

番木瓜胚性细胞悬浮系高效遗传转化体系的建立

杨敏, 周陈平, 李庆萌, 邝瑞彬, 吴夏明, 魏岳荣*

(广东省农业科学院果树研究所·农业农村部亚热带果树生物学与遗传资源利用
重点实验室·广东省热带亚热带果树研究重点实验室, 广州 510640)

摘要:【目的】建立番木瓜高效遗传转化体系,为番木瓜基因功能研究和重要农艺性状改良提供新的技术支撑。【方法】以紫晖番木瓜胚性细胞悬浮系(embryogenic cell suspensions, ECS)为遗传转化受体,利用植物表达载体 pCAM-BIA1301 和农杆菌介导法进行遗传转化,对抗生素浓度筛选、侵染时间、继代培养、抗性胚的诱导与萌发以及植株再生整个过程进行探索,最后获得抗性再生植株。【结果】通过设置不同浓度的头孢霉素和潮霉素处理,观察 ECS 细胞状态,筛选、确定头孢霉素和潮霉素最适处理质量浓度分别为 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。工程菌和 ECS 共培养侵染 2 d 后转到含有头孢霉素和潮霉素的液体筛选培养基上进行继代培养,继代周期为 14 d。经 GUS 染色验证,表明继代 3 次后的 ECS 几乎全部为转化细胞。将以上 ECS 转移到液体胚诱导培养基中进行培养,2 个月后可获得大量球形体细胞胚,且 GUS 组织染色为蓝色。将球形体细胞胚转到半固体成熟培养基上培养,2 个月后可获得成熟子叶期体细胞胚。子叶期体细胞胚在萌发培养基上光培养 30 d 后,可获得再生芽。任意选取再生芽进行 GUS 染色,均可染成蓝色。抗性再生芽经促根培养可成功获得再生植株。利用 PCR 检测抗性再生植株,可以确定 GUS 基因已经整合到番木瓜基因组中。【结论】成功建立了一种以番木瓜 ECS 为转化受体的农杆菌介导的高效遗传转化体系。在该技术体系中,经农杆菌侵染后的 ECS 继代筛选 3 次后,几乎全部为转化细胞,这些转化细胞经体胚诱导、成熟、萌发和生根过程可成功获得再生植株,抗性体胚得胚率为 43.65%,抗性体胚萌发率为 73.26%,植株再生率为 80.55%,大大提高了番木瓜遗传转化效率。该体系为番木瓜基因功能研究和分子育种提供了新的途径。

关键词: 番木瓜; 胚性悬浮系; 根癌农杆菌; 遗传转化; 共培养

中图分类号: S667.9

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2023)10-2089-09

Establishment of a high-efficiency genetic transformation system for papaya using embryogenic cell suspensions as genetic transformation receptors

YANG Min, ZHOU Chenping, LI Qingmeng, KUANG Ruibin, WU Xiaming, WEI Yuerong*

(Institute of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of South Subtropical Fruit Biology and Genetic Resource Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Guangdong Province Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fruit Tree Research, Guangzhou 510640, Guangdong, China)

Abstract: 【Objective】 Papaya (*Carica papaya* L.) is a widely cultivated tropical and subtropical fruit with a high nutritional and medicinal value. However, papaya disease is very serious, which is an important problem restricting the development of papaya industry. The key to solve this problem is to use molecular breeding to breed disease-resistant varieties of papaya, and the establishment of efficient genetic transformation system is an important premise of molecular breeding. Therefore, the aim of this study was to establish an efficient genetic transformation system, and provide new technical support for the study of important gene functions and molecular genetic improvement of papaya. 【Methods】 In this

收稿日期: 2023-04-20

接受日期: 2023-06-26

基金项目: 广州市重点研发计划项目(2023B03J1369); 广东省基础与应用基础研究基金项目(2022A1515010697, 2021A1515010739); 广东省农业科学院果树研究所培育项目(22100); 广东省省级乡村振兴战略专项资金种业振兴项目(2022-NPY-00-032); 国家高端外国专家引进计划项目(G2023030034L); 国家自然科学基金项目(32102355)

作者简介: 杨敏, 女, 副研究员, 博士, 研究方向为番木瓜分子育种。Tel: 020-38765869, E-mail: minyang_0123@126.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 020-38765468, E-mail: weid18@163.com

study, immature zygote embryos of Zihui papaya were used as explants to obtain embryogenic cell suspensions (ECS) by induction, proliferation, screening and liquid oscillation culture. Using ECS as the receptors for genetic transformation, and the plant expression vector pCAMBIA1301 was transformed by *Agrobacterium*-mediated method. This study explored the suitable conditions of antibiotic concentration, infection time, subculture, induction, maturation and germination of resistant embryos, and finally obtained resistant regenerated plants. 【Results】 First, ECS were treated with different concentrations of cefotaxime sodium (0, 100, 200, 300, 400 mg · L⁻¹) and hygromycin (0, 3, 5, 7, 10 mg · L⁻¹) respectively, and then the growth state and cell morphology of suspended cells were observed. The results showed that the optimal concentrations of cefotaxime sodium and hygromycin were 200 mg L⁻¹ and 5 mg L⁻¹, respectively. After that, the engineered bacteria containing target genes were prepared, and the prepared ECS were co-cultured with the engineered bacteria for 2 days and transferred to the liquid screening medium containing cefotaxime sodiums and hygromycin for subculture. The subculture period was 14 days. GUS staining showed that after 3 subgenerations, almost all the suspended cells were transformed cells. These suspended cells were transferred to a liquid embryo induction medium for culture. After 2 months, a large number of spherical somatic embryos were obtained, and GUS tissue staining was blue. The spheroidal somatic embryos were transferred to a mature medium for culture, and the mature somatic embryos at cotyledon stage were obtained after 2 months. The average resistance somatic embryos rate was 23.2×10^3 mature somatic embryos per 1 mL packed cell volume (PCV) of ECS. The germination rate of resistant somatic embryos was 73.26% when cotyledon stage embryos were cultured on a germination medium for 30 days. The result of GUS staining showed that any regenerated bud could be dyed blue. By promoting root culture, the resistant regenerated buds were successfully regenerated, and the regeneration rate was 80.55%. Simultaneously, PCR amplification of the regenerated plants indicated that *GUS* gene had been integrated into the papaya genome. 【Conclusion】 In this study, an *Agrobacterium*-mediated genetic transformation system using papaya ECS as transformation receptor was successfully established. In this technology system, almost all of the ECS infected by *Agrobacterium* were transformed cells after three times of subselection, and these transformed cells could regenerate plants successfully through somatic embryo induction, maturation, germination and rooting. The germination rate of resistant somatic embryos was 43.65%, the germination rate of resistant somatic embryos was 73.26%, and the plant regeneration rate was 80.55%. The efficiency of genetic transformation of papaya was greatly improved. This system could provide a new approach for gene function study and molecular breeding of papaya.

