

## 少花龙葵毛状根的诱导和次生代谢物的产生

龚玉莲\* 施和平 李玲 潘瑞炽

(华南师范大学生物系, 广东 广州 510631)

**摘要:** 研究了发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)对少花龙葵(*Solanum photeinocarpum*)的转化和毛状根的诱导, 分析了影响转化的因素, 并初步检测了毛状根的生长和次生代谢物的产生。发根农杆菌菌株 R1000、R1601 分别感染少花龙葵的叶片、茎段, 约 7 d 后得到毛状根。菌株 R1000 感染的外植体的生根率分别为 90.2% 和 50.0%, 根诱导频率分别为 6.2 和 4.6; 菌株 R1601 感染的外植体的生根率分别为 92.1% 和 49.2%, 根诱导频率分别为 6 和 5.5; 对照两周内不出根。冠瘿碱检测证实所得毛状根为转化根。感染在 MS+PP<sub>m</sub> 培养基上生长的矮壮苗叶片, 毛状根诱导频率显著提高; 用 MS 液体培养基稀释 1 倍的菌液感染叶片, 转化效率也得到提高。毛状根生长速度快, 培养 4 周后干重增加 420 倍, 总糖苷生物碱和皂甙含量分别为原植株根的 31 和 107 倍。

**关键词:** 发根农杆菌; 少花龙葵; 毛状根; 次生代谢物

**中图分类号:** Q943.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-3395(2002)01-0058-05

## Induction of *Solanum photeinocarpum* Hairy Roots and Production of Secondary Metabolites

GONG Yu-lian SHI He-ping LI Ling PAN Rui-chi

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

**Abstract:** Genetic transformation of *Solanum photeinocarpum* by *Agrobacterium rhizogenes* R1000 and R1601, the effects of some factors on transformation efficiency and the production of secondary metabolites by hairy root culture were studied. Hairy roots were induced from leaf and stem explants with *A. rhizogenes* strain R1000 and R1601 ca. 7 days after inoculation. Hairy root frequencies obtained from leaf and stem explants inoculated by R1000 harboring the agropine type Ri plasmid pRiA<sub>4</sub>b were 90.2% and 50.0%, respectively, while those by R1601 with the agropine-type Ri plasmid pRi1500 and pTVK291 were 92.1% and 49.2%, respectively. Opine analysis indicated that T-DNA genes of *A. rhizogenes* strain R1000 and R1601 were expressed in *S. photeinocarpum* hairy roots. Hairy root-inducing frequency of leaf explants from *S. photeinocarpum* grown on MS medium supplemented with PP<sub>333</sub> was remarkably increased, and that of leaf explants inoculated by doubled diluting *agrobacterium* liquid on MS liquid medium was also increased. Hairy roots grew rapidly and the dry weight increased by 420 times after culture for 4 weeks, and the dry weight contents of total glycoalkaloids and saponins were 31 and 107 times higher than those of the original ones, respectively.

**Key words:** *Solanum photeinocarpum*; *Agrobacterium rhizogenes*; Hairy roots; Secondary metabolites

发根农杆菌 Ri 质粒的 T-DNA 在高等植物的 DNA 中整合并表达, 产生具有激素自主型生长、

收稿日期: 2001-02-08 接受日期: 2001-07-11

基金项目: 广东省重点科技项目(S990401); 广东省自然科学基金(994216)资助

\* 现在通讯处: 广东教育学院生物系, 广州 510310

多根毛、多分枝、无向地性、易再生植株等特点的毛状根<sup>[1]</sup>。建立发根农杆菌 Ri 质粒对高等植物的遗传转化系统,对于外源基因导入的研究有重要意义。目前应用 Ri 质粒系统转化成功的植物很多<sup>[2]</sup>。毛状根具有激素自主型、稳定性、高产性等优点,因此应用毛状根生物技术在植物次生代谢物的生产方面有着广阔的前景<sup>[3]</sup>。

