

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2021.40446

焦小雨, 王雷刚, 刘丹丹, 阮旭, 徐奕鼎, 吴琼, 孙明慧, 王文杰. 茶树遗传转化研究进展[J]. 植物科学学报, 2021, 39(4): 446-456

Jiao XY, Wang LG, Liu DD, Ruan X, Xu YD, Wu Q, Sun MH, Wang WJ. Research progress on genetic transformation of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze[J]. *Plant Science Journal*, 2021, 39(4): 446-456

茶树遗传转化研究进展

焦小雨, 王雷刚, 刘丹丹, 阮旭, 徐奕鼎, 吴琼, 孙明慧, 王文杰*

(安徽省农业科学院茶叶研究所, 合肥 230001)

摘要: 茶(*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)是全球重要的非酒精饮料之一, 随着遗传转化技术的不断发展以及人们对高抗性和高品质型品种的需求, 通过遗传转化进行茶树定向改良越来越受到学者们的关注。本文在回顾和总结茶树各遗传转化方法的特点和研究现状的基础上, 重点讨论和概述了当前茶树遗传转化技术存在的主要问题以及影响茶树外植体遗传转化的主要因素, 并对“从活体植株上重新诱导分生组织”技术在茶遗传转化中的应用前景进行了展望。

关键词: 茶树; 遗传转化; 再生; 研究进展

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2021)04-0446-11

Research progress on genetic transformation of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze

Jiao Xiao-Yu, Wang Lei-Gang, Liu Dan-Dan, Ruan Xu, Xu Yi-Ding,
Wu Qiong, Sun Ming-Hui, Wang Wen-Jie*

(Tea Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230001, China)

Abstract: Tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) is one of the most important non-alcoholic beverages in the world. With the continuous development of genetic transformation technology and strong demand for highly resistant and high-quality *C. sinensis* varieties, direct improvement of *C. sinensis* through genetic transformation has attracted increasing attention. In this paper, the characteristics and research status of various genetic transformation methods of *C. sinensis* are reviewed. The main problems with current genetic transformation technology and the main factors affecting genetic transformation of *C. sinensis* are discussed. In addition, the prospects of de novo meristem induction from *in-vivo* technology in the genetic transformation of *C. sinensis* are also considered.

Key words: *Camellia sinensis*; Genetic transformation; Regeneration; Research advances

茶(*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)为山茶科山茶属多年生灌木或乔木, 是世界上重要的饮料作物之一, 也是我国重要的木本经济作物, 在我国国民经济中占有重要地位。

茶树品种是茶产业中最重要的生产资料之一,

它不但影响茶叶质量、品质和茶树抗性, 而且还与新产品开发和技术革新有关^[1]。自20世纪60年代以来, 茶树育种一直是中国茶树研究工作的重点^[2]。目前, 常规系统选育和杂交育种仍然是茶树育种的主要途径^[3]。但由于茶树在遗传组成上

收稿日期: 2020-11-10, 修回日期: 2021-03-27。

基金项目: 安徽省重大专项(202003a06020021); 安徽省农业科学院科研项目(2021YL80)。

This work was supported by grants from the Major Special Projects of Anhui Province (202003a06020021) and Scientific Research Project of Anhui Academy of Agricultural Sciences (2021YL80)。

作者简介: 焦小雨(1993-), 女, 研究实习生, 研究方向为茶树生物技术和分子生物学(E-mail: wsjxy93@126.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: 391590137@qq.com)。

高度异质杂合，具有生长周期长、自交不亲和等特性，致使常规育种进程受限，茶树育种工作难以实现突破性的进展^[4]。

近年来，随着现代分子生物学技术的发展，植物遗传转化技术作为一种植物定向改良和分子育种的有效途径，已被广泛应用于作物的品种改良。目前，茶树遗传转化体系构建研究已取得一定进展，但仍然存在遗传转化效率低、重复性差以及离体再生困难等问题。本文主要总结了茶树遗传转化的方法及其研究进展，讨论了茶树遗传转化研究现存的主要问题以及影响转化效果的主要因素，以期优化茶树遗传转化体系和茶树分子育种研究提供参考。

1 茶树遗传转化方法研究进展

常规的植物遗传转化方法主要有农杆菌介导的遗传转化、直接遗传转化（如：基因枪法、聚乙二醇（PEG）介导法等）和种质系统转化（如：花粉管

通道法、生殖细胞浸泡法等）3 大类^[5]。目前，在茶树相关研究中多以农杆菌介导法和基因枪法为主，且以农杆菌介导的遗传转化方法最为常用。

1.1 农杆菌介导的茶树外植体遗传转化

农杆菌是一种革兰氏阴性土壤杆菌，常用于植物转基因遗传转化研究的有两种，分别为：根癌农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）和发根农杆菌（*Agrobacterium rhizogenes*），前者体内含有肿瘤诱导质粒（Ti），而后者体内含有根诱导质粒（Ri），且两种质粒上均含有可转移 DNA 区（T-DNA 区）和致病区（Vir 区）^[6]，在自然情况下，两种农杆菌通过侵染植物，可导致外植体分别产生冠瘿瘤和毛状根^[7]。农杆菌介导的遗传转化能够自然的实现 T-DNA 向宿主植物细胞的转移和整合，因此被认为是自然界存在的一个天然的遗传转化系统^[8]。目前，学者们以农杆菌为转化载体先后开展了茶树外植体遗传转化体系的构建和优化研究，并取得了一定的进展（表 1）。

表 1 农杆菌介导的茶树外植体遗传转化相关研究
Table 1 *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Camellia sinensis* explants

农杆菌菌株 <i>Agrobacterium</i> strain	外植体 Explant	载体 Vector	转化结果 Transformation result	参考文献 Reference
根癌农杆菌 LBA4404	成熟种胚的子叶；胚芽、胚轴和胚根分别诱导形成的愈伤组织	pVW432	获得了抗性愈伤组织	[9]
根癌农杆菌 LBA4404	叶盘	pBI121	获得了抗性愈伤组织	[10]
根癌农杆菌 LBA4404、EHA105； 发根农杆菌 pRi15834	叶盘、无菌苗基部或从叶片及茎端形成的愈伤组织	含有 <i>Bt</i> 基因的 pCAMBIA2301 重组质粒	获得了 GUS 瞬时表达	[11]
根癌农杆菌 LBA4404、pGV3850、 EHA105	幼叶叶盘	pBI121、pCAMBIA2301	获得了 GUS 瞬时表达	[12]
根癌农杆菌 LBA4404、EHA105	去胚子叶的体细胞胚	p35SGUSINT	获得了转基因茶苗	[13]
根癌农杆菌 EHA105	叶盘	pCAMBIA1301、pCAMBIA2301	获得了具有 GUS 蓝斑的愈伤	[14]
根癌农杆菌 EHA105	茎节组培诱导的第 1 片叶子	p35SGUSINT	获得了具有 GUS 蓝斑的叶片	[15]
根癌农杆菌 EHA105	组培苗叶片	重组 RNAi 载体 pC1301-TCS	获得了 GUS 瞬时表达	[16]
根癌农杆菌 EHA105	幼嫩茎段诱导的愈伤组织	pCAMBIA35S；+GUS	获得了抗性愈伤组织	[17]
根癌农杆菌 EHA105	无菌苗叶片	重组 RNAi 载体 pCAM-RNAi-GS	获得了抗性愈伤组织	[18]
根癌农杆菌 LBA4404	子叶诱导形成的体细胞胚	pCAMBIA 2301、pCAMBIA1301	获得了再生抗性嫩梢	[19]
根癌农杆菌 EHA105	带有绿色胚芽的子叶愈伤组织	PS1aG-3	获得了转基因植株	[3]
根癌农杆菌 GV3101	体胚	pCX-GUS-P	—	[20]
根癌农杆菌 LBA4404	子叶诱导形成的体细胞胚	pBI121-Glu	获得了再生抗性嫩梢	[21]
根癌农杆菌 GV3101	叶片、茎段、愈伤组织和子叶诱导形成的体细胞胚	pYLCRISPR/Cas9P35S-H	获得茶树阳性体细胞胚	[22]
根癌农杆菌 LBA4404	子叶诱导形成的体细胞胚	pCAMBIA1301-Chi、pBI121-Def	获得了再生抗性嫩梢	[23]
发根农杆菌 LBA9402、A4T	无菌苗叶片	—	叶片在强侵染条件下有根突或根毛出现	[24]

