

# APX 基因植物表达双元载体的构建及转化剑麻

覃海燕<sup>1</sup>, 徐洪伟<sup>1</sup>, 高建明<sup>3</sup>, 鹿志伟<sup>1</sup>, 莫廷辉<sup>1\*</sup>, 易克贤<sup>2\*</sup>

1 海南大学农学院, 海南海口 570228

2 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海南海口 571101

3 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101

**摘要** 剑麻是中国热带地区最重要的麻类经济作物。剑麻 H.11648 是中国唯一的当家品种, 此品种虽高产但易感斑马纹病, 而现有的化学农药防效差且病原菌易产生抗性。为了培育出剑麻抗病新品种, 以 Pcambia3300 为基础质粒, 构建由 35S 驱动的 APX 基因的植物表达载体 Pcambia3300-35S-APX-nos, 再通过农杆菌 EHA105 将其导入剑麻中, 经 PCR 扩增后电泳检测分析, 结果表明外源基因已整合到受体植物基因组中。

**关键词** 剑麻; APX 基因; 斑马纹病; 转化

中图分类号 S563.8

文献标识码 A

## Construction of APX Gene Plant Binary Expression Vector and Transformation of Sisal

QIN Haiyan<sup>1</sup>, XU Hongwei<sup>1</sup>, GAO Jianming<sup>3</sup>, LU Zhiwei<sup>1</sup>, MO Tinghui<sup>1\*</sup>, YI Kexian<sup>2\*</sup>

1 College of Agriculture, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China

2 Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China

3 Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China

**Abstract** Sisal is one of the most important cash crops in the tropical areas of China. Sisal H. 11648 is China's only variety dominantly planted. The variety is of high yield but susceptible to zebra grain, and the control effect of chemical pesticides is poor and the pathogens are prone to resistance. In order to breed new sisal disease-resistant varieties, *Agrobacterium*-mediated APX gene transformation of sisal was tried. On the basis of Pcambia 3300 plasmid, an APX's plant expression vector Pcambia-3300-APX which driven by 35S was built and transformed to sisal by agrobacterium EHA105. PCR amplification and electrophoresis detection analysis showed that the exogenous gene was integrated into the receptor plant genome.

**Key words** Sisal; APX; Zebra disease; Transformation

**doi** 10.3969/j.issn.1000-2561.2015.06.016

龙舌兰科植物共有 21 属约 670 种, 龙舌兰麻系是龙舌兰科所属单子叶植物的统称, 俗称剑麻, 英文名 Sisal。剑麻主要分布于热带、亚热带地区。中国是剑麻的主要生产国之一, 中国现在的主栽品种为 11648 号 (Agave hybrid NO.11648, 简称为 H.11648)。剑麻 H.11648 是中国从国外引进的杂交种, 虽高产但易感斑马纹病。剑麻斑马纹病是危害剑麻的主要病害之一, 由烟草疫霉 (*Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*) 引起。1961 年坦桑尼亚首先发现此病, 中国 1970 年首次在广东省东方红农场出现此病, 1973 年暴发流行, 此

后持续流行, 造成严重损失。因烟草疫霉对现存的药剂能够很快的产生耐药性, 目前生产上正在使用的杀菌剂很难有效防治斑马纹病, 因此急需选育剑麻抗病新种质。剑麻一生只开一次花, 开花结果后死亡, 其营养生长周期长, 一般为 10 a, 有的甚至长达 15 a 以上, 且花期不一致、花粉不易贮藏、种子发芽率低 (一般在 10% 左右)、F<sub>1</sub> 育性差等特点, 从而导致近几十年来通过杂交育种、辐射育种等方法虽然也育成了一些品种, 但还未超越 H.11648。基因工程育种能够打破物种间的界限, 将其他物种中优良的基因导入剑麻中对其进行定向改良。

收稿日期 2014-12-08

修回日期 2015-01-25

基金项目 利用转基因技术创制抗斑马纹病剑麻新种质的研究 (No. 31371679)。

作者简介 覃海燕 (1989 年—), 女, 硕士研究生; 研究方向: 作物遗传育种。\* 通讯作者 (Corresponding author): 莫廷辉 (MO Tinghui),

