

研究报告 A Letter

三种抗生素对落叶松胚性细胞系生长的影响

朱彩虹[✉], 栗婷[✉], 韩素英[✉], 齐力旺[✉]

中国林科院林业研究所细胞生物学实验室, 北京, 100091

✉ 通讯作者: lwqi@caf.ac.cn; ✉ 作者

分子植物育种, 2010年, 第8卷, 第15篇 DOI: 10.5376/mpb.cn.2010.08.0015

收稿日期: 2010年10月30日

接受日期: 2010年11月30日

发表日期: 2010年12月27日

这是一篇采用《Creative Commons Attribution License》进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

建议的最佳引用格式:

朱彩虹等, 2010, 三种抗生素对落叶松胚性细胞系生长的影响, 分子植物育种 Vol.8 No.15 (DOI: 10.5376/mpb.cn.2010.08.0015)

摘要 以落叶松胚性细胞系 638(日本落叶松)、109(长白落叶松)、113(日本落叶松)为供试材料, 将各细胞系胚性组织接种至添加有 0-35mg/L 的卡那霉素(Km)、300-500mg/L 头孢霉素(Cef)或 300-500mg/L 羧苄青霉素(Cb)的继代培养基上培养, 观察胚性组织生长状态以及增殖情况, 研究 3 种抗生素对各胚性细胞系生长的影响。结果表明: 在添加抗生素的继代培养基上培养 30d 后, 胚性组织生长情况基本稳定。在相同浓度的 Km 作用下, 落叶松胚性细胞系与其他植物的胚性细胞系反应相比更加敏感。3 种胚性细胞系对 Km 的敏感性不同: 细胞系 113 对 Km 作用反应最敏感, 109 次之, 638 相对来说不太敏感, 耐受临界浓度值分别为 15 mg/L、20 mg/L 和 25 mg/L。Cef 和 Cb 在 300-500mg/L 的浓度范围内, 对细胞系 109 的生长作用不同: Cef 具有促进作用, 而 Cb 则具有毒害作用, 因此落叶松遗传转化中, Cef 适合于抑菌处理。本文的研究结果明确了供试的 3 种抗生素对落叶松胚性细胞系生长作用的概况, 为落叶松遗传转化中抗生素的使用提供了依据。

关键词 胚性组织; 卡那霉素; 羧苄青霉素; 头孢霉素; 遗传转化

Effects of 3 Antibiotics on Growth of Embryogenic Tissues of Larch

Zhu Caihong[✉], Li Ting[✉], Han Suying[✉], Qi Liwang[✉]

Laboratory of Cell Biology, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing, 100091

✉ Corresponding author, lwqi@caf.ac.cn; ✉ Authors

Abstract To identify the optimal antibiotics and the concentration used in the transformation of larch based on somatic embryogenesis, we studied the effects of Kanamycin (Km) at various concentrations on embryogenic tissues of larch cell lines 638, 109 and 113, and effects of Cefotaxime (Cef) and Carbenicillin (Cb) on cell line 109 as well in this paper. The embryogenic tissues of the three larch cell lines were subcultured on proliferation media supplemented with Km (0-35mg/L), Cef (300-500mg/L) or Cb (300-500mg/L). According to the appearance of embryogenic tissues growth after subcultured for 30d, we found that: The embryogenic tissues of larch were more sensitive to km than that of other species. And the sensitivities of 3 cell lines to Km were different. Cell line 113 appeared to be most easily inhabited at a lower concentration of Km than the others. The critical selection concentrations for cell lines 638, 109 and 113 were 25 mg/L, 20 mg/L, 15mg/L respectively. At the concentration of 300-500mg/L, Cef showed a positive impact on the growth and proliferation of cell line 109 while Cb showed a negative impact. So it is suggested that Cef be used to eliminate bacteria during transformation of larch using emryogenic tissues of cell line 109.

