

新疆杨高效遗传转化系统的建立

诸葛强, 王婕琛, 陈英, 黄敏仁, 王明麻

(南京林业大学林木遗传和基因工程重点实验室, 江苏 南京 210037)

摘要: 选择新疆杨 (*Populus alba* L. var. *pyramidalis* Bge.) 为遗传转化受体材料, 为建立根癌农杆菌介导新疆杨高效遗传转化系统, 从预培养时间、侵染时间、共培养时间、添加乙酰丁香酮 (AS) 的时机、共培养培养基中添加乙酰丁香酮浓度、侵染菌液的制备方法、外植体继代方式等 7 个方面优化筛选。结果显示较合适的转化系统为: 预培养 8 h, 农杆菌菌液 ($OD_{600} = 0.4$) 侵染 15 min, 共培养 5 d, 侵染菌液的最优制备方法是液体培养活化农杆菌 2 次加离心收集菌体重悬, 共培养培养基中添加乙酰丁香酮 $80 \mu\text{mol/L}$ 。新疆杨叶盘转化频率可达 38.10%。

关键词: 新疆杨; 根癌农杆菌; 转化

中图分类号: Q943.2; S792.119 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2003)04-0006-05

Establishment of system with high frequency for genetic transformation of *Populus alba* var. *pyramidalis* ZHUGE Qiang, WANG Jie-chen, CHEN Ying, HUANG Min-ren, WANG Ming-xiu (Laboratory of Forest Genetics and Gene Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2003, 12(4): 6-10

Abstract: Several factors affecting transformation of *Populus alba* L. var. *pyramidalis* Bge. were studied by infecting with *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, such as pre-culture time, infection time, co-culture time, acetosyringone (AS) appending method, AS concentration in the co-culture medium, bacterium liquid preparation method, explants state. An effective protocol in optimized conditions which were 8 h for pre-culture, 15 min for infection, 5 d for co-culture and dosage $80 \mu\text{mol/L}$ AS in co-culture medium for transformation of leaf discs of *P. alba* var. *pyramidalis* was developed and the frequency of transformation reached to 38.10%.

Key words: *Populus alba* L. var. *pyramidalis* Bge.; *Agrobacterium tumefaciens*; transformation

新疆杨 (*Populus alba* L. var. *pyramidalis* Bge.) 是我国西部地区的重要树种之一^[1]。新疆杨虽适合西北部地区种植, 但易遭白杨透翅蛾、杨毒蛾等食叶害虫危害, 随着环境的不断恶化, 自然灾害的频繁发生, 虫害日益严重。自 1987 年 Fillatti^[2] 等首次获得抗除草剂杨树基因工程植株以来, 杨树遗传转化研究已取得了较大进展。白杨派已有银白杨的一些派间杂交种^[3-5]、毛白杨^[6] 等获得了转基因植株。但目前尚未有新疆杨高效遗传转化系统建立报道。本研究通过影响新疆杨遗传转化效果的因素筛选试验, 优化其遗传转化条件, 建立高效的新疆杨遗传转化系统, 为利用基因工程技术培育新疆杨抗逆新品种提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

新疆杨穗条由新疆准噶尔生态公司提供。实验

材料为新疆杨的脱毒无菌苗, 由南京林业大学林木遗传和基因工程重点实验室保存, 以根部萌蘖芽方式增值继代, 继代培养基为 1/2MS。

1.2 质粒和菌株

豇豆胰蛋白酶抑制剂 (*CpTI*) 基因表达载体 LBA4404(pFZY1) 由中国农业科学院生物技术研究所范云六院士研究小组提供。

1.3 培养基

基本培养基: 1/2MS;

叶盘分化培养基 (T): 1/2MS + Thidiazuron (TDZ) 0.005 mg/L + 6-BA 0.25 mg/L + IAA 0.5 mg/L ;

收稿日期: 2003-06-13

基金项目: 国家研究与开发专项 (JY03-B-25) 和江苏省高新技术资助项目 (BG2001313)

作者简介: 诸葛强 (1959-), 男, 江苏江阴人, 博士, 副教授, 主要从事林木遗传育种。

叶盘分化初次筛选培养基(T1): T + 头孢霉素 (Cef) 50 mg/L + 卡那霉素(Km) 15 mg/L;

