

拟南芥 *AtTIP5;1* 基因转化非洲紫罗兰的研究

叶志琴, 李佳慧, 王广东*

(南京农业大学 园艺学院, 南京 210095)

摘要: 为研究 *AtTIP5;1* 基因的功能, 以非洲紫罗兰叶片为受体材料, 进行 *AtTIP5;1* 基因遗传转化条件的研究, 并对转基因植株在高浓度硼酸胁迫下的表现进行分析, 以明确利用 *AtTIP5;1* 基因提高非洲紫罗兰抗逆性的可行性。结果表明: (1) 以非洲紫罗兰叶片为受体的最适转化条件为: 叶片预培养 2 d, 农杆菌共培养 2 d, 共培养时添加 100 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰丁香酮; 最适潮霉素筛选浓度为 40 mg/L。 (2) 转化植株经 PCR 和 RT-PCR 检测显示, *AtTIP5;1* 基因成功转入了非洲紫罗兰, 获得了 17 个稳定的转基因植株。 (3) 对转基因植株和对照植株进行 3 mmol/L 硼酸胁迫处理结果表明, *AtTIP5;1* 基因表达受高浓度硼酸诱导, 且 *AtTIP5;1* 基因表达可以减缓植株受高浓度硼酸胁迫导致的组织褐化、叶片卷曲变形症状; 转 *AtTIP5;1* 基因植株干物质率、可溶性糖、可溶性蛋白质含量下降, 而 POD、SOD 活性上升, 证明转 *AtTIP5;1* 基因的非洲紫罗兰植株提高了对高浓度硼酸的耐受能力。研究结果为深入探讨 *AtTIP5;1* 基因的功能以及非洲紫罗兰基因工程育种奠定了基础。

关键词: 非洲紫罗兰; *AtTIP5;1*; 农杆菌; 遗传转化; 硼酸胁迫

中图分类号: Q789

文献标志码: A

Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation of *AtTIP5;1* Gene into *Saintpaulia ionantha*

YE Zhiqin, LI Jiahui, WANG Guangdong*

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In order to study the function of *AtTIP5;1* gene, we employed *Saintpaulia ionantha* leaves as receptor materials and optimized the genetic transformation conditions. The transgenic plants were exposed to high concentration of boric acid and the resistant ability was evaluated. The results showed: (1) The receptor leaves pre-cultured for 2 d, infected for 15 min, co-cultured of 2 d with 100 $\mu\text{mol/L}$ AS, and selected with 40 mg/L hygromycin were the optimum transformation conditions. (2) After PCR and RT-PCR screening, 17 transformed plants containing *AtTIP5;1* transgene were obtained. (3) Transformed and control plants were treated by high concentration boric acid (3 mmol/L) and physiological indexes of these plants were evaluated. The results indicated that the *AtTIP5;1* expression could be induced by boron. Transgenic plants showed a lower degree of plant tissue browning, leaves curling, and a higher rate of dry matter, soluble sugar and soluble protein content. Meanwhile, the increase of POD and SOD activities were weakened. Our results demonstrate that *AtTIP5;1* transformation can improve the tolerance of *S. ionantha* to the high boron stress. Our study is helpful for further investigation on *AtTIP5;1* gene function and gene engineering in breeding of *S. ionantha*.

Key words: *Saintpaulia ionantha*; *AtTIP5;1*; *Agrobacterium tumefaciens*; transformation; boron stress

收稿日期: 2014-06-13; 修改稿收到日期: 2014-10-09

作者简介: 叶志琴(1989—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事观赏植物生物技术研究。E-mail: yzq0520@126.com

* 通信作者: 王广东, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事观赏植物生理及生物技术研究。E-mail: gdwang@njau.edu.cn

AtTIP5;1 是拟南芥水孔蛋白家族的新成员,特异性运输水分子和硼酸^[1]。研究发现 *AtTIP5;1* 基因的表达受高浓度硼酸诱导,在高浓度硼酸处理时,超表达材料获得了高浓度硼酸毒害耐受能力,且提前进入生殖生长,结实率显著提高^[2]。*AtTIP5;1* 在促进水分吸收的同时也促进了硼的吸收,吸收的硼酸与水协同作用促进了植物的生长^[3],但是具体的促进机制尚不明朗。*AtTIP5;1* 基因具有受高浓度硼酸诱导的表达特点和促进水分及硼酸吸收的生理功能,将 *AtTIP5;1* 基因转入花卉,如果能够稳定表达,可以对花卉植物的胁迫抗逆性、营养生长期控制等进行品种改良,具有一定的应用前景。

