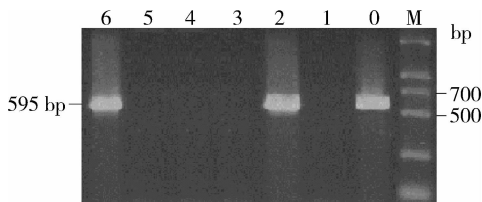
图3 唐菖蒲抗性植株的获得

Fig. 3 Obtaining of *Gladiolus* resistant plant

## 2.3 抗性植株的分子生物学检测

### 2.3.1 PCR 检测

随机抽取经过3~4个月筛选培养的抗性小苗5株,提取总DNA进行PCR检测。结果见图4,有2株转化植株(2和6号)扩增出595 bp的基因片段,与预期 *gus* 基因的扩增片段大小一致,而未转化植株没有目的片段出现。由此初步证实了外源基因已整合到唐菖蒲转化植株的基因组中。



M为DNA Marker(DL2000);0为阳性对照;1为阴性对照;3,4,5为未转化植株;2,6为转化植株。

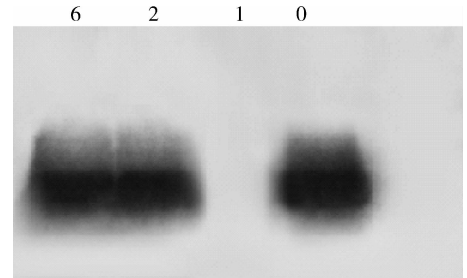
图4 唐菖蒲转化植株的PCR检测

Fig. 4 PCR analysis of transgenic plants

### 2.3.2 Southern 杂交分析

取PCR扩增都为阳性的2个转基因植株进行Southern杂交,如图5显示,质粒和PCR阳性植株

均有杂交信号,未转化的对照植株则没有出现任何杂交信号,证实外源基因已经整合到唐菖蒲转基因苗的基因组DNA中。



0为阳性对照;1为阴性对照;2,6为转化植株。

图5 Southern杂交鉴定转化植株

Fig. 5 Southern blot analysis of transgenic plants

## 3 讨论

1)许多试验研究了预培养时间、菌液OD值、侵染时间和共培养时间对T-DNA转化的影响,尽管各因素的最佳处理依据特定的外植体和菌株而不同<sup>[10-12]</sup>,但一般认为预培养0~3 d,菌液为OD<sub>600</sub>为0.5~1.0,共培养2~4 d是比较合适的,本研究得到与此较为一致的结果。

2)在用农杆菌感染外植体之前,文献中外植体是否需要预培养的结果很不一致。预培养对地被菊<sup>[13]</sup>和苜蓿<sup>[14]</sup>的遗传转化是非常必要的;而烟草的叶片<sup>[15]</sup>和北海道黄杨的下胚轴<sup>[16]</sup>则不需预培养。在唐菖蒲方面,郑洋<sup>[8]</sup>的研究结果表明,以粉色系品种‘Rose Supreme’的胚性愈伤组织为转化受体,在用农杆菌侵染前预培养10~14 d效果较好;相同品种情况下,刘志洋<sup>[17]</sup>在农杆菌几丁质酶基因转化的研究中,以愈伤组织为外植体,预培养2 d可获得较高的转化率,而以子球茎为转化受体时则不需要预培养。本试验对唐菖蒲品种‘Advanced Red’研究中,未经预培养的转化率最高,而随着预培养时间的延长,*gus*瞬时表达率呈下降的趋势。可见,外植体的预培养对转化效果的影响在同种植物的不同品种,及同种植物的不同外植体之间存在一定的差异性。

3)共培养时间的长短也是影响转化效率的一个重要因素。由于农杆菌附着后不能立即转化,需要经过一段“细胞调节期”后才能诱发T-DNA的转移,但共培养时间太长,农杆菌过度生长使植物细胞受到毒害而死亡。所以合适的共培养时间是一个好

的转化系统所必需的<sup>[18]</sup>。

4) 已有大量试验表明 AS 能活化 Vir 区基因, 明显提高多种植物的转化效率。在已报道的兰花农杆菌法转化研究中, 均认为 AS 能提高转化效率。Men 等<sup>[19]</sup>发现。在农杆菌培养基、稀释培养基、预培养培养基及共培养基中均添加 100  $\mu\text{mol/L}$  的 AS 能使 *gus* 瞬时表达效果提高约 3 倍。但是亦有报道, 在其他一些植物的转化上 AS 的使用不但对转化无效甚至有害。洪波等<sup>[20]</sup>报道, 在对菊花进行遗传转化的过程中, AS 对菊花不定芽分化影响不明显。在转化过程中, AS 添加的最佳时期及其对农杆菌的作用机理还有待进一步研究<sup>[21]</sup>。本试验在侵染菌液中加入 100  $\mu\text{mol/L}$  AS 能较为明显地提高唐菖蒲胚性愈伤组织的转化率。