少花龙葵是传统的中草药,具有清热解毒、散血消肿等功效<sup>[4]</sup>,其总糖苷生物碱(total glycoalkloid)和皂甙具有抗炎、抗过敏、抗菌、强心、刺激造血系统等药理作用<sup>[5]</sup>。但未见少花龙葵遗传转化及其毛状根的报道。本文研究了发根农杆菌对少花龙葵的遗传转化和毛状根的诱导,以及影响转化的因素,并初步检测了其毛状根的生长和次生代谢物的生产。

## 1 材料和方法

**细菌菌株及其培养** 发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)R1000 和 R1601 在 AB+100 mg L<sup>-1</sup> Km(卡那霉素)的斜面培养基上培养、保存。感染前挑取单菌落接种于 YEB+100 mg L<sup>-1</sup> Km 的液体培养基中,28℃、160 r min<sup>-1</sup> 振荡培养 30 h,得到活化的菌液。

**植物材料的培养** 少花龙葵(*Solanum photeinocarpum* Nakamura et Odashima)的果实采自华南师范大学校园内。种子先用 70%酒精浸泡 15 s,再用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 10 min,无菌水漂洗 5 次,置于 MS 基本培养基上萌发。按谭文澄的方法<sup>[6]</sup>获得无菌苗,在 25±1℃、光强 350 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>、12 h d<sup>-1</sup> 条件下培养,每月继代 1 次。

**毛状根的诱导与培养** 将少花龙葵叶片切成 0.5–1 cm<sup>2</sup> 小块,于 MS 基本培养基上预培养 48 h,再在已活化的菌液中浸泡 5 min,取出吸干表面菌液,置于原培养基上共培养 48 h,然后转入 MS+500 mg L<sup>-1</sup> 头孢噻肟钠(Cefotaxime)培养基中除菌。将少花龙葵的节间切成 1–2 cm 长的茎段,倒插于 MS 基本培养基中,用接种环在茎段的形态学下端涂上已活化的菌液,共培养 48 h,转入 MS+500 mg L<sup>-1</sup> 头孢噻肟钠培养基中除菌。在 25℃、散射光(12 h d<sup>-1</sup>)条件下诱导毛状根。对照用不含农杆菌的 YEB+100 mg L<sup>-1</sup> Km 处理。两周后统计生根结果。切下毛状根转入 MS+500 mg L<sup>-1</sup> 头孢噻肟钠培养基中彻底除菌。

**冠瘿碱检测** 参照 Ellis 等<sup>[7]</sup>的方法,纸电泳条件为:20 V cm<sup>-1</sup>,时间 60 min。

**影响转化的因素** 测定在 MS+1 mg L<sup>-1</sup> PP<sub>333</sub>(Paclobutrazol)培养基上生长 1 个月的少花龙葵矮壮苗的叶片直径、叶绿素含量(POC-1 型数字显示叶绿素测定仪,上海第二光学仪器厂)和转化效率,对照为 MS 基本培养基上生长的少花龙葵叶片。用稀释菌液(用 MS 基本培养基稀释 1 倍的菌液)感染叶片,对照为原菌液感染叶片。转化过程同前。

**毛状根的生长和次生物质含量的测定** 切取毛状根于修改的 MS 培养基(KNO<sub>3</sub>、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 的浓度为 MS 培养基的 1/5)中液体培养,25℃、100 r min<sup>-1</sup> 条件黑暗培养,4 周继代 1 次,每周取样测定鲜重、干重;对照取少花龙葵无菌苗的根进行培养。总糖苷生物碱、皂甙的提取参照 Ehmked<sup>[7]</sup>的方法,生物碱检测用碘-碘化钾试剂,碘化汞钾试剂<sup>[8]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 毛状根的诱导和培养

