

茶树遗传转化体系研究进展

陈兰¹, 朱晨^{1,2}, 李小桢¹, 傅海峰¹, 郭玉琼^{1*}

(1. 福建农林大学园艺学院, 福建福州 350002; 2. 福建农林大学园艺植物生物工程研究所, 福建福州 350002)

摘要 茶树遗传转化技术是指应用重组 DNA 技术、细胞组织培养技术或种质系统转化技术, 有目的地将外源基因或 DNA 片段插入到茶树受体基因组中并使其在后代植株中得以表达的过程, 在茶树遗传改良、品种选育中发挥重要作用。对茶树遗传转化中受体系统建立、茶树遗传转化方法进行概述, 阐述了茶树遗传转化研究重点、方向以及当前茶树遗传转化研究所面临的转化效率低和离体再生困难的问题, 提出了原位转化技术在茶树遗传转化中的应用潜力, 从而达到优化茶树遗传转化体系的目的。

关键词 遗传转化; 外植体; 农杆菌介导法; 基因枪法

中图分类号 S571.1 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)12-0014-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.12.004



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Research Progress on Genetic Transformation System of *Camellia sinensis*

CHEN Lan¹, ZHU Chen^{1,2}, LI Xiao-zhen¹ et al (1. College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian, 350002; 2. Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002)

Abstract Genetic transformation technology of *Camellia sinensis* refers to the process of using recombinant DNA technology, cell tissue culture technology or germplasm system transformation technology to purposely insert a foreign gene or DNA fragment into the recipient genome of *Camellia sinensis* and express it in the progeny plants. It played an important role in genetic improvement and variety selection of *Camellia sinensis*. We reviewed the system of receptor regeneration and genetic transformation of *Camellia sinensis in vitro*, and recent advance in genetic transformation of *Camellia sinensis* were discussed. And also revealed the problems of low transformation efficiency and difficulty *in vitro* regeneration of the current genetic transformation research institute of *Camellia sinensis*. Consequently, planta agrobacterium mediated was proposed to achieve the purpose of optimizing the genetic transformation system of *Camellia sinensis*.

Key words Genetic transformation; Explant; Agrobacterium mediated; Bombardment mediated

植物遗传转化是指应用重组 DNA 技术、细胞组织培养技术或种质系统转化技术, 有目的地将外源基因或 DNA 片段插入到受体植物基因组中, 并使其在后代植株中得以表达的过程。植物遗传转化体系包括 3 个方面: 植物遗传转化的受体体系、植物遗传转化的方法以及转基因植株再生和检测。从 20 世纪 70 年代起, 植物遗传转化技术不断发展, 特定基因能够根据人们的意愿在植物上得以表达。遗传转化技术打破了常规育种的界限, 为改良作物、创造新品种的基因工程提供了一条新的途径, 并对提高农业经济效益提供新的思路^[1]。

茶树 [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] 属多年生异花授粉的木本植物, 目前茶树育种的主要方法仍是常规系统育种和杂交育种^[2]。但茶树的生育周期长、自交不亲和以及人工授粉成功率低等特性给育种工作带来很大限制^[3]。作为我国重要的农业经济作物, 茶树基因改良日益受到重视^[4-5]。遗传转化技术既能缩短优良品种的选育周期形成茶树的定向育种, 又能实现对茶树抗逆性状的筛选^[6]。通过遗传转化技术将目标基因导入茶树中, 培育出高产、优质和抗逆性强的茶树品种, 使茶树品种按生产和市场的需求方向培育, 从

而推动茶叶经济的发展^[7]。

1 茶树受体系统的建立

建立良好的受体系统是茶树遗传转化的重要基础。茶树受体系统的建立包括外植体的选择及外植体的消毒、培养基的选择、植物激素和外源添加物的选择、外植体褐化和调控等影响因素。

1.1 外植体的选择 选择适宜的外植体是受体系统建立的关键, 茶树外植体常见的培养方式有器官培养和愈伤组织培养, 此外茶树品种、外植体的生长状态对外植体的选择也有一定的影响。

茶树的子叶和茎段在器官培养中再生能力优于茶树其它器官。茶树子叶多用于诱导体胚, Mondal 等^[8]以子叶诱导的体胚作为转化受体, 首次获得茶树的转基因植株; Saini 等^[9]和 Lv 等^[10]相继用子叶诱导体胚进行茶树遗传转化, 也获得了转基因植株。利用茶树子叶进行遗传转化成功率较高, 但也存在缺点, 表现为部分优良的茶树品种不易产生种子, 或子叶是杂合体, 遗传背景与母体之间存在较大差异; 子叶的离体培养和遗传转化需要较长时间, Mondal 等^[8]建立的转化体系至少需要 490 d。为了保持优质、稳定的遗传背景, Sandal 等^[11]认为茶树遗传转化的受体采用茶树叶片优于子叶, 但茶树叶片的离体成活率仅 0~7.1%^[12]。而茶树茎段在茶树遗传转化具有很大的潜力, 在茶树茎段培养中, 要选择有一定成熟度、富含营养成分的茎段, 有研究表明取第二腋芽的茎段为外植体, 萌芽率最高^[13]。

茶树愈伤组织也是遗传转化中应用较多的受体材料, 不同外植体所需诱导愈伤组织的时间不同, 花药诱导愈伤组织

基金项目 福建省自然科学基金项目(2018J01701); 福建农林大学科技创新专项基金项目(CXZX2017164, CXZX2018069); 福建农林大学乡村振兴茶产业技术服务项目(11899170102); 福建省高原学科建设经费项目(102/71201801101); 茶树种质资源生化分析与生物学研究(K1518023A)。

作者简介 陈兰(1995—), 女, 福建闽侯人, 硕士研究生, 研究方向: 茶树生物技术与茶叶生物化学。* 通信作者, 副教授, 博士, 从事茶树生物技术与茶叶生物化学研究。

