

农杆菌介导的香榧幼胚遗传转化体系

周佳君^{1,2}, 胡恒康^{1,2}, 龚 丽^{1,2}, 干安格^{1,2}, 喻卫武^{1,2}, 吴家胜^{1,2}, 黄坚钦^{1,2}, 张启香^{1,2}

(1. 浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江农林大学 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】以香榧 *Torreya grandis* ‘Merrillii’ 幼胚为受体材料, 开展农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 介导的遗传转化研究, 揭示影响香榧遗传转化的关键因素, 以建立农杆菌介导的香榧幼胚遗传转化体系。【方法】以香榧种子突破种鳞后第 8 周至第 11 周的幼胚作为转基因受体材料, 比较受体胚龄、农杆菌菌液浓度、侵染时间、抗生素质量浓度对遗传转化效率的影响, 并采用潮霉素、绿色荧光蛋白 GFP 表达及 GFP 基因聚合酶链式反应对遗传转化香榧幼胚培养物进行阳性筛选。【结果】随着胚龄的增加, 香榧幼胚抗性增强, 污染率降低, 成活率提高, 第 10 周和第 11 周幼胚成活率分别为 52.1% 和 52.3%。农杆菌菌液浓度和侵染时间均对香榧幼胚的污染率、成活率、愈伤组织诱导率以及体胚发生率具有显著影响 ($P < 0.05$)。菌液吸光度 [$D(600)$] 为 0.5 时, 香榧幼胚愈伤组织诱导率和体胚发生率最高, 分别为 17.9% 和 17.3%; 侵染时间为 10 min 时, 愈伤组织诱导率和体胚发生率为最高, 分别达 17.5% 和 17.1%。羧苄青霉素对于受体材料的农杆菌脱除具有显著影响 ($P < 0.05$), 当羧苄青霉素质量浓度为 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 成活率、愈伤组织诱导率和体胚发生率均最高, 分别为 60.5%、15.8% 和 17.5%。潮霉素对于香榧幼胚培养物的阳性筛选具有良好的效果, 当潮霉素质量浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 成活率为 30.5%。【结论】不同胚龄香榧幼胚遗传转化效果不同, 突破种鳞后第 10 周香榧幼胚遗传转化效果良好; 当农杆菌菌液 $D(600)$ 为 0.5, 侵染时间为 10 min 时, 转化效果最佳; $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为羧苄青霉素脱除农杆菌的最佳质量浓度; $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 是潮霉素阳性香榧幼胚筛选的最佳质量浓度。图 3 表 5 参 37

关键词: 香榧; 幼胚; 农杆菌介导的遗传转化; 羧苄青霉素; 潮霉素

中图分类号: S722.3 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2022)01-0013-09

Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation system of *Torreya grandis* ‘Merrillii’ immature embryos

ZHOU Jiajun^{1,2}, HU Hengkang^{1,2}, GONG Li^{1,2}, GAN Ange^{1,2}, YU Weiwu^{1,2},
WU Jiasheng^{1,2}, HUANG Jianqin^{1,2}, ZHANG Qixiang^{1,2}

(1. College of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] The purpose is to explore genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* using *Torreya grandis* ‘Merrillii’ immature embryos as receptors, so as to reveal key factors affecting its genetic transformation and establish *A. tumefaciens* mediated transformation system of *T. grandis* ‘Merrillii’ embryos. [Method] The immature embryos of *T. grandis* ‘Merrillii’ seeds of 8 to 11 weeks after breaking through seed scales were used as transgenic acceptors. The effects of embryo age, *A. tumefaciens* concentration, infection time and antibiotic concentration on genetic transformation efficiency were compared. Hygromycin,

收稿日期: 2021-03-01; 修回日期: 2021-07-06

基金项目: 浙江省重点研发计划项目 (2021C02037); 中央财政林业科技推广示范项目 ([2014] TS 01); 浙江省科技厅重大专项 (2016C02052-12); 浙江省科技厅重点研发项目 (2018C02004)

作者简介: 周佳君 (ORCID: 0000-0003-3868-0948), 从事林木组织培养研究。E-mail: 769826448@qq.com。通信作者: 张启香 (ORCID: 0000-0002-6657-5101), 教授, 博士, 从事植物发育分子生物学研究。E-mail: qxzhang@zafu.edu.cn

GFP fluorescent expression and GFP gene polymerase chain reaction were used for positive screening and selection of immature embryo culture. [Result] The stress resistance increased, the contamination rate decreased and the survival rate increased with the increase of embryo age. The survival rates of 10-week and 11-week young embryos were 52.1% and 52.3%, respectively. The contamination rate, survival rate, callus induction rate and somatic embryogenesis rate of young embryos were significantly affected by the concentration of *A. tumefaciens* and infection time ($P < 0.05$). When the liquid optical density [$D(600)$] was 0.5, the callus induction rate and somatic embryogenesis rate of young embryos were the highest, which were 17.9% and 17.3% respectively. When the infection time was 10 minutes, the callus induction rate and somatic embryogenesis rate were the highest, reaching 17.5% and 17.1% respectively. Carbenicillin had a significant effect on the removal of *A. tumefaciens* ($P < 0.05$). When the concentration was $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the survival rate, callus induction rate and somatic embryogenesis rate were the highest, which were 60.5%, 15.8% and 17.5% respectively. The concentration of hygromycin in different treatments had a good effect on the positive screening of young embryo culture. The survival rate was 30.5% when the concentration of hygromycin was $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. [Conclusion] Immature embryos at the 10th week after the breakthrough of scale, 0.5 [$D(600)$], 10 minutes duration, $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ carbenicillin, and $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ hygromycin were the optimum conditions for genetic transformation of *T. grandis* 'Merrillii'. [Ch, 3 fig. 5 tab. 37 ref.]

