

抗冻蛋白(*afp*)基因表达载体的构建 及对香蕉胚性细胞悬浮系的转化

徐春香¹, 何勇强², 尉义明¹, 卢博彬¹, 胡桂兵¹, 陈厚彬¹

(1. 华南农业大学 园艺学院, 广州 510642; 2. 广西大学 生命科学与技术学院, 南宁 530005)

摘要: 通过 PCR 从‘京都七寸人参’胡萝卜基因组 DNA 中扩增抗冻蛋白基因, 测序结果表明该基因的核苷酸序列与从宁夏‘吴忠’胡萝卜中克隆的完全一致。先后将获得的胡萝卜 *afp* 基因克隆和亚克隆至 pMD18-T 和 pBI121, 构建植物表达载体 pBI121-*afp*。通过冻融法将 pBI121-*afp* 导入根癌农杆菌 EHA105 中。以香蕉栽培品种‘北大矮蕉’的胚性细胞悬浮系为受体, 采用农杆菌介导法将胡萝卜 *afp* 基因导入其中, 然后在 Kanamycin 的选择压力下通过体细胞胚发生途径进行植株再生。共获得抗性再生植株 9 株, 其中两株经 PCR 检测呈阳性, 可初步确定目的基因已经整合到这两株转基因香蕉植株的基因组中。

关键词: 香蕉; 胚性细胞悬浮系; 根癌农杆菌介导法; 遗传转化

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2009)05-0664-05

Construction of a plant expression vector containing antifreeze protein(*afp*) gene and its transformation into banana (*Musa AAA Cavendish*) embryogenic cell suspension

XU Chun-Xiang¹, HE Yong-Qiang², WEI Yi-Ming¹,
LU Bo-Bin¹, HU Gui-Bing¹, CHEN Hou-Bin¹

(1. College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: Antifreeze protein(*afp*) gene was amplified by polymerase chain reaction using genomic DNA extracted from the seedling of carrot cv. Jingdou Qicunrenshen. Sequencing result showed that there was no difference in nucleotide sequence between this *afp* gene and that cloned from ‘Wuzhong’ carrot in Ningxia. *afp* gene was subsequently cloned into intermediate vector pMD18-T and binary vector pBI121 to construct plant express vector pBI121-*afp*, which was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 by freeze-thaw method. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method was used to introduce *afp* gene into the embryogenic cell suspension of *Musa AAA Cavendish* cv. Beida Aijiao, followed by plant regeneration via embryogenesis. PCR analysis showed that 2 from 9 obtained regenerated plants resistant to kanamycin were positive, which possibly indicated that *afp* gene has been integrated into the genome of banana plants.

Key words: Banana; embryogenic cell suspension; *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method; genetic transformation

收稿日期: 2008-08-25 修回日期: 2008-11-12

基金项目: 广西科学基金(桂科基 0009017); 广东省自然科学基金(07006698); 广东省科技攻关项目(2006A20201007); 农业竹业专项(nyhyzx07-029) [Supported by Guangxi Science Foundation(GKJ0009017); Natural Science Foundation of Guangdong(07006698); Key Technologies Research and Development Program of Guangdong Province(2006A20201007); the Special fund for Agro-industry(nyhyzx07-029)]

作者简介: 徐春香(1969-), 女, 江西九江人, 副教授, 主要从事香蕉生物技术方面的研究, (E-mail)chxxu@scau.edu.cn.