收稿日期 2018-12-09; **修回日期** 2018-12-20

的时间为 7~10 d,子叶和根需要 8~12 d,茎段需要 9~12 d,而叶片需要 20 d^[14]。当外植体的切口处脱分化形成浅黄色致密的愈伤组织块,就可进行农杆菌介导的茶树遗传转化,骆颖颖等^[15]以茶树叶片及茎段形成的愈伤组织为受体,采用农杆菌介导法,成功获得了 GUS 瞬时表达。但茶树愈伤组织在遗传转化中多运用于瞬时表达验证,利用愈伤组织实现转基因植株尚未报道。

在选择外植体时也要考虑到茶树品种,茶树基因型对器官分化及愈伤组织产生起关键作用。不同茶树品种的生理代谢和信号传递等基因存在差异,导致茶树的诱导率和启动率不同^[16]。陈振光等^[17]采用福云 7 号等 9 个茶树品种进行花药培养,发现仅福云 7 号可诱导出植株。袁弟顺等^[18]表明在培养条件一致的情况下,不同茶树品种的愈伤组织生长量不同,由大到小依次为福鼎大白茶、福云 595、福安大白、福鼎大毫、福云 6 号。骆颖颖等^[15]对龙井长叶等 9 个不同茶树品种的叶片进行遗传转化,结果发现仅龙井长叶和浙农 23 这 2 个茶树品种分别在不同的菌系侵染中得到 GUS 瞬时表达。此外外植体的生长状态对茶树遗传转化有重要影响,采用幼嫩的外植体较适宜,同时也要考虑外植体的恢复再生水平,张广辉等^[2]表明茶树发根诱导的最适苗龄为 70 d,苗龄因素对叶片发根的影响最大。

1.2 影响茶树受体系统建立的因素

1.2.1 外植体的消毒。在确保外植体取材适宜后,消毒是茶树受体系统建立的首要步骤,外植体有效消毒后才能实现后期正常生长及分化。依据茶树外植体选取的不同,消毒的方式也不同,对茶树叶消毒多采用 4% 次氯酸钙、0.1% 氯化汞、吐温 80 和 75% 乙醇等,及无菌水的多次冲洗^[8-9];对茶树茎段消毒多采用 70% 乙醇、0.1% 氯化汞等,及无菌水的多次冲洗^[6,12-13]。外植体消毒后,有效降低了污染率,接种在培养基上,进行后续培养工作。

1.2.2 培养基的选择。茶树离体培养中多采用 Murashige and Skoog (MS) 培养基,MS 培养基满足茶树离体培养所需要的无机盐和微量元素。杨国伟等^[19]在诱导茶树愈伤组织时选用无机盐含量高、微量元素全的 MS 培养基、无机盐中等的 Heller 培养基和无机盐含量较低的 White 培养基进行比较试验,发现 MS 培养基诱导愈伤组织含量最高,达 90%。张娅婷等^[20]利用 MS、N6 (Chu's N-6) 和 White 为基本培养基,附加相同量的维生素、氨基酸、糖及植物激素等来培育薮北茶芽苗,结果仍是 MS 培养基的诱导率较优。有研究表明将 MS 培养基的大量元素减半,利于茶树茎段的诱导和生长,也可减少茎段褐化,提高成活率^[21]。但在茶树离体培养中培养基的选择并非限于 MS 培养基,近年来 Lv 等^[10]在诱导茶树叶愈伤组织中,采用改良 ER 培养基,并于 25 ℃ 左右室温中光培养 25 d,也同样获得了优质的愈伤组织。

1.2.3 植物激素及外源添加物的选择。植物激素在茶树再生体系中发挥了重大作用,茶树离体再生的影响因素除了培养基的种类和浓度,还包括植物激素和外源添加物。植物激素是茶树组织形成、发育及分化等的主要调节物质^[22],不同

类型外植体对植物激素需求不同,并且植物激素并非单一发挥作用,而是由多种类激素相互协同、共同调节的条件下促进植物成长发育^[23]。茶树遗传转化常见的外植体包括茶树体胚、茎段及愈伤组织。在茶树体胚培养中,有研究表明添加苯硼酸 (PBOA) 和 苜基腺嘌呤 (BA),或 PBOA 和 激动素 (KIN) 可高效诱导茶树体胚增殖^[24],并且使用脱落酸 (ABA) 也可提高茶树体胚的诱导率^[25]。此外郭玉琼等^[23]发现在培养基中添加 0.5 mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 最有利于茶树体胚生长。在茎段培养中,培养基中仅添加极低浓度脱落叶灵 (TDZ) (1 pmol/L~100 nmol/L),能诱导茶树茎尖增殖和维持较高增殖率^[2],Sandal 等^[26]利用 BA 替代 TDZ 也提高了茎段的分化率,但培养基中 BA 降解后会导致芽褐化和坏死,可见 TDZ 在茶树茎段的离体再生中更具应用潜力。有研究表明高浓度 (1~10 μmol/L) 的 6-苜氨基嘌呤 (BAP) 结合 萘乙酸 (NAA) 或 吲哚丁酸 (IBA) 也能诱导茶树茎段分化^[22],此外谭和平等^[27]发现细胞分裂素 (CTK) 与 萘乙酸 (IAA) 共同使用对茶树茎段的诱导效果较好。推测在茶树茎段及体胚的离体培养中采用不同植物激素或激素组合,是由不同茶树品种对植物激素的需求不同而造成的现象。同时在茶树愈伤组织的培养中,有研究表明不同植物激素对茶树愈伤组织诱导作用大小不同,表现为 2,4-D > BA > NAA^[21]。