Key words: *Torreya grandis* 'Merrillii'; immature embryos; *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation; carbenicillin; hygromycin

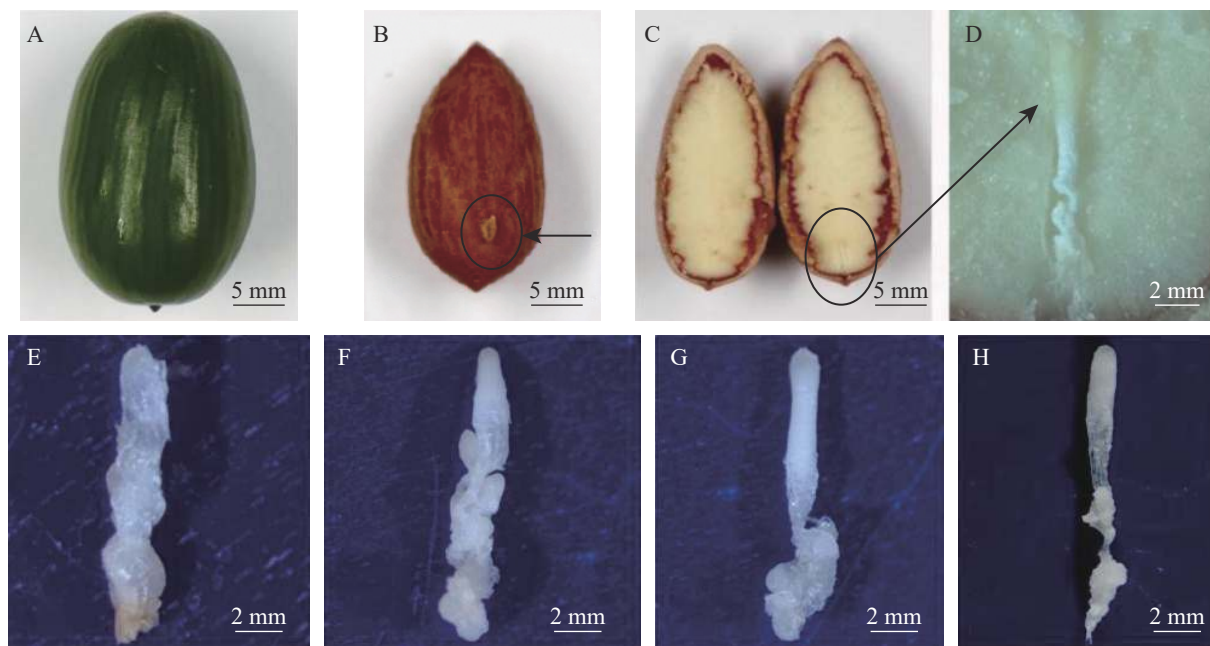
香榧 *Torreya grandis* 'Merrillii' 隶属于红豆杉科 Taxaceae 榧树属 *Torreya* 常绿乔木, 是中国特有的珍稀坚果植物, 具有重要的经济、社会和生态价值^[1]。由于香榧生物学周期长, 性状易受环境等因子影响, 限制了其育种工作的开展。目前, 有关香榧体胚诱导、增殖和离体器官培养再生植株的研究已有一定进展, 但关于利用基因工程改良香榧育种的研究尚未见报道^[2]。基因工程是生物技术的核心, 利用基因工程进行林木遗传改良, 以提高作物产量、改善品质、增强抗性是林木分子育种的最有效途径之一^[3]。1986年, 研究人员通过农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 介导法在杨树 *Populus trichocarpa* × *deltoides* 中成功开展遗传转化, 开创了林木遗传转化研究的先河^[4]。目前, 林木基因转化方法已达 10 余种, 其中, 农杆菌介导法因具有操作简单、拷贝数低、转化效率高、重复性好、发生基因沉默率低等优点而被广泛应用^[5]。随着木本植物遗传转化研究的不断发展, 苹果 *Malus pumila* 等重要果树农杆菌介导的遗传转化体系也相继建立, 为经济林果树种定向育种提供了高效的方法和手段。1989年, 率先成功实现苹果转基因^[6], 包括早花、矮化、抗病等基因的转化, 且有多个品种已成功获得转基因植株。1996年, 梨 *Pyrus communis* 的遗传转化首见报道^[7]。目前, 在豆梨 *P. calleryana* 和砂梨 *P. pyrifolia* 等均有报道。此外, 樱桃 *Prunus cerasus*、李 *P. salicina* 等其他水果也实现了遗传转化。然而, 果树的遗传转化研究大多数集中于水果, 对于坚果树种遗传转化的研究尚处于起步阶段^[8]。坚果为包裹着坚硬外壳的植物种子统称^[9]。坚果类食品富含不饱和脂肪酸, 具有较好的抗氧化和抗衰老活性, 对心脑血管等疾病具有良好的预防作用^[10]。坚果分为树坚果和籽坚果。树坚果是指具有坚硬外壳的木本植物的籽粒, 包括核桃 *Juglans regia*、巴旦木 *Amygdalus communis*、榛子 *Corylus heterophylla*、山核桃 *Carya cathayensis*、香榧等。坚果树种多数为多年生木本植物, 组织细胞中含有大量的酚类化合物和单宁等物质, 导致采用基因工程技术进行种质资源创新难度较大^[11]。目前, 树坚果中核桃的基因工程技术研究进展最为深入。自从 MCGRANAHAN 等^[12]1988 年成功开展了农杆菌介导的核桃遗传转化以来, 科学家已对多个核桃树种进行了基因组测序^[13-14], 构建了良好的遗传转化体系^[15], 并对多个重要基因开展了功能验证, 获得了多份创新种质资源, 开创了果树基因工程的新局面^[16]。香榧作为一种重要的树坚果, 基因工程研究进展缓慢, 遗传转化体系尚不成熟, 限制了香榧种质创新和产业发展。本研究以香榧幼胚为转基因受体材料, 从幼胚胚龄的选择、农杆菌侵染浓度和时间、羧苄青霉素质量浓度以及阳性筛选时潮霉素质量浓度对香榧遗传转化条件进行探索和优化, 利用绿色荧光蛋白 (GFP) 信号检测分析转化效率, 并通过聚合酶链式

