

# 乌饭树再生及遗传转化体系的建立

李晨, 吴清楠, 汪晴晴, 张凌云, 覃雪晶\*

北京林业大学林学院, 北京

收稿日期: 2024年4月3日; 录用日期: 2024年4月30日; 发布日期: 2024年5月7日

## 摘要

本研究以乌饭树叶片为材料, 筛选诱导叶片再生不定芽的植物生长调节剂种类和浓度, 建立了乌饭树再生体系。此外, 确定了用于筛选转基因材料的抗生素浓度、侵染乌饭树叶片的根癌农杆菌菌液浓度和侵染时间, 建立了乌饭树遗传转化体系。结果表明: (1) 乌饭树叶片不定芽再生的最佳培养基配方为: WPM + 0.5 mg/L TDZ + 4 mg/L ZT; (2) 乌饭树叶片预培养5 d, 筛选用抗生素潮霉素浓度为5 mg/L, 农杆菌抑制剂头孢霉素浓度为350 mg/L, 共培养6 d, 农杆菌浓度为0.8, 侵染时间为60 min时, 遗传转化效率最高。上述结果为在乌饭树中进行基因功能验证和分子育种提供了理论基础和技术支撑。

## 关键词

乌饭树, 叶片再生体系, 农杆菌, 遗传转化

# The Establishment of Regeneration and Genetic Transformation System for *Vaccinium bracteatum* Thunb

Chen Li, Qingnan Wu, Qingqing Wang, Lingyun Zhang, Xuejing Qin\*

The College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing

Received: Apr. 3<sup>rd</sup>, 2024; accepted: Apr. 30<sup>th</sup>, 2024; published: May 7<sup>th</sup>, 2024

## Abstract

In this study, leaves of *Vaccinium bracteatum* Thunb were used as materials to screen the types and concentrations of plant growth regulators inducing adventitious bud regeneration, thus establishing the regeneration system of *Vaccinium bracteatum* Thunb. Additionally, optimal concentrations of antibiotics for screening transgenic materials, as well as concentrations and duration

\*通讯作者。

of *Agrobacterium tumefaciens* infection on *Vaccinium bracteatum* Thunb leaves, were determined to establish a genetic transformation system. The results revealed that: (1) the formula of adventitious bud regeneration medium of *Vaccinium bracteatum* Thunb leaves was 0.5 mg/L TDZ + 4 mg/L ZT; (2) the pre-culture time of *Vaccinium bracteatum* Thunb leaves was 5 days, the optimal concentration of the antibiotic hygromycin for screening was 5 mg/L, the optimal concentration of the *Agrobacterium* inhibitor cephalosporin was 350 mg/L, the co-culture time was 6 days, the concentration of *Agrobacterium* was 0.8, and the infection time was 60 minutes, at which the infection efficiency was the highest. These findings provide a theoretical basis and technical support for gene function verification and molecular breeding in *Vaccinium bracteatum* Thunb.

## Keywords

*Vaccinium bracteatum* Thunb, Leaf Regeneration System, *Agrobacterium*, Genetic Transformation

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

乌饭树(*Vaccinium bracteatum* Thunb)属于杜鹃花科(*Ericaceae*)越橘属(*Vaccinium* L.)植物, 主要分布于我国台湾、华东、华中和华南的山区, 是一种重要的经济林木和生态保护树种[1], 乌饭树野生资源丰富, 兼具生态、社会和经济效益。有研究表明, 乌饭树果实中含较强的抗氧化性物质花色苷和酚类物质, 具备抗癌防癌等功效, 保健价值极高[2]。目前, 由于乌饭树多生长在次生林中, 易受到人为活动的破坏, 且其花朵较小且花期短暂, 果实容易受到昆虫和鸟类的侵害, 乌饭树的分布和数量正面临日益减少的威胁[3]。

近年来, 随着分子生物学和基因组学的飞速发展, 遗传转化已成为植物育种领域的重要研究手段[4]。根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导法是最常见的植物遗传转化方法之一, 具备高效、低成本的特点[5], 可以定向导入和表达外源基因, 这不仅有助于突破传统育种的耗时长、效率低的问题, 还可以为乌饭树的分子育种和基因功能研究提供技术支持[6]。植物遗传转化技术在多种农作物和园艺植物中应用广泛[7] [8] [9], 且其他越橘属植物中的遗传转化体系也先后被报道[10] [11], 目前, 国内外关于乌饭树的研究集中在其生物学特性和营养价值[12] [13], 其再生和遗传转化体系建立报道较少。有研究通过探究不同消毒方式、不同植物生长调节剂浓度对乌饭树叶片愈伤组织的诱导效果的影响, 建立了野生乌饭树叶片愈伤组织诱导体系[14]; 利用乌饭树嫩枝作为外植体, 初步建立了乌饭树组织培养体系[15], 但乌饭树遗传转化的最适条件尚不清楚。

本研究以乌饭树组培苗叶片为材料, 探究不同植物生长调节剂及其浓度对乌饭树叶片诱导不定芽再生的影响, 以及农杆菌浓度、侵染时间、筛选抗生素浓度、预培养和共培养时间等因素对根癌农杆菌 EHA105 介导的乌饭树遗传转化体系的影响, 获得转基因的乌饭树植株, 为乌饭树的遗传改良提供参考。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 试验材料

乌饭树组培苗和植物表达载体 pCAMBIA1300-GFP 为本实验室留存; 大肠杆菌菌株 Trans1-T1 购自北京全式金生物技术股份有限公司; 农杆菌菌株 EHA105 购自上海唯地生物有限公司。

