

紫花白及遗传转化体系的建立

姜金星, 于广源, 刘文旭, 黄红梅, 李芳, 刘木兰, 覃静萍*

(湖南农业大学生物科学技术学院,长沙, 410128)

摘要 以紫花白及 [*Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.] 的根、块茎、叶、芽及种子为外植体, 在多次继代选择的条件下, 探究对胚性愈伤组织的最佳诱导条件并建立遗传转化体系。试验对紫花白及不同器官的愈伤组织诱导效率进行了研究, 旨在确定最适快繁外植体及最佳的植物生长调节剂浓度, 以促进愈伤组织的形成和再生。这一认识对于白及遗传转化相关工作的开展至关重要。紫花白及块茎在 MS+0.5 mg/L 6-BA+2 mg/L 2,4-D 条件下愈伤组织诱导效果最佳, 诱导率为 86.1%, 但块茎诱导愈伤组织形成周期较长, 相较块茎, 用紫花白及种子直接诱导获得愈伤组织更为便捷, 诱导效果与块茎无显著差异, 且愈伤组织诱导速度快, 结构致密, 质地较软, 呈白绿色。以种子为外植体, 紫花白及愈伤组织增殖的最佳培养基为 MS+1.5 mg/L 2,4-D, 愈伤致密、干燥、团块状, 且颜色鲜黄绿, 增殖后直径平均 12.267 mm, 褐化率相对较低, 约 19.4%; 不定芽分化的最佳培养基为 MS+0.1 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA, 分化率高达 91.7%, 且诱导不定芽数量大, 褐化率为 8.3%; 最适生根的培养基配方为 MS + 11 g/L 琼脂粉 + 0.3 mg/L NAA, 能有效提高生根率至 66.7%。基于以上紫花白及再生体系, 本研究使用农杆菌侵染法对白及多糖合成关键酶基因 *BsPMM*(磷酸甘露糖变位酶基因)及 *BsPGM*(葡萄糖磷酸变位酶基因)进行过表达, 成功获得阳性紫花白及幼苗, *BsPMM* 转化成功率约为 14.6%, *BsPGM* 转化成功率约为 8.3%。研究成功建立了紫花白及遗传转化体系, 包括外植体选择、愈伤组织诱导、农杆菌介导的遗传转化以及再生植株的获得和鉴定等环节。通过对各环节的优化, 提高了愈伤组织的诱导效率和分化质量。该遗传转化体系为开展白及多糖等活性物质的生物合成、白及遗传改良等研究提供了技术支撑。后续研究可进一步完善该技术体系, 拓展其在白及基因工程应用领域的潜力。

关键词 紫花白及; 白及多糖; 愈伤组织; 遗传转化

白及(*Bletilla striata*), 又称白芨、白给、朱兰等, 是一种应用广泛的贵重中草药, 为多年生地生兰科白及属植物, 主要分布于云南、贵州、四川和陕西等地(ZUO et al., 2017), 紫花白及是该属中的一个主要栽培品种。目前, 紫花白及的繁殖方式包括块茎繁殖、种子繁殖和组培快繁, 块茎繁殖依赖野生资源, 繁殖系数小, 且对栽培环境要求严格(ZHANG et al., 2020); 种子自然繁殖存在萌发率低(WANG et al., 2018)、幼苗生长缓慢、果荚难以长期保存等问题。植物组织培养是一种高效、稳定的植物繁殖方法, 已广泛应用于资源植物的快速繁殖(LI et al., 2025), 但紫花白及的组培技术尚不成熟, 现有报道多用白及种子做外植体(WU et al., 2022)且种子诱导愈伤组织分化率为 36.50%(CHEN et al., 2022), 材料单一、成苗率低等问题限制了紫花白及的规模化利用。

白及多糖(BSP)是紫花白及中一类重要的生物活性成分, 多存在于紫花白及块茎中, 其化学组成是葡甘露聚糖, 包括 D-葡萄糖和 D-甘露糖(LIANG et al., 2025), 是一种高分子、粘稠的化合物, 具有收敛止血、消肿生肌等多种功效, 广泛应用于医药、化妆品、食品等方面(ZHAO et al., 2024)。研究发现 *BsPMM* 和 *BsPGM* 是调控 BSP 合成代谢途径中的关键基因(XU et al., 2019), 在其他植物中, 过表达 *PMM* 基因可使桑黄多糖产量提高 46.8%、GDP-甘露糖前体含量增加, 证实该基因是调控多糖合成的关键基因(LI et al., 2025); *PGM* 基因编码糖代谢途径中的关键限速酶, 通过调控葡萄糖磷酸变位酶活性影响糖核苷酸前体供应, 显著提高茶树菇多糖的产量和合成效率(HOU et al., 2024)。目前, 在白及中对这两个基因的研究较为有限。

因此, 针对当前白及组培过程中存在的外植体单一、组培技术体系不完善, 以及由此导致的芽数少、移栽成活率低等技术瓶颈, 本研究以张家界紫花白及为材料, 开展种苗繁

育关键技术研究, 建立完整且高效的组培再生体系, 并将克隆到的 BsPMM 和 BsPGM 基因分别转入愈伤组织, 建立紫花 BSP 合成相关基因的遗传转化技术, 探索紫花白及种质改良与创新的途径和方法。

1 材料与方法

1.1 植物材料

试验用紫花白及采自湖南省张家界慈利县, 于 2024 年 9 月底挑选大小均一、无机械损伤及任何病虫害、成熟但未开裂的紫花白及蒴果。

1.2 主要试剂与设备

1.2.1 主要试剂

MS 基础培养基、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、1-萘乙酸(NAA)、6-苯甲基腺嘌呤(6-BA)、酒精、升汞, 以上试剂均为分析纯。

1.2.2 主要仪器设备

超净工作台(上海沪净医疗器械有限公司)、人工气候培养箱(上海川昱实验仪器有限公司)、立式压力蒸汽灭菌器(致微(厦门)仪器有限公司)、电子天平(岛津企业管理(中国)有限公司)、DYY-7C 型电泳仪(北京市六一仪器厂)、FR-1000 全功能生物电泳图像分析系统(上海复日科技有限公司)、9.0 cm 一次性培养皿(广州洁特生物过滤股份有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 愈伤组织诱导与最佳外植体筛选

(1)紫花白及无菌种子苗的获得

将采摘的紫花白及蒴果用 75%纯度的酒精消毒 5 min, 放入 1 g/L HgCl₂ 的溶液再消毒 15 min, 在超净工作台上用无菌水清洗 3 - 4 次(LU et al., 2022)后, 剥开果皮将种子均匀铺种在 MS 基本培养基上, 置于温度 25℃, 光周期为 14 小时光照/10 小时黑暗的条件下进行培养。

