

农杆菌介导的花魔芋遗传转化体系的优化

陈磊, 郭政宏, 程海丽, 乐超银* (三峡大学生物技术研究中心, 湖北宜昌 443002)

摘要 [目的] 探讨魔芋愈伤组织培养基、不同转化条件(菌液浓度、侵染时间、预培养时间及共培养时间)及转化植株的筛选条件(抗生素浓度和乙酰丁香酮(AS)浓度)等因素对转化效率的影响。[方法] 采用卡那霉素抗性基因为选择标记, 对农杆菌介导的花魔芋遗传转化体系进行优化。[结果] 在预培养 2 d, 用 OD_{600} 为 0.6 的菌液侵染 30 min, 共培养 3 d, 卡那霉素 100 mg/L, 羧苄青霉素 250 mg/L, AS 浓度 100 $\mu\text{mol/L}$ 的条件下能有效提高转化效率。再生花魔芋植株经 GUS 染色及 PCR 检测, 结果表明外源目的基因已经整合到花魔芋基因组中。[结论] 为魔芋抗病品种的转基因培育, 丰富其种质资源, 寻找抗病新途径提供理论依据和试验基础。

关键词 花魔芋; 农杆菌; 遗传转化体系

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2015)05-021-04

Optimized Genetic Transformation System of *Amorphophallus konjac* Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

CHEN Lei, GUO Zheng-hong, CHENG Hai-li, YUE Chao-yin* (Biotechnology Research Center, Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002)

Abstract [Objective] Factors that influence *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Amorphophallus konjac*, including culture medium, transformation conditions and selection reagents were investigated. [Method] An transformation system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* has been optimized to obtain transgenic plants of *Amorphophallus konjac* by using kanamycin resistance gene as marker gene. [Result] The results showed that preculture for 2 days before infection by *Agrobacterium* ($OD_{600} = 0.6$, 30 min) and then coculture for 3 days yielded the highest rate of antibiotic resistant callus formation with the addition of kanamycin (100 mg/L), carbenicillin (250 mg/L) and acetosyringone (100 $\mu\text{mol/L}$). The transgenic plants were screened and re-clarified by GUS staining and PCR analysis that the exogenous gene was integrated into *Amorphophallus konjac* genome. [Conclusion] The study provided theoretical basis and experimental basis for cultivating genetically resistant varieties, riching germplasm resources and finding new ways for disease resistance.

Key words *Amorphophallus konjac*; *Agrobacterium tumefaciens*; Genetic transformation system

魔芋 (*Amorphophallus*) 属天南星科 (Areaceae) 魔芋属多年生草本植物, 其变态茎宿存于地下, 通常呈球形、扁球形或柱状球形^[1], 主要栽培种为花魔芋 (*Amorphophallus konjac*) 和白魔芋 (*Amorphophallus albus*)。魔芋块茎内富含葡甘聚糖 (Konjac glucomannan)、各种人体必需氨基酸和微量元素^[2]。葡甘聚糖可广泛用于食品、医药、保健、农业、化工、纺织、石油钻探等领域, 具有极大的商业价值。

随着魔芋种植面积的不断扩大, 魔芋软腐病的发生也逐年加剧, 发生严重时产量损失达 30% ~ 50%, 严重的达 80% 以上, 甚至绝收^[3], 严重影响农民种植魔芋积极性。魔芋软腐病是由胡萝卜软腐欧文氏杆菌软腐病亚种 (*Erwinia carotovora* Var. *carotovora*) 侵染所致^[4], 该病有 2 个明显的特征, 即组织腐烂和有恶臭味, 不仅在魔芋田间生长阶段发病, 造成叶片、叶柄及块茎软腐, 还可在魔芋贮藏期间发病造成块茎腐烂。