Key words: Papaya (*Carica papaya* L.); Embryogenic cell suspensions; *Agrobacterium*; Genetic transformation; Co-culture

番木瓜 (*Carica papaya* L.) 起源于墨西哥南部和哥斯达黎加地区, 目前在世界各地的热带和亚热带地区都有种植。番木瓜是中国岭南特色水果, 具有很高的营养和药用价值, 有“百益果王”之称^[1-3]。然而, 番木瓜环斑花叶病毒 (papaya ringspot virus, PRSV)、番木瓜畸形花叶病毒 (papaya leaf distortion mosaic virus, PLDMV)、炭疽病等病害严重制约了番木瓜产业的可持续发展, 培育抗病品种是产业发展的关键^[1,4-5]。由于番木瓜栽培品种抗病资源匮乏,

遗传基础狭窄, 传统杂交育种难以培育出综合性状优异的抗病新品种^[6-7], 因此分子育种是培育抗病番木瓜新品种的最有效途径, 而建立番木瓜高效遗传转化体系是实现这一途径的重要前提。

番木瓜是最早进行转基因的作物之一, 主要集中在抗 PRSV 转基因的研究。Fitch 等^[8-9]首先利用基因枪法, 以番木瓜愈伤组织为转化受体进行遗传转化, 获得了抗 PRSV 毒株 HA 的转基因番木瓜品系 55-1, 之后不断回交, 获得了转基因品种 SunUp。

2017年Jia等^[10]也利用该方法获得了针对海南PRSV毒株的转基因抗病番木瓜。但基因枪法转化效率低,成本高,且轰击会造成细胞核内DNA双链断裂,在DNA双链修复过程中目的基因及其载体片段会随机插入,这个过程极有可能导致染色体重组等非目标基因改变。1993年,Fitch等^[11]首先建立了以番木瓜胚性愈伤组织为遗传转化受体的农杆菌共培养转化体系,并通过体胚发生途径获得了转基因番木瓜。研究人员也利用农杆菌介导法获得了抗病品种华农一号番木瓜^[12]。然而,通过番木瓜胚性愈伤组织诱导体胚发生并获得再生植株的途径,存在基因型依赖、体胚发育不同步、胚根生根质量差、体胚发生率和植株再生率低等问题^[13],成为限制番木瓜转基因技术广泛应用的瓶颈。综上所述,当前的番木瓜遗传转化技术仍需进一步改进和完善,以提高转化效率和增强实用性。

胚性细胞悬浮系(embryogenic cell suspensions, ECS)被认为是理想的遗传转化受体材料。以ECS为受体,利用农杆菌介导等方法在柑橘^[14]和香蕉^[15]等

作物中均获得了转基因植株。课题组前期建立了成熟的番木瓜均质ECS和高效再生技术体系^[7],笔者在本研究中以此为基础,旨在建立一种以番木瓜ECS为遗传转化受体、农杆菌介导的高效遗传转化体系,为番木瓜基因功能研究和分子育种提供技术支撑。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究所利用的遗传转化受体为紫晖番木瓜(广东省农业科学院果树研究所杂交培育的新品种,品种权号:CNA20201005052)的ECS,由广东省农业科学院果树研究所利用未成熟合子胚为外植体,经胚性愈伤组织诱导、增殖、筛选和液体振荡培养等过程建立获得^[7]。供试菌株为根癌农杆菌菌株EHA105,供试载体为pCAMBIA1301:含有 β -葡萄糖苷酸酶基因(β -glucuronidase, *GUS*)和潮霉素磷酸转移酶基因(Hygromycin B phosphotransferase, *HPT*)。本研究所用培养基组成参照魏岳荣等^[7]的配方,并根据实验需要略作改动(表1)。

