

温度和 pH 对农杆菌介导转化橡胶树悬浮细胞的影响

周权男, 谢黎黎, 黄天带, 华玉伟, 孙爱花, 黄华孙*

(中国热带农业科学院 橡胶研究所, 国家橡胶树育种中心, 海南 儋州 571737)

摘要: 橡胶树胚性细胞悬浮培养系及其植株再生体系的建立可为橡胶树遗传转化研究提供良好的材料。以橡胶树品种热研 8-79 悬浮培养的胚性细胞为受体, 研究了共培养基 pH 值和共培养温度对农杆菌介导的橡胶树胚性悬浮细胞遗传转化的影响。结果表明: pH 5.2~5.4、20℃~22℃ 共培养适宜于农杆菌介导的橡胶树胚性悬浮细胞的遗传转化。

关键词: 橡胶树; 胚性细胞; 悬浮培养; 遗传转化; 温度; pH

中图分类号: S722.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-7461(2013)03-0131-03

Effects of Co-culture Medium pH and Temperature on *Agrobacterium*-mediated Transformation of *Hevea brasiliensis* Embryogenic Cell Suspension

ZHOU Quan-nan, XIE Li-li, HUANG Tian-dai, HUA Yu-wei, SUN Ai-hua, HUANG Hua-sun*

(Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences; State Center for Rubber Breeding, Danzhou, Hainan 571737, China)

Abstract: The establishment of embryogenic cell suspension culture system and its regeneration system of *Hevea brasiliensis* can provide sufficient and fine materials for studying genetic transformation. In this study, embryogenic suspension cells of rubber tree clone Reyan 8-79 were used as recipients. Factors influencing genetic transformation such as pH value of co-culture medium and temperature were studied. The optimal pH and temperature were 5.2 to 5.4, and 20 to 22℃.

Key words: *Hevea brasiliensis*; embryogenic cell; suspension culture; genetic transformation; temperature; pH

橡胶树(*Hevea brasiliensis*)又称巴西橡胶树, 大戟科(Euphorbiaceae)橡胶树属(*Hevea*)多年生异花授粉乔木。目前巴西橡胶树的品种选育主要是采用常规育种, 由于橡胶树生活周期长, 常规育种周期一般在 30 a 左右。随着组织培养技术和转基因技术的发展, 建立高效的组织培养体系和遗传转化体系, 有望将转基因技术应用到橡胶树育种上。到目前为止, 巴西橡胶树组织培养技术已有部分无性系实现了体外体胚发生, 橡胶树花药和内珠被组织培养技术体系已经基本建立^[1-2], 且少数品系已经实现了遗传转化, 获得转化植株^[3-9]。在其他木本植物中

如宁夏枸杞^[10]、毛白杨^[11]进行根癌农杆菌介导的遗传转化研究也都有成功的例子, 但橡胶树遗传转化很大程度受限于转化受体材料的再生能力, 直接用受体材料转化效率不高, 而胚性悬浮细胞具有优良的再生能力, 能获得大量均一再生植株, 在小麦^[12]、蝴蝶兰^[13]、甘薯^[14]中已有报道成功转化胚性悬浮。本研究在橡胶树品种热研 8-79 胚性细胞悬浮系植株再生体系已基本建立的基础上, 以胚性悬浮细胞为受体, 研究共培养过程中 pH 值及温度对遗传转化的影响, 为建立高效的农杆菌介导转化体系摸索适宜的转化条件。

收稿日期: 2012-10-26 修回日期: 2013-01-07

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费中国热带农业科学院橡胶研究所基本科研业务费专项(1630022011005); 现代农业产业技术体系建设专项(NYCYTX-34)。

作者简介: 周权男, 男, 助理研究员, 硕士, 研究方向: 植物组织培养。E-mail: zhouquannan2004@163.com

* 通信作者: 黄华孙, 男, 研究员, 研究方向: 植物遗传育种。E-mail: xjshhs@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 热研 8-79 花药来源胚性悬浮细胞为转化受体材料,热研 8-79 单核靠边期花蕾取自国家橡胶树种质资源圃(海南儋州)。