Keywords Embryogenic tissue, Kanamycin, Cefotaxime, Carbenicillin, Genetic transformation

研究背景

落叶松(*Larix ssp.*)为松科(Pinaceae)落叶松亚科(Laricoideae)落叶松属(*Larix Mill*)针叶用材造林树种, 可以作为多种工业用材, 分布广泛, 并以早期速生而著称, 是北半球温带与寒温带地区重要的经济和生态树种。目前落叶松以传统育种为主, 但由于其生长周期长, 具有高度杂合性, 遗传操作难度大, 育种周期长, 传统育种技术远远不能满足生产的需

求。建立高效稳定的落叶松遗传转化体系, 对其品质改良, 加速遗传育种进程具有十分重要的意义, 也是研究外源基因在落叶松体内表达调控及功能的重要前提。

利用抗生素筛选转化体和抑制细菌生长是遗传转化工作中的重要内容。在筛选阶段, 选择压偏大不利于转化体的生长, 从而导致转化率偏低甚至转

化失败;选择压偏小,将导致大量的假阳性转化体产生,给以后的转化体筛选以及分子检测工作带来不便。农杆菌介导的遗传转化中,受体材料与农杆菌共培养后,农杆菌过度生长造成的污染将导致遗传转化失败,因此需要在培养基中添加合适的抗生素抑制农杆菌的继续生长,从而避免细菌污染。研究表明,植物不同基因型对抗生素敏感反应不同(范正琪等,2005),同种植物材料对不同的抗生素反应也存在差异(康薇等,2008;郑树松等,2002)。因此对受体材料对抗生素的敏感性进行研究以确定遗传转化中合适的抗生素种类及使用浓度,从而降低筛选难度,避免细菌污染,同时不影响转化体的正常生长,是进行遗传转化并提高转化效率的保障。遗传转化中使用的抗生素按照用途分主要有筛选抗生素和抑菌抗生素两类。卡那霉素(Kanamycin, Km)属于氨基葡萄糖苷类抗生素,由于Km对细胞具有强烈的毒害作用,致使大量的非抗性受体材料经选择培养后便慢慢死亡,因此Km经常被用作植物遗传转化中的筛选抗生素。头孢霉素(Cefotaxime, Cef)和羧苄青霉素(Carbenicillin, Cb)等常用作植物遗传转化中的抑菌抗生素。大量遗传转化研究表明,300-500 mg的抑菌抗生素能够达到很好的抑菌效果(Cerda等,2002; Hiei等,2006; Nigroa等,2008)。

植物体细胞胚胎是由胚性细胞发育而来,具有很强的接受外源DNA的能力,体细胞胚多是单细胞起源,转化获得的转基因嵌合体较少,是理想的基因转化感受态细胞(陈英等,2006)。在针叶树的遗传转化研究中,用做转化的受体材料主要有胚性细胞、体细胞胚、下胚轴、原生质体、种子、合子胚、茎、花粉等,但是转化成功的报道中以胚性细胞为受体材料居多,例如以胚性细胞为受体材料对辐射松(*Pinus radiata*)、火炬松(*Pinus taeda*)、挪威云杉(*Picea abies*)、黑云杉(*Picea mariana*)进行遗传转化已经获得了稳定表达的转基因植株(陈少瑜等,2006)。因此高效的体胚再生系统是比较理想的遗传转化受体系统。目前本课题组已经建立了稳定高效的落叶松体细胞胚胎发生的体系(齐力旺,2000),是落叶松遗传转化的优良受体系统,关于落叶松遗传转化的研究可以开展。然而抗生素对落叶松细胞系生长影响作用尚不清楚,相关的研究至今为止鲜有报道。

本文研究了Km、Cef、Cb对落叶松胚性细胞系增殖与恢复生长的影响,目的在于确定落叶松胚性细胞系遗传转化研究中合理的抗生素使用方案,为建立基于落叶松体细胞胚胎发生技术的高效遗传转化体系奠定基础。

