

卷丹转基因体系构建及岷江百合 *LrCCoAOMT* 的导入

符勇耀¹, 刘建玲¹, 朱艺勇¹, 徐文姬¹, 雷美艳², 杨利平^{1,*}

(¹长江师范学院现代农业与生物工程学院, 重庆 408100; ²重庆市药物种植研究所, 重庆 408435)

摘要: 以卷丹 (*Lilium lancifolium* Thunb.) 无菌小鳞片为试材, 通过切片处理、优化农杆菌侵染浓度与时间以及重悬液和共培养基成分, 构建农杆菌介导的高效遗传转化体系。结果表明, MS + 1.5 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.5 mg · L⁻¹ NAA + 30 g · L⁻¹ 蔗糖是切片芽分化的最佳培养基, 添加 100 mg · L⁻¹ 抗坏血酸能有效抑制褐化并促进不定芽增殖。MS + 2.0 mg · L⁻¹ NAA + 30 g · L⁻¹ 蔗糖是生根诱导的最佳培养基。抗生素敏感性测试发现, 培养基中添加 Kan 100 mg · L⁻¹ 或 Hyg 75 mg · L⁻¹ 结合 Cef 400 mg · L⁻¹ 适宜抗性筛选。GUS 染色分析表明, 以去除大量元素的改良 MS + 100 μmol · L⁻¹ AS 和去除大量元素的改良 MS + 1.0 mg · L⁻¹ 6-BA + 1.0 mg · L⁻¹ NAA + 100 μmol · L⁻¹ AS 为重悬液和共培养基, 将切片在农杆菌菌液浓度 OD₆₀₀ 为 0.4, 侵染 15 min, 获得 81.72% 瞬时转化率和 25.2% 稳定遗传转化率。将岷江百合 *LrCCoAOMT* 转化卷丹, 分子检测和 GUS 染色分析表明已获得转基因阳性株系。

关键词: 卷丹; 遗传转化; *LrCCoAOMT* 基因; 抗性改良

中图分类号: S 682.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2020) 07-1345-14

Construction of Transformation System and Integration of *LrCCoAOMT* Gene into *Lilium lancifolium*

FU Yongyao¹, LIU Jianling¹, ZHU Yiyong¹, XU Wenji¹, LEI Meiyang², and YANG Liping^{1,*}

(¹School of Advanced Agriculture and Bioengineering, Yangtze Normal University, Chongqing 408100, China; ²Chongqing Institute of Medicinal Plant Cultivation, Chongqing 408435, China)

Abstract: *In vitro* aseptic bulb scales of *Lilium lancifolium* Thunb. were used as the explants to establish a highly efficient *Agrobacterium*-mediated genetic transformation system by slicing scales, optimizing the concentration and infection time of *Agrobacterium* solution, adjusting the composition of the suspension solution and co-culture medium. The results showed that MS + 1.5 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.5 mg · L⁻¹ NAA + 30 g · L⁻¹ sucrose was the optimized medium for the bud differentiation of scale slices, and adding 100 mg · L⁻¹ vitamin C in this medium can effectively inhibit the browning of scale slices and promote the proliferation of adventitious buds. For root induction, MS + 2.0 mg · L⁻¹ NAA + 30 g · L⁻¹

收稿日期: 2019-11-06; **修回日期:** 2020-04-16

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31500245); 重庆市科技局基础研究与前沿探索项目 (cstc2019jcyj-msxmX0014); 重庆市教委科学技术项目 (KJQN201801428); 重庆市科研机构绩效激励引导专项 (cstc2018jxjl-jbky130015); 重庆市人力社保局 2017 年出站留 (来) 渝博士后科研项目 (0108/01096101); 长江师范学院引进人才科研项目 (2017KYQD63); 长江师范学院生物工程与现代农业专业群科研项目 (CSZKY1813)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: yangliping1962@126.com)

sucrose was the best medium choice. Antibiotic susceptibility testing revealed that the addition of $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Kan or $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Hyg in combination with $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cef in the medium was suitable for resistance screening. Taking the modified MS + $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS as the suspension solution and the modified MS + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS as co-culture medium, the final GUS histochemical staining indicated that the transient transformation efficiency and stable transformation efficiency can reach 81.72% and 25.2%, respectively, after inoculating scale slices in the *Agrobacterium* infection solution with $\text{OD}_{600} = 0.4$ for 15 min. Moreover, *LrCCoAOMT* gene cloned from *L. regale* Wilson was transformed into *L. lancifolium* Thunb. using this genetic transformation system, and transgenic positive plants were successfully obtained based on the molecular analysis and GUS staining.

Keywords: *Lilium lancifolium*; genetic transformation; *LrCCoAOMT* gene; resistance improvement

卷丹 (*Lilium lancifolium* Thunb.) 在中国大部分地区均有分布, 是非常罕见的三倍体种质 (杨利平等, 1997; 王志刚等, 2014)。在卷丹主产区, 主要采用鳞茎、分球等无性繁殖的生产方式, 常因病毒聚集而导致种性退化和品质下降 (杨利平和宋晓宏, 2013; 赵祥云和王文和, 2017)。因此, 培育具有抗病能力的卷丹具有重要的科学意义。以往百合的遗传改良主要依赖于传统育种, 然而卷丹为三倍体, 其作为母本育种通常不能成功。利用转基因技术不仅可以避免传统育种中雌蕊或雄蕊不育以及自交不亲和等问题 (Bakhshaie et al., 2016), 而且通过定向修饰目的性状, 可缩短育种周期, 为卷丹分子遗传改良提供新途径。近年来百合转基因研究已取得一些进展, 如刘菊华等 (2003) 以带有微量愈伤组织的鳞片叶盘为转化受体, 通过农杆菌介导法将几丁质酶基因和 β -1,3 葡聚糖酶基因导入龙牙百合; 王进忠等 (2005) 利用含商陆抗病毒蛋白基因 *PAP* 的工程菌侵染麝香百合, 获得转基因阳性植株; Azadi 等 (2011) 将黄瓜花叶病毒复制酶基因缺失片段 (CMV2-GDD) 通过农杆菌介导法导入百合 ‘Acapulco’, 获得了转基因抗性株系; Núñez de Cáceres 等 (2015) 利用水稻几丁质酶基因 *RCH10* 转化东方百合品种 ‘Star Gazer’, 获得抗灰霉菌 (*Botrytis cinerea*) 的转基因植株。然而, 有关卷丹的转基因方法研究未见报道。

本研究中选用的 *LrCCoAOMT* 基因为岷江百合 (*L. regale* Wilson) 咖啡酰辅酶 *A-O*-甲基转移酶 (caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase) 基因, 其与 NCBI 数据库中公布的岷江百合 caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase-like (*CCoAOMT-like*, KX842497.1) 基因有 73.86% 的相似性。目前有关 *LrCCoAOMT* 的功能研究未见报道, 但其同源基因参与木质素单体的合成调控、抗盐和干旱胁迫以及抗腐生性真菌病害 (Yang et al., 2017; 王宇光等, 2018; 俞子承等, 2019)。岷江百合为优良的抗病野生种质, 符勇耀等 (2019) 发现 *LrCCoAOMT* 具有增强植物对病原真菌抗性 & 提高植株抗倒伏的生物学功能。

本研究中选择卷丹鳞茎为试材, 以无菌小鳞片为转化受体, 通过切片 (伤口) 处理、农杆菌感染浓度和时间优化以及改变培养基成分等, 构建农杆菌介导的卷丹遗传转化体系, 并将 *LrCCoAOMT* 导入卷丹, 以获得转基因阳性株系, 为今后培育卷丹的抗病优良品种奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 卷丹的再生体系

卷丹鳞茎采自重庆市药物种植研究所百合种植基地。初代培养基为 MS + 6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +

NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 继代增殖培养基为 MS + 6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (杨利平和宋晓宏, 2013)。为了得到芽分化和生根诱导最佳培养基, 以 MS 为基本培养基, 设计不同浓度的植物生长调节剂配比进行优化 (6-BA 为 $0 \sim 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; NAA 为 $0.2 \sim 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。为防止无菌小鳞片切片发生褐化, 以最佳芽分化培养基为基础, 添加活性炭 (Ac, 0.1% 或 0.2%) 和抗坏血酸 (Vitamin C, 50、75 或 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 进行筛选。培养基均采用固体形式, 含琼脂 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.5 ~ 6.0。

以卷丹鳞茎为试材, 将鳞片剥下, 用洗衣粉浸泡后在自来水下冲洗 3 h 左右, 置于超净工作台, 用 75%乙醇消毒 30 s, 无菌水冲洗 2 次, 0.2%升汞溶液中继续浸泡 12 min, 无菌水冲洗 5 次。用解剖刀切成 $1.0 \text{ cm} \times 1.0 \text{ cm}$ 方块, 凹面朝上接种于初代培养基。光照培养 3 ~ 4 周, 将不定芽转至继代增殖培养基中进行增殖培养。培养 20 ~ 30 d 获得无菌小鳞片, 转入生根培养基中获得组培苗。培养温度为 $(23 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ 、光照强度为 $6\ 000 \sim 8\ 000 \text{ lx}$ 、光照周期为 16 h/8 h。

1.2 卷丹的遗传转化

1.2.1 质粒、菌种和培养基

转化质粒 pLGNe (含 *GUS* 报告基因) 由中国农业科学院柑橘研究所李强博士惠赠, 农杆菌菌种为 EHA105。农杆菌介导的转化培养基如表 1 所示。利福平 (Rifampicin, Rif)、卡那霉素 (Kanamycin, Kan)、头孢霉素 (Cefotaxime, Cef)、潮霉素 (Hygromycin, Hyg) 和乙酰丁香酮 (Acetosyringone, AS) 为 Sigma 公司产品, 5-溴-4-氯-3-吲哚葡聚糖醛酸苷 (5-bromo-4-chloro-3-indolylglucuronide, X-Gluc) 购自北京酷来博科技有限公司, 其他常规试剂均为国产分析纯试剂。

表 1 农杆菌转化重悬液和共培养培养基

Table 1 Suspension solution and co-culture medium for *Agrobacterium*-mediated transformation

培养基 Medium	培养基组成 Medium component
重悬液 A1 Suspension solution A1	MS + AS $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
重悬液 A2 Suspension solution A2	MS - (KH_2PO_4 , NH_4NO_3 , KNO_3 , CaCl_2) + AS $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
共培养基 B1 Co-culture medium B1	MS + 6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + AS $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
共培养基 B2 Co-culture medium B2	MS - (KH_2PO_4 , NH_4NO_3 , KNO_3 , CaCl_2) + 6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + AS $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

1.2.2 抗生素敏感性测试

将外植体接种在含不同浓度 Cef (100 、 200 、 400 和 $800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、Kan (0 、 50 、 75 、 100 和 $125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 Hyg (0 、 12.5 、 25 、 50 、 75 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的最佳芽分化培养基中, 45 d 时根据出芽、生根情况确定转化后 Cef、Kan 或 Hyg 筛选转化植株的最适浓度。

1.2.3 农杆菌菌液的准备

取 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存的 EHA105 (含 pLGNe 质粒) 工程菌菌株, 用划线法接种于含 Kan $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 Rif $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的酵母甘露醇固体培养基 (YEB); $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 36 ~ 48 h 后, 用 $10 \mu\text{L}$ 移液枪枪头挑选单菌落菌株, 接种于含相应抗生素的 YEB 液体培养基中, 于 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 、转速 $180 \sim 250 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 振荡培养 24 h 获得 1 第 1 次活化菌液; 再按体积比 1 : 100 加入 YEB 液体培养基活化, 振荡培养约 12 h, 使 $\text{OD}_{600} = 0.6 \sim 0.8$ 。在超净工作台将菌液倒入 50 mL 离心管中, 用封口膜封好, $5\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后收集菌体, 用重悬液 A1 和重悬液 A2 分别重悬稀释至 $\text{OD}_{600} = 0.2$ 或 0.4 。

1.2.4 农杆菌侵染外植体

取生长状态良好的卷丹无菌小鳞茎, 剥取小鳞片, 然后用解剖刀横切成 $2 \sim 3 \text{ mm}$ 的薄层切片。

将转化受体（无菌小鳞片或薄层切片）分别侵染 5、10 和 15 min，且浸泡过程中缓慢的摇晃使菌液与转化受体充分接触，以未侵染的外植体为对照。将转化受体从菌液中取出，用无菌滤纸吸干多余菌液，接种至共培养基上暗培养 3 d。

1.2.5 转基因材料的筛选

将转化受体材料用无菌水洗净，用无菌滤纸吸干水后转接到含 Kan 100 mg · L⁻¹、Cef 400 mg · L⁻¹ 的芽分化培养基上进行培养，每 15 d 更换 1 次培养基。当叶片基部膨大形成小鳞片时，转入到含 Kan 100 mg · L⁻¹ 的生根培养基中诱导生根。

1.2.6 GUS 组织化学染色

以未转化同步材料为对照，取选择培养 2 周的无菌小鳞片或切片，分别浸泡于含 1 mg · mL⁻¹ X-Gluc 的缓冲液中，置于 37 °C 反应 6 h，检测 *GUS* 基因在卷丹中的瞬时表达情况。取对照和抗性植株幼苗浸泡于上述 *GUS* 染色液中，进行 37 °C 酶反应 3 ~ 4 h，依次用 50%、70% 和 95% 乙醇脱色，观察并记录 *GUS* 在卷丹中稳定表达结果。

1.3 表达载体的构建及转基因阳性植株筛选

1.3.1 植物双元表达载体的构建

重组质粒 pBI121-35S:: *LrCCoAOMT*-NOS 由实验室保存。质粒 pCAMBIA1301 由北京林业大学园林学院贾桂霞教授惠赠。利用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Bam*H I (TaKaRa) 双酶切质粒 pBI121-35S:: *LrCCoAOMT*-NOS 和 pCAMBIA1301，然后分别回收 35S:: *LrCCoAOMT* 表达框和 pCAMBIA1301 载体骨架，利用 T4 连接酶 (NEB) 连接转化大肠杆菌，获得重组质粒 pCAMBIA1301-35S:: *LrCCoAOMT*，转化农杆菌 EHA105 备用。

1.3.2 转 *LrCCoAOMT* 基因阳性植株筛选

卷丹遗传转化采用已构建的方法，转基因植株筛选采用 400 mg · L⁻¹ Cef 和 75 mg · L⁻¹ Hyg 进行。采用常规 PCR 方法对抗性筛选的转基因植株进行检测。根据 *CaMV35S* 和 *LrCCoAOMT* 基因序列，设计特异性引物 35S-F: AGAAGACGTTCCAACCACGTCT 和 *LrCCoAOMT*-R: GCAACATATCACTTGATGCGG。采用 CTAB 法分别从野生型对照和转化植株叶片提取基因组 DNA 为模板，PCR 反应体系为 20 μL，反应程序为 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 38 个循环; 72 °C 7 min。用凝胶电泳分析 PCR 扩增产物。采用 *GUS* 组织化学染色法对转化植株进行分析。取转化幼苗浸泡于含 X-Gluc 的 *GUS* 染液中，37 °C 酶反应 3 ~ 4 h，乙醇脱色后观察其表达情况。进一步采用荧光定量 PCR (qRT-PCR) 对转化幼苗中 *LrCCoAOMT* 基因进行检测。提取转化幼苗和对照组总 RNA，反转录 cDNA，以 *LrCCoAOMT*-QF: ACAATTACCTTAACCTATCACCGCC 和 *LrCCoAOMT*-QR: TATCGCACATACTTCCGCGAG 为引物，*18S rRNA* 为内参 (*18S*-QF: CGCAAGGCTGAAACTTAAAGG, *18S*-QR: CAGACAAATCGCTCCACCAAC)，参照 Wang 等 (2014) 的方法进行 qRT-PCR，计算目的基因相对表达量。