转化所用根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株为 EHA105, 内含 pCambia2301-AtCBF1 质粒(由中国热带农业科学院橡胶所程汉老师构建), 其 T-DNA 区携有 CaMV35S 启动子启动的 β -葡萄糖苷酸酶基因 (*uidA*)、新霉素磷酸转移酶基因 (*npt-II*) 和拟南芥抗寒相关 *AtCBF1* 基因。

1.2 组织细胞培养条件

细胞悬浮培养基为改良的 MS 培养基(其中 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 500 $mg \cdot L^{-1}$, KH_2PO_4 400 $mg \cdot L^{-1}$, $CaCl_2$ 250 $mg \cdot L^{-1}$, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 35 $mg \cdot L^{-1}$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.2 $mg \cdot L^{-1}$), 添加 1.0 $mg \cdot L^{-1}$ 2, 4-D, 0.5 $mg \cdot L^{-1}$ NAA, 1.5 $mg \cdot L^{-1}$ KT, 0.1 $g \cdot L^{-1}$ 肌醇, 5% (v/v) 椰子水, 30 $g \cdot L^{-1}$ 蔗糖, pH 5.8; 均采用暗培养, (27±1)℃。农杆菌重悬培养基为改良的 MS 添加 30 $g \cdot L^{-1}$ 蔗糖, 10 $g \cdot L^{-1}$ 葡萄糖, 100 $mg \cdot L^{-1}$ AS。共培养基为固体悬浮培养基添加 70 $g \cdot L^{-1}$ 蔗糖, 100 $mg \cdot L^{-1}$ AS。

1.3 方法

1.3.1 根癌农杆菌的培养 取保存的根癌农杆菌 EHA105(含质粒 pCambia2301-AtCBF1) 菌种在含有 50 $mg \cdot L^{-1}$ Km、50 $mg \cdot L^{-1}$ Rif 的 YEB 固体培养基上划线, 28℃ 培养 72 h, 挑取单菌落置于添加有相同抗生素的 YEB 液体培养基中, 28℃、220 $r \cdot min^{-1}$ 条件下振荡培养 36 h 至对数生长期, 然后用无菌的离心管室温 4 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 10 min 收集菌体, 收集的菌体用 100 mL 农杆菌重悬培养基重悬, 在相同条件下振荡培养 4~6 h 后用新鲜的农杆菌重悬培养基稀释至适宜浓度备用。

1.3.2 共培养基 pH 值对转化效率的影响 将培养好的农杆菌用新鲜的农杆菌重悬培养基稀释到 $OD_{600}=0.3\sim0.4$, 将 5 g 橡胶树胚性悬浮细胞置于 50 mL 农杆菌悬浮液中浸泡 3 min 后用无菌枪头吸除菌液, 并将悬浮细胞置于无菌滤纸上吸干残留菌液后分成直径约 2~3 mm 的细胞团接种于不同 pH 值的固体共培养基上, 每个培养皿接种 10 个细胞团, 22℃ 共培养 4 d 后, 随机挑取部分悬浮细胞进行 GUS 组织化学染色, 观察 GUS 基因瞬时表达情况并计算 GUS 基因瞬时表达频率。共培养基 pH 值设计 4.8、5.0、5.2、5.4、5.6 与 5.8 共 6 个水

平处理。

1.3.3 共培养温度对转化效率的影响 农杆菌侵染操作同 1.3.2, 所用共培养基 pH 5.2, 橡胶树胚性悬浮细胞接种后分别在 18、20、22、25、28℃ 条件下共培养 4 d, 随机挑取部分细胞进行 GUS 组织化学染色及 FDA 法细胞活性测定, 观察 GUS 基因瞬时表达情况并计算 GUS 基因瞬时表达频率及细胞存活率。