(2)外植体筛选与愈伤组织诱导

为筛选最适外植体类型及愈伤组织诱导配方(ZENG et al., 2024), 以前期获得的紫花白及无菌种子苗为材料, 分别切取其根、茎、叶、芽接种于不同植物生长调节剂(Plant growth regulator, PGR)配比的愈伤组织诱导培养基(1 mg/L 6-BA+2 mg/L 2,4-D、0.5 mg/L 6-BA+2 mg/L 2,4-D、0.2 mg/L 6-BA+1 mg/L 2,4-D)中进行培养(LI et al., 2005)(HOU et al., 2024), 测定各组的平均诱导愈伤率, 筛选最优 PGR 浓度及最适外植体。

1.3.2 愈伤组织的增殖培养

根据紫花白及愈伤组织诱导试验的结果, 以 MS 为基本培养基, 分别添加不同浓度的 2,4-D(0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.5 mg/L)(ZHOU et al., 2018), 设计愈伤组织增殖培养基。选择大小均匀的愈伤组织接入增殖培养基中, 试验采用三重复完全随机区组设计, 每组 12 个接种点, 观察记录愈伤组织生长状态, 待试验组间出现显著差异时终止培养。统计试验所需时间, 并从中随机挑选三个接种愈伤, 测量其形态直径, 记录生长状况, 筛选出紫花白及最佳愈伤组织增殖的 PGR 浓度。

1.3.3 愈伤组织的分化及生根壮苗

根据紫花白及愈伤组织的增殖效果, 设计并优化愈伤组织分化及生根培养基(Huda E et al., 2022)。以 MS 为基本培养基, 分别添加不同浓度的 6-BA(0、0.1、0.2、0.3 mg/L)及 NAA(0、0.1、0.2、0.3 mg/L)用于分化培养, 并选择大小均匀的愈伤组织接入分化培养基中, 每瓶 12 个接种点, 共三瓶。在培养过程中, 每 7 天进行一次观察, 记录出芽情况, 并计算分化率和褐化率。

鉴于 IAA 存在易降解、作用时间短及成本较高的问题, 本研究同时以 NAA 为焦点, 并增加培养基硬度以促进生根。在 MS 基础培养基中, 通过调整琼脂粉添加量使培养基中总琼脂浓度达到 11 g/L, 为根系生长提供稳定的物理支持(HE et al., 2022)。再加入不同浓度 NAA(0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/L)(ZHAO et al., 2024), 以优化生根培养条件。每 7 天进行一次观察, 记录诱导生根数量, 并计算生根率。

1.3.4 遗传转化体系的构建

(1)紫花白及愈伤组织草铵膦抗性筛选

在紫花白及愈伤组织增殖培养基中，添加 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mg/L 草铵膦(PPT)作为处理组(FENG et al., 2014)，每组接种 12 颗大小形态较均一的紫花白及愈伤组织，每组三次重复，待试验组间出现显著差异时终止培养，统计不同浓度 PPT 下紫花白及愈伤组织的存活率。

(2)农杆菌介导目的基因导入紫花白及愈伤组织

将携带 *BsPMM*、*BsPGM* 基因及荧光标记基因 GFP 的 GV3101 农杆菌侵染紫花白及愈伤组织。在农杆菌 OD600 值为 0.6 时，侵染愈伤组织 20 分钟，转至共培养基上，2 天后，用加入 400 mg/L Timentin 的灭菌水对愈伤进行清洗，将清洗后的愈伤组织稍待风干至表面干燥(WANG et al., 2024)，转移至筛选培养基上进行培养，每个处理接种 12 块愈伤外植体，3 组重复，每 1 周继代 1 次(LI et al., 2022)，保证筛选压的稳定，直至筛选培养基上长出新的愈伤组织。

(3)转化愈伤组织的鉴定

由 1.3.4(2)得到具 PPT 抗性愈伤组织，随机挑选新生愈伤组织做 PCR 鉴定，确保愈伤组织成功转化。

(4)抗性愈伤组织的筛选再生

将转化成功的抗性愈伤组织转移到分化培养基上进行诱导。培养条件为温度 25 °C，光周期为 14 小时光照/10 小时黑暗，待长出新的幼芽后转入生根培养基中，并加入适量浓度的 PPT 筛选培养约 60 天后进行 PCR 检测。将生长状态良好的紫花白及转化苗使用天根生化科技公司的植物基因组 DNA 试剂盒提取总 DNA，根据过表达载体中插入目的基因片段位点的上下游序列设计引物进行 PCR 扩增，以验证目标基因是否成功转入，同时排除紫花白及野生型中内源基因 *BsPMM* 和 *BsPGM* 的干扰。扩增体系为: PCR Mix 10 μL、DNA 1 μL、上游和下游引物各 0.5 μL、dd H₂O 8 μL。PCR 扩增条件如下: 预变性 95 °C 5 分钟; 变性 94 °C 30 秒，退火 58 °C 30 秒，延伸 72 °C 40 秒，循环数为 35; 72 °C 10 分钟，4 °C 保存。反应结束后，采用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 DNA 样品进行检测，通过紫外凝胶成像系统观察并记录电泳结果。若扩增出预期条带(*BsPMM* 片段大小约 950 bp、*BsPGM* 约 2000 bp)，则鉴定该转化苗为阳性转化苗。最终，基于鉴定结果统计 *BsPMM* 与 *BsPGM* 的遗传转化效率。

遗传转化效率=(阳性转基因植株数目/抗性愈伤筛选起始的接种数目)×100%

(5)农杆菌污染鉴定

为明确分化培养基中分化苗周围出现的疑似农杆菌污染是否源于试验所用工程菌，需对该菌落进行准确鉴定。鉴定采用 PCR 方法，扩增体系同 1.3.4(4)，根据目的基因序列设计引物并进行 PCR 扩增，并通过凝胶成像系统观察条带结果。若扩增出预期条带(分别约 750 bp 和 1800 bp)，则可判定确为含有目的基因 *BsPMM* 或 *BsPGM* 的农杆菌。

1.3.5 数据分析

用 Excel 软件进行数据整理，用 IBM SPSS Stastics 26 软件进行单因素方差分析(ANOVA)，Duncan 多重分析法进行显著性分析。

2 结果

2.1 紫花白及无菌种子苗的获得

根据 1.3.1(1)的方法，经过约 120 天的培养后，获得紫花白及无菌种子苗，如图 1 所示。

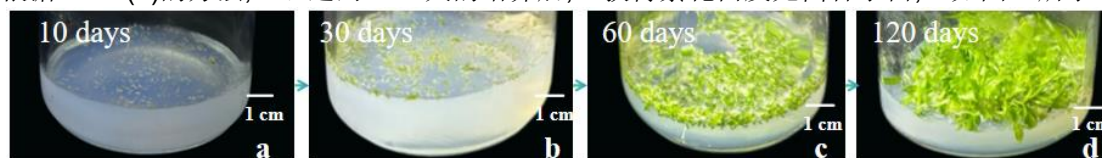


图 1 紫花白及无菌种子苗的生长进程

a ~ d 依次表示不同培养时间紫花白及无菌种子苗的生长发育情况。Bars=1 cm

Fig 1 Growth process of *Bletilla striata* sterile seedlings

a ~ d represent the growth and development of sterile seedlings of *Bletilla striata* at different culture time. Bars = 1 cm

