

# 果树转基因应用研究

刘 明, 杜俊杰

(山西农业大学 园艺学院, 山西 晋中 030801)

**摘 要:** 转基因技术在果树研究的各领域得到广泛应用, 并取得一定成绩。现从果树转基因技术的应用现状, 影响果树基因转化效率的因素, 转化植株的筛选及转基因安全问题等方面对果树转基因应用的研究进行了综述。

**关键词:** 果树; 转基因; 转化效率

中图分类号: S 66; S 603.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)12-0206-04

生物技术从 20 世纪 70 年代以来在果树上广泛应用, 其中基因工程随着 DNA 重组、基因的遗传转化、目的基因的整合与表达检验等技术的日益完善, 在果树遗传育种上的应用研究越来越受到重视。转基因是通过现代细胞工程和基因工程手段, 将理想的基因转移到目标品种中去, 以达到定向改良品种的目的。植物转基因方法主要可分为两大类, 一是直接转化法, 即将目的基因直接导入到受体的细胞中去, 如以原生质体为受体的 PEG 法, 电激法和依赖原生质体的基因枪转移法、显微注射法、激光微束穿刺法、农杆菌微弹法等。另一类是载体法, 载体法一般指农杆菌转化法, 目前已探讨的各种基因转化方法中, 农杆菌基因转化法是研究最清楚、使用最多的一种<sup>[1]</sup>。现针对转基因技术在果树上的具体应用及存在问题进行综述。

## 1 果树转基因的具体应用

### 1.1 促进果树发根

组织培养或枝条扦插不易形成根果树, 采用发根农杆菌介导法转化植株, 促使其发根。现已通过利用野生型发根农杆菌或带有发根农杆菌 *rol* 基因的致瘤农杆菌等转化而得到解决。唐岱<sup>[2]</sup>、李名扬<sup>[3]</sup>等均用含有 Ri 质粒的野生型发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 的毒性菌株 R1000、15834 和 A4 感染实美橙 (*Citrus sinensis* L. Osbeck) 子叶外植体得到了发根能力增强的转化植株, 其中李名扬试验证明 A4 的感染能力最强, 且对外植体预培养可提高转化率。Zhang zhen<sup>[4]</sup>等将 3 种改造的 *prolC* 质粒, 质粒 I (*gus*, *hpt*, *rolC*), 质粒 II (*gus*, *hptII*, *rolC*), 质

粒 III (*gus*, 插入内含子的 *hptII*, *rolC*) 分别电转进根癌农杆菌 LBA4404, 然后感染苹果砧木西府海棠 (*Malus micromalus* Makino), 最后得到了发根能力增强的转化植株, 转化植株具有明显的矮化效果, 并表明质粒 III 的转化效果最佳, 但转化预培养外植体效率差于直接感染。

### 1.2 缩短果树童期

利用克隆的成花基因缩短果树的童龄期, 促其提前开花。刘静等<sup>[5]</sup>以嘎拉苹果叶片为外植体, 研究农杆菌菌株 EHA105 (含 *LFY* 和 *GUS* 基因), 质粒 pROKII 感染浓度及共培养时间等因素对苹果遗传转化的影响, 通过分析 *GUS* 瞬时表达率, 并对感染后的抗性芽进行继代筛选, 获得了转入 *LFY* 基因的嘎拉苹果早熟新种质。Cervera M 等<sup>[6]</sup>将带有早花基因 *API* 质粒 pROKII-API-35SGUSINT 通过农杆菌 EHA105 感染枳橙 (*Citrange*) 外植体获得了转基因植株, 该植株实生苗生长 1 a 就开始了开花结果。

### 1.3 果实成熟期调整

多数果树的果实贮藏期都比较短, 果实成熟时快速软化, 但通过基因工程手段对其进行遗传改良, 调节果实的成熟软化, 有利于采收及采后的贮运和销售。李曜东等<sup>[7]</sup>用农杆菌介导的反义 *PC* 基因的菌液感染肥城桃组培苗的茎断, 得到了能延迟果实变软的植株, 并建立了高转化率的遗传体系。Dandekar A M 等<sup>[8]</sup>首先构建了分别在 CaMV35S 启动子控制下编码正义、反义 *ACS* 序列和 *ACO* 序列的 4 个双元载体, 然后将 4 种质粒分别通过电转移到农杆菌 EHA101 中, 再用农杆菌感染预培养过的苹果绿袖 (*Greensleeves*) 试管苗叶片, 在转化植株结果时分析果实成熟过程中乙烯、糖、有机酸、硬度、挥发性化合物等的含量变化, 发现相对于对照, 乙烯、酯含量合成受到抑制, 而糖、有机酸以及合成酯的前体分子醛和醇的合成没有变化。GAO Mei 等<sup>[9]</sup>将梨树自身的 *ACO* 基因序列分别连上正反启动子转移到梨 (*Pyrus*

