

根癌农杆菌介导转录因子 *CBF1* 基因对菊花的转化

肖 政^{1,2}, 范崇辉^{1*}, 金万梅^{2*}

(1. 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西杨凌 712100; 2. 北京市农林科学院 林业果树研究所, 北京 100093)

摘 要: 利用根癌农杆菌介导法对菊花品种‘小金黄’叶片进行遗传转化, 研究影响菊花转化的若干因素, 建立一套高效的遗传转化体系。结果表明: 2 d 的预培养, OD_{600} 值约为 0.5 的农杆菌菌液添加 50 mg/L AS, 侵染时间 3 min, 2 d 的共培养, 从分化培养基获得的抗性芽在生根培养基 $MS+0.4$ mg/L NAA+10 mg/L Km+100 mg/L Cef 上进行延迟筛选, 有利于获得较高的转化效率。PCR 检测表明, *CBF1* 基因已整合到菊花基因组中, 共获得 18 株转基因植株, 在抗性株系中 PCR 阳性率为 36.7%。

关键词: 菊花; *CBF1*; 乙酰丁香酮; 卡那霉素; 遗传转化

中图分类号: S682.1+1

文献标识码: A

文章编号: 1004-1389(2009)06-0262-06

Agrobacterium-mediated Transformation of *Deranthema morifolium* Tzvel. cv. Xiaojinhuang with Transcription Factor *CBF1* Gene

XIAO Zheng^{1,2}, FAN Chonghui^{1*} and JIN Wanmei^{2*}

(1. College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China; 2. Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing 100093, China)

Abstract: In order to establish an efficient genetic transformation system with leaves of *Dendranthema morifolium* Tzvel. cv. Xiaojinhuang, several factors affected genetic transformation mediated by Agrobacterium were studied. The results showed that the highest transformation efficiency was obtained through the following transformation procedure: after preculture for 2 d, the explants were infected 3 min with 50 mg/L acetosyringone (AS) and $OD_{600} = 0.5$ Agrobacterium culture liquid, and then co-cultivated for 2 d. Resistant shoots from leaf disks were screened on $MS+0.4$ mg/L NAA + 100 mg/L Cef medium supplemented with 10 mg/L Km. Results of PCR proved that the *CBF1* gene was integrated into the genome of transgenic plants, and eighteen transgenic lines were obtained, the transformation rate was 36.7%.

Key words: *Dendranthema morifolium*; *CBF1*; AS; Kanamycin; Genetic transformation

菊花(*Dendranthema morifolium* Tzvel.) 原产中国, 是世界重要盆栽、切花及地被花卉, 是中国北方城区广为应用的重要园林绿化材料。然而, 在中国北方秋冬季露地生长情况下绿期较短, 因此开展耐寒性、耐旱性较强的品种培育显得尤为重要。通过植物基因工程将特异基因导入植物, 在不改变原有优良性状的基础上提高植物的

胁迫耐性已经在多种植物上获得了成功。在过去十几年里, 农杆菌介导的遗传转化技术已经在菊花遗传转化方面获得了成功^[1], 成功转化并得到表达的基因主要包括 GUS 基因^[2-3]、花色调节基因^[4]、花期调控 LFY 基因^[5]、株型改变 GAI 基因^[6]和抗病虫基因^[7]等。

