

发根农杆菌介导的尾巨桉遗传转化体系的建立

罗萍^{1,2} 张昊楠^{1,3} 徐建民¹ 胡冰¹ 王晓萍¹ 李光友¹ 范春节^{1*}

(1. 林木遗传育种国家重点实验室,国家林业和草原局热带林木培育重点实验室中国林业科学研究院热带林业研究所,广州 510520; 2. 南京林业大学,南京 210037; 3. 林木遗传育种国家重点实验室,东北林业大学,哈尔滨 150040)

摘要 发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)的建立对植物功能基因的验证具有重要意义,为了在桉树(*Eucalyptus*)中建立发根农杆菌介导的遗传转化体系,本研究以不同的发根农杆菌菌株侵染尾巨桉(*Eucalyptus urophylla* × *E. grandis*)的叶片和茎段,确定合适的农杆菌菌株和外植体类型,在此基础上开展农杆菌浓度、感染时间对毛状根诱导的影响。结果表明:采用发根农杆菌菌株MSU440,以叶片为外植体进行发根诱导,最高获得了81.0%的毛状根诱导率,毛状根平均根长达到3.23 cm。在发根农杆菌浓度为OD₆₀₀=0.3、感染时间为30 min时,共培养48 h后经过20 mg·L⁻¹卡那霉素筛选培养,通过PCR分子鉴定和GUS染色证实外源基因稳定地整合在桉树毛状根基因组中,转化率达20.2%。初步建立了发根农杆菌介导的桉树遗传转化体系,为桉树基因功能鉴定和进一步的转基因育种奠定基础。

关键词 桉树;发根农杆菌;毛状根;转基因;转化

中图分类号:S184 文献标志码:A doi:10.7525/j.issn.1673-5102.2022.03.021

Establishment of *Agrobacterium rhizogenes*-mediated Genetic Transformation System of *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis*

LUO Ping^{1,2} ZHANG Haonan^{1,3} XU Jianmin¹ HU Bing¹ WANG Xiaoping¹ LI Guangyou¹ FAN Chunjie^{1*}

(1. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Key Laboratory of State Forestry and Grassland Administration on Tropical Forestry, Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou 510520; 2. Nanjing Forestry University, Nanjing 210037; 3. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Northeast Forestry University, Harbin 150040)

Abstract *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation system plays an important role in the identification of functional genes. To establish *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation system in *Eucalyptus*, the different strains infected the leaves and stems of *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* were used to select the appropriate *A. rhizogenes* strains and explant types, and the effects of *Agrobacterium* concentration and infection time on hairy root induction were explored. The results showed that MSU440 was the optimal *A. rhizogenes* strain and leaves was the preferred explants for hairy root induction. The highest hairy root induction rate reached 81.0% with the average root length of hairy roots was 3.23 cm. The leaves were infected by MSU440 which grown to a bacterial density of 0.3(OD₆₀₀) for 30 min, then they were co-cultured for 48h and transferred the selection medium supplemented with 20 mg·L⁻¹ Kanamycin. The exogenous genes were stably integrated in the genome of *Eucalyptus* hair roots which confirmed by PCR analyses and GUS staining, and the transformation efficiency reached 20.2%. In our study, an *A. rhizogenes*-mediated genetic transformation system

基金项目:中国林业科学研究院基本科研业务费专项资金项目(CAFYBB2020ZB004);广东省基础与应用基础研究基金项目(2020A1515011059)

第一作者简介:罗萍(1997—),女,硕士研究生,主要从事林木遗传育种的研究。

* 通信作者:E-mail:fanchunjie@caf.ac.cn

收稿日期:2021-12-03

Foundation item: Special Fund Project for Basic Scientific Research Business Expenses of Chinese Academy of Forestry(CAFYBB2020ZB004); Guangdong Foundation for Basic and Applied Basic Research(2020A1515011059)

First author introduction: LUO Ping(1997—), female, postgraduate, forest genetics and breeding.

* Corresponding author: E-mail:fanchunjie@caf.ac.cn

Received date: 2021-12-03

of *Eucalyptus* was preliminarily established, which laid a foundation for gene function identification and further transgenic breeding of *Eucalyptus*.

Key words *Eucalyptus*; *Agrobacterium rhizogenes*; hairy root; transgene; transformation

桉树(*Eucalyptus* spp.)是桃金娘科(Myrtaceae)桉属(*Eucalyptus*)的总称,原产澳大利亚及其附近岛屿。由于桉树具有速生丰产、材质优良、适应性广等优良特性,因此广泛种植于热带和亚热带地区,是世界四大速生造林树种之一,也是我国华南地区主要造林树种之一^[1]。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、轮伐周期短以及出材率高,是我国桉树人工林的主栽品种。

近年来,植物基因工程技术在林木育种中被广泛应用,弥补了常规育种周期长、定向改良难以控制、远缘杂交或物种间杂交几乎难以实现的不足。目前,不同桉树品种已成功建立了农杆菌(*Agrobacterium*)介导的遗传转化体系,如赤桉(*E. camaldulensis*)^[2]、蓝桉(*E. globulus*)^[3]、尾叶桉^[4]等。部分研究获得了与开花^[5]、材性^[6]、抗性^[7]等相关的转基因株系并进行了田间试验。尽管如此,以根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导法进行桉树遗传转化存在着转化效率低、稳定性差、转化系统冗长耗时等问题,难以建立快速、高效的根癌农杆菌介导的遗传转化体系,严重影响了桉树的进一步遗传改良和基因功能鉴定的进一步发展。而发根农杆菌(*A. rhizogenes*)介导的遗传转化可以从外植体组织中快速、高效地诱导出大量的毛状根。诱导的转基因毛状根可以用来开展体内基因功能表征的研究,如亚细胞定位/双分子荧光互补以及特定基因的功能鉴定^[8-9]。另外,这种转基因体系也可以与常规基因工程方法,如过表达、基因沉默、基因编辑工具 CRISPR/Cas9 等技术相结合^[10-11]。此外,通过载体优化以及激素配比等方法在棉花(*Gossypium hirsutum*)^[12]、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)^[13]等植物中进行转基因毛状根的不定芽诱导,从获得的转基因组织中直接再生出完整的转基因植株,这为发根农杆菌转化体系的应用进一步拓宽了范围。

