生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):177-187

不同转化方法介导高温胁迫下枇杷果实*EjHSFB-2a*过表达效率比较

牛洁 汪红霞 任艺华 易鹏翰 周佳 孟鹏蕊 邓群仙* 张慧芬*
（四川农业大学园艺学院，成都 611130）

摘 要：【目的】探究不同转化方法介导的*EjHSFB-2a*瞬时过表达对转色期枇杷果实耐热性的影响，为枇杷抗逆功能基因组学研究及育种提供技术依据。【方法】分别采用果柄注射法、果面注射法及真空渗透法3种转化方法导入pC1300-*EjHSFB-2a*过表达载体，45 ℃高温胁迫7 h后，通过测定基因表达水平、丙二醛含量、过氧化氢含量、超氧阴离子产生速率及抗氧化酶活性，比较3种转化方法的差异。【结果】3种处理方法均不同程度地降低了果实热害指数与热害发生率。RT-qPCR分析证实，所有方法均能在果肉组织中成功过表达*EjHSFB-2a*，而仅果面注射法在果皮中有效转化。在果肉组织中，3种方法均显著降低了MDA、H_2O_2和O_2^-的积累，其中真空渗透法对MDA和H_2O_2的抑制效果最佳，降幅分别为43.33%和7.82%；果面注射法对O_2^-的清除能力最强，降幅达29.70%。此外，3种处理均提升了果肉中SOD、POD和CAT的活性。【结论】3种转化方法均可通过*EjHSFB-2a*过表达增强枇杷果肉的耐热性。不同转化方法对抗高温胁迫的调控效果具有组织特异性，转化效率由高到低依次为果面注射法＞真空渗透法＞果柄注射法，其中果面注射法是鉴定果皮及果肉组织基因功能的最适方法。

关键词： 枇杷；高温胁迫；*EjHSFB-2a*；瞬时转化；果面注射法；真空渗透法；果柄注射法；生理效应
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2025-1341

Comparison of the Efficiency of Different Transformation Methods for Mediating *EjHSFB-2a* Overexpression in Loquat Fruit under High-temperature Stress

NIU Jie WANG Hong-xia REN Yi-hua YI Peng-han ZHOU Jia MENG Peng-rui DENG Qun-xian*
ZHANG Hui-fen*
(*College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Chengdu* 611130)

Abstract: 【Objective】To explore the effects of transient overexpression of *EjHSFB-2a* on enhancing the heat tolerance of loquat fruit at the turning-color stage, thereby providing a technical basis for stress-resistant functional genomics and breeding in loquat. 【Method】The pC1300-*EjHSFB-2a* overexpression vector was introduced using three transformation methods: fruit stalk injection, fruit surface injection, and vacuum infiltration. After exposure to high-temperature stress at 45 ℃ for 7 h, the differences among the three methods were compared by measuring gene expression levels, malondialdehyde content, hydrogen peroxide content, superoxide anion production rate, and antioxidant enzyme activities. 【Result】All three treatment methods reduced the heat injury index and incidence to varying degrees. RT-qPCR analysis confirmed that all methods successfully overexpressed *EjHSFB-2a* in the flesh tissue, while only fruit surface injection achieved effective transformation in the peel. In the flesh tissue, all three methods significantly reduced the accumulation of MDA, H_2O_2 and O_2^-. Among them, vacuum infiltration was most effective in suppressing MDA and H_2O_2, with reductions of 43.33% and 7.82%, respectively. Fruit surface injection showed the strongest scavenging capacity for O_2^-, with a reduction of 29.70%. Furthermore, all three treatments enhanced the

收稿日期：2025-12-10
基金项目：四川省科学技术厅“十四五”育种攻关项目（2021YFYZ0023），国家现代农业产业技术体系四川省水果创新团队项目（SCCXTD -2024-4）
*通信作者：邓群仙 dengqx@sicau.edu.cn，张慧芬 hfcheung@sicau.edu.cn

activities of SOD, POD and CAT in the flesh tissue.【Conclusion】All three transformation methods enhanced the thermotolerance of loquat flesh via *EjHSFB-2a* overexpression. The regulatory effects of different transformation methods on resistance to high-temperature stress exhibited tissue specificity, with transformation efficiency ranking from high to low as fruit surface injection > vacuum infiltration > fruit stalk injection. Among these, fruit surface injection is the most suitable method for functional gene identification in both peel and flesh tissues.

Keywords: loquat; high temperature stress; *EjHSFB-2a*; transient transformation; fruit surface injection; vacuum infiltration; fruit stalk injection; physiological effects

枇杷（*Eriobotrya japonica* Lindl.）为蔷薇科枇杷属植物，属亚热带常绿果树，喜温暖湿润的气候。四川省地域辽阔，气候多样，加之得天独厚的地理条件，使得四川省成为枇杷种质资源的密集分布区之一，拥有丰富的枇杷种质资源[1]。枇杷果实口感多汁，味甜清香，含有多种维生素、矿物质等营养成分，广受消费者欢迎。然而近年来随着全球气候变暖，温室效应加剧，高温胁迫成为制约果树产业健康发展的主要因素之一[2]。

枇杷果皮较薄，果肉柔嫩多汁，在枇杷果实转色期前后，如遇高温，果面温度达到30 ℃以上时，果实极易发生热害，受热害后果实表面会出现褐色不规则斑块[3]，影响优质商品果的生产。高温胁迫会引发氧化应激，导致细胞内产生过多的活性氧物质，从而损害细胞结构和功能[4]。邓朝军等[5]通过对‘红种’枇杷果皮热伤害的抗氧化特性进行研究发现，高温处理增加了果皮丙二醛、超氧阴离子含量，降低了抗氧化酶活性。同时高温胁迫会造成枇杷果皮细胞角质层变薄，表皮细胞变形，并使细胞壁厚度增加[6]。潘德灼等[7]通过比较不同抗热性枇杷果皮的差异蛋白表达模式发现，需要一定量的HSP以维持蛋白的正确折叠和正常功能，从而提高枇杷果实耐热性。果实作为一个庞大的代谢库，由于低的表面积/体积比，蒸发失水、散热较慢，在较高的外界温度下果实即成为一个热库，果皮和果肉温度明显高于气温[8]，因此果实对温度变化更为敏感。一旦发生热害，不仅影响果实的外观品质，还会降低果实口感和营养价值，降低果实的市场竞争力，使果实丧失商品性[9]。