甜菜碱、肉桂酸、椰乳 (CM)、水解酪蛋白 (CH)、蔗糖和山梨醇等是茶树离体再生中常见营养物质^[21]。郭玉琼等^[23]研究表明在培养基中添加 3 mg/L 肉桂酸有利于茶树体胚的增殖,且蔗糖或蔗糖与山梨醇的组合也有利于茶树体胚的增殖。营养物质的添加也可显著促进芽增殖,尤其是在芽分化初始期^[2],Jha 等^[28]研究发现在培养基中添加 10% CM 和 1 000 mg/L CH 能够显著增加茎尖、子叶和分化芽的数量。并且有研究表明在愈伤组织的继代培养中添加 AgNO₃ 对转化频率的影响不大,但却与预培养的培养基存在一定的相互促进作用^[29]。在茶树离体培养中选择 MS 为基础培养基,并添加适量的植物激素、外源添加物等有利于茶树的离体培养。

1.2.4 外植体褐化及调控。外植体褐化是茶树离体培养的重点问题,有效控制褐化现象在茶树受体系统建立甚至整个茶树遗传转化体系中都至关重要。茶树外植体褐化受内部因素和外部因素的影响。

茶树基因型不同是造成外植体褐化的主要内部因素,骆颖颖等^[15]对安吉白茶等 9 个不同茶树品种进行遗传转化,发现安吉白茶叶片褐化率达 80%,福鼎大白茶达 50%。茶树的生理状态、生长季节和外植体类型等内部因素对茶树的离体培养也有影响。茶树生理状态不同,接种后褐化程度也不同,处于幼龄期的茶树外植体褐化较浅,从成年茶树植株取用的外植体褐化程度较重。茶树生长季节也很大程度影响外植体褐化,在茶树茎段培养中春季腋芽褐化率比秋季的低^[30]。此外茶树茎段最易褐化,其次是叶片,子叶褐化率最低^[2]。

培养基成分及其浓度、外源添加物和培养条件等外部因素对外植体褐化程度也有影响。MS 培养基中过高浓度的无机盐会使褐化程度加深,骆颖颖等^[15]认为将盐用量降低

至 MS 培养基半量,可有效降低外植体褐化率。在外源添加物方面,聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、维生素 C、核黄素和活性炭等是常见的抗氧化剂和吸附剂。有研究表明,在茶树外植体在接种前,使用 2.0 g/L PVP 溶液浸泡 30 min 抑制褐化的效果最佳。黄燕芬等^[31]发现在培养基中添加维生素 C 和活性炭,褐化率由 86% 下降至 41%。郭秀宏等^[32]发现培养基中添加维生素 C 虽有效降低外植体褐化率,但在加热条件下易分解出酸性物质,使培养基 pH 下降,而采用核黄素替代,降低褐化率效果更明显,由 57% 下降至 13.3%;同时,培养时间过长、温度过高以及光照过强等均会导致多酚氧化酶活性增强,从而加快褐变程度。有研究表明,在相对低温情况下(8 ℃),外植体褐化率可明显降低^[30]。此外郭玉琼等^[13]发现对茶树茎基部的切割方式也会影响褐化程度,选择横切可有效降低外植体褐化率。

2 茶树遗传转化的方法及影响因素

2.1 茶树遗传转化的方法

常规的植物遗传转化方法主要分为农杆菌介导的外源基因转化法、种质转化法和直接基因转化法 3 类。种质转化法包括花粉管通道法、生殖细胞浸泡法等;直接基因转化法包括脂质体包埋法、聚乙二醇(PEG)介导法、显微注射法、电激法、离子束法、激光微束法以及基因枪法等^[12]。其中花粉管通道法是基因工程和常规育种结合起来的方法,花粉管通道法在茶树遗传转化中有相关研究报道^[33],但转化后的结实率明显低于正常植株,技术有待进一步完善。部分 DNA 直接基因转移方法,如电击法、显微注射和 PEG 法等以原生质体为转化受体,要求高的原生质体再生频率,而茶树原生质体的再生基础研究薄弱,研究难度较大^[2]。目前茶树遗传转化的方法多采用农杆菌介导法和基因枪法^[12]。

2.1.1 农杆菌介导法(*Agrobacterium mediated*)

农杆菌做为一种天然高效的转基因载体,在植物遗传转化上应用较广^[34]。自然界中存在的农杆菌包括根癌农杆菌(*A. tumefaciens*)和发根农杆菌(*A. rhizogenes*)。根癌农杆菌的 Ti 质粒基因转化是最常见、应用最广泛的基因转化途径,转基因植物中 80% 以上是利用根癌农杆菌转化的,它具有遗传稳定、转化大片段 DNA、操作容易以及成本低等优点^[35]。自 20 世纪 90 年代以来,运用根癌农杆菌介导法成功获得多种植物抗性愈伤组织后,人们开始对茶树的遗传转化技术进行探索^[8],利用根癌农杆菌介导茶树遗传转化体系的建立,成为茶树分子育种的新方向。目前农杆菌介导的茶树遗传转化多采用根癌农杆菌,发根农杆菌的报道较少^[2]。

Mondal 等^[8]首次利用根癌农杆菌(EHA105 和 LBA4404)来感染茶树体胚,将双元质粒 p35GUS-INT 所携带的 *nptII* 基因和具有内含子的 *gus* 基因导入到茶树体胚中,筛选出具有 Kan 抗性和 GUS 活性的体胚,再经分化培养基培养出嫩梢,最后将转基因嫩梢嫁接在同种茶树茎段上,获得了转基因茶树。骆颖颖等^[15]总结前人研究得出农杆菌介导的茶树遗传转化的一般条件为:茶树外植体经 3 d 预培养,农杆菌液浓度 OD 值在 0.8 左右侵染 15 min,25 ℃ 条件下共培

