果 树 学 报 2026,43(1):196-210
Journal of Fruit Science

DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20250313

发根农杆菌介导的草莓遗传转化体系构建

朱雨萱[1],姚明军[2],李 斌[2],王瑛皎[3],张连曦[1],毕晓艺[1],连红莉[1*],许鹏博[1*]

([1]上海交通大学农业与生物学院,上海 200240;[2]上海市金山区农业技术推广中心,上海 201500;
[3]上海市宝山区农业技术推广中心,上海 201901)

摘 要:【目的】建立草莓高效、经济、快速的发根农杆菌转化体系。**【方法】**以发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)Ar.1193、Ar.Qual、C58C1、K599为转化菌株,选取八倍体栽培草莓粉玉和二倍体森林草莓*rg40*、Ruegen为试验材料,采用匍匐茎子株划伤法、短缩茎穿刺法、下胚轴侵染法3种外植体处理方法,结合*35S::RUBY*视觉报告基因,系统评估不同菌株的毛状根转化效率。**【结果】**在3种不同处理方法下,4种发根农杆菌均可诱导不同草莓外植体产生转基因阳性毛状根,其中菌株Ar.1193在3种处理方式中均表现最佳。栽培草莓粉玉采用匍匐茎子株划伤法产生的阳性毛状根诱导率高达79.41%,森林草莓*rg40*采用短缩茎穿刺法产生的阳性毛状根诱导率达到73.33%,森林草莓Ruegen采用下胚轴侵染法产生的阳性毛状根诱导率为14.38%。**【结论】**采用3种不同处理方法,筛选出最适宜诱导草莓毛状根的菌株为Ar.1193。初步建立了草莓毛状根培养体系,为后续草莓的遗传转化体系提供了科学依据。

关键词:草莓;发根农杆菌;*RUBY*基因;遗传转化

中图分类号:S668.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-9980(2026)01-0196-15

Establishment of genetic transformation system mediated by *Agrobacterium rhizogenes* in strawberry

ZHU Yuxuan[1], YAO Mingjun[2], LI Bin[2], WANG Yingjiao[3], ZHANG Lianxi[1], BI Xiaoyi[1], LIAN Hongli[1*], XU Pengbo[1*]

([1]School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; [2]Jinshan District Agricultural Technology Extension Center, Shanghai 201500, China; [3]Baoshan District Agricultural Technology Extension Center, Shanghai 201901, China)

Abstract:【Objective】The study aimed to establish an efficient, economical and rapid *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation system in strawberry.【Methods】This study used four strains of *A. rhizogenes*, namely Ar.1193, Ar.Qual, C58C1, and K599, and selected octoploid cultivated strawberry Fenyu and diploid woodland strawberry *rg40* and Ruegen as experimental materials. The study adopted scratching stolon method, puncturing shortened stem method and hypocotyl infection method and *35S::RUBY* visual reporter gene to systematically evaluate the hairy root transformation efficiency of different strains and to screen the strain for optimal transformation. For scratching stolon method, Fenyu stolon-derived plantlets were used as the experimental material. The *A. rhizogenes* carrying the *35S::RUBY* plasmid was streaked onto YEP solid medium and cultured at 28 ℃ for 2−3 days. The primary roots of the stolon-derived plantlets were removed, and the base of the stolon was lightly wounded with a sterile blade. The solid bacterial cells were then applied to the wounded area. The sterilized vermiculite was placed into transparent plastic cups. The treated stolon-derived plantlets were inserted into the cups, which were subsequently wrapped with aluminum foil to simulate a dark environment for root growth. The remaining bacterial cells on YEP solid medium were resuspended in water to create a bacterial suspension, which was used to irrigate the wounded area. The infected stolon-derived plantlets were cov-

收稿日期:2025-06-06 **接受日期:**2025-07-02

基金项目:上海市农业科技创新项目(2024-02-08-00-12-F00013)

作者简介:朱雨萱,女,在读硕士研究生,主要从事草莓遗传育种方向的研究。E-mail:ZYX1030@sjtu.edu.cn

*通信作者 Author for correspondence. E-mail:hllian@sjtu.edu.cn;E-mail:xpb2005@sjtu.edu.cn

ered with a transparent cover to maintain high humidity and were wrapped with black cloth for overnight dark treatment. The next day, the black cloth was removed, and the infected stolon-derived plantlets were kept in a high-humidity environment. After 20 days of insertion, the stolon-derived plantlets were uniformly observed. For puncturing shortened stem method, one-month-old woodland strawberry *rg40* were used as the experimental material. The *A. rhizogenes* carrying the *35S::RUBY* plasmid was streaked onto YEP solid medium and cultured at 28 ℃ for 2-3 days. A single colony from the plate was picked using a syringe needle and used to perform multiple piercings at the short stem region of the seedling. Subsequently, the bacterial cells were scraped from the YEP solid medium and applied to the short stem region. The seedlings were then planted in the substrate. Since the diploid seedlings were relatively tender, it was not convenient to pull them up for observation at an early stage. Therefore, observation was conducted after 45 days. For hypocotyl infection method, the *A. rhizogenes* carrying the *35S::RUBY* plasmid was streaked and cultured on YEP solid medium for 2−3 days to obtain single colonies. A positive single colony was selected and inoculated into YEP liquid medium containing 75 $mg \cdot L^{-1}$ spectinomycin and 50 $mg \cdot L^{-1}$ streptomycin, and cultured at 28 ℃ with shaking at 220 $r \cdot min^{-1}$ for 16 hours. The next day, the culture was inoculated at a 1∶100 ratio into 50 mL of YEP liquid medium containing 75 $mg \cdot L^{-1}$ spectinomycin and 50 $mg \cdot L^{-1}$ streptomycin, and cultured at 28 ℃ until the OD_{600} reached 0.6. The bacterial suspension was collected by centrifugation at 3220 g for 10 minutes and resuspended in 1/2MS liquid medium containing 100 $\mu mol \cdot L^{-1}$ acetosyringone (AS) to achieve an OD_{600} of 0.8. The bacterial suspension was activated at 28 ℃ with shaking at 100 $r \cdot min^{-1}$ for 1 hour. When the Ruegen seedlings had two cotyledons, the hypocotyl was cut off from the root, and the hypocotyl with cotyledons was used as experimental material. The explant was immersed in the Agrobacterium suspension and cultured at 28 ℃ with shaking at 100 $r \cdot min^{-1}$ for 15 minutes, followed by sonication for 5 seconds (KQ-500DE digital ultrasonic cleaner, power 90%). The infected explant was then transferred to a filter paper moistened with 1/2MS (containing 2% sucrose and 100 $\mu mol \cdot L^{-1}$ AS) and co-cultured in the dark at 23 ℃ for 4 days. After co-cultivation, the infected explant was washed with sterile water and transferred to 1/2MS medium containing 2% sucrose 250 $mg \cdot mL^{-1}$ cefotaxime sodium (CEF) for decontamination and hairy root induction. The explants were observed uniformly 30 days after infection.【Results】The results showed that under the three different treatment methods, all four strains of *A. rhizogenes* could induce the strawberry explants to produce hairy roots. Among the four strains, the strain Ar.1193 showed the best positive rooting rate. In the scratching stolon method, the induction rate of positive hairy roots for the octoploid cultivated strawberry Fenyu reached 79.41%. The induction rate of positive hairy roots for the diploid woodland strawberry *rg40* was 73.33% using the puncturing shortened stem method, while the induction rate of positive hairy roots for the diploid woodland strawberry Ruegen was 14.38% via the hypocotyl infection method.【Conclusion】Through three methods, Ar.1193 was identified as the most suitable strain for inducing strawberry hairy roots. This study preliminarily established a strawberry hairy root culture system using the *35S::RUBY* reporter gene for screening. This system not only would provide a scientific basis for the subsequent genetic transformation of strawberries but also would lay the foundation for the rapid validation of strawberry root development and CRISPR/Cas9 gene editing efficiency.

Key words: Strawberry; *Agrobacterium rhizogenes; RUBY* gene; Genetic transformation

草莓（*Fragaria*×*ananassa* Duch.）为蔷薇科（Rosaceae）草莓属（*Fragaria*）多年生草本植物，是重要的园艺作物。草莓色泽红艳，肉质多汁，风味酸甜且芳香浓郁，营养价值高[1]，素有“水果皇后”之

称[2]。近年来，中国草莓栽培面积持续扩大，国内新品种选育成效显著，产业规模快速增长，经济效益和社会效益同步提升[3]。然而，草莓基因组高度杂合，传统育种方法存在周期长、性状改良效率低等技术瓶颈。转基因技术与基因编辑技术（如CRISPR/Cas9）因操作精准、育种周期短、遗传修饰效率高等优势，为草莓种质创新和新品种选育提供了新的解决方案[4]。因此，建立高效稳定的草莓遗传转化体系，对推进草莓分子设计育种、加速优良品种选育进程具有重要意义[5]。

