

## ◆ 生物科学 ◆

褐角苔遗传转化体系的建立<sup>\*</sup>黄丹<sup>1</sup>, 彭涛<sup>1\*</sup>, 姜山<sup>2</sup>, 王顺莉<sup>1</sup>, 李旭强<sup>1</sup>, 马怀富<sup>1</sup>, 盛福源<sup>1</sup>

(1. 贵州师范大学生命科学学院, 贵州贵阳 550025; 2. 贵州师范大学国际教育学院, 贵州贵阳 550025)

**摘要:**本研究旨在筛选适用于农杆菌(*Agrobacterium*)介导的角苔植物遗传转化体系,为今后研究早期陆生植物的进化提供理论基础。实验使用携带 pCAMBIA1305.2 质粒的农杆菌 AGL1 菌株对褐角苔(*Folioceros fuciformis*)外植体进行侵染,将潮霉素作为筛选标记,通过比较外植体预培养时间、菌液 OD 值、菌液添加量、乙酰丁香酮(AS)浓度和共培养时间来构建该物种的遗传转化体系。结果表明,褐角苔抗性植株筛选所用潮霉素的最适浓度为 15 mg/L,预培养 4 d 的外植体侵染后状态最好。最佳侵染条件为共培养基中添加 80  $\mu$ L OD<sub>600</sub> 为 0.8 的农杆菌菌液,AS 浓度为 100  $\mu$ mol/L,共培养时间为 3 d。通过潮霉素筛选、PCR、实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)和  $\beta$ -葡萄糖苷酸酶(GUS)染色鉴定获得转基因植株褐角苔。研究结果可为后续角苔植物基因功能的研究提供技术支持。

**关键词:**褐角苔;外植体;农杆菌介导法;遗传转化体系

中图分类号:Q37 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2024)03-0469-09

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20240430.001

苔藓植物包括苔类植物、藓类植物和角苔植物三大类群,其中角苔植物是在 4.6 亿年前从苔类和藓类植物两个单系类群中分化出来的第三个分支<sup>[1-3]</sup>。3 个类群中角苔植物物种丰富度最低,只有 200—250 种。因具有不确定的基部分生组织产生的孢子体,以及类似于苔藓、维管植物的气孔使角苔植物成为研究陆地植物进化的关键类群<sup>[4,5]</sup>。因此,对角苔植物深入研究并挖掘更多的基因资源至关重要。目前,苔类植物和藓类植物的遗传转化体系已经成熟,但关于褐

角苔(*Folioceros fuciformis*)的遗传转化方法还未见报道,仍是一个有待攻克的领域。

植物遗传转化是指有目的地将外源基因或 DNA 片段插入受体植物基因组中,所导入的基因在植物中能够稳定地表达和遗传<sup>[6,7]</sup>。当前常见的植物遗传转化方法包括聚乙二醇(Polyethylene Glycol, PEG)介导转化法、基因枪介导转化法(Gene gun mediated transformation)、限制内切酶介导转化法(Restriction Enzyme-Mediated DNA Integration, REMI)及

收稿日期:2024-01-31

修回日期:2024-02-28

\* 国家自然科学基金项目(32060611,31560508)资助。

## 【第一作者简介】

黄丹(1998—),女,在读硕士研究生,主要从事植物生态学研究,E-mail:1093617061@qq.com。

## 【\*\*通信作者简介】

彭涛(1977—),男,副教授,主要从事苔藓植物学、湿地生态学及生物多样性保护研究,E-mail:pengtiao@gznu.edu.cn。

## 【引用本文】

黄丹,彭涛,姜山,等.褐角苔遗传转化体系的建立[J].广西科学,2024,31(3):469-477.

HUANG D, PENG T, JIANG S, et al. Establishment of a Genetic Transformation System for *Folioceros fuciformis* [J]. Guangxi Sciences, 2024, 31(3):469-477.

农杆菌 (*Agrobacterium*) 介导的转化法 (*Agrobacterium*-Mediated Transformation, ATMT), 其中农杆菌介导法是最常用的转基因方法<sup>[8,9]</sup>。与其他转化方法相比, 农杆菌介导的遗传转化具有显著优势, 除易操作、转化成本低外, 还具有受体范围选择广、转化效率高、低拷贝、能够稳定复制及表达等特点<sup>[10]</sup>。1991年, Schaefer等<sup>[11]</sup>通过聚乙二醇介导转化法介导DNA转染至原生质体, 使得小立碗藓 (*Physcomitrium patens*) 首次转化成功, 这使不育突变体的遗传优势研究和互补分析成为可能, 小立碗藓成为藓类植物发育遗传学的模式生物。Ishizaki等<sup>[12]</sup>利用农杆菌介导将带有 $\beta$ -葡萄糖苷酸酶(GUS)和潮霉素(Hygromycin)标记的载体转化到地钱 (*Marchantia polymorpha*) 中, 为苔类植物提供遗传转化方法以促进比较基因组学的发展。因此, 在角苔植物中建立高效稳定的遗传转化方法尤为重要。本研究以褐角苔为受体材料, 对潮霉素浓度、外植体预培养时间、农杆菌菌液OD值、菌液添加量、乙酰丁香酮(AS)浓度和共培养时间等影响遗传转化效率的因素进行筛选, 构建高效稳定的褐角苔遗传转化体系, 拟为进一步研究角苔植物的演化历史和基因功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 供试植物、菌株和质粒

