

# 农杆菌介导 CBL 基因对菊花品种‘C008’的转化

贾红梅,王碧玉,刘 迪,毛洪玉\*

(沈阳农业大学 林学院,辽宁 沈阳 110161)

**摘 要:**以菊花品种‘C008’无菌苗叶片作为外植体,在建立了菊花高效再生体系的基础上,通过农杆菌介导法将 CBL 基因导入菊花品种‘C008’中。试验共获得抗性植株 41 株,PCR 检测表明,阳性植株为 5 株,证明 CBL 基因已转化到菊花‘C008’的基因组 DNA 中,转化率为 12.2%。遗传转化过程中,预培养 2 d 后,将  $OD_{600}=0.5\sim0.6$  的农杆菌稀释 50 倍后侵染叶片 8 min,再共培养 2 d、延迟筛选 2 d,有利于获得较高的转化率。

**关键词:**菊花;CBL 基因;农杆菌介导;遗传转化

**中图分类号:**S682.11      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-7461(2017)01-0184-06

## Agrobacterium-Mediated Transformation of *Chrysanthemum morifolium* ‘C008’ With CBL Gene

JIA Hong-mei, WANG Bi-yu, LIU Di, MAO Hong-yu\*

(College of Forestry, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161, China)

**Abstract:** On the basis of a highly efficient regeneration system of chrysanthemum, the CBL gene was introduced into chrysanthemum ‘C008’ by agrobacterium mediated method based on the chrysanthemum ‘C008’ aseptic seedling leaf as explants. In the experiment, 41 strains of resistant plants were obtained. The PCR test showed that the positive plants were 5, which proved that the CBL gene had been transformed into the genome DNA of the chrysanthemum ‘C008’, and the transformation rate was 12.2%. In the process of genetic transformation, after pre-culture for 2 d, the explants were infected for 8 min with diluted  $OD_{600}=0.5-0.6$  Agrobacterium culture liquid with 50 times, and then co-cultured for 2 d, delayed screening for 2 d, which was beneficial to obtain a higher transformation rate.

**Key words:** chrysanthemum; CBL gene; agrobacterium-mediated; genetic transformation

菊花(*Chrysanthemum morifolium*)是菊科菊属,多年生宿根花卉,我国十大名花之一,在世界花卉产值中居于首位<sup>[1]</sup>。菊花因品种繁多、形态各异、色彩丰富而深受世人喜爱。1991 年, S. E. Ledger<sup>[2]</sup>首次利用农杆菌侵染叶片,成功地获得第一株转基因菊花,此后越来越多科研工作者利用基因工程技术培育菊花新品种。该技术可定向修饰菊花的某些性状<sup>[3]</sup>,在改变菊花的花色<sup>[4-5]</sup>、花型<sup>[6]</sup>、花期<sup>[7-10]</sup>、株型<sup>[11]</sup>、抗病<sup>[12-13]</sup>及抗逆性<sup>[14-18]</sup>等方面已取得了极大的成就。目前,利用农杆菌介导法已成功将 *At-*

*DREB1A*<sup>[19]</sup>、*DgLsL*<sup>[20]</sup>、*HsfA2*<sup>[21]</sup>等基因转至菊花基因组中,但受菊花基因型及转化条件的影响,菊花品种不同,转化体系也不相同。CBL(Calciurin B-like Proteins)是植物中重要的钙信号感受蛋白<sup>[22]</sup>,并与其下游的靶蛋白 CIPK(CBL-interacting protein kinase)相互作用,构成了 CBL/CIPK 信号网络系统,在植物干旱、盐、冷等逆境胁迫应答中起着重要的作用<sup>[23-26]</sup>。本试验在已建立的菊花高效再生体系的基础上,通过农杆菌介导的方法将 CBL 基因导入菊花品种‘C008’中,成功地获得了转基因植株,

收稿日期:2016-05-24 修回日期:2016-08-19

基金项目:辽宁省自然科学基金(2014027004);辽宁省教育厅科学研究计划(2015483)。

作者简介:贾红梅,女,在读硕士,研究方向:园林植物栽培与应用研究。E-mail:575658983@qq.com

\* 通信作者:毛洪玉,女,副教授,研究方向:园林植物逆境生理与分子生物学研究。E-mail:maohongyu74@163.com

并对影响菊花遗传转化的因素进行了研究,为菊花的抗性育种奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 菊花品种‘C008’无菌苗采自沈阳农业大学林学院组培实验室。