续表 1

农杆菌菌株 <i>Agrobacterium</i> strain	外植体 Explant	载体 Vector	转化结果 Transformation result	参考文献 Reference
发根农杆菌 15834、9402、1601、A4	春梢嫩叶	—	诱导产生了毛状根	[25]
发根农杆菌 9402、15834、1000、1025、1601	无菌苗完整叶片和无叶茎段；具有叶片的茎段、子叶片、根段	—	感染 1025 菌种的‘大红’茎段诱导获得了毛状根	[26]
发根农杆菌 15834、LBA902	无菌苗的茎段和叶片；愈伤组织；子叶胚性愈伤组织、扦插苗顶端叶片和茎段	pCambia2301-Bt	获得了具有 GUS 蓝斑和转入 <i>Bt</i> 基因的毛状根	[27]
发根农杆菌 15834、LBA9402	组培苗茎段和叶片	—	诱导产生了毛状根	[28]
发根农杆菌 MTCC 532	无菌叶片	—	诱导产生了毛状根	[29]
发根农杆菌 LBA9402	组培苗的嫩叶	pART27 和 pBI121	获得了具有 GUS 蓝斑和转入 <i>nptII</i> 基因的毛状根	[30]
发根农杆菌 15834 和 K599；根癌农杆菌 GV3101	茶树幼苗的叶、茎、子叶或下胚轴切段	根癌农杆菌中含有 pBI121	探究儿茶素对茶树农杆菌遗传转化的影响，诱导产生了毛状根	[31]
发根农杆菌 15834	子叶的愈伤组织	pBI121	探究培养基添加物对茶树发根农杆菌遗传转化的影响，诱导产生了毛状根	[32]

注：“—”表示无外源转化载体。
Note: “—” means no exogenous transformation vector.

1. 1. 1 根癌农杆菌介导的茶树外植体遗传转化

自 20 世纪 80 年代初研究人员成功利用根癌农杆菌将外源基因导入植物细胞并获得抗性植株以来^[33,34]，根癌农杆菌介导的遗传转化被广泛应用于植物转基因领域。1994 年，张学文等^[9]在根癌农杆菌转化茶树方面进行了尝试，以‘福鼎大白茶’种胚各部分诱导形成的愈伤组织为外植体与根癌农杆菌进行共培养，最终获得了约 5% 的抗性愈伤组织。此后，其他研究人员在根癌农杆菌介导茶树外植体遗传转化方面也进行了一些研究^[10-12]，但皆只获得抗性愈伤组织或限定在瞬时表达，并未获得完整的茶树转基因植株。直到 2001 年底，Mondal 等^[13]以 15 d 茶树幼苗去胚子叶节段诱导的体细胞胚为外植体，两种携带 p35SGUSINT 双元载体的根癌农杆菌 (LBA4404 和 EHA105) 为侵染菌株，通过综合利用根癌农杆菌介导的遗传转化和植物显微嫁接技术，最终获得了转基因茶苗，为构建完整转基因茶树植株提供了新的思路。但根癌农杆菌介导茶树外植体遗传转化效果受到多种因素的限制，为提高转化效率，对转化体系进行不断优化^[15-17, 20, 22]一直都是学者们关注的重点。目前，在已有报道中通过转化获得 *GUS* 瞬时表达和抗性愈伤的较多，但运用组织培养技术从转化的外植体再生诱导出抗性嫩梢或转基因植株的成功案

例却很少。近年来，除 Mondal 等^[13]外，仅 Singh 等^[19, 21, 23]和 Lv 等^[3]相继以茶树子叶诱导的体细胞胚或愈伤组织作为外植体，采用根癌农杆菌介导的遗传转化获得了再生抗性嫩梢，但报道中的总转化再生效率很低，仅 3% 左右。目前，相较于其他植物，茶树在转化技术上仍然存在较大难度。

1. 1. 2 发根农杆菌介导的茶树外植体遗传转化

发根农杆菌含 Ri 质粒，可诱导植物或外植体产生分支呈毛状的不定根，故又称毛状根、发状根，简称毛根或发根^[35]。毛状根的诱发从本质上说是发根农杆菌侵染整株植物或植株某一器官、组织 (包括愈伤组织)、单个细胞甚至原生质体所产生的一种病理现象^[36]。与天然植物根相比，这些毛状根通常表现出生长快速、向地性丧失、激素自主性以及遗传和生物合成稳定等特点^[30]。因此，常被应用于植物次生代谢产物有效成分提取及离体扩大培养的研究。此外，由于发根农杆菌诱导的毛状根多为单细胞起源，遗传相对稳定^[37]且容易再生出芽^[27]，可为阳性转化子的筛选以及再生获得转基因植株提供方便，使得发根农杆菌在植物转基因工程方面的应用也越来越受到关注。目前，发根农杆菌介导的遗传转化也已被成功应用于甜橙 (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)^[38]、苹果砧木山定子 (*Malus baccata* (L.) Borkh)^[39]等木本植物。

而在茶树中,毛状根的诱导培养和遗传转化研究大约开始于20世纪90年代。在研究初期,奚彪等^[24]和高秀清等^[25]利用发根农杆菌成功诱导出了茶树毛状根,但其毛状根诱导率低、重复性差,且缺乏相应的分子检测验证。因此,为初步构建发根农杆菌介导的茶树毛状根诱导体系,彭正云等^[26]以3个茶树品种的不同部位、器官为材料,对发根农杆菌转化茶树及毛状根增殖的条件进行了探讨,发现将1/2 MS培养基的 NH_4^+ 含量减至1/8时,毛状根生长快,分枝多,采用低盐浓度和添加一定量生长素的培养基更有益于茶树毛状根的诱导和增殖。同年,张广辉等^[27]对影响发根农杆菌转化茶树的各因素,包括培养基种类、外植体种类、苗龄、侵染时间等进行了系统的研究,构建了诱导频率最高达30%以上的毛状根诱导体系,并应用此诱导体系将*Bt*基因转入茶树毛状根中,通过PCR和GUS组织化学染色实验证实外源基因已插入基因组DNA中并获得表达。此后,Neelakshi等^[30]利用携有两种常见标记基因(*npt II*和*gus*)表达载体的发根农杆菌LBA9402侵染茶树叶片,也成功获得了具有标记基因表达的阳性毛状根,但整体的诱导转化效率仅有1%左右。目前发根农杆菌介导茶树遗传转化的相关报道大都仍处于采用*gus*等标记基因进行转化技术研究的“试转化”阶段,很少涉及功能目标基因的转移以及茶树毛状根再生成苗研究。