E-mail: 1112409mth@163.com; 易克贤 (YI Kexian), E-mail: yikexian@21cn.com。

抗坏血酸过氧化物酶(Ascorbate peroxidase, 以下简称为APX)广泛存在于各种植物体中。植物体无论是在正常的生物代谢还是在受到生物胁迫或非生物胁迫时都会产生大量的过氧化物,过氧化物若不及时清除会造成植物细胞膜和叶绿体的损伤,甚至造成植物死亡。抗坏血酸过氧化物酶通过清除植物体中的过氧化物来提高植物对生物和非生物胁迫的抵抗能力。张怡<sup>[1]</sup>通过突变筛选得到 APX 基因超表达植株,表明 APX 基因的超表达能够提高植物抵抗环境胁迫的能力。程林梅等<sup>[2]</sup>和孙卫红等<sup>[3]</sup>通过将 APX 基因转入菊苣和烟草中,结果显示转基因植株的抗逆性提高。孙宏丽<sup>[4]</sup>通过构建反义载体并转入烟草中,得到的转基因植株抗氧化能力降低。蒋明等<sup>[5]</sup>通过对青花菜 APX 基因进行 RT-PCR 分析,结果表明 APX 基因的表达受霜霉病菌、水杨酸和 NaCl 诱导。Sarowar 等<sup>[6-7]</sup>将来自于胡椒叶片的抗坏血酸过氧化物酶基因(ascorbate peroxidase-like 1)导入烟草,极大地提高了植物抵抗烟草疫霉的能力,并在次年发现番茄中的过氧化物酶基因能够抵抗卵菌型的病原体。

鉴于此,本实验拟通过将胡椒叶片中的 APX 基因插入 Pcambia3300 载体并转入剑麻中,从而获得既抗剑麻斑马纹病,又抗除草剂的植株。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

Pbi121 表达载体、Pcambia3300 表达载体和农杆菌 EHA105 均由中国热带农业科学院生物技术研究 所张树珍实验室提供,Puc57-APX 由本实验室保存。限制性内切酶为 fragment 公司产品,DNA 聚合酶为 NEB 公司产品,其他产品均由市售分析纯试剂。

### 1.2 方 法

1.2.1 Pcambia3300-APX 表达载体的构建 (1) pbi121-APX 的构建:设计引物对 5'-GCTCTAGAGCA CGAGGTCGGTCTCTCTC-3'和 5'-TCGAGCTCCCTC CAAAGTATGGGTATC-3'(引物中下划线部分表示 Xba 和 Sac 酶切位点),以 Puc57-APX 载体为模板,PCR 扩增获得目的基因 APX。上述 PCR 产物用 Xba 和 Sac 进行双酶切,并利用 PCR 产物回收试剂盒回收片段。pbi121 质粒用 Xba 和 Sac 进行双酶切,电泳后进行胶回收(pbi121 回收大片段)。将上述 2 个片段用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶进行连接,热激法转入大肠杆菌中,挑取单克隆进行扩繁,提取质粒进行双酶切验证,挑取阳性克隆送公司测序。

(2)Pcambia3300-35S-APX-nos 表达载体的构建:设计引物对 5'-ATCCCCGGGCATGGAGTCAAA GATTCAAATAGAG-3'和 5'-CCCAAGCTTCCCGATC TAGTAACATAGATGACAC-3'(引物中下划线部分表示 Hind 和 Sma 酶切位点),以 pbi121-apx 载体为模板,PCR 扩增获得 35S-APX-nos 的全长。将上述 PCR 产物和 Pcambia3300 分别用 Hind 和 Sma 进行双酶切,用 PCR 产物回收试剂盒回收 35S-APX-nos 片段(约 2 kb),Pcambia3300 回收片段(约 8.4 kb),将 2 个回收片段经 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接,热激法转入大肠杆菌中,挑取单克隆进行扩繁,提取质粒进行双酶切验证,挑取阳性克隆送公司测序。

(3)表达载体转入农杆菌:将重组表达载体 Pcambia3300-35S-APX-nos 经液氮冻融法转入到农杆菌 EHA105 中,用含有 50 mg/L 卡那霉素、50 mg/L 利福平和 50 mg/L 链霉素的 YEP 平板进行筛选,提取质粒经双酶切验证,显示阳性的菌液经 -70 ℃液氮速冻保存,备用。

1.2.2 剑麻的遗传转化 (1)转化菌液的制备:将含有 Pcambia3300 空载体的农杆菌从 -70 ℃液氮速冻中取出涂布于含有抗生素(50 mg/L 卡那霉素、50 mg/L 利福平和 50 mg/L 链霉素)YEP 平板进行活化,2 d 后挑取单菌落接种于含有抗生素(50 mg/L 卡那霉素、50 mg/L 利福平和 50 mg/L 链霉素)YEP 液体培养基中,经 28 ℃、200 r/min 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 为对数期时备用。

