

尾巨桉遗传转化体系研究

刘国花¹, 刘奕清^{1,2}, 阳佳位³, 胡 凯¹

(1. 重庆文理学院 生命科学与技术学院, 重庆 永川 402168; 2. 重庆高校园林花卉工程研究中心, 重庆 永川 402168; 3. 西南大学, 重庆 400715)

摘 要:以尾巨桉(*Eucalyptus urophylla* × *E. grandis*) 32-29 无性系为研究对象, 研究了不同农杆菌种类以及侵染时间因素对尾巨桉茎段和愈伤组织遗传转化的影响, 探讨了适宜尾巨桉转化的卡那霉素和抑菌抗生素使用浓度。结果表明, 茎段外植体较愈伤组织转化率高, 侵染时间为 4 min。LBA4404 转化效率高于 EHA105, GUS 检测转化率分别为 80.7%、63.5%。适宜生长在 50 mg · L⁻¹ 的卡那霉素、400 mg · L⁻¹ 头孢唑林钠的筛选培养基上。

关键词:尾巨桉; 茎段; 愈伤组织; 遗传转化; GUS 基因

中图分类号: S792.390.4

文献标志码: A

文章编号: 1001-7461(2010)05-0064-04

Establishment of Genetic Transformation of *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis*

LIU Guo-hua¹, LIU Yi-qing^{1,2}, YANG Jia-wei³, HU Kai¹

(1. Department of Life Science and Technology, Chongqing University of Arts and Sciences, Yongchuan, Chongqing 402168, China;

2. Garden and Flower Engineering Research Center of Chongqing Colleges, Yongchuan, Chongqing 402168, China;

3. Southwest University, Chongqing 402168, China)

Abstract: Taking clone 32-29 of *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* as materials, stem segments and callus as explants for transformation, factors affecting the transformation frequency, such as the kind of *Agrobacterium* and infection time were investigated. The concentrations of kanamycin, and antibiotics to inhibit the growth of *Agrobacterium*, which were suitable to transform *E. urophylla* × *E. grandis* were discussed. The results indicated that the efficiency of transformation was higher in stem segments than callus, higher in LBA4404 than EHA105. The suitable infection time was 4 min, and the conversion rates were 80.7% and 63.5% respectively. The media for better growth contained kanamycin 50 mg · L⁻¹ and cefazolin sodium 400 mg · L⁻¹.

Key words: *E. urophylla* × *E. grandis*; stem segment; callus; genetic transformation; GUS gene

桉树是世界上三大速生树种之一, 也是我国南方热带、亚热带地区最为重要的速生丰产林造林树种。尾巨桉(*Eucalyptus urophylla* × *E. grandis*) 是尾叶桉(*E. urophylla*) 与巨桉(*E. grandis*) 的杂交种, 具有明显的杂种优势, 其树干通直、均匀, 具有适应性广、耐寒性强、速生丰产等优点。尾巨桉营造的人工林面积已占全国桉树人工林面积 40% 以上, 成为栽培面积最大的桉树无性系^[1]。

由于常规育种方法的局限性, 给桉树进一步改良带来一定的困难。随着植物生物技术的发展, 国内外已将植物基因工程和常规育种结合起来进行桉

树育种的研究, 以提高桉树的抗虫、抗病、抗寒能力以及桉树材性、纤维含量等品质性状的改良。国内的桉树转基因研究起步较晚, 报道很少^[2]。本研究以尾巨桉无性系 32-29 为研究对象, 对影响根癌农杆菌转化的一些因素进行了研究, 初步建立了较为稳定的遗传转化系统, 为进一步利用基因工程技术改良桉树打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料 供试品种尾巨桉无性系 32-29 由重

收稿日期: 2009-09-13 修回日期: 2009-11-01

基金项目: 国家“863”项目(2006AA100109)。

作者简介: 刘国花, 女, 副教授, 主要从事植物生物技术研究。

庆高校园林花卉工程研究中心提供。

1.1.2 菌株及转化载体 农杆菌菌株为 EHA105、LBA4404, 转化载体为 pCambia2301, 该质粒携带有 NPT II (卡那霉素抗性基因) 和 GUS (编码 β -葡萄糖醛酸苷酶基因), 均由中国农业科学院柑橘研究所提供。