发根农杆菌感染少花龙葵叶片 3–4 d,外植体膨大,形态学下端有少量白色或淡黄绿色愈伤组

织产生,而上端切口处的愈伤组织出现较晚。感染 1 周后发生毛状根,主要由切口处长出,下端比上端生根早、多。根白色、密集丛生,多根毛、多分枝,无向地性(图版 I:2,3);生长迅速,多次继代仍能保持上述性状(图版 I:4)。对照两周内未生根,两周后才略有膨大或不膨大(图版 I:1),有 3 个外植体上长出 3 条根,分支少、生长慢甚至停滞,具有明显的正向地性。

发根农杆菌感染少花龙葵茎段 3 d 后,形态学下端开始膨大,并产生愈伤组织,6-7 d 后在愈伤组织处长出辐射状丛生、白色、多根毛的根(图版 I:6)。对照茎段两周内未见生根,仅下端略有愈伤组织形成(图版 I:5)。

从表 1 可见,发根农杆菌 R1000 和 R1601 对少花龙葵叶片的致根能力高于茎段,但菌株之间无显著差异。

表 1 发根农杆菌 R1000 和 R1601 感染少花龙葵叶片和茎段的生根情况  
Table 1 Induction of hairy roots from leaf and stem explants of *Solanum photeinocarpum* infected by *Agrobacterium rhizogenes* R1000 and R1601

菌株 Strain	外植体总数 No. of explants		存活率 Survival (%)		生根所需时间 Time for rooting (d)		生根率 Rooting (%)		根诱导频率 Frequency of root induction *	
	叶片 Leaf	茎段 Stem	叶片 Leaf	茎段 Stem	叶片 Leaf	茎段 Stem	叶片 Leaf	茎段 Stem	叶片	茎段
									Leaf	Stem
R1000	52	32	90.2	100	7	6	90.2	50	6.2	4.6
R1601	56	28	92.1	100	6	6	92.1	49.2	6	5.5
Control	32	20	99.2	100	-	-	0	0	0	0

\* 根诱导频率:平均每个外植体的生根数 Mean number of roots produced by one explant.

值得注意的是,叶片在转化操作过程中出现部分褐化甚至死亡的现象,而感染后存活的外植体全部能生根。

## 2.2 冠瘿碱检测

由图 1 可见,发根农杆菌感染少花龙葵叶片和茎段后产生的毛状根,均能合成农杆菌碱和甘露碱,而对照根未能检测出。初步表明 Ri 质粒中 T-DNA 编码的冠瘿碱合成酶基因已在少花龙葵细胞中表达。

## 2.3 影响转化的因素

PP<sub>333</sub> 处理使少花龙葵苗矮壮,生长慢,粗壮,叶色浓绿。与对照相比,叶片直径增大了 28.4%,叶绿素含量增加了 54.6%,株高仅为对照的 44.1%。

发根农杆菌 R1000 和 R1601 转化矮壮苗叶片的结果如表 2,表明外植体的生理状态对转化有一定影响。

用 1/2 浓度的发根农杆菌 R1000 和 R1601 菌液转化叶片的结果如下:对照的存活率分别为 81.3%和 87.5%,生根所需时间均为 7 d,生根率分别为 81.3%和 87.5%,根诱导频率分别为 5.2 和 5.7;处理的存活率分别为 92.6%和 100%,生根所需时

