

极性和 NAA 浓度对发根农杆菌遗传转化黄瓜子叶的影响

施和平 李玲 潘瑞炽

(华南师范大学生物系, 广州 510631)

摘要 本文研究了极性和 NAA 浓度对发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) R1000 和 R1601 诱导黄瓜子叶产生毛状根的影响。结果表明, 感染发根农杆菌 R1000 和 R1601 的黄瓜子叶都仅在其下端产生毛状根。培养基中加入 0.1 mg L^{-1} 和 5.0 mg L^{-1} NAA 预培养和共培养都可提高发根农杆菌 R1000 和 R1601 对黄瓜子叶外植体下端的生根能力。但仅用 5.0 mg L^{-1} NAA 预培养和共培养感染的发根农杆菌 R1000 和 R1601 的子叶外植体上端可不同程度地生根, 生根率分别为 32.5% 和 6.48%。经检测, 毛状根均含有农杆菌碱和甘露碱。

关键词 极性; 萘乙酸 (NAA); 黄瓜; 发根农杆菌; 毛状根

EFFECTS OF POLARITY AND NAA CONCENTRATION ON TRANSFORMATION OF CUCUMBER COTYLEDONS BY *AGROBACTERIUM RHIZOGENES*

Shi Heping Li Ling Pan Ruichi

(Department of Biology, South China Normal University, Guangzhou 510631)

Abstract Effects of polarity and concentration of NAA on the ability of producing hairy roots in cucumber cotyledon explants infected by *Agrobacterium rhizogenes* R1000 and R1601 were studied. The results showed that hairy roots appeared only at the basal part of cucumber cotyledon explants infected with *A. rhizogenes* R1000 and R1601. If 0.1 mg L^{-1} and 5.0 mg L^{-1} NAA were added to MS medium, the rooting ability of the basal part of cotyledon infected with *A. rhizogenes* R1000 and R1601 was enhanced. However, in treatment only with 5.0 mg L^{-1} NAA in preculture and cocultivation on MS medium, the hairy roots could be incited in the apical part of cucumber cotyledon infected with *A. rhizogenes* R1000 and R1601. Opine analysis evidenced the intergration and expression of TR-DNA.

Key words Polarity; NAA; *Cucumis sativus* L.; *Agrobacterium rhizogenes*; Hairy root

发根农杆菌侵染植物后, 通过其所含 Ri 质粒的 T-DNA 在植物细胞基因组中的整合和表达, 导致毛状根 (Hairy root) 的产生^[1]。现虽已有百余种植物感染 Ri 质粒后产生毛状根^[2,3], 但如何提高发根农杆菌的致病力, 拓宽发根农杆菌的寄主范围, 仍是亟待研究的课题。

本实验承蒙原中国科学院北京植物所林忠平先生, 法国国家科学研究中心 Jacques Tempé 先生分别馈赠发根农杆菌和冠瘿碱标准样品, 特此致谢。

1996-09-18 收稿; 1997-03-17 修回

发根农杆菌 RiT-DNA 对植物的转化是农杆菌和植物细胞双向作用的复杂系列过程。一些研究表明, 感染与毛状根的产生不仅取决于农杆菌本身的致病力, 还与感染条件和植物种类等密切相关^[4-9]。本文以黄瓜子叶为材料, 研究外植体极性和 NAA 浓度对发根农杆菌转化黄瓜子叶的影响, 为今后用 Ri 质粒载体建立黄瓜高效遗传转化系统奠定实验基础。

1 材料和方法

材料培养 黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 津研 4 号种子用水浸泡去瘪后, 用 0.1% HgCl₂ 消毒 28 min, 无菌水冲洗 5 次, 接种至盛湿润无菌脱脂棉的三角瓶中, 25℃ 暗萌发 48 h 后, 移入光照培养箱中培养, 每天光照 12 h, 光强 110 μmol m⁻² s⁻¹; 温度为 25 ± 2℃。

在无菌条件下, 取萌发 10 d 的黄瓜子叶按图 1 所示切成 A, B, C 和 D 四种子叶外植体; 其中用来研究极性对发根农杆菌遗传转化影响的 A, B, C 三种外植体置于不含激素的 MS 培养基上预培养; 子叶外植体 D 则在不同浓度 NAA 的 MS 培养基上预培养。