非洲紫罗兰 (*Saintpaulia ionantha*) 为苦苣苔科 (Gesneriaceae) 非洲苦苣苔属 (*Saintpaulia*) 的多年生花卉^[4]。其离体培养及快速繁殖较为成熟,并已应用于商业化生产^[5],但目前国内外关于非洲紫罗兰遗传转化方面的研究工作较少,尚处于探索阶段^[6-7]。本研究以非洲紫罗兰无菌苗叶片为受体材料,开展 *AtTIP5;1* 基因的遗传转化研究,以期建立非洲紫罗兰的转化体系,获得转基因植株,并明确转 *AtTIP5;1* 基因对提高非洲紫罗兰硼酸胁迫抗性的作用,为深入研究 *AtTIP5;1* 基因功能及非洲紫罗兰的抗逆基因工程育种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

植物材料:切取长 1 cm 左右的非洲紫罗兰幼嫩叶片作为转化受体。分化培养基为 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖+6.5 g/L 琼脂,pH 5.7。生根培养基为 MS+0.1 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖+6.5 g/L 琼脂,pH 5.7。农杆菌培养所用培养基为 YEB,组成为 5.0 g/L 牛肉浸膏+1.0 g/L 酵母提取物+5.0 g/L 蛋白胨+0.4 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ +5.0 g/L 蔗糖,pH 7.0。农杆菌菌株及载体:农杆菌菌株为 GV3101,携带表达载体为 P35S::AtTIP5;1,具有潮霉素 (Hyg) 抗性,由中国农业大学庞永奇博士提供。

1.2 试验方法

1.2.1 农杆菌转化体系的优化 挑取农杆菌单菌落接种于 YEB 液体培养基,震荡培养至 OD₆₀₀ 约 0.6,离心收集菌体,以 1/2MS 液体培养基悬浮菌体,加入乙酰丁香酮 (AS) 至 100 $\mu\text{mol/L}$ 。解剖刀蘸取农杆菌菌液切割叶片进行侵染,然后进行共培养,之后转移至含头孢霉素 300 mg/L 的分化培养

基抑菌 1 周,再进行潮霉素 (Hyg) 抗性筛选,20 d 继代 1 次,共 3 次,筛选出抗性叶片及不定芽。并对以下转化因素进行研究:潮霉素筛选压 (0、10、20、30、40、50 和 80 mg/L),预培养时间 (0、1、2 和 3 d),共培养时间 (1、2、3、4 和 5 d),乙酰丁香酮 (0、100 $\mu\text{mol/L}$),比较抗性叶片转化率,以上指标均重复 3 次,取平均值。

1.2.2 转化材料的分子鉴定 DNA 整合的检测:采用改良 CTAB 法^[8] 提取总 DNA,采用正向引物 *AtTIP5;1F* (ATGAGAAGAATGATTCCAACA-TCG) 和反向引物 *AtTIP5;1R* (CGGCTTAGTAT-CACAAACCAGAGT) 进行 PCR 扩增。反应体系:DNA 1 μL ,引物各 1 μL ,Mix 酶 (GENEray 公司) 10 μL ,H₂O 7 μL 。扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 复性 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。mRNA 表达的检测:采用改良 CTAB 法^[9] 提取总 RNA,反转录 cDNA 是采用 TransScript One-Step Gdna Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒 (TRANSGEN 公司) 完成,采用引物 *cAtTIP5;1F* (FAGCGTTC-CAACCCTATGTT) 和 *cAtTIP5;1R* (TAAAGCA-GCTGTGGCTCCTC) 进行 RT-PCR。反应体系和程序同上。均设置 3 个对照,以农杆菌菌液为阳性模板,以野生型非洲紫罗兰为阴性模板,以 ddH₂O 为空白模板。扩增结束后,利用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳分析。

1.2.3 转 *AtTIP5;1* 基因非洲紫罗兰的硼酸耐性研究 野生型非洲紫罗兰叶片分化培养基设定 4 个硼酸浓度 (0、1、3 和 5 mmol/L),1 个月后统计其生长状态,根据生长和分化情况确定适宜的硼胁迫处理浓度。