叶盘分化二次筛选培养基(T2): T + Cef 50 mg/L + Km 20 mg/L。

1.4 转化方法

参照 Horsch 的叶盘法^[7]。取苗龄4周的无茵苗第3~5片叶,大小、形状和色泽基本一致。去叶缘,剪成0.7 cm²的叶盘,置于T培养基预培养2 d。挑取农杆菌LBA4404(pFZY1)单菌落接种到YEB液体培养基中培养(220 r/min);次日取0.5~1.0 mL转接至25 mL YEB液体培养基中,离心收集菌体,取适当MS液体培养基悬浮菌体至OD₆₀₀ = 0.4左右备用。将预培养后的叶盘浸入侵染菌液,充分浸泡15 min左右,在无茵滤纸上吸去菌液,放回T培养基共培养。暗中共培养3 d后,叶盘洗涤3次以除去农杆菌,转移到T1筛选培养基,2周后换用T2筛选培养基,至分化出Km^r(Kanamycin-resistant)芽。

1.5 影响根癌农杆菌转化新疆杨效果的因素筛选

1.5.1 预培养时间 叶盘侵染前,分别预培养8、24、48和72 h,其余操作同上。

1.5.2 侵染时间 在OD₆₀₀ = 0.4左右的菌液中分别侵染5、15、30和45 min,其余操作同上。

1.5.3 共培养时间 侵染外植体分别共培养2、3、4和5 d,其余操作同上。

1.5.4 添加乙酰丁香酮的时机 共设计4种处理:CK:未添加乙酰丁香酮;AS1:在侵染菌液中添加乙酰丁香酮200 μmol/L;AS2:在共培养基中添加乙酰丁香酮200 μmol/L;AS3:在侵染菌液和共培养基中均添加乙酰丁香酮200 μmol/L。

1.5.5 共培养培养基中添加乙酰丁香酮浓度 在共培养培养基中分别添加乙酰丁香酮0、50、100和200 μmol/L,其余操作同上。

1.5.6 侵染菌液的制备方法 共设计4种处理:
a. 液体培养活化农杆菌1次;b. 液体培养活化农杆菌2次;c. 液体培养活化农杆菌2次加离心收集菌体重悬;d. 液体培养活化农杆菌2次加离心收集菌体重悬再培养2 h。

1.5.7 外植体继代方式 均为离体继代16个月的外植体,但继代方式不同:A.每1个月继代1次,每次取顶芽继代;B.每1.5月继代1次,每次取根部萌蘖芽继代。

1.5.8 评价指标 以叶盘移入筛选培养基6周后

Km^r芽的产生频率为评价指标。转化频率为:转化频率(%) = (再生Km^r芽的叶盘数/接种叶盘数) × 100%。

2 结果和分析

2.1 预培养时间对新疆杨产生Km^r芽的影响

在植物遗传转化中预培养的主要作用是促进细胞分裂,分裂状态的细胞更易整合外源DNA,提高转化率。本实验结果表明(见表1),随着预培养时间的延长,新疆杨的转化频率降低,预培养8 h转化频率最高,为17.4%。杨属植物预培养时间一般较短。Confalonieri^[8]等转化欧洲黑杨(*Populus nigra* L.)的实验表明,无预培养或预培养1 d,对欧洲黑杨的转化率没有显著影响;Confalonieri等^[9]研究欧美杨(*Populus euramericana* Neva.)和美洲黑杨(*Populus deltoides* Marsh.)的转化时,采用预培养24 h的处理;其他植物,如亚麻(*Linum usitatissimum* L.)下胚轴转化,曾报道预培养12 d为最佳处理^[10]。说明杨属植物叶片分化较快,预培养时间可能较短。实验中也观察到新疆杨叶盘分化较快,未加抗生素11 d时,就可见叶盘切口处有绿色芽点露头。预培养时间过长,可能造成植物细胞再次由脱分化状态进入分化状态,反而妨碍外源DNA的进入和整合。

表1 预培养时间对新疆杨产生Km^r芽的影响

Table 1 Effect of pre-culture time on producing Km^r shoot of *Populus alba* L. var. *pyramidalis* Bge.