植物的遗传转化主要利用根癌农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）与发根农杆菌（*Agrobacterium rhizogenes*）[6]。目前，基于根癌农杆菌的叶盘转化法是草莓遗传转化的常规方法。该方法以叶片为外植体，经农杆菌浸染、抗生素筛选及器官再生途径获得转基因植株[7-8]。然而，该体系转化周期长、转化效率低、影响因素较多[9]。相较而言，发根农杆菌介导法（*A. rhizogenes*-mediated，ARM）具有成本低、效能高、基因沉默率低及宿主适应性强等优势，是一种高效的植物遗传转化方法。它能够快速将自身含有的Ri质粒上T-DNA片段转移至植物细胞中，诱导植物产生毛状根，从而实现遗传物质的交流[10-11]，其转化周期通常比根癌农杆菌的叶盘转化法更短。发根农杆菌介导法能够快速获得大量的转基因材料，为后续的基因功能验证、次生代谢产物研究等提供充足的试验样本，极大提高了研究效率。此外，发根农杆菌具有较强的宿主适应性，不仅能够感染双子叶植物，对部分单子叶植物、裸子植物以及非植物生物如真菌等也具有一定的感染能力，突破了根癌农杆菌宿主范围的限制，极大地拓宽了植物遗传转化的研究范围，为不同种类植物的遗传改良提供了可能。舒铫等[12]在甜瓜中利用发根农杆菌介导法建立了甜瓜转化体系，并利用该系统实现了对CRISPR/Cas9靶点有效性的快速检测。邬婷婷等[13]在蓝莓中也建立了简单、快速的发根农杆菌介导的蓝美1号遗传转化体系，为蓝莓的基因功能研究和良种选育提供了技术支持。在草莓中，Yan等[14]利用发根农杆菌在林地草莓中探索出一种有效的侵染方法，该方法可用于草莓根系特异性启动子的研究，并可作为分析草莓根系基因功能的工具。此外，Hao等[15]在草莓中利用发根农杆菌体内注射（IVI）方法，得到转基因毛状根，并用转基因毛状根系证实了*FaNRT1.1*的硝酸盐转运功能。

在草莓遗传转化研究中，现有技术主要依赖组织培养[14]和体内注射[15]获取转基因毛状根。然而，这些方法存在明显局限：IVI法虽规避了组织培养步骤，但操作流程复杂、转化效率低且阳性根获取周期长。此外，现有体系普遍采用GFP荧光标记筛选，依赖荧光显微镜观察，增加了技术门槛和设备成本。针对以上问题，笔者创新性地引入*RUBY*报告系统，进行阳性毛状根筛选，无需使用特殊设备或化学处理，肉眼即可清楚观察[16]。在模式植物拟南芥、水稻[17]以及园艺植物辣椒[18]、矮牵牛[19]、柠檬[20]中均已验证了*RUBY*报告系统能够有效发挥预期的功能。因此，通过在草莓中建立以*RUBY*报告基因筛选的发根农杆菌介导的遗传转化体系，可简化操作并有望克服GFP荧光标签的弊端，为提高基因功能研究的准确性和遗传转化过程中的筛选效率奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

发根农杆菌菌株Ar.1193、Ar.Qual、C58C1、K599（表1），所用菌种由上海交通大学农业与生物学院刘振华老师、温海帆老师、李彭丽老师提供；*35S::RUBY*质粒购于广西唯创生物科技有限公司；草莓试验材料来自本实验室。

表1 发根农杆菌菌株抗性

Table 1 Resistance of *Agrobacterium rhizogenes* strains

菌株 Strains	抗性 Resistance
Ar.1193	羧苄青霉素、链霉素、利福平 Carb, Strep, Rif
Ar.Qual	链霉素、氯霉素 Strep, Cam
C58C1	链霉素、利福平 Strep, Rif
K599	链霉素 Strep

1.2 外植体获取

匍匐茎子株划伤法：挑选八倍体栽培草莓粉玉健康无病虫害的匍匐茎子株，因其子株部位生根能力较强，故选取此部位作为试验材料。

短缩茎穿刺法：挑选1月龄无病虫害的二倍体森林草莓*rg40*幼苗短缩茎，因其短缩茎部位生根能力较强，并且*rg40*叶柄呈绿色，无花青素积累，可避免色素干扰，故选取此部位作为该方法的试验材料。

下胚轴侵染法：挑选二倍体森林草莓Ruegen（简称RG）成熟种子，经表面消毒处理。置于2 mL

离心管中，经75%乙醇振荡消毒1 min，吸出乙醇。随后，用10%的次氯酸钠溶液消毒8 min至种皮脱色，无菌水漂洗3~5次，播于MS＋2%蔗糖的固体培养基中，置于光照培养箱（24 ℃，光照16 h/黑暗8 h）中培养。待幼苗发育至2片子叶期时，在无菌条件下将其下胚轴与根部连接处切断。因其下胚轴生根能力强[14]，故选用携带子叶的下胚轴作为该方法的试验材料。

1.3 发根农杆菌转化

将−80 ℃冰箱中的发根农杆菌感受态置于冰上，待其融化后置于冰盒。每100 μL感受态加入1 μg *35S::RUBY*质粒，依次于冰上静置5 min，液氮5 min，37 ℃水浴5 min，冰浴5 min，随后加入700 μL无抗生素的YEP液体培养基，置于28 ℃摇床上220 $r\cdot min^{-1}$振荡培养2~3 h。离心后弃掉部分上清液，剩余100 μL上清液重悬菌体沉淀后涂布在含有对应抗生素的YEP平板上，28 ℃倒置培养2~3 d，以获得单克隆。挑取单克隆置于含相应抗生素的YEP液体培养基中振荡培养过夜，第2天进行菌液PCR扩增验证。根据载体序列合成*RUBY*检测引物：*RUBY*检测-F（5'-3'）GACAGCCGAGACAGACCAAA和*RUBY*检测-R（5'-3'）TCCCAGGAGGAGTGGATCAG。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测，目的条带为441 bp，条带大小正确的为阳性克隆，用于后续试验。

1.4 转基因根的鉴定

采用CTAB方法提取DNA[21]。将获得的毛状根置于1.5 mL离心管中，向离心管中加入2颗钢珠于液氮中速冻，快速置于组织破碎仪中破碎；随后，加入600 μL CTAB裂解液（含4%的*β*-巯基乙醇），涡旋混匀，60 ℃烘箱中放置30 min；加入600 μL氯仿和异戊醇的混合液（氯仿和异戊醇的体积比为24∶1），振荡混匀，在13 400 *g*条件下离心10 min，吸出600 μL上清液，转移到新的离心管中；随后，加入600 μL氯仿和异戊醇的混合液，振荡混匀，在13 400 *g*条件下离心10 min，吸出450 μL上清液，并加入在−20 ℃预冷的无水乙醇900 μL，颠倒混匀，于−20 ℃冰箱放置1 h；随后，在13 400 *g*条件下离心10 min，去除上清液，置于通风橱下吹干；最后，加入30 μL TE缓冲液（pH=8.0，每1.5 mL TE缓冲液含100 μL核糖核酸酶A溶液），置于−20 ℃冰箱保存待用。

采用双重PCR体系进行转基因毛状根的分子鉴定。使用*RUBY*特异性引物*RUBY*检测-F和*RUBY*检测-R扩增载体*35S::RUBY*的序列，目的条带大小为441 bp；同时，利用引物*FvACTIN*-F（5'-3'）GAGGCTCCATCTTAGCATCC和引物*FvACTIN*-R（5'-3'）ACAATTGAAGGGCCTGATTC扩增草莓内参基因，目标条带大小为184 bp，经琼脂糖凝胶电泳检测，同时呈现441 bp（*RUBY*）和184 bp（*ACTIN*）特异性条带的样本，可确认为转基因阳性毛状根。