细菌菌株及培养 发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) R1000 具有质粒 pRiA4b; 发根农杆菌 R1601 具有质粒 pRiA4b, 并且其中 Hind III 片段 21 上整合 NPT II (neomycin phosphotransferase II) 基因, 染色体背景与 C58 相同, 同时该菌还具有超致病根癌农杆菌 (*A. tumefaciens*) pTiBo542 的 Vir 区的粘性质粒 pTVK291^[9]。将农杆菌划线培养在含有 100 μg ml⁻¹ 卡那霉素的 AB 培养基上, 28℃ 下培养, 待长出菌落后, 挑取单菌落接于 YEB 液体培养基中, 28℃ 振荡培养 30 h 的培养物即可用于感染。

毛状根的诱导 将上述预培养 1 d 的子叶外植体浸入菌液 (用 MS 液体培养基稀释 5 倍) 中, 28℃ 放置 20 min, 取出, 用无菌滤纸吸干多余菌液, 放回至原培养基上共培养 2 d 后, 转入 MS + 500 μg ml⁻¹ 头孢噻肟钠 (Cefotaxime) 的培养基上, 25℃ 每日 12 h 散射光下诱导毛状根的产生。各因素的处理均重复二次, 均在共培养 12 d 后统计子叶外植体的出根情况。

毛状根的鉴定 将新鲜的毛状根捣碎离心, 取上清液按 Ellis 等^[10] 的方法进行高压纸电泳检测。根据冠瘿碱的有无确定是否是 Ri T-DNA 转化毛状根。

2 结果与分析

2.1 外植体极性对发根农杆菌诱导黄瓜子叶生根能力的影响

从表 1 可见, 非感染的黄瓜子叶外植体培养 12 d 后都没有生根。而感染发根农杆菌 R1000 和 R1601 的子叶外植体, 2-3 d 后便从其下端中脉附近产生白色或淡黄绿色愈伤组织, 并陆续生根, 至 12 d 时已从愈伤组织上长出许多毛状根。从生根部分来看, 感染发根农杆菌 R1000 和 R1601 的上半部子叶和下半部子叶都分别只在其下端中脉附近产生许多毛状根, 而其上端则极少或不生根。比较而言, R1000 菌株的生根能力比 R1601 菌株稍强。对于纵切子叶, 无论是否感染, 其纵

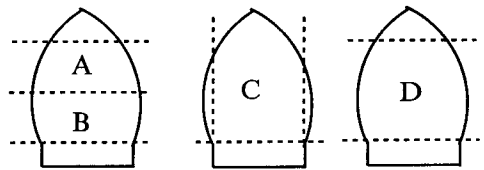


图 1 黄瓜子叶外植体的制备
Fig. 1 Preparation of explants from cucumber cotyledons
按图中虚线所示切取 A, B, C, D 子叶外植体
The explants A, B, C and D were cut from the cotyledons as indicated by the dashed lines

切伤口一直未能生根。这些表明,子叶外植体极性对发根农杆菌 R1000 和 R1601 转化黄瓜子叶产生毛状根的能力有很大影响。

2.2 NAA 浓度对感染发根农杆菌 R1000 和 R1601 的黄瓜子叶生根能力的影响

从表 2 可知,非感染黄瓜子叶外植体,用 0.1 mg L⁻¹ 和 5.0 mg L⁻¹ NAA 处理都只诱导其下端生根,其中 0.1 mg L⁻¹ NAA 处理的子叶外植体生根快,生根率高;而 5.0 mg L⁻¹ NAA 处理的生根率反比 0.1 mg L⁻¹ NAA 低,且根极短小。对于感染发根农杆菌 R1000 和 R1601 的黄瓜子叶外植体,0.1 mg L⁻¹ 和 5.0 mg L⁻¹ NAA 预培养和共培养都可提高发根农杆菌对其下端的生根能力;但仅 5.0 mg L⁻¹ NAA 预培养和共培养可使感染发根农杆菌 R1000 和 R1601 的黄瓜子叶外植体的上端不同程度地生根,生根率分别为 32.5% 和 6.48%。而 0.1 mg L⁻¹ NAA 预培养和共培养则不能。

2.3 黄瓜毛状根冠瘿碱的检测

取黄瓜子叶外植体诱导产生的新鲜毛状根进行冠瘿碱检测。结果表明,毛状根均含有农杆菌碱和甘露碱(图 2)。这说明 Ri 质粒的 T-DNA 片段已在黄瓜细胞基因组中得到表达,而对对照根(黄瓜子叶自然生根率很低,故用 0.1 mg L⁻¹ NAA 诱导子叶外植体产生的不定根作为对照)中既未检测到农杆菌碱和甘露碱,也未能在无激素的 MS 固体培养基上自主生长。

3 讨论

经发根农杆菌 R1000 和 R1601 感染的黄瓜子叶,无论是上半部子叶、

表 1 极性对发根农杆菌 R1601 和 R1000 感染的黄瓜子叶出根能力的影响
Table 1 Effect of polarity on rooting ability of cucumber cotyledon explants infected with *Agrobacterium rhizogenes* R1601 and R1000