由图 1 可以看出，随着培养时间的延长，紫花白及无菌种子苗的叶片逐渐展开，根系也变得发达。a 阶段种子苗刚萌发，b 阶段叶片初步形成，c 阶段叶片明显增大，d 阶段植株

整体生长旺盛，表明培养条件适宜，生长态势良好。

2.2 植物生长调节剂浓度对紫花白及不同外植体愈伤组织诱导率的影响

选取紫花白及不同器官(根、块茎、叶、芽)置于不同诱导培养基，经 20 - 30 天后即表现出器官间的差异。通过对比紫花白及根、块茎、叶、芽愈伤组织诱导过程中的污染、褐化、出愈等情况，发现块茎的愈伤组织诱导情况最佳，且 2.0 mg/L 2,4-D 下愈伤组织诱导率达到 77.8%(表 1)。

表 1 不同器官在不同 2,4-D 浓度下的愈伤组织诱导率 (%)

Table 1 Callus induction rates (%) from different explants under various 2,4-D concentrations

Organ	2,4-Dichlorophe oxyacetic (mg/L)					
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.5
Root	19.4±12.7 ^{cd}	36.1±4.8 ^{abc}	50±8.3 ^a	41.7±8.3 ^{ab}	22.2±17.3 ^{bd}	13.9±9.6 ^{cd}
Tuber	36.1±21 ^{bc}	61.1±12.7 ^{ab}	75±22 ^a	77.8±12.7 ^a	61.1±17.3 ^{ab}	22.2±9.6 ^c
Leaf	2.8±4.8 ^a	5.6±4.8 ^a	8.3±8.3 ^a	5.6±9.6 ^a	2.8±4.8 ^a	2.8±4.8 ^a
Bud	22.2±4.8 ^c	41.7±22 ^{ab}	38.9±4.8 ^a	36.1±12.7 ^a	13.9±4.8 ^a	22.2±4.8 ^{bc}

小写字母代表 $p < 0.05$ ，数值代表平均值±标准差，下同。

为系统优化紫花白及块茎愈伤组织的诱导条件，本研究在上述基础上试验了不同浓度配比的 6-BA 与 2,4-D 对其诱导效率的影响。结果显示，经过 30 天的培养，在 I 组处理中，0.5 mg/L 6-BA 与 2.0 mg/L 2,4-D 的组合表现最佳，愈伤组织诱导率由原来的 77.8% 进一步提升到 86.1%(表 2)。II 组处理的诱导效果与 I 组较为接近，差异不显著。III 组处理在加入 6-BA 的同时降低了 2,4-D 浓度，结果是诱导效率显著下降。综合诱导率及形态学表现，本研究确定 I 组为紫花白及块茎愈伤组织诱导的最适生长调节剂浓度组合。

表 2 不同植物生长调节剂浓度下对块茎的愈伤组织诱导率

Table 2 Callus induction rate of tubers under different plant growth regulator concentrations

No. of medium	6-Benzylamin purine (mg/L)	2,4-Dichlorophe oxyacetic (mg/L)	Callus induction(%)
I	0.5	2.0	86.1 ± 4.8 ^a
II	1.0	2.0	75.0 ± 8.3 ^a
III	0.2	1.0	44.4 ± 1.27 ^b

虽然上述结果表明紫花白及块茎的愈伤诱导情况最好，但依然存在块茎诱导愈伤组织形成周期较长的问题。鉴于此，将上述最适诱导愈伤培养基配方用于直接诱导种子(Alexander Betekhtin et al., 2018)，来比较块茎和种子形成愈伤组织的优劣(图 2)。综合评估培养周期及操作效率，种子在诱导培养基中培养 30 天后，出愈情况相较于块茎诱导方式更好，不仅单位面积内产量高且诱导周期大大减少。基于这些优势，本研究选择紫花白及种子诱导的愈伤组织作为后续实验的标准材料。

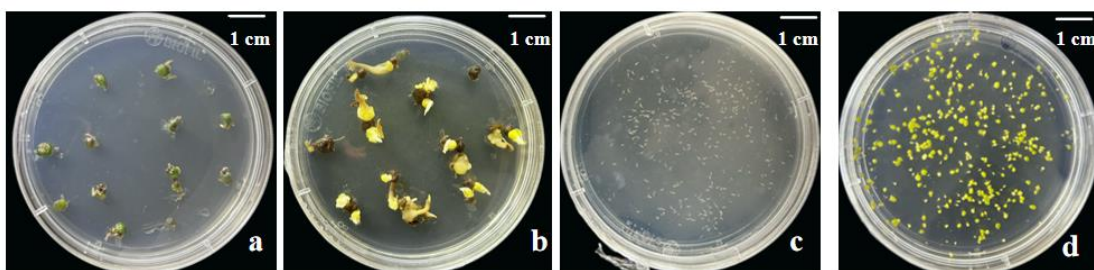


图2 紫花白及愈伤组织诱导情况

(a) 块茎外植体培养初期(接种时); (b) 块茎外植体培养30天后; (c) 种子外植体培养初期(接种时); (d) 种子外植体培养30天后。Bars=1 cm

Figure 2 Callus induction from different explants

(a) Early stage of tuber explants culture (inoculation); (b) Tuber explants were cultured for 30 days ; (c) Early stage of seed explants culture (inoculation); (d) Seed explants were cultured for 30 days. Bars=1 cm

2.3 2,4-D 浓度梯度对愈伤组织增殖的影响

愈伤增殖效率是遗传转化效果的重要影响因素。通过在 MS 基础培养基中加入不同浓度的 2,4-D, 培养 30 天左右观察(图 3)。紫花白及愈伤组织增殖的较优培养基为 MS+1.5 mg/L 2,4-D, 得到的愈伤组织直径约 12.267 cm, 致密、干燥, 呈团块状, 且褐化率较低(表 3)。2,4-D 浓度为 1.0 mg/L 时褐化率显著升高, 可能是由于该浓度触发了细胞的氧化应激反应(Mesnage et al., 2021), 导致酚类物质氧化和细胞损伤。随后在 1.5 - 2.0 mg/L 范围内褐化率降低, 可能与细胞适应性增强、抗氧化系统激活有关(da Silva et al., 2024)。而 2.5 mg/L 时褐化率再次上升, 可能是高浓度 2,4-D 的毒性效应导致细胞膜透性增加和程序性死亡加剧(Diao. 2025)。这种双峰变化趋势反映了 2,4-D 对植物细胞的剂量依赖性效应, 低浓度可能诱导应激反应, 中等浓度激活保护机制, 而高浓度则直接造成细胞损伤。综上所述, MS+1.5 mg/L 2,4-D 是紫花白及胚性愈伤组织增殖的最佳培养基。