1.1.3 外植体的接种与培养 将外植体接种在改良 MS (KH_2PO_4 335 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NH_4NO_3 365 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 480 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) + 6-BA 0.4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA 0.25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 琼脂粉 4 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 5.8) ($0.5 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-3}$, 121 $^\circ\text{C}$, 高压灭菌 20 min) 的培养基, 于 26~28 $^\circ\text{C}$, 1500 lx 光强, 每天光照 10 h 条件下培养。

1.2 方法

1.2.1 转化受体的获得 选取长势好的生长一致的尾巨桉无性系 32-29 幼嫩愈伤组织作为遗传转化受体; 选取株高 2~3 cm 生长势好的尾巨桉无性系 32-29 组培苗, 取其嫩茎, 去除顶芽及腋芽, 切成 0.5 cm 长的茎段, 作为遗传转化受体。

1.2.2 农杆菌的培养 挑取农杆菌 EHA105 和 LBA4404 单菌落分别于含有 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素、25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 利福平和 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素、50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 利福平的 LB 培养基中, 28 $^\circ\text{C}$ 振荡培养至农杆菌浓度为 $\text{OD}_{600} = 0.4$ 时加入 $\text{AS100} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (乙酰丁香酮)。

1.2.3 转化方法 将愈伤组织和茎段在制备好的农杆菌菌液中轻摇 0、4、8 min, 于 MS 培养基上共培养 2 d 后, 转至含卡那霉素以及头孢唑林钠的分化培养基上筛选并抑菌。每 3 d 转接 1 次, 30 d 左右可获再生芽。

1.2.4 卡那霉素(Km)以及抑菌抗生素头孢唑林钠(Cef)抗性梯度试验 将桉树茎段分别接种于含 0、25、50、75、100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素的分化培养基上, 3 d 更换 1 次培养基, 30 d 后观察统计不定芽分化率, 每处理 10 块外植体, 重复 3 次, 取其平均数。将侵染、共培养后的茎段, 分别接种于含 100、200、300、400、500 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 头孢唑林钠的分化培养基上, 3 d 更换 1 次培养基, 选择有效抑制农杆菌的最低头孢唑林钠浓度。每处理 10 块外植体, 重复 3 次, 取其平均数。

1.2.5 GUS 染色分析 GUS 基因表达的组织化学法检测参照 Rueb^[3] 的方法进行。

1.2.6 统计分析 外植体分化率/% = 分化外植体数/外植体总数 $\times 100$ 。

GUS 表达率/% = 染成蓝色的外植体数/GUS 染色分析的总外植体数 $\times 100$ 。

2 结果与分析

2.1 不同农杆菌侵染对外植体转化率的影响

影响农杆菌介导的植物遗传转化效率的因素很多, 其中菌种就是一个相当重要的影响因素。以桉树茎段为外植体, 分别用含有植物表达载体 pCambia2301 (内含 gus 基因) 的章鱼碱型 LBA4404 和琥珀碱型 EHA105 的菌液对其侵染, 侵染外植体个数为每菌种 10 个, 重复 3 次, GUS 染色后观察统计 GUS 表达率, 取平均值作为各菌种对其转化率的指标。由图 1 可知, 2 个菌种中, LBA4404 对外植体的侵染能力最强, GUS 表达率达 80.7%; EHA105 表达率仅为 63.5%。为此选用 LBA4404 作为后续试验侵染桉树外植体的农杆菌材料。图 2 为桉树再生茎段的 GUS 染色并脱色照片。

