

# 苹果果实愈伤转化体系的建立及其在基因功能研究中的应用

李兴亮 丁宁 贾美茹 魏灵芝 姜金铸 李冰冰 贾文锁\*

(中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100193)

**摘要** 以苹果‘金冠’为试材,对苹果果实愈伤转化体系的建立及其在苹果基因功能分析中的应用进行研究。首先优化了苹果果实表面消毒的方法、外植体大小和形状、愈伤和继代培养基的组成,以及愈伤和继代培养的适宜条件,最后成功建立了苹果果实愈伤培养体系。在此基础上,将 CaM 35S 驱动的 GUS 报告基因转化苹果果实愈伤,发现 GUS 基因大幅度表达,同时 GUS 活性强烈提高。证明所获得的苹果果实愈伤适用于基因转化。为进一步证明该体系适用于苹果基因功能研究,分别构建了 CaM 35S 驱动的乙烯合成关键酶 MdACO1 过表达载体和 RNAi 载体, MdACO1 的过量表达促进了乙烯合成并调控了一系列乙烯信号转导相关的基因表达,相反 MdACO1 的 RNAi 抑制了乙烯的合成,同时也改变了一系列与乙烯信号转导有关的基因表达。

**关键词** 苹果;愈伤;基因转化;乙烯

中图分类号 S 661.1

文章编号 1007-4333(2015)02-0108-06

文献标志码 A

## Establishment of gene transformation system in fruit callus and Its application in gene functional analysis for apple plant

LI Xing-liang, DING Ning, JIA Mei-ru, WEI Ling-zhi, JIANG Jin-zhu, LI Bing-bing, JIA Wen-suo\*

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

**Abstract** With apple ‘Golden Delicious’ as research material, this work was aimed at developing a transient gene transformation system in callus and confirming whether it might be applicable for the functional analysis of the genes in apple plants. The research firstly optimized the sterilization method, the size and shape of explants, the culture medium for callus growth and regeneration, and finally developed the system for agrobacterium mediated gene transient transformation in apple plants. Application of gene transformation was tested with GUS reporter gene driven by CaM 35S. The results showed that there were both high expression of GUS gene and strong GUS activity, suggesting that the developed system could be used for gene manipulation. In order to further demonstrate the reliability of the system, an over-expression construct as well as an RNAi construction of *MdACO1*, a key gene in ethylene biosynthesis pathway, was respectively transformed into the callus. The expression analysis demonstrated that over-expression of *MdACO1* caused dramatic increase in *MdACO1* transcript level. In contrast, RNAi caused a significant decrease in the *MdACO1* transcript level. Moreover, both over-expression and RNAi of *MdACO1* resulted in changes of ethylene production and expression patterns of a series of genes involved in ethylene signaling.

**Key words** apple; callus; gene transformation; ethylene

植物分子生物学研究始于模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)。拟南芥采用的优势不仅在于其基因组较小,遗传转化方便,而且还在于其个体

较小,繁殖快速,而拟南芥突变体技术的采用更是植物分子生物研究历程中的一个革命性进展<sup>[1-5]</sup>。近年来,随着模式植物分子生物研究的快速发展,分子

收稿日期:2014-06-01

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31171921)

第一作者:李兴亮,博士研究生,Email:lixingliang2008cs@163.com

通讯作者:贾文锁,教授,主要从事果树逆境生理和分子生物学研究,E-mail:jjaws@cau.edu.cn

生物学研究已渗透到农作物领域,而水稻,玉米和小麦等主要农作物分子生物学研究逐渐成为植物分子生物学研究的主流。但和模式植物及主要农作物相比,果树分子生物学研究却十分落后,因此,加速果树分子生物学研究对果树学科的发展具有重要意义。

果树分子生物研究落后的根本原因在于果树的生物学特性及果树的生长和发育特点,模式植物和农作物的研究技术和策略并不适用于果树分子生物学研究。例如,在模式植物和农作物中,基因功能分析的基本策略在于突变体的创建和筛选<sup>[6-9]</sup>。由于果树树体大,生长周期长,更主要的是由于果树一般高度杂合,不能用种子繁殖,因此,突变体创建和筛选策略不能为果树分子生物学所采用。近年来,随着各种分子生物学技术的快速发展,特别是适用于不同农作物包括蔬菜和花卉等园艺作物的稳定转基因技术及基因沉默体系的成功建立,为园艺作物分子生物学研究的发展带来了机会<sup>[10-12]</sup>,但是,对于一般果树而言,稳定遗传转化体系仍然没有建立,即便成功建立,但由于其遗传转化效率很低,在基因功能解析中实际上很少得到利用。可以说,高效的果树遗传转化体系的建立迄今仍是限制果树分子生物学研究的关键因素。