1.3.4 GUS 组织化学染色 随机取部分经共培养的胚性悬浮细胞团置于 1.5 mL 离心管中, 称取 1.5 mL 离心管加入胚性悬浮细胞前后重量, 计算出所取胚性悬浮细胞重量 W(g), 加入 x-gluc 检测液至胚性悬浮细胞完全被浸没, 室温过夜。在显微镜下观察 GUS 组织化学染色情况, 并统计蓝斑数 n, 每克细胞 GUS 基因瞬时表达频率 N 由公式 $N=n/W$ 计算得出。GUS 组织化学染色 x-gluc 检测液配方为: 100 $mmol \cdot L^{-1}$ $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 100 $mmol \cdot L^{-1}$ $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 10 $mmol \cdot L^{-1}$ Na_2EDTA , 1 $mmol \cdot L^{-1}$ $K_3[Fe(CN)_6]$, 1 $mmol \cdot L^{-1}$ $K_4[Fe(CN)_6]$, 0.5% (v/v) Triton X-100, 20% (v/v) 甲醇, 0.5 $mg \cdot mL^{-1}$ X-Gluc。

1.3.5 FDA 细胞活性测定 称取 0.01 g 二乙酸钠荧光素(FDA)溶于 2 mL 丙酮作为 FDA 储存液, 取 100 μL FDA 储存液用 ddH₂O 稀释到 5 mL, 即为工作液。挑取少量经共培养的胚性悬浮细胞置于载玻片上, 滴 1~2 滴 FDA 工作液, 在荧光显微镜下(最大激发波长 495 nm)观察细胞活性情况, 细胞壁呈黄绿色荧光的为活细胞, 没有荧光的为已死亡的细胞。以一个显微镜视眼为计数范围, 统计该视眼下活细胞与死细胞数目。细胞存活率(%)由公式: 细胞存活率(%)=活细胞个数/(活细胞个数+死细胞个数)×100, 每次试验观察 3 个视眼, 结果取平均。

1.3.6 试验数据统计与分析 所有试验设计均重复 3 次, 结果取平均值, 试验结果用 SAS 9.0 软件进行差异显著性分析, Duncan 检测, $p=0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 共培养基 pH 对农杆菌介导转化橡胶树胚性细胞悬浮培养的影响

共培养基 pH 5.2 时 GUS 基因瞬时表达频率达到最高, pH 值高于 5.6 时 GUS 基因瞬时表达频率明显下降, 而 pH 值低于 5.0 时, 转化效率下降(图1)。农杆菌介导转化橡胶树胚性细胞悬浮培养共培养基 pH 值以 5.2~5.4 为宜。

2.2 共培养温度对农杆菌介导转化橡胶树胚性细胞悬浮培养的影响

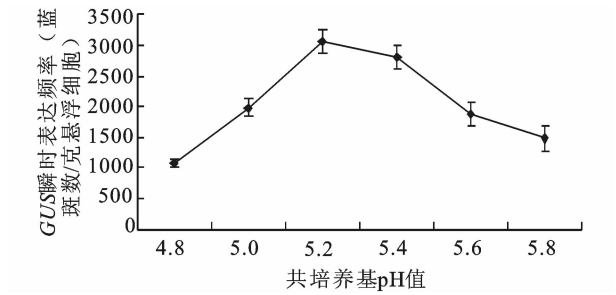


图 1 共培养基 pH 对橡胶树品种热研 8-79 胚性悬浮细胞 GUS 瞬时表达频率的影响

Fig. 1 Effects of pH of medium for co-culture on transient expression frequency of GUS gene of embryogenic cell suspension of *H. brasiliensis* clone Reyan 8-79

