

‘伏令夏橙’原位转化体系的建立及优化

谢幸男*, 杨莉*, 刘范, 田娜, 车婧如, 靳三鹏, 张永艳**, 程春振**

(福建农林大学园艺学院, 园艺植物生物工程研究所, 福州 350002)

摘要: 以‘伏令夏橙’实生苗为材料进行原位转化体系建立及优化。首先, 研究侵染部位对原位转化效率的影响: 使用带有 PBI121 载体的农杆菌分别侵染 5 周龄‘伏令夏橙’实生苗上胚轴切口、顶芽切口(保留/去除真叶) 2 次, 共培养 3 d 后进行抗性筛选及暗处理, 7 周后提取叶片 DNA 用于转基因植株 PCR 鉴定; 之后, 以上胚轴切口作为侵染部位进一步研究苗龄对原位转化效率的影响。研究表明, 5 周龄上胚轴切口再生率为 93.10%, 转化率为 20.68%; 保留/去除真叶后侵染顶芽时, 再生率分别为 81.74% 和 94.55%, 转化率分别为 19.09% 和 17.82%; 4 周龄和 6 周龄上胚轴切口再生率为 94.59% 和 91.50%, 转化率为 25.42% 和 19.36%。可见利用农杆菌介导的遗传转化法原位转化 4 周龄‘伏令夏橙’的上胚轴切口可获得较高的转化效率。原位转化操作简单、周期短、转化率高, 在甜橙遗传育种研究中具有重要的应用价值。

关键词: 橙; 原位转化; 苗龄; 外植体; 转化效率

中图分类号: S 666.4

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2020) 01-0111-09

Establishment and Optimization of Valencia Sweet Orange *in planta* Transformation System

XIE Xingnan*, YANG Li*, LIU Fan, TIAN Na, CHE Jingru, JIN Sanpeng, ZHANG Yongyan**, and CHENG Chunzhen**

(Institute of Horticultural Biotechnology, College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: By using the Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* ‘Valencia’) seedlings as plant materials, the *in planta* transformation system was established and optimized. The influence of infection sites on *in planta* transformation efficiency was firstly investigated. *Agrobacterium* carrying the PBI121 vector was used to infect the epicotyl incision or apical bud incision (with/without true leaves) of the 5-week-old Valencia sweet orange seedling for 2 times. After three days’ co-culture, resistance screening and dark treatments were performed. Seven weeks later, leaf DNA of the candidate transgenic plants was isolated and was used as template for PCR detection to calculate the transformation rate. The effect of different seedling ages on the *in planta* transformation efficiency was further studied by using the epicotyl

收稿日期: 2019-09-26; **修回日期:** 2019-11-07

基金项目: 福建省自然科学基金面上项目 (2017J01615); 福建省大学生创新训练项目 (201810389094); 福建省省级大学生创新创业训练项目 (201910389149); 福建省高原学科建设经费项目 (102/71201801101); 广东省科技计划项目 (2016B020201006, 2017A070702005); 广西自然科学基金项目 (2017GXNSFBA198055)

* 共同第一作者

** 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhyy0425@126.com, ld0532cheng@126.com)

incision as the infection site. Results showed that the regeneration rate of 5-week-old seedling epicotyl incision was 93.10%, and the transformation rate was 20.68%. The apical bud regeneration rate for with/without true leaf was 81.74% or 94.55%, and the transformation rate was 19.09% or 17.82%. The regeneration rates of 4- and 6-week-old Valencia sweet orange seedling epicotyl incisions were 94.59% and 91.50%, respectively, and the transformation rates were 25.42% and 19.36%, respectively. By infecting the epicotyl incision of 4-week-old Valencia sweet orange seedlings, high *in planta* transformation rate could be obtained. The *in planta* transformation method is easier to be applied, less time consuming and more efficient. Thus, it is of great potential to be applied in sweet orange genetic breeding.

Keywords: orange; *in planta* transformation; seedling age; explant; transformation efficiency

目前甜橙遗传转化大多依赖组织培养,对无菌环境和无菌操作技术要求较高,且存在再生率低、转化周期长等问题。建立一种不依赖组织培养的遗传转化体系是解决上述问题的有效途径。原位转化法是一种操作简单、转化率高、周期短、高效率的非组织培养的遗传转化方式 (Supartana et al., 2005),在拟南芥 (Jiang et al., 2014)、白菜 (Zhong et al., 2016)、小麦 (Jones et al., 2005)、麻风树 (Jaganath et al., 2014)、大豆 (Li et al., 2017; Chen et al., 2018)、番茄 (Shah et al., 2015)等植物上都已成功应用。在柑橘上,洪勇等 (2000)利用农杆菌侵染锦橙、新会橙、沙田柚的试管实生苗上胚轴切口获得了转基因枝条;He等 (2011)使用农杆菌侵染微嫁接于试管实生苗上的成年态锦橙再生枝条切口,获得了转基因枝条;在之前的研究中,Zhang等 (2017)以3~4周龄沙田柚实生苗为材料,建立了沙田柚原位转化体系并获得了转基因枝条,但发现使用卡那霉素作为筛选剂时转化率偏低。

