

## 茶树离体再生和遗传转化的研究进展

张照亮<sup>1</sup>, 任露露<sup>2</sup>, 颜小梅<sup>1</sup>, 聂昕茹<sup>2</sup>, 杨天元<sup>1</sup>

(1. 安徽农业大学茶树生物学与资源利用国家重点实验室, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学园艺学院, 合肥 230036)

**摘要:** 茶树是我国重要的经济作物之一, 通过组织培养技术, 利用茶树茎段、腋芽、叶、花粉、种子等器官作为外植体建立茶树遗传转化的再生系统, 对获得优质茶树种质资源至关重要。目前关于茶树遗传转化方法的研究, 主要集中在农杆菌介导法和基因枪法。综述当前茶树遗传转化再生系统的研究进展, 并对今后茶树遗传转化提出展望。

**关键词:** 茶树; 遗传转化; 农杆菌介导; 基因枪法

中图分类号: S571.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2021)05-0738-06

### Research progress on regeneration *in vitro* and genetic transformation system of *Camellia sinensis*

ZHANG Zhaoliang<sup>1</sup>, REN Lulu<sup>2</sup>, YAN Xiaomei<sup>1</sup>, NIE Xinru<sup>2</sup>, YANG Tianyuan<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Utilization, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. School of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

**Abstract:** Tea plant is one of the important economic crops in China. The regeneration system of tea genetic transformation established by tissue culture technology of organs such as stem segments, axillary buds, leaves, pollen and seeds is essential to obtain high-quality tea germplasm resources. The current research on the genetic transformation methods of tea plants mainly focuses on the *Agrobacterium*-mediated method and the particle bombardment. In the paper, we reviewed the research progress of regeneration systems and genetic transformation systems in recent years, and prospected tea plant genetic transformation in the future.

**Key words:** *Camellia sinensis*; genetic transformation; *Agrobacterium*-mediated; particle bombardment

茶 (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) 属于山茶科多年生木本植物。茶叶是世界三大无酒精饮料之一, 由于独特的清香风味和镇静消炎功效, 深受国民的喜爱。截至 2019 年, 我国茶叶产量达 279.34 万 t, 其中出口茶叶 36.65 万 t, 茶园面积 4 597.86 万亩 (数据来源网络), 因此茶树是我国一种重要的经济作物。选育高产优质的茶树品种是我国科研工作者的育种目标, 常规育种和杂交育种是常用的茶树育种方法, 但由于受茶树自交不亲和、育种年限长等因素的制约, 茶树育种工作难以得到突破性进展。

植物遗传转化 (plant genetic transformation) 是指通过生物学手段将外源基因从一个有机体转移到另一个有机体, 随后在基因组中稳定表达和整合, 并能够稳定遗传的过程<sup>[1]</sup>。植物遗传转化包括以农杆菌和病毒为载体的载体转化系统; 以种质和植物

生殖细胞为种质媒介放入种质转化系统以及直接转化系统, 分为物理法和化学法。植物遗传转化技术打破了常规育种的界限, 缩短了育种年限, 对物种品质改良、增强抗逆性等具有重要意义。

利用植物遗传转化技术, 能够实现茶树定向育种, 加快育种进程, 从而获得品质优良的茶树新品种。近年来, 以茶树花药、茎段、子叶、腋芽等不同器官建立茶树的再生系统, 以农杆菌为介导、基因枪和花粉管通道等方法进行茶树遗传转化, 取得了一定的进展。本文将系统总结当前的茶树遗传转化体系的研究进展, 并对改进和提高茶树遗传转化提出一些建议和展望, 以期利用茶树遗传转化体系辅助茶树新品种选育提供理论依据和技术支持。

### 1 茶树再生体系

为了建立茶树的遗传转化体系, 需要通过组织

收稿日期: 2021-01-27

基金项目: 茶树生物学与资源利用国家重点实验室开放基金项目 (SKLTOF20170115 和 SKLTOF20170117) 资助。

共同第一作者: 张照亮, 教授, 博士生导师。E-mail: zhlzhang@ahau.edu.cn 任露露, 硕士研究生。E-mail: luluren07@163.com