植物分子生物学的核心内容是基因功能分析,而基因功能分析的基本策略是基因的过量表达和沉默。在基因过量表达和沉默中,除稳定转基因体系外,农杆菌介导下的常规稳定表达载体和病毒干扰载体 VIGS 等在瞬时转化体系中发挥着越来越重要的作用。由于果树稳定遗传转化困难,因此,果树中基因瞬时转化体系在基因功能解析中发挥着特殊的作用。无论是农杆菌还是病毒介导的瞬时转化,目的基因能否得到有效操纵关键在于受体材料特性和转化条件的优化。苹果在国内外均是主要果树品种之一,苹果分子育种对苹果产业发展具有重要意义。苹果基因功能解析是苹果分子育种的基础,但苹果遗传转化困难一直是限制苹果分子生物学研究的主要因素。本研究试图以苹果为试材,建立一套可靠的苹果瞬时转化体系,旨在为苹果分子生物学研究探索新的途径。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

‘金冠’苹果果实采自北京市昌平区北流果园。

于盛花期后果实不同发育时期分别采集。

植物激素 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)、2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-D)、萘乙酸(NAA)(Sigma 公司,美国);限制性内切酶、M-MLV 逆转录酶及 Real-time PCR SYBR mix(TaKaRa 公司,日本);根癌农杆菌 EHA105、AGL0、GV3101、LBA4404、植物表达载体 pCAMBIA1304 为本实验室保存。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 果实愈伤的诱导

将苹果果实于 70% 无水乙醇中浸泡 2 min,无菌水漂洗 2~3 次,再浸入 1.8% NaOCl 中 30 min,期间缓慢摇动,最后无菌水漂洗 3 次。于无菌环境中,将果实打孔切成直径 1.0 cm 及厚 0.1 cm 的圆片,置于愈伤诱导培养基中(MS+蔗糖 30 g/L+琼脂 8 g/L+6-BA 0.1 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L,pH 5.8),27 °C 避光培养 2~3 周。生长出愈伤后,将新生愈伤组织剥离果实圆片并置于新鲜培养基中继续培养,2~4 周继代一次。取继代培养后 10 d 左右状态良好的愈伤组织用于基因转化或其他处理。

#### 1.2.2 植物表达载体构建

从 GenBank 中获得 *MdACO1* (AF030859) 基因全长序列,以基因全长引物(OE-F: TCTAGAA-TGGCGACTTTCCAGTTGTTG; OE-R: GGTA-CCTCAGGCAGTTGCAACAG GGGTG) 克隆 *MdACO1* 基因全长序列构建 pCAMBIA1304 35S: *MdACO1* 过表达载体;以反义干扰引物(as-F: GGTACCGAGAATCTTGGACTCGAGAAG; as-R: TCTAGACACAAAC TTGGGATAAGTTG) 克隆 *MdACO1* 基因 399~840 bp 序列构建 pCAMBIA1304 35S:as *MdACO1* 反义表达载体;

#### 1.2.3 愈伤遗传转化

将 *MdACO1* 过表达载体、反义表达载体及 pCAMBIA1304 空载体分别转化农杆菌 EHA105,液体 LB 培养基 28 °C,220 r/min 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 0.8,集菌去上清后重悬于侵染缓冲液(MS+10 mmol/L MES+200 μmol/L AS,pH 5.6)至 OD<sub>600</sub> 0.6,室温、避光条件下缓慢震荡活化 2~4 h。取继代培养后 10 d 左右状态良好的愈伤块,切成直径约 3 mm 的小块浸入菌液 15~25 min,期间轻微摇动;侵染后,使用无菌滤纸吸去多余菌液,放置于愈伤培养基中(MS+蔗糖 30 g+琼脂 8 g+6-BA 0.1 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L,pH 5.8),27 °C 避光培养,一定时间后进行 GUS 组织化学染色及基因