本研究中以‘伏令夏橙’实生苗为材料,在沙田柚原位转化体系基础上,对操作进行了简化和改良,研究了不同侵染部位、不同苗龄对甜橙遗传转化效率的影响。使用枪头倒置侵染替代 Parafilm 包裹成漏斗状侵染伤口,简化了操作,同时为了提高转化效率,将侵染次数增至2次 (Zhang et al., 2006)。

1 材料与amp;方法

1.1 材料及处理

试验在福建农林大学园艺植物生物工程研究所进行。‘伏令夏橙’ (*Citrus sinensis* ‘Valencia’) 种子由广西农业科学院园艺研究所提供。携带有 PBI121 (Endo et al., 2016) 载体的农杆菌 EHA105 菌株由广东省农业科学院果树研究所提供。于2018年5—6月选取饱满完好种子播种于塑料花盆,放于温室中。选择播种4~6周的幼苗用于原位转化研究 (播种3周后萌发数量较少且植株相对较小不易操作)。于2018年8—9月提取DNA用于PCR检测。

1.2 根癌农杆菌侵染液制备

将农杆菌在含有 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Kan 的 LB 培养基上划线, $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 暗培养 2 d 后挑取单菌落在新的选择培养基上涂板,继续 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 暗培养 2 d 后使用 MS 液体培养基洗下菌落并调整 OD_{600} 为 0.5~1.0,

加入终浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的乙酰丁香酮 (AS), 于 $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下振荡培养 30 min 后用于侵染。

1.3 原位转化

1.3.1 上胚轴切口的原位转化

将 5 周龄 ‘伏令夏橙’ 实生幼苗于真叶着生部位切断, 将吸有侵染液的枪头倒扣于切口使切口浸没于侵染液中。侵染 45 min 后用 Parafilm 薄膜包被切口保湿, 以黑色塑料膜覆盖后进行共培养。为提高转化效率, 共培养 3 d 后揭开黑膜, 去除 Parafilm 薄膜, 进行二次侵染。3 d 后再次揭开黑膜、去除 Parafilm 薄膜, 用 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Kan 溶液轻擦切口 2 ~ 3 次, 使之覆有明显的抗生素溶液。参照 Marutani-Hert 等 (2012) 的方法用 Parafilm 薄膜包被切口后暗处理以促进切口再生, 2 周后揭去黑膜, 自然光照条件下培养。

1.3.2 顶芽切口的原位转化

切除 5 周龄 ‘伏令夏橙’ 实生幼苗顶芽后分为两组, 一组去除真叶, 一组保留真叶。去除真叶组以吸有侵染液的枪头倒扣于顶芽切口进行侵染; 保留真叶组, 将吸有侵染液的脱脂棉包覆于切口进行侵染和共培养。其余步骤同上胚轴切口的转化。具体步骤见图 1。

1.3.3 不同苗龄上胚轴切口原位转化

进一步以 4 周龄和 6 周龄 ‘伏令夏橙’ 实生苗为材料, 以上胚轴切口为侵染部位进行原位转化, 每组至少重复 5 次。具体步骤同上。

1.4 植株再生率计算

筛选培养 7 周后, 大部分再生枝条已长有 4 ~ 5 片叶, 此时统计植株再生率。部分植株可以形成 2 个或以上再生枝条, 统计单芽率和多芽率。再生率 (%) = 再生植株数/总植株数 $\times 100$; 单芽率 (%) = 再生 1 个芽的植株数/总再生植株数 $\times 100$; 多芽率 (%) = (再生 ≥ 2 个芽的植株数) / 总再生植株数 $\times 100$ 。

1.5 转基因植株检测

取叶片置于 2 mL 离心管中, 加入适量液氮, 使用液氮预冷的末端烧平的 1 mL 枪头研磨叶片, 采用 CTAB 法提取叶片 DNA (Fallah et al., 2017)。以 GUS-F/GUS-R 为引物 (GUS-F: CCCGGCAATAACATACGGCGTG; GUS-R: GTCCTGTAGAAACCCCAACCCGTG) 进行 PCR。25 μL PCR 扩增体系含: $2 \times \text{Taq PCR Mix}$ 12.5 μL , 引物各 1 μL , 叶片基因组 DNA 1 μL , ddH₂O 9.5 μL 。PCR 反应条件为: $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s, 38 个循环; $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。取 7 μL PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳检测。根据电泳检测情况, 统计转基因植株转化率。转化率 (%) = 转基因枝条数/总植株数 $\times 100$ 。