反应 (PCR) 检测进行阳性鉴定, 以期初步建立农杆菌介导的香榧遗传转化体系, 为香榧重要基因功能验证及种质创新提供重要技术体系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 于 2018 年 7 月 5—26 日 (种子突破种鳞后第 8~11 周, 以下简称第 8~11 周) 采集生长健壮的香榧种子, 经消毒后, 用无菌修枝剪从种子榧眼端 (珠孔端) 纵向剪开, 剥取完整幼胚 (图 1A~D) 待用。具体消毒步骤参照龚丽等^[17]的方法。



A. 香榧种子 (带假种皮); B. 香榧种子外形 (箭头示榧眼); C. 沿榧眼断纵切开的香榧种子; D. 香榧幼胚; E~H. 香榧 8~11 周幼胚

图 1 香榧种子及幼胚发育表型动态

Figure 1 Characters of seeds and immature embryos of *T. grandis* 'Merrillii'

1.1.2 载体及农杆菌菌株 采用携带 *GFP* 报告基因的 pCAMBIA1300-GFP 载体, 内含卡那霉素抗性基因和潮霉素抗性基因^[18]; 农杆菌菌株 GV3101。

1.2 方法

1.2.1 农杆菌介导香榧幼胚遗传转化 ①农杆菌的活化与培养。将 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存的携带 pCAMBIA1300-GFP 载体的 GV3101 农杆菌菌株接种至含有 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 卡那霉素的 LB 固体培养基中划线培养, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱活化培养 2 d。挑取若干单菌落分别放置于盛有附加 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 卡那霉素和 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 利福平的 LB 液体培养基的无菌离心管中, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡培养箱继续培养, 至菌液混浊。②侵染液的制备。取上述适量菌液稀释 10 倍, 分光光度计下测定吸光度 [$D(600)$]。侵染液制备所需菌液体积按照如下公式计算: 所需菌液量 (mL)=[所需侵染量 (mL)×所需菌液 $D(600)$]/[实测 $D(600)$ ×10]。计算得出所需菌液体积后, 在超净工作台上用移液枪吸取所需菌液至无菌带盖离心管中 $6\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速下离心 10 min, 弃上清液, 加入 2 mL 含有 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 萘乙酸和 $40.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮的 1/2 SH 液体共培养基, 吸打混匀成悬浮液后, 再加液体共培养基至所需菌液侵染量, 将离心管放回至 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡培养箱继续培养 1~2 h, 待用。

1.2.2 香榧幼胚遗传转化条件优化 ①香榧幼胚最佳胚龄筛选。采用第 8~11 周的香榧幼胚, 用农杆菌侵染 [$D(600)$ 为 0.5], 并添加乙酰丁香酮共培养后接种至农杆菌脱菌培养基 (1/2 SH+ $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 萘乙酸+ $2.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 活性炭+ $30.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖+ $200.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 羧苄青霉素+ $12.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂) 培养 4 周, 分别统计筛选过程中香榧幼胚的污染率、成活率、愈伤组织诱导率以及体细胞胚 (简称体胚) 发生率。每个处理重复

3次,每次处理30个幼胚。②最佳农杆菌侵染吸光度筛选。将农杆菌菌液吸光度设置为4个水平 [$D(600)$ 为 0.3、0.5、0.8、1.0],对香榧幼胚侵染 15 min,乙酰丁香酮共培养 3 d 后接种至脱菌培养基(同①)培养 4 周,统计幼胚污染率、成活率、愈伤组织诱导率和体胚发生率,确定适宜转化用的菌液浓度。每个处理重复 3 次,每次处理 30 个幼胚。③最佳农杆菌侵染时间筛选。采用 $D(600)$ 为 0.5 的农杆菌菌液对幼胚分别侵染 5、10、15、20、30 min,共培养 3 d 后转接至脱菌培养基(同①)培养 4 周,统计污染率、成活率、愈伤组织诱导率以及体胚发生率,以确定适宜转化用的菌液浓度。每个处理重复 3 次,每次处理 30 个幼胚。④最佳羧苄青霉素质量浓度筛选。将共培养后的香榧幼胚接种在含有 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 羧苄青霉素和不同质量浓度羧苄青霉素 (100、200、300、400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 1/2 SH 固体培养基中进行抗生素质量浓度筛选。每个处理重复 3 次,3 d 继代培养 1 次,4 周后统计污染率、成活率、愈伤组织诱导率以及体胚发生率,以确定适宜的羧苄青霉素质量浓度。

1.2.3 农杆菌介导香榧幼胚遗传转化和抗性筛选 选取生长良好的香榧幼胚在最佳浓度农杆菌侵染液中,悬浮培养最佳侵染时间后,将幼胚转接至附加羧苄青霉素 ($0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 和乙酰丁香酮 ($40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 1/2 SH 固体培养基中共培养 3 d 后,再转接至脱菌培养基(1.2.2 节④筛选出的最佳培养基)中培养至无菌。具体步骤参照 ZHANG 等^[8]的方法。将脱菌后的香榧幼胚接种至附加 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 羧苄青霉素和质量浓度分别为 50、80、100、200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 潮霉素的 1/2 SH 固体培养基中进行筛选培养,2 周后转接至附加 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 羧苄青霉素和 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 潮霉素的 1/2 SH 固体培养基中进行筛选培养,隔 2 d 转接 1 次至完全脱菌并获得潮霉素抗性幼胚。

1.2.4 绿色荧光蛋白基因 *GFP* 荧光信号阳性检测和 PCR 鉴定 将经潮霉素筛选的抗性幼胚置于体式显微镜 (SteREO Discovery V1) 下进行 450~490 nm 蓝光激发,表面能观察到明亮绿色荧光的幼胚为 *GFP* 荧光信号阳性幼胚。选取潮霉素基因和 *GFP* 绿色荧光鉴定均为阳性的幼胚培养材料,利用 TPS 法提取 DNA。利用 *GFP* 基因引物 (*GFP*-F: 5'-GACGCACAATCCCACTATCCTT-3', *GFP*-R: 5'-AACCGATGATACGAACGAAAGC-3'),以上述提取的 DNA 为模板进行 *GFP* 基因的 PCR 扩增 [PCR 程序为: 94 °C 2 min; 98 °C 10 s; 68 °C 45 s (32 个循环); 72 °C 10 min; 4 °C 保存],目的片段大小为 750 bp。PCR 程序结束后,10 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳检测,条带符合预期大小的确定为转化成功的香榧幼胚培养物。