1.5 数据统计与分析

使用Excel统计数据，计算公式如下：

再生根率/%=产生毛状根的外植体数/外植体总数×100；

阳性根率/%=产生红色毛状根的外植体数/产生毛状根的外植体数×100；

愈伤率/%=产生愈伤的外植体数/外植体总数×100；

红色愈伤率/%=产生红色愈伤的外植体数/产生愈伤的外植体数×100。

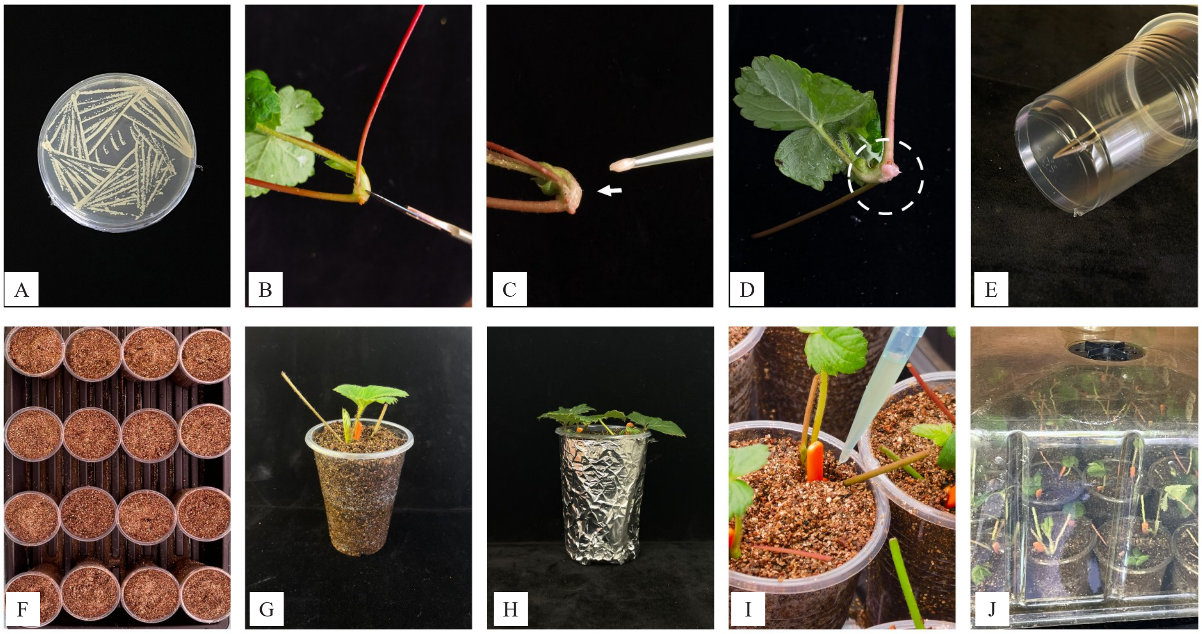
使用Adobe Illustrator 2020软件作图。

2 结果与分析

2.1 草莓发根遗传转化体系的构建

2.1.1 匍匐茎子株划伤法转化流程 将含有*35S::RUBY*的农杆菌在YEP固体培养基上划线，在28 ℃恒温培养箱中培养2~3 d（图1-A）。选取八倍体栽培草莓粉玉健康匍匐茎子株，去除子株上原有根系，使用灭菌刀片在原生根部位轻划5~6道5~8 mm长的伤口（图1-B）。用灭菌枪头轻刮固体菌落，涂抹在子株伤口表面（图1-C~D，箭头标注为涂抹部位）。采用一次性透明塑料杯作为培养容器，用镊子将杯底部戳孔以吸水（图1-E），将灭菌蛭石（粒径1~2 mm）装入杯中作为基质（图1-F）。随后，将涂抹菌体的子株垂直扦插于透明塑料杯中，确保接种部位与基质充分接触（图1-G）。杯体外周包裹锡箔纸，模拟根部的暗生长环境（图1-H），将锡箔纸取下后仍可通过透明杯壁观察毛状根生长动态。用无菌水重悬平板上剩余菌体，吸取菌液补充浇灌接种部位（图1-I），幼苗用透明保湿罩覆盖（图1-J），以确保高湿度环境，并使用黑布进行过夜暗处理，黑暗处理16 h后转入正常光周期（光照16 h/黑暗8 h）。扦插20 d后进行统一观察。

2.1.2 短缩茎穿刺法转化流程 将含有*35S::RUBY*的农杆菌在YEP固体培养基上划线、28 ℃恒温培养



A. 划线活化菌株；B. 去除子株原根并划伤；C-D. 涂抹菌体；E. 杯底部戳孔；F. 杯中装入灭菌蛭石；G. 扦插；H. 锡箔纸包裹杯身；I. 浇灌菌液；J. 透明罩覆盖。

A. Streaking for strain activation; B. Removing the original root and wounding; C-D. Smearing the bacterial suspension; E. Piercing holes in the bottom of the cup; F. Filling the cup with sterilized vermiculite; G. Inserting; H. Wrapping the cup with aluminum foil; I. Irrigating with bacterial suspension; J. Covering with a transparent dome.

图1　匍匐茎子株划伤法转化流程图

Fig. 1　Flowchart of transformation for the scratching stolon method

箱中培养2~3 d（图2-A）。选取1月龄森林草莓苗*rg40*作为试验材料（图2-B），用注射器针头挑取平板上的单克隆，对准幼苗短缩茎部位进行4~6次垂直穿刺（图2-C，箭头标注为短缩茎部位），用注射器针管盖刮取平板上的菌体，均匀涂抹至短缩茎创伤部位，随后将幼苗种植于基质中（图2-D~F，箭头标注为短缩茎部位）。鉴于二倍体幼苗幼嫩易损，为避免早期取样损伤，定于45 d后进行统一观察。

2.1.3　下胚轴侵染法转化流程　将含有*35S::RUBY*的农杆菌在YEP固体培养基上划线、28 ℃恒温培养箱培养2~3 d，待其长出单克隆。选择阳性单克隆接种于含有75 mg·L^{-1}壮观霉素和50 mg·L^{-1}链霉素的YEP液体培养基中，在28 ℃、220 r·min^{-1}摇床中培养16 h。第2天按照1∶100的比例接种于50 mL含有壮观霉素和链霉素的YEP液体培养基中，并在28 ℃、220 r·min^{-1}摇床中培养直至OD_{600}达到0.6。接着3220 *g*离心10 min，收集菌液沉淀，用含有100 μmol·L^{-1}乙酰丁香酮（AS）的1/2MS液体培养基进行重悬，使其OD_{600}达到0.8。在28 ℃、100 r·min^{-1}条件下活化菌液1 h。当RG出现2片子叶时，切断下胚轴与根部连接处，选用携带子叶的下胚轴作为外植体材料（图3-A）。将外植体浸没在农杆菌溶液中，在28 ℃、100 r·min^{-1}条件下培养侵染15 min（图3-B），随后超声5 s（KQ-500DE型数控超声波清洗器，功率的90%）（图3-C）。将侵染后的外植体转移到用1/2MS+2%蔗糖（含有100 μmol·L^{-1} AS）润湿的滤纸上，23 ℃黑暗共培养4 d（图3-D）。共培养后，将感染的外植体用无菌水洗涤并转移到含250 mg·mL^{-1}头孢噻肟钠（Cef）的1/2MS+2%蔗糖培养基上，脱菌培养以诱导毛状根产生（图3-E）。侵染处理30 d后进行统一观察。

2.2　毛状根表型观察及阳性鉴定

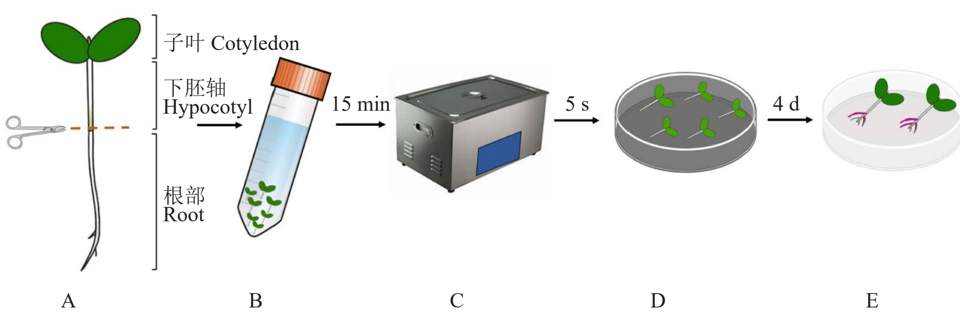
2.2.1　匍匐茎子株划伤法根系表型观察与鉴定　试验组（*RUBY*-OE）采用携带*35S::RUBY*质粒的4种菌株（Ar.1193、Ar.Qual、C58C1、K599），对照组（CK）采用对应不携带任何质粒的4种菌株。在接种后9 d时，观察到试验组根部出现红色表型。接种后20 d时，对透明杯壁观察的结果显示，对照组只产生白色根系（图4-A），而试验组则出现明显的红色根系（图4-B）。随后，将所有材料拔出清洗，进一步观察根部

A. 划线活化菌株；B. 森林草莓苗 *rg40*；C. 挑菌穿刺短缩茎；D~F. 涂抹菌体后种植。

A. Streaking for strain activation; B. Woodland strawberry *rg40*; C. Picking colonies and puncturing the shortened stem; D-F. Planting after smearing the bacterial suspension.

图 2　短缩茎穿刺法转化流程图

Fig. 2　Flowchart of transformation for the puncturing shortened stem method



A. 切下胚轴部位；B. 侵染 15 min；C. 超声处理 5 s；D. 黑暗下共培养 4 d（1/2MS+AS）；E. 脱菌培养诱导毛状根（1/2MS+CEF）。

A. Cutting hypocotyl; B. Infecting for 15 minutes; C. Ultrasonication for 5 seconds; D. Co-cultivating in the dark for 4 days (1/2MS+AS); E. Hairy root induction on disinfected medium (1/2MS+CEF).