## 2.2. 试验方法

### 2.2.1. 乌饭树组培苗的扩繁

在无菌条件下,选取健康无病害的乌饭树茎段脱毒后,剪成 1~2 cm 带有一个腋芽的短茎段,将形态学下端插入 WPM 固体培养基中(Ph = 5.5),每个培养瓶接种 3~4 根茎段。培养瓶置于 16 h 光照/8 h 黑暗的正常光照条件下进行培养,温度 25℃,继代扩繁周期为 8 周。

### 2.2.2. 乌饭叶片不定芽再生

选取 60 d 左右苗龄、长势良好且健壮的乌饭树组培苗,剪取健康嫩绿的叶片,剪去叶尖,垂直于主叶脉剪两刀造伤,叶背朝上平铺在培养基上。将乌饭树叶片接种到含有不同植物生长调节剂的培养基中(表 1),每个处理接种 3 个培养皿,每个培养皿中放置 10 个外植体,试验重复 3 次。培养条件为 25℃,黑暗处理 7 d 后置于光照时间为 16 h/8 h,光照强度为 350  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 。先初步筛选的植物生长调节剂种类(表 1),再进一步筛选植物生长调节剂浓度(表 2)。

**Table 1.** Medium for regenerating adventitious buds from the leaves of *Vaccinium bracteatum* Thunb

**表 1.** 乌饭树叶片再生不定芽培养基

Medium no	Combination and Concentration (mg/L)
1	WPM + 5 mg/L 2ip + 2 mg/L ZT
2	WPM + 4 mg/L ZT
3	WPM + 1 mg/L TDZ + 0.5 mg/L NAA
4	WPM + 2 mg/L TDZ + 2 mg/L ZT

**Table 2.** Optimization of medium for regenerating adventitious buds from the leaves of *Vaccinium bracteatum* Thunb

**表 2.** 乌饭树叶片再生不定芽培养基优化

Medium no	Formula
1	WPM + 0.5 mg/L TDZ + 2 mg/L ZT
2	WPM + 0.5 mg/L TDZ + 4 mg/L ZT
3	WPM + 1mg/L TDZ + 2 mg/L ZT
4	WPM + 1 mg/L TDZ + 4 mg/L ZT

### 2.2.3. 乌饭树遗传转化体系的建立

#### ① 外植体的抗生素和抑菌剂的敏感性试验

本试验对乌饭树遗传转化中所需的抗生素卡那霉素和潮霉素、以及抑菌剂头孢霉素的浓度进行梯度筛选,确定抗生素的适宜浓度,将乌饭树叶片造伤处理后放置在含有响应抗生素的培养基上(表 3),观察外植体生长情况。每种处理 30 个外植体,重复 3 次,15 d 更换一次培养基。

**Table 3.** Selective pressure gradient test on Km, Hyg and Cef in the leaves of *Vaccinium bracteatum* Thunb

**表 3.** 乌饭树叶片对卡那霉素、潮霉素和头孢霉素选择压梯度试验

Variety	Antibiotic	Concentration (mg/L)					Days
乌饭树	卡那霉素	0	5	10	15	20	60
	潮霉素	0	5	10	15	20	
	头孢霉素	0	150	250	350	500	

## ② 农杆菌活化与制备

吸取根癌农杆菌 EHA105 菌液在固体 YEB 板(含有 50 mg/L 卡那霉素和 50 mg/L 利福平)上平板化线, 28℃ 培养 1~2 d, 挑取单菌落加入含有 50 mg/L 卡那霉素和 50 mg/L 利福平的液体 YEB 培养基中在摇床中培养(28℃, 200 r/min), 直至颜色为透亮的果粒橙色即状态最佳。之后倒入 50 ml 含有 50 mg/L 卡那霉素和 25 mg/L 利福平的液体 YEB 液体中(添加 50 mg/L 的 AS)再放入 28℃ 200 r/min 的摇床中 12 h 左右, OD<sub>600</sub> 值为 1.2~1.8, 放入离心机(28℃、5000 r/min、10 min), 将上层液体倒掉, 再加入重悬液(20 g/L 蔗糖, 50 mg/L AS, 注意避光保存)稀释, OD<sub>600</sub> 值至 0.8~1.0, 配置好的重悬液放入 28℃ 培养箱黑暗培养 1 h。

## ③ 外植体的预培养

按上述造伤方式, 本试验剪取乌饭树叶片放置在最适合不定芽生长的培养基上, 在 25℃、黑暗条件下培养 0、5、10 d, 观察并记录转化后 60 d 外植体生长状态以及不定芽萌发情况。该处理接种叶片 30 个外植体, 实验重复 3 次。

## ④ 外植体的侵染和共培养

按 2.2.2 造伤方式, 将乌饭叶片在不定芽再生培养基上黑暗预培养 0、5、10 d 后, 置于 OD<sub>600</sub> 值为 0.8 的侵染液中, 28℃、120 r/min 分别侵染 30、60、90 min。吸干菌液后将外植体平铺于共培养培养基上(表 4), 25℃, 黑暗共培养 3、6、12 d(表 5)。该处理每次接种叶片 30 个外植体, 实验重复 3 次。观察并记录转后 60 d 叶片和腋芽生长状态以及不定芽的再生状态。

Table 4. Minimal medium composition

表 4. 基本培养基

Type of medium	Formula	pH
YEB 固体	5 g/L 牛肉浸粉 + 5 g/L 胰蛋白胍 + 1 g/L 酵母提取物 + 5 g/L 蔗糖 + 0.5 g/L MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O + 15 g/L 琼脂	7.0
YEB 液体	5 g/L 牛肉浸粉 + 5 g/L 胰蛋白胍 + 1 g/L 酵母提取物 + 5 g/L 蔗糖 + 0.5 g/L MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	7.0
重悬液(液体)	20 g/L 蔗糖 + 100 μM AS	5.5
洗脱液(液体)	无菌水 + 500 mg/L Cef	5.5
再生培养基/预培养培养基(固体)	WPM + 0.5 mg/L TDZ + 4 mg/L ZT	5.5
共培养培养基(固体)	WPM + 0.5 mg/L TDZ + 4 mg/L ZT + 100 μM AS	5.5
再生筛选培养基(固体)	WPM + 0.5 mg/L TDZ + 4 mg/L ZT + 5 mg/L Hyg + 350 mg/L Cef	5.5