预培养时间 Time for pre-culture (h)	供试叶盘数 Number of leaf disc explants	产生 Km ^r 芽的叶盘数 Number of leaf disc explants producing Km ^r shoots	产生 Km ^r 芽的频率 Rate of the explants producing Km ^r shoots(%)
8	92	16	17.4
24	97	5	5.2
48	87	4	4.4
72	108	5	3.6

2.2 农杆菌侵染时间对新疆杨产生Km^r芽的影响

本实验采用4种菌液侵染时间处理,结果显示(表2),叶盘侵染15 min稍优于其他处理,差异不显著。据报道在杨属植物的遗传转化实验中,采用的菌液浓度和侵染时间有很大差异。Leple等^[3]用农杆菌转化杨树杂种(*Populus tremula* L. × *P. alba* L.)时,采用OD₆₀₀ = 0.3的菌液侵染缓慢搅拌16 h;郝贵霞^[11]在研究毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.)的

转化时,认为用 $OD_{600} = 0.2 \sim 0.4$ 的菌液侵染 10 ~ 20 min 最佳。子叶和胚轴对农杆菌比较敏感,宜采取较低的菌液浓度和较短的侵染时间。周冀明^[12]转化诸葛菜 [*Orychopragmus violaceus* (L.) O. E. Schulz] 的下胚轴,仅用 $OD_{600} = 0.3$ 的菌液侵染 45 ~ 60 s。属于农杆菌天然宿主的植物,因其易产生过敏反应而导致外植体切口处褐化,故常采用较低的 OD 值和较短的侵染时间。本实验中因新疆杨叶片敏感性相对较低,故使用中等浓度的菌液进行侵染 ($OD_{600} = 0.4$),由于杨树是农杆菌的天然宿主,故采用较短的侵染时间。而且农杆菌菌液对植物细胞有毒害作用,因此倾向于采取较低的菌液浓度和较短的侵染时间。

表 2 农杆菌侵染时间对新疆杨产生 Km^r 芽的影响
Table 2 Effect of infection time on producing Km^r shoot of *Populus alba* L. var. *pyramidalis* Bge.

侵染时间 Time for infection (min)	供试叶盘数 Number of leaf disc explants	产生 Km^r 芽的叶盘数 Number of leaf disc explants producing Km^r shoots	产生 Km^r 芽的频率 Rate of the explants producing Km^r shoots (%)
5	93	1	1.1
15	95	4	4.3
30	85	2	2.5
45	119	3	2.5

2.3 共培养时间对新疆杨产生 Km^r 芽的影响

农杆菌和植物共培养是整个转化过程中最重要的环节,因为农杆菌的附着,T-DNA 的转移及整合都在共培养时期内完成^[13]。本实验结果表明(表 3),随共培养时间延长,新疆杨获 Km^r 芽的频率显著增加,共培养 5 d,叶盘分化 Km^r 芽的频率达到 28%,是共培养 2 d 的 6 倍多。杨属植物的共培养时间一般较短,Confalonieri 等^[8]在欧洲黑杨遗传转化研究中,认为共培养 48 h 最佳;郝贵霞等^[12]对毛白杨的转化研究表明,共培养时间如长于 4 d,假阳性增多,而以共培养 2 ~ 4 d 为最佳处理。一般认为杨属植物分化较快,又是农杆菌的天然宿主,属于易转化种类,无需长时间共培养,但本实验结果表明,共培养时间的延长并不会引起假阳性增加。周冀明^[12]认为,不能以共培养时间长短来判断共培养是否成功,应以是否出现肉眼可见的微生物落作为结束共培养的标志。本实验中观察发现,共培养 2 d 内,不会出现肉眼可见农杆菌微生物落;共培养 3 ~ 5 d,一般都能出现微生物落。

表 3 共培养时间对新疆杨产生 Km^r 芽的影响
Table 3 Effect of co-culture time on producing Km^r shoot of *Populus alba* L. var. *pyramidalis* Bge.

共培养时间 Time for co-culture (d)	供试叶盘数 Number of leaf disc explants	产生 Km^r 芽的叶盘数 Number of leaf disc explants producing Km^r shoots	产生 Km^r 芽的频率 Rate of the explants producing Km^r shoots (%)
2	46	2	4.4
3	44	2	4.6
4	47	7	14.9
5	50	14	28.0