褐角苔为本实验室保存, 基因组DNA和RNA提取试剂盒均购自宝日医生物技术(北京)有限公司, 潮霉素、头孢(Cephalosporins)、农杆菌AGL1感受态细胞和AS均购自贵阳超研远诚生物科技有限公司, 植物表达载体pCAMBIA1305.2购自长沙瑞英生物科技有限公司。

#### 1.1.2 培养基

KNOP培养基:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  250 mg/L、KCl 250 mg/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  250 mg/L、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1 000 mg/L和 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  12.5 mg/L, pH值为5.8。YEP培养基: 称取胰蛋白胍(Tryptone)10 g, 氯化钠5 g, 酵母浸粉10 g, 琼脂粉15 g, 水1 L, 调节pH值为5.8。共培养基: 在KNOP培养基中加入2%的蔗糖和100  $\mu\text{mol/L}$ 的AS。筛选培养基: 在KNOP培养基中加入15 mg/L潮霉素。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 褐角苔对潮霉素的敏感实验

设置潮霉素浓度为0、5、10、15、20、25 mg/L。将

褐角苔植株接种在筛选培养基中进行培养, 于22  $^{\circ}\text{C}$ 恒温组培室中培养, 每个浓度设置3个重复, 观察褐角苔的生长情况。

#### 1.2.2 农杆菌菌液的制备

将质粒pCAMBIA1305.2通过冻融法转化至农杆菌AGL1菌株中, 于28  $^{\circ}\text{C}$ 在含有卡那霉素[Kanamycin (Kan), 50 mg/L]的YEP培养基中培养, 获得单菌落的转化子。将2—3个农杆菌菌落接种在含有Kan (50 mg/L)和利福平(10 mg/L)的YEP培养基中, 在28  $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min振荡下培养2 d。

#### 1.2.3 外植体的预培养

在50 mL无菌离心管中装入0.5 g的褐角苔无菌叶状体组织和15 mL无菌水, 用均质器将其均质化。使用100  $\mu\text{m}$ 细胞筛将均质化的组织过滤后铺在KNOP培养基上, 并在22  $^{\circ}\text{C}$ 恒温组培室中培养。培养4周后, 将培养组织重新均质化, 并使用100  $\mu\text{m}$ 细胞筛过滤。将再次均质化的褐角苔组织置于KNOP培养基中预培养。预培养时间(A)设置为0、1、2、3、4 d。

#### 1.2.4 农杆菌菌液OD值、农杆菌添加量、AS浓度和共培养时间设置

为初步筛选遗传转化因素的最佳条件, 设置农杆菌菌液 $OD_{600}$ 值(B)梯度为0.4、0.6、0.8、1.0和1.2, 用以上5个梯度农杆菌菌液侵染褐角苔预培养外植体; 设置KNOP培养基中的农杆菌添加量(C)为30、50、80、100、120  $\mu\text{L}$ ; 设置AS浓度梯度(D)为0、50、100、150、200  $\mu\text{mol/L}$ , 在添加了农杆菌的KNOP培养基中加入不同浓度的AS; 将上述添加了不同浓度农杆菌菌液和AS的5 mL KNOP培养基再加入褐角苔预培养外植体共培养, 设置共培养时间(E)梯度为0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 d。设计上述5因素5水平的正交试验对褐角苔进行农杆菌介导的遗传转化实验(表1), 用Excel 2016和SPSS 27.0.1软件对数据进行极差分析, 最终得出遗传转化效率较高的参数组合。

#### 1.2.5 共培养及转化

首先, 将1.2.2节方法下培养的25 mL农杆菌菌液离心沉淀, 弃去上清液, 在沉淀物中加入5 mL含有2%(W:V)蔗糖和相应浓度AS的KNOP培养基中, 用酶标仪测定农杆菌菌液 $OD_{600}$ 值后在28  $^{\circ}\text{C}$ 下振荡(120 r/min)孵育5 h。其次, 将预培养后的褐角苔组织放到孵育5 h后的KNOP培养基中, 在黑暗、22  $^{\circ}\text{C}$ 和110 r/min振荡条件下共培养。然后, 用

