

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.01.023

韦银凤,王瑞鑫,阮春燕,等. ‘圣剑’洋桔梗植株高频再生体系建立及卡那霉素敏感性测定[J]. 广西植物,2014,34(1):120—125

Wei YF,Wang RX,Ruan CY, et al. Establishment of high frequency regeneration system for *Eustoma grandiflorum* cv. Excalibur Blue Picotee and determination of kanamycin sensitivity[J]. *Guihaia*,2014,34(1):120—125

‘圣剑’洋桔梗植株高频再生体系 建立及卡那霉素敏感性测定

韦银凤,王瑞鑫,阮春燕,梅谱成,严振亚,陈崇顺*

(南京师范大学生命科学学院 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室,南京 210023)

摘要: 洋桔梗是国际上十分流行的盆花和切花种类。以洋桔梗‘圣剑’无菌苗叶片为外植体,研究了 6-BA 与 NAA 不同浓度组合对其不定芽再生的影响,并分别比较了不同浓度 IBA 和 NAA 诱导其生根的效果,测定了该品种在不定芽再生时对卡那霉素(Km)的敏感性。结果表明:MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.01 mg·L⁻¹ NAA 为不定芽再生最适培养基,不定芽再生率达 91%;1/2 MS+0.2 mg·L⁻¹ IBA 为不定根再生的最适培养基,生根率达 89%;抑制叶片不定芽再生的 Km 最低浓度为 25 mg·L⁻¹。建立了‘圣剑’洋桔梗植株高频再生体系,并确定了其对卡那霉素的敏感性,为该品种的基因工程研究奠定了基础。

关键词: 洋桔梗‘圣剑’; 植株高频再生体系; 卡那霉素敏感性

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2014)01-0120-06

Establishment of high frequency regeneration system for *Eustoma grandiflorum* cv. Excalibur Blue Picotee and determination of kanamycin sensitivity

WEI Yin-Feng, WANG Rui-Xin, RUAN Chun-Yan, MEI Pu-Cheng,
YAN Zhen-Ya, CHEN Chong-Shun*(Jiangsu Key Laboratory of Biodiversity and Biotechnology, College of Life Sciences,
Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: *Eustoma grandiflorum* is a popular cut flower and pot flower in the world. In this study, using leaves of sterile plantlets of *E. grandiflorum* cv. Excalibur Blue Picotee as explants, the effects of different concentration combinations of 6-BA and NAA on adventitious bud regeneration were investigated. The effects of different concentrations of IBA and NAA on rooting were studied, respectively. The sensitivity to kanamycin upon the regeneration of adventitious buds was determined. The results showed that the medium with MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.01 mg·L⁻¹ NAA was the optimum medium for adventitious bud regeneration, with 91% regeneration rate. Meanwhile, the medium with 1/2MS+0.2 mg·L⁻¹ IBA was the optimum medium for rooting, and the rooting rate reached 89%. Besides, the minimum concentration of Km inhibiting the regeneration of adventitious buds was 25 mg·L⁻¹. This study laid an important foundation for the research of genetic engineering on this cultivar of *E. grandiflorum*.

Key words: *Eustoma grandiflorum* ‘Excalibur Blue Picotee’; high frequency plant regeneration system; kanamycin sensitivity

收稿日期: 2013-06-07 修回日期: 2013-09-02

基金项目: 江苏省高校优势学科建设工程项目

作者简介: 韦银凤(1990-),女,陕西铜川人,硕士研究生,主要从事植物生物技术与分子生物学研究,(E-mail)weiyinfeng90@126.com。

*通讯作者: 陈崇顺,博士,硕士生导师,主要从事植物生物工程与分子生物学研究,(E-mail)chenchongshun@njnu.edu.cn。

洋桔梗(*Eustoma grandiflorum*),原产于美国南方和墨西哥,又名草原龙胆,为龙胆科草原龙胆属多年生宿根草本花卉,生产上常作一、二年生栽培(李竹英等,2011)。它的许多性状通过传统育种技术改良(Thiruvengadam *et al.*,2009)后,如今的商用植株株态轻盈潇洒,花色典雅明快,花形别致可爱,已成为国际上时尚的盆花和切花种类(Chen *et al.*,2010),并跻身世界十大切花之列(Thiruvengadam *et al.*,2009;李军萍等,2013)。**‘圣剑’**(Excalibur Blue Picotee)洋桔梗,花复色,白底紫边,2007年开始推出,现已成为秋季主要品种。

