北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

基于双向启动子的植物多基因表达系统构建及其在油松瞬时转化中的应用

刘佳凡 李京京 钮世辉

Engineered plant bidirectional promoter for multigene expression: application in transient transformation of Chinese pine

Liu Jiafan, Li Jingjing, Niu Shihui

引用本文:
刘佳凡, 李京京, 钮世辉. 基于双向启动子的植物多基因表达系统构建及其在油松瞬时转化中的应用[J]. 北京林业大学学报, 2026, 48(6):30–40. doi: 10.12171/j.1000–1522.20260130
Liu Jiafan, Li Jingjing, Niu Shihui. Engineered plant bidirectional promoter for multigene expression: application in transient transformation of Chinese pine[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2026, 48(6):30–40. doi: 10.12171/j.1000–1522.20260130

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20260130

您可能感兴趣的其他文章
Articles you may be interested in

白桦*BpSPL6*基因启动子的克隆及表达分析
Cloning and expression analysis of *BpSPL6* promoter from *Betula platyphylla*
北京林业大学学报, 2022, 44(2): 1–10. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200174

油松*SAUR*基因家族鉴定及其干旱胁迫表达模式分析
Identification of *SAUR* gene family in *Pinus tabuliformis* and analysis on its expression patterns under drought stress
北京林业大学学报, 2024, 46(8): 57–67. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20230333

核桃*JrTT1–1*启动子不同长度片段响应干旱的活性分析
Activity analysis of different length fragments of walnut *JrTT1–1* promoter in response to drought stress
北京林业大学学报, 2022, 44(8): 31–38. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210126

欧李果肉酵母cDNA文库构建及*PhLDOX*基因上游调控因子筛选
Construction of yeast cDNA library of *Prunus humilis* flesh and screening for upstream regulatory factors of *PhLDOX* gene
北京林业大学学报, 2026, 48(3): 191–202. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20250293

油松*PtNF–YC1*基因鉴定及其调控球花发育的作用机制研究
Identification of *PtNF–YC1* of *Pinus tabuliformis* and its molecular mechanism involved in regulation of cone development
北京林业大学学报, 2023, 45(9): 1–8. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20220250

枸杞 *SnRK*基因家族鉴定及表达分析
Identification and expression analysis of *SnRK* gene family in *Lycium barbarum*
北京林业大学学报, 2025, 47(11): 96–108. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20250274

DOI:10.12171/j.1000−1522.20260130

基于双向启动子的植物多基因表达系统构建及其在油松瞬时转化中的应用

刘佳凡　李京京　钮世辉
（北京林业大学生物科学与技术学院，林木资源高效生产全国重点实验室，北京 100083）

摘要:【目的】本研究旨在开发一种结构紧凑、表达高效且序列同源性低的双向启动子多基因表达系统，为针叶树本源基因功能验证提供高效平台。**【方法】**将经验证的植物高效短转录增强子（STE）串联（4 × STE），两端反向连接非重复的 CaMV 35S 与 CsVMV 最小核心启动子，从源头上降低序列同源性；同时结合 P2A 自剪切肽多顺反子策略，构建单个双向启动子驱动 5 个基因协同表达的系统。通过发根根瘤菌介导的瞬时转化体系，在模式植物烟草及裸子植物油松下胚轴中验证该系统的表达效率与跨物种适用性。**【结果】**（1）成功构建了结构紧凑的双向启动子，在烟草与油松中均能同时驱动上游与下游基因的高效表达，证实该系统具有跨物种适用性；（2）下游甜菜红素合成途径基因（*CYP*76*AD*1、*DODA*、*GT*）成功表达并催化酪氨酸转化为甜菜红素，组织呈现明显红色；（3）上游 *GUS* 基因的表达强度虽低于 35S 启动子，但仍保持较高水平，*LUC* 亦检测到稳定发光信号。**【结论】**本研究构建的双向启动子多基因表达系统，有效规避了传统多基因载体中重复序列引发的基因沉默风险，解决了载体结构冗余与表达效率之间的矛盾。该系统为植物多基因遗传改良提供了新型工具，在针叶树等难转化物种的基因功能验证与分子育种中具有重要应用价值。

关键词：双向启动子；多基因共表达；油松；短转录增强子 (STE)；转录调控元件；P2A
中图分类号：S791.254；S722　**文献标志码：**A　**文章编号：**1000−1522(2026)06−0030−11
引文格式：刘佳凡，李京京，钮世辉. 基于双向启动子的植物多基因表达系统构建及其在油松瞬时转化中的应用［J］. 北京林业大学学报，2026，48(6)：30−40. Liu Jiafan, Li Jingjing, Niu Shihui. Engineered plant bidirectional promoter for multigene expression: application in transient transformation of Chinese pine［J］. Journal of Beijing Forestry University, 2026, 48(6): 30−40.

Engineered plant bidirectional promoter for multigene expression: application in transient transformation of Chinese pine

Liu Jiafan　Li Jingjing　Niu Shihui
(School of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, State Key Laboratory of Efficient Production of Forest Resources, Beijing 100083, China)

Abstract: ［**Objective**］ This study aimed to develop a compact, efficient and low-sequence-homology bidirectional promoter-based multigene expression system, providing a high-performance platform for native gene functional validation in conifers. ［**Method**］ A validated plant short transcriptional enhancer (STE) was tetramerized (4 × STE) and flanked by two non-repetitive minimal core promoters, CaMV 35S and CsVMV, in opposite orientations to minimize source sequence homology. Combined with a P2A self-cleaving peptide-based polycistronic strategy, a single-promoter system for the simultaneous expression of five genes was constructed. The expression efficiency and cross-species applicability of this system were verified in the

收稿日期: 2026−03−13　**修回日期:** 2026−04−30
基金项目: 国家自然科学基金项目（32441043），中央高校基本科研业务费（QNTD202502）。
第一作者: 刘佳凡。主要研究方向：生物技术。Email: JiaFan@bjfu.edu.cn　地址：100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学生物科学与技术学院。
责任作者: 钮世辉，教授。主要研究方向：林木遗传育种。Email: arrennew@bjfu.edu.cn　地址：同上。
本刊网址: https://j.bjfu.edu.cn; https://journal.bjfu.edu.cn

model plant tobacco (*Nicotiana benthamiana*) and hypocotyls of the gymnosperm *Pinus tabuliformis* via *Rhizobium*-mediated transient transformation. [**Result**] (1) A compact bidirectional promoter was successfully constructed, driving robust and simultaneous expression of both upstream and downstream genes in tobacco and *P. tabuliformis*, thereby confirming that the system has certain species applicability. (2) The downstream betalain biosynthesis genes (*CYP*76*AD*1, *DODA*, *GT*) were successfully expressed and catalyzed the conversion of tyrosine into betalains, resulting in distinct red pigmentation in tissues. (3) Although the expression intensity of the upstream *GUS* gene was lower than that driven by the 35S promoter, it remained at a relatively high level, and stable luminescent signals were also detected for *LUC*. [**Conclusion**] The bidirectional promoter-based polygenic expression system established in this study effectively avoids the risk of transgene silencing caused by repetitive sequences in traditional polygenic vectors, resolving the trade-off between vector structural redundancy and expression efficiency. This system provides a novel tool for plant polygenic genetic improvement and exhibits significant application potential in gene function characterization and molecular breeding of recalcitrant species, including conifers.

