

引用格式: 王学君, 张双, 于茹恩, 等. 预培养对尾巨桉 DH32-29 遗传转化效率的影响[J]. 浙江农林大学学报, 2026, 43(3): 496-503. WANG Xuejun, ZHANG Shuang, YU Ru'en, et al. Effect of preculture on genetic transformation efficiency of *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* DH32-29[J]. Journal of Zhejiang A&F University, 2026, 43(3): 496-503.

预培养对尾巨桉 DH32-29 遗传转化效率的影响

王学君¹, 张双¹, 于茹恩¹, 杨珺², 曾炳山¹, 范春节¹

(1. 中国林业科学研究院 热带林业研究所/林木遗传育种全国重点实验室/华南森林培育经营国家林业和草原局重点实验室, 广东广州 510520; 2. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要: 【目的】为获得稳定、高效的遗传转化效率, 得到大量转基因林系和创制优良品种, 研究不同预培养时间对尾巨桉 *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* DH32-29 遗传转化的影响。【方法】尝试精细化调整不同预培养时间, 通过 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (EdU) 染色和流式细胞仪检测 DNA 合成期 (S 期) 细胞周期的细胞数量, 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测 S 期相关基因 *EgrCDKD3*、*EgrCYCD3;3*、*EgrCYCD1;1* 和 *EgrCYCH1;1* 的表达量, 确定尾巨桉 DH32-29 稳定遗传转化的最佳处理时间。【结果】外植体叶片不同的预培养时间影响了尾巨桉 DH32-29 叶片的瞬时转化效率和稳定转化效率。预培养 3 d 时, 外植体 S 期细胞数量占比最高, S 期关键基因 *EgrCDKD3*、*EgrCYCD3;3*、*EgrCYCD1;1* 和 *EgrCYCH1;1* 表达量达到峰值, 表明预培养 3 d 时, 外植体适宜进行农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 的浸染。稳定转化表明: 预培养 3 d 能够大幅度提高农杆菌介导的桉树遗传转化效率, 将最初转化效率从 0.77% 提高至 4.67%。【结论】预培养对于农杆菌介导的桉树遗传转化效率至关重要, 经过 3 d 预培养可有效提高桉树的遗传转化效率。图 7 表 1 参 28

关键词: 尾巨桉; 转化效率; 流式细胞术; EdU 染色; 细胞周期; 预培养

中图分类号: S718.46 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2026)03-0496-08

Effect of preculture on genetic transformation efficiency of *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* DH32-29

WANG Xuejun¹, ZHANG Shuang¹, YU Ru'en¹, YANG Jun², ZENG Bingshan¹, FAN Chunjie¹

(1. Research Institute of Tropical Forestry/State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding/National Forestry and Grassland Administration Key Laboratory of Silviculture and Management in South China, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou 510520, Guangdong, China; 2. College of Biological Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: [Objective] To obtain a stable and efficient genetic transformation rate, generate a large number of transgenic lines, and create improved varieties, the effects of different preculture treatment durations on genetic transformation of *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* DH32-29 were studied. [Method] This study aimed to fine-tune different preculture durations to determine the optimal timing for stable genetic transformation of *E. urophylla* × *E. grandis* DH32-29, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) staining and flow cytometry were used to quantify the proportion of cells in the DNA synthesis (S) phase of the cell cycle, and RT-qPCR was used to measure the expression levels of S phase-related genes *EgrCDKD3*, *EgrCYCD3;3*, *EgrCYCD1;1*, and

收稿日期: 2025-06-20; 修回日期: 2026-02-10

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFD2200102-05); 中国林业科学研究院基本科研业务费专项资金项目 (CAFYBB2020ZB004)

作者简介: 王学君 (ORCID: 0009-0002-0517-8070), 博士研究生, 从事林木遗传育种研究。E-mail: 15765974351@163.com。通信作者: 范春节 (ORCID: 0000-0003-1152-3539), 研究员, 博士, 从事林木遗传育种研究。E-mail: fanchunjie@caf.ac.cn

EgrCYCHI;1. [Result] The duration of preculture of leaf explants significantly affected both the transient and stable transformation efficiency of *E. urophylla* × *E. grandis* DH32-29. After 3 days of preculture, the proportion of explant cells in the S phase was the highest, and the expression levels of key S-phase genes *EgrCDKD3*, *EgrCYCD3;3*, *EgrCYCD1;1*, and *EgrCYCHI;1* peaked, indicating that explants precultured for 3 days are optimal for *Agrobacterium tumefaciens* infection. Further stable transformation assays demonstrated that a 3-day preculture substantially improved the efficiency of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in eucalyptus, increasing the transformation efficiency from 0.77% to 4.67%. [Conclusion] Preculture is crucial for the efficiency of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in eucalyptus. A 3-day preculture period can effectively enhance the genetic transformation efficiency of eucalyptus. [Ch, 7 fig. 1 tab. 28 ref.]