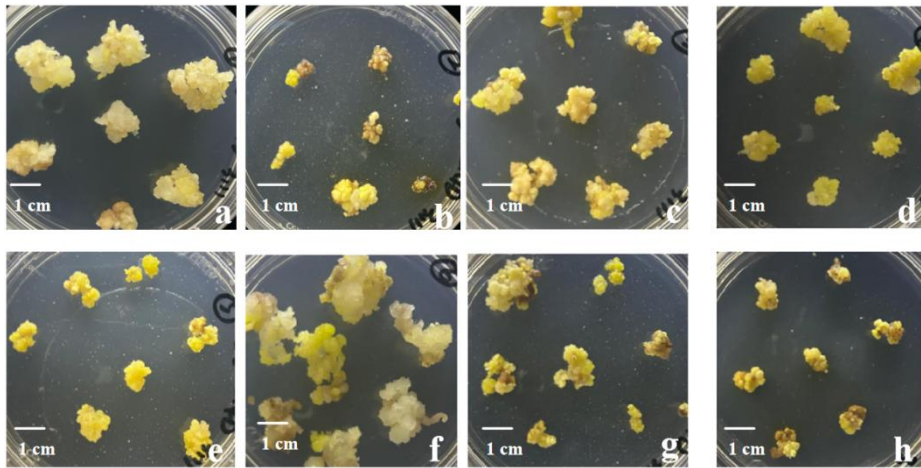


图3 紫花白及愈伤组织增殖生长情况

图 a - h 依次为 0 - 3.5 mg/L 2,4-D 浓度下愈伤组织生长情况。Bars = 1 cm

Figure 3 Proliferative growth of *Blitilla striata* callus under different treatments

Callus growth under different 2,4 - D concentrations (0 - 3.5 mg/L) is shown in Figs. a - h. Bars=1 cm

表3 紫花白及愈伤组织增殖统计

Table 3 Statistical results of *Blitilla striata* callus proliferation

Group	Callus growth status				
	2,4-Dichlorophe oxyacetic(mg/L)	Color	Texture	Diameter(mm)	Browning rate(%)
a	0.0	White green	Soft, moist, water-soaked	18.067 ± 1.861 ^a	19.4 ± 4.8 ^{bc}
b	0.5	Yellow-green	Dense, dry,	9.233 ± 2.413 ^{cde}	36.1 ± 17.3 ^{bc}

		partial	lumpy		
		browning			
		Yellow-green			
c	1.0	partial	Soft, moist, water-soaked	13.133 ± 1.106^{bc}	69.4 ± 12.7^a
		browning			
d	1.5	Fresh yellow green	Dense, dry, lumpy	12.267 ± 2.75^{bcd}	19.4 ± 9.6^{bc}
e	2.0	Light yellowish green	Dense, dry, granular	6.367 ± 1.358^e	13.9 ± 0.127^c
f	2.5	yellow green	Soft, moist, water-soaked	15.633 ± 2.043^{ab}	69.4 ± 21.0^a
		Yellow-green			
g	3.0	partial	Dense, moist, granular	7.933 ± 3.707^{de}	72.2 ± 21.0^a
		browning			
		Yellow-green			
h	3.5	partial	Dense, dry, granular	8.5 ± 1.758^{de}	47.2 ± 21.0^{ab}
		browning			

2.4 植物生长调节剂浓度对愈伤组织分化及生根壮苗的影响

将愈伤组织转入不同植物生长调节剂浓度分化培养基中(表 4), 在 0.1 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 条件下, 紫花白及愈伤组织分化出芽率约为 91.7%, 且褐化率只有 8.3%, 将该浓度作为愈伤组织最适分化浓度。分化培养至 60 天后, 芽的生长状况良好, 但生根缓慢(图 4)。

表 4 紫花白及愈伤组织分化统计

Table 4 Statistical analysis of *Bletilla striata* callus differentiation

Group	Growth status			
	6-BA	NAA	Germination(%)	Browning rate(%)
	(mg/L)	(mg/L)		
1	0	0	33.3 ± 0.0^{ef}	33.3 ± 0.0^{bc}
2	0.1	0.1	91.7 ± 8.3^a	8.3 ± 0.0^e
3	0.1	0.2	75.0 ± 16.7^{bc}	8.3 ± 0.0^e
4	0.1	0.3	58.3 ± 8.3^{cd}	25.0 ± 8.3^{cd}

5	0.2	0.1	83.3±0.0 ^{ab}	16.7±0.0 ^{de}
6	0.2	0.2	50.0±8.3 ^{de}	33.3±8.3 ^{bc}
7	0.2	0.3	33.3±8.3 ^{ef}	50.0±8.3 ^a
8	0.3	0.1	66.7±8.3 ^{bcd}	16.7±8.3 ^{de}
9	0.3	0.2	50.0±8.3 ^{de}	33.3±8.3 ^{bc}
10	0.3	0.3	16.7±8.3 ^f	41.7±8.3 ^{ab}

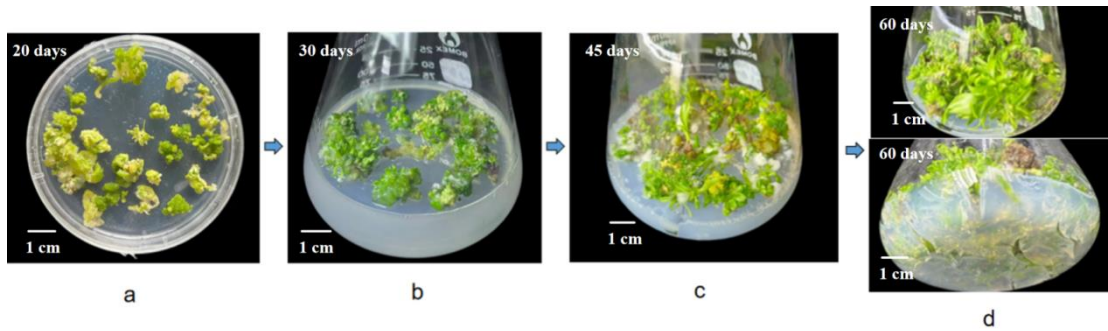


图 4 紫花白及愈伤组织分化

a - d 表示分化不同时间的愈伤组织: (a) 分化 20 天; (b) 分化 30 天; (c) 分化 45 天; (d) 分化 60 天。Bars=1 cm

Figure 4 Differentiation of *Bletilla striata* callus.

Temporal progression of callus differentiation: (a) 20 days; (b) 30 days; (c) 45 days; (d) 60 days. Bars=1 cm

为优化紫花白及分化培养中生根慢的问题, 前期试验以 MS 为基础培养基, 设置了不同浓度的 IAA 和 NAA 组合进行生根培养。结果发现在 1.5 mg/L IAA + 0.1 mg/L NAA 条件下, 经约 60 天培养, 生根率最高也只有 47.2%, 褐化率达 33.3%。在改为增加培养基中琼脂粉的含量并辅以 NAA 诱导的方案后(表 5), 添加琼脂粉的试验组生根率较前期试验显著提高, 在 NAA 浓度为 0.4 mg/L 时, 生根率达到 66.7%, 表明通过调整培养基硬度并优选 NAA 浓度, 可有效提升紫花白及组培苗的生根效率。

表 5 不同植物生长调节剂下紫花白及愈伤组织生根结果

Table 5 Statistical analysis of rhizogenesis in *Bletilla striata* callus under different phytoplant growth regulator treatments