采用 Trizol 法提取 PCR 检测为阳性的植株叶片总 RNA, 使用 TaKaRa 公司反转录试剂盒反转录合成 cDNA 用于实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测转基因植株中 GUS 基因的表达情况。GUS 基因定量引物为 Real-GUS-F: TACCGTACCTCGCATTACCC; Real-GUS-R: CTGTAAGTGCGCTTGCTGAG (马岩岩 等, 2014); 内参基因 Actin 引物序列 Actin-F: CCAAGCA GCATGAAGATCAA; Actin-R: ATCTGCTGGAAGGTGCTGAG (刘美雅, 2011)。qRT-PCR 反应在 LightCycler[®] 480 上进行, 20 μL 体系包含 10 μL $2 \times \text{SYBR Green qPCR Mix}$, 各 0.8 μL 正、反向引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 1 μL cDNA 和

7.4 μL ddH₂O。PCR 反应程序为 95 °C 变性 2 min; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 72 °C 15 s; 45 个循环。每个样品重复 4 次。使用 2^{- $\Delta\Delta\text{CT}$} 法计算基因相对表达情况 (Zhang et al., 2017)。

1.6 不同部位、苗龄的再生率及转化率分析

运用 SPSS21.0 软件对不同部位、不同苗龄的再生率、单芽率、多芽率、转化率及转基因植株叶片中 *GUS* 基因相对表达量进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同侵染部位切口再生

以 5 周龄实生苗为材料, 分别研究了原位转化后上胚轴切口和顶芽切口再生情况 (图 1)。筛选培养 1 周, 上胚轴切口 (图 1, F1、F2)、去除真叶的顶芽切口 (图 1, F') 及保留真叶的顶芽切口 (图 1, F'') 均能形成再生芽。2 周后再生芽逐步长大 (图 1, G1、G2、G'、G'')。筛选培养 7 周时统计发现, 去除真叶的顶芽切口、保留真叶的顶芽切口和上胚轴切口再生率分别为 94.55%、81.74%和 93.10%, 同时还发现, 侵染植株可以形成多于 2 个 (含 2 个) 的芽, 不同部位侵染处理多芽率无显著差异 (表 1)。

