

木本植物的遗传转化及转基因植物的鉴定

崔恒瑞

东北林业大学, 中国·黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 本研究聚焦木本植物遗传转化及转基因植株的分子检测, 对木本植物生长周期长、组织再生能力弱等制约遗传改良的关键问题展开系统研究。研究过程中建立农杆菌介导的遗传转化技术模式, 对三亲本杂交转移、抗生素筛选条件、外植体感染参数等核心环节完成优化, 同时采用多重 PCR 等分子生物学技术, 对转基因植株完成鉴定。整理实验数据可发现, 抗生素筛选浓度和抑菌效率存在剂量效应关系, 优化后的感染时长可提高转化成功率, 本研究分析影响木本植物遗传转化效率的主要调控因素, 评价不同转基因检测技术的适用性, 同时对基因编辑技术支撑下木本植物遗传改良的研究前景作出展望。

关键词: 木本植物遗传转化; 农杆菌介导法; 多重 PCR; 接合转移; 抗生素抑菌

Genetic transformation of woody plants and identification of transgenic plants

Cui Hengrui

Northeast Forestry University, China Heilongjiang Harbin 150040

Abstract: This study focuses on genetic transformation of woody plants and molecular detection of transgenic plants, conducting a systematic investigation into key issues that constrain genetic improvement, such as the long growth cycle and weak tissue regeneration ability of woody plants. During the research process, an Agrobacterium-mediated genetic transformation technology model was established, optimizing core aspects such as triparental hybridization transfer, antibiotic screening conditions, and explant infection parameters. Additionally, molecular biology techniques such as multiplex PCR were employed to identify transgenic plants. Analysis of experimental data reveals a dose-response relationship between antibiotic screening concentration and bacteriostatic efficiency, and optimized infection duration can enhance transformation success rate. This study analyzes the main regulatory factors affecting the efficiency of genetic transformation in woody plants, evaluates the applicability of different transgenic detection techniques, and provides an outlook on the research prospects of genetic improvement in woody plants supported by gene editing technology.

Keywords: Genetic transformation of woody plants; Agrobacterium-mediated method; Multiplex PCR; Conjugation transfer; Antibiotic inhibition

1 研究背景及目的意义

木本植物是陆地生态系统的关键组成部分, 对经济社会发展、生态平衡维护有不可替代的作用。这类植物存在世代周期长、遗传机制复杂、离体再生模式不成熟等固有特性, 遗传改良工作长期面临诸多技术瓶颈, 传统育种手段耗时费力, 效率偏低, 已经无法匹配当前社会对林木品种快速更新的需求。近年来分子生物学技术取得突破, 遗传转化技术逐步成熟, 可帮助木本植物品种改良突破现有技术困境。

依托农杆菌开发的遗传转化技术, 凭借高效和适配范围广的特点, 已经成为植物转基因研究领域的重要技术手段, 已有大量相关研究显示, 这项技术在工业大麻、苧麻、野生稻、花生、辣椒、大豆等经济作物遗传改良过程中都取得了不错的效果^[2,3,5,6,7]。根癌农杆菌拥有独特生物学

特性, 可以借助 Ti 质粒完成 T-DNA 转移, 把外源基因稳定整合到宿主植物的基因组内, 使目的基因长期稳定表达。这套天然的基因转移系统适配木本植物遗传转化研究, 能为木本植物分子育种提供可靠技术支撑。

和草本植物相比, 木本植物在遗传转化技术领域, 要面对更复杂的挑战。相关表现包括以下内容, 组织培养技术模式还没有建立完善; 由于木本植物稳定遗传转化的转基因时间长和效率低, 对稳定转基因木本植物细胞内实时细胞器成像的探索有限; 农杆菌介导转化的效率偏低, 转基因植株检测方法也存在局限。这些技术瓶颈, 阻碍木本植物基因工程研究的发展。当前环境中, 开发高效稳定的木本植物遗传转化技术模式, 优化转基因植株分子检测方法, 是推动木本植物分子育种技术突破的关键。