拟南芥抗冻转录激活因子 CBF 家族在近几

收稿日期: 2009-03-24 修回日期: 2009-05-20

基金项目: 北京市自然科学基金项目(5052010); 北京市科技新星计划项目(2006B39); 转基因专项(Z07070501770701)部分资助。

作者简介: 肖 政(1984—), 男, 福建三明人, 在读硕士, 研究方向: 园林植物分子遗传育种。Email: xiaozheng314@163.com

* 通讯作者: 范崇辉, 金万梅。

年被深入研究,实验证明它能明显地提高植物的脯氨酸含量和耐低温能力^[8-10]。CBF 基因家族包括 CBF1、CBF2、CBF3 和 CBF4^[11-13]。Stockinger 等^[12]在研究拟南芥低温驯化期间如何调节 COR (cold regulated) 基因表达的分子机制时,分离鉴定了一种编码转录因子的 cDNA,这种转录因子含有 AP2/EREBP 的 DNA 结合域,能识别 COR 基因中的 CRT/DRE 元件并与之结合,故命名为 CBF1 (CRT/DRE binding factor 1),即 CRT/DRE 结合因子。随后 CBF1 转录激活因子受到广泛而深入的研究,经实验证明该因子能特异地与 CRT/DRE DNA 调控元件结合,激活启动子中具有这一调控元件的冷诱导和(或)脱水诱导基因的表达,从而引起植物体内的多种生理生化变化,并产生一定的抗寒和抗旱能力。CBF 基因在拟南芥和油菜中过量表达,显著增强了转基因植株对低温、干旱和高盐胁迫的耐性^[14-15]。CBF1 基因在番茄中过量表达可以提高番茄对多种逆境(缺水,冷激,过氧化)的耐性^[16-17]。本研究在已建立的菊花‘小金黄’再生体系的基础上,建立其高效的遗传转化体系,以期获得转 CBF1 基因的抗旱、耐低温植株。

1 材料与方法

1.1 材料

菊花品种‘小金黄’采自北京农林科学院林业果树研究所苗圃内。采当年生带腋芽茎段,流水冲洗后用饱和的洗涤剂水浸泡 2 h,无菌水冲洗后用 0.1% 的升汞消毒 5~7 min,无菌水冲洗 3 次,每次 5 min,接种于继代培养基 MS + 1.0 mg/L 6-BA 上,建立试管苗无性繁殖系。所用基本培养基为 MS 培养基,附加 30 g/L 蔗糖,6 g/L 琼脂,pH 为 5.8。主要培养基配方为,C1:分化培养基 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.4 mg/L NAA; C2:继代培养基 MS+1.0 mg/L 6-BA; C3:生根培养基 MS+0.4 mg/L NAA。

1.2 根癌农杆菌及所含的质粒

转化试验中所用的农杆菌菌株为 LBA4404,含有二元表达载体 pBPCBF1 (图 1)。该植物表达载体携带有 CaMV35S 启动子、新霉素磷酸转移酶基因 (NPT II) 和来自拟南芥冷诱导基因的转录因子 CBF1 基因(由北京大学林忠平教授惠赠)。

1.3 菊花抗生素敏感性的确定

在培养基中分别附加 0,4,8,12,16,20 mg/L 的卡那霉素 (Km),接种叶片,观察叶片生长动态,5 周后调查不定芽再生情况。

在生根培养基中分别附加 0,5,10,20,40 mg/L 的 Km,接种带芽的茎段,观察其生根动态,3 周后调查生长情况。

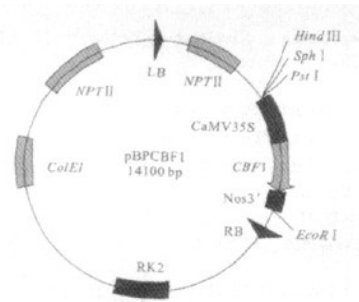


图 1 携 CBF1 基因的双元载体 pBPCBF1 模式图

Fig. 1 Diagram of binary vector pBPCBF1 with CBF1 gene

1.4 抑菌素浓度的确定

叶片经农杆菌侵染后接种于附加 0,100,200,300,400,500 mg/L 头孢霉素 (Cef) 的培养基上,3 周后观察抑菌效果。以未经农杆菌侵染的叶片为对照。

1.5 根癌农杆菌介导菊花叶片的转化

用接种针从含有 50 mg/L Km 的已制备好的固体平板 LB 培养基上挑取单个菌落,加入 40 mL 含有 50 mg/L Km 的液体 LB 培养基中,振荡培养 (28℃, 200 r/min, 黑暗条件下) 24~48 h,农杆菌生长至对数平台期;用新鲜无抗生素的 MS 液体培养基按一定比例稀释农杆菌液,继续振荡培养 4 h 左右,至 OD₆₀₀ 为 0.3~0.7。用 OD₆₀₀ 浓度为 0.3,0.5,0.7 的农杆菌液分别侵染预培养后的叶片各 3~6 min,以未侵染的叶片为对照。

用分别附加 0,50,100,200 mg/L 乙酰丁香酮 (AS) 的农杆菌液侵染 3~5 min,侵染后,用无菌滤纸将叶片周围菌液吸干,转接到分化培养基上,黑暗条件下共培养 2 d,以研究 AS 对转化效率的影响。