表1 番木瓜胚性细胞悬浮系及遗传转化所用培养基

Table 1 All mediums used in ECS and genetic transformation of papaya

代号 Code	培养基 Mediums	配方 Ingredient
ML	液体增殖培养基 Liquid medium	1/2 MS 培养基+2.0 mg·L ⁻¹ 2,4-D +400 mg·L ⁻¹ 谷氨酰胺+ 60 g·L ⁻¹ 蔗糖, pH 5.8 1/2 MS medium+2.0 mg·L ⁻¹ 2,4-D +400 mg·L ⁻¹ Glutamine + 60 g·L ⁻¹ Sucrose, pH 5.8
LSM	液体筛选培养基 Liquid selection medium	1/2 MS 培养基+2.0 mg·L ⁻¹ 2,4-D +400 mg·L ⁻¹ 谷氨酰胺+ 60 g·L ⁻¹ 蔗糖+ 100 μmol·L ⁻¹ 乙酰丁香酮+ 200 mg·L ⁻¹ 头孢霉素+5 mg·L ⁻¹ 潮霉素, pH 5.8 1/2 MS medium +2.0 mg·L ⁻¹ 2,4-D +400 mg·L ⁻¹ Glutamine + 60 g·L ⁻¹ Sucrose + 100 μmol·L ⁻¹ Acetosyringone +200 mg·L ⁻¹ Cefotaxime sodium +5 mg·L ⁻¹ Hygromycin, pH 5.8
MSI	体胚诱导和成熟培养基 Embryo induction and mature medium	1/2 MS 盐+MS 维生素+50 mg·L ⁻¹ 肌醇+400 mg·L ⁻¹ 谷氨酰胺+ 30 g·L ⁻¹ 蔗糖+200 mg·L ⁻¹ 头孢霉素, pH 5.8 1/2 MS basal salts + MS vitamins +50 mg·L ⁻¹ myo-inositol+400 mg·L ⁻¹ Glutamine + 30 g·L ⁻¹ Sucrose +200 mg·L ⁻¹ Cefotaxime sodium, pH 5.8
MG	体胚萌发培养基 Embryo germination medium	MS+ 0.4 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.02 mg·L ⁻¹ NAA+30 g·L ⁻¹ 蔗糖+7 g·L ⁻¹ 琼脂粉+200 mg·L ⁻¹ 头孢霉素, pH 5.8 MS medium + 0.4 mg·L ⁻¹ 6-BA+0.02 mg·L ⁻¹ NAA+30 g·L ⁻¹ Sucrose +7 g·L ⁻¹ Agar+200 mg·L ⁻¹ Cefotaxime sodium, pH 5.8
MR	生根培养基 Rooting medium	1/2 MS+0.1 mg·L ⁻¹ 6-BA+2 mg·L ⁻¹ IBA+30 mg·L ⁻¹ 蔗糖+7 g·L ⁻¹ 琼脂粉, pH 5.8 1/2 MS medium +0.1 mg·L ⁻¹ 6-BA+2 mg·L ⁻¹ IBA +30 mg·L ⁻¹ Sucrose +7 g·L ⁻¹ Agar, pH 5.8

1.2 头孢霉素和潮霉素最适浓度的筛选

为了明确液体增殖培养基中可抑制根癌农杆菌生长的头孢霉素(Cef)浓度和筛选阳性植株的潮霉素浓度,笔者在ML培养基中分别添加了不同质量浓度的头孢霉素(0、100、200、300、400 mg·L⁻¹)和潮霉素(0、3、5、7、10 mg·L⁻¹),在黑暗条件下,(27±1)°C、110 r·min⁻¹ 振荡培养,观察ECS增殖生长情况,并利用显微镜观察细胞状态,确定合适的筛选浓度。

1.3 工程菌的制备

将含有目的基因的根癌农杆菌在YEB(含有

50 mg·L⁻¹卡那霉素)的固体培养基上划线,(27±1)°C条件下培养,然后挑取单菌落继续在含有50 mg·L⁻¹卡那霉素的YEB液体培养基中,150 r·min⁻¹振荡培养至对数期(OD₆₀₀=0.8~1.0),将菌液离心弃去上清液后,重悬于含有100 μmol·L⁻¹乙酰丁香酮(AS)的液体共培养培养基中,制备工程菌备用。

1.4 侵染与液体共培养

取在ML液体培养中継代培养10 d的ECS,离心去上清液后,加入经1.3步骤获得的工程菌液,在(27±1)°C、黑暗条件下静置1~2 h,然后在(27±1)°C、

黑暗、50 r·min⁻¹振荡条件下共培养2 d,将培养物离心、去除上清液后,清洗3次,转移至含有100 μmol·L⁻¹ AS、200 mg L⁻¹头孢霉素和5 mg L⁻¹潮霉素的液体筛选培养基LSM中,继续黑暗培养,每14 d继代1次。

1.5 抗性筛选和植株再生

按1.4方法,连续继代3次以上。每次继代培养时取0.1 mL细胞密实体积的ECS进行GUS染色实验。取液体筛选培养3代的ECS,静置后去上清液,将培养物转移至液体体胚诱导培养基MSI中诱导体细胞胚,每14 d更新一次培养基,黑暗条件下培养2个月统计体细胞胚发生数量。将获得的球形体细胞胚转移到半固体MSI上成熟培养2个月,直至获得成熟的子叶期体胚。将子叶期抗性体胚转移至体胚萌发培养基MG上进行萌发培养,1个月后统计体细胞胚萌发率。培养条件为:(27±1)°C、12 h(L)/12 h(D)光周期、54 μmol·m⁻²·s⁻¹光照度。然后,将萌发的分化芽转移至生根培养基MR,促进茎部和根系发育,培养1个月后获得完整的转化植株,统计植株再生率。同时以未侵染的ECS为对照,进行体胚诱导、成熟和萌发培养,直到获得再生植株。

1.6 GUS基因的检测及阳性植株的鉴定

1.6.1 GUS基因的检测 通过GUS组织染色,主要检测对象:共培养后继代筛选的第一代、第二代和第三代的ECS细胞团、由共培养筛选3个继代周期后通过ECS诱导获得的成熟体细胞胚及其再生芽以及相应的对照材料。

1.6.2 阳性植株的分子鉴定 利用CTAB(cetyltrimethylammonium bromide)法提取番木瓜叶片DNA,并以此为模板,利用GUS基因特异性引物:LP:5'-TTACGGCAAAGTGTGGTCA-3'和RP:5'-TCG-GTGATGATAATCGGCTG-3',进行PCR扩增检测,扩增长度为1233 bp,PCR反应条件为:94 °C 2 min、

98 °C 10 s、58 °C 30 s、68 °C 1 min,33个循环,68 °C延伸5 min。PCR产物利用1.5%琼脂糖凝胶进行电泳,电泳后利用凝胶成像系统拍照保存。

2 结果与分析

2.1 头孢霉素和潮霉素最适质量浓度的筛选

在液体筛选培养基中添加头孢霉素主要是为了抑制共培养之后根癌农杆菌的生长,同时为了确保头孢霉素不会对ECS的生长造成影响。在ML培养基中分别添加0、100、200、300、400 mg·L⁻¹头孢霉素进行暗培养,观察其对ECS增殖生长状态和细胞形态的影响。培养2周后,结果如表2和图1-A所示,头孢霉素质量浓度为0、100、200 mg·L⁻¹时,胚性悬浮细胞为圆形或椭圆形,生长量基本正常;当头孢霉素质量浓度达到300 mg·L⁻¹时,悬浮细胞颜色变深,开始褐化,通过光学显微镜观察,部分细胞伸长变形,ECS增殖生长受到影响;而当质量浓度达到400 mg·L⁻¹时,出现较多的游离长月形异常细胞,ECS增殖生长受到明显影响。以有效抑制农杆菌生长且不影响番木瓜ECS生长为原则,确定200 mg·L⁻¹头孢霉素为最适质量浓度。