1.1.2 农杆菌及所含质粒 携带 *pCAM-BIA1301-CBL* 表达载体的农杆菌 *GV3101* 由沈阳农业大学林学院风景园林实验室保存。

### 1.2 研究方法

1.2.1 菊花叶片及根的抗生素敏感性试验 将菊花叶盘接种到潮霉素(Hyg)浓度为 0、1、3、5、8、10、20 mg·L<sup>-1</sup>的再生培养基上,每种处理 50 个叶盘,3 次重复,以不加 Hyg 的再生培养基为对照,统计叶片再生频率。再生培养基:MS+3.0 mg·L<sup>-1</sup>6-BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup>NAA。

叶片再生频率=再生芽外植体数/接种的外植体数×100%

将长至 1.5~2 cm 的菊花再生芽切下,分别接种于 Hyg 浓度为 0、1、3、5、8、10、20 mg·L<sup>-1</sup>的生根培养基中,每种处理 50 个再生芽,3 次重复,观察生根状况,3 周后统计生根率。生根培养基为:MS+0.3 mg·L<sup>-1</sup>NAA。

生根率=生根不定芽数/接种不定芽数×100% (1)

1.2.2 农杆菌的活化 将农杆菌划线在含有 50 mg·L<sup>-1</sup>卡那霉素(Kan)和 80 mg·L<sup>-1</sup>利福平(Rif)的 LB 培养基上,倒置于 28℃ 黑暗条件下培养 2 d。挑取单菌落加入含有 50 mg·L<sup>-1</sup> Kan 和 80 mg·L<sup>-1</sup> Rif 的 5 mL YEP 溶液中 28℃,200 r·min<sup>-1</sup>振荡过夜,取振荡过夜的菌液 1:100 加入 YEP 溶液中 28℃,200 r·min<sup>-1</sup>继续振荡,待 OD<sub>600</sub>=0.4~0.8 时收集菌体,4 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,菌体悬浮于 MS 液体中作为侵染液。

1.2.3 农杆菌介导菊花叶片的转化

1.2.3.1 预培养 取苗龄为 30 d 左右的无菌苗叶片,切成 0.5 cm×0.5 cm 的方形叶盘接种于再生培养基上,25℃、黑暗条件下预培养 0~3 d 后用于侵染,每种处理 50 个叶盘,重复 3 次,将菌液浓度调制 OD<sub>600</sub>=0.6,侵染时间为 10 min,共培养时间为 3 d,延迟筛选时间为 3 d,然后叶盘转至不定芽分化筛选培养基中,每 14 d 更换 1 次培养基,直至分化出抗性芽,统计抗性芽再生频率,并与未经过预培养的侵染叶片比较抗性芽再生频率。预培养培养基:MS+3.0 mg·L<sup>-1</sup>6-BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup>NAA。

抗性芽再生频率=产生抗性芽的外植体数/侵

染的外植体数×100%

1.2.3.2 农杆菌浓度、稀释倍数与侵染时间 用 OD<sub>600</sub> 值为 0.4、0.6 和 0.8,各稀释倍数为 20、30、50 的菌液侵染菊花叶片 3、5、8、10、15 min,每种处理 50 个叶盘,重复 3 次,控制其他转化条件一致,比较菌液浓度、稀释倍数及侵染时间对菊花叶片抗性芽再生频率的影响。

1.2.3.3 共培养 将侵染后的菊花叶片用滤纸吸干菌液后接种于再生培养基中,25℃、黑暗条件下共培养 1~5 d,每种处理 50 个叶盘,重复 3 次,保证其他转化条件一致的情况下,比较不同共培养时间对菊花叶片抗性芽再生频率的影响。共培养培养基:MS+3.0 mg·L<sup>-1</sup>6-BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup>NAA。

1.2.3.4 延迟筛选 将经过共培养的叶片用加有 300 mg·L<sup>-1</sup>头孢霉素(Cef)的 MS 液体中清洗 30 min,无菌水冲洗 2 次,用滤纸吸干后转接到延迟筛选培养基中,培养时间为 0~5 d,每种处理 50 个叶盘,重复 3 次,保证其他转化条件相同的情况下,比较不同延迟筛选时间菊花叶片抗性芽再生频率的影响。延迟筛选培养基:MS+3.0 mg·L<sup>-1</sup>6-BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup>NAA+150 mg·L<sup>-1</sup>Cef。