Table 5. Agrobacterium infection time and co-culture time screening assay

表 5. 农杆菌侵染时间和共培养时间筛选试验

No.	Time of infection (min)	Co-culture time (d)	Days (d)
1	30		
2	60	3	
3	90		60
4	30		
5	60	6	
6	90		

续表

7	30	
8	60	12
9	90	

### ⑤ 外植体的脱菌处理和筛选培养

在共培养结束后,对叶片进行脱菌处理,先使用含有 500 mg/L 头孢霉素的无菌水振荡清洗 3 次,每次 5 min。然后再将叶片转移至无菌水中,振荡清洗 3 次,每次 5 min。吸干水分后将叶片叶背朝上平铺到叶片筛选培养基上,每 15 d 更换一次筛选培养基,60 d 后观察培养生长情况。

### ⑥ PCR 扩增鉴定

农杆菌侵染叶片长出的幼苗作为外植体,每个叶片上取一株幼芽放入液氮中,研磨成粉,使用高效植物基因组 DNA 提取试剂盒(擎科生物 TSINGKE, TSP102-50),具体步骤按照试剂盒说明书来操作,提取 DNA。

设计扩增引物, pCAMBIA1300-F: 5'-CCAACCACGTCTTCAAAGCA-3', pCAMBIA1300-R: 5'-CGTTTACGTCGCCGTCCA-3', 扩增条带长度为 278,引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成,进行 PCR 片段扩增,反应体系(25  $\mu$ l)为 Taq PCR mix 12.5  $\mu$ l、Forward Primer 1  $\mu$ l、Reverse Primer 1  $\mu$ l、DNA 1  $\mu$ l、ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu$ l。反应程序设定为:85 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,55 $^{\circ}$ C 退火 15 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 后延伸 5 min。反应结束后,用 1% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳进行检测,用紫外凝胶成像仪进行拍照。

### ⑦ 实验结果与数据分析

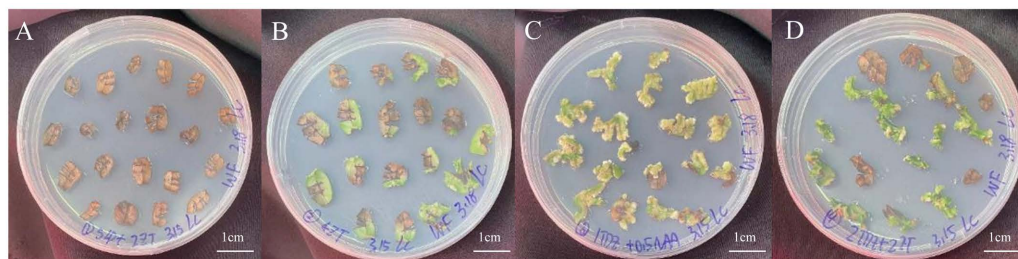
叶片再生不定芽诱导效率 = 分化出不定芽的外植体数/接种外植体的总数  $\times$  100%; 增值倍数 = 总不定芽数/接种外植体总数  $\times$  100%; 抗性出芽率 = 长出抗性芽的叶片个数/侵染叶片总数  $\times$  100%; 抗性增值系数 = 抗性芽总数/抗性芽的叶片个数  $\times$  100%; 抗性芽 GFP 阳性率 = 表达 GFP 的不定芽个数/抗性芽总数  $\times$  100%; 叶片存活率 = 存活的叶片数量/接种的叶片外植体数量  $\times$  100%。所有的试验均采用完全随机的方法,重复 3 次,分别采用 Excel Office 2021 和 SPSS Statistics 27 进行数据统计和显著分析,同一列间进行差异分析,不同字母代表两组数据存在  $p < 0.05$  的显著差异,定量数据将用平均数  $\pm$  标准差(SD)表示。

## 3. 结果与分析

### 3.1. 植物生长调节剂对诱导乌饭树叶片再生不定芽的影响

乌饭树叶片接种到 5 mg/L 2ip + 2mg/L ZT 培养基时(表 6),叶片褐化,无不定芽产生;当叶片接种到 4 mg/L 的 ZT 时,叶片部分褐化,无不定芽产生;在基础培养基中添加 1 mg/L TDZ + 0.5 mg/L NAA 时,乌饭树叶片卷曲,并在造伤部位长出大量愈伤组织,愈伤组织呈淡黄色,生长较缓慢。当培养基中添加了 2 mg/L TDZ + 2 mg/L ZT 时,乌饭树叶片卷曲,并在造伤部位再生不定芽。上述结果表明,培养基中添加 2 mg/L TDZ + 2 mg/L ZT 这两种植物生长调节剂时,可以促进乌饭树叶片不定芽的再生(图 1)。