1.3 数据统计与图像处理

受体材料污染率、成活率及 *GFP* 阳性率等数据采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,其中包括平均值和方差分析。计算公式如下:污染率=污染幼胚数/侵染总体胚数 $\times 100\%$;成活率=成活幼胚数/侵染总体胚数 $\times 100\%$; *GFP* 阳性率=*GFP* 阳性幼胚数/成活幼胚数 $\times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 香榧幼胚遗传转化条件的优化

2.1.1 香榧幼胚胚龄对遗传转化的影响 本研究采用处于第 8~11 周的香榧幼胚为材料进行农杆菌介导的遗传转化(图 1E~H)。第 8~11 周分别为胚胎选择初期、胚胎选择中期、胚胎选择晚期和优势胚完全发育期。结果表明(表 1):4 个胚龄的幼胚转化过程中污染率和成活率均存在显著差异 ($P<0.05$)。随着香榧幼胚胚龄的增加,抗逆性增强,污染率降低,成活率提高。第 10 周和第 11 周成活率分别为 52.1% 和 52.3%。香榧幼胚胚性感受态具有较大差异,第 10 周时愈伤组织诱导率下降为 17.9%,但体胚发生率最高,达 17.3%;第 11 周时愈伤组织诱导率和体胚发生率均下降,分别为 10.7% 和 5.6%。尽管香榧第 8~11 周幼胚均可用于农杆菌介导的遗传转化,但综合污染率、成活率、愈伤组织诱导率和体胚发生率均表明采用第 10 周香榧幼胚进行农杆菌介导的遗传转化效果最佳。

2.1.2 农杆菌菌液吸光度对香榧幼胚遗传转化的影响 表 2 表明:随着菌液 $D(600)$ 的升高,污染率逐渐上升,成活率逐渐下降。过高的污染率会增加大量的前期采样、灭菌、侵染、共培养及后期脱菌培养的工作量。当菌液 $D(600)=0.3$ 时,污染率最低,成活率最高,但愈伤组织诱导率和体胚发生率都比 $D(600)=0.5$ 时低。随着 $D(600)$ 的升高,愈伤组织诱导率和体胚发生率先上升后下降。当 $D(600)=0.5$ 时,愈伤组织诱导率和体胚发生率最高,分别为 17.9% 和 17.3%。因此,综合考虑, $D(600)=0.5$ 时是最佳侵染浓度(表 2)。

表 1 香榧幼胚胚龄对遗传转化的影响

Table 1 Different growth stages of embryos on the transformation efficiency in *T. grandis* ‘Merrillii’

采样时 间/周	污染率/ %	成活率/ %	愈伤组织 诱导率/%	体胚发生 率/%
8	22.3±0.3 a	35.6±1.3 b	18.1±0.6 a	0.0±0.0 c
9	21.5±0.5 a	40.9±2.3 b	20.1±1.6 a	0.0±0.0 c
10	18.8±0.3 b	52.1±2.0 a	17.9±0.3 b	17.3±1.2 a
11	18.7±0.6 b	52.3±1.3 a	10.7±0.7 b	5.6±0.5 b

说明：同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

表 2 农杆菌菌液浓度对香榧幼胚遗传转化的影响

Table 2 Different concentrations of bacteria on the impact of transformation in *T. grandis* ‘Merrillii’

<i>D</i> (600)	污染率/ %	成活率/ %	愈伤组织 诱导率/%	体胚发生 率/%
0.3	42.0±0.8 d	62.1±1.4 a	15.2±1.0 a	6.9±0.9 b
0.5	48.2±0.6 c	58.7±3.8 a	17.9±1.5 a	17.3±0.3 a
0.8	63.1±3.3 b	36.6±0.8 b	8.9±0.5 b	4.9±0.3 c
1.0	71.5±1.4 a	14.1±0.2 c	0.0±0.0 c	0.0±0.0 d

说明：同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

2.1.3 农杆菌菌液侵染时间对香榧幼胚转化的影响 表 3 表明：随着侵染时间的延长，污染率逐渐升高，成活率逐渐下降，侵染 5 min 时，污染率最低，成活率最高；当侵染 30 min 时，污染率最高，达 100%。不同侵染时间下，各处理间愈伤组织诱导率和体胚发生率均存在显著差异 ($P<0.05$)，侵染 10 min 时，愈伤组织诱导率和体胚发生率均为最高，分别达 17.5% 和 17.1%；侵染 20~30 min 时，愈伤组织诱导率和体胚发生率均下降至 0。综合以上指标，选择 10 min 为最佳侵染时间。

2.1.4 羧苄青霉素质量浓度对香榧幼胚携带农杆菌抑制的影响 本研究选用的农杆菌种类为碱型 GV3101 菌株，因此，在前期研究的基础上，选用羧苄青霉素为农杆菌脱菌抗生素。表 4 表明：香榧幼胚成活率随着羧苄青霉素质量浓度的升高先上升后下降，当羧苄青霉素质量浓度为 300 mg·L⁻¹ 时成活率最高，为 60.5%。随着羧苄青霉素质量浓度的升高，愈伤组织诱导率和体胚发生率均呈先上升后下降的趋势，当质量浓度为 300 mg·L⁻¹ 时，愈伤组织诱导率和体胚发生率最高，分别为 15.8% 和 17.5%。因此，最佳羧苄青霉素质量浓度为 300 mg·L⁻¹。

表 3 农杆菌菌液不同侵染时间对香榧幼胚遗传转化的影响

Table 3 Effect of different infection times on transformation in *T. grandis* ‘Merrillii’

