

文章编号: 1003-8701(2008)01-0028-05

精子载体转基因技术研究进展

周 兴, 张居农

(石河子大学动物科学技术学院, 新疆 石河子 832003)

摘 要: 精子因在受精过程中的独特作用, 而被公认为是转移外源 DNA 的理想载体, 且操作简便, 成本低廉, 危险隐患相对较低, 近 10 几年来的研究表明, 精子载体介导法可以得到转基因阳性动物。本文对精子载体转基因方法、精子载体转基因的机理、影响精子与外源 DNA 结合的因素以及外源 DNA 在宿主动物中的存在形式等方面进行了论述, 并对精子作为载体的研究方向和前景进行了预测。

关键词: 精子载体; 转基因; 动物

中图分类号: S814.8

文献标识码: A

A Review of Sperm-Mediated Gene Transfer Technology Researches

ZHOU Xing, ZHANG Ju-nong

(College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Xinjiang, Shihezi 832003, China)

Abstract: Due to sperm has special function, it has been thought as ideal vectors for introducing foreign DNA. Sperm-mediated gene transformation is the most convenient way and also has little concealed damage. It is reported that several positive animals can be obtained through the sperm-mediation. Recent advance on these researches was introduced and assessed in the paper, which covered method of transgenic animal, molecular mechanism of interact sperm and foreign DNA, foreign DNA existing form of introducing animal or embryo, factors which affected integration of sperm and foreign DNA. The development tendency of sperm as vector introducing gene into animal was predicted in the paper.

Key words: Spermatozon vector; Transgene; Animal

转基因方法是转基因动物生产的重要技术环节之一, 目前最为普遍运用的是显微注射法, 但其实验设备昂贵、效率低, 导致生产成本高。因而人们一直在试图寻找一种简单、高效的转基因方法。1971 年, Brackett 等^[1] 开始了精子介导外源 DNA 转移的先驱工作: 当兔精子暴露于纯化的 SV40-DNA(HB 标记腺嘌呤)中后, 在精子的头部检测到放射性物质。他们的结果表明, 异源的 DNA 分子可以结合进入哺乳动物的精子, 在 2-细胞胚胎期检测到这些 DNA, 说明这些精子在受精过程中能将外源 DNA 携入卵细胞, 但是这一发现当时未引起人们的注意。1989 年, Arezzo^[2]等研究发现, 同源和异源的大分子可以穿进活的海胆

精子, 而且借助于精子载体将外源 pRSVCAT 或 pSV2CAT 质粒带入卵子, 外源的 CAT 基因还可以在胚胎中表达。其中最引人注目的报道是意大利学者 Lavitrano 等^[3]在小鼠上进行的研究, 他们将获得的小鼠附睾精子与线粒体或环状 pSV2CAT 质粒一起 37℃ 孵育 30min 后, 再与成熟卵子进行体外受精, 这样得到的胚胎在 2-细胞期移植入受体鼠的输卵管内, 在受体鼠产出的 250 只体外受精鼠有 30%(70/250)为阳性个体。实验还发现阳性个体中转入的基因可以稳定地整合入生殖细胞系, 而且在转基因的后代个体的组织器官中, 特别是在尾组织和肌肉组织中可检测到 CAT 基因的表达。在 Lavitrano 的文章发表不久, Binster 等^[4]根据 Lavitrano 的实验方案, 用近 10 种基因结构、6 个不同品系的小鼠、多种培养液和不同基因浓度在得到的 1 500 只小鼠中没有阳性结果, 这使人