2 研究材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 菌株与质粒

本研究使用了以下菌株和质粒系统:

本研究选用根癌农杆菌 EHA105 菌株和 LBA4404 菌株作为受体菌, 菌株带有利福平抗性筛选标记, 可经标记完成身份鉴定, 这类菌株可高效介导外源基因转移, 帮助植物材料完成遗传转化过程。

充当辅助菌的大肠杆菌 HB101, 体内携带游动质粒 pRK2013, 这种质粒可以编码出接合转移过程必需的游动功能基因和转移功能基因。

本研究选取携带中间表达载体 pBI121 的大肠杆菌作为供体菌株, 这个菌株对卡那霉素存在抗性, 该表达载体整合有目标基因片段, 还包括供植物筛选使用的标记基因。

2.1.2 培养基

实验使用了多种培养基以满足不同阶段的需求:

本研究选取 YEB 培养基, 支撑农杆菌培养和接合转移实验进行, 该培养基可依照实验需求, 配制成液态或固态两种形态。

本研究选取 LB 培养基用于大肠杆菌的培养, 包括液体和固体两种形式。

2.1.3 抗生素

实验使用了以下抗生素:

本研究选取浓度 50 mg/L 的利福平作为选择性抗生素, 作用是抑制非转化农杆菌生长, 筛选出携带农杆菌标记基因的接合子。

卡那霉素属于选择性抗生素, 配置工作浓度为 50mg/L, 筛选过程中用来选出携带中间质粒的阳性转化子。

氨苄青霉素属于有效抑菌试剂, 应用过程中浓度多控制在 250 至 1000 毫克每升, 作用为抑制农杆菌过度增殖。

2.2 实验方法

2.2.1 接合转移实验

本研究进行接合转移实验, 实验设计参考 Lederberg 和 Tatum1946 年第一次公开的细菌接合现象, 实验操作的关键步骤可梳理如下。

实验菌株制备按以下流程操作, 取供体菌 0.4 毫升, 取辅助菌 0.4 毫升, 另取受体菌 0.6 毫升, 三类菌体全部加入同一离心管, 充分混匀。

以离心洗涤法处理菌体样本, 第一步设定转速 8000 r/min, 离心 1 分钟, 完成后去除上清液, 加入 1 mL LB 液体培养基, 使菌体沉淀重新分散于液体中, 最后重复离心操作, 完成整个洗涤过程。

使用滤纸培养法操作时, 第一步要把经过灭菌处理的

滤纸片, 均匀铺在 YEB 固体培养基表面, 取定量混合菌液, 滴在滤纸的中心位置, 静置五到十分钟, 待菌液完全吸附, 将培养皿倒置, 放在恒温环境中培养。

菌体培养筛选操作如下, 培养次日, 取出滤纸片, 移入装有 5 mL YEB 液体培养基的离心管中, 振荡处理使菌体充分分散, 取出 0.1 mL 菌悬液, 均匀涂抹在添加 50 mg/L 利福平和 50 mg/L 卡那霉素的双抗选择培养基表面, 放入 28℃恒温培养箱, 培养 5 到 7 天。

2.2.2 抗生素抑菌实验

筛选适合后续植物遗传转化实验, 用来抑制农杆菌生长的抗生素浓度, 本研究进行抑菌效果评估实验。

制备农杆菌菌液时, 第一步挑选单菌落, 接种到添加 50mg/L 卡那霉素、利福平的 YEB 液体培养基内, 将培养基放置在 28℃环境振荡培养, 等到培养液在 600nm 波长处的光密度数值到达 0.5 即可停止。