侵染时间/ min	污染率/ %	成活率/ %	愈伤组织 诱导率/%	体胚发生 率/%
5	35.2±0.4 e	72.1±2.3 a	16.2±0.6 b	15.3±0.3 b
10	45.1±0.7 d	65.3±0.6 b	17.5±0.3 a	17.1±1.0 a
15	49.3±1.4 c	60.5±1.4 c	10.8±0.3 c	3.5±0.4 c
20	72.5±0.5 b	42.8±1.1 d	0.0±0.0 d	0.0±0.0 d
30	100.0±3.7 a	0.0±0.0 e	0.0±0.0 d	0.0±0.0 d

说明：同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

表 4 羧苄青霉素质量浓度对香榧幼胚农杆菌脱除的影响

Table 4 Effects of carboxypenicillin concentration on the removal of *Agrobacterium tumebii* from *T. grandis* ‘Merrillii’ embryos

羧苄青霉素/ (mg·L ⁻¹)	污染率/ %	成活率/ %	愈伤组织 诱导率/%	体胚发生 率/%
100	82.2±1.0 a	22.1±0.8 c	6.7±0.2 c	00.0±0.0 c
200	64.9±1.9 b	45.3±2.3 b	7.3±0.1 b	7.1±0.4 b
300	17.3±2.0 c	60.5±1.4 a	15.8±0.3 a	17.5±1.5 a
400	12.1±0.3 d	42.8±1.2 b	0.0±0.0 d	0.0±0.0 c
500	0.0±0.0 e	10.1±0.4 d	0.0±0.0 d	0.0±0.0 c

说明：同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

2.2 香榧阳性幼胚鉴定

2.2.1 香榧阳性幼胚培养物潮霉素鉴定 表 5 表明：随着潮霉素质量浓度的升高，幼胚成活率逐渐下降，当潮霉素质量浓度为 50 mg·L⁻¹ 时，成活率最高，为 62.1%；当潮霉素质量浓度升高至 100 mg·L⁻¹ 时，成活率下降至 30.5%，但当潮霉素质量浓度继续升高至 200 mg·L⁻¹，香榧幼胚培养物的成活率基本不变。当潮霉素质量浓度为 50~100 mg·L⁻¹ 时，各处理间愈伤组织诱导率和体胚发生率无显著性差异；当潮霉素质量浓度升高至 200 mg·L⁻¹ 时，愈伤组织诱导率和体胚发生率均显著下降 ($P<0.05$)。因此，100 mg·L⁻¹ 为筛选抗性幼胚培养物的潮霉素最佳质量浓度。

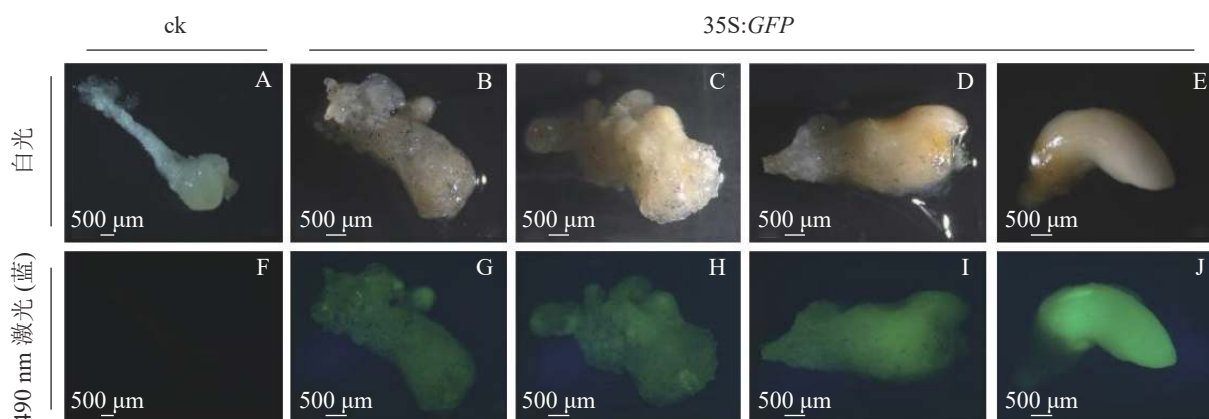
表 5 潮霉素质量浓度对香榧幼胚培养物潮霉素阳性筛选的影响

Table 5 Effect of hygromycin concentration on positive screening of *T. grandis* ‘Merrillii’ embryo culture

潮霉素/ (mg·L ⁻¹)	成活率/ %	愈伤组织 诱导率/%	体胚发生 率/%
50	62.1±0.7 a	14.7±0.5 a	12.8±0.3 a
80	45.3±1.7 b	14.3±0.7 a	13.1±0.1 a
100	30.5±1.2 c	15.2±1.6 a	12.5±0.5 a
200	30.8±0.9 c	8.2±0.3 b	7.6±0.2 b

说明：同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

2.2.2 香榧遗传转化幼胚 GFP 荧光表达 将通过筛选的潮霉素抗性幼胚置于体式显微镜下进行蓝光激发 (490 nm)。结果发现: 潮霉素抗性幼胚培养物中, 白光视野下, 胚胎选择期 (第 8~10 周) 幼胚培养物呈现乳白色至淡黄色, 蓝光视野下呈现明亮的绿色荧光, 各胚龄间 GFP 荧光阳性率无显著性差异, 为 75.5%~78.3%; 优势胚完全发育期 (第 11 周) GFP 荧光阳性率较低, 为 53.0%, 且幼胚不同部位的荧光表达量不一致, 其中相对成熟的部位荧光表达量较低, 生长旺盛单位荧光表达量较高, 呈现明亮的绿色; 对照幼胚培养物在白光下呈现乳白色至淡黄色, 蓝光视野中无荧光激发, 呈现黑色 (图 2)。