同时,在ML培养基中分别添加0、3、5、7、10 mg·L⁻¹潮霉素,观察其对ECS增殖生长状态和细胞形态的影响。结果如图1-B和表2所示,培养2周后,当潮霉素质量浓度为5 mg·L⁻¹时,ECS出现轻微褐化,但细胞形态和增殖量基本正常;当质量浓度达到7 mg·L⁻¹和10 mg·L⁻¹时,ECS颜色变白,生长状态差,增殖量小,显微镜下可看到大量弯月形和长条形异常细胞,生长受到严重影响。以不改变细胞形态且可筛选抗性悬浮细胞为目标,确定5 mg·L⁻¹潮霉素为最适质量浓度。

2.2 工程菌侵染共培养及转化细胞的筛选

将工程菌侵染2 d后的ECS用ML培养基清洗

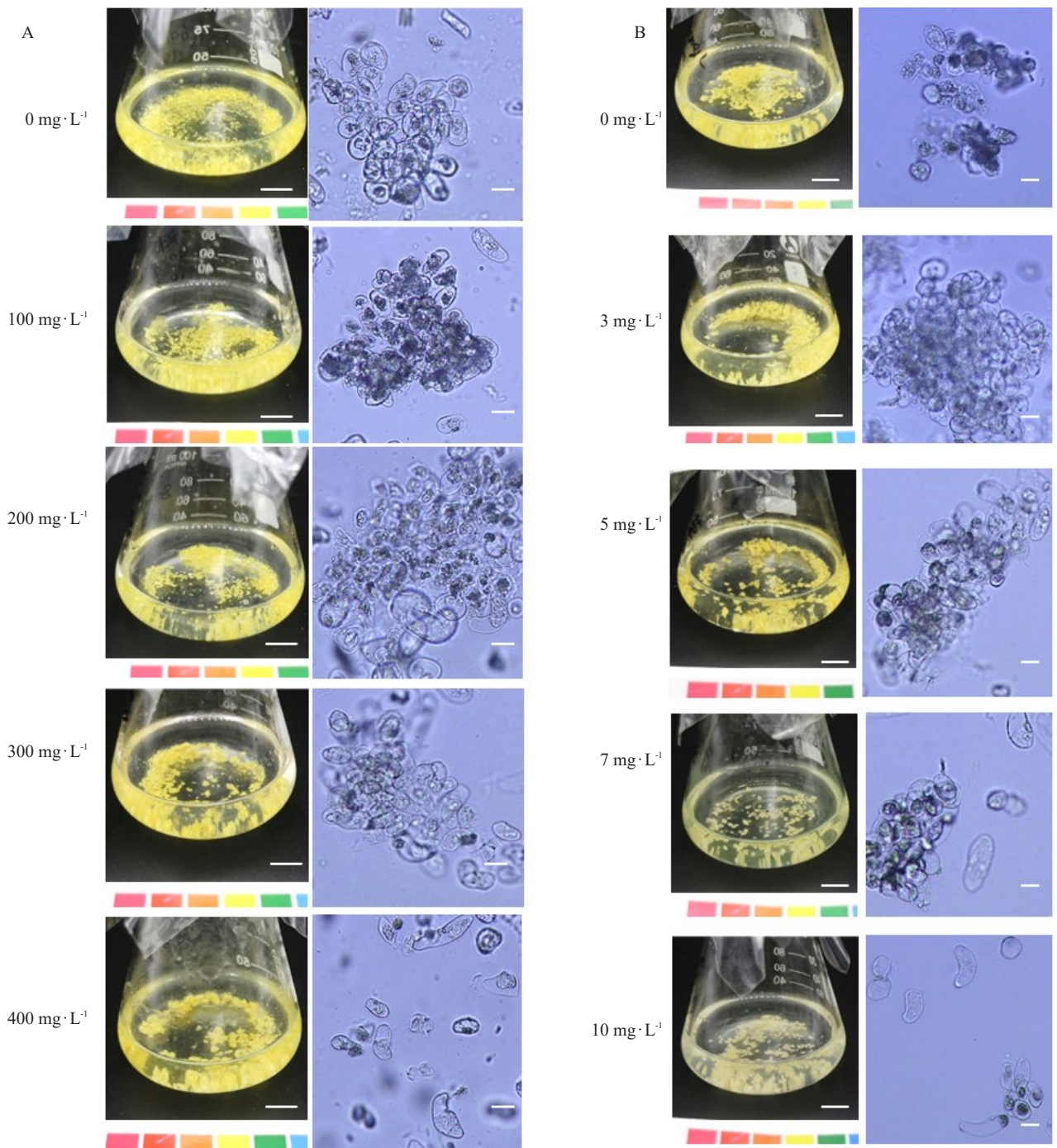
表2 不同浓度头孢霉素和潮霉素处理条件下ECS的生长情况

Table 2 Growth of ECS under different concentrations of cefotaxime sodium and hygromycin

ρ(头孢霉素) Concentration of cef/(mg·L ⁻¹)	ECS增长率 Growth rate of ECS/%	异常细胞占比 The proportion of abnormal cells/%	ρ(潮霉素) Concentration of hygromycin/(mg·L ⁻¹)	ECS增长率 Growth rate of ECS/%	异常细胞占比 The proportion of abnormal cells/%
0	206.7±2.9	1.2±0.3	0	203.3±5.8	0.7±0.5
100	191.7±5.0	3.3±1.5	3	188.4±7.6	4.3±0.6
200	186.7±4.8	3.7±1.2	5	176.7±5.7	6.3±1.5
300	113.3±5.7	9.7±1.1	7	88.3±7.6	19.7±1.6
400	97.6±9.3	12.7±0.6	10	66.7±7.6	24.6±3.2

注:表中数据代表平均值±标准误差,3次重复。

Note: Data shown are means±SD of three independent biological determinations.