Key words: *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis*; transformation efficiency; flow cytometry; EdU staining; cell cycle; preculture

桉树为桃金娘科 Myrtaceae 桉属 *Eucalyptus* 的总称^[1-2], 是目前世界上种植数量最多的阔叶树种之一^[3]。桉树生长速度快、轮伐周期短、适应能力强、木材产量高, 与杨树 *Populus* 和松树 *Pinus* 并称世界上三大速生树种^[4-5]。其中, 尾叶桉 *Eucalyptus urophylla* 和巨桉 *E. grandis* 的杂交种尾巨桉 *E. urophylla* × *E. grandis* DH32-29 杂种优势明显, 其干形通直、适应性广、出材率高、材质优良、耐寒性好, 是中国南方地区林业生产中的主栽品种^[6]。

植物遗传转化是分子育种的关键步骤^[7-8], 不仅可用于鉴定基因功能, 还可以用于改良植物品种的短板性状, 尤其适用于育种世代周期较长的树种, 实现其目标性状的遗传改良^[9]。预培养时间是遗传转化研究中讨论较多的影响因素之一。有研究表明: 处于分裂期或代谢活跃期的“感受态细胞”更容易被根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 感染而转化。预培养有利于外植体在切口处形成微愈伤, 改变其生理生化状态, 促进受体细胞分裂, 提高细胞代谢活性, 易于整合外源 DNA, 提高转化率^[10]。预培养时间过短, 细胞未进入最佳分化阶段; 预培养时间过长, 外植体伤口会产生保护层, 阻碍农杆菌与分裂细胞的接触, 因此, 适宜的预培养时间可显著提高农杆菌转化效率^[11]。一般 1~4 d 的预培养时间较为适宜^[12]。此外预培养时间的长短与物种和外植体类型有关, 石榴 *Punica granatum* 嫩茎为受体材料时, 遗传转化过程中预培养 3 d 的转化率最高^[11]。香蕉 *Musa nana* 最佳的预培养时间为 1 d, 转化效率最高达 6.87%^[13]。

外植体不同发育阶段对转化效率有很大影响, 当外植体培养到细胞发育的适宜状态时, 可提高遗传转化的效率^[14]。最新研究发现: 杨树和烟草 *Nicotiana tabacum* 的 DNA 合成期(S 期) 是进行遗传转化的最佳细胞周期处理时间点^[15]。因此, 本研究以尾巨桉 DH32-29 叶片为材料, EHA105 为转化农杆菌, 通过观察细胞周期 S 期细胞数量, 确认预培养时间, 从而建立高效、稳定的农杆菌介导的植物转化体系。

1 材料与方法

1.1 植物材料

以尾巨桉无性系 DH32-29 为外植体进行遗传转化研究, 并在含有木本植物培养基 (WPM) 的预培养液体培养基 (2.46 g·L⁻¹WPM + 30.00 g·L⁻¹蔗糖 + 1.00 g·L⁻¹水解酪蛋白) 上培养。组培苗由中国林业科学研究院热带林业研究所林木生物育种课题组繁殖保存。

1.2 受体材料的分化培养

将继代 20~25 d 的尾巨桉 DH32-29 组培苗的 3~5 片叶片切去叶尖后, 置于 WPM 液体培养基中培养 0、1、2、3、4、5、6、7 d。培养条件: 培养温度为 (25±2) °C, 光照强度为 2 000 lx, 光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗, 每个预培养时间点使用至少 3 个独立培养批次的外植体, 每批次含 60 片叶片。

1.3 不同分化培养时间的离体材料表型特征观察

将体外培养的桉树叶片置于体视显微镜 (Olympus) 下观察, 记录不同预培养时间处理的体外培养材料切口处发育状态。

1.4 细胞周期检测

本研究使用流式细胞仪 (BD FACSCalibur) 检测细胞周期。将 3~5 片桉树叶片切碎后, 放入 300.0 μL 裂解液, 置于 10 cm 的培养皿中, 再加入 1.2 mL 的碘化丙啶 (PI) 混合染液, 通过 30 μm 尼龙网过滤至检测管中, 避光孵育 10 min, 每个处理采集 2 个样品。峰图由 Cyflow®倍性分析仪进行分析, 并使用 modfitLT 软件鉴别峰图中 DNA 合成前期 (G1 期)、DNA 合成期 (S 期) 和 DNA 合成后期/有丝分裂期 (G2/M 期) 所占比例。

1.5 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (EdU) 染色

EdU 是胸腺嘧啶核苷类似物。在细胞增殖过程中, EdU 会被摄取到细胞核中, 与 DNA 合成过程中的 DNA 结合, 形成 EdU-DNA 复合物。这个复合物可以被抗 EdU 抗体识别并结合, 从而形成 EdU-DNA-抗体复合物。通过检测这个复合物的信号强度, 可以确定细胞增殖的速率和细胞周期。EdU 染色可以准确定位细胞周期 S 期的细胞, 使其发出绿色荧光。

将桉树叶片在分化培养基上培养 1、2、3、4、5、6 和 7 d, 然后置于含 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EdU 的分化培养基上培养 24 h, 孵育结束后, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗材料 3 次 (此时将切口处朝下)。然后用质量浓度为 4.0% 的多聚甲醛固定, 避光处理 30 min 后用 PBS 洗涤 3 次。然后用体积分数为 0.5% Triton X-100 处理 15 min 促渗。根据 YF 488 Click-iT EdU 成像试剂盒 (百瑞极) 处理样品。最后在激光共聚焦显微镜 (徕卡仪器有限公司) 拍照观察, 设置波长为 495~515 nm 检测 GFP 信号, 650 nm 检测叶绿体发出的荧光。

1.6 总 RNA 提取和荧光定量 PCR 分析 (RT-qPCR)