第一作者简介: 刘明 (1986-), 男, 在读硕士, 研究方向为果树遗传育种学。

通讯作者: 杜俊杰 (1961-), 男, 硕士, 教授, 现主要从事果树设施栽培与育种方面研究工作。

收稿日期: 2010-03-02-22

communis cv. ‘La France’), 发现被转入反义链的植株极大地抑制了乙烯的积累, 且有早花现象。

1.4 改良果实品质

我国已克隆了与钙信号传导有关的猕猴桃钙调蛋白基因<sup>[10]</sup>, 葡萄果实 ACPK1、CDPK 蛋白激酶基因<sup>[11]</sup> 和苹果果实中的钙依赖蛋白激酶基因 *MdCPK1*<sup>[12]</sup> 等。曹艳红<sup>[13]</sup> 用携带双元载体 pYPX145 (含 APPO 正反 DNA 片段) 的农杆菌 LBA 4404 感染苹果叶片获得了转化植株, 减小了褐化现象。叶霞等<sup>[14]</sup> 用根癌农杆菌为携带表达载体质粒 pAP160 (包含 nptII 和 gus, 铁结合蛋白基因 (ferritin) 由 2A11 果实特异表达启动子控制, 并在铁结合蛋白基因右端插入了一个利于基因稳定表达的核骨架附着区 (DNA 片段 SAR) 的菌株 LBA 4404 通过叶盘法感染皇家嘎拉试管苗, 获得了转化植株, 提高了果实的含铁量。

1.5 果树抗逆性的增强

面对不断恶化的生态环境 为从根本上解决低温、干旱和盐碱等非生物胁迫对果树生长发育的不良影响, 培育抗逆性强的果树品种是中国转基因果树育种研究的一个重要方向。如通过转入抗冻蛋白 AFP 培育出具有一定抗冻性的转基因杏<sup>[15]</sup>, 转入甜菜碱脱氢酶基因的转基因草莓<sup>[16]</sup>、双价耐盐基因的猕猴桃<sup>[17]</sup> 等果树提高了抗盐性, 转入三价融合基因 *Rirol* 的八棱海棠<sup>[28]</sup> 能够提高抗缺铁、耐盐胁迫性。

1.6 提高果树抗病虫能力

应用转基因技术提高果树抗病虫能力是十分有效的。目前主要的抗病虫基因有胰蛋白酶抑制剂基因、植物凝集素基因、几丁质酶基因、洋李痘病毒 (PPV) 的 CP 基因、抗真菌蛋白基因 *osmotin*、番木瓜环斑病毒 PRV 的外壳蛋白 CP 基因、*TRSV* 外壳蛋白基因、*CTV* 外壳蛋白基因、*CIP* 基因、抗菌肽基因、苹果抗火疫病基因、抗菌肽 *MB39* 基因、杀菌肽基因、*Bt* 基因、豇豆胰蛋白酶抑制剂 (*CpTj*) 基因等。

抗病害方面, 汤浩茹等<sup>[19]</sup> 通过农杆菌介导法将哈兹木霉几丁质酶 *ThEn-42* 基因导入核桃, 并对核桃的疮痂病具有良好的抵抗作用。刘庆忠等<sup>[20]</sup> 将抗菌的硫堇蛋白 *Rsa-fP1* 基因成功转入苹果中, 获得了具有较高的抗苹果火疫病、黑星病、白粉病以及腐烂病的转基因植株。陈善春等<sup>[21]</sup> 将柞蚕抗菌肽 *D* 基因导入柑橘, 获得了具有广谱杀菌作用抗性植株。方宏筠等<sup>[22]</sup> 用不同类型根癌农杆菌及质粒 (抗菌肽基因为双价, 包含有 CecropinB 和 ShivaA) 感染樱桃矮化砧木茎尖获得了抗根瘤菌的植株, 其中含 pTYB4A 的菌株 EHA 105 转化效果最好。另外王关林等<sup>[23]</sup> 也获得了抗根癌菌病害的转基因樱桃植