Key words: bidirectional promoter; multigene co-expression; *Pinus tabuliformis*; short transcriptional enhancer; transcriptional regulatory element; P2A

多基因共表达是实现植物复杂数量性状遗传改良的关键策略[1]。传统多基因转化方法主要包括多次转化法、基因枪共转化法、杂交聚合法及连锁基因共转化法等[2]，但存在载体过大（因多个完整基因表达串联）、转化困难、受体负担加重及操作流程繁琐等局限。更为关键的是，相同元件的重复使用易引发转录基因沉默（transcriptional gene silencing，TGS）现象[3]。该现象可能源于宿主细胞将重复序列识别为外源入侵 DNA，进而通过 DNA 甲基化[4−7]、组蛋白表观遗传修饰[8−9]、转录因子结合位点竞争[7]以及 sRNA 介导的转录后沉默[10]等多种途径诱导异染色质形成，抑制基因转录，被视为是转基因技术的主要障碍[11]。现有研究试图通过增加抗沉默候选基因数量[12]、引入 RNA 沉默抑制子[13]、使用组织特异性启动子[14]或新型植物内源性启动子[15]以及堆叠多种不同启动子[16]等方法来降低序列同源性。然而，上述策略均未能从根本上解决“载体结构冗余”与“序列重复诱发沉默”之间的矛盾。增加抗沉默基因会加剧细胞代谢负担，干扰植株正常生长发育[17]；引入 RNA 沉默抑制子易干扰内源 miRNA 通路，引发发育异常[18]；组织特异性启动子不仅种类有限，且多具物种特异性，跨物种使用往往活性不足；而堆叠多种不同启动子则易导致各单元表达失衡，并显著增加载体大小与构建复杂度。因此，开发结构紧凑、低同源性且表达高效的新型多基因表达系统，已成为突破该技术瓶颈的关键。

双向启动子（bidirectional promoters，BDPs）是指位于相邻但转录方向相反的两个基因之间的共享 DNA 序列，而这两个基因称为双向基因对。其独特结构可在载体构建中减少重复启动子的使用，从源头上降低基因沉默风险；同时简化载体结构，在多基因转化应用中展现出显著优势。目前，双向启动子的常用构建方式为单向启动子的反向连接。例如，将 CaMV 35S 启动子与 35S mini 反向连接以构建双向启动子[19]，但该策略仍未避免重复序列引入的问题。此外，传统双向启动子通常仅能驱动两个基因的表达，难以满足复杂代谢途径或多性状聚合的需求。自剪切肽多肽 P2A（porcine teschovirus-1 2A peptide）为解决这一问题提供了有效工具。P2A 编码平均长度为 18~22 个氨基酸的肽段[20]，在多顺反子载体中置于两个基因之间，可通过核糖体跳跃实现自切割[21]，从而由一个启动子驱动多个基因以近乎等摩尔比例的共表达[22]。因其序列短、切割效率高、对蛋白表达影响小及生物兼容性广等优势，P2A 被广泛应用于多基因共表达系统。

启动子的活性由无方向性的转录增强元件与具方向性的核心启动子共同决定。相关研究开发出一种筛选植物短转录增强子（short transcriptional enhancers，STE）的新策略[23]，从水稻（*Oryza sativa*）和花椰菜花叶病毒 35S 启动子中筛选出一系列高活性短 STE 片段，单个 STE 片段即可显著提升下游靶基因的表达水平。同时，在双生病毒甘薯曲叶病毒的 SBG51 卫星 DNA 中发现的增强序列可显著提高上游基因表达，且其增强效果不依赖启动子与终止子类型[24]。此外，终止子与非翻译区（untranslated region，UTR）序列在基因表达调控中同样发挥关键作用。拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）热激蛋白（heat shock protein，HSP）终止子（AtHSP Term）比 NOS、OCS、CaMV35S 等常用终止子更高效，可通过提升 mRNA 积累水平提高基因表达水平[25]；烟草延伸

蛋白(extensin)基因的终止子(NtEU term)同样通过高效终止转录、优化 Poly(A)加尾等机制，大幅提高 mRNA 的稳定性和积累量，实现高水平的转基因表达[26]；而从拟南芥光系统 I 复合体 K 亚基 5′非翻译区(the 5′ untranslated region derived from the *Arabidopsis thaliana* Photosystem I subunit K gene)截取的部分增强子片段，可有效提升蛋白表达水平且不具备基因特异性，同时其序列长度对表达效果有显著影响[27]。

与被子植物相比，以针叶树为代表的裸子植物遗传改良面临更严峻的挑战。油松(*Pinus tabuliformis*)作为我国北方特有的乡土树种，其生态适生区面积达 300 万 km^2，在林业生态和经济中具有不可替代的作用[28]。目前，其 25 Gb 超大基因组的组装与精准注释已完成[29]，使其成为开展遗传转化及机制研究的理想模式树种。然而，油松再生困难、对农杆菌/根瘤菌介导转化的天然抵抗性强、依赖组织培养技术及转化周期长等因素，导致其基因功能研究多依赖拟南芥、烟草等被子植物进行异源验证[30]，严重阻碍了其分子育种进程。因此，建立高效、稳定且操作简便的瞬时转化体系，成为亟待解决的关键问题。

基于此，本研究构建了一种基于双向启动子的多基因表达系统(图 1)。该系统串联经验证的水稻高效增强子 STEos007、STEos008、STEos006 和病毒来源增强子 STEvs011，形成合成型四联 STE 增强子(4 × STE)，并反向连接木薯叶脉花叶病毒最小核心启动子 CsVMV mini-pro[31]和花椰菜花叶病毒最小核心启动子 CaMV 35S mini-pro；同时结合 P2A 自剪切肽策略，实现单启动子同步驱动上游 *GUS*、*LUC* 和下游 *RUBY*(*CYP76AD1*、*DODA*、*GT*)共 5 个基因的高效表达。此外，系统还整合了 SBG51、AtPsaK UTR、NtEU Term、AtHSP1.8 Term 等调控元件以进一步提高表达效率。将该系统应用于油松下胚轴中以实现瞬时遗传转化，旨在为裸子植物本源基因功能研究提供快速验证平台。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 植物材料

本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)于人工气候室中(25 ℃、光照强度 150 μmol/(m^2·s)、光周期 16 h 光照/ 8 h 黑暗、相对湿度 65% ~ 75%)培养 4~6 周。

油松种子采集自中国河北省平泉市的无性系种子园(41°39′N，118°45′E，海拔为 560 ~ 580 m)。将种子均匀地洒在水苔的表面，置于人工气候室中(19 ~ 24 ℃、光照强度 150 μmol/(m^2·s)、光周期 16 h 光照/8 h 黑暗、湿度 65% ~ 75%)，培养 20~25 d。

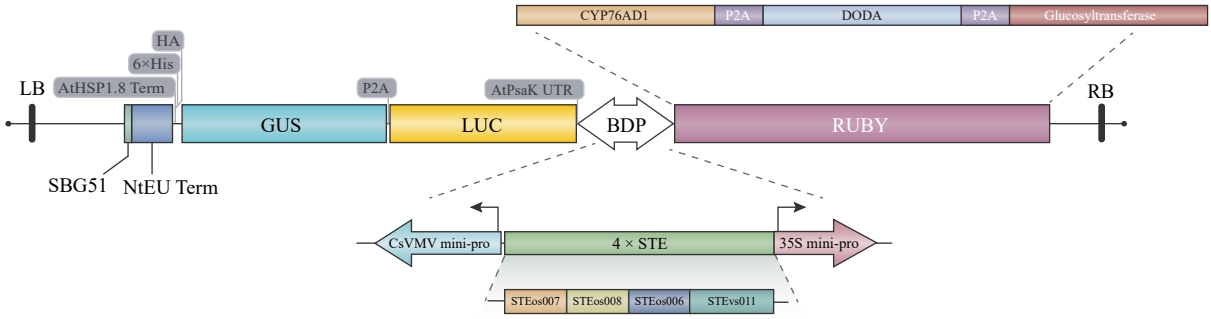
1.1.2 菌株及质粒

发根根瘤菌(*Rhizobium rhizogenes*)K599 化学感受态细胞(AC1083S)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α 化学感受态细胞(DL1001S)均购自上海唯地生物技术有限公司。

双向启动子及调控模块(结构见图 1)由北京擎科生物科技股份有限公司化学合成。

pRi2-35*S*::*RUBY*、p35*S*::*GUS*-p35*S*::*RUBY*、p35*S*::*LUC*-p35*S*::*RUBY* 及 pRi2-*BDP*(结构见图 2)以及 pBI121 和 pGreenII 0800-LUC(结构见图 3)均由本实验室保存。

植物二元表达载体 pRi2vGR106[32]由本实验室保存。该载体是本实验室前期经系统性迭代工程改造获得的发根根瘤菌介导高效二元载体(结构见图 3)。该载体在 pTi 质粒的基础上，通过替换为嵌合型 T-DNA 边界、引入 VirGN54D 组成型激活突变和 pVS1 R106H 高拷贝突变实现 T-DNA 递送效率大幅提升，同时包含 *RUBY* 与 *GUS* 报告基因，适用



