

根癌农杆菌介导的怀地黄遗传转化研究

王丰青¹, 田云鹤^{1,2}, 谢彩侠³, 杜家方¹, 李烜楨¹, 张留记⁴, 何华勤², 张重义^{1,2*}

1. 河南农业大学农学院, 河南 郑州 450002

2. 福建农林大学中药材 GAP 研究所, 福建 福州 350002

3. 河南中医学院药学院, 河南 郑州 450046

4. 河南省中医药研究院, 河南 郑州 450004

摘要: 目的 研究适于怀地黄 *Rehmannia glutinosa* 遗传转化的激素质量浓度和潮霉素质量浓度。方法 以地黄无菌苗叶片为外植体, 以根癌农杆菌介导的叶盘法进行转化, 分析了潮霉素和乙酰丁香酮 (AS) 对抗性愈伤诱导率和再生芽分化效率的影响。结果 潮霉素的质量浓度对抗性愈伤和抗性芽的产生影响很大, 影响抗性愈伤诱导的临界质量浓度为 9 mg/L, 影响抗性芽分化的临界质量浓度为 6 mg/L, 适宜于进行地黄遗传转化的质量浓度为 12 mg/L。侵染培养基和共培养培养基中添加 100 μmol/L 的 AS 可以极显著提高转化效率。PCR 扩增和 β-葡萄糖苷酶 (GUS) 染色结果表明, 外源基因成功整合到地黄基因组中。结论 建立了有效的怀地黄稳定遗传转化再生体系, 为地黄的分子生药研究和遗传改良奠定基础。

关键词: 地黄; 根癌农杆菌; 遗传转化; 潮霉素; 乙酰丁香酮

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)17-2541-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.17.022

Studies on genetic transformation of *Rehmannia glutinosa* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

WANG Feng-qing¹, TIAN Yun-he^{1,2}, XIE Cai-xia³, DU Jia-fang¹, LI Xuan-zhen¹, ZHANG Liu-ji⁴, HE Hua-qin², ZHANG Zhong-yi^{1,2}

1. Agronomy College of Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

2. Institute of Chinese Crude Drugs GAP, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

3. School of Medicine, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

4. Henan Province Institute of Chinese Medicine Research, Zhengzhou 450004, China

Abstract: Objective To determine the optimal concentration of hormone and hygromycin for seedling regeneration of *Rehmannia glutinosa*. **Methods** Using the young leaf of sterile plantlet from *R. glutinosa* as explants, we conducted the transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, analyzed the efficiency of hygromycin and acetosyringone (AS) on resistant callus induction and plant regeneration. **Results** The concentration of hygromycin had greatly affected the production of resistant callus and seedlings. The critical concentration of hygromycin on the resistant callus induction and shoot regeneration were 9 and 6 mg/L, respectively. The optimal concentration of hygromycin for the genetic transformation of Wen 85-5 was 12 mg/L. Adding 100 μmol/L AS could greatly improve the transformation efficiency of *R. glutinosa*. It was confirmed by PCR detection of *hpt* gene and GUS staining that the foreign gene was integrated into the genome of *R. glutinosa*. **Conclusion** The stable genetic transformation system of *R. glutinosa* is established, which lays the foundations for the research on molecular pharmacognosy and genetic improvement.

Key words: *Rehmannia glutinosa* L.; *Agrobacterium tumefaciens*; genetic transformation; hygromycin; acetosyringone

地黄 *Rehmannia glutinosa* L. 为玄参科多年生草本植物, 以块根入药, 是著名“四大怀药”之一。因其用药历史悠久、临床疗效确切, 已成为构建我

国现代大中药产业链重点推荐研究利用的大宗药材之一^[1-2]。然而, 由于地黄生产上多以块根进行无性繁殖, 易遭受病原菌和病毒侵袭而发病。而且, 地

收稿日期: 2014-03-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81274022, 81473299); 中国博士后科学基金资助项目 (2013M541977); 河南省教育厅科学技术研究重点资助项目 (14A360007)

作者简介: 王丰青 (1977—), 男, 河南兰考人, 博士, 讲师, 研究方向为中药资源学。E-mail: heauzycxw@126.com

*通信作者 张重义, 男, 教授, 主要从事中药资源可持续利用研究。Tel: (0591)83742793 E-mail: zyzhang@fafu.edu.cn