高浓度硼酸处理对 *AtTIP5;1* 基因表达的影响:转化叶片分化出不定芽后,切割分株培养。在生根培养基中设定 2 个硼酸浓度,0 和 3 mmol/L (高硼),接种幼苗。处理 5 d 后提取 RNA,分析基因的表达情况,选取转基因表达正常的株系进行继代培养。

高硼胁迫下转化 *AtTIP5;1* 基因对非洲紫罗兰正常生理功能的影响:生根培养基中添加 3 mmol/L 硼酸 (高硼),接种转基因非洲紫罗兰和对照幼苗,在处理的第 0、7 天取样,测定干鲜重、可溶性糖、可溶性蛋白质含量及 POD 和 SOD 活性。干鲜重测定:蒸馏水洗净材料,吸干水分,称鲜重,105 $^{\circ}\text{C}$ 杀青 30 min,70 $^{\circ}\text{C}$ 烘至恒重,称干重。干物质率=干重/

鲜重×100%。可溶性糖含量采用蒽酮比色法^[10]测定;可溶性蛋白质含量采用考马斯亮蓝 G-250 比色法^[11]测定;愈创木酚显色法^[12]测定过氧化物酶(POD);超氧化物歧化酶(SOD)活性采用 NBT 光还原法^[13]测定,以上指标均重复 3 次。

1.3 数据分析

利用 Excel 进行数据整理,SPSS 19.0 进行方差分析,LSD 进行差异显著性比较。

2 结果与分析

2.1 农杆菌转化体系的优化

抗生素选择压是农杆菌遗传转化的重要因素,试验表明,随着 Hyg 浓度的升高,非洲紫罗兰叶片逐渐褐化死亡,存活率和芽诱导率显著下降(表 1)。Hyg 浓度达到 40 mg/L 时,叶片存活率为 7.33%,芽分化率为 2.0%,但当浓度达到 50 mg/L 时,存活率降至 1.33%,无叶片分化。为了达到筛选目的,且保证转化外植体的存活,试验将选择压力确定为

表 1 非洲紫罗兰遗传转化中潮霉素选择压的确定

Table 1 Screening of hygromycin concentration in *S. ionantha* transformation

潮霉素浓度 Hyg concentration (mg/L)	存活率 Survival rate/%	芽分化率 Bud differentiation rate/%
0	100.00±0a	100.00±0a
10	86.00±6.0b	21.33±3.06b
20	46.67±1.15c	14.00±4.0c
30	21.33±3.06d	7.33±2.31d
40	7.33±1.15e	2.00±2.0e
50	1.33±1.15f	0e
80	0f	0e

注:不同的小写字母代表 0.05 水平差异显著;下同。

Note:Different normal letters within the same column indicate significant difference at 0.05 level. The same as below.

Hyg 40 mg/L。

转化试验结果表明,预培养对非洲紫罗兰的农杆菌转化必不可少(表 2),叶片预培养(控制单因素变量)2 d 转化率最高(10.67%)。此外,农杆菌共培养以 2 d 为最佳(转化率 11.33%),时间过长,农杆菌生长过于旺盛,易使叶片死亡(表 2)。AS 促进农杆菌 Vir 区基因的活化,共培养时添加 100 μmol/L AS 有利于非洲紫罗兰转化体的获得,转化率由 4.67%提高到 8.67%(表 2)。综合以上结果,确定非洲紫罗兰叶片遗传转化的最适条件为叶片预培养 2 d 后,农杆菌共培养 2 d,共培养时添加 AS 100 μmol/L。

2.2 抗性植株的分子鉴定

对受体材料进行长时间潮霉素筛选后得到抗性植株,随机选取抗性植株提取总 DNA 进行 PCR 检测,结果(图 1,A)显示,转化成功的抗性植株能扩增出与阳性对照大小一致的条带,而阴性对照、空白对