表达检测。

#### 1.2.4 Real-time PCR 检测

从苹果基因组数据库 (<http://genomics.research.iasma.it/>)及 GenBank 中获得乙烯合成途径关键酶及其受体基因序列 *MdACSl* (U89156)、*MdERSl* (AY083169)、*MdETR1* (AF032448)、*MdETR2* (DQ847145)、*MdCTR1* (DQ847149)、*MdActin*(MDP0000774288),使用 Primer 5.0 软件进行 Real-time PCR 引物设计,于 ABI7500 上进行 Real-time PCR 检测。

#### 1.2.5 乙烯释放速率的测定

将待测果实愈伤组织放入容积为 10 mL 的橡胶筛玻璃瓶内,27 °C 避光放置 2 h,抽取 1 mL 气样注入岛津 GC-17A 气相色谱仪进行乙烯生成量的测定,测定条件为:柱温 55 °C,进样口 110 °C,检测器 160 °C;载气(N<sub>2</sub>)、空气和 H<sub>2</sub> 流速分别为 50、500 和 70 mL/min。

## 2 结果与分析

### 2.1 果实愈伤的诱导

取不同发育时期的‘金冠’苹果果实进行愈伤诱导,以植物激素 2,4-D、6-BA、NAA 和抗氧化物质活性炭不同浓度组合筛选出适宜愈伤组织生成的诱导条件(表 1)。试验发现,在花后 30~60 d 的果实发育初期,果实圆片在各种激素、活性炭浓度条件下均严重褐化,不能诱导出愈伤组织;而花后 60 d 至采收期果实圆片褐化程度降低,在一定浓度的 2,4-D 和 6-BA 诱导下能够生长出愈伤,但诱导时间较长且愈伤组织生活力低,难以继代培养和扩繁。经过前期不同果实发育时期及激素条件的摸索,试验最终发现,取采收期发育偏晚的绿果,在 1.0 mg/L 2,4-D 与 0.1 mg/L 6-BA 组合条件下诱导效果最好,果实圆片诱导第 3 周生成愈伤,后续继代、扩繁培养效果较好(图 1)。

表 1 不同激素配比对果实愈伤形成的影响

Table 1 Effect of different hormones on fruit callus formation

处理 Treatment	组合号 No.							
	1	2	3	4	5	6	7	8
2,4-D/(mg/L)			1.0	2.0	1.0	2.0	1.0	1.0
6-BA/(mg/L)			0.1	0.1	0.1	0.1		
NAA/(mg/L)							0.2	0.2
活性炭/(mg/L) Activated carbon		0.5			0.5	0.5	0.5	
诱导率/% Induction rate	0	0	85.2	79.5	32.6	20.3	0	0

注:各处理基础培养基为 MS+蔗糖(30 g/L),并以诱导 20 d 时的愈伤生成情况统计诱导率。

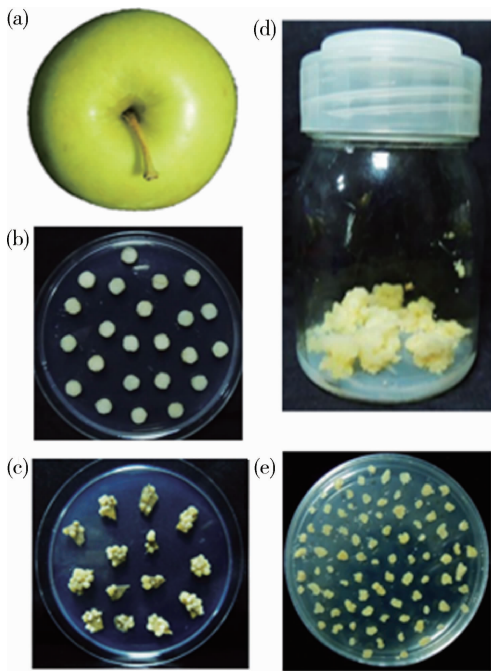
Note:Basal medium in each treatment is MS with 30 g/L sucrose,and induction date is calculated on 20 d after induction.