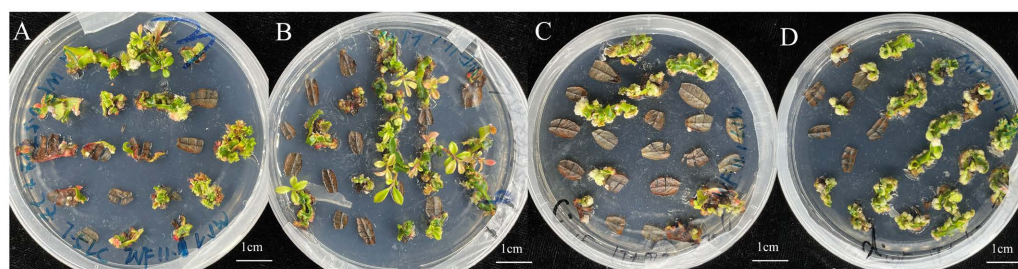
在 TDZ 和 ZT 这两种植物生长调节剂的基础上进行浓度的优化,进一步设计了 4 种培养基配方(表 7),当 TDZ 浓度为 0.5 mg/L 时,随着 ZT 浓度由 2 mg/L 到 4 mg/L,乌饭树叶片不定芽再生率由 74.44% 升高到 79.99%,ZT 浓度为 4 mg/L 时比 2 mg/L 产生的不定芽生长更加旺盛(图 2),不定芽的节间距离相对较大,增值系数也由 5.21 升高到 5.41;当添加 TDZ 的浓度为 1 mg/L 时,乌饭树叶片的褐化率提高,叶片卷曲,在造伤处长出愈伤组织,愈伤组织呈现淡黄色。上述结果表明,最适合乌饭树叶片再生不定芽最佳配方为 WPM + 0.5 mg/L TDZ + 4 mg/L ZT (图 2B)。



注: A: 激素配比为 5 mg/L 2ip + 2 mg/L ZT; B 激素配比为 4 mg/L ZT; C 激素配比为 1 mg/L TDZ + 0.5 mg/L NAA; D 激素配比为 2 mg/L TDZ + 2 mg/L ZT。

**Figure 1.** Different medium hormone combinations induced adventitious buds in leaves of *Vaccinium bracteatum* Thunb

**图 1.** 不同培养基激素组合诱导乌饭树叶片不定芽



注: A: 激素配比为 0.5 mg/L TDZ + 2 mg/L ZT; B 激素配比为 0.5 mg/L TDZ + 4 mg/L ZT; C 激素配比为 1 mg/L TDZ + 2 mg/L ZT; D 激素配比为 1 mg/L TDZ + 4 mg/L ZT。

**Figure 2.** The optimized hormone combination of different media induced adventitious buds in the leaves of *Vaccinium bracteatum* Thunb

**图 2.** 优化后的不同培养基激素组合诱导乌饭树叶片不定芽

**Table 6.** Effectiveness of different plant growth regulators in inducing adventitious shoots in leaves of *Vaccinium bracteatum* Thunb

**表 6.** 不同植物生长调节剂诱导乌饭树叶片不定芽的效果

Formula	Induction efficiency (%)	Value-added coefficient	State of growth
5 mg/L 2ip + 2 mg/L ZT	0	0	大面积褐化、没有不定芽产生
4 mg/L ZT	0	0	部分褐化、没有不定芽产生
1 mg/L TDZ + 0.5 mg/L NAA	0	0	叶片卷曲、出现黄绿色愈伤组织
2 mg/L TDZ + 2 mg/L ZT	66.67 ± 3.34	3.6 ± 0.07	叶片卷曲、长出短簇不定芽

**Table 7.** Optimizing the effect of TDZ and ZT combinations on the regeneration of adventitious shoots from leaves of *Vaccinium bracteatum* Thunb

**表 7.** 优化 TDZ 和 ZT 组合对乌饭树叶片再生不定芽的效果

Formula	Induction efficiency (%)	Value-added coefficient	State of growth
0.5 mg/L TDZ + 2 mg/L ZT	74.44 ± 1.92	5.21 ± 0.13	产生不定芽, 芽形较矮, 数量多
0.5 mg/L TDZ + 4 mg/L ZT	79.99 ± 3.34	5.41 ± 0.15	产生不定芽、芽形高、量多、长势较好
1 mg/L TDZ + 2 mg/L ZT	0	0	部分褐化、叶片卷曲、长出大量黄绿色愈伤组织
1 mg/L TDZ + 4 mg/L ZT	0	0	部分褐化、叶片卷曲、长出大量黄绿色愈伤组织、生长缓慢

