

基于 *GUS* 基因瞬时表达优化云南杜鹃 (*Rhododendron yunnanense* Franch.) 遗传转化方法*

彭绿春^{1,2,3}, 周 微⁴, 汪玲敏⁵, 张 露^{1,2,3}, 宋 杰^{1,2,3}, 解玮佳^{1,2,3}, 关文灵⁵, 李世峰^{1,2,3**}

(1. 云南省农业科学院 花卉研究所, 云南 昆明 650205; 2. 云南省花卉育种重点实验室, 云南 昆明 650205;

3. 云南花卉技术工程研究中心, 云南 昆明 650205; 4. 九江农业科学院, 江西 九江 332101;

5. 云南农业大学 园林园艺学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 本研究以云南杜鹃无菌叶片和愈伤组织为受体材料, 运用正交试验设计, 通过组织染色分析法研究了预培养时间、菌液密度、侵染时间、共培养时间对农杆菌介导的 *GUS* 基因瞬时表达的影响。结果表明: 叶片是云南杜鹃较理想的遗传转化受体材料, 无菌叶片预培养 0 d, 菌液 OD₆₀₀ 值 0.5, 侵染时间 40 min, 共培养 5 d, *GUS* 基因瞬时表达率最高, 平均表达率为 70%。试验结果为云南杜鹃遗传转化研究提供了快速可靠的依据。

关键词: 云南杜鹃; *GUS* 基因; 瞬时表达; 遗传转化方法

中图分类号: S 685.210.36 文献标志码: A 文章编号: 1004-390X (2016) 06-1045-07

Optimize the Genetic Transformation Method of *Rhododendron yunnanense* Franch. with Transient Expression of *GUS* Gene

PENG Lyuchun^{1,2,3}, ZHOU Wei⁴, WANG Lingmin⁵, ZHANG Lu^{1,2,3}, SONG Jie^{1,2,3},
XIE Weijia^{1,2,3}, GUAN Wenling⁵, LI Shifeng^{1,2,3}

(1. Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China;

2. Yunnan Flower Breeding Key Laboratory, Kunming 650205, China;

3. Yunnan Flower Research and Development Center, Kunming 650205, China;

4. Jiujiang Academy of Agricultural Sciences, Jiujiang 332101, China;

5. College of Horticulture and Landscape, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: The experiment was conducted to investigate the transient expression mediated by *Agrobacterium tumefaciens* using sterile leaves and calli of *Rhododendron yunnanense* as receptor materials. Effects of pre-culture length, *A. tumefaciens* concentration, infection time and co-culture length on transient expression of *GUS* gene were studied by tissue staining method. The results showed that leaf was the optimal receptor material for genetic transformation in *R. yunnanense*, while the highest transient expression rate (70%) of *GUS* gene was obtained as pre-culture for 0 day, OD₆₀₀ value of *A. tumefaciens* for infection 0.5, infection for 40 min, and co-culture for 5 days. The results provided a fast

收稿日期: 2016-30-20 修回日期: 2016-06-05 网络出版时间: 2016-11-11 10:36

* 基金项目: 国家观赏园艺工程技术研究中心项目 (2012FU125X10); 云南省科技计划项目 (2015BB013); 云南省技术创新人才培养配套项目 (2014-HB057); 云南省花卉育种重点实验室开放基金 (FKL-201202)。

作者简介: 彭绿春 (1981—), 女, 云南个旧人, 硕士, 副研究员, 主要从事观赏植物种质创新及繁育研究。E-mail: green315@126.com

** 通信作者 Corresponding author: 李世峰 (1970—), 男, 云南曲靖人, 硕士, 研究员, 主要从事花卉资源评价利用、种质创新及繁殖技术研究。E-mail: kylin7023@126.com

网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20161111.1036.025.html

and reliable method for genetic transformation of *R. yunnanense*.