自 1983 年人类首次获得转基因植物以来, 植物遗传转化技术发展十分迅速, 该项技术目前已成为植物性状遗传改良的重要手段。2000 年新加坡国立大学 Dong 等^[5] 从芽孢杆菌 *Bacillus* 240B1 中克隆到抗软腐病 *aiiA* 基因, 将该基因转入烟草、马铃薯后, 获得的转基因植株具有较好的软腐病抗性。但魔芋的遗传转化研究起步较晚, 到目前为止, 国外未发现这方面的报道, 国内仅有几例抗软腐病遗传转化的相关

报道。张兴国等^[6] 采用 RT-PCR 方法从白魔芋组培苗的幼嫩球茎组织中克隆到 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶大亚基基因。周盈等^[7] 初步建立了农杆菌介导花魔芋遗传转化体系, 但并未进行转化条件的优化及后续感病试验来验证转基因魔芋的抗软腐病能力。

笔者采用农杆菌介导的花魔芋遗传转化体系, 对影响转化效率的各种转化参数进行了较为系统的优化, 并对所获得的再生植株进行了一系列的分子检测, 为魔芋抗病品种的转基因培育, 丰富其种质资源, 寻找抗病新途径提供理论依据和试验基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料与农杆菌菌株 供试魔芋材料采自湖北宜昌秭归县花魔芋, 花魔芋球茎愈伤诱导参照郭正宏等^[8] 方法, 将花魔芋球茎和鳞片表面用洗涤剂清洗干净, 用小刀轻轻削去外皮, 将球茎切成 3 cm^3 大小含芽孢的块状。放在干净的烧杯里经流水冲洗 10 min, 再用 75% 乙醇浸泡 5 ~ 10 s, 用 0.1% 升汞浸泡 8 ~ 10 min, 最后用灭菌水洗 4 次, 将消毒好的魔芋球茎和鳞片削去表皮并切成小块转移至 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L NAA 的诱导愈伤组织培养基上 25 $^{\circ}\text{C}$ 暗培养, 每隔 20 d 继代一次。

农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株为 LBA4404, 内含 pBI121.35S 质粒, pBI121 中含有双 CaMV35S 启动子驱动的 *aiiA* 与 GUS 融合表达基因。*aiiA* 基因具有抗软腐病作用, 来自苏云金芽孢杆菌。构建得到抗软腐病植物表达载体 pBI121.35S-*aiiA*。

将农杆菌在 YEB 培养基上划线, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d, 然后用接种环将菌体刮入高压灭菌 (121 $^{\circ}\text{C}$, 20 min) 的侵染培养基,

基金项目 国家自然科学基金项目 (30871579)。

作者简介 陈磊 (1990 -), 男, 湖北孝感人, 硕士研究生, 研究方向: 微生物与植物互作。* 通讯作者, 教授, 博士, 从事微生物与植物互作研究。

收稿日期 2014-12-22

制成悬浮液用于侵染愈伤组织。

1.2 农杆菌介导遗传转化体系的优化

1.2.1 预培养时间。用0.1%升汞灭菌魔芋块茎后移至愈伤诱导培养基上,置于暗培养室25℃培养50d左右,挑选诱导较好的愈伤组织转至预培养基上置暗培养室25℃预培养1、2、3、4d。

1.2.2 菌液浓度。将农杆菌在YEB培养基上划线,28℃培养,然后用接种环将菌体刮入已高压灭菌(121℃,20min)的侵染培养基中,制成 OD_{600} 为0.4、0.6、0.8、1.0的农杆菌侵染液用于侵染愈伤组织。检测GUS瞬间转化率,比较共培养时间对转化的影响。

1.2.3 农杆菌侵染时间。将愈伤组织移入准备好的农杆菌侵染液中浸泡10、20、30、45min,然后将其转移到灭菌吸水纸上吸干表面菌液,最后移入共培养基上置暗培养室25℃共培养2d。检测GUS瞬间转化率,比较浸染时间对转化的影响。