培养技术建立茶树器官的再生系统。植株的再生一般要经历 4 个阶段: ①外植体经历脱分化形成愈伤组织; ②愈伤组织分化形成体细胞胚或器官; ③体细胞胚成熟萌发或芽的发育; ④植株再生<sup>[2]</sup>。目前, 尽管茶树器官再生体系已得到一定的优化和改进, 但仍有一些问题待解决。如茶树外植体的再生能力不一致、内生菌污染及外植体的褐化等因素都制约茶树诱导和分化效率, 导致茶树器官的再生系统建立困难。

关于茶树器官再生的研究始于 20 世纪 60 年代, 日本胜尾清<sup>[3]</sup>对茶树花药进行诱导, 紧接着研究人员便对茶树种子、茎段、腋芽、叶片等不同器官进行研究。下面将从不同器官的诱导、培养基的优化和外源添加物等方面阐述茶树遗传转化再生体系方面的研究进展。

## 1.1 不同器官的诱导

**1.1.1 花药** 20 世纪, 日本胜尾清等<sup>[3]</sup>最先以茶树花药为诱导材料, 获得了愈伤组织和根。国内研究者陈振光等<sup>[4]</sup>于 20 世纪 80 年代第 1 次通过茶树品种福云 7 号的花药培养获得了具有根、茎、叶的完整植株。研究指出: 茶树花药培养受其发育程度影响, 花粉发育在单核中晚期, 花药颜色以橙黄色为宜<sup>[4]</sup>。

**1.1.2 种子** 茶树的种子包括果皮、种皮、胚和子叶, 茶树种子的诱导主要是子叶和胚的诱导。茶树子叶可诱导出胚状体最后再生成完整植株<sup>[5]</sup>, 胚状体由茶树子叶表皮细胞发育而来<sup>[6]</sup>, 逐步确定了“子叶外植体→体细胞胚(分化芽)→再生植株”的茶树再生体系<sup>[7]</sup>; 另外, 未成熟胚也可诱导出愈伤组织并分化芽苗, 最后形成完整植株<sup>[8-9]</sup>; 大叶茶的成熟种子也可诱导愈伤组织并分化出丛生苗<sup>[10]</sup>。

**1.1.3 茶树腋芽** 腋芽是茶树中离体培养的常用外植体, 具有稳定的遗传特性。腋芽是微体繁殖中保持亲本最安全的材料, 且腋芽在亲本基因型保真度方面最高<sup>[11]</sup>。茶树腋芽可诱导出愈伤组织<sup>[12]</sup>并分化出芽<sup>[13]</sup>, 但在继代过程中生长变慢。

**1.1.4 茶树茎段** 20 世纪 80 年代, 国外学者利用茎段成功诱导出茶树完整植株。随后, 黄亚辉<sup>[14]</sup>以茶树茎尖为外植体诱导出愈伤组织; Akula 等<sup>[15]</sup>采用茎段培养产生体细胞胚, 并获得茶树完整植株; 刘德华等<sup>[16]</sup>利用茶树茎段产生胚性愈伤组织、体细胞胚和不定芽; 孙仲序等<sup>[17]</sup>以茶树嫩茎为外植体, 诱导出丛生芽, 并移栽生成完整植株。

**1.1.5 茶树叶片** 1989 年刘德华等<sup>[18]</sup>发现: 将茶树品种毛蟹的叶片作为外植体, 放置于含有不同激素种类和配比的 MS 培养基上, 叶具有较强的分化成愈

伤组织、胚性细胞团、胚状体以及芽的能力。1994 年王毅军等<sup>[19]</sup>以春季云南大叶茶第 1 叶和第 2 叶为外植体, 将叶片置于诱导培养基 (MS 培养基中加入  $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-苄氨基嘌呤(6-BA)、 $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  赤霉素 (GA)、 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  吲哚乙酸(IAA)和 0.2%~0.3% 活性炭) 上, 50 d 后可诱导出光滑且呈现淡黄色的愈伤组织, 随后愈伤组织的表层细胞或细胞团又可再次启动并脱分化形成胚状体, 并最终分化形成完整茶树植株, 但发育过程中有畸形胚出现。1994 年严学成等<sup>[20]</sup>以云南大叶茶和海南野生茶的春季幼叶为外植体, 在不同的培养条件下诱导出正常器官和畸形器官两种结果。1995 年暨淑仪等<sup>[21]</sup>以云南大叶茶叶片为外植体, 诱导出愈伤组织, 并对叶薄壁细胞脱分化形成愈伤组织的过程做了细胞组织学观察。