养 3 d。目前利用根癌农杆菌介导茶树遗传转化,大部分仍限于瞬时表达,稳定表达技术有待提高^[12],遗传转化的检测多采用 GUS 染色法和 PCR 检测技术。

农杆菌介导茶树遗传转化的重点是农杆菌转化效率较低,产生该现象的原因是茶树中多酚类物质含量较高,农杆菌致病基因 *Vir* 基因在转化时功能消减^[6,36]。茶树中的多酚类物质具有抑菌作用和蛋白质沉淀作用。抑菌作用直接导致农杆菌的生长受到抑制,致使转化效率降低,而蛋白质沉淀作用使其对农杆菌致病基因 *Vir* 基因起拮抗作用,阻塞了农杆菌的 T-DNA 向茶树细胞运转的通道,从而间接影响农杆菌的转化效率^[6]。通过外部条件的优化可提高农杆菌的转化效率,Sandal 等^[11]研究表明采用多酚吸附剂和抗氧化剂虽不能解决农杆菌转化效率低的问题,但在共培养阶段添加适量的 L-谷氨酰胺(L-Gln),可减轻多酚类物质的抑菌作用。通过选用抗酚菌株或减少农杆菌与茶树外植体接触部位的多酚浓度等,也可提高农杆菌转化效率。茶树是一种富含多酚类物质的多年生木本植物,多酚类的抑菌作用使得农杆菌介导的茶树遗传转化困难^[37],建立一套稳定完善的农杆菌介导的茶树遗传转化体系是解决目前转化效率低的重要途径^[12]。

2.1.2 基因枪法(*bombardment-mediated or biolistic gun-mediated*)

基因枪法也叫生物弹法,是目前除了农杆菌介导法外应用最广泛的方法。与农杆菌介导法相比,基因枪法不限于受体植物的范围,载体质粒构建较为简单,转化率也较高^[29]。基因枪法的原理是将外源 DNA 包被在微小金粒或钨粒表面,利用高压作用,将微粒高速射入受体细胞或组织内,微粒上外源 DNA 进入细胞后,整合到植物染色体上得到表达,实现基因转化。基因枪轰击效率的高低与受体生理状态、轰击条件和轰击用微弹性状等因素有关^[38]。

20 世纪 90 年代,研究人员将基因枪技术首次应用到茶树遗传转化研究上,并比较了基因枪不同发射压力、入射次数对体胚再生频率的影响,结果显示:单枪入射时发射压力 1 100~1 300 psi 的再生频率在 20% ~ 30%;轰击 2 次时,1 300 psi 会造成过多伤口,不易再生新的体胚^[12]。吴姗等^[38]对茶树基因枪转化体系优化,构建制弹程序为:60 mg/mL 钨粉悬浮液 10 μL 中加入 1.6 μL 质粒 DNA (1 μg/μL),再分别加入 0.1 mol/L 的亚精胺 4 μL,2.5 mol/L 的 CaCl₂ 15 μL,最后定容至 48 μL;每次轰击上样量为 8~10 μL。此外吴姗等^[29]对基因枪介导转化茶树愈伤的参数优化,得出:每枪 DNA 和钨粉用量分别为 0.25、125 μg 可得到较高转化率;在轰击压力 7MPa,射程 5 cm 的条件下,不论对 GUS 瞬时表达还是愈伤再生都是较为适合的轰击条件。并且 Saini 等^[9]利用入射压力 7.58 MPa、轰击距离 9 cm 的参数将质粒 DNA 1.0 μg 轰入茶树体胚,也可成功获得目标基因的表达。

2.2 影响茶树遗传转化的因素

遗传转化过程中一般经预培养、共培养(农杆菌介导法需要)、抗性筛选以及转基因再生等多个环节。侵染茶树外植体时农杆菌菌种、菌液浓度和

侵染时间及共培养时间、温度、光照条件和真空度等都会对茶树遗传转化效率产生影响^[38]。为了获得高效稳定的转化体系,茶树外植体进行农杆菌浸染、基因枪轰击的条件需进一步优化。

2.2.1 预培养条件。茶树遗传转化的预培养条件包括预培养时间、基本培养基以及外源添加物。茶树外植体在进行农杆菌侵染前,进行一段时间的预培养可使外植体处于感受态,有效提高转化率。有研究表明 2~3 d 的预培养时间最适宜,此外以 MS 培养基为基础培养基,并添加适量的 PVP,可显著提高转化效率^[38]。此外张根义等^[39]利用农杆菌转化烟草中发现,预培养的培养基中含有 Ca^{2+} 可诱导外植体处于感受态,使转化效率提高;而吴姍等^[38]在农杆菌介导茶树遗传转化中也在预培养的培养基中添加 CaCl_2 ,但转化率明显降低,推测茶树是嫌钙植物,对 Ca^{2+} 的敏感度比烟草高。

2.2.2 共培养条件。茶树遗传转化的共培养条件包括共培养时间、基本培养基以及外源添加物。共培养是农杆菌介导的茶树遗传转化的关键,有研究表明共培养 2 d 最有利于提高茶树的转化效率^[10]。常见共培养的培养基为 MS 培养基,但存在着诱导频率低、重复性差等问题。共培养培养基使用 YEB 培养基效果更佳,张广辉等^[40]以 YMB 为共培养的培养基,获得了高的发根诱导频率,Lv 等^[10]对比 YEB 培养基和 ER 培养基,发现使用 YEB 培养基转化率较高。

共培养阶段添加适量的外源添加物可促进转化率的提高。乙酰丁香酮(AS)是共培养中常见的外源添加物,AS 可诱导农杆菌中 *Vir* 基因以及 Ti 质粒上 *repABC* 操纵子的表达,促进农杆菌侵染并提高转化率^[41]。Hiei 等^[42]认为添加 AS 是促使农杆菌介导水稻转化的关键;茶树中酚类物质很大程度上限制了农杆菌的转化率,但添加适量 AS 也可茶树的转化率。项威等^[6]研究表明,添加 100 $\mu\text{mol/L}$ AS 对茶树愈伤组织转化最有利。近年来 Lv 等^[10]发现 150 $\mu\text{mol/L}$ AS 对茶树愈伤组织的转化最适宜,而浓度过高的 AS,会导致外植体的中毒死亡。有研究表明糖类物质可协助 AS 等物质诱导高水平的 *Vir* 基因表达,提高茶树的转化率^[43]。此外程振东等^[44]研究表明,添加 AgNO_3 可提高农杆菌转化甘蓝型油菜的效率;而赵东等^[45]在茶树中同样添加 AgNO_3 ,发现非但不能促进茶树转化率或 GUS 瞬时表达,反而使其降低,推测 Ag^+ 对农杆菌具有毒害作用,导致转化率和 GUS 瞬时表达降低。