## 3.2. 乌饭树遗传转化体系建立

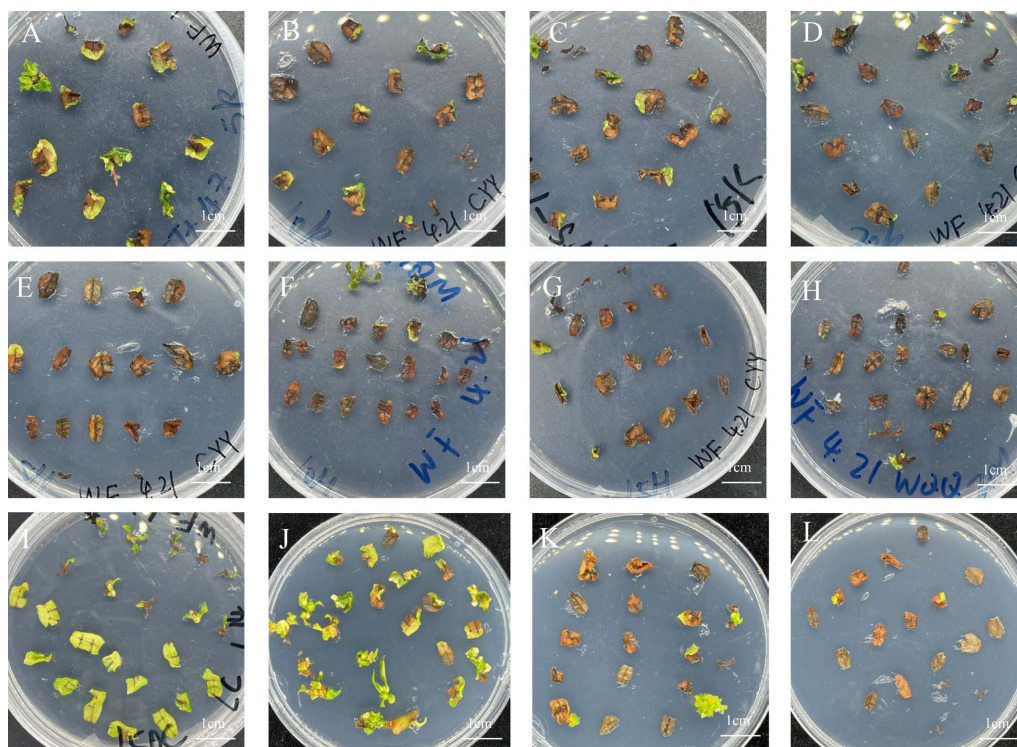
### 3.2.1. 抗生素对乌饭树叶片再生的影响

乌饭树叶片对卡那霉素、潮霉素、头孢霉素耐受性进行浓度梯度设置,基础再生培养基为 WMP + 0.5 mg/LTDZ + 4 mg/LZT。

卡那霉素的浓度梯度设置为 0、5、10、15、20 mg/L,如图 3 所示,乌饭树叶片放置在含有 5 mg/L 卡那霉素上时,乌饭树叶片部分保持翠绿,部分叶片长出不定芽,但不定芽长势较弱,培养基中的卡那霉素浓度增加到 10 mg/L 以上时,叶片开始出现失绿黄化,无不定芽产生,浓度到 15 mg/L 以上,叶片达到 100% 褐化率,因此,卡那霉素耐受性浓度应该选择 5 mg/L (表 8)。

潮霉素的浓度梯度设置为 0、5、10、15、20 mg/L,如图 5 所示,乌饭树叶片在潮霉素浓度与叶片再生不定芽的诱导率成反比,培养基中的潮霉素浓度由 5 mg/L 增加到 20 mg/L 时,乌饭树叶片生长的受抑制程度逐渐增加,存活率从 31% 下降到 0%;当潮霉素的浓度为 10 mg/L 时,叶片褐化率达到 100%,无法再产生不定芽,因此乌饭树叶片对潮霉素的耐受度浓度应选择 5 mg/L (表 8)。

统计乌饭树叶片对头孢霉素耐受性以及侵染后复染天数,头孢霉素的浓度梯度设置为 0、150、250、350、500 mg/L,结果表明,头孢霉素的浓度为 150、250、350 mg/L 时叶片均可以产生不定芽,说明乌饭树对头孢霉素不敏感,如表 8 所示,对侵染后的叶片进行观察,随着头孢霉浓度由 150 mg/L 逐渐增加到 500 mg/L 时,叶片出现复染的天数也由 9 d 增加至 50 d,头孢霉素浓度由 350 mg/L 增至 500 mg/L 时,叶片存活率由 100% 下降至 80%,因此乌饭树叶片的头孢霉素筛选浓度应为 350 mg/L (表 9)。



注: A~D 培养基中卡那霉素浓度分别为 5、10、15、20 mg/L; E~H 培养基中潮霉素浓度分别为 5、10、15、20 mg/L; I~L 培养基中头孢霉素浓度分别为 150、250、350、500 mg/L。

**Figure 3.** Selective pressure gradient experiments on kanamycin, thiamin and cephalixin by leaves of *Vaccinium bracteatum* Thunb

**图 3.** 乌饭树叶片对卡那霉素、潮霉素、头孢霉素选择压梯度实验

**Table 8.** Selective pressure gradient test on kanamycin and thauMATIN by leaves of *Vaccinium bracteatum* Thunb  
**表 8.** 乌饭树叶片对卡那霉素和潮霉素选择压梯度试验

Concentration of kanamycin (mg/L)	Induction rate (%)	Chloramphenicol concentration (mg/L)	Induction rate (%)
0	100	0	100
5	28	5	31
10	0	10	0
15	0	15	0
20	0	20	0

**Table 9.** Selective pressure gradient test of cephalosporin by leaves of *Vaccinium bracteatum* Thunb  
**表 9.** 乌饭树叶片对头孢霉素选择压梯度试验

Cephalosporin concentration (mg/L)	Agrobacterium re-infection days (d)	Induction rate (%)
0	4	100%
150	9	100
250	16	100
350	39	100
500	50	80

### 3.2.2. 乌饭树叶片预培养

有研究表明,对叶片进行预培养可以有效增加植物材料转化效率[16]。因此,本研究对乌饭树叶片进行了不同时间的预培养,并对不定芽再生率和遗传转化效率进行了检测,结果表明,预培养 0 d 的乌饭树叶片,不定芽再生率较低,仅为 23.33%,且阳性率仅为 33.14%;当预培养时间为 5 d 时,乌饭树叶片卷曲并长出少量愈伤组织,不定芽再生率达到 52.22%,且阳性率达到 100%;此外,预培养 10 d 的乌饭树叶片比预培养 5 d 的叶片再生不定芽率略低为 44.44%,且预培养 10 d 的叶片阳性率比预培养 5 d 的低,只有 49.04%。因此,乌饭树叶片预培养的最佳时间为 5 d (表 10)。

**Table 10.** Statistical data of pre-cultivation test on leaves of *Vaccinium bracteatum* Thunb  
**表 10.** 乌饭树叶片预培养试验数据统计

No.	Pre-incubation days	Resistance bud rate (%)	Value-added coefficient of resistance	Resistant buds GFP positive rate (%)
1	0	23.33 ± 3.34c	2.61 ± 0.05c	33.14 ± 4.46c
2	5	52.22 ± 5.09a	4.45 ± 0.07a	100 ± 0.00a
3	10	44.44 ± 1.93b	3.86 ± 0.10b	49.04 ± 3.85b