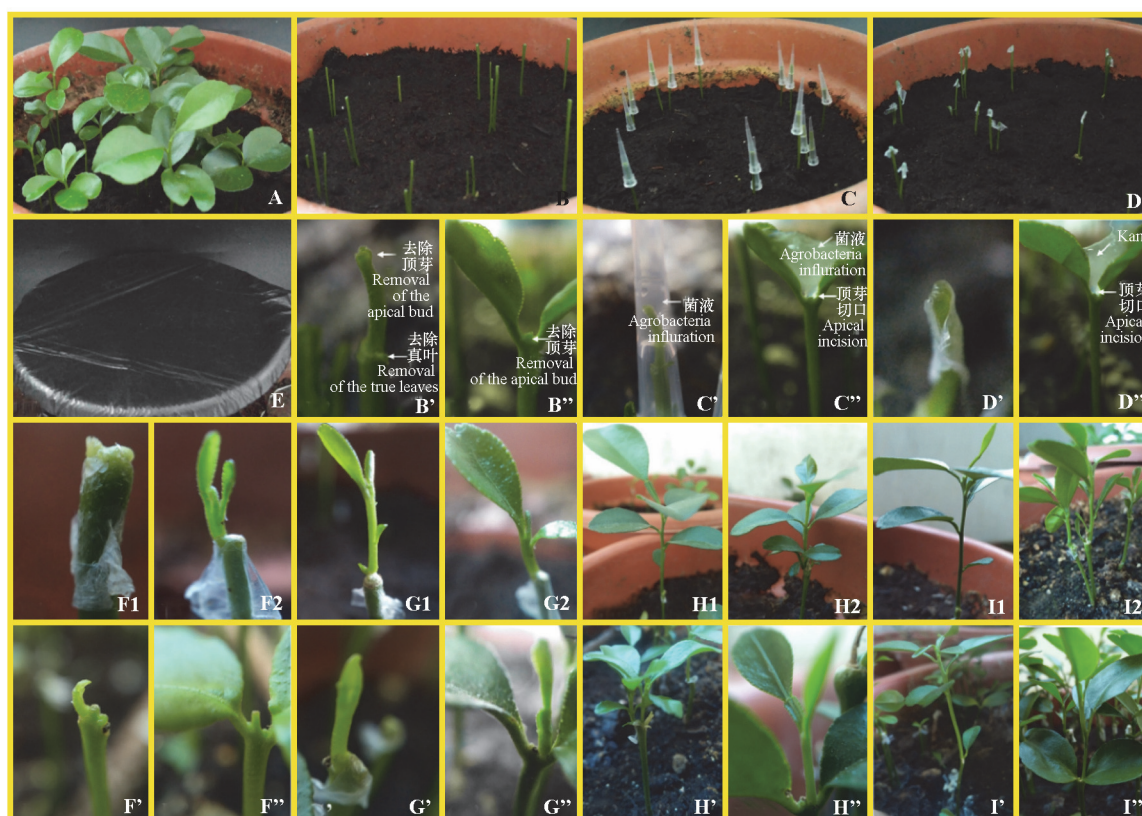


图 1 ‘伏令夏橙’实生苗原位转化流程图

A: 实生苗; B: 于真叶着生处去顶; B': 去顶芽和真叶; B'': 去顶芽留真叶; C: 上胚轴切口侵染; C': 去真叶侵染顶芽切口; C'': 留真叶侵染顶芽切口; D: 上胚轴切口 Kan 筛选; D': 去真叶顶芽切口 Kan 筛选; D'': 留真叶顶芽切口 Kan 筛选; E: 暗处理; F1: 上胚轴切口处形成愈伤; F2: 上胚轴切口处形成芽; F': 顶芽切口再生芽; F'': 顶芽切口再生腋芽; G: 筛选培养 2 周后切口再生芽长大形成枝条 (G1: 由愈伤形成的再生枝条; G2: 由芽长大形成的再生枝条; G': 去除真叶的顶芽切口再生芽长大形成枝条; G'': 保留真叶的顶芽切口再生腋芽长大形成枝条); H: 筛选培养 4 周后的再生枝条 (H1: 器官发生型再生枝条; H2: 器官型再生枝条; H': 顶芽切口再生枝条; H'': 顶芽切口侧面再生枝条); I: 筛选培养 7 周后的再生枝条 (I1: 器官发生型; I2: 器官型; I' 和 I'': 顶芽切口再生枝条)。

Fig. 1 Procedures of the *Agrobacterium*-mediated Valencia orange *in planta* transformation

A: Seedlings; B: Decapitated seedlings; B': Removal of the apical bud and true leaves; B'': Remove the apical bud but keep the true leaves; C: *Agrobacterium* infection on the epicotyl incision; C': *Agrobacterium* infection on the apical incision without true leaves; C'': *Agrobacterium* infection on the apical incision with true leaves; D: Kan screening on the epicotyl incision; D': Kan screening on the apical incision without true leaves; D'': Kan screening on the apical incision with true leaves; E: Dark incubation; F1: Callus formed on the epicotyl incision; F2: Regenerated bud from epicotyl incision; F': Regenerated bud from the apical bud incision; F'': Regenerated axillary buds; G: Sprouted shoots from buds at 2 weeks after screening culture [G1: Sprouted shoot from callus; G2: Epicotyl incision sprouted shoot from bud; G': Apical bud (without true leaf) incision sprouted shoot from bud; G'': Apical bud (with true leaf) incision sprouted shoot from axillary buds]; H: Regenerated shoots at 4 weeks after screening culture (H1: Organogenesis type shoot; H2: Organ type shoot; H': Regenerated shoots from the apical bud incision; H'': Regenerated shoot from the apical bud incision side); I: Regenerated shoots at 7 weeks after screening culture (I1: Organogenesis type; I2: Organ type; I' and I'': Regenerated shoots from the apical bud incision) .

表 1 ‘伏令夏橙’实生苗不同部位的再生率、单芽率、多芽率和转化率

Table 1 Rates of regeneration, single bud, multiple buds and transformation of different Valencia orange infection sites

侵染部位 Infection site	再生率/% Regeneration rate	单芽率/% Single bud rate	多芽率/% Multiple buds rate	转化率/% Transformation rate
上胚轴 Epicotyl	93.10 ± 2.01 a	72.42 ± 0.54 a	27.58 ± 0.54 a	20.68 ± 5.72 a
顶芽切口 (保留真叶) Apical bud incision (with true leaf)	81.74 ± 10.07 a	78.71 ± 6.74 a	21.29 ± 6.74 a	19.09 ± 9.11 a
顶芽切口 (去除真叶) Apical bud incision (without true leaf)	94.55 ± 6.40 a	78.88 ± 7.82 a	21.12 ± 7.82 a	17.82 ± 12.19 a

注: 同一列中不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

Note: Different letters in the same column mean significant difference ($P < 0.05$) . The same below.