2.2.3 脱菌抗生素的选择。在农杆菌介导的茶树遗传转化中,使用脱菌抗生素能有效抑制农杆菌活性,防止其危害茶树组织及细胞^[46]。分析不同种类脱菌抗生素对农杆菌的抑菌效果及外植体对抗生素浓度的敏感度是建立农杆菌介导茶树遗传转化体系的关键。茶树遗传转化中常见脱菌抗生素有头孢霉素(Cef)、羧苄青霉素(Car)、潮霉素(Hyg)和特美汀(Tim)等。Mondal 等^[8]研究表明 Cef 和 Car 协同使用,可抑制根癌农杆菌(EHA105 和 LBA4404)的活性,且对茶树体胚生长和器官发生的影响不显著。田丽丽等^[47]研究表明 Tim 300 mg/L 较 Cef 400 mg/L 与 Hyg 15 mg/L 协同使用更有

效抑制根癌农杆菌(GV3101),且显著促进茶树体胚增殖。研究表明单一抗生素的使用会使农杆菌产生抗药性,抗生素混合使用能有效减少农杆菌的抗药性^[48],根据不同农杆菌选择适合的抗生素并交替使用,可有效降低农杆菌抗药现象的发生。

2.2.4 筛选试剂的选择。在选择培养基中使用筛选试剂会产生一定的选择压力,致使未转化的外植体生长发育不良最终死亡。筛选试剂浓度依据外植体类型不同而存在差异^[15],茶树遗传转化中常见筛选试剂为卡那霉素(Kan)和潮霉素(Hyg),且 Hyg 的筛选效果优于 Kan。赵东等^[45]研究表明当叶片愈伤组织切成足够小薄片,Kan 才会起到筛选作用。骆颖颖等^[15]也发现茶树愈伤组织对 Kan 不敏感,当 Kan 浓度高达到 200 mg/L 时,未转化的愈伤组织仍未完全死亡;而 Hyg 浓度仅 20 mg/L,即可使未转化的愈伤组织几乎不生长,并且 14 d 后未转化的愈伤组织全部褐化死亡。

3 小结与讨论

茶树遗传转化体系面临的主要问题是离体再生难和转化效率低^[3]。茶树遗传转化的受体多采用体胚、茎段和愈伤组织等,外植体的离体再生率仍有待提高。茶树体胚和茎段是最具潜力的受体材料,但茶树茎段诱导率较低,体胚运用仍较广泛,如 Mondal 等^[8]、Jeyaramraja 等^[49]和 Singh 等^[50]均利用茶树体胚成功获得了转基因茶树,但存在的问题是体胚遗传背景与母体之间有较大差异且诱导周期长。茶树愈伤组织的遗传转化多应用于 GUS 瞬时表达验证,从愈伤组织实现植株再生是茶树等木本植物需突破的重要技术瓶颈。原位转化技术是直接将茶树活体与农杆菌接触,减缓了酚类物质的抑菌作用,其根本特点在于不需组织或细胞培养手段,而达到植物在活体状态下的转化^[51]。目前原位转化技术在植物遗传转化技术中研究较广泛,拟南芥^[52]、苜蓿^[53]、白菜^[54]和萝卜^[55]等植物上均有相关研究进展,而茶树采用农杆菌介导的遗传转化效率低的原因是由于茶树组织中的酚类物质具有杀菌作用,从而抑制农杆菌侵染率,茶树遗传转化中采用原位转化技术的研究较少,Alagarsamy 等^[56]利用发根农杆菌对 60 d 龄的茶树品种“农抗早”的下胚轴进行侵染,并保持在高湿环境中进行培养,60 d 后 88.3% 侵染部位发育成毛状根。因此将农杆菌介导的原位转化技术应用到茶树转基因中具有前景。

茶树对农杆菌不敏感,转化效率偏低是农杆菌介导的遗传转化的主要难题^[29],基因枪介导的遗传转化的转化率较农杆菌介导的高,但此项技术仍需完善,如仪器可控性、准确性、精确性和轰击后进入受体细胞 DNA 的生物学变化及其调控机理等^[6]。吴姍等^[29]发现利用农杆菌侵染和基因枪轰击相结合的技术,比起两种方法单独使用,更有助于提高茶树的转化率,农杆菌侵染与基因枪轰击相结合能有效提高转化率,可将这两项技术充分发挥在茶树遗传转化的研究中。此外花粉管通道法在茶树遗传转化也有待完善,应避免人工处理时对花器造成的机械伤害,提高转化后的结实率^[33]。此外可借鉴在其他植物中应用的生殖细胞浸泡法、PEG 介导

法、显微注射技术、电激法、离子束法和激光微束法等遗传转化技术,填补茶树遗传转化技术空白。

茶树次生代谢产物种类繁多且在生化分析上取得较多成果^[57-58],但重要次生代谢产物的代谢途径及基因调控方面的研究较少,可通过茶树遗传转化技术,完善建立转基因体系,研究茶树次生代谢的基因调控^[12]。此外,利用茶树遗传转化技术也可进行茶树抗逆能力改良,将抗病虫、抗寒、抗旱等基因导入茶树中来提高茶树抗性,如利用遗传转化技术将抗病虫基因(*Bt* 基因)导入茶树中,提高茶树抗病虫能力,获得抗病虫转基因新品种,有效降低茶叶的农残问题^[59],从根源上提高茶树抗性,培育出具有高产、优质和适宜当地环境的新品种,使茶树品种选育满足生产和市场的需求。