收稿日期: 2007-02-03

作者简介: 周 兴(1976-), 男, 在读硕士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究

们对精子载体法变得谨慎和怀疑。1998 年 Maione 等^[5]同样使用小鼠附睾精子与 PSV2CAT 共温育, 在所进行的 75 组实验中, 共产生小鼠 1 755 只, 其中 130 只为转基因小鼠, 转基因效率为 7.4%。但这 130 只转基因小鼠集中来自于 13 组实验产生的 366 只小鼠, 平均转基因效率约为 36%。这 13 组实验中, 有 5 组转基因效率达 85% 以上, 其中 3 组转基因效率达 100%。在总的 75 组实验中, 剩余 62 组共产生 1 389 只小鼠, 全部为阴性小鼠。这个实验不仅从正面肯定了 Lavitrano 等 (1989) 阳性结果和 Brinster 等 (1989) 阴性结果的合理性。上述研究均是将精子在体外进行处理, 1999 年, 黄为民等^[6]报道了一种改良方法, 即通过显微注射将被脂质体包裹的外源基因 (tPacDNA) 直接注入生长状况良好的性成熟雄性小鼠的输精管和部分附睾管, 3 d 后与生长状况良好的性成熟母鼠交配。共转染 5 只小鼠, 使得 10 只母鼠受精, 繁殖出 79 只小鼠, 存活 42 只, PCR 检测其外源基因整合情况, 阳性率为 7/42 (16.67)。凝胶平板溶圈实验检测 5 只 PCR 阳性的雌性首建者小鼠泌乳期乳汁中活性 tPA, 3/5 表达, 表达量在 12~20 IU/mL 之间; PCR 检测 4 只子一代小鼠外源基因的遗传情况, 阳性率 2/4, 这种途径给精子载体法带来了新的活力, 特别是在大的转基因动物研究中预示着良好的前景, 值得进一步研究。

1 促进外源 DNA 与动物精子结合的方法^[7]

1.1 共孵育法

将精液与外源 DNA (20 $\mu\text{g/mL}$) 直接混合, 或对精液进行稀释, 使其浓度达 $1 \times 10^6 \sim 10^8/\text{mL}$, 再与 DNA 混合孵育 20~40 min。采用这种直接孵育的方法, 吸附外源性 DNA 的精子占 6.3% 左右, 精子在吸附 DNA 后仍保持很好的活力。1991 年 Horan^[8]用猪精子进行的实验表明, DNA 与精子结合牢固, 每个精子约结合 3.8×10^2 个 DNA 分子, 运动精子捕捉 DNA 的效率较高。线状 DNA 较环状 DNA 更易于被精子结合。

1.2 电击法

通过高压电场使精子质膜通透性产生暂时的可逆性变化, 从而使 DNA 分子进入细胞内。在电穿孔前, 先对精子进行离心洗涤, 然后用电穿孔缓冲液 (200 mM/L 葡萄糖、5 mM/L 硫酸镁、2 mM/L 巯基乙醇和 20 mM/L Tris-HCl, pH 值 7.6) 稀释精子, 再将

精子悬浮液置入高压细胞处理器中进行电脉冲处理。1995 年 Gagne 等^[9]发现, 电脉冲能增加牛精子摄取外源 DNA 的效率 5~8 倍。Horan 发现电击能提高猪精子对 DNA 的摄取量; 在禽类, 1993 年 Nakanish 等^[10]报道, 电击后精子摄取 DNA 的量增加 10 倍, 但此时精子的受精率下降。表明电穿孔过早引起精子顶体的损坏, 因此必须摸索最佳的电穿孔参数。

1.3 脂质体法

1992 年 Rottmann 等对精子载体法进行了改进, 外源 DNA 与兔精子混合培养之前先用脂质体包裹, 脂质体表面带有阳离子, 可与带负电的 DNA 形成脂质体-DNA 复合。复合物通过静电作用被细胞吸附, 再通过细胞融合或细胞吞噬作用进入细胞内。阳离子脂质体转基因效率比传统的包埋基因的脂质体明显提高。DNA 用脂质体包裹后, 与精子共处理, 人工授精的后代中 63% 为转基因兔, 用转染的禽精子人工授精获得了 15%~26% 的转基因后代。在 Rottmann 的研究中脂质体的介导对精子的活力和受精能力都没有影响, 而 Nakanishi 则发现脂质体的存在引起精子活力的轻微下降。

2 精子载体转基因机理^[7, 11]