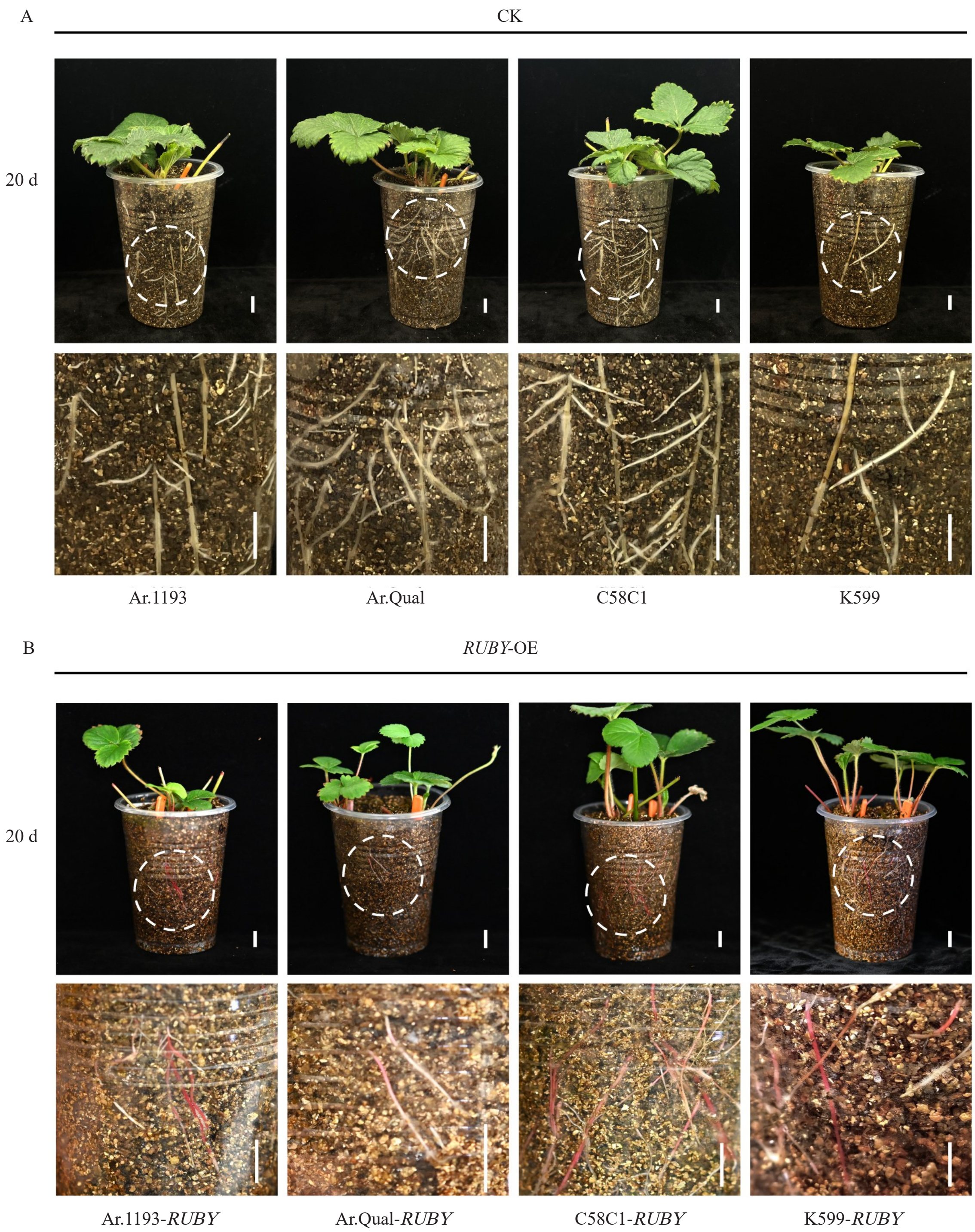
图 3　下胚轴侵染法转化流程图

Fig. 3　Flowchart of transformation for the hypocotyl infection method

表型。结果同样表明，对照组均产生白色根系，而试验组均能诱导出具有显著甜菜红素积累的红色毛状根（图5）。

对该方法获得的根系进行随机取样，根据经典CTAB方法提取DNA。采用双重PCR体系进行转基因毛状根的分子鉴定，利用引物*RUBY*检测-F和*RUBY*检测-R扩增载体*35S::RUBY*的序列，目的条带大小为441 bp；利用引物*FvACTIN*-F和*FvACTIN*-R扩增草莓内参基因，目标条带大小为184 bp。同时呈现441 bp（*RUBY*）和184 bp（*ACTIN*）特异性条带的样本，可在DNA水平上确认为转基因阳性毛状根。PCR结果显示，对照组白色根系均未扩增出*RUBY*条带，而所取红色根系均可扩增出*RUBY*条带，*RUBY*条带大小与*35S::RUBY*质粒扩增的大小一致（图6-A），并且红色根中草莓内参基因*ACTIN*均存在（图6-B），证实这些红色毛状根为转基因阳性根。

2.2.2　短缩茎穿刺法根系表型观察与鉴定　由于二



A.CK：不携带任何质粒的 4 种菌株处理；B. *RUBY*-OE：携带 *35S::RUBY* 质粒的 4 种菌株处理。标尺=1 cm。

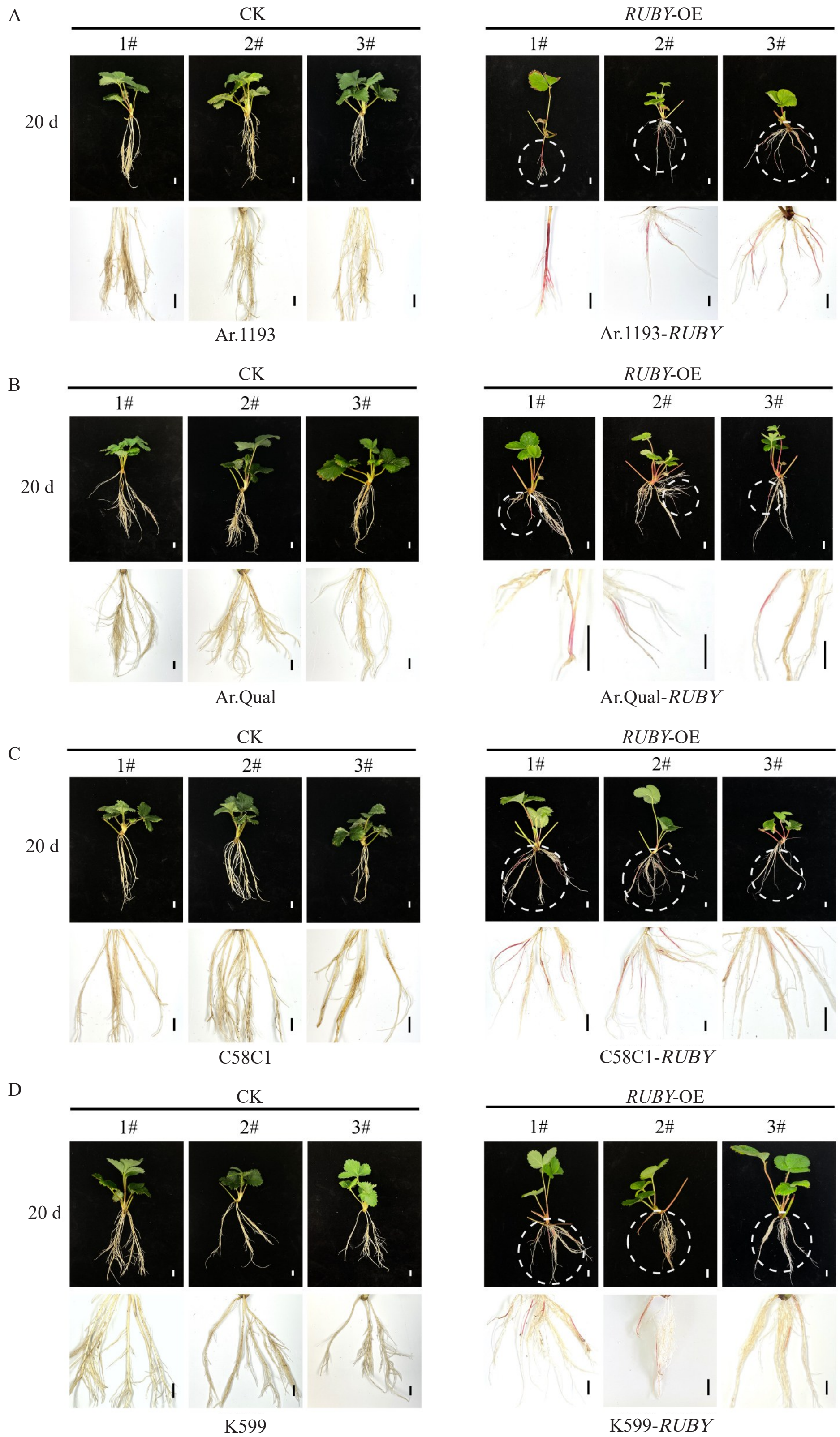
A. CK: Treatment with four strains without any plasmids; B. *RUBY*-OE: Treatment with four strains carrying the *35S::RUBY* plasmid. Bar=1 cm.

图 4 匍匐茎子株划伤法杯身表型观察

Fig. 4 Observation from the cup of the scratching stolon method

倍体小苗较为幼嫩，在较早时期不便于拔起观察，选取在45 d进行表型观察。试验组（*RUBY*-OE）采用携带 *35S::RUBY* 质粒的4种菌株（Ar.1193、Ar.Qual、C58C1、K599），对照组（CK）采用对应不携带任何质粒的4种菌株。观察结果表明，左侧对照组的新生根为白色，右侧携带 *35S::RUBY* 质粒的试验组产生红色毛状根（图7）。

同样，对该方法获得的根系进行随机取样并提

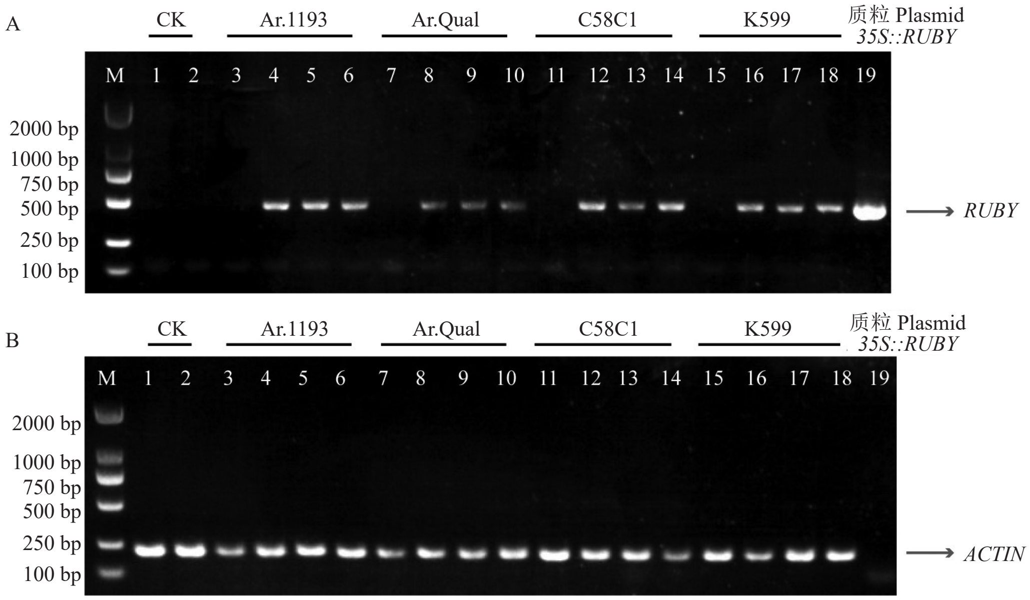


A. Ar.1193 菌株处理的对照组（左）与试验组（右）；B. Ar.Qual 菌株处理的对照组（左）与试验组（右）；C. C58C1 菌株处理的对照组（左）与试验组（右）；D. K599 菌株处理的对照组（左）与试验组（右）。标尺=1 cm。

A. CK (left) and *RUBY*-OE (right) treated with Ar.1193 strain; B. CK (left) and *RUBY*-OE (right) treated with Ar.Qual strain; C. CK (left) and *RUBY*-OE (right) treated with C58C1 strain; D. CK (left) and *RUBY*-OE (right) treated with K599 strain. Bar=1 cm.