参考文献

- [1] 马伯军,徐根娣,袁妙葆.高等植物遗传转化的研究进展[J].浙江师大学报(自然科学版),1994,17(4):61-66.
- [2] 张广辉,吕才有,段红星.茶树离体植株再生与遗传转化[J].分子植物育种,2010,8(2):345-349.
- [3] MONDAL T K, BHATTACHARYA A, LAXMIKUMARAN M, et al. Recent advances of tea (*Camellia sinensis*) biotechnology [J]. Plant cell, tissue and organ culture, 2004, 76(3): 195-254.
- [4] WEI C L, YANG H, WANG S B, et al. Draft genome sequence of *Camellia sinensis* var. *sinensis* provides insights into the evolution of the tea genome and tea quality [J]. Proceedings of the national academy of sciences, 2018, 115(18): 4151-4158.
- [5] XIA E H, ZHANG H B, SHENG J, et al. The tea tree genome provides insights into tea flavor and independent evolution of caffeine biosynthesis [J]. Molecular plant, 2017, 10(6): 866-877.
- [6] 项斌, 史成颖, 贺志荣, 等. 根癌农杆菌介导茶树转基因体系的建立 [J]. 安徽农业大学学报, 2012, 39(5): 721-724.
- [7] 廖书娟, 李华钧, 吉当玲. 基因工程在茶树育种中的应用 [J]. 茶叶科学技术, 2004(4): 6-8.
- [8] MONDAL T, BHATTACHARYA A, AHUJA P, et al. Transgenic tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze cv. Kangra Jat] plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos [J]. Plant cell reports, 2001, 20(8): 712-720.
- [9] SAINI U, KAUR D, BHATTACHARYA A, et al. Optimising parameters for biolistic gun-mediated genetic transformation of tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] [J]. The journal of horticultural science and biotechnology, 2012, 87(6): 605-612.
- [10] LV Q R, CHEN C S, XU Y J, et al. Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation systems in tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. Horticultural plant journal, 2017, 3(3): 105-109.
- [11] SANDAL I, SAINI U, LACROIX B, et al. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of tea leaf explants; Effects of counteracting bactericidality of leaf polyphenols without loss of bacterial virulence [J]. Plant cell reports, 2007, 26(2): 169-176.
- [12] 谭和平, 周李华, 钱杉杉, 等. 茶树转基因技术研究进展 [J]. 植物科学学报, 2009, 27(3): 323-326.
- [13] 郭玉琼, 赖钟雄, 吕柳新, 等. 福建乌龙茶种质离体保存研究 [J]. 成年茎段无菌系建立 [J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2008, 37(6): 587-591.
- [14] 成浩, 李素芳. 茶树组织培养再生技术的研究 [J]. 中国茶叶, 1996(3): 28-30.
- [15] 骆颖颖, 梁月荣. *Bt* 基因表达载体的构建及对茶树遗传转化的研究 [J]. 茶叶科学, 2000, 20(2): 141-147.
- [16] 杨亚萍. 茶树组织培养技术及遗传转化中抑菌剂选择 [D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [17] 陈振光, 廖惠华. 茶树花药培养诱导单倍体植株的研究 [J]. 福建农业学报, 1988, 17(3): 185-190.
- [18] 袁弟顺, 林丽明, 孙咸江, 等. 不同品种茶树愈伤组织的培养与茶氨酸的积累 [J]. 福建农业大学学报(自然科学版), 2004, 33(2): 178-181.
- [19] 杨国伟, 兰蓉, 王晓杰, 等. 茶树愈伤组织诱导和组织培养 [J]. 江苏农业科学, 2006(4): 122-124.
- [20] 张婷婷, 张伟. 薷北茶的组织培养 [J]. 周口师范学院学报, 2004, 21(5): 74-76.
- [21] 吴扬, 邓婷婷, 黄建安. 茶树组织培养的影响因素及应用展望 [J]. 茶叶通讯, 2009, 36(2): 14-17.
- [22] 岳川, 曾建明, 章志芳, 等. 茶树中植物激素研究进展 [J]. 茶叶科学, 2012, 32(5): 382-392.
- [23] 郭玉琼, 黄道斌, 常笑君, 等. 铁观音茶树体胚发生及其内源激素变化 [J]. 应用与环境生物学报, 2018, 24(4): 824-832.
- [24] PONSAMUEL J, SAMSON N P, GANESHAN P S, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from the immature cotyledonary tissues of cultivated tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) [J]. Plant Cell Rep, 1996, 16(3/4): 210-214.
- [25] AKULA A, AKULA C, BATESON M. Betaine a novel candidate for rapid induction of somatic embryogenesis in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) [J]. Plant growth regulation, 2000, 30(3): 241-246.
- [26] SANDAL I, BHATTACHARYA A, AHUJA P S. An efficient liquid culture system for tea shoot proliferation [J]. Plant cell, tissue and organ culture, 2001, 65(1): 75-80.
- [27] 谭和平, 余桂容, 杜文平, 等. 不同茶树品种组培快繁技术研究 [J]. 西南农业学报, 2003, 16(1): 102-104.
- [28] JHA T, SEN S K. Micropropagation of an elite Darjeeling tea clone [J]. Plant Cell Rep, 1992, 11(2): 101-104.
- [29] 吴姗, 梁月荣, 陆建良, 等. 基因枪及其与农杆菌相结合的茶树外源基因转化条件优化 [J]. 茶叶科学, 2005, 25(4): 255-264.
- [30] 雷攀登, 孙俊, 张正竹. 茶树腋芽初代培养过程中外植体褐化的控制措施研究 [J]. 茶业通报, 2010, 32(3): 101-104.
- [31] 黄燕芬, 周国兰, 赵华富. 降低茶树组织培养中外植体褐化程度的研究 [J]. 西南农业学报, 2009, 22(5): 1492-1495.
- [32] 郭秀宏, 李中林, 陈正明, 等. 茶树组织培养中外植体褐化控制的研究 [J]. 西南农业学报, 2012, 25(3): 1065-1068.
- [33] 李玲玲, 江昌俊, 房婉萍, 等. 花粉管通道法对茶树进行 dsTCS 基因转化的初步研究 [J]. 安徽农业大学学报, 2007, 34(1): 20-22.
- [34] DUNWELL J M. Transgenic approaches to crop improvement [J]. J Exp Bot, 2000, 51: 487-496.
- [35] INGELBRECHT I, BREYNE P, VANCOMPERNOLLE K, et al. Transcriptional interference in transgenic plants [J]. Gene, 1991, 109(2): 239-242.
- [36] 梁月荣, 石萌. 茶树遗传育种研究进展 [J]. 茶叶科学, 2015, 35(2): 103-109.
- [37] 邓婷婷, 吴扬, 黄建安. 发根农杆菌转化茶树细胞的应用前景 [J]. 茶叶通讯, 2009, 36(2): 44-47.
- [38] 吴姗, 梁月荣, 陆建良, 等. 茶树农杆菌转化系统和基因枪转化系统的优化 [J]. 茶叶科学, 2003, 23(1): 6-10.
- [39] 张根义, 徐武, 李鸣, 等. 植物细胞感受态研究初探(简报) [J]. 农业生物技术学报, 1997, 5(1): 100-103.
- [40] 张广辉, 梁月荣, 陆建良. 发根农杆菌介导的茶树发根高频诱导与遗传转化 [J]. 茶叶科学, 2006, 26(1): 1-10.
- [41] MCCULLEN C A, BINNS A N. *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006, 22: 101-127.
- [42] HIEI Y, OHTA S, KOMARI T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA [J]. Plant J, 1994, 6(2): 271-282.
- [43] 邓婷婷, 吴扬, 黄建安. 发根农杆菌转化茶树细胞的应用前景 [J]. 茶叶通讯, 2009, 36(2): 44-47.
- [44] 程振东, 卫志明, 许智宏. 根癌农杆菌对甘蓝型油菜的转化及转基因植株的再生 [J]. 植物学报, 1994, 36(9): 657-663.
- [45] 赵东, 刘祖生, 陆建良, 等. 根癌农杆菌介导茶树转化研究 [J]. 茶叶科学, 2001, 21(2): 108-111.
- [46] BHATTACHARYA A, SAINI U, JOSHI R, et al. Osmotin-expressing transgenic tea plants have improved stress tolerance and are of higher quality [J]. Transgenic research, 2014, 23(2): 211-223.
- [47] 田丽丽, 李娟, 张静, 等. 农杆菌介导茶树遗传转化中抗生素种类和浓度优化 [J]. 分子植物育种, 2017, 15(3): 934-937.
- [48] 任艳, 王辉, 石延茂, 等. 抗生素在花生组织培养中的抑菌效应研究 [J]. 山东农业科学, 2011(10): 74-75, 81.
- [49] JEYARAMAJA P R, MEENAKSHI S N. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic tissues of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) [J]. Plant Mol Biol Rep, 2005, 23(3): 299-300.
- [50] SINGH H R, BHATTACHARYA N, AGARWALA N, et al. Exogenous gene transfer in Assam tea [*Camellia assamica* (Masters)] by *Agrobacterium*-mediated transformation using somatic embryo [J]. Eur J Exp Biol, 2014, 4: 166-175.