黄生产上存在非常严重的连作障碍问题,造成地黄产量和品质明显下降,种植过地黄的土地须隔 8~10 年方可再种。培育脱毒地黄虽然能够提高地黄的产量,但并没有改变地黄的遗传特性,病毒复侵速度快,2~3 代就要更换 1 次种苗,成本高。这些都在很大程度上影响了地黄生产的稳定发展,也制约了地黄道地产区中药农业的可持续发展。近年来,由于高通量 DNA 测序技术的发展,地黄的基因转录本不断被解析,快速获取地黄产量形成和活性成分合成调控的基因信息成为可能^[3-4]。最近,关于地黄蛋白编码基因克隆的报道越来越多^[5-8]。因此,通过遗传转化的方法对地黄的遗传特性进行修饰,对于获得产量高、活性成分高和抗病虫能力强的优良地黄品种具有重要的现实意义。

地黄是较早开展组织培养技术的药用植物之一,已经建立了高效的地黄脱毒、快繁和再生体系^[9]。然而,有关怀地黄遗传转化的研究却很少。付建喜等^[10]报道用发根农杆菌侵染地黄子叶、叶柄和茎,获得了转基因地黄植株。然而,由于发根农杆菌转化的转基因植株普遍表现地上部分节间缩短、地下部分以须根为主,而且 Ri 质粒改造技术滞后,限制了其在植物基因组的遗传修饰方面的应用。Park 等^[11]虽然最早报道获得了根癌农杆菌介导的地黄转化植株,然而,作为转化受体的地黄种质不明,且转化程序较复杂。臧亚超^[12]虽也获得了地黄转基因植株,但由于抑菌抗生素质量浓度过高,再生芽分化慢,转化效率也低。因此,构建转化程序简单、转化效率高、重复性好的怀地黄遗传转化再生体系仍是地黄种质遗传改良中亟需解决的问题。

1 材料与方法

1.1 材料

地黄温 85-5 为道地产区大面积推广品种,具有高产优质的特点,经河南省中医药研究院张留记研究员鉴定为地黄 *Rehmannia glutinosa* L.

1.2 遗传转化的潮霉素和 AS 处理

筛选适宜于遗传转化的潮霉素质量浓度,实验设置 0、3、6、9、12 mg/L 5 个质量浓度梯度。研究乙酰丁香酮 (acetosyringone, AS) 在遗传转化中的作用,实验设置了在侵染培养基和共培养培养基中添加 100 μmol/L AS 和不添加 AS 的 2 个处理。统计愈伤诱导率 (愈伤诱导率 = 诱导出愈伤的叶盘数 / 接种的叶盘总数) 和再生芽分化率 (再生芽分化率 = 分化出再生芽的叶盘数 / 接种的叶盘总数)。

1.3 遗传转化方法

1.3.1 怀地黄无菌苗的制备 将田间挖取的直径约 1~2 cm 的怀地黄块根洗净,用体积分数为 70% 乙醇表面消毒 30 s,然后用 0.1% HgCl₂ 消毒 10~15 min,无菌水冲洗 5~6 次;将带芽眼的部分切成 1.5~2.0 cm 小块放入 MS 基本培养基中,15 d 后将再生芽转至新的 MS 基本培养基,30 d 继代 1 次。

1.3.2 菌株的活化与侵染菌液的制备 将鉴定正确的含质粒载体 pCABMA1301 的根癌农杆菌 LBA4404 在含 50 mg/L 卡那霉素的 YEB 固体培养基上划线活化,于 27 °C 下暗培养 48 h,挑取单克隆菌落接种到 20~30 mL 含 50 mg/L 卡那霉素 YEB 液体培养基中,于 27 °C 下,180 r/min 振荡培养 24 h,取 100 μL 的菌液接种到 50 mL 的 YEB 液体培养基中,于 27 °C 下 180 r/min 振荡培养,至 A₆₀₀ 为 0.4~0.8,4 000 r/min 条件下离心 10 min 收集菌体,弃上清,用侵染培养基悬浮至 A₆₀₀ 为 0.5,待用。