高温胁迫会激活一些特定的转录因子，调控一系列与逆境响应相关的基因表达，如热诱导基因*HSFA1*、*HSFA2*、*HSFA7a*、*HSFBs*和*HSPs*[10]。枇杷果实中大多数*HSPs*相关基因表达水平受高温诱导上调[11]，而*HSPs*基因的转录又受到HSFs的调控[12]。HSFs是植物响应高温胁迫的关键调节因子，根据其寡聚化结构域（OD）的差异可分为HSFA、HSFB和HSFC 3类[13]。Li等[14]研究发现高温胁迫能够诱导百合（*Lilium brownie* var. *viridulum* Baker）花瓣盘中*LdHSFB2a*的表达。进一步的功能验证表明，瞬时过表达*LdHSFB2a*能够显著降低细胞的相对电导率和过氧化氢（H_2O_2）含量，并有效提升过氧化氢酶（CAT）活性。本课题组前期通过转录组学数据筛选到枇杷*EjHSFB-2a*在高温诱导下表达水平上调，推测其可能参与枇杷果实的热胁迫响应。但目前，其在转色期枇杷果实中过表达后是否能够提升果实抗高温胁迫的能力，仍缺乏直接的遗传证据。

遗传转化是解析基因功能与实现作物性状定向改良的核心技术。然而，在枇杷等果树中，稳定的遗传转化体系构建困难，而且果树童期长，严重制约了果实中基因的功能研究。瞬时转化技术作为一种快速、灵活的研究手段，为在果实发育阶段进行基因功能验证提供了可行性。Chi等[15]使用果面注射法在枇杷果实中分别瞬时过表达*EjNI*、*EjtDT2*，发现*EjNI*过表达增加了中性倒转酶的活性，从而促进蔗糖转化为果糖和葡萄糖。*EjtDT2*的过表达促进了苹果酸的积累。Zhang等[16]使用果柄注射法在枇杷幼果中瞬时过表达*EjS6PDH1*、*EjS6PDH4*，提高了幼果抗寒性。吴艳菊等[17]利用真空渗透法在紫花苜蓿（*Medicago sativa* L.）发芽种子中成功瞬时过表达*GUS*基因。在无花果（*Ficus carica* L.）果实中使用瞬时注射法过表达*FcERF100*，能够显著延缓果实软化并降低果胶裂解酶活性[18]。目前，虽已有多种瞬时转化方法应用于果实体系，但其转化效率、组织特异性及对复杂器官（如整果）的适用性仍缺乏系统评估与比较，制约了该技术在果实基因功能研究中的准确性与普适性。并且关于不同瞬时转化方式在效率、组织特异性及对枇杷果实损伤程度等

方面的研究有待开展。

本研究使用果柄注射法、果面注射法及真空渗透法3种转化方法，在枇杷果实中瞬时过表达*EjHSFB-2a*基因，比较3种转化方法效率差异及其对枇杷果实耐热性的影响。以期筛选出可用于高效介导*EjHSFB-2a*过表达的遗传转化方法，对推进枇杷功能基因组学研究及抗逆育种具有重要意义。

1　材料与方法

1.1　材料

试验材料为种植于四川农业大学园艺学院枇杷种质资源圃（北纬30°56′，东经103°65′，海拔496.9 m）‘2016-6-2’枇杷转色期果实。挑选果实大小一致、无病虫害及机械损伤的枇杷转色期果穗，带回实验室先进行水培，后续分别采用果柄注射法、果面注射法及真空渗透法3种转化方法瞬时过表达*EjHSFB-2a*。

1.2　方法

1.2.1　试验设计　本研究采用3种转化方法进行*EjHSFB-2a*基因的瞬时过表达：果柄注射法、果面注射法及真空渗透法。3种转化方法各选取20个大小、成熟度一致的果实进行*EjHSFB-2a*瞬时过表达，并各另设20个果实注射pC1300空载作为相应的对照组。具体操作如下：（1）果柄注射法：使用一次性无菌注射器（成都浩博优科技有限公司），于果柄（连接果实与果梗的部位）进行注射。沿果实生长方向，正反两侧各注射一次，每次注入pC1300-*EjHSFB-2a*菌液0.5 mL。pC1300空载对照处理同上。（2）果面注射法：在果实赤道部位均匀选取3个注射点，使用一次性无菌注射器于每个注射点注入pC1300-*EjHSFB-2a*菌液0.3 mL。pC1300空载对照处理同上。（3）真空渗透法：在果实表面使用2.5 mL一次性注射器（不带针头）尖端均匀按压4个圆孔，后将果穗倒置于装有菌液的塑料烧杯，使果实完全浸泡在pC1300-*EjHSFB-2a*菌液中，随即放于真空干燥器中，使用SHZ-D(III)循环水式真空泵进行真空渗透，压力值达到0.08 MPa，处理时间为10 min。pC1300空载对照处理同上。转化后培养3 d，在智能人工气候箱（RQH-350）中进行高温处理，条件设置为：温度45 ℃、相对湿度40%、光照10 450 lx、时间7 h。果柄注射法取样部位为自果实果蒂到果柄方向均匀取3条0.5 cm宽的果皮及相应位置的果肉；果面注射法取样部位为注射孔周围0.5 cm宽的果皮及相应位置的果肉；真空渗透法取样部位为按压圆孔周围0.5 cm宽的果皮及相应位置的果肉。为准确评估转化成功率并减少检测误差，将每种方法所取样品随机分为3份，并迅速置于液氮冷冻，保存于-80 ℃超低温冰箱进行后续基因表达水平与生理指标测定。

1.2.2　*EjHSFB-2a*基因克隆与过表达载体构建　从‘大五星’枇杷基因组[19]提取*EjHSFB-2a*（EVM0039834）序列信息，根据引物设计原则，使用SnapGene软件设计出克隆引物，引物送至擎科生物科技有限公司合成（引物序列见附表1）。以枇杷果实的cDNA为模板扩增*EjHSFB-2a*基因的全长编码序列，PCR扩增体系和反应程序参考TSINGKE TSE101金牌Mix（green）试剂盒说明书（北京擎科生物公司），PCR产物进行凝胶电泳检测，选择正确的条带进行胶回收，回收步骤见胶回收试剂盒（北京擎科生物公司），将回收的目的片段与T载体连接，连接体系参考pClone007 Blunt Simple Vector试剂盒说明书（北京擎科生物公司），PCR仪25 ℃连接30 min。连接后立即进行转化，将10 μL连接产物转入30–50 μL DH5α感受态（冰上进行），冰上静置30 min，42 ℃热激90 s，冰上冷却3 min，超净工作台中加入1 mL LB液体培养基（无抗性），37 ℃活化摇菌1 h，4 000 × *g*离心3 min，随后在超净工作台中涂板，去上清液，保留50 μL吹打均匀，移取到固体培养基（含Amp）上加玻璃珠摇晃均匀，倒掉玻璃珠，将培养皿封口后37 ℃培养箱倒置培养过夜。用黄色枪头挑取8个单菌落加入到1 mL含Amp的液体培养基中，活化摇菌至菌液浑浊（约5–6 h）。摇菌后进行菌液PCR检测，PCR体系和反应程序参考TSINGKE TSE004，Master Mix（blue）试剂盒说明书（北京擎科生物公司），将PCR产物进行凝胶电泳，选择电泳位置正确的条带进行测序，测序成功的保存质粒。以测序成功的克隆质粒为模板，使用带有同源臂的引物进行*EjHSFB-2a*扩增（引物序列见附表1），将枇杷*EjHSFB-2a*的全长CDS重组到*Bam*H I酶与*Kpn* I酶线性化的pC1300载体上，以空载pC1300为对照，操作步骤参考ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit V3试剂盒说明书（南京诺唯赞生