香蕉(*Musa* spp.)是重要的热带亚热带水果与粮食作物,2006年我国年产量超过600万吨(中国农业年鉴编辑委员会,2006)。除了枯萎病等严重病害外,我国香蕉的生产还受到冷害的威胁。如20世纪90年代,我国香蕉主产区就先后4次遭遇重大寒潮的袭击。最根本、最有效的措施就是栽培优质、抗性强的品种。然而,香蕉的主要栽培品种均为三倍体,难以通过传统的杂交育种方式获得品质好、抗性强的优良新品种。利用包括基因工程技术在内的生物技术培育香蕉抗病新品种成为必要。至今,国内外均未见有香蕉抗寒遗传转化的研究报道。

香蕉胚性细胞悬浮系(Embryogenic cell suspension, ECS)是遗传转化的理想受体,因为通过体胚发生途径的植株再生通常是单细胞起源的,可大幅度减少甚至避免嵌合体的产生(Roux等,2004)。近年来,国际上香蕉遗传转化已开始采用ECS为受体(Ganapathi等,2001;Khanna等,2004),但至今国内所有的香蕉遗传转化报道均以茎尖为受体(李华平等,2000;黄霞等,2002;林德球等,2004)。

从胡萝卜(*Daucus carota*)中克隆的抗冻蛋白基因(Antifreeze protein, *afp*)不仅具抗冻活性(Worrall等,1998;Fan等,2002),还有提高生物耐冷性的功能(赵凌等,2006)。本文在成功建立香蕉ECS和体细胞胚发生途径植株再生体系的基础上(徐春香等,2004a,b;Xu等,2005),采用根癌农杆菌介导法,将从胡萝卜中克隆的*afp*基因导入香蕉ECS,然后通过体细胞胚发生途径进行植株再生,以期通过基因工程技术培育香蕉抗寒新品种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

目的基因供体为市售‘京都七寸人参’胡萝卜(*Daucus carota*),播种萌芽后采用CTAB法提取幼叶基因组DNA备用。遗传转化的受体为‘北大矮蕉’(*Musa* AAA Cavendish)的ECS,保存在华南农业大学热带亚热带果树实验室。大肠杆菌(*E. coli*)菌株为JM109,根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株是EHA105。基因克隆载体为pMD18-T,植物表达载体为pBI121。

1.2 方法

1.2.1 *afp*基因的克隆 根据已发表的胡萝卜*afp*

基因序列(尹明安等,2001)设计1对特异引物,分别在正向和反向引物的5'端加入*Xba*I和*Sac*I酶切位点,以方便后续步骤中目的基因与植物表达载体pBI121的连接并保证目的基因按正确方向插入。引物序列:正向5' TCTAGA(*Xba*I酶切位点)ATG AAT ATT GAA TCA TCT TTC TGC 3',反向5' GAGCTC(*Sac*I酶切位点)CTA GCA TTC TGG CAA TGG AGC A 3'。由于胡萝卜*afp*基因中不含内含子(尹明安等,2001),所以直接以其基因组DNA为模板进行PCR扩增。PCR反应条件:94℃预变性4 min,94℃变性1 min,55℃退火1 min,72℃延伸1 min,反应进行30个循环,72℃最终延伸10 min。PCR产物经纯化回收后与pMD18-T载体(Takara)连接(按生产商推荐的方法进行),构建重组质粒(命名为T-*afp*)。重组质粒按文献(Sambrook等,1992)进行转化、筛选与抽提。经酶切鉴定呈阳性的克隆用于序列测定。酶切反应体系为:10×缓冲液2 μL,*Xba*I 1 μL(Takara),*Sac*I 1 μL(Takara),待检质粒10 μL,加ddH₂O至总体积20 μL,37℃下反应过夜。序列分析由宝生物工程(大连)有限公司完成。

1.2.2 *afp*基因植物表达载体的构建与工程菌的获得 测序结果表明含正向插入目的片段的重组质粒用*Xba*I和*Sac*I对其进行双酶切,纯化回收约1.1 kb的目的DNA片段;再用相同的酶对pBI121进行双酶切,回收约10 kb大小的线状pBI121载体,并将二者进行连接,构建植物表达载体,命名为pBI121-*afp*。pBI121-*afp*对大肠杆菌的转化、筛选、抽提与酶切的方法均参照文献(Sambrook等,1992)进行。经酶切鉴定呈阳性的pBI121-*afp*克隆采用液态冻融法(Sambrook等,1992)转化根癌农杆菌,经PCR检测呈阳性的克隆用于香蕉ECS的遗传转化。引物序列与PCR反应条件同1.2.1。