Group	Growth status		
	Add agarose concentration(mg/L)	NAA(mg/L)	Rootability(%)
1	11.0	0.0	52.8±9.6 ^{ab}
2	11.0	0.1	27.8±9.6 ^c
3	11.0	0.2	36.1±12.7 ^{bc}
4	11.0	0.3	41.7±22.0 ^{bc}
5	11.0	0.4	66.7±8.3 ^a
6	11.0	0.5	36.1±4.8 ^{bc}

2.5 紫花白及再生体系在遗传转化中的应用

2.5.1 PPT 浓度对紫花白及抗性愈伤组织筛选的影响

愈伤组织的成活率随着各筛选培养基中 PPT 浓度升高而降低(表 6), 当 PPT 浓度为 1.0 mg/L 时, 紫花白及愈伤组织存活率为 61.1%。因此, 本试验选择 1.0 mg/L 的 PPT 浓度作为愈伤组织诱导阶段中的筛选压, 在保持一定愈伤组织存活率的情况下筛选阳性样本。

表 6 不同 PPT 浓度下紫花白及愈伤组织成活率

Table 6 Survival rates of *Bletilla striata* callus under different PPT concentrations

Group	Growth status	
	PPT(mg/L)	Survival rate(%)
1	0.0	91.7±8.3 ^a
2	0.5	77.8±12.7 ^{ab}
3	1.0	61.1±9.6 ^b
4	1.5	33.3±8.3 ^c
5	2.0	16.7±8.3 ^{cd}
6	2.5	25.0±8.3 ^c
7	3.0	5.6±48.1 ^d
8	3.5	27.8±48.1 ^d

2.5.2 愈伤组织共培养体系的建立与筛选

农杆菌介导法插入的外源基因大多数是单拷贝, 遗传稳定性好, 且所需的仪器设备简单, 操作易行, 成本低(LI et al., 2024)。经农杆菌介导法转化的愈伤组织在含 PPT 的筛选培养基上培养 14 天后, 可观察到明显的再生现象, 新生的愈伤组织呈淡黄色颗粒状, 质地致密, 细胞分裂活跃, 保持了良好的分化潜能(如图 5 a - b)。相比之下, 未转化对照组愈伤组织在筛选培养中出现明显的生长抑制现象, 表现为组织边缘失水皱缩, 细胞间隙增大, 未转化组织完全褐化, 细胞结构解体, 出现典型的程序性死亡特征(如图 5 c - d)。

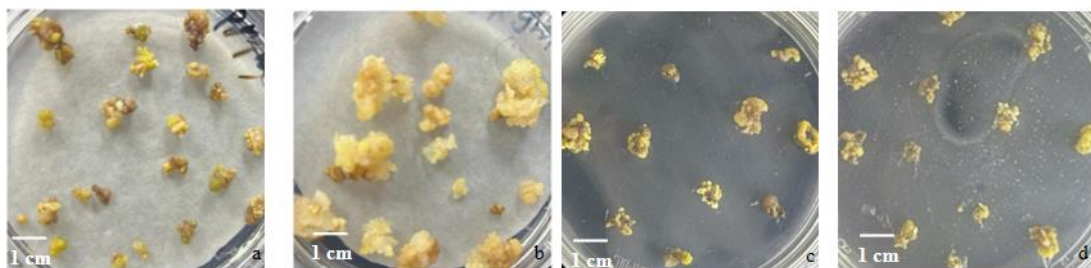


图 5 紫花白及愈伤组织侵染

(a)过表达 *BsPMM*(共培养); (b)过表达 *BsPGM*(共培养);
(c)过表达 *BsPMM*(抗性筛选); (d)过表达 *BsPGM*(抗性筛选)

Figure 5 Agrobacterium-mediated transformation of *Bletilla striata* callus

(a) Overexpression of *BsPMM* (co-culture) ; (b) Overexpression of *BsPGM* (co-culture) ;
(c) Overexpression of *BsPMM* (resistance screening) ; (d) : Overexpression of *BsPGM* (resistance screening)

2.5.3 阳性愈伤组织的分化生根及鉴定

将抗性筛选后新生出的愈伤组织移入分化培养基中, 20 天左右开始分化, 约 2 个月后再生苗长至高 1 cm, 叶片数为 2 - 3 片, 此时转移至生根培养基, 1 - 2 个月后抗性苗完成生根(见图 6)。

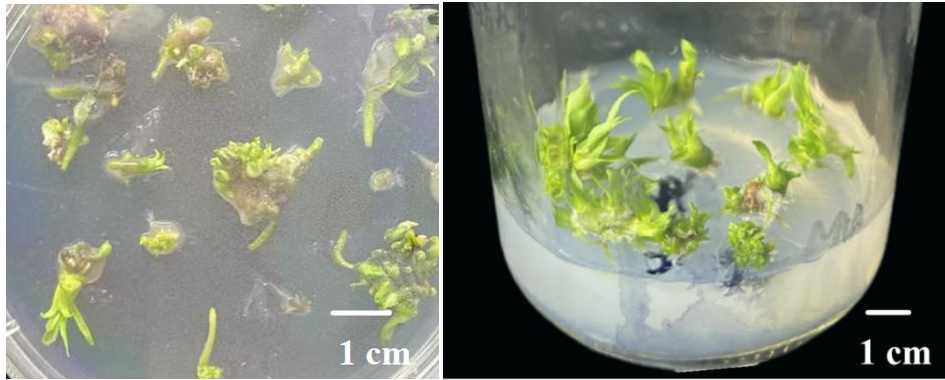


图 6 左：侵染后分化的紫花白及组培苗；右：分化后生根的紫花白及组培苗

Figure 6 Left: Differentiated tissue culture plantlets of *Bletilla striata* after infection; Right: *In vitro*-rooted plantlets of *Bletilla striata* at the post-differentiation stage.

通过 PCR 鉴定阳性苗(部分结果见图 7)，试验结果表明，经农杆菌 GV3101 介导的 *BsPMM* 遗传转化后，从 48 个受侵染的愈伤组织中最终获得 7 株紫花白及阳性幼苗，转化成功率约为 14.6%；而经农杆菌 GV3101 介导的 *BsPGM* 遗传转化后，从 48 个受侵染的愈伤组织中获得 4 株阳性幼苗，转化成功率约为 8.3%。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

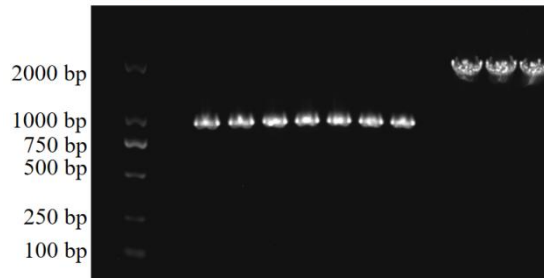


图 7 分化苗的琼脂糖凝胶电泳检测

泳道 1、9: 未转化的紫花白及组培苗，泳道 2 - 8: *BsPMM* 转化苗，泳道 10 - 12: *BsPGM* 转化苗

Figure 7 Agarose gel electrophoresis analysis of the complex

Lanes 1, 9: Wild - type; Lanes 2 - 8: *BsPMM* - transformed; Lanes 10 - 12: *BsPGM* - transformed