物科技股份有限公司）。将pC1300-*EjHSFB-2a*及pC1300空载分别转化至农杆菌GV3101中，按照不同转化方法转化枇杷果实（方法详见1.2.1）。

1.2.3 测定指标及方法 将3种转化方法过表达*EjHSFB-2a*的枇杷果实于45 ℃高温处理后，分别统计果实的热害发生率及热害指数，并测定膜脂过氧化与抗氧化酶等相关指标。热害发生率（%）=热害果数/调查总果数×100%。枇杷果实热害指数评定分为5级[5]，评定标准如下：0级，无褐色斑块，0%；1级，褐斑面积≤10%；2级，10%＜褐斑面积≤25%；3级，25%＜褐斑面积≤50%；4级，褐斑面积＞50%。热害指数计算公式为：

热害指数（%）=∑（各级病果数×各级代表值）/（调查总数×最高级代表值）×100%。

丙二醛（MDA）含量的测定采用硫代巴比妥酸法[20]，H_2O_2含量测定采用四氯化钛法[21]，采用羟胺氧化的方法[22]测定O_2^-的产生速率。SOD活性测定参考Rao等[23]氮蓝四唑的方法，POD活性采用愈创木酚法[24]测定，CAT活性测定参考Aghdam等[25]的方法。

不同转化方法的综合评价参考张钰林等[26]隶属函数法，计算3种转化方法介导*EjHSFB-2a*过表达在高温胁迫下各评价指标的平均隶属函数值，以此为不同方法的综合隶属函数值。综合隶属函数值越高，说明该种转化方法介导*EjHSFB-2a*过表达后枇杷果实的耐热性越强，计算公式如下：

若测定指标与耐热性呈正相关，$U(X_j)=(X_j-X_{min})/(X_{max}-X_{min})$；

若测定指标与耐热性呈负相关，$U(X_j)=1-(X_j-X_{min})/(X_{max}-X_{min})$；

其中，$U(X_j)$为第j个测定指标的隶属函数值，X_j为第j个测定指标测定值，X_{min}为所有测定指标最小值，X_{max}为所有测定指标最大值。

RNA提取采用CTAB法[27]并加以改进。逆转录使用Goldenstar™ RT 6 cDNA Synthesis Ver.2反转录试剂盒（北京擎科生物公司）。实时荧光定量PCR（RT-qPCR）引物设计使用Beacon Designer 7.0，具体引物信息见附表1，引物委托擎科生物公司合成。采用SYBR® Premix Ex Taq™ II试剂盒（北京擎科生物公司）在CFX 96型PCR仪（Bio-rad，美国）进行扩增，反应体系和反应程序参考试剂盒说明书。用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算基因的相对表达量，每个样品重复3次。

1.2.4 数据统计与分析 数据统计使用Excel 2019；图表使用GraphPad Prism 9.5绘制；方差分析采用IBM SPSS Statistics 25完成。

2 结果

2.1 不同转化方法对高温胁迫下枇杷果实热害发生的影响

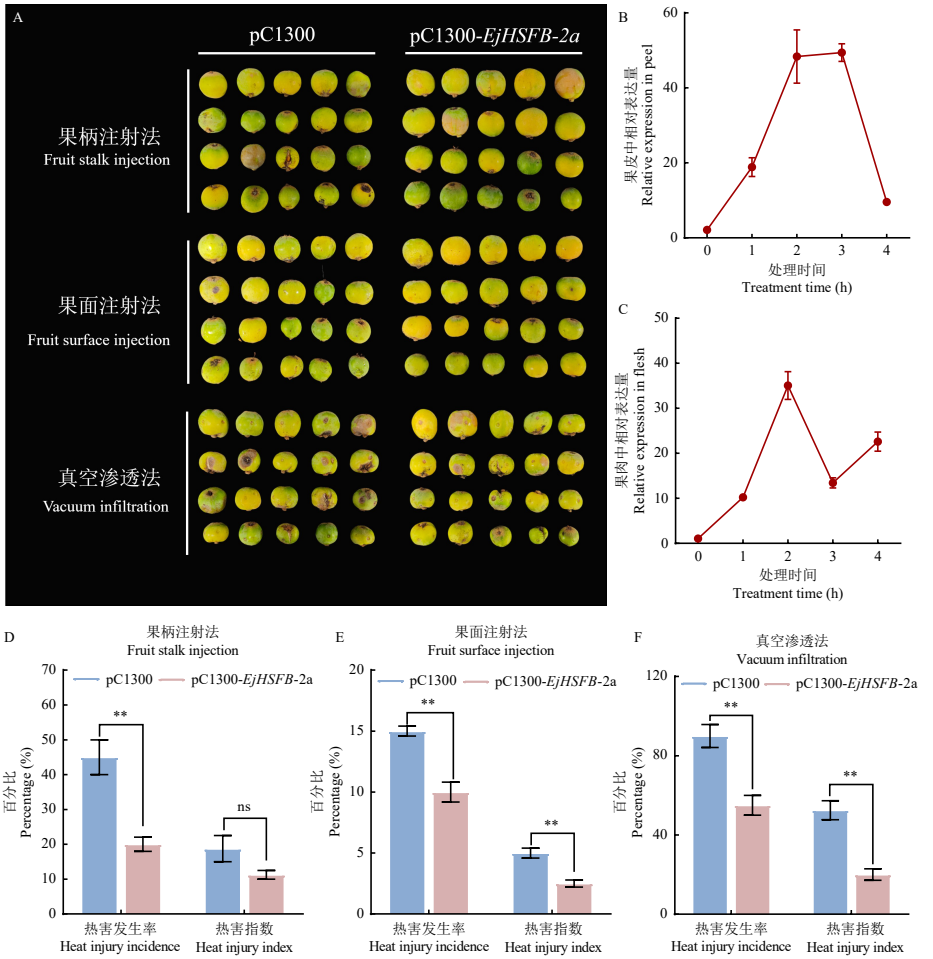
高温胁迫下枇杷果实基因表达分析发现，果皮与果肉中*EjHSFB-2a*均能快速响应胁迫，表达量提升（图1-B、C）。经3种不同转化方法进行*EjHSFB-2a*瞬时过表达的枇杷果实，在45 ℃高温胁迫下呈现出不同程度的热损伤表型，但均较对应空载更轻（图1-A）。在空载组中，果面注射法的热害发生率最低，仅为15.00%，真空渗透法的热害发生率最高，为90.00%。与空载组相比，3种方法在缓解热害方面效果不同，其中真空渗透法效果最为明显，其热害指数降低了61.90%，果面注射法次之，热害指数降低了50.00%，果柄注射法最低，热害指数降低了40.00%（图1-D–F）。