2.4 添加乙酰丁香酮对新疆杨产生 Km^r 芽的影响

根癌农杆菌 T-DNA 的转移和整合,需 Ti 质粒中相关 *vir* 基因的表达调控,*vir* 基因属诱导型操纵子,植物细胞受伤后所分泌的一些化学物质如酚类物质(乙酰丁香酮、羟基乙酰丁香酮)、酸性多糖和中性糖(葡萄糖、甘露糖等)^[14]是 *vir* 基因的诱导物,其中诱导效果最佳的为乙酰丁香酮。本实验在菌液培养和共培养培养基中加入乙酰丁香酮,结果表明(表 4),共培养培养基中添加乙酰丁香酮,转化频率比 CK 提高了近 4 倍;侵染菌液中添加乙酰丁香酮,转化频率稍高于 CK;2 种培养基中都加入乙酰丁香酮,转化频率反而低于 CK。郝贵霞等^[12]用菌株 LBA4404 进行毛白杨的遗传转化,发现在菌液中添加乙酰丁香酮 200 $\mu\text{mol/L}$, Km^r 芽的产生频率略有提高;在共培养培养基中添加乙酰丁香酮 200 $\mu\text{mol/L}$, Km^r 芽的产生频率有明显提高,这一研究结果与本实验相似。但 David^[15]研究苹果 (*Malus pumila* Mill.) 的转化时认为,侵染菌液中添加乙酰丁香酮 100 $\mu\text{mol/L}$ 有显著促进作用;在共培养培养基添加乙酰丁香酮 100 $\mu\text{mol/L}$,转化频率没有提高。

表 4 乙酰丁香酮的添加方式对新疆杨产生 Km^r 芽的影响
Table 4 Effect of acetosyringone (AS) appending method on producing Km^r shoot of *Populus alba* L. var. *pyramidalis* Bge.

添加 AS 的 不同处理 ¹⁾ AS appending method ¹⁾	供试叶盘数 Number of leaf disc explants	产生 Km^r 芽的叶盘数 Number of leaf disc explants producing Km^r shoots	产生 Km^r 芽的频率 Rate of the explants producing Km^r shoots (%)
CK	93	3	3.2
AS1	48	2	4.2
AS2	72	9	12.2
AS3	102	1	1.1

¹⁾ CK: 未添加乙酰丁香酮的处理 no AS; AS1: 在侵染菌液中添加 200 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰丁香酮 added 200 $\mu\text{mol/L}$ AS for infection; AS2: 在共培养培养基中添加 200 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰丁香酮 added 200 $\mu\text{mol/L}$ AS for co-culture; AS3: 在侵染菌液和共培养培养基均添加 200 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰丁香酮 added 200 $\mu\text{mol/L}$ AS for infection and co-culture.

此外,也有实验表明诱导物对于转化没有促进作用,这可能与所用植物材料和根癌农杆菌菌株类型有关。Godwin 等^[16]用3种野生型的根癌农杆菌侵染5种植物,研究共培养培养基中乙酰丁香酮和pH对转化的作用,发现3种类型的菌株对烟草叶盘的侵染能力没有显著区别,乙酰丁香酮也无促进作用;但章鱼碱型农杆菌 Ach5 在无乙酰丁香酮条件下对其他4种植物都无致瘤能力,而pH 5.2时添加乙酰丁香酮 200 $\mu\text{mol/L}$ 可使 Ach5 扩展宿主范围至金鱼草 (*Antirrhinum majus* L.)。本实验所用菌株是章鱼碱型根癌农杆菌 LBA4404,属于宿主范围较小、毒力中等的菌株,对杨属植物敏感性不强^[3,9],在共培养基中添加乙酰丁香酮对其转化有促进作用。

2.5 共培养培养基中乙酰丁香酮浓度对新疆杨产生 Km^r芽的影响

杨属内常用的乙酰丁香酮添加浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ ^[11,17],使用更高浓度的报道极少。国内外对乙酰丁香酮添加浓度的研究一般低于 200 $\mu\text{mol/L}$,如方宏筠^[18]在樱桃 (*Prunus pseudocerasu* Lindl.) 的转化中发现,培养基添加乙酰丁香酮 80 $\mu\text{mol/L}$ 为最佳。本实验结果表明(见表5),添加乙酰丁香酮的培养基转化率都明显高于对照,最适浓度为 80 $\mu\text{mol/L}$,浓度过高,则转化率反而下降,其原因有三:一为乙酰丁香酮是1种植物受伤后分泌的酚类物质,浓度过大对植物细胞本身有毒害作用;二是杨树是农杆菌的天然宿主^[2],细胞受伤后本身就有酚类物质的分泌,但可能数量较少;三为乙酰丁香酮对农杆菌的生长也有一定的伤害。

表5 共培养基中乙酰丁香酮的浓度对新疆杨产生 Km^r芽的影响
Table 5 Effect of different concentration of acetosyringone (AS) in the co-culture medium on producing Km^r shoot of *Populus alba* L. var. *pyramidalis* Bge.