1.3.3 侵染和共培养 将怀地黄无菌苗的叶片去掉主脉,剪成长宽约 0.5~1.0 cm 的小块即叶盘,置于制备好的农杆菌液中浸泡 5~10 min,用无菌滤纸吸去叶盘上多余的菌液,接种到添加适宜质量浓度 6-BA 和 NAA 的共培养培养基上暗培养 48~72 h。

1.3.4 外植体的抗性愈伤诱导和再生芽分化 共培养后的叶盘转接到含 200 mg/L 特美汀、0.1 mg/L NAA、2.0 mg/L 6-BA 以及不同质量浓度的潮霉素、AS 的筛选培养基上,3~4 周后把抗性愈伤转接到新的筛选培养基上,2~3 周长出抗性芽。

1.3.5 再生芽增殖和生根 将长 2~3 cm 的抗性芽转接到含 0.2 mg/L 6-BA 和 0.01 mg/L NAA 的丛生芽分化培养基中进行抗性芽扩繁,把长 2~3 cm 的丛生芽剪下转入含 0.01 mg/L NAA 和适宜质量浓度潮霉素的生根培养基中生根。

所有材料均在智能光照培养箱里培养,温度为 25 °C,光照强度为 2 000~4 000 lx,14 h/d。计算转化率 (转化率 = 分化出抗性芽的叶盘数 / 接种的叶盘总数)。

1.4 转基因植株分子检测

取所获得的抗性再生植株的叶片,采用 CTAB 法提取叶片的基因组 DNA,用潮霉素标记基因特异引物 5'-ATCGAAATTGCCGTCACACC-3' / 5'-ACAGCGTCTCCGACCTGAT-3' 进行 PCR 鉴定,能扩增出 794 bp 的特异片段的为阳性植株。

β-葡萄糖苷酶 (GUS) 染色方法参照 Sieburth

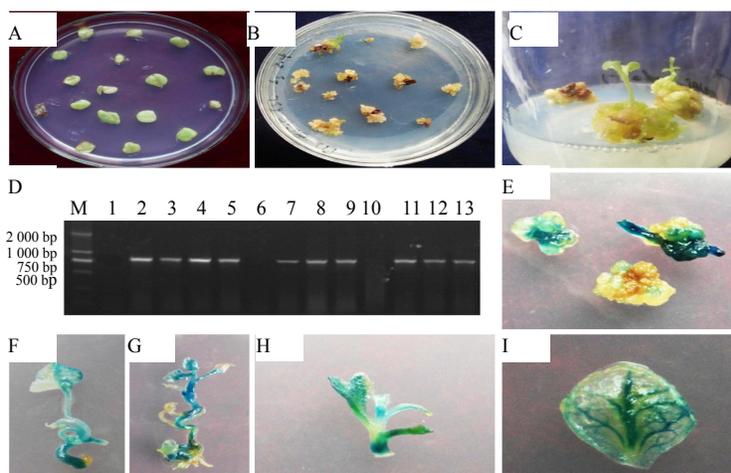
等^[13]，并做适当修改。将抗性愈伤、再生芽和幼苗浸没在 GUS 染色液 [50 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0)，0.5 mmol/L 铁氰化钾，0.5 mmol/L 亚铁氰化钾，10 mmol/L EDTA-Na₂，0.1% Triton X-100，10 mmol/L X-Glu] 中，37 °C 暗培养 24 h，分别用 50%、70% 和 100% 乙醇去除叶绿素，显微镜下观察。

2 结果与分析

2.1 潮霉素和 AS 对抗性愈伤诱导的影响

以添加 NAA 0.1 mg/L、6-BA 2.0 mg/L 为筛选培养基的激素质量浓度，分析不同侵染培养基和筛选培养基对抗性愈伤诱导的影响，把叶片小块 (叶盘) 在菌液里侵染 5 min，在共培养培养基上 2 d 后置于筛选培养基上培养 (图 1-A)，2 周后统计愈伤，结果 (表 1) 表明，对于未进行农杆菌侵染的