1.2 基因枪法介导的茶外植体遗传转化

基因枪法又叫生物弹枪法,是一种直接基因转化技术,其原理是利用高压作用,将包裹外源DNA的微粒高速射入受体细胞或组织内,外源DNA在进入受体细胞后整合入受体基因组并得到表达,最终实现基因转化^[5]。相比农杆菌介导法,基因枪法不受受体基因型的限制,载体质粒构建较为简单,且可将含有不同目标基因的多个质粒共同导入受体细胞,实现多价转化^[8]。因此,基因枪法被广泛应用于植物遗传转化,特别是一些对农杆菌不敏感的物种和基因型。但基因枪法也存在例如实验重复性差、成本较高,导入的外源基因易出现多拷贝,从而引起外源基因在转化体中“沉默”等局限性。

目前,在仅有的几例基因枪介导的茶树遗传转化报道中,除了探究影响基因枪转化效率的因素,优化相应转化体系外^[14],吴姗等^[40]还尝试将农杆

菌侵染和基因枪轰击两种转化技术结合起来,发现基因枪结合农杆菌的转化方法比单独使用两种方法更有助于提高茶树转化的效率。但上述报道也皆只停留在转化后抗性愈伤组织筛选和GUS瞬时表达的阶段,并未获得转基因植株^[14, 40]。直到2011年,印度学者Mohanpuria等^[41]利用基因枪法将咖啡碱合成酶基因(Caffeine synthase gene, CS)的RNAi载体(pFGC1008-CS)导入茶树体细胞胚,经潮霉素抗性筛选、PCR分子验证和诱导阳性体细胞胚再生芽,最终获得了CS基因表达和咖啡因含量均显著降低的转基因茶苗。而同研究小组的Saini等^[42]在2012年同样利用基因枪法成功地将烟草(*Nicotiana tabacum* L.)渗透蛋白基因(*Osmotin*)导入茶树体细胞胚,获得的转基因株系表现出比对照植株更强的耐NaCl胁迫和干旱胁迫的能力^[43]。除了以茶树体胚为外植体外,Sandal等^[44]采用基因枪法,以茶树离体腋芽发育形成的嫩叶为外植体也获得了完整的转基因茶苗。虽然在被轰击的500片嫩叶中只有217个(43.4%)产生抗性愈伤,且最终仅有15个再生成芽,总体的再生效率很低,但该研究为从叶片为外植体开发优良转基因茶树提供了新的可行的方法,进一步推进了基因枪转化技术在茶树遗传转化上的应用。此外,值得注意的是,该研究还综合评价了转基因茶苗在温室条件下4年的生长和繁殖性能,发现转基因茶苗除苗高明显低于对照外,在表型上均与未轰击的对照茶树相似,但生殖行为上,转基因茶苗明显受到抑制,其花芽和花容易脱落,落果以及空种子发生率更高,转基因茶树种子的活力和发芽率也明显低于对照。虽然转基因茶树的生殖行为受到一定影响,但这种生殖行为受抑制的表现对于转基因生物安全方面是有益的,可减少转基因漂移的机率,降低可能引发的生态风险^[44]。

1.3 茶树非组织培养遗传转化方法

目前,植物遗传转化所采用的受体系统,大都依赖于细胞组织培养技术才能获得转基因植株^[45]。但对于茶树等木本植物来说,采用组织培养进行遗传转化并实现植株再生需要相当长的周期,且实际操作过程中也存在种种困难。因此,近年来随着原位转化(*in-planta* transformation)技术在植物遗传转化研究中的广泛应用,茶树非组织培养遗传转化技术的研究也逐渐活跃起来。常见的非组织培养遗传转化技术有:花粉管通道法、活体组织浸染法

等, 其特点在于不需要组织或细胞培养手段, 而达到植物或组织在活体 (*in-vivo*) 而非离体 (*in-vitro*) 状态下的转化。

其中, 花粉管通道法将基因工程和常规育种结合起来, 操作简便、直接^[46], 目前在茶树中已有少量研究报道。例如李玲玲等^[46]运用花粉管通道法将茶树咖啡碱合成酶 dsRNA 表达载体 (dsTCS) 导入茶花子房中, 转化后获得的茶树植株叶片的咖啡碱含量均低于对照组植株叶片, 说明花粉管通道法导入的 dsTCS 对咖啡碱的合成起到了部分的抑制作用。但花粉管通道法的转化操作也可能会对茶树的结实率和茶籽的生长发育造成一定的负面影响。成杨等^[47, 48]连续 3 年开展的双价抗虫基因 (*Bt* 和 *Cpti*) 转化实验结果显示, 实验组 3 年平均结实率为 16.25%, 对比 2012 和 2013 年实验数据, 进行了转化操作的茶籽出苗率仅为普通茶籽的一半左右。若使用花粉管通道法进行茶树遗传转化, 须通过扩大实验样本数量来提高获得阳性样本的数量。此外, 茶树极长的结实周期在一定程度上也限制了应用该方法进行茶树基因功能分析和转基因育种的速度。

因而, 为避免茶树离体组织遗传转化所面临的诸多问题和挑战, 寻求更简便、快速和高效的茶树遗传转化方法。2010 年, 印度学者 Mohanpuria 等^[49]用携带有 CS 基因 RNAi 载体 (pFGC1008-CS) 的根癌农杆菌侵染 1 个月大的茶树实生苗根系, 最终在转化的 50 个茶苗中, 获得了 7 株阳性植株, 并通过实验发现干涉效应 (抑制咖啡因和可可碱的生物合成) 不仅表现在阳性植株的根中, 也表现在远端未转化的叶中, 说明干涉效应能够从茶树根部转移到其它部位, 阳性株系叶中咖啡碱合成酶基因转录表达以及咖啡因和可可碱含量的显著降低证明了开发农杆菌介导茶树根原位转化方法用于基因沉默或表达研究的可行性。而相类似的沉默信号在细胞间的扩散现象早前在其他植物中也已被观察到^[50, 51]。近年来, 茶树非组培遗传转化方法也在不断被优化和改进。2018 年, Alagarsamy 等^[52]报道构建了茶树幼苗活体发根农杆菌转化体系, 该体系获得的转基因毛状根诱导率高达 88.3%, 相比之前的研究报道^[49], 其转化效率显著提高。运用这种复合系统 (转化植株具有转基因根和野生型芽), 无需改变芽的遗传背景, 可以在完整植株的背景下“从根上”进行根冠相互作用