Keywords: *Rhododendron yunnanense* Franch.; *GUS* gene; transient expression; genetic transformation

鉴于在打破种间杂交障碍、定向选育新品种上的优势,近年来基因工程技术已成为杜鹃花育种的研究热点。PAVINGEROVA 等^[1]、TRIPEPI 等^[2]、UENO 等^[3]、MERTENS 等^[4]在不同的转化条件下,通过农杆菌介导,成功将报告基因转入杜鹃花栽培品种,高文强等^[5]也将逆向转运蛋白基因 *AtNHX1* 转入到映红杜鹃。

瞬时表达技术是在相对短的时间内将目标基因转入靶细胞,在细胞内建立暂时高效的表达系统,获得该目的基因短暂的高水平表达的技术^[6]。与稳定表达相比,首先,瞬时表达不需将外源基因整合到受体植物染色体中,具有简单、快速、周期短、准确的优点;其次,不受基因位置效应和基因沉默的影响,表达效率较稳定,转化率高;同时,瞬时表达不产生可遗传后代,生物安全性高。因此,瞬时表达技术被广泛应用于植物品种的改良和选育研究,为植物的遗传转化提供快速可靠的依据^[7]。

农杆菌介导的瞬时表达,已在许多植物中取得了成功,如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的叶片^[8],百合 (*Lilium × formolongi*)^[9]、月季 (*Rosa hybrida*) 的花瓣^[10],半夏 (*Pinellia tuber*) 的无菌叶片、叶柄和愈伤组织^[11]等。影响农杆菌瞬时表达的因素主要有菌液密度、侵染时间、共培养时间、受体基因型、生理状态等。吴英杰等^[7]用转入植物表达载体 pBI121 的根癌农杆菌 EHA105 转化烟草叶片,通过分析菌液密度、侵染时间、共培养时间等条件对 *GUS* 基因表达的影响,得到了瞬时表达的最佳条件。刘栋等^[12]实验了基因型、苗龄、共培养时间等条件对农杆菌介导的大豆子叶节和胚尖 2 种转化方法的转化效率的影响,以此来优化大豆转化条件。黄天带等^[13]探讨了基因型对橡胶树胚状体遗传转化瞬时表达的影响,其结果对利用胚状体为受体改良橡胶树优良无性系奠定良好基础。从前人研究可以看出:不同基因型、同一基因型不同材料类型,遗传转化条件存在较大差异,针对具体种的不同材料类型的转化方法都需进行相应的优化。

云南杜鹃 (*Rhododendron yunnanense*) 为杜鹃花科杜鹃属灌木或小乔木,花淡红色或淡紫色,

叶有淡香,为云南的广布物种。其抗逆性强,具有很强的适应性和较广的适应范围,是杜鹃花重要的遗传育种材料^[14]。不同基因型杜鹃花的遗传转化能力和遗传转化条件差异大,尤其野生种的难度普遍大于栽培种,要想实现云南杜鹃在基因工程中的有效利用,需建立高效的遗传转化体系。汪玲敏等^[14]以云南杜鹃无菌叶片为材料,建立了高效的植株再生体系,为其遗传转化奠定了基础。基于瞬时表达技术的转化条件的优化,将为云南杜鹃的遗传转化提供快速可靠的依据。

本研究以云南杜鹃无菌离体叶片和愈伤组织为材料,以农杆菌介导转化,通过 *GUS* 组织化学染色评判其瞬时表达率,试验预培养时间、菌液密度、侵染时间、共培养时间 4 个因子对瞬时表达率的影响,为优化云南杜鹃的遗传转化条件提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料

试验受体材料为云南杜鹃无菌苗上部的第 1 轮幼嫩叶片及黄绿色愈伤组织,由云南省农科院花卉研究所组织培养实验室参照汪玲敏等^[14]的方法培养获得。

1.1.2 质粒和菌株

试验所用质粒为 pCambia1301-220.6-*Pg-F3'5'H* (图 1),农杆菌菌株为 C58c1,由云南省农业科学院花卉研究所马璐琳博士惠赠,并保存于云南省农业科学院花卉研究所实验室。