叶盘在潮霉素 6 mg/L 以下筛选培养基上培养，愈伤诱导率均超过 90%，当潮霉素为 9 mg/L 时愈伤诱导率仅有 48.89%，潮霉素为 12 mg/L 时所有叶片均没有诱导出愈伤。在不含 AS 的侵染培养基中侵染的叶盘，置于含潮霉素低于 6 mg/L 的筛选培养基上培养，愈伤诱导率较未侵染的稍低，除 6 mg/L 的处理外均不显著，之后随着潮霉素质量浓度的增加愈伤诱导率迅速降低，12 mg/L 时诱导率仅有 21.11%。而在添加了 100 μmol/L AS 的侵染培养基侵染过的地黄叶盘，在潮霉素 6 mg/L 以下筛选培养基上培养，愈伤诱导率与未侵染的几乎一致，9 mg/L 时愈伤诱导率没有降低，12 mg/L 时诱导率虽有降低，但仍有 61.11%，而且愈伤鲜黄色，生长速度快 (图 1-B)。



A-叶片接种 B-抗性愈伤诱导 C-再生芽分化 D-转基因地黄的 PCR 检测 (M-Marker, 1-阴性对照, 2-质粒阳性对照, 3-13-遗传转化后不同的地黄植株) E-抗性愈伤 F、G-分化芽 H-苗 I-叶片
A-leaf inoculation B-induction of resistant callus C-differentiation of shoot D-detection of transformed shoots with PCR amplification (M-Marker, 1-negative control 2-plasmid positive control 3-13-regenerated plants of *R. glutinosa* after genetic transformation) E-resistant callus F and G-seedlings H-plantlets I-leaf

图 1 地黄的遗传转化及转基因苗的分子检测

Fig. 1 Molecular detection on genetic transformation and transgenic seedlings of *R. glutinosa*

表 1 潮霉素和 AS 对地黄叶片抗性愈伤诱导的影响

Table 1 Effects of hygromycin and AS on resistant callus induction from leaf explants of *R. glutinosa* in selective media at different concentration

潮霉素质量浓度 / (mg·L ⁻¹)	接种叶盘数	未侵染		培养基无 AS		培养基+100 μmol·L ⁻¹ AS	
		诱导愈伤数	诱导率 / %	诱导愈伤数	诱导率 / %	诱导愈伤数	诱导率 / %
0	30	29.00±1.00	96.67±3.33 aA	28.00±1.00	93.33±3.33 abA	28.33±1.15	94.44±3.85 abA
3	30	29.33±0.58	97.78±1.92 aA	29.00±1.00	96.67±3.33 aA	29.33±1.15	97.78±3.85 aA
6	30	27.67±0.58	92.22±1.92 abA	26.33±2.31	87.78±7.70 bA	27.67±0.57	92.22±1.92 abA
9	30	14.67±2.52	48.89±8.39 dC	17.67±2.52	58.89±8.39 cBC	28.67±1.52	95.56±5.10 abA
12	30	0	0 fE	6.33±1.16	21.11±3.85 eD	18.33±2.52	61.11±8.39 cB

小写字母表示处理间在 0.05 水平上差异显著，大写字母表示在 0.01 水平上差异极显著，下同

Lowercase letters mean significant difference at 0.05 level among treatments, uppercase letters mean highly significant difference at 0.01 level; same as below

2.2 潮霉素和 AS 对抗性芽分化的影响

对上述侵染农杆菌的地黄叶片诱导的愈伤继续在含相应质量浓度潮霉素的筛选培养基上培养, 结果表明(表 2), 随着潮霉素质量浓度的增加, 未添加 AS 的处理再生芽分化率呈递减趋势, 当潮霉素质量浓度达到 6 mg/L 时, 愈伤几乎均不同程度褐变, 很少有再生芽出现, 潮霉素质量浓度为 12 mg/L 时, 3 次重复实验均没有分化出再生芽。随潮霉素质量浓度增加, 添加 AS 的处理再生芽分化率虽也有降低, 但降低趋势不明显, 除了潮霉素 9 mg/L 时再生芽分化率不足 10% 以外, 其余 4 个处理的再生芽分化率均在 20% 以上。观察发现, 潮霉素质量浓度为 12 mg/L 时, 添加 AS 的处理愈伤生长状态好, 再生芽分化率高(图 1-C)。以 PCR 扩增的方法对