2.2 不同转化方法对高温胁迫下枇杷果实*EjHSFB-2a*相对表达量的影响

本研究通过RT-qPCR检测*EjHSFB-2a*基因在各处理组中的相对表达量，以判断基因是否瞬时转化成功。3种不同的转化方法在实现*EjHSFB-2a*基因瞬时表达方面，呈现出显著的组织特异性与效率差异（图2）。果柄注射法3组样品中，仅1份果肉样本*EjHSFB-2a*表达量显著提升，其表达水平为对照的4.07倍（图2-C）；果面注射法3组样本中，2份果皮样品及对应的果肉样本中*EjHSFB-2a*表达量显著提升（图2-D、F）；真空渗透法3组样本中，仅2份果肉样本*EjHSFB-2a*表达量显著提升（图2-G、I）。转化成功率分析显示，仅果面注射法在果皮组织中的转化效率高（2/3样品成功）（图2-J）。在果肉组织中，果面注射法与真空渗透法均展现出较高的转化效率（2/3样品成功），优于果柄注射法（仅1/3样品成功）（图2-K）。

2.3 不同转化方法对高温胁迫下枇杷果实细胞膜损伤程度的影响

通过3种转化方法过表达*EjHSFB-2a*，对高温胁



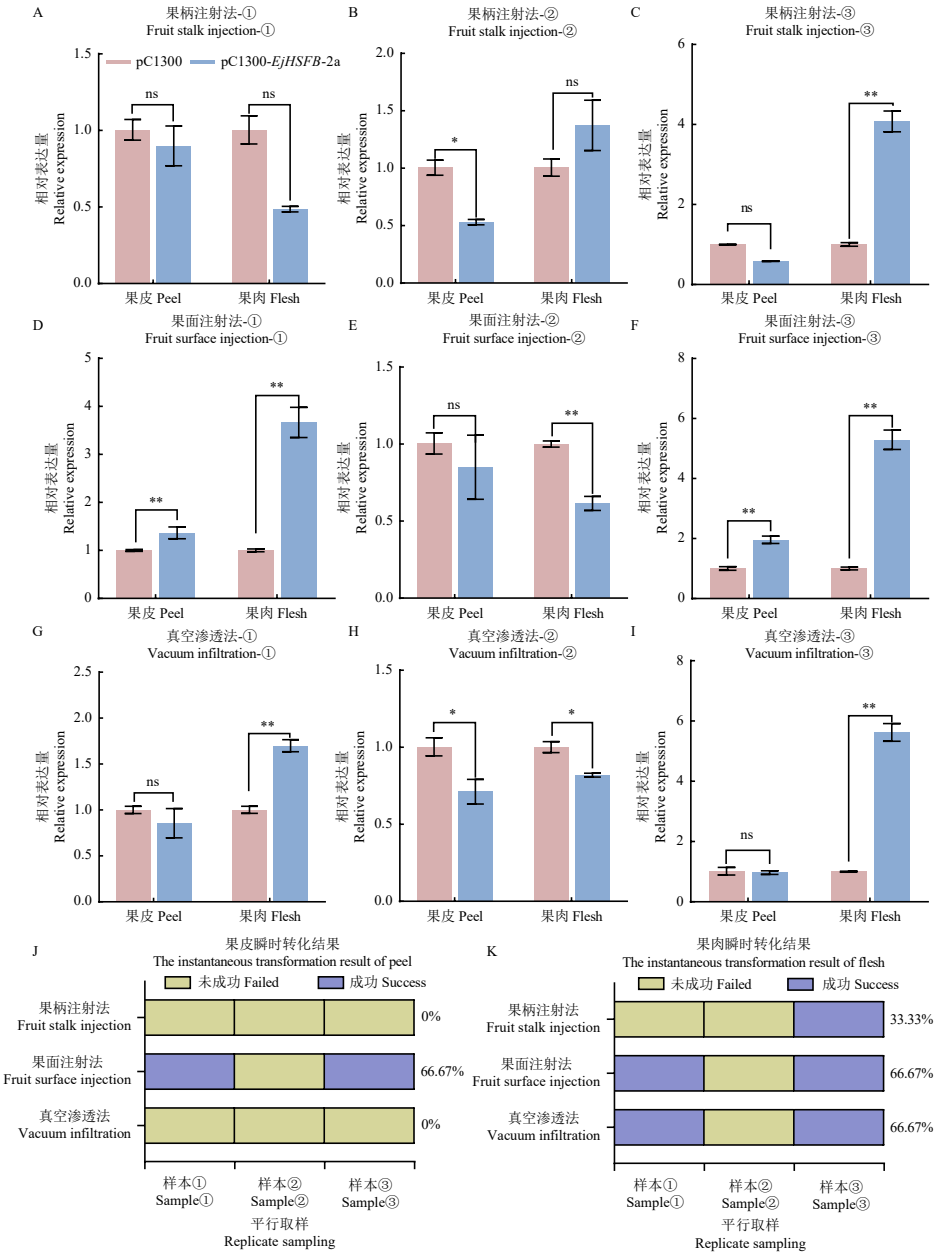
A：不同转化方法过表达*EjHSFB-2a*后表型变化；B：45 ℃高温处理4 h果皮中*EjHSFB-2a*相对表达量变化；C：45 ℃高温处理4 h果肉中*EjHSFB-2a*相对表达量变化；D–F：果柄注射法（D）、果面注射法（E）、真空渗透法（F）过表达*EjHSFB-2a*热害发生率与热害指数；* $P<0.05$，** $P<0.01$。下同

A: Phenotypic changes after overexpression of *EjHSFB-2a* via different transformation methods. B: Relative expression level of *EjHSFB-2a* in peel after 4 h of high-temperature stress at 45 ℃. C: Relative expression level of *EjHSFB-2a* in flesh after 4 h of high-temperature stress at 45 ℃. D–F: Heat injury incidence and index after overexpression of *EjHSFB-2a* via fruit stalk injection (D), fruit surface injection (E), and vacuum infiltration (F). * $P<0.05$, ** $P<0.01$. The same below

图1　不同转化方法对高温胁迫下枇杷果实表型的影响

Fig. 1　Effects of different transformation methods on the phenotype of loquat fruits under high temperature stress

