

茶树转基因技术研究进展

谭和平^{1,2}, 周李华^{1,2*}, 钱杉杉¹, 李怀平¹, 叶德萍¹

(1. 中国测试技术研究院, 成都 610021; 2. 茶叶标准与检测技术四川省重点实验室, 成都 610021)

摘要: 茶树原产于中国, 目前已经成为一种世界性的重要经济作物, 也是最流行的健康饮料植物。本文概要介绍了茶树农杆菌介导法和基因枪法遗传转化的特点、研究现状及存在问题, 对近年来利用这两种方法转化茶树的范例做了概述, 并展望了发展前景, 将为新技术在茶树育种及育苗过程中的应用提供理论依据。

关键词: 茶树; 转基因; 农杆菌; 基因枪

中图分类号: Q943; S571.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2009)03-0323-04

Advances on Transgenic Technique in Tea Plants

TAN He-Ping^{1,2}, ZHOU Li-Hua^{1,2*}, QIAN Shan-Shan¹, LI Huai-Ping¹, YE De-Ping¹

(1. National Institute of Measurement and Testing Technology, Chengdu 610021, China; 2. Key Laboratory of Standard and Testing Technology of Tea Science of Sichuan Province, Chengdu 610021, China)

Abstract: Tea plant originated from China, it had been spread to many countries and became the important economic plant and popular healthy beverage plant in the world. Transgenic technique is very important in molecular biology fields. The characteristic, examples and achievements of *Agrobacterium*-mediated technique and particle bombardment-mediated technique in tea plants were introduced in this paper. The problems and prospects of transgene in tea plants were discussed. The paper will provide the theory basic for application on tea breeding of new technologies.

Key words: *Camellia sinensis*; Transgene; *Agrobacterium tumefaciens*; Particle bombardment

茶树[*Camellia sinensis*(L.) O. Kuntze]是多年生异花授粉植物, 有悠久的栽培历史, 是我国重要的经济作物之一。茶是中国人民的传统饮品, 被誉为“国饮”, 也是世界上除水之外消耗量最大的饮料, 其保健、治病功能近年来又被重新认识, 且倍受关注。由于常规茶树育种技术的局限性, 如连锁性状遗传难以分开、有益突变频率低、选育优良品种耗时长、远缘杂交困难、花期不遇等等, 制约了茶树优质资源的利用, 使得品种的选育难以取得突破性进展^[1]。转基因技术能够实现茶树的定向育种, 缩短育种周期, 获得优异性状的品种, 因此对于茶树育种来说, 转基因技术有非常重要的现实意义。

常规的基因转移技术概括起来主要分为农杆菌介导的外源基因转化系统、种质转化系统和直接基因转移系统三类。种质转化系统包括: 花粉管通道法、生殖细胞浸泡法等。直接基因转移系统包括脂质体包埋法、聚乙二醇(PEG)介导法、显微注射技术、电激法、离子束法、激光微束法、基因枪法等。在

茶树遗传转化研究中, 主要采用农杆菌转化体系和基因枪转化技术^[2-4]。

1 茶树转基因技术研究现状

1.1 农杆菌介导技术研究现状

农杆菌包括根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)和发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)都为革兰氏阴性土壤杆菌, 质粒中有一段可转移的 DNA, 称 T-DNA, 因此可作为外源 DNA 载体^[5,6]。

自 20 世纪 90 年代重光雄等和 Matsumoto 等以叶盘为外植体, 采用根癌农杆菌转化得到抗性愈伤组织以来, 茶树转基因育种也开始了探索工作^[7](表 1)。目前, 多集中在对农杆菌转化体系的优化研究。如外植体预培养、农杆菌菌液浓度、侵染时间及共培养的时间、温度、光照条件等^[8-12]; 赵东等通过检测 GUS 瞬时表达, 对影响根癌农杆菌侵染茶树叶子效果的若干因素进行了研究, 结果表明, 茶树较为适宜的农杆菌转化系统是 OD₆₀₀ 为 0.5 ~ 0.8 的

