



刘炎,刘克俭,王江,等.农杆菌介导的针叶树种遗传转化研究进展[J].黑龙江农业科学,2021(4):136-141.

农杆菌介导的针叶树种遗传转化研究进展

刘炎¹,刘克俭²,王江²,王颖²,张毓航伊²,王昊²,初艳³,由香玲¹

(1.东北林业大学 生命科学学院,黑龙江 哈尔滨 150040;2.吉林省永吉县国有林总场,吉林 永吉 132100;3.吉林市林业科学研究院,吉林 长春 130033)

摘要:农杆菌介导法是目前遗传转化应用最广泛的技术手段之一。本文主要从农杆菌菌株、外植体类型、预培养时间、侵染过程、共培养条件以及抗性细胞的筛选等方面综述了影响针叶树转化效率的因素,为针叶树的遗传转化及遗传育种研究提供参考。

关键词:针叶树;农杆菌介导;遗传转化

针叶树是指树叶细长如针的树种,在世界分布范围广,多数种类在各地林区组成针叶林或针、阔叶混交林。因具有很高的经济价值而被广泛种植,是重要的造林树种^[1]。农杆菌介导的遗传转化是一种被广泛使用的研究工具,通过农杆菌在侵染植物将目的基因或 DNA 随 Ti(Tumor inducing)质粒或 Ri(Root inducing)质粒插入并整合到植物基因组中,使外源基因在植物基因组中遗传和表达^[2]。遗传转化技术打破了常规育种的界限,可以更多、更快、更好地创造新品种、新类型和新种质,达到植物定向改良的目的。植物遗传转化最早发生在 20 世纪 80 年代,目前获得大约 50 多个物种,共 120 多种转基因植物^[3],如香蕉^[4]、苹果^[5]、木瓜^[6]、杨树^[7]、松树^[8]等木本植物。其中针叶树由于其组织再生缓慢、对抗生素敏感、转化体系不完善等原因,其转化难度较大^[9]。自 1934 年,Smith^[10]发现根癌农杆菌能侵染针叶树以来,目前也有针叶树种获得了转基因植株,如爻晓强^[11]以马尾松成熟合子胚为外植体将 RCA 小同工型基因导入受体细胞,提高了马尾松光合生产力。张利^[9]以白皮松成熟胚合子胚子叶为外植体,转入抗盐基因 SOS1 和 NHX1,使白皮松植株获得抗盐耐碱能力。证明利用农杆菌转化法获得转基因针叶树种是可行的。本文将依据现有研究报道,对影响针叶树种遗传转化的因素进行综述。

1 针叶树遗传转化农杆菌菌株的选择

用于植物遗传转化农杆菌的菌株分为 3 种类型,即章鱼碱型、胭脂碱型和农杆菌型(琥珀碱型),其代表菌株分别为 LBA4404、GV3101、EHA101/EHA105^[12]。章鱼碱型菌株转化困难,不易脱菌;胭脂碱型生长迅速,容易操作;农杆菌型与胭脂碱型相似^[13]。不同的农杆菌菌株对针叶树种遗传转化影响非常显著,也与针叶树的种类有关。Humara 等^[14]和 López 等^[15]分别以意大利伞松成熟合子胚的子叶和黑云杉子叶为受体材料,利用 GUS 基因瞬时表达,研究发现菌株 EHA105 转化效果明显优于菌株 LBA4404 和菌株 GV3850。而在白云杉胚性组织的遗传转化中,只有菌株 EHA105 转化成功,而 LBA4404 和 GV3101 都没有得到转基因植株^[16]。Tang 等^[8]以火炬松成熟合子胚为材料,利用菌株 LBA4404 成功获得了转 *MtId* 和 *GutD* 基因的抗盐植株。利用菌株 GV3101 对油松愈伤组织进行瞬时侵染,其转化率高达 70.1%^[17]。由此可见,不同针叶树遗传转化,其菌株的选择几乎没有规律可循,受针叶树种的影响较大。