研究、基因功能验证和作物性状改良, 大大节约了实验周期, 简化了实验步骤, 也为茶树生物学和生物技术研究, 特别是根系生物学和基因表达调控研究提供了一种实用、便捷的替代方法。

2 茶树外植体遗传转化存在的主要问题

茶树对农杆菌不敏感, 转化效率偏低是农杆菌介导茶树外植体遗传转化的主要难题之一。茶树是一种富含多酚类物质的多年生木本植物, 早期毛黎清等^[53]研究发现儿茶素 (TC80) 对发根农杆菌 R1000 的生长具有明显的抑制作用。随后, Song 等^[31]的研究结果也证实茶叶提取物中的儿茶素类物质是影响农杆菌生长和植物转化的关键化学成分。茶树多酚类物质一方面作为抑菌剂, 会杀死农杆菌, 抑制其生长和活性, 进而直接影响转化率; 另一方面作为蛋白质的抑制剂, 还能拮抗农杆菌致病基因 (*Vir*) 的蛋白质产物, 阻塞农杆菌的 T-DNA 向茶树细胞运转的通道, 从而间接影响农杆菌介导的茶树遗传转化效率^[54]。因此, 介于茶多酚的抑菌作用, Mondal 等^[13]建议将通常大多数农作物 2~3 d 的共培养时间在茶树上延长至 5~6 d, 使农杆菌在共培养阶段充分生长和侵染茶树外植体, 以提高转化效率。但值得注意的是, 茶树多酚类物质除了具有强烈的杀菌作用外, 其氧化形成的醌对植物组织和农杆菌具有很强的毒性, 易使外植体褐化、坏死, 失去感受性^[6]。Song 等^[31]在利用根癌农杆菌 GV3101 对茶树不同外植体进行瞬时转化研究时也发现, 被侵染伤口处组织出现明显的褐化, 且仅含少量儿茶素的茶树愈伤组织 GUS 瞬时表达染色率与富含儿茶素的茶树叶片组织的瞬时表达染色率是相当的, 并没有出现儿茶素含量很低时转化效率增加的趋势, 说明除儿茶素外, 外植体褐化、坏死等其它因子也极大影响着遗传转化效果。农杆菌介导茶树外植体的遗传转化效率低, 很大程度上是由于茶多酚的抑菌作用和茶树外植体细胞的感受状态 (褐变程度) 共同影响的结果^[31]。共培养时间过长容易引起外植体褐变, 危害外植体材料, 因此与 Mondal 等^[13]看法不同的是, Lv 等^[3]的研究认为共培养 3 d 最有利于提高根癌农杆菌 EHA105 介导茶树子叶愈伤组织的转化效率。

此外, 茶树外植体再生获得完整植株较为困难是茶树遗传转化体系面临的另一主要问题。理论上, 任何活的含完整细胞核的植物细胞都具有全能

性,只要条件适宜,均能再生成完整的植株^[55]。但木本植物的再生能力往往不如草本植物,且不同外植体的分化再生能力和对农杆菌的敏感性因外植体类型、生长状态和植株品种基因型等因素会表现出较大差异。目前,茶树的离体再生难度较大,特别是器官发生途径的植株再生。另外,茶树原生质体分离和再生相关研究基础薄弱,而一些DNA直接基因转移方法(如:PEG介导法和电激法等)多以原生质体为转化受体,要求高效的原生质体再生频率。这使得茶树转化方法也多以农杆菌介导愈伤组织为主,较为单一。目前,通过组培技术实现植株高效再生依旧是茶树等木本植物需突破的重要技术瓶颈。

3 影响茶树外植体遗传转化的主要因素

3.1 外植体的选择

良好的受体系统是建立稳定高效的茶树遗传转化体系的基础。而在进行转化之前,根据目的和需求选择适宜的外植体是受体系统建立的关键。

目前,胚性培养物(如:体胚、胚性愈伤组织)是茶树遗传转化研究中使用频率较高的外植体,其转化和再生效果也要优于其他茶树外植体。研究表明,体细胞胚发生多是单细胞来源^[56],遗传特性相对稳定。在遗传转化过程中胚性细胞能与农杆菌和抗生素紧密接触,既提高了转化效率和筛选效率,也减少了不定芽再生途径所诱导出的嵌合体的出现,被认为是理想的遗传转化受体^[57]。不过,除茶籽(子叶和子叶柄等)外,茶树其他器官不易诱导产生体胚^[22, 58],且发育过程中常伴有畸形胚出现^[59]。目前茶树中几例成功获得再生抗性嫩梢^[19, 21, 23]或转基因植株^[13]的报道也基本都是利用茶树子叶诱导的体细胞胚为外植体。以此为外植体具有一定优势,但也存在遗传背景与母体之间差异较大^[60]以及体胚诱导培养和遗传转化耗时长等缺点。因此,在需要进一步定向改良选定的品种并希望保留其原有优良特性的情况下,采用茶树营养器官来源的外植体要优于茶树子叶。茶树叶片、茎段及各营养器官诱导的愈伤组织也常被用于茶树遗传转化研究。但相比子叶诱导的体细胞胚,茶树营养器官发生途径的植株再生更为困难。目前,仅Sandal等^[44]采用基因枪法,从被轰击的茶树嫩叶中再生出少量转基因茶苗。茶树营养器官来源的外植体在遗传转化中多运用于瞬时表达验证。此外,

虽然有研究指出毛状根容易再生出芽^[27],且其再生植株通常根系发达,移栽较易成活^[38],利用发根农杆菌介导茶树遗传转化取得成功的可能性更大。但目前在茶树中,相关研究报道多仅获得转基因毛状根,尚未有转基因毛状根再生获得转基因植株的报道。

3.2 培养条件

共培养是农杆菌介导茶树外植体遗传转化的关键环节。除共培养时间的影响外,基础培养基的选择以及外源物的添加对遗传转化效果也具有重要影响。

MS培养基是茶树组织培养中常用的基础培养基,具有无机盐含量高、微量元素全等特点。但MS培养基中过高浓度的无机盐会增加多酚类物质的产生,使外植体褐变加重^[61]。研究发现,适度减少MS培养基中无机盐的含量,可以有效降低组织褐变的程度^[11, 61],且采用低盐浓度的MS培养基也有利于茶树毛状根的诱导和增殖^[26]。MS培养基虽为茶树遗传转化中应用最多的基础培养基,但MS培养基的培养效果并不十分稳定。例如Zhang等^[28]研究发现,毛状根和愈伤组织仅在含100 mmol/L AS的YMB共培养基培养的外植体上诱导产生,而培养在相同水平AS的MS或MSOH共培养基的外植体均未诱导产生毛状根和愈伤组织。此外,茶离体培养中培养基的选择也并非仅限于MS培养基。研究发现,相较于MS培养基,茶树子叶在含有较低铵盐的B5培养基上更容易诱导产生体胚^[62]。另外,改良的ER培养基也可诱导获得优质的茶树子叶愈伤组织,但YEB培养基作为共培养的转化效果更佳,其茶树子叶愈伤组织最高转化率相比ER培养基提高了15.9%^[3]。