A、F. 白光和蓝光下的对照幼胚; B~E. 分别为白光视野下 8~11 周的幼胚培养物; G~J. 分别为荧光激发下 8~11 周的 GFP 阳性幼胚培养物

图 2 绿色荧光蛋白在香榧潮霉素抗性幼胚培养物中表达

Figure 2 Green fluorescent protein GFP gene expressed stably in *T. grandis* 'Merrillii'

2.2.3 香榧阳性幼胚 GFP 基因鉴定 为进一步排除 GFP 绿色荧光假阳性, 本研究选取具有潮霉素抗性且 GFP 强荧光信号表达的香榧幼胚培养物提取 DNA 并进行 PCR 扩增, 并以同时接种未转化的幼胚为对照。香榧 GFP 荧光阳性幼胚培养物提取 DNA 进行 PCR 检测结果表明 (图 3): 75% 的携带潮霉素抗性且 GFP 荧光阳性香榧幼胚培养物可扩增出目的条带, 长度约 750 bp, 符合预期大小 (泳道 3~8), 而对照幼胚培养物相应无条带 (泳道 1~2), 表明 GFP 基因已成功转入香榧幼胚。

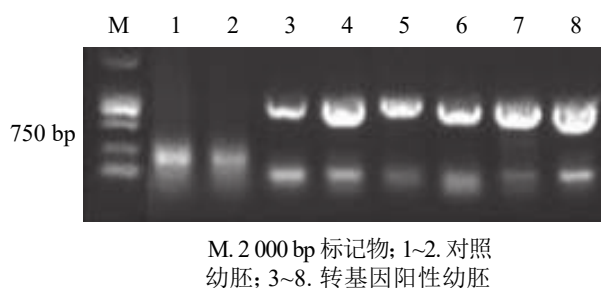


图 3 香榧培养物 DNA 的 PCR 扩增产物电泳图

Figure 3 PCR amplification products of transgenic somatic and control somatic embryos DNA in *T. grandis* 'Merrillii'

3 讨论

3.1 受体材料对农杆菌介导遗传转化的影响

在木本植物遗传转化中, 常用的受体材料一般有花序、叶片、体细胞胚、胚性愈伤组织、合子胚、下胚轴、原生质体、茎尖及花粉等^[19]。目前, 林木遗传转化研究多以胚性愈伤组织、合子胚和体细胞胚为受体材料^[20]。

有研究表明: 同一外植体的不同部位对农杆菌转化效率也不同^[21], 胡杨 *Populus euphratica* 在遗传转化时使用叶片的转化率高达 80%, 而茎段转化率只有 20%^[22]。受体材料的生长发育阶段对遗传转化效率具有重要影响^[23]。处于旺盛分裂期的林木细胞或组织是农杆菌转化成功的基础。一般来说, 发育早期的组织细胞分裂能力较强^[24]。方宏筠等^[25]在研究黑核桃 *Juglans nigra* 体胚遗传转化时发现: 球形胚、鱼雷胚等有较高的转化效率, 而发育晚期的子叶胚很难诱导出抗性体细胞胚状体, 这可能与其分裂能力低有关。DAI 等^[26]选用葡萄 *Vitis vinifera* 胚胎发育过程中的 3 个阶段 (胚性愈伤组织、原胚团、体胚) 为遗传转化的受体材料, 结果显示: 仅原胚团样品得到了 32 个转基因株系。选择幼胚作为外植体, 易产生胚

性愈伤组织, 且分化和再生能力较强, 缩短了再生所需时间, 提高了遗传转化效率^[27]。香榧胚性愈伤组织结构特殊, 胚性细胞团结构疏松脆弱, 在农杆菌侵染过程中极易受到不可逆的损害, 大大影响了后续发育的活力。因此, 本研究以种子突破种鳞后第 8~11 周的香榧幼胚为农杆菌介导的遗传转化受体材料, 发现处于胚胎选择期的香榧幼胚遗传转化能力较强, *GFP* 荧光阳性率高于优势胚完全发育期, 与该时期幼胚具有较强的胚性感受态有关^[17]。

3.2 转化条件对农杆菌介导遗传转化的影响

菌液侵染是农杆菌介导的遗传转化的第 1 步, 涉及诸多影响因子, 包括农杆菌菌液浓度、侵染时间等。一般来讲, 菌液浓度过高, 脱菌时抗生素不能抑制农杆菌生长, 而且易使外植体产生过敏反应; 当菌液浓度较低时, 外植体表面的菌液不足以侵染植物组织细胞^[28]。刘晓晨^[15]在研究核桃体胚转化条件时发现: 在侵染时间相同情况下, 阳性率随着侵染液浓度提高呈上升趋势, 但污染率也随之提高; 全铸等^[29]在建立柠檬 *Citrus limon* 遗传转化体系时发现: 菌液 *D*(600) 为 0.6 时胚轴再生率达到最高, *D*(600) 高于 0.6 胚轴再生率随之下降。因此, 选择合适的菌液吸光度是高效转化体系的关键。本研究中, 农杆菌 *D*(600) 为 0.5 时香榧幼胚转化效率最高。

农杆菌侵染时间的长短也因植物材料不同而异, 适宜的时间可以确保农杆菌对植物细胞充分稳定的吸附, 时间过短不能完成农杆菌有效侵染, 导致转化效率过低甚至转化失败, 而过长的侵染时间容易导致材料过度污染甚至死亡。杜丽等^[30]研究樟树 *Cinnamomum camphora* 胚性愈伤组织遗传转化时发现: 转化效率在侵染时间超过 40 min 后呈下降趋势。糜瑶琦^[31]在研究美国山核桃 *Carya illinoensis* 遗传转化条件时发现: 侵染 15 min 时 β -葡萄糖苷酸酶 (GUS) 表达率最高, 达 61.52%, 超过 15 min 后呈下降趋势。在本研究的香榧幼胚转化中, 最佳侵染时间为 10 min, 且不同农杆菌菌液吸光度和侵染时间处理下, 污染率、成活率、愈伤组织诱导率以及体胚发生率均具显著性差异。