1.2.3.5 抗性植株的获得 将经过延迟筛选的叶片转移到不定芽分化筛选培养基上,每 14 d 更换 1 次培养基。待叶片分化出的小芽长至 1.5~2 cm 时切下,接种于生根筛选培养基中进行生根培养。不定芽分化筛选培养基:MS+3.0 mg·L<sup>-1</sup>6-BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup>NAA+300 mg·L<sup>-1</sup>Cef+3.0 mg·L<sup>-1</sup>Hyg;生根筛选培养基:MS+3.0 mg·L<sup>-1</sup>NAA+300 mg·L<sup>-1</sup>Cef+3.0 mg·L<sup>-1</sup>Hyg。

1.2.4 抗生素抗性植株的分子检测 采用 CTAB 法同时提取抗性植株及未转化植株叶片的总 DNA,以 DNA 为模板设计 1 对特异引物(引物 1:5'-AT-GCCTCGCATTTTTTACGCAAC-3'和引物 2:5'-CTACAAAAATCACCTCACTGTACTTATA-3')。PCR 反应程序为:1 μL 模板 DNA,2 μL 10× 缓冲液,2 μL Mg<sup>2+</sup>,Taq DNA 酶 0.5 μL,引物 1 和引物 2 均取 1 μL,去离子水补足 20 μL;扩增程序为 94℃ 预变性 5 min;94℃ 30 s,55℃ 40 s,72℃ 40 s,35 个循环;72℃ 10 min。PCR 反应结束后,在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 潮霉素浓度对菊花叶片不定芽分化及生根的影响

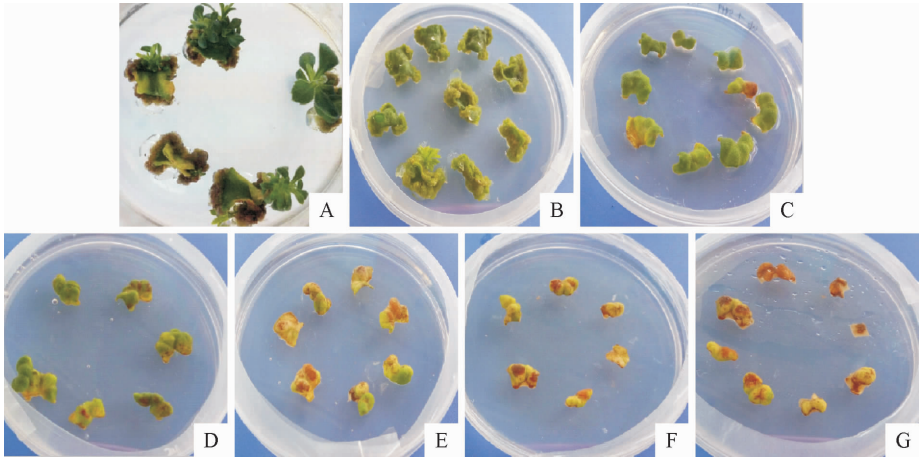
菊花品种‘C008’对 Hyg 反应十分敏感,随着 Hyg 浓度的增大叶片褐化严重,不定芽的分化及生

根都受到了严重的抑制。由表 1 和表 2 可知,当 Hyg 浓度为  $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时便对叶片不定芽和根的形成造成了影响,再生率及生根率分别为 18% 和 22%,当 Hyg 浓度为  $3.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时再生率及生根率分别降到了 6% 和 4%,基本抑制了叶片不定芽和根的形成。此浓度下的叶片在 40 d 后有极小的不定芽产生,分化出的不定芽继续培养 2 个月 后仍未见长大。当浓度  $>3.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  后,浓度越大褐化越严重,当浓度达到  $20\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,部分叶片白化死亡。此外,当 Hyg 浓度为  $3.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,植株正常生长但不生根,当 Hyg 浓度  $>3.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,植株不生长也不生根(图 1、图 2)。

表 1 菊花叶片潮霉素浓度敏感性试验

Table 1 The sensitivities of chrysanthemum leaves to Hyg

潮霉素浓度 /( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	外植体数	再生不定芽的 外植体数	再生频率 /%
0	50	50	100
1	50	9	18.00
3	50	3	6.00
5	50	0	0
8	50	0	0
10	50	0	0
20	50	0	0