1.2.4 共培养时间。共培养时间分别设置为1、2、3、4d,置暗培养室25℃培养,检测GUS瞬间转化率,比较共培养时间对转化的影响。

1.2.5 AS浓度。通过在预培养基、侵染培养基和共培养基中添加0、100、200、300 $\mu\text{mol/L}$ 的AS,预培养2d,在侵染培养基中侵染30min和共培养2d后,检测GUS瞬间转化率,研究不同浓度AS对转化的影响。

1.2.6 抗生素浓度的确定。①卡那霉素筛选浓度的确定。筛选培养基的卡那霉素浓度设置50、75、100、125mg/L4个梯度,将共培养2d后的愈伤组织分别接种在不同浓度卡那霉素筛选培养基上,30~40d后观察愈伤在各个卡那霉素浓度上的生长状况。②羧苄青霉素抑菌浓度的确定。将共培养2d后的魔芋愈伤组织接种于含羧苄青霉素100、200、300、400mg/L的筛选培养基上培养,30~40d后观察农杆菌染菌情况。

1.3 转化植株的检测

1.3.1 转化植株的GUS组织化学染色检测。将共培养2d后的愈伤从培养基中取出(以未转化的愈伤作阴性对照),清洗掉表面的残留培养基,用刀片将愈伤组织切成薄片放入1.5ml无菌离心管中,加GUS染色液置37℃生化培养箱中染色过夜,将愈伤切片加入75%乙醇中脱色24h后观察是否有蓝斑出现。

1.3.2 转化植株内*aiiA*基因PCR检测。取GUS染色成蓝色的魔芋叶、柄或根0.1~0.2g,用CTAB法^[9]提取植物总DNA。以质粒DNA作为阳性对照,未转基因的魔芋DNA作为阴性对照,进行PCR反应检测*aiiA*基因。上游引物FP:5'-CGCGGATCCATGAC AGTAAAGAAGCTTTATTTTC-3'(划线部分为*Bam*HI酶切位点,CGC为酶切位点保护碱基),下游引物RP:5'-CGCGGATCCCTATATATACTCAGGGAACA CTCTAC-3'(划线部分为*Bam*HI酶切位点,CGC为酶切位点保护碱基)。反应体系:10 \times PCR Buffer 2.5 μl ,dNTP mixture 2.0 μl ,Primer1 0.5 μl ,Primer2 0.5 μl ,*Taq*酶 0.5 μl ,DNA模板 0.5

μl ,加ddH₂O至25 μl 。反应程序:94℃预变性5min;94℃变性45s,55℃退火45s,72℃延伸2min,共进行30个PCR循环;最后在72℃继续延伸10min。扩增产物通过1.0%TAE琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 预培养时间 一般认为预培养对外植体的转化是有益的,它可以促进外植体细胞进行分裂,分裂状态的细胞更容易整合外源DNA,从而提高外源基因的转化率。由表1可知,魔芋愈伤组织预培养2~3d更易于提高遗传转化率。

表1 预培养时间对魔芋遗传转化效率的影响

时间//d	愈伤组织数//个	GUS组织化学染色数//个	表达率/%
1	20	10	50
2	20	18	90
3	20	12	60
4	20	5	25

2.2 菌液浓度 由表2可知,随着农杆菌菌液浓度的增加,转化率显著提高,用 $OD_{600}=1.0$ 和 $OD_{600}=0.8$ 的浸染液比用 $OD_{600}=0.6$ 的浸染液进行转化时瞬间转化率稍高,但侵染后魔芋愈伤组织的活力不易恢复,褐化现象较明显,农杆菌生长抑制难度较高。所以在满足较高转化率的情况下,尽量采用低浓度的浸染液,故采用 $OD_{600}=0.6$ 的农杆菌浸染浓度。

表2 侵染菌液浓度对魔芋遗传转化效率的影响

菌液浓度(OD_{600})	愈伤组织数//个	GUS组织化学染色数//个	表达率/%
0.4	20	12	60
0.6	20	18	90
0.8	20	17	85
1.0	20	15	75