LB 和 RB 分别表示 T-DNA 左/右边界；BDP 为双向启动子；STE 表示短转录增强子；35S mini-pro 表示花椰菜花叶病毒最小核心启动子；CsVMV mini-pro 表示木薯叶脉花叶病毒最小核心启动子；NtEU Term 表示烟草延伸蛋白终止子；AtPsaK UTR 表示拟南芥光系统 I 复合体 K 亚基 5’ 非翻译区增强子片段；AtHSP1.8 Term 表示拟南芥热激蛋白非翻译区终止子。下同。

图 1 植物双向启动子结构示意图

Fig. 1 Construction of the plant bidirectional promoter

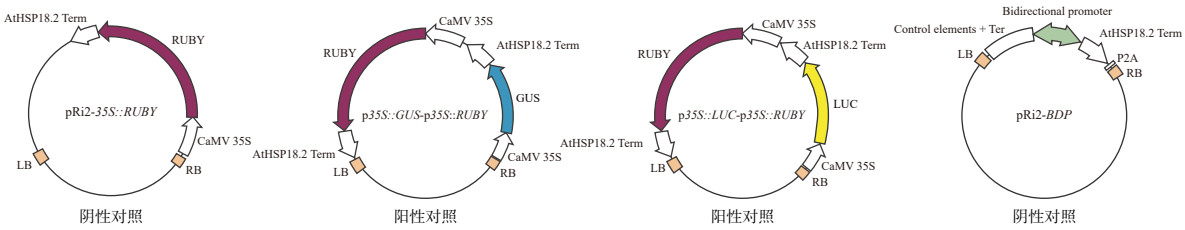


图 2　本研究所用对照载体的结构示意图

Fig. 2　Schematic diagram of the control vectors used in this study

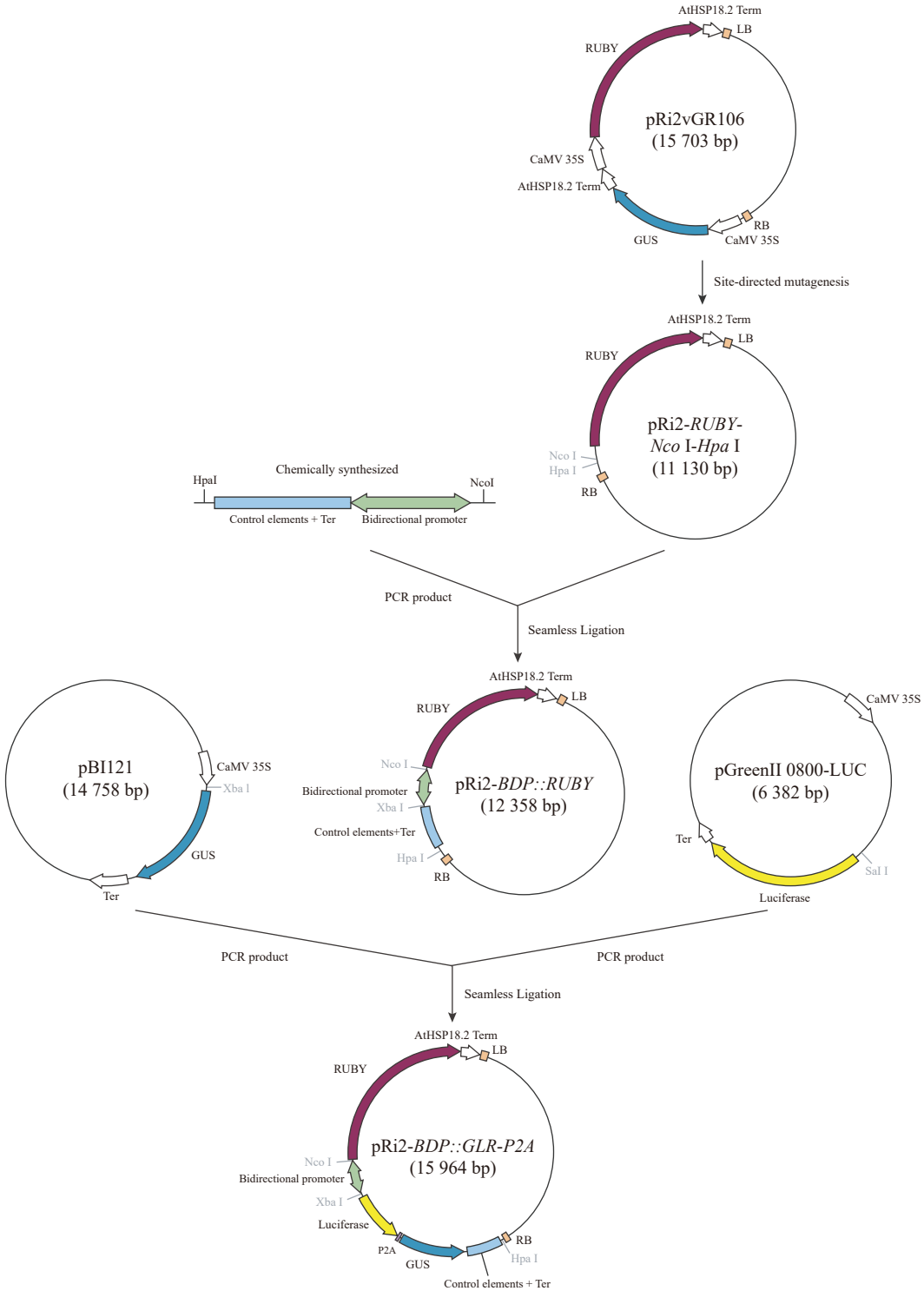


图 3　双向二元表达多基因载体 pRi2-*BDP::GLR-P2A* 的构建示意图

Fig. 3　Schematic diagram of the construction of the bidirectional binary plasmid pRi2-*BDP::GLR-P2A*

于针叶树等难转化物种的遗传转化。

1.1.3 酶与主要试剂

限制性内切酶 *Xba* Ⅰ、*Nco* Ⅰ和 *Hpa* Ⅰ购自 NEB(北京)有限公司。

2 × Phanta Max Master Mix(P222)、FastPure® Gel DNA Extraction Mini Kit(DC301)、FastPure® Plasmid Mini Kit(DC201)及 Mut Express® II Fast Mutagenesis Kit V2(C214)均购自南京诺唯赞生物科技有限公司。

Uniclone One Step Seamless Cloning Kit(SC612)购自北京金沙生物技术有限公司；GUS 组织化学染色试剂盒(SL7160)、GUS 报告基因荧光定量检测试剂盒(G3070)、Bradford Protein Assay Kit(SK1060)及 D-荧光素钾盐(CL6930)均购自北京酷来搏科技有限公司。

抗生素(壮观霉素、硫酸链霉素)购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.4 培养基及试剂配方

LB 培养基：胰蛋白胨 10.0 g/L，酵母提取物 5.0 g/L，氯化钠 10.0 g/L，使用 KOH 调节 pH 至 7.0。LB 固体培养基需在上述成分基础上添加琼脂粉 15.0 g/L。经 121 ℃ 高温湿热灭菌 20 min，于 4 ℃ 保存备用。

TY 培养基：胰蛋白胨 5.0 g/L，酵母提取物 3.0 g/L，灭菌后加入氯化钙至终浓度 1 mol/L。TY 固体培养基需在上述成分基础上添加琼脂粉 15.0 g/L。经 121 ℃ 高温湿热灭菌 20 min，于 4 ℃ 保存备用。

菌体重悬液：含 10 mmol/L 2-吗啉乙磺酸(MES)、10 mmol/L 氯化镁和 150 μmol/L 乙酰丁香酮(AS)。使用 KOH 调节 pH(侵染烟草 pH 调至 5.4 ~ 5.6；侵染油松 pH 调至 5.2 ~ 5.4)，现配现用或于 4 ℃ 避光短期保存。