放置滤纸片: 用无菌滤纸片蘸取不同浓度的氨苄置于平板上。

环境设定为 28 摄氏度恒温无光照, 培养时长控制在 2 天到 3 天, 培养结束后观察抑菌圈的生成状态, 使用精度符合要求的测量工具记录抑菌圈的直径数值。

2.2.3 农杆菌介导的遗传转化

梳理已有研究对多种植物遗传转化方法的考察结果, 本研究对木本植物展开遗传转化实验。

实验材料预处理阶段, 本研究选择木本植物受损伤叶片作为初始外植体材料, 提前做培养处理, 诱导愈伤组织生成, 提高细胞分裂活性。

探究不同浸染时间对遗传转化效率的影响, 本研究选用 OD600 值为 0.5 的农杆菌悬浮液处理植物外植体, 一共设置五个梯度处理组, 浸染时长分别为 3 分钟、5 分钟、6 分钟、8 分钟和 10 分钟。

共培养操作中, 完成浸染的外植体需要转移到共培养基表面, 再放入 28℃的黑暗环境, 培养时间控制在 2 至 4 天, 推动 T-DNA 进入植物细胞, 完成植物基因组的整合过程。

2.2.4 转基因植物的分子鉴定

验证外源基因是否有效整合进木本植物基因组, 本研究进行多个分子水平检测实验。

本研究采集样本时, 分别从转基因植株和它对应的非转基因对照植株上取材, 以此保障实验材料完整, 后续提取总 RNA, 使用的是长沙信励致和科技有限公司售卖的植物组织总 RNA 提取试剂盒。

cDNA 第一链合成阶段, 选取 Oligo dT 作为特异性引物, 借助逆转录酶完成催化, 使 RNA 模板转变为互补

DNA 链，整个逆转录过程效率稳定。

以反转录合成的 cDNA 为扩增模板，依靠多重 PCR 技术，用匹配目标基因设计出的特异性引物，完成核酸序列的体外扩增。

3 结果分析

3.1 接合转移效率分析



图1 三亲接合转移实验结果

本研究借助三亲接合法，完成中间表达载体 pBI121 从大肠杆菌向根癌农杆菌的跨菌种转移，转移操作可正常完成，观察培养结果发现，同时添加 50 mg/L 利福平和 50 mg/L 卡那霉素的双重抗性选择培养基上、未添加任何抗生素的对照培养基中，受体菌株生长状态旺盛。菌落密度过高，菌落计数无法准确完成。

接合转移失败的主要原因，可能包括接合过程效率偏低，或是接合过程完全停止，也包括抗生素作用未达到预期效果。优化实验方案可从多方面调整操作，第一步，对所有菌株重新划线活化，制备新鲜的抗生素母液，配制对应工作浓度的平板；第二步，严格把控菌株培养条件，使菌株生长处于对数生长期（ $OD_{600} \approx 0.5$ ）；第三步，充分混匀菌体悬液，预留充足共培养时间（通常过夜培养，约 16—24 小时）；第四步，将平板放置在 28℃ 环境中培养，保证培养时长充足。调整操作后，后续实验可获得接合转移产物。

3.2 抗生素抑菌效果分析



图2 纸片扩散法结果

本研究选用纸片扩散法，检测头孢类抗生素对根癌农杆菌的抗菌活性，整理实验数据可发现，抑菌圈直径随抗生素浓度变化同向变动，抗生素浓度升高，对应抑菌区域范围扩大，头孢类抗生素对根癌农杆菌的抑制作用，符合浓度依赖性特征。

纸片扩散法操作简单，结果判读直观，现有应用场景中，这类方法仅输出定性或半定量结果，无法准确测定最小抑菌浓度这类关键定量指标，获取精确抗菌活性评估数据，可在后续实验设计中整合微量肉汤稀释法这类定量检

测方法，完成交叉验证。

3.3 遗传转化过程分析



图3 农杆菌介导法实验结果

本研究以农杆菌介导的木本植物遗传转化模式为对象，梳理各操作环节的作用特点，重点梳理外植体筛选、农杆菌侵染处理、共培养条件、抗性筛选培养等关键环节的优化方向。

已有研究显示，外植体的生理状态影响遗传转化效率，进行系统实验验证可发现，使用预培养处理的叶片外植体，还有茎段外植体，都能有效刺激愈伤组织细胞增殖，提高受体细胞整合外源基因的能力，处于最佳培养条件下时，外植体可维持良好的形态学特征，观测过程中未发现褐变或脱水等不良生理反应。