收稿日期: 2008-05-23, 修回日期: 2008-11-25。

基金项目: 国家科技条件平台项目(2004DEA71180)。

作者简介: 谭和平(1957-), 男, 重庆市人, 研究员, 博士, 享受国务院政府津贴专家, 从事茶叶生物化学研究。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: zhousu1103@163.com)。

表 1 茶树 (*Camellia sinensis*) 遗传转化
Table 1 Transformation of Tea plant

外植体 Explant	农杆菌菌株 Agrobacterium strain	转化结果 Results	文献 Reference
子叶	At LBA4404	抗性愈伤组织	重光雄等 ^[15]
叶盘	At LBA4404	抗性愈伤组织	Matsumoto 等 ^[9]
叶愈伤组织	At EHA105	抗性愈伤组织	吴姗等 ^[26]
愈伤	At LBA4404, EHA101, PC2760, GV3101, MP90	GUS 蓝斑	吴姗等 ^[4]
叶盘, 愈伤组织	At LBA4404, EHA105, Ar1583	GUS 蓝斑	骆颖颖等 ^[11]
叶盘	At LBA4404, pGV3850, EHA105	GUS 蓝斑	赵东等 ^[2]
子叶体胚	At EHA105, LBA4404	转基因植株	Monda 等 ^[7]
叶盘	ArLBA9402	发状根	奚彪等 ^[8]
愈伤组织, 芽	Ar	发状根	Konwar 等 ^[10]
叶片	Ar	发状根	彭正云等 ^[35]
叶盘	Ar	发状根	高秀清等 ^[36]

LBA4404 侵染 10 min 左右, 暗中 28℃ 共培养 2 ~ 3 d^[12]。为了提高转化率, 也研究了一些添加物、抑制剂、抗生素^[9,13,14] 等对转化的影响: Matsumoto 等将茶树叶片外植体与携带 pBI121 质粒的农杆菌 LBA4404, 在不同浓度的乙酰丁香酮中进行共培养, 侵染后, 再将外植体移至含 200 mg/L 卡拉霉素的培养基中培养, 以选择抗性愈伤组织。在以 100、500 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰丁香酮处理的外植体上得到了抗性愈伤组织, 后者能促进抗性愈伤组织的产生, 并证实了抗性愈伤组织具有活性且为转化体^[15]。硝酸银对农杆菌生长有抑制作用, 不宜在共培养阶段添加^[12]。茶树外植体对卡那霉素的敏感性差, 容易造成假阳性。有研究表明, 10 个卡那霉素抗性愈伤组织仅 2 个检测到 GUS 表达, 不同茶树品种对卡那霉素的敏感程度有非常大的差异^[15,16]。茶树外植体对潮霉素非常敏感^[11]。利用不同的农杆菌得到了一些 GUS 瞬间表达^[9-12,14] 或检测到 GUS 报告基因的存在^[3], 也有成功地把蛋白溶解酶导入茶树外植体, 并且通过 PCR 及 RT-PCR 验证了转化的愈伤中该基因的存在^[17]: 如张广辉等^[13] 用含携带 Bt 基因的双元载体质粒 pCambia2301 的发根农杆菌 15834, 侵染茶树外植体诱导出发根, PCR 和 GUS 组织化学染色证实外源基因已经插入到基因组 DNA 中并获得表达。Mondal 等利用根癌农杆菌 (EHA105 和 LBA4404) 感染茶树体细胞胚, 将双元质粒上携带的 *nptII* 和具有内含子的 *gus* 基因导入到茶树体细胞胚的核基因组中, 筛选出既有 Kan 抗性又有 GUS 活性的体细胞胚转入分化培养基中长出嫩梢, 再将转基因嫩梢嫁接到同种茶树的茎上, 从而获得了转基因植株^[5]。

1.2 基因枪技术研究现状

基因枪技术的基本原理是将外源 DNA 包被在

微小的金粒或钨粒表面, 在高压作用下微粒被高速射入受体细胞或组织。微粒上的外源 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。因为颗粒的体积非常细小, 再加上射击的速度非常快, 所以外源基因进入细胞后仍能保持正常生物活性, 发育不受太大影响。通过细胞和组织培养技术, 再生出植株, 选出其中转基因阳性植株即为转基因植株。

