

# 猕猴桃遗传转化研究进展

周玲艳<sup>1,2</sup>, 秦华明<sup>3</sup>, 梁红<sup>1</sup>

(1. 仲恺农业技术学院 生命科学学院 广州 510225; 2. 华南农业大学 生命科学学院 广州 510642 3. 暨南大学 理工学院 广州 510623)

**摘要:**猕猴桃现有栽培品种存在一定的缺陷,利用遗传转化技术对猕猴桃品质特性改良具有广泛的应用前景。对猕猴桃目的基因的分离,猕猴桃遗传转化的基本方法和研究进展以及影响猕猴桃转化效率的因素进行了总结,并对猕猴桃遗传转化需解决的问题进行了探讨。

**关键词:**猕猴桃;遗传转化

中图分类号: S 663.4 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2007)08-0050-04

猕猴桃(*Actinidia*)属猕猴桃科猕猴桃属植物,其风味独特,营养丰富, Vc 含量高,有一定保健功效,因而倍受关注。我国猕猴桃栽培面积居世界第一位,产量排第二位。目前,猕猴桃的栽培品种往往存在某些性状缺陷,如耐贮藏性和抗逆性较差等。通过常规育种方法改良往往周期长、工作量大、效率较低,很难满足生产发展的需要。采用遗传转化技术培育新品种,有几个明显的优点:首先,它可以有目的、有计划地引入优良性状而不需要改变原有的其它特性;其次,它可以突破物种障碍,把许多原来植株中没有的基因引入;另外,它可以在幼苗期对转化植株进行筛选和鉴定,大大缩短了得到稳定遗传的新品种所需要的时间。因此,遗传转化技术为猕猴桃种质改良开辟了一条新的途径,其将大大缩短猕猴桃的育种年限,扩展猕猴桃的育种范围,拓宽猕猴桃的基因资源,从而大力推动猕猴桃育种工作的进程。

## 1 猕猴桃目的基因的分离与克隆

迄今为止,在猕猴桃和其他果树上应用的目的基因已不少,但应用的目的基因大多数不是从其自身分离来的,而是从其他作物甚至微生物中分离、克隆出来的,并且多是在其他作物上先得到应用。目前,猕猴桃中已被分离和克隆的目的基因主要与猕猴桃果实成熟及衰老过程有关,如 ACC 合成酶(ACS)基因、ACC 氧化酶(ACO)基因、多聚半乳糖醛酸酶(PG)基因、脂氧合酶(LOX)基因以及猕猴桃素(Actinidin)基因等。

猕猴桃是跃变型果实,乙烯是其呼吸高峰产生、果实衰老软化及色泽改变等的关键物质。ACC 氧化酶是

乙烯生物合成途径中最后一个酶,催化 ACC 转化为乙烯,在果实成熟过程中,该酶是一限速酶。1993 年, Macdiarmid 等<sup>[1]</sup>成功地从猕猴桃果实中分离和克隆了 ACC 氧化酶基因 cDNA,其后,任小林等<sup>[2]</sup>也成功地从猕猴桃中分离到了 ACC 酶基因,并构建 ACC 氧化酶反义基因植株表达载体,为培养耐贮藏的猕猴桃新品种奠定了基础。在这之间, Ikoma 等<sup>[3]</sup>从猕猴桃中成功地分离到 ACC 合成酶基因。通过将 ACC 合成酶反义基因导入猕猴桃,同样可增强猕猴桃的耐贮藏性。

细胞壁中的多聚半乳糖醛酸酶(PG)是一个果实成熟过程中特异性表达的细胞壁水解酶,PG 被认为是参与果实细胞壁中果胶的溶解而在果实的软化过程中起着重要作用。目前,调节控制 PG 基因表达已成为园艺植物基因工程的一个重要研究内容,同样也是猕猴桃研究的重要内容。1993 年, Atkinson 与 Gardner<sup>[4]</sup>用番茄 PG 的 cDNA 克隆 pTOM6 作探针,在美味猕猴桃 DNA 中分离出 PG 基因,该基因长 8062bp。随后,王中炎等<sup>[5]</sup>又从中华猕猴桃果实中克隆到 PG 基因,并研究了 PG 基因表达与果实成熟、乙烯释放的关系。

