

张 倩, 孙 晶, 廖 静, 等. RNA 干扰技术抑制洋桔梗 ACC 合酶基因的表达[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(2): 267-272.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.02.005

RNA 干扰技术抑制洋桔梗 ACC 合酶基因的表达

张 倩, 孙 晶, 廖 静, 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, 江苏 南京 210023)

摘要: 为了延长洋桔梗的花期, 本研究通过农杆菌介导法, 以 ACC 合酶(ACS) 基因干扰表达载体, 对 Double Mariachi Pink 洋桔梗(*Eustoma grandiflorum*) 的叶片外植体进行了转化。经过再生芽的筛选增殖培养, 在含有卡那霉素 Km (15 mg/L) 再生根筛选培养基中得到了 46 株抗性苗, 其中 11 株经 *GFP* 基因 PCR 鉴定为阳性。经进一步的 *GFP* 基因 RT-PCR 鉴定, 3 株表达为阳性, 并且其中 2 株经 *GFP* 荧光检测呈阳性。提取荧光阳性植株 RNA, 逆转录后, 进行了 ACS 荧光定量 PCR。结果表明, 与未转基因对照植株相比, 转基因植株 ACS 的相对表达量平均下降了 63.17%。花期统计结果表明, ACS 干扰表达载体转化的洋桔梗植株花期比未转基因植株对照延长了 17 d。

关键词: 洋桔梗; ACC 合酶; RNA 干扰; 花期

中图分类号: S681.9

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2017)02-0267-06

Inhibition of ACC synthase gene expression in *Eustoma grandiflorum* using RNA interference technology

ZHANG Qian, SUN Jing, LIAO Jing, CHEN Chong-shun

(College of Life Sciences, Nanjing Normal University / Jiangsu Key Laboratory of Biodiversity and Biotechnology, Nanjing 210023, China)

Abstract: To prolong the life of cut flower of *Eustoma grandiflorum*, leaf explants of Double Mariachi Pink were transformed with the ACC synthase (ACS) gene interference expression vector by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method. Forty six resistant regenerated plantlets rooted in the culture medium containing kanamycin (15 mg/L), 11 of which were identified as positive by PCR of *GFP* gene. RT-PCR revealed that, three plantlets were positive for expression, and two of them were positive by *GFP* fluorescence detection. The ACS fluorescence quantitative PCR was performed after the fluorescence-positive plant RNA was extracted and the RNA was reversely transcribed. The results showed that the ACS relative expression in the transformed lines was decreased by an average of 63.17%, compared with the untransformed control. The flowering time for the transformed plant was also markedly prolonged (17 days longer).

Key words: *Eustoma grandiflorum*; ACC synthase; RNA interference; flowering time

洋桔梗(*Eustoma grandiflorum*), 又名草原龙胆, 是龙胆科草原龙胆属的一、二年生草本观赏植物。

洋桔梗植株妩媚多姿、花型别致可爱、花色丰富, 近年来成为国际上一种流行的高档鲜切花, 现已跻身全球市场最受欢迎的十大切花之列^[1]。鲜切花必须具有较长的保鲜期才能提高其商品价值, 因此如何使花卉延缓衰老、延长保鲜期, 一直是国内外相关方面关注的重要问题。研究结果证明, 乙烯在切花的衰老中起着极其重要的作用。罗江会等^[2]发现乙烯参与了蜡梅花朵开放和衰老的调控。Ichimura 等^[3]在研究切花洋桔梗的衰老与乙烯产生的关系

收稿日期: 2016-07-31

基金项目: 江苏省自然科学基金重点项目(BK2001206)

作者简介: 张 倩(1994-), 女, 安徽蚌埠人, 硕士研究生, 主要从事植物生物技术与分子生物学研究。(Tel) 15996270610; (E-mail) QianZhangNNU@163.com。孙 晶为共同第一作者。