图 5　匍匐茎子株划伤法根系表型观察

Fig. 5　Phenotype of hairy roots of the scratching stolon method



A. PCR 鉴定 *RUBY* 基因；B. PCR 鉴定 *ACTIN* 内参基因。M. DL2000 DNA Maker；泳道 1. 未做任何处理所产生的根；泳道 2. 只划伤处理所产生的根；泳道 3、7、11、15. 分别为 Ar.1193、Ar.Qual、C58C1、K599 均无质粒处理的毛状根；泳道 4~6、8~10、12~14、16~18. 分别为 Ar.1193、Ar.Qual、C58C1、K599 均携带 *35S::RUBY* 质粒处理的阳性毛状根；泳道 19. *35S::RUBY* 质粒。

A. PCR identification of *RUBY* gene; B. PCR identification of *ACTIN* reference gene. M. DL2000 DNA Maker; Line 1. Roots grown without any treatment; Line 2. Roots grown after only scratching treatment; Lines 3, 7, 11 and 15. Hairy roots grown after treatment with Ar.1193, Ar.Qual, C58C1 and K599, respectively, all without any plasmids. Lines 4-6, 8-10, 12-14 and 16-18. Positive hairy roots grown after treatment with Ar.1193, Ar.Qual, C58C1 and K599, respectively, all carrying the *35S::RUBY* plasmid; Line 19. *35S::RUBY* plasmid.

图6 匍匐茎子株划伤法阳性根鉴定

Fig. 6 Identification of positive hairy roots of the scratching stolon method

取DNA。PCR结果显示，对照组白色根均未扩增出*RUBY*条带，而所取红色根均可扩增出*RUBY*条带，条带大小与*35S::RUBY*质粒扩增的大小一致（图8-A），并且红色根中草莓内参基因*ACTIN*均存在（图8-B），进一步在DNA水平确认红色根为转基因阳性根。

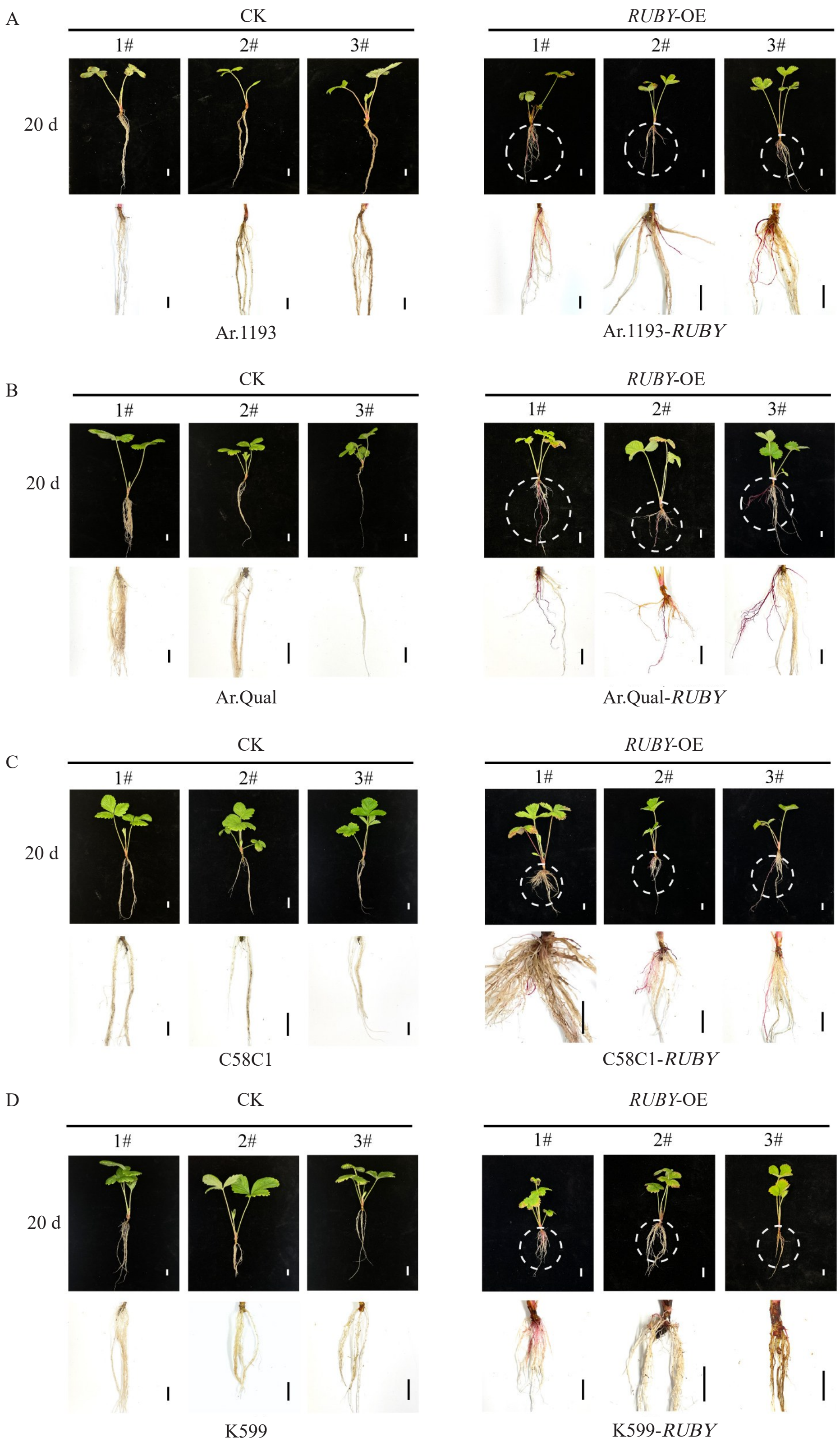
2.2.3 下胚轴侵染法愈伤及根系表型观察与鉴定 以携带*35S::RUBY*质粒的4种菌株作为试验组（*RUBY*-OE），以不携带任何质粒的对应4种菌株分别作为对照组（CK）。将带子叶的下胚轴脱菌培养（含250 mg·mL^{-1} Cef的1/2 MS+2%蔗糖培养基）7~12 d时，可以观察到下胚轴伤口部位有毛状根出现。侵染30 d后进行统计，观察到对照组产生白色根（图9-A），试验组有紫红色根的产生，并且产生了红色愈伤组织（图9-B）。对获得的根进行随机取样并提取DNA，PCR结果表明，对照组的白色根均未扩增出*RUBY*条带，而试验组所取紫红色根均可扩增出*RUBY*条带，并且条带大小正确（图9-C）。此外，紫红色根中草莓内参基因*ACTIN*均存在（图9-D），进一步在DNA水平确认紫红色根为转基因阳性根。

2.3 4种发根农杆菌菌株在不同方法下的转化效率

对4种发根农杆菌菌株在匍匐茎子株划伤法、短缩茎穿刺法、下胚轴侵染法3种方法下的转化情况进行统计。

2.3.1 在匍匐茎子株划伤法中对毛状根转化的影响 将未携带任何质粒的4种发根农杆菌菌株侵染的划伤匍匐茎子株作为对照组，携带*35S::RUBY*质粒的4种菌株侵染的划伤匍匐茎子株作为试验组。在20 d时进行观察统计，在该方法下，4种携带*35S::RUBY*质粒的发根农杆菌菌株的阳性根率均超过58%。其中Ar.1193的阳性根率最高，可达79.41%；Ar.Qual与K599的阳性率分别为67.65%与65.71%（表2）。因此在该方法下，最佳菌株为Ar.1193。

2.3.2 在短缩茎穿刺法中对毛状根转化的影响 将未携带任何质粒的4种菌株穿刺的短缩茎作为对照组，携带*35S::RUBY*质粒的4种菌株穿刺的短缩茎作为试验组。在45 d时进行观察统计，在该方法下，有3种携带*35S::RUBY*质粒的菌株阳性根率超过

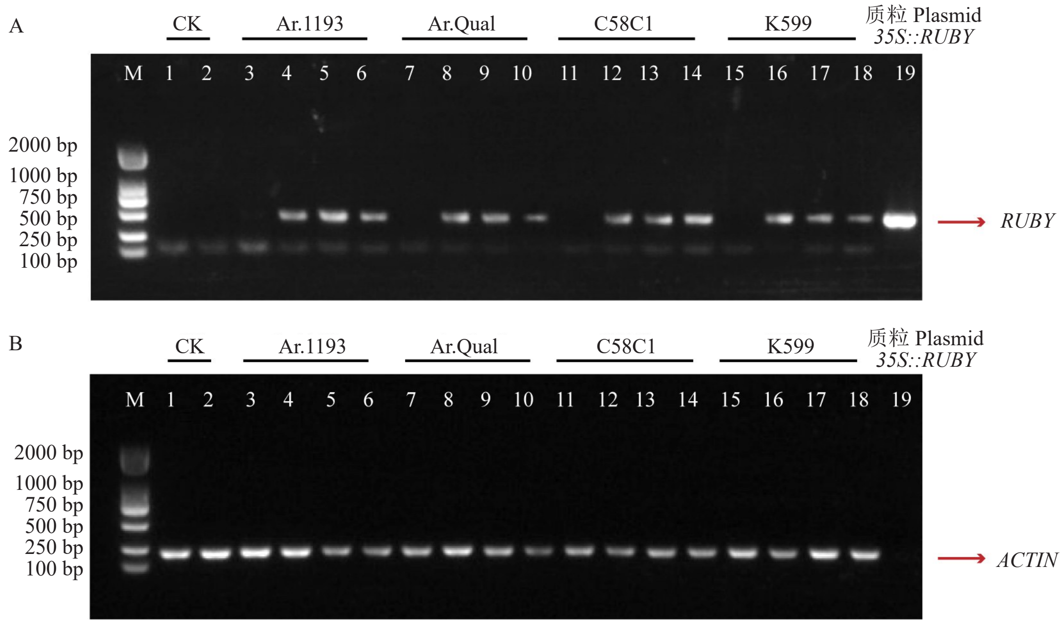


A. Ar.1193 菌株处理的对照组（左）与试验组（右）；B. Ar.Qual 菌株处理的对照组（左）与试验组（右）；C. C58C1 菌株处理的对照组（左）与试验组（右）；D. K599 菌株处理的对照组（左）与试验组（右）。标尺=1 cm。

A. CK (left) and *RUBY*-OE (right) treated with Ar.1193 strain; B. CK (left) and *RUBY*-OE (right) treated with Ar.Qual strain; C. CK (left) and *RUBY*-OE (right) treated with C58C1 strain; D. CK (left) and *RUBY*-OE (right) treated with K599 strain. Bar=1 cm.