2.2 转基因再生枝条鉴定

筛选培养 7 周后, 大部分再生枝条长出 4 ~ 5 片叶。取 1 ~ 2 片叶以 CTAB 法提取 DNA, 以 GUS-F/GUS-R 为引物进行 PCR 扩增。PCR 检测结果显示第 1、3、5、6、8、10、12、15 号样品呈 PCR 阳性 (图 2), 说明载体片段已成功转入部分‘伏令夏橙’。

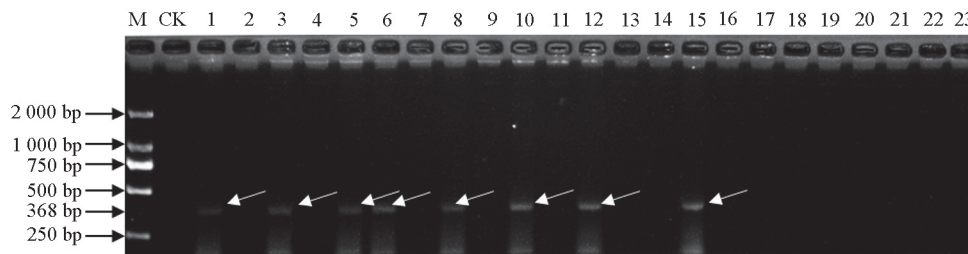


图 2 部分再生枝条 PCR 产物检测结果

M: Marker; CK: 非转基因对照; 1~23: 待检测再生枝条; 箭头所指为目的条带。

Fig. 2 Electrophoresis detection results of PCR products of the regenerated shoots

M: Marker; CK: Non-transgenic seedling; 1 - 23: Regenerated shoots after *in planta* transformation; The arrow heads to the target band.

利用 qRT-PCR 检测了转基因叶片中 *GUS* 基因的表达情况，发现 *GUS* 基因在非转基因植株（对照）中无表达，在转基因植株中的表达量差异较大（图 3）。

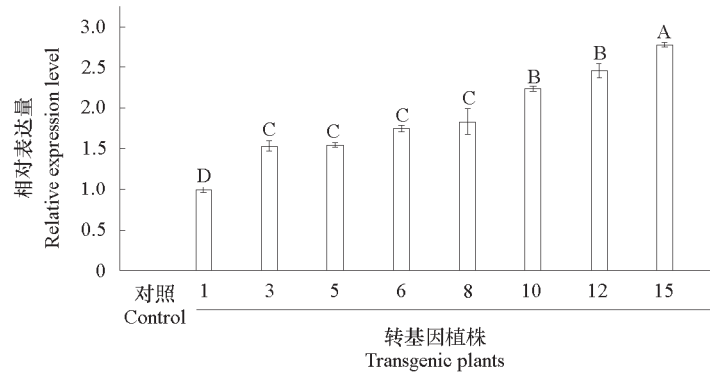


图 3 部分转基因‘伏令夏橙’叶片中 *GUS* 基因的表达

不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

Fig. 3 The expression of *GUS* in leaves of some transgenic Valencia orange
Different capital letters upon column indicated significant difference at 0.01 level.

2.3 不同侵染部位的再生及转化

检测结果显示：以顶芽切口为侵染部位时，保留或去除真叶均能得到转基因再生枝条（图 4，A、B）；部分上胚轴切口形成的两个再生枝条均为转基因阳性如 5 号和 6 号转基因植株（图 4，C）；部分上胚轴切口侧面再生枝条和上胚轴切口下端再生枝条经 PCR 鉴定也为阳性（图 4，D、E）。通过统计发现：以 5 周龄‘伏令夏橙’幼苗为材料，以上胚轴切口、保留真叶的顶芽切口和去除真叶的顶芽切口作为侵染部位时的平均转化率分别为 20.68%、19.09%和 17.82%（表 1）。