2.3 农杆菌侵染时间 从表3可以看出,瞬时转化率随浸染时间的增加而增大,浸染时间超过30min后,瞬时表达率虽有一定的提高,但增长并不很明显,且后期染菌和死亡率较高。这可能是因为愈伤长时间处在农杆菌菌液中,受到毒害作用及长时间缺氧影响,导致其死亡。因此,浸染30min对转化效果最有利。

表3 侵染时间对魔芋遗传转化效率的影响

时间//min	愈伤组织数//个	GUS组织化学染色数//个	表达率/%
10	20	6	30
20	20	10	50
30	20	16	80
45	20	17	85

2.4 共培养时间 农杆菌附着到植物细胞上并不能立即转化,需要在细胞上生存一定时间后才能进行转化,但共培养时间过长,农杆菌的旺盛生长给试验后期农杆菌的抑制带来困难,共培养时间过短,会造成T-DNA的转移过程不能完成,农杆菌还没有在细胞创伤部位诱发肿瘤,农杆菌的转化率就会降低。由表4可知,愈伤组织在侵染后共培养2~3d

最有利于提高遗传转化率,且浸染后魔芋组织中的农杆菌也能被有效地控制。

表 4 共培养时间对魔芋遗传转化效率的影响

时间//d	愈伤组织数//个	GUS 组织化学染色数//个	表达率//%
1	20	12	60
2	20	18	90
3	20	17	85
4	20	15	75

2.5 AS 浓度 乙酰丁香酮能够促进农杆菌 T2DNA 向宿主细胞核转移,从而提高遗传转化效率,近年来,AS 被广泛应用于植物遗传转化中,取得了较好的效果,使得农杆菌介导的遗传转化方法更加完善。由表 5 可知,预培养和浸染培养基中添加 100 $\mu\text{mol/L}$ AS 时瞬时表达率为 80%,表明 AS 能促进农杆菌对魔芋愈伤的侵染力。

表 5 AS 对魔芋遗传转化效率的影响

AS 浓度 $\mu\text{mol/L}$	愈伤组织数//个	GUS 组织化学染色数//个	表达率//%
0	20	6	30
50	20	10	50
100	20	16	80
200	20	12	60

2.6 抗生素浓度

2.6.1 Kan 浓度。共培养后的愈伤组织在 4 个梯度的卡那霉素培养基上筛选培养 40 d 后,愈伤组织白化和死亡情况见表 6,愈伤组织的分化率随着 Kan 浓度的提高而下降,所以笔者前期使用 75 mg/L 的 Kan 以保证得到足够的幼苗,后期再使用 100 mg/L Kan 筛选阳性植株。

表 6 Kan 浓度对魔芋遗传转化效率的影响

Kan 浓度//mg/L	愈伤组织数//个	分化数//个	分化率//%
50	30	20	88.9
75	30	18	60.0
100	30	15	50.0
125	30	3	10.0

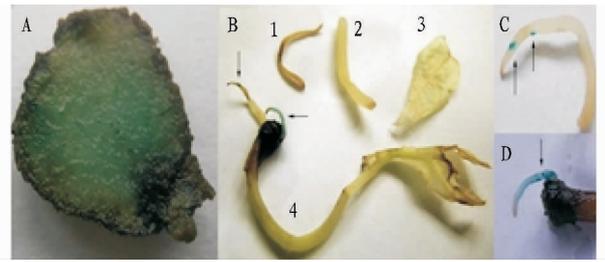
2.6.2 Carb 浓度。共培养后的愈伤组织在 4 个梯度的羧苄青霉素培养基上筛选培养 40 d 后,愈伤组织农杆菌的抑制情况和坏死情况见表 7,400 mg/L Carb 可以完全抑制农杆菌的生长,所以前期使用 400 mg/L 的 Carb 以保证愈伤组织脱菌培养,后期继代时陆续降低到 200 mg/L 的 Carb。