关于发根农杆菌介导的桉树毛状根转化体系仅少量报道^[9,14],且由于不同的桉树种和无性系遗传背景不一致,导致遗传方法也有所差异,而对于我国华南地区广泛种植的栽培品种尾巨桉的遗传

转化体系国内未见报道。因此,建立一个高效稳定的发根农杆菌介导的尾巨桉遗传转化体系进一步开展桉树木质素合成、次生代谢产物合成等相关基因功能的鉴定显得尤为重要。在本研究中,以华南地区广泛种植的尾巨桉优良无性系 DH3229 为外植体材料,通过筛选外植体和农杆菌菌株等重要因素开展毛状根诱导,以期建立发根农杆菌介导的尾巨桉遗传转化体系,为今后开展桉树特定基因功能的鉴定和桉树的遗传改良奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

以尾巨桉(*Eucalyptus urophylla* × *E. grandis*)优良无性系 DH3229 的无菌苗为材料,在添加 0.5 mg·L⁻¹ 6-苄氨基嘌呤(6-BA)和 0.1 mg·L⁻¹ α-萘乙酸(NAA)的 MS 基本培养基中继代培养 20~25 d,培养条件为光照时间 16 h·d⁻¹,光照强度 100 μmol·m⁻²·s⁻¹,培养温度(25±2) °C。分别选取生长健壮,高度超过 2 cm 的芽苗上的叶片和茎段为外植体材料,其中叶片选取完全舒展的叶片,茎段选取茎部节间,切除两端腋芽。试验所用材料由中国林业科学研究院热带林业研究所保存培养。

1.1.2 试剂与培养基

卡那霉素(Kanamycin, KM)、链霉素(Streptomycin, Strep)、头孢噻肟钠(Cefotaxime sodium, Cef)和 Wood Plant Medium (WPM)均购自 Duchefa 公司, GUS 染色试剂盒购自北京华越洋生物技术有限公司,发根农杆菌感受态细胞均购自上海唯地生物技术有限公司,植物表达载体 pBI121 为本实验室保存,该载体含有 35 S 启动子, NOS 终止子, NPT II 基因(卡那霉素抗性基因)和 GUS 基因(编码 β-葡萄糖醛酸苷酶基因)。发根农杆菌的培养采用 TY 培养基(3 g·L⁻¹ 酵母提取物+5 g·L⁻¹ 蛋白胨+10 μmol·L⁻¹ 氯化钙, pH 7.0),悬浮液(WPM+30 g·L⁻¹ 蔗糖),共培养基(WPM+30 g·L⁻¹ 蔗糖+6 g·L⁻¹ 琼脂),毛状根诱导培养基(WPM+30 g·L⁻¹ 蔗糖+2.5 mg·L⁻¹ 聚乙烯吡咯烷酮 PVP10+2 g·L⁻¹ 交联聚乙烯吡咯烷酮 PVPP+0.8 g·L⁻¹ 水解酪蛋白+200 mg·L⁻¹ Cef+

6 g·L⁻¹琼脂),悬浮液和培养基 pH 值调整到 5.8,然后高温高压灭菌备用。

1.2 方法

1.2.1 菌株的选择和活化

选取 ArA4、Ar1193、K599、MSU440、ArQual 共 5 种野生型发根农杆菌菌株进行测试。取保存的发根农杆菌菌液,划平板后挑取单菌落,分别接种至加有不同抗生素的 TY 液体培养基中(见表 1)。在 28 ℃,200 r·min⁻¹的恒温摇床中培养过夜,4 000×g 离心 10 min 收集菌液,弃上清,加入等体积的悬浮液,待侵染。

表 1 发根农杆菌类型及抗性

Table 1 *A. rhizogenes* strain and antibiotics

菌株 <i>Agrobacterium</i> strain	冠瘿碱类型 Crown gallin type	抗性 Resistance
ArA4	农杆菌型 Agropine	卡那霉素 Kanamycin
MSU440	农杆菌型 Agropine	链霉素 Streptomycin
Ar1193	农杆菌型 Agropine	链霉素 Streptomycin
ArQual	农杆菌型 Agropine	链霉素 Streptomycin
K599	黄瓜碱型 Cucumopine	链霉素 Streptomycin

1.2.2 毛状根的诱导

取培养 20~25 d 的增殖苗叶片和茎段为外植体,在外植体表面轻轻划 1~2 道伤口,置于含有农杆菌的悬浮液中 30 min,每隔 5 min 震荡一次。然后取出侵染后的外植体,使用无菌滤纸吸干表面菌液,放置于共培养培养基上暗培 3 d,培养温度为(25±2) ℃。随后将外植体转移到毛状根诱导培养基中,在光照时间为 16 h·d⁻¹,光照强度 100 μmol·m⁻²·s⁻¹,以及培养温度为(25±2) ℃的条件下培养 2~3 个星期,统计毛状根诱导率,计算公式如下:

诱导率=产生毛状根的外植体数量/总外植体数量×100%

1.2.3 农杆菌的制备

采用电转法将 pBI121 质粒转入发根农杆菌 MSU440 的感受态细胞中,加入 600 μL 无抗生素的 TY 培养基,28 ℃恒温,200 r·min⁻¹振荡培养 2~3 h,然后 4 000×g 离心 1 min 收集菌液,留取 100 μL 上清轻轻吹打混匀后涂布于附加有 50 mg·L⁻¹卡那霉素及 50 mg·L⁻¹链霉素的 TY 固体培养基,28 ℃倒置培养 2~3 d,挑取单克隆进行 PCR 鉴定获得阳

性克隆,摇菌后保存备用。

1.2.4 遗传转化体系的优化

将携带有质粒 pBI121 的发根农杆菌 MSU440 摇菌培养,待菌液浓度分别为 OD₆₀₀=0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 时对叶片进行侵染,经过共培养和筛选培养后,3 个星期后诱导出毛状根,然后取出毛状根进行 GUS 染色分析。每个处理 5 个重复,每个重复 20~25 个外植体。将携带有质粒 pBI121 的发根农杆菌 MSU440 摇菌培养,待菌液浓度分别为 OD₆₀₀=0.3 时分别侵染叶片 10、30、50、70、90 min,经过共培养和筛选培养后,3 个星期后诱导出毛状根,然后取出毛状根进行 GUS 染色分析。每个处理 5 个重复,每个重复 20~25 个外植体。

1.2.5 抗生素浓度的确定

在毛状根诱导培养基中分别加入 100、200、300、400、500 mg·L⁻¹的 Cef,3 个星期后统计叶片毛状根诱导率和毛状根根长,确定抑菌剂对毛状根诱导的影响。每个处理 5 个重复,每个重复 20~25 个外植体。在毛状根诱导培养基中分别加入 0、10、15、20、25、30 mg·L⁻¹的 KM,3 个星期后统计叶片毛状根诱导率和毛状根根长,确定合适的筛选浓度。每个处理 5 个重复,每个重复 20~25 个外植体。

1.2.6 转基因毛状根的检测

将获得的所有毛状根置于加有 5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-葡萄糖苷酸(X-gluc)染液的离心管中,37 ℃避光保温 12~24 h,观察显色反应,统计染色率。以野生型菌株 MSU440 侵染的毛状根作为阴性对照,并计算阳性转化率,计算公式如下:

阳性转化率=染上蓝色毛状根数量/染色总数量×100%

选取抗性平板上的毛状根,采用 CTAB 法提取毛状根 DNA,利用特异性引物 *rolA* 基因和 *rolB* 基因确定诱导出来的根是否为毛状根,使用 *GUS* 基因和 *NPT II* 基因引物进行 PCR 检测确定报告基因是否稳定整合到毛状根中(见表 2)。

1.3 数据统计分析

采用 Excel 进行相关试验的数据记录以及柱状图的绘制,采用 SPSS 分析软件进行单方差分析(ANOVA)和 Duncan 多重比较(P=0.05),其中所有百分数要先经平方根反正弦化处理再进行数据分析。

表2 引物列表

Table 2 Primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'—3')	产物长度 Product length /bp
rola-F	AGCGTTCGGACAGCCACCA	519
rola-R	GGCGTGAAATGAATCGAAGAC	
rolb-F	GCTCTTGCACTGCTAGATT	423
rolb-R	GAAGGTGCAAGCTACCTCTC	
GUS-F	ACTCAGCAAGCGCACTTACAGG	496
GUS-R	TCCATACCTGTTACCGACGAC	
NPTII-F	ATTGAACAAGATGGATTGCACGCA	742
NPTII-R	GAGCGGCGATACCGTAAAGCA	

2 结果与分析

2.1 不同菌株和外植体对桉树毛状根诱导的影响

不同的发根农杆菌菌株对植物毛状根的诱导能力存在差异。本研究中共选取5种不同类型的

发根农杆菌包括 ArA4、Ar1193、K599、MSU440、ArQual(见表1),分别以叶片和茎段为外植体进行试验。如图1所示,不同发根农杆菌菌株对桉树毛状根的诱导呈现出明显的差异,其中 ArA4 和 MSU440 菌株可以诱导出大量的毛状根(见图1: D,E),而 K599 几乎没有毛状根。与茎段相比,叶片为外植体材料时能够获得更高的毛状根诱导。进一步统计分析发现,以叶片为外植体时 MSU440 和 ArA4 毛状根诱导率较高分别为 81.0% 和 79.1%。与叶片略微不同,以茎段为外植体,ArA4 诱导率最高,为 59.2%,其次是 MSU440,诱导率为 25.4%(见图2A)。通过对毛状根根长的测定,发现 Ar1193 诱导的毛状根平均长度最长,为 5.23 cm,其次是 MSU440 和 ArA4 分别为 3.23、3.20 cm (见图2B)。综合毛状根诱导率、毛状根根长和形态的比较分析,在后期的试验中,采用发根农杆菌 MSU440 为侵染菌株,以叶片为受体材料,进行进一步转化体系的优化。