2.5.4 农杆菌污染鉴定

在农杆菌鉴定试验中，对分化苗周围疑似污染菌液进行了 PCR 检测。电泳结果显示，在预期条带大小处出现清晰的特异性扩增条带，与所用工程农杆菌携带 *BsPMM*、*BsPGM* 基因片段大小一致(如图 8)。该结果表明，污染源确为本试验所使用的携带目的基因的农杆菌菌株，而非其他环境微生物。

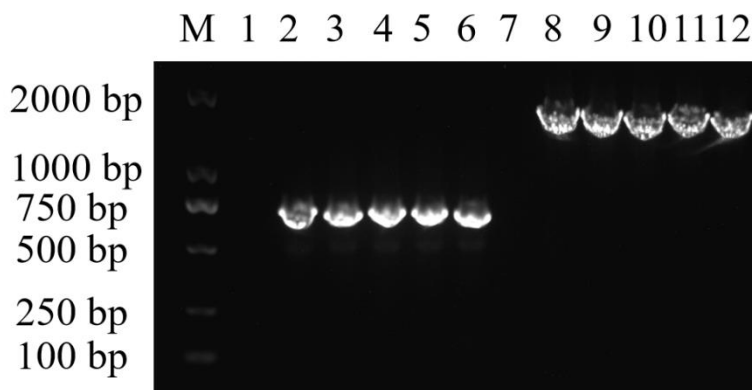


图 8 农杆菌污染鉴定的琼脂糖凝胶电泳检测

泳道 1、7: GFP 转化平板上挑取菌落的 PCR 扩增产物的空白对照；泳道 2 - 6: *BsPMM* 转化平板上挑取菌落的 PCR 扩增产物；泳道 8 - 12: *BsPGM* 转化平板上挑取菌落的 PCR 扩增产物

Figure 8 Agarose gel electrophoresis detection for identification of Agrobacterium contamination

Lane 1, 7: Negative control (PCR amplicons from colonies selected from the GFP transformation plate); Lanes 2 - 6: PCR amplicons from colonies selected from the *BsPMM* transformation plate;

3 讨论

利用组织快繁技术加速紫花白及的繁殖有利于这一植物资源的规模化利用, 本研究建立了紫花白及离体再生体系, 在以下方面进行了优化: (1)比较了紫花白及不同器官愈伤组织的诱导效率, 结果是种子>块茎>根>芽>叶片, 其中种子诱导在时间及数量方面显著优于其他组。尽管块茎的诱导效率低于种子, 但其作为稳定的外植体来源, 仍具有试验应用价值。(2)探究了 2,4-D 浓度对紫花白及愈伤组织增殖的影响。低浓度 2,4-D 无法抑制愈伤组织的褐化, 而高浓度 2,4-D 会导致愈伤组织呈水浸状、丧失分化能力, 不利于胚性愈伤诱导(XU et al., 2022)。紫花白及愈伤组织在 1.5 mg/L 2,4-D 浓度时增殖状态良好, 可为后续高成苗率提供保障(WANG et al., 2010)(CHEN et al., 2019)。(3)优化了紫花白及的生根条件。在原有 NAA 激素的作用下增加琼脂粉的含量, 明显提高了紫花白及组培苗的生根效率和质量, 使其达到可移栽的生理状态。以上再生体系仍存在待完善之处, 即紫花白及蒴果必须在特定成熟期采集材料且保存时间有限, 使得操作窗口期较短, 因此以块茎为外植体的培养体系也是有必要进一步优化的。

紫花白及作为重要的药用兰科植物, 其遗传转化体系的建立是分子育种和功能基因组学研究的一种重要途径。本研究在获得再生体系的基础上, 进一步建立了紫花白及的遗传转化体系, 与以往研究相比, 本研究创建了紫花 BSP 合成关键酶基因 *BsPMM*、*BsPGM* 从转化到再生的完整过程, 但转化效率有待进一步提高。通过在愈伤组织中进行过表达处理, 得到 *BsPMM*、*BsPGM* 过表达分化苗, 后续可通过检测基因表达量、多糖含量、植株表型变化等对过表达基因进行功能验证。紫花白及遗传转化技术的建立不仅为紫花白及功能基因研究提供了支持, 也为利用基因工程手段改良紫花白及药用品质奠定了基础。

作者贡献声明

姜金星: 试验主要完成人, 数据分析及论文撰写; 于广源, 刘文楹: 试验主要参与人; 李芳, 刘木兰: 试验材料采集; 黄红梅: 论文修改; 覃静萍: 试验构思与设计, 数据分析及论文修改。

参考文献

- Zuo SM (2021). Research progress on chemical components and pharmacological action of *Bletilla striata*. *China Modern Doctor* **59**(04), 18—9192. (in Chinese)
- 左世梅(2021). 药用植物白及化学成分和药理作用研究进展. *中国现代医生* **59**(04), 189—192
- Zhang Z, Yang BM, Li YP, Wang GY, Dai F, Wang Q (2020). Control efficacy on the *Botrytis cinerea* of *Bletilla striata*. *Yunnan Agricultural Science and Technology* **2020**(06), 4—5. (in Chinese)
- 张泽, 杨宝明, 李永平, 王桂渝, 戴烽, 王琦 (2020). 白芨叶斑: 灰霉病防治药效试验. *云南农业科技* **2020**(06), 4—5.
- Wang GP, Meng SX, Cheng CM, Gong SB, Bai YC, Liu PK (2018). Study on subculture of tissue culture seedlings of *Bletilla striata*. *Contemporary Horticulture* **08**, 9—10. (in Chinese)
- 王高鹏, 孟淑霞, 程超民, 公少波, 白耀春, 刘鹏科 (2018). 白及组培苗繁育组织继代培养研究. *现代园艺* **08**, 9—10.
- Li T, Li CR, Zhang ZY, Fu XM, Liu Y, Zhang YJ, Yang LY, Zhao P (2025). A preliminary study on tissue culture and rapid propagation technology of *Phyllanthus acidus*. *Chinese Bulletin of Botany* **60**(04), 611—620. (in Chinese)
- 李彤, 李楚然, 张芷瑜, 付晓慢, 刘云, 张颖君, 杨力颖, 赵平 (2025). 西印度醋栗组培快繁技术初探. *植物学报* **60**(04), 611—620
- Wu QF, Xia K, Zhao ZG, Ma XY, Qiu S (2022). Study on efficient propagation technology of *Bletilla striata* plantlets. *Journal of Guangxi Academy of Sciences* **38**(02), 181—187. (in Chinese)
- 吴巧芬, 夏科, 赵志国, 马晓雅, 仇硕 (2022). 白及组培苗高效繁育技术研究. *广西科学院学报* **38** (02), 181—187.