## 1.2 培养基的选择

诱导不同的外植体所用的培养基也有所不同, 常用的培养基有 Murashige and Skoog (MS)、1/2 MS、Woody Plant medium (WPM)、H、Gamborg's (B5)、改良 MS、Eriksson (ER)、Murashige and Tucker (MT), 其中 MS 培养基应用最为广泛。

陈振光等<sup>[4]</sup>先后用了 MS、N6、SJ-1、Blaydes、H 等不同基础盐培养基诱导茶树花药愈伤组织并作培养效果比较, 结果表明不同培养基对花药愈伤组织的诱导效率存在差异, 具体表现为  $\text{SJ-1} > \text{H}$ 、 $\text{MS} > \text{Blaydes} > \text{N6}$ 。郭玉琼等<sup>[22]</sup>研究发现茶树花药诱导愈伤组织受基础盐培养基种类的影响, SJ-1 培养基最有益于茶树花药愈伤组织的诱导率。

茶树种子的诱导, 主要以 ER、MS 等为基础培养基。Kato<sup>[23]</sup>以茶树种子子叶为外植体, 研究出最佳的初代培养基, 即在 MS 培养基中加入  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  维生素 B<sub>1</sub>、 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  烟酸、 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  维生素 B<sub>6</sub>、 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  甘氨酸 (Gly) 和  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  肌醇。

## 1.3 植物生长调节剂

在花药培养中, 郭玉琼等<sup>[22]</sup>发现, 不同蔗糖和激素的浓度会影响茶树花药愈伤组织的诱导。结果表明, 在 MS 基础培养基中蔗糖浓度不变且均为 3% 时, 花药愈伤组织的诱导效率随 2, 4-二氯苯氧乙酸 (2, 4-D) 浓度的增高而增大; 在基本培养基及 2, 4-D 浓度相同时, 适于茶树花药愈伤组织诱导的蔗糖浓度为 5%~7%。杨娟等<sup>[24]</sup>探索影响茶树花药愈伤组织诱导条件发现培养基为  $\text{MS} + 0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2, 4-D +  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  激动素(KT)时, 愈伤组织诱导发生率最高, 达到 34.4%。

茶树种子诱导主要添加萘乙酸(NAA)、6-BA、吲哚丁酸 (IBA)等激素。刘德华等<sup>[25]</sup>利用茶籽子叶

诱导分化出芽,所用培养基为 MS + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 维生素 B<sub>1</sub> + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 烟酸 + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 维生素 B<sub>6</sub> + 2.0 mg·L<sup>-1</sup> 甘氨酸 + 100 mg·L<sup>-1</sup> 肌醇 + 4 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 2 mg·L<sup>-1</sup> IBA, pH 为 5.7; 蔡海云等<sup>[26]</sup>用农抗早成熟胚为外植体,发现 2,4-D 和 6-BA 在一定配比下,愈伤组织的诱导率高达 97%,在 MS 培养基中加 2 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA 适合胚直接诱导成幼苗; 杨国伟等<sup>[27]</sup>在茶树诱导愈伤组织中发现,不同激素的诱导影响是不同的,2,4-D > 6-BA > NAA。

李家华等<sup>[28]</sup>研究不同激素配方诱导大叶种茶树新梢,结果表明在 MS 培养基中加 1.0% 琼脂、3.0% 蔗糖、0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA 和 4 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D 对促进腋芽生成单生芽效率最高;在 MS 培养基中加 1.0% 琼脂,3.0% 蔗糖,10 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA 和 0.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA 对腋芽诱导愈伤组织效果较好。张建华等<sup>[13]</sup>用不同培养基和激素配比探讨茶树腋芽的诱导情况,发现在 MS 培养基加 3%蔗糖、0.7% 琼脂、4 mg·L<sup>-1</sup> BA 和 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA 诱导的愈伤组织和芽效果比较好,而在继代培养过程中,ER 培养基加 3%蔗糖、0.7% 琼脂、3 mg·L<sup>-1</sup> BA 和 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA,分化芽效果显著。