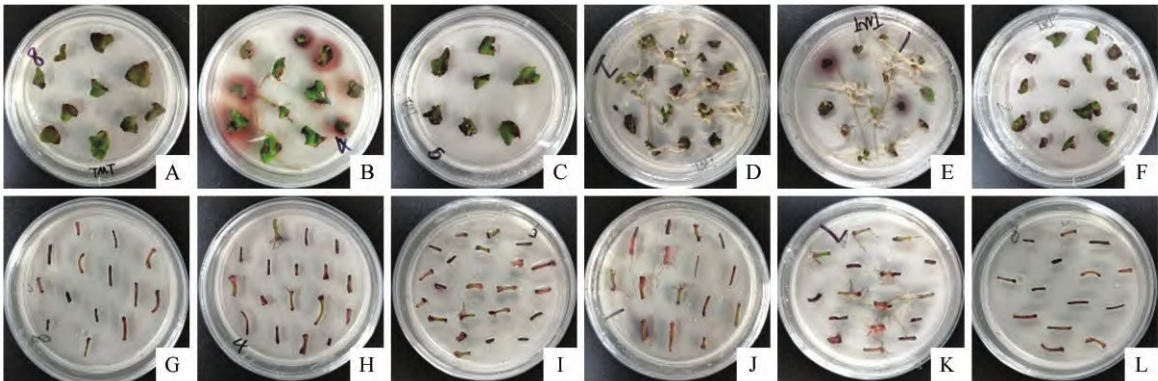


图1 不同发根农杆菌诱导的毛状根

A~F 分别为对照、Ar1193、ArQual、ArA4、MSU440、K599,受体材料为叶片;G~L 分别为对照、Ar1193、ArQual、ArA4、MSU440、K599,受体材料为茎段

Fig.1 Hairy roots induced by different *A. rhizogenes*

A~F represent control, Ar1193, ArQual, ArA4, MSU440, K599, respectively, the leaves were used as receptor material; G~L represent control, Ar1193, ArQual, ArA4, MSU440, K599, respectively, the stem segments were used as receptor material

2.2 毛状根诱导和转化体系的优化

农杆菌的菌液浓度在一定的程度上能影响发根农杆菌的侵染效率。结果如图3A~E所示,菌液浓度显著影响了毛状根的诱导率和转化率。菌液浓度在 OD₆₀₀=0.1~0.9 范围内毛状根诱导率及阳性转化率都呈现出先上升后下降的趋势(见图4A)。当 OD₆₀₀ 为 0.3 时,毛状根诱导率达到峰值,为 24.6%,显著高于其他处理;其毛状根阳性转化率在 OD₆₀₀ 为 0.3 时也达到了峰值,其阳性率为

20.5%,与其他处理组也存在着显著性差异。与 MSU440 野生型农杆菌相比,含有质粒的农杆菌其毛状根诱导率大大下降,这可能与外源基因的插入以及诱导培养基中抗生素的加入有关。因此,综合毛状根诱导率以及阳性毛状根诱导率比较分析,选取 OD₆₀₀ 为 0.3 为最佳侵染浓度。

同时开展了不同侵染时间对毛状根诱导率和转化率的影响研究,结果如图3F~J所示。结果表明在一定的侵染时间范围内,毛状根诱导率和阳

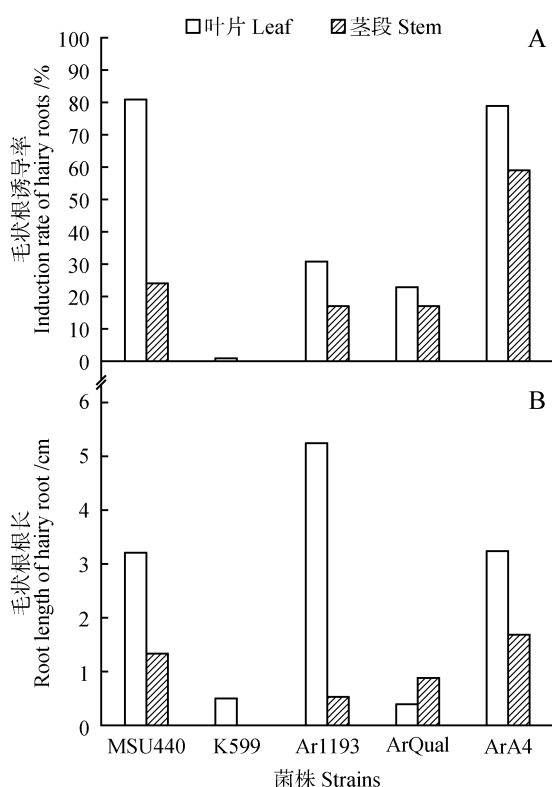


图2 不同菌株和外植体对毛状根的影响

Fig.2 Effects of different strains and explants on hairy roots

性转化率呈现出先升高后降低的趋势(见图4B)。当侵染时间为30 min时毛状根诱导率最高,为23.2%,且与其他处理相比存在着显著的差异性。与毛状根诱导率相似,对毛状根阳性转化率的统计结果分析发现侵染30 min时毛状根阳性转化率也达到了峰值,为20.2%,且与其他处理相比存在

着显著的差异性。因此,综合毛状根诱导率和阳性毛状根诱导率比较分析,发现侵染30 min可达到最佳的遗传转化效果,选定为最佳侵染时间。

2.3 抗生素对毛状根诱导的影响

为了抑制农杆菌的生长需加入适量的抑菌生长素,同时抑菌剂的添加可能会对毛状根的诱导和生长产生影响,为了确定抑菌抗生素是否对毛状根的生长造成影响。本研究中,在诱导培养基中添加不同质量浓度的Cef进行确定合适的抑菌剂浓度。结果表明:在一定的质量浓度范围内,不同质量浓度的Cef对尾巨桉叶片毛状根诱导率和毛状根根长的影响差异不显著(见图5)。在添加量为 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,培养基中的农杆菌在一定时间范围内基本受到抑制。综合毛状根诱导率及表型和经济效益考虑,确定最适的Cef抑菌浓度为 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