农杆菌介导遗传转化的另一个重要环节为脱菌培养。筛选出适合的抑菌抗生素对于农杆菌介导的遗传转化至关重要^[32]。林木遗传转化中常用的抑菌剂有头孢霉素和羧苄青霉素等^[33]。黄建^[34]研究枣 *Ziziphus jujuba* 遗传转化时发现, 低浓度的羧苄青霉素促进叶片外植体形成愈伤组织, 而浓度过高有抑制作用。MONDAL 等^[35]在研究茶 *Camellia sinensis* 遗传转化中发现: 头孢霉素和羧苄青霉素协同使用, 可有效抑制农杆菌的活性。坚果树种对农杆菌脱菌抗生素非常敏感, 在加有抗生素压力的抑菌培养基上生长能力较差。优化核桃体胚遗传转化条件时, 使用 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 羧苄青霉素时体胚转化率最高, 达 28.0%, 随后体胚转化率逐渐下降^[36]。在本次香榧幼胚的转化中, $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 羧苄青霉素为最佳脱菌质量浓度。

目前, 坚果类树种的遗传转化仍存在较多问题需要进一步探究和解决。坚果树种转化方法单一是限制其遗传转化体系建立的一个重要因素^[19]。此外, 坚果类树种体胚再生频率低、重复性差的自身特性是影响转化效率的主要原因, 甚至有些坚果树种难以建立再生体系, 致使转化无法进行。这一特性是导致坚果类树种遗传转化研究和应用滞后的主要原因^[37]。本研究在受体材料选择、农杆菌侵染时间、侵染浓度、抗生素质量浓度等方面进行了初步研究, 成功获得了香榧转化幼胚培养物。研究结果可为香榧重要基因遗传转化和功能验证打下良好基础, 同时也为香榧种质创新提供重要技术平台。

4 参考文献

- [1] 黎章矩, 戴文圣. 中国香榧[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
LI Zhangju, DAI Wensheng. *Torreya grandis 'Merrillii' of China*[M]. Beijing: Science Press, 2007.
- [2] JIAN Shugang, SHI Suhua, ZHONG Yang, et al. Genetic diversity among south China *Heritiera littoralis* detected by inter-simple sequence repeats (ISSR) analysis [J]. *J Genet Mol Biol*, 2002, **13**(4): 272–276.
- [3] ROOKE L, LINDSEY K. Potato transformation [J]. *Method Mol Biol*, 1998, **81**(4): 353–358.
- [4] PARONS T J, SINKAR V P, STETTLER F, et al. Transformation of poplar by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Bio/Technology*, 1986, **4**: 533–536.
- [5] HIGGINES E S, HULME J S, SHIELDS R. Early events in transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Sci*, 1992, **82**(1): 109–118.

- [6] JAMES D J, PASSEY A J, BARBARA D J, *et al.* Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill) using a disarmed ti-binary vector [J]. *Plant Cell Rep*, 1989, 7(8): 658 – 661.
- [7] MOURGUES F, CHEVREAU E, LAMBERT C, *et al.* Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and recovery of transgenic plants from pear (*Pyrus communis* L.) [J]. *Plant Cell Rep*, 1996, 16(3/4): 245 – 249.
- [8] ZHANG Qixiang, WALAWAGE S L, TRICOLI D M, *et al.* A red fluorescent protein (DsRED) from *Discosoma* sp. as a reporter for gene expression in walnut somatic embryos [J]. *Plant Cell Rep*, 2015, 34: 861 – 869.
- [9] 郝荣庭, 张毅萍. 中国核桃[M]. 北京: 中国林业出版社, 1992: 1 – 5.
XI Rongting, ZHANG Yiping. *China Walnut* [M]. Beijing: China Forestry Press, 1992: 1 – 5.
- [10] MORGILLO S, HILL A M, COATES A M. The effects of nut consumption on vascular function [J/OL]. *Nutrients*, 2019, 11(1): 116[2021-03-25]. doi: 10.3390/nu11010116.
- [11] SAVAGE G P. Chemical composition of walnuts (*Juglans regia* L.) grown in New Zealand [J]. *Plant Food Hum Nutr*, 2001, 56(1): 75 – 82.
- [12] MCGRANHAN G H, LESLIE C A, URATSU S L, *et al.* *Agrobacterium*-mediated transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plants [J]. *Bio/Technology*, 1988, 6: 800 – 804.
- [13] MARTINEZ P J, CREPEAU M W, PUIU D, *et al.* The walnut (*Juglans regia*) genome sequence reveals diversity in genes coding for the biosynthesis of non-structural polyphenols [J]. *Plant J*, 2016, 87: 507 – 532.
- [14] ZHANG Junpei, ZHANG Wenting, JI Feiyang, *et al.* A high-quality walnut genome assembly reveals extensive gene expression divergences after whole-genome duplication [J]. *Plant Biotechnol J*, 2020, 18(9): 1848 – 1850.
- [15] 刘晓晨. 核桃遗传转化体系及嫁接砧穗间基因转导探究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2017.
LIU Xiaochen. *The Establishment of Genetic Transformation in Walnut (Juglans regia L.) and the Study on Gene Transduction between Grafts* [D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2017.
- [16] ESCOBAR M A, JAEIN P, POLITO V S, *et al.* Using GFP as a scorable marker in walnut somatic embryo transformation [J]. *Ann Bot*, 2000, 85(6): 831 – 835.
- [17] 龚丽, 胡恒康, 胡渊渊, 等. 香榧幼胚发育与胚性感态之间的相关性[J]. *浙江农林大学学报*, 2018, 35(5): 861 – 867.
GONG Li, HU Hengkang, HU Yuanyuan, *et al.* Immature embryo development and embryogenic frequency in *Torreya grandis* ‘Merrillii’ [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2018, 35(5): 861 – 867.
- [18] 张佳琦, 胡恒康, 徐川梅, 等. 核桃 *JrGA2ox* 基因的克隆、亚细胞定位及功能验证[J]. *林业科学*, 2019, 55(2): 50 – 60.
ZHANG Jiaqi, HU Hengkang, XU Chuanmei, *et al.* Cloning, subcellular localization and dunction verification of gibberellin 2-oxidase gene in walnut (*Juglans regia*) [J]. *Sci Silv Sin*, 2019, 55(2): 50 – 60.
- [19] 王瑶, 林木兰, 沈锡辉, 等. 农杆菌介导的木本植物遗传转化[J]. *生物技术通报*, 1999, 15(6): 23 – 27.
WANG Yao, LIN Mulan, SHEN Xihui, *et al.* Xylophyta genetic transformation by *Agrobacterium* [J]. *Biotechnol Inf*, 1999, 15(6): 23 – 27.
- [20] 宋跃, 甄成, 张含国, 等. 长白落叶松胚性愈伤组织诱导及体细胞胚胎发生[J]. *林业科学*, 2016, 52(10): 45 – 54.
SONG Yue, ZHEN Cheng, ZHANG Hanguo, *et al.* Embryogenic callus induction and somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Larix olgensis* [J]. *Sci Silv Sin*, 2016, 52(10): 45 – 54.
- [21] CONFALONIERI M, BALESTRAZZI A, BISOFFI S. Genetic transformation of *Populus nigra* by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Cell Rep*, 1994, 13(5): 256 – 261.
- [22] 范源伟, 刘挨枝, 王华芳. 胡杨转基因体系的建立[J]. *植物学报*, 2009, 44(6): 728 – 734.
FAN Yuanwei, LIU Aizhi, WANG Huafang. Transformation of *Populus euphratica* [J]. *Chin Bull Bot*, 2009, 44(6): 728 – 734.
- [23] MARITINEZ-TRUJILLO M M, CABRERA-PONCE J L, HERRERA-ESTRELLA L. Improvement of rice transformation using bombardment of scutellum-derived calli [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2003, 21(4): 429 – 437.
- [24] MCGRANAHAN G H, LESLIE C A, DANDEREKAR A M. Transformation of pecan and regeneration of transgenic plants [J]. *Plant Cell Rep*, 1993, 12(11): 634 – 638.
- [25] 方宏筠, 王关林. 黑核桃体细胞胚状体发生及其基因转化系统的建立[J]. *园艺学报*, 2000, 27(6): 406 – 411.
FANG Hongyun, WANG Guanlin. Somatic embryogenesis of *Juglans nigra* L. and establishment of gene transformation system of walnut [J]. *Acta Horti Sin*, 2000, 27(6): 406 – 411.