此外,为克服儿茶素等多酚类物质对茶树遗传转化的抑制作用,在基础培养基中添加适量的外源添加剂可促进转化效率的提高。Sandal等^[15]研究发现,高压灭菌的L-谷氨酰胺可促进根癌农杆菌对茶树外植体的感染。L-谷氨酰胺经高压灭菌后化学结构会发生变化,其化学修饰形成的主要化合物 α -氨基戊二酰亚胺虽不具有任何致病基因(*vir*)诱导特性,但可减轻多酚类物质的抑菌作用,且不影响农杆菌致病基因(*vir*)的表达,在提高农杆菌介导茶树等“顽固性农作物”的遗传转化效率方面具有显著效果^[63]。另外,有研究表明在共培养基中添加过滤除菌的L-谷氨酰胺和L-谷氨酸也可以防

止外植体的组织褐变和坏死,促进根癌农杆菌感染外植体;而常用的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、木炭等多酚吸附剂以及半胱氨酸、抗坏血酸等抗氧化剂虽然在一定程度上能够促进根癌农杆菌的生长,但不足以解决农杆菌转化效率低的问题^[64]。Rana等^[32]在探究不同组合的抗氧化剂和吸附剂对发根农杆菌介导茶树遗传转化的影响时发现,在培养基中添加 0.1 g/L L-谷氨酰胺和 5 g/L 交联聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)有助于提高毛状根的生成效率,而在此基础上补充 0.15 g/L 的二硫苏糖醇(DTT)则会对控制褐变、致病基因(*vir*)表达水平以及毛根的生成产生负面影响。乙酰丁香酮(AS)作为农杆菌致病基因(*vir*)的常见激活诱导剂,被广泛用于农杆菌介导的植物遗传转化。但在茶树相关报道中,AS的作用效果并不一致,有报道称茶树自身就含大量酚类物质,添加 AS 无助于提高转化效率^[13];相反,也有研究表明添加一定浓度的 AS 有利于促进茶树的遗传转化^[17, 19, 29]。例如近期 Lv等^[3]的研究表明添加 150 $\mu\text{mol/L}$ AS 对茶树子叶愈伤组织的转化最有利,但过高浓度的 AS 会对外植体产生毒性,降低转化效率。Rana等^[32]的研究结果也表明 AS 对控制农杆菌介导茶树遗传转化过程中外植体的褐变具有负面影响,因此考虑到 AS 对 *vir* 基因表达的诱导作用,Rana等^[32]建议在农杆菌感染愈伤组织之前用含 150 $\mu\text{mol/L}$ AS 的培养基对农杆菌进行预处理,而不是将 AS 添加到共培养的培养基中。此外,Alagarsamy等^[65]近期的研究发现,应用 2 $\mu\text{mol/L}$ 多酚合成途径中苯丙氨酸解氨酶(PAL)抑制剂——2-氨基吲哚-2-膦酸(2-aminoindane-2-phosphonic acid, AIP),能显著降低茶树愈伤组织中表没食子儿茶素(EGC)的丰度,进而抑制茶树愈伤组织褐变,且通过混合使用 6-苄氨基嘌呤(BAP)和噻苯隆(TDZ)等植物生长调节剂、椰乳(CM)以及 L-谷氨酰胺,可有效增进愈伤组织的诱导和生长。

3.3 抑菌剂和筛选剂的使用

在茶树的遗传转化过程中,使用抑菌剂和筛选剂可分别抑制农杆菌过度生长和筛选抗性组织。但培养基中任何物质的改变在一定程度上都会影响外植体的生理状态^[66],因此,抑菌剂和筛选剂的选择需在有效抑制农杆菌生长和筛选抗性组织的同时,尽可能最小程度的影响茶树组织生长。

头孢霉素类和羧苄青霉素是目前茶树遗传转化

体系中常用的抑菌剂。早期, Mondal等^[13]的研究表明单独使用 400 $\mu\text{g/mL}$ 的头孢氨苄(Cephalexin, Cep)以及混合使用各 250 $\mu\text{g/mL}$ 的羧苄青霉素(Carbenicillin, Car)和头孢噻肟(Cefotaxime, Cef)均可有效控制农杆菌(EHA105 和 LBA4404)的过度生长,且对体细胞胚生长和器官发生的副作用很小。但之后的研究发现,相比头孢噻肟钠和羧苄青霉素,特美汀(Timentin, Tim)不仅抑菌效果更好,对茶树外植体的负面作用更小^[66],在茶树体胚的增殖^[20]和消除茶树叶片内生菌^[65]方面也表现出一定的积极效应。因此,作为抑菌剂,特美汀在茶树遗传转化体系中具有巨大的潜力。另外,有研究发现协同使用不同种类抗生素对根癌农杆菌(GV3101)的抑制效果要优于使用单一抗生素^[20],根据不同农杆菌选择适合的抗生素并交替使用,能有效降低农杆菌抗药现象的发生^[5]。

与抑菌剂不同的是,筛选剂则要根据导入表达载体的标记基因的不同选择相应的抗生素。目前茶树遗传转化中常用的主要有卡那霉素(Kanamycin, Kan)和潮霉素(Hygromycin, Hyg)等。有研究指出,50 mg/L Kan 是较为适宜的筛选浓度,但 Kan 对茶树愈伤组织不敏感,其抑制作用会随茶树愈伤组织形成大大减小^[12]。相比之下,Hyg 作为茶树愈伤组织筛选剂的效果要明显优于 Kan^[11, 12]。而为减少假阳性现象, Mondal等^[13]尝试在筛选后期将 Kan 浓度从 50 $\mu\text{g/mL}$ 提高到 75 $\mu\text{g/mL}$,但实验的效果并不明显。虽然提高筛选试剂浓度产生的选择压力会更明显致使未转化的外植体生长发育不良并最终死亡,但死亡或垂死的细胞也将抑制邻近的细胞并阻碍已转化细胞的生长^[3]。因此,筛选剂浓度的选择需在筛选效果和植物再生之间取得平衡。另外, Lv等^[3]研究发现,将茶树子叶愈伤组织延迟选择培养 3 d,子叶愈伤组织 GUS 瞬时表达率相比对照提高了 6.6%,适当的延迟选择培养可使已转化细胞产生抗性,从而间接提高遗传转化和再生效率,但延迟选择的时间不易过长,时间过长会使未转化的细胞迅速增殖并且在数量上优于转化的细胞,从而抑制转化细胞的正常增殖。

3.4 植物生长调节剂的使用

植物生长调节剂是茶树组织培养中不可缺少的组成部分,使用不同种类、质量浓度和配比的生长调节剂对茶树组织形成、发育及器官分化等都有很大的影响。而由于不同品种和不同器官的内源激素