2 针叶树遗传转化外植体的选择

外植体是影响植物遗传转化的重要因素,植物的细胞、组织、器官或原生质体均可作为遗传转化的受体材料。常用的外植体一般包括根、茎、叶片、茎尖生长点、下胚轴、体细胞胚、幼胚、成熟胚等^[11]。由于针叶树再生体系的建立比较困难,适合针叶树遗传转化的外植体非常有限。目前成熟的和未成熟的合子胚、体细胞胚、幼苗(种子实生苗、组培的再生苗)、茎尖分生组织、子叶都作为遗传转化的受体材料获得了成功转化。其中合子胚

收稿日期:2020-11-18

作者简介:刘炎(1995—),女,在读硕士,从事植物细胞工程研究。E-mail:youxiangling@nefu.edu.cn。

通信作者:由香玲(1971—),女,博士,教授,博导,从事植物细胞工程研究。E-mail:youxianglingqu@hotmail.com。

和体细胞胚是最适于诱导胚性愈伤组织。例如马尾松^[18]、斜松^[19]、火炬松^[20]等都是利用成熟的合子胚获得了较好的遗传转化效果;思茅松^[21]、日本柳杉^[22]等以再生的体细胞胚为外植体,成功进行了遗传转化;也有以子叶为外植体进行遗传转化的,如意大利伞松^[14]、黑云杉^[15]、白皮松^[9]、辐射松^[23]等;另外白云杉^[16]旺盛分裂的胚性悬浮组织也是良好的遗传转化材料,还有火炬松茎尖分生组织^[24]、长白落叶松的幼苗^[25]等也成功获得了瞬时转化。

3 农杆菌介导针叶树遗传转化的预培养时间

外植体在侵染农杆菌之前,需要在诱导培养基或分化培养基中预培养一定时间,期间可产生酚类物质,对农杆菌的 *Vir* 基因有激活作用,有利于 T-DNA 转移、插入和整合^[26]。一般来说利用农杆菌转化针叶树种的预培养时间多数以 3~7 d 为宜。张利^[9]比较了不同预培养时间对白皮松子叶抗性芽产生的影响,发现预培养 3~7 d 时,抗性芽产生的频率从 4% 增加到 8%。马尾松初生茎顶组织预培养时间从 0~1 d 上升到 3~7 d 时,抗性芽产生的频率从 6.3% 增加到 22.0%^[27-28]。在建立杉木茎段转化体系时,预培养 1~3 d 为最适时间^[29]。在白松成熟合子胚^[30]和马尾松合子胚^[21]的转化试验中,预培养时间为 3 d 时均可成功获得转化植株。而 Maleki 等^[18]发现马尾松合子胚预培养 7 d 转化效率最高。Grant 等^[23]发现预培养 4 d 的辐射松子叶细胞分裂水平达到最高,有利于农杆菌转化。对于黑云杉子叶来说,预培养 7 d 瞬时转化的效率明显提高^[28]。

4 农杆菌介导针叶树遗传转化的侵染过程

在农杆菌侵染的过程中菌液浓度、侵染时间、添加剂、超声处理等也是影响针叶树种遗传转化效率的关键因素。

4.1 菌液浓度和时间

在植物遗传转化试验中,侵染时间和侵染浓度的最佳组合是针叶树种转基因成功的重要因素之一。针叶树种用于侵染的菌液浓度,用 OD 值表示一般在 0.3~0.8。当细菌溶液浓度过低时,农杆菌在共培养时增殖缓慢,则转化几率较小;反之,当菌液浓度过高,外植体在共培养时周围农杆菌过度增殖,外植体则会受毒害而死亡^[29]。同时

