

DOI:10.12403/j.1001-1498.20230390

# 日本落叶松瞬时转化体系的优化及初步应用

邢俊霞<sup>1,2</sup>, 臧巧路<sup>2,3</sup>, 叶查龙<sup>2</sup>, 张陈谊<sup>1,2</sup>, 程冬霞<sup>2</sup>,  
齐力旺<sup>2</sup>, 杨玲<sup>1</sup>, 李万峰<sup>2\*</sup>

(1. 林木遗传育种全国重点实验室, 东北林业大学, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 林木遗传育种全国重点实验室, 国家林草局林木培育重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091; 3. 山西农业大学, 山西 太谷 030801)

**摘要:** [目的] 优化农杆菌介导的日本落叶松胚性愈伤组织瞬时转化体系。[方法] 以液体增殖培养 7 d 的日本落叶松胚性愈伤组织为受体材料, 利用携带  $\beta$ -葡糖醛酸酶基因 (*GUS*) 的 pCAMBIA1305.1 载体进行瞬时转化, 根据 *GUS* 的表达量及酶活性, 筛选最佳侵染液浓度、侵染时间和共培养时间。并利用筛选出的转化体系, 分析落叶松 *scarecrow-like 6* (*LaSCL6*) 启动子的活性。[结果] 瞬时转化后, *GUS* 表达明显。当侵染液浓度  $OD_{600}$  为 0.2, 侵染 5 min, 共培养 72 h 时, *GUS* 的表达量最高,  $\Delta C_T$  值为 -2.274 2; 当侵染液浓度  $OD_{600}$  为 0.05, 侵染 5 min, 共培养 72 h 时, *GUS* 酶活性最高, 为 25.7286 U·L<sup>-1</sup>。*LaSCL6* 启动子的活性是 *CaMV35S* 启动子的 1.55 倍。[结论] 综合考虑 *GUS* 的表达量和酶活性, 当侵染液浓度  $OD_{600}$  为 0.05, 侵染 5 min, 共培养 24 h 时, *GUS* 的表达量和酶活性较高, 这一条件可以用来进行日本落叶松胚性愈伤组织的高效转化。

**关键词:** 落叶松; 瞬时转化; 胚性愈伤组织; *GUS*; 启动子

**中图分类号:** S722; S791.223

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-1498(2024)03-0001-07

瞬时表达分析是一种快速研究基因功能的方法, T-DNA 虽然未被整合到宿主基因组上, 但在其进入宿主细胞后, 仍可以进行转录和翻译, 在转化后 12 h 左右即可检测到目的基因的表达<sup>[1]</sup>。瞬时转化体系以其快捷、高效的优点被广泛应用于外源基因表达分析、基因沉默、启动子分析、蛋白互作等许多植物分子生物学领域<sup>[2-7]</sup>。瞬时表达系统的受体材料主要包括愈伤组织<sup>[8-9]</sup>、原生质体<sup>[10-11]</sup>、叶片<sup>[12]</sup>等。与其它受体材料相比, 愈伤组织具有成本低、转化效率高、能够大量增殖培养等优势<sup>[13]</sup>, 因此, 以愈伤组织为受体材料的瞬时转化体系在植物基因功能研究中具有重要的应用价值。但是, 瞬时转化过程中一些参数和培养条件会影响转化效率, 如农杆菌菌液的浓度、侵染时间和共培养时间等<sup>[14-15]</sup>。因此, 转化条件的探索对转化体系的

建立及转化效率的提高至关重要。

日本落叶松 (*Larix kaempferi* (Lamb.) Carr.) 具有材质优良、抗病性强和用途广等特点, 是我国重要的人工造林树种。随着日本落叶松基因组的测定<sup>[16]</sup>, 日本落叶松中越来越多重要的基因被鉴定出来<sup>[17-19]</sup>, 因此, 基因功能的解析已成为当前日本落叶松研究的主要目标。遗传转化技术是研究基因功能的重要手段, 其中根癌农杆菌介导的遗传转化是最常用的转基因方法之一。自从 Rossi 等<sup>[20]</sup>于 1993 年在烟草中首次成功建立以来, 该技术目前已在多种植物中成功应用。遗传转化包括稳定转化和瞬时转化, 目前, 已经建立了农杆菌介导的日本落叶松胚性愈伤组织稳定转化体系<sup>[21-23]</sup>, 对于其瞬时转化体系的研究仍未见报道。

本研究以农杆菌介导的日本落叶松胚性愈伤组

收稿日期: 2023-10-07 修回日期: 2024-01-03

基金项目: 国家自然科学基金面上项目“落叶松 miR171-LaSCL6 调控体胚发生的分子机理”(32271904)。

\* 通讯作者: 李万峰, 男, 研究员, 主要从事落叶松遗传育种工作, E-mail: liwf@caf.ac.cn

织稳定转化体系为基础<sup>[21-23]</sup>, 利用携带  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶基因 (*GUS*) 的 pCAMBIA1305.1 载体进行瞬时转化, 通过分析侵染液浓度、侵染时间和共培养时间对 *GUS* 表达量和酶活性的影响, 筛选高效的瞬时转化条件, 为日本落叶松基因及其启动子的功能研究提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料与培养条件