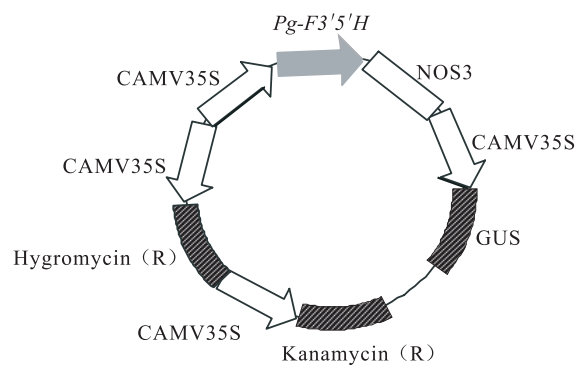


图 1 pCambia1301-220.6-*Pg-F3'5'H*质粒图谱
Fig. 1 Map of pCambia1301-220.6-*Pg-F3'5'H*

1.2 试验方法

1.2.1 培养基与培养条件

预培养在 WPM + 2 mg/L ZT + 0.05 mg/L NAA 固体培养基上进行, 共培养在 WPM + 2 mg/L ZT + 0.05 mg/L NAA + 20 mg/L AS 固体培养基上进行, 糖 30 g/L, pH 5.4。

培养温度 25 ℃, 光照时间 12 h/d 光照, 光强度 2 000 ~ 2 500 lx, 暗培养将培养皿置于盒子中在相同条件下进行。

1.2.2 转化方法

取云南杜鹃愈伤组织及无菌苗叶片, 叶片背面积划 3 个伤口, 分别进行预培养, 之后将愈伤组

织及叶片分别放入准备好的农杆菌菌液中, 室温下置于 100 r/min 的摇床上侵染, 完成后用无菌滤纸吸干菌液, 放入共培养基中暗培养, 随后进行 *GUS* 基因瞬时表达检测。

1.2.3 侵染条件的优化

对预培养时间、菌液密度、侵染时间、共培养时间 4 个影响转化效率的因子进行正交试验设计, 获得 16 组参数组合 (表 1)。按照 1.2.2 节的方法, 试验不同因素和水平条件下的侵染效果, 每个处理组合分别取 10 个大小相近的叶片 (面积约 0.4 cm²) 及 10 个体积相近的愈伤组织 (体积约 0.3 cm³), 重复 3 次。

表 1 侵染条件试验因素及水平
Tab. 1 Factors and levels of infection treatment

水平 level	因素 factor			
	A	B	C	D
	预培养时间/d pre-culture time	菌液 OD ₆₀₀ 值 OD ₆₀₀ value of <i>A. tumefaciens</i>	侵染时间/min infection time	共培养时间/d co-culture time
1	0	0.3	20	3
2	3	0.5	30	4
3	—	0.7	40	5
4	—	0.9	50	6

1.2.4 *GUS* 基因瞬时表达检测

共培养结束后, 参照 JEFFERSON^[15] 的方法进行 *GUS* 组织化学染色。叶片和愈伤组织浸入 X-Gluc 染色液中, 37 ℃ 过夜; 第 2 天, 弃染色液, 材料分别用 70%、80%、90%、100% 乙醇梯度脱色, 直到除去叶绿素, 体视镜下观察染色形态表现, 并统计染色率和染色程度。

1.2.5 统计分析

采用 SPSS Statistics 18.0 软件进行正交试验设计和方差分析。

2 结果与分析

2.1 *GUS* 组织化学染色的形态表现

对农杆菌侵染过的叶片和愈伤组织进行 *GUS* 组织化学染色, 两者均有蓝斑产生, 肉眼可识别的蓝斑分为点状蓝斑和片状蓝斑。愈伤组织上的主要为片状蓝斑, 且有明显的深浅变