在此基础上,将桉树叶片分别接种于含有不同卡那霉素浓度的毛状根诱导培养基中,以确定合适的KM筛选压。结果表明,KM浓度显著影响了毛状根的诱导率和毛状根根长(见图6)。与对照相比,随着卡那霉素浓度增加,毛状根生长明显受到抑制,且毛状根长度明显变短,当浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,毛状根生长完全被抑制。因此, $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素浓度为筛选转基因毛状根的最适浓度。

2.4 转基因毛状根的获得与鉴定

在建立起的毛状根诱导和转化体系的基础上,通过抗生素筛选后获得大量的毛状根,为进一步验证GUS等外源基因是否整合到发根农杆菌诱

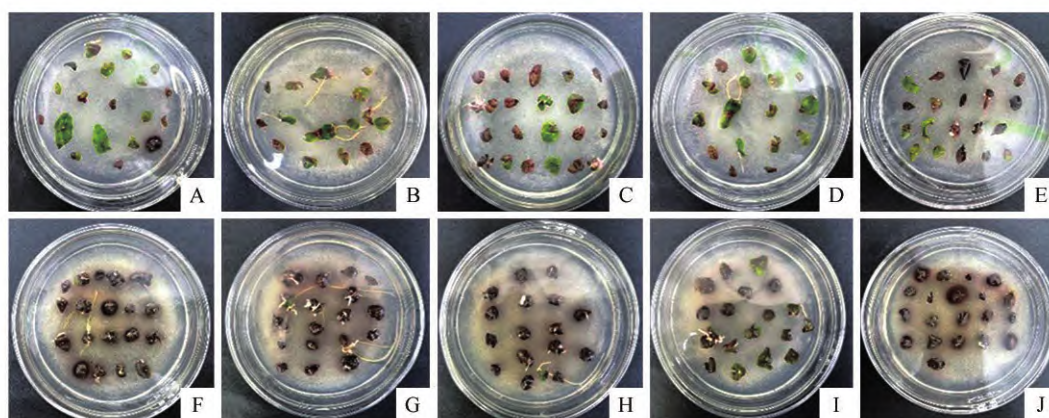


图3 菌液浓度和侵染时间对转基因毛状根诱导率的影响

A~E分别为农杆菌菌液吸光值 OD_{600} 为0.1、0.3、0.5、0.7、0.9;F~J分别为侵染时间10、30、50、70、90 min

Fig.3 Effects of bacterial concentration and infection time on the induction rate of transgenic hairy roots

A~E represent the Agrobacterium concentration, which OD_{600} reaches 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 and 0.9 respectively; F~J represent the infection time of 10, 30, 50, 70 and 90 min, respectively

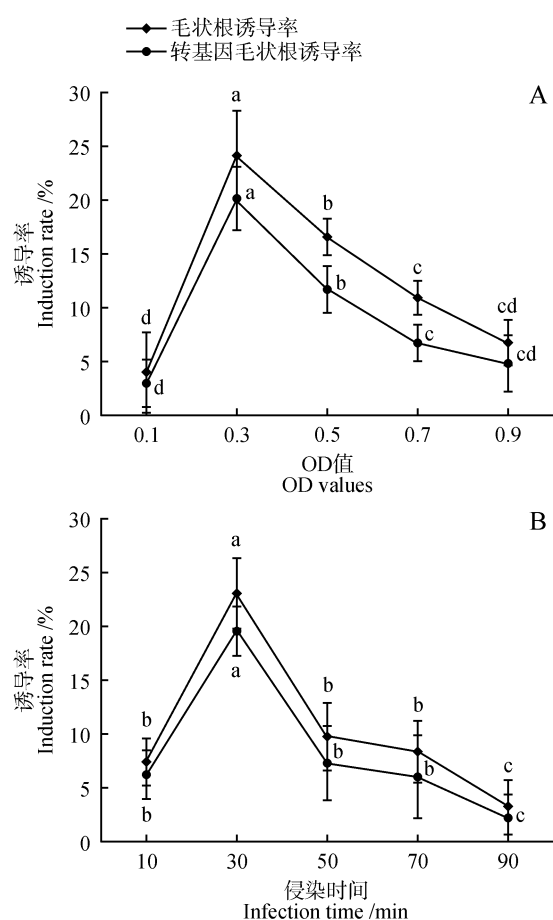


图4 菌液浓度和侵染时间对转基因毛状根诱导率的影响
Fig.4 Effects of bacterial concentration and infection time on the induction rate of transgenic hairy roots

导形成的桉树毛状根基因组中,选取卡那霉素抗性平板上生长的毛状根,进行GUS组织化学染色(见图7A)。另外提取抗性板上的毛状根基因组DNA,并利用特异性引物PCR(见表2)分别检测 $rolA$ 、 $rolB$ 、 $NPTII$ 和 GUS 基因。由图7B、C可知, $rolA$ 和 $rolB$ 基因已经整合到桉树毛状根中。进一步采用 $NPTII$ 和 GUS 基因检测表明外源的 GUS 基因已稳定整合到毛状根的基因组中。经卡那霉素筛选后获得了23.2%的毛状根诱导率,其中87.1%发生了显色反应,转化率为20.2%。

3 讨论

由于发根农杆菌介导的遗传转化体系具有便利性和高效性,目前在多种植物中开展应用,尤其是在缺乏高效稳定遗传转化体系的非模式物种以及生长周期较长,转化困难的木本植物中,已有不少报道。例如Meng等^[9]在木豆(*Cajanus cajan*)中利用发根农杆菌诱导的转基因毛状根作为试验材