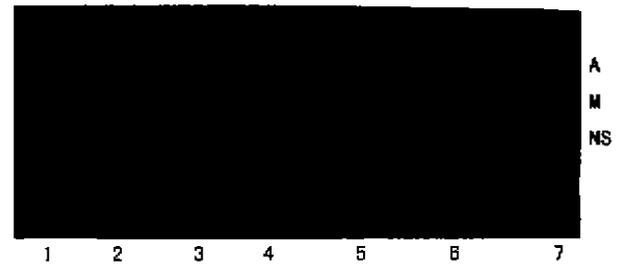


图 1 少花龙葵毛状根的电泳图

Fig.1 Paper electrophoretogram of the extracts from normal roots and hairy roots of *Solanum photeinocarpum*  
1. R1601 诱导叶片形成的毛状根 Hairy roots from leaf explants induced by R1601; 2. R1000 诱导叶片形成的毛状根 Hairy roots from leaf explants induced by R1000; 3. R1601 诱导茎段形成的毛状根 Hairy roots from stem explants induced by R1601; 4. R1000 诱导茎段形成的毛状根 Hairy roots from stem explants induced by R1000; 5. 对照 (非转化根) Non-transformed roots (control); 7 标准品 Standard. A: 农杆菌碱 Authentic agropine; M: 甘露碱 Mannopine; NS: 中性糖 Neutral sugar

间均为 6 d, 生根率分别为 92.6% 和 100%, 根诱导频率分别为 7.1 和 8.2。这表明菌液浓度也能影响转化效率, 稀释菌液的转化致根能力较未稀释的好。

表 2 发根农杆菌 R1000 和 R1601 感染少花龙葵矮壮苗叶片的生根情况

Table 2 Induction of hairy roots from the leaf of dwarf seedling of *S. photeinocarpum* inoculated with *A. rhizogenes* R1000 and R1601

菌株 Strain	存活率 Survival (%)		生根所需时间 Time for rooting (d)		生根率 Rooting (%)		根诱导频率 Frequency of root induction *	
	矮壮苗 Dwarf seedling	对照 Control	矮壮苗 Dwarf seedling	对照 Control	矮壮苗 Dwarf seedling	对照 Control	矮壮苗 Dwarf seedling	对照 Control
	R1000	98.2	88.9	8	7	98.2	88.9	15.4
R1601	96.7	89.2	8	8	96.7	89.2	14.1	5.6

\* 同表 1, Same as in Table 1.

## 2.4 毛状根的生长和次生代谢物的产生

培养 4 周后, 毛状根的鲜重增加 453 倍, 干重增加 420 倍, 生长速度达  $0.3 \text{ g DW L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ 。继代 7 个月仍能保持快速生长、多分枝、无向地性的特性, 且未见愈伤组织分化。对照的生长慢甚至停滞, 鲜重仅增加 1.9 倍, 干重增加 2 倍。

少花龙葵毛状根及对照的酸提取液与碘-碘化钾试剂、碘化汞钾试剂反应结果均为阳性, 表明含有生物碱。培养 4 周的毛状根粗总糖苷生物碱含量为  $41 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ , 为对照的 31 倍, 皂甙含量为  $1.8 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ , 为对照的 107 倍。

## 3 讨论

发根农杆菌 R1000 具质粒 pRiA<sub>4</sub>b<sup>[9]</sup>。发根农杆菌 R1601 也具质粒 pRiA<sub>4</sub>b, 并且其中的 Hind III 片段 21 上整合有 NPT II 基因, 染色体背景与 C<sub>38</sub> 相同。该菌还具有超致病根癌农杆菌 pTiBo542 的 Vir 区的粘性质粒 pTVK291<sup>[10]</sup>。本实验中发根农杆菌感染少花龙葵叶片和茎段产生的毛状根均由切口处的愈伤组织上发生, 但偶有毛状根从叶片非切口处长出, 这可能是由于叶片在操作过程中因机械损伤而感染发根农杆菌所致。叶片和茎段均以形态学下端生根较多, 可能与生长素的极性运输有关<sup>[11]</sup>。感染后只得到一种形态的毛状根, 这与少花龙葵的近种龙葵 (*Solanum niger*) 的转化结果类似, 但转化效率比龙葵原生质体高<sup>[12]</sup>。

PP<sub>333</sub> 在离体培养中具有使试管苗矮壮、改善试管苗生长状况的作用<sup>[13]</sup>。用矮壮苗叶片进行转化, 外植体存活率提高, 有助于克服叶片在转化操作过程中出现褐化甚至死亡的问题。