本次研究重点考察农杆菌介导转化过程中，浸染条件对转化效率产生影响的作用机制，实验过程中对各类浸染参数完成系统优化，调整参数后得到如下结果， OD_{600} 值为 0.5 的农杆菌悬浮液用于浸染处理，同时浸染时间控制在 10 分钟，外植体可收获最佳侵染效果，这个结果可支撑后续遗传转化实验，成为实验进行可参照的技术参数。

实验进行过程中，可观察到培养皿内部出现杂菌污染，污染的来源，可能是叶片转移操作环节中无法完全隔绝的外部污染。

3.4 转基因植物鉴定结果

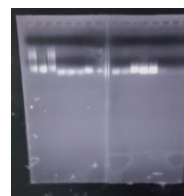


图4 多重pcr实验结果

本研究使用逆转录 PCR 技术，对抗性植株做分子水平鉴定，先设计特异性引物扩增目标外源基因，提取植物总 RNA，反转录得到 cDNA 模板，再借助 PCR 扩增，搭配琼脂糖凝胶电泳分析检测扩增产物。

凝胶电泳分析后，转基因阳性植株可显示出特异性条带，条带位置和阳性对照重合，分子量符合实验预期，阴性对照样本中，未找到对应条带，这个现象确认实验结果可靠，电泳图谱上，目标条带清晰可辨，可确认本实验操作完成。

聚合酶链式反应检测多用于转基因植物鉴定的初步筛查,检测结果会出现一定概率的假阳性,提高鉴定结果准确性,可在后续实验设计中加入 Southern 印迹杂交 Western 免疫印迹两类特异性更高的分子生物学技术,验证外源基因在宿主基因组中的整合情况,确认对应蛋白的表达水平。

4 讨论

4.1 木本植物遗传转化的关键影响因素

梳理实验数据,整理已公开研究成果可发现,木本植物遗传转化效率受多重关键因素影响,外植体类型选择,农杆菌菌株特性,共培养条件调整,筛选标记运用,每一变量都会左右最终转化效果。

外植体筛选合理,是植物遗传转化模式成功建立的关键前提,和草本植物相比,木本植物外植体再生能力更低,存在比较严重的褐化问题。已有研究记录,工业大麻遗传转化模式建立过程中,选取 1.0 cm 长度的 7 日龄幼苗茎尖作为外植体材料,可提高转化效率^[2]。结合过往研究结论,本实验选取木本植物机械损伤叶片和茎段作为外植体材料,通过预培养处理抑制褐化反应,最终转化效率出现提高。

T-DNA 转移效率受多方面影响,核心内容关联农杆菌菌株选择,也关联侵染条件调整,已有实验数据显示,EHA105 和 LBA4404 投入木本植物遗传转化工作,二者侵染性能均可满足研究需求,不同菌株特性有差异,宿主范围出现变化,侵染效率也出现变化^[6]。现有研究确认,转化效率和侵染时间、菌液浓度之间不存在线性关联。侵染时间和菌液浓度超过临界数值后,农杆菌繁殖量超出合理范围,外植体存活会受到负面作用,花生遗传转化研究得出结论,在实验模式中加入 DTT 和特定种类氨基酸,可提高转化效率,这套调整方案,可为木本植物搭建遗传转化模式提供参考。

共培养过程是 T-DNA 整合的关键环节,持续时间长短会改变转化效率,已有实验数据显示,共培养时间控制在 2 天到 4 天范围,可获得最佳转化效果,这个结果和现有公开研究结论一致,本研究采用真空侵染法提高大豆遗传转化过程中农杆菌的侵染效率,这个技术方案可辅助木本植物等难转化物种完成遗传改良^[9,10]。梳理实验数据可发现,共培养阶段加入乙酰丁香酮等酚类化合物,能激活 vir 基因表达,推动 T-DNA 完成转移,这个现象已在多项相关研究中得到验证。