2.1 精子携带外源 DNA 的条件

Spadafora 等^[12]1998 年的研究结果表明, 几乎所有动物的精子都具有与外源 DNA 结合的能力, 但只有附睾精子和经洗涤去除精清的射出精子才能够有效携带外源 DNA, 这说明精清中的某些成分强烈抑制外源 DNA 的结合。在自然受精时, 因为精清对精子的保护作用, 杜绝了外源遗传物质对遗传稳定性的干扰, 避免了物种的变异。目前, 已在哺乳动物精清中和低等动物 (如海胆) 的精子表面发现了一种颌颌 DNA 结合的抑制因子 (称为 IF-1), 来源于海胆精子的 IF-1 的提取物经纯化分析, 确定它是一种 37 kDa 的糖蛋白。IF-1 和 N-糖基酶或 O-糖基酶预孵育能完全解除其对外源 DNA 结合的抑制作用, 它广泛存在于哺乳动物的精液中, 它能选择性地结合到精子的核后帽区, 与外源 DNA 结合的部位相同。因而, IF-1 很可能在自然界起着屏障和保护附睾精子免受外源分子的侵入作用。外源 DNA 与精子的结合可能还受一个分子量为 30~35 kDa 精子蛋白质的调节, 称其为 DNA 结合蛋白 (DNA Binding Protein, DBP)。在研究 DNA 与精子膜蛋白结合的实验中发现此蛋白

质能与 DNA 形成稳定的复合物, 并与 IF-1 有很高的亲和性。在凝胶实验中发现 IF-1 分子能置换出与 DNA 结合的 30~35 kDa 蛋白质 (Zani 等, 1995)。

2.2 精子结合外源 DNA 的核内化过程

1997 年 Lavitrano 等^[13]通过敲除小鼠的组织相容性因子(MHC-II)和 CD4 基因的实验结果表明: 在精子与 DNA 作用过程中, MHC-II 与精子和 DNA 结合有关而 CD4 与精子进一步吸收 DNA 也有关。因而 MHC-II 可能参与精子与外源 DNA 的结合。利用单克隆抗体免疫反应发现, 正常成熟精子细胞中不存在 MHC-II 分子, 这暗示可能在精子发生过程中 MHC-II 分子出现与否影响到其后成熟精子结合 DNA 的能力。免疫荧光反应和 Western 杂交都表明精子头部含有 CD4 分子, 它在介导 DNA 渗入精子细胞内起重要作用。此过程可用一个模型予以解释: 外源 DNA 与动物精子共培养时, 成熟精子表面未被精清里存在的 IF-1 因子所封闭的 DNA 结合蛋白(如 30~35kDa 蛋白)与之发生相互作用, 这依赖于精子发生过程 MHC-II 基因的表达。核内化的发生是在结合的最初几分钟开始并有精子细胞膜上 CD4 分子进行信号传导, DNA 结合蛋白(DBP)与外源 DNA 形成的核蛋白复合物(DBP/DNA)是产生核内化的触发信号, 使得 DNA/DBP/CD4 复合物进入精子内并穿过核孔抵达核基质区, 此时 DNA 与 DBP/CD4 解离, DBP 和 CD4 分子返回精子细胞膜, 继续介导其他的外源 DNA 进入精子细胞核内, 而外源 DNA 则与核基质(MAR)区在染色体的拓扑异构酶的作用下发生外源基因的整合。

2.3 外源 DNA 在精子内的变化

进入精子核内的外源 DNA 分子结构是否发生变化, 编码绵羊乳球蛋白的 DNA 与小鼠附睾精子共培养, 从精子核内分离外源 DNA, 经 Southern 杂交分析发现: 用低浓度 DNA 处理(1~10ng/106 精子), 外源 DNA 分子仍然完整, 当用较高浓度的 DNA 处理 (300~500ng/105 精子), DNA 分子大量降解。这表明大量外源 DNA 进入可能引起附睾精子内核酸裂解酶活性增高(Maione 等, 1997)。当精子与外源 DNA 分子培养时, 精子核酸酶被激活, 催化精子染色体 DNA 的局部降解。

3 精子与外源 DNA 结合的因素

许多因素影响 DNA 与精子的结合, 归纳起来有以下几点: ①DNA 片断的长短, 大片段(7kb)