菌液浓度是转化过程中常常被调整的因素。菌液浓度过高, 发根农杆菌生长过快, 不易被抗生素杀死, 易导致外植体受到伤害、发生褐化甚至死亡; 菌液浓度过低, 又无法感染外植体。用 MS 基本培养基稀释 1 倍的菌液感染少花龙葵叶片, 转化效果较好。

少花龙葵毛状根培养物生长快, 能长期保持其毛状根的特性, 有较强的次生代谢物合成能力, 具有生产次生代谢物的可能性。

## 参考文献:

- [1] White F F, Nester E W. Hairy root; plasmid encodes virulence traits in *Agrobacterium rhizogenes* [J]. J Bacteriol, 1980, 141:1134-1141.
- [2] Teper D. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes* [J]. Physiol Plant, 1990, 79:104-146.
- [3] 周立刚, 王君健, 杨崇仁. 植物毛状根的培养及其化学进展, I 植物毛状根的诱导形成与培养 [J]. 天然产物研究与开发, 1998,

- 10(3):87-95.
- [4] 谭文澄. 茄属六种植物的组织培养 [J]. 植物生理学通讯, 1984, 1:38-41.
- [5] 《广东中药志》编辑委员会. 广东中药志(第二卷) [M]. 广州:广东科技出版社, 1996.
- [6] Ellis D, Roberts D, Sutton B, et al. Transformation of white spruce and other conifer species by *Agrobacterium rhizogenes* [J]. *Plant Cell Reports*, 1989, 8:16-20.
- [7] Ehmked A, Ohmstede D, Ellert U. Steroidal glycoalkaloids in cell and shoot teratoma cultures of *Solanum dulcamara* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1995, 43:191-197.
- [8] 郭晓庄. 有毒中草药大词典 [M]. 天津:天津科技翻译出版公司, 1992.
- [9] White E 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]. *J Bacteriol*, 1985, 164:33-44.
- [10] 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 [J]. *Bio/Techn*, 1987, 29(5):1323-1327.
- [11] 施成平. 发根农杆菌对黄瓜的遗传转化及毛状根中内源激素的变化 [D]. 广州:华南师范大学博士研究生毕业论文, 1996.
- [12] Mugnier J. Establishment of new axenic hairy root lines by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes* [J]. *Plant Cell Reports*, 1988, 7:9-12.
- [13] 赵成章, 郑康乐, 戚秀芳. 多效唑对水稻未成熟胚愈伤组织诱导、分化和壮苗的影响 [J]. *植物学报*, 1990, 32(5):407-409.