1.2.3 香蕉ECS受体系统遗传转化体系的建立 过夜培养(14~16 h)的工程菌液,4 000 g离心10 min,弃上清,用ZZL液体培养基(Dhed'a等,1991)重悬浮至OD₆₀₀=0.4左右(含AS 150 μmol·L⁻¹),加入约占总体积三分之一,继代后培养7 d的悬浮细胞,使AS的终浓度约为100 μmol·L⁻¹,于21~22℃、20~30 r·min⁻¹条件下进行侵染。侵染结束后,吸干悬浮细胞表面的菌液后将其转入含100 μmol·L⁻¹ AS的ZZSS(Dhed'a等,1991)培养基中21~22℃下黑暗条件下共培养6 d。共培养结束后

的细胞转到筛选培养基(ZZSS+50 mg·L⁻¹卡那霉素和500 mg·L⁻¹羧苄青霉素)上,28℃下暗培养,每2周继代1次,继代2次后将羧苄青霉素浓度降至300 mg·L⁻¹。8周后,按徐春香等(2004b)所描述的方法进行体细胞胚与植株再生,整个植株再生过程添加羧苄青霉素的浓度均为100 mg·L⁻¹,添加卡那霉素浓度除生根培养基中为100 mg·L⁻¹,其余在体细胞胚再生、成熟、萌发培养基中均为50 mg·L⁻¹,每2周更换培养基一次。以未经转化的ECS在不添加卡那霉素和羧苄青霉素的培养基上进行体细胞胚与植株再生为对照。

以从1g细胞转化所获得的抗性植株与从1g对照所获得的再生植株数之比为遗传转化效率。

1.2.4 PCR检测 CTAB法提取转基因植株和对照的基因组DNA。用 afp 基因特异性引物进行PCR检测。引物序列及PCR反应条件均同1.2.1。

2 结果与分析

2.1 胡萝卜 afp 基因植物表达载体的构建

以胡萝卜幼叶基因组DNA为模板,经PCR扩增、纯化回收后所获得的的目的片段见图1,其长度约1.1 kb,与预期一致,表明目的基因已被成功扩增。

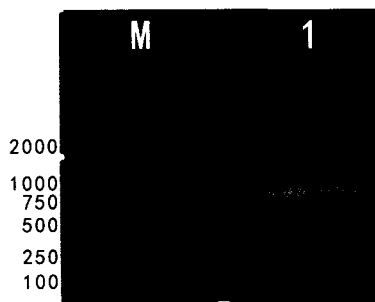


图1 胡萝卜基因组DNA中目的基因片段的扩增
Fig. 1 The amplification of interest fragment from genomic DNA of carrot
M. DNA marker DL2000; 1. PCR产物。

用 Xba I和 Sac I对重组质粒T- afp 进行酶切所获得的结果见图2,表明目的基因已被成功克隆至pMD18-T载体。测序结果表明:‘京都七寸人参’胡萝卜的目的基因长1099 bp,其核苷酸序列与从宁夏‘吴忠’胡萝卜中克隆的 afp 基因(尹明安等,2001)完全一致,核苷酸同源率为100%(核苷酸序列省略),证明所克隆的目的片段正是 afp 基因。

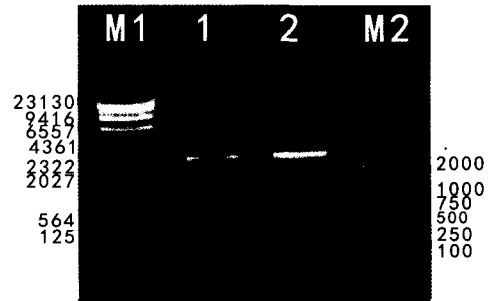


图2 重组质粒T- afp 酶切结果
Fig. 2 Restriction enzyme digestion of recombinant T- afp plasmid
M₁. λ -Hind III DNA marker; 1-2. 重组质粒 Xba I和 Sac I双酶切; M₂. DNA marker DL2000.