化; 叶片上蓝斑主要出现在伤口处及叶片边缘, 有点状蓝斑, 也有片状蓝斑, 颜色均较深。根据叶片上蓝斑面积 (图 2), 将染色程度分为 3 个级别, 其中 “+++” 为 *GUS* 基因瞬时表达程度最深, 蓝斑面积大于 0.15 cm², “++” 为 *GUS* 基因瞬时表达程度次之, 蓝斑面积 0.1 ~ 0.15 cm²; “+” 为 *GUS* 基因瞬时表达程度最弱, 蓝斑面积 0 ~ 0.1 cm²。而愈伤组织染色率和染色程度普遍较低, 未进行分级 (图 3)。

2.2 不同侵染条件对云南杜鹃无菌叶片及愈伤组织 *GUS* 基因瞬时表达的影响

不同侵染条件下, 云南杜鹃无菌叶片及愈伤组织瞬时表达染色率结果见表 2。分别进行预培养时间、菌液 OD₆₀₀ 值、侵染时间、共培养时间 4 个因子对云南杜鹃无菌叶片和愈伤组织染色率影响的方差分析, 结果见表 3 ~ 5。

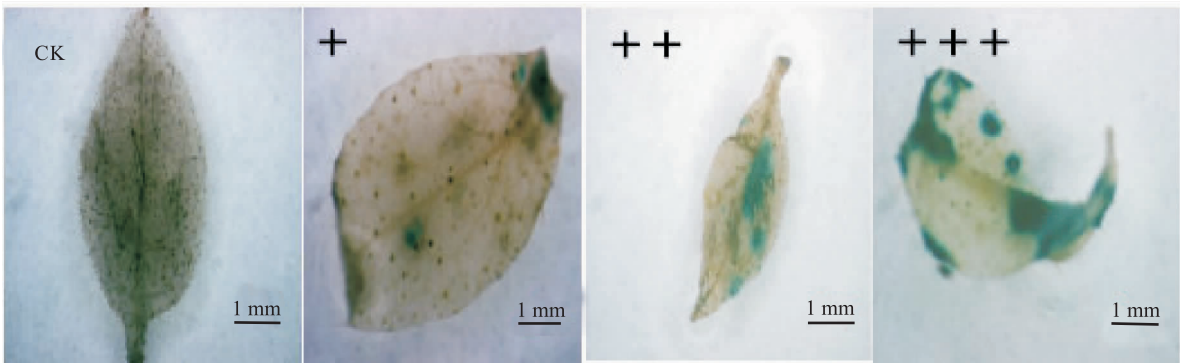


图 2 云南杜鹃叶片 *GUS* 基因瞬时表达级别
Fig. 2 Grade of *GUS* gene transient expression efficiency of *R. yunnanense* leaves