与农杆菌转化相比, 基因枪法转化的一个主要优点是不受受体植物范围的限制。而且其载体质粒的构建也相对简单, 是目前转基因研究中应用较为广泛的一种方法。如对报告基因^[18,19]、启动子^[20,21] 的研究; 对某些基因表达调控的研究^[22,23]; 在细胞间物质传递^[24]、植物根际微生物利用等研究中^[25] 也扮演了重要的角色。20 世纪 90 年代, 奚彪将基因枪作为介导转化的工具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 1100 ~ 1300 psi 时, 再生频率在 20% ~ 30% 之间; 轰击 2 次时, 1300 psi 会造成过多的伤口, 不易再生新的体胚, 同时对转化体进行高渗处理, 不仅使 GUS 瞬间表达频率下降, 而且新体胚再生也困难。吴姗等^[26] 通过比较基因枪转化参数对转化效果的影响, 优化了茶树基因枪转化体系, 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 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 再分别加入 0.1 mol/L 的亚精胺 4 μL , 2.5 mol/L 的 CaCl_2 15 μL , 最后定容至 48 μL ; 每次轰击上样量为 8 ~ 10 μL 。基因枪转化后抗性筛选 2 个月, 抗性愈伤组织存活率为 5.0% ~ 12.1%。在轰击压力 7 MPa, 射程 5 cm 的条件下轰击一次, 不论对 GUS 表达还是愈伤的再生都是较为适合的轰击条件。农杆菌法、基因枪法及

农杆菌与基因枪结合等方法对茶树遗传转化效率的影响研究表明,虽然优化基因枪转化程序各阶段的外植体状态有所差异,但总体上基因枪系统得到的GUS表达频率比农杆菌转化系统高。瞬间表达的结果及抗性愈伤筛选的结果显示,农杆菌与基因枪结合使用比两种方法单独使用更有助于提高茶树转化的效率^[4]。

2 茶树转基因技术存在的问题

(1) 茶树被认为是一种较难被农杆菌侵染的植物,转化频率较低。茶树中富含儿茶素等多酚类物质,多酚类物质一方面作为一种抑菌剂,直接杀死农杆菌而影响转化率;另一方面作为蛋白质的沉淀剂,拮抗Vir基因产物(一种结合在膜上的受体蛋白),阻塞发根农杆菌的T-DNA向茶树细胞运转的通道,从而间接影响茶树的遗传转化。所以茶树富含多酚类是制约农杆菌介导(包括发根农杆菌和根癌农杆菌介导)法对茶树进行遗传转化的关键因子,迄今为止国内外农杆菌介导茶树进行遗传转化成功率低、转化率低,主要原因之一是缺乏一套稳定完善的农杆菌介导的茶树遗传转化培养体系。

(2) 茶树再生成活比较困难。高效的遗传转化体系依赖于高频的芽再生体系。茶树的离体再生难度大^[27],特别是器官发生途径的植株再生。除子叶容易产生体细胞胚外,茶树的各种器官都不容易再生^[23],如茶树叶片的再生非常困难,仅有0~7.1%;茶树的茎段有再生成功的报道,但芽再生频率很低,尚不明确哪种组织的再生能力强。这些可能是导致部分遗传转化失败的主要原因。以体细胞胚为转化受体有一定优势,但也存在一些缺点:其一,一些优良的茶树品种(系)不产生种子,且子叶是杂合体,遗传背景与母体之间有较大的差异;其二,体胚的诱导、成熟和萌发需要较长的时间,转化需要非常长的时间,如Mondal等^[7]建立的转化体系至少需要70周。

(3) 不受基因型影响的基因枪技术在茶树遗传转化方面的工作还处于起步的阶段,还有不少需要解决的问题,如仪器的可控性、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理论等^[28-30]。