橡胶树悬浮培养胚性细胞农杆菌侵染后在 18~28℃ 范围内共培养 4 d,结果表明较低温度(20℃, 22℃)时 GUS 基因瞬时表达频率高,且胚性悬浮细胞存活率也较高,达 60% 以上;提高共培养温度至 25℃,胚性悬浮细胞存活率下降到 50% 左右,同时 GUS 基因瞬时表达频率也下降;当共培养温度提高到 28℃,胚性悬浮细胞仅有 15.87% 存活,GUS 基因瞬时表达频率也为所有处理最低(表 1)。因此,20~22℃ 的共培养温度有利于农杆菌介导橡胶树胚性悬浮细胞转化。

表 1 共培养温度对橡胶树品种热研 8-79 胚性悬浮细胞 GUS 瞬时表达频率和存活率的影响

Table 1 Effects of co-culture temperature on transient expression frequency of GUS gene and survival rate of embryogenic cell suspension of *H. brasiliensis* clone Reyan 8-79

共培养温度/℃	GUS 基因瞬时表达频率 (蓝斑数/克细胞)	悬浮细胞存活率/%
18	917±138c	39.89±0.61d
20	3 013±171a	61.42±0.59b
22	3 158±305a	66.66±2.20a
25	2 263±164b	49.11±0.51c
28	373±530d	15.87±1.28e

注:百分数经反正弦平方根转换后应用 SAS 9.0 进行差异显著性分析;不同字母表示差异性显著, $p=0.01$ 。

3 结论与讨论

农杆菌介导转化是一个自然存在的生物过程,影响农杆菌介导转化的因素很多,从农杆菌培养,外植体的选择到抗性外植体的筛选,研究者们不断在摸索、优化转化条件。本研究对共培养过程中 pH 和温度对农杆菌介导转化橡胶树悬浮培养胚性细胞的遗传转化影响很大,最适培养温度为 20~22℃,共培养基 pH 值以 5.2~5.4 左右为最佳。

共培养过程中农杆菌的增殖适度与转化有直接的关系,农杆菌生长状况与侵染能力相关。农杆菌生长状况不佳,转化效率低,过度增殖,易使外植体

毒害致死。温度和 pH 是控制农杆菌适度增殖的 2 个重要因素。G. Blanc^[7] 等在研究农杆菌介导转化橡胶树长期继代胚性愈伤组织时发现,将共培养温度从 27℃ 降至 20℃,能将共培养时间延长到 7 d,并能提高转化效率,黄天带^[15] 等研究表明 22℃ 为最佳的共培养温度。较低的共培养温度和培养基 pH 使农杆菌生长在一定程度上受到抑制,可以适当延长共培养时间。pH 对 Vir 区基因的活化也有着明显的影响,有报道在玉米遗传转化研究中,共培养基 pH 值在 5.4 左右效果最好^[16-17],一般来说含 AS 的培养基 pH 值为 5.0~5.6 时,Vir 区基因的诱导表达达到最高水平。通常农杆菌培养 pH 值在 7.2 左右,生长旺盛的农杆菌菌株 Vir 基因处于不活化状态,因此在转化时应适当调整培养基的 pH。

参考文献:

[1] 王泽云,曾宪松,陈伟琴,等. 用离体花药诱导巴西橡胶植株的研究[J]. 热带作物学报,1980,1(1):16-25.
WANG Z Y,ZENG X S,CHEN W Q, *et al.* Induction of rubber plantlets from anther of *Hevea brasiliensis* Mull. Arg *in vitro*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops,1980,1(1):16-25. (in Chinese)

[2] CARRON M P. Germination *in vitro* d'embryons immatures d'hevea[J]. Caoutch Plast,1981,612:93.

[3] AROKIARAJ P. Agrobacterium-mediated transformation of Hevea cells derived from *in vitro* and *in vivo* seeding cultures [J]. Journal of Natural Rubber Research,1991,6(1):551.

[4] AROKIARAJ P, YEANG H Y, CHEONG K F, *et al.* CaMV35S promoter directs β -glucuronidase expression in the laticiferous system of transgenic *Hevea brasiliensis* (rubber tree) [J]. Plant Cell Reports,1998,17:621-625.