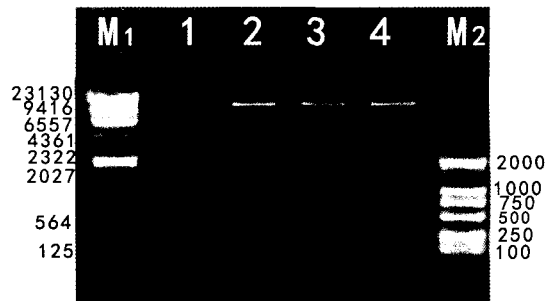


图3 重组植物表达载体pBI121- afp 酶切结果
Fig. 3 Restriction enzyme digestion of recombinant pBI121- afp plasmid
M₁. λ -Hind III DNA marker; 1-4. 重组质粒 Xba I和 Sac I双酶切; M₂. DNA marker DL2000.

测序结果还表明目的片段在克隆载体内的连接方向为正向的(测序结果略)。用 Xba I和 Sac I对植物表达载体pBI121- afp 进行酶切,也可切下大小约为1.1 kb,与预期一致的产物(图3),表明植物表达载体构建成功。随机挑取几个经液态冻融法转化的根癌农杆菌EHA105克隆进行PCR检测,结果均呈阳性反应(图4),表明携带胡萝卜 afp 基因的植物表达载体已成功转化至根癌农杆菌中,可用于下一步香蕉ECS的遗传转化。图5是重组质粒pBI121- afp 的区段示意图。

2.2 转化子的筛选与体细胞胚发生途径植株再生

‘北大矮蕉’的ECS转入筛选ZZSS培养基后,2周内转化材料的生长情况与对照间的差异不明显:对照没有褐化现象,极少量直径很小的细胞团在接种后2周内褐化死亡(通常在边缘),转化后的实验材料基本也不会发生褐变现象,只有极少量的细

胞团褐化死亡,通常呈点状分布而不是固定在边缘。约在接种至筛选培养基 4 周后,在抗生素的持续作

用下,转化材料中死亡的细胞量逐渐增多,可以很明显地观察到呈点状分布的黑褐色斑点,细胞的增殖量明显少于对照。而对照的细胞在不含任何抗生素的 ZZSS 培养基上迅速增长,初期少量的死亡细胞因所占比例下降而不易被观察到。8 周后,转化材料中的黑褐色斑点逐步连成一片,与黄白色细胞相间并存,并已有少量再生体细胞胚出现(图 6:A)。在 RD1 体细胞胚再生培养基筛选 8 周后,再生体细胞胚进一步增大(图 6:B),在 RD2 体细胞胚成熟培养基上培养 4 周后,大多数再生体细胞胚在抗生素的选择压力下逐渐褐化死亡,只有少量体细胞胚萌发(图 6:C)。将获得的再生体胚转入 REG 培养基后萌生叶(图 6:D),在生根培养基上已萌发的再生材料其叶鞘进一步伸长,并诱导产生根,最终获得完整的再生植株(图 6:E)。

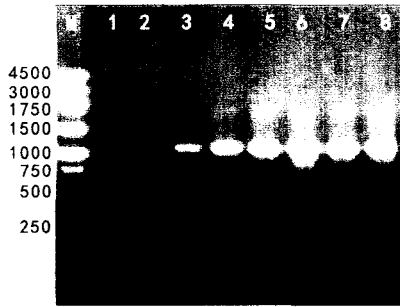


图 4 EHA105 菌株中 *afp* 基因的 PCR 扩增
Fig. 4 PCR amplification of *afp* gene in EHA105 strain
M. 250bp ladder marker: 1-2. 空白对照; 3. 质粒;
4-8. 转化 EHA105 克隆。