1.6 抗性植株的再生

将共培养完成的菊花叶片接入添加 Cef 300 mg/L 的分化培养基中,每 14 d 用新的分化培养

基转接一次。待外植体分化出小芽后,将小芽从外植体上切下,转入到附加 100 mg/L Cef 和 10 mg/L Km 的生根培养基进行抗性筛选。

1.7 抗性植株的 PCR 检测

以 CTAB 法^[18]提取转基因菊花叶片的总 DNA。PCR 扩增的引物分别为 P1(5'-GTACTC TAGTCA ATGAACTC-3') 和 P2 (5'-GAAACGACTATCGAATATTAG-3');扩增体系为 1 μ L 模板, 2 μ L 10 $\times$ 缓冲液, 2 μ L Mg^{2+} , Taq DNA 酶 0.5 μ L, P1 和 P2 均取 1 μ L, 去离子水补足 20 μ L; 扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.8 数据统计

抗性芽再生频率(%)的计算方法为:抗性再生频率=PCR 阳性芽数/Km 抗性芽总数 $\times$ 100%

2 结果与分析

2.1 菊花卡那霉素抗性筛选

不同质量浓度的 Km 对菊花叶片再生不定芽的影响很大,随着浓度的增加,其抑制作用加强。当 Km 的质量浓度为 0 时,叶片在 5 周后产生大量不定芽(图 2),再生频率为 67%。当 Km 的质量浓度为 4 mg/L,叶片有少量愈伤,无不定芽分化,随浓度增加,叶片切口愈伤减少,黄化现象加重。在附加有 Km 的培养基上叶片的再生频率均为 0。可见菊花品种‘小金黄’叶片对 Km 很敏感,4 mg/L 的 Km 即可完全抑制不定芽的再生和愈伤的形成。

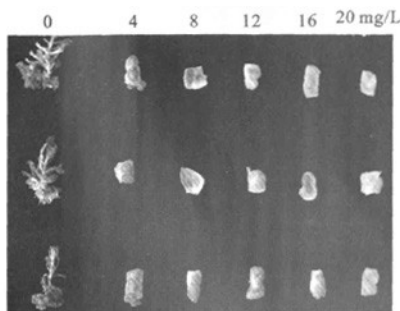


图 2 Km 浓度对叶片再生的影响

Fig. 2 Effects of Km concentration on leaf regeneration

对照的茎段在 3 周后生长出粗壮的根(图 3)。当 Km 的质量浓度为 5 mg/L 时,茎段的生长受到抑制,但 100% 的茎段可以生根;10 mg/L

的 Km 即能完全抑制根生长,茎顶端开始白化,20 mg/L Km 条件下茎段明显白化,以后随浓度递增白化现象加重。因此选 10 mg/L 的 Km 作为‘小金黄’遗传转化中生根筛选的临界浓度。