有性杂交是洋桔梗传统的主要育种方法,而植物基因工程可在基因水平上改变植物的遗传物质,能定向、高效地改造植物遗传性状,从而改变传统花卉的种类、颜色、品质,创造新奇的变异品种(崔兴国,2011)。对于植物基因工程育种研究,大多需要建立优良的植株再生体系(董福双等,2011)。有关洋桔梗叶片离体再生体系建立的研究表明,其基因型依赖性强,不同品种间差异大,再生频率低(陈奇等,2010)。另一方面,在进行遗传转化时,最常用的遗传标记基因为 *NPTII* 基因,该基因编码的新霉素磷酸转移酶能使植物产生抗卡那霉素特性(吕梦雨等,2010)。因此,对转化体的筛选一般需要确定受体植物对抗生素的敏感性,其中大多涉及不定芽再生的卡那霉素最低浓度的测定(王玉华等,2009;刘苗霞等,2011)。本研究以‘圣剑’洋桔梗品种叶片作为外植体,建立其植株高频再生体系,并确定抑制不定芽再生的卡那霉素最低浓度,为进一步开展相关基因工程研究奠定重要基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料 洋桔梗‘圣剑’(*Eustoma grandiflorum*)包衣种子,购于昆明缤纷园艺种子公 司。

1.1.2 生化试剂 6-苄氨基嘌呤(6-Benzylaminopurine, 6-BA)、 α -萘乙酸(Naphthalene acetic acid, NAA)、吲哚丁酸(Indole-3-butyric acid, IBA),均购于中国医药(集团)上海化学试剂公司;卡那霉素(Kanamycin, Km),购于南京丁贝生物科技有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 无菌苗的获得 参照金雪花等(2009)的方法,将‘圣剑’包衣种子置于用细纱布制成的纱布袋中,

在 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 洗衣粉溶液(200 mL)中浸泡 8 min,在自来水下冲洗 8 min;在超净台中用 70% 乙醇浸泡 60 s 后,再于浓度为 0.1% 的 HgCl_2 中浸泡 10 min;最后用无菌水冲洗 5 次,每次 3 min。用无菌滤纸吸干包衣种子表面水滴,然后将其播于 MS 基本培养基(含 3% 蔗糖,0.6% 琼脂,灭菌前 pH 值调为 6.0;在 0.1 Mpa,121 $^{\circ}\text{C}$ 下,灭菌 20 min)上,置于培养室萌发生长。培养室温度(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,光照强度 $60\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光周期 16h/8h。如无特殊说明,以下培养基配制及培养条件则均与此相同。

1.2.2 不定芽的再生 参照杨燕燕等(2007)的方法,以上述生长 4~5 个月的无菌苗为试材,自上而下取其第三对及以下的叶片,切去四边,即按照“五刀切”法,将叶片切成 $5\text{ mm}\times 5\text{ mm}$ 的叶块。将叶块背面向下接种于含 6-BA(0、0.1、0.5、1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和 NAA(0、0.01、0.05、0.10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)完全组合共 16 种处理的 MS 培养基上,并用镊子轻轻按压叶块,使其与培养基充分接触。每种处理 8 瓶,每瓶 5 个叶块,试验重复 3 次。以星期为单位定期观察,在培养 7 周时,记录再生不定芽生长状态,统计各处理的不定芽再生率。不定芽再生率=(再生不定芽叶块总数/接种叶块总数) $\times 100\%$ 。

1.2.3 芽苗的增殖 将再生不定芽接于 MS 基本培养基,进行均一化生长。将长高的芽苗切成带一对叶片的茎段,转接于 $\text{MS}+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 培养基中进行增殖(杨燕燕等,2007)。4 周后,再将获得的芽苗切下,转接于 MS 基本培养基中;过渡培养 2 周后,进行不定根的诱导。