水平不同, 对外源生长调节物质的敏感度也不同^[67], 使得研究各外植体再生各阶段所需生长调节剂的种类、浓度及其配比问题也变的更加复杂。就目前几例成功获得再生植株的茶树遗传转化报道来看, 虽然在茶树再生体系建立过程中生长调节剂种类和浓度的选择上各研究存在一定差异, 但大多都是以一种生长素搭配一种细胞分裂素的组成方式配比添加入培养基^[3, 13, 19, 21, 23, 41, 42], 少数只添加单一激素^[44]。不过目前茶树根芽分化的必要条件并不十分清楚, 还需后期更加系统和全面的研究, 以掌握各生长调节剂种类及配比对茶树再生及遗传转化各个过程中所起的作用, 从而有针对性地选择利用, 并不断扩大体系所适用的品种。

4 茶树遗传转化的发展前景和展望

随着转基因技术的提高和发展, 遗传转化已成为植物分子生物学和功能基因组研究中不可缺少的工具。经过学者们多年的探索, 茶树遗传转化相关研究已取得了一些进展, 但相比其他作物, 茶树在遗传转化方面的研究起步较晚, 取得的成效有限, 还存在许多问题有待研究和解决。目前, 建立一个高效稳定的茶树遗传转化体系, 是实现茶树转基因和基因编辑等分子育种技术的首要条件。而今后, 在不断完善茶树外植体遗传转化和组织培养方法的同时, 其他林木植物的成功方法以及一些新的技术或可尝试应用于茶树中, 促进茶树遗传转化技术的进步和多元发展。例如, 近期美国明尼苏达大学报道了在植物中同时表达植物分生组织发育调控因子 (Developmental regulators, DRs) 和基因编辑元件, 通过重新诱导分生组织, 不经过组织培养便能从活体植株上获得可以稳定遗传的转基因和基因编辑的芽^[68]。该技术为茶树遗传转化研究提供了新的思路和方向, 若能将其成功应用于茶树中, 则有望解决组织培养带来的离体再生困难的问题, 从而推动茶树分子育种的研究和进一步发展。

基因遗传转化技术为茶树育种提供了广阔的应用前景, 使茶树品种按生产和市场的需求进行定向改良 (例如将抗病虫、抗寒、抗旱等基因导入茶树中提高茶树抗性等) 成为可能。但基因遗传转化技术是一把双刃剑, 在带来效益的同时, 也潜藏着威胁生态环境安全的可能性。近年来, 随着转基因技术的广泛应用和发展, 转基因作物的生物安全性也越来越受到人们的重视和关注。其中, 筛选标记基

因和载体骨架序列是影响转基因作物安全性评价的重要因素^[45]。因此, 考虑到转基因作物及其产品的安全性问题, 培育具有安全选择标记或无选择标记的转基因茶树, 降低安全风险也是今后茶树转基因遗传育种研究需不断奋斗的目标。

参考文献:

- [1] 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.
Liang YR, Shi M. Advances in tea plant genetics and breeding[J]. *Journal of Tea Science*, 2015, 35(2): 103-109.
- [2] 翟秀明, 唐敏, 罗红玉, 邹秀宏, 侯渝嘉. 茶树倍性育种研究进展[J]. 中国农学通报, 2018, 34(7): 8-12.
Zhai XM, Tang M, Luo HY, Wu XH, Hou YJ. Research progress of tea polyploidy breeding[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2018, 34(7): 8-12.
- [3] Lv Q, Chen C, Xu Y, Hu SK, Wang L, et al. Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation systems in tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *Hortic Plant J*, 2017, 3(3): 105-109.
- [4] 刘硕谦, 唐雨薇, 田娜, 刘丽萍, 王若娴, 梁恒. 一种茶树咖啡因合成酶 CRISPR/Cas9 基因组编辑载体的构建方法: 105821075[P]. 2016-08-03.
- [5] 陈兰, 朱晨, 李小桢, 傅海峰, 郭玉. 茶树遗传转化体系研究进展[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(12): 14-18.
Chen L, Zhu C, Li XZ, Fu HF, Guo Y. Research progress on genetic transformation system of *Camellia sinensis* [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2019, 47(12): 14-18.
- [6] 宋大鹏. 几茶素对农杆菌介导的茶树遗传转化的影响[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2014.
- [7] 陈雨梅, 潘俊松, 何欢乐, 蔡润. 农杆菌介导的基因转化研究进展[J]. 甘肃科学学报, 2005, 17(2): 61-63.
Chen LM, Pan JS, He HL, Cai R. Progress of gene transformation mediated by *Agrobacteria* [J]. *Journal of Gansu Sciences*, 2005, 17(2): 61-63.
- [8] 胡燕. 转基因技术在茶树抗病虫育种中的应用前景[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(32): 19692.
Hu Y. Application prospect of transgene technique in tea plants breeding of resistance to diseases and pests [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(32): 19692.
- [9] 张学文, 刘选明, 董延瑜, 周朴华. 茶树愈伤组织诱导与共培养转化的初步研究[J]. 湖南农学院学报, 1994, 20(6): 550-554.
Zhang XW, Liu XM, Dong YY, Zhou PH. Preliminary study of callus induction and co-culture transformation of *Thea sinensis* [J]. *Journal of Hunan Agricultural College*, 1994, 20(6): 550-554.