黄亚辉<sup>[14]</sup>以 MS 为基础盐,加 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 维生素 B<sub>1</sub>、维生素 B<sub>5</sub>、维生素 B<sub>6</sub>、1.2 mg·L<sup>-1</sup> 维生素 C、20 g·L<sup>-1</sup> 的蔗糖、0.02 mg·L<sup>-1</sup> GA、1.5 mg·L<sup>-1</sup> IAA 和 2.0 mg·L<sup>-1</sup> BA,适宜茶树茎尖的诱导。孙仲序等<sup>[17]</sup>发现以春季嫩茎和冬季催芽萌发的嫩茎为外植体诱导更好;在 MS 培养基加 1.5 mg·L<sup>-1</sup> BA 和 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 玉米素 (ZT),诱导分化高达 83%;以 1/2 MS 添加 0.2 mg·L<sup>-1</sup> IBA 和 20 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖诱导生根最佳。张亚萍等<sup>[29]</sup>发现 MS 培养基+10 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D 对茶树茎尖诱导愈伤组织最佳。杨国伟等<sup>[30]</sup>以龙井茶幼嫩茎段为外植体,发现最适宜的愈伤组织诱导培养基配方为:MS + 3% 蔗糖 + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA。

陈玉玲等<sup>[31]</sup>比较了不同激素配比对茶树叶片和幼茎诱导愈伤组织的影响,发现 MS + 0.4 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 2 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D 为最适宜培养基。

茶树遗传转化受体体系的建立与完善对茶树遗传转化体系具有重要影响。在受体体系的研究进展中,需要解决的问题有:(1)不同器官都可作为外植体来诱导愈伤组织进而分化成丛生芽,但因茶树品种、采样时间、环境影响等因素,诱导结果存在差异,因此,应该找到一个最容易诱导的品种和诱导效率最高的茶树器官,以普遍用于茶树受体体系研究;(2)激素对茶树器官诱导结果影响也较大,但是不同的研

究中所用的激素种类、浓度也有所不同,从而导致茶树器官诱导的效果也存在差异。应根据激素的生理作用和茶树组织培养中的作用找到激素对茶树遗传转化再生体系中的普遍作用,并且能够找到最适合茶树器官诱导的激素种类和浓度。

## 2 茶树遗传转化体系

### 2.1 农杆菌介导

农杆菌的 Ti 质粒具有将 DNA 整合到植物染色体上并使之与植物内源基因同步表达的能力。因此,农杆菌经常作为一种“桥梁”用于植物遗传转化研究中。在 20 世纪 90 年代,科研人员初探农杆菌介导茶树的遗传转化并不断改进和完善,比如在农杆菌浓度、株系的选择、共培养条件的优化、外源物添加及受体的筛选等方面。到目前为止,农杆菌介导的茶树遗传转化很大程度上仅限于基因瞬时表达体系的应用。

**2.1.1 根癌农杆菌** 根癌农杆菌含有 Ti 质粒,一般采用共培养法,即在适宜条件下将根癌农杆菌与愈伤组织、悬浮培养细胞、茎切段和子叶切片等离体材料共同培养。张学文等<sup>[32]</sup>研究发现,利用福鼎大白茶的胚根、胚轴、子叶和胚芽作为外植体诱导的愈伤组织,与带 *GUS* 和 *NPTII* 基因 Ti 质粒的根癌农杆菌共培养,通过卡那霉素抗性筛选,得到了抗性愈伤组织,最终获得抗性芽。骆颖颖等<sup>[33]</sup>构建了一个含有 *Bt* 基因 *GUS* 内含子和 *NPTII* 基因的 Ti 质粒,将其质粒转化至大肠杆菌,通过三亲交配法导入到 LBA4404、EHA105、pRi15834 等农杆菌菌株中,通过农杆菌介导法将其转入茶树叶片和愈伤组织中,获得了 *GUS* 报告基因的瞬时表达组织。