在愈伤继代培养的过程中,往往会出现因环境条件、激素浓度变化或培养时间过长等原因导致的愈伤不能正常生长,如愈伤组织上部失水老化,泛白或呈深黄色;以及玻璃化,不能成团生长等(图 2)。愈伤的诱导及培养均在 25~27 °C、避光条件下进行,3~4 周更换一次培养基,应避免因培养基硬度、干裂和激素浓度变化对愈伤组织生长的影响。

### 2.2 遗传转化方法的建立

根癌农杆菌对不同的宿主具有不同的侵染活性,为检测适用于侵染愈伤组织的菌株类型,前期试

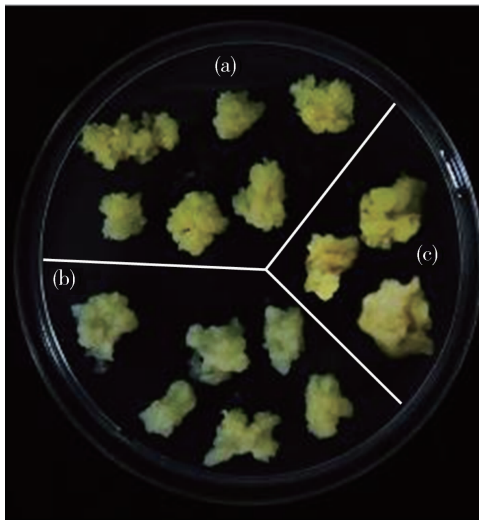
验对 EHA105、AGL0、GV3101 和 LBA4404 这 4 种农杆菌的侵染活性进行检测。对侵染后第 3 天的愈伤组织进行 GUS 染色观察,结果显示 4 种菌株对苹果果实愈伤均具有较强的侵染活性,无显著差异。对 EHA105 介导的 pCAMBIA1304 35S:GUS 愈伤组织中 GUS 的表达水平进行检测,结果显示,侵染后 1 d 即能检测到 GUS 的表达,在侵染后的第 4 天 mRNA 水平达到最大值,随后快速下降(图 3)。可见,农杆菌介导下的苹果果实愈伤侵染是一种能够快速调控基因表达的瞬时遗传转化方法。



(a) 采收期发育偏晚的绿果; (b) 果实圆片; (c) 诱导 20 d 时愈伤组织形成; (d) 愈伤组织的继代培养; (e) 用于下游试验的愈伤小块。  
 (a) Small green fruit from harvesting stage; (b) Fruit discs; (c) Callus from 20 d after induction; (d) Subculture of callus; (e) Callus used for downstream experiment.

图 1 苹果果实愈伤诱导过程

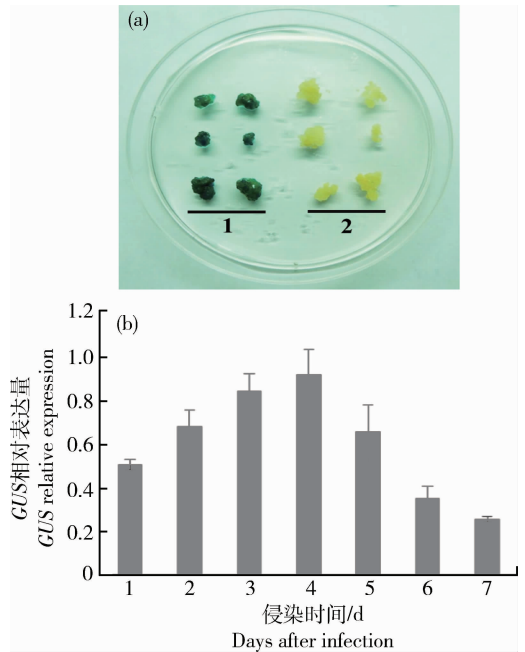
Fig. 1 Induction process of apple fruit callus



(a) 正常生长, 呈淡黄色, 形成正常愈伤团; (b) 玻璃化, 泛白, 不能形成愈伤团; (c) 老化, 生活力下降, 呈深黄或白色。  
 (a) Normal growth, pale yellow, forming a group of normal callus; (b) Glass, white, can not form a callus group; (c) Aging, decreased viability, dark yellow or white.

图 2 苹果果实愈伤组织的不同生长状态

Fig. 2 Different growth state of apple fruit callus



(a) GUS 组织化学检测, 1 为 pCAMBIA1304 35S:GUS, 2 为对照 (未侵染组织); (b) Real-time PCR 检测 GUS 表达水平变化。

(a) Histochemical detection of GUS activity, 1: pCAMBIA1304 35S:GUS, 2: control; (b) Detection of GUS expression level by Real-time PCR.