### 3.2.3. 农杆菌侵染时间对叶片再生存活率的影响

侵染时间对转化效率有重要影响,农杆菌侵染时间过短则不能完全附着在受体组织上,从而降低转化效率,农杆菌侵染时间过长,则会对受体材料造成伤害,严重会导致死亡[17]。因此,本研究对乌饭树遗传转化中根癌农杆菌侵染时间进行梯度设置,将根癌农杆菌侵染时间设置为 0、30、60、90 min,如表 11 所示,当共培养时间设置为 3 d,侵染时间为 30 min 时,叶片的存活率为 23.85%;侵染时间为 60 min 时,叶片存活率会小幅度提高至 26.73%;当侵染时间延长至 90 min 时,叶片存活率又下降至 22.46%。当共培养时间设置为 6 d,侵染时间设置为 30 min,叶片的存活率为 36.86%;侵染时间为 60 min 时,叶片存活率达到 48.96%,但是随着侵染时间的延长至 90 min 时,叶片的存活率又下降至 28.78%。当共培



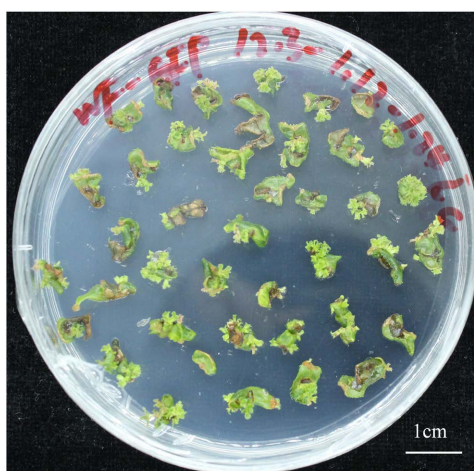
养时间设置在 9 d 时, 随着侵染时间的增长, 叶片的存活率也是先升高再降低, 存活率由 19.35% 升高到 20.43% 又下降至 17.83%, 可以得出结论, 当共培养时间相同, 侵染时间设置为 30、60、90 min, 叶片的存活率先上升后下降, 所以最适合乌饭树侵染时间为 60 min。侵染时间为 60 min, 共培养 3 d 时, 乌饭树叶片的存活率为 26.73%; 共培养 6 d 时, 叶片存活率上升为 48.96%; 共培养 9 d 时, 叶片的存活率下降至 20.43%, 因此乌饭树最佳共培养的时间为 6 d, 得出结论, 乌饭树叶片的最佳侵染时间为 60 min, 最佳共培养时间为 6 d, 此时乌饭树叶片依然能够存活, 存活率达到 48.96%, 叶片与培养基接触的位置有少量农杆菌出现, 叶片造伤部位已经充分和农杆菌接触。

**Table 11.** Effect of time of infestation and time of co-cultivation on the survival of leaves of *Vaccinium bracteatum* Thunb  
**表 11.** 侵染时间和共培养时间对乌饭树叶片存活率的影响

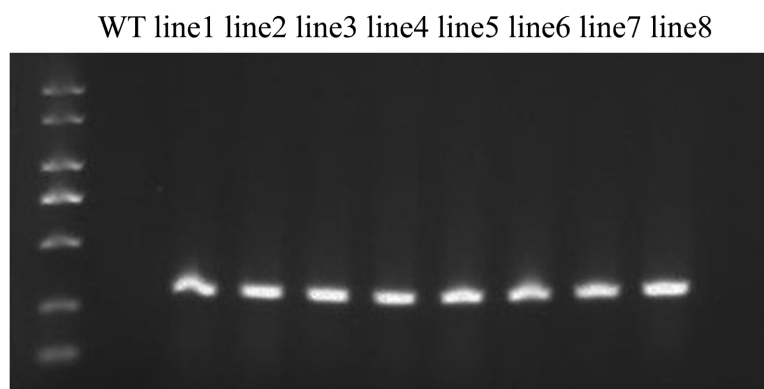
No.	OD600	Infection time (d)	Co-culture time (d)	Screening culture time (d)	Survival rate (%)
1	0.8	30	3	30	23.85
2	0.8	60	3	30	26.73
3	0.8	90	3	30	22.46
4	0.8	30	6	30	36.86
5	0.8	60	6	30	48.96
6	0.8	90	6	30	28.78
7	0.8	30	9	30	19.35
8	0.8	60	9	30	20.43
9	0.8	90	9	30	17.83

### 3.2.4. 转基因乌饭树叶片的鉴定

将含有表达载体 pCAMBIA1300-GFP 的根癌农杆菌对乌饭树叶片进行遗传转化试验, 乌饭树叶片经过 5 d 的预培养, 60 min 的侵染时间, 6 d 的黑暗共培养, 转移至光下培养 60 d, 乌饭树叶片不定芽长势良好(图 4), 幼芽翠绿健康, 将伸长处理后的抗性芽提取 DNA, 筛选出可能转化成功的转基因植株, 进行 PCR 鉴定。结果表明, 1~8 号株系均出现目标条带, 而野生型并未出现条带(图 5), 从 200 个外植体中获得 42 个潜在的转基因芽, 转化率在 21%。



**Figure 4.** Resistant buds grow in the ubiquitous rice tree infested with *Agrobacterium tumefaciens*  
**图 4.** 乌饭树经农杆菌侵染后长出抗性芽