A. 不同浓度头孢霉素处理下 ECS 的生长情况, 左边 Bar=1 cm, 右边 Bar=100 μm; B. 不同浓度潮霉素处理下 ECS 的生长情况: 左边 Bar=1 cm, 右边 Bar=100 μm。

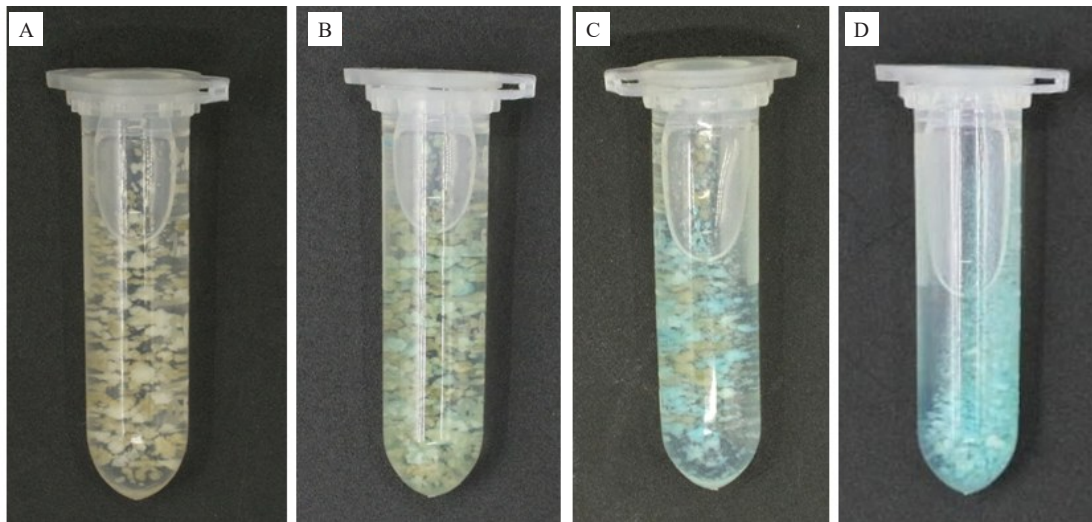
A. Growth state of ECS treated with different concentrations of Cef. Left, Bar=1 cm, right, Bar=100 μm; B. Growth state of ECS treated with hygromycin at different concentrations. Left, Bar=1 cm, right, Bar=100 μm.

图 1 头孢霉素和潮霉素浓度的筛选

Fig. 1 Screening of suitable concentration of cefotaxime sodium (Cef) and hygromycin

干净, 转移到液体筛选培养基 LSM 中进行继代培养。在继代的同时, 吸取部分 ECS 进行 GUS 染色, 与未转化的 ECS 对照(图 2-A)相比, 在筛选培养第 1 代的 ECS 中可见少许被染上蓝色的转化细胞团(图 2-B); 继续进行第 2 代筛选培养, 转化细胞在筛选压

力下不断增殖, 未转化的细胞会发生褐化死亡, 能染上蓝色的细胞团比例明显增多(图 2-C); 在第 3 代 ECS 中, ECS 几乎全部染上蓝色, 即几乎全部为转化细胞(图 2-D)。由此可见, 经过 3 代或 3 代以上的筛选培养, 可以获得生长良好的转基因番木瓜 ECS。



A. 未转化 ECS 的 GUS 染色情况; B. 液体筛选第 1 代 ECS 的 GUS 染色情况; C. 液体筛选第 2 代 ECS 的 GUS 染色情况; D. 液体筛选第 3 代 ECS 的 GUS 染色情况。

A. GUS staining of untransformed ECS; B. Transient GUS expression of first-generation sub-cultured ECS in liquid selective medium; C. Transient GUS expression of second-generation sub-cultured ECS in liquid selective medium; D. Transient GUS expression of third-generation sub-cultured ECS in liquid selective medium.

图 2 液体筛选各代 ECS 的 GUS 表达情况

Fig. 2 Transient GUS expression of ECS cultured in selective liquid medium from different generations

2.3 体胚的诱导、成熟、萌发和植株再生

将继代 3 次的 ECS 先转到液体体胚诱导培养基 MSI 上, 2 个月后可见大量白色圆球形体细胞胚(图 3-A~B)。对抗性球形胚进行 GUS 染色鉴定表明, 诱导形成的抗性球形胚几乎全部都可以染上蓝色, 即全部为转化体细胞胚(图 3-C)。经统计, 筛选继代 3 次的番木瓜 ECS 具有很强的体细胞胚发生能力, 平均抗性体细胞胚获得率为 23.2×10^3 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ PCV, 抗性体胚得胚率为 43.65%, 与对照 ECS 的平均体细胞胚获得率相近(表 3)。将球形体细胞胚转移到半固体 MSI 上培养 2 个月, 可逐步发育为成熟的子叶期体细胞胚(图 3-D~E)。

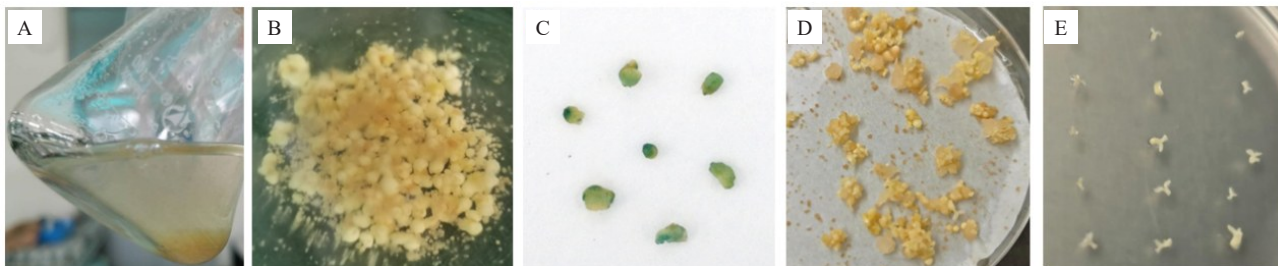
表 3 抗性体胚和正常体胚的诱导、萌发和再生率统计结果

Table 3 Statistical results of induction, germination and regeneration rates of resistant and normal somatic embryos

体胚类型 Types	得胚率 Somatic embryos acquisition rate/%	萌发率 Germination rate/%	再生率 Regeneration rate/%
抗性体胚 The resistant somatic embryos	43.65±1.65	73.26±2.17**	80.55±1.48
正常体胚 The normal somatic embryos	47.38±2.35	97.58±1.02	81.36±2.63

注: 表中数据代表平均值±标准误差, **表示差异极显著 ($p < 0.01$)。

Note: Data shown are means ± SD of three independent biological determinations, ** indicate extremely significant difference ($p < 0.01$).