菌株 Strain	出根能力 Rooting ability	外植体类型 Explant from		
		上半部 A*	下半部 B*	纵切 C*
R1601	外植体数 No. of explants	86	99	75
	生根的外植体 % % of rooted explants	72.10	90.90	0
	根诱导频率(条/外植体) Frequency of root induction (root No./explant)	4.2	12.4	0
	外植体数 No. of explants	96	92	80
R1000	生根的外植体 % % of rooted explants	63.54	86.36	0
	根诱导频率(条/外植体) Frequency of root induction (root No./explant)	15	18.5	0
	外植体数 No. of explants	78	72	57
	生根的外植体 % % of rooted explants	0	0	0
Control	根诱导频率(条/外植体) Frequency of root induction (root No./explant)	0	0	0

* For A, B and C see Fig. 1

表 2 NAA 对发根农杆菌 R1601 和 R1000 感染的黄瓜子叶出根能力的影响
Table 2 Effect of NAA on rooting ability of cucumber cotyledon explants infected with *Agrobacterium rhizogenes* R1601 and R1000

菌株 Strain	NAA 浓度 Concentration of NAA (mg L ⁻¹)	出根时间 Days for root appearance (d)	生根的外植体 (%) Rooting percentage	
			子叶上端 Apex part	子叶下端 Base part
R1601	0.1	5	0	80.65
		10	0	100
		5	0	46.7
R1000	5.0	10	6.48	100
		5	0	78.57
		10	0	100
Control	0.1	5	0	34.65
		10	32.5	97.5
		5	0	27.27
Control	5.0	10	0	81.82
		5	0	0
		10	0	41.2

下半部子叶还是纵切子叶, 都仅在其下端中脉处产生毛状根, 而中脉以外的组织极少产生毛状根, 这表明外植体的维管束是产生毛状根敏感组织, 而外植体极性可影响发根农杆菌的致根能力。该结果与胡萝卜根圆片、欧洲油菜下胚轴和绿豆下胚轴等材料的结果类似^[4,11,12]。这种影响可能是由于生长素在体内作极性运输所致, 因而子叶外植体下端生长素含量较高。同时, 我们的实验(表 2)也进一步证实, 生长素 NAA 可提高发根农杆菌 R1000 和 R1601 对黄瓜子叶外植体上端和下端的致根能力。我们发现, 0.1 mg L⁻¹ 和 5.0 mg L⁻¹ NAA 都能诱导非感染黄瓜子叶外植体下端生根, 但都不能诱导其上端生根。而同样浓度的 NAA, 除都可以提高发根农杆菌 R1000 和 R1601 诱导黄瓜子叶外植体下端产生毛状根的能力外, 5.0 mg L⁻¹ NAA 预培养和共培养还可使感染发根农杆菌 R1000 和 R1601 的黄瓜子叶外植体上端产生毛状根, 生根率分别为 32.5% 和 6.48%。但与 NAA 诱导非感染黄瓜子叶外植体产生的根不同, 感染发根农杆菌 R1000 和 R1601 的黄瓜子叶外植体产生的毛状根既能合成农杆菌碱和甘露碱, 又能在无激素培养基上自主生长。

一些研究表明, 生长素能对发根农杆菌 RiT-DNA 的 rolC 和 rolB 的启动子产生正调控; 适当浓度的生长素能使 rolB 的表达强度提高 20-100 倍, 能使 rolC 的表达强度提高 5 倍^[13]。而 rolABC 是发根农杆菌 RiT-DNA 上诱导生根的因子^[14]。Shen 等报道, 发根农杆菌 RiT-DNA 转化可使植物细胞对生长素的敏感性提高 100-1000 倍, 并认为毛状根的生长特性是由于 RiT-DNA 转化提高了生长素敏感性的结果^[15]。此外用 T-DNA 区不含 aux 基因的甘露碱和黄瓜碱型的发根农杆菌或 aux 基因缺失的农杆菌型农杆菌都能诱导毛状根的产生。但 McInnes 等却用仅含 aux 基因的 TR-DNA 也诱导黄瓜子叶产生了毛状根^[16]。因此, 我们认为 5.0 mg L⁻¹ NAA 预培养和共培养能使感染发根农杆菌 R1000 和 R1601 的黄瓜子叶外植体上端产生毛状根, 可能与 RiT-DNA 转化提高了子叶细胞对生长素的敏感性以及生长素水平升高的影响有关。我们的实验表明, 极性和 NAA 都可对毛状根的形成发挥重要作用, 但它们可能只是用来启动转化细胞的反应, 或者说是初级决定因素; 而发根农杆菌的 RiT-DNA 才对毛状根的形成起着更为重要的决定作用。