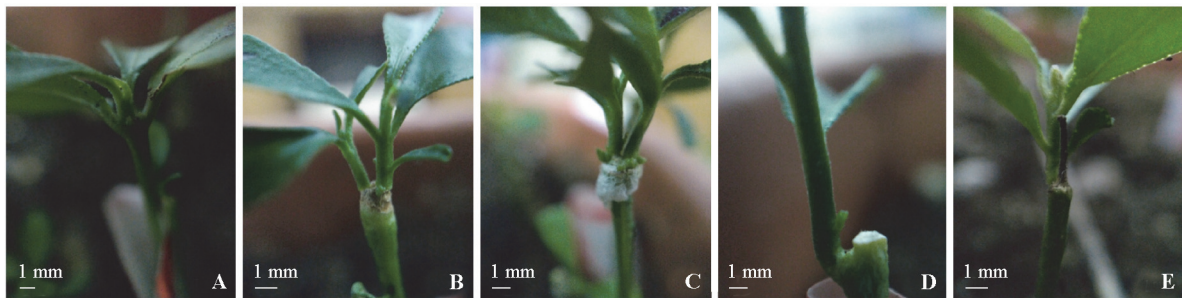


图 4 不同部位的转基因再生枝条

A: 留真叶的顶芽切口处再生; B: 去除真叶的顶芽切口处再生; C: 同一上胚轴切口再生两个枝条;
D: 上胚轴切口侧面再生; E: 上胚轴切口下侧再生。

Fig. 4 Some regenerated transgenic shoots after *in planta* transformation

A: Regenerated shoot from the apical bud incision with true leaves; B: Regenerated shoots from the apical bud incision without true leaves;
C: Two transgenic shoots regenerated from the same incision; D: Shoot regenerated from the side of epicotyl incision;
E: Regenerated shoot below the epicotyl incision.

2.3 不同苗龄的再生及转化

以4周龄和6周龄‘伏令夏橙’为材料, 采用上胚轴切口作为侵染部位, 研究了苗龄对原位转化再生和转化的影响。筛选培养1周后, 可在切口处观察到愈伤组织、从切口处直接再生的芽和由愈伤组织再生的多个芽。筛选培养2周后, 均可形成再生枝条。结合5周龄实生苗上胚轴切口的再生及转化情况, 发现不同苗龄实生苗再生率和转化率差异不显著, 4周龄实生苗多芽率最高, 为32.37% (表2)。

表2 ‘伏令夏橙’实生苗不同苗龄上胚轴的再生率、单芽率、多芽率和转化率

苗龄 Seedling age	再生率 Regeneration rate	单芽率 Single bud rate	多芽率 Multiple buds rate	转化率 Transformation rate
4	94.59 ± 3.28 a	67.63 ± 7.21 a	32.37 ± 7.21 b	25.42 ± 7.25 a
5	93.10 ± 2.01 a	72.42 ± 0.54 a	27.58 ± 0.54 b	20.68 ± 5.72 a
6	91.50 ± 5.19 a	86.76 ± 10.08 b	13.24 ± 10.08 a	19.36 ± 4.47 a

3 讨论

本研究中将沙田柚原位转化方法 (Zhang et al., 2017) 应用于‘伏令夏橙’, 并对部分操作进行了简化。以枪头倒扣的方式进行农杆菌侵染, 相比于沙田柚原位转化法中使用 Parafilm 将切口包裹成漏斗状然后向漏斗中加入农杆菌进行侵染, 该操作更为简便。

植物不同部位的再生能力差异较大, 因此研究侵染部位对原位转化效率的影响。以5周龄‘伏令夏橙’实生苗为材料研究了侵染部位对植株再生率和转化率的影响, 发现以不同侵染部位进行原位转化时的再生率和转化率差异不显著。但以上胚轴切口作为侵染部位操作更方便, 因此确定上胚轴切口为原位转化的最佳侵染部位。

苗龄对转化率影响显著 (Rai et al., 2012)。沙田柚原位转化研究中所用沙田柚实生苗苗龄为3~4周, 由于‘伏令夏橙’植株长势较沙田柚慢, 本研究中对4周龄、5周龄和6周龄‘伏令夏橙’实生苗的原位转化效率进行了比较, 发现再生率和转化率差异不显著。

筛选标记基因对转化率有很大的影响 (Tabatabaei et al., 2018)。沙田柚原位转化时使用除草剂和潮霉素作为筛选剂转化率均接近20%, 而使用卡那霉素时转化率仅约为3% (Zhang et al., 2017)。卡那霉素是最为常用的转基因筛选剂之一 (Nagashima & Koiwa, 2017), 使用卡那霉素作为筛选剂进行原位转化时效率低是亟需解决的问题。鉴于多次侵染可以提高植物遗传转化效率 (Zhang et al., 2006), 本研究中采用了二次侵染, 发现以卡那霉素为筛选剂进行甜橙原位转化时也可以得到20%左右的转化率。

综上所述, ‘伏令夏橙’最优原位转化体系为: (1) 农杆菌侵染液的制备: 使用MS液体培养基将新鲜活化的农杆菌从培养基上洗下, 调整OD₆₀₀为0.5~1.0, 加入100 μmol · L⁻¹ AS振荡培养30 min后用于侵染 (Zhang et al., 2017); (2) 农杆菌侵染: 将4周龄实生苗去顶, 用吸有农杆菌侵染液的枪头倒扣于上胚轴切口, 使切口浸于侵染液中, 45 min后将枪头取下; (3) 共培养: 使用Parafilm薄膜包被切口, 使用黑色塑料膜覆盖后暗培养3 d后去除Parafilm薄膜进行二次侵染, 之后取下枪头, 再次用Parafilm薄膜包被后暗培养3 d; (4) 筛选培养: 去除Parafilm薄膜, 使用50 mg · L⁻¹ 抗生素溶液轻擦切口2~3次, 切口处留有抗生素溶液后再次用Parafilm包被; (5) 暗培