实验材料为本实验室保存的由日本落叶松未成熟种子诱导的胚性愈伤组织<sup>[22]</sup>。在固体增殖培养基<sup>[24]</sup>上每隔 15 d 继代一次, 在液体增殖培养基上每 7 d 继代一次。增殖培养在暗环境 ( $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) 下进行。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 DNA 提取** 使用 CTAB 植物基因组 DNA 快速提取试剂盒 (ZP309K-2, 北京庄盟国际生物基因科技有限公司) 进行总 DNA 的提取, 具体操作按照说明书进行。通过琼脂糖凝胶电泳确定 DNA 的质量, 使用分光光度计对 DNA 的浓度进行检测。合格的 DNA 于  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱保存。

**1.2.2 落叶松 *scarecrow-like 6* (*LaSCL6*) 启动子克隆及载体构建** 利用日本落叶松基因组数据<sup>[16]</sup>, 选取 *LaSCL6* 起始密码子上游 2 500 bp 序列进行引物设计。以 DNA 为模板, 利用引物 5'-AAACCCTCGTCATGGATTTG-3' 和 5'-TGACAGCAAACCAAAA-3' 进行 PCR 扩增。PCR 产物切胶回收后进行 TA 克隆和测序验证。以测序正确的质粒为模板, 利用分别带有 *Hind* III 和 *Nco* I 酶切位点的引物 5'-GACCTGCAGGCATGCAAGCTTAAACCCTCGTCATGGATTTG-3' 和 5'-TTACCTCAGATCTACCATGGTGACAGCAAACCAAAA-3' 进行 PCR 扩增 (下划线表示酶切位点序列)。利用 *Hind* III 和 *Nco* I 酶分别消化 pCAMBIA1305.1 载体和 PCR 产物, 酶切产物切胶回收后进行连接和转化, 测序验证后获得 *P<sub>LaSCL6</sub>::GUS* 重组质粒。

**1.2.3 侵染** 通过冻融法将携带 *GUS* 的 pCAMBIA1305.1 载体 (*35S::GUS*) 和重组质粒 (*P<sub>LaSCL6</sub>::GUS*) 转入根癌农杆菌 GV3101 感受态细胞中。取 200  $\mu\text{L}$  菌液, 涂于含 50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  卡那霉素的固体 Luria-Bertani (LB) 培养基上, 28  $^\circ\text{C}$

倒置培养 2 d。挑取单菌落于含 50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  卡那霉素的液体 LB 培养基中, 28  $^\circ\text{C}$ , 200 rpm 摇床上震荡培养至  $OD_{600}$  为 0.6~0.8。菌液 4  $^\circ\text{C}$ , 4 000 rpm, 离心 10 min 后, 弃上清, 收集菌体。使用含 20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酰丁香酮的液体增殖培养基重悬菌体, 使菌液  $OD_{600}$  分别为 0.05、0.1 和 0.2 (表 1), 此时得到的溶液即为侵染液。

胚性愈伤组织液体增殖培养 7 d 后, 使用抽滤脱菌装置抽干水分, 置于侵染液中进行侵染, 侵染时间分别为 1、5 和 10 min (表 1)。侵染之后使用抽滤脱菌装置将混合物抽干, 之后将愈伤组织转移至含有 20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酰丁香酮的固体增殖培养基 BM 中, 23  $^\circ\text{C}$ , 黑暗条件下分别共培养 24、48 和 72 h (表 1), 随后收集材料,  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  保存。

**1.2.4 RNA 提取、半定量 RT-PCR 和定量 RT-PCR (qRT-PCR)** 以瞬时转化的胚性愈伤组织为材料, 使用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA (ER101, 北京全式金生物技术), 具体操作按照说明书进行。使用核酸检测仪及琼脂糖凝胶电泳进行 RNA 浓度及纯度检测。使用反转录试剂盒 (P10720, 北京全式金生物技术) 将检测合格的 RNA 反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板进行半定量 RT-PCR 和 qRT-PCR 检测, *LaEF1A1* 为内参基因, 引物序列为 5'-GACTGTACCTGTTGGTCGTG-3' 和 5'-CCTCCAGCAGAGCTTCAT-3'<sup>[25]</sup>。以 pCAMBIA1305.1 载体中的 *GUS* 作为检测基因, 引物序列为 5'-CGAAGCGAGCAATGTGATGG-3' 和 5'-GATCCGCAAGACGCATCAAC-3'。