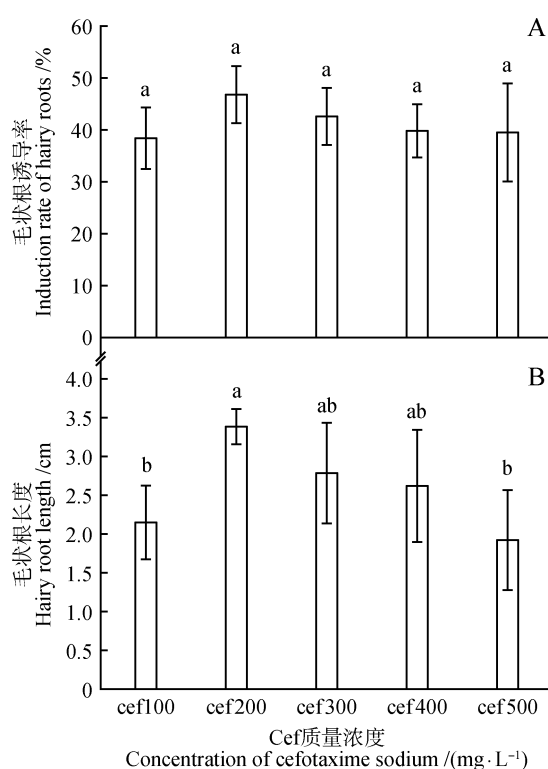


图5 Cef质量浓度对毛状根诱导率(A)和毛状根根长(B)的影响
Fig.5 Effect of cefotaxime sodium concentration on inducing rate(A) and length of hairy roots(B)

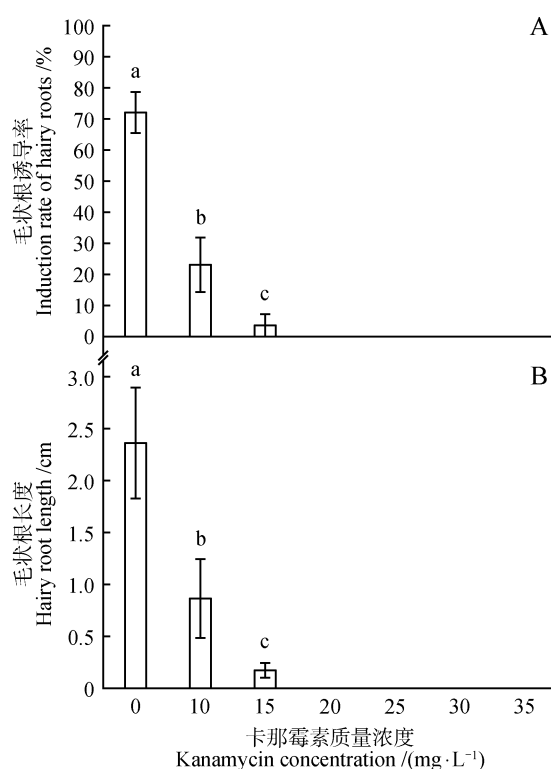


图6 卡那霉素对毛状根诱导率(A)和毛状根根长(B)的影响
Fig.6 Effect of kanamycin concentration on inducing rate(A) and length of hairy roots(B)

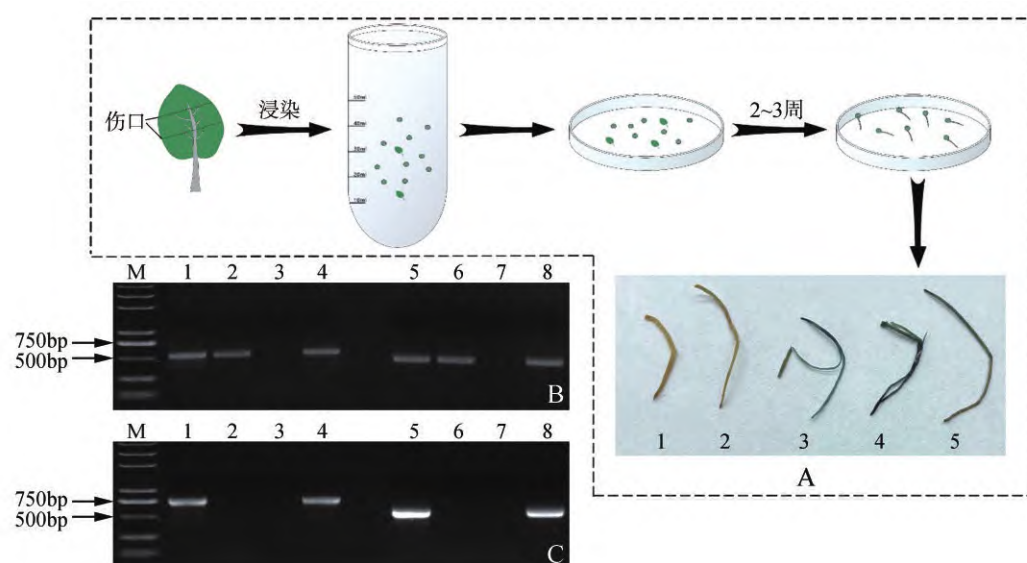


图7 桉树毛状根的诱导过程简易图以及转基因毛状根的GUS组织化学染色分析(A)和PCR分子鉴定(B~C)

A.1~2为阴性对照;3~5为阳性毛状根;图B~C中1,5为阳性对照,2,6为阴性对照(野生型菌株侵染得到的毛状根),3,7为ddH₂O(阴性对照),4,8为抗性板上诱导的毛状根;B.分别检测*rolA*,*rolB*;C.分别检测*NPT II*,*GUS*