图 7　短缩茎穿刺法根系表型观察

Fig. 7　Phenotype of hairy roots of the puncturing shortened stem method



A. PCR 鉴定 *RUBY* 基因；B. PCR 鉴定 *ACTIN* 内参基因。M. DL2000 DNA Maker；泳道 1. 未做任何处理所产生的根；泳道 2. 只划伤处理所产生的根；泳道 3、7、11、15. 分别为 Ar.1193、Ar.Qual、C58C1、K599 均无质粒处理的毛状根；泳道 4~6、8~10、12~14、16~18. 分别为 Ar.1193、Ar.Qual、C58C1、K599 均携带 *35S::RUBY* 质粒处理的阳性毛状根；泳道 19. *35S::RUBY* 质粒。

A. PCR identification of *RUBY* gene; B. PCR identification of *ACTIN* reference gene. M. DL2000 DNA Maker; Line 1. Roots grown without any treatment; Line 2. Roots grown after only scratching treatment; Lines 3, 7, 11 and 15. Hairy roots grown after treatment with Ar.1193, Ar.Qual, C58C1 and K599, respectively, all without any plasmids. Lines 4-6, 8-10, 12-14 and 16-18. Positive hairy roots grown after treatment with Ar.1193, Ar.Qual, C58C1 and K599, respectively, all carrying the *35S::RUBY* plasmid; Line 19. *35S::RUBY* plasmid.

图 8 短缩茎穿刺法阳性根鉴定

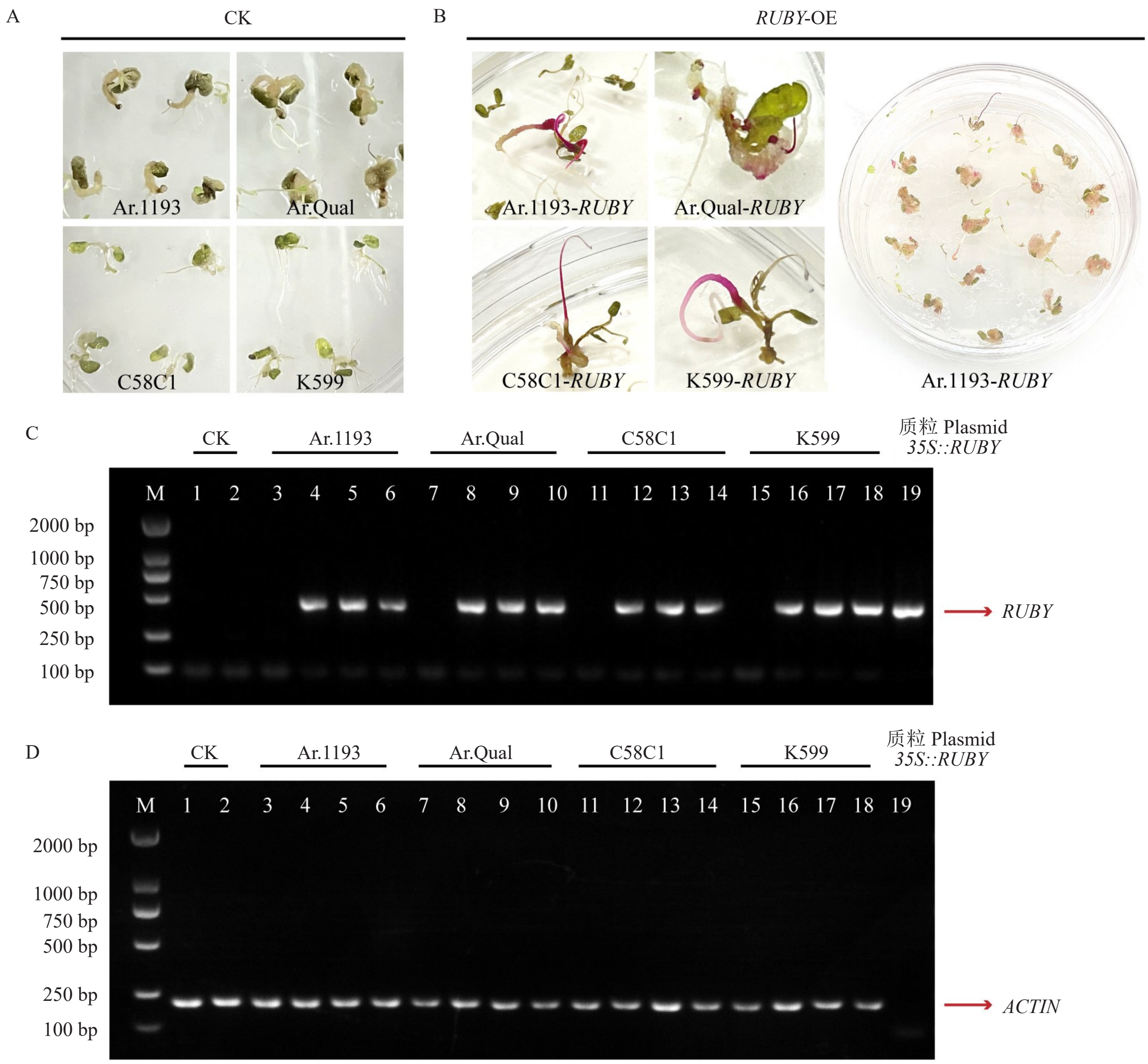
Fig. 8 Identification of positive hairy roots of the puncturing shortened stem method

50%。其中，Ar.1193 处理效果最好，阳性根率可达 73.33%；其次是 K599，阳性根率达到 58.06%；Ar.Qual 的阳性根率为 50.00%（表 3）。因此在该方法下，最佳菌株为 Ar.1193。

2.3.3 *在下胚轴侵染法中对毛状根转化的影响* 在 30 d 时，统计各项数值。由表 4 可知，Ar.1193 与 Ar.Qual 两种菌株在携带或不携带 *35S::RUBY* 质粒时诱导的生根率较高，均超过 60%。在阳性根率方面，Ar.1193 菌株达到 14.38%，Ar.Qual 菌株达到 12.50%。此外，笔者发现，在诱导毛状根的同时也伴随着愈伤组织的产生。菌株 Ar.1193 与 Ar.Qual 在诱导愈伤组织方面表现突出，不携带质粒的 2 种菌株侵染胚轴后愈伤率分别为 90.74% 和 82.69%，携带 *35S::RUBY* 质粒的 2 种菌株的愈伤率分别为 94.55% 和 80.54%，2 种菌株诱导产生的愈伤组织均较大且较为明显。K599 菌株诱导产生的愈伤组织较小且较少；Ar.Qual 菌株诱导所产生的红色愈伤组织较多，红色愈伤率高达 88.59%；Ar.1193 菌株的红色愈伤率达到 73.82%。

3 讨 论

在非组织培养方法层面，针对现有草莓毛状根诱导技术存在的问题，采取了系统化解决对策。与已报道的草莓体内注射诱导毛状根方法[15]相比，传统方法在匍匐茎茎部注射后 40 d，毛状根在注射部位附近开始发育，在注射后 60 d 毛状根大量增殖。此方法耗时较长，操作繁琐，茎段易折断，且只获得了 50% 的表皮隆起率，发根效率较低。此外，仅测试了 K599 菌株，菌株单一。为此，笔者创新性地开发了基于匍匐茎子株划伤法的快速转化体系，在划伤部位涂抹菌体，进行扦插培养。该方法将培养周期缩短至 20 d，效率提升了 2~3 倍。此外，结合 *RUBY* 视觉报告基因，无需使用特殊设备即可肉眼观察，简化操作环节、节省成本。并且，经对 4 种发根农杆菌（Ar.1193、Ar.Qual、C58C1、K599）进行系统比较，确定 Ar.1193 为最优菌株，其转化效率高达 79.41%，显



A. CK：不携带任何质粒的 4 种菌株侵染所产生的毛状根；B. *RUBY*-OE：携带 *35S::RUBY* 质粒的 4 种菌株侵染所产生的紫红色根与红色愈伤组织；C. PCR 鉴定 *RUBY* 基因；D. PCR 鉴定 *ACTIN* 内参基因；M. DL2000 DNA Maker；泳道 1. 未做任何处理所产生的根；泳道 2. 只切断处理所产生的根；泳道 3、7、11、15. 分别为 Ar.1193、Ar.Qual、C58C1、K599 均无质粒处理的毛状根；泳道 4~6、8~10、12~14、16~18. 分别为 Ar.1193、Ar.Qual、C58C1、K599 均携带 *35S::RUBY* 处理的阳性毛状根；泳道 19. *35S::RUBY* 质粒。

A. CK, Infection without any plasmids inducing white hairy roots; B. *RUBY*-OE：Infection with *35S::RUBY* plasmid inducing red roots and red callus; C. PCR identification of *RUBY* gene; D. PCR identification of *ACTIN* reference gene; M. DL2000 DNA Maker; Line 1. Roots grown without any treatment; Line 2. Roots grown after only cutting treatment; Lines 3, 7, 11 and 15. Hairy roots grown after treatment with Ar.1193, Ar.Qual, C58C1 and K599, respectively, all without any plasmids. Lines 4-6, 8-10, 12-14 and 16-18. Positive hairy roots grown after treatment with Ar.1193, Ar.Qual, C58C1 and K599, respectively, all carrying the *35S::RUBY* plasmid; Line 19. *35S::RUBY* plasmid.