侵染时间也影响 T-DNA 的转移,从而影响遗传转化效率。根据针叶树种的外植体种类和生理状态,侵染时间大多数在 30 min 以内。张利^[9]在白皮松遗传转化中使用的菌液为 $OD_{600} = 0.4$,感染 30 min 的组合得到了最佳的转化效果。采用 $OD_{600} = 0.4$,侵染时间 10 min 的组合在落叶松胚性愈伤组织的转化中获得较好的效果^[30]。意大利伞松子叶瞬时转化实验, $OD_{600} = 0.8$,侵染 30 min,效果最佳^[14]。王静^[31]发现在菌液浓度 $OD_{600} = 0.4$ 、侵染时间 20 min 有利于提高 T-DNA 的转移效率,抗性愈伤组织诱导率最高。而杉木遗传转化研究中,使用 $OD_{600} = 0.1 \sim 0.4$,侵染时间为 10~15 min 的组合获得抗性芽最多^[32]。许想平等^[33]在曼地亚红豆杉细胞遗传转化实验中,侵染时间为 25 min, $OD_{600} = 0.6$ 。白晓明^[34]采用 $OD_{600} = 0.6$,侵染 20 min 的组合成功获得长白落叶松抗性愈伤组织。还有试验表明,在火炬松成熟合子胚的转化中,用低质量浓度的菌液($OD_{600} = 0.2$)侵染 5~20 min 不能检测到 *GUS* 基因的瞬时表达,即使侵染时间达到 30 min,瞬时表达率只有 6.7%;而 $OD_{600} = 0.8$ 时,侵染 15~30 min,瞬时表达率能达到 70% 左右^[35]。另外,对农杆菌进行预处理也可提高针叶树种遗传转化效率,如将农杆菌悬浮液在 4 °C 下冷处理 5 h 可获得较高马尾松合子胚的转化率^[18]。

4.2 添加剂

在农杆菌介导的植物材料转化过程中,侵染液中添加一些诱导剂可活化农杆菌 *Vir* 区基因,可有效促进 T-DNA 的转移^[3],如乙酰丁香酮(Acetosyringone, AS)、松柏醇(Coniferyl alcohol, CA)等。针叶树的遗传转化过程中也同样需要添加这几种物质。不同受体材料的 AS 的添加量也不相同。挪威云杉和火炬松遗传转化中,侵染悬浮液中使用的 AS 浓度也为 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[36]。段晓强^[11]在马尾松成熟合子胚遗传转化体系研究中,侵染液中加入 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AS 更有利于转化。在意大利伞遗传转化实验中,AS 浓度为 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时转化效率可达 70% 以上^[14]。在白皮松成熟胚^[9]转化中,在侵染液中添加 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,AS 转化效率最高。

Tween-20 是一种表面活性剂,可以提高细胞膜的通透性,加快 T-DNA 的转移速度。多种植物在侵染液中添加 Tween-20 极大提高了遗传转化效率,例如在玉米愈伤组织的转化侵染液中添加

加 0.1% 和 0.01% Tween-20, 可以将 *GUS* 表达率分别提高 1.6 和 1.4 倍^[37]。刘志学等^[38]在农杆菌菌液和水稻材料的混合物中加入 0.1% Tween 20 并进行负压处理, 水稻愈伤组织存活率提高了 8.78 倍。在针叶树种的遗传转化中使用 Tween-20 也有同样的效果, 例如在落叶松愈伤组织侵染液中添加 0.1% Tween-20 的表面活性剂, 可以极大提高转化率^[31]。

4.3 超声处理

研究还表明超声波介导法有利于针叶树种进行遗传转化^[39]。农杆菌侵染外植体时, 超声波可以破坏植物细胞壁, 将 DNA 或核酸转移到细胞中, 提高遗传转化能力^[40]。超声辅助农杆菌介导法是由 1997 年首次应用的, Trick 等^[41]报道, 用超声处理辅助农杆菌转化中, 绿豆原生质体的瞬时表达水平得到显著提高。意大利伞松转化实验中根癌农杆菌联合超声的方法产生了 28% *GUS* 阳性植株^[14]。2003 年在火炬松成熟合子胚转化试验中, 利用超声处理外植体能显著提高农杆菌介导的基因转移效率^[20]。2007 年东方白松合子胚超声 45 s 后获得了 95% 的 *GUS* 瞬时表达频率^[42]。