- [10] Matsumoto S, Fukui M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to tea plant (*Camellia sinensis*) cells[J]. *Jpn Agr Res Q*, 1998, 32(4): 287–291.
- [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): 141–147.
Luo YY, Liang YR. Studies on the construction of *Bt* gene expression vector and its transformation in tea plant[J]. *Journal of Tea Science*, 2000, 20(2): 141–147.
- [12] 赵东, 刘祖生, 陆建良, 钱利生, 屠幼英, 奚彪. 根癌农杆菌介导茶树转化研究[J]. 茶叶科学, 2001, 21(2): 108–111.
Zhao D, Liu ZS, Lu JL, Qian LS, Tu YY, Xi B. Study on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of tea plant[J]. *Journal of Tea Science*, 2001, 21(2): 108–111.
- [13] Mondal TK, Bhattacharya A, Ahuja PS, Chand PK. 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.
- [14] 吴珊, 梁月荣, 陆建良, 金惠淑, 吴颖. 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.
Wu S, Liang YR, Lu JL, Kim H, Wu Y. Optimization of *Agrobacterium*-mediated and particle bombardment-mediated transformation systems in tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *Journal of Tea Science*, 2003, 23(1): 6–10.
- [15] Sandal I, Saini U, Lacroix B, Bhattacharya A, Ahuja PS, Citovsky V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of tea leaf explants: effects of counteracting bactericidal activity of leaf polyphenols without loss of bacterial virulence [J]. *Plant Cell Rep*, 2007, 26(2): 169–176.
- [16] 石冠华. 茶树遗传转化体系的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2012.
- [17] 项威, 史成颖, 贺志荣, 徐燕. 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.
Xiang W, Shi CY, He ZR, Xu Y. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2012, 39(5): 721–724.
- [18] 汤志近. 茶氨酸合成相关基因 RNAi 载体的构建及茶树遗传转化研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2013.
- [19] Singh HR, Bhattacharyya N, Agarwala N, Bhagawati P, Deka M, Das S. Exogenous gene transfer in Assam tea (*Camellia assamica* (Masters)) by *Agrobacterium*-mediated transformation using somatic embryo[J]. *Euro J Exp Bio*, 2014, 4(3): 166–175.
- [20] 田丽丽, 李娟, 张静, 刘建军, 王英姿, 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.
- Tian LL, Li J, Zhang J, Liu JJ, Wang YZ, et al. Studies on optimization of antibiotic species and concentration in genetic transformation of *Camellia sinensis* L. mediated by *Agrobacterium* [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15(3): 934–937.
- [21] Singh HR, Hazarika P, Agarwala N, Bhattacharyya N, Bhagawati P, et al. Transgenic tea over-expressing *solanum tuberosum endo-1*, 3-beta-D-glucanase gene conferred resistance against blister blight disease [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2018, 36: 107–122.
- [22] 唐雨薇. CRISPR/Cas9 介导的茶树基因组编辑技术体系的构建[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2018.
- [23] Singh HR, Hazarika P, Deka M, Das S. Study of *Agrobacterium*-mediated co-transformation of tea for blister blight disease resistance [J]. *J Plant Biochem Biot*, 2019, 29(2): 24–35.
- [24] 奚彪, 刘祖生, 梁月荣, 杨秀芳, 黄卫红, 等. 发根农杆菌介导的茶树遗传转化[J]. 茶叶科学, 1997, 17(S1): 155–156.
- [25] 高秀清, 成浩, 牛爱军. 茶树毛状根的诱导[J]. 特产研究, 2004(2): 31–33.
Gao XQ, Cheng H, Niu AJ. Induction of hair roots from tea [J]. *Special Wild Economic Animal and Plant Research*, 2004(2): 31–33.
- [26] 彭正云, 刘德华, 肖海军, 蒋立文, 张丽霞, 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.
Peng ZY, Liu DH, Xiao HJ, Jiang LW, Zhang LX, et al. Study on *Agrobacterium*-mediated transformation of *Camellia sinensis* L. [J]. *Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences)*, 2006, 32(2): 190–194.
- [27] 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.
Zhang GH, Liang YR, Lu JL. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated high frequency hairy root induction and genetic transformation in tea plant [J]. *Journal of Tea Science*, 2006, 26(1): 1–10.
- [28] Zhang GH, Liang YR, Jin J, Lu JL, Borthakur D, et al. Induction of hairy roots by *Agrobacterium rhizogenes* in relation to L-theanine production in *Camellia sinensis* [J]. *J Hortic Sci Biotech*, 2007, 82(4): 636–640.
- [29] John KMM, Joshi SD, Mandal AKA, Kumar SR, Kumar RR. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root production in tea leaves (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) [J]. *Indian J Biotechnol*, 2009, 8(4): 430–434.
- [30] Neelakshi B, Hijam RS, Niraj A, Bhagawati P, Ahmed G, Das S. *Agrobacterium* mediated transfer of *nptII* and *gus* genes in *Camellia assamica* [J]. *J Agric Biotech Sustain Dev*, 2014, 6(2): 22–28.
- [31] Song DP, Feng L, Rana MM, Gao MJ, Wei S. Effects of

- catechins on *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Camellia sinensis* [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2014, 119(1): 27–37.
- [32] Rana MM, Han ZX, Song DP, Liu GF, Li DX, *et al*. Effect of medium supplements on *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction from the callus tissues of *Camellia sinensis* var. *sinensis* [J]. *Int Journal Mol Sci*, 2016, 17(7): 1132.
- [33] Herrera-Estrella L, Depicker A, Montagu MV, Schell J. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector[J]. *Nature*, 1983, 303(5914): 209–213.
- [34] Herrera-Estrella L, de Block M, Messens E, Hernalsteens JP, Montagu MV, Schell J. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells [J]. *Embo J*, 1983, 2(6): 987–995.
- [35] 陈秀清. 发根农杆菌诱导毛状根研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(16): 9512–9514.
- Cheng XQ. Research progress of hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(16): 9512–9514.
- [36] 武蛟, 孔瑾, 王忆, 韩振海, 许雪峰. 发根农杆菌介导山定子遗传转化及发根再生植株[J]. 园艺学报, 2008, 35(7): 959–966.
- Wu J, Kong J, Wang Y, Han ZH, Xu XF. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and hairy root regeneration of *Malus baccata* (L.) Borkh [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2008, 35(7): 959–966.
- [37] Bahramnejad B, Naji M, Bose R, Jha S. A critical review on use of *Agrobacterium rhizogenes* and their associated binary vectors for plant transformation [J]. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(7): 107405.
- [38] 肖璇. 发根农杆菌介导的柑橘遗传转化体系建立及转基因柑橘溃疡病抗性分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- [39] Wu J, Wang Y, Zhang LX, Zhang XZ, Kong J, *et al*. High-efficiency regeneration of *Agrobacterium rhizogenes*-induced hairy root in apple rootstock *Malus baccata* (L.) Borkh [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2012, 111(2): 183–189.
- [40] 吴姗, 梁月荣, 陆建良, 黎昊雁. 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.
- Wu S, Liang YR, Lu JL, Li HY. Combination of particle bombardment-mediated and *Agrobacterium*-mediated transformation methods in tea plant [J]. *Journal of Tea Science*, 2005, 25(4): 255–264.
- [41] Mohanpuria P, Kumar V, Ahuja PS, Yadav SK. Producing low-caffeine tea through post-transcriptional silencing of caffeine synthase mRNA [J]. *Plant Mol Biol*, 2011, 76(6): 523–534.
- [42] Saini U, Kaur D, Bhattacharya A, Kumar S, Singh RD, Ahuja PS. Optimising parameters for biolistic gun-mediated genetic transformation of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) [J]. *J Hortic Sci Biotech*, 2012, 87(6): 605–612.
- [43] Bhattacharya A, Saini U, Joshi R, Kaur D, Pal AK, *et al*. *Osmotin*-expressing transgenic tea plants have improved stress tolerance and are of higher quality [J]. *Transgenic Res*, 2014, 23(2): 211–223.
- [44] Sandal I, Koul R, Saini U, Mehta M, Dhiman N, *et al*. Development of transgenic tea plants from leaf explants by the biolistic gun method and their evaluation [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2015, 123: 245–255.
- [45] 任海红, 任小俊, 王英, 刘学义. 非组培遗传转化法在农作物上的应用[J]. 山西农业科学, 2010, 38(11): 85–88.
- Ren HH, Ren XJ, Wang Y, Liu XY. Application of non-tissue culture transformation methods in farm crops [J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2010, 38(11): 85–88.
- [46] 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.
- Li LL, Jiang CJ, Fang WP, Deng WW. Transform of *dsTCS* into tea plant (*Camellia sinensis*) by pollen-tube pathway [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2007, 34(1): 20–22.
- [47] 成杨, 赵洋, 杨培迪, 杨阳, 刘振. 茶树 *Bt* 和 *Cpti* 双价抗虫基因转化研究[J]. 茶叶通讯, 2014, 41(4): 41–43.
- Cheng Y, Zhao Y, Yang PD, Yang Y, Liu Z. Transform of *Bt* and *Cpti* into tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *Journal of Tea Communication*, 2014, 41(4): 41–43.
- [48] 成杨, 杨阳, 刘振, 赵洋, 杨培迪. 双价抗虫基因转化对茶籽生长发育影响的研究初探[J]. 茶叶通讯, 2016, 43(1): 35–37.
- Cheng Y, Yang Y, Liu Z, Zhao Y, Yang PD. The effect of the transformation of the dual resistance gene on the growth of tea seeds [J]. *Journal of Tea Communication*, 2016, 43(1): 35–37.
- [49] Mohanpuria P, Kumar V, Ahuja PS, Yadav SK. *Agrobacterium*-mediated silencing of caffeine synthesis through root transformation in *Camellia sinensis* L. [J]. *Mol Biotechnol*, 2011, 48(3): 235–243.
- [50] Subramanian S, Graham MY, Yu O, Graham TL. RNA Interference of soybean isoflavone synthase genes leads to silencing in tissues distal to the transformation site and to enhanced susceptibility to *Phytophthora sojae* [J]. *Plant Physiol*, 2005, 137(4): 1345–1353.
- [51] Stanisławska J, Olszewski WL. RNA interference-significance and applications [J]. *Arch Immunol Ther Ex*, 2005, 53(1): 39–46.
- [52] Alagarsamy K, Shamala LF, Wei S. Protocol: high-efficiency in-planta *Agrobacterium*-mediated transgenic hairy root induction of *Camellia sinensis* var. *sinensis* [J].