产生的抗性芽进行检测, 结果表明(图 1-D), 无论是否添加 AS, 当潮霉素质量浓度低于 6 mg/L 时所有的芽均无法扩增出潮霉素抗性基因特异的 PCR 产物, 为假阳性。未添加 AS 的处理, 潮霉素为 9 mg/L 时 1 个叶盘分化出的抗性芽为阳性。添加 AS 的处理, 潮霉素为 9 mg/L 时 3 次重复共 8 个叶盘分化出抗性芽, 其中有 5 个为阳性, 阳性率为 62.5%; 潮霉素质量浓度为 12 mg/L 时 3 次重复共有 22 个叶盘分化出再生芽, 其中 19 个为阳性, 阳性率为 96.4%。为了进一步检测抗性芽是否为阳性, 对所有 PCR 扩增检测为阳性的再生芽和愈伤进行了 GUS 染色分析, 结果(图 1-E~I)表明, 这些愈伤和再生芽均能够被染成深浅不一的蓝色, 证实为阳性愈伤和转基因再生芽。

表 2 不同浓度潮霉素和 AS 对地黄抗性芽分化的影响

Table 2 Effects of hygromycin and AS on resistant seedling regeneration of *R. glutinosa* in selective media at different concentration

潮霉素浓度 / (mg·L ⁻¹)	叶盘数	培养基无 AS				培养基+100 μmol·L ⁻¹ AS			
		分化芽的叶盘数	分化率 / %	阳性芽	转化率 / %	分化芽的叶盘数	分化率 / %	阳性芽	转化率 / %
0	30	10.00±2.00	33.33±6.67 aA	0	0	9.33±1.53	31.11±5.09 abA	0	0
3	30	3.00±1.00	10.00±3.33 dB	0	0	7.00±1.00	23.33±3.33 bcA	0	0
6	30	0.33±0.58	1.11±1.92 eB	0	0	6.67±0.58	22.22±1.92 cA	0	0
9	30	0.33±0.58	1.11±1.92 eB	0.33±0.58	1.11±1.92 cB	2.67±2.08	8.89±6.93 deB	1.67±1.15	5.56±3.85 bB
12	30	0	0 fB	0	0	7.33±2.08	24.44±6.93 bcA	6.33±1.53	21.11±5.09 aA

以上结果表明, 添加 100 μmol/L 的 AS 能够显著提高农杆菌侵染后的叶片诱导愈伤和分化抗性芽, 9 mg/L 为潮霉素发挥作用的临界质量浓度, 12 mg/L 为适宜于遗传转化的筛选剂质量浓度。

2.3 抗性植株的增殖、生根和移栽

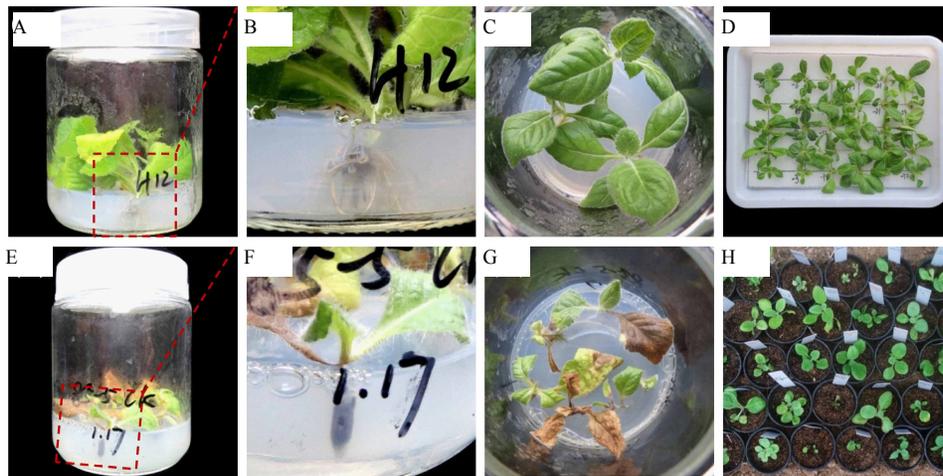
把分子检测为阳性的转化再生芽转入含 0.2 mg/L 6-BA 和 0.01 mg/L NAA 的丛生芽分化培养基中进行扩繁, 25 个转化体共获得 69 株增殖芽, 增殖系数为 2.76。