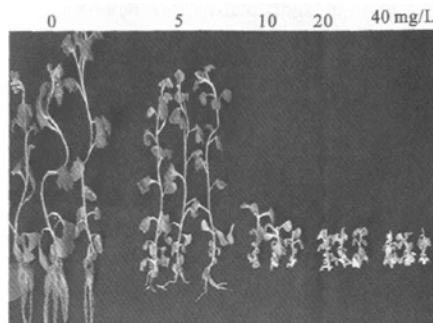


图 3 Km 浓度对菊花生根的影响

Fig. 3 Effects of Km concentration on root induction

2.2 抑菌素浓度对农杆菌生长的影响

将菌液(OD_{600} 值为 0.5 左右)浸泡过的叶片接种在没有添加 Cef 的培养基上,3 d 后,叶片周围出现点状的农杆菌斑,5 d 后农杆菌大量繁殖,培养基呈黑褐色,叶片均枯死;而附加 Cef 的培养基暂时没有出现农杆菌大量繁殖的现象。3 周后,在附加 100 mg/L Cef 的培养基中,叶片周围出现少量农杆菌斑;4 周后,附加 100 mg/L Cef 培养基出现农杆菌大量繁殖,附加 200 mg/L Cef 出现少量农杆菌斑;Cef 的浓度为 30, 400, 500 mg/L 的培养基暂时未发现农杆菌菌斑;此时对照的再生频率为 79.1%,在附加 Cef 浓度为 300, 400, 500 mg/L 的培养基上,叶片的再生频率分别为 41.6%, 14.5%, 10.4%。6 周后, Cef 浓度为 300 mg/L, 400 mg/L 的培养基均出现农杆菌菌斑。可见在 5 周内, Cef 浓度为 300, 400, 500 mg/L 时能有效抑制农杆菌的繁殖,其中 Cef 500 mg/L 的抑菌效果最好;但随着 Cef 浓度的增大,叶片的再生频率明显降低,菊花叶片再生不定芽的周期为 4 周左右,因此,受体材料抑菌所用 Cef 浓度以 300 mg/L 为宜。

2.3 遗传转化的优化

2.3.1 不同菌液浓度和侵染时间对转化效率的影响 农杆菌侵染时间及菌液浓度对菊花不定芽分化有较大影响。试验结果表明,菌液浓度 OD_{600} 为 0.5 时,侵染时间 3~6 min 时,转化效率均较高(表 1)。当菌液浓度 OD_{600} 为 0.7, 侵染 6 min 时,叶片切口处褐化严重,甚至腐烂,在后期

培养中很难抑制农杆菌的繁殖,导致转化率显著降低。侵染时间过短,菌液没有完全侵染外植体伤口,也不利于转化。因此,取农杆菌菌液侵染外

表 1 不同菌液浓度和侵染时间

对‘小金黄’遗传转化的影响

Table 1 Effects of Agrobacterium concentration and infection times on transformation of *Dendranthema morifolium* Tzvel. cv. ‘Xiaojinhuang’

菌液浓度 Concentration of agrobacterium (OD ₆₀₀)	侵染时间 /min Infection time	抗性芽再生频率 /% Regeneration rate of resistant shoot
0.3	3	0
0.3	6	0
0.5	3	5.2
0.5	6	4.3
0.7	3	3.1
0.7	6	0

注:外植体为 96 个;预培养 2 d,共培养 2 d。

Note: Explant numbers was 96; Preculture time was 2 d; Co-cultivation time was 2 d.

植体浓度 OD₆₀₀ 为 0.5,侵染 3 min 较为适宜。

2.3.2 乙酰丁香酮(AS)对转化效率的影响

Vir 区基因的活化是农杆菌 Ti 质粒整合的前提因素,它直接调控 T-DNA 的转移。试验表明,AS 作为常用的 Vir 区基因诱导物,能明显提高‘小金黄’叶片的转化效率。附加 50 mg/L AS 的农杆菌菌液的转化效率远高于对照(表 2),但随 AS 浓度增加,叶片的转化效率逐渐降低。

表 2 AS 对‘小金黄’转化效率的影响

Table 2 Effects of AS concentration on transformation frequency of ‘Xiaojinhuang’

AS 浓度/(mg/L) Concentration of AS	外植体数 No. of explants	PCR 阳性 Positive shoots	抗性芽再生频率/% Regeneration rate of resistant shoot
0	96	1	1.0
50	96	9	9.4
100	96	3	3.1
200	96	2	2.1

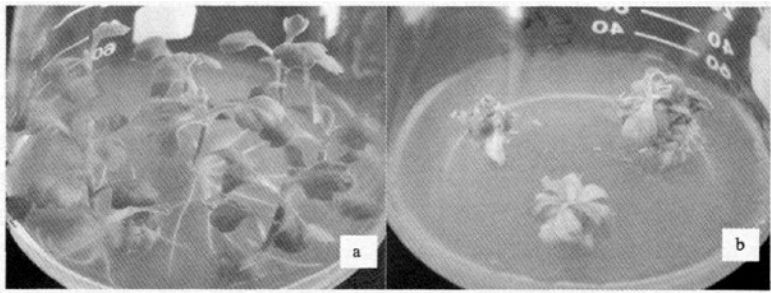


图 4 菊花转化芽的生长

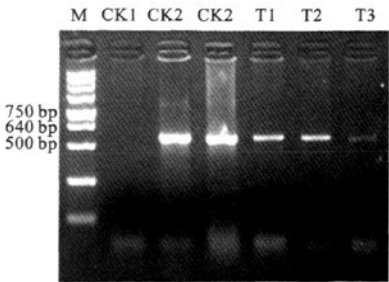
Fig. 4 Transformed shoots generated from the infected *Dendranthema* leaf discs and growing