AS 浓度 Concentration of AS ($\mu\text{mol/L}$)	供试叶盘数 Number of leaf disc explants	产生 Km ^r 芽的叶盘数 Number of leaf disc explants producing Km ^r shoots	产生 Km ^r 芽的频率 Rate of the explants producing Km ^r shoots (%)
0	43	6	14.0
40	50	19	38.0
80	51	20	39.2
120	56	14	25.0
200	47	13	27.7

2.6 侵染菌液的制备方法对新疆杨产生 Km^r芽的影响

在转化操作中,制备侵染菌液的方法多种多样。

据 Gould^[19]对火炬松 (*Pinus paeda* L.) 转化的报道,将菌落直接从固体平板上刮下来稀释于液体培养基就制备成了侵染菌液;而 Klopfenstein^[5]转化杂交杨树,将1次液体活化后的农杆菌菌液直接与叶片共培养。本实验采用4种侵染菌液制备方法,结果表明(见表6),液体培养活化农杆菌2次加离心收集菌体重悬的菌液转化率最高,为14.3%,明显优于其他处理方式。虽然这种制备菌液的方法比较复杂,但有2方面优点:和单菌落1次接种大体积液体培养基方法比较,2次液体活化法生长至一定浓度所需时间更少,农杆菌的状态更一致、活力也更强;农杆菌液体培养过程中会产生一些代谢物质,这些代谢物质对植物细胞有伤害,而且为纯化农杆菌菌株,通常要在农杆菌培养基中添加抗生素,抗生素对植物细胞也有伤害,所以菌液离心重悬比直接用菌液侵染好。有研究认为,2次液体活化时直接用植物培养基更好^[20]。本实验在离心重悬后再用植物培养基培养2h,结果发现在pH 5.2的植物培养基中农杆菌长势很差,培养2h,OD₆₀₀没有任何增加,可能是由于pH 5.2适于诱导 *vir* 基因表达,并不适于农杆菌生长。

表6 侵染菌液的制备方法对新疆杨产生 Km^r芽的影响
Table 6 Effect of bacterium liquid preparation method on producing Km^r shoot of *Populus alba* L. var. *pyramidalis* Bge.

侵染菌液的 制备方法 ¹⁾ Preparation method of bacterium liquid ¹⁾	供试叶盘数 Number of leaf disc explants	产生 Km ^r 芽的叶盘数 Number of leaf disc explants producing Km ^r shoots	产生 Km ^r 芽的频率 Rate of the explants producing Km ^r shoots (%)
a	45	1	2.2
b	50	3	6.0
c	49	7	14.3
d	45	2	4.4

¹⁾ a: 液体培养活化农杆菌1次 culturing one time for bacterium liquid; b: 液体培养活化农杆菌2次 culturing two times for bacterium liquid; c: 液体培养活化农杆菌2次加离心收集菌体重悬 culturing two times for bacterium liquid and centrifugation for bacterium collection; d: 液体培养活化农杆菌2次加离心收集菌体重悬再培养2h culturing two times for bacterium liquid and 2h culturing after centrifugation for bacterium collection.

2.7 外植体继代方式对新疆杨产生 Km^r芽的影响

植物材料的外植体继代方式对转化频率影响较大,本实验用不同继代方式的植物材料进行对比,结果表明(表7),同为离体继代16个月的外植体,每1.5月继代1次、每次取根部萌蘖芽继代的外植体转化频率更高。在木本植物组织培养和扦插取材

时,均认为多年生树木的根部萌条比树梢枝条再生能力强^[21]。本实验中根部萌蘖芽方式继代的植株,比顶芽植株转化率高,可能是因为前一种外植体分化能力保持更好。

表7 外植体继代方式对新疆杨产生 Km^r芽的影响

Table 7 Effect of sub-culturing method of explants on producing Km^r shoot of *Populus alba* L. var. *pyramidalis* Bge.

继代方式 ¹⁾ Sub-culturing method ¹⁾	供试叶盘数 Number of leaf disc explants	产生 Km ^r 芽的叶盘数 Number of leaf disc explants producing Km ^r shoots	产生 Km ^r 芽的频率 Rate of the explants producing Km ^r shoots (%)
A	141	9	6.4
B	117	10	8.6

¹⁾ A: 离体继代16个月的外植体,每1个月继代1次,每次取顶芽继代 total sub-culturing for 16 months, sub-culturing one time in a month with top buds; B: 离体继代16个月的外植体,每1.5月继代1次,每次取根部萌蘖芽继代 total sub-culturing for 16 months, sub-culturing one time in a month and half with buds from roots.