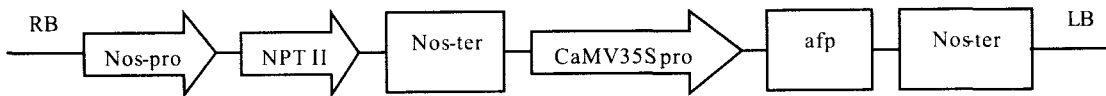


图 5 质粒 pBI121-*afp* 的区段示意图
Fig. 5 The construction of plasmid pBI121-*afp*

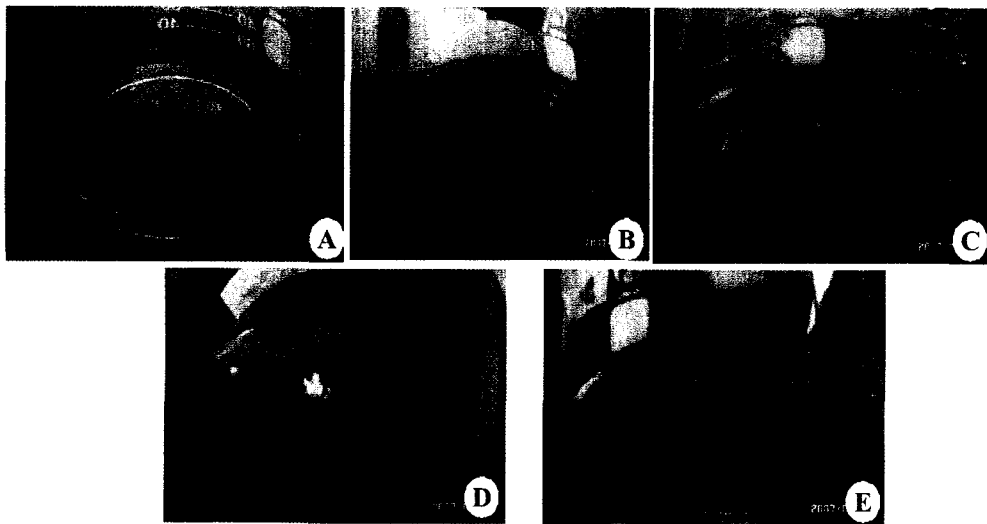


图 6 ‘北大矮蕉’胚性细胞悬浮系遗传转化后体细胞胚发生途径植株的再生
Fig. 6 Plant regeneration from the embryogenic cell suspension of *Musa* AAA cv. ‘Beida Aijiao’ via embryogenesis after transformation

A. ZZSS 培养基筛选 8 周; B. RD1 培养基 8 周; C. RD2 培养基 4 周; D. REG 培养基 4 周; E. 生根培养基 4 周。
A. Screening on ZZSS medium for 8 weeks; B. Eight weeks after inoculation on RD1 medium; C. Four weeks after inoculation on RD2 medium; D. Four weeks after inoculation on REG medium; E. Four weeks after inoculation on rooting medium

2.3 遗传转化效率

实验中从每克未经转化和筛选的细胞所获得的再生植株数为 1 080 株,而从 0.76 g 转化细胞经筛

选后共获得抗性再生植株 9 株,折算从每克经转化和筛选的细胞所获得的再生植株数为 11.8 株。因此,所获得的遗传转化效率约为 1.1%。

2.4 PCR 分析

提取 9 株抗性植株的基因组 DNA,以非转基因体细胞胚发生途径再生植株为对照进行 PCR 检测,从其中 2 株转基因植株能扩增出与目的基因大小一致的条带(约 1.1 kb)(图 7),从而证明了转基因植株中 *afp* 的存在。PCR 阳性率为 22.22%。