以 12 mg/L 的潮霉素为生根筛选剂, 把增殖的转化芽转入含筛选剂和 0.01 mg/L NAA 的生根培养基上, 发现转接后 7 d 多数转化地黄芽即开始生根, 转接后 15 d 所有分子检测鉴定为阳性的转化地黄丛生芽均能正常生根, 而且植株生长旺盛(图 2-A~C)。而未转基因的地黄芽转接 7 d 后没有生根, 15 d 后所有植株仍然没有生根, 且部分植株开始变黄、枯死(图 2-E~F)。结果表明, 分子检测为阳性的抗性芽的潮霉素基因均得到了表达, 进一步验证了分子检测结果的可靠性。

为了提高其成活率, 生根的转基因植株移栽前先炼苗。即把转基因苗置入含 1/4 MS 液体培养基的营养液中水培生长 10 d(图 2-D), 之后把地黄苗移栽到含蛭石-草炭(1:1)的营养基质中生长 15~20 d(图 2-H), 然后把健壮的地黄苗移栽到大田。结果 69 株转基因苗移栽成活 57 株, 成活率 82.6%。

3 讨论

在植物的遗传转化体系中, 影响转化效率的主要有外植体来源、基因型、农杆菌株、侵染时间、培养基组分、激素、抑菌抗生素、筛选抗生素、添加物和培养条件等多个因素的影响, 但激素、抑菌抗生素、筛选抗生素的种类和质量浓度, 以及是否添加 AS 等成为限制遗传转化的关键因素。Park 等^[11]最早报道获得了地黄的遗传转化植株, 筛选抗生素卡那霉素的质量浓度为 50 mg/L, 抑菌抗生素特美汀的质量浓度为 200 mg/L, 但是没有说明所用地黄的种质。系统进化研究表明, ITS 和 rps16 区域序列中国地黄与韩国地黄的序列一致, 但是应用一对 RAPD 引物(HRgF 和 HRgR)能够完全区分中国



A~C-分化抗性芽 D-转化地黄植株水培炼苗 E~G-未转化地黄芽 H-盆栽的转基因地黄苗

A—C-differentiation of resistant seedlings D-transformed seedlings of *R. glutinosa* with liquid MS medium E—G-untransformed seedlings of *R. glutinosa* H-pot-planted transgenic seedlings

图2 转基因地黄生根和移栽

Fig. 2 Rooting and transplanting of transgenic *R. glutinosa*

地黄与韩国地黄，说明二者有明显的遗传差异^[14]。刘志刚等^[15]初步探讨了影响怀地黄遗传转化的抗生素质量浓度，认为适于地黄转化的卡那霉素质量浓度以 20 mg/L 为宜，羧苄西林钠 400 mg/L 为宜，但没有进行遗传转化验证。李萌萌^[16]初步确定筛选抗生素潮霉素的质量浓度为 4 mg/L，羧苄青霉素的质量浓度为 200 mg/L，检测了 *GUS* 基因的表达效率，但未获得 *GUS* 基因稳定表达的转化体。臧亚超^[12]确定了适于转化的卡那霉素质量浓度为 75 mg/L，抑菌抗生素氨基苄青霉素（Amp）的质量浓度为 600 mg/L，获得了 6 株抗性苗，其中 5 株为阳性，且 Amp 质量浓度为 400、500 mg/L 时并不能有效抑制农杆菌的生长，虽然 600 mg/L 时抑菌效果较好，但高质量浓度的 Amp 对于地黄丛生芽的分化有强烈的抑制作用，不利于转化叶片的再生。