5 农杆菌介导针叶遗传转化的共培养条件

侵染后的外植体需要在固体培养基上进行共培养, 外植体细胞分裂和生长, 附着在外植体上的农杆菌也随之增殖生长, 并将 T-DNA 转移到植物受体细胞进行遗传整合, 达到转化的目的。绝大多数植物遗传转化共培养的时间在 2~3 d^[43-45], 针叶树共培养的时间也类似。例如在杂种冷杉胚性组织细胞系^[46]和白云杉胚性组织^[16]遗传转化中, 共培养时间为 48 h。长白落叶松愈伤组织共培养 48 h, 成功获得抗性愈伤组织^[34]。马尾松成熟合子胚共培养时间为 72 h^[11, 18]。在意大利伞松转化试验中, 使用 72 和 48 h 的共培养时间, 转移效率提高了 15 倍^[14]。也存在特殊的情况, 例如马尾松初生茎顶组织共培养 5~6 d 转化效率最高, 适合杉木茎段的共培养时间为 4~5 d^[27]。

与侵染过程类似, 在共培养基中添加一些物质可以提高转化效率, 通常添加 AS。例如在共培养基里中加入 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 AS 可提高白云杉转化效率^[16, 47], 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 AS 可以提高杉

木转化率^[32]。利用农杆菌介导的展叶松 *GUS* 基因转化中, 添加了 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 AS^[48]。在白皮松成熟胚^[11]和长白落叶松体细胞胚^[13]转化中, 在侵染液和共培养基中同时使用 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 AS 转化效率最高。杂交落叶松共培养基中加入 CA 可以提高转化率^[47]。Ellis 等^[49]对杂种落叶松进行转化, 也证明共培养基中添加 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CA 能提高农杆菌对针叶树的转化效率。王静^[31]研究表明在侵染液中和共培养基中添加 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 AS 或 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CA 对落叶松愈伤组织的转化有诱导效应, 同时添加 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 AS 和 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CA 效果最好, 抗性愈伤率提高为对照的 2 倍。

也有报道显示共培养基中添加冈田酸和三氟拉嗪也能提高植物的遗传转化效率。在东方白松共培养过程中添加 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 冈田酸, 抗性愈伤组织率提高了 3.5 倍, 添加 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三氟拉嗪抗性愈伤组织率提高了 2.5 倍^[42]。

在共培养过程中添加一些抗氧化剂, 例如 AgNO_3 、半胱氨酸(CYS)、抗坏血酸(VC)、二硫苏糖醇(DDT)、硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)、聚乙烯吡咯烷等, 可以抑制植物细胞的过氧化物酶(POD)和多酚氧化酶(PPO 酶)的活性, 减少组织褐化, 提高转化率^[50]。例如在大豆子叶节转化的共培养基中添加 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 硝酸银来降低外植体褐化程度从而提高转化率^[51]。在共培养基中添加 800 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 半胱氨酸后, 侵染后的小麦幼胚没有出现组织坏死和细胞凋亡, 且添加了半胱氨酸后转化效率相对较高^[52]。在共培养基中加入 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硫代硫酸钠能有效防止大豆子叶节褐化, 提高丛生芽率^[53]。在针叶树种目前还未有相关报道, 可考虑在今后的针叶树遗传转化中添加抗氧化剂来提高转化效率。

6 农杆菌介导针叶树遗传转化的抗性细胞筛选培养

6.1 外植体脱菌

共培养后为除去附着于外植体上的农杆菌, 通常使用抗生素对农杆菌生长进行抑制, 以达到脱菌的效果。目前常用的抗生素有羧苄青霉素(Carbenicillin, Carb)、头孢霉素(Cefotaxime, Cef)和特美汀(Timentin, Tim), 其除菌的效果与菌株有关。

王静^[31]研究发现, 使用 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Carb 洗涤共培养后的落叶松愈伤组织并在培养基中添加

Carb 可抑制农杆菌 EHA105 生长,并且 Carb 的抑菌效果明显优于 Cef 或 Cef 与 Carb 的组合^[31]。思茅松成熟胚的遗传转化中,使用 $800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Carb 作为抑菌剂,明显抑制农杆菌 C58 活性^[54]。朱彩虹^[30]发现 Carb 对落叶松胚性愈伤组织有毒害作用,使用 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cef 可有效抑制农杆菌 GV3101 的生长,并能够促进细胞生长。长白落叶松体细胞胚^[13]转化试验用 Cef 对农杆菌 GV3101 进行脱菌。马尾松成熟合子胚转化试验中使用 Cef 抑制农杆菌 EHA105 效果也较为理想^[11]。海岸松体细胞胚遗传转化中在选择培养基中添加 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cef 来抑制农杆菌生长取得了较好效果^[55]。斜松成熟合子胚转化试验使用 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tim 可以有效抑制农杆菌(GV3101、EHA105、LBA4404)的活性^[19]。