RT-qPCR 是通过荧光染料或荧光标记的特异性探针, 对 PCR 产物进行标记跟踪, 实时在线监控反应过程, 结合相应的软件可以对产物进行分析, 计算待测样品模板的初始浓度。为了验证上述实验, 在细胞周期 S 期, 选择不同分化培养时间 7 个关键基因的表达水平进行 RT-qPCR 检测。

使用植物总 RNA 提取试剂盒 (Aidlab), 从植物组织中提取总 RNA。使用 cDNA 合成试剂盒 (Takara) 合成 cDNA。RT-qPCR 分析采用罗氏 LightCycler 96 仪器进行。对每个样品进行 3 次生物重复。Primer 5 设计基因特异性引物 (表 1)。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因相对表达水平^[16]。

1.7 GUS 染色

GUS 基因是目前常用的一种报告基因, 其产物 β -葡萄糖苷酸酶是一种水解酶, 能催化许多 β -葡萄糖苷酯类物质的水解, 它可以将 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -葡萄糖苷酸酯分解为蓝色的物质^[17]。将含有 GUS 基因的 pBI121 载体转入尾巨桉离体叶片中。将叶片放入 1.5 mL 离心管中, 加入 GUS 染色液, 用锡纸包好离心管, 真空抽滤 30 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 16 h。用体积分数为 70% 的乙醇浸泡样本 3 h, 直至阴性对照呈白色, 将样本保存于乙醇中, 用体视显微镜观察并拍照。同时统计 GUS 染色率, 处理叶片蓝色覆盖面积 $\geq 50\%$ 视为转化成功。GUS 染色率=染色叶片个数/总外植体个数 $\times 100\%$ 。

1.8 统计分析

采用 Excel 2021 进行数据处理, SPSS 24.0^[18-19] 进行数据分析, GraphPad Prism 5 进行图表绘制。使用 SPSS 24.0 进行单因素方差分析 (one-way ANOVA), 使用 Duncan 极差法进行多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 GUS 染色

经过不同预培养时间的叶片伤口处能够明显看到蓝色, 主要为切口处 (图 1)。预培养 0 d 时, 转化

表 1 特异性引物

Table 1 Specific primer

引物	碱基序列(5'→3')
<i>EgrCDK3</i> -F	GCTCGGTGAGGGTACGTATG
<i>EgrCDK3</i> -R	GCAGGTTCCCTTTGTGAGGA
<i>EgrCYCD3</i> ;3-F	CCTCCGCGAGATAAAGGACC
<i>EgrCYCD3</i> ;3-R	ACGGCCAACATAGCAGTCAA
<i>EgrCYCD1</i> ;1-F	TGCGATGGGCTAAGCAAAGA
<i>EgrCYCD1</i> ;1-R	ACGATGGCGATAACGAGGAC
<i>EgrCYCHI</i> ;1-F	CGGATTTCAGAGCTCGACG
<i>EgrCYCHI</i> ;1-R	TGGACGGGAATGCTTGTCAT
<i>EgrCDKB1</i> ;2-F	CTATTCGATCGGCGTGGACA
<i>EgrCDKB1</i> ;2-R	GGTAACTCCTGGCCATTGCT
<i>EgrCYCD6</i> ;1-F	GCTCGGTGAGGGTACGTATG
<i>EgrCYCD6</i> ;1-R	GCAGGTTCCCTTTGTGAGGA
<i>EgrCYCA3</i> ;4-F	TGCTCAAGAAGTCCACAAGACTA
<i>EgrCYCA3</i> ;4-R	GTGAGTCTTGTTGCGTGAT

效率最高，GUS 染色率为 97.33%；预培养 2 d 时，转化效率次之，染色率为 84.31%；预培养 6 d 时，转化效率最低，GUS 染色率为 20.62%。预培养 1 和 3 d 的染色率均在 80% 以上 (图 2)。GUS 染色结果说明：预培养 0~3 d 的染色率较高。

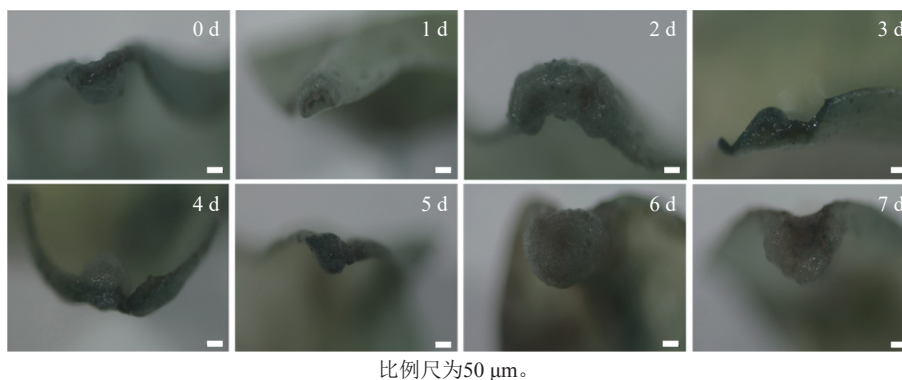
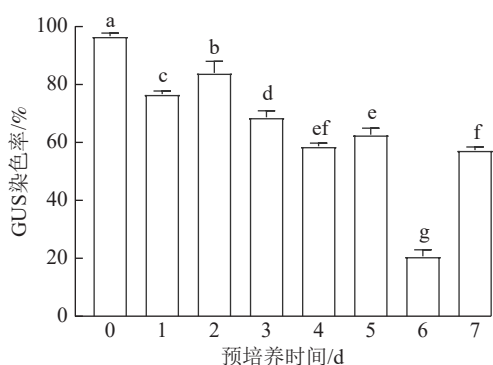