半定量 RT-PCR 反应体系: 1  $\mu\text{L}$  cDNA, 12.5  $\mu\text{L}$  KOD 酶, 引物各 0.75  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  RNase-free  $\text{H}_2\text{O}$ 。反应条件: 94  $^\circ\text{C}$  2 min; 98  $^\circ\text{C}$  10 s, 55  $^\circ\text{C}$  5 s, 68  $^\circ\text{C}$  15 s, 32 个循环; 68  $^\circ\text{C}$  2 min。PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳进行检测。

qRT-PCR 反应体系: 12.5  $\mu\text{L}$  TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup>, 2  $\mu\text{L}$  cDNA, 引物各 0.5  $\mu\text{L}$ , 9.5  $\mu\text{L}$  RNase-free  $\text{H}_2\text{O}$ 。反应条件: 95  $^\circ\text{C}$  30 s; 95  $^\circ\text{C}$  5 s, 60  $^\circ\text{C}$  30 s, 40 个循环; 95  $^\circ\text{C}$  10 s; 65  $^\circ\text{C}$  5 s; 95  $^\circ\text{C}$  5 s。每个反应进行 3 次重复, 表达量以  $\Delta\text{C}_T$  值体现, 结果以平均值  $\pm$  标准差 (Mean  $\pm$  SD) 的形式表示。

**1.2.5 GUS 酶活性检测** 将  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  保存的实验样品置于液氮中研磨成粉末, 以 1:9 的比例置于

表1 侵染液浓度、侵染时间及共培养时间对 GUS 表达量与酶活性的影响

Table 1 Effects of infection solution concentration, infection time and co-culture time on the expression and enzyme activity of GUS

处理 Treatment	OD <sub>600</sub>	侵染时间 infection time/min	共培养时间 co-culture time/h	ΔC <sub>T</sub> 值 ΔC <sub>T</sub> value	GUS酶活性 GUS enzyme activity / (U·L <sup>-1</sup> )
1	0.05	1	24	-11.630 0 ± 0.36 <sup>j</sup>	17.5818 ± 0.69 <sup>efgh</sup>
2	0.05	1	48	-7.936 7 ± 0.49 <sup>fgh</sup>	18.0120 ± 1.69 <sup>efgh</sup>
3	0.05	1	72	-6.237 5 ± 0.25 <sup>def</sup>	21.4831 ± 1.11 <sup>bc</sup>
4	0.05	5	24	-3.562 5 ± 0.14 <sup>abc</sup>	21.2536 ± 1.12 <sup>bcd</sup>
5	0.05	5	48	-7.530 0 ± 0.23 <sup>fgh</sup>	24.4378 ± 0.94 <sup>a</sup>
6	0.05	5	72	-4.440 0 ± 0.13 <sup>cd</sup>	25.7286 ± 0.50 <sup>a</sup>
7	0.05	10	24	-4.515 0 ± 0.24 <sup>cd</sup>	19.6185 ± 2.07 <sup>bcd</sup>
8	0.05	10	48	-6.755 0 ± 0.09 <sup>efg</sup>	17.3810 ± 1.82 <sup>efgh</sup>
9	0.05	10	72	-4.890 0 ± 0.20 <sup>cde</sup>	13.5370 ± 1.86 <sup>ijkl</sup>
10	0.1	1	24	-2.318 3 ± 0.22 <sup>ab</sup>	15.3442 ± 1.51 <sup>ghijk</sup>
11	0.1	1	48	-7.355 0 ± 0.28 <sup>fgh</sup>	15.4590 ± 1.39 <sup>ghijk</sup>
12	0.1	1	72	-4.652 5 ± 0.14 <sup>cd</sup>	18.3276 ± 1.38 <sup>defg</sup>
13	0.1	5	24	-8.422 5 ± 0.44 <sup>gh</sup>	16.7499 ± 1.68 <sup>efghi</sup>
14	0.1	5	48	-6.694 2 ± 0.27 <sup>efg</sup>	18.7579 ± 1.64 <sup>cdef</sup>
15	0.1	5	72	-3.570 0 ± 0.2 <sup>abc</sup>	14.9713 ± 1.55 <sup>hijkl</sup>
16	0.1	10	24	-8.737 5 ± 0.41 <sup>hi</sup>	16.1761 ± 1.81 <sup>fghij</sup>
17	0.1	10	48	-6.612 5 ± 0.21 <sup>efg</sup>	21.7413 ± 1.76 <sup>b</sup>
18	0.1	10	72	-4.135 0 ± 0.18 <sup>bc</sup>	19.7906 ± 1.90 <sup>bcd</sup>
19	0.2	1	24	-10.403 0 ± 0.11 <sup>ij</sup>	17.1228 ± 1.55 <sup>efghi</sup>
20	0.2	1	48	-7.845 0 ± 0.20 <sup>fgh</sup>	16.8359 ± 1.89 <sup>efghi</sup>
21	0.2	1	72	-6.022 5 ± 0.09 <sup>def</sup>	18.3563 ± 1.04 <sup>defg</sup>
22	0.2	5	24	-10.515 0 ± 0.21 <sup>ij</sup>	14.2542 ± 1.88 <sup>ijkl</sup>
23	0.2	5	48	-6.025 0 ± 0.33 <sup>def</sup>	12.0453 ± 1.72 <sup>l</sup>
24	0.2	5	72	-2.274 2 ± 0.07 <sup>a</sup>	16.2048 ± 2.31 <sup>fghij</sup>
25	0.2	10	24	-10.280 0 ± 0.59 <sup>ij</sup>	13.0493 ± 1.59 <sup>kl</sup>
26	0.2	10	48	-6.035 0 ± 0.31 <sup>def</sup>	17.6104 ± 1.94 <sup>efgh</sup>
27	0.2	10	72	-3.925 0 ± 0.17 <sup>abc</sup>	14.9713 ± 1.39 <sup>hijkl</sup>