株。黄文江<sup>[24]</sup> 用含双元载体 pGV (MB39 由来自烟草的诱导型启动子 *Osmotin* 启动) 的根癌农杆菌菌株 EHA105 感染樱桃试管苗新梢叶片获得抗性植株。罗赛男等<sup>[25]</sup> 将获得 *TERF1* 基因糖橙的春梢叶片进行柑桔溃疡病和炭疽病的接种, 结果表明, *TERF1* 基因增强了糖橙的广谱抗病性。Malnoy M 等<sup>[26]</sup> 将含有 bovine lactoferrin cDNA 的双元载体 pLacto13 利用农杆菌 EHA105 感染对火疫病高度敏感的梨栽培品种帕斯卡桑西洋梨 (*Passe Crassane*) 叶片, 证明转基因植株对火疫病不再敏感, 有效地防止了火疫病的发生。Dean Oe-lofse 等<sup>[27]</sup> 研究了苹果的 *PGIP* 蛋白及基因, 证明了来自苹果 cv. *Granny Smith* 果实的 *PGIP* 蛋白抑制来自 *C. lupini* and *A. niger* 的 PGs 酶活性, 也证明了 *PGIP* 转入烟草后同样能够抑制 *C. lupine* and *A. niger* 的 PGs 酶活性。张开春等<sup>[28]</sup> 从圆叶樱桃克隆了多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白 (*PGIP*) 基因。这些研究为通过转基因技术防止病菌造成的果实腐烂奠定了良好的基础。

抗虫害方面, 裴东等<sup>[29]</sup> 用分别将 *Bt* 基因完全改造和部分改造的表达载体 pB48.7 和 pB48.6, 通过农杆菌 LBA 4404 感染苹果优良品种红富士、早生富士、辽伏, 获得了转化植株, *Bt* 抗性主要表现在防治蚜虫及食叶类害虫。师校欣等<sup>[30]</sup> 利用根癌农杆菌菌株为 LBA 4404, 将高效启动子控制的豇豆胰蛋白酶抑制剂基因 (*Cp TI*) 通过叶圆片转化法转入富士、乔纳金、王林、嘎拉等苹果主栽品种中, 检测证明了 4 个品种均获得转化再生植株, 现已移栽成活, 更有效地解决了果树的抗虫问题。

2 影响果树转基因效率及植株再生的因素

2.1 农杆菌类型影响着转化效率及不同植株再生能力

马德钦等<sup>[31]</sup> 用含有致瘤的 Ti 质粒的生化 III 型葡萄根癌土壤杆菌 MI3-2、Bs33-6 等菌株, 其中用章鱼碱菌株 MI3-2、MI14-1、MA32-1、MI22-1 及胭脂碱菌株 BS33-6、BS33-7 能从葡萄试管苗的茎诱导出生冠瘿瘤, 但未能诱导再生植株。胭脂碱菌株 BS33-6 能诱导毛叶受陀罗产生畸胎瘤, 并在无植物激素的培养基内, 培养 1 个月能分化出植株。

2.2 不同的外植体再生能力对转基因植株的获得起着关键作用

黄学森等<sup>[32]</sup> 用含 Ti 质粒 C58 和 PGV3850; 1103 nec 的根癌农杆菌感染葡萄枝条生长点碎片获得了转基因枝条, 但是没能进一步得到植株。程家胜<sup>[33]</sup> 用的农杆菌为带有 pCGN7001 质粒的菌系 EHA101 对苹果品种绿袖 (Greensleeves) 叶片作基因导入获得成功, 从而获得转基因的苹果试管苗。张克忠以葡萄的原生质体为外植体成功地获得苏云金杆菌内毒素蛋白基因的转基因

植株, 而采用上胚轴切段、子叶、节间部分及茎段时, 转化效率相对较高, 且以切段或茎段为外植体操作简单, 试验成本也较低。

### 3 提高转化及转化植株筛选效率的研究

#### 3.1 抗生素标记的应用

Petri C 等<sup>[34]</sup> 用携带质粒 pBin19-*sgfp* 的农杆菌 EHA105 感染杏树品种海莱那(Helena)的试管苗叶片, 建立的有效转化和植株再生体系, Petri C 等<sup>[35]</sup> 在以前研究的基础上又进行了抗生素筛选策略的试验, 并找到了提高转化植株筛选效率的方法。