1.4 数据统计分析

使用 Excel 和 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析。采用 Duncan's 多重比较法和 *t* 检验进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 不定芽和生根诱导培养基的筛选

2.1.1 不定芽诱导培养基的筛选与褐化控制

将鳞片切片接种于 6 种不同植物生长调节剂配比的 不定芽诱导培养基上, 接种 13~15 d 后, 外植体表面出现小凸起, 20~25 d 后有嫩绿色的不定芽出现, 45 d 后观察发现, 培养基 (MS + 6-BA 1.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.5 mg · L⁻¹) 的不定芽诱导效果最好, 诱导率为 75%, 平均每个接种鳞片不定芽数达 4.88。鳞片切片在各个处理的培养基中均发生明显褐化, 其平均褐化率为 31.25% (表 2)。

表 2 不同 MS 培养基对切片不定芽诱导的影响

Table 2 The effect of different media on the regeneration of shoots

MS/ (mg · L ⁻¹)		切片数 Number of inoculated slices	诱导切片数 Number of slice induction	芽诱导率/% Shoot inductivity	褐化数 Browning number	褐化率/% Browning rate	不定芽总数 Total number of shoots	平均每个切片出芽数 Number of shoots per slice on average
6-BA	NAA							
0.5	0.2	40	30.00 ± 2.08 a	75.00 ± 5.20 a	10.00 ± 2.08 b	25.00 ± 5.20 b	137.00 ± 21.94 b	3.43 ± 0.55 b
0.5	0.5	40	26.00 ± 1.00 ab	65.00 ± 2.50 ab	14.00 ± 1.00 ab	35.00 ± 2.50 ab	127.00 ± 17.90 b	3.18 ± 0.45 b
1.0	0.2	40	22.00 ± 1.15 b	55.00 ± 2.89 b	18.00 ± 1.15 a	45.00 ± 2.89 a	97.00 ± 4.04 b	2.43 ± 0.10 b
1.0	0.5	40	28.00 ± 0.58 ab	70.00 ± 1.44 ab	12.00 ± 0.58 ab	30.00 ± 1.44 ab	138.00 ± 1.73 b	3.45 ± 0.04 b
1.5	0.2	40	28.90 ± 4.61 ab	72.23 ± 11.32 ab	11.10 ± 4.61 ab	27.77 ± 11.32 ab	141.00 ± 21.94 b	3.53 ± 0.55 b
1.5	0.5	40	30.00 ± 0.58 a	75.00 ± 1.44 a	10.00 ± 0.58 b	25.00 ± 1.44 b	195.00 ± 0.58 a	4.88 ± 0.01 a

注: 表中数据为平均值 ± 标准误; 同列数值后字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

Note: The data in the table represent mean ± standard deviation. Different letters behind each column mean significant difference ($P < 0.05$). The same below.

为了降低褐变的影响, 在上述不定芽诱导最好的培养基的基础上加入不同浓度活性炭或抗坏血酸。30 d 后统计结果 (表 3) 表明, 在附加抗坏血酸的培养基上, 褐变率显著降低, 而不定芽诱导数较高。含 100 mg · L⁻¹ 抗坏血酸的培养基褐变率仅为 3.33%。

表 3 MS 培养基中不同抑制剂对切片褐化的影响

Table 3 Effects of different inhibitors on browning of the slices in MS medium

抗坏血酸/ (mg · L ⁻¹) Vitamin C	活性炭/% Ac	切片数 Number of inoculated slices	褐变数 Browning number	褐化率/% Browning rate	诱导切片数 Number of slice induction	芽诱导率/% Shoot inductivity	不定芽总数 Total number of shoots	平均每个切片 出芽数 Number of shoots per slice on average
0	0	60	20.00 ± 4.62 a	33.33 ± 7.70 a	40.33 ± 4.62 b	66.67 ± 7.70 b	253.00 ± 12.50 b	4.22 ± 0.36 b
50	0	60	4.00 ± 0.58 b	6.67 ± 0.96 b	55.67 ± 0.58 a	93.33 ± 0.96 a	278.00 ± 22.52 ab	4.63 ± 0.65 ab
75	0	60	6.00 ± 1.73 b	10.00 ± 2.89 b	54.00 ± 1.73 a	90.00 ± 2.89 a	314.00 ± 24.83 a	5.23 ± 0.72 a
100	0	60	2.00 ± 0.58 b	3.33 ± 0.96 b	58.33 ± 0.58 a	96.67 ± 0.96 a	328.00 ± 20.78 a	5.47 ± 0.60 a
0	0.1	60	24.00 ± 2.31 a	40.00 ± 3.85 a	36.33 ± 2.31 b	60.00 ± 3.85 b	94.00 ± 6.25 c	1.57 ± 0.18 c
0	0.2	60	20.00 ± 2.31 a	33.33 ± 3.85 a	39.67 ± 2.31 b	66.67 ± 3.85 b	102.00 ± 1.15 c	1.73 ± 0.03 c

注: 基本培养基为 MS + 6-BA 1.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.5 mg · L⁻¹。

Note: Base medium is MS + 6-BA 1.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.5 mg · L⁻¹.

2.1.2 不同培养基对诱导生根的影响

将鳞片接种于添加 6-BA 和 NAA 6 种不同配比的 MS 诱导培养基中, 生根诱导 40 d 后统计 (表

4), 在只添加 2.0 和 1.0 mg · L⁻¹ NAA 的培养基中有大量根和根原基发生, 根洁白, 诱导率均为 90% 以上, 但 MS + NAA 2.0 mg · L⁻¹ 诱导的根系更加粗壮, 因此, 将其作为生根诱导培养基。

表 4 不同 MS 培养基对生根诱导的影响

Table 4 Effects of the MS medium on the root induction

MS/ (mg · L ⁻¹)		接种鳞片数 Number of explants	诱导生根数 Number of root induction	诱导率/% Induction rate	根和根原基 Root and root primordium
6-BA	NAA				
0.5	2.0	60	45.00 ± 2.31 b	75.25 ± 3.86 b	大量, 洁白 A lot, white
1.0	2.0	60	8.00 ± 0.00 d	13.33 ± 0.00 d	根少, 洁白, 粗壮 Few roots, white and strong
0	2.0	60	55.00 ± 2.31 a	91.66 ± 3.85 a	大量, 洁白, 粗壮 A lot, white and strong
0.5	1.0	60	32.00 ± 1.15 c	53.44 ± 1.93 c	较少, 洁白 Less, white
1.0	1.0	60	30.00 ± 1.73 c	49.76 ± 2.90 c	较少, 洁白 Less, white
0	1.0	60	56.00 ± 1.15 a	93.33 ± 1.93 a	大量, 洁白 A lot, white

2.2 农杆菌介导的遗传转化条件筛选

2.2.1 抗生素敏感性测试分析

将无菌小鳞片近轴面向上分别接种于含 3 种不同浓度抗生素 (Cef、Kan 和 Hyg) 的 MS 培养基中, 40 d 后观察对不定芽再生的影响 (表 5), 发现随着抗生素浓度的增加, 再生芽数减少, 不定芽再生率逐渐降低。抗生素浓度较低时, 鳞片发芽正常, 当 Kan 和 Hyg 浓度分别为 100 和 75 mg · L⁻¹ 时, 发芽量显著降低并呈萎缩趋势, 而浓度分别增至 125 和 100 mg · L⁻¹ 时, 无芽和根发生。可见, 100 mg · L⁻¹ Kan 和 75 mg · L⁻¹ Hyg 可以有效抑制未转化受体的不定芽分化。对于 Cef 而言, 添加 400 mg · L⁻¹ 时, 鳞片正常出芽; 而 600 mg · L⁻¹ 时大部分鳞片能正常发芽; 800 mg · L⁻¹ 时, 鳞片部分死亡。因此, 选择 100 mg · L⁻¹ Kan 或 75 mg · L⁻¹ Hyg 结合 400 ~ 600 mg · L⁻¹ Cef 筛选转化植株。