图 1 尾巨桉 DH32-29 叶片不同离体培养时间下的 GUS 染色

Figure 1 GUS staining of leaves of *E. urophylla* × *E. grandis* DH32-29 under different *in vitro* culture time

2.2 细胞周期的确定

预培养 0 d 时 G2/M 期细胞比例最高，1~7 d 时 S 期细胞占比均高于 0 d，且在整个预培养时间中，S 期细胞在预培养 5 d 时比例最高，为 26.88%，而在预培养 5 d 时，G2/M 期细胞占比为 56.12%，G1 期细胞为 17.00%。预培养 3 d 时，S 期细胞占比为 23.54%，仅次于处理 5 d。表明尾巨桉 DH32-29 叶片离体预培养 3~5 d 为最佳遗传转化时间 (图 3)。



不同字母表示不同预培养时间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 2 尾巨桉 DH32-29 叶片不同离体培养时间下的 GUS 染色率

Figure 2 GUS staining rate in leaves of *E. urophylla* × *E. grandis* DH32-29 under different *in vitro* culture time

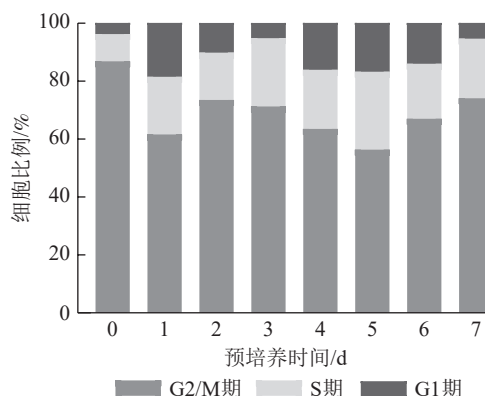


图 3 尾巨桉 DH32-29 叶片不同离体培养时间下的细胞周期鉴定

Figure 3 Identification of cell cycle in leaves of *E. urophylla* × *E. grandis* DH32-29 under different *in vitro* culture time

本研究采用 EdU 染色对不同离体培养的桉树叶片进行染色，观察它们的荧光信号分布 (图 4)。预培养 0~1 d 出现少量绿色荧光，2~3 d 绿色荧光最多，4 d 后荧光数量逐渐减少，但 4 d 荧光信号仍较强，而且荧光主要分布于叶脉两侧靠近切口处，7 d 绿色荧光最少，部分叶片无绿色荧光，这说明细胞周期 S 期的细胞数量在离体后先升高后降低，且 2~3 d 时 S 期细胞数量较高。说明尾巨桉 DH32-29 叶片离体培养 2~3 d，其转化效率可能最佳。

2.3 细胞周期相关基因的表达量分析

图 5 表明：细胞周期 *EgrCDKD3* 离体培养 1 d 时表达量升高，显著高于 0 d ($P < 0.05$)，2 d 后迅速升高，但 4 d 后表达量降低。细胞周期 *EgrCYCD3;3* 和 *EgrCYCD1;1* 在 0~2 d 表达量逐渐递减，但在 3 d 时表达量显著升高后迅速下降 ($P < 0.05$)，2 d 时表达量升高，3 d 时表达量最大，4 d 时表达量迅速下降，之后表达量逐渐升高。S 期关键基因 *EgrCDKD3*、*EgrCYCD3;3*、*EgrCYCD1;1* 和 *EgrCYCH1;1* 均在 3 d 时，表达量达到峰值，这与 EdU 染色结果一致。但 *EgrCDKB1;2*、*EgrCYCA3;4* 和 *EgrCYCD6;1* 在 G2/M