此外,由于针叶树种的外植体通常较脆弱,脱菌过程中减少对受体材料的伤害也是非常重要的。在落叶松胚性愈伤组织转化中选用添加 Carb 的 0.1% 甘露醇溶液代替无菌水或液体培养基作为脱菌液可维持一定的渗透压,减少脱菌液对落叶松愈伤组织的伤害^[31]。

6.2 抗性细胞的筛选

6.2.1 延迟筛选 由于针叶树种的外植体通常对抗生素更为敏感,适当延迟筛选,更有利于抗性组织的获得。长白落叶松愈伤组织共培养后在不添加的抗生素培养基中恢复培养 7 d 再进行筛选,转化效率明显提高^[46]。马尾松茎顶组织恢复培养 5~6 d,茎段恢复培养 6~7 d 转化效果最好^[27]。长白落叶松体细胞胚恢复培养 3~7 d 后进行筛选,可获得更多抗性组织^[13]。杉木侵染后延迟 3 d 进行筛选,转化效果最佳^[32]。在挪威云杉和火炬松胚性悬浮细胞转化实验中,共培养后至少要经过 7 d 的时间进行筛选才可获得抗性组织^[36]。朱彩虹^[30]研究了农杆菌介导的日本落叶松胚性细胞遗传转化,恢复培养 7 d 后,在含 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Hyg 的固体培养基上多次筛选,最终共获得 54 个抗性细胞系。使用 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Carb 洗涤后在无选择压的培养基上恢复培养 7 d 再筛选,并不断降低 Carb 使用浓度,筛选 2 次可明显降低抗生素对胚性细胞和体细胞胚诱导及分化的抑制,有利于胚性愈伤组织较快地恢复生长^[31]。

6.2.2 筛选剂 筛选抗性细胞也是遗传转化过程中的重要环节,针叶树种遗传转化过程中常用的筛选剂主要有两种:卡那霉素(Kanamycin,

Kan)和潮霉素(Hygroscopic, Hyg),这两者均严重阻碍植物生长和发育。

6.2.3 浓度 不同植物对不同抗生素的敏感性不同,在转化前需要去测试不同外植体的敏感程度,确定适宜的选择压。被子植物在进行遗传转化时常用的 Kan 浓度通常在 $40 \sim 150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[56-58],有的甚至达到 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[59]。Hyg 浓度多数在 $5 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[56-57]。西瓜子叶节不定芽分化的 Hyg 筛选浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[44]。而裸子植物尤其是针叶树遗传转化选择的 Kan 和 Hyg 浓度相对较低,Kan 浓度多数在 $10 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Hyg 浓度大多在 $1 \sim 5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。张利^[9]在白皮松转化中确定 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Kan 对细胞生长起到抑制作用。在海岸松^[55]和火炬松^[35]的转化研究中,选择 $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Kan 来筛选基因材料。马尾松合子胚转化实验中选择的 Kan 浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[11]。白云杉胚性组织遗传转化研究中,使用 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Kan 筛选 42 d 获得抗性组织^[16]。杉木转化实验中选择 $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Kan 进行筛选^[32]。李哲馨^[60]在落叶松胚性细胞的转化中选择的 Hyg 浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,落叶松体细胞胚的转化中同样采用 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[61]。

6.2.4 筛选强度 有研究发现使用 Kan 筛选抗性组织假阳性高达 90%,而使用 Hyg 筛选获得的抗性组织均为阳性^[62]。同样在落叶松的抗性组织筛选中,Hyg 效果优于 Kan,使用浓度为 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[13]。朱彩虹^[30]使用 Hyg 筛选得到的抗性组织均为阳性转化体。Hyg 在低浓度下短时间内就可以起到明显抑制作用,因此筛选效果比较好,但毒害作用比 Kan 更强烈和迅速,因此需要根据材料选择合适的抗生素。