图 9 下胚轴侵染法根系及愈伤组织表型观察与阳性根鉴定

Fig. 9 Phenotype of hairy roots and callus and identification of positive hairy roots of the hypocotyl infection method

著优于传统方法。

在组织培养方法层面，笔者利用发根农杆菌侵染下胚轴，相较于传统根癌农杆菌介导的叶盘法，该方法展现出显著优势：下胚轴再生根率最高可达75.74%，30 d即可获得转基因材料，相比于传统叶盘法周期缩短50%以上，转化效率提升4~5倍[22]。此外，研究发现下胚轴侵染法可同时诱导产生转基因愈伤组织，这些呈现红色表型的愈伤组织证实了*35S::RUBY*报告基因的成功整合与表达。值得注意的是，与根癌农杆菌介导的叶盘法相比，发根农杆菌

表 2 4 种发根农杆菌菌株在匍匐茎子株划伤法中对毛状根转化的影响

Table 2 Effects of four *A. rhizogenes* strains on hairy root transformation in the scratching stolon method

菌株 Strains	外植体数 Number of explants	毛状根的外植体数 Number of explants with hairy roots	阳性根的外植体数 Number of explants with positive roots	再生根率 Regeneration rate of roots/%	阳性根率 Frequency of positive roots/%
Ar.1193[1]	12	11	0	91.67	0.00
Ar.Qual[1]	12	12	0	100.00	0.00
C58C1[1]	12	10	0	83.33	0.00
K599[1]	12	11	0	91.67	0.00
Ar.1193-*RUBY*[2]	36	34	27	94.44	79.41
Ar.Qual-*RUBY*[2]	36	34	23	94.44	67.65
C58C1-*RUBY*[2]	37	34	20	91.89	58.82
K599-*RUBY*[2]	38	35	23	92.11	65.71

注：1 对照组．不携带任何质粒的 4 种菌株划伤的匍匐茎子株；2 试验组．携带 *35S::RUBY* 质粒的 4 种菌株划伤的匍匐茎子株。

Note: 1 Control groups. Stolon-derived plantlets were scratched by four strains that did not carry any plasmids. 2 Experimental groups. Stolon-derived plantlets were scratched by four strains that carry *35S::RUBY* plasmid.

表 3 4 种发根农杆菌菌株在短缩茎穿刺法中对毛状根转化的影响

Table 3 Effects of four *A. rhizogenes* strains on hairy root transformation in the puncturing shortened stem method

菌株 Strains	外植体数 Number of explants	毛状根的外植体数 Number of explants with hairy roots	阳性根的外植体数 Number of explants with positive roots	再生根率 Regeneration rate of roots/%	阳性根率 Frequency of positive roots/%
Ar.1193[1]	12	10	0	83.33	0.00
Ar.Qual[1]	12	11	0	91.67	0.00
C58C1[1]	12	9	0	75.00	0.00
K599[1]	12	10	0	83.33	0.00
Ar.1193-*RUBY*[2]	35	30	22	85.71	73.33
Ar.Qual-*RUBY*[2]	36	30	15	83.33	50.00
C58C1-*RUBY*[2]	37	30	9	81.08	30.00
K599-*RUBY*[2]	37	31	18	83.78	58.06

注：1 对照组．不携带任何质粒的 4 种菌株穿刺的短缩茎；2 试验组．携带 *35S::RUBY* 质粒的 4 种菌株穿刺的短缩茎。

Note: 1 Control groups. Shortened stem punctured by four strains that did not carry any plasmids. 2 Experimental groups. Shortened stem punctured by four strains that carry *35S::RUBY* plasmid.

表 4 4 种发根农杆菌菌株在下胚轴侵染法中对毛状根转化的影响

Table 4 Effects of four *A. rhizogenes* strains on hairy root transformation in hypocotyl infection method

菌株 Strains	外植体数 Number of explants	长愈伤的外植体数 Number of explants with callus	红色愈伤的外植体数 Number of explants with red callus	长毛状根的外植体数 Number of explants with hairy roots	有阳性根的外植体数 Number of explants with positive roots	愈伤率 Induction rate of callus/%	红色愈伤率 Induction rate of red callus/%	再生根率 Regeneration rate of roots/%	阳性根率 Frequency of positive roots/%
Ar.1193[1]	54	49	0	44	0	90.74	0.00	81.48	0.00
Ar.Qual[1]	52	43	0	39	0	82.69	0.00	75.00	0.00
C58C1[1]	51	22	0	21	0	43.14	0.00	41.18	0.00
K599[1]	50	4	0	20	0	8.00	0.00	40.00	0.00
Ar.1193-*RUBY*[2]	202	191	141	153	22	94.55	73.82	75.74	14.38
Ar.Qual-*RUBY*[2]	185	149	132	112	14	80.54	88.59	60.54	12.50
C58C1-*RUBY*[2]	166	84	18	70	4	50.60	21.43	42.17	5.71
K599-*RUBY*[2]	168	21	10	66	8	12.50	47.62	39.29	12.12

注：1 对照组．不携带任何质粒的 4 种菌株侵染的下胚轴；2 试验组．携带 *35S::RUBY* 质粒的 4 种菌株侵染的下胚轴。

Note：1 Control groups. Hypocotyl infected by four strains that did not carry any plasmids. 2 Experimental groups. Hypocotyl infected by four strains that carry *35S::RUBY* plasmid.

诱导的愈伤组织形成周期显著缩短[7]，表现出更高的转化效率，红色愈伤率最高可达88.59%，为草莓及其他蔷薇科作物的遗传转化和功能基因组研究提供了高效、普适的新技术体系。这不仅解决了传统叶盘法转化率低、周期长的问题，更为难转化植物的基因编辑和分子育种奠定了基础。

此外，众多研究表明，当植物受到创伤与植物生长调节剂刺激时，发育调节因子（developmental regulators，DRs）可以改变植物细胞发育进程，重新诱导分生组织形成，以此得到转基因幼芽进而获得转基因植株[23]。利用*WUS*、*IPT*、*BBM*、*PLT*、*GRF*、*GIF*和*STM*等DRs可极大地改善植物体细胞胚胎的发生速度和再生能力，显著提高遗传转化效率[24]。目前，已有利用发根农杆菌携带发育调节因子侵染植物成功获得转基因植株的研究[25]。Wang等[26]在白菜中已实现利用发根农杆菌共表达发育调节因子*ZmWUS2-IPT-AtPLT5*复合体，获得了转基因植株，在白菜物种中打破了基因型的限制条件，建立了高效便捷的遗传转化系统。Yi等[27]在萝卜中通过发根农杆菌介导法，利用发育调节因子与*RUBY*视觉报告基因，在不添加任何外源激素的情况下成功获得了转基因植株。对于发根农杆菌介导的草莓转基因体系的建立，可参考利用发育调节因子的方式。

4　结　论

通过匍匐茎子株划伤法、短缩茎穿刺法和下胚轴侵染法3种方法，结合*35S::RUBY*视觉报告基因，成功诱导二倍体森林草莓以及八倍体栽培草莓产生转基因阳性毛状根。研究结果表明，4种发根农杆菌（Ar.Qual、Ar.1193、C58C1、K599）在不同处理方法下均能诱导草莓外植体形成毛状根。其中Ar.1193菌株的诱导效果最为显著，毛状根阳性率最高可达79.41%。笔者筛选出最适宜的菌株，并建立了草莓高效、经济、快速的发根农杆菌转化体系，为草莓遗传转化研究提供了有力的技术支持，也为草莓的根系发育、CRISPR/Cas9基因编辑效率的快速验证奠定了基础。

参考文献　References：

[1]　罗学兵，贺良明. 草莓的营养价值与保健功能[J]. 中国食物与营养，2011，17(4)：74-76.
LUO Xuebing，HE Liangming. Nutritional value and health function of strawberry[J]. Food and Nutrition in China，2011，17(4)：74-76.

[2]　LIU Z C，LIANG T，KANG C Y. Molecular bases of strawberry fruit quality traits：Advances，challenges，and opportunities[J]. Plant Physiology，2023，193(2)：900-914.

[3]　武冲，姜莉莉，宗晓娟，王晓芳，田中一久. 中国草莓育种研究进展[J]. 落叶果树，2022，54(2)：28-30.
WU Chong，JIANG Lili，ZONG Xiaojuan，WANG Xiaofang，TIAN Zhongyijiu. Advances in strawberry breeding in China[J]. Deciduous Fruits，2022，54(2)：28-30.

[4]　邢思年. 草莓CRISPR/Cas9基因组编辑技术体系建立和*FaMAPK12*基因功能分析[D]. 北京：中国农业大学，2018.
XING Sinian. Establishment of strawberry CRISPR/Cas9 genome editing technology system and analysis of *FaMAPK12* gene function[D]. Beijing：China Agricultural University，2018.