2.4 抗性植株的获得

将从分化培养基上获得的再生芽切割下来,转接到含有 10 mg/L Km 和 100 mg/L Cef 的生根筛选培养基上继续培养,结果大部分芽出现黄化现象(图 4-b),最后枯死,即为逃逸芽。有个别芽能正常生根(图 4-a),形成完整的植株,即为抗性芽。

2.5 转基因植物 PCR 鉴定

对获得的抗性植株,提取叶片基因组 DNA,进行 PCR 检测。结果表明,部分抗性芽可以扩增出 CBF1 特异片段。共对 49 个株系进行了检测,其中 18 个株系的 DNA 经扩增产生了与阳性对照相同的特异扩增带,其片段大小约为 640 bp,与阳性质粒一致(图 5),其余 31 个株系没有扩增出该片段。



M, Marker; CK1. 菊花阴性对照; CK2. 质粒 pBPCBF1 阳性对照; T1~T3, 3 个转基因菊花株系 M. Molecular marker; CK1. Negative control; CK2. Plasmid DNA of pBPCBF1 as positive control; T1~T3. Three lines of transgenic *Dendranthema morifolium* Tzvel.

图 5 PCR 鉴定转基因植株

Fig. 5 PCR analysis of transgenic plants

3 讨论

本研究以试管苗叶片为外植体直接分化得到再生芽,利用生根培养基进行 Km 抗性筛选,初步获得转基因株系。整个遗传转化过程具有再生芽数量多,易操作,周期短的优点。从侵染到获得抗性植株只需要 3 个月。试验最终获得 49 个 Km 抗性株系,经 PCR 检测有 18 个株系扩增出特异的 PCR 谱带,在抗性株系中 PCR 阳性率为 36.7%。

外植体经农杆菌浸泡后,表面及浅层组织中共生大量农杆菌,需进行脱菌培养。农杆菌的有效去除对提高转化效率非常重要,若农杆菌去除不彻底就会导致后期培养中外植体污染、褐化死亡。本研究采用 300 mg/L 的 Cef 能在 40 d 内有效抑制农杆菌的大量繁殖,而且叶片有较高的再生频率。试验中发现,接种叶片 14 d 后,叶片切口刚开始膨大,有少量的愈伤组织,此时更换培养基有利于延迟农杆菌的繁殖,在转接操作时对叶片的伤害也小;后期叶片开始分化芽时,此时更换培养基容易对叶片造成二次伤害,导致刚萌发的芽容易愈伤化,而且后期一旦出现农杆菌菌斑,就难以再抑制。

遗传转化中要求施加的选择压既能有效地抑制非转化细胞的生长,使之缓慢死亡,又不影响转化细胞的正常生长。景岚^[19]认为,附加 25 mg/L Km 的选择培养基适宜筛选油菜抗性苗。本研究发现‘小金黄’品种对卡那霉素很敏感。在添加有 Km 的分化培养基上,叶片均无芽分化,叶片切口处均有黄化现象,随着 Km 浓度的升高,黄化现象逐渐加重。附加 10 mg/L Km 的生根培养基就能显著抑制植株的生长,使植株逐渐白化枯死。

另外,农杆菌菌液浓度和侵染时间影响外植体敏感反应及农杆菌的能否被有效去除。较低的菌液浓度不利于农杆菌附在外植体上,T-DNA 不能有效整合进植物细胞基因组,明显降低转化效果;菌液浓度过高或侵染时间过长,使外植体受到农杆菌过度伤害而导致外植体切口褐化、腐烂严重,且共培养后农杆菌极不易去除,明显降低转化效率。因而,在菌液浓度和侵染时间上需严格控制,以避免或减轻对外植体的伤害及农杆菌污染程度。本试验选择菌液浓度 OD₆₀₀ 为 0.5,侵染时间以 3~5 min 较适宜。