3 茶树转基因技术发展前景

茶树转基因技术研究还处于起步阶段,有大量工作要做,包括功能成分的合成代谢研究、基因功能

鉴定、基因分离和克隆、目的基因的转化技术、转基因植物的鉴定技术等。但茶树转基因技术有着广阔的前景。要使基因工程应用于茶树遗传改良,从根本上改变茶树育种面貌,应从以下两方面加强研究:(1)技术上要解决转化效率低、再生系统难、基因枪技术不成熟的问题。前者可主要通过抗酚菌株来解决,另外减少农杆菌与茶树外植体接触部位的多酚浓度也有效果^[31]。后者则要进一步挖掘基因枪潜力,开展更深层次的研究,充分利用基因枪技术在茶树遗传转化中的应用;(2)转基因技术的应用。①茶树抗逆能力改良:将抗病虫、抗寒、抗旱等基因导入茶树中,提高茶树的抗性,利用转基因技术将抗病虫基因(Bt基因等)导入茶树,可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^[11,32]。②茶树品质成分的调控与改良:克隆并研究影响茶叶功能性成分的基因,利用转基因技术增加或减少某些产物的表达,从而培育出具有高品质、高产量、适宜当地环境的新型茶树品种。如通过基因工程技术研究克隆并研究儿茶素和茶氨酸等功能性成分的目的基因,将其转入某些工程菌,采用微生物发酵技术高效生产这些有效成分。利用反义RNA技术或RNA干扰技术可以促使咖啡因生物合成途径中关键酶基因的沉默,从而抑制咖啡因的生物合成^[33-36]。

相信随着茶树转化体系的日渐成熟,转基因技术会为茶树育种提供广阔的应用前景,解决常规育种中很多难题,使茶树品种按生产和市场的需求方向培育成为可能。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 赵东. 茶树多酚氧化酶基因的克隆和转化体系系统研究[D]. 杭州:浙江大学,2001(3): 47-53.
- [3] Youichi A Masumi. Efficient application of tissue culture technique to high expression of useful physiological functions of tea[C]// Proceedings of 2001 International Conference O-cha (tea) Culture and Science. Shizuoka, Japan: JARO,2001: 50-53.
- [4] 吴娜,梁月荣,陆建良. 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): 55-64.
- [5] 王从丽,张学成. 农杆菌——植物间基因转移的分子基础[J]. 生命科学,2002,14(1): 1-5.
- [6] 方卫国,张永军,杨星勇. 根癌农杆菌介导真菌遗传转化的研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2002,22(5): 40-44.
- [7] Mondal T K, Bhattacharya A, Ahuja P S. Transgenic tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze cv. Kangral Jat] plants obtained by

- Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos [J]. *Plant Cell Rep*, 2001, 20: 712–720.
- [8] 奚彪, 刘祖生, 梁月荣. 发根农杆菌介导的茶树遗传转化[J]. 茶叶科学, 1997, 17(增刊): 155–156.
- [9] Matsumoto S, Fukui M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genes transfer to tea plant (*Camellia sinensis*) cells [J]. *JARO*, 1998, 32: 287–291.
- [10] Konwar B K, Das S C, Bordoloi B J, et al. Hair root development in tea through *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation [J]. *Tow and a Bud*, 1998, 45(2): 12–20.
- [11] 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): 42–47.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 奚彪. 茶树再生系统及其遗传转化的研究[D]. 杭州: 浙江农业大学, 1995: 68–83.
- [15] 重光雄, 山ノ内宏昭, 平野久. アケロラク介入レたチャ子菜への外来遺伝子導入[J]. 茶叶研究报告, 1994(别册): 30–31.
- [16] 川田真佐枝, 早津雅仁, 近藤真昭, 高柳嫌治. チャカルスのカナマイツ感受性[J]. 茶业研究报告, 1989, 70(别册): 7–8.
- [17] Kato Miehiyo, Kato Misako, Watanabe M, Kato A. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation tea embryogenic callus [C]// Proceedings of 2001 International Conference O-cha (tea) Culture and Science. Shizuoka, Japan; JARO, 2001: 125–127.
- [18] Schweizer P, Pokorny J, Abdethalden O, Dudler R. A transient assay system for the functional assessment of defense-related genes in wheat [J]. *MPMI*, 1999, 12(8): 647–654.
- [19] Baruah, Wolff J, Harwood W A, Lonsdale D A, Harvey A, Hull R, Snape J W. Lueiferase as a reporter gene for transformation studies in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant Cell*, 1999, 18: 715–720.
- [20] Stoger E, Williams S, Keen D, Christou P. Constitutive versus seed specific expression in transgenic wheat: temporal and patial control [J]. *Transgenic Res*, 1999, 8: 73–82.
- [21] Salgueiro S, Pignocchi C, Parry M A J. Intron-mediated gus A expression in tritordeum and wheat resulting from particle bombardment [J]. *Plant Mol Biol*, 2000, 42: 615–622.
- [22] Lehr A, Kirsch M, Viereck R, Sehiemann J, Rauseh T. cDNA an genomic cloning of sugar beet V-type H⁺-ATPase subunit A and C isoforms: evidence for coordinate expression during plant development an coordinate induction in response to high salinity [J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 39: 463–475.
- [23] Maleuit I, Marano M R, Kavanagh T A, Jong W A, Forsyth A, Baulcombe D C. The 25-kDa movement protein of PVX elicits Nb-mediate hypersensitive cell death in potato [J]. *MPM*, 1999, 12(6): 536–543.
- [24] Itaya A, Hiekman H, Bao Y. Cell-to-cell trafficking of cucumber mosaic virus movement protein: green fluorescent protein fusion produced by biolistic gene bombardment in tobacco [J]. *Plant J*, 1997, 12(5): 1223–12230.
- [25] Bills S, Podila G K, Hiremath S. Genetic engineering of an ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* for use as a biological agent [J]. *Mycologia*, 1999, 91(2): 237–242.
- [26] 吴姗, 梁月荣, 陆建良, 等. 茶树农杆菌转化和基因枪转化系统的优化[J]. 茶叶科学, 2003, 23(1): 6–10.
- [27] 李玲玲, 江昌俊, 房婉萍, 邓威威. 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.
- [28] 董云洲, 贾士荣. 基因枪转化小麦悬浮细胞参数的优化[J]. 中国农业科学, 1998, 31(6): 79–81.
- [29] Jarl C I. Brief report plant regeneration and transient expression after particle bombardment of different barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes [J]. *Hereditas*, 1999, 130: 83–87.
- [30] Zhang S, Cho M J, Koprek T, et al. Genetic transformation of commercial cultivars of oat (*Avena sativa* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) using *in vitro* shoot meristematic cultures derived from germinated seedlings [J]. *Plant Cell Reports*, 1999, 18: 959–966.
- [31] 毛清黎, 施兆鹏, 李玲, 等. 茶叶儿茶素对发根农杆菌的抑制作用及抗酚菌株筛选研究[J]. 茶叶科学, 2007, 27(3): 243–247.
- [32] 陆建良, 林晨, 路颖颖, 等. 茶树重要功能基因克隆研究进展[J]. 茶叶科学, 2007, 27(2): 95–103.
- [33] Sudipta Das, Timir B. Jha, Sumita Jha. Organogenesis and regeneration from pigmented callus of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntzev Nandadevi, an elite Darjeeling tea clone [J]. *Plant Science*, 1996, 121: 207–211.
- [34] 张启发. 对我国转基因作物研究和产业化发展策略的建议[J]. 中国农业信息, 2005(2): 4–7.
- [35] 余梅, 江昌俊, 叶爱华, 等. 茶树花粉特异蛋白基因 Cs PSP1 的分离及序列分析[J]. 激光生物学报, 2008, 17(2): 206–212.
- [36] 彭正云, 刘德华, 肖海军, 等. 发根农杆菌转化茶树的研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2006, 32(2): 190–194.
- [37] 高秀清, 成浩, 牛爱, 等. 茶树毛状根的诱导[J]. 特产研究, 2004(2): 23–28.