参考文献

- White F F, Nester E W. Hairy root: plasmid encodes virulence traits in *Agrobacterium rhizogenes*. *J Bacteriol*, 1980, 141: 1134-1141
- 周达锋, 卜学贤, 陈维伦. 发根农杆菌 Ri 质粒的分子生物学及应用前景. *植物学通报*, 1993, 10(2):24-34

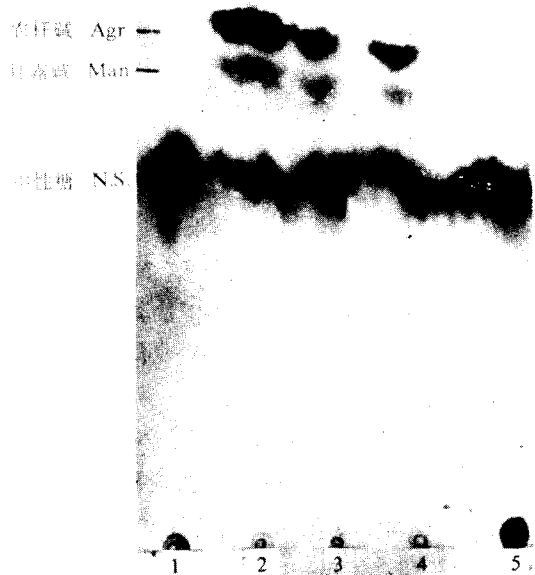


图 2 黄瓜毛状根中农杆菌碱和甘露碱的检测
Fig. 2 Detection of agropine and mannopine in hairy roots of cucumber

1,5. 正常根 Normal roots; 2. 农杆菌碱和甘露碱标准品 Standard agropine and mannopine; 3. R1000 诱导的毛状根 Hairy roots induced by R1000; 4. R1601 诱导的毛状根 Hairy roots induced by R1601.
Agr—农杆菌碱 Agropine; Man—甘露碱 Mannopine; N.S.—中性糖 Neutral sugars

- 3 卜学贤, 林忠平, 陈维伦. 农杆菌对毛白杨的转化及完整转化植株的获得. 植物学报, 1991, 33(3):206-213
- 4 倪德祥, 李建兵, 邓志龙等. 发根农杆菌对两种豆科植物发状根诱导的形态发生. 复旦学报(自然科学版), 1993, 32(3): 308-315
- 5 徐香玲, 刘伟华, 李集临. Ri 质粒转化番茄的初步研究. 生物技术, 1993, 3(1):20-24
- 6 de Cleene M, de Ley J. The host range of infectious hairy root. The Botanical Review, 1981, 47:147-194
- 7 Ryder M H, Tate M E, Kerr A. Virulence properties of strains of *Agrobacterium* on the apical and basal surface of carrot root disc. Plant Physiol, 1985, 77:215-221
- 8 Stachel S E, Messens E, Van Montagu M et al. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium rhizogenes*. Nature, 1985, 318:624-629
- 9 Pythoud F, Sinkar V P, Nester E W et al. Increased virulence of *Agrobacterium rhizogenes* conferred by the vir region of pTiBo542: application to genetic engineering of poplar. Bio/Techn, 1987, 5:1323-1327
- 10 Ellis D, Roberts D, Sutton B et al. Transformation of white spruce and other conifer species by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports, 1989, 8:16-20
- 11 Wang F J, Zhang L M, Cui M L et al. Transformation of several vegetable crops by *Agrobacterium rhizogenes*. Beijing: Proc Asia-Pacific Conf on Agri Biot, 1992, 284-285
- 12 Damgaard O, Rasmussen O. Direct regeneration of transformed shoot in *Brassica napus* from hypocotyl infectious with *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Mol Biol, 1991, 17:1-8
- 13 Maurel C, Brevet J, Barbier-Brygoo H et al. Auxin regulates the promoter of the root-inducing rolB gene of *Agrobacterium rhizogenes* in transgenic tobacco. Mol Gen Genet, 1990, 223:58-64
- 14 White F F, Taylor B H, Huffman G A et al. Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. J Bacteriol, 1985, 164:33-44
- 15 Shen W H, Davioud E, David C et al. High sensitivity to auxin is a common feature of hairy root. Plant Physiol, 1990, 94:554-560
- 16 McInnes E, Morgan A J, Mulligan B J et al. Roots induced on cucumber cotyledons by the agropine Ri plasmid TR-DNA exhibit the transformed phenotype. Plant Cell Reports, 1991, 9:647-650