表 7 Carb 浓度对魔芋遗传转化效率的影响

Carb 浓度//mg/L	愈伤组织数//个	分化数//个	分化率//%
100	30	0	0
200	30	12	30.0
300	30	24	80.0
400	30	30	100.0

2.7 GUS 组织化学染色检测 GUS 组织化学染色检测和抗性植株的检测都出现蓝色斑点,而未转化的对照植株未出

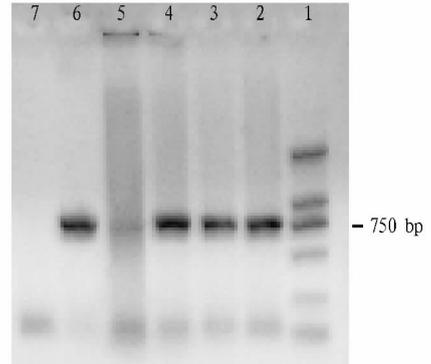
现蓝色,说明外源 GUS 基因可在花魔芋组织中表达(图 1)。



注:A. 魔芋组织瞬时检测呈蓝色;B. 1、2、3 分别为未转化无菌苗的根、茎、叶;4 为转化的抗性植株,箭头所示为 GUS 染色阳性的根;C、D. 根部染色 3 倍效果图。

图 1 魔芋各组织 GUS 组织化学染色

2.8 PCR 检测 以转基因魔芋总 DNA 为模板,重组质粒为阳性对照,未转基因的魔芋总 DNA 为阴性对照,进行 PCR 反应扩增 *aiiA* 基因,结果见图 2。转基因魔芋总 DNA 扩增得到一条 750 bp 左右的的目的条带,初步说明外源基因已经转入魔芋植株基因组中。



注:1. DL2000;2~5. 转基因魔芋提取的总 DNA 扩增带;6. 阳性对照;7. 阴性对照。

图 2 转基因魔芋植株总 DNA 的 PCR 检测

3 结论与讨论

影响农杆菌遗传转化的因素很多,包括外植体类型及取材部位的选择以及筛选培养条件和标记基因的选择等因素。

可以用农杆菌进行魔芋转化的受体材料有多种,正确选择外植体,是植物转基因成功的重要条件。而且在同一植物不同基因型之间存在极大差别^[10]。该试验选取魔芋球茎形成的愈伤组织作为转化受体,其愈伤诱导及再生效果明显优于叶片和叶柄,抗农杆菌的能力明显优于鳞片,且球茎可以越季储存,保证稳定的材料来源。

在根癌农杆菌介导的遗传转化中,附加一些酚类化合物有助于提高转化效率^[11],而常用且诱导效果最佳的是乙酰丁香酮(AS)。单子叶植物对农杆菌的敏感性一般比双子叶植物差,转化较困难,但最近大量研究表明,部分单子叶植物在转化时使用 AS 能使转化率明显提高。AS 等酚类物质能诱导 *vir* 基因转录活化,以提高转化效率^[12-13]。

标记基因的选择是建立高效农杆菌介导遗传转化的另一个重要因素。常用于遗传转化的标记基因很多,但关于魔芋遗传转化的标记基因却很少。该试验所采用的是卡那霉

素抗性基因 *nptII*, 通过优化试验发现前期采用 75 mg/L, 后期逐渐加大筛选强度到 100 mg/L 的卡那霉素可以有效筛选出阳性植株。

培养条件对遗传转化有较大影响, 该研究分别对预培养时间、菌液浓度、侵染时间、共培养时间、AS 浓度和抗生素浓度 6 个影响转化效率的因素进行了优化, 结果表明, 预培养 2 d, AS 100 $\mu\text{mol/L}$, 菌体侵染浓度 OD_{600} 为 0.6, 侵染时间 30 min, 共培养时间 2 d, 卡那霉素 75 ~ 100 mg/L, 此体系的瞬时转化率可达 80% 以上。该研究为今后得到更高效的遗传转化体系奠定了基础, 也为进一步开展魔芋的转基因研究和抗软腐病育种提供了依据。