表 2 不同处理方式对非洲紫罗兰转化的影响

Table 2 Effects of different treatments on *S. ionantha* transformation ratio

处理方式 Different treatment	转化率 Transformation ratio/%
	0c
预培养时间 Pre-culture time/d	1 4.67±1.15b
	2 10.67±3.06a
	3 6.67±2.31b
共培养时间 Co-culture time/d	1 2.67±1.15b
	2 11.33±3.06a
	3 4.67±1.15b
	4 0c
	5 0c
乙酰丁香酮 AS/(μmol/L)	0 4.67±4.16b
	100 8.67±3.06a

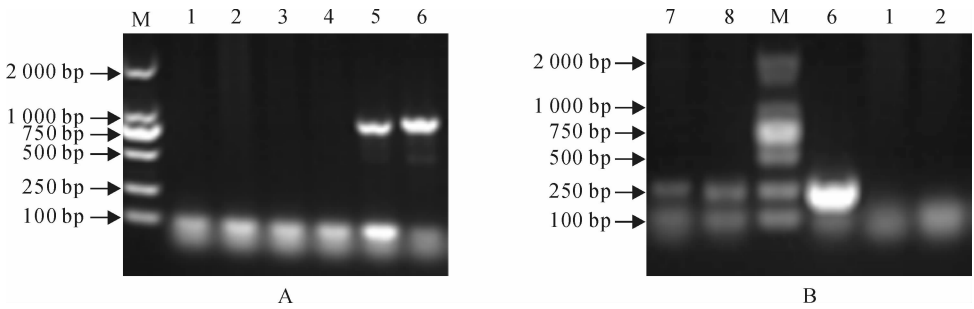


图 1 转化非洲紫罗兰的 PCR(A)和 RT-PCR(B)检测结果

M. 标准分子量;1. 阴性对照;2. 空白对照;3,4. 未转化非洲紫罗兰;5,7,8. 转化非洲紫罗兰;6. 阳性对照

Fig. 1 PCR analysis result(A) and RT-PCR analysis result(B) of transgenic *S. ionantha*

M. Marker;1. Negative control;2. Blank control;3,4. Non-transgenic *S. ionantha*;5,7,8. Transgenic *S. ionantha*;6. Positive control

照和未转化材料的 DNA 则没有相应的电泳条带,结果表明 *AtTIP5;1* 基因已转入非洲紫罗兰叶片。同时提取抗性植株的 RNA,进行 RT-PCR 检测(图 1,B),抗性植株可以扩增出目的基因条带,表明 *AtTIP5;1* 基因已转入非洲紫罗兰并能正常表达,经检测共获得稳定转化植株 17 株。

2.3 *AtTIP5;1* 基因转化对非洲紫罗兰基因功能的影响

2.3.1 硼酸处理对非洲紫罗兰生长和分化的影响

由表 3 结果可知,无硼酸处理的非洲紫罗兰叶片可正常分化出不定芽,且不存在褐化,而添加硼酸处理的叶片随着硼酸浓度的提高,芽分化率显著下降,褐化率显著提高,超过 3 mmol/L 时,芽分化率仅 10.2%,褐化率超过 50%,当硼酸浓度到达 5 mmol/L 时,叶片无法分化不定芽,褐化率达到 78.7%。为确保高浓度硼酸对 *AtTIP5;1* 基因的激活和材料的存活,在非洲紫罗兰高硼处理时添加 3 mmol/L 的硼酸量。

2.3.2 高硼处理对 *AtTIP5;1* 基因表达的影响

转基因非洲紫罗兰经 0 和 3 mmol/L 硼酸处理,提取 RNA,进行 RT-PCR 检测。结果表明(图 2),高硼处理的转基因非洲紫罗兰(图中泳道 5,8)基因有强烈表达,条带清晰,而未进行高浓度硼酸处理的转基因非洲紫罗兰(图中泳道 6,9)表达较弱,条带模糊,表明高浓度硼酸处理促进了 *AtTIP5;1* 基因的表达。

表 3 硼酸对非洲紫罗兰叶片生长的影响
Table 3 Effect of boric acid on the growth of *S. ionantha* leaf

硼酸 Boric acid/(mmol/L)	芽分化率 Bud differentiation rate/%	褐化率 Browning rate/%
0	100.0±0a	0d
1	88.0±4.3b	22.2±8.3c
3	10.2±4.2c	54.6±5.8b
5	0d	78.7±7.0a

表 4 高硼胁迫对转基因非洲紫罗兰和对照非洲紫罗兰生长的影响

Table 4 Effect of high boric acid stress on the growth of transgenic *S. ionantha* and control