1 结果与分析

1.1 Km处理下细胞系638的生长

胚性组织于含有不同浓度Km的增殖培养基培养30 d后,生长情况趋于稳定。经观察,组织对Km的反应比较敏感。随着Km浓度的增加,接种组织产生新生细胞数量逐渐减少,生长状态也越来越差(图1)。当Km浓度为15 mg/L时,组织生长开始受到明显的抑制,呈现褐色,表面仅有少数的存活细胞;当浓度为20 mg/L时,组织褐化现象严重并呈水渍状,表面只有零星细胞存活。随着浓度的增大(≥ 25 mg/L),组织呈严重水渍状,完全失去再生能力且逐渐死亡。经过对组织增殖率的统计得知,随着Km浓度的增大,组织增殖率逐渐下降;用LSD法对组织增殖率进行多重比较结果表明(见表1),胚性组织在Km的作用下增殖率与对照存在显著性差异,Km浓度 ≥ 25 mg/L的处理间无显著差异。结合Km作用下组织生长状态及组织增殖率分析,Km浓度为25 mg/L时细胞系638耐受性已经达到临界程度。

1.2 Km处理下细胞系109的生长

统计结果表明,随着Km浓度的增大,细胞系109组织增殖率逐渐降低。对不同浓度Km处理下胚性组织的增殖率进行LSD法多重比较(见表1)得出,各处理与对照存在显著性差异,较高浓度(15-25 mg/L)的各处理差异不显著。通过观察各处理下胚性组织生长状态可知,当Km浓度为15 mg/L时,组织已经开始受到严重的伤害;浓度 ≥ 20 mg/L时,生长完全被抑制,且全部死亡。由此看来,细胞系109对Km耐受性临界浓度为20 mg/L。

1.3 Km处理下细胞系113的生长

细胞系113对Km的反应与另外两个细胞系相比更加敏感。经Km处理后,该细胞系组织增殖率明显低于不经处理的组织。LSD法多重比较结果表明(表1):胚性组织在Km的作用下增殖率与对照存在显著性差异;不同浓度Km作用下,胚性组织的增殖

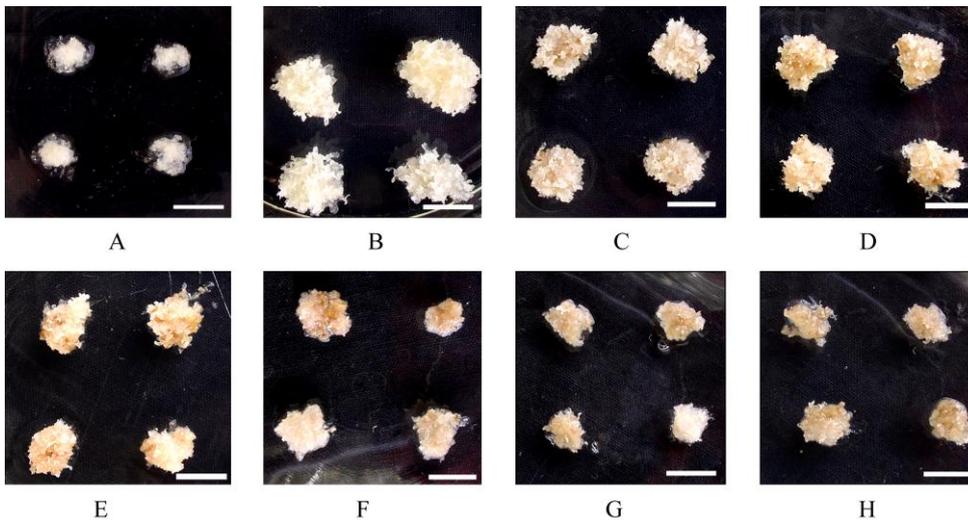


图1 不同浓度Km作用下, 胚性细胞系638的生长状态

注: A: 细胞系处理前的状态; B-H: 分别表示细胞系在添加不同浓度Km的继代培养基上培养30 d后的生长状态, 其中添加Km的浓度分别为0 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L, 30 mg/L, 35 mg/L (标尺为1.0 cm)

Figure 1 Effects of Km at different concentrations on proliferation of cell line 638

Note: A: The tissues before treatment; B-H: The tissues on proliferation medium supplemented with Km at different concentrations. The concentrations of Km are 0 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L, 30 mg/L, 35 mg/L, respectively(The bar is 1.0 cm)

表1 不同浓度 Km 对 3 种细胞系组织增殖率的影响(LSD 法)
 Table 1 LSD multi-comparisons of effect of Km on tissues proliferation