A: $0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; B: $1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; C: $3\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; D: $5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; E: $8\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; F: $10\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; G: $20\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

图 1 不同浓度潮霉素对菊花叶片再生的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of Hyg on on the regeneration of chrysanthemum leaves

间过长时,农杆菌大量繁殖,污染率提高,叶片损伤及褐化严重,不利于遗传转化。由表 4 可知,当菌液浓度为  $OD_{600}=0.4$  时,无论侵染时间长短都没有阳性抗性芽产生;当菌液浓度为  $OD_{600}=0.6$  和  $OD_{600}=0.8$  时均有阳性抗性芽产生且以  $OD_{600}=0.6$ ,侵染时间为 8 min 最佳。

当菌体稀释倍数为 20 时,经共培养后可看到外植体周围有明显的菌落形成,且菌落较大,后期培养中农杆菌生长较快且难以抑制;当稀释倍数为 30 和 50 时,经共培养后则有微菌落产生(图 3)。经延迟

表 2 菊花再生不定芽生根对潮霉素敏感性试验

Table 2 The sensitivities of rooting of chrysanthemum bud regeneration to Hyg

潮霉素浓度 /( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	不定芽数	生根不定芽数	生根率 /%
0	50	50	100
1	50	11	22.0
3	50	2	4.0
5	50	0	0
8	50	0	0
10	50	0	0
20	50	0	0

2.2 预培养时间对转化效率的影响

由表 3 可知,菊花品种‘C008’无论是否经过预培养都能产生抗性芽,随着预培养时间的增加抗性芽产生率逐渐升高,2 d 时抗性芽再生频率最高,为 26%,超过 2 d 后抗性芽数量呈下降趋势。经后期培养发现,经过 2 d 预培养后的叶片能明显减轻农杆菌侵染后叶盘的褐化程度。

2.3 农杆菌浓度、稀释倍数与侵染时间对转化效率的影响

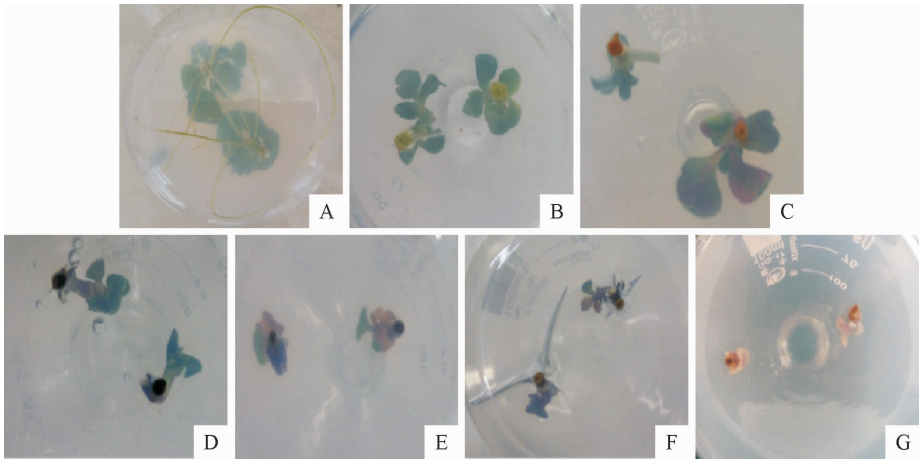
当农杆菌浓度过低,侵染时间过短时,农杆菌细胞数目不足而使转化效率降低;当浓度过高,侵染时

筛选后,稀释倍数为 50 的菊花叶片抗性芽生成率更高,因此,本试验农杆菌稀释倍数为 50 最佳。

表 3 预培养时间对转化效率的影响

Table 3 The transformation rate of different pre-culture time

预培养 时间/d	外植体数	产生抗性芽的 外植体数	抗性芽再生 频率/%
0	50	3	6.0
1	50	4	8.0
2	50	13	26.0
3	50	1	2.0



注:A:0 mg · L<sup>-1</sup>; B:1 mg · L<sup>-1</sup>; C:3 mg · L<sup>-1</sup>; D:5 mg · L<sup>-1</sup>; E:8 mg · L<sup>-1</sup>; F:10 mg · L<sup>-1</sup>; G:20 mg · L<sup>-1</sup>。

图 2 不同潮霉素浓度对菊花再生不定芽生根的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of Hyg on the rooting of regeneration of adventitious buds of chrysanthemum