**Figure 5.** Identification of GFP-positive plants by agarose gel electrophoresis  
**图 5.** 琼脂糖凝胶电泳鉴定 GFP 阳性植株

## 4. 讨论

### 4.1. 植物生长调节剂对乌饭树叶片再生体系的影响

建立乌饭树叶片不定芽再生体系是建立高效遗传转化体系的基础。植物生长调节剂在诱导植物再生过程中发挥重要作用[18], 细胞分裂素能够有效促进不定芽的产生, 在河北杨叶片诱导不定芽再生体系的建立中添加 TDZ 会促进不定芽再生[19], 在元宝枫组织培养中研究发现添加 6-BA、TDZ 等细胞分裂素会促进不定芽的诱导[20], TDZ 是一种高效的植物组织培养细胞分裂素[21], 本试验选择 ZT、TDZ 等细胞分裂素添加到培养基中, 初步设计了四种培养基配方(表 1), 筛选最适合乌饭树叶片再生的植物生长调节剂种类, 初步得出 2 mg/L TDZ + 2 mg/L ZT 诱导效率最高, 在添加 TDZ 和 ZT 的基础上进行浓度梯度筛选, 优化了设计了 4 种浓度配方(表 2), 从而确定了 0.4 mg/L TDZ + 4 mg/L ZT 时, 乌饭树叶片诱导效率最高且幼芽健壮。有研究表明, TDZ 可以抑制植物体内源性细胞分裂素酶的产生, 从而提高不定芽诱导的数量, 低浓度的 TDZ 对不定芽的再生有促进作用[22]。本研究发现当 TDZ 浓度由 0.5 mg/L 增加到 2 mg/L 时, 乌饭树叶片不定芽的再生受到抑制, 这一结论与滇杨组织再生[23]和河北杨叶片诱导不定芽再生体系的建立中研究结果一致。

### 4.2. 不同因素对根癌农杆菌介导的乌饭树遗传转化效率的影响

影响根癌农杆菌介导的遗传转化的因素有很多, 其中最主要的因素有抗生素的浓度、根癌农杆菌侵染浓度以及时间、植物外植体的预培养时间、根癌农杆菌与植物外植体的共培养时间等[24]。

抗生素对阳性植株的筛选和抑制农杆菌生长有重要作用[25], 本研究分析和比较了乌饭树叶片对卡那霉素、潮霉素、头孢霉素三种抗生素的敏感性, 发现随着这三种抗生素浓度的增加, 乌饭树叶片受到抑制, 当卡那霉素浓度超过 10 mg/L 时, 叶片出现黄化死亡现象; 当潮霉素浓度超过 10 mg/L 时, 叶片逐渐出现失绿死亡现象。合适的抑菌剂种类和浓度可有效抑制共培养后农杆菌过度污染情况, 保证转化后的植株正常生长, 头孢霉素可以有效的抑制农杆菌过度生长, 本试验发现头孢霉素浓度为 350 mg/L 时可以有效果抑制农杆菌过度生长且对植株正常生长无显著的抑制效果, 头孢霉素达到 500 mg/L 时, 虽然可以有效抑制农杆菌生长, 但是会对受体材料造成伤害导致死亡, 实验结果与不同抗生素对卷叶贝母鳞片叶诱导生长的影响保持一致, 随着抗生素浓度的提高, 会对受体材料产生伤害[26]。

农杆菌侵染时间和共培养时间对转化效率有重要影响[27] [28]。农杆菌侵染时间过短, 农杆菌就不能完全附着在受体组织上, 从而无法实现有效转化, 侵染时间过长农杆菌会起到毒害作用, 对受体材料造成伤害, 严重会导致死亡[29]。本试验研究发现, 当共培养时间相同, 侵染时间从 30 min 增加到 90 min

时,受体材料的存活率表现出先上升再下降的趋势,因此根癌农杆菌介导的乌饭树遗传转化最佳侵染时间为 60 min。为了使农杆菌与外植体充分接触和外源基因的高效插入,农杆菌侵染后进行黑暗共培养,共培养时间过短,会导致插入植物外源基因数量减少,共培养时间过长,会导致残留在外植体上的农杆菌过度生长,从而对植物细胞造成伤害[30]。与前人研究结果一致,本试验设置侵染时间相同,共培养时间由 6 d 增加至到 9 d 时,附着在叶片上的根癌农杆菌出现过度繁殖现象,外植体存活率降低。

外植体经过预培养,能够促进细胞分裂,外源基因更容易整合到受体中,从而提高遗传转化的效率[30]。本研究发现,在黑暗条件下进行预培养,可以增加潮霉素阳性芽的数量,预培养 5 d 时,叶片卷曲,侵染效果较好,不定芽再生率达到 52.22%,预培养 0 d 的乌饭树叶片易出现褐化死亡现象,当预培养为 10 d 时,不定芽再生率高于预培养 0 d 的处理,阳性率只有 49.04%。预培养时间过长可能会导致外植体伤口迅速愈合,不利于外源基因的导入,从而降低了遗传转化的效率;另外,预培养时间过长也可能使外植体产生抗性,同样不利于外源基因的导入和整合[31]。因此,为了保持高效的遗传转化率,需要适当控制预培养的时间。

## 5. 结论

本研究以乌饭树叶片为外植体,建立了乌饭树再生体系,乌饭树叶片再生不定芽最佳培养基配方为 WPM + 0.5 mg/L TDZ + 4 mg/L ZT。建立了根癌农杆菌介导的乌饭树遗传转化体系,最适的转化条件为:选择预培养 5 d 的乌饭树叶片为材料、根癌农杆菌的浓度为 0.8 和侵染时间为 60 min、黑暗共培养 6 d,筛选培养基组合为:WPM + 0.5 mg/L TDZ + 4 mg/L ZT + 5 mg/L Hyg + 350 mg/L Cef。