0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS 缓冲液中, 充分混匀后, 4 °C 离心 15 min, 5 000 rpm, 取上清移入新的管中, 放到冰上备用。之后使用分光光度计检测上清中总蛋白含量, 随后置于-20 °C 备用。使用 β-葡萄糖苷酶酶联免疫分析试剂盒 (LB5023A, 武汉力博瑞生物科技有限公司) 进行 GUS 酶活性检测, 具体操作步骤按照说明书进行。使用酶标仪在 450 nm 波长下测定标准品与待测样品的吸光度, 以标准品的浓度为横坐标, OD<sub>450</sub> 处的值为纵坐标, 使用 Excel 绘制出标准曲线。根据待测样品的 OD<sub>450</sub> 处的值计算样品相应的浓度, 再乘以稀释倍

数, 即为样品总蛋白的浓度。每个样品检测 3 次, 检测结果以平均值 ± 标准差 (Mean ± SD) 的形式表示。

1.2.6 顺式作用元件分析 使用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 对启动子 CaMV35S 和 P<sub>LaSCL6</sub> 的顺式作用元件进行分析。使用 TBtools 软件绘制启动子元件图。

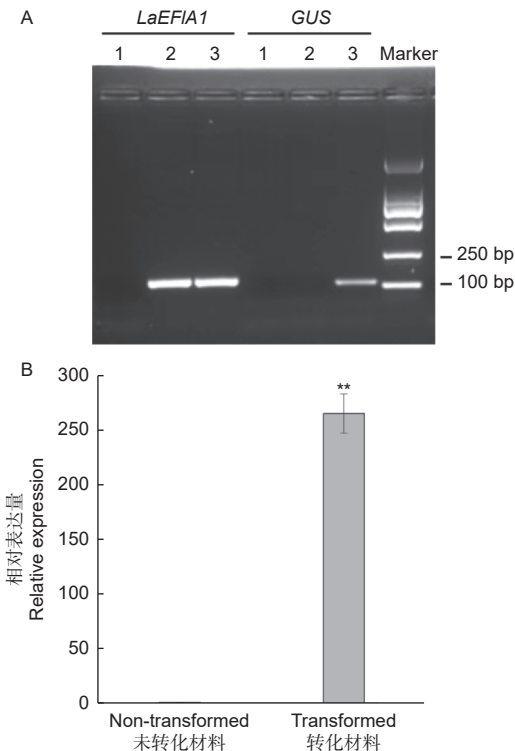
### 1.3 数据处理与分析

采用 SPSS 软件进行显著性分析。柱状图使用 Origin 2021 软件绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 日本落叶松胚性愈伤组织中 *GUS* 的瞬时表达

使用载体 *35S::GUS*，以  $OD_{600}=0.1$  的侵染液侵染 10 min，共培养 48 h 为条件进行瞬时转化。半定量 RT-PCR 结果显示，在转化的材料中可以检测到 *GUS* 的扩增片段，而在未转化的材料中未检测到（图 1A）。qRT-PCR 分析也进一步验证了半定量 RT-PCR 的结果（图 1B）。这两个结果表明，以  $OD_{600}=0.1$  的侵染液侵染 10 min，共培养 48 h 为瞬时转化条件，载体 *35S::GUS* 可以导入日本落叶松胚性愈伤组织的细胞中，且 *CaMV35S* 启动子可以驱动 *GUS* 的表达。



注：\*\*， $P < 0.01$ ；1， $H_2O$ ；2，未转化材料；3，转化材料

Notes:\*\*， $P < 0.01$ ；1， $H_2O$ ；2，Non-transformed sample；3，Transformed sample

图 1 *CaMV35S* 驱动 *GUS* 表达的半定量 (A) 和定量 (B) RT-PCR 分析

Fig. 1 Semi-quantitative (A) and quantitative (B) RT-PCR analysis of *GUS* driven by *CaMV35S*