表 1 正交试验因素水平

Table 1 Levels and factors of orthogonal experiment

水平 Level	预培养时间(A)/d Preculture time (A)/d	菌液 $OD_{600}$ 值(B) $OD_{600}$ value of bacterial suspension (B)	菌液添加量(C)/ $\mu$ L Bacterial suspension addition (C)/ $\mu$ L	AS 浓度(D)/( $\mu$ mol/L) AS concentration (D)/( $\mu$ mol/L)	共培养时间(E)/d Co-incubation time (E)/d
1	0	0.4	30	0	0.5
2	1	0.6	50	50	1.0
3	2	0.8	80	100	2.0
4	3	1.0	100	150	3.0
5	4	1.2	120	200	4.0

100  $\mu$ m 细胞筛过滤共培养的褐角苔组织,并移至含有 100  $\mu$ mol/L 头孢和 15 mg/L 潮霉素的固体 KNOP 培养基中,在 22  $^{\circ}$ C 恒温组培室中培养。3—4 周后,将存活下来的植物转移到含有 15 mg/L 潮霉素的固体 KNOP 培养基中,最后筛选抗性转化子,计算转化效率。

转化效率(%) = 转化植株数(个)/总接种数(个)  $\times$  100%。

#### 1.2.6 转基因褐角苔阳性植株的鉴定

提取褐角苔转基因阳性苗和野生组培苗总 DNA,设计潮霉素引物和载体引物进行 PCR 验证。提取 T2 代转基因褐角苔阳性苗总 RNA 并反转录得到 cDNA,以内参基因(*Actin*)引物和载体引物进行 RT-qPCR 验证(表 2)。实验结果采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算<sup>[13]</sup>。

表 2 本研究所用引物序列

Table 2 Primer sequences used in the study

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
Hygromycin-F	CCCAAGCTGCATCATCGAAA
Hygromycin-R	GCGCCGATGGTTTCTACAAA
pCAMBIA1305.2-F(PCR)	CAAACAAACCACCGCTGGTA
pCAMBIA1305.2-R(PCR)	ATAGAGTAGATGCCGACCGGA
<i>Actin</i> -F	ACGCCTGAACATCTCTGAA
<i>Actin</i> -R	CGTGCAGAACAAGAACTCGT
pCAMBIA1305.2-F(RT-qPCR)	TCTTCCCCGATATCCTCCCT
pCAMBIA1305.2-R(RT-qPCR)	TGTGGATTGCGAAAACCTGGG

#### 1.2.7 转基因植株 $\beta$ -葡萄糖苷酸酶(GUS)染色检测

取出褐角苔野生型(WT)植株和转基因植株,置于 GUS 染色液中,37  $^{\circ}$ C 恒温染色 6 h。使用 70% 酒

精脱色两次以除去叶绿素,观察植株染色情况。

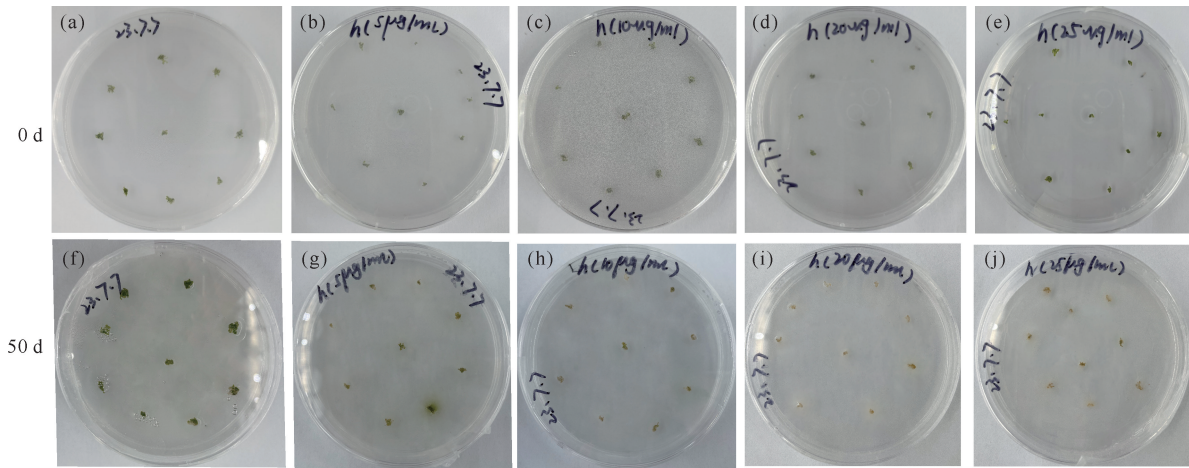
## 2 结果与分析

### 2.1 褐角苔对潮霉素的敏感性实验

将褐角苔外植体分别接种于含有不同浓度潮霉素的 KNOP 培养基上培养 50 d 后,发现潮霉素浓度为 5 mg/L 时,褐角苔外植体还能存活;随着潮霉素浓度增加,浓度 10 mg/L 及以上的潮霉素会导致褐角苔外植体褐化死亡(图 1)。因此,褐角苔外植体在浓度 10 mg/L 以下的潮霉素中才能存活,而且浓度适量增大可提高筛选成功率,因此 15 mg/L 潮霉素可作为抗性植株筛选的最适浓度。