#### 3.2 假转化问题的解决

Domínguez A 等<sup>[36]</sup> 研究了经抗生素筛选出的转基因柑橘组培芽体再生植株中假转化高频率存在的原因, 发现主要是嵌合体的存在与基因表达沉默导致的。石玮等<sup>[37]</sup> 发现由于茎段作为转化的材料不仅容易产生嵌合体, 并且由于经过有性过程, 造成遗传背景不清楚。通过根癌农杆菌介导的方法, 使用根癌农杆菌菌株为 EHA105, 质粒载体为 pCAMBIA1303 将绿色荧光蛋白基因导入印度酸桔的愈伤组织中获得转基因的再生植株, 没有假转化出现。TIAN Li-ning 等<sup>[38]</sup> 研究了在李的转基因技术中不同选择标记基因的选择效率, 结果表明含有质粒 pC1381(*npt*, *gus*)的农杆菌 LBA 4404 比含有质粒 pC1301(*npII*, *gus*)的农杆菌 EHA 105 感染李的种胚块的转化植株筛选效率高且无非转化植株的逃逸。

### 4 转基因技术针对生物安全问题做出的研究

转基因的生物安全问题一直受到公众的关注和担忧, 在某种程度上阻碍了转基因技术的发展。研究者针对转基因的生物安全做了很多研究。

#### 4.1 被转基因的稳定性

Maghuly F 等<sup>[39]</sup> 以抗霜冻性樱桃砧木(*Prunus subhirtella* cv. autumnosa)作为模式果树, 研究了转基因植株经过 9 a 的嫁接等营养繁殖后, 发现被转进植物的标记基因的稳定性表达水平并没有改变, 基因的结构、拷贝数同样没有变化, 也没有出现基因沉默。

#### 4.2 抗性基因对物种多样性影响

Capote N 等<sup>[40]</sup> 通过研究转基因欧洲李对 ppv 和蚜虫的多样性和数量的影响, 证明转基因 CP 与非转基因的欧洲李相比较几乎没有造成 ppv 的变异, 也没有造成蚜虫数量的变化, 目前可以说转基因是安全的。

#### 4.3 转基因食品的安全性

Weiss J 等<sup>[41]</sup> 通过 PCR 方法检验了经过储藏和标准程序加工后的转基因的柑橘橘汁中细菌、真菌、植物的基因组 DNA 的完整性, 证明了食用转基因橘汁的安全性。

#### 4.4 启动子的安全性

消除公众对由 CaMV 35S 启动子控制的外源基因的组成型表达的生物安全性的担忧, Gittins J R 等<sup>[42]</sup> 开始使用特异型表达启动子, 对特异型表达启动子的表达效率进行了研究, 它们构建了 3 种质粒, 均以 *gusA* 作为报告基因, 启动子分别为 CaMV35S 启动子, *rolC* 启动子, CoYMV 启动子的 pSCV1.6 质粒 I, pPCV002-*rolCGUS* 质粒 II, pBI101. pCO 质粒 III 将质粒分别转入农杆菌 EHA101 感染苹果绿袖(Greensleeves)的外植体, 获得转基因植株, 最后比较 3 种启动子的启动表达效率, 结果为 CaMV35S 启动子 > CoYMV 启动子 > *rolC* 启动子, 虽然特异型表达启动子的表达效率不如组成型, 但是它的安全性高。

#### 4.5 选择标记的安全性

Ballester A 等<sup>[43]</sup> 用含 MAT 质粒 pEXMGFP1 的根瘤农杆菌 EHA 105 感染卡里佐橙橘(*Carrizo citrange*)和甜橘(*Pineapple sweet orange*)的组培苗茎段, 研究分析发现用 MAT 作为筛选标记, 不但安全而且筛选率高。Alida Ballester 等<sup>[44]</sup> 鉴于公众对转进植物的抗性基因的压力, 对能够替代卡那霉素抗性筛选的其它筛选标记基因进行了研究, 研究了 3 个替代方案的转化效率, 分别 GUS, MAT, PMI/ mannose system 作为转化柑橘 *Carrizo citrange* and *Pineapple sweet orange* 的筛选标记基因, 结果表明 3 种方案的转化效率均高于 *nptII* 其中 PMI/ mannose system 的效率最高, 说明完全可以用安全性选择标记代替抗性筛选标记。

随着世界果树业的发展, 提高果实品质、增加果树抗逆性及延长果品的贮藏期是果树育种的趋势。因此, 今后我国在果树研究方面要重点探索栽培果木的高效转化体系, 加强果树中价值基因的分离和克隆, 尤其是与产量、果实品质及抗逆性有关的基因。扩大基因的筛选范围, 由常规的栽培品种扩大到野生或半野生的种质资源。同时要加强对转基因安全的检测, 改进转基因方法, 使转基因果品更安全, 相信随着基因分离技术和遗传转化技术的进一步成熟, 以及基因功能和人工构建体系的进一步发展, 果树转基因在遗传育种中将有更广阔的研究前景和更大的应用潜力。