### 2.2 侵染液浓度、侵染时间及共培养时间对 *GUS* 表达量和酶活性的影响

侵染液浓度、侵染时间和共培养时间分别设计了 3 个梯度，使用载体 *35S::GUS* 进行瞬时转化。qRT-PCR 结果显示，*GUS* 在不同的条件下均能表

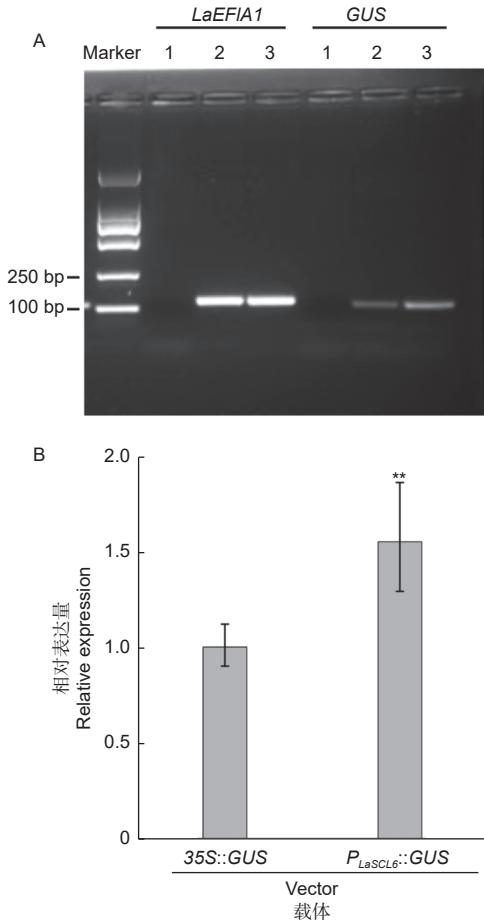
达，但表达量差别明显（表 1）。当侵染液  $OD_{600}=0.2$ ，侵染 5 min，共培养 72 h 时，*GUS* 的表达量最高， $\Delta C_T$  值为  $-2.274 2$ ；当侵染液  $OD_{600}=0.05$ ，侵染 1 min，共培养 24 h 时，*GUS* 的表达量最低， $\Delta C_T$  值为  $-11.630 0$ 。*GUS* 酶活性在所有材料中均能被检测到，但在不同的条件下，其大小不同（表 1）。当侵染液  $OD_{600}=0.05$ ，侵染 5 min，共培养 72 h 时，*GUS* 酶活性最高，为  $25.728 6 U \cdot L^{-1}$ ；当侵染液  $OD_{600}=0.2$ ，侵染 5 min，共培养 48 h 时，*GUS* 酶活性最低，为  $12.045 3 U \cdot L^{-1}$ 。*GUS* 表达量较高的 5 个材料是处理 4、10、15、24 和 27，而酶活性较高的 5 个材料是处理 3、4、5、6 和 17。这些结果表明，处理 4 中，即以侵染液  $OD_{600}=0.05$ ，侵染 5 min，共培养 24 h 为转化条件时，*GUS* 的表达量和酶活性都比较高。

### 2.3 *CaMV35S* 和 *P<sub>LaSCL6</sub>* 启动子活性分析

分别使用载体 *35S::GUS* 和重组质粒 *P<sub>LaSCL6</sub>::GUS*，以  $OD_{600}=0.05$  的侵染液侵染 5 min，共培养 24 h 为条件进行瞬时转化。半定量 RT-PCR 结果表明，两种转化材料中都可以检测到 *GUS* 的扩增片段，但转 *P<sub>LaSCL6</sub>::GUS* 的材料中电泳条带相对较亮（图 2A）。qRT-PCR 结果进一步表明，转 *P<sub>LaSCL6</sub>::GUS* 的材料中 *GUS* 表达量是转 *35S::GUS* 的 1.55 倍（ $P < 0.01$ ）（图 2B）。

### 2.4 *CaMV35S* 和 *P<sub>LaSCL6</sub>* 启动子元件分析

根据预测结果，*P<sub>LaSCL6</sub>* 上调控元件的数量和种类均要明显多于 *CaMV35S*。*P<sub>LaSCL6</sub>* 具有 132 个调控元件，而 *CaMV35S* 仅有 28 个调控元件（图 3A）。*P<sub>LaSCL6</sub>* 上 TATA-box 有 45 个，而 *CaMV35S* 上仅有 3 个。此外，*P<sub>LaSCL6</sub>* 中包含 19 种顺式作用元件，而 *CaMV35S* 上有 11 种，它们共有的调控元件有 7 种，分别是激素响应元件（ABRE、TGA-box）、光响应元件（G-box）、参与 MeJA 反应的元件（CGTCA-motif、TGACG-motif）、 $-30$  附近的核心启动子元件（TATA-box）和常见的顺式作用元件（CAAT-box）（图 3B）。此外，*P<sub>LaSCL6</sub>* 上还包含多种其它顺式作用元件，如激素响应元件（GARE-motif、P-box、CGTCA-motif、TGACG-motif）、光响应元件（AE-box、Box 4、Box II、G-Box、I-box）、厌氧诱导必须的调控元件 ARE、干旱诱导相关元件 MBS 和参与



注: \*\*,  $P < 0.01$ ; 1,  $H_2O$ ; 2, 转 35S::GUS 载体材料; 3, 转  $P_{LaSCL6}$ ::GUS 载体材料

Notes: \*\*,  $P < 0.01$ ; 1,  $H_2O$ ; 2, Transformed sample with vector 35S::GUS; 3, Transformed sample with vector  $P_{LaSCL6}$ ::GUS

图2  $CaMV35S$  和  $P_{LaSCL6}$  驱动  $GUS$  表达的半定量 (A) 与定量 (B) RT-PCR 分析

Fig. 2 Semi-quantitative (A) and quantitative (B) RT-PCR analysis of  $GUS$  driven by promoter  $CaMV35S$  or  $P_{LaSCL6}$