材料及处理 Material and treatment		干物质率 Dry matter percentage/%	可溶性糖含量 Soluble sugar content/(mg/g)	可溶性蛋白质含量 Soluble protein content/(mg/g)	POD 活性 POD activity/(U/g)	SOD 活性 SOD activity/(U/g)
转基因非洲紫罗兰 Transgenic <i>S. ionantha</i>	0 d	7.63±0.14a	9.93±0.05a	1.61±0.11a	972.0±9.6c	327.8±11.52c
	7 d	5.11±0.07b	6.67±0.07b	0.36±0.02b	2 326.3±18.8b	498.2±16.10b
对照非洲紫罗兰 Control <i>S. ionantha</i>	0 d	7.32±0.04a	9.69±0.13a	1.56±0.07a	1 004.5±10.4c	350.03±7.48c
	7 d	4.72±0.08c	6.13±0.11c	0.22±0.03c	3 592.3±24.34a	574.93±14.42a

2.3.3 高浓度硼酸胁迫下 *AtTIP5;1* 基因转化对非洲紫罗兰相关生理指标的影响 在高浓度硼酸处理前,从非洲紫罗兰野生型和转化植株增殖群体中各取 20 株叶色、叶形等生长状态基本一致的植株,经检测,其中 5 项生理指标(干物质率、可溶性糖、可溶性蛋白含量及 POD、SOD 活性)均无显著差异,结合 2.3.2 中高浓度硼酸处理对 *AtTIP5;1* 基因表达的影响结果,表明在非高浓度硼酸胁迫的条件下,

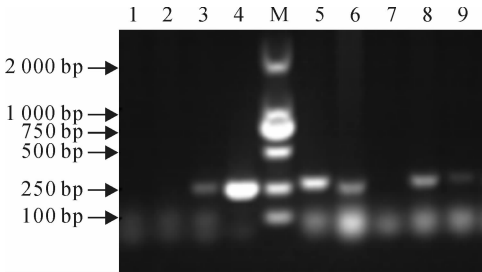


图 2 高硼处理转基因非洲紫罗兰的 RT-PCR 检测结果
M. 标准分子量;1. 阴性对照;2,7 空白对照;4. 阳性对照;
3,5,6,8,9. 转基因非洲紫罗兰;5,8. 高硼处理;6,9. 非高硼处理
Fig. 2 RT-PCR analysis result of transgenic *S. ionantha* with high boron treatment
M. Marker;1. Negative control;2,7 Blank control;
4. Positive control;3,5,6,8,9. Transgenic *S. ionantha*;
5,8. High boron treatment;6,9. No boron treatment

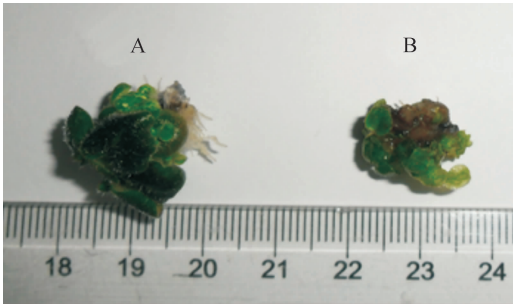


图 3 高硼处理 7 d 后转基因(A)和对照(B)非洲紫罗兰的生长状态
Fig. 3 The growth status of transgenic(A) and control(B) *S. ionantha* after 7 d with high boron treatment

AtTIP5;1 基因的转化并不影响非洲紫罗兰的正常生长,进而表明该基因表达受高浓度硼酸诱导。由表 4 结果可以看出,高浓度硼酸处理会引起转化和对照植株的干物质率、可溶性糖和可溶性蛋白质含量显著下降,POD 和 SOD 活性显著提高,试验表明高浓度硼酸处理对非洲紫罗兰的生长极为不利。处理 7 d 后对比两种材料的生长状态(图 3),从图中可以看出对照组的幼苗基部褐变症状更为严重,叶片扭曲变形,而转基因幼苗的基部褐变组织较少,叶片生长正常。比较处理 7 d 后 2 种材料的 5 组指标差异,结果(表 4)表明,转基因非洲紫罗兰受高硼诱导时,其干物质率、可溶性糖和可溶性蛋白质含量的减少(0.39%、0.54%和 0.14%),POD、SOD 活性的上升(1 266、76.73 U/g),均显著低于对照组,从高硼胁迫下非洲紫罗兰各项生理指标的综合分析来看,*AtTIP5;1* 基因的转化有利于提高非洲紫罗兰的高硼耐受性。