- Plant Methods*, 2018, 14(1): 17.
- [53] 毛清黎, 施兆鹏, 李玲, 刘仲华, 朱旗. 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.
- Mao QL, Shi ZP, Li L, Liu ZH, Zhu Q. Study on inhibition of *Agrobacterium rhizogenes* by tea catechin and screening of anti-polyphenol strain[J]. *Journal of Tea Science*, 2007, 27(3): 243–247.
- [54] 仓梅芹, 周健, 成浩, 黎星辉, 王丽鸳. 几种农杆菌的耐酚性能比较与驯化研究[J]. 茶叶科学, 2008, 28(3): 189–194.
- Cang MQ, Zhou J, Cheng H, Li XH, Wang LY. Studies on polyphenol-resisting characteristics of several kinds of *Agrobacterium* and the domestication of polyphenol-resisting strain[J]. *Journal of Tea Science*, 2008, 28(3): 189–194.
- [55] 王栋鑫, 彭隼, 张爽. 农杆菌介导木本植物遗传转化的研究进展[J]. 北方园艺, 2018(2): 181–185.
- Wang DX, Peng D, Zhang S. Advances in *Agrobacterium*-mediated transformation of woody plants[J]. *Northern Horticulture*, 2018(2): 181–185.
- [56] 陈金慧, 施季森, 诸葛强, 黄敏仁. 植物体细胞胚胎发生机理的研究进展[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2003, 27(1): 75–80.
- Chen JH, Shi JS, Zhu GQ, Huang MR. Progress on the mechanism of somatic embryogenesis of plants and research trends[J]. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 2003, 27(1): 75–80.
- [57] 刘昱, 付濛濛, 安栋梁, 叶霞, 郑先波, 等. 葡萄体细胞胚发生及遗传转化体系研究进展[J]. 分子植物育种, 2018, 16(18): 6068–6079.
- Liu Y, Fu MM, An DL, Ye X, Zheng XB, et al. Research progress on somatic embryogenesis and genetic transformation system in grape[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(18): 6068–6079.
- [58] 谭和平, 周李华, 钱杉杉, 李怀平, 叶德萍. 茶树转基因技术研究进展[J]. 植物科学学报, 2009, 27(3): 323–326.
- Tan HP, Zhou LH, Qian SS, Li HP, Ye DP. Advances on transgenic technique in tea plant[J]. *Plant Science Journal*, 2009, 27(3): 323–326.
- [59] 王毅军, 严学成, 暨淑仪, 魏新姐. 茶(*Camellia sinensis* Kuntze)离体培养体细胞胚胎发生的组织细胞学研究[J]. 热带亚热带植物学报, 1994, 2(2): 47–51.
- Wang YJ, Yan XC, Ji SY, Wei XJ. Histo-cytological study on somatic embryogenesis from the leaf of *Camellia sinensis* Kuntze[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 1994, 2(2): 47–51.
- [60] 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.
- Zhang GH, Lü CY, Duan HX. Plant regeneration and genetic transformation in *Camellia sinensis*[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2010, 8(2): 345–349.
- [61] 雷攀登, 吴琼, 徐奕鼎, 王烨军, 丁勇, 等. 茶树腋芽离体培养中的褐化控制研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(7): 190–193.
- Lei PD, Wu Q, Xu YD, Wang YJ, Ding Y, et al. Prevent browning of axillary buds *in vitro* culture of *Camellia sinensis*[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(7): 190–193.
- [62] 田丽丽, 李娟, 张静, 刘建军, 王坤波, 等. 不同诱导条件对茶树体胚诱导及增殖的影响[J]. 分子植物育种, 2017, 15(2): 669–671.
- Tian LL, Li J, Zhang J, Liu JJ, Wang KB, et al. The effect on embryogenic induction and proliferation of *Camellia sinensis* in different inductive condition[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15(2): 669–671.
- [63] Sandal I, Bhattacharya A, Saini U, Kaur D, Sharma S, et al. Chemical modification of L-glutamine to alpha-amino glutarimide on autoclaving facilitates *Agrobacterium* infection of host and non-host plants; a new use of a known compound[J]. *BMC Chem Biol*, 2011, 11: 1.
- [64] Kumar N, Gulati A, Bhattacharya A. L-Glutamine and L-Glutamic acid facilitate successful *Agrobacterium* infection of recalcitrant tea cultivars[J]. *Appl Biochem Biotech*, 2013, 170: 1649–1664.
- [65] Alagarsamy K, Shamala LF, Wei S. Influence of media supplements on inhibition of oxidative browning and bacterial endophytes of *Camellia sinensis* var. *sinensis*[J]. *Biotech*, 2018, 8(8): 356.
- [66] 杨亚萍, 李永兰, 梁月荣, 陆建良, 郑新强. 发根农杆菌抑菌剂的抑菌效果及对茶组培苗丛生芽的影响[J]. 茶叶科学, 2015, 35(5): 437–442.
- Yang YP, Li YL, Liang YR, Lu JL, Zheng XQ. Antibiotics inhibition to *Agrobacterium rhizogenes* and effect to tea multiple shoots[J]. *Journal of Tea Science*, 2015, 35(5): 437–442.
- [67] 岳川, 曾建明, 章志芳, 王新超, 曹红利. 茶树中植物激素研究进展[J]. 茶叶科学, 2012, 32(5): 382–392.
- Yue C, Zeng JM, Zhang ZF, Wang XC, Cao HL. Research progress in the phytohormone of tea plant(*Camellia sinensis*)[J]. *Journal of Tea Science*, 2012, 32(5): 382–392.
- [68] Maher MF, Nasti RA, Vollbrecht M, Starker CG, Clark MD, et al. Plant gene editing through de novo induction of meristems[J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 84–89.

(责任编辑: 周媛)