A、B. 在液体培养基中进行体细胞胚的诱导; C. 抗性体细胞胚 GUS 染色情况; D、E. 抗性体细胞胚诱导成熟形成子叶期体细胞胚。

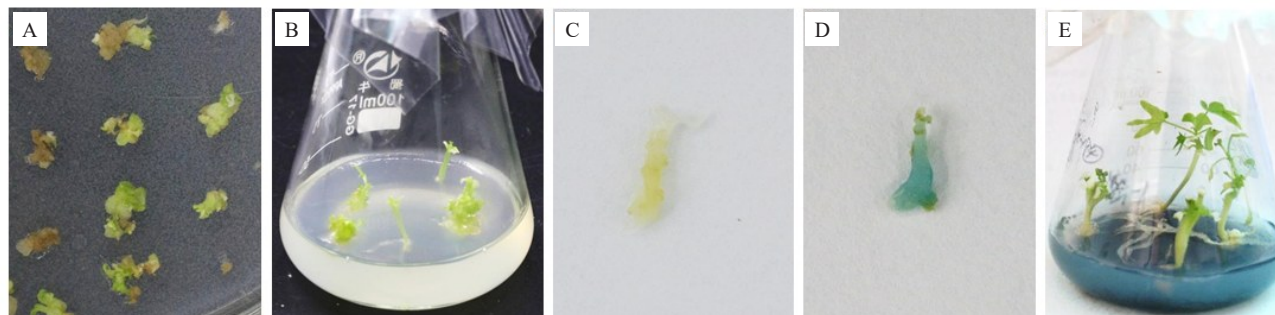
A, B. Induction of resistant somatic embryos in liquid medium; C. GUS expression of transformed embryos; D, E. The resistant somatic embryo induction and maturation into the cotyledonary somatic embryo.

图 3 抗性胚的诱导和成熟

Fig. 3 Induction and maturation of resistant embryos

挑选子叶期体细胞胚接种于体细胞胚萌发培养基 MG 上进行光培养,3 d 后可见体细胞胚开始萌发,10 d 后可见到萌发的绿色子叶(图 4-A),同时体细胞胚根段开始出现愈伤化。培养 30 d 后,体细胞胚已具备完整的下胚轴、子叶和芽(图 4-B)。经统

计,经遗传转化的子叶期体细胞胚萌发率为 73.26%,低于对照(97.58%)(表 3)。以未转化芽作对照,任意切取再生抗性芽进行 GUS 染色鉴定,均可被染成蓝色(图 4-C~D)。再生芽于生根培养基 MR 上培养 10 d 后开始生根,1 个月后可获得发育良



A. 绿色子叶的形成;B. 再生芽;未转化芽(C)和转化芽(D)的 GUS 染色;E. 抗性再生植株。
A. Formation of green cotyledon; B. Regenerated buds; GUS staining of untransformed bud (C) and transformed bud (D); E. The regenerated papaya seedlings.

图 4 植株再生

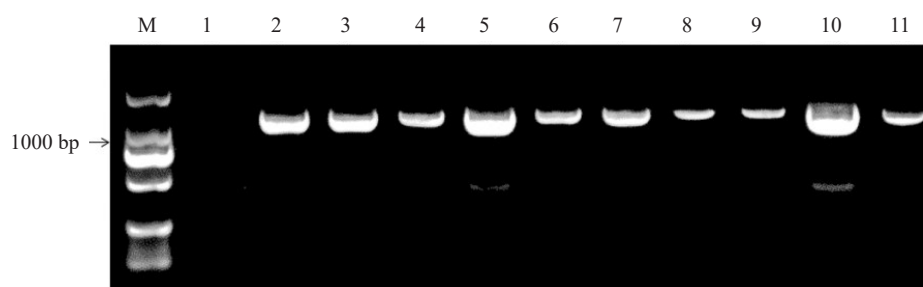
Fig. 4 Regeneration of papaya seedlings

好的小植株,植株再生率为 80.55%,与对照(81.36%)相近(图 4-E,表 3)。

2.4 转化植株的分子鉴定

为了确定 GUS 基因在番木瓜基因组中的整合情况,笔者对获得的具有 GUS 活性的 10 株(2~11 号

泳道)番木瓜转基因植株进行了 PCR 检测。电泳结果表明,与未转化的番木瓜植株(1 号泳道)相比,在获得的具有 GUS 活性的番木瓜转基因株系中均可扩增出目的条带(图 5),进一步说明 GUS 基因转化成功,已经整合到番木瓜基因组中。



第 1 泳道为以未转化番木瓜植株 DNA 为模板进行的 PCR 扩增、电泳结果,第 2~11 泳道分别为以具有 GUS 活性的 10 株番木瓜转基因植株 DNA 为模板进行的 PCR 扩增、电泳结果。M. D2000。

Lane 1 was PCR amplification and electrophoresis results using DNA of untransformed papaya plant as template, lane 2-11 was PCR amplification and electrophoresis results using DNA of 10 transgenic papaya plants with GUS activity as template. M. D2000.