(2)影响剑麻遗传转化的因素:取剑麻组培苗的茎尖,放入剑麻愈伤诱导培养基中诱导生成愈伤。将愈伤切成 0.5 cm<sup>3</sup> 大小,预培养 3 d(暗培养)后,在农杆菌菌液(菌液 OD 为 0.4)中浸泡 15 min。取出外植体用滤纸吸干多余的菌液,置于共培养基中共培养 3 d(暗培养)。将转化后的剑麻愈伤组织经无菌水清洗 3 次,再用含有 200 mg/L 的 timentin 的无菌水清洗 3 次。转入筛选培养基中筛选 3 轮(每轮 15 d),最后统计抗性愈伤率。所有培养基均经过 121 ℃高压灭菌 20 min,且抗生素通过无菌 22 μm 滤膜过滤除菌(表 1)。

对于转化的影响因素,设计了 7 组试验:①预培养时间:1、2、3、4 d;②农杆菌菌液浓度、侵染时间和抗坏血酸的影响:设计了 3 因子 3 因素的正交试验(表 2);③表面活性剂的影响:在感染液中添加 0、0.01%、0.1%、1% (V/V) 的 tween20;④共培养温度:19、22、25、28 ℃;⑤共培养时间:2、3、4、5 d;⑥干燥处理:侵染后直接放入

表 1 农杆菌介导剑麻转化所使用的培养基

Table 1 The medium of *Agrobacterium*-mediated transformation of sisal

培养基	培养基成分
YEP 培养基	氯化钠(5 g/L)、蛋白胨(10 g/L)、酵母提取物(10 g/L), 液体不加琼脂, 固体培养基加 15 g/L 的琼脂, pH7.0
愈伤诱导培养基 <sup>[8]</sup>	SH+3 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+0.1 mg/L 2,4-D+30 g/L 蔗糖, 固体培养基加入 6.5 g/L 卡拉胶, pH5.8
预培养基	SH+2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+0.1 mg/L 2,4-D+30 g/L 蔗糖+200 μmol/L AS <sup>[9]</sup> , 固体培养基加入 6.5 g/L 卡拉胶, pH5.8
共培养基	SH+2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+0.1 mg/L 2,4-D+30 g/L 蔗糖+200 μmol/L AS+50 mg/L Vc, 固体培养基加入 6.5 g/L 卡拉胶, pH5.6
筛选培养基	SH+2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+0.1 mg/L 2,4-D+30 g/L 蔗糖+200 mg/L timentin <sup>[9]</sup> , 固体培养基加入 6.5 g/L 卡拉胶, pH5.8。PPT 的浓度视情况不等: 0.5、1.5、2.5 mg/L <sup>[9]</sup>
生根培养基 <sup>[8]</sup>	SH+ 0.1 g/L IAA+200 mg/L timentin, 固体培养基加入 6.5 g/L 卡拉胶, pH5.8

表 2 农杆菌菌液浓度、侵染时间和抗坏血酸 3 因子 3 因素的正交表

Table 2 The orthogonal table of *Agrobacterium* bacterial concentration, infection time and ascorbic acid

试验组	农杆菌菌液浓度(OD值)	侵染时间/min	抗坏血酸/(mg/L)
1	0.4	15	0
2	0.4	25	25
3	0.4	35	50
4	0.5	15	25
5	0.5	25	50
6	0.5	35	0
7	0.6	15	50
8	0.6	25	0
9	0.6	35	25

共培养基中, 在超净工作台中处理 30、60 min 后, 再放入共培养基中培养; ⑦滤纸的使用: 在共培养基上加滤纸和不加滤纸 2 种处理。其它所有剑麻组培过程均在 28 ℃, 光照强度 3, 光照时间 16 h/d 条件下进行。

(3) 剑麻的遗传转化。转化菌液的制备: 将含有 APX 基因的农杆菌从 -70 ℃ 中取出, 涂布于含有抗生素 (50 mg/L 卡那霉素、50 mg/L 利福平和 50 mg/L 链霉素) YEP 平板进行活化, 2 d 后挑取单菌落接种于含有抗生素 (50 mg/L 卡那霉素、50 mg/L 利福平和 50 mg/L 链霉素) YEP 液体培养基中, 经 28 ℃、200 r/min 振荡培养至  $OD_{600}$  为 0.5 时备用。再按 1.2.2 (2) 优化的剑麻遗传转化体系, 用含有 APX 基因的农杆菌侵染剑麻愈伤组织 100 个, 得到分化的小苗。