1.2.4 不定根的诱导 将培养在上述 MS 基本培养基中、高度 3 cm 左右的芽苗,接入 $1/2$ MS 基本培养基并分别附加 IBA(0.2、0.4、0.6、0.8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)或 NAA(0.2、0.4、0.6、0.8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的完全培养基中,进行不定根的诱导(以 $1/2$ MS 基本培养基为对照)。共 9 种处理,每处理接 10 瓶,每瓶接 3 个芽苗,试验重复 3 次。以星期为单位定期观察,在培养 7 周时,记录再生不定根生长状态,统计各处理中各重复的芽苗生根率。进一步研究了较低浓度 NAA(0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)对诱导芽苗再生不定根的影响,试验设计同上,观测芽苗生根率、平均每芽苗生根数量、根平均长度、根生长状态等指标;芽苗生根率=(生根芽苗总数/接种芽苗总数) $\times 100\%$;平均每芽苗生根数量=芽苗生根总数/生根芽苗总数;根平均长度=芽苗根长度总和/芽苗生根总数。

1.2.5 卡那霉素敏感性的测定 参照相关文献(杨燕燕等,2007;郑阳霞等,2009),在 MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA 培养基中,分别加入 0、5、10、15、20、25、30、35 mg·L⁻¹ 的 Km,以测定抑制不定芽再生的 Km 最低浓度。为避免叶片大小不一而造成误差,如上所述,采用“五刀切”将叶片切成 5 mm×5 mm 左右的叶块。每个处理接 6 瓶,每瓶接 5 个叶块,试验重复 3 次。以星期为单位定期观察,在 6 周时,统计各处理的不定芽再生率、每叶块平均不定芽数(再生不定芽总数/再生不定芽叶块数)。

1.2.6 试验数据的统计分析 利用 SPSS17.0 软件,对研究所得数据分别进行单因素方差分析或双因素方差分析(对于百分数类型的数据,在进行方差分析前先进行适当的变换)。在分析结果中,标有不同小

写字母的处理间差异显著($\alpha=0.05$)。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 6-BA 与 NAA 的组合对不定芽再生的影响

在培养 1 周左右,叶块切口处开始膨大;在培养 2~3 周时,叶块切口处开始出现不定芽;在 7 周时,不定芽再生率及不定芽生长状态如表 1 和图 1 所示。双因素方差分析结果显示:添加 6-BA 和 0.05~0.1 mg·L⁻¹ NAA 能明显提高不定芽再生率,且 6-BA 的作用比 NAA 更为显著。综合表 1 结果,6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.01mg·L⁻¹ 为‘圣剑’叶片不定芽再生最适培养基。

表 1 不同浓度 6-BA 与 NAA 的组合对不定芽再生的影响

Table 1 Effects of different combinations of 6-BA and NAA on adventitious bud regeneration

处理 Treatment (6-BA, NAA) (mg·L ⁻¹)	平均不定芽再生率(%) Average regeneration rate of adventitious buds	不定芽生长状态 Growth of adventitious buds
1:(0.0,0.00)	2.5±1.44 d	不定芽极少、小、黄绿色,易与叶块分离
2:(0.0,0.01)	5.0±1.44 d	不定芽很少、小、黄绿色、玻璃化;有少量不定根
3:(0.0,0.05)	15.0±2.50 c	不定芽在不定根后生出,部分正常、叶片舒展;部分黄绿色;较多不定根
4:(0.0,0.10)	32.0±3.00 b	不定芽在不定根后生出,大部分为黄绿色、玻璃化;
5:(0.1,0.00)	89.2±1.67 a	不定芽由叶盘突起直接生出,叶片舒展,不定芽大;少部分为玻璃化
6:(0.1,0.01)	86.7±3.63 a	大部分不定芽从愈伤组织上生出,较大,叶片偏黄绿色;部分为玻璃化
7:(0.1,0.05)	93.3±1.67 a	不定芽从愈伤组织上生出,多为丛生状,大部分玻璃化,较脆;有的为正常芽
8:(0.1,0.10)	91.7±2.20 a	不定芽从愈伤组织上生出,多为丛生状,大部分为黄绿色、玻璃化,较脆
9:(0.5,0.00)	90.0±2.89 a	部分不定芽较分散,叶片舒展;部分为愈伤组织上生出,丛生、黄绿色、玻璃化
10:(0.5,0.01)	90.8±1.67 a	不定芽多为叶块突起直接生出,分散,叶片舒展,少部分玻璃化
11:(0.5,0.05)	92.5±1.44 a	不定芽为愈伤组织上生出,芽丛生状,几乎全部为黄绿色、玻璃化
12:(0.5,0.10)	93.3±0.83 a	不定芽为愈伤组织上生出,芽丛生状,几乎全部为黄绿色、玻璃化
13:(1.0,0.00)	89.2±3.00 a	不定芽为愈伤组织上生出,芽丛生状,小,黄绿色,玻璃化
14:(1.0,0.01)	93.3±3.00 a	不定芽为愈伤组织上生出,芽丛生状,小,黄绿色,玻璃化
15:(1.0,0.05)	90.0±0.83 a	不定芽为愈伤组织上生出,丛生状,很小,与愈伤组织很难分离,黄绿色,玻璃化
16:(1.0,0.10)	91.7±3.63 a	不定芽为愈伤组织上生出,丛生状,很小,与愈伤组织很难分离,黄绿色,玻璃化