猕猴桃素是一种半胱氨酸蛋白酶,它能够把肉类的纤维蛋白质分解成氨基酸,使肉类嫩化。1990 年, Snowden 和 Gardner<sup>[6]</sup>克隆了一个由 5 个外显子和 4 个内含子组成的猕猴桃素基因,并命名为 λKIWI44。Lin 等<sup>[7]</sup>将美味猕猴桃素基因 5' 端区作为启动子与 GUS 基因构成嵌合基因,并将其转入矮牵牛属植物中得到表达。

此外,陈昆松等<sup>[8]</sup>从成熟猕猴桃果实中克隆到一个长 824 bp 的脂氧合酶基因片段。任小林等<sup>[9]</sup>从美味猕猴桃首次成功地克隆了钙调蛋白 cDNA。陈昆松等<sup>[10]</sup>后来又从成熟中华猕猴桃果实中克隆到了一个 β-半乳糖苷酶基因 cDNA 片段。

## 2 猕猴桃遗传转化的方法

将目的基因导入植物细胞中的方法主要有物理、化学和生物学方法。其中物理法包括基因枪、电激、显微

第一作者简介:周玲艳(1972-),女,讲师,湖南衡阳人,在读博士,主要从事植物生物技术研究。

基金项目:广东省猕猴桃资源保护及开发利用资助项目(2005B60301010);利用 AFLP 筛选与猕猴桃性别相关的分子标记资助项目(G3051312)。

收稿日期:2007-03-29

注射、激光、超声波、碳化硅纤维等;化学法有磷酸钙—DNA 共沉淀、聚乙二醇、脂质体等;生物学方法主要有农杆菌、花粉管通道法等。目前,在猕猴桃遗传转化中应用的方法主要有农杆菌介导法、基因枪法、PEG 法等。

## 2.1 农杆菌介导法

农杆菌介导法是植物基因工程应用最常用、成功率最高的遗传转化方法。农杆菌介导法相对于其他转化法而言,具有明显的优点:外源基因多以单拷贝或低拷贝数插入,较少出现基因沉默现象;转化效率高,转化结果重复性好;可以转移大片段 DNA 等。在木本植物的转基因研究中,绝大多数是以农杆菌介导法而实现的,利用农杆菌法进行猕猴桃遗传转化的研究起始于 20 世纪 90 年代初,转移的基因多数为报告基因 GUS 和筛选标记基因 NPTII 等,近些年来,也有一些利用农杆菌介导法将目的性状改良的基因导入猕猴桃的报道。

Gonzalez 等<sup>[1]</sup>最早采用农杆菌介导法进行猕猴桃遗传转化的研究,其用海沃德的叶柄、叶片与根癌农杆菌共培养 48 h,然后将外植体进行培养,诱导出愈伤组织与类似胚状体的瘤状物。1991 年, Uemastu 等<sup>[2]</sup>和 Rugini 等<sup>[3]</sup>利用农杆菌介导法首次成功转化猕猴桃。1993 年, Janssen 等<sup>[4]</sup>利用标记基因 GUS 的瞬间表达,建立了一个高效、可重复的猕猴桃遗传转化体系。1994 年,刘春林等<sup>[5]</sup>以美味猕猴桃茎段产生的愈伤组织为受体,通过根癌农杆菌介导获得了抗 Kan 的抗性苗。1996 年, Yazawa 等<sup>[6]</sup>以猕猴桃根段为受体,通过发根农杆菌介导而导入 pRiA4 外源基因,获得转基因植株。同年, Kobayashi 等<sup>[7]</sup>利用编码人类表皮生长因子的基因转化猕猴桃获得转化植株; Yamakawa 等<sup>[8]</sup>以叶圆片为外植体,通过与发根农杆菌共培养,获得了多个猕猴桃品种的转基因植株。1998 年, Fung 等<sup>[9]</sup>以叶片为外植体,利用农杆菌介导法,将 gus 报告基因转入美味猕猴桃获得转基因植株; Kusada 等<sup>[20]</sup>将可以改变形态特性的同源水稻基因 OSH1 基因导入猕猴桃,转化植株表现出叶小、矮化、叶缘开裂和无顶端优势等特征,为果树矮化品种的培育提供了新思路。1999 年,郭卫东等<sup>[21]</sup>以农杆菌菌株 LBA4404 介导的叶盘法转化猕猴桃,将 IfycDNA 导入猕猴桃基因组中,以期提高猕猴桃的早实性;同年, Nakamuura 等<sup>[22]</sup>以叶盘为受体,把大豆  $\beta$ -1,3-内切葡聚糖酶基因导入猕猴桃,转化植株的抗病性高于对照。樊军锋等<sup>[23]</sup>利用叶盘法和基因枪相结合的方法将双价盐基因 mt1D/gutD 导入秦美猕猴桃。黄萍等<sup>[24]</sup>以叶柄为受体,采用短时液相共培和长时气相共培相结合的转化方法,获得抗 Kan 的植株,初步建立起了一套叶柄的农杆菌转化体系。毕静华等<sup>[25]</sup>以阔叶猕猴桃的叶片为外植体,通过根癌农杆菌介导法成功获得了转基因植株,为通过基因工程对阔叶猕猴桃进行遗传改良奠定基础。