[5]　乔瑞琪，金万梅，沈元月. 二倍体草莓'Ruegen'再生体系的建立[J]. 北京农学院学报，2018，33(3)：35-39.
QIAO Ruiqi，JIN Wanmei，SHEN Yuanyue. Establishment of regeneration system using the leaves of diploid strawberry 'Ruegen'[J]. Journal of Beijing University of Agriculture，2018，33(3)：35-39.

[6]　陈赢男，胡传景，诸葛强，胡建军，尹佟明. 杨树农杆菌遗传转化研究30年[J]. 林业科学，2022，58(12)：114-129.
CHEN Yingnan，HU Chuanjing，ZHUGE Qiang，HU Jianjun，YIN Tongming. Thirty years of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Populus*[J]. Scientia Silvae Sinicae，2022，58(12)：114-129.

[7]　吴雪梅，汤浩茹. 草莓叶片培养研究进展[J]. 果树学报，2004，21(6)：598-602.
WU Xuemei，TANG Haoru. Advances on *in vitro* culture of strawberry (*Fragaria ananassa*) leaves[J]. Journal of Fruit Science，2004，21(6)：598-602.

[8]　王翠华，刘荇，杜小云，曾弓剑，谭雅慧，周超，刘开鸿，沈祥陵. 红颜草莓叶盘再生及遗传转化体系的优化[J]. 生物资源，2020，42(2)：234-242.
WANG Cuihua，LIU Xing，DU Xiaoyun，ZENG Gongjian，TAN Yahui，ZHOU Chao，LIU Kaihong，SHEN Xiangling. Optimization of leaf disc regeneration and genetic transformation system in Benihope strawberry[J]. Biotic Resources，2020，42(2)：234-242.

[9]　李鹏举，宋鹏慧，段亚东，杨光，周双，张鹍，房磊. 草莓遗传育种中的生物技术的应用[J]. 现代农业研究，2021，27(8)：121-122.
LI Pengju，SONG Penghui，DUAN Yadong，YANG Guang，ZHOU Shuang，ZHANG Kun，FANG Lei. Application of biotechnology in strawberry genetics and breeding[J]. Modern Agriculture Research，2021，27(8)：121-122.

[10]　汪虞骅，黄思远，郝雪婷，金朝辉，张清虹，赵荣. 植物毛状根研究与应用进展[J]. 现代农业科技，2024(22)：138-142.
WANG Yuhua，HUANG Siyuan，HAO Xueting，JIN Zhaohui，ZHANG Qinghong，ZHAO Rong. Research and application progress on plant hairy roots[J]. Modern Agricultural Science and Technology，2024(22)：138-142.

[11] 曹冬梅，韩振海，许雪峰．发根农杆菌 Ri 质粒研究进展[J]. 中国生物工程杂志，2003，23(2)：74-78.

CAO Dongmei，HAN Zhenhai，XU Xuefeng. Research progress of *Agrobacterium rhizogenes*[J]. Journal of Chinese Biotechnology，2003，23(2)：74-78.

[12] 舒铫，杨嵩涵，孔可心，吕若涵，吕桂云，张春秋，宋士清．发根农杆菌介导的甜瓜转化体系的建立及对 CRISPR/Cas9 靶位点的快速检测[J]. 农业生物技术学报，2025，33(4)：924-932.

SHU Yao，YANG Songhan，KONG Kexin，LÜ Ruohan，LÜ Guiyun，ZHANG Chunqiu，SONG Shiqing. Establishment of *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation system in melon (*Cucumis melo*) and rapid detection of CRISPR/Cas9 target sites[J]. Journal of Agricultural Biotechnology，2025，33(4)：924-932.

[13] 邬婷婷，刘凉琴，姜燕琴，葛春峰，田亮亮，刘梦溪，曾其龙，於虹．发根农杆菌介导的蓝莓遗传转化体系的建立[J/OL]. 果树学报，2025：1-12(2025-04-27). https://doi.org/10.13925/j.cnki.gsxb.20250077.

WU Tingting，LIU Liangqin，JIANG Yanqin，GE Chunfeng，TIAN Liangliang，LIU Mengxi，ZENG Qilong，YU Hong. Construction of genetic transformation system mediated by *Agrobacterium rhizogenes* in *Vaccinium corymbosum*[J/OL]. Journal of Fruit Science，2025：1-12(2025-04-27). https://doi.org/10.13925/j.cnki.gsxb.20250077.

[14] YAN H Q，MA D D，YI P P，SUN G L，CHEN X Y，YI Y，HUANG X L. Highly efficient *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation for functional analysis in woodland strawberry[J]. Plant Methods，2023，19(1)：99.

[15] HAO F L，WU S X，SHEN Z Y，TANG M T，GE X J，WU M Q，SUN Q H，FANG C B. Establishment of an *in vivo* transgenic hairy root system in strawberry for verifying the nitrate-transport activity of *FaNRT1.1*[J/OL]. Horticultural Plant Journal，2024(2024-12-18). https://doi.org/10.1016/j.hpj.2024.11.001.

[16] 李雯静，李旭彤，辛同旭，柴森，王帅，杨学勇．RUBY 无创筛选系统在黄瓜遗传转化中的应用[J]. 中国蔬菜，2025(3)：46-54.

LI Wenjing，LI Xutong，XIN Tongxu，CHAI Sen，WANG Shuai，YANG Xueyong. Application of RUBY noninvasively selection system in cucumber genetic transformation[J]. China Vegetables，2025(3)：46-54.

[17] HE Y B，ZHANG T，SUN H，ZHAN H D，ZHAO Y D. A reporter for noninvasively monitoring gene expression and plant transformation[J]. Horticulture Research，2020，7：152.

[18] 王中一，刘熠，胡博文，朱凡，刘峰，杨莎，熊程，欧立军，戴雄泽，邹学校．基于 RUBY 及 CaREF1 的辣椒高效遗传转化体系构建[J]. 园艺学报，2025，52(4)：1093-1104.

WANG Zhongyi，LIU Yi，HU Bowen，ZHU Fan，LIU Feng，YANG Sha，XIONG Cheng，OU Lijun，DAI Xiongze，ZOU Xuexiao. Construction of a high-efficiency genetic transformation system in pepper leveraging RUBY and CaREF1[J]. Acta Horticulturae Sinica，2025，52(4)：1093-1104.

[19] 胡晓．矮牵牛 *PMADS18* 和 *PMADS9* 基因的定点敲除及 RUBY 标记基因在矮牵牛中的应用[D]. 重庆：西南大学，2022.

HU Xiao. Site-directed knockout of *PMADS18* and *PMADS9* genes and application of RUBY marker gene in *Petunia hybrida*[D]. Chongqing：Southwest University，2022.

[20] 苑忠杰．RNAi 技术在柠檬抗 CYVCV 育种中的应用及柠檬遗传转化体系的建立[D]. 重庆：西南大学，2024.

YUAN Zhongjie. Application of RNAi technology in breeding of lemon resistant to CYVCV and establishment of genetic transformation system of lemon[D]. Chongqing：Southwest University，2024.

[21] ROGERS S O，BENDICH A J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh，herbarium and mummified plant tissues[J]. Plant Molecular Biology，1985，5(2)：69-76.

[22] FOLTA K M，DAVIS T M. Strawberry genes and genomics[J]. Critical Reviews in Plant Sciences，2006，25(5)：399-415.

[23] 马曦，张金睿，庄红梅，陈巍，张蜜，袁晓琪，易小芳，王聪聪，王海云，王燕．发根农杆菌介导的芜菁高效遗传转化体系建立[J/OL]. 园艺学报，2025：1-10(2025-05-07). https://doi.org/10.16420/j.issn.0513-353x.2025-0140.

MA Xi，ZHANG Jinrui，ZHUANG Hongmei，CHEN Wei，ZHANG Mi，YUAN Xiaoqi，YIXiaofang ，WANG Congcong，WANG Haiyun，WANG Yan. Establishment of an efficient genetic transformation system mediated by *Agrobacterium rhizogenes* in turnip[J/OL]. Acta Horticulturae Sinica，2025：1-10(2025-05-07). https://doi.org/10.16420/j.issn.0513-353x.2025-0140.

[24] 谢盈盈，王克剑，饶玉春，黄勇．发育调节因子助力作物遗传转化效率提升[J/OL]. 遗传，2025：1-21(2025-04-21). http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.r.20250418.1608.002.html.

XIE Yingying，WANG Kejian，RAO Yuchun，HUANG Yong. Developmental regulatory factors promote the efficiency of cropgenetic transformation[J/OL]. Hereditas (Beijing)，2025：1-21(2025-04-21). http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.r.20250418.1608.002.html.

[25] 王盈润，郑仲辰，JUDITH M，何轶洋，李杰勤，郑甲成．发育调控因子提高植物遗传转化效率的研究进展[J]. 河南科技学院学报(自然科学版)，2025，53(1)：23-30.

WANG Yingrun，ZHENG Zhongchen，JUDITH M，HE Yiyang，LI Jieqin，ZHENG Jiacheng. Improvement progress of plant genetic transformation efficiency by the developmental regulatory factors[J]. Journal of Henan Institute of Science and Technology (Natural Science Edition)，2025，53(1)：23-30.

[26] WANG Y L，YANG X D，WANG W L，WANG Y，CHEN X S，WU H，GAO Z Y，XU H H，LIU T K，LI Y，XIAO D，LIU W S，HOU X L，ZHANG C W. Efficient genetic transformation and gene editing of Chinese cabbage using *Agrobacterium rhizogenes*[J]. Plant Physiology，2025，197(2)：kiae543.

[27] YI X F，WANG C C，YUAN X Q，ZHANG M，ZHANG C W，QIN T J，WANG H Y，XU L，LIU L W，WANG Y. Exploring an economic and highly efficient genetic transformation and genome-editing system for radish through developmental regulators and visible reporter[J]. The Plant Journal，2024，120(4)：1682-1692.