注:标注不同小写字母的处理间具有显著性差异(在 $\alpha=0.05$ 水平)。下同。

Note: Different lowercase letters show significant difference at $\alpha=0.05$. The same below.

2.2 不同浓度 NAA 与 IBA 对芽苗不定根再生的影响

NAA 四种不同浓度(0.2、0.4、0.6、0.8 mg·L⁻¹)的处理中(图 2:A-D),芽苗基部均先形成大量愈伤组织,而后由愈伤组织生出不定根,且不定根空脆、易断,整个植株玻璃化现象严重,不能正常生长。由此可见,较高浓度 NAA 不利于‘圣剑’芽苗不定根再生及植株正常生长。因此,设计较低浓度(0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 mg·L⁻¹)的 NAA 处理,从平均生根率、单株均根数、平均根长及再生根生长状态等方面,进一步研究了 NAA 对诱导芽苗生根的影响(表 3,图 2:I-VI)。结果表明,就生根率而

言,0.04~0.10 mg·L⁻¹ 的 NAA 处理,生根率明显高于对照;0.02 mg·L⁻¹ 的 NAA 处理,生根率与对照组差异不显著。就单株平均根数而言,0.06 mg·L⁻¹ NAA 比其它浓度处理及对照能诱导再生更多的根(13.3 条/株)。就平均根长而言,以 0.02 mg·L⁻¹ NAA 处理效果为最好。就根生长状态而言,较低浓度 NAA 处理诱导的不定根均表现出先端锐尖、空脆、易断的特点。由此可见,NAA 浓度高或低均不适于植株进一步的生长。

IBA 四种不同浓度(0.2、0.4、0.6、0.8 mg·L⁻¹)的处理中(图 2:E-H,表 2),芽苗平均

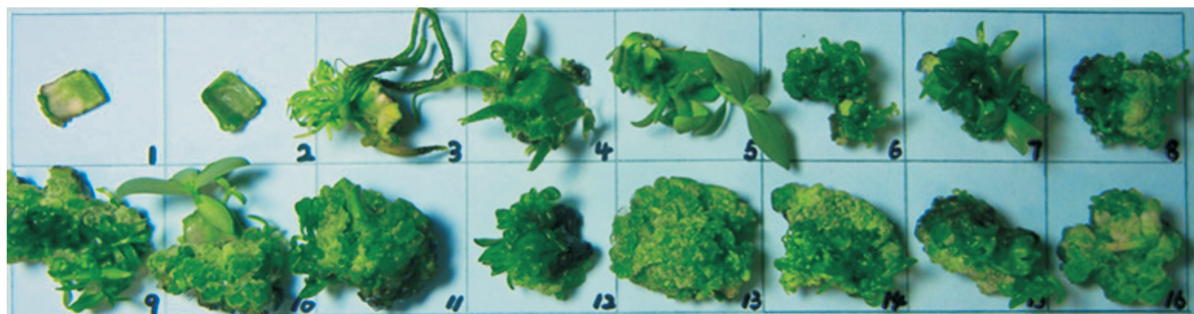


图 1 不同浓度 6-BA 与 NAA 的组合对不定芽再生的影响 1~16 号:6-BA (0,0.1,0.5,1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 分别与 NAA (0,0.01,0.05,0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的完全组合。