防御和应激反应的调控元件 TC-rich-repeats 等。

### 3 讨论

植物的遗传转化受到多种因素的影响, 要建立一个高效的瞬时转化体系, 需对影响遗传转化的多种因素进行全面的探索与优化<sup>[26]</sup>。彭绿春等认为菌液浓度对云南杜鹃 (*Rhododendron yunnanense* Franch.) 愈伤组织中  $GUS$  的瞬时表达有显著影响<sup>[27]</sup>。侵染时间、共培养时间也是影响转化效率的重要因素<sup>[28]</sup>, 因为侵染时间过长容易导致外植体死亡, 而侵染时间过短则受体材料上不能够附着足够的菌液<sup>[29]</sup>, 共培养时间的长短又直接影响着目的基因的整合和转化<sup>[30]</sup>。本研究以日本落叶松胚性愈伤

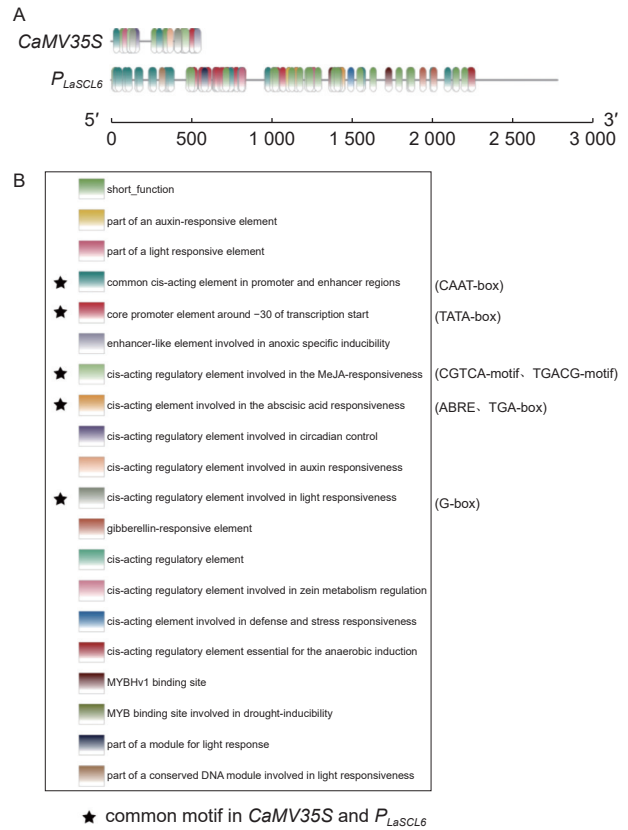


图3 启动子  $CaMV35S$  和  $P_{LaSCL6}$  的顺式作用元件分析  
Fig. 3 Analysis of cis-acting elements of the  $CaMV35S$  and  $P_{LaSCL6}$  promoters

组织为受体材料, 探讨了农杆菌介导的瞬时转化体系中侵染液浓度、侵染时间和共培养时间对转化效率的影响。从  $GUS$  的表达量和酶活性来看, 不同组合处理后转化效率差别较大。综合分析后, 发现以侵染液浓度  $OD_{600}$  为 0.05, 侵染 5 min, 共培养 24 h 为转化条件时,  $GUS$  的表达量和酶活性都比较高。研究结果也再次表明掌握好侵染液浓度、侵染时间和共培养时间有助于提高瞬时转化效率。另外, 上述条件不仅可以用来进行日本落叶松胚性愈伤组织的瞬时转化, 也为其它针叶树瞬时转化体系的建立和优化提供参考。

启动子是调控基因表达的重要元件, 它的调控作用是由多层次、多因素共同作用的结果。对启动子结构、功能和作用机制的研究不仅有利于了解基因调控模式和信号传递途径, 而且对于了解植物的生长发育机制和对外界环境的响应具有重要意义<sup>[31]</sup>。由于对日本落叶松基因的启动子研究不够深入, 导致其在应用中具有不确定性。有些外源启动子在转基因植物中不一定能够诱导目的基因高效表达。例如, 外源性启动子 *hsr203J* 在柑橘 (*Citrus*

*sinensis* Osbeck) 中并未被激活<sup>[32]</sup>。落叶松  $P_{LKf3H2}$  启动子的活性在本生烟草 (*Nicotiana benthamiana* Domin) 中略弱于  $CaMV35S$  启动子, 并且随着  $P_{LKf3H2}$  启动子长度的缩短, 其活性降低<sup>[33]</sup>。因此, 在未来日本落叶松启动子的克隆及应用研究仍然是重中之重。上述转化条件在启动子活性检测上的成功应用证明了该转化体系的高效性和稳定性。在此基础上发现  $CaMV35S$  活性低于  $P_{LaSCL6}$ , 这可能与  $P_{LaSCL6}$  是落叶松内源启动子有关, 也可能与  $P_{LaSCL6}$  较  $CaMV35S$  具有更多的顺式作用元件有关 (图3)。这一结果不仅验证了上述转化体系的有效性, 也为日本落叶松遗传转化提供了一个候选启动子。