1.2 实验方法

1.2.1 引物设计与合成

实验所用引物均由擎科生物科技(北京)股份有限公司合成，具体序列及信息见表 1。

1.2.2 特异性酶切位点的定点引入

以 pRi2vGR106 质粒为模板，使用引物 *Nco* I-*Hpa* I-F/*Nco* I-*Hpa* I-R，利用 Mut Express® II Fast Mutagenesis Kit V2 试剂盒进行连续多碱基点突变，将 CaMV 35S 启动子-*GUS*-AtHSP 18.2 Term-CaMV 35S 启动子的表达核心区替换为 *Nco* I(CCATGG)和 *Hpa* I(GTTAAC)酶切位点。PCR 反应程序如下：95 ℃ 预变性 30 s；95 ℃ 变性 15 s、57 ℃ 退火 15 s、72 ℃ 延伸 14 min，共 30 个循环；最后 72 ℃ 延伸 15 min。

PCR 产物经 *Dpn* I(37 ℃ 反应 1 h)消除甲基化模板质粒后，随后使用 2 × Uniclone Seamless 连接酶于 50 ℃ 连接 40 min。连接产物通过热激法转化至 *E.coli* DH5α 感受态细胞，复苏于无抗 LB 液体培养基(37 ℃，200 r/min 复苏 1 h)后，涂布于含硫酸链霉素(50 mg/L)的 LB 固体平板，37 ℃ 倒置培养 12 ~ 16 h。挑取单克隆，经菌落 PCR(引物对 Primer

表 1 引物序列及信息

Tab. 1 Primer sequences and information

引物名称	序列(5′—3′)	产物长度/bp
Nco I-*Hpa* I-F	ACAAAACTCGAGCCATGGTGAAGCAGAACATCTTCTATGTCCA	~ 14 000
Nco I-*Hpa* I-R	TTCACCATGGCTCGAGTTTTGTTAACTGACAGGATATATCCCCTTGT	
BDP-F	GGGATATATCCTGTCAGTTAACTTTTAATTTCTTTTTCCATTTATTTCTGTTGT	3 129
BDP-R	TCCATACTAGTTTTCTAGAGGTACCTCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCTTATATAG	
Primer 1	GAAGATTTTCTCCAAGAAGCCGAA	400
Primer 2	TGAGACACCGCACTACTTCGATGGT	
Primer 3	CCTTTTAAATATCCGATTAT	~ 800
LUC-F	CGTCGTATGGGTAGAATTCGTCGACTTACACGGCGATCTTTCCG	1 653
LUC-R	ATCAACTAAGAAAGGTACCTCTAGAATGGAAGACGCCAAAAACATAAA	
Primer 4	TTTTCTCATTGTCTCTCGAA	~ 800
Primer 5	CCCCGACTTCCTTAGAGAGG	~ 800
Primer 6	TAAAGCCGACAGCAGCAGTT	~ 800
GUS-F	CGTCGTATGGGTAGAATTCGTCGACTTGTTTGCCTCCCTGCTGCGGTTTT	1 809
GUS-R	GAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAATGTTACGTCCTGTAGAAACCCCA	
P2A-F	TTTCTTCAACGTCACCCGCCTGTTTCAGCAGGGAGAAGTTGGTTGCTCCGCTACCGGCGCGCCT	74
P2A-R	CGGGTGACGTTGAAGAAAACCCGGGTCCGATGTTACGTCCTGTAGAAACCCCA	

1/Primer 2)和 Sanger 测序(引物 Primer 3)验证。使用 FastPure® Plasmid Mini Kit 试剂盒提取验证正确的质粒，命名为 pRi2-*RUBY*-*Nco* I-*Hpa* I。

1.2.3　双向启动子及调控模块的克隆

以化学合成的双向启动子片段(图 1)为模板，利用引物对 BDP-F/BDP-R 进行 PCR 扩增，获得两端携带 *Nco* I 和 *Hpa* I 同源臂的目的片段。PCR 反应程序如下：95 ℃ 预变性 30 s；95 ℃ 变性 15 s、56 ℃ 退火 15 s、72 ℃ 延伸 1 min，共 34 个循环；最后 72 ℃ 延伸 5 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后，使用 FastPure®Gel DNA Extraction Mini Kit 回收纯化。

将 pRi2-*RUBY*-*Nco* I-*Hpa* I 质粒用 *Hpa* I 和 *Nco* I 于 37 ℃ 双酶切 3.5 h，酶切产物经胶回收纯化，获得线性化载体。使用 Uniclone One Step Seamless Cloning Kit 试剂盒，将线性化载体与纯化后的启动子片段于 50 ℃ 反应 30 min。重组产物转化 DH5α 培养。挑取单克隆，通过菌落 PCR(引物对 Primer 1/Primer 2)和纳米孔全质粒测序(康为世纪生物科技股份有限公司)验证，提取质粒，获得中间载体 pRi2-*BDP*::*RUBY*。

1.2.4　多报告基因二元表达载体的构建

以 pBI121 和 pGreenII 0800-LUC 质粒为模板，分别用引物对 *GUS*-F/*GUS*-R 和 *LUC*-F/*LUC*-R 扩增含同源臂且不含终止子的 *GUS* 基因和 *LUC* 基因。PCR 反应程序如下：95 ℃ 预变性 30 s；95 ℃ 变性 15 s、58 ℃ 退火 15 s、72 ℃ 延伸 2 min，共 34 个循环；最后 72 ℃ 延伸 5 min。扩增产物经胶回收纯化。

将 pRi2-*BDP*::*RUBY* 质粒用 *Xba* I（TCTAGA）单酶切线性化(37 ℃ 反应 3.5 h)，酶切产物经胶回收纯化。将线性化载体与 *LUC*、*GUS* 两片段按顺序依次连接(50 ℃ 反应 30 min)，产物转化 DH5α 培养。挑取单克隆，通过菌落 PCR(引物对 Primer 1/Primer 2)和 Sanger 测序(*LUC* 引物对：Primer 4/Primer 5；*GUS* 引物对：Primer 4/Primer 6)筛选获得含有正确插入片段的克隆，提取质粒，获得重组载体 pRi2-*BDP*::*GLR*。

以该质粒为模板，使用引物对 P2A-F/P2A-R 进行高保真 PCR 定点突变，在 *GUS* 与 *LUC* 基因之间插入 P2A 自剪切肽序列。PCR 反应程序如下：95 ℃ 预变性 30 s；95 ℃ 变性 15 s、58 ℃ 退火 15 s、72 ℃ 延伸 16 min，共 30 个循环；最后 72 ℃ 延伸 5 min。经 *Dpn* I 消化、连接与转化后，转化 DH5α 培养。挑取单克隆，通过菌落 PCR(引物对 Primer 1/Primer 2)和纳米孔全质粒测序验证，获得最终的多基因表达载体，命名为 pRi2-*BDP*::*GLR*-*P2A*。载体构建流程如图 3 所示。

1.2.5　发根根瘤菌转化与培养

将验证正确的重组质粒 pRi2-*BDP*::*GLR*-*P2A* 通过冻融法转入发根根瘤菌 K599 感受态细胞中。转化条件如下：冰浴 5 min，液氮速冻 5 min，迅速置于 37 ℃ 热激 5 min，随后冰浴 5 min。转化后的细胞在无抗 TY 液体培养基(28 ℃，200 r/min 复苏 2 h)中复苏，涂布于含壮观霉素(75 mg/L)的 TY 固体平板上，28 ℃ 倒置培养 2 d。挑取单克隆，使用引物对 Primer1/Primer2 进行菌落 PCR 以验证阳性克隆。

1.2.6　发根根瘤菌瞬时侵染烟草

挑取经菌落 PCR 验证阳性的发根根瘤菌单克隆，接种于含壮观霉素(75 mg/L)的 TY 液体培养基中，在 28 ℃、200 r/min 条件下振荡培养 12 ~ 16 h。于 7 500 r/min 离心 8 min 收集菌体，弃去上清液。加入重悬液(pH 调至 5.4 ~ 5.6)重悬至 OD_{600} 为 1.0 左右。将菌悬液避光于 4 ℃ 静置 1 h。

使用去除针头的 1 mL 无菌注射器，将菌液缓慢注入 4 ~ 6 周龄本氏烟草叶片的背面。每株烟草注射 3 ~ 5 片叶，每片叶注射 3 个点。实验设置对照：以携带 pRi2-35*S*::*RUBY* 的 K599 发根根瘤菌作为阴性对照，以携带传统 35S 启动子驱动相应报告基因(p35*S*::*GUS*-p35*S*::*RUBY*，p35*S*::*LUC*-p35*S*::*RUBY*)的发根根瘤菌作为阳性对照，进行平行侵染。注射后的植株置于 25 ℃ 光照培养室中，先暗培养 8 h，再转入正常光周期(16 h 光照/8 h 黑暗)培养 24 ~ 48 h，用于后续分析。