迫下枇杷果实细胞膜损伤的缓解效果存在显著差异，且具有组织特异性（图3）。*EjHSFB-2a*过表达有效减轻了细胞膜脂过氧化程度。在果肉组织中，真空渗透法的效果最为显著，使MDA含量较空载对照降低了43.43%（图3-C）；果柄注射法亦能显著降低MDA含量（降幅22.53%）（图3-A）。与之相比，果面注射法在果皮与果肉组织中均表现出显著效果，MDA含量分别降低了23.09%和34.63%（图3-B）。对于H_2O_2的积累，不同处理的影响各异。在果皮组织中，仅果面注射法能显著降低H_2O_2含量，降幅高达59.12%（图3-E）。而在果肉组织中，虽然3种方法均观察到H_2O_2含量的下降，但仅真空渗透法达到统计学显著水平，较对照显著降低了7.82%（图3-F）。同时，对比不同转化方法下枇杷果实的超氧阴离子产生速率发现，结果与H_2O_2类似。果面注射法在果皮组织中表现出独特的优势，使$O_2^{\cdot-}$产生速率显著降低了19.60%（图3-H）。在果肉组织中，3种方法均能降低$O_2^{\cdot-}$水平，其中果柄注射法与果面注射法的降低幅度较大，分别为28.01%和29.70%（图3-G–H），而真空渗透法则降低了12.86%（图3-I）。



A–C：果柄注射法过表达 *EjHSFB-2a* 后 3 份样本 RT-qPCR 检测结果；D–F：果面注射法过表达 *EjHSFB-2a* 后 3 份样本 RT-qPCR 检测结果；G–I：真空渗透法过表达 *EjHSFB-2a* 后 3 份样本 RT-qPCR 检测结果；J–K：不同转化方式在果皮（J）和果肉（K）中转化成功率

A–C: RT-qPCR results of three replicate samples after overexpression of *EjHSFB-2a* via fruit stalk injection. D–F: RT-qPCR results of three replicate samples after overexpression of *EjHSFB-2a* via fruit surface injection. G–I: RT-qPCR results of three replicate samples after overexpression of *EjHSFB-2a* via vacuum infiltration. J–K: Transformation success rates in peel (J) and flesh (K) for different transformation methods

图 2 不同转化方法转化后枇杷果实中 *EjHSFB-2a* 相对表达量

Fig. 2 Relative expression of *EjHSFB-2a* in loquat fruit after different transformation methods

2.4 不同转化方法对高温胁迫下枇杷果实抗氧化酶活性的影响

为明确在高温胁迫下不同转化方法对枇杷果实抗氧化系统的调控作用，测定 SOD、POD、CAT 3 种抗氧化酶活性在不同处理中的变化情况（图 4）。结果表明，与空载对照相比，果柄注射法与真空渗透

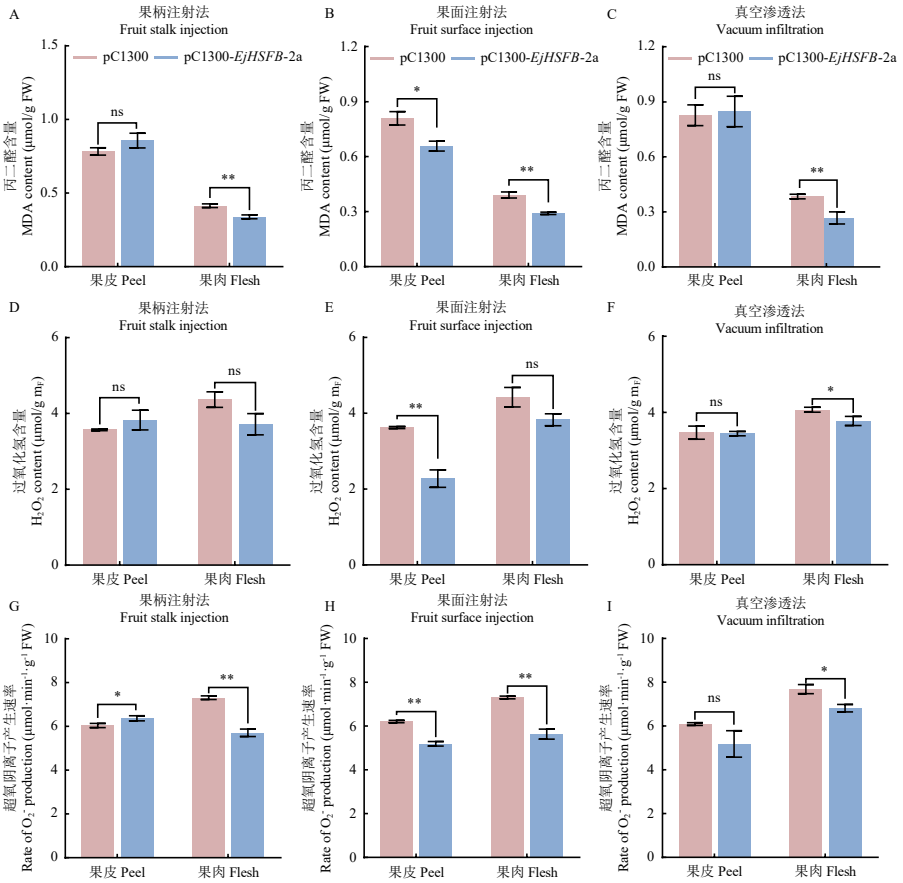


图3　不同转化方法对高温胁迫下枇杷果实细胞膜损伤程度的影响

Fig. 3　Effects of different transformation methods on cell membrane damage of loquat fruit under high temperature stress

法均能显著提高果肉组织中的SOD活性（图4-A、C）；而果面注射法则在果皮与果肉2种组织中均诱导了SOD活性的显著上升（图4-B）。3种方法在果肉组织中POD活性均表现出上调作用，其中真空渗透法提升幅度最大（较对照上升25.80%），果面注射法次之（20.28%），果柄注射法为12.73%（图4-D–F）。值得注意的是，仅果面注射法在果皮组织中显著诱导了POD活性，增幅达47.32%。CAT活性变化与SOD、POD相似（图4-G–I），果面注射法同样在果皮与果肉组织中均促进CAT活性的显著上升，增幅分别为41.95%与98.12%。与之相比，果柄注射法与真空渗透法仅显著提高了果肉组织中的CAT活性，增幅分别为26.39%和62.78%。

2.5　不同转化方法对高温胁迫下枇杷果实耐热性综合评价

本研究以3种转化方法的各项生理指标综合隶属函数值评价3种方法介导*EjHSFB-2a*过表达枇杷果实耐热性的差异。果皮中，果柄注射法、果面注射法和真空渗透法的综合隶属函数值分别为-0.211 7、0.800 0、0.243 7；果肉中，果柄注射法、果面注射法和真空渗透法的综合隶属函数值分别为0.359 2、0.674 3和0.650 7（表1）。综合隶属函数值越大，对高温胁迫的缓解能力越强。3种转化方法介导*EjHSFB-2a*过表达缓解转色期枇杷果实高温胁迫的排名为：果面注射法 > 真空渗透法 > 果柄注射法（表2）。