7 结语

针叶树在林木经济中占有非常重要的地位,对其进行遗传转化是进行新材料创作及获取转基因新品种的重要手段。影响农杆菌介导的针叶树种遗传转化体系的影响因素有很多,对不同的针叶树种中不同材料遗传转化体系的构建,需要充分考虑各影响因素的作用,系统研究、优化、筛选适宜的农杆菌介导遗传转化条件。虽然随着实验技术和研究方法的持续更新和改善,农杆菌介导的遗传转化在针叶树种上取得了一定成果,但与其他被子植物的研究相比,还存在转化树种种类有限、转化效率普遍不高等问题,有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 何畏. 针叶树自然类型的形态特征研究进展[J]. 防护林科技, 2019(10): 66-68.
- [2] 黄颜众, 郭娜, 轩慧冬, 等. 农杆菌介导的基因转化及在生产中的作用[J]. 大豆科技, 2019(5): 62-64.
- [3] 叶兴国, 王艳丽, 丁文静. 主要农作物转基因研究现状和展望[J]. 中国生物工程杂志, 2006(5): 93-100.
- [4] 陆英, 李华平, 郑服丛. 利用农杆菌介导法获得转基因香蕉植株[J]. 热带农业科学, 2007(2): 10-13.
- [5] 陈秀孔. 农杆菌介导湖北海棠 *MhNPR1* 基因转化‘长富 6 号’的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [6] 何玮毅. 双 T-DNA 共转化获得转基因番木瓜的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2009.
- [7] 黄佳欢, 刘关君, 陈瑾元, 等. 小黑杨 *PnCCH10* 基因的克隆、功能初步鉴定及遗传转化[J]. 植物生理学报, 2019, 55(11): 1625-1637.
- [8] Tang W, Peng X, Newton R J. Enhanced tolerance to salt stress in transgenic loblolly pine simultaneously expressing two genes encoding mannitol-1-phosphate dehydrogenase and glucitol-6-phosphate dehydrogenase[J]. Plant Physiol Biochem, 2005, 43(2): 139-146.
- [9] 张利. 白皮松组织培养和遗传转化的初步研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
- [10] Smith C O. Crown gall on conifers[J]. Phytopathology, 1934, 25(1): 894.
- [11] 段晓强. 马尾松组织培养与遗传转化的研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2017.
- [12] Gurel S, Gurel E, Miller T I, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Sorghum bicolor* using immature embryos [J]. Methods in Molecular Biology, 2012, 847(10): 109-122.
- [13] 宋跃. 长白落叶松体细胞胚胎发生及遗传转化研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2017.
- [14] Humara J M, Lopez M, Ordas R J. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Pinus pinea* L. cotyledons: An assessment of factors influencing the efficiency of *uidA* gene transfer[J]. Plant Cell Reports, 1999, 19(1): 51-58.
- [15] López M, Humara J M, Roberto R, et al. Factors involved in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer into *Pinus nigra* Arn. ssp. *Salzmannii* (Dunal) Franco[J]. Euphytica, 2000, 114(3): 195-203.
- [16] Le V Q, Belles I J, Dusabenyagasani M, et al. An improved procedure for production of white spruce (*Picea glauca*) transgenic plants using *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Journal of Experimental Botany, 2001, 52(364): 2089-2095.
- [17] Liu S W, Ma J J, Liu H M, et al. An efficient system for *Agrobacterium*-mediated transient transformation in *Pinus tabulaeformis*[J]. Plant Methods, 2020, 16(1).
- [18] Maleki S S, Mohammadi K, Ji K S. Study on factors influencing transformation efficiency in *Pinus massoniana* using *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Cell, Tissue Organ Culture, 2018, 133(3): 437-445.