## 4 结论

本研究分析了日本落叶松胚性愈伤组织瞬时转化过程中侵染液浓度、侵染时间及共培养时间对转化效率的影响。结果表明, 当  $OD_{600}=0.2$  的侵染液侵染 5 min, 共培养 72 h 时,  $GUS$  的表达量最高,  $\Delta C_T$  值为  $-2.2742$ ; 当  $OD_{600}=0.05$  的侵染液侵染 5 min, 共培养 72 h 时,  $GUS$  酶活性最高, 为  $25.7286 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 。综合考虑  $GUS$  的表达量和酶活性, 当  $OD_{600}=0.05$  的侵染液侵染 5 min, 共培养 24 h 时转化效率较高, 这一条件可以用来进行日本落叶松胚性愈伤组织的高效转化。研究结果优化了日本落叶松瞬时遗传转化体系, 不仅为日本落叶松的基因功能研究提供了技术支持, 也为其它针叶树遗传转化体系的建立和完善提供了参考。

## 参考文献:

- [1] KRENEK P, SAMAJOVA O, LUPTOVCIK I, et al. Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications[J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(6): 1024-1042.
- [2] MCCULLEN C A, BINNS A N. *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2006, 22: 101-127.
- [3] BHASKAR P B, VENKATESHWARAN M, WU L, et al. *Agrobacterium*-mediated transient gene expression and silencing: a rapid tool for functional gene assay in potato[J]. PLoS ONE, 2009, 4(6): e5812.
- [4] WANG L, CHEN W, LIU Y, et al. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system and its utilization in RNAi based gene silencing of rose (*Rosa hybrida*) petals[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2014, 22(2): 133-140.
- [5] MARION J, BACH L, BELLEC Y, et al. Systematic analysis of protein subcellular localization and interaction using high-throughput transient transformation of *Arabidopsis* seedlings[J]. The Plant Journal, 2008, 56(1): 169-179.
- [6] LI J F, PARK E, VON ARNIM A G, et al. The FAST technique: a simplified *Agrobacterium*-based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of *Arabidopsis* and other plant species[J]. Plant Methods, 2009, 5: 6.
- [7] XIA P, HU W, LIANG T, et al. An attempt to establish an *Agrobacterium*-mediated transient expression system in medicinal plants[J]. Protoplasma, 2020, 257(6): 1497-1505.
- [8] BOIVIN E B, LEPAGE E, MATTON D P, et al. Transient expression of antibodies in suspension plant cell suspension cultures is enhanced when co-transformed with the tomato bushy stunt virus p19 viral suppressor of gene silencing[J]. Biotechnology Progress, 2010, 26(6): 1534-1543.
- [9] 魏文桃, 张千悦, 吴季, 等. 杉木愈伤组织的高效诱导和瞬时转化体系的建立[J]. 分子植物育种, 2023, 21(6): 2007-2017.
- [10] SHEN J B, FU J X, MA J, et al. Isolation, culture, and transient transformation of plant protoplasts[J]. Current Protocols in Cell Biology, 2014, 63(1): 2.8.1-2.8.17.
- [11] 赵小慧, 郁凯, 刘冲, 等. 玉米叶片原生质体瞬时转化体系的优化[J]. 大麦与谷类科学, 2022, 39(6): 6-10.
- [12] 李刚, 宋平丽, 王翔, 等. 农杆菌介导的杜梨叶片瞬时转化方法的建立[J]. 果树学报, 2021, 38(11): 2006-2013.
- [13] HELLWIG S, DROSSARD J, TWYMAN R M, et al. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins[J]. Nature Biotechnology, 2004, 22: 1415-1422.
- [14] 吴英杰, 姜波, 张岩. 农杆菌介导的烟草瞬时表达试验条件优化[J]. 东北林业大学学报, 2010, 38(9): 110-112.
- [15] WU H Y, LIU K H, WANG Y C, et al. AGROBEST: an efficient *Agrobacterium*-mediated transient expression method for versatile gene function analyses in *Arabidopsis* seedlings[J]. Plant Methods, 2014, 10: 9.
- [16] SUN C, XIE Y H, LI Z, et al. The *Larix kaempferi* genome reveals new insights into wood properties[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2022, 64(7): 1364-1373.
- [17] LI W F, YANG W H, ZHANG S G, et al. Transcriptome analysis provides insights into wood formation during larch tree aging[J]. Tree Genetics and Genomes, 2017, 13: 19.
- [18] ZHANG Y, ZHANG S G, HAN S Y, et al. Transcriptome profiling and in silico analysis of somatic embryos in Japanese larch (*Larix leptolepis*) [J]. Plant Cell Reports, 2012, 31(9): 1637-1657.
- [19] HE S E, XIE Y H, SUN X M, et al. Comparative transcriptome analyses reveal candidate genes regulating wood quality in Japanese larch (*Larix kaempferi*) [J]. Journal of Forestry Research, 2020, 31(1): 65-73.
- [20] ROSSI L, ESCUDERO J, HOHN B, et al. Efficient and sensitive assay for T-DNA-dependent transient gene expression[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1993, 11(3): 220-229.
- [21] KANG Y H, LI W F, ZHANG L F, et al. Over-expression of the cell-cycle gene *LaCDKB1*; 2 promotes cell proliferation and the

formation of normal cotyledonary embryos during *Larix kaempferi* somatic embryogenesis[J]. *Genes*, 2021, 12(9): 1435.