图 3 愈伤遗传转化及 GUS 表达检测

Fig. 3 Genetic transformation and GUS expression detection

### 2.3 调控 MdACO1 表达水平影响愈伤组织的乙烯释放速率

GUS 报告基因的表达证明了在合适载体和合适条件的转化下, 外源基因可以在苹果果实愈伤体系中得以很好的表达。为了进一步证明该体系在基因功能研究中的可靠性和实用性, 围绕乙烯代谢, 对 MdACO1 基因的表达特征及其功能行为进行了分析。分别构建了 35S CaM 驱动的 MdACO1 过量表达以及反义干扰表达体系, 通过农杆菌 EHA105 介导转化苹果果实愈伤。结果显示, MdACO1 过表达及其反义干扰能够显著调控愈伤组织 MdACO1 mRNA 的丰度, 在侵染后的第 4 天和第 5 天过表达及干扰效果最好(图 4)。乙烯释放速率测定结果显示, 在过表达 MdACO1 第 12 h 即出现乙烯释放高峰, 随后快速下降至低于对照水平; 而 MdACO1 反义干扰作用下的愈伤组织, 在 16 和 24 h 乙烯释放速率显著低于对照水平(图 5)。该结果表明, 操纵 MdACO1 的基因表达, 可以操纵乙烯代谢, 因而苹果愈伤转化体系适用于功能基因研究。

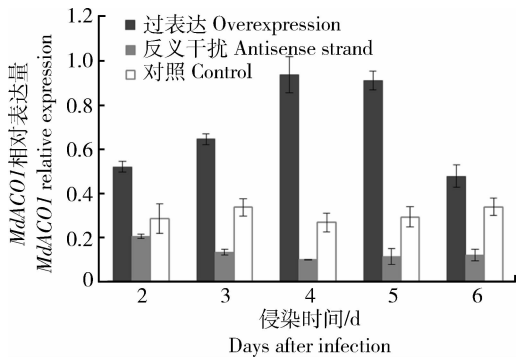


图4 愈伤组织 *MdACO1* 表达水平

Fig. 4 Detection of *GUS* expression level from *MdACO1* overexpression callus

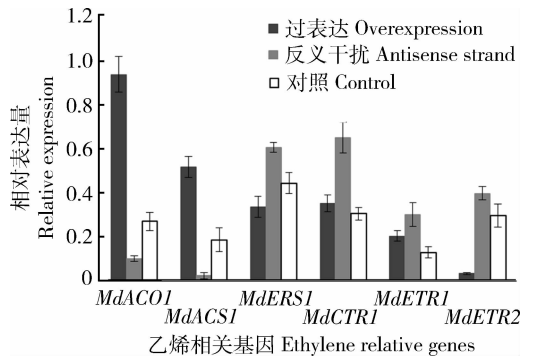


图6 愈伤组织 *MdACO1* 表达水平对乙烯相关基因的影响

Fig. 6 Effect of *MdACO1* expression level on ethylene relative genes in callus

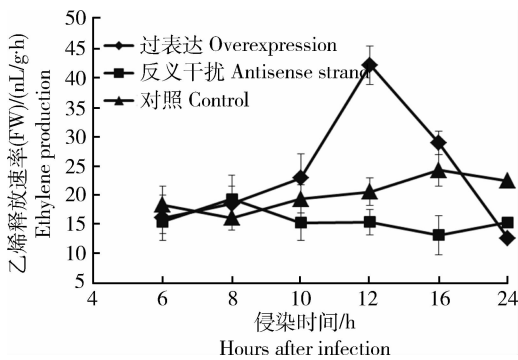


图5 *MdACO1* 过表达及反义干扰愈伤组织中乙烯释放速率

Fig. 5 Detection of ethylene release rate from *MdACO1* overexpression and antisense interference callus