通讯作者: 陈崇顺, (Tel) 13815862346; (E-mail) chenchongshun@njnu.edu.cn

和切花洋桔梗对乙烯的敏感性时发现,洋桔梗产生的乙烯随着花的衰老而增加。洋桔梗切花对乙烯较敏感,较易衰败,一般瓶插寿命只有 5~6 d^[4]。

随着对乙烯功能研究的逐渐深入,利用基因工程方法抑制乙烯合成,延缓果实成熟或花卉衰老已成为当前研究的热点。植物中 ACC 合酶(ACS)是乙烯生物合成的重要限速酶,由多基因家族编码^[5],它在植物组织内的活性大小决定着乙烯产生的速率。Kosugi 等^[6]发现氨基异丁酸(AOIB)可抑制 ACS 和 ACC 氧化酶(ACO)的活性,从而抑制乙烯的合成,延长康乃馨的保鲜时长。Nakajima 等^[7]的研究结果表明,导入 ACS 反义基因,可提高烟草耐受臭氧的能力,降低由臭氧诱导产生的乙烯生成量。陈银华等^[8]构建了能自主形成发卡结构的 ACO 基因的 RNA 干扰载体,转基因花椰菜叶片的 Northern blotting 分析以及酶活性试验结果证实内源基因的表达受到了抑制。

RNA 干扰(RNAi)是指内源性或外源性双链 RNA(dsRNA)介导的细胞内 mRNA 发生特异性降解,导致靶基因的表达沉默,产生相应的功能表型缺失^[9-12]。本研究拟以 Double Mariachi Pink 洋桔梗为试验材料,利用 RNAi 技术,进行洋桔梗 ACS 基因的 RNAi 研究,以期提高洋桔梗切花寿命,培育具有较长观赏周期的优良品种。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料:转接 30 d 左右幼嫩的 Double Mariachi Pink 洋桔梗组培苗顶芽下 2~3 对叶片作外植体。

菌株和质粒:已转入干扰载体 pCambia1301-GFP-(*GUS*+ACS)*i-NPT II*(本实验室保存)的根癌农杆菌菌株 LBA4404^[13]。pCambia1301-GFP-(*GUS*+ACS)*i-NPT II*质粒长约 14 000 bp,T-DNA 区含选择标记基因 *NPT II* 和报告基因 *GFP*,进行遗传转化时可通过卡那霉素抗性筛选转化体,长 1 137 bp 的 ACC 合酶基因片段位于双向启动子 CaMV 35 S 下游。

试剂:萘乙酸(NAA)、6-苄氨基嘌呤(6-BA)为 Sanland International Inc 公司产品,乙酰丁香酮(AS)购自上海生工生物工程技术有限公司,卡那霉素(Km)为 BBI 公司产品,购自南京赛吉科技有限

公司,羧苄青霉素(Cb)为 Japan 分装,琼脂糖为西班牙分装,均购自南京基天生物技术有限公司,利福平(Rif)为 Scigene 公司产品。植物基因组 DNA、RNA 提取试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒购于南京华普生物公司,DNA 分子量标准:DL15000 DNA Marker、dNTPs、10×Buffer、MgCl₂、Taq DNA 聚合酶、反转录试剂盒均为 TaKaRa 公司产品,购于大连宝生物公司,Marker 3 购于广东东盛科技有限公司,荧光定量试剂盒为 Vazyme 公司产品,所用引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 农杆菌菌液的制备 将携带 pCambia1301-GFP-(*GUS*+ACS)*i-NPT II* 质粒的农杆菌单菌落接种于 40 ml LB+50 mg/L Km +50 mg/L Rif 液体培养基中,28 ℃、200 r/min 培养 18 h 左右,使 OD₆₀₀ 达到 0.8~1.0,4 000 r/min 离心 5 min,沉淀菌体。菌体置于无菌 1/2MS(pH=5.8)液体培养基悬浮培养,用 1/2MS 液体培养基稀释至 OD₆₀₀ 约为 0.5,并加入终浓度为 100 mol/L 的 AS^[14]。