### 2.2 褐角苔遗传转化体系条件筛选

通过正交试验确定农杆菌介导的褐角苔遗传转化条件的最佳组合。比较 5 个因素转化效率的极差  $R$  值, $R$  值越大,其对应的因素对转化效率的影响越大,因此根据极性  $R$  值的大小可以确定主要影响因素和次要影响因素,从而确定最优组合。由表 3 可以看出, $R$  值的大小顺序为  $B=C=E>A=D$ ,即各因素对转化效率的影响大小顺序为菌液  $OD_{600}$  值 = 菌液添加量 = 共培养时间  $>$  预培养时间 = AS 浓度,说明菌液  $OD_{600}$  值、菌液添加量和共培养时间对转化效率的影响最大。根据各因素水平所对应转化效率的平均值来看,A 因素的第五水平、B 因素的第三水平、C 因素的第三水平、D 因素的第三水平和 E 因素的第四水平均为最高,即可以确定各因素的最佳组合为  $A_5B_3C_3D_3E_4$ ,即预培养 4 d、菌液  $OD_{600}$  值 = 0.8、菌液添加量 80  $\mu$ L、AS 浓度 100  $\mu$ mol/L 和共培养时间 3 d。在该条件下褐角苔的遗传转化效率最高,可达 30%。



(a)–(e) are the explants of *Folioceros fuciiformis* cultured in KNOP medium for 0 d, there was no hygromycin added in (a), and the concentrations of hygromycin added in (b)–(e) were 5, 10, 20 and 25 mg/L, respectively; (f)–(j) are explants of *F. fuciiformis* cultured in KNOP medium for 50 d, there was no hygromycin added in (f), and the hygromycin added in (g)–(j) was 5, 10, 20 and 25 mg/L, respectively.

图1 潮霉素对褐角苔生长的影响

Fig. 1 Effect of hygromycin on the growth of *F. fuciiformis*

表3 正交试验各因素的极差分析

Table 3 Range analysis of factors for orthogonal experiment

处理 Treatment	A	B	C	D	E	接种数/个 Number of explants	转化植株数/个 Number of transformed plants	转化效率/% Transformati on rate/%
1	1(0)	1(0.4)	1(30)	1(0)	1(0.5)	10	0	0
2	1	2(0.6)	3(80)	4(150)	5(4)	10	0	0
3	1	3(0.8)	5(120)	2(50)	4(3)	10	0	0
4	1	4(1.0)	2(50)	5(200)	3(2)	10	0	0
5	1	5(1.2)	4(100)	3(100)	2(1)	10	0	0
6	2(1)	1	5	4	3	10	0	0
7	2	2	2	2	2	10	0	0
8	2	3	4	5	1	10	0	0
9	2	4	1	4	5	10	0	0
10	2	5	3	1	2	10	0	0
11	3(2)	1	4	2	5	10	0	0
12	3	2	1	5	4	10	0	0
13	3	3	3	3	3	10	1	10
14	3	4	5	1	2	10	0	0
15	3	5	2	4	1	10	0	0
16	4(3)	1	1	5	2	10	0	0
17	4	2	5	3	1	10	0	0
18	4	3	2	1	5	10	1	10
19	4	4	4	4	4	10	2	20
20	4	5	1	2	3	10	0	0
21	5(4)	1	2	3	4	10	0	0
22	5	2	4	1	3	10	0	0
23	5	3	3	3	4	10	3	30