### 3 讨论

植物分子生物学研究的本质之一即揭示基因的功能。在过去的一些年中,由于大部分果树品种的基因序列都是未知的,因此,在果树分子生物学的研究中很多工作都集中在对未知基因的分离和克隆上<sup>[13-16]</sup>。近年来,随着苹果、葡萄及草莓等很多果树品种都已进行了全基因组序列测序,基因分离和克隆工作已没有多大意义,而基因功能的解析已成为果树分子生物学研究的主要任务。无论基因功能解析研究多么复杂,如果目标基因不能得到有效地操纵,那么基因功能得以彻底揭示是不可能的。在模式植物和主要农作物中,基因操纵一般多采用稳定遗传转化体系,但至今为止,果树稳定转基因仍十分困难,为此,高效和可靠的瞬时基因表达体系的建立对果树分子生物学研究具有特殊的意义。

利用农杆菌介导的基因瞬时表达方法主要包括2个体系,一是使用常规的稳定载体进行基因的瞬时表达,包括基因过表达、反义干扰和RNA发卡干扰;二是使用病毒载体VIGS等的瞬时表达体系,进行基因干扰表达。由于农杆菌和病毒载体都存在着寄主特异性,因此无论对于哪种体系,植物受体材料的正确选择是至关重要的。例如,在农杆菌介导下利用病毒载体进行的基因沉默体系VIGS在番茄果实中可以得到较好的基因沉默效果,但在大部分果树果实中都没有成功的报道。本研究曾经尝试了农杆菌介导下常规稳定载体和VIGS载体的基因过量表达或沉默在苹果果实中的应用,但没有得到预期的效果。主要原因一是农杆菌或病毒载体导入果实很困难,二是农杆菌和病毒不侵染苹果果实。有鉴

在苹果果实中,乙烯是一个重要的信号分子。由于信号的反馈调节,乙烯水平的变化可导致一系列乙烯代谢及某些乙烯下游信号组分的基因表达的变化。为此,进一步检测了某些乙烯代谢和乙烯下游信号组分的基因表达。结果显示 *MdACO1* 的过表达和反义干扰分别促进和抑制了乙烯上游合成关键酶 *MdACS1* 的表达水平;同时, *MdACO1* 的过表达下调了乙烯受体基因 *MdERS1* 及 *MdETR2* 的表达水平,而 *MdACO1* 的下调表达促进了 *MdERS1*、*MdCTR1*、*MdETR1* 及 *MdETR2* 的表达水平,即在 *MdACO1* 表达水平影响下的乙烯释放速率对其合成基因、受体基因的表达水平产生了反馈调控作用(图6),表明苹果果实愈伤体系也适用于调节基因或信号转导机制的研究。

于此,苹果愈伤侵染是一个必要的选择。愈伤细胞尽管不可能实现100%的细胞转化,但本研究的研究表明,目标基因的表达水平一般可达到甚至超过稳定遗传转化体系,说明该体系在基因转化研究中的优越性。

理论上分析,愈伤细胞不同于果实细胞,因此在基因功能分析中存在着很大的局限性。但是一般而言,不同组织及不同细胞中基本代谢系统和基本生物学过程存在着共通性。例如,在模式植物中,拟南芥和玉米等原生质体的瞬时表达体系曾作为一种技术体系,在基因功能研究得到广泛应用<sup>[17-21]</sup>。为了证明苹果果实愈伤体系在苹果基因功能研究中的实用性,针对乙烯代谢关键基因 *MdACO1* 表达行为进行了研究。该基因的选择一是因为乙烯代谢在苹果果实发育及成熟调控中起着关键作用,二是因为乙烯代谢及其信号代谢通路已揭示的相对清楚,这可为基因功能验证提供很多便利。本研究研究表明,操纵 *MdACO1* 的表达不仅可以操纵乙烯的产生而且还可以操纵一系列乙烯信号转导相关基因的表达。乙烯信号转导相关基因表达的改变是乙烯反馈调节的结果。至少就乙烯代谢和乙烯信号转导研究而言,苹果果实愈伤转化体系不仅适用于功能基因研究也适用于调节基因研究。

植物分子机理的研究是非常复杂的,任何一个代谢系统或信号转导通路都涉及到众多的蛋白成员,而几乎任何一个蛋白家族又包括数量众多的成员,因此在植物分子机理的揭示中,基因能否高效转化在很大程度上决定了基因功能能否得以揭示。苹果愈伤转化体系尽管和果实细胞存在着差异,但是它的高效转化和操作的方便可以大大加速基因功能的初步鉴定,基因功能的彻底揭示还需要在基因功能初步揭示的基础上利用稳定转基因体系加以证明。苹果果实愈伤瞬时表达体系和稳定转基因的结合将大大促进苹果分子生物学研究的进程。