(4) 抗性植株的 PCR: 提取再生植株叶的总 DNA 并以其作为模板, 利用引物 1 (5'-ATCCCCGGG CATGGAGTCAAAGATTCAAATAGAG-3') 和引物 2 (5'-CCCAAGCTTCCCGATCTAGTAACATAGATGAC AC-3') 进行 PCR 扩增, PCR 程序为: 2xPCRmix

12.5 μL, 引物 1 (10 μm) 和引物 2 (10 μm) 各位 1.0 μL, Template 1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 9.5 μL, 总体积 25.0 μL。最后扩增得到的片段大小为 1 102 bp。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组 Pcambia3300-35S-APX-nos 载体的酶切验证

剑麻叶片顶端带刺, 田间除草不便; 将 APX 基因插入 PCAMBIA3300 表达载体 (含 *Bar* 基因) 中 (图 1), 从而得到既抗病又抗除草剂的剑麻植株。

由图 2 可知, 重组 pbi121-APX 载体经 PCR 扩增和双酶切验证, 结果显示, APX 基因已插入到 pbi121 载体中。由图 3 可知, 重组 Pcambia3300-35S-APX-nos 载体经 PCR 扩增和双酶切验证, 结果显示, 35S-APX-nos 片段已插入到 Pcambia3300 质粒中。

### 2.2 表达载体转入农杆菌的双酶切验证

提取转化农杆菌的质粒进行双酶切验证, 结果见图 4, 说明该重组表达载体已成功转入到农杆菌 EHA105 中。

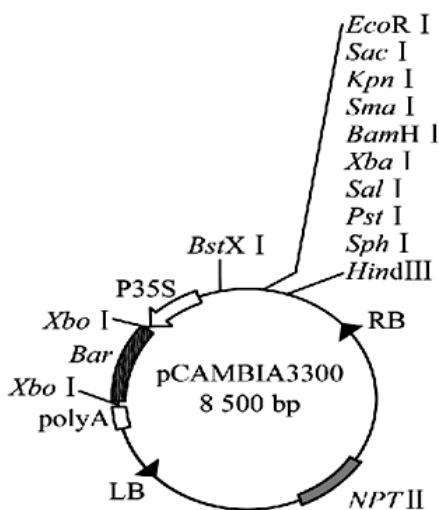


图 1 PCAMBIA3300 载体构建图

Fig. 1 PCAMBIA3300 vector map

### 2.3 转化影响因素

2.3.1 预培养时间对转化的影响 由图 5 可知, 预培养 2 d 时, 得到的抗性愈伤率最高。

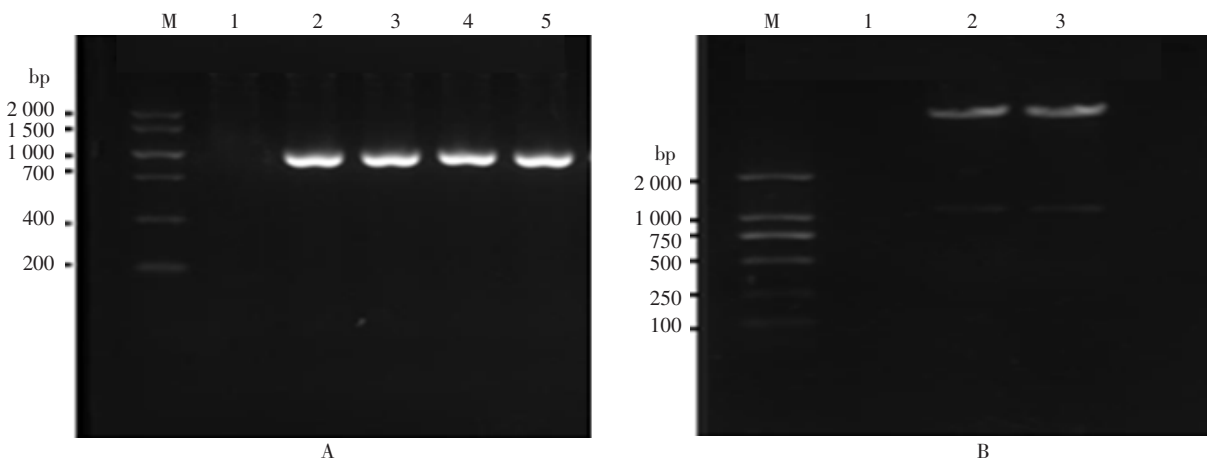
2.3.2 农杆菌菌液浓度、侵染时间和抗坏血酸对转化的影响 由图 6 可知, 在农杆菌菌液浓度 OD 值 0.5、侵染时间 25 min 和抗坏血酸 50 mg/L 时, 得到的抗性愈伤率最高。