Km 浓度 (mg/L)	组织平均增殖率(%)		
	Mean ratio of tissues proliferation (%)		
Concentration of Km (mg/L)	细胞系 638 Cell line 638	细胞系 109 Cell line 109	细胞系 113 Cell line 113
0	503.41a	575.96a	326.58a
10	201.02b	388.82b	76.20b
15	175.92b	230.19c	61.97bc
20	109.54c	165.11cd	59.71bc
25	91.59c	147.24cd	59.00bc
30	85.03c	142.80cd	44.00bc
35	69.60c	137.60d	33.25c

注: 显著差异水平为0.05

Note: The significance is 0.05

率无显著差异。通过观察发现, 在浓度为10 mg/L的Km作用下, 胚性组织几乎全部死亡。当浓度 ≥ 15 mg/L时, 胚性组织完全不具有耐受能力而全部死亡。因此细胞系113耐受性临界浓度值15 mg/L。

1.4 Cef和Cb对落叶松细胞系生长的影响

继代培养基中抗生素浓度为300–500 mg/L时, 胚性细胞系109在2种抗生素作用下的生长状态(图2)

及组织增殖率(图3)表现不同。在Cef的作用下, 胚性组织呈白色透明状, 生长旺盛, 增殖率高于对照, 且随着Cef浓度的增加呈平缓的上升趋势。Cb对胚性组织具有明显的毒害作用: 浓度为300 mg/L时, 胚性组织呈现水渍状, 部分死亡; 随着浓度的增加, 组织死亡程度加重, 增殖率逐渐下降。由此可见, Cef和Cb对细胞系109的生长影响不同: Cef起促进作用, 而Cb则具有抑制作用。因此, 为避免转化组织生长受到抑制, 在以细胞系109为受体材料的遗传转化中, 选用Cef用于抑菌处理比较合理。

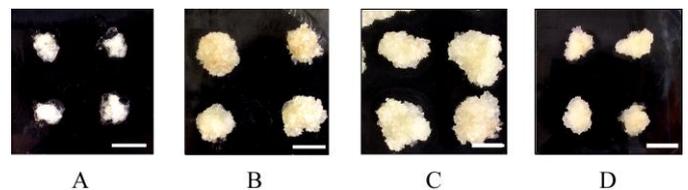


图2 Cef和Cb作用下, 细胞系109生长状态

注: A: 细胞系处理前的状态; B-D: 胚性细胞系添加Cef或Cb的继代培养基上培养30 d后生长状态, 继代培养基中抗生素种类及浓度分别为 B: 不添加任何抗生素; C: 300 mg/L Cef; D: 300 mg/L Cb (标尺为1.0 cm)

Figure 2 Effects of Cef and Cb on proliferation of cell line 109
 Note: A: The tissues before treatment; B-D: The concentrations of Cef or Cb are as following; B: without antibiotic; C: 300 mg/L Cef; D: 300 mg/L Cb (The bar is 1.0 cm)

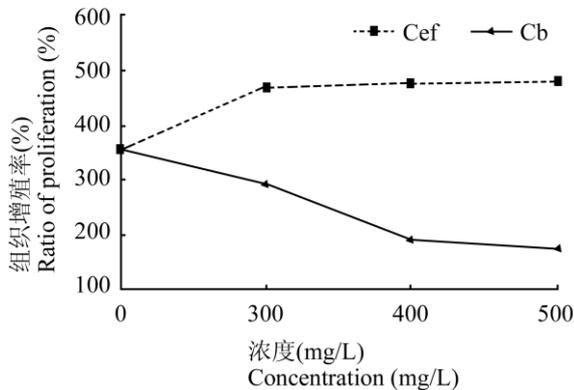


图3 Cef和Cb对细胞系109增殖生长的影响
 Figure 3 Effects of Cef and Cb on proliferation of cell line 109

2 讨论

2.1 落叶松胚性细胞系对Km的敏感性反应

落叶松胚性细胞系对Km反应比较敏感。在较低浓度(10 mg/L)的Km作用下,各细胞系生长不良,当培养基中Km浓度 ≥ 25 mg/L时,胚性组织全部死亡。Km的作用下各细胞系的组织增殖率明显低于对照,且与对照存在显著的差异。