较小片段(150~750bp)更容易被精子所摄取, 这种现象被解释成是由于分子间的相互作用, 这种结合是可逆的; ②DNA、多聚阴离子、低等电点的蛋白质等物质与精子相结合的过程中这些分子的电荷密度具有决定意义。分子电荷性的重要性最近已得到进一步证实: 精子-DNA 复合物可以很容易地被高盐溶液(250~700mmol/L NaCl 离子梯度)分开^[14]。由于多聚阴离子物质在精子头部结合部位相同, 因此存在一种特殊底物蛋白即 DNA 结合蛋白(DBP), 这种蛋白充当精子和核酸相互作用底物; ③正常生理条件下, 动物排出的精液中含有特异的抑制因子 IF-1, 使精子失去了与外源 DNA 的结合能力。对精子和附睾精子的清洗可提高精子与 DNA 结合效率; ④1999 年, 李文蓉等^[15]研究表明: 精清中含有脱氧核糖核酸酶能降解外源 DNA, 在精清中加入一定浓度的 EDTA 能有效地抑制该酶的作用, 保护其中的外源 DNA。但考虑到加入 EDTA 可能对外源 DNA 的结构有影响, 而且 EDTA 的加入是否影响精子活力、受胎率, 尚需进一步实验验证; ⑤精子获能是一个极其复杂的生理过程, 受多种因素的影响, 其中与 Ca^{++} 、 K^{+} 、 Na^{+} 等离子的浓度密切相关。杜立新等^[16]应用 mDMF-mHis 法体外培养液增强精子的超激活运动(HAM), 提高精子与卵子的受精机会。结果表明, 经获能处理的受精率(91.4%)比未处理组(80%)高了约 10 个百分点。

4 外源 DNA 在宿主动物中的存在形式^[11]

在一些研究中人们得到了外源 DNA 永久性整合进入宿主基因组的转基因动物, 但在另外的一些研究中外源 DNA 以附加体的形式存在于染色体之外, 外源 DNA 或是在胚胎发育的某一阶段丢失或是形成嵌合体动物。从最近的研究来看, 精子载体法更容易高效率地得到以附加体形式存在的转基因动物, 即使在基因组整合有外源 DNA 的转基因个体中同样存在以附加体形式存在的质粒 DNA。Nadanishi 等^[10]在使用电穿孔法和脂质体介导的精子载体法得到的新生仔鸡中未能发现外源 DNA 整合入基因组, 但观察到外源 DNA 以附加体的形式存在, 合适的附加体质粒同样可以在动物细胞中表达。如果对附加体质粒进行精细的设计, 人们可以得到在宿主动物细胞中稳定地存在并表达, 甚至可遗传后代的以附加体质粒形式存在的转基因动物; 而精子载体法则是附加体质粒

导入宿主动物细胞内的有效方法。在用显微注射法获得的转基因动物中, 同一外源基因在不同动物中表达水平差异很大, 这些数量上的不一致通常是由于外源基因插入位点的不同引起的。外源基因在宿主基因组中的插入通常是随机的。虽然目前只有很少直接的证据, 但人们相信外源基因插入后其两侧的宿主 DNA 序列、染色体结构以及外源基因的排列和拷贝数影响转基因的表达。这种转基因能否表达以及表达水平是一个不可控过程。如果采用同源重组的方法, 这个问题可以解决, 但就目前而言, 同源重组法的效率相当低, 影响了它的应用。生产外源 DNA 以附加体形式存在的转基因动物可以使转入基因不再受到宿主 DNA 的影响, 从理论上讲可通过使用组织特异性的增强子和启动子修饰转入基因的表达 (Eibrecht, 1987)。由于精子载体法可以有效地将附加体质粒转入宿主动物, 因此精子载体法在生产转基因动物方面显示出优越性和良好的前景。由于精子载体法简便、实用, 人们只需利用人工授精程序就可以得到大量可供商业利用的转基因动物, 因而附加体质粒能否稳定地遗传给后代已不再是一个重要方面。

5 结束语

精子因在受精过程中的独特作用, 而被认为是转移外源 DNA 的理想载体。到目前为止, 精子载体法至少在 12 种动物中获得了转基因后代: 其中包括鲤鱼 (1991 年, Castro 等^[17])、金鱼 (1994 年, 于健康等^[18])、斑马鱼 (1992 年, Khoo 等^[19])、泥鳅 (1996 年, 李国华等^[20])、小鼠 (1989 年 Lavitrano 等^[3], 1998 年 Maione 等^[5])、鸡 (1993 年, Nakanishi 等^[10])、家兔 (1994 年, Rottmann 等^[21])、绵羊 (1992 年, 武坚等^[22])、牛 (1995 年, Schellander 等^[7])、猪 (1996 年, Sperandio 等^[7], 2002 年 Lavitrano 等^[23])。但是在用它作为载体时, 仍然存在一些局限, 其中首先要解决的难题就是如何让它携带或吸收外源 DNA。由于精子膜结构的特殊性, 适用于一般细胞转化的方法, 如电击、钙沉淀、超声波和反转录等方法难以对它足够奏效。蛋白质因子学和脂质体法给人们提供了一种新的思路, 所以, 近期的主要目标是研究精子膜的分子特性, 进一步阐明 DNA 与蛋白质结合、内化的分子机制, 找出保护外源 DNA, 维持精子授精能力的新技术, 提出理想的转化条件。Keejong Chang 等^[24]于 2002 年将单克隆抗体 (mAb C) 与 DNA 结合, 而后和精子共孵育 (Linker-based