期发挥作用,在预培养7 d时,在桉树叶片中达到最高值。综上所述,尾巨桉 DH32-29 叶片离体预培养 3~4 d 为最佳遗传转化时间。

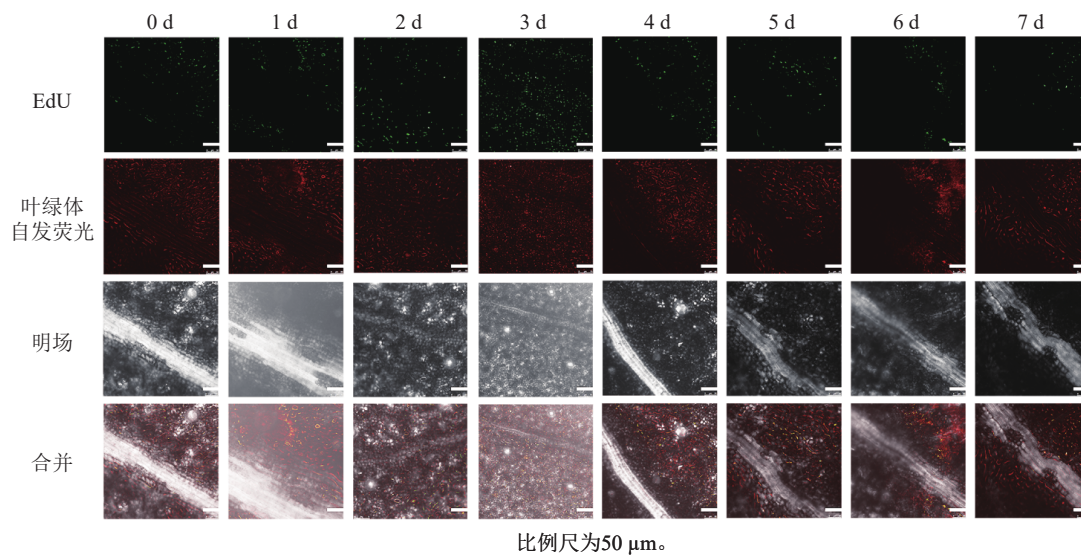
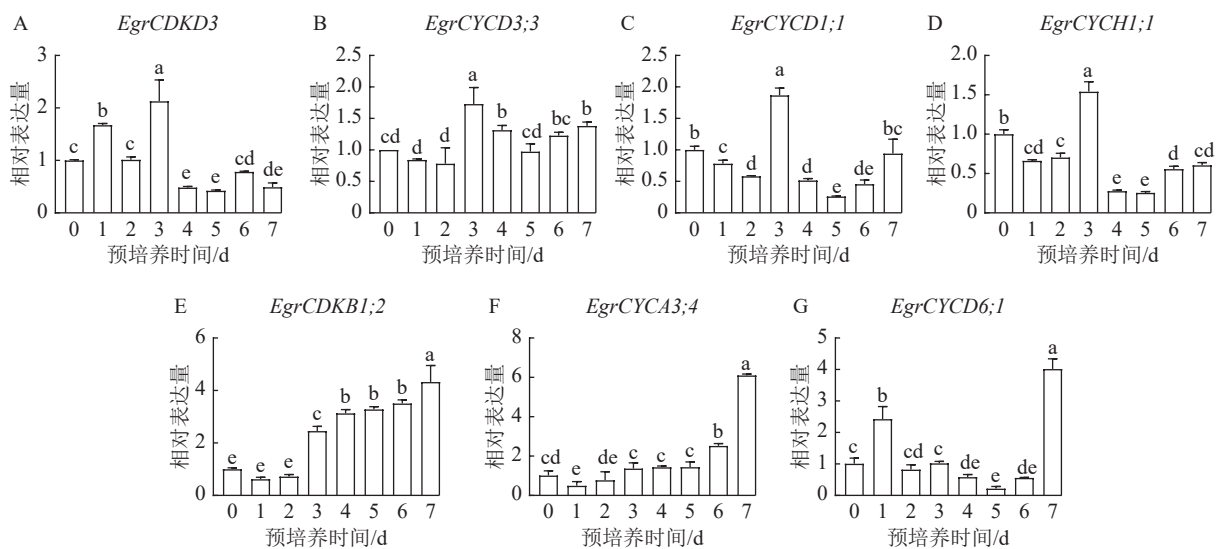


图4 尾巨桉 DH32-29 叶片不同离体培养时间下的 EdU 染色
Figure 4 EdU staining of DH32-29 leaves of *E. urophylla* × *E. grandis* under different *in vitro* culture time



不同字母表示不同预培养时间差异显著 ($P < 0.05$)。

图5 细胞周期相关基因的表达水平

Figure 5 Expression levels of genes associated with the cell cycle

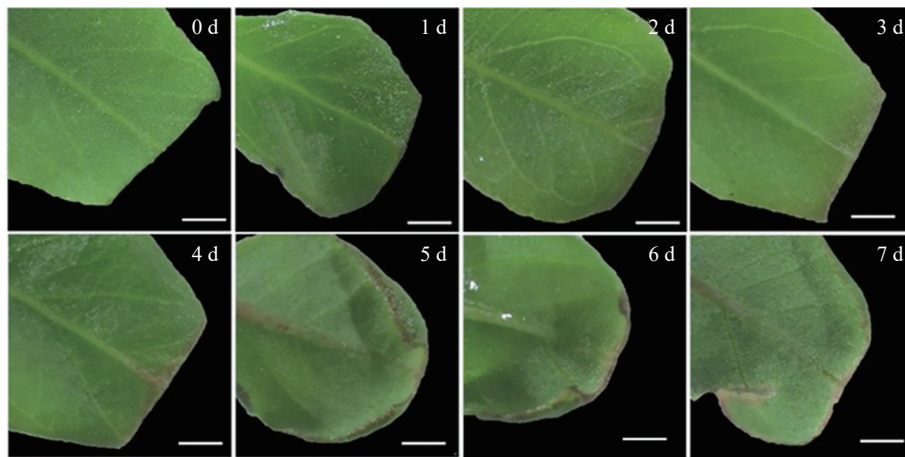
2.4 植物离体培养的形态变化特征

图6表明:随着预培养时间的延长,叶片逐渐卷曲,离体培养 0~2 d 的桉树叶片切口处湿润,切口处为绿色,整个叶片平整无皱缩;培养 3 d 后,叶片切口处开始变得干燥,且小部分切口转为红色;培养 4 d 后,尾巨桉叶片开始卷曲,且切口处干燥和起皱明显;5 d 观察到少量愈伤组织形成;6~7 d 愈伤组织大量出现。切口处干燥皱缩,几乎整个切口变为红色。因此,可推断当叶片切口开始干燥且变红时,是进行遗传转化的最佳处理时间。