- [19] Tang W, Xiao B, Fei Y. Slash pine genetic transformation through embryo cocultivation with *A. tumefaciens* and transgenic plant regeneration[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant, 2014, 50(2): 199-209.
- [20] Tang W. Additional virulence genes and sonication enhance *Agrobacterium tumefaciens*-mediated loblolly pine transformation[J]. Plant Cell Reports, 2003, 21(6): 555-562.
- [21] Malabadi R B, Silva A T, Nataraja K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of *Pinus kesiya* Rpyle ex Gord (Khasi Pine) [J]. Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology, 2008, 2: 7-14.
- [22] Taniguchi T, Ohmiya Y, Kurita M, et al. Regeneration of transgenic *Cryptomeria japonica* D. Don after *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic tissue[J]. Plant Cell Reports, 2008, 27(9): 1461-1466.
- [23] Grant J E, Cooper P A, Dale T M. Transgenic *Pinus radiata* from *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of cotyledons [J]. Plant Cell Reports, 2004, 22(12): 894-902.
- [24] Gould J H, Zhou Y X, Padmanabhan V. Transformation and regeneration of loblolly pine: shoot apex inoculation with *Agrobacterium* [J]. Molecular Breeding, 2002, 10: 131-141.
- [25] 张磊, 熊欢欢, 曹庆, 等. 瞬时遗传转化长白落叶松 NAC 基因植株抗旱性的研究[J]. 植物研究, 2020, 40(3): 394-400.
- [26] 赵巧阳. 香蕉根癌农杆菌介导 ACS 反义基因遗传转化及 ACS 基因克隆[D]. 福州: 福建农林大学, 2009.
- [27] 张宇. 三种针叶树种遗传转化受体系统的建立及农杆菌介导的遗传转化研究[D]. 上海: 中国科学院研究生院(上海生命科学研究院), 2006.
- [28] Charest P J, Devantier Y, Lachance D. Stable genetic transformation of *Picea mariana* (black spruce) via particle bombardment[J]. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant, 1996, 32(2): 91-99.
- [29] 郭佳. 杉木的遗传转化研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2005.
- [30] 朱彩虹, 李水根, 齐力旺, 等. 农杆菌介导的日本落叶松胚性细胞遗传转化研究[J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(5): 75-80.
- [31] 王静. 利用胚性愈伤组织进行落叶松遗传转化体系的研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2007.
- [32] 席梦利. 杉木转基因受体系统的建立及遗传转化研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2004.
- [33] 许想平, 于小青, 董艳山, 等. 农杆菌介导的曼地亚红豆杉细胞遗传转化体系的建立[J]. 山地农业生物学报, 2012(5): 406-411.
- [34] 白晓明. 长白落叶松 *LoCAT* 基因的克隆及功能分析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2019.
- [35] Tang W. *Agrobacterium*-mediated transformation and assessment of factors influencing transgene expression in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) [J]. Cell research, 2001, 11(3): 237-243.
- [36] Wenck A R, Quinn M, Whetten R W, et al. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of Norway spruce (*Picea abies*) and loblolly pine (*Pinus taeda*) [J]. Plant Molecular Biol-