[5] SOBHA S,SUSHAMAKUMARI S,THANSEEM I, *et al.* Genetic transformation of *Hevea brasiliensis* with the gene coding for superoxide dismutase with FMV 34S promoter[J]. Current Science,2003,85(12):1767-1773.

[6] MONTORO P,RATTANA W,PUJADE-RENAUD V, *et al.* Production of *Hevea brasiliensis* transgenic embryogenic callus lines by *Agrobacterium tumefaciens*: roles of calcium[J]. Plant Cell Reports,2003,21(11):1095-1102.

[7] BLANC G, BAPTISTE C, OLIVER G, *et al.* Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic calli and regeneration of *Hevea brasiliensis* Mull Arg. plants[J]. Plant Cell Reports,2006,24(12):724-733.

[8] LECLERCQ J,LARDET L,MARTIN F, *et al.* The green fluorescent protein as an efficient selection marker for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Hevea brasiliensis*(Müll. Arg)[J]. Plant Cell Reports,2010,29(5):513-522.

[9] 黄天带,李哲,孙爱花,等. 根癌农杆菌介导的橡胶树花药愈伤组织遗传体系的建立[J]. 作物学报,2010,36(10):1691-1697.
HUANG T D, LI Z, SUN A H, *et al.* Establishment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated anther calli transformation system in *Hevea brasiliensis*[J]. ACTA Agronomica Sinica,2010,36(10):1691-1697. (in Chinese)

种类、丰富的空间层次,丰富的季相变化和色彩以及植物景观的安全性是影响植物景观质量的主要因素。植物景观元素的动态变化(如季节变化)会影响评价体系的可行性^[16],可通过对滨水绿道进行重复性的调查来降低其影响。由于研究评价体系的检验样方数量较小,在今后的研究中还应用较多的样方对其进行验证,以使评价体系能够更科学合理。

参考文献:

[1] 安然,翁殊斐,陈华平,等.广州公园滨水植物景观特色探讨[J].西北林学院学报,2012,27(1):186-192.
AN R,WENG S F,CHEN H P,*et al.* Characteristics of water-front vegetation landscape in parks of Guangzhou[J]. Journal of Northwest Forestry University,2012,27(1):186-192. (in Chinese)

[2] 郭春华,李宏彬.滨水植物景观建设初探[J].中国园林,2005(6):59-62.
GUO C H,LI H B. Preliminary discussion of the landscape construction of waterfront plants[J]. Chinese Landscape Architecture,2005(6):59-62. (in Chinese)

[3] AHERN J. Greenways as a planning strategy[J]. Landscape and Urban Planning,1995,33(1-3):131-155.

[4] FÄBOS J G. Greenway planning in the United States;its origins and recent case studies[J]. Landscape and Urban Planning,2004,68(2-3):321-342.

[5] 谭少华,赵万民.绿道规划研究进展与展望[J].广东园林,2007(2):85-89.

[6] 徐新洲,薛建辉.基于 AHP—模糊综合评价的城市湿地公园植物景观美感评价[J].西北林学院学报,2012,27(2):213-216.
XU X Z,XUE J H. Aesthetic evaluation for plant landscape of wetland park based on AHP[J]. Journal of Northwest Forestry University,2008,27(2):213-216. (in Chinese)

[7] 翁殊斐,陈锡木,黄少伟.用 SBE 法进行广州市公园植物配置

研究[J].中国园林,2002(5):84-86.
WENG S F,CHEN X M,HUANG S W. The application of SBE in plant disposition of Guangzhou parks,Guangdong[J]. Chinese Landscape Architecture,2002(5):84-86. (in Chinese)

[8] 俞孔坚.自然风景质量评价研究—BIB-LCJ 审美评判测量法[J].北京林业大学学报,1988,10(2):1-11.
YU K J. Landscape preference;BIB-LCJ procedure and comparison of landscape preference among different groups[J]. Journal of Beijing Forestry University,1988,10(2):1-11.