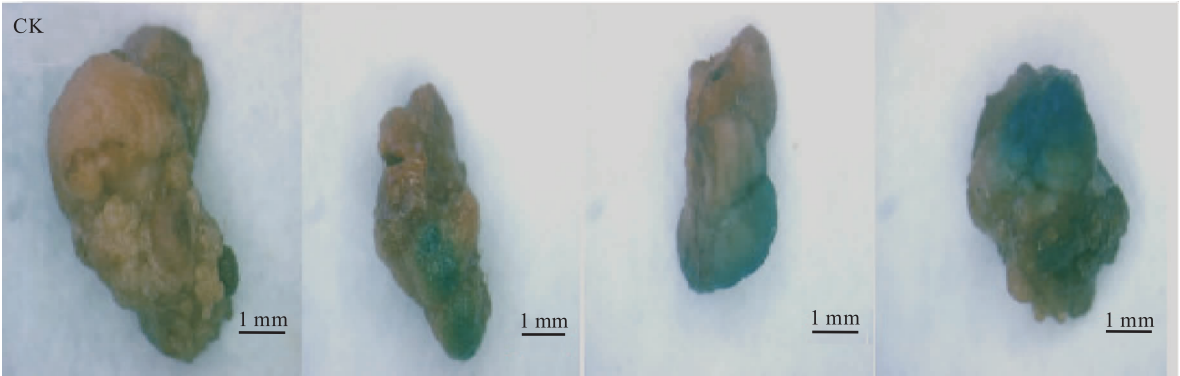


图 3 云南杜鹃愈伤组织 *GUS* 基因瞬时表达
Fig. 3 *GUS* gene transient expression of *R. yunnanense* calli

表 2 云南杜鹃无菌叶片和愈伤组织染色率及染色级别

Tab. 2 Staining rate and grade of leaves and calli of *R. yunnanense*

序号 No.	因素 factor				叶片染色率% staining rate of leaves			叶片染色级别 staining grade of leaves	愈伤组织染色率% staining rate of calli		
	A	B	C	D	重复 1	重复 2	重复 3		重复 1	重复 2	重复 3
					repeat 1	repeat 2	repeat 3		repeat 1	repeat 2	repeat 3
1	1	2	1	2	2	3	3	+	4	5	2
2	2	4	1	4	3	2	1	+	1	0	1
3	2	3	1	3	1	2	0	+	0	1	1
4	1	1	3	4	7	6	6	++	2	1	1
5	1	4	2	2	3	2	2	+	0	2	1
6	2	2	4	1	1	1	2	+	2	1	3
7	1	3	4	4	1	0	2	+	1	2	2
8	1	3	2	1	2	3	1	+	1	0	1
9	1	2	3	3	8	6	7	+++	5	4	4
10	1	4	4	3	1	3	5	++	2	1	4
11	2	4	3	1	0	1	2	+	0	2	0
12	1	1	1	1	5	4	2	++	2	3	1
13	2	3	3	2	3	2	2	+	0	0	1
14	2	1	4	2	0	1	0	+	1	1	2
15	2	2	2	4	1	0	3	+	1	2	1
16	2	1	2	3	3	2	3	+	0	1	2

表3 方差分析表
Tab. 3 Variance analysis

变异来源 source of variation	平方和 sum of squares		自由度 <i>df</i>		均方 mean square		<i>F</i>		<i>P</i>	
	叶片 leaves	愈伤组织 calli	叶片 leaves	愈伤组织 calli	叶片 leaves	愈伤组织 calli	叶片 leaves	愈伤组织 calli	叶片 leaves	愈伤组织 calli
预培养时间 pre-culture time	48.000	15.188	1	1	48.000	15.188	35.758	19.760	0.000	0.000
菌液 OD ₆₀₀ 值 OD ₆₀₀ value of <i>A. tumefaciens</i>	23.000	27.896	3	3	7.667	9.299	5.711	12.098	0.003	0.000
侵染时间 infection time	49.833	5.229	3	3	16.611	1.743	12.375	2.268	0.000	0.097
共培养时间 co-culture time	17.500	5.063	3	3	5.833	1.688	4.346	2.196	0.010	0.105
误差 error	49.667	28.438	37	37	1.342	0.769				