2.3.3 表面活性剂对转化的影响 由图 7 可知, 当在感染液中加入 0.10% 的 Tween20 时, 得到的抗性愈伤率最高。

2.3.4 共培养温度对转化的影响 由图 8 可知, 当共培养温度为 22 °C 时, 抗性愈伤率最高。

2.3.5 共培养时间对转化的影响 由图 9 可知, 当共培养时间为 4 d 时, 得到的抗性愈伤率最高。

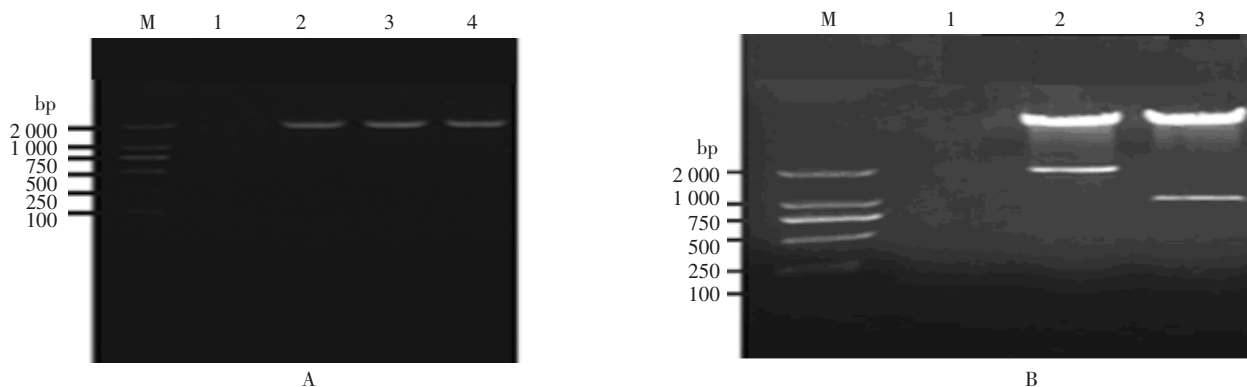
2.3.6 干燥处理对转化的影响 由图 10 可知, 当



A: M. LG 2 000 Marker; 2~5. 重组质粒。 B: M. DL 2 000 Marker; 2~3. 重组质粒。  
A: M. LG 2 000 Marker; 2~5. Recombinant plasmid. B: M. DL 2 000 Marker; 2~3. Recombinant plasmid.

图 2 APX 基因的 PCR 扩增 (A) 和 pbi121-APX 双酶切验证 (B)

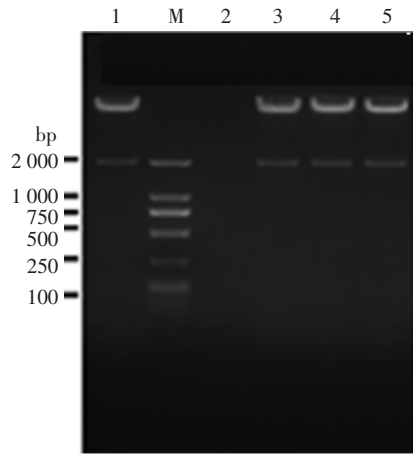
Fig. 2 PCR amplification of APX gene (A) and double enzyme validation of pbi121-APX (B)



A: M. DL 2 000 Marker; 2~4. 重组质粒。 B: M. DL 2 000 Marker; 2~3. 重组质粒, 分别用 Hind<sup>III</sup>、Sma<sup>I</sup> 和 Xba<sup>I</sup>、Sac<sup>I</sup> 双酶切。  
A: M. DL 2 000 Marker; 2~4. Recombinant plasmid. B: M. DL 2 000 Marker; 2~3. Recombinant plasmid, double enzyme cut with Hind<sup>III</sup>, Sma<sup>I</sup> and Xba<sup>I</sup>, Sac<sup>I</sup>, respectively.