3　讨论

瞬时转化技术是将目的基因导入靶细胞内快速表达以分析基因功能，可在转化之后直接进行表型鉴定，主要方式有粒子轰击转化、PEG介导原生质体转化、植物病毒载体介导转化以及农杆菌介导转化，具有周期短、转化效率高、通量高等优点[28–29]。

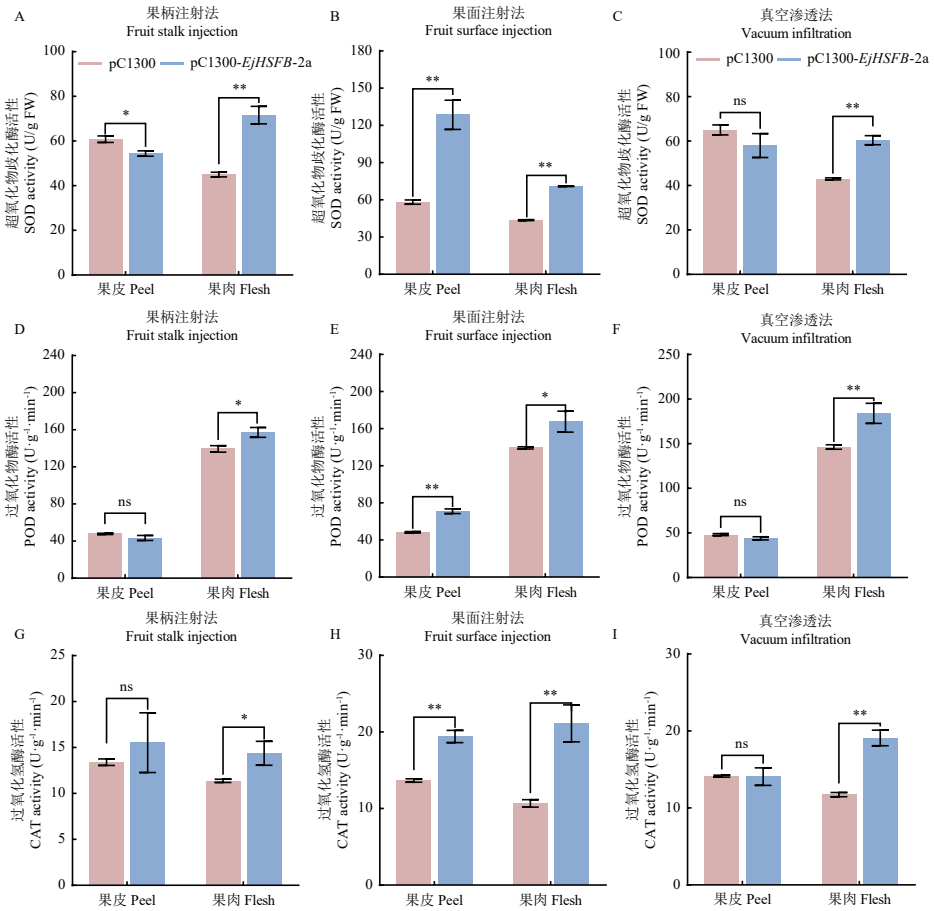


图4 不同转化方法对高温胁迫下枇杷果实抗氧化酶活性的影响

Fig. 4 Effects of different transformation methods on antioxidant enzyme activities in loquat fruit under high temperature stress

其中农杆菌介导的瞬时转化技术具有高效整合、可批量转化、操作简便、效果佳等优点。王碧莹等[30]在喜树（*Camptotheca acuminata* Decne.）中建立了一种降低叶片个体差异的瞬时转化方法，使用叶片直接注射法过表达*GUS*基因。Chen等[31]使用果面注射法在柑橘（*Citrus reticulata* Blanco）果实中过表达与沉默*CrWRKY42*，发现其在柑橘果实中正向调控叶绿素降解和类胡萝卜素的生物合成。Han等[32]使用真空侵染法在桂花（*Osmanthus fragrans*（Thunb.）Lour.）花瓣中成功过表达*OfWRKY3*。王树军等[33]将农杆菌瞬时转化荔枝（*Litchi chinensis* Sonn.）果实组织中，发现使用果柄注射法注射农杆菌后，果柄注射口部位乙烯迅速增加且促进果皮转色。本研究使用了果柄注射法、果面注射法以及真空渗透法这3种转化方法瞬时过表达*EjHSFB-2a*。果面注射法之所以能成为在果皮组织中实现有效转化的唯一方法，主要原因可能在于其将菌液直接且局限性地注入果皮组织，实现了高效的局部转化。相比之下，真空渗透法在果肉组织中诱导了高水平的基因表达，这很可能得益于真空负压驱动菌液通过按压孔从果肉组织间隙进行系统性渗透，从而实现了对果肉更均匀、高效地转化，但按压孔处更容易受到高温胁迫损伤。而果柄注射法效率相对较低，推测是其依赖果柄维管束进行长距离运输，菌液在途中可能被稀释或受阻所致。

高温胁迫会引发氧化应激，导致细胞内产生过多的活性氧物质，从而损害细胞结构和功能[4]。高温胁迫下丙二醛大量累积，其生成加速了细胞膜的破坏，致使膜透性增大，从而抑制了细胞功能，降低了植物的耐热性[34]。Zhang等[35]在苹果（*Ma-*

表1　三种转化方法生理指标平均隶属函数值

Table 1　Average membership function values of physiological indicators for the three transformation methods

测定指标 Measured parameters	隶属函数值 Membership function value					
	果皮 Peel			果肉 Flesh		
	果柄注射法 Fruit stalk injection	果面注射法 Fruit surface injection	真空渗透法 Vacuum infiltration	果柄注射法 Fruit stalk injection	果面注射法 Fruit surface injection	真空渗透法 Vacuum infiltration
转化成功率 Transformation success rate	0	1.000 0	0	0	1.000 0	1.000 0
基因表达水平 Gene expression level	0	1.000 0	0.065 4	0	0.785 7	1.000 0
热害发生率 Heat injury incidence	0.666 7	0	1	0.666 7	0	1.000 0
热害指数 Heat injury index	0.166 7	0	1	0.166 7	0	1.000 0
MDA	-3.664 2	1.000 0	0.214 3	0	0.578 7	1.000 0
H_2O_2	0	1.000 0	0.097 9	1.000 0	0.792 1	0
O_2^-	0.324 2	1.000 0	0	0.899 6	1.000 0	0
SOD	0.002 8	1.000 0	0	0.859 1	1.000 0	0
POD	0	1.000 0	0.059 6	0	0.577 7	1.000 0
CAT	0.386 3	1.000 0	0	0	1.000 0	0.507 3
平均值 Average	-0.211 7	0.800 0	0.243 7	0.359 2	0.674 3	0.650 7