## 2.2 基因枪法

该方法的优点是可直接转化植物的各种外植体,且不受基因型的限制。但该方法存在转化频率较低,容易出现基因沉默,外源 DNA 整合的机理尚不清楚等缺点。在多种果树上已有利用基因枪转化方法转化成功的报道<sup>[26-28]</sup>,但在猕猴桃遗传转化方面未见单独转化成功的相关报道。基因枪的轰击会对外植体造成创伤,而创伤有利于农杆菌对外植体的侵染。1996 年, Scorza 等<sup>[29]</sup>就利用两步法转化来提高葡萄的转化率,他们先用基因枪轰击葡萄体胚两次,再与农杆菌共培养,提高了转化率。樊军锋等<sup>[23]</sup>利用叶盘法和基因枪相结合的方法转化猕猴桃同样提高了遗传转化的效率。

## 2.3 PEG 法

PEG 法的基本原理是 PEG 作为原生质体融合剂使细胞膜之间或 DNA 与膜形成分子桥,促进相互的接触和粘连。也有研究认为,它可引起膜表面电荷紊乱,干扰细胞间的识别,从而促进细胞膜的融合和外源 DNA 进入原生质体,实现基因的转化。由于木本植物原生质体再生植株周期长,难度大,加上原生质体操作繁琐,利用原生质体作为受体的转基因方法在木本植物上应用较少,在猕猴桃遗传转化方面应用也不多。Olivieria 等<sup>[30]</sup>以美味猕猴桃原生质体为受体,用 PEG 和电激法将 CAT (氯霉素磷酸转移酶)基因转化原生质体获得成功。朱道圩等<sup>[31]</sup>用 PEG 介导法对软枣猕猴桃原生质体进行遗传转化,成功地将绿色荧光蛋白(GFP)基因导入了原生质体。

## 3 影响猕猴桃遗传转化效率的因素

### 3.1 转化方法

农杆菌介导的叶盘法是目前猕猴桃基因及其他木本植物改良中最成熟、最高效的方法。但农杆菌介导法的转化过程中要合理掌握菌液的浓度、侵染和共培养的时间等,且需要解决培养过程中容易出现细菌大量增殖而导致外植体不能继续生长的问题。Janssen 等<sup>[14]</sup>在猕猴桃叶片共培养时研究发现,在培养基上加一层滤纸能提高转化率。基因枪转化效率较低,但常可在轰击叶片上形成很多微小创伤而有利于农杆菌的侵染,因此,将基因枪转化和叶盘法转化相结合,可大大提高基因转化效率<sup>[6,23]</sup>。PEG 法可直接将外源 DNA 导入植物细胞,且很少产生嵌合体,但制备原生质体困难,再生周期长,且 PEG 对细胞具有一定的毒害作用,因此,选择 PEG 法进行遗传转化时,应注意植物材料的生理状态以及 PEG 的种类和浓度的选择。