表 4 不同菌液浓度和侵染时间的转化效率

Table 4 The transformation rate of different concentrations of agrobacterium and infected time

菌液浓度 OD <sub>600</sub>	侵染时间 /min	抗性芽数	生根的 抗性芽数	PCR 阳性 抗性芽数
0.4	5	1	0	0
0.4	8	4	1	0
0.4	10	2	0	0
0.6	5	5	2	1
0.6	8	8	6	4
0.6	10	6	2	2
0.8	5	1	0	1
0.8	8	7	3	0
0.8	10	4	2	0
总计		38	16	8

2.4 共培养时间对转化效率的影响

农杆菌侵染叶片后不能立即进行转化,需经过一段时间后才能进行转移,但时间不宜过长,否则容易造成农杆菌的过度生长使细胞受到毒害。由表 5 可知,经共培养 2 d 的菊花叶片抗性芽再生频率为 20%,高于经过 1、3、4、5 d 共培养叶片抗性芽再生频率,随着共培养时间的增加,抗性芽再生率降低且农杆菌在后期生长中过度繁殖,给抑菌带来困难。

表 5 共培养时间对转化效率的影响

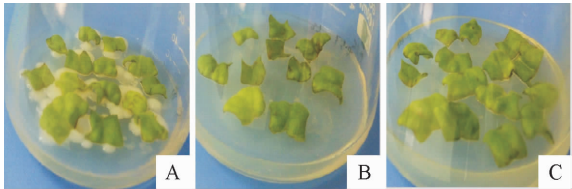
Table 5 The transformation rate of different co-culture time

共培养 时间/d	外植体数	产生抗性芽的 外植体数	抗性芽再生 频率/%
1	50	4	8.0
2	50	10	20.0
3	50	5	10.0
4	50	3	6.0
5	50	0	0

2.5 延迟筛选时间对转化效率的影响

潮霉素加入的早晚也能影响转化效率,从表 6 中可以看出共培养结束后,经过一段时间的延迟筛

选再把菊花叶片转接到筛选培养基中,有利于抗性芽的获得,未经过延迟筛选的叶盘经过一段时间的培养后叶片变黄甚至褐化,没有抗性芽的产生。其中,以延迟筛选 2 d 效果最佳,抗性芽再生频率为 16%,超过 2 d 后抗性芽的产生率逐渐降低。



注:A:20 倍;B:30 倍;C:50 倍。

图 3 不同稀释倍数对菊花叶片的影响

Fig. 3 Effects of different dilution times on the leaves of chrysanthemum

表 6 延迟筛选时间对转化效率的影响

Table 6 The transformation rate of different delayed culture time

延迟筛选 时间/d	外植体数	产生抗性芽的 外植体数	抗性芽再生 频率/%
0	50	0	0
1	50	2	4
2	50	8	16
3	50	4	8
4	50	1	2
5	50	0	0

2.6 抗性植株的获得

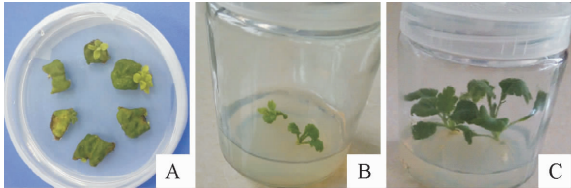
筛选培养过程中,由于 Hyg 的作用,使抗性苗生长缓慢,当抗性苗转入加有 Hyg 的生根培养基中,部分小苗白化死亡,只有少数转化成功的抗性苗生根(图 4),部分假阳性植株被淘汰,本试验共获得 41 株抗性植株。

2.7 抗性植株的分子检测

同时提取转基因植株及未转基因植株的 DNA 进行 PCR 检测,结果(图 5)显示转基因植株可在近



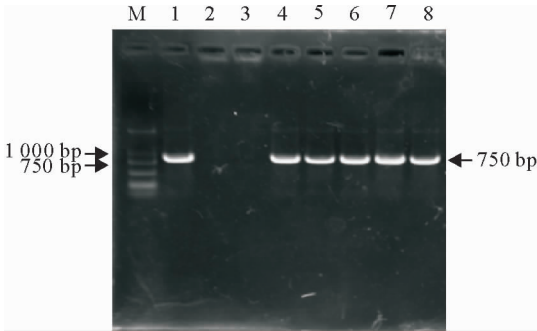
750 bp 处扩增出 1 条清晰的条带,该条带与 *CBL* 基因引物所界定的 DNA 片段大致相同,而未转基因的植株则没有。证明外源基因 *CBL* 已转入菊花品种‘C008’DNA 中,其中 PCR 阳性植株为 5 株。