- Chen C, Zhang DC, Hu S, Li YZ, Jiang ZG, Yang JY, Liang HW (2022). Callus induction and plant regeneration of *Bletilla striata*. *Molecular Plant Breeding* 20(24), 8201—8206. (in Chinese)
陈晨, 张德春, 胡胜, 李友志, 姜治国, 杨敬元, 梁宏伟(2022). 白芨愈伤组织诱导及植株再生. *分子植物育种* 20 (24), 8201—8206.
- Liang SS, Wu JQ, Xiong QL, Xue J, Yang WD, Meng XQ, Wei Q (2025). Monosaccharide composition and dynamic mechanism analysis of inhibiting tyrosinase of *Bletilla striata* polysaccharides. *Food Research and Development* 46(01), 9—16. (in Chinese)
梁珊珊, 吴俊秋, 熊巧玲, 薛娟, 杨武德, 孟宪群, 魏晴. 白芨多糖单糖组成及其抑制酪氨酸酶动力学机制. *食品研究与开发* 46(01), 9—16.
- Zhao CL, Wang B, Zhao YM, Yang CL, Li JX, Zhou YQ (2024). Research progress on extraction, biological activity, and application of polysaccharides from *Bletilla striata*. *Guangdong Chemical Industry* 51(12), 85—87. (in Chinese)
赵春丽, 王博, 赵亚敏, 杨昌玲, 李嘉欣, 周永强. 白芨多糖提取、生物学活性及应用研究进展. *广东化工* 51 (12), 85—87.
- Xu J, Shi YP, Su ZX, Lin Q, Li XQ, Wei SL, Gui J, Hu YF (2019). cDNA sequence cloning of *PMM* gene of *Bletilla striata* and expression character analysis of mannose synthesis related genes. *Journal of Southern Agriculture* 50(09), 1913—1921. (in Chinese)
许娟, 石云平, 苏祖祥, 林茜, 李小泉, 韦绍龙, 桂杰, 胡一凤 (2019). 白芨 *PMM* 基因 cDNA 序列克隆及甘露糖合成相关基因的表达特性分析. *南方农业学报* 50(09), 1913—1921.
- Li YB (2025). Mining related enzyme genes in sanghuang porus sanghuang polysaccharide synthesis pathway and homologous expression of *PMM* gene. Master's thesis. Wuhan: Huazhong Agricultural University. pp. 6. (in Chinese)
李彦斌. 桑黄多糖合成途径相关酶基因的挖掘与 *PMM* 基因的同源表达. 硕士学位论文. 湖北武汉: 华中农业大学. pp. 6.
- Hou YK, Zhou XT, Nie SP, Xie MY (2024). Effects of overexpression of glucose-phosphate mutase (*PGM*) on polysaccharide biosynthesis of *Agrocybe aegerita*. In: Abstracts of the 21st Annual Conference of Chinese Institute of Food Science and Technology Chongqing, China: Chinese Institute of Food Science and Technology. pp. 408—409. (in Chinese)
侯钰柯, 周兴涛, 聂少平, 谢明勇 (2024). 过表达葡萄糖磷酸变位酶(*PGM*)对茶树菇多糖生物合成的影响. *中国食品科学技术学会第二十一届年会论文摘要集*. 重庆: 中国食品科学技术学会. pp. 408—409.
- Lu JC, Cao LN, Tong GJ, Wang XY, Zhang LY, Yu X, Li HF, Li YH (2022). Establishment of callus induction and regeneration system of *Anemone silvestris*. *Chinese Bulletin of Botany* 57(02), 217—226. (in Chinese)
逯锦春, 曹丽娜, 佟冠杰, 王鑫颖, 张利英, 喻铨, 李荟芳, 李彦慧 (2022). 大花银莲花愈伤组织诱导及再生体系的建立. *植物学报* 57(02), 217—226.
- Zeng H, Li PF, Guo ZH, Liu CL, Ruan Y (2024). Establishment of a regeneration system for *Lunaria annua*. *Chinese Bulletin of Botany* 59(03), 433—440. (in Chinese)
曾浩, 李佩芳, 郭至辉, 刘春林, 阮颖 (2024). 银扇草再生体系的建立. *植物学报* 59(03), 433—440.
- Li YJ, Chen YL, Wang LL, Zhao SM, Zhu ZG (2005). The influence of 2,4-D and 6-BA on culture ability of rice callus. *Journal of Hebei Normal University (Natural Science)* 04, 395—398 + 403. (in Chinese)
李玉静, 陈彦龙, 王玲玲, 赵颂民, 朱正歌(2005). 2,4-D 和 6-BA 对水稻愈伤组织培养力的影响. *河北师范大学学报* 04, 395—398 + 403.
- Zhou ZY, Liao YH, Liu HL, Liu HG, Liu SC, Li LJ, Liu JC, Wang S (2018). Effects of different treatment methods on seed germination and seedling establishment of *Bletilla striata*. *Rural Economy and Science-Technology* 29(17), 76—77. (in Chinese)
周志扬, 廖艳红, 刘洪亮, 刘合干, 刘实超, 李丽娟, 刘建成, 汪胜(2018). 白芨种子不同