3种细胞系对Km的敏感性反应不同。细胞系113对Km作用反应最敏感,109次之,638相对来说不太敏感,对Km的耐受临界浓度分别为15 mg/L、20 mg/L、25 mg/L。在其他研究中也表明,不同基因型的外植体对Km敏感性存在差异。如范正琪等(2005)对不同浓度Km作用下2种油茶愈伤组织敏感性反应的研究表明,浙江红山茶对Km的敏感性高于大花红花油茶。Km对浙江红山茶的致死浓度为50 mg/L,而对大花红花油茶愈伤组织的致死浓度为60 mg/L。

与其他植物的胚性细胞系相比,落叶松胚性细胞系对Km反应更加敏感。通过以上分析,3种落叶松细胞系对Km的耐受临界浓度在10-25 mg/L范围内,低于其他植物胚性细胞系对Km的耐受临界浓度。如黄天带等(2008)研究Km对巴西橡胶树花药愈伤组织生长与分化的影响,得出Km为50 mg/L时完全抑制组织的生长,但不致死。郑树松等(2002)的相关研究表明,Km对棉花愈伤组织的生长具有抑制作用,浓度大于50 mg/L时,愈伤组织增长量变化不再明显。胡桂兵等(2001)用不同浓度的Km处理台

湾青枣茎段愈伤组织生长,通过实验发现即使是用含50 mg/L Km的培养基对胚性组织进行继代培养,也无法将外植体全部杀死。由此看来,落叶松胚性细胞系相对于其他植物来说,对Km的反应比较敏感,这可能与针叶树自身生物特性有关。

另外,值得指出的是在遗传转化中,转化体由于已经受到伤害,在耐受临界浓度的Km的作用下很难恢复生长从而导致转化率降低,因此筛选培养基中Km的浓度应稍低于细胞系的Km耐受临界值。

2.2 不同抑菌抗生素对细胞系生长的作用

本文关于Cef和Cb对落叶松细胞系生长的影响的研究表明,2种抗生素对细胞系生长作用不同,Cef促进胚性细胞系109的生长,而Cb则抑制其生长,因此对于胚性细胞系109为受体的遗传转化研究,Cef是比较合适的抑菌抗生素。其他关于Cef和Cb对植物材料生长影响的研究中有不同的结果。如康薇等(2008)研究发现Cef对刺槐离体培养的外植体毒性比Cb大,Cb只在高浓度(500 mg/L)才对不定芽的分化有抑制作用。郑树松等(2002)研究发现Cef和Cb对棉花下胚轴切段诱导的愈伤组织生长没有明显的影响。因此,抑菌抗生素对植物材料生长的影响作用因植物类型不同而存在差异。

通过本研究,明确了不同抗生素对部分落叶松胚性细胞系生长的影响,给落叶松遗传转化研究中筛选抗生素及抑菌抗生素和其浓度的使用提供了参考,为遗传转化工作的顺利进行奠定了基础。

3 材料与方法

3.1 材料

采用生长优良的落叶松胚性细胞系638(日本落叶松, *Larix leptolepis*)、109(长白落叶松, *L. olgensis*)、113(日本落叶松, *L. leptolepis*)作为供试材料。3种胚性细胞系均为从辽宁省大孤家落叶松种子园采集的材料利用齐力旺(2000)关于华北落叶松体细胞胚胎发生的技术经过诱导和多次继代培养获得的胚性组织。

3.2 培养基

诱导及继代基本培养基为S(Ewald et al., 1996);诱导培养基为S+VB₁ 0.5 mg/L+BA 0.4 mg/L+2,4-D

1.1 mg/L+KT 0.4 mg/L, 继代培养基为S+B(HBO₃由S的3.1 mg/L增加至7.5 mg/L)+VB₁0.5 mg/L+BA 0.4 mg/L+2,4-D 0.4 mg/L; 另外两种培养基中再添加谷氨酰胺450 mg/L, 酸水解酪蛋白500 mg/L, 肌醇1 g/L, 蔗糖30 g/L, 琼脂(Sigma[#])3g/L, pH5.8。