## 参 考 文 献

- [1] 赵淑清. 一种筛选拟南芥突变体的有效方法[J]. 遗传, 2001, 23(3): 260-262
- [2] 张健, 徐金相, 孔英珍, 等. 化学诱导激活型拟南芥突变体库的构建及分析[J]. 遗传学报, 2005(10): 1082-1088
- [3] Kwon Y, Yu S, Lee H, et al. Arabidopsis serine decarboxylase mutants implicate the roles of ethanolamine in plant growth and development [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(12): 3176-3188
- [4] Jiang S, Kumar S, Eu Y J, et al. The Arabidopsis mutant, *fy-1*, has an ABA-insensitive germination phenotype[J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(7): 2693-2703
- [5] Fujii H, Verslues P E, Zhu J. Arabidopsis decuple mutant reveals the importance of SnRK2 kinases in osmotic stress responses in vivo[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011, 108(4): 1717-1722
- [6] Zhu J. Plant salt tolerance[J]. Trends in Plant Science, 2001, 6(2): 66-71
- [7] Sutton F, Chen D, Ge X, et al. Cbf genes of the Fr-A2 allele are differentially regulated between long-term cold acclimated crown tissue of freeze-resistant and susceptible, winter wheat mutant lines[J]. BMC Plant Biology, 2009, 9(1): 34
- [8] Krishnan A, Guiderdoni E, An G, et al. Mutant resources in rice for functional genomics of the grasses [J]. Plant Physiology, 2009, 149(1): 165-170
- [9] Hirochika H, Guiderdoni E, An G, et al. Rice mutant resources for gene discovery[J]. Plant Molecular Biology, 2004, 54(3): 325-334
- [10] 孟楠, 刘月学, 孙立茹, 等. 农杆菌注射法转化草莓果实细胞的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2009(4): 404-407
- [11] Fu D, Zhu B, Zhu H, et al. Virus-induced gene silencing in tomato fruit[J]. The Plant Journal, 2005, 43(2): 299-308
- [12] 李曜东, 顾淑荣, 魏玉凝, 等. 转反义 PG 基因番茄果实细胞结构变化的研究[J]. 植物学通报, 2002(3): 348-353
- [13] Li Y Y, Mao K, Zhao C, et al. MdCOP1 Ubiquitin E3 ligases interact with MdMYB1 to regulate light-induced anthocyanin biosynthesis and red fruit coloration in apple [J]. Plant Physiology, 2012, 160(2): 1011-1022
- [14] Yao Y, Li M, Zhai H, et al. Isolation and characterization of an apple cytosolic malate dehydrogenase gene reveal its function in malate synthesis[J]. Journal of Plant Physiology, 2011, 168(5): 474-480
- [15] Goulao L F, Oliveira C M. Molecular identification of novel differentially expressed mRNAs up-regulated during ripening of apples[J]. Plant Science, 2007, 172(2): 306-318
- [16] Wang A, Tan D, Takahashi A, et al. MdERFs, two ethylene-response factors involved in apple fruit ripening[J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(13): 3743-3748
- [17] Nakata M, Mitsuda N, Herde M, et al. A bHLH-type transcription factor, ABA-inducible BHLH-type transcription factor/JA-associated MYC2-like1, acts as a repressor to negatively regulate jasmonate signaling in arabidopsis[J]. The Plant Cell, 2013, 25(5): 1641-1656
- [18] Li B, Zhao Y, Liang L, et al. Purification and characterization of ZmRIP1, a novel reductant-inhibited protein tyrosine phosphatase from maize[J]. Plant Physiology, 2012, 159(2): 671-681
- [19] Fujii H, Chinnusamy V, Rodrigues A, et al. *In vitro* reconstitution of an abscisic acid signalling pathway [J]. Nature, 2009, 462(7273): 660-664
- [20] Yoo S, Cho Y, Sheen J. Arabidopsis mesophyll protoplasts: A versatile cell system for transient gene expression analysis[J]. Nature Protocols, 2007, 2(7): 1565-1572
- [21] 刘晓光, 赵锦, 刘孟军, 等. 果树原生质体培养研究进展[J]. 分子植物育种, 2005(6): 143-148