3 讨 论

本试验建立了稳定高效的非洲紫罗兰农杆菌转化体系,结果表明非洲紫罗兰预培养 2 d 时,转化率最高。叶片与农杆菌共培养时完成目的基因的转移和整合,试验显示以 2 d 效果最佳,这与杨树等遗传转化中适宜的共培养时间相似^[14],添加 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 AS 也有利于非洲紫罗兰转化体的获得,提高了转化率,与葡萄等遗传转化时添加 AS 的效果相同^[15]。抗性材料进行筛选时,适宜的筛选压下未转化细胞生长受阻,并逐渐死亡,而转化细胞获得抗性,保留下来,从而达到筛选目的,本试验潮霉素最适筛选压为 40 mg/L,这与小麦遗传转化过程中的潮霉素筛选浓度相似^[16]。

本试验结果表明 *AtTIP5;1* 基因的表达受高浓度硼酸的诱导,且转化 *AtTIP5;1* 基因使非洲紫罗兰获得了高硼毒害耐受能力,这与 Daud 的研究结果一致^[6]。相关研究显示超表达拟南芥水通道蛋白

AtTIP5;1 可以促进植物的生长,这可能是由于水通道蛋白的水转运活性在起作用,但也可能是硼发挥了作用^[2]。

植物高硼中毒会导致成熟叶的叶尖或叶缘退绿,叶片卷曲变形甚至坏死^[17]。在高硼胁迫下,植物碳氮代谢受抑制,氮素同化出现异常,产生大量的 H_2O_2 和 O_2^- 等活性氧自由基,造成膜系统的氧化损伤^[15]。对非洲紫罗兰生长发育影响的试验表明:高硼胁迫时,非洲紫罗兰叶片生长受到显著抑制,叶片从基部向上开始出现失绿褐变症状,最终褐化坏死,分化出的不定芽也以基部组织褐化最为明显,叶片卷曲不正常。高硼毒害时,非洲紫罗兰的干物质率、可溶性糖、可溶性蛋白质含量显著下降,POD、SOD 活性显著提高,这与 Aftab^[18] 和段九菊^[19] 等的硼毒害研究结果一致。本试验发现 *AtTIP5;1* 基因的转化缓解了高硼毒害带来的伤害,转基因非洲紫罗兰的褐化和叶片变形等症状得到了缓解。本试验还比较了高硼处理下,转基因非洲紫罗兰材料和对照的 5 组生理指标差异,结果显示,在转基因非洲紫罗兰受高硼诱导激活并表达 *AtTIP5;1* 基因时,转基因植株的干物质率、可溶性糖和可溶性蛋白质含量的减少,POD、SOD 活性的提高,均低于对照,并存在显著差异,这与甘蓝转 *StP5CS* 基因植株在盐胁迫下的形态和生理指标变化趋势类似^[20]。从高硼胁迫下非洲紫罗兰生长状态和各项生理指标的相关性分析来看,*AtTIP5;1* 基因的转化有利于提高非洲紫罗兰的高硼耐受性,减缓了高浓度硼酸的伤害。

本研究成功将 *AtTIP5;1* 基因转入非洲紫罗兰,建立了稳定的遗传转化体系,获得了转基因植株,验证了高浓度硼酸对 *AtTIP5;1* 基因的诱导表达,初步明确 *AtTIP5;1* 基因转化提高了非洲紫罗兰耐高硼胁迫毒害能力,研究结果为进一步开展 *AtTIP5;1* 基因功能研究以及非洲紫罗兰的遗传转化育种奠定了基础。

参考文献:

- [1] GABRIELA S. *AtTIP1;3* and *AtTIP5;1*, the only highly expressed *Arabidopsis* pollen-specific aquaporins, transport water and urea[J]. *FEBS Letters*, 2008, **582**(20): 4 077—4 082.
- [2] PANG Y Q, LI L J, REN F, *et al.* Overexpression of the tonoplast aquaporin *AtTIP5;1* conferred tolerance to boron toxicity in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2010, **37**(6): 389—397.
- [3] IWAI H, HOKURA A, OISHI M, *et al.* The gene responsible for borate cross-linking of pectin Rhamnogalacturonan-II is required for