获得高纯度真阳性转化体,筛选策略的优化设计起决定性作用,已有实验数据显示,抗生素筛选时机的选择同浓度设定存在相关性,过早施加高浓度抗生素,假阳性率会上升,延迟筛选或降低抗生素浓度,假阴性比例会增加,

本研究提出梯度筛选方案,解决这个技术难题,方案具体内容为,愈伤组织诱导阶段采用 50 mg/L 卡那霉素完成初步筛选,生根培养阶段将浓度调整为 30 mg/L,这个策略可维持筛选严格度同外植体存活率之间的动态平衡。苧麻遗传转化模式研究中可观察到,头孢霉素可抑制农杆菌生长,还可调控外植体分化过程,经系统优化确定其最适工作浓度为 500 mg/L,这个实验结论同既有文献报道^[3]内容相吻合。

4.2 转基因植物鉴定方法的比较与优化

木本植物遗传转化研究存在多个关键环节,本研究聚焦转基因植株精准鉴定展开分析,实验选择逆转录 PCR 技术完成检测分析,最终取得的鉴定结果未符合预期状态,这个现象提示,该分子生物学方法应用于木本植物研究领域,可能存在特定应用限制。

聚合酶链式反应是转基因检测领域的关键技术,依靠检测速度快、灵敏度高、操作流程简便的优势,已经在行业内获得广泛应用。该技术只能有效鉴定外源基因的整合状态,无法对其表达水平、功能活性做出有效评估,木本植物的转基因鉴定有自身特殊性,研究人员需要重点优化 DNA 提取工艺,去除 PCR 反应抑制因子,保证检测结果准确可靠。

GUS 组织化学染色法是一种广泛应用于报告基因检测的技术,当前已经在工业大麻遗传转化研究中,用来对外源基因表达做可视化检测,该方法拥有结果直观、数据可靠的优势,方法本身带有破坏性处理特性,会干扰植物组织后续的培养过程,部分植物体内存在内源性 GUS 酶活性,可能引发假阳性结果。研究者需要在实验设计阶段设置严格的阴性对照模式,排除这类干扰因素。

Southern 杂交技术是检测外源基因整合的金标准,它能准确测定基因拷贝数,也能帮研究者看清基因在基因组里具体的整合位置,但这项技术在实际应用中存在局限,操作步骤繁琐,实验花费时间长,检测需要投入的成本也高,这些都使它没法适配大规模样本的初步筛选工作。

和传统 PCR 技术相比,实时荧光定量 PCR 应用于外源基因表达水平检测时,拥有更优越的性能,它的检测精度和灵敏度都有提高,该技术和反转录 PCR 结合使用,可以在 mRNA 方面完成基因表达检测,产出分子生物学研究数据。

保证木本植物转基因鉴定结果准确可靠,我们设计了多方法联用的综合检测方案:先用 PCR 技术完成初步筛选,再通过 GUS 组织化学染色或实时荧光定量 PCR 技术,检测目标基因的表达水平,最后挑出部分 PCR 阳性植株做 Southern 印迹杂交分析,验证外源基因在基因组中

的整合状态。这种递进式的多层次检测模式,可以提高鉴定结果的科学性和可信度。

4.3 木本植物遗传转化的技术挑战与对策

和草本植物相比,木本植物遗传转化过程中存在若干技术瓶颈,这些瓶颈来自多个方面,组织培养技术模式尚未建立完整模式,不同基因型的表现存在明显差异,转化效率普遍偏低,转基因沉默现象出现频率较高,本研究梳理现有方法,从多个方向调整研究方案。

现有研究显示,离体再生系统效率较高时,木本植物遗传转化才能顺利进行,不同树种,甚至同一树种的不同品种,再生能力存在差异,研究者要对具体树种调整外植体选择方向,改变培养基配方,调整培养环境各类参数,搭建稳定高效的再生技术模式,已有研究内容确认,基因型能直接决定遗传转化效率。这个结论最初从野生稻转化研究中得出,目前已确认该规律可应用于各类木本植物^[4]。