Fig.7 Chart of *Eucalyptus* hairy root and GUS histochemical staining analysis(A) and molecular analysis of hairy roots (B~C)

A.1-2 are negative controls;3-5 are positive hairy roots;In figures B and C,1,5 are positive controls,2,6 are negative controls(hairy roots infected by wild-type strains),3,7 are ddH₂O(negative control),4,8 are hairy roots induced on the resistant plate;B detects *rolA* and *rolB* genes respectively;C detects *NPT II* and *GUS* genes respectively

料,采用双分子荧光互补分析验证CBLs与CIPKs相互作用。Plasencia等^[8]在巨桉中利用发根农杆菌A4RS诱导巨桉生成毛状根对木质素生物合成的基因CCR1进行功能分析。由此可见,利用发根农杆菌介导的遗传转化系统为基因功能的鉴定提供了一条新途径。

发根农杆菌介导的遗传转化体系的建立受许多因素的影响,包括菌株类型、外植体类型、菌液浓度和侵染时间等。发根农杆菌侵染植物的受伤部位后,会将其Ri质粒的T-DNA区的DNA片段插入并整合至宿主细胞的基因组,因此,不同Ri质粒类型的发根农杆菌具有不同的致根能力。本研究中无论以桉树叶片还是茎段为外植体时,黄瓜碱型K599菌株无法诱导其毛状根形成,这与Meng等^[9]发现K599广泛适用于多种植物的结果有所不同,可能是由于不同物种之间的差异。而另外4种农杆菌菌株均有一定的诱导毛状根的能力,其中MSU440诱导毛状根的能力高于其他3种农杆菌菌株,且毛状根生长粗壮、状态较好,是开展尾巨桉发根农杆菌转化的首选菌株。肖璇^[15]在建立甜橙(*Citrus sinensis*)的遗传转化体系中表明

MSU440诱导的毛状根效果最好,其毛状根转化效率高达68.3%。Gharari等^[16]使用MSU440对黄芩(*Scutellaria bornmuelleri*)的茎段外植体进行注射时发现其转化频率可达100%,与本研究采用的菌株一致。

外植体类型是毛状根遗传转化过程中的一大重要因素。本研究选用叶片和茎段作为外植体材料,尽管不同农杆菌菌株在毛状根诱导率上存在一定的差异,但是不管使用哪种菌株都是叶片较茎段更为敏感,诱导率较高。与之相似,刘雪羽等^[17]在建立发根农杆菌介导光皮桦(*Betula luminifera*)的遗传转化体系中表明,叶片作为外植体能够获得较高的转化效率,其转化率为36.4%,高于茎段和种子苗下胚轴。赖家业等^[18]在建立的根癌农杆菌介导的尾巨桉遗传转化体系中发现,茎段诱导的愈伤组织质量较高,可再分化出不定芽,并保持较高的分化率。主要原因可能是由于不同品种之间的差异,也有可能是根癌农杆菌与发根农杆菌对外植体的敏感程度不同造成的。

另外菌液浓度和侵染时间也是影响转化效率的重要因素。本研究结果表明在菌液OD₆₀₀为0.3、

侵染时间为 30 min, 以及叶片为外植体时毛状根的诱导率及转化率最高, 这与刘思巧^[19]在研究发根农杆菌介导银杏(*Ginkgo biloba*)毛状根培养中得出的结论相似。丁雪^[20]在建立银中杨(*Populus alba* × *P. berolinensis*)的遗传转化体系中也表明最佳侵染时间为 30 min, 其转化效率达到了 57.0%。主要原因可能是菌液浓度过低或侵染时间过短时农杆菌可能无法大量吸附于外植体细胞壁, 从而导致外源基因无法整合到植物中。而当农杆菌菌液浓度过高或侵染时间较长时, 大量农杆菌附着于外植体表面, 共培养过程中农杆菌大量繁殖导致后期脱菌困难, 引起植物褐化死亡, 导致毛状根诱导率及转化率均降低。

获得 KM 的最适筛选压是植物遗传转化过程中十分关键的步骤, 是获得转基因毛状根的重要因素。本试验中以无性系尾巨桉 DH3229 的叶片作为外植体, 在 KM 浓度为 20 mg·L⁻¹ 时, 毛状根生长完全被抑制。这与周利建等^[21]在建立根癌农杆菌介导的巨尾桉遗传转化体系过程中的研究结果相同。根据其他研究者的试验结果可知不同品系的桉树筛选压大小会有较大差别。Mullin 等^[22]在研究赤桉的报告中表明, 9 mg·L⁻¹ 的 KM 能抑制未转化外植体再生出植株, 10 mg·L⁻¹ 的 KM 能抑制根的生长。而蓝桉具有较高的 KM 抗性, 愈伤组织在 KM 浓度 75~100 mg·L⁻¹ 时仍然有植株再生^[23]。

4 结论

本研究以尾巨桉优良无性系 DH3229 为外植体材料, 分别优化了发根农杆菌菌株、外植体材料以及菌液浓度等因素, 并通过 GUS 染色分析和 PCR 分子检测证实该体系可以稳定获得转基因毛状根, 其转化效率为 20.2%。但是诱导率和转化率都有待进一步提高, 可以从其他因素来进一步完善遗传转化体系, 例如酚类物质乙酰丁香酮的添加以及基本培养基的选择等。本研究建立的转基因毛状根体系为今后尾巨桉优良无性系 DH3229 优良基因的挖掘奠定基础。同时, 也为后续利用毛状根诱导完整的转基因再生植株提供稳定的材料。

参 考 文 献

- [1] 谢耀坚. 中国桉树育种研究进展及宏观策略[J]. 世界林业研究, 2011, 24(4): 50-54.
- XIE Y J. Research progress on *Eucalyptus* breeding and

its strategy in China[J]. World Forestry Research, 2011, 24(4): 50-54.