- 3 α inhibits protein kinase B/Akt activation and suppresses Akt-activated cancer[J].Cancer research,2006,66(6):3096-3105.
- [50] SCHULTZ J,IBRAHIM S M,VERA J,et al.14-3-3 σ gene silencing during melanoma progression and its role in cell cycle control and cellular senescence[J].Mol Cancer,2009,8:1-13.
- [51] LODYGIN D,DIEBOLD J,HERMEKING H.Prostate cancer is characterized by epigenetic silencing of 14-3-3sigma expression[J].Oncogene,2004,23(56):9034-9041.
- [52] MHAWECH P,BENZ A,CERATO C,et al.Downregulation of 14-3-3sigma in ovary,prostate and endometrial carcinomas is associated with CpG island methylation[J].Mod Pathol,2005,18(3):340-348.
- [53] LUO J,FENG J,LU J,et al.Aberrant methylation profile of 14-3-3 sigma and its reduced transcription/expression levels in Chinese sporadic female breast carcinogenesis[J].Med Oncol,2010,27(3):791-797.
- [54] FERGUSON A T,EVRON E,UMBRICHT C B,et al.High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 sigma locus leads to gene silencing in breast cancer[J].Proc Natl Acad Sci USA,2000,97(11):6049-6054.
- [55] YE M,HUANG T,YING Y,et al.Detection of 14-3-3 sigma (σ) promoter methylation as a noninvasive biomarker using blood samples for breast cancer diagnosis[J].Oncotarget,2017,8(6):9230-9242.
- [56] NADERI A.C1orf64 is a novel androgen receptor target gene and coregulator that interacts with 14-3-3 protein in breast cancer[J].Oncotarget,2017,8(34):57907-57933.
- [57] SINGRANG N,KITTISENACHAI S,ROYTRAKUL S,et al.NOTCH1 regulates the viability of cholangiocarcinoma cells via 14-3-3 theta[J].J Cell Commun Signal,2019,13(2):245-254.
- [58] MAXWELL S A,CHERRY E M,BAYLESS K J.Akt,14-3-3zeta,and vimentin mediate a drug-resistant invasive phenotype in diffuse large B-cell lymphoma[J].Leuk Lymphoma,2011,52(5):849-864.
- [59] LI Z G,ZHAO J,DU Y H,et al.Down-regulation of 14-3-3zeta suppresses anchorage-independent growth of lung cancer cells through anoikis activation[J].Proc Natl Acad Sci USA,2008,105(1):162-167.
- [60] CHATTERJEE D,GOLDMAN M,BRAASTAD C D,et al.Reduction of 9-nitrocampothecin-triggered apoptosis in DU-145 human prostate cancer cells by ectopic expression of 14-3-3zeta[J].Int J Oncol,2004,25(2):503-509.
- [61] ROOT A,BEIZAEI A,EBHARDT H A.Structure-based assessment and network analysis of targeting 14-3-3 proteins in prostate cancer[J].Mol Cancer,2018,17(1):156.
- [62] EBHARDT H A,ROOT A,LIU Y S,et al.Systems pharmacology using mass spectrometry identifies critical response nodes in prostate cancer[J].NPJ Syst Biol Appl,2018,4:26.
- [63] CHOI H S,JEONG E H,LEE T G,et al.Autophagy inhibition with mTOR inhibitor enhances cell cycle arrest and apoptosis induced by mTOR or epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer cells[J].Tuberc Respir Dis (Seoul),2013,75(1):9-17.
- [64] KIDD M E,SHUMAKER D K,RIDGE K M.The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer[J].Am J Respir Cell Mol Biol,2014,50(1):1-6.
- [65] ZHONG J T,KONG X X,ZHANG H Y,et al.Inhibition of CLIC4 enhances autophagy and triggers mitochondrial and ER stress-induced apoptosis in human glioma U251 cells under starvation[J].PLoS One,2012,7(6):1-10.
- [66] HE C L,BIAN Y Y,XUE Y,et al.Pyruvate kinase M2 activates mTORC1 by phosphorylating AKT1S1[J].Sci Rep,2016,6:215-241.
- [67] WANG R C,WEI Y,AN Z,et al.Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation[J].Science,2012,338(6109):956-959.
- [68] FETTWEIS G,DI VALENTIN E,L' HOMME L,et al.RIP3 antagonizes a TSC2-mediated pro-survival pathway in glioblastoma cell death[J].Biochim Biophys Acta Mol Cell Res,2017,1864(1):113-124.
- [69] MARCHAND B,ARSENAULT D,RAYMOND-FLEURY A,et al.Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) inhibition induces pro-survival autophagic signals in human pancreatic cancer cells[J].J Biol Chem,2015,290(9):5592-5605.
- [70] BODEN G,DUAN X,HOMKO C,et al.Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese,insulin-resistant individuals[J].Diabetes,2008,57(9):2438-2444.
- [71] INSENER M,MONTES-NIETO R,VILARRASA N,et al.A nontargeted proteomic approach to the study of visceral and subcutaneous adipose tissue in human obesity[J].Mol Cell Endocrinol,2012,363(1/2):10-19.
- [72] LIM G E,ALBRECHT T,PISKE M,et al.14-3-3 ζ coordinates adipogenesis of visceral fat[J].Nat Commun,2015,6:1-19.
- [73] DIALLO K,OPPOG A K,LIM G E.Can 14-3-3 proteins serve as therapeutic targets for treatment of metabolic diseases? [J].Pharmacological research,2019,139:199-206.
- [74] THANDAVARAYAN R A,GIRIDHARAN V V,SARI F R,et al.Depletion of 14-3-3 protein exacerbates cardiac oxidative stress, inflammation and remodeling process via modulation of MAPK/NF-kB signaling pathways after streptozotocin-induced diabetes mellitus[J].Cell Physiol Biochem,2011,28(5):911-922.
- [75] WATANABE K,THANDAVARAYAN R A,GURUSAMY N,et al.Role of 14-3-3 protein and oxidative stress in diabetic cardiomyopathy[J].Acta Physiol Hung,2009,96(3):277-287.
- [76] KAPLAN A,OTTMANN C,FOURNIER A E.14-3-3 adaptor protein-protein interactions as therapeutic targets for CNS diseases[J].Pharmacol Res,2017,125(Pt B):114-121.
- [77] GU Y,MI W,GE Y,et al.GlcNAcylation plays an essential role in breast cancer metastasis[J].Cancer Res,2010,70(15):6344-6351.
- [78] MI W Y,GU Y C,HAN C F,et al.O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy[J].Biochim Biophys Acta,2011,1812(4):514-519.
- [79] FERRER C M,LYNCH T P,SODI V L,et al.O-GlcNAcylation regulates cancer metabolism and survival stress signaling via regulation of the HIF-1 pathway[J].Mol Cell,2014,54(5):820-831.