#### 参考文献

- [1] 赵玉辉, 李作轩. 农杆菌介导果树遗传转化之研究进展[J]. 中国农学通报, 2006, 21(11): 281-285.
- [2] 唐岱, 徐淳. 利用发根农杆菌转化实美橙子叶外植体的研究[J]. 西南农业大学学报, 1993, 15(4): 363-365.
- [3] 李名扬, 罗金华, 陈红. 发根农杆菌对柑橘的离体转化和植株再生作用[J]. 西南农业大学学报, 1996, 9(1): 90-95.
- [4] ZHANG Zheng, SUN Aijun, CONG Yu. Agrobacterium-Mediated Transformation of the Apple Rootstock *Malus micromalus* Makino with the

- roIC Gene[J]. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant, 2006, 42: 491-497.
- [5] 刘静, 李湘利, 徐继忠, 等. 农杆菌介导法将 LFY 基因导入嘎拉苹果的研究[J]. 华北农学报, 2007, 22(2): 53-55.
- [6] Cervera M, Navarro L, Pena L. Gene stacking in 1-year-cycling AP-ETALA 1 citrus plants for a rapid evaluation of transgenic traits in reproductive tissues[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 140: 278-282.
- [7] 李曜东, 魏玉凝. 肥城桃组培苗诱导、基因转化及其增殖[J]. 果树学报, 2003, 20(1): 70-72.
- [8] Dandekar A M, Teo G, DeFlippi B G. Effect of down-regulation of ethylene biosynthesis on fruit flavor complex in apple fruit [J]. Transgenic Research, 2004, 13: 373-384.
- [9] Gao Mei, Matsuta Narumi, Murayama Hideki. Gene expression and ethylene production in transgenic pear (*Pyrus communis* cv 'La France') with sense or antisense cDNA encoding ACC oxidase [J]. Plant Science, 2007, 173: 32-42.
- [10] 任小林, 金志强, 李嘉瑞, 等. 猕猴桃钙调蛋白 cDNA 的克隆及测序[J]. 西北农业大学学报, 1997, 25(3): 1-5.
- [11] Yu X C, Li M J, Gao G F, et al. Absciscic acid stimulates a calcium-dependent protein kinase in grape berry [J]. Plant Physiology, 2006, 140: 558-579.
- [12] 邹庆琴. 苹果钙依赖蛋白激酶 MdCPK1: 分子克隆、表达、定位及被脱落酸的激活[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [13] 曹艳红. 苹果多酚氧化酶双链 RNA 干扰(dsRNAi)研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2004.
- [14] 叶霞, 黄晓德, 陶建敏, 等. 农杆菌介导 ferritin 基因转化苹果的研究[J]. 果树学报, 2005, 22(4): 387-389.
- [15] 冯殿齐, 刘静珊, 孙仲序, 等. 利用氮离子注入技术转化抗寒基因 (afp) 初步研究[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2005, 36(1): 86-92.
- [16] 刘风华, 郭岩, 谷东梅, 等. 转甜菜碱醛脱氢酶基因植物的耐盐性研究[J]. 遗传学报, 1997, 24: 54-58.
- [17] 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.
- [18] 王三红, 杨梦悦, 顾敏, 等. 农杆菌介导三价融合基因 Rirol 转化八棱海棠的研究[J]. 果树学报, 2007, 24(6): 731-736.
- [19] 汤浩茹, Wall braun M, 任正隆, 等. 通过农杆菌介导法将哈兹木霉几丁质基因 ThEn-42 导入核桃[J]. 园艺学报, 2001, 28(1): 12-18.
- [20] 刘庆忠, 赵红军, 孙清荣, 等. 抗真菌硫堇蛋白基因导入苹果获得转基因植株[J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(3): 239-242.
- [21] 陈善春, 张进仁, 黄自然, 等. 根癌农杆菌介导柞蚕抗菌肽 D 基因转化柑桔的研究[J]. 中国农业科学, 1997, 30(3): 7-13.
- [22] 方宏筠, 王关林, 王火旭, 等. 抗菌肽基因转化樱桃矮化砧木获得抗根瘤病的转基因植株[J]. 植物学报, 1999, 41(11): 1192-1198.
- [23] 王关林, 夏秀英, 钟文田, 等. 樱桃砧木叶片再生系统建立及抗菌肽基因转化[J]. 园艺学报, 2003, 30(2): 209-211.
- [24] 黄文江, 马锋旺. 甜樱桃矮化砧木离体叶片再生及抗菌肽 MB39 基因转化植株的获得[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2002.
- [25] 罗赛男, 邓子牛, 钟晓红, 等. *TERF1* 基因增强糖橙抗病性的初步研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2008, 28(5): 71-76.
- [26] Malnoy M, Venisse J S, Brisset M N. Expression of bovine lactoferrin cDNA confers resistance to *Erwinia amylovora* in transgenic pear[J]. Molecular Breeding, 2003(12): 231-244.