续表

Continued table

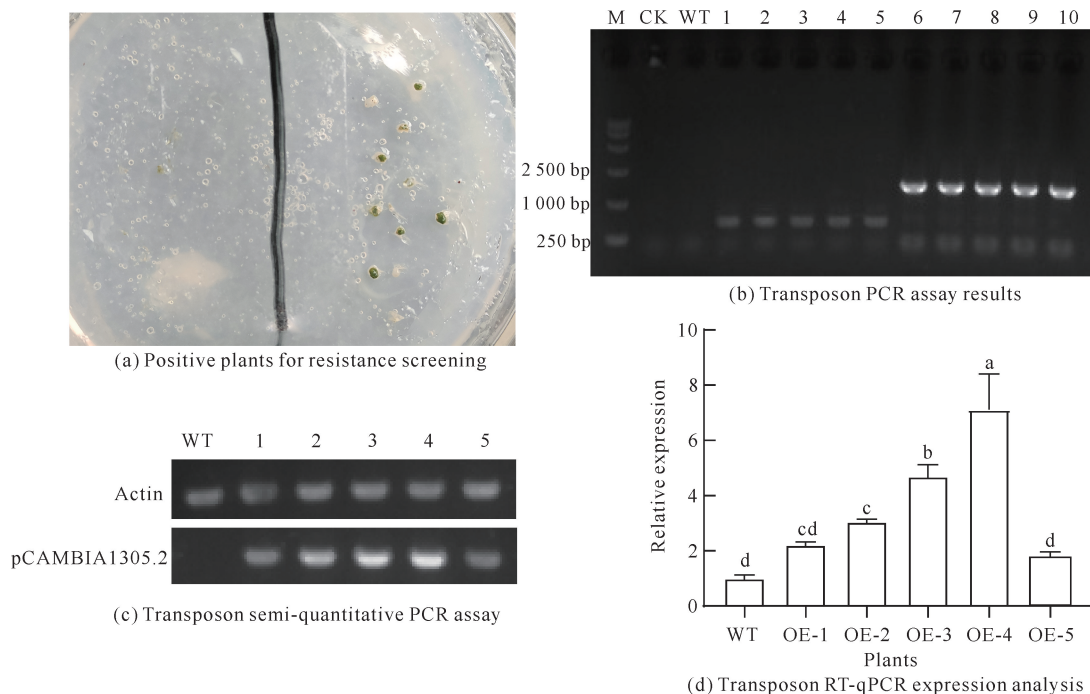
处理 Treatment	A	B	C	D	E	接种数/个 Number of explants	转化植株数/个 Number of transformed plants	转化效率/% Transformati on rate/%
24	5	4	3	2	1	10	1	10
25	5	5	5	5	5	10	0	0
K1	0	0	0	10	10			
K2	0	0	10	10	0			
K3	10	50	50	40	10			
K4	30	30	20	20	50			
K5	40	0	0	0	10			
k1	0.00	0.00	0.00	3.33	3.33			
k2	0.00	0.00	3.33	3.33	0.00			
k3	3.33	16.67	16.67	13.33	3.33			
k4	10.00	10.00	6.67	6.67	16.67			
k5	13.33	0.00	0.00	0.00	3.33			
R	13.33	16.67	16.67	13.33	16.67			

Note: the values in brackets indicate the specific levels of the five factors (see Table 1 for details).

### 2.3 转基因植株分子鉴定

分别提取转化实验中获得的携带潮霉素抗性的转基因植株[图 2(a)]及 WT 植株叶片 DNA, 以潮霉素引物和载体引物进行 PCR 扩增检测, 其中共有 5 株转基因植株扩增出与阳性质粒一致的条带, 而 WT、空白对照(CK)均未扩增出条带[图 2(b)]。

为进一步检测目的载体在褐角苔转化植株中是否转录, 对上述转基因阳性植株与野生型植株作半定量 PCR[图 2(c)]和实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)分析[图 2(d)]。转基因阳性植株基因表达水平高于野生型植株, 为野生型植株 1.7—7.1 倍, 表明目的载体已转入褐角苔并稳定表达, 可用于后续实验。



M: marker(15 000 bp); CK: blank control; WT: wild type plant; Lane 1—5: hygromycin amplification test, Lane 6—10: vector primer amplification detection; OE-1—OE-5: transgenic plants.

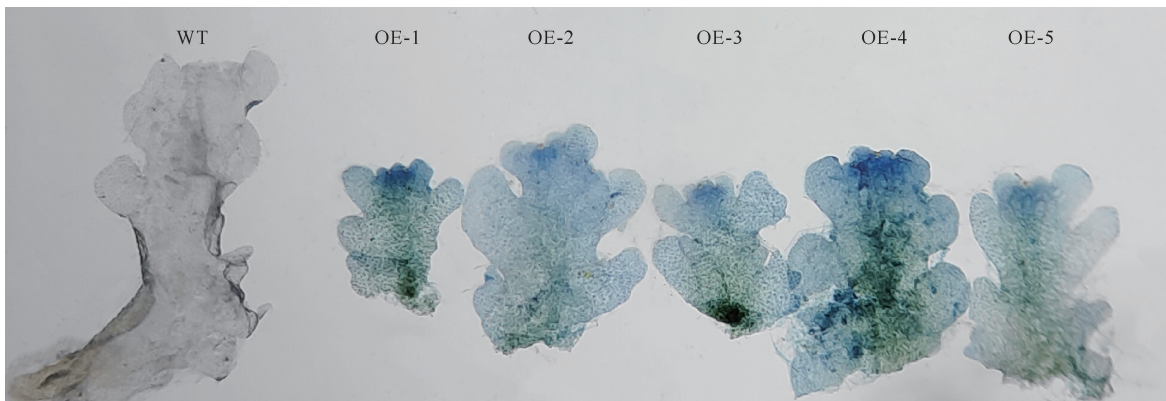
图 2 褐角苔转基因植株分子鉴定

Fig. 2 Molecular characterization of *F. fuciiformis* transgenic plants

## 2.4 GUS 染色鉴定抗性植株

分别对褐角苔 WT 植株和转基因阳性植株进行 GUS 染色, 其中转基因阳性植株呈现蓝色, 而 WT 植

株无色(图 3), 表明携带目的基因的载体已转入褐角苔中, 并获得了正确表达。



WT: wild type plant; OE-1—OE-5: transgenic plants.