Fig. 1 Effects of different combinations of 6-BA and NAA on adventitious bud regeneration 1~16: Complete combination of 6-BA (0,0.1,0.5,1.0) and NAA (0,0.01,0.05,0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

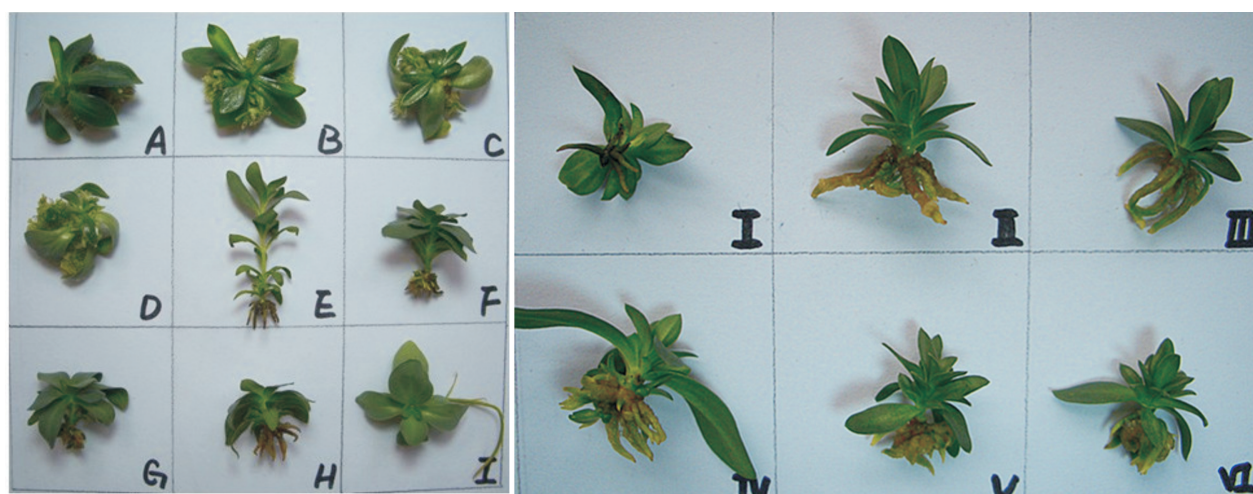


图 2 不同浓度 NAA 与 IBA 对芽苗不定根再生的影响 A~D: NAA 为 0.2,0.4,0.6,0.8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; E~H: IBA 为 0.2,0.4,0.6,0.8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; I 为对照; I~VI: 各处理 NAA 浓度分别为 0,0.02,0.04,0.06,0.08,0.10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

Fig. 2 Effects of different concentrations of NAA and IBA on rooting A~D: NAA 0.2,0.4,0.6,0.8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; E~H: IBA 0.2,0.4,0.6,0.8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; I: The control; I~VI: NAA in each treatment is 0,0.02,0.04,0.06,0.08,0.10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

表 2 IBA 对芽苗不定根再生的影响

Table 2 Effects of different concentrations of IBA on rooting

IBA 浓度 Concentration of IBA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	平均生根率 Average rooting rate (%)	不定根生长状态 Growth of adventitious root
0.2	88.9±2.23 a	根由茎部直接发出,根分散,粗细均匀,附生根毛
0.4	90.0±1.91 a	根由茎部直接发出,根分散,较短簇,附生根毛
0.6	91.1±1.10 a	根部有少量愈伤组织,根较粗,有根毛,少部分透明状,较易断
0.8	88.9±2.23 a	根部有少量愈伤组织,根较粗,部分透明状,较易断
0 (CK)	81.1±2.94 b	根由茎部直接发出,根较细长,附生根毛