- ogy, 1999, 39(3): 407-416.
- [37] 杨爱国. 农杆菌介导玉米愈伤遗传转化体系优化及基因工程雄性不育系初步研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2006.
- [38] 刘志学, 马向前, 何艺园, 等. 农杆菌介导遗传转化中辅助处理方法的改良[J]. 复旦大学学报(自然科学版), 1999, 38(5): 601-604.
- [39] Beranova M, Rakousky S, Vavrova Z, et al. Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation enhances the transformation efficiency in flax(*Linum usitatissimum* L.)[J]. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 2008, 94(3): 253-259.
- [40] Liu Y, Yang H, Sakanishi A. Ultrasound: Mechanical gene transfer into plant cells by sonoporation[J]. Biotechnology advances, 2006, 24(1): 1-16.
- [41] Trick H N, Finer J J. SAAT: Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. Transgenic Research, 1997, 6(5): 329-336.
- [42] Tang W, Lin J, Newton R J. Okadaic acid and trifluoperazine enhance *Agrobacterium*-mediated transformation in eastern white pine[J]. Plant Cell Reports, 2007, 26(5): 673-682.
- [43] 李静, 张换样, 朱永红, 等. 农杆菌介导棉花遗传转化的影响因素[J]. 南方农业, 2020, 14(22): 8-12, 28.
- [44] 张曼, 徐锦华, 刘广, 等. 西瓜‘SM1’高效遗传转化体系的构建[J]. 分子植物育种, 2020(5): 1-7.
- [45] 崔永祯, 赵红, 黄格, 等. 农杆菌介导的冷诱导基因水稻遗传转化体系的建立[J]. 江西农业学报, 2020, 32(7): 6-11.
- [46] Salaj T, Moravcikova J, Vookova B. *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic tissues of hybrid firs (*Abies* spp.) and regeneration of transgenic emblings[J]. Biotechnology Letters, 2009, 31(5): 647-652.
- [47] Levée V, Lelu M A, Jouanin L, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of hybrid larch (*Larix kaempferi* T L. decidua) and transgenic plant regeneration[J]. Plant Cell Reports, 1997, 16(10): 680-685.
- [48] Nigro S A, Makunga N P, Jones N B. An *Agrobacterium*-mediated system for gene transfer in *Pinus patula* [J]. South African Journal of Botany, 2008, 74(1): 144-148.
- [49] Ellis D D, McCabe D E, Mcinnis S L. Stable transformation of *Picea glauca* by particle acceleration[J]. Nature Biotechnology, 1993, 11(1): 84-89.
- [50] 杨柳, 于翠梅, 刘铭, 等. 农杆菌介导大豆遗传转化影响因素研究进展[J]. 大豆科学, 2018, 37(5): 803-808.
- [51] 杨权, 王月月, 刘炎光, 等. 大豆子叶节遗传转化体系优化及抗逆基因 *AtNHX5* 的转化研究[J]. 大豆科学, 2015, 34(2): 205-211.
- [52] 李静雯, 张正英. 根瘤农杆菌介导的大麦幼胚遗传转化影响因素研究[J]. 大麦与谷类科学, 2010(2): 1-6.
- [53] 王伟, 姚嘉龙, 熊鹤雯, 等. 大豆科丰 14 子叶节遗传转化体系的优化[J]. 大豆科学, 2015, 34(3): 389-393.
- [54] 吴涛, 陈少瑜, 陈芳, 等. 思茅松成熟胚无菌萌发及农杆菌介导的遗传转化[J]. 东北林业大学学报, 2008, 36(2): 10-12, 15.
- [55] Alvarez J M, Ordas R J. Stable *Agrobacterium*-mediated transformation of maritime pine based on kanamycin selection [J]. The Scientific World Journal, 2013 (5): 681792-681801.
- [56] 于永明, 王军辉, 麻文俊, 等. 不同浓度卡那霉素、潮霉素对桉树试管苗生长的影响[J]. 生物技术通讯, 2014, 25(6): 832-836.
- [57] 张小平. 不同抗生素的浓度对百合鳞片再生的影响[J]. 绿色科技, 2020(5): 105-109.
- [58] 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.
- [59] 丁一, 耿晓丽, 何守朴, 等. 农杆菌介导的棕色棉胚珠离体培养遗传转化体系的建立[J]. 分子植物育种, 2020(2) 1-10.
- [60] 李哲馨. 过表达 LaMIR166a 在落叶松 ESMs 成胚发育及其萌发过程中的功能研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2017.
- [61] 肖霞. 落叶松 miR396 对体细胞胚发育的调控及 GRF 基因的表达研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2015.
- [62] Trontin J F, Harvengt L, Garin E. Towards genetic engineering of maritime pine(*Pinus pinaster* Ait.)[J]. Annals of Forest Science, 2002, 59(5): 687-697.

Research Progress on *Agrobacterium* Mediated Genetic Transformation of Conifer Species

LIU Yan¹, LIU Ke-jian², WANG Jiang², WANG Ying², ZHAG Yu-hang-yi², WANG Hao², CHU Yan³, YOU Xiang-ling¹

(1. College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 2. State Owned Forest Farm of Yongji County, Yongji 132100, China; 3. Jilin Academy of Forestry Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: *Agrobacterium* mediated transformation is one of the most widely used methods in genetic transformation. In this paper, the factors affecting the transformation efficiency of conifer were summarized from the aspects of *Agrobacterium* strains, explant types, pre-culture time, infection process, co-culture conditions and selection of resistant cells, so as to provide reference for improving the genetic transformation and breeding of conifer.

Keywords: conifer; *Agrobacterium* mediated; genetic transformation