提高遗传转化效率,核心工作围绕转化方法的系统优化展开,木本植物这类物种的转化工作存在较大难度,可在传统农杆菌介导法的基础上,整合多种物理辅助手段,覆盖基因枪轰击、电穿孔技术及真空渗透处理等方向,增强外源DNA的递送效果,本文评述种子介导转化,花器官原位转化,活体组织直接注射等不依赖组织培养的转化技术,这些创新方法可支撑木本植物这类再生困难物种的遗传改良工作^[5]。

优化筛选策略可以提高目标性状的阳性检出率,常规筛选多使用抗生素,在此基础上引入除草剂或特定代谢产物作为筛选标记物,可有效减少假阳性干扰,把早期筛选和延迟筛选结合,组成复合筛选方案,能在保证筛选效率的同时,维持外植体较高的存活率。

4.4 研究展望

近些年,基因编辑技术发展速度很快,为木本植物遗传转化研究打开了新的方向,以CRISPR/Cas9为代表的基因组精准编辑工具,拉高了木本植物育种的精准性,也使育种效率得到提高,这项技术应用在木本植物模式中,实际操作过程中还碰到不少难以解决的技术问题,集中在外源基因递送效率不够,还有基因组编辑成功率不高这些方面。

后续研究可重点围绕以下四个方向展开,第一,面向木本植物的独有特性开发创新型遗传转化技术,技术方向包括基于纳米材料的基因递送载体,也包括病毒载体介导的转基因系统,第二,整合多组学分析手段,系统鉴定木

本植物特有的高活性启动子和调控序列,提高转基因表达水平。第三,改良基因编辑工具的递送策略,优化再生培养模式,实现木本植物基因组的高效精准修饰,第四,探索建立不依赖组织培养的新型遗传转化技术模式,从根源解决木本植物再生困难的技术问题。

转基因木本植物存在潜在生态风险,相关生物安全性评价模式建立仍有不足,完善工作属于后续研究核心方向。科研人员需要从分子方面,观察外源基因在宿主基因组中整合后能否保持稳定,测算基因依托花粉或种子完成水平转移的概率,分析外源基因对非靶标生物、生态系统功能可能产生的影响,为转基因木本植物商业化推广,搭建可靠的风险评估框架。

参考文献:

- [1] 李娇娇,王晓光,白梦岚等. 农杆菌介导的植物非组培遗传转化技术研究进展[J]. 浙江农林大学学报, 2025,42(05):888-897.
- [2] 张园,郭孟璧,许艳萍等. 农杆菌介导工业大麻茎尖遗传转化体系的建立与优化[J]. 植物生理学报, 2025,61(04):539-548.
- [3] 何鹏亮,伍旭东,朱宁静等. 农杆菌介导的苧麻遗传转化体系优化研究[J]. 现代农业科技, 2025,(07):150-155.
- [4] 李爽,张淑梅,田缘等. 农杆菌介导的稻瘟病菌遗传转化体系的建立及优化[J]. 湖北农业科学, 2025,64(03):182-189.
- [5] 熊子璇,雷凌云,李金璐等. 农杆菌介导的野生稻遗传转化[J]. 分子植物育种, 1-8.
- [6] 邓洪涛,杨艳雯,冯鹤言等. 农杆菌介导花生遗传转化体系的优化[J]. 分子植物育种, 1-21.
- [7] 许晴,张宏冠,赵红杰等. 农杆菌介导辣椒遗传转化的影响因素[J]. 辣椒杂志, 2024,22(01):38-46.
- [8] 张志祥,宋凯,严成其等. 农杆菌介导过程若干关键问题解析[J]. 中学生物教学, 2023,(27):45-47.
- [9] 石淼,韩晗,陈玥等. 农杆菌介导大豆遗传转化新技术的建立及优化[J]. 分子植物育种, 2023,21(16):5295-5300.
- [10] 韦永淑. 农杆菌介导的大豆遗传转化体系优化[D]. 南京农业大学, 2022.

作者简介:崔恒瑞(2004-),男,汉族,黑龙江省七台河市人,东北林业大学本科在读,生物科学专业。