3.3 试验方法

本研究中筛选抗生素为Km, 试验对象为胚性细胞系638、109、113。将各细胞系胚性组织均接种于添加Km的继代培养基上进行培养。培养基中Km浓度分别为10 mg/L、15 mg/L、20 mg/L、25 mg/L、30 mg/L、35 mg/L, 以不添加抗生素为对照, 共7个处理。各细胞系每个处理设置5个重复(即分别接种5个培养皿), 每个重复接种约1.0 g胚性组织。

抑菌抗生素为Cef和Cb, 试验对象为胚性细胞系109。继代培养基中添加Cef或Cb 300、400、500 mg/L, 以不添加抗生素为对照, 共7个处理。其他试验方法同上。

Km和Cb均购于北京欣经科生物技术有限公司, Km为Merck分装, Cb为国产分装。Cef购于北京鼎国昌盛生物技术有限公司国产分装。Km经无菌水溶解配制50 mg/ml的母液, 过滤灭菌后于-20℃保存。Cef和Cb瓶装粉末4℃保存。培养基高压灭菌后冷却至约60℃时添加所需抗生素备用。

3.4 试验统计分析

30 d后观察记录胚性组织状态及再生情况, 统计处理前后接种组织重量并计算胚性组织增殖率(以下称组织增殖率, 计算方法见下面公式), 数据使用数理统计软件SPSS 16.0进行统计分析。

组织增殖率(%)=(处理后组织重量-接种重量)/接种重量×100

作者贡献

朱彩虹、栗婷是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 朱彩虹完成结果分析, 论文初稿的写作; 韩素英指导实验研究的实施; 齐力旺是项目的负责人, 指导实验设计, 结果分析, 论文写作与修改。全体作者均已阅读并同意论文最终文本。

致谢

本研究由国家“973”项目(2009CB119100), 国家自然

科学基金重点项目(30830086), 国家“863”项目(2006AA10-0109, 2007AA10Z182, 2008AA10Z126, 2007AA100105)和国家林业局948项目(2007-4-03)资助。

参考文献

- Chen Y., He Q.L., Zhuge Q., Huang M.R., and Wang M.X., 2006, Recent advances in forest-tree gene engineering, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 4(1): 1-7 (陈英, 何秋伶, 诸葛强, 黄敏仁, 王明麻, 2006, 林木基因工程研究进展, 分子植物育种, 4(1): 1-7)
- Chen S.Y., Chen F., Wang Y.B., and Chen S.N., 2006, Advances and applications in genetic transformation of conifers, *Shijie Linye Yanjiu (World Forestry Research)*, 19(2): 12-17 (陈少瑜, 陈芳, 王寅冰, 陈善娜, 2006, 针叶树种遗传转化研究进展与应用, 世界林业研究, 19(2): 12-17)
- Cerda F., Aquea F., Gebauer M., Medina C., Medina C., and Arce-Johnson P., 2002, Stable transformation of *Pinus radiata* embryogenic tissue by *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70(3): 251-257
- Ewald D., and Kretzschmar U., 1996, The influence of micrografting in vitro on tissue culture behavior and vegetative propagation of old European larch trees, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 44(3): 249-252
- Fan Z.Q., Li J.Y., and Tian M., 2005, Effect of antibiotics on induction and growth of camellia callus, *Linye Kexue Yanjiu (Forest Research)*, 18(2): 183-186(范正琪, 李纪元, 田敏, 2005, 抗生素对山茶愈伤组织诱导和生长的影响, 林业科学研究, 18(2): 183-186)
- He B.W., Yue C.W., and Zhang Y.Z., 2009, Study on callus differentiation and antibiotic resistance of sweet potato, *Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 25(9): 140-143 (何博文, 岳昌武, 张义正, 2009, 甘薯愈伤组织分化及抗生素耐受性研究, 中国农学通报, 25(9): 140-143)
- Hiei Y., Ishida Y., Kasaoka K. and Komari T., 2006, Improved frequency of transformation in rice and maize by treatment of immature embryos with centrifugation and heat prior to infection with *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 87(3): 233-243
- Huang T.D., Li Z., Sun A.H., Hua Y.W., and Huang H.S., 2008, Effects of antibiotics on growth and somatic embryogenesis