- [26] DAI Lingmin, ZHOU Qi, LI Ruimin, *et al.* Establishment of a picloram-induced somatic embryogenesis system in *Vitis vinifera* cv. chardonnay and genetic transformation of a stilbene synthase gene from wild-growing *Vitis* species [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2015, **121**(2): 397 – 412.
- [27] 王世玉. 高频再生的玉米成熟胚遗传转化受体系统的建立[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.
WANG Shiyu. *Establishment of High-frequency Regeneration Ability Transgenic Acceptor System from Mature Embryos of Maize (Zea Mays L.)* [D]. Wuhan: Central China Agricultural University, 2007.
- [28] 张福丽, 陈龙, 李成伟. 农杆菌介导的植物转基因影响因素[J]. 生物技术通报, 2012(7): 14 – 19.
ZHANG Fuli, CHEN Long, LI Chengwei. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated plant genetic transformation [J]. *Biotechnol Bull*, 2012(7): 14 – 19.
- [29] 全铸, 何利刚, 吴黎明, 等. 柠檬遗传转化体系的建立及优化[J]. 湖北农业科学, 2014, **53**(9): 2100 – 2102, 2106.
TONG Zhu, HE Ligang, WU Liming, *et al.* Establishment and optimization of genetic transformation system of lemon [*Citrus limon* (L.) Burm. f.] [J]. *Hubei Agric Sci*, 2014, **53**(9): 2100 – 2102, 2106.
- [30] 杜丽, 庞振凌, 周索, 等. 香樟胚性愈伤组织遗传转化体系建立[J]. 林业科学, 2008, **44**(4): 54 – 59.
DU Li, PANG Zhenling, ZHOU Suo, *et al.* Establishment of *Agrobacterium*-mediated transformation system of embryogenic calli of *Cinnamomum camphora* [J]. *Sci Silv Sin*, 2008, **44**(4): 54 – 59.
- [31] 糜瑶琦. 薄壳山核桃遗传转化体系的构建[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2017.
MI Yaoqi. *Construction of Pecan Genetic Transformation System* [D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2017.
- [32] 何光源. 植物基因工程[M]. 北京: 清华大学出版社, 2007.
HE Guangyuan. *Plant Gene Engineering* [M]. Beijing: Tsinghua University Press, 2007.
- [33] LIN J J, ASSAD G N, KUO J. Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissues by *Agrobacterium tumefaciens* cells [J]. *Plant Sci*, 1995, **109**(2): 171 – 177.
- [34] 黄建. 农杆菌介导 S6PDH 基因转化枣树的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2006.
HUANG Jian. *Study on Agrobacterium-mediated Transformation of Zyziphus jujube with S6PDH Gene* [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2006.
- [35] MONDAL T, BHATTACHARYA A, AHUJA P S, *et al.* Transgenic tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze cv. Kangra Jat] plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos [J]. *Plant Cell Rep*, 2001, **20**(8): 712 – 720.
- [36] 王庆鹏. 农杆菌介导的核桃体细胞胚转基因研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2020.
WANG Qingpeng. *Agrobacterium-mediated Genetic Transformation of Walnut (Juglans regia L.)* [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2020.
- [37] 张勇, 张守攻, 齐力旺, 等. 杨树——林木基因组学研究的模式物种[J]. 植物学通报, 2006, **23**(3): 286 – 293.
ZHANG Yong, ZHANG Shougong, QI Liwang, *et al.* Poplar as a model for forest tree in genome research [J]. *Chin Bull Bot*, 2006, **23**(3): 286 – 293.