表 5 抗生素浓度对不定芽分化的影响

Table 5 The effect of the antibiotic concentration on the shoot induction

处理 Treatment	浓度/ (mg · L ⁻¹) Concentration	接种鳞片数 Number of explants	诱导出芽鳞片数 Number of explants which formed buds	芽再生率/% Regeneration rate of shoots	不定芽生长 Shoot growth
对照 Control	0	50	49.33 ± 0.67 a	98.67 ± 1.33 a	量大, 深绿色 A lot, dark green
Cef	200	50	49.67 ± 0.33 a	99.33 ± 0.67 a	正常, 深绿色 Normal, dark green
	400	50	47.67 ± 0.33 a	95.34 ± 0.67 a	正常, 深绿色 Normal, dark green
	600	50	42.00 ± 0.58 b	84.00 ± 1.15 b	大部分正常, 绿色 Most normal, green
	800	50	37.00 ± 0.58 c	74.00 ± 1.76 c	部分正常, 部分死亡 Some normal, some dead
Kan	50	50	42.67 ± 0.33 b	85.34 ± 0.67 b	有芽, 深绿色 Budding, dark green
	75	50	28.67 ± 0.88 c	57.34 ± 1.15 c	量少, 较绿 Less, more green
	100	50	15.00 ± 0.58 d	30.00 ± 1.15 d	极少量, 淡绿色 Little, light green
	125	50	0.33 ± 0.33 e	0.67 ± 0.67 e	无 None
	12.5	50	29.67 ± 0.33 a	59.33 ± 0.67 a	有芽, 深绿色 Budding, dark green
Hyg	25	50	25.33 ± 0.33 b	50.67 ± 0.67 b	量少, 较绿 Less, more green
	50	50	6.33 ± 0.88 c	12.67 ± 1.76 c	极少量, 淡绿色 Little, light green
	75	50	3.00 ± 0.58 cd	6.00 ± 1.15 cd	极少量 Little
	100	50	0 d	0 d	无 None

2.2.2 不同转化受体对转化效率的影响

将共培养的无菌小鳞片或鳞片切片 (图 1) 在芽分化培养基中培养 7 d, 以未转化材料为对照, 进行 GUS 染色。

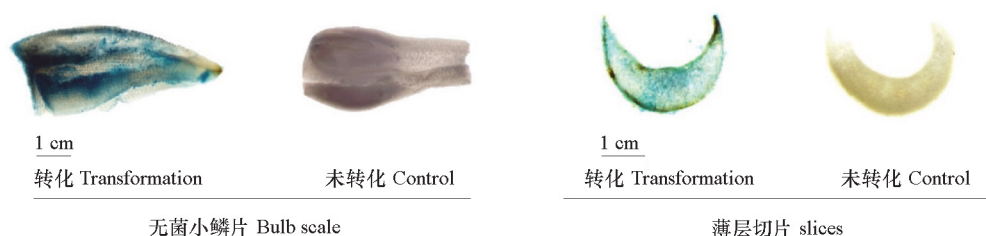


图 1 无菌小鳞片和薄层切片瞬时转化的 GUS 染色分析
Fig. 1 Analysis of GUS staining on the bulb scales and slices

结果 (表 6) 表明, *GUS* 基因均能导入卷丹, 以无菌小鳞片为受体的 *GUS* 瞬时转化效率最高可达 21.67%, 而以鳞片切片为受体的 *GUS* 瞬时转化效率最高可达 81.72%; 并且前者被农杆菌侵染后容易出现污染, 污染率最高为 24.44%, 而后者几乎没有污染。因此, 以鳞片切片为外植体材料有利于农杆菌侵染和外源基因的导入, 转化效率更高; 并且农杆菌更容易去除, 无污染。在后续试验中选择以鳞片切片为转化受体构建卷丹的高效遗传转化体系。

表 6 农杆菌介导的瞬时转化
Table 6 The results of the *Agrobacterium*-mediated transient transformation

重悬液 Suspension solution	共培养基 Co-culture medium	OD ₆₀₀ 侵染浓度 Suspension concentration	侵染时间/ min Infection time	鳞片受体 Scales			切片受体 Slices		
				鳞片数 Scales number	污染率/% Pollution rate	瞬时转化率/% Transient transformation rate	切片数 Slices number	污染率/% Pollution rate	瞬时转化率/% Transient transformation rate
A1	B1	0.2	5	60	19.44 ± 3.09 ab	1.11 ± 0.56 h	62	0 b	31.78 ± 2.68 g
			10	60	5.55 ± 1.47 c	10.55 ± 1.47 cd	62	0.56 ± 0.56 b	35.86 ± 0.64 fg
			15	60	10.55 ± 1.47 bc	21.67 ± 0.96 a	62	0.54 ± 0.54 b	38.51 ± 3.90 ef
		0.4	5	60	22.78 ± 2.42 a	1.66 ± 0.96 h	62	0 b	18.81 ± 0.30 h
			10	60	19.44 ± 2.00 ab	18.33 ± 0.96 b	60	2.78 ± 1.47 a	43.33 ± 1.93 de
			15	60	24.44 ± 3.09 a	6.67 ± 0.96 ef	60	0 b	53.33 ± 2.89 c
A2	B2	0.2	5	60	6.67 ± 1.93 c	3.88 ± 0.56 fgh	62	1.04 ± 1.04 a	44.10 ± 0.45 d
			10	60	11.67 ± 0.96 bc	5.56 ± 0.56 fg	62	0 b	50.02 ± 0.95 c
			15	60	16.11 ± 3.38 ab	9.45 ± 1.47 de	60	0.67 ± 0.67 b	68.30 ± 0.17 b
		0.4	5	60	13.33 ± 2.55 bc	2.78 ± 1.11 gh	60	0 b	50.00 ± 0.00 c
			10	60	16.67 ± 3.33 ab	9.44 ± 1.11 de	60	0.56 ± 0.56 b	70.00 ± 0.00 b
			15	60	23.89 ± 4.55 a	13.33 ± 0.96 c	62	0 b	81.72 ± 0.05 a

注: A1、B1、A2、B2 同表 1。下同。

Note: A1, B1, A2, B2 is the same as Table 1. The same below.

2.2.3 农杆菌浓度和侵染时间对转化效率的影响

以鳞片切片为转化受体的瞬时转化结果 (表 6) 显示, 在同一菌液浓度条件下, 随着侵染时间的增加, 瞬时转化率有所提高。农杆菌浓度 OD₆₀₀ 为 0.4 较 0.2 而言, 瞬时转化率明显提高。菌液浓度 OD₆₀₀ 为 0.4, 侵染 15 min, 以去除大量元素的改良 MS 为重悬液和共培养基 (A2 和 B2), 其瞬时转化率最高 (81.72%)。

以鳞片切片为转化受体的稳定遗传转化结果 (表 7 和图 2) 表明, 当农杆菌浓度 OD₆₀₀ 为 0.4, 侵染 15 min, 重悬液和共培养基成分为去除大量元素的改良 MS 培养基时, 稳定转化率高达 25%。