- 处理方式对发芽成苗的影响.农村经济与科技 **29** (17), 76—77.
- Huda E. Mahood, Virginia Sarropoulou, Thiresia-Teresa Tzatzani** (2022). Effect of explant type (leaf, stem) and 2,4-D concentration on callus induction: influence of elicitor type (biotic, abiotic), elicitor concentration and elicitation time on biomass growth rate and costunolide biosynthesis in gazania (*Gazania rigens*) cell suspension cultures. *Bioresources and Bioprocessing* **9** (100), 1—14.
- He HR** (2022). Preliminary study on tissue culture system of *Ulmus lamellosa*. Master's thesis. Beijing: Beijing Forestry University. (in Chinese)
- 何慧茹(2022). 脱皮榆组织培养体系的初步研究. 硕士学位论文. 北京: 北京林业大学. pp. 03.
- Zhao RY, Guo XX, Zhu WH, Li RM, Zhao JX, Du D, Dai L, Liu ZG, Wang LX, Liu MJ** (2024). Induction and cultivation of 77 Jujube cultivars pulp callus. *Acta Horticulturae Sinica* **51**(04), 903—914. (in Chinese)
- 赵若雨, 郭晓雪, 朱文慧, 李瑞梅, 赵佳雪, 牡丹, 代丽, 刘志国, 王立新, 刘孟军(2024). 枣 77 个品种果肉愈伤组织诱导培养研究. *园艺学报* **51** (04), 903—914.
- Feng H, Yi SL, Xie JH, Lei MQ, Huang X** (2014). Callus induction and plant regeneration of *Rosa hybrida*. *Chinese Bulletin of Botany* **49**(05), 595—602. (in Chinese)
- 冯欢, 易姝利, 谢佳恒, 雷梦琦, 黄萱 (2014). 微型月季愈伤组织诱导及植株再生. *植物学报* **49** (05), 595—602.
- Wang JC, Li YZ, Miao JM, Zhang YK, Ding FF** (2024). Establishment of callus culture system for transgenic receptor of Xinjiang DaYe alfalfa. *Grassland and Turf*.(in Chinese).
Doi: <https://link.cnki.net/urlid/62.1156.S.20240604.1427.004>.
- 王井昌, 李玉珠, 苗佳敏, 张云琨, 丁菲菲(2024). 新疆大叶紫花苜蓿转基因受体—愈伤组织培养体系的建立. *草原与草坪*. DOI: <https://link.cnki.net/urlid/62.1156.S.20240604.1427.004>.
- Li BQ, Zhang JR, Jing HH, Zhou YH** (2022). Screening of antibiotics in *Agrobacterium*-mediated Rose genetic transformation system. *Molecular Plant Breeding*. (in Chinese). DOI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220602.1755.016.html>.
- 李冰清, 张家瑞, 景欢欢, 周云鹤(2022). 农杆菌介导月季遗传转化体系中抗生素的筛选. *分子植物育种*. Doi: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220602.1755.016.html>.
- Alexander Betekhtin, Magdalena Rojek, Katarzyna Nowak** (2018). Cell wall epitopes and endoploidy as reporters of embryogenic potential in *Brachypodium Distachyon* callus culture. *International Journal of Molecular Sciences* **19** (12), 3811.
- Mesnage, Robin Brandsma, Inger Moelijker, Nynke Zhang, Gaonan Antoniou, Michael N** (2021). Genotoxicity evaluation of 2, 4-D, dicamba and glyphosate alone or in combination with cell reporter assays for DNA damage, oxidative stress and unfolded protein response. *Food and Chemical Toxicology* **157**, 112601.
- da Silva, Ana Paula Poquioma Hernández, Hilda Vanessa Comelli, Camila Luiza Guillén Portugal, Miguel Angel Moreira Delavy, Fernanda**(2024). Meta-analytical review of antioxidant mechanisms responses in animals exposed to herbicide 2, 4-D herbicide. *Science of The Total Environment* **924**, 171680.
- Diao S** (2025). Effects of three exogenous hormones on physiological characteristics of grape seedlings under drought stress and its mechanism. Master's thesis. Shanxi: Shanxi Agricultural University. (in Chinese)
- 刁珊(2025). 三种外源激素对干旱胁迫下葡萄幼苗生理特性的影响及其机制. 硕士学位论文. 山西: 山西农业大学. pp. 03.
- Li YC, Zhao HX, Jiang X, Huang XT, Liu YL, Wu ZY, Zhao Y, Fu CX** (2024). Establishment of *Agrobacterium*-mediated transformation system for *Agropyron mongolicum*. *Chinese Bulletin of Botany* **59**(04), 600—612. (in Chinese)
- 李宇琛, 赵海霞, 姜希, 黄馨田, 刘亚玲, 吴振映, 赵彦, 付春祥. 根癌农杆菌介导的蒙古冰草稳定遗传转化体系建立. *植物学报* **59**(04), 600—612.
- Xu JT, Liu XG, Jin ML, Pan H, Han BZ, Li MJ, Yan S, Hu GQ, Yan JB** (2022).

Establishment of genotype-independent high-efficiency transformation system in maize. *Acta Agronomica Sinica* **48**(12), 2987—2993.(in Chinese)

许洁婷, 刘相国, 金敏亮, 潘弘, 韩宝柱, 李梦娇, 岩说, 胡国庆, 严建兵 (2022). 不依赖基因型的高效玉米遗传转化体系的建立. *作物学报* **48**(12), 2987—2993.

Wang YY, Liu XN, Bai DS (2010). Study on salt tolerance and establishment of regeneration system of three cultivars of alfalfa from the south of China. *Journal of Gansu Agricultural University* **45**(2), 127—133. (in Chinese)

王媛媛, 柳小妮, 柏东山 (2010). 三个南方紫花苜蓿品种的耐盐性及其再生体系的建立 [J]. *甘肃农业大学* **45**(2), 127—133.

Chen P, Yang LL, Zhang SZ, Zhang SZ, Yang JF (2019). Embryonic callus induction and plantlet regeneration of *Camellia granthamiana*. *Plant Physiology Journal* **55**(06), 767—773. (in Chinese)

陈朋杨, 蕾蕾, 张苏州, 张寿洲, 杨建芬(2019).大苞白山茶胚性愈伤的诱导及植株再生. *植物生理学报* **55** (06), 767—773.

Establishment of a Genetic Transformation System in *Bletilla striata*

Jinxing Jiang, Guangyuan Yu, Wenkui Liu, Hongmei Huang, Fang Li, Mulan Liu, Jingping Qin*

College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha, 410128

INTRODUCTION: In this experiment, the roots, tubers, leaves, buds and seeds of *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb.f.were used as explants to explore the best induction conditions for embryonic callus and establish a genetic transformation system under the condition of multiple subculture selection.

RATIONALE: According to the experiment, the callus induction efficiency of different organs of *Bletilla striata* was studied to determine the optimal rapid propagation explants and the optimal concentration of plant growth regulators to promote the formation and regeneration of callus. This understanding is crucial for the development of genetic transformation related work in *Bletilla striata*.

RESULTS: The results showed that the best callus induction effect was obtained under the condition of MS + 0.5 mg / L 6-BA + 2 mg / L 2,4-D, and the induction rate was 86.1 %. However, the callus induction period of tubers was longer. Compared with tubers, it was more convenient to obtain callus directly from the seeds of *Bletilla striata*, and the induction effect was not significantly different from that of tubers. The callus induction speed was fast, the structure was dense, the texture was soft, and it was white and green. Using seeds as explants, the best medium for callus proliferation was MS + 1.5 mg / L 2,4-D. The callus was dense, dry, clumpy and bright yellow-green. The average diameter after proliferation was 12.267 mm, and the browning rate was relatively low, about 19.4 %. The best medium for adventitious bud differentiation was MS + 0.1 mg / L 6-BA + 0.1 mg / L NAA, the differentiation rate was as high as 91.7 %, and the number of adventitious buds was large, and the browning rate was 8.3 %. The optimum medium for rooting was MS + 11 g / L agar powder + 0.3 mg / L NAA, which could effectively increase the rooting rate to 66.7 %. Based on the above regeneration system of *Bletilla striata*, this study used *Agrobacterium* infection method to overexpress the key enzyme genes *BsPMM* (phosphomannose mutase gene) and *BsPGM* (glucose phosphomutase gene) for polysaccharide synthesis of *Bletilla striata*, and successfully obtained positive *B. striata* seedlings. The success rate of *BsPMM* transformation was about 14.6 %, and the success rate of *BsPGM* transformation was about 8.3 %.

CONCLUSION: In this study, the genetic transformation system of *Bletilla striata* was successfully established, including explant selection, callus induction, *Agrobacterium*-mediated genetic transformation, and the acquisition and identification of regenerated plants. Through the optimization of each link, the induction efficiency and differentiation quality of callus were improved. The genetic transformation system

provides technical support for the research on the biosynthesis of active substances such as *Bletilla striata* polysaccharide and the genetic improvement of *Bletilla striata*. Follow-up research can further improve the technical system and expand its potential in the application of *Bletilla striata* genetic engineering.

Key words *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.; *Bletilla striata* polysaccharides(BSP); callus ; transformation