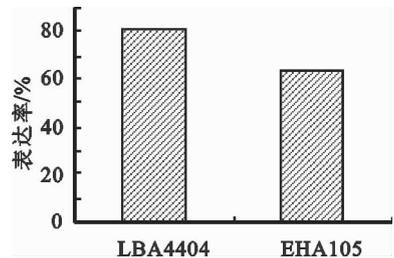


图 1 农杆菌菌种对 GUS 表达率的影响

Fig. 1 Effects of the variety of *Agrobacterium* on GUS expression



图 2 再生茎段的 GUS 染色图

Fig. 2 GUS dyeing on regenerated stem segment

2.2 浸染时间对外植体分化率及 GUS 表达率的影响

用 $\text{OD}_{600 \text{ nm}} = 0.4$ 的农杆菌菌液对外植体进行不同侵染时间的比较, 由表 1 可知, 愈伤组织和茎段在相同的侵染时间里污染率差异较大。由于愈伤组织表面粗糙, 凹凸不平吸附农杆菌较多, 而且清洗较为困难, 故愈伤组织农杆菌污染率较高, GUS 表达率较茎段低。没有经过农杆菌侵染的愈伤组织分化情况较好 (图 3), 呈淡绿色, 表面湿润有突起。侵染 4 min 和 8 min 分化率、污染率以及 GUS 表达率均有差异。侵染 8 min 时, GUS 表达率下降, 而且会导致外植体受伤过度。因此本试验选取 4 min 作为桉树遗传转化合适的侵染时间。

表 1 浸染时间对外植体分化率及 GUS 表达率的影响

Table 1 Effects of inoculation time on differentiation rate and GUS transient expression

外植体	侵染时间/min	外植体总数/个	污染率/%	分化率/%	GUS 表达率/%
愈伤组织	0	30	0.0	89.5	0.0
	4	30	91.4	8.5	3.2
	8	30	94.3	5.6	1.1
茎段	0	30	0.0	96.3	0.0
	4	30	13.1	75.8	16.5
	8	30	23.4	68.6	12.7

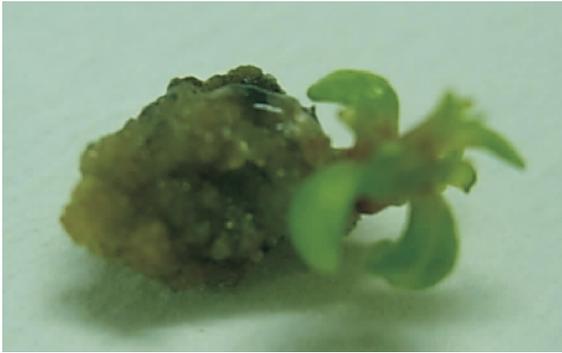


图 3 愈伤分化苗

Fig. 3 Differentiated seedlings from callus

2.3 卡那霉素对桉树茎段分化的影响

从表 2 可看出,不定芽分化培养基中不含卡那霉素时茎段分化率为: EHA105 95.6%, LBA4404 96.4%。含 25 mg · L⁻¹卡那霉素时,分化率受到了一定的抑制;培养基中含 50 mg · L⁻¹卡那霉素时,桉树茎段还能保持相当的分化率,但更大浓度的卡那霉素会导致茎段萎蔫或褐变死亡。因此卡那霉素浓度为 50 mg · L⁻¹为茎段分化的选择压。

2.4 头孢唑林钠抑制农杆菌试验

在进行基因转化时,被农杆菌侵染携带目的基因的外植体转接入分化培养基时,要在培养基中加入抑菌抗生素来抑制农杆菌的滋生,以保证外植体的正常生长与分化。但抗生素均不利于外植体再

生,从图 4 可看出,加抗生素植株长势明显弱于不加抗生素植株,且抗生素影响外植体分化。因此应尽量减小抗生素的影响,选择有效杀菌的最低头孢唑林钠浓度。从表 3 可以看出,头孢唑林钠浓度为 400 mg · L⁻¹较为适宜。

表 2 卡那霉素对茎段不定芽分化的影响

Table 2 Effects of Kanamycin concentration on shoot regeneration

Km 浓度/ (mg · L ⁻¹)	EHA105		LBA4404	
	接种数/个	分化率/%	接种数/个	分化率/%
0	30	95.6	30	96.4
25	30	75.4	30	77.5
50	30	36.3	30	41.5
75	30	8.8	30	12.1
100	30	0	30	0



左:农杆菌侵染加抗生素植株 中:无农杆菌侵染加抗生素植株 右:无农杆菌侵染不加抗生素植株

图 4 头孢唑林钠对外植体分化影响

Fig. 4 Effect of cefazolin sodium on differentiation of explant

表 3 不同头孢唑林钠浓度抑制农杆菌的效果

Table 3 Results of different cefazolin sodium concentration inhibiting growth of *Agrobacterium*