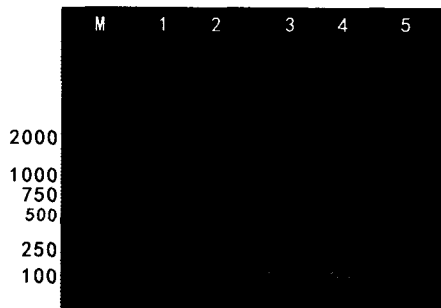


图 7 转基因植株 *afp* 的 PCR 扩增检测

Fig. 7 PCR amplification of *afp* in transgenic plants

M. DNA marker DL2000; 1. 空白对照; 2. 质粒;
3. 阴性对照; 4-5. 转基因植株。

3 讨论

Worrall 等(1998)首次从英国胡萝卜(var. *autumn*)中克隆到 *afp* 基因。尹明安等(2001)从耐寒性很强的中国宁夏‘吴忠’胡萝卜中也克隆到 *afp* 基因,其核苷酸序列与英国胡萝卜的同源性为 98.5%。本研究从‘京都七寸人参’胡萝卜克隆到的 *afp* 基因与宁夏‘吴忠’胡萝卜中克隆到的同源性高达 100%,这表明胡萝卜中的 *afp* 基因高度保守。

尽管国内已有一些成功建立香蕉 ECS 的报道(徐春香等,2004a;2004b;Xu 等,2005),但至今尚未见有以香蕉 ECS 为受体系统进行遗传转化的报道。本文在成功建立我国香蕉栽培品种 ECS 的基础上,采用根癌农杆菌介导法将胡萝卜 *afp* 基因导入香蕉 ECS,成功获得了转基因植株,为通过基因工程技术培育香蕉新品种奠定基础,同时也能为其他功能基因对香蕉 ECS 的转化提供参考。

本研究中所获得的遗传转化效率相对较低。可能原因如下:1)本次实验中采用的 ECS 年龄偏老(2 年),有研究表明年龄小于 6 个月的香蕉 ECS 最适于遗传转化(Remy,2000);2)与遗传转化效率的计算方法有一定的关系,本研究中以从 1 g 细胞转化所获得的可能的转化植株与从 1 g 对照所获得的再生植株数之比为遗传转化效率,较准确、合理地

ECS 为受体时所获得的遗传转化效率进行了计算;3)抗生素在植株再生过程中长期(约 6 个月)、不间断的使用影响了转化效率。如果只经过 2 个月的抗生素筛选后去除抗生素的选择压力,有可能大幅度地提高遗传转化的效率,但同时也会降低 PCR 检测的阳性率。此外,提高 ECS 的质量、探讨离心和真空等技术在香蕉 ECS 遗传转化中的应用,将有利于遗传转化效率的提高。

Worrall 等(1998)将从冷诱导的胡萝卜中克隆的 *afp* 基因的 cDNA 序列导入烟草后,成功检测到了 *afp* 基因的组成型表达,发现转基因烟草提取物可以抑制冰晶的生长。将从胡萝卜中克隆的 *afp* 基因转入烟草,结果发现转基因烟草的耐冷性比野生型烟草的还要强(Fan 等,2002)。赵凌等(2006)利用花粉管通道法将从胡萝卜中克隆的 *afp* 基因转入水稻中,获得了转基因后代,并对 T3 代和 T4 代转基因植株进行苗期耐冷性鉴定,结果发现这些转基因苗获得了不同程度的耐低温性。本研究获得的 PCR 检测呈阳性的转化植株其抗寒性能还有待于进一步研究。

参考文献:

- 中国农业年鉴编辑委员会. 2006. 中国农业年鉴[M]. 北京:中国农业出版社,192-194
- Dhed'a D, Dumortier F, Panis B, et al. 1991. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. Bluggoe (*Musa* spp. ABB group)[J]. *Fruits*, 46(2):125-135
- Fan Y, Liu B, Wang H, et al. 2002. Cloning of an antifreeze protein gene from carrot and its influence on cold tolerance in transgenic tobacco plants[J]. *Plant Cell Rep*, 21(4):296-301
- Ganapathi TR, Higgs NS, Balint-Kurti PJ, et al. 2001. Agrobacterium-mediated transformation of embryogenic cell suspensions of the banana cultivar Rasthali(AAB)[J]. *Plant Cell Rep*, 20(2):157-162
- Huang X(黄霞), Huang XL(黄学林), Li Z(李哲), et al. 2002. Factors affecting the early phase of Agrobacterium-mediated genetic transformation of banana(影响根癌农杆菌介导的香蕉基因转化早期的主要因素)[J]. *Acta Univ Sunyatseni (Sci Nat)* (中山大学学报·自然科学版), 41(5):68-72
- Khanna H, Becker D, Kleidon J, et al. 2004. Centrifugation assisted Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation(CAAT) of embryogenic cell suspension of banana (*Musa* spp. Cavendish AAA and Lady finger AAB)[J]. *Mol Breeding*, 14:239-252
- Li HP(李华平), Hu JS(胡晋生), Wang M(王敏), et al. 2000. Genetic transformation system of banana meristems(香蕉茎尖遗传转化法研究)[J]. *Chin J Trop Crops*(热带作物学报), 21(4):33-38
- Lin DQ(林德球), Qv LH(屈良鹄), Zhang HD(张宏达). 2004. (下转第 710 页 Continue on page 710)

效果好,质量浓度在 14.55~116.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与峰高呈良好的线性关系($r=0.9999$),平均回收率为 97.56%。将该方法应用于样品的测定,其稳定性、重现性和准确性良好,可作为牙膏的质量控制方法。

参考文献:

- 邓婷婷,刘素纯,贺建华. 2008. 柚皮提取物有效成分的研究概况[J]. 中国食物与营养, 6:16-19
- Feng BM(冯保民), Yuan YG(苑艳光), Pei YH(裴月湖). 2001. Chemical and pharmacological advances of the study on *Citrus grandis*(柚的化学与药理研究进展)[J]. *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报), 18(3):228-232
- Han CX(韩彩轩). 2003. Detection of naringin from healthy foods by using reversed phase high performance liquid chromatography (反相高效液相色谱法测定保健食品中的柚皮苷)[J]. *China Trop Med*(中国热带医学), 3(3):357-358
- He ZD(贺肇东), Chen Q(陈强), Zhu BF(朱贵峰), et al. 2008. Determination of naringin in fructus ponciri trifoliatae by RP-HPLC(PR-HPLC 法测定绿衣枳实中柚皮苷的含量)[J]. *J Strait Pharm*(海峡药理学), 20(5):37-38
- Huang GW(黄光伟), Wei BH(韦宝韩), Lu KL(卢凯玲), et al. 2009. Determination of total flavonoids from the extract of *Ginkgo* leaf in toothpaste by HPLC(HPLC 法测定牙膏中银杏叶提取物总黄酮的含量)[J]. *Flavour Fragrance Cosmetics*(香料香精化妆品), 3:25-27
- Jia DY(贾冬英), Yao K(姚开), Tan M(谭敏), et al. 2001. Advance in research of physiologically-active compounds in pummelo peel(柚果皮中生理活性成分的研究进展)[J]. *Food and Fermentation Industries*(食品与发酵工业), 27:77-78
- Jia DY(贾冬英), Yao K(姚开), Tan M(谭敏). 2002. Ethanol extract processing of naringin from pummelo pericarp(柚皮中柚皮苷的乙醇提取工艺研究)[J]. *Chin Trad Herb Drugs*(中草药), 33(9):801-802
- Lin CM(林春绵), Wang ZJ(王忠杰), Mao HZ(茅惠忠). 1996. A study on the extraction and stability of the pigment from pomelo peel(柚皮色素的提取及其稳定性研究)[J]. *Food and Fermentation Industries*(食品与发酵工业), 4:50-53
- Li F(李芳), Zhou JP(周建平), Lei JL(雷建林), Cao XX(曹勋学), et al. 2007. Determination of naringin in Jiegu Xujin capsules by HPLC(HPLC 测定接骨续筋胶囊中柚皮苷的含量)[J]. *Modern Tradit Chin Med*(现代中医药理学), 27(6):57-59
- Su DL(苏东林), Shan Y(单杨), Li GY(李高阳), et al. 2008. Determination of hesperidin and naringin in citrus peel by RP-HPLC simultaneously(PR-HPLC 法同时测定柑桔皮中橙皮苷和柚皮苷的含量)[J]. *Sci Tech Food Industry*(食品工业科技), 6:288-290
- Su L(苏玲), Liu QD(刘启德). 2008. Biological activity and pharmacokinetics of Naringin(柚皮苷生物活性和药代动力学研究新进展)[J]. *Chin J Pharm Tech Economics Management*(中国医药技术经济与管理), 2(10):74-80
- Wang LG(王林果), Jiang LY(蒋玲艳), Huang GH(黄国欢), et al. 2008. Extraction and Application of Dietary Fiber from Pomelo Peel(柚皮中膳食纤维的提取及其应用)[J]. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学), 36(24):10 492-10 494
- Yang Y(杨洋), Yu L(余炼), Deng LG(邓立高), et al. 2001. Study on extraction technology of flavonoid from pomelo peel and determination of flavonoid(柚皮黄酮的提取工艺及其含量测定)[J]. *Guangxi J Light Industry*(广西轻工业), 4:47-50
- Zhang C(张晨), Liu zw(刘志伟). 2000. Extraction of pomelo peel oil by super critical CO₂(CO₂ 超临界萃取技术提取沙田柚皮的研究)[J]. *Flavour Fragrance Cosmetics*(香料香精化妆品), 3:10-12
- =====
- (上接第 668 页 Continue from page 668)
- The cloning of replicase gene of banana bunchy top virus and the gene expression(香蕉束顶病毒复制酶基因克隆及转基因表达)[J]. *J Trop and Subtrop Bot*(热带亚热带植物学报), 12(4):142-146
- Remy S. 2000. Genetic transformation of banana(*Musa* spp.) for disease resistance by expression of antimicrobial protein[D]. Belgium; K. U. Leuven
- Roux NS, Toloza A, Dolezel J, et al. 2004. Usefulness of embryogenic cell suspension cultures for the induction and selection of mutants in *Musa* spp[C]//Jain SM, Swennen R. Banana improvement: cellular, molecular biology, and induced mutations. Enfield USA; Science Publishers, Inc; 33-43
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1992. Molecular cloning; A laboratory manual(2nd ed)[M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Worrall D, Elias L, Ashford D, et al. 1998. A carrot leucine-rich repeat protein that inhibits ice recrystallization[J]. *Science*, 282(2):115-117
- Xu CX(徐春香), Panis B, Strosse H, et al. 2004a. The induction of embryogenic callus and establishment of embryogenic cell suspension of *Musa* spp(香蕉胚性愈伤组织的诱导及胚性细胞悬浮系的建立)[J]. *J South China Agric Univ(Sci Nat)*(华南农业大学学报·自然科学版), 25(1):70-73
- Xu CX(徐春香), Panis B, Strosse H, et al. 2004b. Factors affecting banana(*Musa* spp., AAB Group) plant regeneration via embryogenesis(影响体胚发生途径香蕉植株再生的因素)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), 2004, 40(3):293-296
- Xu CX, Panis B, Strosse H, et al. 2005. Establishment of embryogenic cell suspensions and plant regeneration of the dessert banana Williams(*Musa* AAA group)[J]. *J of Horti Sci Biotech*, 80(5):523-528
- Yin MA(尹明安), Cui HW(崔鸿文), Fan DM(樊代明), et al. 2001. Cloning and sequencing of antifreeze protein gene in *Daucus carota* var *sativus* Hoffm Deutschl(胡萝卜抗冻蛋白基因的克隆及测序)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), 21(2):226-231
- Zhao L(赵凌), Wang CL(王才林), Zhang YD(张亚东), et al. 2006. Transformation of antifreeze protein gene(AFP) from carrot(*Daucus carota*) into rice(*Oryza sativa* L.) by pollen-tube pathway(花粉管介导的转抗冻蛋白基因(AFP)水稻)[J]. *Jiangsu J Agri Sci*(江苏农业学报), 22(4):315-317