表4 单因素统计表
Tab. 4 Statistics for single factor

序号 No.	因素 factor	水平 level	均数 mean value		标准误差 standard deviation		95% 置信区间 95% confidence interval			
			叶片 l eaves	愈伤组织 calli	叶片 leaves	愈伤组织 calli	下限 lower limit		上限 upper limit	
							叶片 leaves	愈伤组织 calli	叶片 leaves	愈伤组织 calli
1	A	1	3.500	2.125	0.236	0.179	3.021	1.762	3.979	2.488
		2	1.500	1.000			1.021	0.637	1.979	1.363
2	B	1	3.250	1.417	0.334	0.253	2.572	0.904	3.928	1.929
		2	3.083	2.833			2.406	2.321	3.761	3.346
		3	1.583	0.833			0.906	0.321	2.261	1.346
		4	2.083	1.167			1.406	0.654	2.761	1.679
3	C	1	2.333	1.750	0.334	0.253	1.656	1.237	3.011	2.263
		2	2.083	1.000			1.406	0.487	2.761	1.513
		3	4.167	1.667			3.489	1.154	4.844	2.179
		4	1.417	1.833			0.739	1.321	2.094	2.346
4	D	1	2.000	1.333	0.334	0.253	1.322	0.821	2.678	1.846
		2	1.917	1.583			1.239	1.071	2.594	2.096
		3	3.417	2.083			2.739	1.571	4.094	2.596
		4	2.667	1.250			1.989	0.737	3.344	1.763

表 5 配对比较表
Tab. 5 Pair comparison

试验因素 factor	均值最大的处理 (I) treatment with the maximum mean		其余处理 (J) other treatment		均值差值 (I-J) deviation from mean		标准误差 standard deviation		P	
	叶片 leaves	愈伤组织 calli	叶片 leaves	愈伤组织 calli	叶片 leaves	愈伤组织 calli	叶片 leaves	愈伤组织 calli	叶片 leaves	愈伤组织 calli
A	1	1	2	2	2.000 *	1.12 *	0.334	0.253	0.000	0.000
	1	2	2	1	0.167	1.41 *			0.727	0.000
B			3	3	1.667 *	2.00 *	0.473	0.358	0.001	0.000
			4	4	1.167 *	1.66 *			0.018	0.000
C	3	4	1	1	1.833 *	0.083			0.000	0.817
			2	2	2.083 *	0.83 *	0.473	0.358	0.000	0.025
			4	3	2.750 *	0.167			0.000	0.644
D	3	3	1	1	1.417 *	0.75 *			0.005	0.043
			2	2	1.500 *	0.500	0.473	0.358	0.003	0.171
			4	4	0.750	0.83 *			0.121	0.025

注：“*”表示均值差值在 0.05 水平上差异显著。
Note: “*” means significant difference among treatments at 0.05 level.

对云南杜鹃无菌叶片染色数的方差分析结果可以看出, 预培养时间、菌液 OD₆₀₀ 值、侵染时间、共培养时间对云南杜鹃无菌叶片染色数均有显著影响 ($P < 0.05$), 且影响程度是预培养时间 > 侵染时间 > 菌液 OD₆₀₀ 值 > 共培养时间 (表 3)。表 4 显示: A₁B₁C₃D₃ 即预培养 0 d, 菌液 OD₆₀₀ 值 0.3, 侵染时间 40 min, 共培养 5 d 是侵染云南杜鹃无菌叶片的最优组合。由表 5 可以看出: 菌液 OD₆₀₀ 值各水平中均数最大的 B₁ (0.3) 与 B₂ (0.5) 差异不显著, 但与 B₃ (0.7)、B₄ (0.9) 差异显著; 共培养时间各水平中均数最大的 D₃ (5 d) 与 D₄ (6 d) 差异不显著, 而与 D₁ (3 d)、D₂ (4 d) 差异显著。可见, 表 2 中得到的云南杜鹃无菌叶片侵染条件的最优组合 A₁B₂C₃D₃ 即预培养 0 d, 菌液 OD₆₀₀ 值 0.5, 侵染时间 40 min, 共培养 5 d, 与方差分析结果相符, 平均染色率达 70% 且染色程度最深。

愈伤组织染色数的方差分析结果可以看出: 预培养时间、菌液密度对云南杜鹃愈伤组织 GUS 基因的瞬时表达率有显著影响 ($P < 0.05$), 且预培养时间对云南杜鹃 GUS 基因瞬时表达率的影响大于菌液密度 (表 3), 侵染时间和共培养时间对愈伤组织瞬时表达率并无显著影响。