- plant reproductive tissue development and fertilization[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, **103**(44):16 592—16 597.
- [4] STRECK N A. A temperature response functions for modeling leaf growth and development of the African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl)[J]. *Ciência Rural Santa Maria*, 2004, **34**(1):55—62.
- [5] GONG Y ZH(龚宇舟), LIU Q B(刘清波), LEI J Q(雷洁琼), *et al.* Callus induction and plant regeneration of *Saintpaulia ionantha*[J]. *Agriculture Engineering* (农业工程), 2013, **3**(3):120—123(in Chinese).
- [6] DAUD N, TAHA R M. Factors affecting shoot organogenesis in leaf disc culture of African violet[J]. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2008, **11**(7):1 055—1 058.
- [7] ANTONIO M, LAURA D B, GIANLUCA B, *et al.* Agrobacterium-mediated transformation of African violet[J]. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*, 2000, **60**(1):39—46.
- [8] ZHENG Q(郑 泉), GUO W M(郭维明), ZHENG Y P(郑勇平), *et al.* Study on extraction of genomic DNA from recalcitrant plant *Dendrobium*[J]. *Journal of Anhui Agriculture Science* (安徽农业科学), 2010, **38**(3):1 156—1 159, 1 166(in Chinese).
- [9] FENG L G(冯立国), LI T L(李婷琳), CHEN CH(陈 陈), *et al.* Study on methods of extracting total RNA from *Rosa rugosa* flower tissues[J]. *Journal of Yangzhou University* (扬州大学学报), 2013, **34**(4):104—107(in Chinese).
- [10] KUMAR G N M, KNOWLES N R. Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radical scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers[J]. *Plant Physiology*, 1993, **102**(1):115—124.
- [11] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社, 2000:184—185.
- [12] MUNOZ-MUNOZ J L, GARCIA-MOLINA F, GARCIA-RUIZ P A, *et al.* Enzymatic and chemical oxidation of trihydroxylated phenols [J]. *Food Chemistry*, 2009, **113**(2):435—444.
- [13] ZHOU W, ZHAO D, LIN X. Effects of water logging on nitrogen accumulation and alleviation of waterlogging damage by application of nitrogen fertilizer and mixtalol in winter rape (*Brassica napus* L.)[J]. *Plant Growth Regulation*, 1997, **16**(1):47—53.
- [14] CHEN ZH(陈 仲), LIAO W H(廖维华), WANG J CH(王静澄), *et al.* Factors influencing frequency of *Agrobacterium*-mediated populus transformation[J]. *Plant Physiology Journal* (植物生理学报), 2014, **50**(8):1 126—1 134(in Chinese).
- [15] DONG ZH G(董志刚), MA X H(马小河), WANG G P(王国平), *et al.* Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation system of grape[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences* (核农学报), 2014, **28**(7):1 169—1 174(in Chinese).
- [16] YANG Q(杨 桥), LIN Z M(蒯自敏), HOU X W(侯译文), *et al.* Establishment and application of the hygromycin selection system in wheat transformation[J]. *Journal of Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2013, **34**(3):304—310(in Chinese).
- [17] YAU S K, RYAN J. Boron toxicity tolerance in crops: viable alternative to soil amelioration[J]. *Crop Science*, 2008, **48**(3):854—865.
- [18] AFTAB T, KHAN M M A, IDRESS M, *et al.* Boron induced oxidative stress, antioxidant defence response and changes in artemisinin content in *Artemisia annua* L. [J]. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 2010, **196**(6):423—430.
- [19] DUAN J J(段九菊), CAO D M(曹冬梅), KANG L F(康黎芳), *et al.* Effects of high boron stress on the growth and element content of Bromeliaceae[J]. *Chinese Agriculture Science Bulletin* (中国农学通报), 2011, **27**(2):137—143(in Chinese).
- [20] WANG X H(王肖红), ZENG A S(曾爱松), GAO B(高 兵), *et al.* Resistance to salt in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) transformed with *StP5CS* gene[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2013, **33**(5):885—891(in Chinese).