2.5 遗传转化效率

为了确定稳定的转化效率,通过农杆菌介导法将抗草甘膦基因 *G10-EPSPS* 转入尾巨桉 DH32-29 叶片中(图7),将含有 *G10-EPSPS* 基因的根癌农杆菌 EHA105 菌液(600 nm 波长下的吸光度约 0.4,农杆菌浓度为 0.4),在 4 °C 条件下以 4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,弃上清后加入等体积重悬液重新悬浮菌体。将叶片置于重悬菌液中振荡侵染 30 min,取出后用无菌滤纸吸干表面菌液,随后转移至共培养基中进行共培

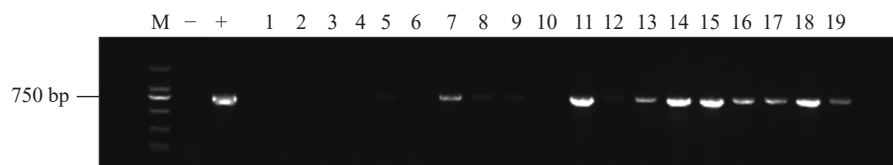
养。分别提取野生型植株和抗性植株的 DNA，并用特异性引物对 *G10-EPSPS* 进行 PCR 扩增。结果表明：*G10-EPSPS* 基因成功转入到桉树中，最高转化效率达 4.67%。



比例尺为0.05 mm。

图 6 尾巨桉 DH32-29 叶片离体培养时间下的表型特征

Figure 6 Phenotypic characteristics of leaves of *E. urophylla* × *E. grandis* DH32-29 under different *in vitro* culture time



M为DNA标记；+为阳性对照，质粒pSOY19-epsps为模板；-为阴性对照，基因组DNA从一个未转化的植物提取作为模板；1~19为来自19株抗性芽的基因组DNA。

图 7 抗性植株的 PCR 检测

Figure 7 PCR detection of resistant plants

3 讨论

本研究确定预培养 3 d 时 S 期细胞最多，最高转化效率为 4.67%，是前期报道的尾巨桉 DH32-29^[20] 转化效率的 6 倍。

农杆菌转化法因具有遗传稳定性高、嵌合体少等优势，在桉树研究中得到了广泛应用，但在桉树转基因过程中存在的转化效率低、稳定性差等问题，极大地制约了桉树转基因育种工作的开展。高效的遗传转化体系建立是桉树转基因育种的基础，因此进一步提高遗传转化效率变得尤其重要^[21]。活跃分裂的细胞即细胞分裂的 S 期最容易通过农杆菌进行遗传转化^[22]，在此期间细胞对农杆菌转化十分敏感，预培养处理有助于植物获得更高的转化效率^[10]。在进行遗传转化时，预培养可以促进植物细胞的分裂，使代谢活跃，让细胞更容易融合外源 DNA，进而提高转化效率，不同的预培养时间对外植体的转化效率有着一定的影响^[23]。

本研究发现：外植体叶片出现逐渐卷曲，切口处从绿色湿润转变完红色干燥，后期有透明愈伤组织形成，与杨树和烟草中的报道相似^[14]。流式细胞仪检测结果显示：S 期细胞在处理 5 d 时比例最高，为 26.88%，而此时，G2/M 期细胞占比为 56.12%，G1 期细胞为 17.00%，处理 3 d 的 S 期细胞次之。EdU 染色和荧光定量结果显示：预培养 3 d 的 S 期细胞较多，且大多集中于叶脉切口附近。这与流式细胞仪的结果有所不同，可能与外植体状态有关。

预培养时间与物种以及外植体类型有关，不同植物种类、同一物种内的不同基因型、同一物种的不同外植体以及外植体的不同发育阶段对转化效率影响很大，培养外植体可以提高遗传转化率达到合适的细胞发育状态。杜仲 *Eucommia ulmoides* 在预培养 5 d 时，GUS 瞬时转化效率最高^[23]，杜鹃 *Rhododendron simsii* 预培养 0 d 最为合适^[24]，番茄 *Solanum lycopersicum* 预培养 3 d 时遗传转化效率最高，而在之前的研究中，番茄大多预培养 2 d，但转化效率未高于预培养 0 d^[25-26]。在本研究中，尾巨桉 DH32-29 预培

养3 d时遗传转化效率最高。不同物种的研究结果不同,这可能是外植体发育状态不一致导致的,但稳定遗传转化效率的预培养处理时间为1~3 d,这与外植体最佳培养时间为1~4 d的结论相符合^[27]。对大麦 *Hordeum vulgare* 进行遗传转化时,培养1 d的转化率高于未培养的,1 d后转化率急剧下降^[28]。在杨树中,以叶片作为外植体进行转化时,其预培养3 d的遗传转化效率最高,而以茎段为外植体进行遗传转化时,预培养4 d的遗传转化效率最高^[21]。在以烟草叶片为外植体进行遗传转化时,预培养5 d的遗传转化效率最高^[21]。在流式细胞仪检测结果中,预培养5 d比3 d的S期细胞占比稍高,这可能是由于植物材料的影响。此外,流式细胞仪检测时,细胞孵育时间的长短均会在一定程度上影响研究结果。