Mondal 等<sup>[34]</sup>首次利用携带 *NPTII* 和 *GUS* 基因根癌农杆菌 (EHA105 和 LBA4404) 侵染茶树体细胞胚,得到了既有 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,最后获得了转基因茶树。赵东等<sup>[35]</sup>在研究根癌农杆菌侵染茶树叶片效果的影响因素时得出:农杆菌介导的茶树较为适宜的转化系统为 LBA4404 ( $OD_{600} = 0.5 \sim 0.8$ ) 侵染外植体 10 min 左右,随后在 28 °C 黑暗条件下共培养 2~3 d。

在外源添加物方面,乙酰丁香酮 (AS) 是能够提高农杆菌 T-DNA 导入植物核基因组的效率。Matsumoto 等<sup>[36]</sup>研究发现 AS 浓度达到 100~500 μmol·L<sup>-1</sup> 时对茶树的遗传转化起促进作用。项威等<sup>[37]</sup>发现共培养培养基中添加 100 μmol·L<sup>-1</sup> AS 可使农

杆菌转化效率达到 10%。此外,赵东等<sup>[35]</sup>发现不宜在茶树和农杆菌共培养阶段添加硝酸银。

筛选剂也在一定程度上影响根瘤农杆菌转化效率。骆颖颖等<sup>[33]</sup>研究发现茶树愈伤组织对卡那霉素不敏感,而对潮霉素非常敏感。田丽丽等<sup>[38]</sup>研究了头孢霉素、潮霉素和特美汀等抗生素对茶树体胚抑菌和生长的影响,结果表明 3 种抗生素对茶树体胚的抑菌和生长存在显著差异。茶树体胚生长趋势随抗生素浓度的变化而有所不同。

**2.1.2 发根农杆菌** 携带 Ri 质粒的发根农杆菌在植物遗传改造过程中具有增强次生代谢的功能,但是将其用于茶树遗传转化的研究比较少。发根农杆菌侵染茶树常用方法有直接注射法和共培养法两种。

奚彪等<sup>[39]</sup>首次利用发根农杆菌 A4T 侵染浙农 9501、9502 品系的组培幼叶,发现在高浓度的发根农杆菌和负压条件下,能够诱导茶树叶片长出发状根。高秀清等<sup>[40]</sup>将发根农杆菌(15834、9402、1601 和 A4)与龙井 43 的春梢嫩芽共培养,得到茶树毛状根,其中 15834 侵染株系的诱导效率最高。张广辉等<sup>[41]</sup>利用茶树品种浙农 129 无菌苗的茎段作为外植体,再用携带 *Bt* 基因的双元载体质粒 pCAMBIA 2301 的发根农杆菌 15834 侵染,成功诱导出发根,经 PCR 和 GUS 组织化学染色实验证实外源基因已经插入到基因组 DNA 中并获得表达。邓婷婷等<sup>[42]</sup>总结了发根农杆菌侵染茶树的机制、感染方法,还介绍发根农杆菌影响遗传转化的因素,它们包括农杆菌株系、茶树基因型和外源添加物等。Alagarsamy 等<sup>[43]</sup>用野生型发根农杆菌感染抗早品种的下胚轴,产生含有野生型芽和转基因根的复合茶树。

**2.1.3 存在问题** 茶树不同于其他植物,其含有丰富的多酚类物质。这类物质的抑菌功能使其在转化过程中杀死农杆菌从而降低转化效率;同时,多酚类物质又可作为蛋白质沉淀剂,拮抗农杆菌致病基因 *Vir*, 阻塞农杆菌的 T-DNA 向茶树细胞转运,从而间接影响茶树的转化效率<sup>[44]</sup>。因此,需要对农杆菌介导茶树遗传转化体系进行完善。Sandal 等<sup>[45]</sup>在不影响农杆菌侵染的情况下,共培养阶段时加入一定浓度的 L-谷氨酰胺,能够减轻多酚类物质的抑菌作用,从而提高农杆菌转化效率。Rana 等<sup>[46]</sup>研究发现,在基础培养基中加入活性炭或聚乙烯基吡咯烷酮(PVPP)等吸附物可吸附酚类化合物,降低其毒性,从而提高茶树的遗传转化效率。