参考文献

- [1] 何家庆. 关于魔芋的农业科学[M]. 合肥: 安徽大学出版社, 2002.
- [2] 孔凡真. 魔芋的开发利用与市场前景[M]. 昆明: 云南科技出版社, 1997.
- [3] 庞杰, 张盛林, 刘佩琪, 等. 中国魔芋资源的研究[J]. 资源科学, 2001, 23(5): 87-89.
- [4] 唐嘉义, 张泽. 魔芋软腐病病原菌鉴定及部分生物学特性研究[J]. 云

南农业大学学报, 2001, 16(3): 185-187.

- [5] DONG Y H, XU J L, LI X Z, et al. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia Carotovora* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(7): 3526-3531.
- [6] 李贞霞, 张兴国. 基因枪法介导的魔芋遗传转化研究[J]. 华中农业大学学报, 2004, 23(6): 659-662.
- [7] 周盈, 林拥军, 柴鑫利, 等. 根癌农杆菌介导的花魔芋遗传转化体系的研究[J]. 分子植物育种, 2006, 4(4): 559-564.
- [8] 郭政宏, 乐超银, 王健, 等. 花魔芋组织培养的研究[J]. 安徽农业大学学报, 2009, 37(25): 11867-11868.
- [9] 苗晓燕, 贾晓梅. 药用植物虎杖毛状根 DNA 提取方法研究[J]. 保定学院学报, 2009, 7(22): 67-69.
- [10] CHENG M, LOWE B A, SPENCER T M, et al. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species [J]. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 2004, 40(1): 31-45.
- [11] 许耀, 贾敬芬, 郑国倡. 酚类化合物促进根癌农杆菌对植物离体外植物体的高效转化[J]. 科学通报, 1988(22): 1745-1748.
- [12] 林荣呈, 陈龙清, 包满珠, 等. 提高根癌农杆菌介导的香石竹遗传转化效率的研究[J]. 林业科学研究, 2003, 16(2): 123-128.
- [13] 王关林, 方宏药. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1997.

(上接第 11 页)

(2) 研究对于不同玫瑰的品种或同一品种在不同环境、土壤条件下对水分胁迫的的反应的差异, 总结玫瑰在不同时期的不同需水指标, 得到其需水要求, 通过控制算法得到每个品种最适宜生长的条件, 最终发展为有针对性的、区域性的节水灌溉。

(3) 适当的水分胁迫不但对植株的生长没有负面影响, 而且会促进其生长发育。这就是非充分灌溉理论, 以水分胁迫为主要研究对象, 深入研究非充分灌溉对玫瑰生物和生理反应的影响。

参考文献

- [1] 汤章成. 玫瑰对水分胁迫的反应和适应[J]. 植物生理学通讯, 2003(4): 1-7.
- [2] TRUNET N C, KRAVMER P J. Adaptation of plants to water and high temperature stress[M]. New York: John Wiley Sons Inc, 2011: 353-389.
- [3] 伏健民, 束怀瑞. 春季干旱对金冠苹果不同部位叶片衰老和脱落的影响[J]. 果树科学, 1993(2): 65-68.
- [4] 潘瑞焱. ABA 与植物的抗旱和耐旱[J]. 植物生理学报, 2008(3): 312-316.
- [5] 宫长荣, 李艳梅, 杨立均. 水分胁迫下离体烟叶中脂氧合酶活性、水杨酸与茉莉酸积累的关系[J]. 中国农业科学, 2009, 36(3): 269-272.
- [6] 曹慧, 韩振海, 许雪峰. 水分胁迫诱导平邑甜茶叶片衰老期间内肽酶活性的变化及其生化特性研究[J]. 中国农业科学, 2010, 35(12): 1514-1518.
- [7] 北京林学院. 植物生理学[M]. 北京: 中国林业出版社, 2007.
- [8] 陈有民. 园林树木学[M]. 北京: 中国林业出版社, 2007: 70-71.
- [9] 吉增宝, 王进鑫, 李继文, 等. 不同季节干旱及复水对刺槐幼苗可溶性糖含量的影响[J]. 西北植物学报, 2009, 29(7): 1358-1363.
- [10] 廖飞勇, 李修清. 高温强光对花叶蔓长春花生理指标的影响[J]. 北方园艺, 2010(11): 76-78.
- [11] 康绍忠, 熊运章. 作物缺水状况的判别方法与灌水指标的研究[J]. 水利学报, 2009(1): 34-39.
- [12] 张莉, 续九如. 水分胁迫下刺槐不同无性系生理生化反应的研究[J]. 林业科学, 2010(4): 162-167.
- [13] CAMPOS H, COOPER M, HABBEN J E, et al. Improving drought tolerance in maize: a view from industry[J]. Field Crops Res, 2011, 90: 19-