1.2.7　烟草多基因表达产物检测

培养约 36 h 后，对烟草叶片进行 *RUBY* 产物活性检测、GUS 组织化学染色、GUS 酶活荧光定量以及 *LUC* 产物活性检测。

RUBY 产物活性检测：直接观察并拍照记录叶片中因甜菜红素积累而产生的红色表型。

GUS 组织化学染色：参照 GUS 染色试剂盒说明书，剪取侵染后的烟草叶片，浸泡在 X-Gluc 染色液中，于 37 ℃ 避光孵育 1 h 至过夜(约 14 ~ 16 h)。待蓝色显现后，用 70% 乙醇反复脱色，直至对照叶片无色，随后观察并拍照。

GUS 酶活荧光定量：取约 100 mg 新鲜叶片组织，经液氮速冻研磨后，加入 GUS 提取液，在冰上提取总蛋白。使用 Bradford 法测定蛋白浓度。参照 GUS 荧光定量检测试剂盒说明书，以 4-甲基伞形酮(4-MU)为标准，测定反应产物的荧光值，计算 GUS 的活性总蛋白(nmol 4-MU/min/mg protein)。

LUC 产物活性检测：在烟草叶片背面均匀涂抹 1 mmol/L D-荧光素钾盐溶液，暗适应 10 min 后，使用化学发光成像仪曝光 5 min，采集荧光信号。

1.2.8 发根根瘤菌瞬时侵染油松下胚轴

选取经烟草侵染验证成功的阳性发根根瘤菌单克隆，接种于含壮观霉素(75 mg/L)的 TY 液体培养基中，于 28 ℃、200 r/min 振荡培养 12 ~ 16 h。7 500 r/min 离心 8 min 收集菌体，弃上清。加入重悬液(pH 调至 5.2 ~ 5.4)重悬菌体至 OD_{600} 为 0.7 左右。将菌悬液避光于 4℃ 静置 1 h。

选取幼嫩油松幼苗，于根茎结合处切除根系，将切口浸入制备好的发根根瘤菌菌悬液中。在 0.06 MPa 真空条件下处理 30 min，使菌液充分渗入下胚轴伤口组织。侵染后将幼苗移栽至土壤基质中，于 25 ℃ 光照培养室中，先暗处理 8 ~ 16 h，再转入正常光周期(16 h 光照/8 h 黑暗)培养 36 ~ 48 h，用于后续分析。

1.2.9 油松下胚轴多基因表达产物检测

发根根瘤菌侵染培养约 48 h 后，对油松下胚轴进行 *RUBY*、*GUS* 和 *LUC* 产物活性检测。

RUBY 产物活性检测：直接观察并拍照记录油松下胚轴中甜菜红素积累产生的红色表型。

GUS 产物活性检测：在油松下胚轴伤口上方 2 ~ 4 mm 处切取下胚轴组织，浸泡在 X-Gluc 染色液中，于 37 ℃ 避光孵育 1 h 至过夜。待蓝色显现后，用 70% 乙醇反复脱色，直至阴性对照组织无色，观察并拍照。

LUC 产物活性检测：于油松下胚轴伤口处均匀涂抹 1 mmol/L D-荧光素钾盐溶液，暗适应 10 min 后，使用化学发光成像仪曝光 5 min，采集荧光信号。

2 结果与分析

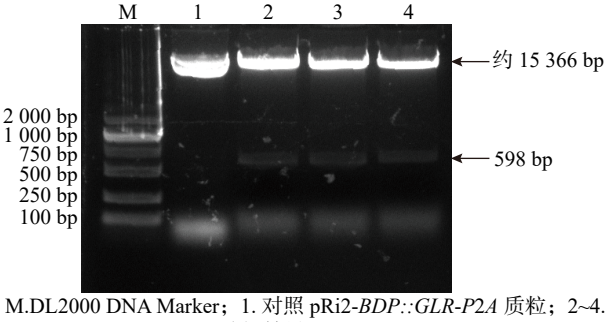
2.1 重组载体的酶切验证

以 pRi2-*BDP::GLR-P2A* 为模板，采用 *Nco* Ⅰ/*Xba* Ⅰ 双酶切质粒，产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果显示(图 4)，泳道 1 为未经酶切的 pRi2-*BDP::GLR-P2A* 质粒，主要呈现超螺旋形态，条带大小位置略低于泳道 2 ~ 4，表明酶切反应有效；泳道 2 ~ 4 为 pRi2-*BDP::GLR-P2A* 质粒的 3 次酶切技术重复，均在约 598 bp 处出现明亮、清晰且无杂带的特异性条带，与双向启动子的理论大小基本一致。

为进一步验证构建的准确性，对该载体的启动子区域进行 Sanger 测序，并利用 DNA MAN 9 软件将测序结果与设计序列进行比对(图 5)。结果显示，该片段全长 598 bp，序列一致性为 100%，未检测到任何碱基突变、插入或缺失。上述结果表明，双向启动子构建成功。

2.2 烟草瞬时遗传转化的功能验证

RUBY 瞬时表达检测结果显示(图 6A-b)，实验组(pRi2-*BDP::GLR-P2A*)烟草叶片注射区域呈现明显红色表型，与阳性对照组(pRi2-35*S::RUBY*)表型一致。此外，实验组与对照组的红色表型均在侵染后 24 h 左右初现，且 36 h 后着色强度无明显肉眼差异。该结果证实，双向启动子具备驱动 *RUBY* 表达的能力。*GUS* 瞬时表达的定性检测显示(图 6A)，实验组叶片注射区域及叶脉附近出现特征性蓝色斑点，与阳性对照(p35*S::GUS*-p35*S::RUBY*)表型一致；阴



M.DL2000 DNA Marker；1. 对照 pRi2-*BDP::GLR-P2A* 质粒；2~4. pRi2-*BDP::GLR-P2A* 双酶切结果。

图 4 二元表达载体 pRi2-*BDP::GLR-P2A* 的酶切鉴定图

Fig. 4 Restriction enzyme digestion identification profile of the binary expression vector pRi2-*BDP::GLR-P2A*

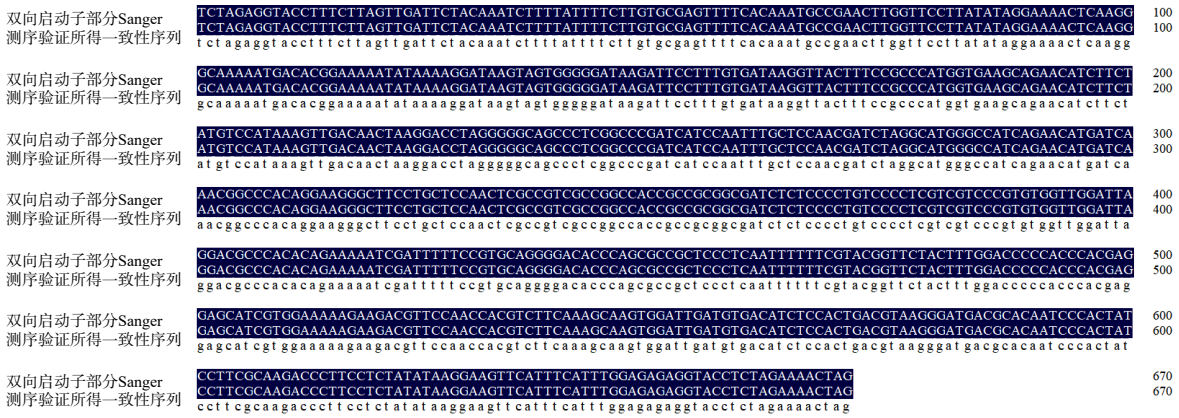
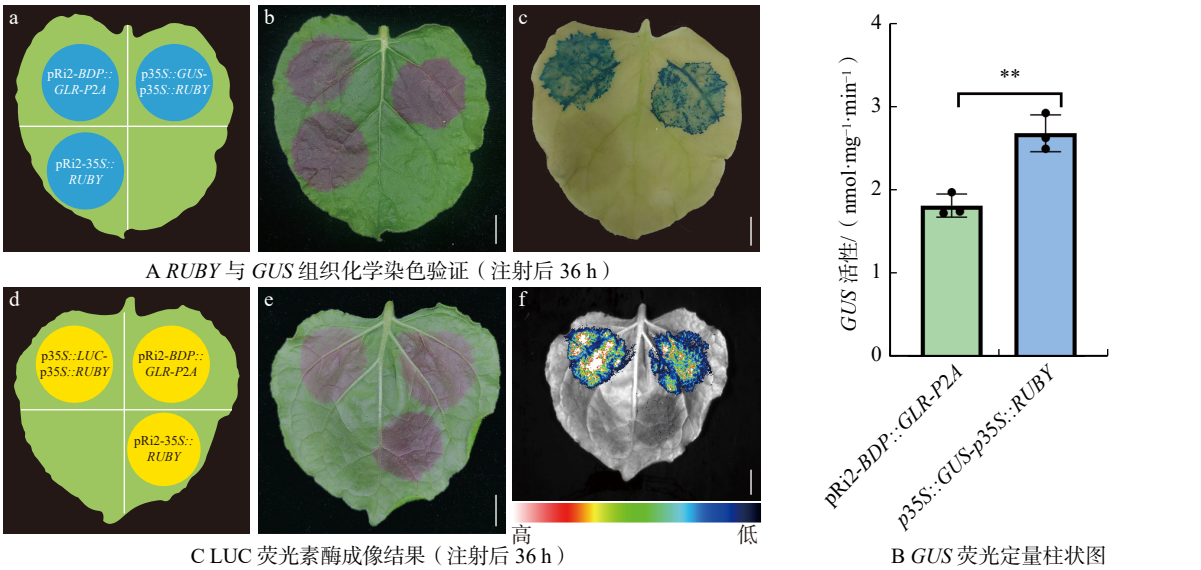