### 3.2 受体系统

作为受体系统要求具有良好的再生能力和充足的外植体来源。木本植物叶片、茎段、叶柄、愈伤组织、悬浮细胞系及原生质体等均可作为遗传转化受体,由于原

生质体再生困难,愈伤组织和悬浮细胞系容易出现变异体,因此,为使转基因植株保持原来优良性状,通常以叶片、茎段等直接分化形成不定芽的外植体。例如苹果的转化主要以叶片为受体,柑橘类主要采用茎段、胚轴和子叶,猕猴桃也主要以叶片或叶圆盘为受体<sup>[13 16,22]</sup>,而葡萄则通常利用胚性培养物来转化。同时,受体植物的基因型也非常重要,因为不同物种对农杆菌的敏感性不同,甚至同一种的不同品种对农杆菌的敏感性也大不相同。目前,在获得的猕猴桃转基因植株中有美味猕猴桃<sup>[13]</sup>、中华猕猴桃<sup>[16]</sup>和阔叶猕猴桃<sup>[25]</sup>。

### 3.3 筛选标记基因

在质粒载体构建中往往插入了标记基因,它能编码正常植物细胞中不存在的酶,并能在转化体中充分表达而易于检测。对于不同植物、同一植物不同品种所实用的筛选标记基因不同,筛选标记基因和筛选剂的种类和浓度的选择正确与否直接影响转化的成功与否。新霉素磷酸转移酶基因(NPTII)是猕猴桃转化研究中最常使用的标记基因,该基因产物具有抗氨基糖苷类抗生素卡那霉素和G418的功能,其作用原理是NPTII基因产物通过酶促磷酸化使氨基糖苷类抗生素失活,从而解除毒性,抗生素卡那霉素的使用浓度一般为25~50 mg/L。磷酸转移酶基因(HPT)和抗除草剂基因(bar基因)等选择标记基因在其他果树遗传转化中也有使用<sup>[32 33]</sup>,但在猕猴桃中还尚未见报道。

### 3.4 农杆菌菌株

不同农杆菌菌株,甚至同一菌株在不同培养条件下侵染能力有明显差异,也就是说农杆菌菌株本身的因素对其侵染能力有很大影响。这些因素包括农杆菌的趋向能力;农杆菌表面存在不适合的成分阻止农杆菌对植物细胞的附着;农杆菌外膜的信号受体蛋白不能有效地识别植物细胞分泌的诱导分子等。不同农杆菌菌株对猕猴桃侵染力有一定的差异,有研究表明A281略好于C58,EHA101和LBA4404<sup>[34]</sup>,Bond等<sup>[35]</sup>也比较好于C58,EHA101和LBA4404三种农杆菌菌株对柑橘的转化频率,发现C58的感染力强于EHA101,而LBA4404的转化频率最差。但由于LBA4404菌株广谱性好,对多种植物均有较好侵染力,且易于保存繁殖,故常用于开展猕猴桃转化研究<sup>[25]</sup>。

## 4 展望

目前,国内外学者已经分离与克隆出猕猴桃的一些目的基因,这些已克隆的基因绝大多数与猕猴桃的果实成熟及衰老过程密切相关,同时,有研究者<sup>[20 21 22 23]</sup>将Lfy cDNA、OSH1.β-1,3-内切葡聚糖酶、双价耐盐mt1D/gutD等基因导入猕猴桃并获得转基因植株。基因克隆和遗传转化技术在猕猴桃品质改良中的重大进展,给猕猴桃育种带来了新的希望。但利用遗传改良技术对猕