图 5 抗性再生植株的 PCR 鉴定

Fig. 5 Identification of regenerated papaya seedlings by PCR

3 讨论

目前,番木瓜转基因研究采用的遗传转化受体材料主要是胚性愈伤组织,采用的转基因方法包括基因枪法、农杆菌介导法和花粉管通道技术^[9-13,16]。虽然在番木瓜转基因的研究中应用这些方法都可获

得转基因植株,但是需要进一步改进和完善转化体系,以提高转化效率和增强实用性。笔者在本研究中从受体材料选择、农杆菌共培养方式、侵染时间、筛选培养基选择等方面进行了探索和优化,成功建立了番木瓜胚性细胞悬浮系的高效遗传转化和再生体系。

3.1 遗传转化方法的选择

在番木瓜转基因研究方面,最早应用的是基因枪法,通过该方法获得转基因胚的时间大概需要4个月^[4],但是基因枪转化效率低,且轰击会造成细胞核内DNA双链断裂,在DNA双链修复过程中目的基因及其载体片段会随机插入,这个过程极有可能导致染色体重组等非目标基因改变。花粉管通道法目前还没有明确的定论。相较基因枪法,农杆菌转化系统具有拷贝数低、变异少等优点。因此,Fitch等^[11]在1993年开始利用农杆菌介导法进行番木瓜的遗传转化,结果获得了转基因植株,但由于受体材料的限制,筛选过程中材料损失很大,在方法上迫切需要优化。

3.2 受体材料及再生体系

受体材料是实现番木瓜高效遗传转化的重要因素。前人曾较多地报道以番木瓜胚性愈伤组织为受体进行遗传转化,进而诱导体细胞胚发生并获得再生植株,但该途径存在基因型依赖、体胚发育不同步、胚根生根质量差、体胚发生率和植株再生率低等问题^[8,17-19],限制了转基因技术的广泛应用。番木瓜胚性细胞悬浮系被认为是最理想的转基因受体,但由于悬浮系制备困难,且周期较长,目前还未见相关报道。笔者在本研究中以前期制备的番木瓜胚性悬浮系为受体材料,进行遗传转化,发现在继代3次以后,转化细胞几乎为100%,具有很高的转化效率。同时,笔者所在课题组前期还建立了基于胚性细胞悬浮系的高效植株再生技术体系^[7],该体系可以提高细胞胚再生率、发育的同步性以及植株再生率,解决了之前报道的方法转化效率低、同时再生难的问题。值得一提的是,多年的研究经验表明,与香蕉等其他物种一样,番木瓜胚性细胞悬浮系的体胚发生能力与继代时间长短密切相关^[20-21],随着继代时间的延长,体胚诱导率和萌发率都会逐渐下降。因此,为了提高转化效率,在选择胚性细胞悬浮系作为受体时应考虑这一因素,并保持研究材料胚性细胞悬浮系的持续更新。

3.3 农杆菌侵染及继代筛选方法

目前农杆菌侵染共培养的方法主要采用半固体培养法^[8-12,22],不但容易污染,而且容易导致受体严重褐化甚至损失^[22],笔者在本研究中采用液体培养方式进行农杆菌与ECS共培养,在保证悬浮细胞和工程菌充分接触的同时,降低培养时的转速以减缓农杆菌的生长速度,防止其过度生长。在继代筛选时,笔

者同样使用了液体培养方式,经3次继代筛选后,可使转化细胞高效地快速繁殖,并淘汰非转化细胞,操作简便,同时能得到大量转化胚性悬浮细胞,为后续体胚诱导、萌发、植株再生和转基因材料的获得提供了充足的材料基础。由于潮霉素等抗生素在一定程度上会影响植物正常生长发育,应用本文方法经过3代及3代以上的筛选培养后,几乎所有的ECS都已经是转化的材料,所以在后续胚诱导、体胚萌发和生根时可适当降低或不添加抗生素,可显著提高获得转基因材料的概率。值得一提的是,在本研究中笔者发现,虽然抗性体细胞胚获得率与未转化ECS体细胞胚获得率基本一致,后期不添加抗生素也提高了转基因植株获得的概率,但是抗性体细胞胚成熟率和萌发率都会比未转化对照的低一些,笔者认为这可能还是与液体筛选中添加了头孢霉素和潮霉素、在抗性体细胞胚成熟和萌发培养基中添加了头孢霉素有很大关系。

4 结 论

笔者在本研究中成功建立了一种以番木瓜ECS为转化受体的农杆菌介导的高效遗传转化体系。在该技术体系中,经农杆菌侵染后的ECS继代筛选3次后,几乎全部为转化细胞,这些转化细胞经体胚诱导、成熟、萌发和生根过程可成功获得再生植株,抗性体胚得胚率为43.65%,抗性体胚萌发率为73.26%,植株再生率为80.55%,大大提高了番木瓜遗传转化效率。

参考文献 References:

- [1] YANG M, ZHOU C P, YANG H, KUANG R B, LIU K D, HUANG B X, WEI Y R. Comparative transcriptomics and genomic analyses reveal differential gene expression related to *Colletotrichum brevisporum* resistance in papaya (*Carica papaya* L.)[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 1038598.
- [2] YANG M, ZHOU C P, YANG H, KUANG R B, HUANG B X, WEI Y R. Genome-wide analysis of basic helix-loop-helix transcription factors in papaya (*Carica papaya* L.)[J]. *PeerJ*, 2020, 8: e9319.
- [3] 杨培生, 钟思现, 杜中军, 周鹏, 陈业渊. 我国番木瓜产业发展现状和主要问题[J]. *中国热带农业*, 2007(4): 8-9.
YANG Peisheng, ZHONG Sixian, DU Zhongjun, ZHOU Peng, CHEN Yeyuan. Development status and main problems of papaya industry in China[J]. *China Tropical Agriculture*, 2007(4): 8-9.
- [4] 黄建昌, 肖艳, 赵春香. 番木瓜遗传改良研究进展[J]. *果树学报*, 2005, 22(1): 60-65.
HUANG Jianchang, XIAO Yan, ZHAO Chunxiang. Advances and prospects on genetic improvement in *Carica papaya*[J].