乙酰丁香酮是遗传转化中常用的诱导能力较强的一种酚类化合物,对单子叶植物的遗传转化有很大帮助,而在双子叶植物中,不同的植物种类却有不同的要求。很多双子叶植物由于其组织和器官受伤后可以分泌类似酚类或酮类的物质,因此对 AS 没有很强的依赖性,在没有 AS 存在的情况下仍然可以获得一定的转化效率。张国裕^[20]在对菜心进行遗传转化的过程中发现,添加 100 μ mol/L AS 的农杆菌菌液有利于菜心转化。郭丽^[21]在对大岩桐进行遗传转化的过程中,筛选培养基中附加不同浓度的 AS,在处理和对照间的叶片不定芽分化没有明显差别。本试验在农杆菌液中添加不同浓度的 AS,转化效率明显高于对照,其中以附加 50 mg/L AS 的农杆菌液转化效率最高,达到 9.4%。此外,在前期预试验中,筛选培养基分别附加 AS 浓度 0、50、100、200 mg/L,结果叶片不定芽分化在处理和对照间没有明显差别(数据未列出)。可见相同浓度的 AS 不同的使用方式,对叶片转化效率的影响有所不同。

低温、干旱、高盐等逆境条件不仅限制观赏植物栽培范围,而目每年给园林绿化造成重大损失,因此培育耐寒的园林植物新品种在理论和现实上都具有深远的意义。CBF1 转录因子能调控一组抗干旱、抗低温基因的表达,更有效地提高植物抗干旱、抗低温的能力。Owens 等^[22]在酸樱桃中克隆了类似 CBF1 的片段。在水稻、番茄等植物中也克隆到 CBF1 基因^[23],同样草莓中也存在 CBF1 基因冷调节途径^[24]。CBF 转录因子的发现为基因工程改良植物耐逆性提供了一种全新的技术途径。

参考文献:

- [1] Teixeira da Silva J A. Chrysanthemum: Advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology [J]. Biotechnol Adv, 2003, 21: 715-766.
- [2] Ledger S E, Deroles S C, Given N K. Regeneration and Agrobacterium-mediated transformation of chrysanthemum [J]. Plant Cell Reports, 1991, 10: 195-199.
- [3] Boase M R, Borst N K, Bradley J M. Chrysanthemum cultivar-Agrobacterium interactions revealed by GUS expression time course experiments [J]. Scientia Horticulture, 1998, 77: 89-107.
- [4] Gutterson N. Anthocyanin biosynthetic genes and their application to flower color modification through sense suppression [J]. HortScience, 1995, 30(5): 964-966.