## 参考文献

- [1] 章嘉磊. 乌饭树设施栽培、产品加工工艺及乌米饭保健机理研究[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江理工大学, 2017.
- [2] 谭小丹, 陈涵, 王淑娜, 等. 乌饭树的营养价值及其开发利用[J]. 农产品加工(下半月), 2016(4): 59-62.
- [3] 谢远程. 乌饭树(*Vaccinium bracteatum*)生态学特性及其无性繁殖技术研究[D]: [硕士学位论文]. 南京: 南京林业大学, 2005.
- [4] Su, W., Xu, M., Radani, Y., et al. (2023) Technological Development and Application of Plant Genetic Transformation. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, Article No. 10646. <https://doi.org/10.3390/ijms241310646>
- [5] Levengood, H., Dou, Y., Fan, J., et al. (2023) *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Genetic Transformation of Narrowleaf Plantain. *Journal of Visualized Experiments*. <https://doi.org/10.3791/64777>
- [6] Sutradhar, M. and Mandal, N. (2023) Reasons and Riddance of *Agrobacterium tumefaciens* Overgrowth in Plant Transformation. *Transgenic Research*, **32**, 33-52. <https://doi.org/10.1007/s11248-023-00338-w>
- [7] Choudhury, A. and Rajam, M.V. (2021) Genetic Transformation of Legumes: An Update. *Plant Cell Reports*, **40**, 1813-1830. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02749-7>
- [8] Budeguer, F., Enrique, R., Perera, M.F., et al. (2021) Genetic Transformation of Sugarcane, Current Status and Future Prospects. *Frontiers in Plant Science*, **12**, Article ID: 768609. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.768609>
- [9] Ge, X., Xu, J., Yang, Z., et al. (2023) Efficient Genotype-Independent Cotton Genetic Transformation and Genome Editing. *Journal of Integrative Plant Biology*, **65**, 907-917. <https://doi.org/10.1111/jipb.13427>
- [10] Song, G.Q. and Gao, X. (2017) Transcriptomic Changes Reveal Gene Networks Responding to the Overexpression of a Blueberry *DWARF AND DELAYED FLOWERING 1* Gene in Transgenic Blueberry Plants. *BMC Plant Biology*, **17**, Article No. 106. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1053-z>
- [11] Omori, M., Yamane, H., Osakabe, K., et al. (2020) Targeted Mutagenesis of *CENTRORADIALIS* Using CRISPR/Cas9 System through the Improvement of Genetic Transformation Efficiency of Tetraploid Highbush Blueberry. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **96**, 153-161. <https://doi.org/10.1080/14620316.2020.1822760>
- [12] Fan, M., Li, T., Li, Y., et al. (2021) *Vaccinium bracteatum* Thunb. as a Promising Resource of Bioactive Compounds with Health Benefits: An Updated Review. *Food Chemistry*, **356**, Article ID: 129738. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129738>

- [13] Zhang, Y.-L., Lin-Wang, K., Albert, N.W., *et al.* (2021) Identification of a Strong Anthocyanin Activator, VbMYBA, from Berries of *Vaccinium bracteatum* Thunb. *Frontiers in Plant Science*, **12**, Article ID: 697212. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.697212>
- [14] 刘雅兰, 张婷婷, 杨倩倩, 等. 野生乌饭树叶片愈伤组织的诱导及增殖[J]. 安徽农学通报, 2023, 29(20): 83-87.
- [15] 蔡升, 续晨, 宰学明, 等. 乌饭树组织培养技术[J]. 北方园艺, 2021(5): 114-118.
- [16] 刘炎, 刘克俭, 王江, 等. 农杆菌介导的针叶树种遗传转化研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2021(4): 136-141.
- [17] 张曼, 徐锦华, 刘广, 等. 西瓜'SM1'高效遗传转化体系的构建[J]. 分子植物育种, 2021, 19(2): 498-503.
- [18] Yu, H., Lin, T., Meng, X., *et al.* (2021) A Route to *de Novo* Domestication of Wild Allotetraploid Rice. *Cell*, **184**, 1156-1170e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.013>
- [19] 乌日罕, 代金玲, 白向东, 等. 河北杨叶片诱导不定芽再生体系的建立[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2021, 42(4): 34-38.
- [20] 权志珣, 燕丽萍, 王因花, 等. 元宝枫组织培养与快速繁殖技术[J]. 中南林业科技大学学报, 2024, 44(1): 119-127, 139.
- [21] 王欢, 郭俊杰, 王春胜, 等. 西南桦节间茎段植株再生体系的建立[J]. 林业科学研究, 2023, 36(6): 115-125.
- [22] 陈桂芝, 腊贵晓, 郭军旗, 等. “唐半夏”无菌繁殖体系建立[J]. 北方园艺, 2024(1): 113-120.
- [23] 张晓琳, 纵丹, 李嘉其, 等. 滇杨组织培养再生及遗传转化体系建立[J]. 浙江农林大学学报, 2024, 41(2): 314-321.
- [24] 黄赛, 高凯, 苗得雨, 等. 毛白杨 GM107 再生体系和遗传转化体系的建立[J]. 分子植物育种, 2022: 1-22.
- [25] 杨敏, 周陈平, 李庆萌, 等. 番木瓜胚性细胞悬浮系高效遗传转化体系的建立[J]. 果树学报, 2023, 40(10): 2089-2097.
- [26] 马涛, 陈芳, 王跃华, 等. 不同抗生素对卷叶贝母鳞片叶诱导生长的影响[J]. 安徽农业科学, 2021, 49(10): 161-163.
- [27] 刘源, 李际红, 秦光华, 等. 柳树离体再生及遗传转化体系研究进展[J]. 中国农学通报, 2023, 39(29): 32-38.
- [28] 何旭, 高源, 张群野, 等. 白城小黑杨遗传转化体系建立及其应用[J]. 植物研究, 2023, 43(5): 667-678.
- [29] 刘倩, 符潮, 胡珊, 等. 松属植物再生体系和遗传转化的研究现状及展望[J]. 分子植物育种, 2023: 1-10.
- [30] 李猷, 尹蕾, 唐凯悦, 等. 外植体预培养时间对番茄外源基因转化的影响[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(17): 4208-4210.
- [31] 王栋鑫, 彭棣, 张爽. 农杆菌介导木本植物遗传转化的研究进展[J]. 北方园艺, 2018(2): 181-185.