本研究在构建的尾巨桉 DH32-29 遗传转化体系^[20]基础上进一步优化,但影响遗传转化效率的多种因素仍未被研究,通过探索更多的影响因素有望获得更高效与稳定的转化体系。后期需进一步优化尾巨桉 DH32-29 的遗传转化方式,从而加快尾巨桉 DH32-29转基因良种的培育过程。

4 结论

本研究优化了尾巨桉 DH32-29 的转化体系,通过 GUS 染色确定预培养 0~3 d 时的转化效率相对较高,流式细胞仪、EdU 染色以及 RT-qPCR 确定预培养 3 d 为最佳处理时间。利用优化后的体系,将 *G10-EPSPS* 基因成功转入桉树中,使遗传转化效率由不足 1.00% 提高至 4.67%。

5 参考文献

- [1] 王豁然. 桉树生物学概论[M]. 北京: 科学出版社, 2010. WANG Huoran. *A Chinese Appreciation of Eucalypts*[M]. Beijing: Science Press, 2010.
- [2] 黄六贴. 桉树主要病虫害及防治措施[J]. 现代农业科技, 2022(6): 80–81. HUANG Liutie. Main diseases and insect pests of *Eucalyptus* and their control measures[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2022(6): 80–81. DOI: 10.3969/j.issn.1007-5739.2022.06.025.
- [3] DAI Ying, HU Guojian, DUPAS A, et al. Implementing the CRISPR/Cas9 technology in *Eucalyptus* hairy roots using wood-related genes[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(10): 3408. DOI: 10.3390/ijms21103408.
- [4] FEUILLET C, LAUVERGEAT V, DESWARTE C, et al. Tissue- and cell-specific expression of a cinnamyl alcohol dehydrogenase promoter in transgenic poplar plants[J]. *Plant Molecular Biology*, 1995, 27(4): 651–667. DOI: 10.1007/bf00020220.
- [5] 陈健波, 项东云, 张建明, 等. 广西耐寒桉树育种研究现状与对策[J]. 广西林业科学, 2003, 32(1): 7–11. CHEN Jianbo, XIANG Dongyun, ZHANG Jianming, et al. The present status of studies on cold tolerant *Eucalyptus* selection in Guangxi, China[J]. *Guangxi Forestry Science*, 2003, 32(1): 7–11. DOI: 10.19692/j.cnki.gfs.2003.01.002.
- [6] 袁滔. 广西尾巨桉 DH 系列无性系育苗技术[J]. 南方农业, 2023, 17(15): 266–269. YUAN Tao. DH series clone seedling breeding technology of *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* in Guangxi Province[J]. *South China Agriculture*, 2023, 17(15): 266–269. DOI: 10.19415/j.cnki.1673-890x.2023.15.064.
- [7] ALIU E, LEE K, WANG Kan. CRISPR RNA-guided integrase enables high-efficiency targeted genome engineering in *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(10): 1916–1927. DOI: 10.1111/pbi.13872.
- [8] 徐成成, 刘锦, 吴恩, 等. 基于组织培养的木本植物器官发生型再生研究进展[J/OL]. 浙江农林大学学报, 2025-11-26. <https://link.cnki.net/urlid/33.1370.S.20251126.1125.002>. XU Chengcheng, LIU Jin, WU En, et al. Advances in organogenesis regeneration of woody plants based on tissue culture[J/OL]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2025-11-26. <https://link.cnki.net/urlid/33.1370.S.20251126.1125.002>.
- [9] WANG Haihai, WANG Cuiting, LIU Hua, et al. An efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration system for leaf explants of two elite aspen hybrid clones *Populus alba* × *P. berolinensis* and *Populus davidiana* × *P. bolleana*[J]. *Plant Cell Reports*, 2011, 30(11): 2037–2044. DOI: 10.1007/s00299-011-1111-1.
- [10] 唐靖雯, 王宁, 伍程程, 等. 白花玉石籽石榴遗传转化体系的建立[J]. 果树学报, 2024, 41(12): 2621–2633. TANG Jingwen, WANG Ning, WU Chengcheng, et al. Establishment of genetic transformation system for Baihuayushizi pomegranate[J]. *Journal of Fruit Science*, 2024, 41(12): 2621–2633. DOI: 10.13925/j.cnki.gsxb.20240326.
- [11] JACQ B, LESOBRE O, SANGWAN R, et al. Factors influencing T-DNA transfer in *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarbeet[J]. *Plant Cell Reports*, 1993, 12(11): 621–624. DOI: 10.1007/bf00232811.
- [12] WEN Shuangshuang, GE Xiaolan, WANG Rui, et al. An efficient *Agrobacterium*-mediated transformation method for