## 图版说明

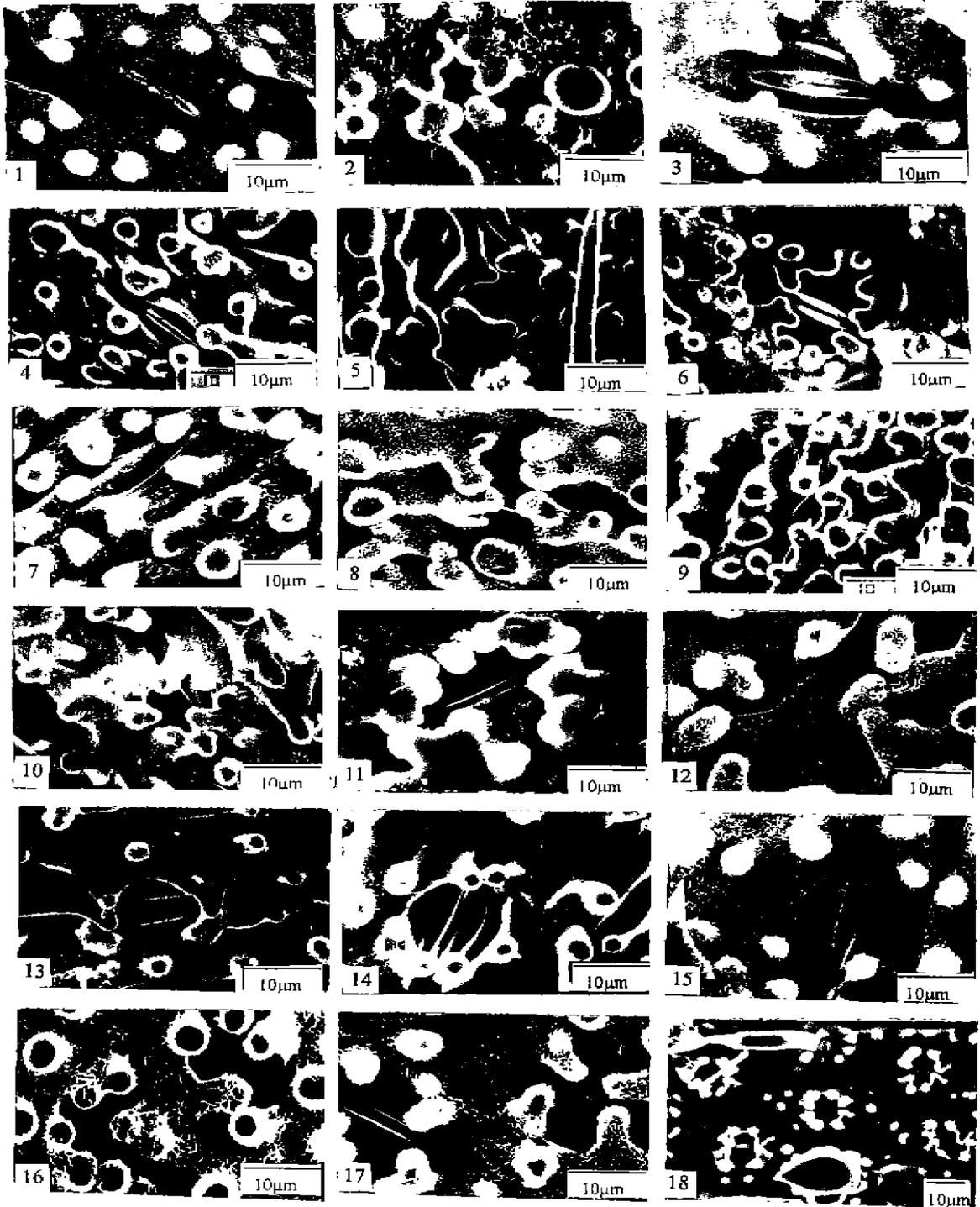
### 图版 I

1. 对照, 培养 2 周的少花龙葵叶片;
2. 发根农杆菌 R1000 感染 2 周后的少花龙葵叶片诱导出的毛状根;
3. 发根农杆菌 R1601 感染 2 周后的少花龙葵叶片诱导出的毛状根;
4. 在修改的 MS 液体培养基上生长 4 周的少花龙葵毛状根;
5. 对照, 培养 2 周的少花龙葵茎段;
6. 发根农杆菌 R1601 感染 2 周后的少花龙葵茎段诱导出的毛状根。

## Explanation of plate

### Plate I

1. Control leaf of *Solanum phaeinocarpon*, after culture for 2 weeks;
2. Hairy roots induced from leaf of *S. phaeinocarpon* infected by *Agrobacterium rhizogenes* strain R1000 after culture for 2 weeks;
3. Hairy roots induced from leaf of *S. phaeinocarpon* infected by strain R1601 after culture for 2 weeks;
4. Hairy roots cultured on modified MS liquid medium for 4 weeks;
5. Control stem of *S. phaeinocarpon*, after culture for 2 weeks,
6. Hairy roots induced from stem of *S. phaeinocarpon* infected by strain R1601 after culture for 2 weeks.



See explanation at the end of text