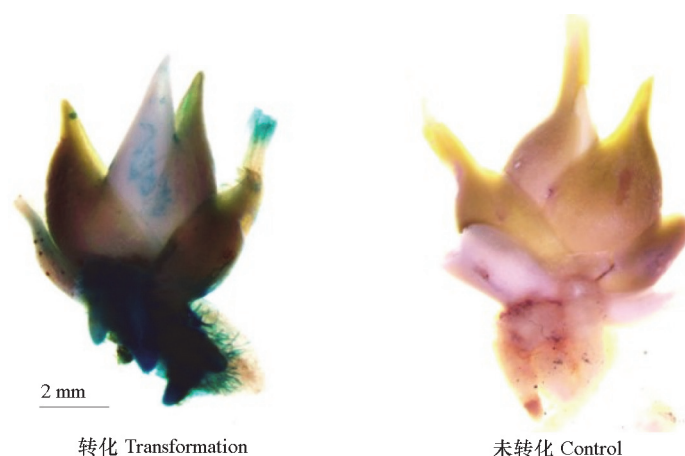


图 2 转化幼苗的 GUS 染色分析
Fig. 2 Analysis of GUS staining on transformed seedlings

表 7 切片的农杆菌遗传转化

Table 7 The results of *Agrobacterium*-mediated transformation for slices

重悬液 Suspension solution	共培养基 Co-culture medium	OD ₆₀₀ 侵染浓度 Suspension concentration	侵染时间/min Infection time	转化切片数 Number of transformation slices	诱导切片数 Induction of slices	诱导率/% Induction rate	选培不定芽数 Number of shoots for culture		
A1	B1	0.2	5	61	41	67.21	97.67±0.88 a		
			10	57	31	54.39	47.67±2.02 g		
			15	64	37	57.81	87.67±1.45 b		
		0.4	5	61	19	31.15	44.00±1.00 g		
			10	62	39	62.90	68.67±1.76 de		
			15	63	36	57.14	65.00±1.15 e		
		A2	B2	0.2	5	56	38	67.86	34.00±2.08 h
					10	63	53	84.13	82.00±1.53 c
					15	66	46	69.70	54.67±1.45 f
0.4	5			68	56	82.35	46.67±1.20 g		
	10			56	37	66.07	73.00±1.76 d		
	15			60	30	50.00	87.67±0.33 b		
重悬液 Suspension solution	共培养基 Co-culture medium	OD ₆₀₀ 侵染浓度 Suspension concentration	抗性筛选存活幼苗数 Number of surviving seedlings	GUS 染蓝数 Number of GUS stained seedlings	GUS 转化率/% Transformation rate of GUS				
A1	B1	0.2	87.67±1.45 a	9.00±1.00 bc	10.24±0.99 e				
			33.67±1.45 f	3.00±0.58 e	8.84±1.55 e				
			67.67±1.20 b	8.00±1.00 bcd	11.78±1.25 de				
		0.4	34.67±0.88 f	3.00±0.58 e	8.61±1.56 e				
			62.33±0.88 c	9.67±0.88 ab	16.54±1.17 bcd				
			55.00±1.15 d	7.00±1.15 cd	12.65±1.84 cde				
A2	B2	0.2	21.33±1.52 g	3.00±1.15 e	13.65±4.67 cde				
			48.67±1.20 e	9.00±0.58 bc	18.21±0.76 bc				
			31.67±1.76 f	6.00±1.15 d	18.67±2.64 bc				
		0.4	32.67±1.45 f	6.00±0.58 d	18.28±0.96 bc				
			45.67±2.33 e	10.00±1.15 ab	21.76±1.45 ab				
			47.67±0.88 e	12.00±0.58 a	25.15±0.76 a				

2.2.4 悬浮液和共培养基成分对转化效率的影响

有研究表明, 去除大量元素的改良 MS 作为重悬液和共培养基成分可以显著提高农杆菌介导的新铁炮百合 (*Lilium formolongi* Hort.) 或 ‘Acapulco’ 百合的遗传转化效率 (Azadi et al., 2010)。本试验中, 在以鳞片切片为受体材料的农杆菌转化试验中, 选择去除大量元素的改良 MS 为重悬液

和共培养基, 在同一菌液浓度和侵染时间条件下, 其瞬时转化效率和稳定遗传转化效率均较未去除大量元素的 MS 培养基显著提高 (表 6), 与前人研究结果相符合。另外, 在悬浮液和共培养基成分中去除乙酰丁香酮 AS 将明显降低瞬时转化效率, 表明乙酰丁香酮 AS 对农杆菌介导的卷丹遗传转化具有重要作用。

2.3 pCAMBIA1301-35S:: *LrCCoAOMT* 表达载体的构建

对 pBI121-35S:: *LrCCoAOMT*-NOS 和 pCAMBIA1301 两个重组质粒进行酶切。经过 *Hind* III 和 *Eco*R I 双酶切后, pBI121-35S:: *LrCCoAOMT*-NOS 质粒可以得到 2 000 bp 左右条带 (35S:: *LrCCoAOMT*-NOS) 和大于 10 000 bp 大片段; pCAMBIA1301 质粒可以得到 11 800 bp 左右线性大片段。分别纯化回收 2 000 bp 左右条带 (35S:: *LrCCoAOMT*-NOS) 和 11 800 bp 线性大片段, 连接后转化大肠杆菌, 通过菌落 PCR 鉴定阳性克隆 (图 3, A)。进一步通过质粒酶切分析, *Hind* III 和 *Eco*R I 双酶切验证 (图 3, B), 获得重组表达载体 pCAMBIA1301-35S:: *LrCCoAOMT*。

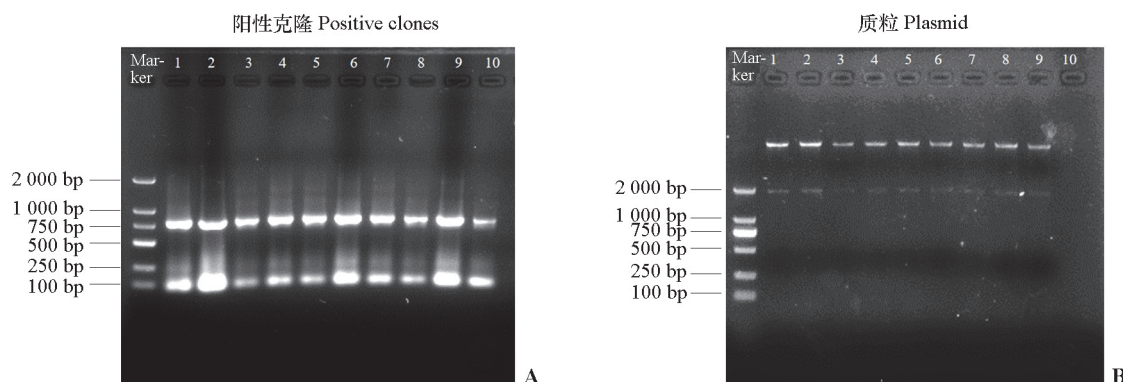


图 3 抗性平板上阳性克隆的 PCR 检测 (A) 和质粒 *Hind* III 和 *Eco*R I 双酶切分析 (B)

Fig. 3 Detection of positive clones on resistant plates by PCR (A) and plasmid digestion by *Hind* III and *Eco*R I (B)

2.4 抗性植株的获得及检测

卷丹鳞片切片被农杆菌侵染后共培养 3 d, 转移至含 Kan 抗性的芽分化培养基中 (图 4, a), 经过 20 d 左右选择培养, 形成单个抗性芽 (图 4, b), 约 35 d 后形成大量抗性丛生芽 (图 4, c), 然后继续培养约 30 d, 丛生芽基部发生膨大形成小鳞片 (图 4, d), 将其接入生根培养基培养, 再经过 40 d 左右开始生根, 根为白色 (图 4, e), 最后获得无菌的抗性组培苗。组培苗长到 7~8 cm 时移栽至室外培养。

从生根培养基中选取抗性组培苗, 提取基因组 DNA 进行 PCR 检测。22 个抗性筛选的转基因幼苗中有 5 个扩增出目标条带, 而未转化植株没有相应条带 (图 5)。