(上接第 18 页)

- [51] 刘凡,王国英,曹鸣庆.农杆菌介导的植物原位转基因方法研究进展[J].分子植物育种,2003,1(1):108-116.
- [52] FELDMANN K A,DAVID MARKS M.*Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*:A non-tissue culture approach[J].Molecular & general genetics,1987,208(1/2):1-9.
- [53] TRIEU A T,BURLEIGH S H,KARDAILSKY L V,et al.Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*[J].The plant journal,2000,22(6):531-541.
- [54] QING C M,FAN L,LEI Y,et al.Transformation of Pakchoi (*Brassica rapa* L.ssp.chinensis) by *Agrobacterium* infiltration[J].Molecular breeding,2000,6(1):67-72.
- [55] CURTIS I S,NAM H G.Transgenic radish (*Raphanus sativus* L.longipinnatus Bailey) by floral-dip method-plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency[J].Transgenic research,2001,10(4):363-371.
- [56] ALAGARSAMY K,SHAMALA L F,WEI S.Protocol:High-efficiency *in-planta Agrobacterium*-mediated transgenic hairy root induction of *Camellia sinensis* var.sinensis[J].Plant methods,2018,14(1):1-7.
- [57] PARK J,KIM J,HAHN B,et al.EST analysis of genes involved in secondary metabolism in *Camellia sinensis* (tea), using suppression subtractive hybridization[J].Plant science,2004,166(4):953-961.
- [58] LI C F,ZHU Y,YU Y,et al.Global transcriptome and gene regulation network for secondary metabolite biosynthesis of tea plant (*Camellia sinensis*) [J].BMC Genomics,2015,16(1):1-21.
- [59] 郭玉琼,赖钟雄,郭志雄,等.茶树生物技术研究进展[J].福建农林大学学报(自然科学版),2002,31(4):470-475.