图 3 转化子 GUS 染色检测情况

Fig. 3 Transposon GUS staining

## 3 讨论

常用的植物遗传转化方法是使用农杆菌介导, 该技术是目前最成熟、应用最广泛的遗传转化方法<sup>[14-16]</sup>。Hood 等<sup>[17]</sup>用农杆菌转化方法感染生长 3 个月的挪威云杉(*Picea abies*)幼苗, 转化率达 31%。王晶莹<sup>[18]</sup>通过比较发现用农杆菌介导转化地钱胞芽的转化效率较高, 均可达到 50% 以上。目前尚未有关于农杆菌介导的褐角苔遗传转化体系的报道, 因此本研究对农杆菌 AGL1 菌株介导褐角苔遗传转化过程中的主要影响因素(预培养时间、农杆菌菌液  $OD_{600}$  值、农杆菌添加量、共培养时间、AS 浓度)进行筛选, 构建了褐角苔的遗传转化体系, 为角苔的后续研究提供了一定的参考。

在植物的遗传转化过程中首要步骤应确定筛选转化体的筛选剂。潮霉素是一种氨基糖苷类抗生素, 通过竞争叶绿体、线粒体中的核糖体与延长因子 EF-2 的结合位点, 破坏核糖体的功能、抑制蛋白质的合成, 从而使敏感组织褐化死亡。不同物种对潮霉素的耐受性存在一定差异<sup>[19]</sup>; 李瑞美等<sup>[20]</sup>发现 50 mg/L 潮霉素为果蔗胚性愈伤组织遗传转化筛选的最佳浓度, 姚丽等<sup>[21]</sup>发现潮霉素浓度 30 mg/L 为甘蔗遗传转化时芽分化阶段的最佳筛选浓度, 孙靖等<sup>[22]</sup>估测潮霉素琼脂处理筛选转基因小立碗藓的最适浓度为 60 mg/L。本研究选择了潮霉素作为转化植物的筛选剂, 结果发现潮霉素浓度达到 10 mg/L 时褐角苔外植体不能正常生长, 且开始褐化死亡。所以, 潮霉

素浓度为 15 mg/L 可作为最适筛选浓度。

农杆菌介导的遗传转化所受影响因素较多, 包括植物材料类型、外植体的预处理方式、菌液  $OD$  值、共培养时间等<sup>[23,24]</sup>。外植体经过预培养后可以促进细胞分裂, 更容易整合外源基因, 从而提高外源基因的遗传转化效率<sup>[25]</sup>。肖艳华等<sup>[26]</sup>以天绿香(*Sauropus androgynus*)进行农杆菌转化时发现, 预培养 2 d 的外植体转化率最高。Ishizaki 等<sup>[12]</sup>研究发现地钱预培养 5—7 d 为最佳转化条件。不同的菌液  $OD$  值对转移 DNA(T-DNA)进入植株内的效果有不同的影响。在沾化冬枣(*Ziziphus jujuba* Mill.)和薄壳山核桃(*Carya illinoensis*)的遗传转化研究中发现, 菌液  $OD_{600}$  为 0.8 时的转化率最高<sup>[27,28]</sup>。Duan 等<sup>[29]</sup>对芍药(*Paeonia lactiflora*)遗传转化体系进行优化时发现, 农杆菌菌液  $OD_{600}$  为 0.6 时转化效果最好。可见不同物种在遗传转化过程中对预培养时间和菌液  $OD$  值的要求均有所不同。本研究中褐角苔预培养时间为 4 d 时转化效率最高, 0 d 时转化效率最低(可能是因为愈伤组织还未形成)。农杆菌菌液  $OD_{600}$  为 0.8 时转化效率最高; 当  $OD_{600}$  低于 0.8 时转化效率低, 可能是因为菌液浓度未达到而不能侵入愈伤组织;  $OD_{600}$  高于 0.8 的转化效率同样也较低, 可能是菌液浓度过高导致外植体死亡造成的。

董喜才等<sup>[30]</sup>研究表明 AS 浓度和外植体共培养时间对遗传转化效率至关重要, 菌液中添加 AS 能够将农杆菌中 T-DNA 片段成功插入到受体基因组中, 显著诱导增强农杆菌的侵染活力。在向日葵(*Helio-*