[9] 刘颖,周春玲,安丽娟.青岛市居住区夏季植物景观评价[J].北方园艺,2011(5):136-140.

[10] 张哲,潘会堂.园林植物景观评价研究进展[J].浙江农林大学学报,2011,28(6):926-967.
ZHANG Z,PAN H T. Research on the evaluation of garden plant landscapes[J]. Journal of Zhejiang A&F University,2011,28(6):926-967. (in Chinese)

[11] 唐东芹,杨学君,许东新.园林植物景观评价方法及其应用[J].浙江农林大学学报,2001,18(4):394-397.

[12] 宁惠娟,邵峰,孙茜茜,等.基于 AHP 法的杭州花港观鱼公园植物景观评价[J].浙江农业学报,2011,23(4):717-724.

[13] 翁殊斐,柯峰,黎彩敏.用 AHP 法和 SBE 法研究广州公园植物景观单元[J].中国园林,2009(4):78-81.
WENG S F,KE F,LI C M. Application of AHP and SBE methods in the study of landscape plant composition in Guangzhou parks[J]. Chinese Landscape Architecture,2009(4):78-81. (in Chinese)

[14] 许树柏.层次分析法原理[M].天津:天津大学出版社,1998:51-59.

[15] 《运筹学》教材编写组.运筹学[M].北京:清华大学出版社,1990.

[16] AMIR S,GIDALIZON E. Expert based method for the evaluation of visual absorption capacity of the landscape[J]. Journal of Environmental Management,1990,30(3):251-163.

(上接第 133 页)

[10] 曲玲,曹有龙,侯玉霞,等.将 GNA 基因导入宁夏枸杞及其表达的研究[J].西北林学院学报,2007,22(3):88-91.
QU L,CAO Y L,HOU Y X,*et al.* A study of the introduction and expression of GNA gene in *Lycium bararum* [J]. Journal of Northwest Forestry University,2007,22(3):88-91. (in Chinese)

[11] 梁海永,刘兴菊,苏彦苹,等. rolB 基因对三倍体毛白杨的转化研究[J].西北林学院学报,2011,26(2):86-90
LIANG H Y,LIU X J,SU Y P,*et al.* Genetic transformation of the triploid *Populus tomentosa* with *rolB* gene[J]. Journal of Northwest Forestry University,2011,26(2):86-90. (in Chinese)

[12] WEIR B,GU X,WANG M B,*et al.* *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat using suspension cells as a model system and green fluorescent protein as a visual marker[J]. Australian Journal of Plant Physiology,2001,28(8):807-818.

[13] SJAHRIL R,CHIN D P,KHAN R S,*et al.* Transgenic *Pha-laenopsis plants* with resistance to *Erwinia carotovora* pro-

duced by introducing wasabi defensin gene using *Agrobacterium* method[J]. Plant Biotechnology,2006,23(2):191-194.

[14] XING Y J,JI Q,YANG Q,*et al.* Studies on *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of embryogenic suspension cultures of sweet potato[J]. African Journal of Biotechnology,2008,7(5):534-540.

[15] 王关林,方宏绮.植物基因工程[M].2 版.北京:科学出版社,2002.

[16] HUANG X Q,WEI Z M. Successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of maize elite inbred lines[J]. Plant Cell,Tissue and Organ Culture,2005,83(2):187-200.

[17] 庄志扬,王汉宇,张金文,等.农杆菌介导玉米幼胚愈伤组织遗传转化体系的优化[J].甘肃农业大学学报,2010,45(6):49-54.
ZHUANG Z Y,WANG H N,ZHANG J W,*et al.* Optimization of genetic transformation system for maize immature embryo calli mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Journal of Gansu Agricultural University,2010,45(6):49-54. (in Chinese)