1.2.2 叶盘法转化洋桔梗 选取洋桔梗组培苗的幼嫩叶片,采用“三刀切”切割叶片^[15],将其接种于 MS+6-BA 1.00 mg/L 培养基上,于 24 ℃、光照条件下预培养 3 d^[16]。将预培养的叶片取出,放在无菌小培养皿中,向培养皿中倒入稀释好的菌液,室温下不断摇动菌液使叶片与菌液充分接触(大约 10 min),取出叶片置于无菌滤纸上吸去多余的菌液。将叶片放回预培养基中,于 24 ℃、黑暗条件下共培养 4 d,将叶片转入 MS+1.00 mg/L 6-BA +30.00 mg/L Km +200.00 mg/L Cb 培养基,于 24 ℃、光照条件下培养。将再生芽切下转入筛选增殖培养基 MS+0.10 mg/L 6-BA +0.05 mg/L NAA +30.00 mg/L Km +100.00 mg/L Cb 中,30 d 更换 1 次新鲜的培养基,筛选培养 2 代。

1.2.3 抗性苗的生根筛选检测 将形态正常、生长健康的抗性绿苗,转入生根培养基 1/2MS +0.10 mg/L NAA +15.00 mg/L Km 中生根^[16]。

1.2.4 抗性苗 PCR 检测 *GFP* 利用 DNA 试剂盒分别提取抗 Km 生根的洋桔梗和未转化洋桔梗(对照)的基因组 DNA,采用 PCR 方法检测 *GFP*。根据 *GFP*(X83959)的保守序列,设计 1 对特异引物:上游引物 *GFP*-P1:5'-ATGCTGAGCAAGGGCGAGGA-3',下游引物 *GFP*-P2:5'-TTACTTGTACAGCTCGTC-

CAT-3'。以无菌 ddH₂O 为空白对照,未转基因的洋桔梗 DNA 为阴性对照, pCAMBIA1301-*GFP*-(*GUS*+*ACS*)*i-NPT II* 质粒为阳性对照,反应体系为:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 40 s,53 ℃ 复性 50 s,72 ℃ 延伸 1 min,循环 35 次,72 ℃ 延伸 7 min,4 ℃ 保温。PCR 电泳结果置于紫外分析仪上观察,并通过 UVP 紫外凝胶成像系统采集图像。

1.2.5 抗性苗 RT-PCR 检测 *GFP* 利用植物 RNA 的提取试剂盒提取洋桔梗中总 RNA,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。利用 TaKaRa 反转录试剂盒进行 RNA 的反转录,将得到的 cDNA 于 -20 ℃ 下保存。RT-PCR 引物及扩增条件同 PCR 检测,1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.6 抗性苗的 *GFP* 荧光检测 转入干扰载体 pCAMBIA1301-*GFP*-(*GUS*+*ACS*)*i-NPT II* 的洋桔梗叶片在紫外波长 (365 nm) 的光激发下,会发荧光。利用该特点,将 RT-PCR 检测呈阳性的转基因完整植株和未转基因的洋桔梗完整植株,用长波紫外灯照射,成像观察。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 检测 *ACS* 基因的表达 利用植物 RNA 的提取试剂盒提取 *GFP* 荧光阳性植株及未转基因洋桔梗中总 RNA,1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。根据干扰载体 pCAMBIA1301-*GFP*-(*GUS*+*ACS*)*i-NPT II* 中 *ACS* 基因的保守序列,设计 1 对特异引物:上游引物: *ACSi-P1*:5'-CACGTTCGCTCCAAGCTG-3',下游引物: *ACSi-P2*:5'-GT-TACCAGTGGCGTTGCTG-3',利用 TaKaRa 反转录试剂盒进行 RNA 的反转录,将得到的 cDNA 于 -20 ℃ 下保存。以 cDNA 为模板,根据洋桔梗 *Actin* 基因扩增内参引物 *ACT-F*:5'-CCCATGCAATTCCTTCGTCTA-3'和 *ACT-R*:5'-TTGCCATACAAATCCTTCCT-3',进行荧光定量 PCR 检测。反应体系含 AceQ QPCR SYBR Green Master Mix 5.0 μl、cDNA 2.0 μl、10 μmol/L 上下游引物各 0.2 μl,补水至总体积 10.0 μl。反应程序为 95 ℃ 5 min;95 ℃ 10 s,60 ℃ 60 s,40 个循环,试验设 3 个重复,利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达量。