图 5 双向启动子区域比对结果

Fig. 5 Sequencing alignment of the bidirectional promoter region



a. 烟草叶片注射区域划分：pRi2-*BDP::GLR-P2A*（实验组，左上）、p35*S::GUS*-p35*S::RUBY*（阳性对照组，右上）、pRi2-35*S::RUBY*（阴性对照组，左下）。b. *RUBY* 显色结果。c. *GUS* 显色结果。比较 35S 启动子与双向启动子驱动下的 *GUS* 酶活性。数据以均值±标准差表示（$n = 3$）。**表示在 $p < 0.01$ 水平上差异显著（独立样本 t 检验）。d. 烟草叶背注射区域划分：p35*S::LUC*-p35*S::RUBY*（阳性对照组，左上）、pRi2-*BDP::GLR-P2A*（实验组，右上）、pRi2-35*S::RUBY*（阴性对照组，右下）。e. *RUBY* 显色结果（叶背）。f. *LUC* 生物发光成像结果。

图 6　双向启动子驱动多基因表达系统在烟草中的瞬时表达

Fig. 6　Transient expression of multiple reporter genes driven by the bidirectional promoter in *Nicotiana benthamiana*

性对照组（pRi2-35*S::RUBY*）叶片经脱色后呈完全白色，无任何非特异性着色。这表明该启动子具备驱动 *GUS* 表达能力。

为量化双向启动子转录活性，以 4-甲基伞形酮（4-MU）为标准品绘制标准曲线（$R^2 = 0.997$），结合 Bradford 法蛋白定量结果计算 GUS 比活性。结果显示（图 6B），阳性对照组 GUS 活性为（2.69 ± 0.22）nmol/（mg·min），实验组则为（1.82 ± 0.14）nmol/（mg·min）。独立样本 t 检验表明，尽管实验组 GUS 活性显著低于对照组（$t = 5.74$，df = 4，$p = 0.005$），但仍保持较高的表达水平；同时，结合该实验组中 *RUBY* 报告基因呈现的稳定红色表型，可判断该表达水平足以驱动多报告基因协同表达。

LUC 荧光素酶成像结果显示（图 6C），实验组检测到稳定且高强度的生物发光信号，其发光强度与阳性对照组（p35*S::LUC*-p35*S::RUBY*）基本一致，而阴性对照组（pRi2-35*S::RUBY*）无可见发光信号。该结果表明，GUS-P2A-LUC 融合蛋白能够被高效剪切，GUS 与 LUC 均以独立成熟蛋白形式发挥功能，表明该启动子具有驱动 *GUS* 和 *LUC* 表达能力。

2.3　油松下胚轴瞬时转化结果

为验证双向启动子在木本植物中的功能，本研究在同一油松下胚轴中依次检测了 *RUBY*、*LUC* 及 *GUS* 3 种报告基因的表达情况。

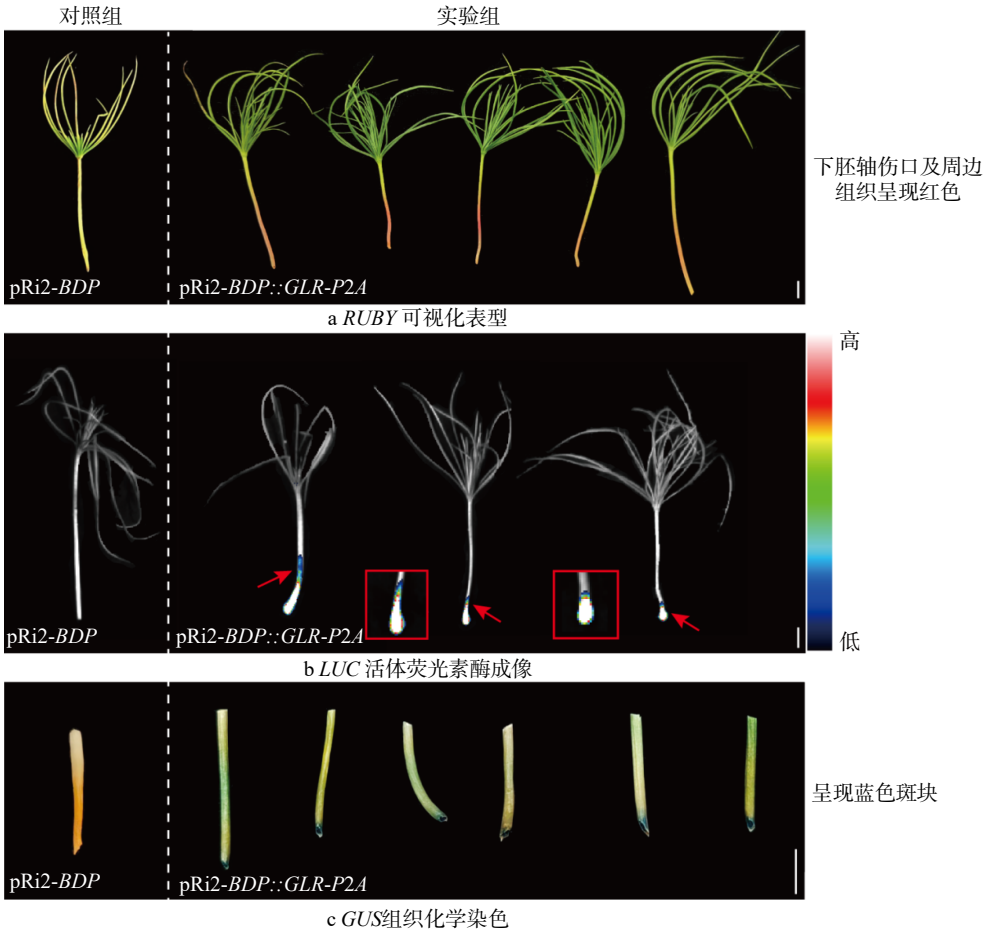
RUBY 表型观察显示（图 7a），经 pRi2-*BDP::GLR-P2A* 载体侵染的实验组，其伤口及周边组织在培养 48 h 后呈现明显且稳定的红色表型；而经空载体 pRi2-*BDP*（结构见图 2，去除 *LUC*、*GUS* 及 *RUBY* 等所有报告基因，仅保留启动子及载体骨架）侵染的阴性对照组则无红色表型。*LUC* 荧光素酶成像检测显示（图 7b），实验组检测到稳定且高强度的生物发光信号，而阴性对照组未检测到发光信号。*GUS* 组织化学染色显示（图 7c），实验组呈现清晰的蓝色斑块，而阴性对照组经脱色处理后呈无色。