养：使用黑色塑料膜覆盖植株，暗培养 2 周后去除，之后正常光照培养；（6）转基因植株鉴定：使用 PCR 检测再生植株‘转基因’转化情况，使用 qRT-PCR 分析转基因表达情况。

使用本方法进行‘伏令夏橙’遗传转化，仅需 3 ~ 4 个月便可获得转基因植株，且转化效率较高，比依赖组培的遗传转化更为简单、高效。今后还可对以下几个方面进行优化：（1）在侵染液中添加氨基酸类物质及植物生长调节剂（Li et al., 2017; Chen et al., 2018），进一步提高转化效率；（2）以成年树嫩枝扦插扩繁后再进行原位转化以解决实生苗遗传背景差异较大和童期问题；（3）选用更高效的筛选剂，如 Basta（Kapildev et al., 2016）或潮霉素（Mayavan et al., 2015）等；（4）可对再生枝条进行抗生素处理（Acanda et al., 2017），仅对处理后叶片仍为绿色的再生枝条进行转基因验证，进而提高筛选效率，降低筛选工作量及成本。

CRISPR/Cas9 这一精确的基因修饰和基因功能鉴定工具在柑橘中的成功应用为柑橘基因功能研究提供了更精确、更高效的方法（Jia et al., 2017; Peng et al., 2017; Zhang et al., 2017; Zhu et al., 2019），预期基于原位转化的 CRISPR/Cas9 编辑育种将在柑橘基因功能研究和遗传育种过程中发挥重要作用。

References

- Acanda Y, Canton M, Wu Hao, Zale J. 2017. Kanamycin selection in temporary immersion bioreactors allows visual selection of transgenic citrus shoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 129 (2): 351 - 357.
- Chen L, Cai Y, Liu X, Yao W, Guo C, Sun S, Wu C, Jiang B, Han T, Hou W. 2018. Improvement of Soybean *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency by adding glutamine and asparagine into the culture media. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (10): 3039.
- Endo T, Fujii H, Sugiyama A, Nakano M, Nakajima N, Ikoma Y, Omura M, Shimada T. 2016. Overexpression of a citrus basic helix-loop-helix transcription factor (CubHLH1), which is homologous to *Arabidopsis* activation-tagged BR1 suppressor 1 interacting factor genes, modulates carotenoid metabolism in transgenic tomato. *Plant Science*, 243: 35 - 48.
- Fallah F, Minaei Chenar H, Amiri H, Omodipour S, Shirbande Ghods F, Kahrizi D, Sohrabi M, Ghorbani T, Kazemi E. 2017. Comparison of two DNA extraction protocols from leave samples of *Cotinus coggygria*, *Citrus sinensis* and Genus *juglans*. *Cellular and Molecular Biology*, 63(2): 76 - 78.
- He Y, Chen S, Peng A, Zou X, Xu L, Lei T, Liu X, Yao L. 2011. Production and evaluation of transgenic sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) containing bivalent antibacterial peptide genes (*Shiva A* and *Cecropin B*) via a novel *Agrobacterium*-mediated transformation of mature axillary buds. *Scientia Horticulturae*, 128 (2): 99 - 107.
- Hong yong, He Yongrui, Chen Shanchun, Tang Yixiong, Zhang Jinren, Jia Shirong. 2000. New gene transforaiton technique for commercial citrus cultivasrs. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 21 (2): 37 - 41. (in Chinese)
- 洪 勇, 何永睿, 陈善春, 唐益雄, 张进仁, 贾士荣. 2000. 柑桔栽培品种高效基因转化新技术研究. *热带作物学报*, 21 (2): 37 - 41.
- Jaganath B, Subramanyam K, Mayavan S, Karthik S, Elayaraja D, Udayakumar R, Manickavasagam M, Ganapathi A. 2014. An efficient *in planta* transformation of *Jatropha curcas* (L.) and multiplication of transformed plants through *in vivo* grafting. *Protoplasma*, 251 (3): 591 - 601.
- Jia H, Zhang Y, Orbović V, Xu J, White F F, Jones J B, Wang N. 2017. Genome editing of the disease susceptibility gene *CsLOB1* in citrus confers resistance to citrus canker. *Plant Biotechnology Journal*, 15 (7): 817 - 823.
- Jiang W, Yang B, Weeks D P. 2014. Efficient CRISPR/Cas9-mediated gene editing in *Arabidopsis thaliana* and inheritance of modified genes in the T2 and T3 generations. *PLoS ONE*, 9 (6): e99225.
- Jones H D, Doherty A, Wu H X. 2005. Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. *Plant Methods*, 1 (1): 5.
- Kapildev G, Chinnathambi A, Sivanandhan G, Rajesh M, Vasudevan V, Mayavan S, Arun M, Jeyaraj M, Alharbi S A, Selvaraj N, Ganapathi A. 2016. High-efficient *Agrobacterium*-mediated *in planta* transformation in black gram [*Vigna mungo* (L.) Hepper]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38 (8): 205.