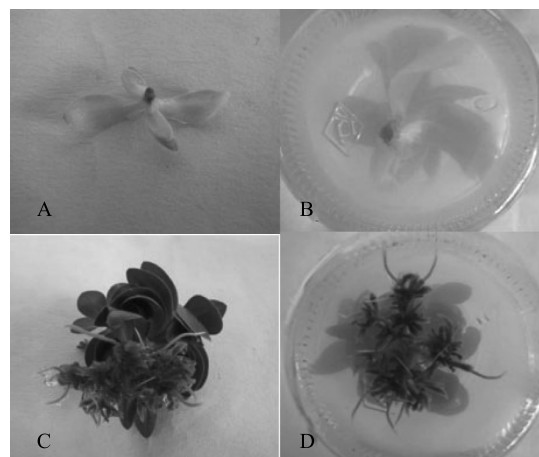
1.2.8 转基因组培苗的出瓶、炼苗、移栽及花期统计 选取叶片在 4 片以上,生长势与根系状况良好的组培苗,先在 (25±1) ℃、光照度 60 μmol/(m²·s)、光周期 16 h/8 h、湿度为 70%~80% 的培养室内打开瓶盖,并在培养瓶中放入无菌水,超

过培养基约 1 cm,炼苗 3 d。取出组培苗,用无菌水冲洗根部,移栽至经高温灭菌处理的混合基质(田园土:泥炭土:蛭石=5:4:1,体积比)中,自然光照下生长。生长 30 d 后统计幼苗的成活率和花期。

2 结果与分析

2.1 抗性苗的生根筛选检测

由于洋桔梗根对 Km 相当敏感,组培苗转接到含 15 mg/L Km 的生根培养基中,可观察到 Km 对生根有明显的抑制作用。转化干扰载体的组培苗,由于基因组中有抗 Km 的基因,对 Km 有一定的抗性,所以转化苗在含 Km 的培养基中生根良好。将 2 次 Km 筛选后所得的 65 株抗性苗转移到生根筛选培养基中,30 d 后观察生根情况,有 19 株抗性苗不能生根。前期茎叶亦能生长,后期茎叶自下而上枯黄(图 1),最后枯萎而死。经过生根筛选,共得到 46 株正常生根的抗性苗,生根率为 70.8%。