生根率(88.9%~91.1%)均显著高于对照,但不同浓度间差异不显著。当 IBA 浓度为 0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,芽苗再生的不定根与茎直接相连,粗细均匀,数量多,韧性好,植株明显比在其它处理下长得高,长得好。当 IBA 为 0.6 和 0.8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,芽苗基部也出现形成愈伤组织的现象,再生的不定根也变得较

脆、易断。因此,‘圣剑’最适生根培养基为 1/2 MS +0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA。

2.3 抑制不定芽再生的卡那霉素最低浓度的确定

不同浓度 Km 对不定芽再生的影响,见图 3 和表 4。在 Km 浓度为 0 时,平均不定芽再生率为 95.6%;随着 Km 浓度不断升高,叶块不定芽再生受

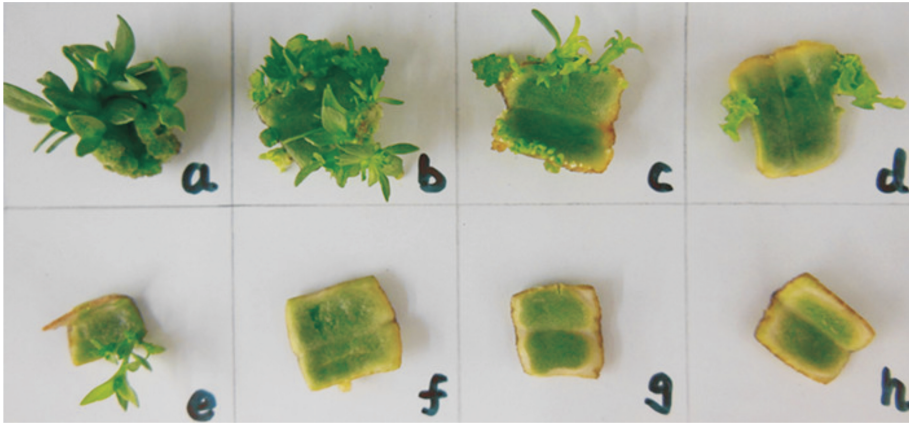


图3 不同浓度 Km 对不定芽再生的影响 a~h:各处理 Km 浓度为 0.5,10,15,20,25,30,35 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

Fig. 3 Effects of different concentrations of Km on the regeneration of adventitious buds

a-h: Km in each treatment is 0.5,10,15,20,25,30,35 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

表3 NAA 对诱导芽苗生根的影响

Table 3 Effects of different lower concentrations of NAA on rooting

NAA 浓度 Concentration of NAA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	平均生根率 Average rooting rate (%)	单株均根数 No. of roots per plant	平均根长 Average root length (cm)
0 (CK)	74.4±4.82 b	3.0±0.41 c	0.55±0.19 c
0.02	80.0±3.87 ab	2.3±0.63 c	1.64±0.32 a
0.04	88.9±2.20 a	9.0±1.08 b	0.92±0.18 b
0.06	90.0±3.87 a	13.3±1.11 a	0.83±0.19 bc
0.08	88.9±2.94 a	8.0±1.29 b	0.68±0.20 bc
0.10	91.1±1.10 a	9.3±1.31 b	0.58±0.11 c

表4 不同浓度 Km 对不定芽再生的影响

Table 4 Effects of different concentrations of Km on regeneration of adventitious bud

Km 浓度 Concentration of Km ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	平均不定芽再生率 Average regeneration rate of adventitious buds (%)	平均不定芽数/叶块 No. of adventitious buds per leaf
0 (CK)	95.6±2.23 a	11.88±0.64 a
5	73.3±5.77 b	5.20±0.96 b
10	36.7±3.83 c	1.42±0.68 c
15	10.0±1.90 d	0.20±0.19 d
20	4.4±2.94 de	0.07±0.11 d
25	0±0.00 e	0±0.00 d
30	0±0.00 e	0±0.00 d
35	0±0.00 e	0±0.00 d