图 3 35S-APX-nos 片段 PCR 扩增 (A) 和 Pcambia3300-35S-APX-nos 载体双酶切验证 (B)

Fig. 3 PCR amplification of 35S-APX-nos segments (A) and double enzyme validation Pcambia3300-35S-APX-nos carrier (B)



M. DL2000 Marker; 3-5. 重组质粒。  
M. DL2000 Marker; 3-5. Recombinant plasmid.

图 4 P<sub>cambia3300-35S-APX-nos</sub> 重组质粒  
转入农杆菌的双酶切验证

Fig. 4 Double enzyme validation of P<sub>cambia3300-35S-APX-nos</sub> recombinant plasmid into *Agrobacterium*

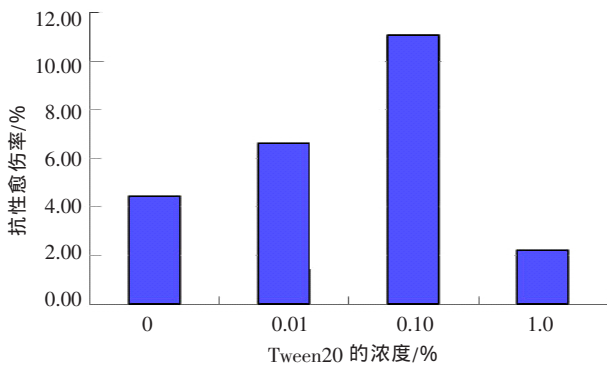


图 7 表面活性剂对转化的影响

Fig. 7 The influence of surfactants on conversion

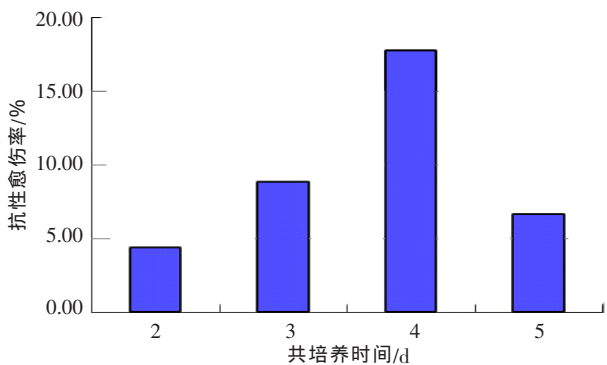


图 9 共培养时间对转化的影响

Fig. 9 The influence of co-culture time on conversion

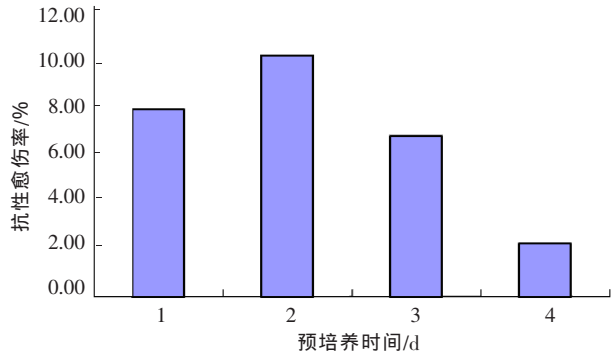


图 5 预培养时间对转化的影响

Fig. 5 The influence of pre-incubation time on conversion

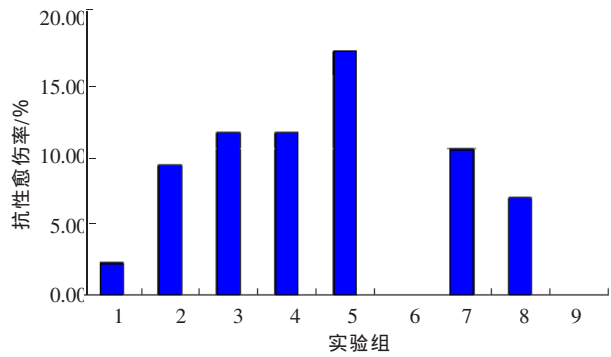


图 6 农杆菌菌液浓度、侵染时间和抗坏血酸对转化的影响

Fig. 6 The influence of *Agrobacterium bacterial* concentration, infection time and ascorbic acid on conversion