*anthus annuus*)<sup>[31]</sup>和地钱<sup>[12]</sup>的遗传转化共培养基中加入 100  $\mu\text{mol/L}$  AS 最有利于转化率的提高。共培养是为了使附着在外植体伤口处的农杆菌不断繁殖,促进 T-DNA 的转入从而提高转化率<sup>[32]</sup>。研究表明,共培养时间在 2—4 d 所得到的转化子最多<sup>[33,34]</sup>。本研究发现,在装有预培养外植体的 5 mL KNOP 培养基中添加 80  $\mu\text{L}$   $OD_{600}$  为 0.8 的农杆菌和 100  $\mu\text{mol/L}$  AS 时转化效率最高,这与 Frangedakis 等<sup>[35]</sup>的研究结果基本一致。当共培养时间低于 3 d 和高于 3 d 时转化率降低,这可能是由于培养时间过短或过长,导致农杆菌 T-DNA 片段未成功插入到受体基因组中或在褐角苔外植体内过度增殖致使外植体死亡。

#### 4 结论

随着分子生物学技术的发展,角苔植物在基因层面的研究越来越深入,农杆菌介导的遗传转化技术可为角苔植物的研究奠定基础。本研究通过农杆菌介导法建立了褐角苔的遗传转化体系,该体系稳定且遗传转化效率高。该体系的最优组合为外植体预培养 4 d 后转入含有 80  $\mu\text{L}$   $OD_{600}$  为 0.8 的农杆菌菌液和 100  $\mu\text{mol/L}$  AS 的 5 mL KNOP 培养基中共培养 3 d。通过潮霉素筛选、PCR、RT-qPCR 和 GUS 染色鉴定阳性转化子,极大地提高了阳性转化子的筛选效率。

#### 参考文献

- [1] MORRIS J L, PUTTICK M N, CLARK J W, et al. The timescale of early land plant evolution [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(10): E2274-E2283.
- [2] INITIATIVE O T P T. One thousand plant transcriptomes and the phylogenomics of green plants [J]. Nature, 2019, 574(7780): 679-685.
- [3] LI F W, NISHIYAMA T, WALLER M, et al. *Anthoceros* genomes illuminate the origin of land plants and the unique biology of hornworts [J]. Nature Plants, 2020, 6(3): 259-272.
- [4] FRANGEDAKIS E, SHIMAMURA M, VILLARREAL J C, et al. The hornworts: morphology, evolution and development [J]. The New Phytologist, 2021, 229(2): 735-754.
- [5] RENZAGLIA K S, VILLARREAL J C, PIATKOWSKI B T, et al. Hornwort stomata: architecture and fate shared with 400-million-year-old fossil plants without leaves [J]. Plant Physiology, 2017, 174(2): 788-797.
- [6] 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.
- [7] 康庆华. 植物遗传转化及其在亚麻中的应用[J]. 中国麻业科学, 2011, 33(6): 298-301.
- [8] DE CARVALHO TEIXEIRA YASSITEPE J E, DA SILVA V C H, HERNANDES-LOPES J, et al. Maize transformation: from plant material to the release of genetically modified and edited varieties [J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 766702.
- [9] 张慧颖, 王颖, 韩成贵. 转基因技术在中国主要粮食作物改良中的研究进展[J]. 农学学报, 2022, 12(10): 44-50.
- [10] HWANG H H, YU M, LAI E M. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: biology and applications [J]. The Arabidopsis Book, 2017, 15: e0186.
- [11] SCHAEFER D, ZRYD J P, KNIGHT C D, et al. Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens* [J]. Molecular & General Genetics: MGG, 1991, 226(3): 418-424.
- [12] ISHIZAKI K, CHIYODA S, YAMATO K T, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of the haploid liverwort *Marchantia polymorpha* L., an emerging model for plant biology [J]. Plant and Cell Physiology, 2008, 49(7): 1084-1091.
- [13] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [14] 陈思, 张从合, 王慧, 等. 农杆菌介导水稻遗传转化的影响因素及应用研究进展[J]. 现代农业科技, 2023(5): 1-4, 8.
- [15] 姚冉, 石美丽, 潘沈元, 等. 农杆菌介导的植物遗传转化研究进展[J]. 生物技术进展, 2011, 1(4): 260-265.
- [16] 吴水涵. 农杆菌介导的雪落樱瞬时遗传转化体系的初步构建[D]. 南京: 南京林业大学, 2023.
- [17] HOOD E E, CLAPHAM D H, EKBERG I, et al. T-DNA presence and opine production in tumors of *Picea abies* (L.) Karst induced by *Agrobacterium tumefaciens* A281 [J]. Plant Molecular Biology, 1990, 14(2): 111-117.
- [18] 王晶莹. 地钱遗传转化体系的建立及芥子油苷代谢工程的初探[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2019.
- [19] 王坚, 李永玲, 刘炜. 潮霉素 B 在遗传转化中应用的研究进展[J]. 宁夏农林科技, 2017, 58(12): 36-43.
- [20] 李瑞美, 何炎森. 果蔗‘拔地拉’植株再生与农杆菌介导的遗传转化研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2009, 17(6): 567-570.
- [21] 姚丽, 吴才文, 曾千春. 甘蔗遗传转化中不同阶段潮霉素抗性筛选[J]. 中国糖料, 2010(2): 17-19.