猴桃进行育种还应做好以下工作:加强目的基因的克隆;再生及遗传转化体系的完善;转基因的表达调控;生物安全性问题的研究。

### 参考文献

- [1] Macdiarmi D, Cardner R C. A cDNA sequence from kiwifruit homologs to 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase[J]. Plant Physiol, 1993, 101: 691-692.
- [2] 任小林,金志强,彭世清,等.猕猴桃ACC氧化酶cDNA克隆及全序列测定[J].园艺学报,1997,24(4):333-337.
- [3] Ikoma Y, Yan M, Ogawa K. Cloning and expression of genes encoding ACC synthase in Kiwifruit[J]. Acta Horticulture, 1995, 398: 179-186.
- [4] Atkinson R G, Gardner R C. 1993. A polygalacturonase gene from kiwifruit (*Actinidia deliciosa*)[J]. Plant Physiol., 103(2): 669-670.
- [5] 王中炎,Elspeth A, MacRae R, et al. 中华猕猴桃成熟有关的β-半乳糖苷酶(PG)基因的特性研究[A]. 黄宏文. 猕猴桃研究进展[C]. 北京: 科学出版社, 2000: 245-263.
- [6] Snowden K C, Gardner R C. Nucleotide sequence of an actinidin genomic clone[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22): 66-84.
- [7] Lin E, Burns D J W, Gardner R C. Fruit developmental regulation of the kiwifruit actinidin promoter is conserved in transgenic petunia plants[J]. Plant Molecular Biology, 1993, 23(3): 489-499.
- [8] 陈昆松,张隆, Ross G S. 猕猴桃成熟果实中脂氧合酶基因的克隆[J]. 园艺学报, 1998, 25(3): 230-235.
- [9] 任小林,金志强,李嘉瑞. 猕猴桃钙调蛋白cDNA克隆及测序[J]. 西北农业大学学报, 1997, 25(3): 1-5.
- [10] 陈昆松,张上隆, Ross G S. β-半乳糖苷酶基因在猕猴桃果实成熟过程的表达[J]. 植物生理学报, 2000, 26(2): 117-122.
- [11] Gonzalez M V. Morphogenetic patterns in kiwi tissue culture and after *Agrobacterium* co-culture[J]. Acta Horticulture, 1990, 282: 358-364.
- [12] Uematsu G, Murase M, Inohkawa H, Imamura J. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of kiwifruit[J]. Plant Cell Rep., 1991(10): 286-290.
- [13] Rugini E, Pellegrineschi A, Mencuccini M, Mariotti D. Increase of rooting ability in the woody species kiwi (*Actinidia deliciosa* A. Chev.) by transformation with *Agrobacterium rhizogenes* rol genes[J]. Plant Cell Rep., 1991, 10: 291-295.
- [14] Janssen B J, Gardner R C. The use of transient GUS expression to develop an *Agrobacterium*-mediated gene transfer system for kiwifruits[J]. Plant Cell Rep., 1993, 13: 28-31.
- [15] 刘春林,董延瑜. 美味猕猴桃遗传转化研究初报[J]. 湖南农学院学报, 1994, 20(3): 214-221.
- [16] Yazawa M, Sugiyama G, Ichikawa K. Regeneration of transgenic plants from hairy root of kiwifruit induced by *Agrobacterium rhizogenes*[J]. 1995, 45(2): 241-244.
- [17] Kobayashi Y, Nakamura M, Kaneyoshi J. Transformation of kiwifruit and trifoliate orange with a synthetic gene encoding the human epidermal growth factor[J]. J. Japan Soc Hort Sci., 1996, 64: 763-769.
- [18] Yamakawa Y, Chen L H. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) by direct formation of adventitious buds[J]. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 1996, 64: 741-747.
- [19] Fung R W, Janssen B J, Morris B A, et al. Inheritance and expression of transgenes in kiwifruit[J]. New Zealand Journal of Crop & Crop Horticultural Science, 1998, 26(3): 169-179.
- [20] Kusada S, Kano-Murakami Y, Sakamoto T, et al. A rice homeobox gene OSH1 alters morphology of kiwifruit and inhibits the gibberellin bio-

# 草坪草转基因研究进展

党卫玲<sup>1</sup>, 孙彦<sup>1</sup>, 杨青川<sup>2</sup>

(1. 中国农业大学 草业科学系 北京 100094; 2 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所 北京 100094)

**摘 要:** 随着园林事业的发展, 草坪草转基因技术越来越成为人们关注的焦点。现概括草坪草转基因技术在抗病、抗虫、抗除草剂以及抗逆(干旱, 盐碱, 低温等)研究的进展。

**关键词:** 草坪草; 转基因

**中图分类号:** S 688.403.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2007)08—0053—05

伴随城市的发展, 园林绿化事业发展迅速, 草坪以其具有的保持水土, 美化环境, 改善生态环境等功能受到越来越多的亲睐。草坪的质量优劣历来是世界各国关注的焦点。人们对于草坪草坪用性状以及抗逆性状的需求仅仅依靠常规的育种手法以及管理手段是远远不能得到满足的。为了缓解这一矛盾, 我们把目光逐渐转移到转基因技术上来, 希望这一有力工具能够在推动草坪业发展的道路上发挥其强大作用。