本实验所用的遗传转化受体材料为温 85-5。为了确定适宜的抑菌抗生素质量浓度，前期分别选用羧苄青霉素和特美汀做预实验，发现抑菌效果二者基本一致，200 mg/L 即可有效抑制农杆菌的继续生长，而且发现特美汀对于叶片愈伤分化有一定的促进作用，因此选用 200 mg/L 的特美汀进行地黄遗传转化。实验室的多个表达载体均具有潮霉素抗性基因，因此，对适宜遗传转化的潮霉素质量浓度进行了研究。结果发现潮霉素 6 mg/L 以下时，虽然也有再生芽分化，但均为假阳性；12 mg/L 时分化率仍

有 21.11%，阳性率高达 96.4%，是适宜于遗传转化的质量浓度，比李萌萌^[16]确定的潮霉素质量浓度要高。实验还发现，添加 100 μmol/L 的 AS 对于遗传转化再生芽的分化有显著地促进作用，这与李萌萌^[16]、臧亚超^[12]的研究结果一致。

本实验建立了有效的根癌农杆菌介导的怀地黄遗传转化再生体系，明确了适宜于温 85-5 遗传转化的特美汀质量浓度为 200 mg/L，潮霉素质量浓度为 12 mg/L，侵染培养基和共培养基培养基中应加入 100 μmol/L 的 AS 以提高转化效率。

参考文献

- [1] 黄璐琦, 李军德, 李哲, 等. 我国现代大中药产业链发展趋势及对策 [J]. 中国科技投资, 2010(5): 67-69.
- [2] 司南, 杨柳, 王宏洁, 等. 近红外光谱法鉴别怀地黄药材地道性的研究 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(4): 542-546.
- [3] Sun P, Song S, Zhou L, et al. Transcriptome analysis reveals putative genes involved in iridoid biosynthesis in *Rehmannia glutinosa* [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(10): 13748-13763.
- [4] Li M J, Yang Y H, Chen X J, et al. Transcriptome/Degradome-Wide identification of *R. glutinosa* miRNAs and their targets: The role of miRNA activity in the replanting disease [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68531.
- [5] 周延清, 张永华, 张喻, 等. 怀地黄 3-酮酯酰 CoA-

- 硫解酶基因的克隆, 序列特征和时空表达分析 [J]. 中草药, 2013, 44(1): 76-84.
- [6] 刘 驰, 李明杰, 王鹏飞, 等. 地黄内质网型 (ER) Ca^{2+} ATPase 基因的克隆及表达分析 [J]. 植物生理学报, 2013, 49(5): 445-451.
- [7] 王丰青, 田云鹤, 李明杰, 等. 地黄 *Aux/IAA* 家族基因 *RgIAA1* 的克隆和表达分析 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(23): 4033-4039.
- [8] 赵春丽, 李先恩, 都晓伟, 等. 地黄 microRNAs 和靶基因的生物信息学预测及验证 [J]. 中草药, 2014, 45(8): 1129-1135.
- [9] 王丰青, 田云鹤, 周 勋, 等. 地黄高效叶片离体再生系统的建立 [J]. 中国现代中药, 2013, 15(2): 122-126.
- [10] 付建喜, 范喜梅, 周春娥, 等. 发根农杆菌介导的怀地黄遗传转化研究 [J]. 河南农业科学, 2007(10): 72-76.
- [11] Park S U, Kim H H, Yu C Y, *et al.* Agrobacterium-mediated genetic transformation of Chinese foxglove, *Rehmannia glutinosa* L [J]. *Biotechnol Lett*, 2002, 24(7): 547-550.
- [12] 臧亚超. 地黄扩展蛋白基因 RgExpA1 的克隆及遗传转化体系的优化 [D]. 保定: 河北农业大学, 2012.
- [13] Sieburth L E, Meyerowitz E M. Molecular dissection of the AGAMOUS control region shows that cis elements for spatial regulation are located intragenically [J]. *Plant Cell*, 1997, 9(3): 355-365.
- [14] Kim Y S, Ryuk J A, Ko B S. Discrimination of Korean *Rehmannia glutinosa* from Chinese *Rehmannia glutinosa* using sequence-characterized amplified region marker [J]. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 2012, 55(1): 1-6.
- [15] 刘志刚, 李明军, 张振臣. 地黄叶片遗传转化再生系统的建立 [J]. 河南农业科学, 2006(11): 83-85.
- [16] 李萌萌. 地黄高频再生体系的建立及遗传转化体系的初步研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2007.