3 结 论

总结上述预培养时间、侵染时间、共培养时间、添加乙酰丁香酮(AS)的时机、共培养培养基中添加AS浓度、侵染菌液的制备方法和外植体继代方式等7个方面的筛选实验结果,得到新疆杨叶盘适宜的遗传转化体系为:预培养8 h, OD₆₀₀ = 0.4左右农杆菌菌液侵染15 min,共培养5 d;侵染菌液的最优制备方法是液体培养活化农杆菌2次加离心收集菌体重悬;共培养培养基中添加乙酰丁香酮80 μmol/L。在此最优转化体系下,新疆杨叶盘转化频率最高可达38.10%。在所有影响转化的因素中,共培养时间的延长和共培养培养基中乙酰丁香酮的添加对转化频率的提高贡献最大。

参考文献:

- [1] 赵干锡,陈章水. 中国杨树集约栽培[M]. 北京:中国科学技术出版社,1994. 639-672.
- [2] Fillatti J J, Brain F L. *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of poplar[J]. Mol Gen Genet, 1987, 206(2): 192-199.
- [3] Leple J C, Jordan M L, Svante P K, et al. Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs[J]. Plant Cell Reports, 1992, 11(1): 137-141.
- [4] Block M D, Debrouwer D. Two T-DNA's co-transformation into *Brassica napus* by a double *Agrobacterium tumefaciens* infection are mainly integrated at the same locus[J]. Thero Appl Genet, 1991, 82

- (5): 257-263.
- [5] Klopfenstein N B. Transgenic *populus* hybrid expresses a wound-inducible potato proteinase inhibitor II-cat gene fusion[J]. Can J For Res, 1991, 21(11): 1321-1328.
- [6] 郝贵霞,朱 楨,朱之梯. 豇豆胰蛋白酶抑制剂基因转化毛白杨的研究[J]. 植物学报, 1999, 41(12): 1276-1282.
- [7] Horsch R B. A simple and general method for transferring genes into plants[J]. Science, 1985, 227(12): 1229-1231.
- [8] Confalonieri M, Allegro G. Genetic transformation of *Populus nigra* by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Plant Cell Reports, 1994, 13(7): 256-261.
- [9] Confalonieri M, Balestrazzi A, Cella R. Genetic transformation of *Populus deltoids* and *P. euramericana* clones using *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1997, 48(1): 53-61.
- [10] Alan M, Mark J, Gina F. A pre-culture period prior to *Agrobacterium* inoculation increases production of transgenic plants [J]. J Plant Physiol, 1989, 135(6): 245-248.
- [11] 郝贵霞,朱 楨,朱之梯. 毛白杨遗传转化系统优化的研究 [J]. 植物学报, 1999, 41(9): 936-940.
- [12] 周冀明,卫志明,许智宏,等. 根癌农杆菌介导转化诸葛菜获得转基因植株[J]. 植物生理学报, 1997, 23(1): 21-28.
- [13] 王关林,方宏筠. 植物基因工程(第二版)[M]. 北京:科学出版社, 2002.
- [14] Gelvin S B. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration review [J]. Annual Review of Phytopathology, 2000, 51(7): 223-256.
- [15] David J J, Sandra U, Cheng J S, et al. Acetosyringone and osmoprotectants like betaine or proline synergistically enhance *Agrobacterium* mediated transformation of apple [J]. Plant Cell Reports, 1993, 12(11): 559-563.
- [16] Godwin I, Gordon T, Brain F L, et al. The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium* mediated transformation vary according to plant species[J]. Plant Cell Reports, 1990, 9(9): 671-675.
- [17] Confalonieri M, Cella R. Factor affecting *Agrobacterium* mediated transformation in several black poplar clones[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1995, 43(5): 215-222.
- [18] 方宏筠,王关林,王火旭,等. 抗菌肽基因转化櫻桃矮化砧木获得抗根瘤病的转基因植株[J]. 植物学报, 1999, 41(11): 1192-1198.
- [19] Gould J H, Zhou Y X, Veeraragavan P, et al. Transformation and regeneration of loblolly pine: shoot apex inoculation with *Agrobacterium*[J]. Molecular Breeding, 2002, 10(1): 131-141.
- [20] 王 瑶,柳 晟,杜 涛,等. 根癌农杆菌对健康和患从枝病泡桐的转化[J]. 西北植物学报, 2001, 21(3): 406-412.
- [21] 沈惠娟. 木本植物组织培养[M]. 北京:中国农业科技出版社, 1992.