表2　三种转化方法综合评价

Table 2　Comprehensive evaluation of the three transformation methods

部位 Tissue	方法 Methods	综合隶属函数值 Comprehensive membership function value	排名 Ranking
果皮 Peel	果柄注射法 Fruit stalk injection	-0.211 7	3
	果面注射法 Fruit surface injection	0.800 0	1
	真空渗透法 Vacuum infiltration	0.243 7	2
果肉 Flesh	果柄注射法 Fruit stalk injection	0.359 2	3
	果面注射法 Fruit surface injection	0.673 4	1
	真空渗透法 Vacuum infiltration	0.650 7	2

lus pumila Mill.）植株中瞬时过表达*MdHSFB2a*后发现苹果植株ROS积累减少，*Fv*/*Fm*值增加，植株耐热性增强。葡萄（*Vitis vinifera* L.）叶片中瞬时过表达*VvHSFB2a*降低了叶片的相对电导率，植株叶片长势更优[36]。作为植物体内清除活性氧的关键防线，SOD、POD及CAT的协同作用对维持细胞氧化还原稳态至关重要[37]。在本研究中，*EjHSFB-2a*的过表达有效缓解了枇杷果实由高温引起的氧化损伤，并提高了果实的抗氧化酶活性，结果表明，3种方法的转化效率与组织特异性存在显著差异，转化效率由高到低综合表现为果面注射法＞真空渗透法＞果柄注射法。在已报道的研究中，多采用单一方法，缺乏对同一体系中不同方法效率的比较，而本研究首次在枇杷果实中对3种瞬时转化方法进行了平行比较，结合基因表达水平及生理指标进行综合评价，使对不同转化方法优劣的判断更为全面客观。本研究也存在一定的局限性，仅使用了单个基因进行转化效率的评估，未来可增加多个不同特性的基因进行交叉验证，同时本研究以高温胁迫为评价体系，所得结论是否适用于其他逆境（如低温、干旱）或果实发育阶段，尚需进一步验证。

因此，在后续研究中，若目标为系统研究果皮与果肉组织的整体抗氧化响应，果面注射法为较理想的选择。并且可通过优化处理方法进一步提升转化效率并降低对果实的物理损伤。同时可将本研究的比较方案拓展至其他木本果树，检验3种方法在不同物种间的适用性差异，为建立广谱性的果实瞬时转化技术体系提供理论基础。

4 结论

果柄注射法、果面注射法及真空渗透法3种转化方法均能通过上调*EjHSFB-2a*的表达，有效减轻高温胁迫下枇杷果实的细胞膜损伤，并激活抗氧化酶系统，从而增强果实的耐热性。综合比较转化效率及其对生理表型的改善效果发现，果面注射法是枇杷果实果皮与果肉中基因瞬时遗传转化功能鉴定的最适方法。

文章所有附表数据请点击链接获取（https://biotech.aiijournal.com/fileup/1002-5464/NEWS/20260506150355_NewsFile_85.pdf）。

参考文献

[1] 林顺权. 枇杷属野生种种质资源的研究与创新利用进展 [J]. 园艺学报, 2017, 44(9): 1704-1716.
Lin SQ. A review on research of the wild species in genus *Eriobotrya* germplasm and their innovative utilization [J]. Acta Hortic Sin, 2017, 44(9): 1704-1716.

[2] 刘羿飞, 陈奇凌, 吴翠云. 外源亚精胺对枣树抗高温胁迫的调节机制 [J]. 北方园艺, 2024(4): 14-20.
Liu YF, Chen QL, Wu CY. Regulation mechanism of exogenous spermidine on resistance of jujube tree to high temperature stress [J]. North Hortic, 2024(4): 14-20.

[3] 桑荣生, 吴宝玉. 枇杷果实日灼等非侵染性病害调查与分析 [J]. 农业科技通讯, 2020(2): 173-177.
Sang RS, Wu BY. Investigation and analysis of non-infectious diseases such as sunburn in loquat fruits [J]. Bull Agric Sci Technol, 2020(2): 173-177.

[4] Huang FY, Lei Y, Duan JH, et al. Investigation of heat stress responses and adaptation mechanisms by integrative metabolome and transcriptome analysis in tea plants (*Camellia sinensis*) [J]. Sci Rep, 2024, 14: 10023.

[5] 邓朝军, 许奇志, 蒋际谋, 等. 高温胁迫对枇杷果皮热伤害的抗氧化特性影响 [J]. 热带亚热带植物学报, 2012, 20(5): 439-444.
Deng CJ, Xu QZ, Jiang JM, et al. Changes in antioxidant properties induced by heat injury in loquat peel under high temperature stress [J]. J Trop Subtrop Bot, 2012, 20(5): 439-444.

[6] 高雨薇, 邓朝军, 许奇志, 等. 外源褪黑素对新白8号枇杷果实日灼和果皮解剖结构的影响 [J]. 果树学报, 2024, 41(7): 1387-1400.
Gao YW, Deng CJ, Xu QZ, et al. Effects of exogenous melatonin on the sunburn and peel anatomical structure of Xinbai 8 loquat fruit [J]. J Fruit Sci, 2024, 41(7): 1387-1400.

[7] 潘德灼, 邓朝军, 吕晓杰, 等. 日灼胁迫对枇杷果皮蛋白质组的影响 [J]. 西北植物学报, 2016, 36(9): 1801-1812.
Pan DZ, Deng CJ, Lü XJ, et al. Effect of sunburn stress on pericarp proteomics in loquat fruits [J]. Acta Bot Boreali Occidentalia Sin, 2016, 36(9): 1801-1812.

[8] 刘洪涛, 黄卫东, 郝燕燕. 果实对高温逆境的响应及其信号转导机理 [J]. 中国食品学报, 2004, 4(2): 95-99.
Liu HT, Huang WD, Hao YY. Response of fruit to high temperature stress and its signal transduction mechanism [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2004, 4(2): 95-99.

[9] 刘佳, 张国薇. 四川地区果树间套作大豆高温干旱灾害分析及应对措施 [J]. 四川农业科技, 2022(10): 21-23.
Liu J, Zhang GW. Analysis and countermeasures of high temperature and drought disaster of intercropping soybean among fruit trees in Sichuan area [J]. Sichuan Agric Sci Technol, 2022(10): 21-23.

[10] Guo M, Liu JH, Ma X, et al. The plant heat stress transcription factors (HSFs): structure, regulation, and function in response to abiotic stresses [J]. Front Plant Sci, 2016, 7: 114.

[11] Chen YP, Deng CJ, Xu QZ, et al. Integrated analysis of the metabolome, transcriptome and miRNome reveals crucial roles of auxin and heat shock proteins in the heat stress response of loquat fruit [J]. Sci Hortic, 2022, 294: 110764.