A、B:经 Km 筛选后不能生根的抗性苗;C、D:经 Km 筛选后能生根的抗性苗。

图 1 Km 抗性苗

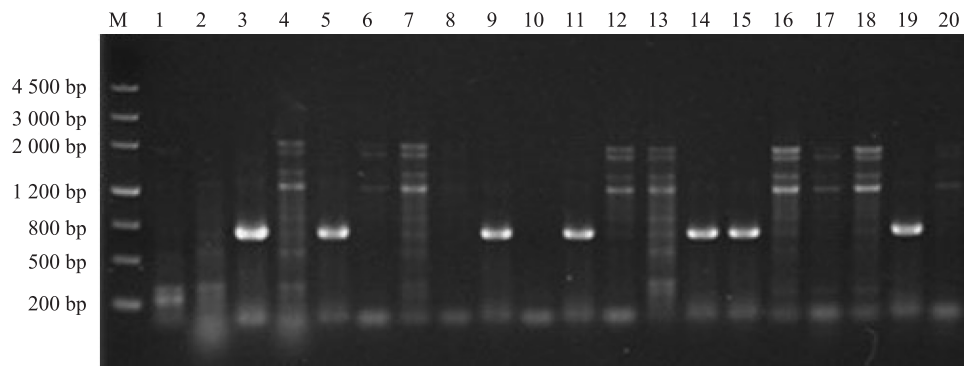
Fig.1 Km-resistant plantlets

2.2 抗性苗 PCR 检测 *GFP*

对 46 株生根的抗性苗进行 PCR 检测,从 11 个抗 Km 洋桔梗株系中扩增出 *GFP* 目的片段 (700 bp),与质粒 DNA 扩增出的片段大小相同,为阳性株系。PCR 扩增阳性苗占生根抗性苗的 23.9%,而对照植株不能扩增出相应的特异片段(图 2)。据此可初步判断,ACS 基因干扰片段已转入 11 个洋桔梗株系。

PCR 检测只能证明转化植株存在外源目的基因片段,而且由于 PCR 扩增十分灵敏,有时会出现

假阳性,所以基因是否转化成功还需要进一步做 RT-PCR 分析。



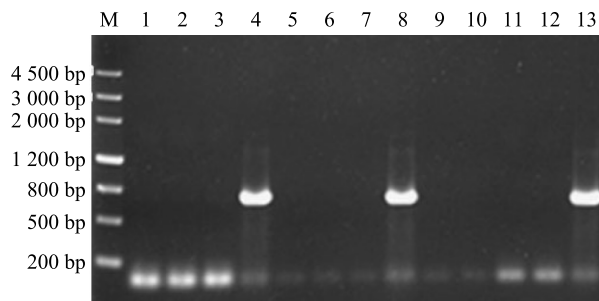
M:分子量标准 Marker 3;1:空白对照;2:阴性对照;3:阳性对照;4~20:生根抗性苗。

图 2 抗性苗的 PCR 检测(部分)

Fig.2 PCR identification of resistant plantlets

2.3 抗性苗的 RT-PCR 扩增鉴定

转化干扰载体 pCAMBIA1301-*GFP*-(*GUS* + *ACS*)*i* - *NPT II* 洋桔梗,以 RNA 为模版反转录合成 cDNA,以 *GFP* 的引物进行 PCR 扩增。结果如图 3 显示,选择的 11 株 PCR 呈阳性的植株中,有 3 株扩增出 700 bp 大小的预期条带,为阳性的转基因植株,结果初步表明,*GFP* 已经导入洋桔梗并得到表达。但有 8 株没有扩增出预期的条带,为阴性的转基因植株,也许存在转录上的沉默。