GUS 染色分析证实, 扩增出目标条带的转基因幼苗中大部分 (4/5) 被染成蓝色 (图 6)。

为进一步确认外源基因导入, 进行 qRT-PCR 分析 (图 7), 转化幼苗株系中 *LrCCoAOMT* 基因相对于未转化幼苗均显著上调表达。

综上所述, *LrCCoAOMT* 基因已成功转化卷丹。

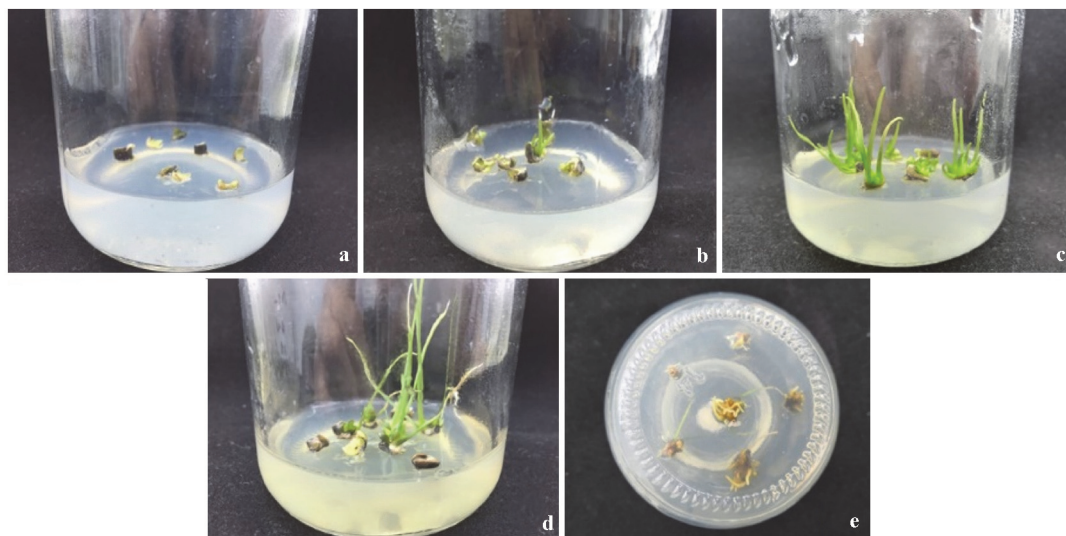


图4 卷丹转化植株的再生过程

a: 鳞片切片; b: 抗性芽; c: 大量丛生芽; d: 继代培养; e: 生根培养。

Fig. 4 The regeneration process of transgenic *Lilium lancifolium* plants

a: Scale slices; b: Resistant buds; c: Cluster resistant buds; d: Subculture; e: Rooting.

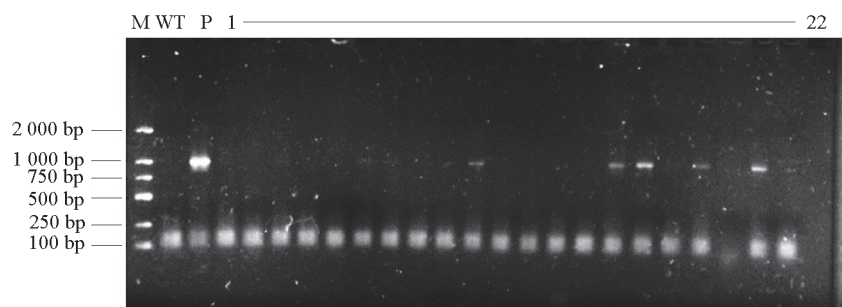


图5 抗性筛选卷丹幼苗的PCR检测

M: Marker 2000; WT: 野生型; P: 阳性质粒; 1~22: 转基因幼苗。

Fig. 5 Detection of *Lilium lancifolium* seedlings based on resistance screening by PCR

M. Marker 2000; WT. Wild-type; P. Positive control plasmid; 1 - 22. Transgenic *Lilium lancifolium* seedlings.

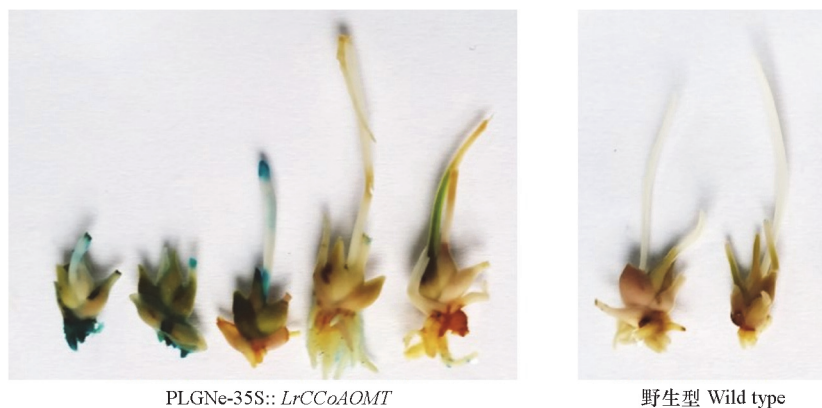


图6 卷丹幼苗的GUS染色分析

Fig. 6 GUS staining analysis of transgenic *Lilium lancifolium* seedlings

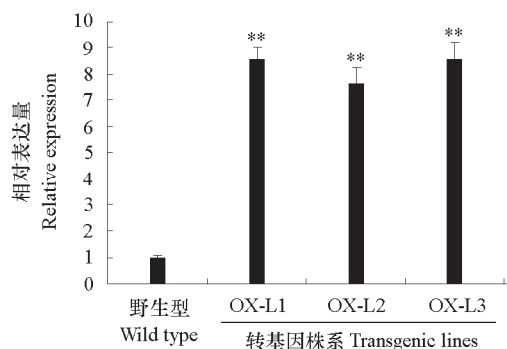


图7 卷丹转 *LrCCoAOMT* 基因株系的 qRT-PCR 检测

**：具有差异显著性， $P < 0.01$ 。

Fig. 7 Analysis of transcript levels of *LrCCoAOMT* in transgenic lines by qRT-PCR

** means significant difference, $P < 0.01$.

3 讨论

自 Cohen 和 Meredith (1992) 和 Langeveld 等 (1995) 发现农杆菌可以侵染百合以来, 关于农杆菌介导的遗传转化、基因枪转化和电激转化等方法先后被运用于百合转基因研究。农杆菌介导的转化因具有成本低廉、导入外源基因拷贝数少、发生可遗传变异且后代遗传简单等优点 (Travella et al., 2005; Zhang et al., 2005; Li et al., 2018), 已经在多种野生百合, 如铁炮百合、龙牙百合、兰州百合和其他百合品种, 如‘西伯利亚’百合、新铁炮百合、‘索邦’百合中得以实现, 是目前最广泛使用的外源基因导入法 (Bakhshaie et al., 2016)。卷丹是我国三大食用百合之一, 也作药用, 同时被广泛应用于园林绿化 (赵祥云和王文和, 2017; 杨盼盼 等, 2018)。但是, 国内外有关农杆菌介导的卷丹遗传转化研究未见报道。本研究以卷丹无菌小鳞片切片为外植体, 首先构建其再生体系, 分析抗生素敏感性, 通过优化农杆菌侵染浓度与时间、重悬液和共培养基成分, 建立农杆菌介导的高效转化体系。

在植物再生体系中, 伤口处理会导致酚酸类物质发生氧化形成有色物质, 即褐化现象, 严重影响外植体的分化。研究表明, 在培养基中添加 PVP (聚乙烯吡咯烷酮)、抗坏血酸或活性炭可以抑制卷丹褐变的发生 (梁春辉 等, 2017)。在本试验中, 以鳞片切片为试材, 在培养基中添加 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗坏血酸可有效抑制褐化发生, 并促进不定芽增殖。该结果比梁春辉等 (2017) 利用抗坏血酸调控卷丹组培褐变的效果更好, 其原因可能是所选用外植体材料差异。

抗生素敏感性测试是构建遗传转化体系的关键步骤, 选择正确的抗生素及其适宜浓度为筛选转基因阳性植株提供基础。本试验表明, Hyg 和 Kan 均能有效抑制无菌小鳞片出芽生长, 但 Hyg 对外植体的抑制作用更强, 芽再生率约为 50% 的浓度为 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 而 Kan 的作用较温和, 芽再生率约为 50% 的浓度为 $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。选择 $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Hyg 或 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Kan 是适合卷丹抗性筛选的适宜浓度。这与新铁炮百合和‘索邦’百合对 Hyg 或 Kan 的敏感性不同, 前者对 Hyg 过于敏感, 不适合用于抗性筛选; 而两者对 Kan 的敏感性均高于卷丹, 芽再生率约为 50% 的浓度为 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (李邱华 等, 2008; 刘光欣 等, 2010)。

在农杆菌介导的遗传转化中, 外植体材料、农杆菌菌液浓度与侵染时间对转化效率有着重要影响 (Hoshi et al., 2004; Dong et al., 2007; Liu et al., 2011)。目前, 百合转化多数选择愈伤组织、