34.

- [14] 高俊凤. 植物生理学实验技术[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000: 145-149.
- [15] XU D Q. Photosynthetic Efficiency[M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2002: 821-834.
- [16] 丁筱玲, 赵立新, 张业民. 植物茎液流速及蒸腾量动态测试仪[J]. 农业工程学报, 2000, 16(2): 46-49.
- [17] 潘瑞焱, 董惠得. 植物生理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1995: 27.
- [18] BAI L P, SUI F G, GE T D, et al. Effect of soil drought stress on leaf water status, membrane permeability and enzymatic antioxidant system of maize [J]. Pedosphere, 2006, 16(3): 326-332.
- [19] 孔祥生. 植物生理学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008.
- [20] SCHREIBER U, SCHLIWA U, BILGER W. Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer[J]. Photosynth Res, 2003, 10: 51-62.
- [21] 侯小改, 段春燕, 刘素云, 等. 不同土壤水分条件下玫瑰的生理特性研究[J]. 华北农学报, 2007, 22(3): 80-83.
- [22] SHARP R E, POROYKO V, HEJLEK L G, et al. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics[J]. J Exp Bot, 2004, 55: 2343-2351.
- [23] 张智猛, 万书波, 戴良香, 等. 花生抗旱性鉴定指标的筛选与评价[J]. 植物生态学报, 2011, 35(1): 100-109.
- [24] 李俊庆, 芮文利, 齐敏忠, 等. 水分胁迫对不同抗旱型花生生长发育及生理特性的影响[J]. 中国农业气象, 1996, 17(1): 11-13.
- [25] 严美玲, 李向东, 王丽丽, 等. 花生苗期不同程度干旱胁迫对叶片某些酶活性的影响[J]. 中国油料作物学报, 2006, 28(4): 440-443.
- [26] 张美云, 钱吉, 郑师章. 渗透胁迫下野生大豆游离脯氨酸和可溶性糖的变化[J]. 复旦学报: 自然科学版, 2001, 40(5): 558-561.
- [27] 张立军, 樊金娟, 阮燕晖, 等. 聚乙二醇在植物渗透胁迫生理研究中的应用[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(3): 361-364.
- [28] 喻方圆, 徐锡增, ROBERT D G. 水分和热胁迫对苗木针叶可溶性糖含量的影响[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2004, 28(5): 1-5.
- [29] 郭永来, 欧国菁. 玫瑰的营养水平及其土壤环境[J]. 北京林业大学学报, 1991(4): 121-126.
- [30] 金敬宏. 玫瑰的综合开发[J]. 中国野生植物资源, 2000, 19(6): 21-25.
- [31] 史继孔, 张万萍, 樊卫国, 等. 银杏雌花芽分化过程中内源激素含量的变化[J]. 园艺学报, 2009, 26(3): 194-195.
- [32] 邓烈. 柑桔花芽分化与内源激素及淀粉酶活性的关系[J]. 西南农业大学学报, 2007, 13(1): 85-91.