上述 3 种报告基因的检测结果与烟草中的结果高度一致，证实该系统同样能在木本植物油松中实现多基因的同步高效表达。

3　讨　　论

随着植物基因工程对精准和多样化表达模式需求的增长，新型启动子的挖掘与构建成为研究热点[33−34]。然而，天然启动子数量有限且活性不足；传统病毒启动子长期稳定性差且易引发基因沉默；尤其是木本植物遗传转化体系的不成熟，进一步限制了多基因表达的应用。本研究基于双向启动子，采用“两个最小核心启动子反向连接与 P2A 自剪切肽”的组合策略，为解决上述问题提供了极具潜力的方案。

表达调控序列的排布是合成启动子构建的关键，不同的排布可能导致截然不同的表达模式与效率[35−36]。在增强子的选择上，单个 STE 功能强大且序列紧凑，已验证具有显著的转录激活能力，但不同来源的 STE 增强效果差异显著。因此，本研究串联 4 个不同的 STE，通过多聚化增强转录因子的协同



所有结果均来自同一株油松幼苗的下胚轴样品，依次完成 *RUBY* 观察、*LUC* 成像及 *GUS* 染色（$n=3$），所有照片中的比例尺均代表 1 cm。

图 7 双向启动子驱动多基因表达系统在油松下胚轴中的瞬时表达

Fig. 7 Transient expression of multiple reporter genes driven by the bidirectional promoter in the hypocotyl of *Pinus tabuliformis*

效应以实现叠加增强效果，同时避免同源重复，从源头降低基因沉默风险。在核心启动子方面，本研究突破传统的“CaMV 35S 全长与 35S mini 反向重复”常规模式，采用不同病毒的最小核心启动子反向连接，仅保留 TATA-box 及转录所必需的核心元件，使结构更为紧凑，组分逻辑更加清晰。此外，CaMV 35S 启动子在双子叶植物中活性优异，但在部分单子叶植物中活性相对有限；而 CsVMV 启动子已被证实可在多种植物中驱动稳定的组成型表达，二者的组合增强了该系统在不同植物类群中的表达稳定性和广谱适用性。在表达容量方面，传统植物双向启动子通常仅能驱动 2 个基因同步表达[36−38]，本研究结合 P2A 自剪切肽策略，实现单启动子高效驱动 5 个基因同步表达，突破了仅能研究单一性状叠加的局限[38]。而 P2A 其编码序列极短，几乎不增加载体负荷；其切割高效且不留多余氨基酸，保证上下游蛋白近似等摩尔比表达。与传统多顺反子元件 IRES（内部核糖体进入位点）相比，P2A 避免了 IRES 序列冗长、下游基因翻译效率低及表达比例失衡等问题，同时也规避了多表达盒或融合蛋白带来的载体冗余与蛋白功能损伤。此外，系统整合 SBG51、AtPsaK UTR、EU Term 和 AtHSP1.8 Term 等调控元件，从转录、翻译到转录终止等多过程协同优化，进一步提升了表达效率。最后，该系统成功应用于油松下胚轴瞬时转化，为针叶树本源基因功能验证和多性状聚合提供了高效检测平台。

尽管如此，本研究未对 STE 的串联数量进行梯度优化。尽管 4 × STE 已实现高效的双向转录激活，但更少拷贝数（如 2 × STE 或 3 × STE）是否足以驱动同等表达水平，即最小有效拷贝数仍有待进一步验证；而不同 STE 之间可能存在潜在协同或拮抗效应，其最佳组合方式也有待探究。此外，该系统目前仅在烟草和油松中验证了有效性，其在更多植物物种中的普适性尚需进一步验证。在油松瞬时转化体系中，转化效率仍有提升空间，且侵染位点表达丰度的异质性影响定量准确性，故本研究以定性检测为主，后续需结合稳定转化植株开展精确定量分析。需要特别指出的是，油松下胚轴瞬时转化体系目前仅适用于启动子活性分析[39]、次生代谢关键基因筛选[40]、蛋白互作[41]及亚细胞定位[42−44]等可快速检测

的基因功能验证，但并不适用于涉及生殖发育、木材形成等长周期或需稳定遗传背景的研究。

基于此，未来研究应从以下方面深入推进：(1)持续挖掘与优化调控元件，设计广谱适应性元件和物种特异性元件，以拓展宿主范围；(2)与纳米载体、超声波辅助侵染、CRISPR-Cas9、RNAi 及人工智能等技术深度融合，实现多基因的同时编辑与精准表达；(3)构建稳定转化植株，开展精确定量分析，并监测多代遗传中的表达水平和沉默发生率，以更全面评估该启动子的转录强度与育种价值。此外，随着转基因技术的广泛应用，其生物安全性问题日益受到关注[45]。双向启动子的应用可能对生态环境和非目标生物存在潜在风险，应充分评估其潜在风险并采取相应防范措施，以促进生物技术的健康可持续发展。

综上，本研究构建的双向启动子多基因表达系统具有结构紧凑、低冗余、高活性、跨物种适用性强等优势，为植物遗传改良提供了新型工具，尤其为裸子植物本源基因功能验证与育种应用奠定了重要基础。

参　考　文　献

[1] Zhang M P, Liu Y H, Xu W W, et al. Analysis of the genes controlling three quantitative traits in three diverse plant species reveals the molecular basis of quantitative traits [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 10074.

[2] 张航. 玉米中组成型双向启动子的筛选克隆与初步功能鉴定 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学, 2017.
Zhang H. Screening, cloning and preliminary functional identification of bidirectional promoter in maize[D]. Harbin: Harbin Normal University, 2017.

[3] Al-Kaff N S, Kreike M M, Covey S N, et al. Plants rendered herbicide-susceptible by cauliflower mosaic virus-elicited suppression of a 35S promoter-regulated transgene [J]. Nature Biotechnology, 2000, 18(9): 995−999.

[4] Matsunaga W, Shimura H, Shirakawa S, et al. Transcriptional silencing of 35S driven-transgene is differentially determined depending on promoter methylation heterogeneity at specific cytosines in both plus- and minus-sense strands [J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 24.

[5] 王海海, 吴慎杰, 李飞飞, 等. 35S 启动子甲基化引起棉花转基因沉默 [J]. 棉花学报, 2008(4): 274−280.
Wang H H, Wu S J, Li F F, et al. Transgene silencing caused by 35S promoter methylation in upland cotton [J]. Cotton Science, 2008(4): 274−280.

[6] Zhou X L, Wei M W, Nie W F, et al. The H3K9me2-binding protein AGDP3 limits DNA methylation and transcriptional gene silencing in *Arabidopsis* [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2022, 64(12): 2385−2395.

[7] Lee T, Maheshri N. A regulatory role for repeated decoy transcription factor binding sites in target gene expression [J]. Molecular Systems Biology, 2012, 8(1): MSB20127.

[8] Machnik M, Oleksiewicz U. Dynamic signatures of the epigenome: friend or foe? [J]. Cells, 2020, 9(3): 653.

[9] Křížová K, Depicker A, Kovařík A. Epigenetic switches of tobacco transgenes associate with transient redistribution of histone marks in callus culture [J]. Epigenetics, 2013, 8(6): 666−676.

[10] Fei Y, Nyikó T, Molnar A. Non-perfectly matching small RNAs can induce stable and heritable epigenetic modifications and can be used as molecular markers to trace the origin and fate of silencing RNAs [J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(4): 1900−1913.

[11] Wakasa Y, Kawakatsu T, Harada T, et al. Transgene-independent heredity of RdDM-mediated transcriptional gene silencing of endogenous genes in rice [J]. Plant Biotechnology Journal, 2018, 16(12): 2007−2015.

[12] Kishimoto N, Nagai J, Kinoshita T, et al. DNA elements reducing transcriptional gene silencing revealed by a novel screening strategy [J]. PLoS ONE, 2013, 8(1): e54670.

[13] 姜银银, 唐亚楠, 谭宇萍, 等. 一种植物多基因表达体系的构建及功能验证 [J]. 中国中药杂志, 2025, 50(12): 3291−3296.
Jiang Y Y, Tang Y N, Tan Y P, et al. Construction of a multigene expression system for plants and verification of its function [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2025, 50(12): 3291−3296.