- of *Hevea brasiliensis* anther callus, Redai Zuowu Xuebao (Chinese Journal of Tropical Crops), 12(6): 673-677 (黄天带, 李哲, 孙爱花, 华玉伟, 黄华孙, 2008, 抗生素对巴西橡胶树花药愈伤组织生长与分化的影响, 热带作物学报, 12(6): 673-677)
- Hu G.B., Chen D.C., Zheng Q.F., and Huang Z.R., 2001, Effect of antibiotics on growth of stem segments and callus of ber (*Ziziphus mauritiana* Lam.), Huanan Nongye Daxue Xuebao (Journal of South China Agricultural University), 22(2): 21-23 (胡桂兵, 陈大成, 郑启发, 黄自然, 2001, 抗生素对台湾青枣茎段和愈伤组织生长的影响, 华南农业大学学报, 22(2): 21-23)
- Kang W., Zheng J., and Hong H.Z., 2008, Effects of antibiotics on induction and differentiation of Blacust callus, Anhui Nongye Kexue (Journal of Anhui Agricultural Sciences), 36(29): 12593-12594 (康薇, 郑进, 洪华珠, 2008, 抗生素对刺槐愈伤组织诱导与分化的影响, 安徽农业科学, 36(29): 12593-12594)
- Le V.Q., Belles-Isles J., Dusabenyagasani M., and Tremblay F.M., 2001, An improved procedure for production of white spruce (*Picea glauca*) transgenic plants using *Agrobacterium tumefaciens*. Journal of Experimental Botany, 52(364): 2089-2095
- Mamidala P., and Nanna R.S., 2009, Influence of antibiotics on regeneration efficiency in tomato, Plant Omics Journal, 2(4): 135-140
- Matsumoto T., Okunishi K., Nishida K., Noguchi M., and Noguchi M., 1972, Effects of physical factors and antibiotics on the growth of higher plant cells in suspension culture, Agricultural and Biological Chemistry, 36(12): 2177-2183
- Nigroa S.A., Makungab N.P., Jones N.B. and Stadena J. Van., 2008, An *Agrobacterium*-mediated system for gene transfer in *Pinus patula*, South African Journal of Botany, 74 (1): 144-148
- Qi L.W., 2008, Studies on the somatic embryogenesis and establishment of experimental system in *larix principis-Rupprechtii*, Dissertation for Ph.D., the Research Institute of Forestry, the Chinese Academic of Forestry, Supervisor: Han Y. F. (齐力旺, 2000, 华北落叶松体细胞胚胎发生及遗传转化系统建立的研究, 博士学位论文, 中国林业科学研究院林业研究所, 导师: 韩一凡)
- Salaj T., Moravčíková J., Vooková B., and Salaj J., 2009, *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic tissues of hybrid firs (*Abies* spp.) and regeneration of transgenic emblings, Biotechnol Letters, 31(5): 647-652
- Wang B., Peng D.X., Sun Z.X., Zhang N., and Gao S.M., 2006, Effect of three antibiotics on seed germination and plant regeneration from cotyledons of ramie [*Boehmeria nivea* (L.) Gaud], Molecular Plant Breeding, 4(6): 895-900 (汪波, 彭定祥, 孙珍夏, 张娜, 高世梅, 2006, 三种常用抗生素对苧麻种子发芽及子叶再生的影响, 分子植物育种, 4(6): 895-900)
- Zheng S.S., An C.C., Li Q.R., and Chen Z.L., 2002, Effect of antibiotics on the cotton callus proliferation in vitro, Mianhua Xuebao (Acta Gossypii Sinica), 14(5): 280-282 (郑树松, 安成才, 李启任, 陈章良, 2002, 离体条件下抗生素对棉花愈伤组织生长的影响, 棉花学报, 14(5): 280-282)

BioPublisher是一个致力于发表生物科学研究论文、开放取阅的出版平台

在BioPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文:

- 同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- 在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- 开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- 快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- 论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://chinese.sophiapublisher.com>