- hybrid poplar 84K (*Populus alba* × *P. glandulosa*) using calli as explants[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, **23**(4): 2216. DOI: [10.3390/ijms23042216](https://doi.org/10.3390/ijms23042216).
- [13] 甘珊珊, 王静毅, 程运江, 等. 香蕉遗传转化体系优化[J]. 热带农业科学, 2024, **44**(10): 17–24. GAN Shanshan, WANG Jingyi, CHENG Yunjiang, *et al.* Optimization of the banana genetic transformation system[J]. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 2024, **44**(10): 17–24.
- [14] HAN Xue, MA Shurong, KONG Xianghui, *et al.* Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of hybrid poplar *Populus davidiana* Dode × *Populus bollena* Lauche[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, **14**(2): 2515–2528. DOI: [10.3390/ijms14022515](https://doi.org/10.3390/ijms14022515).
- [15] XIA Yufei, CAO Yuan, REN Yongyu, *et al.* Effect of a suitable treatment period on the genetic transformation efficiency of the plant leaf disc method[J]. *Plant Methods*, 2023, **19**: 15. DOI: [10.1186/s13007-023-00994-3](https://doi.org/10.1186/s13007-023-00994-3).
- [16] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402–408. DOI: [10.1006/meth.2001.1262](https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262).
- [17] DEININGER P. Gus protocols: using the gus gene as a reporter of gene expression[J]. *Analytical Biochemistry*, 1992, **207**(2): 356. DOI: [10.1016/0003-2697\(92\)90027-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90027-5).
- [18] 薛薇. 基于 SPSS 的数据分析[M]. 北京: 中国人民大学出版社, 2006. XUE Wei. *Data Analysis based on SPSS*[M]. Beijing: China Renmin University Press, 2006.
- [19] CAVANAGH B L, WALKER T, NORAZIT A, *et al.* Thymidine analogues for tracking DNA synthesis[J]. *Molecules*, 2011, **16**(9): 7980–7993. DOI: [10.3390/molecules16097980](https://doi.org/10.3390/molecules16097980).
- [20] WANG Xiaoping, CHEN Shanshan, ZHANG Haonan, *et al.* *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the most widely cultivated superior clone *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* DH32-29 in southern China[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, **13**: 1011245. DOI: [10.3389/fpls.2022.1011245](https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1011245).
- [21] 陈珊珊. 尾巨桉 DH32-29 不定芽再生机制及遗传转化体系优化的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2023. CHEN Shanshan. *Study on the Mechanism of in vitro Shoot Regeneration and Optimization of Genetic Transformation System in Eucalyptus grandis* × *E. urophylla*[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2023. DOI: [10.27009/d.cnki.gdblu.2023.001039](https://doi.org/10.27009/d.cnki.gdblu.2023.001039).
- [22] 陈梅, 陈露倩, 陈思, 等. 农杆菌介导的黄瓜遗传转化体系优化研究[J]. 四川农业大学学报, 2024, **42**(3): 540–545, 571. CHEN Mei, CHEN Luqian, CHEN Si, *et al.* Optimization of the genetic transformation system of cucumber mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2024, **42**(3): 540–545, 571. DOI: [10.16036/j.issn.1000-2650.202310365](https://doi.org/10.16036/j.issn.1000-2650.202310365).
- [23] 刘闵豪, 徐郡偏, 叶靖, 等. 农杆菌介导的杜仲叶片愈伤组织遗传转化体系[J]. 林业科学, 2020, **56**(2): 79–88. LIU Minhao, XU Junlei, YE Jing, *et al.* *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of leaf callus in *Eucommia ulmoides*[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2020, **56**(2): 79–88. DOI: [10.11707/j.1001-7488.20200209](https://doi.org/10.11707/j.1001-7488.20200209).
- [24] LONG Fenfang, ZUO Weiwei, LI Huie, *et al.* Genetic transformation of *Rhododendron delavayi* for anthocyanin synthesis using *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2024, **157**(2): 47. DOI: [10.1007/s11240-024-02775-9](https://doi.org/10.1007/s11240-024-02775-9).
- [25] 邱实, 张文举, 许馥慧, 等. Micro-Tom 番茄转基因植株再生体系的优化[J]. 上海大学学报(自然科学版), 2018, **24**(2): 322–330. QIU Shi, ZHANG Wenju, XU Fuhui, *et al.* System optimization for tomato Micro-Tom transgenic regeneration[J]. *Journal of Shanghai University (Natural Science Edition)*, 2018, **24**(2): 322–330. DOI: [10.12066/j.issn.1007-2861.1773](https://doi.org/10.12066/j.issn.1007-2861.1773).
- [26] 张杨, 诸燕, 韩之刚, 等. 过表达紫花苜蓿 *ChOMT* 基因创制高异黄酮营养强化番茄[J]. 浙江农林大学学报, 2026, **43**(2): 303–309. ZHANG Yang, ZHU Yan, HAN Zhigang, *et al.* Overexpression of *Medicago sativa* *ChOMT* gene in constructing homoisoflavone-enriched tomatoes[J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2026, **43**(2): 303–309. DOI: [10.11833/j.issn.2095-0756.20250186](https://doi.org/10.11833/j.issn.2095-0756.20250186).
- [27] HUSAINI A M. Pre- and post-agroinfection strategies for efficient leaf disk transformation and regeneration of transgenic strawberry plants[J]. *Plant Cell Reports*, 2010, **29**(1): 97–110. DOI: [10.1007/s00299-009-0801-4](https://doi.org/10.1007/s00299-009-0801-4).
- [28] ISMAGUL A, MAZONKA I, CALLEGARI C, *et al.* *Agrobacterium*-mediated transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.)[M]//FLEURY D, WHITFORD R. *Crop Breeding. Methods in Molecular Biology*, vol 1145. New York: Humana Press, 2014: 203–211. DOI:[10.1007/978-1-4939-0446-4_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0446-4_16).