- [5] 邵寒霜,李继红,郑学勤,等. 拟南芥 LFY cDNA 的克隆及转化菊花的研究[J]. 植物学报,1999, 41(3): 268-271.
- [6] Petty L M, Harberd N P, Jackson S D, *et al.* Expression of the *Arabidopsis* *gai* gene under its own promoter causes a reduction in plant height in chrysanthemum by attenuation of the gibberellin response [J]. *Plant Science*, 2003, 164: 175-182.
- [7] Yepes L C, Mittak V, Pang S Z, *et al.* Biolistic transformation of chrysanthemum with the nucleocapsid gene of tomato spotted wilt virus [J]. *Plant Cell Reports*, 1995, 14: 694-698.
- [8] Gilmour S J, Zarka D G, Stockinger E J, *et al.* Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression [J]. *Plant J*, 1998, 16: 433-442.
- [9] Jaglo-ottosen K R, Gilmour S J, Zarka D G, *et al.* *Arabidopsis* CBF1 over expression induces COR genes and enhances freezing tolerance [J]. *Science*, 1998, 280 (5360): 104-106.
- [10] Medina J, Bargues M, Terol J, *et al.* The *Arabidopsis* CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration [J]. *Plant Physio*, 1999, 119: 463-470.
- [11] Shinwari Z K, Nakashima K, Miura S, *et al.* An *Arabidopsis* gene family encoding DRE/CRT binding proteins involved in low-temperature-responsive gene expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 250(1): 161-170.
- [12] Stokinger E J, Gilmour S J, Thomashow M F. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(3): 1035-1040.
- [13] Haake V, Cook D, Riechmann J L, *et al.* Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physio*, 2002, 130(2): 639-648.
- [14] Liu Q, Mic Kasuga, Yoh Sakuma, *et al.* Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought-and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 1998, 10: 1391-1406.
- [15] Kasuga M, Liu Q, Miura S, *et al.* Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor [J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17: 287-291.
- [16] Hsieh T H, Lee J T, Yang P T, *et al.* Heterology expression of the *Arabidopsis* C-Repeat/dehydration response element binding factor1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato [J]. *Plant Physiology*, 2002, 129: 1086-1094.
- [17] Hsieh T H, Lee J T, Charng Y Y, *et al.* Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis* CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress [J]. *Plant Physiology*, 2002, 130: 618-626.
- [18] Porebski S, Bailey L G, Baum B R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and poly phenol components [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1997, 15: 8-15.
- [19] 景 岚, 孙燕飞, 张 岗, 等. 油菜遗传转化体系中卡那霉素浓度的筛选及抑菌剂的选择 [J]. 西北农业学报, 2008, 17(1): 102-105.
- [20] 张国裕, 王 岩, 程智慧, 等. 农杆菌介导的菜心遗传转化体系的建立 [J]. 西北农林科技大学学报, 2006, 34(9): 61-64.
- [21] 郭 丽. 大岩桐遗传转化体系的建立与 LEA 蛋白基因的导入 [D]. 重庆: 西南大学, 2008.
- [22] Owens C L, Thomashow M F, Hancock J F, *et al.* CBF1 orthologs in sour cherry and strawberry and the heterologous expression of CBF1 in strawberry [J]. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 2002, 127(4): 489-494.
- [23] Jaglo K R, Kelf S, Amundsen K L. Components of *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species [J]. *Plant Physiology*, 2001, 127: 910-917.
- [24] Christlan N D, Francois O, Mario H, *et al.* Gene expression during cold acclimation in strawberry [J]. *Plant Cell Physiology*, 1997, 38(7): 863-870.

刊名: [西北农业学报](#) [ISTIC](#) [PKU](#)
英文刊名: [ACTA AGRICULTURAE BOREALI-OccIDENTALIS SINICA](#)
年, 卷(期): 2009, 18(6)

参考文献(24条)

1. [Teixeirada Silva J A](#) [Chrysanthemum:Advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology](#) 2003
2. [Ledger S E;Deroles S C;Given N K](#) [Regeneration and Agrobacterium-mediated transformation of chrysanthemum](#) 1991
3. [Boase M R;Borst N K;Bradley J M](#) [Chrysanthemum cultivar-Agrobacterium interactions revealed by GUS expression time course experiments](#) 1998
4. [Gutterson N](#) [Anthocyanin biosynthetic genes and their application to flower color modification through sense suppression](#)[外文期刊] 1995(05)
5. 邵寒霜;李继红;郑学勤 [拟南芥LFY cDNA的克隆及转化菊花的研究](#) 1999(03)
6. [Petty L M;Harberd N P;Jackson S D](#) [Expression of the Arabidopsis gai gene under its own promoter causes a reduction in plant height in chrysanthemum by attenuation of the gibberellin response](#) 2003
7. [Yepes L C;Mittak V;Pang S Z](#) [Biolistic transformation of chrysanthemum with the nucleocapsid gene of tomato spotted wilt virus](#) 1995
8. [Gilmour S J;Zarka D G;Stockinger E J](#) [Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression](#) 1998
9. [Jaglo-ottosen K R;Gilmour S J;Zarka D G](#) [Arabidopsis CBF1 over expression induces COR genes and enhances freezing tolerance](#)[外文期刊] 1998(5360)
10. [Medina J;Bargues M;Terol J](#) [The arabidopsis CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration](#) 1999
11. [Shinwari Z K;Nakashima K;Miura S](#) [An arabidopsis gene family encoding DRE/CRT binding proteins involved in low-temperature-responsive gene expression](#)[外文期刊] 1998(01)
12. [Stokinger E J;Gilmour S J;Thomashow M F](#) [Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit](#) 1997(03)
13. [Haake V;Cook D;Riechmann J L](#) [Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis](#)[外文期刊] 2002(02)
14. [Liu Q;Mie Kasuga;Yoh Sakuma](#) [Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought-and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis](#)[外文期刊] 1998
15. [Kasuga M;Liu Q;Miura S](#) [Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor](#) 1999
16. [Hsieh T H;Lee J T;Yang P T](#) [Heterology expression of the Arabidopsis C-Repeat/dehydration response](#)