SMIG) 获得了转基因猪和小鼠, 阳性率分别为 37.5% 和 33%。其机理就是利用 mAb C 能与精子表面的特异抗原相结合, 从而提高了外源 DNA 和精子的结合效率。最近还有人提出, 在传统精子载体法的基础上, 辅以生精细胞显微注射授精的基因转移, 输精管注射法体内转染成熟精子和曲精管注射法转染精源干细胞法建立转基因动物, 并有相关报道发表^[25, 26]。基因转移作为一种新型生物技术, 它的发展依赖于人类对真核生物表达调控的理解、动物基因图谱的明晰及定位整合技术水平, 在动物上, 尤其是在改变动物对疾病的抗性、利用乳房反应器生产医用蛋白和制作动物疾病模型等方面具有极其广泛的应用前景。但对于其详细机理还应进行深入地研究, 特别是转基因后的动物致畸、致病性方面的研究尤为重要。

参考文献:

- [1] Brackett B G, Baranska W, Sawicki W, et al. Proc Natl Acad Sci USA [C]. 1971, 68: 353-357.
- [2] Arezzo F. Sea urchin as a vector of foreign genetic information [J]. Cell Biol Int Rep, 1989, (13): 391-404.
- [3] Lavitrano M, Camaiori A, Fazio V.M, et al. sperm cell as vector for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice [J]. Cell, 1989, (57): 717-723.
- [4] Brackett R.N, Sandgren E.P, Behringer R.R, et al. No simple solution for making transgenic mice [J]. Cell, 1989(59): 239-241.
- [5] Maione B, Lavitrano M, Spadafora C, and Kiessling A. Sperm-Mediated gene transfer in mice [J]. Mol.Rep.Dev, 1998, (50): 406-409.
- [6] 黄为民, 赖良学, 乔桂林, 等. 小鼠输精管内转染法建立人组织型纤溶酶原激活剂 (tPacDNA) 乳腺定位表达生物反应器的研究 [J]. 实验生物学报, 1999, 32(3): 227.
- [7] 陈学进, 曾申明, 等. 精子载体转基因技术的最新研究进展 [J]. 国外畜牧科技, 2000, 27(2): 28-30.
- [8] Horan R, et al. Arch Androl. 1991 26: 83-92.
- [9] Gagne M B, et al. Meth Mol Biol. 1995, 48: 181-166.
- [10] Nakanish A, et al. Gene transfer in the chicken by sperm mediated methods [J]. Mol Report Dev. 1993, 36: 258-261.
- [11] 李碧春, 等. 精子介导外源 DNA 转移的研究进展 [J]. 动物医学进展, 2000, 21 (4): 14-16.
- [12] Spadafora C, BioEssays. 1998, 20: 955-964.
- [13] Lavitrano M, et al. Transplantation Res, 1997, 29: 3508-3509.
- [14] Lavitrano M, French D, Zani M, et al. The interaction between exogenous DNA and sperm cells [J]. Mol Reprod Dev. 1992, 31: 161-169.
- [15] 李文蓉, 武坚, 史洪才, 郭志勤. EDTA 对绵羊精液中脱氧核糖核酸酶的抑制作用 [J]. 草食家畜, 1999(1): 27-30.
- [16] 杜立新, 蒋满喜. 脂质体介导精子载体制备转基因鸡的研究 [J]. 山东畜牧兽医, 2001(1): 1-2.
- [17] Castro F O, Hernandez O. et al. Introduction of foreign DNA into

Spermatozoa of fam animals [J] Theriogenology 1991, 34: 1099-1110 .