## 2.2 基因枪法

1987 年,美国康奈尔大学的 Sanford 等人首次发明了基因枪技术。其原理主要是利用重金属颗粒

释放电子而加速,在细胞表面打孔,从而将其表面携带的外源基因引入植物受体细胞,让其整合到细胞染色体中,从而实现转化过程。与农杆菌介导法相比较而言,基因枪法适用大多数细胞或组织,克服了受体材料的限制,在烟草、豆类、果树花卉和大多数禾本植物中均获得成功。然而目前鲜有基因枪法运用于茶树遗传转化的报道。

20 世纪 90 年代,科研者开始探究基因枪技术在茶树遗传转化上的应用。奚彪等<sup>[47]</sup>比较了基因枪入射次数和不同发射压力对茶树体胚再生频率的影响,单枪入射发射压力是 1 100 ~ 1 300 psi 时,再生频率在 20% ~ 30%之间;轰击 2 次时,1 300 psi 会造成过多的伤口,且不能再生新的体胚。吴姗等<sup>[48-49]</sup>优化了基因枪介导茶树转化体系的制弹程序和相关参数,制弹程序即:在 60 mg·mL<sup>-1</sup> 钨粉悬浮液 10 μL 中加入 1.6 μL 质粒 DNA,分别加入 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 的亚精胺 4 μL, 2.5 mol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> 15 μL,最后定容至 48 μL,每次轰击上样量为 8~10 μL,获得抗性愈伤组织为 5.0% ~ 12.1%;随后,对相关参数进行优化,含有 PVP 的培养基可提高转化频率;每枪 DNA 和钨粉用量分别为 0.25 和 125 μg 时可得到较高的转化率;轰击压力为 7 MPa,射程为 5 cm 时,不论是对 *GUS* 表达还是愈伤的再生都是较为合适的轰击条件。

## 3 展望

茶树遗传转化体系的瓶颈是器官再生困难和转化效率低。因此,结合茶树的特殊性,茶树遗传转化体系的完善需要逐一解决这两个问题。

目前,茶树主要通过组织培养技术进行。与其他植物相比,茶树的组织培养存在周期长、材料受限、愈伤组织诱导率低等问题。茶树的各个器官在适宜的诱导条件下均可以产生不同类型的愈伤组织。茶树的叶片在培养基中容易形成致密的愈伤组织,但是大多不具备继续分化的能力。茶树的子叶经过适合的诱导,可以形成一定数量的胚性愈伤组织,为进一步的器官分化提供可能。但是只在每年的 8—11 月可以收获到不同成熟度的茶籽,且茶籽的保存难度较大,因此直接以茶籽的子叶为材料会严重制约茶树离体器官再生的发展。针对以上问题,在茶树的转化受体系统中,可尝试直接分化再生系统、原生质体和胚状体再生系统以提高茶树器官再生的效率。Maher 等<sup>[50]</sup>报道可以越过组织培养这一阶段,通过基因编辑分生组织实现植物转化。

除农杆菌介导和基因枪等茶树遗传转化方法需

要不断优化和完善外,还可以尝试其他方法如:脂质体、PEG、电击、花粉管通道法等。Demirer等<sup>[51]</sup>利用碳纳米管将遗传物质传递到植物细胞中,在茶树的遗传转化操作过程中也可尝试。吴姗等<sup>[49]</sup>将农杆菌与基因枪结合使用发现比两种方法单独使用时茶树的遗传转化效率更高。

本文系统总结了当前茶树器官再生和茶树遗传转化技术的研究进展,对于今后茶树稳定遗传转化技术的建立并为茶树分子辅助育种及培育出高产优质的茶树品种提供理论支撑和实践方法。