Horn 等(1988)<sup>[1]</sup>用电激法和 PEG 介导法将外来基因转入鸭茅原生质体, 获得转基因植株。这是关于草坪

草转基因成功的第一次报道。自此以后, 关于转基因成功的报道不断出现。目前研究相对广泛的为多年生黑麦草、草地早熟禾、匍匐翦股颖以及高羊茅。现就几年来草坪草转基因研究所取得的一些成果做一总结, 希望为我国该研究领域日后的发展提供有用信息。

## 1 抗病转基因研究

草坪草的病害一般有真菌病害、细菌病害以及病毒病害。其中危害草坪草最为严重的是真菌病害。目前生产上尚无十分有效的防治办法。草坪草转基因领域近几年来取得了一些成果。

Chai 等(2002)<sup>[2]</sup>将新近发现并克隆的类似几丁质酶作用的 *hs2* 基因转到匍匐翦股颖, 发现转基因植株对立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Kuhn)有显著的抑制作用, 且抗病能力的强弱与该基因的拷贝数呈正相关。Takahashi W 等(2005)<sup>[3]</sup>用基因枪法将水稻几丁质酶基因(RCC2)导入意大利黑麦草, 经过Northern blot,

**第一作者简介:** 党卫玲(1981-), 女, 中国农业大学草业科学系在读硕士研究生, 研究方向: 草坪分子生物学。E-mail: dangweiling@163.com.  
**通讯作者:** 孙彦, 副教授。E-mail: cts-china@sohu.com.  
**收稿日期:** 2007—03—23

synthesis[J]. Acta Horti. 1998 463: 53-60.

[21] 郭卫东, 沈向. 利用 Lfy cDNA 转化猕猴桃的研究[J]. 园艺学报, 1999, 26(2): 116-117.

[22] Nakamura M, Sawada H, Kobayashi S, et al. Expression of soybean  $\beta$ -1, 3-endoglucanase cDNA and effect on disease tolerance in kiwifruit plants[J]. Plant Cell Rep, 1999, 18: 527-532.

[23] 樊军锋, 李嘉瑞, 韩一凡, 等. mtID/gutD 双价耐盐基因转化秦美猕猴桃的研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2002 30(3): 53-58.

[24] 黄萍, 沈孝善, 马朝宏. 农杆菌对中华猕猴桃叶柄的遗传转化初报[J]. 西南农业学报, 2002, 15(4): 113-115.

[25] 毕静华, 高月, 刘永立, 等. 阔叶猕猴桃抗生素敏感性及其遗传转化的研究[J]. 核农学报, 2006, 20(4): 287-291.

[26] Fitch M M, Manshardt R V, Gonsalves D, et al. Virus resistant papaya plants derives from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus[J]. Bio/ Technol, 1992 10: 1466-1472.

[27] Hebert D. Optimization of biolistic transformation of embryogenic grape cell suspensions[J]. Plant Cell Rep 1993 12: 585-589.

[28] Gereheva R, Zimmermann R H, Owens LD, et al. Particle bombardment of apple leaf explants influences adventitious shoot formation[J]. Hort-Science, 1994, 29(2): 1536-1538.

[29] Sforza R, Cordts JM, Gray DJ, et al. Producing transgenic Thompson Seedless grape plant[J]. J. Amer Soc Hort Sci. 1996. 121 (4): 616-619.

[30] Oliveira M M, Barroso J, Pais M S S. Direct gene transfer into *Actinidia deliciosa* protoplasts: analysis of transient expression of the CAT gene using TLC autoradiography and a GC-MS based method[J]. Plant Molecular Biol., 1991, 17: 235-242.

[31] 朱道圩, 米银法, 陈延惠, 等. GFP 基因在软枣猕猴桃愈伤组织原生质体中瞬间表达的初步研究[J]. 河南农业大学学报, 2003 37(2): 145-148.

[32] Hidaka T, Omura M, Ugaki M, et al. Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of citrus spp. From suspension cells[J]. Japan J Breed 1990 40: 199-207.

[33] Cabrera-Ponce J L, Vegas-García A, Herrera-Estrella L. Herbicide resistant papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method[J]. Plant Cell Rep 1995 15: 1-7.

[34] Bart J J, Richard C G. The use of transient Gus expression to develop an Agrobacterium mediated gene transfer system for kiwifruit[J]. Plant Cell Reports, 1993, 13: 28-31.

[35] Bond JE, Roose ML. Agrobacterium-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange[J]. Plant Cell Rep 1998, 18: 229-234.