表 4 显示: A₁B₂C₄D₃ 即预培养 0 d, 菌液 OD₆₀₀ 值 0.5, 侵染时间 50 min, 共培养 5 d 是侵染云南杜鹃愈伤组织的最优组合。由表 5 可以看出:

侵染时间各水平中均数最大的 C₄ (50 min) 与 C₁ (20 min)、C₃ (40 min) 差异不显著, 但与 C₂ (30 min) 差异显著; 共培养时间各水平中均数最大的 D₃ (5 d) 与 D₂ (4 d) 差异不显著, 而与 D₁ (3 d)、D₄ (6 d) 差异显著。可见, 表 2 中得到的云南杜鹃无菌叶片侵染条件的最优组合 A₁B₂C₃D₃ 即预培养 0 d, 菌液 OD₆₀₀ 值 0.5, 侵染时间 40 min, 共培养 5 d, 与方差分析结果相符。

一般情况下, 侵染时间对转化率是有影响的, 而方差分析结果显示: 侵染时间对愈伤组织瞬时表达率无显著影响, 分析原因可能是对于云南杜鹃愈伤组织来说, 设计的最短侵染时间 20 min 都超过了其耐受能力, 侵染不同时间的愈伤组织在共培养过程中均表现不同程度的褐变, 甚至死亡, 故在试验中 4 个侵染时间下瞬时表达率无显著差异。同时, 在实际转化过程中, 共培养时间不宜过长, 如过长则农杆菌过度繁殖, 导致后续筛选培养中脱菌、抑菌困难, 可选择 4 d 作为共培养时间。

3 讨论

本研究以云南杜鹃无菌叶片和愈伤组织为材料, 通过 GUS 组织化学染色率来评价其瞬时表达率, 筛选出了云南杜鹃适宜的遗传转化受体材料及其最佳侵染条件。高山杜鹃已有多例获得转基因植株的报道^[1-5], 然而不同基因型之间侵染条

件差异大。本研究发现预培养时间对GUS基因的瞬时表达率有显著影响,经预培养3 d的云南杜鹃叶片及愈伤组织GUS基因的瞬时表达率均较低。贾永芳等^[11]在农杆菌介导的半夏GUS基因瞬时表达中也认为:只有不经过预培养的感受体能够检测到GUS基因染色瞬时表达。而高文强^[5]在农杆菌介导的映红杜鹃遗传转化体系的建立中提出:预培养的过程是外植体伤口酚类物质积累的过程,酚类物质的积累有利于活化Vir基因的表达,从而促进外源基因的整合,提高转化效率,映红杜鹃预培养5 d,得到的抗性愈伤率最高。本研究表明,不经过预培养具有新鲜伤口的转化受体,利于农杆菌的侵入,得到高的瞬时表达率,但瞬时表达率不能完全等同于实际转化率。对于研究结果的差异,需再增加预培养的时间梯度进一步验证不同预培养时间下的实际转化率。

影响农杆菌瞬时表达系统的因素主要有农杆菌菌株、浓度、植株基因型、受体材料的生理状态、农杆菌与受体材料的共培养时间等。本研究中无菌叶片和愈伤组织两种受体材料相比较,愈伤组织由于结构比较立体,表面积大,较难脱菌,并且在菌液浸泡过程中,常会褐化、死亡,且GUS基因瞬时表达率低;而叶片易于脱菌,GUS基因瞬时表达率远高于愈伤组织,且直接分化不定芽率高,所需时间短于愈伤组织,是云南杜鹃理想的遗传转化受体材料。以叶片为受体材料进行侵染,一方面可使叶片直接分化不定芽进行抗性筛选,另一方面侵染后的叶片诱导愈伤组织,再分化不定芽进行抗性筛选,提高抗性芽获得率。

[参考文献]