## 参考文献:

- [1] 任永霞,季静,王罡,等.植物遗传转化方法概述[J].河北北方学院学报(自然科学版),2005,21(6):38-42.
- [2] 李进,阮颖,刘春林,等.月季组织培养和遗传转化体系的研究进展[J].西北植物学报,2007,27(7):1479-1483.
- [3] 胜尾清,陈文怀.茶树花药培养的研究(第一报):培养基的组成与愈伤组织形成的关系[J].茶业通报,1981,3(S1):10.
- [4] 陈振光,廖惠华.茶树花药培养诱导单倍体植株的研究[J].福建农学院学报,1988(3):185-190.
- [5] 莫典义.茶树胚状体的诱导和植株再生[J].中国茶叶,1981(4):45.
- [6] 颜慕勤,陈平.茶树子叶离体培养形成胚状体的研究[J].林业科学,1983,19(1):25-29,113.
- [7] 余有本.茶树中咖啡碱合成酶基因的抑制及在其它生物体中的表达[D].合肥:安徽农业大学,2004.
- [8] 王立,杨素娟,王玉书.茶树未成熟胚离体培养植株的形成[J].中国茶叶,1988,10(4):16-18.
- [9] 黄燕芬,周国兰,赵华富.茶子未成熟胚子叶柄离体培养诱导再生植株[J].贵州农业科学,2011,39(3):31-33.
- [10] 陈平,颜慕勤,王以红.大叶茶的组织培养[J].植物生理学通讯,1985,21(2):45-46.
- [11] AGARWAL B, SINGH U, BANERJEE M. In vitro clonal propagation of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze)[J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 1992, 30(1): 1-5.
- [12] 袁地顺,倪元栋,邝平喜.茶细胞培养法生产茶氨酸的技术研究:茶愈伤组织的诱导体系建立[J].福建茶叶,2003,25(3):27-28.
- [13] 张建华,毛平生,彭火辉.茶树的组培快繁技术初探[J].蚕桑茶叶通讯,2003(4):32-33.
- [14] 黄亚辉.茶树茎尖培养研究初报[J].茶叶通讯,1992,19(2):18-20.
- [15] AKULA A, DODD W A. Direct somatic embryogenesis in a selected tea clone, 'TRI-2025' (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) from nodal explants[J]. Plant Cell Rep, 1998, 17(10): 804-809.
- [16] 刘德华,周带娣,肖文军.茶树茎段培养胚性状态的调控及其分化[J].湖南农业大学学报,2000,26(2):110-112.
- [17] 孙仲序,刘静,王玉军,等.山东茶树良种组织培养及繁殖能力的研究[J].茶叶科学,2000,20(2):129-132.
- [18] 刘德华,廖利民.茶树叶片组织培养的初步研究[J].福建茶叶,1989,11(2):13-16.
- [19] 王毅军,严学成,暨淑仪,等.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.
- [20] 严学成,丘安经,王毅军.茶树(*Camellia sinensis* O. Ktze.)叶片培养的器官发生[J].中药新药与临床药理,1994(2):48-49,64.
- [21] 暨淑仪,严学成,王毅军.茶叶片愈伤组织形成的细胞组织学观察[J].茶叶,1995,21(2):11-13.
- [22] 郭玉琼,陈财珍,赖钟雄,等.茶树花药愈伤组织诱导及茶多酚含量测定[J].福建茶叶,2001,23(4):7-10.
- [23] KATO M. Micropropagation through cotyledon culture in *Camellia japonica* L. and *C. sinensis* L.[J]. Ikushugaku Zasshi, 1986, 36(1): 31-38.
- [24] 杨娟,袁林颖,邬秀宏.茶树花药愈伤组织诱导初探[C]//中国科学技术协会、云南省人民政府.第十六届中国科协年会——分12茶学青年科学家论坛论文集.中国科学技术协会、云南省人民政府:中国科学技术协会学会学术部,2014:16-20.
- [25] 刘德华.茶籽子叶柄培养直接分化芽[J].中国茶叶,1987(6):15-17.
- [26] 蔡海云,江昌俊,王朝霞,等.诱导茶树成熟胚培育成幼苗的研究[J].生物学杂志,2007,24(2):21-23.
- [27] 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,2006,34(4):122-124.
- [28] 李家华,周红杰,李明珠.不同激素配方对大叶种茶树新梢组织培养的效果[J].云南农业科技,2001(3):27-28.
- [29] 张亚萍,邵鸿刚.不同茶树品种组织培养的初步研究[J].贵州茶叶,2002(4):10-12.
- [30] 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,2006,34(4):122-124.
- [31] 陈玉玲,马丽霞,纪红冰,等.茶愈伤组织诱导的研究[J].河北师范大学学报(自然科学版),2007,31(3):389-391.
- [32] 张学文,刘选明,董延瑜,等.茶树愈伤组织诱导与共培转化的初步研究[J].湖南农学院学报,1994,20(6):550-554.
- [33] 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.
- [34] 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 Rep, 2001, 20(8): 712-720.
- [35] 赵东,刘祖生,陆建良,等.根瘤农杆菌介导茶树转化研究[J].茶叶科学,2001,21(2):108-111.
- [36] Matsumoto S, Fukui M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to tea plant (*Camellia sinensis*) cells[J]. JARQ-JPN AGR RES Q, 1998, 32(4): 287-291.