鳞片或鳞片叶为材料(黄洁等, 2012; Bakhshaie et al., 2016), 也有利用茎的切片为转化受体(Liu et al., 2011; Núñez de Cáceres et al., 2011), 但以无菌小鳞片切片为外植体的研究未见报道。本试验中, 通过比较无菌小鳞片及其切片为外植体的试验表明, 前者在转化后容易发生农杆菌污染现象, 即使采用脱菌处理和提高培养基中 Cef 浓度, 污染率仍然较高。这可能是因为无菌小鳞片两边内卷, 形成凹槽, 农杆菌侵染后不易清洗; 而切片更容易清洗, 其污染率很低。另外, 以切片为转化受体诱导形成不定芽的时间更短, 大约为 18 d, 而以无菌小鳞片为转化受体则需要 25 d 左右。与前期研究(杨利平和宋晓宏, 2013)相比, 其不定芽诱导率也明显提高。一般认为, 提高菌液浓度和侵染时间有助于提高转化效率, 在试验中发现, 相同侵染时间条件下, 农杆菌浓度 OD₆₀₀ 为 0.4 的转化效率普遍高于 OD₆₀₀ 为 0.2, 但是在以无菌小鳞片为转化受体的研究中, 其污染率也相应提高。在相同菌液浓度条件下, 侵染时间越长, 其瞬时转化效率也相应提高。

研究表明, 侵染悬浮液和共培养基成分是影响农杆菌介导遗传转化的关键因素(Azadi et al., 2010; Wang et al., 2012; Nobakht et al., 2018)。Azadi 等(2010)通过优化侵染悬浮液和共培养基成分, 使新铁炮百合和东方百合‘Acapulco’的遗传转化效率分别提高到 25.4%和 23.3%。本试验中选取含完整 MS 或去除 KH₂PO₄、NH₄NO₃、KNO₃、CaCl₂ 的改良 MS 为悬浮液和共培养基分别转化卷丹, 结果发现, 以切片为外植体时, 选择含改良 MS 的悬浮液和共培养基所得瞬时转化效率明显高于前者, 与前人研究相符。然而, 以无菌小鳞片为外植体时, 两者的瞬时转化效率并无显著区别。原因可能是切片处理以后, 有创伤面, 更容易受到侵染悬浮液和共培养基成分的影响, 与前人采用薄壁愈伤组织细胞转化(Azadi et al., 2010, 2016)有相似之处。另外, 前人研究发现选择改良 MS 培养基为悬浮液和共培养基时, 一些百合如‘Casa Blanca’和‘Red Ruby’的愈伤组织对农杆菌生长过于敏感, 最终无法获得转基因材料(Azadi et al., 2010, 2016), 而本研究中未发现该现象, 提示利用鳞片切片转化或许可以避免由于愈伤组织的农杆菌敏感性而引起的转化失败。通过研究 AS 对卷丹遗传转化影响时发现, 在悬浮液和共培养基中添加 100 μmol · L⁻¹AS 可以显著提高以鳞片或切片为转化受体的瞬时转化率, 与前人报道(董喜才等, 2011; Liu et al., 2011; 叶兴国等, 2012)相符。

课题组前期对灰霉菌处理岷江百合叶片的比较转录组测序揭示, *LrCCoAOMT* 基因响应灰霉菌诱导后明显上调表达, 克隆该基因并异源转化拟南芥表达分析表明, 转基因植株抗倒伏与灰霉菌的能力均显著提高。本试验通过构建农杆菌介导的卷丹遗传转化体系, 并将 *LrCCoAOMT* 基因转化卷丹, 经过分子检测和 GUS 染色分析证明, *LrCCoAOMT* 基因已经成功导入卷丹。研究结果不仅为卷丹基因功能研究提供技术保障, 也为获得优良抗性的卷丹新种质奠定基础。

References

- Azadi P, Chin D P, Kuroda K, Khan R S, Mii M. 2010. Macro elements in inoculation and co-cultivation medium strongly affect the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation in *Lilium*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 101 (2): 201 - 209.
- Azadi P, Otang N V, Supaporn H, Khan R S, Chin D P, Nakamura I, Mii M. 2011. Increased resistance to *Cucumber mosaic virus* (CMV) in *Lilium* transformed with a defective CMV replicase gene. *Biotechnology Letters*, 33 (6): 1249 - 1255.
- Azadi P, Ntui V O, Chin D P, Mii M. 2016. Genetic transformation and metabolic engineering of *Lilium*. *Bulbous plants*. Boca Raton: Biotechnology CRC Press: 197 - 213
- Bakhshaie M, Khosravi S, Azadi P, Bagheri H, van Tuyl J M. 2016. Biotechnological advances in *Lilium*. *Plant Cell Reports*, 35 (9): 1799 - 1826.
- Cohen A, Meredith C P. 1992. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lilium*. *Acta Horticulturae*, 325: 611 - 618.
- Dong W, Mao Y F, Li W. 2007. Factors influencing T-DNA transferring into pollen of lily *in vitro*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 54 (3):

- 420 - 425.
- Dong Xi-cai, Du Jian-zhong, Wang An-le, Wei Guo-ying, Chen Zhao-hui. 2011. Role of acetosyringone in plants transformation researcher. Chinese Agricultural Science Bulletin, 27 (5): 292 - 299. (in Chinese)
- 董喜才, 杜建中, 王安乐, 魏国英, 陈朝辉. 2011. 乙酰丁香酮在植物转基因研究中的作用. 中国农学通报, 27 (5): 292 - 299.
- Fu Yong-yao, Yang Li-ping, Yang Wei, Zhu Yi-yong, Xu Wen-ji. 2019. A gene encoding *Lilium regale* caffeoyl-CoA O-methyltransferase and its application. China. Application No.: 201910313556.9. Invention patent. (in Chinese)
- 符勇耀, 杨利平, 杨 伟, 朱艺勇, 徐文姬. 2019. 一种岷江百合 *LrCCoAOMT* 基因及其应用. 中国, 申请号: 201910313556.9. 发明专利.
- Hoshi Y, Kondo M, Mori S, Adachi Y, Nakano M, Kobayashi H. 2004. Production of transgenic lily plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. Plant Cell Reports, 22 (6): 359 - 364.
- Huang Jie, Liu Xiao-hua, Guan Jie, Lü Ying-min. 2012. Progress in molecular breeding of lily. Acta Horticulturae Sinica, 39 (9): 1793 - 1808. (in Chinese)
- 黄 洁, 刘晓华, 管 洁, 吕英民. 2012. 百合分子育种研究进展. 园艺学报, 39 (9): 1793 - 1808.
- Langeveld SA, Gerrits M M, Derks A F L M, Boonekamp P M, Bol J F. 1995. Transformation of lily by *Agrobacterium*. Euphytica, 85 (1): 97 - 100.
- Li G L, Yue L X, Li F, Zhang S F, Zhang H, Qian W, Fang Z Y, Wu J, Wang X W, Zhang S J, Sun R F. 2018. Research progress on *Agrobacterium tumefaciens*-based transgenic technology in *Brassica rapa*. Horticultural Plant Journal, 4 (3): 126 - 132.
- Li Qiu-hua, Hong Bo, Tong Zheng, Yang Ying-jie, Ma Chao, Yu Jing-juan, Gao Jun-ping. 2008. Establishment of regeneration system and transformation of *Zm401* gene in *Lilium longiflorum* × *L. formosanum*. Journal of Agricultural Biotechnology, 16 (1): 96 - 102. (in Chinese)
- 李邱华, 洪 波, 仝 征, 杨英杰, 马 超, 于静娟, 高俊平. 2008. 新铁炮百合遗传转化体系的建立及 *Zm401* 基因的导入. 农业生物技术学报, 16 (1): 96 - 102.
- Liang Chun-hui, Yan Xiao-dong, Huang Min, Li Rong-xi, Chen Li-fen, Li Xiu-ping. 2017. Techniques of reducing tissue culture browning of *Lilium lancifolium*. Subtropical Plant Science, 46 (2): 122 - 125. (in Chinese)
- 梁春辉, 闫晓东, 黄 敏, 李荣喜, 陈礼芬, 李秀平. 2017. 降低卷丹百合组培褐变技术研究. 亚热带植物科学, 46 (2): 122 - 125.
- Liu Guang-xin, Hu Feng-rong, Zhang Rui-jing, Shi Ji-sen. 2010. Establishment of a transgenic acceptor system for oriental lily. Molecular Plant Breeding, 8 (5): 991 - 996. (in Chinese)
- 刘光欣, 胡凤荣, 张睿婧, 施季森. 2010. 东方百合转基因受体系统的建立. 分子植物育种, 8 (5): 991 - 996.
- Liu Ju-hua, Jin Zhi-qiang, Xu Bi-yu, Zheng Si-xiang, Liu Zhi-min. 2003. The regeneration and transformation of Longya *Lilium*. Molecular Plant Breeding, 1 (4): 465 - 474. (in Chinese)
- 刘菊华, 金志强, 徐碧玉, 郑思乡, 刘志敏. 2003. 龙牙百合的植株再生与遗传转化. 分子植物育种, 1 (4): 465 - 474.
- Liu J H, Zhang J, Xu B Y, Jia C H, Zhang J B, Tan G L, Jin Z Q. 2011. Regeneration and production of transgenic *Lilium longiflorum* via *Agrobacterium tumefaciens*. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 47 (3): 348 - 356.
- NobakhtVakili A, Bagheri H, Azadi P. 2018. Elimination of macro elements from inoculation and co-cultivation media enhances the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation in *Petunia*. Physiology and Molecular Biology of Plants, 24 (4): 703 - 710.
- Núñez de Cáceres González F F, Davey M R, Sanchez E C, Wilson Z A. 2015. Conferred resistance to *Botrytis cinerea* in *Lilium* by overexpression of the *RCH10* chitinase gene. Plant Cell Reports, 34 (7): 1201 - 1209.
- Núñez de Cáceres González F F, Davey M R, Wilson Z A. 2011. A rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for *Lilium*. Acta Horticulturae, 900: 161 - 167.
- Travella S, Ross S M, Harden J, Everett C, Snape J W, Harwood W A. 2005. A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. Plant Cell Reports, 23 (12): 780 - 789.
- Wang J M, Yang Y, Liu X H, Huang J, Wang Q, Gu J H, Lu Y M. 2014. Transcriptome profiling of the cold response and signaling pathways in *Lilium lancifolium*. BMC Genomics, 15 (1): 203.
- Wang Jin-zhong, Wang Yan-jun, Wang Xi-feng, Zhang Min-zhao, Gao Xia-hong, Zhou Guang-he. 2005. Transformation of Pokeweed antiviral