- [27] Oelofse D, Dubey I A, Meyer R. Apple polygalacturonase inhibiting protein I expressed in transgenic tobacco inhibits polygalacturonases from fungal pathogens of apple and the anthracnose pathogen of lupins [J]. Phytochemistry, 2006, 67: 255-263.
- [28] 张开春, 张军科. 马哈利樱桃 PGP 基因克隆及全序列测定[J]. 农业生物技术学报, 2000, 8(3): 281-283.
- [29] 裴东, 田颖川, 刘群禄, 等. 苹果叶片再生的改进及转抗虫基因植株的获得[J]. 河北农业大学学报, 1996, 19(4): 23-26.
- [30] 师校欣, 王斌, 杜国强, 等. 根癌农杆菌介导豇豆胰蛋白酶抑制剂基因转入苹果品种[J]. 园艺学报, 1997, 27(4): 282-284.
- [31] 马德钦, 相望年. 葡萄根癌土壤杆菌诱导的葡萄. 毛叶曼陀罗冠瘿瘤的离体培养和植株再生[J]. 遗传学报, 1986, 13(6): 417-422.
- [32] 黄学森, Mullins M G. 用生物工程技术将外源基因转入葡萄的研究[J]. 遗传, 1989, 11(3): 9-11.
- [33] 程家胜. 苹果基因转移技术研究初报[J]. 园艺学报, 1992, 19(2): 102-104.
- [34] Petri C, Wang Hong, Albuquerque N, et al. Agrobacterium-mediated transformation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) leaf explants [J]. Plant Cell Rep, 2008, 27: 1317-1324.
- [35] Petri C, Lopez-Noguera S, Albuquerque N, et al. An antibiotic-based selection strategy to regenerate transformed plants from apricot leaves with high efficiency [J]. Plant Science, 2008, 175: 777-783.
- [36] Domínguez A, Cervera M, Pérez-Rosa M. Characterisation of regenerants obtained under selective conditions after Agrobacterium-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies [J]. Molecular Breeding, 2004, 14: 171-183.
- [37] 石玮, 李东栋, 邓秀新, 等. 根癌农杆菌介导绿色荧光蛋白基因转化印度酸桔的研究[J]. 园艺学报, 2002, 29(2): 109-112.
- [38] TIAN Li-ning, Canli F A, WANG Xin-hua. Genetic transformation of *Prunus domestica* L. using the hpt gene coding for hygromycin resistance as the selectable marker [J]. Scientia Horticulturae, 2009, 119: 339-343.
- [39] Maghuly F, da Camara Machado, Leopold S. Long-term stability of marker gene expression in *Prunus subhirtella*: A model fruit tree species [J]. Journal of Biotechnology, 2007, 27: 310-321.
- [40] Capote N, Perez-Panades J, Monzo Ce. Assessment of the diversity and dynamics of Plum pox virus and aphid populations in transgenic European plums under Mediterranean conditions [J]. Transgenic Res, 2008, 17: 367-377.
- [41] Weiss J, Ros-Chumillas M, Pena L. Effect of storage and processing on plasmid, yeast and plant genomic DNA stability in juice from genetically modified oranges [J]. Journal of Biotechnology, 2007, 128: 194-203.
- [42] Gittins J R, Pellny T K, Biricolti S. Transgene expression in the vegetative tissues of apple driven by the vascular-specific roIC and CoYMV promoters [J]. Transgenic Research, 2003, 12: 391-402.
- [43] Ballester A, Cervera M, Pena L. Efficient production of transgenic citrus plants using isopentenyl transferase positive selection and removal of the marker gene by site-specific recombination [J]. Plant Cell Rep, 2007, 26: 39-45.
- [44] Ballester A, Cervera M, Pena L. Evaluation of selection strategies alternative to nptII in genetic transformation of citrus [J]. Plant Cell Rep, 2008, 27: 1005-1015.