[18]于健康, 阎维, 张玉廉, 等.精子介导鱼类基因转移和聚合酶链式反应检测技术[J]. 动物学报, 1994, 40(1): 96-99 .

[19]Khoo H W, Ang L H, Lim H B, et al. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into zebrafish [J] . Aquaculture, 1992, 107: 1-19 .

[20]李国华, 崔宗斌, 朱作言, 等 . 鱼精子携带的外源基因导入[J] . 水生生物学报, 1996, 20(3): 242- 247 .

[21]Rottmann O J. et.al.Proc.5th World Congress Genetics applied to livestock Production[C] . 1994.347- 351 .

[22]武 坚, 刘明军, 李文蓉, 等.精子载体介导法生产转基因绵

羊的研究[J] . 草食家畜, 2001(增刊): 186- 190 .

[23]Lavitrano M, et al. Efficient production bysperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplatation [J] . Proceedings of the National Academy of Sciences USA.2002, 99(22): 14230- 14235 .

[24]Chang,K, Qian.J et al. Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer [J].BMC. Bitechndol.2002, 2(1): 5 .

[25]赵 君, 刘 彬, 任文陟, 等 . 体内精原干细胞转染法建立转基因小鼠[J] . 实验生物学报, 2003, 36(3): 197- 200 .

[26]曹 阳, 高华颖, 等 . 精子干细胞转染法制备转基因兔的研究[J] . 高技术通讯, 2001(10): 17- 19 .



(上接第 27 页)

接入生根培养基中诱导生根。结果表明(表 3), 浓度为 0.5 mg/L 的 IBA 对 GM256 生根效果最好, 生根快, 生根数多, 生根率可达 86.3%, 浓度超过 2 mg/L 则抑制生根, 只形成愈伤组织。IAA 对 GM256 的生根也有一定的诱导作用, 但生根率低, 只有 59.7%。NAA 不能诱导 GM256 生根。各种生长素配比后也不利于 GM256 的生根。另外, 调查数据显示, 暗培养和光培养对 GM256 生根无明显差别。

表 5 试管苗生根情况调查

处理号	开始生根时间(d)	平均生根数(个)	生根率(%)
A100	12	5.6	86.3
A101	14	4.1	79.2
A102			
A103			
A104	12	4.8	59.7
A105	12	4.2	45.6
A106	15	4.3	50.5
A107	14	3.5	42.3
A108		只形成愈伤, 没有发根	
A109		只形成愈伤, 没有发根	
A110		只形成愈伤, 没有发根	
A111		只形成愈伤, 没有发根	
A112		只形成愈伤, 没有发根	
A103		有大量愈伤, 没有发根	
A104		有愈伤	
A105		有愈伤	

注: A102、A103 茎节部和基部有大量愈伤组织; A107 基部有大量愈伤组织

3 讨 论

GM256 组培成功的关键是芽的诱导, GM256 不同于其它植物, 对激素的种类和浓度非常敏感, 正确的激素种类和浓度能使芽存活, 而诱导成苗的决定因素是暗培养, GM256 的芽只有经过暗培养处理后才能诱导成苗。

增殖培养中, 如果激素浓度配比不好, GM256 试管苗易出现玻璃化苗和黄化苗现象, 正确的激素浓度配比是 BA2~3 mg/L, NAA 0.05 mg/L。

1/2MS+IBA0.5 mg/L 是 GM256 最佳诱导生根培养基, IAA 可诱导生根, 但生根率低。NAA 不能诱导 GM256 试管苗生根。暗培养对 GM256 试管苗生根无影响。

参考文献:

[1] 吕 汰, 裴建文, 王 娟 . 苹果试管苗生根实验研究 [J] . 甘肃农业科技, 1998(6): 31 .

[2] 查仁明 . 苹果属植物组织培养快速繁殖技术 [J] . 青海农林科技, 2001(1): 58- 59 .

[3] 师校欣, 等 . 苹果砧木离体培养快速繁殖的研究 [J] . 河北农业大学学报, 1991(3) .

[4] 高遐虹, 张 海, 张桂凤 . 苹果砧木试管苗发生玻璃化的因素与预防 [J] . 北京农学院学报, 1997, 12(2): 16- 19 .

[5] 金 芳 . 珠美海棠适宜培养基的选择研究 [J] . 甘肃农林科技, 1996(4) .