[12] Wahid A, Gelani S, Ashraf M, et al. Heat tolerance in plants: an overview [J]. Environ Exp Bot, 2007, 61(3): 199-223.

[13] Wang L, Gao YH, Zhang L, et al. Reduced proteasome degradation of HsfB2a at higher temperatures is responsible for the inhibition of anthocyanin synthesis in pear [J]. Plant Cell, 2025, 37(6): koaf102.

[14] Li T, Xu SJ, Zhang YY, et al. Molecular mechanism analysis of LdHSFB2a in lily thermotolerance [J]. Stress Biol, 2025, 5: 45.

[15] Chi ZH, Zhao ML, Wang LW, et al. EjNAC25, a NAC transcription factor in early-maturing seedless triploid loquat, promotes sugar and malic acid accumulation by activating EjNI and EjtDT2 [J]. Postharvest Biol Technol, 2025, 224: 113474.

[16] Zhang HF, Wang YT, Du Y, et al. Sorbitol source-sink distribution and S6PDH regulation modulate freezing tolerance in young loquat (*Eriobotrya japonica*) fruits [J]. Plant Physiol Biochem, 2026, 231: 110945.

[17] 吴艳菊, 冷彦儒, 景思荦, 等. 利用真空侵染法在紫花苜蓿中瞬时表达*GUS*基因 [J]. 分子植物育种, 2022, 20(3): 859-864.
Wu YJ, Leng YR, Jing SL, et al. Expression of *GUS* gene in *Medicago sativa* L. by vacuum infiltration [J]. Mol Plant Breed, 2022, 20(3): 859-864.

[18] Fan ZY, Wang Y, Zhai YL, et al. ERF100 regulated by ERF28 and NOR controls pectate lyase 7, modulating fig (*Ficus carica* L.) fruit softening [J]. Plant Biotechnol J, 2025, 23(7): 2611-2626.

[19] Wang YS. A draft genome, resequencing, and metabolomes reveal the genetic background and molecular basis of the nutritional and medicinal properties of loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl) [J].

Hortic Res, 2021, 8: 231.

[20] Banin Sogvar O, Razavi F, Rabiei V, et al. Postharvest application of L-cysteine to prevent enzymatic browning of 'Stanley' plum fruit during cold storage [J]. J Food Process Preserv, 2020, 44(10): e14788.

[21] Wang ZT, Guo J, Luo WX, et al. Salicylic acid cooperates with lignin and sucrose signals to alleviate waxy maize leaf senescence under heat stress [J]. Plant Cell Environ, 2025, 48(6): 4341-4355.

[22] Gao Y, Dong X, Wang RJ, et al. Exogenous calcium alleviates oxidative stress caused by salt stress in peanut seedling roots by regulating the antioxidant enzyme system and flavonoid biosynthesis [J]. Antioxidants, 2024, 13(2): 233.

[23] Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP. Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiol, 1996, 110(1): 125-136.

[24] Siragusa S, Fontana C, Cappa F, et al. Disruption of the gene encoding glutamate dehydrogenase affects growth, amino acids catabolism and survival of *Lactobacillus plantarum* UC1001 [J]. Int Dairy J, 2011, 21(2): 59-68.

[25] Aghdam MS, Fard JR. Melatonin treatment attenuates postharvest decay and maintains nutritional quality of strawberry fruits (*Fragaria*×*anannasa* cv. Selva) by enhancing GABA shunt activity [J]. Food Chem, 2017, 221: 1650-1657.

[26] 张钰林, 刘亚敏, 刘玉民, 等. 不同品种香榧对高温的生理响应及其耐热性评价 [J]. 森林与环境学报, 2025, 45(2): 192-202.
Zhang YL, Liu YM, Liu YM, et al. Physiological responses and heat resistance of *Torreya grandis* varieties to high temperatures [J]. J For Environ, 2025, 45(2): 192-202.

[27] Gasic K, Hernandez A, Korban SS. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction [J]. Plant Mol Biol Rep, 2004, 22(4): 437-438.

[28] 杨丽萍. 植物瞬时表达系统的研究进展 [J]. 现代农业研究, 2019, 25(5): 51-52.
Yang LP. Research progress of plant transient expression system [J]. Mod Agric Res, 2019, 25(5): 51-52.

[29] 李玲, 顾恒, 岳远征, 等. 木本植物瞬时转化体系的研究进展 [J]. 分子植物育种, 2020, 18(23): 7784-7794.
Li L, Gu H, Yue YZ, et al. Advances in transient transformation systems of woody plants [J]. Mol Plant Breed, 2020, 18(23): 7784-7794.

[30] 王碧莹, 谷金芸, 霍春红, 等. 根瘤农杆菌介导的喜树叶片瞬时转化体系的建立 [J]. 分子植物育种, 2018, 16(17): 5624-5630.
Wang BY, Gu JY, Huo CH, et al. Establishment of *Agrobacterium tumefaciens* mediated transient transformation system in *Camptotheca acuminata* leaves [J]. Mol Plant Breed, 2018, 16(17): 5624-5630.

[31] Chen HY, Ji HY, Huang WK, et al. Transcription factor CrWRKY42 coregulates chlorophyll degradation and carotenoid biosynthesis in citrus [J]. Plant Physiol, 2024, 195(1): 728-744.

[32] Han YJ, Wu M, Cao LY, et al. Characterization of OfWRKY3, a transcription factor that positively regulates the carotenoid cleavage dioxygenase gene *OfCCD4* in *Osmanthus fragrans* [J]. Plant Mol Biol, 2016, 91(4/5): 485-496.

[33] 王树军, 王果, 李焕苓, 等. 农杆菌注射法瞬时转化荔枝果实组织的研究 [J]. 热带作物学报, 2019, 40(12): 2405-2410.
Wang SJ, Wang G, Li HL, et al. Transformation of tissues of litchi fruit with injection of *Agrobacterium* [J]. Chin J Trop Crops, 2019, 40(12): 2405-2410.

[34] Zhou LJ, Geng ZQ, Wang YX, et al. A novel transcription factor CmMYB012 inhibits flavone and anthocyanin biosynthesis in response to high temperatures in *Chrysanthemum* [J]. Hortic Res, 2021, 8: 248.

[35] Zhang ZJ, Yang C, Xi J, et al. The MdHSC70-MdWRKY75 module mediates basal apple thermotolerance by regulating the expression of heat shock factor genes [J]. Plant Cell, 2024, 36(9): 3631-3653.

[36] Li SC, Yuan L, Yu HB, et al. The HSFA2-HSFB2a-WRKY10 transcriptional cascade mediates thermotolerance across grape germplasms [J]. Plant Physiol, 2025: kiaf651.

[37] Sun TX, Wang WL, Chan ZL. How do cool-season turfgrasses respond to high temperature: progress and challenges [J]. Grass Res, 2024, 4: e010.

（责任编辑　高洁）