- [1] PAVINGEROVA D, BRIZA J, KODÝTEK K, et al. Transformation of *Rhododendron* spp. using *Agrobacterium tumefaciens* with a GUS-intron chimeric gene [J]. *Plant Science*, 1997, 122 (2): 165. DOI: 10. 1016/S0168 - 9452 (96) 04544-X.
- [2] TRIPEPI R R, GEORGE M W, SRIPO T, et al. 1999. Infection and transformation of *Rhododendron* by *Agrobacterium tumefaciens* strain B6 [J]. *HortScience*, 1999, 34 (3): 455.
- [3] UENO K I, FUNKUNAGA Y, ARISUMI K I. Genetic transformation of *Rhododendron* by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Cell Reports*, 1996, 16 (1): 38. DOI: 10. 1007/BF01275445.
- [4] MERTENS M, HEURSEL J, BOCKSTAELE E V, et al. 1998. Inheritance of foreign genes in transgenic azalea plants generated by *Agrobacterium*-mediated transformation [J]. *ISHS Acta Horticulturae*, 1998, 521: 127. DOI: 10. 17660/actahortic. 2000. 521. 13.
- [5] 高文强. 农杆菌介导的杜鹃花遗传转化体系的建立 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
- [6] 赵文婷, 魏建和, 刘晓东, 等. 植物瞬时表达技术的主要方法与应用进展 [J]. *生物技术通讯*, 2013, 22 (2): 294. DOI: 10. 3969/j. issn. 1009-0002. 2013. 02. 035.
- [7] 吴英杰, 姜波, 张岩, 等. 农杆菌介导的烟草瞬时表达试验条件优化 [J]. *东北林业大学学报*, 2010, 38 (9): 110. DOI: 10. 13759/j. cnki. dlxb. 2010. 09. 008.
- [8] MCINTOSH K B, HULM J L, YOUNG L W, et al. A rapid *Agrobacterium* - mediated *Arabidopsis thaliana* transient assay system [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2004, 22 (1): 53. DOI: 10. 1007/BF02773349.
- [9] OGAKI M, FURUICHI Y, KURODA K, et al. Importance of co-cultivation medium pH for successful *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lilium × formolongi* [J]. *Plant Cell Reporters*, 2008, 27: 699. DOI: 10. 1007/s00299 - 007 - 0481 - x.
- [10] 王磊, 陈雯, 刘娅, 等. 月季花瓣中农杆菌介导的基因瞬时表达体系的优化及其在RNAi中的应用 [J]. *农业生物技术学报*, 2014, 22 (2): 133. DOI: 10. 3969/j. issn. 1674 - 7968. 2014. 02. 001.
- [11] 贾永芳, 马玉坤, 郭余龙, 等. 农杆菌介导的半夏GUS基因瞬时表达 [J]. *华北农学报*, 2007, 22 (4): 42.
- [12] 刘栋, 石强, 李鹏丽, 等. 利用GUS基因瞬时表达对大豆子叶节和胚尖转化方法的比较及优化 [J]. *生物学通报*, 2008, 43 (12): 35. DOI: 10. 3969/j. issn. 0006 - 3193. 2008. 12. 014.
- [13] 黄天带, 华玉伟, 周权男, 等. 基因型对橡胶树胚状体遗传转化瞬时表达影响的研究 [J]. *热带农业科学*, 2012, 32 (12): 27. DOI: 10. 3969/j. issn. 1009 - 2196. 2012. 12. 008.
- [14] 汪玲敏, 李世峰, 解玮佳, 等. 云南杜鹃(*Rhododendron yunnanense* Franch.) 无菌叶片高频再生体系的建立 [J]. *分子植物育种*, 2015, 13 (7): 1. DOI: 10. 13271/j. mpb. 013. 001877.
- [15] JEFFERSON R A. Assaying chimeric genes in plants: the gus staining gene fusion system [J]. *Plant Molecular Biology Reports*, 1987, 5 (4): 387. DOI: 10. 1007/BF02667740.