[14] Jeong J S, Kim Y S, Baek K H, et al. Root-specific expression of OsNAC10 improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions [J]. Plant Physiology, 2010, 153(1): 185−197.

[15] Wei C C, Hu Z B, Wang S H, et al. An endogenous promoter *LpSUT2* discovered in duckweed: a promising transgenic tool for plants [J]. Frontiers in Plant Science, 2024, 15: 1368284.

[16] 王木桂, 朱健康. 化繁为简: 植物多基因编辑体系的优化 [J]. 生命科学, 2018, 30(9): 980−986.
Wang M G, Zhu J K. Simplification of multiplex gene editing systems in plants [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2018, 30(9): 980−986.

[17] 罗健达, 刘笑玮, 宋丽云, 等. 过表达和沉默 *NbRbcS* 基因对烟草主要病毒侵染的影响 [J]. 中国烟草科学, 2021, 42(1): 27−32,39.
Luo J D, Liu X W, Song L Y, et al. The effects of over-expressing and silencing the *NbRbcS* gene on major tobacco virus infection [J]. Chinese Tobacco Science, 2021, 42(1): 27−32,39.

[18] Kontra L, Csorba T, Tavazza M, et al. Distinct effects of p19 RNA silencing suppressor on small RNA mediated pathways in plants [J]. PLoS Pathogens, 2016, 12(10): e1005935.

[19] Park Y D, Papp I, Moscone E A, et al. Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity [J]. The Plant Journal, 1996, 9(2): 183−194.

[20] Ryan M D, King A M, Thomas G P. Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence [J]. The Journal of General Virology, 1991, 72(Pt 11): 2727−2732.

[21] de Felipe P, Luke G A, Brown J D, et al. Inhibition of 2A-mediated 'cleavage' of certain artificial polyproteins bearing N-terminal signal sequences [J]. Biotechnology Journal, 2010, 5(2): 213−223.

[22] de Felipe P, Luke G A, Hughes L E, et al. E unum pluribus: multiple proteins from a self-processing polyprotein [J]. Trends in Biotechnology, 2006, 24(2): 68−75.

[23] Yao Q, Shen R D, Shao Y, et al. Efficient and multiplex gene upregulation in plants through CRISPR-Cas-mediated knockin of enhancers [J]. Molecular Plant, 2024, 17(9): 1472−1483.

[24] Zhang Y, Xian Y B, Yang H, et al. A novel geminivirus-derived 3′ flanking sequence of *Terminator* mediates the gene expression enhancement [J]. Plant Biotechnology Journal, 2025, 23(4): 1053−1066.

[25] Nagaya S, Kawamura K, Shinmyo A, et al. The *HSP* terminator of *Arabidopsis thaliana* increases gene expression in plant cells [J]. Plant & Cell Physiology, 2010, 51(2): 328−332.

[26] Rosenthal S H, Diamos A G, Mason H S. An intronless form of the tobacco extensin gene *Terminator* strongly enhances transient gene expression in plant leaves [J]. Plant Molecular Biology, 2018, 96(4): 429−443.

[27] Diamos A G, Rosenthal S H, Mason H S. 5' and 3' untranslated regions strongly enhance performance of geminiviral replicons in *Nicotiana benthamiana* leaves [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 200.

[28] Li J, Han F X, Yuan T Q, et al. The methylation landscape of giga-genome and the epigenetic timer of age in Chinese pine [J]. Nature Communications, 2023, 14(1): 1947.

[29] Niu S H, Li J, Bo W H, et al. The Chinese pine genome and methylome unveil key features of conifer evolution [J]. Cell, 2022, 185(1): 204−217.

[30] Liu S W, Ma J J, Liu H M, et al. An efficient system for *Agrobacterium*-mediated transient transformation in *Pinus tabuliformis* [J]. Plant Methods, 2020, 16(1): 52.

[31] 库马尔 S, 柏林格 J R, 陈 W, 等. 人造双向植物启动子: 201580055915.5 [P]. 2017−06−13.
Kumar S, Berringer J R, Chen W, et al. Synthetic bi-directional plant promoter: 201580055915.5 [P]. 2017−06−13.

[32] Li J J, Zhao Y M, Liu J F, et al. Rooting conifer genetic research: an accessible and efficient transformation system [J]. Plant Biotechnology Journal, 2026, 24(6): 4027−4040.

[33] Mitra A, Han J G, Zhang Z J, et al. The intergenic region of *Arabidopsis thaliana* cab1 and cab2 divergent genes functions as a bidirectional promoter [J]. Planta, 2009, 229(5): 1015−1022.

[34] Ogo Y, Ozawa K, Ishimaru T, et al. Transgenic rice seed synthesizing diverse flavonoids at high levels: a new platform for flavonoid production with associated health benefits [J]. Plant Biotechnology Journal, 2013, 11(6): 734−746.

[35] Wang R, Zhu M L, Ye R J, et al. Novel green tissue-specific synthetic promoters and *cis*-regulatory elements in rice [J]. Scientific Reports, 2015, 5(1): 18256.

[36] Bai J Y, Wang X, Wu H, et al. Comprehensive construction strategy of bidirectional green tissue-specific synthetic promoters [J]. Plant Biotechnology Journal, 2020, 18(3): 668−678.

[37] 张舒. 拟南芥源双向启动子 K9I9 在玉米中的功能验证评价 [D]. 长春: 东北师范大学, 2017.
Zhang S. Preliminary characterization of Arabidopsis bidirectional promoter K919 in maize[D]. Changchun: Northeast Normal University, 2017.

[38] 张春晓, 盖颖, 朱艳燕, 等. 双向启动子构建及在毛白杨中瞬时表达研究 [J]. 北京林业大学学报, 2007, 29(1): 119−122.
Zhang C X, Gai Y, Zhu Y Y, et al. Construction of bidirectional promoter and its transient expression in *Populus tomentosa* [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2007, 29(1): 119−122.

[39] 尹晓, 许文娣, 李娟, 等. 山葡萄基因 *VaEXO11* 及其启动子的克隆与序列分析 [J]. 果树学报, 2024, 41(7): 1285−1296.
Yin X, Xu W D, Li J, et al. Cloning and sequence analysis of *VaEXO11* and its promoter in Vitis amurensis [J]. Journal of Fruit Science, 2024, 41(7): 1285−1296.

[40] Lee H, Park S, Lee S B, et al. Tailored biosynthesis of diosmin through reconstitution of the flavonoid pathway in *Nicotiana benthamiana* [J]. Frontiers in Plant Science, 2024, 15: 1464877.

[41] Chen F, Wang L, Huang Q, et al. Establishment of *Agrobacterium*-mediated transient transformation system in sunflower [J]. Plants (Basel, Switzerland), 2025, 14(15): 458−470.

[42] Li J F, Park E, von Arnim A G, et al. The FAST technique: a simplified *Agrobacterium*-based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of *Arabidopsis* and other plant species [J]. Plant Methods, 2009, 5(1): 6.

[43] 霍信屹, 陈欣晨, 赵慧敏, 等. 郁金香叶肉原生质体的分离纯化与瞬时转化方法 [J]. 浙江大学学报 (农业与生命科学版), 2025, 51(1): 80−88.
Huo X Y, Chen X C, Zhao H M, et al. A method for isolation, purification and transienttransformation of mesophyll protoplasts fromtulip (*Tulipa gesneriana*) [J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences), 2025, 51(1): 80−88.

[44] 叶如梅, 汪长天, 韩潇, 等. 闽楠叶片原生质体分离及瞬时转化体系的建立 [J]. 浙江农林大学学报, 2025, 42(3): 592−600.
Ye R M, Wang C T, Han X, et al. Establishment of protoplast isolation and transient expression system in *Phoebe bournei* leaves [J]. Journal of Zhejiang A&F University, 2025, 42(3): 592−600.

[45] 梁晋刚, 张开心, 张旭冬, 等. 中国农业转基因生物环境安全检测标准体系现状与展望 [J]. 中国油料作物学报, 2021, 43(1): 1−14.
Lang J G, Zhang K X, Zhang X D, et al. Current status and prospects of environmental safety standard system for agricultural genetically modified organisms in China [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2021, 43(1): 1−14.

（责任编辑 赵田芸 范 娟
责任编委 康向阳）