- protein gene into calli of *Lilium longiflorum*. *Biotechnology*, 15 (3): 73 - 75. (in Chinese)
- 王进忠, 王彦珺, 王锡锋, 张民照, 高遐虹, 周广和. 2005. 商陆抗病毒蛋白基因导入百合愈伤组织初报. *生物技术*, 15 (3): 73 - 75.
- Wang Y, van Kronenburg B, Menzel T, Maliepaard C, Shen X H, Krens F. 2012. Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of multiple lily cultivars. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 111 (1): 113 - 122.
- Wang Yu-guang, Lü Xiao-yan, Ji Mei-chao, Gong Shi-long, Li Hai-ying. 2018. Stress tolerance improvement by *BvM14-CCoAOMT* gene in Sugar Beet M14 strain. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 34 (34): 30 - 35. (in Chinese)
- 王宇光, 吕笑言, 季美超, 宫世龙, 李海英. 2018. 甜菜 M14 品系咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶提高植物抗性功能分析. *中国农学通报*, 34 (34): 30 - 35.
- Wang Zhi-gang, Yin Dong-sheng, Zhang Hui-hua, Wu Tian-yu, Pan Bai-tao, Yuan Xing-fu. 2014. Research progress on genetic breeding of *Lilium lancifolium* Thunb. *Horticulture & Seed*, (1): 1 - 3, 10. (in Chinese)
- 王志刚, 印东生, 张惠华, 吴天宇, 潘百涛, 袁兴福. 2014. 卷丹百合遗传育种研究进展. *园艺与种苗*, (1): 1 - 3, 10.
- Yang Li-ping, Liu Xue-mei, Zhang Xiao-fang. 1997. Study on cytology in *Lilium lancifolium* Thunb. *Bulletin of Botanical Research*, 17 (1): 85 - 88. (in Chinese)
- 杨利平, 刘雪梅, 张敬芳. 1997. 卷丹的细胞学研究. *植物研究*, 17 (1): 85 - 88.
- Yang Li-ping, Song Xiao-hong. 2013. Tissue culture system construction of *Lilium lancifolium* Thunb. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 36 (4): 17 - 21, 30. (in Chinese)
- 杨利平, 宋晓宏. 2013. 卷丹组培体系的构建. *河北农业大学学报*, 36 (4): 17 - 21, 30.
- Yang Panpan, Xu Hua, Xu Leifeng, Tang Yuchao, He Guoren, Cao Yuwei, Yuan Suxia, Ren Junfang, Ming Jun. 2018. Cloning and expression analysis of *LLAGO1* in *Lilium lancifolium*. *Acta Horticulturae Sinica*, 45 (4): 784 - 794. (in Chinese)
- 杨盼盼, 徐 华, 徐雷锋, 唐玉超, 何国仁, 曹雨薇, 袁素霞, 任君芳, 明 军. 2018. 卷丹 *LLAGO1* 基因的克隆及表达分析. *园艺学报*, 45 (4): 784 - 794.
- Yang Q, He Y J, Kabahuma M, Chaya T, Kelly A, Borrego E, Bian Y, Kasmi F E, Yang L, Teixeira P, Kolkman J, Nelson R, Kolomiets M, Dangl J L, Wisser R, Caplan J, Li X, Lauter N, Balint-Kurti P. 2017. A gene encoding maize caffeoyl-CoA O-methyltransferase confers quantitative resistance to multiple pathogens. *Nature Genetics*, 49 (9): 1364 - 1372.
- Ye Xing-guo, Wang Xin-min, Wang Ke, Du Li-pu, Lin Zhi-shan, Xu Hui-jun. 2012. A review of some assisted strategies for improving the efficiency of *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Scientia Agricultura Sinica*, 45 (15): 3007 - 3019. (in Chinese)
- 叶兴国, 王新敏, 王 轲, 杜丽璞, 林志珊, 徐惠君. 2012. 提高植物农杆菌转化效率辅助策略研究进展. *中国农业科学*, 45 (15): 3007 - 3019.
- Yu Zi-cheng, Ni Fei, Jiang Cheng, Huang Hua-hong, Lin Er-pei, Tong Zai-kang. 2019. Isolation, expression and single nucleotide polymorphism analysis of *BICCoAOMT* from *Betula luminifera*. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 33 (5): 870 - 879. (in Chinese)
- 俞子承, 倪 飞, 江 成, 黄华宏, 林二培, 童再康. 2019. 光皮桦 *BICCoAOMT* 基因的克隆、表达及单核苷酸变异分析. *核农学报*, 33 (5): 870 - 879.
- Zhang Y S, Yin X Y, Yang A F, Li G S, Zhang J R. 2005. Stability of inheritance of transgenes in maize (*Zea mays* L.) lines produced using different transformation methods. *Euphytica*, 144 (1 - 2): 11 - 22.
- Zhao Xiang-yun, Wang Wen-he. 2017. Status and development proposals of lily industry in China//Papers (abstracts) of the 12th Symposium of Chinese Society of Flower Bulbs. Beijing: Beijing Zhonglü Gardan Science Research Institute: 61 - 69. (in Chinese)
- 赵祥云, 王文和. 2017. 我国百合产业的现状及存在问题和发展建议//第 12 届中国球宿根花卉研讨会论文 (摘要) 集. 北京: 北京中绿园林科学研究院: 61 - 69.