Cef 浓度/ (mg · L ⁻¹)	EHA105			LBA4404		
	污染率/%	分化率/%	抑菌状况	污染率/%	分化率/%	抑菌状况
100	100.0	5.3	2 d 后茎段周围有农杆菌出现	100.0	11.8	2 d 后茎段周围有农杆菌出现
200	82.2	20.6	3 d 后,多数茎段周围有农杆菌出现	78.7	23.7	3 d 后,多数茎段周围有农杆菌出现
300	33.4	17.3	4 d 后,少数茎段周围有农杆菌出现	36.2	18.3	5 d 后,少数茎段周围有农杆菌出现
400	0.0	24.5	未见有农杆菌	0.0	26.6	未见有农杆菌
500	0.0	10.7	未见有农杆菌	0.0	11.2	未见有农杆菌

3 结论与讨论

高效的再生及转化体系是外源目的基因导入受体植株的前提和基础^[4-5]。研究表明桉树可以直接通过愈伤组织或茎为外植体建立遗传转化体系,但以茎段最佳。孔华等以桉树叶片为外植体,筛选出了适合遗传转化的再生体系,建立起一套较为稳定的离体再生和遗传转化体系。有研究认为通过间接分化途径即茎段诱导出愈伤组织,愈伤组织再分化出不定芽,能够保持较高的分化率和生长势,符合基因转化受体系统的要求。不同的品种间,其转化受体以及转化能力存在一定的差异^[6-7],因此,每一桉树品种都需建立其最佳的遗传转化体系。

在桉树转基因研究中,农杆菌介导法是相对有效的一种转化方法,也是应用比较成功的一种转化方法^[8]。赤桉的农杆菌转化已经作为一种转基因模式进行木本植物转基因研究^[9]。侵染菌种的选择在不同的品种间也有差异,孔华^[10]等研究了3种农杆菌 LBA4404、EHA105、GV3101 侵染桉树叶盘,统计其愈伤组织 GUS 染色率,发现 EHA105 对外植体的侵染能力最强(83.3%)。本研究则发现尾巨桉 32-29 LBA4404 较 EHA105 对外植体的侵染能力强。这可能与侵染菌种的生长周期以及桉树品种之间的差异有关。

除了侵染菌种的选择外,侵染时间也至关重要,赖家业^[2]等研究报道 2~4 min 为桉树茎段合适的遗传转化侵染时间,侵染时间超过 7 min 后,会导致外植体受伤过度。本研究设置了 0、4 min 和 8 min

3个梯度,来检测适合尾巨桉 32-29 的侵染时间,结果同赖家业等的研究报道一致。

本研究选择愈伤组织和茎段作为遗传转化的受体,其中茎段侵染后不诱导愈伤组织而直接分化不定芽,这样在获得再生苗以及检测周期上大大缩短了时间,但同时也存在转化的再生芽有嵌合体现象,因此此研究有待进一步深入。

致谢:在此特别感谢重庆高校园林花卉工程研究中心刘奕清教授以及中国农业科学院柑橘研究所钟广炎研究员给予的支持和帮助。

参考文献:

- [1] 韦大器,时群.尾巨桉愈伤组织诱导与植株再生研究[J].桉树科技,2008,25(1):19-22.
- [2] 赖家业,石海明,刘凯,等.尾巨桉遗传转化系统建立的研究[J].四川大学学报:自然科学版,2007,44(2):415-419.
- [3] RuUEB S, HENSGENS L A M. Improved histochemical staining for β -D-glucuronidase activity in monocotyledonous plants [J]. Rice Genet Newsl,1989,6:168-169.
- [4] 吴乃虎.基因工程原理[M].北京:科学出版社,1997.
- [5] 王关林,方宏筠.植物基因工程原理与技术[M].北京:科学出版社,1998.
- [6] 王笑春,李峰,蒋湘宁.桉树组织培养与再生系统建立研究[J].河北建筑科技学院学报,2006,23(2):71-74.
- [7] 谢耀坚.桉树组织培养研究进展[J].世界林业研究,2000,13(6):14-19.
- [8] 范春节,曾炳山,裘珍飞,等.桉树转基因研究进展[J].浙江林业科技,2008,28(2):65-72.
- [9] HEN Z Z, HO C K, AHN I S, *et al.* Eucalyptus [J]. Methods Mol. Biol., 2006, 344: 125-134.
- [10] 孔华,郭安平,郭运玲,等.尾叶桉 U6 遗传转化再生体系的建立[J].热带作物学报,2008,29(4):424-429.