- [22] DANG S F, ZHANG L F, HAN S Y, *et al.* *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Larix kaempferi* (Lamb.) Carr. embryogenic cell suspension cultures and expression analysis of exogenous genes[J]. *Forests*, 2022, 13(9): 1436.
- [23] LI Z X, LI S G, ZHANG L F, *et al.* Over-expression of miR166a inhibits cotyledon formation in somatic embryos and promotes lateral root development in seedlings of *Larix leptolepis*[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2016, 127(2): 461-473.
- [24] 宋 跃, 甄 成, 张含国, 等. 长白落叶松胚性愈伤组织诱导及体细胞胚胎发生[J]. *林业科学*, 2016, 52(10): 45-54.
- [25] LI W F, ZHANG S G, HAN S Y, *et al.* The post-transcriptional regulation of LaSCL6 by miR171 during maintenance of embryogenic potential in *Larix kaempferi* (Lamb.) Carr[J]. *Tree Genetics and Genomes*, 2014, 10(1): 223-229.
- [26] 王 飞, 邢新生, 马有志, 等. 根瘤农杆菌介导D32基因转化烟草的条件研究[J]. *西北植物学报*, 2009, 29(6): 1104-1110.
- [27] 彭绿春, 周 微, 汪玲敏, 等. 基于GUS基因瞬时表达优化云南杜

鹃(*Rhododendron yunnanense* Franch.)遗传转化方法[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2016, 31(6): 1045-1051.

- [28] 王关林, 方 宏. 植物基因工程[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2002: 344-346.
- [29] 余智莹, 张 平, 徐志胜, 等. 根瘤农杆菌介导的“魏可”葡萄遗传转化体系的优化[J]. *果树学报*, 2012, 29(3): 343-349 + 524.
- [30] 郝贵霞, 朱 祯, 朱之梯. 毛白杨遗传转化系统优化的研究[J]. *植物学报*, 1999, 41(9): 936-940.
- [31] 李濯雪, 陈信波. 植物诱导型启动子及相关顺式作用元件研究进展[J]. *生物技术通报*, 2015, 31(10): 8-15.
- [32] ZOU X P, SONG E L, PENG A H, *et al.* Activation of three pathogen-inducible promoters in transgenic citrus (*Citrus sinensis* Osbeck) after *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* infection and wounding[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2014, 117(1): 85-98.
- [33] LI C, JIANG W T, JIANG X N, *et al.* Cloning and functional analysis of the *PLkF3H2* promoter in *Larix kaempferi*[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2023, 154(2): 481-491.

## Optimization and Application of Transient Transformation System of *Larix kaempferi*

XING Jun-xia<sup>1,2</sup>, ZANG Qiao-lu<sup>2,3</sup>, YE Zha-long<sup>2</sup>, ZHANG Chen-yi<sup>1,2</sup>, CHENG Dong-xia<sup>2</sup>,  
QI Li-wang<sup>2</sup>, YANG Ling<sup>1</sup>, LI Wan-feng<sup>2</sup>

- (1. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China;  
2. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation of the National Forestry and Grassland Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China;  
3. Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China )

**Abstract:** [Objective] To optimize an *Agrobacterium*-mediated transient transformation system with *Larix kaempferi* embryogenic callus. [Methods] The embryogenic callus of *Larix kaempferi* cultured in liquid medium for 7 days was used as the receptor material, and pCAMBIA1305.1 vector carrying  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*) was used for transient transformation. Based on the expression level and enzyme activity of *GUS*, the optimal infection solution concentration, infection time and co-culture time were screened. The activity of *Larix kaempferi scarecrow-like 6* (*LaSCL6*) promoter was analyzed with the screened transformation system. [Results] After transient transformation, the expression of *GUS* was obvious. When the concentration of infection solution was 0.2, the infection lasted for 5 minutes, and the co-culture time was 72 hours, *GUS* expression was the highest, with -2.274 2. When the concentration of infection solution was 0.05, the infection lasted for 5 minutes, and the co-culture time was 72 hours, *GUS* enzyme activity was the highest with 25.728 6 U/L. The activity of *LaSCL6* promoter was 1.55 times higher than that of *CaMV35S* promoter [Conclusion] In view of the expression level and enzyme activity of *GUS*, transformation efficiency is high when the concentration of infection solution is 0.05, the infection time is 5 minutes, and the co-culture time is 24 hours, which can be used for efficient transformation of embryogenic callus of *Larix kaempferi*.

**Keywords:** Larch; transient transformation; embryogenic callus; *GUS*; promoter