- Li S, Cong Y, Liu Y, Wang T, Shuai Q, Chen N, Gai J, Li Y. 2017. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean. *Frontiers in Plant Science*, 8: 246.
- Liu Meiya. 2011. Functional verification of Csi-miR390 and Csi-miR156 related to somatic embryogenesis in *Citrus* [M. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University.
- 刘美雅. 2011. 柑橘体细胞胚发生相关 Csi-miR390、156 功能验证 [硕士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Ma Yanyan, Chen Jiao, Wu Tianli, Zhang Jun, Zhong Guangyan. 2014. Isolation of the citrus *CsTBL1* gene promoter and its activity in transgenic *Arabidopsis*. *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (5): 817 - 824.
- 马岩岩, 陈娇, 吴天利, 张军, 钟广炎. 2014. 柑橘 *CsTBL1* 启动子的克隆及其在转基因拟南芥中的活性分析. *园艺学报*, 41 (5): 817 - 824.
- Marutani-Hert M, Bowman K, Mccollum G, Mirkov T, J. Evens T, Niedz R. 2012. A dark incubation period is important for *Agrobacterium*-mediated transformation of mature internode explants of sweet orange, grapefruit, citron, and a citrange rootstock. *PLoS ONE*, 7: e47426.
- Mayavan S, Subramanyam K, Jaganath B, Sathish D, Manickavasagam M, Ganapathi A. 2015. *Agrobacterium*-mediated *in planta* genetic transformation of sugarcane setts. *Plant Cell Reports*, 34 (10): 1835 - 1848.
- Nagashima Y, Koiwa H. 2017. High throughput selection of antibiotic-resistant transgenic *Arabidopsis* plants. *Analytical Biochemistry*, 525: 44 - 45.
- Peng A, Chen S, Lei T, Xu L, He Y, Wu Liu, Yao L, Zou X. 2017. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene *CsLOB1* promoter in citrus. *Plant Biotechnology Journal*, 15 (12): 1509 - 1519.
- Rai G K, Rai N P, Kumar S, Yadav A, Rathaur S, Singh M. 2012. Effects of explant age, germination medium, pre-culture parameters, inoculation medium, pH, washing medium, and selection regime on *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 48 (5): 565 - 578.
- Shah S H, Ali S, Jan S A, Jalal-Ud-Din, Ali G M. 2015. Piercing and incubation method of *in planta* transformation producing stable transgenic plants by overexpressing *DREB1A* gene in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 120 (3): 1139 - 1157.
- Supartana P, Shimizu T, Shioiri H, Nogawa M, Nozue M, Kojima M. 2005. Development of simple and efficient *in planta* transformation method for rice (*Oryza sativa* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100 (4): 391 - 397.
- Tabatabaei I, Dal Bosco C, Bednarska M, Ruf S, Meurer J, Bock R. 2018. A highly efficient sulfadiazine selection system for the generation of transgenic plants and algae. *Plant Biotechnology Journal*, 17 (3): 638 - 649.
- Zhang X, Henriques R, Lin S, Niu Q, Chua N. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols*, 1 (2): 641 - 646.
- Zhang Y, Zhang D, Zhong Y, Chang X, Hu M, Cheng C. 2017. A simple and efficient *in planta* transformation method for pommelo (*Citrus maxima*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Scientia Horticulturae*, 214: 174 - 179.
- Zhong L, Zhang Y, Liu H, Sun G, Chen R, Song S. 2016. *Agrobacterium*-mediated transient expression via root absorption in flowering Chinese cabbage. *Springer Plus*, 5 (1): 1825.
- Zhu C, Zheng X, Huang Y, Ye J, Chen P, Zhao F, Xie Z, Zhang S, Wang N, Li H, Wang L, Tang X, Chai L, Xu Q, Deng X. 2019. Genome sequencing and CRISPR/Cas9 gene editing of an early flowering mini-citrus (*Fortunella hindsii*). *Plant Biotechnology Journal*, 17 (11): 2199 - 2210.