- [37] 项威, 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.
- [38] 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.
- [39] 奚彪, 刘祖生, 梁月荣, 等. 发根农杆菌介导的茶树遗传转化[J]. 茶叶科学, 1997, 17(S1): 934-937.
- [40] 高秀清, 成浩, 牛爱军. 茶树毛状根的诱导[J]. 特产研究, 2004, 26(2): 30-32.
- [41] 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.
- [42] 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.
- [43] 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: 17.
- [44] 谭和平, 周李华, 钱杉杉, 等. 茶树转基因技术研究进展[J]. 武汉植物学研究, 2009, 27(3): 323-326.
- [45] SANDAL I, SAINI U, LACROIX B, et al. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of tea leaf explants: effects of counteracting bactericidity of leaf polyphenols without loss of bacterial virulence[J]. Plant Cell Rep, 2007, 26(2): 169-176.
- [46] RANA M M, HAN Z X, SONG D P, et al. Effect of medium supplements on *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction from the callus tissues of *Camellia sinensis* var. *sinensis*[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(7): E1132.
- [47] 奚彪. 茶树再生系统建立与遗传转化的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 1995.
- [48] 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.
- [49] 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.
- [50] MAHER M F, NASTI R A, VOLLBRECHT M, et al. Plant gene editing through de novo induction of meristems[J]. Nat Biotechnol, 2020, 38(1): 84-89.
- [51] DEMIRER G S, ZHANG H, MATOS J L, et al. High aspect ratio nanomaterials enable delivery of functional genetic material without DNA integration in mature plants[J]. Nat Nanotechnol, 2019, 14(5): 456-464.

## 安徽农业大学在发酵茶微生物毒素检测与膳食风险评估领域取得系列研究进展

普洱茶等发酵黑茶以其独特的风味和健康功能一直深受消费者喜爱,但随着普洱茶黄曲霉毒素安全问题的提出,发酵黑茶的微生物安全问题备受关注,特别是2017年以来,普洱茶霉菌毒素安全问题已成为发酵黑茶产业及社会广泛关注的热点问题之一。安徽农业大学茶树生物学与资源利用国家重点实验室周有教授课题组(微生物安全研究团队)聚焦民众关心的社会热点,针对后发酵茶叶基质特点,采用多酚沉淀法和双柱串联法,历时4年多研究积累,有效克服了茶叶中次生代谢物对霉菌毒素检测的干扰难题,获得系列研究结果,并依次建立了发酵茶中四种黄曲霉毒素(B1、B2、G1、G1)LC-MS/MS确证性方法(J. Agric. Food Chem. 2019, 67, 11481-11488),完成了我国六大类发酵黑茶黄曲霉毒素安全专项风险评估(Food Chem. Toxicol. 2020, 146:111830)和赭曲霉毒素A的专项风险评估(J. Agric. Food Chem. 2021; <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c04824>);建立了发酵黑茶中六类(11种)霉菌毒素的HPLC-fld确证性检测方法和11种霉菌毒素累积性风险评估研究(Environ. Pollut., 2020, 261: 114180),为普洱茶霉菌毒素安全检测提供了有效的理论支持及科学方法。

“微生物安全团队”作为茶树生物学与资源利用国家重点实验室在茶叶质量安全和加工利用方向上的一支科研团队,多年来始终围绕茶产业的质量安全等民生问题开展研究。针对2017年以来茶业产业及老百姓普遍关心的普洱茶霉菌毒素安全问题,微生物安全团队成员,经过4年多研究积累,并充分依据本团队以及国内外同行近年来在霉菌毒素领域检测与风险评估结果,从确证性检测方法建立,样品抽检、膳食调查,到定量风险评估等方面,较为系统地解答了发酵黑茶(含普洱茶)霉菌毒素安全问题。

以上研究工作同时得到安徽农业大学张梁教授、中国科学院上海营养与健康研究所武爱波科研团队的协作和支持。