注:A、B:抗性芽;C:抗性苗。

图 4 转基因植株筛选流程

Fig. 4 Screening of transgenic plants



注:M;DNA marker;1:阳性对照;2:阴性对照;3:未转化植株;4~8:转化植株。

图 5 PCR 检测结果

Fig. 5 Results of PCR analysis

### 3 结论与讨论

在菊花的遗传转化中最大的难题是转化效率低,转化效率低的原因受多种因素影响<sup>[27]</sup>。一般认为预培养有利于提高转化的成功率<sup>[28-30]</sup>,但本试验中预培养时间过长会造成菊花叶片切割处褐化,影响转化的成功率。元帅<sup>[31]</sup>等试验结果表明,不经过预培养直接进行农杆菌侵染,相较经预培养后再进行侵染有更高的转化率。另外,农杆菌的浓度及侵染时间对转化效率很重要,当农杆菌浓度低、侵染时间较短时,虽然叶片保持绿色且没有褐化,但也没有抗性芽产生的现象;相反浓度高、时间短则会造成农杆菌大量生长且叶片褐化严重,不利于产生抗性芽,但受基因型影响导致浓度与时间有一定的差异<sup>[32-33]</sup>;此外,稀释倍数对于转化的成功率也有影响,本试验中分别对稀释倍数为 20、30 和 50 进行比较研究,发现稀释倍数为 50 时更有利于提高菊花品种‘C008’遗传转化的成功率。共培养在转化过程中起着非常重要的作用,因为农杆菌的附着、T-DNA 的转移及整合都在共培养阶段进行<sup>[34]</sup>。许志茹<sup>[35]</sup>等在进行菊花的遗传转化时,将共培养设置 4

个不同时间段,结果证明共培养 48 h 最为合适,且共培养时间也存在着品种差异,何森<sup>[36]</sup>等研究发现,共培养 3 d 时转化效率最高。延迟筛选可让转化细胞分裂几个细胞周期,同时经过一段时间的延迟筛选再加入 Hyg 可增大试验的成功率。本试验表明,未经过延迟筛选直接进行筛选培养的菊花叶片黄化严重,愈伤较少,增加延迟筛选时间可以增加抗性愈伤组织生成率,但时间过长反而减少抗性芽生成率。本研究还发现,菊花品种‘C008’对 Hyg 十分敏感,较低浓度的 Hyg 便可强烈抑制不定芽的分化以及抗性芽的生根。因此,本试验通过筛选出最佳的临界值用于遗传转化,提高了转化的成功率,最终获得了 41 株 Hyg 抗性植株,经 PCR 扩增共有 5 株呈阳性,转化率为 12.2%。整个遗传转化过程操作简单,并且周期短,从侵染到抗性植株的获得只需 2~3 个月的时间。

目前,*CBL* 基因在梨、谷子、玉米等植物中的过量表达都使转基因植株的抗逆性得到了提高。本试验为进一步研究 *CBL* 基因提高菊花品种‘C008’的抗逆性奠定了基础。

### 参考文献:

[1] 陈俊愉. 中国花卉品种分类学[M]. 北京:中国林业出版社, 2001:218-219.

[2] LEDGER S E,DEROLES S C,GIVEN N K. Regeneration and agrobacterium-mediated transformation of *Chrysanthemum* [J]. Plant Cell Report,1991,10:195-199.

[3] 肖政,范崇辉,金万梅. 生长调节物质对菊花‘小金黄’叶片再生不定芽的影响[J]. 西北林学院学报,2009,24(6):50-53. XIAO Z,FAN C H,JIN W M. Effects of plant growth regulators on adventitious shoot regeneration of *Dendranthema morifolium* cv. xiaojinhuang leaf discs[J]. Journal of Northwest Forestry University,2009,24(6):50-53. (in Chinese)

[4] 赵夏云,鲜登宇,宋明,等. MIKC 型 MADS-box 蛋白对开花调控作用研究进展[J]. 生物技术通报,2014,7(2):8-15. ZHAO X Y,XIAN D Y,SONG M,et al. Research progress of MIKC-type MADS-box protein regulation on flowering [J]. Biotechnology Bulletin,2014,7(2):8-15. (in Chinese)

[5] 许志茹,陈智华,姜艳东,等. 露地菊离体再生体系建立及 BrD-FR 基因遗传转化[J]. 园艺学报,2013,40(8):1517-1526.