- Journal of Fruit Science, 2005, 22(1):60-65.
- [5] 杨敏,李庆萌,周陈平,邝瑞彬,杨护,黄炳雄,魏岳荣. 番木瓜 WRKY 转录因子 CpWRKY11 的克隆和表达[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2023, 51(5): 119-130.
YANG Min, LI Qingmeng, ZHOU Chenping, KUANG Ruibin, YANG Hu, HUANG Bingxiong, WEI Yuerong. Cloning and expression analysis of transcription factor CpWRKY11 in papaya (*Carica papaya* L.)[J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2023, 51(5): 119-130.
- [6] DHEKNEY S A, KANDEL R, BERGEY D R, SITHTER V, SOORIANATHASUNDARAM K, LITZ R E. Advances in papaya biotechnology[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2016, 5: 133-142.
- [7] 魏岳荣,周陈平,邝瑞彬,杨护,黄炳雄,杨敏. 番木瓜均质胚性细胞悬浮系的建立和高效植株再生[J]. 果树学报, 2023, 40(2):376-385.
WEI Yuerong, ZHOU Chenping, KUANG Ruibin, YANG Hu, HUANG Bingxiong, YANG Min. Development of embryogenic cell suspension cultures and efficient plant regeneration of *Carica papaya* L.[J]. Journal of Fruit Science, 2023, 40(2): 376-385.
- [8] FITCH M M M, MANSHARDT R M. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of papaya (*Carica papaya* L.)[J]. Plant Cell Reports, 1990, 9(6): 320-324.
- [9] FITCH M M M, MANSHARDT R M, GONSALVES D, SLIGHTOM J L, SANFORD J C. Virus resistant *Papaya* plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of *Papaya ringspot* virus[J]. Nature Biotechnology, 1992, 10(11): 1466-1472.
- [10] JIA R Z, ZHAO H, HUANG J, KONG H, ZHANG Y L, GUO J Y, HUANG Q X, GUO Y L, WEI Q, ZUO J, ZHU Y J, PENG M, GUO A P. Use of RNAi technology to develop a PRSV-resistant transgenic papaya[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 12636.
- [11] FITCH M M M, MANSHARDT R M, GONSALVES D, SLIGHTOM J L. Transgenic papaya plants from *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos[J]. Plant Cell Reports, 1993, 12(5):245-249.
- [12] 姜大刚,周峰,姚涓,穆虹,梅曼彤. 转基因番木瓜‘华农一号’事件特异性定性 PCR 检测方法的建立[J]. 华南农业大学学报, 2009, 30(1):37-41.
JIANG Dagang, ZHOU Feng, YAO Juan, MU Hong, MEI Mantong. Establishment of event-specific qualitative PCR detection method for transgenic *Papaya* ‘Huanong No. 1’ [J]. Journal of South China Agricultural University, 2009, 30(1): 37-41.
- [13] AL-SHARA B, TAHA R M, MOHAMAD J, ELIAS H, KHAN A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in the *Carica papaya* L. cv. Eksotika[J]. Plants, 2020, 9(3):360.
- [14] MONIRUZZAMAN M, ZHONG Y, HUANG Z F, YAN H X, LV Y D, JIANG B, ZHONG G Y. *Citrus* cell suspension culture establishment, maintenance, efficient transformation and regeneration to complete transgenic plant[J]. Plants, 2021, 10(4): 664.
- [15] 胡春华,魏岳荣,易干军,黄秉智,黄永红. 根癌农杆菌介导的香蕉高效遗传转化体系的建立[J]. 分子植物育种, 2010, 8(1): 172-178.
HU Chunhua, WEI Yuerong, YI Ganjun, HUANG Bingzhi, HUANG Yonghong. Establishment of a high efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for banana[J]. Molecular Plant Breeding, 2010, 8(1): 172-178.
- [16] 蔡群芳,魏军亚,周鹏. 花粉管通道技术转化番木瓜的初步研究[J]. 生命科学研究, 2009, 13(1):16-19.
CAI Qunfang, WEI Junya, ZHOU Peng. Preliminary research of PRSV-CP gene transferred into *Papaya* by pollen-tube pathway[J]. Life Science Research, 2009, 13(1): 16-19.
- [17] CIPRIANO J L D, CRUZ A C F, MANCINI K C, SCHMILDT E R, LOPES J C, OTONI W C, ALEXANDRE R S. Somatic embryogenesis in *Carica papaya* as affected by auxins and explants, and morphoanatomical-related aspects[J]. Anais Da Academia Brasileira De Ciências, 2018, 90(1):385-400.
- [18] SOLÓRZANO- CASCANTE P, SÁNCHEZ- CHIANG N, JIMÉNEZ V M. Explant type, culture system, 6-benzyladenine, meta-topolin and encapsulation affect indirect somatic embryogenesis and regeneration in *Carica papaya* L.[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 1769.
- [19] ZHAO X B, SONG J J, ZENG Q X, MA Y Y, FANG H M, YANG L Y, DENG B, LIU J, FANG J P, ZUO L P, YUE J J. Auxin and cytokinin mediated regulation involved *in vitro* organogenesis of papaya[J]. Journal of Plant Physiology, 2021, 260: 153405.
- [20] 肖望,陈晓娜,黄少丽. 在继代培养中贡蕉胚性悬浮细胞的分化能力和染色体数目的变化[J]. 果树学报, 2008, 25(6):946-949.
XIAO Wang, CHEN Xiaona, HUANG Shaoli. Differentiation potential and chromosome number of embryogenic suspension cells of *Musa acuminata* cv. Mas (AA) in subculture[J]. Journal of Fruit Science, 2008, 25(6):946-949.
- [21] 洪林,劳世辉,梁国鲁,魏岳荣,刘正富. 香蕉胚性悬浮细胞分化能力及染色体数目变异研究[J]. 热带作物学报, 2012, 33(6):969-974.
HONG Lin, LAO Shihui, LIANG Guolu, WEI Yuerong, LIU Zhengfu. Differentiation potential and chromosome number of embryogenic suspension cells of *Musa* spp. in subculture[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2012, 33(6):969-974.
- [22] TRIPATHI S, SUZUKI J, GONSALVES D. Development of genetically engineered resistant papaya for papaya ringspot virus in a timely manner: A comprehensive and successful approach[J]. Methods in Molecular Biology, 2007, 354: 197-240.