[element binding factor1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato](#) 2002

17. [Hsieh T H;Lee J T;Charng Y Y](#) [Tomato plants ectopically expressing Arabidopsis CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress](#) 2002

18. [Porebski S;Bailey L G;Baum B R](#) [Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and poly phenol components](#) 1997

19. [景岚;孙燕飞;张岗](#) [油菜遗传转化体系中卡那霉素浓度的筛选及抑菌剂的选择](#)[期刊论文]-[西北农业学报](#) 2008(01)

20. [张国裕;王岩;程智慧](#) [农杆菌介导的菜心遗传转化体系的建立](#)[期刊论文]-[西北农林科技大学学报\(自然科学版\)](#) 2006(09)

21. [郭丽](#) [大岩桐遗传转化体系的建立与LEA蛋白基因的导入](#)[学位论文] 2008

22. [Owens C L;Thomashow M F;Hancock J F](#) [CBF1 orthologs in sour cherry and strawberry and the heterologous expression of CBF1 in strawberry](#)[外文期刊] 2002(04)

23. [Jaglo K R;Kelf S;Amundsen K L](#) [Components of Arabidopsis C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in Brassica napus and other plant species](#) 2001

24. [Christlan N D;Francois O;Mario H](#) [Gene expression during cold acclimation in strawberry](#)[外文期刊] 1997(07)

本文读者也读过(10条)

1. [李庆芝. 尚志华. 房玉洁. 李玲. LI Qing-zhi. SHANG Zhi-hua. FANG Yu-jie. LI Ling](#) [姜基因转化系统的建立及优化](#)[期刊论文]-[山东农业科学](#)2006(3)

2. [于淼. 刘兆磊. 陈素梅. 陈发棣. YU Miao. LIU Zhao-lei. CHEN Su-mei. CHEN Fa-di](#) [转梅PGIP基因增强菊花抗病性研究](#)[期刊论文]-[西北植物学报](#)2010, 30(6)

3. [郑树松. 安成才. 李启任. 陈章良](#) [乙酰丁香酮对棉花下胚轴遗传转化效率的影响](#)[期刊论文]-[棉花学报](#)2003, 15(2)

4. [王春能. 张启翔. 高亦柯](#) [菊花转基因研究进展](#)[期刊论文]-[河南林业科技](#)2002, 22(2)

5. [李超. 史春风. 魏倩. 宁艳民. 洪波. LI Chao. SHI Chunfeng. WEI Qian. NING Yanmin. HONG Bo](#) [转DREB1A基因地被菊花Fall Color后代综合性状及耐寒性检测](#)[期刊论文]-[西北农业学报](#)2010, 19(6)

6. [王娟. 韩科厅. 戴思兰. Wang Juan. Han Keting. Dai Silan](#) [玉米Lc基因植物表达载体构建及菊花转化](#)[期刊论文]-[基因组学与应用生物学](#)2009, 28(2)

7. [任永霞. 季静. 王萍. 王罡. Ren Yong-xia. Ji Jing. WANG Ping. WANG Gang](#) [农杆菌介导类胡萝卜素合成酶基因LycB转化菊花的研究](#)[期刊论文]-[吉林农业大学学报](#)2005, 27(3)

8. [蒋细旺. 包满珠](#) [菊花转基因研究进展](#)[期刊论文]-[华中农业大学学报](#)2003, 22(6)

9. [杨秀荣. 陈永文. 方平. 高峰](#) [乙酰丁香酮对根癌农杆菌介导的甘薯遗传转化的影响](#)[期刊论文]-[西南师范大学学报\(自然科学版\)](#)2002, 27(5)

10. [何俊平. 陈发棣. 陈素梅. 房伟民. 缪恒彬. 罗火林](#) [石蒜凝集素基因转化切花菊及抗蚜性鉴定](#)[期刊论文]-[西北植物学报](#)2009, 29(11)

引用本文格式：[根癌农杆菌介导转录因子CBF1基因对菊花的转化](#)[期刊论文]-[西北农业学报](#) 2009(6)