[6] AIDA R,KOMANO M,SAITO M,et al. *Chrysanthemum* flower shape modification by suppression of *Chrysanthemum*-AGAMOUS gene[J]. Plant Biotechnol,2008,25(1):55-59.

[7] ODA A,NARUMI T,LI T,et al. *CsFTL3*, a *Chrysanthemum* FLOWERING LOCUS *T*-like gene, is a key regulator of photoperiodic flowering in chrysanthemums[J]. Journal of Experimental Botany,2012,63 (3):1461-1477.

[8] SHULGA O A,MITIOUCHKINA T Y,SHCHENNIKOVA A V,et al. Overexpression of *AP1*-like genes from *Asteraceae* induces early-flowering in transgenic *Chrysanthemum* plants

- [J]. In Vitro Cell. Dev. Biology-Plant, 2011, 47 (5): 553-560.
- [9] 姜丹, 梁建丽, 陈晓丽, 等. 拟南芥花期基因 FT 转化切花菊‘神马’[J]. 园艺学报, 2010, 37(3): 441-448.
- JIANG D, LIANG J L, CHEN X L, *et al.* Transformation of arabidopsis flowering gene *FT* to from cut *Chrysanthemum* ‘Jinba’ by *Agrobacterium mediate* [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2010, 37(3): 441-448. (in Chinese)
- [10] MORITA S, MUTAKOSHI Y, HOJO A, *et al.* Early flowering and increased expression of a *FLOWERING LOCUS T-like* gene in *Chrysanthemum* transformed with a mutated ethylene receptor gene mDG-ERS1 (etr1-4) [J]. J. Plant Biol. , 2012, 55: 398-405.
- [11] ZHENG Z L, YANG Z B, JANG J C, *et al.* Modification of plant architecture in *Chrysanthemum* by ectopic expression of the tobacco phytochrome *B1* Gene [J]. J. Amer. Soc. Hort. Sci. , 2001, 126(1): 19-26.
- [12] TAKATSU Y, NISHIZAWA Y, HIBI T, *et al.* Transgenic *Chrysanthemum* (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) expressing a rice chitinase gene shows enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*) [J]. Scientia Horticulturae, 1999, 82(2): 113-123.
- [13] KUMAR S, RAJ S K, SHARMA A K, *et al.* Genetic transformation and development of Cucumber mosaic virus resistant transgenic plants of *Chrysanthemum morifolium* cv. Kundan [J]. Scientia Horticulturae, 2012, 134: 40-45.
- [14] 毛洪玉, 周杨, 刘迪, 等. 地被菊‘中国红’再生及遗传转化体系的建立[J]. 沈阳农业大学学报, 2015, 46(6): 672-677.
- [15] 魏倩, 李超, 杨英杰, 等. ‘神马’菊花 DREB1A 基因的分离及同源遗传转化[J]. 植物生理学报, 2011, 47 (2): 153-159.
- WEI Q, LI C, YANG Y J, *et al.* Isolation and homologous genetic transformation of *DREB1A* in *Chrysanthemum* cv. ‘Jinba’ [J]. Plant Physiology Journal, 2011, 47 (2): 153-159. (in Chinese)
- [16] 洪波, 张常青, 李邱华, 等. 根癌农杆菌介导的转录因子 *DREB1A* 基因在地被菊花中的遗传转化[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(3): 304-309.
- [17] 张晓娇, 史春风, 李春水, 等. 转 *AtDREB1A* 基因地被菊杂交后代优株耐寒性分析[J]. 园艺学报, 2011, 38(9): 1717-1726.
- [18] 王萃铂, 张璦, 张晓雪, 等. 菊花转录因子 *CmMYB59* 的克隆与表达特性分析[J]. 南京农业大学学报, 2016, 39(1): 63-69.
- WANG C B, ZHANG Z, ZHANG X X, *et al.* Molecular cloning and expression of *CmMYB59* from *Chrysanthemum morifolium* [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2016, 39(1): 63-69. (in Chinese)