- [22] 孙靖,步佳佳.潮霉素对小立碗藓生长的影响[J].现代农业科技,2012(2):36,39.
- [23] CHEN K, HU K Q, XI F H, et al. High-efficient and transient transformation of moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) and ma bamboo (*Dendrocalamus latiflorus* Munro) [J]. Journal of Plant Biology, 2023, 66(1):75-86.
- [24] QIN Y Q, WANG D, FU J X, et al. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root transformation as an efficient system for gene function analysis in *Litchi chinensis* [J]. Plant Methods, 2021, 17(1):103.
- [25] 李猷,尹蕾,唐凯悦,等.外植体预培养时间对番茄外源基因转化的影响[J].湖北农业科学,2014,53(17):4208-4210.
- [26] 肖艳华,曾幼玲,兰海燕,等.农杆菌介导的天绿香遗传转化影响因素的研究[J].植物研究,2008,28(5):564-567,573.
- [27] 孟辉.沾化冬枣基因工程改良的基础研究[D].济南:山东大学,2005.
- [28] 谢晓婷,黄巧宇,温广超,等.非组培依赖的发根农杆菌介导的薄壳山核桃转化体系构建[J].果树学报,2022,39(1):131-140.
- [29] DUAN S Y, XIN R J, GUAN S X, et al. Optimization of callus induction and proliferation of *Paeonia lactiflora* Pall. and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation [J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 996690.
- [30] 董喜才,杜建中,王安乐,等.乙酰丁香酮在植物转基因研究中的作用[J].中国农学通报,2011,27(5):292-299.
- [31] 郝彦玲,朱本忠,朱鸿亮,等.根癌农杆菌介导的向日葵遗传转化体系的建立[J].农业生物技术学报,2005,13(6):713-717.
- [32] NAKANO M, OTANI M. Plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation systems in liliaceous ornamental plants [J]. Plant Biotechnology, 2020, 37(2):129-140.
- [33] ZHANG P Y, XU B, WANG Y Z, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the fungus *Penicillium marneffeii* [J]. Mycological Research, 2008, 112(Pt 8): 943-949.
- [34] SØRENSEN L Q, LYSØE E, LARSEN J E, et al. Genetic transformation of *Fusarium avenaceum* by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and the development of a USER-Brick vector construction system [J]. BMC Molecular Biology, 2014, 15:15.
- [35] FRANGEDAKIS E, WALLER M, NISHIYAMA T, et al. An *Agrobacterium*-mediated stable transformation technique for the hornwort model *Anthoceros agrestis* [J]. The New Phytologist, 2021, 232(3):1488-1505.

## Establishment of a Genetic Transformation System for *Folioceros fuciformis*

HUANG Dan<sup>1</sup>, PENG Tao<sup>1\* \* \*</sup>, JIANG Shan<sup>2</sup>, WANG Shunli<sup>1</sup>, LI Xuqiang<sup>1</sup>, MA Huaifu<sup>1</sup>, SHENG Fuyuan<sup>1</sup>

(1. School of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang, Guizhou, 550025, China; 2. School of International Education, Guizhou Normal University, Guiyang, Guizhou, 550025, China)

**Abstract:** The selection of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation system for hornworts provides a theoretical basis for the future study of early terrestrial plant evolution. In this study, *Agrobacterium* AGL1 carrying the plasmid pCAMBIA1305.2 was used to infect the explants of *Folioceros fuciformis*. With hygromycin as a screening marker, the pre-culture time of explants, the OD value and addition amount of the bacterial suspension, the concentration of acetosyringone (AS), and the co-culture time were optimized for the establishment of the genetic transformation system. The results showed that the optimum concentration of hy-



gromycin was 15 mg/L for the screening of resistant seedlings, and the state of the explants was the best after 4 d of pre-culture. The optimal infection conditions were addition of 80  $\mu\text{L}$  *Agrobacterium* suspension with  $OD_{600}=0.8$  in the co-culture medium, AS concentration of 100  $\mu\text{mol/L}$ , and co-culture time of 3 d. The transgenic plants were identified by hygromycin screening, PCR, RT-qPCR and beta-glucuronidase (GUS) staining. The findings provide technical support for the subsequent research on the gene functions of hornworts.

**Key words:** *Folioceros fuciformis*; explants; *Agrobacterium*-mediated method; genetic transformation system

责任编辑:米慧芝



微信公众号投稿更便捷

联系电话:0771-2503923

邮箱:gxxk@gxas.cn

投稿系统网址:<http://gxxk.ijournal.cn/gxxk/ch>