M:分子量标准 Marker 3;1:空白对照(水);2:阴性对照(非转基因洋桔梗);3~13:PCR 呈阳性的洋桔梗植株。

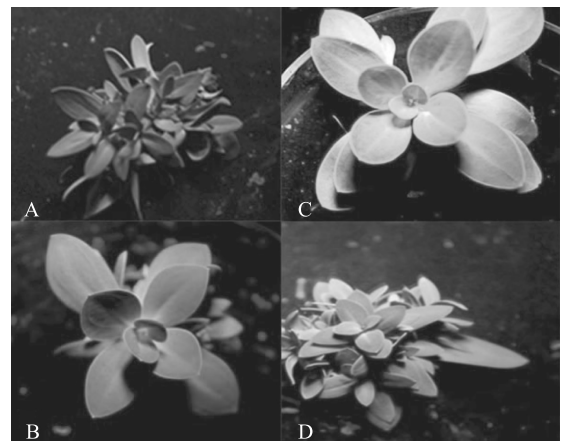
图 3 PCR 呈阳性的洋桔梗的 *GFP* RT-PCR 检测

Fig.3 RT-PCR analysis of *GFP*

2.4 抗性苗的 *GFP* 荧光观察

3 株 RT-PCR 呈阳性植株在手携式紫外灯照射下,并不是所有阳性植株都有绿色荧光现象,其中 2 株出现荧光(图 4B、4C),1 株未出现荧光(图 4D),

表明 *GFP* 可以在转基因的洋桔梗叶片中表达。



A:未转基因的洋桔梗植株;B、C 转基因的洋桔梗植株 *GFP* 基因表达;D 转基因的洋桔梗植株 *GFP* 基因未表达。

图 4 转基因洋桔梗在 365 nm 紫外光下的荧光观察

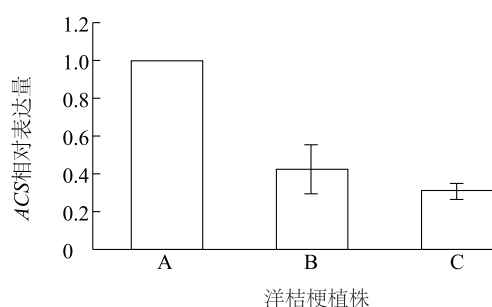
Fig.4 The transgenic *Eustoma grandiflorum* (with *GFP*) under UV-light at 365 nm

2.5 实时荧光定量 PCR 检测 *ACS* 基因的表达

荧光定量 PCR 结果(图 5)显示,2 株转基因洋桔梗中 *ACS* 的表达量低于未转基因的植株,B 株降低 57.27%,C 株降低 69.07%,平均下降了 63.17%。表明 *ACS* 干扰基因在洋桔梗中已成功表达。

2.6 转基因组培苗的花期

将未转基因和转基因洋桔梗组培苗出瓶、炼苗

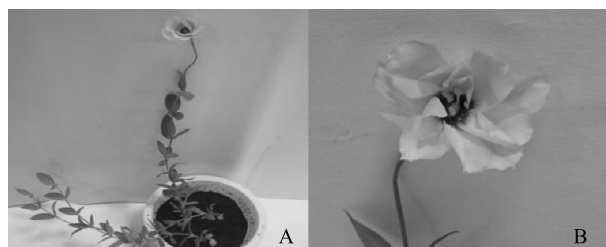


A:空白对照(未转基因洋桔梗植株);B、C:转基因洋桔梗植株。

图5 ACS 基因的相对表达量

Fig.5 Relative expression of ACS gene in *E. grandiflorum*

和移栽,30 d 后移栽的 4 株未转基因洋桔梗中有 3 株成活,移栽苗的成活率达 75.0%,其中 1 株开花,单朵花的花期为 10 d。3 株转基因洋桔梗中有 2 株成活,移栽苗的成活率达 66.7%,其中 1 株开花,单朵花的花期为 27 d(图 6)。



A:非转基因洋桔梗;B:转 ACS 干扰基因洋桔梗组培苗。

图6 转化 ACS 干扰基因洋桔梗组培苗的开花情况

Fig.6 The blossom of the plantlets transformed with ACS-interfering gene

3 讨论

在遗传转化中,转基因植株的检测和鉴定是非常重要的环节。生根筛选培养适用于转基因植株的早期检测,可以淘汰掉大部分假转化体,简单便捷,大大减少工作量。楼程富等^[17]认为,出现假转化体的原因主要有三方面:一是外植体的再生和转化细胞部位未与选择培养基充分接触;二是选择压添加得太少或太迟,致使未转化细胞分裂分化;三是转化体的代谢产物“滋养”了非转化体,使非转化体细胞在一定程度上可以耐受选择压。