抑制程度也逐渐加深,叶块边缘变黄、变褐,而且逐渐向叶块中央扩展(图3)。当 Km 浓度为 25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (图3中的 f)时,只有极少数叶块出现小的芽点,但最终未见不定芽的形成;而当 Km ; 30 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,则完全没有不定芽的再生。统计分析结果(表4)显示:随着 Km 浓度逐渐升高,平均不定芽再生率和平均不定芽数/叶块的值都逐渐下降,且各处理

间存在显著差异。表4结果显示,抑制‘圣剑’洋桔梗叶片不定芽再生的最低 Km 浓度为 25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3 结论与讨论

植物生长物质能以极微小的量影响植物的各项生理生化活动,对植物离体培养起决定性作用(袁学军等,2011)。通常将细胞分裂素与生长素以不同浓度进行组合诱导不定芽再生,且二者之间存在平衡关系,一旦打破这种平衡,就会明显减弱再生效果(龚明霞等,2008;刘冰等,2011)。本研究结果与此相吻合。通常,较低浓度的 6-BA 能有效促进不定芽的再生和增殖;而过高浓度的 6-BA 则促使不定芽过度再生,并呈矮簇状和玻璃化状态。相较于其他相关研究(金雪花等,2009;钟波,2012),本研究不仅以“平均不定芽再生率”作为评价指标,而且以“不定芽生长状态”作为检测指标,以能否进一步正常生长为评价标准,筛选适宜的培养基。

NAA 和 IBA 广泛用于诱导生根。一般生长素浓度低时,能促进生根;生长素浓度高时,往往先诱导形成愈伤组织,而后从愈伤组织上生根。这样的不定根,一般不与茎的导管相通,吸收的营养物质难以运输,不利于植株生长(杨永刚等,2001)。因此,本研究在利用生长素诱导生根时,不仅考虑到平均生根率,而且考虑到不定根的生长状态。张子学等(2005)研究所得 NAA 最适生根浓度对于‘圣剑’洋桔梗来说偏高而不利其生根。进一步研究较低浓度 NAA 对诱导芽苗生根的影响,发现再生出的不定根也均表现出某种程度的先端锐尖、空脆、易断的特

点。而利用较低浓度 IBA 处理时,生出的根则粗细均匀,略呈绿色,较为坚韧。因此,本研究认为 IBA 诱导洋桔梗生根的效果优于 NAA,这与毛元荣等(2004)的研究结果一致。而对于其它洋桔梗品种,是否也存在此规律,有待深入探讨。

不同种植物的不同外植体对卡那霉素的敏感程度不同,即使同种植物的不同品种对其敏感性也存在差异。本研究得出 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Km 为抑制‘圣剑’洋桔梗叶片不定芽再生的最低浓度,这与‘Double Mariachi Pink’洋桔梗相同(杨燕燕等,2007)。而抑制‘Deep Blue’洋桔梗叶片不定芽再生的 Km 最低浓度为 $45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (郑阳霞等,2009)。因此,对受体植物进行抗生素敏感性测定是遗传转化的必要先行步骤。

本研究建立了‘圣剑’洋桔梗的高频再生体系,为后期介导基因转化、品种改良,进而实行商品化生产奠定重要基础。

参考文献:

袁学军,王志勇. 2011. 植物组织培养[M]. 北京:北京师范大学出版社:18—19

Chen Q(陈奇), Wang GQ(王阁奇), Ma L(马莉), et al. 2010. Study of transformation *Eustoma russellianum* (洋桔梗的转基因研究)[J]. *Biotechnol Bull*(生物技术通报), (3):109—113

Cui XG(崔兴国). 2011. Application of plant genetic engineering in modern agriculture(植物基因工程在现代农业中的应用)[J]. *Mod Agric Sci Technol*(现代农业科技), **17**:52—53

Dong FS(董福双), Zhang YM(张艳敏), Yang F(杨帆), et al. 2011. Advances, problems and breakthrough direction of plant transgenic technique(植物转基因技术的进展存在问题及突破方向)[J]. *J Hebei Agric Sci*(河北农业科学), **15**(3):57—65

Jin XH(金雪花), Yang W(杨薇), Li YL(李有林), et al. 2009. Technique for aseptic seeding and establishment of plant regeneration system of *Eustoma grandiflorum*(洋桔梗无菌播种与植株再生体系的建立)[J]. *Northern Hortic*(北方园艺), **5**:48—50