5) 自 Bechtold 等<sup>[22]</sup>建立了整株原位真空渗入遗传转化方法后, 负压处理开始被应用到菌液侵染过程中。负压侵染是遗传转化中的一种辅助手段, 在拟南芥、白菜和油菜等的遗传转化中广泛应用。在负压处理下, 有利于农杆菌附着在植物细胞表面, 一定程度上提高转化效率。而另一方面, 负压也可能会对植物细胞造成损伤<sup>[23]</sup>。本试验将唐菖蒲胚性愈伤组织在 -97.3 kPa 负压下侵染 10 min 得到较常压处理下高的转化率。然而, 最佳的负压处理时间和压力大小还有待进一步研究。

## 参 考 文 献

[1] 义鸣放, 王玉国, 缪珊. 唐菖蒲[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 1-3

[2] 王侠礼. 转基因技术在观赏植物育种中的应用[J]. 北方园艺, 2005(6): 14-15

[3] 刘久东, 刘伟, 周厚高, 等. 唐菖蒲育种的研究进展[J]. 北方园艺, 2006(4): 74-75

[4] Kamo K, Blowers A, Smith F, et al. Stable transformation of *Gladiolus* by particle gun bombardment of cormels[J]. Plant Science (Limerick), 1995, 110(1): 105-111

[5] Kamo K. Bean yellow mosaic virus coat protein and *gusA* gene expression in transgenic *Gladiolus* plants [J]. Acta Horticulturae, 1997, 447: 393-399

[6] Kamo K, Blowers A, McElroy D. Effect of the cauliflower mosaic virus 35S, actin, and ubiquitin promoters on uidA expression from a Bar-uidA fusion gene in transgenic *Gladiolus* plants[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant,

2000, 36: 13-20

[7] Joan A. Aebig<sup>1</sup>, Kathryn Kamo, Hei-Ti Hsu. Biolistic inoculation of *gladiolus* with cucumber mosaic cucumovirus [J]. Journal of Virological Methods, 2005, 123: 89-94

[8] 郑洋. 唐菖蒲再生体系建立及 *NPR1* 基因的遗传转化[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2007

[9] Tai T H, Tanksley S D. A rapid inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue[J]. Plant Molecular Biological Report, 1990, 8 (4): 297-303

[10] Ashok K, Shrawat, Allen G Good. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of cereals using immature embryos[J]. Biomedical and Life Sciences, 2011, 710: 355-372

[11] Diane E, Darlington, Chiu-Yueh Hung, et al. Developing an *agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation for a selenium-hyperaccumulator *Astragalus racemosus* [J]. Plant Cell, 2009, 99: 157-165

[12] Rao M M, Amita Jain, Rao A M, et al. Factors affecting *agrobacterium*-mediated genetic transformation in tomato (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.) [J]. Advances in Plant Sciences, 2009, 22: 323-329

[13] 孙淑斌, 徐文君, 衣艳君. 地被菊的再生与转化体系的建立[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(6): 1032-1036

[14] 梁慧敏, 夏阳, 孙仲序. 根癌农杆菌介导苜蓿遗传转化体系的建立[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(2): 152-156

[15] 柴红梅, 张绍松, 万萌, 等. *GNA* 和  $\alpha$ -*PAP* 双抗表达载体的构建及对烟草的遗传转化[J]. 西南农业学报, 2002, 15(4): 35-37

[16] 尚爱芹, 田卫卫, 赵梁军. 根癌农杆菌介导北海道黄杨遗传转化体系的建立[J]. 园艺学报, 2008, 35(3): 409-414

[17] 刘志洋. 农杆菌介导的几丁质酶基因转化唐菖蒲的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2005

[18] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002

[19] Men S Z, Ming X T, Liu R W, et al. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Dendrobium orchid* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2003, 75: 63-71

[20] 洪波, 张常青, 高俊平, 等. 根癌农杆菌介导的转录因子 DREB1A 基因在地被菊花中的遗传转化[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(3): 304-309

[21] 张妙彬, 梁攀中, 肖浩, 等. 农杆菌介导石斛兰遗传转化的研究[J]. 园艺学报, 2008, 35(4): 565-570

[22] Bechtold, Ellis J. In Planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plant [J]. CR Acad Sci Paris Life Sci, 1993, 316: 1194-1199

[23] 张燕红, 黄乐平, 周小云, 等. 农杆菌真空渗透法转化棉花花粉的初步研究[J]. 棉花学报, 2008, 20(5): 354-358