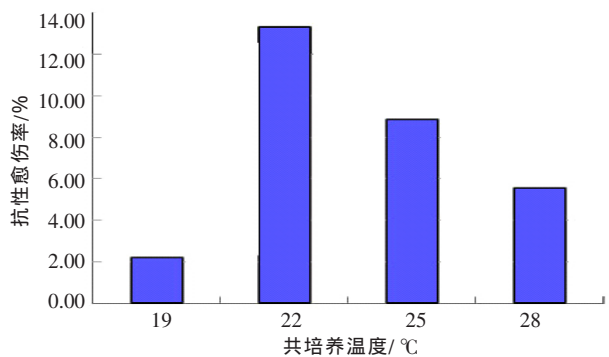


图 8 共培养温度对转化的影响

Fig. 8 The influence of co-culture temperature on conversion

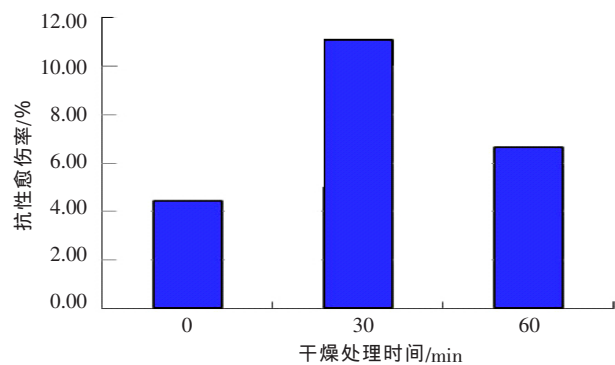


图 10 干燥处理对转化的影响

Fig. 10 The influence of dry processing on conversion

干燥处理为 30 min 时, 得到的抗性愈伤率最高。

2.3.7 滤纸的使用对转化的影响 由图 11 可知, 共培养时, 在培养基上加上滤纸可得到较高的抗性愈伤率。

2.4 剑麻的遗传转化 用农杆菌侵染剑麻愈伤 100 个, 结果得到 38 个抗性愈伤, 其转化率为 38%; 得到抗 PPT 的小苗 51 株, 经 PCR 扩增验证, 含 APX 基因的阳性植株有 19 株, 说明 APX 基因的阳性转化率为 37.25%(图12)。

### 2.5 转基因植株的 PCR 验证

部分转基因剑麻的 PCR 验证见图 13, 结果显示 APX 基因已转入剑麻中。

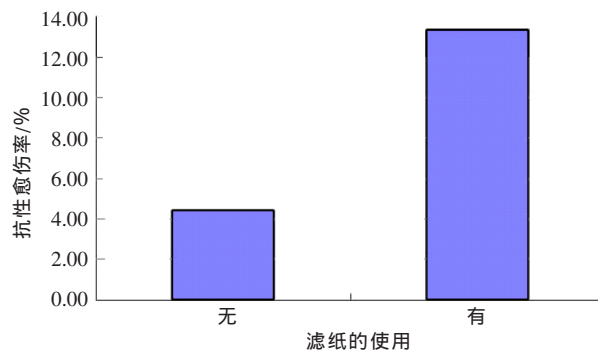
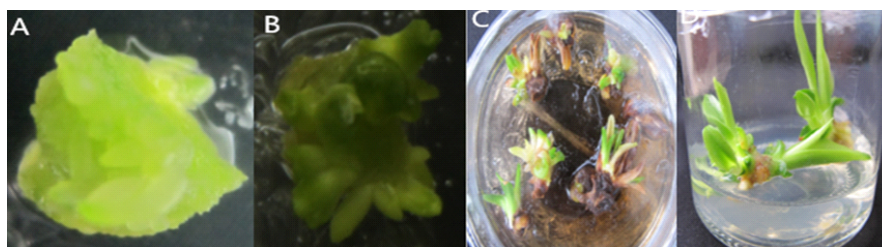


图 11 滤纸的使用对转化的影响

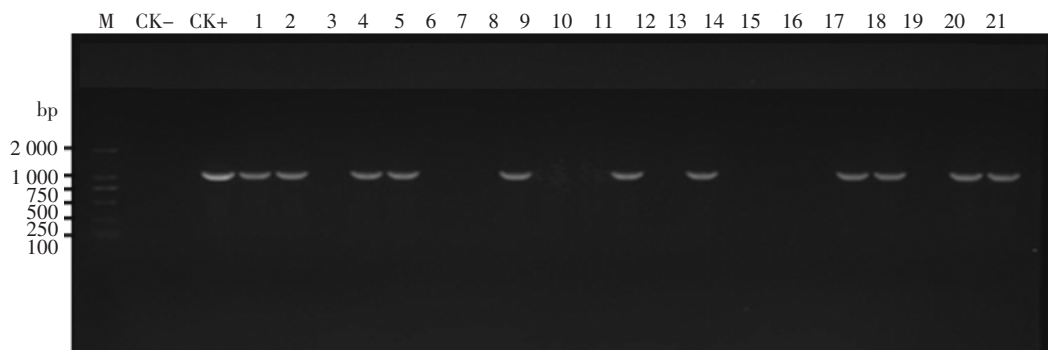
Fig. 11 The influence of filter paper on conversion



A: 剑麻愈伤; B: 愈伤分化; C: PPT 筛选; D: 抗 PPT 的剑麻小苗。  
A: Sisal callus; B: Sisal callus differentiation; C: PPT screening; D: The sisal seedlings with anti PPT.