- [19] 杨英杰, 李春水, 张晓娇, 等. 转 *AtDREB1A* 基因菊花杂交后代优株水分胁迫耐性分析[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21 (2): 148-157.
- [20] 石晓, 张冬菊, 卫晶晶, 等. 菊花 *DgLsL* 基因 RNAi 表达载体的构建及遗传转化[J]. 分子植物育种, 2012, 10(4): 411-417.
- SHI X, ZHANG D J, WEI J J, *et al.* Construction of RNAi expression vector of *DgLsL* gene and genetic transformation of *Chrysanthemum* ‘Jinba’ [J]. Molecular Plant Breeding, 2012, 10(4): 411-417. (in Chinese)
- [21] 赵伶俐, 石少川, 孙佳琦, 等. 拟南芥 *HsfA2* 基因转化地被菊的研究[J]. 北京林业大学学报, 2011, 33(5): 97-102.
- ZHAO L L, SHI S C, SUN J Q, *et al.* Transformation of ground-cover *Chrysanthemum* with *HsfA2* gene isolated from *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2011, 33(5): 97-102. (in Chinese)
- [22] BATISTIĆ O, KUDLA J. Plant calcineurin B-like proteins and their interacting protein kinases [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2009, 1793: 985-992.
- [23] HALFTER U, ISHITANI M, ZHU J K. The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3 [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. , 2000, 97(7): 3735-3740.
- [24] 董凤丽, 刘杰, 黄河, 等. 甘菊 *CBL* 基因的克隆与表达分析[J]. 草业科学, 2014, 31(7): 1283-1289.
- [25] 许园园, 蔺经, 李晓刚, 等. 梨 *CBL* 基因家族全基因组序列的鉴定及非生物胁迫下的表达分析[J]. 中国农业科学, 2015, 48 (4): 735-747.
- [26] 赵晋锋, 余爱丽, 田岗, 等. 谷子 *CBL* 基因鉴定及其在干旱、高盐胁迫下的表达分析[J]. 作物学报, 2013, 39(2): 360-367.
- ZHAO J F, YU A L, TIAN G, *et al.* Identification of *CBL* genes from foxtail Millet (*Setaria italica* (L.) Beauv.) and its expression under drought and salt stresses [J]. Acta Agonomica Sinica, 2013, 39(2): 360-367. (in Chinese)
- [27] 张志玲, 徐品三, 刘纪文, 等. 农杆菌介导菊花遗传转化效率的研究进展[J]. 中国农学通报, 2011, 27(22): 99-102.
- ZHANG Z L, XU P S, LIU J W, *et al.* Research progress in genetic transformation efficiency of *Chrysanthemum* mediated with *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(22): 99-102. (in Chinese)
- [28] 肖政, 范崇辉, 金万梅. 根癌农杆菌介导转录因子 *CBF1* 基因对菊花的转化[J]. 西北农业学报, 2009, 18(6): 262-267.
- [29] 崔新利, 陈发棣, 陈素梅. 地被菊雨花勋章再生和遗传转化体系的建立[J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(2): 40-46.
- [30] 冯连荣, 宋立志, 张妍, 等. 根癌农杆菌介导杨树遗传转化的影响因素[J]. 西北林学院学报, 2015, 30(3): 120-126.
- FENG L R, SONG L Z, ZHANG Y, *et al.* Influence factors on *Agrobacterium* mediated transformation efficiency of *Populus* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2015, 30(3): 120-126. (in Chinese)
- [31] 亓帅, 付建新, 王翊, 等. 甘菊下胚轴遗传转化体系的建立[J]. 分子植物育种, 2014, 12(2): 356-362.
- [32] 姜宁宁, 付建新, 戴思兰. 中国传统菊花品种‘小林静’再生及转化体系建立[J]. 生物技术通报, 2012, 4(6): 87-92.
- [33] 赵伶俐, 石少川, 张启翔, 等. 农杆菌介导的地被菊遗传转化体系的优化[J]. 分子植物育种, 2011, 9(1): 74-80.
- [34] 刘彩萍, 曾炳山, 裴珍飞, 等. 优化农杆菌介导基因转化效率因子分析[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(3): 1141-1143.
- [35] 许志茹, 马静, 侯杰, 等. 4 种地被菊再生及遗传转化条件的比较[J]. 中国农学通报, 2014, 30(7): 130-137.
- [36] 何淼, 高文杰, 高耀辉, 等. 农杆菌介导的神农香菊遗传转化体系的建立[J]. 中药材, 2014, 37(8): 1327-1331.