特异引物 PCR 检测具有反应灵敏和操作快捷的特点,是转基因植株检测的最简便技术,常用来对转化子进行初步鉴定,缩小进一步筛选和检测的范

围。但由于 PCR 的强扩增力和高灵敏性,易产生假阳性和假阴性^[18]。经 PCR 扩增检测后的 11 株阳性再生植株,RT-PCR 证实 8 株为假阳性,推测其原因有:(1) T-DNA 进入细胞后并没有整合到受体基因组中,而以游离状态存在,导致 PCR 检测结果呈阳性反应^[14];(2)在培养基中虽然加有羧苄青霉素,但农杆菌只是处于抑制状态而并未死亡,农杆菌的存在,会因所含的质粒上带有耐卡那霉素的标记基因 *NPT II* 而使外植体上乃至其周围培养基中卡那霉素部分被破坏掉,从而降低了抗卡那霉素筛选的强度,这也会造成假转化现象;(3)外植体生芽是以伤口组织直接再生为主,尤其是早期分化出的芽,如果转化细胞最初位于生长点核心位置,就会形成转化嵌合体的芽,其必然是假转化株。

RT-PCR 技术的高灵敏性,可以利用较少转基因植株的组织对不同部位转入基因的表达进行转录水平上的检测^[19],RT-PCR 检测方法在转基因植物中的应用非常广泛^[20-21]。与同样用于检测基因转录的 Northern blot 相比,RT-PCR 具有简便快捷的优点。本研究 RT-PCR 检测结果确定 3 个株系的外源基因已整合到洋桔梗基因组中,并在洋桔梗组织中得到转录。

荧光定量 PCR 技术在细胞基因表达的定量检测和基因突变分析 2 个方面应用较广泛^[22],与常规 PCR 相比,该方法较为简便、快速、高效,克服了常规检测技术中存在的假阳性污染和不能准确定量的缺点。本试验利用该技术测定了转基因植株中 ACS 基因的相对表达量,结果证明 RNA 干扰可以诱发 ACS 沉默效应,使得 ACS 表达量降低。

RNAi 利用双链 RNA 上的序列信息致使 RNA 蛋白复合体降解特定的 mRNA,并且只对与特异双链 RNA 有同源性的基因起作用,这一技术在导致内源基因沉默上有着高度的特异性,近年来利用这一技术对植物表型、品质等进行改良,获得不少突破^[23]。RNAi 技术与常规育种相比,其优越性不仅表现在可操作基因的范围和突变种类的扩大上,对目的基因的表达也具有可控性^[24]。Liu 等^[25]以 *ghsAD-1* 和 *ghsAD-2* 基因为目标,利用反义 RNA 和导入双链 RNA 技术分别转化棉花 Coker315 引起 *PTGS* 抑制目标基因,提高了棉花籽油中硬脂酸与油酸的比例。试验结果证明,利用 RNAi 诱发基因沉默的效果要好于用反义 RNA 造成基因沉默的效果。

本研究中转化 ACS 基因的洋桔梗花期为 27 d, 孙晶等^[26]将 ACS 反义基因转入洋桔梗 Double Mariachi Pink 中, 其移栽苗的单朵花的花期为 24 d。

参考文献:

- [1] BRENT H. Flower breeding and genetics[M]. Germany: Springer Netherlands, 2006: 644-663.
- [2] 罗江会, 马 婧, 刘道凤, 等. 乙烯对蜡梅切花开放衰老及乙烯受体基因表达的影响[J]. 植物生理学报, 2015, 51(2): 253-258.
- [3] ICHIMURA K, SHIMAMURA M, HISAMATSU T. Role of ethylene in senescence of cut *Eustoma* flowers [J]. Postharvest Biol Tec, 1998, 14(2): 193-198.
- [4] 田如英, 周 恒. 不同保鲜剂对洋桔梗鲜切花保鲜效果的影响[J]. 植物生理学报, 2005, 41(5): 625-626.
- [5] DEIKMAN J. Molecular mechanism of ethylene regulation of gene transcription [J]. Physiologia Plantarum, 1997, 100(3): 561-566.
- [6] KOSUGI Y, MATSUOKA A, HIGASHI A, et al. 2-Aminooxyisobutyric acid inhibits the in vitro activities of both 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase and ACC oxidase in ethylene biosynthetic pathway and prolongs vase life of cut carnation flowers[J]. Journal of Plant Biology, 2014, 57(4): 218-224.
- [7] NAKAJIMA N, ITOH T, TAKIKAWA S, et al. Improvement in ozone tolerance of tobacco plants with an antisense DNA for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase[J]. Plant, Cell & Environment, 2002, 25(6): 727-735.
- [8] 陈银华, 张俊红, 欧阳波. 花椰菜 ACC 氧化酶基因的克隆及其 RNAi 对内源基因表达的抑制作用[J]. 遗传学报, 2005, 32(7): 764-769.
- [9] 周雅智, 姜 玲, 黄 勇. BraSDG2RNA 干扰载体的构建和拟南芥的遗传转化[J]. 山东农业科学, 2016, 48(10): 7-11.
- [10] 周晓婴, 付三雄, 陈 松, 等. 甘蓝型油菜 *CRABS CLAW* 基因克隆及其 RNA 干扰载体的构建[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(4): 737-742.
- [11] MATZKE M, MATZKE A J M, KOOTER J M. RNA: guiding gene silencing[J]. Science, 2001, 293(5532): 1080-1083.
- [12] 杜改梅, 胡志华, 罗碧平, 等. RNA 干扰沉默 *Ghrelin* 基因对仔猪胃酸分泌的调节作用[J]. 南方农业学报, 2016, 47(8): 1396-1400.
- [13] 廖 静. 洋桔梗 ACC 合酶基因的 RNA 干扰研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2011: 5.
- [14] 王关林, 方洪筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [15] 杨燕燕, 陈崇顺, 瞿大枫, 等. 洋桔梗高频再生系统的建立及其卡那霉素敏感性测定[J]. 江苏农业科学, 2007(2): 98-100.
- [16] 廖 静, 王 轶, 陈崇顺, 等. 洋桔梗 Double Mariachi Pink 高效遗传转化体系的建立[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(2): 91-94.
- [17] 楼程富, 陆小平, 潘 刚. 桑树遗传转化的受体细胞及其再生[J]. 蚕业科学, 2005, 31(2): 182-186.
- [18] 马燕斌, 孙 璇, 吴 霞, 等. 转新型抗草甘膦基因棉花的转化效率及相关分子特征分析[J]. 棉花学报, 2016, 28(4): 418-424.
- [19] 盖树鹏, 孟祥栋. 转基因植物的筛选与检测[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2000, 31(1): 95-100.
- [20] HONG B, MA C, YANG Y, et al. Over-expression of AtDREB1A in chrysanthemum enhances tolerance to heat stress [J]. Plant Molecular Biology, 2009, 70(3): 231-240.
- [21] PEEBLES C A M, HUGHES E H, SHANKS J V, et al. Transcriptional response of the terpenoid indole alkaloid pathway to the overexpression of ORCA3 along with jasmonic acid elicitation of *Catharanthus roseus* hairy roots over time[J]. Metabolic Engineering, 2009, 11(2): 76-86.
- [22] AGINDOTAN B O, SHIEL P J, BERGER P H. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan[®] real-time RT-PCR[J]. Journal of Virological Methods, 2007, 142(1): 1-9.
- [23] HANNON G J. RNA interference [J]. Nature, 2002, 418(6894): 244-251.
- [24] TANG G, GALILI G. Using RNAi to improve plant nutritional value: from mechanism to application [J]. Trends in Biotechnology, 2004, 22(9): 463-469.
- [25] LIU Q, SINGH S P, GREEN A G. High-stearic and high-oleic cottonseed oils produced by hairbin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing [J]. Plant Physiology, 2002, 129(4): 1732-1743.
- [26] 孙 晶, 王 轶, 陈崇顺, 等. ACC 合酶反义基因转化洋桔梗 Double Mariachi Pink 的研究[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(4): 27-31.

(责任编辑: 王 妮)