图 12 剑麻的遗传转化

Fig. 12 Transformation of Sisal



M: DL 2 000 Marker; CK-: 非转基因植株; CK+: 重组阳性质粒; 1-21: 转基因植株的 PCR 结果。

M: DL 2 000 Marker; CK-: Non- transgenic plant; CK+ : Recombinant plasmid; 1-21: Transgenic plants of PCR results.

图 13 转基因植株的 PCR 验证

Fig. 13 PCR verification of transgenic plants

## 3 讨论与结论

已有研究结果表明, 外植体进行适当时间的预培养有利于提高外源基因的转化效率<sup>[10-12]</sup>。共培养是植物转化最关键的时期, T-DNA 的转移和整合均在该时期完成<sup>[13]</sup>。如果共培养时间短, 外源基因不能有效的整合到植物中; 如果过长, 则会因农杆菌的过度生长而导致外植体死亡或后期不能很好的

去除农杆菌。农杆菌在侵染外植体时会造成外植体的过敏反应, 从而褐化, 甚至死亡, 在侵染液和共培养基中加入适当浓度的 Vc 能够有效的降低农杆菌对外植体造成的伤害<sup>[14]</sup>。在共培养时, 在共培养基上加上滤纸能够有效的抑制农杆菌的生长, 且有利于后期农杆菌的去除<sup>[15-16]</sup>。已有研究结果表明, 对于剑麻愈伤的遗传转化, 外植体预培养 3 d、

$OD_{600}$  为 0.6、侵染 10 min 时，获得的转化率为 23%<sup>[9]</sup>。本实验在前人的研究基础上，系统的优化了农杆菌介导剑麻遗传转化的条件，从而得到了更高的转化率<sup>[9]</sup>。

参考文献

[1] 张 怡. 水稻OsAPXZ抗坏血酸过氧化物酶基因功能及抗逆性分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.

[2] 程林梅, 孙 毅, 张丽君. 转抗坏血酸过氧化物酶基因(APX)菊苣抗旱相关生理特性[J]. 西北农业学报, 2013, 22(6): 124-130.

[3] 孙卫红, 陈相燕, 杜 斌, 等. 过量表达番茄类囊体膜抗坏血酸过氧化物酶基因(*SlAPX*)提高了烟草种苗的抗氧化能力[J]. 植物生理学报, 2011, 47(6): 613-618.

[4] 孙宏丽. 反义表达基因对植物抗逆能力的影响[D]. 济南: 山东师范大学, 2012.

[5] 蒋 明, 张志仙, 袁菱婧. 青花菜抗坏血酸过氧化物酶基因*BoAPX2*的克隆与表达分析[J]. 植物病理学报, 2012, 42(4): 374-380.

[6] Sarowar S, Kim E N, Kim Y J, *et al.* Overexpression of a pepper ascorbate peroxidase-like1 gene in tobacco plants enhances tolerance to oxidative stress and pathogens[J]. Plant Science, 2005, 169(1): 55-63.

[7] Sarowar S, Kim Y J, Kim E N, *et al.* Constitutive expression of two pathogenesis-related genes in tomato plants enhanced resistance to oomycete pathogen *Phytophthora capsici*[J]. Plant Science, 2006, 170(1): 7-14.

[8] 杨 峰, 刘巧莲, 代真真. 不同基本培养基和外植体对剑麻愈伤组织诱导及分化的影响[J]. 热带作物学报, 2012, 33(3): 475-478.

[9] Gao J M, Yang F, Zhang S Q, *et al.* Expression of a hevein-like gene in transgenic Agave hybrid No.11648 enhances tolerance against zebra stripe disease [J]. Journal of Plant Biotechnology, 2014, 22(1): 1-9.

[10] 吴关庭. 农杆菌介导高羊茅遗传转化体系的建立及CBF耐逆相关基因的导入[D]. 杭州: 浙江大学, 2004.

[11] 刘宏波. 甘蓝型油菜抗病虫基因遗传转化及转基因植株抗性鉴定的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2010.

[12] 朱海生. 草葛乙烯受体反义基因遗传转化的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2008.

[13] 王会强. 根癌农杆菌介导的花青素调节基因*Lc-NtAn2*转化烟草的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.

[14] 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.

[15] 陶丽莉. 小麦幼胚农杆菌转化体系优化和*HMW-GS*基因转化研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009.

[16] 丁 焱. DFL在甘菊中的转化与表达研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2009.

责任编辑: 黄东杰