Li JP(李军萍), Xu ZR(徐峥嵘), Shi JL(师进霖), et al. 2013. Effect of Methylcyclopropene on cut-flowers *Eustoma grandiflorum* during vase period(1-甲基环丙烯对洋桔梗切花的保鲜效应)[J]. *Jiangsu Agric Sci*(江苏农业科学), **41**(3):212—214

Li ZY(李竹英), Wu J(吴军). 2011. Study on germination of different varieties of *Eustoma grandiflorum*(洋桔梗品种发芽试验)[J]. *Northern Hortic*(北方园艺), **19**:63—65

Liu B(刘冰), Yang JS(杨际双), Xiao JZ(肖建忠), et al. 2011. Efficient shoots regeneration from adventitious buds of cutting chrysanthemum(切花菊高效不定芽再生体系的建立)[J]. *J Hebei Agric Univ*(河北农业大学学报), **34**(1):25—29

Lü MY(吕梦雨), Dong FS(董福双), Zhang JM(张俊敏), et al. 2010. Study on screening method of transgenic maize using kanamycin(转基因玉米抗卡那霉素筛选方法研究)[J]. *South-west Chin J Agric Sci*(西南农业学报), **23**(6):1 895—1 899

Mao YR(毛元荣), Liu Q(刘茜), Zhou GY(周根余). 2004. Establishment of leaf regeneration system of *Eustoma grandiflorum*(洋桔梗叶片再生体系的建立)[J]. *J Shanghai Norm Univ; Nat Sci Ed*(上海师范大学学报·自然科学版), **33**(1):92—96

Wang YH(王玉华), Hao JG(郝建国), Jia JF(贾敬芬). 2009. Establishment of recipient system of high frequency for genetic transformation of ‘Zaohong’ strawberry(‘早红’草莓高效遗传转化受体系统的建立)[J]. *Genom & Appl Biol*(基因组学与应用生物学), **28**(5):990—997

Yang YG(杨永刚), Zhou GY(周根余). 2001. Hormone regulation of *Eustoma grandiflorum* leaf in vitro regeneration system(洋桔梗叶片体外再生系统的激素调控)[J]. *J Shanghai Norm Univ; Nat Sci Ed*(上海师范大学学报·自然科学版), **30**(1):99—100

Yang YY(杨燕燕), Chen CS(陈崇顺), Qu DZ(瞿大枫), et al. 2007. Establishment of regeneration system with high frequency for *Eustoma grandiflorum* and determination of its sensitivity to kanamycin(洋桔梗高频再生系统的建立及其卡那霉素敏感性测定)[J]. *Jiangsu Agric Sci*(江苏农业科学), (2):98—100

Zhang ZX(张子学), Ding WQ(丁为群), Qiao HW(乔华伟), et al. 2005. Study of the fast propagation technology of *Eustoma grandiflorum*(洋桔梗的快速繁殖研究)[J]. *For Prod & Spec Chin*(中国林副特产), (4):1—3

Zheng YX(郑阳霞), Huang BC(黄彬城), Ji J(季静), et al. 2009. Establishment of *Agrobacterium* - mediated transformation system of *Eustoma grandiflorum*(农杆菌介导的洋桔梗遗传转化体系的建立)[J]. *Acta Agric Nucl Sin*(核农学报), **23**(4):597—601

Zhong B(钟波). 2012. Study on key technology of Production tissue culture seedling of *Eustoma grandiflorum*(洋桔梗组培苗生产关键技术研究)[J]. *Northern Hortic*(北方园艺), (16):90—92

ChenYT, Fang QS, Chiang CH, et al. 2010. Transgenic *Eustoma grandiflorum* expressing the bar gene are resistant to the herbicide Basta[J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, **102**:347—356

Thiruvengadam M, Yang CH. 2009. Ectopic expression of two MADS box genes from orchid (*Oncidium Gower Ramsey*) and lily (*Lilium longiflorum*) alters flower transition and formation in *Eustoma grandiflorum*[J]. *Plant Cell Rep*, **28**:1 463—1 473