- [2] SONODA T, KOITA H, NAKAMOTO-OHTA S, et al. Increasing fiber length and growth in transgenic tobacco plants overexpressing a gene encoding the *Eucalyptus camaldulensis* HD-Zip class II transcription factor[J]. Plant Biotechnology, 2009, 26(1): 115-120.
- [3] SPOKEVICIUS A V, SOUTHERTON S G, MACMILLAN C P, et al. Beta-tubulin affects cellulose microfibril orientation in plant secondary fibre cell walls [J]. The Plant Journal, 2007, 51(4): 717-726.
- [4] 邵志芳, 陈伟元, 罗焕亮, 等. 柞蚕抗菌肽 D 基因转化桉树培育抗青枯病株系的研究[J]. 林业科学, 2002, 38(2): 92-97, 178.
- SHAO Z F, CHEN W Y, LUO H L, et al. Studies on the introduction of the cecropin D gene into *Eucalyptus urophylla* to breed the resistant varieties to *Pseudomonas solanacearum* [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2002, 38(2): 92-97, 178.
- [5] VINING K J, ROMANEL E, JONES R C, et al. The floral transcriptome of *Eucalyptus grandis* [J]. New Phytologist, 2015, 206(4): 1406-1422.
- [6] AGGARWAL D, KUMAR A, REDDY M S. Genetic transformation of endo-1, 4-β-glucanase (Korrigan) for cellulose enhancement in *Eucalyptus tereticornis* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture: PCTOC, 2015, 122(2): 363-371.
- [7] OUYANG L J, LI L M. Effects of an inducible *aiiA* gene on disease resistance in *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* [J]. Transgenic Research, 2016, 25(4): 441-452.
- [8] PLASENCIA A, SOLER M, DUPAS A, et al. *Eucalyptus* hairy roots, a fast, efficient and versatile tool to explore function and expression of genes involved in wood formation [J]. Plant Biotechnology Journal, 2016, 14(6): 1381-1393.
- [9] MENG D, YANG Q, DONG B Y, et al. Development of an efficient root transgenic system for pigeon pea and its application to other important economically plants [J]. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17(9): 1804-1813.
- [10] BORTESI L, FISCHER R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond [J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(1): 41-52.
- [11] CAI Y, CHEN L, LIU X, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in soybean hairy roots [J]. PLoS One, 2015, 10(8): e136064.
- [12] CUI M, LIU C, PIAO C, et al. A stable *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of cotton (*Gossypium*

- hirsutum* L.) and plant regeneration from transformed hairy root via embryogenesis [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 604255.
- [13] CRANE C, WRIGHT E, DIXON R A, *et al.* Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens*-transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots [J]. *Planta*, 2006, 223(6): 1344-1354.
- [14] DAI Y, HU G, DUPAS A, *et al.* Implementing the CRISPR/Cas9 technology in *Eucalyptus* hairy roots using wood-related genes [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(10): 3408.
- [15] 肖璇. 发根农杆菌介导的柑橘遗传转化体系建立及转基因柑橘溃疡病抗性分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- XIAO X. Development of *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation and canker disease resistance analysis in *Citrus* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014.
- [16] GHARARI Z, BAGHERI K, DANAFAR H, *et al.* Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Scutellaria bornmuelleri* by elicitor induced over-expression of *MYB7* and *FNSII2* genes [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 148: 35-44.
- [17] 刘雪羽, 杜笑雪, 陈思源, 等. 发根农杆菌介导的光皮桦毛状根高频诱导体系及遗传转化[J]. *农业生物技术学报*, 2021, 29(3): 495-505.
- LIU X Y, DU X X, CHEN S Y, *et al.* *Agrobacterium rhizogenes* mediated high frequency hairy root induction system and genetic transformation in *Betula luminifera* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2021, 29(3): 495-505.
- [18] 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.
- LAI J Y, SHI H M, LIU K, *et al.* Studies on the establish genetic transform of *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* [J]. *Journal of Sichuan University: Natural Science Edition*, 2007, 44(2): 415-419.
- [19] 刘思巧. 发根农杆菌介导的银杏毛状根培养及黄酮的生物合成[D]. 雅安: 四川农业大学, 2019.
- LIU S Q. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root culture and flavonoid biosynthesis of *Ginkgo biloba* L. [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2019.
- [20] 丁雪. 发根农杆菌介导的银中杨茎段遗传转化体系的建立及生理生化指标的测定[D]. 四平: 吉林师范大学, 2017.
- DING X. Determination of physiological and optimization on the stem of *Populus alba* × *P. berolinensis* by *Agrobacterium rhizogenes* [D]. Siping: Jilin Normal University, 2017.
- [21] 周利建, 赵艳玲. 巨尾桉组培快繁与转基因再生体系的优化[J]. *广东农业科学*, 2012, 39(22): 51-54.
- ZHOU L J, ZHAO Y L. Optimization of *Eucalyptus grandis* × *E. ophylla* tissue culture and regeneration system on genetic transformation [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2012, 39(22): 51-54.
- [22] MULLINS K V, LLEWELLYN D J, HARTNEY V J, *et al.* Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis* [J]. *Plant Cell Reports*, 1997, 16(11): 787-791.
- [23] MORALEJO M, ROCHANGE F, BOUDET A M, *et al.* Generation of transgenic *Eucalyptus globulus* plantlets through *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation [J]. *Australian Journal of Plant Physiology*, 1998, 25(2): 207-212.