

露水草毛状根的诱导和培养*

周立刚² 杨崇仁¹⁺ 王君健²

(¹中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

(²华中理工大学药物研究所, 武汉 430074)

摘要 发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) pRi 15834 菌株感染露水草 (*Cyanotis arachnoidea*) 的茎和根的外植体及小苗, 均诱导出毛状根。毛状根能在不含激素的 MS 培养基上生长。用纸电泳和高效薄层层析法, 在毛状根中检测到甘露碱。用 Southern 印迹杂交, 在植物 DNA 中检测到 rolC 基因。表明 Ri 质粒的 T-DNA 部分已转移到毛状根细胞的 DNA 中。该毛状根能产生 β -蜕皮激素。露水草毛状根的诱导培养在单子叶植物中是一个成功的先例。

关键词 露水草, 毛状根, β -蜕皮激素, 发根农杆菌, Southern 印迹杂交, 甘露碱

INDUCTION AND CULTURE OF HAIRY ROOTS OF CYANOTIS ARACHNOIDEA

ZHOU Li-Gang², YANG Chong-Ren¹⁺, WANG Jun-Jian²

(¹Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204)

(²Institute of Materia Medica, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074)

Abstract A hairy root system of *Cyanotis arachnoidea* C. B. Clarke has been established from its intact plants, and the root and leaf explants by using a wild strain pRi 15834 of *Agrobacterium rhizogenes*. The hairy roots grew well on MS hormone free agar medium. Mannopine was characterized in the transformed roots by paper electrophoresis and high performance thin layer chromatography. The genomic DNA analysis of the hairy roots was carried out by Southern hybridization and chemiluminescent detection. The rolC bacteria gene existed in the nuclear genome of the roots. This indicated that T-DNA of Ri plasmid was inserted into plant DNA. The hairy root system of *C. arachnoidea* is one of the few examples of monocotyledous plants for inducing hairy roots.

Key words *Cyanotis arachnoidea*, Hairy root, β -ecdysone, *Agrobacterium rhizogenes*, Southern blot, Mannopine

用发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 诱导形成毛状根 (hairy root) 或称转化根 (transformed roots), 并通过毛状根的大量培养, 生产有用的植物次生代谢产物, 在迅速发展的植物生物技术领域中日益引起重视。双子叶植物的毛状根诱导与培养方面已有不少报道, 个别研究已进入中试或小规模的生产阶

*国家自然科学基金资助课题(29272071)

+通讯联系人 Author to whom correspondence should be addressed

1995-04-07 收稿, 1995-06-15 修回

段 (Saito 等, 1992)。而单子叶植物毛状根的诱导和培养, 迄今尚未见成功的先例。

露水草 (*Cyanotis arachnoidea* C. B. Clarke) 系鸭跖草科 (*Commelinaceae*) 多年生草本植物, 主产云南, 富含 β -蜕皮激素 (β -ecdysone, 或称 20-hydroxyecdysone), 是迄今为止工业化大量生产蜕皮激素的最佳天然原料 (聂瑞麟等, 1983)。我们曾报道用露水草的外植体诱导形成正常根及其培养, 以及培养根中蜕皮激素的形成 (周立刚等, 1996)。本文报道用发根农杆菌诱导露水草毛状根的形成, 以及培养的毛状根中 β -蜕皮激素的分析测定。

材料和方法

细菌菌株及培养

发根农杆菌 pRi 15834 在 YEB 培养基中, 28 °C 暗培养 2 天后于 4 °C 保存, 30~40 d 继代培养 1 次。感染植物材料之前, 将农杆菌置于 28 °C 活化培养 24 h。

无菌植株和愈伤组织的获得

露水草种子灭菌后, 接种到不含激素的 MS 培养基上, 光照 16 h/d, 光强 $57\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$, 21 °C 发芽并长成植株。将无菌植株的外植体 (即根、茎、叶切段) 置于含 2,4-D 2mg/L 和 KT 0.1mg/L 的 MS 培养基上, 21 °C 暗培养, 即可诱导出愈伤组织。

毛状根的诱导

将上述培养的无菌苗外植体 (根、茎和叶切段) 和愈伤组织浸于含有发根农杆菌的 MS 培养液中 10 min, 取出, 用无菌滤纸吸干放回原培养基上继续培养 2 d, 然后转入 MS 加头孢噻肟钠 (cefotaxime) 的培养基 (500 mg/L) 上, 于 21 °C 暗培养。亦可刺伤无菌苗的茎节后, 小心涂上含有发根农杆菌的 MS 培养液, 将幼苗植入原培养基上继续培养。

冠瘿碱的检测

按 Dahl 等 (1983) 方法, 进行纸电泳的分析条件是 45 volts/cm, 50 min。亦可用高效薄层层析 (HPTLC) 法, HPTLC 板为 Silica gel 60F254 (Merck), 展层剂为正丁醇-冰醋酸-水 (2:1:1, v:v), 用 0.5% 茚三酮 (丙酮配制) 显色。

DNA 分析

植物材料 DNA 的提取 参照 Rogers 和 Bendich (1985) 的 CTAB 法, 提取露水草的正常根和毛状根的 DNA。

探针 rolC DNA 的提取、纯化和标记 鉴定毛状根所用的探针 DNA 来自 pUC19C Δ P 质粒 (由 Max Planck Institute Clogne 提供), 克隆在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中。该质粒用 EcoR I 和 Hind III 酶切后, 通过电泳即可获得纯化的探针 rolC DNA, 然后进行探针的 biotinylation。

Southern 印迹杂交 (Southern, 1975) 分离出的植物 DNA 经 EcoR I 和 Hind III 酶切后, 在 0.6% 的琼脂糖凝胶上电泳, 采用 Southern 印迹杂交的标准方法, 将 DNA 从胶上转移到 immobilon-S 膜上, 即可进行 Southern 印迹杂交, 滤膜加标记的探针 DNA 在 65 °C 杂交 24 h, 然后进行化学发光 (chemiluminescence) 检测。

β -蜕皮激素的测定

用 HPLC 法测定 β -蜕皮激素的含量, 具体方法如前文所述 (周立刚等, 1996)。

结 果

露水草毛状根的诱导

露水草外植体在无激素的 MS 培养基上连续培养 1 个月, 无一生根, 随着培养时间的延长, 外植体逐渐死亡。用发根农杆菌感染的根、茎、叶外植体, 几日后从茎和根的切段部位长出少量的愈伤组织, 10 d 后从愈伤组织上长出少量毛状根 (图版 I:6,7), 但未能从叶外植体获得毛状根。

将无菌苗茎节处刺伤, 并涂以发根农杆菌菌液, 1 周后, 从茎节处长出毛状根 (图版 I:2,3), 所诱导的毛状根转入无激素的 MS 固体培养基上继续培养, 毛状根生长迅速, 且分枝多, 失去向地性生长, 表现出典型的毛状根性状特性 (图版 I:4)。如果将无菌苗的茎节处刺伤, 涂以蒸馏水或新鲜培养基, 从茎节处均不发生毛状根。如果将正常植株的根切下, 在无激素的 MS 培养基上培养, 该根生长缓慢, 随着时间的延长而逐渐死亡。在开始诱导时, 某些根长得很快, 如果将其转移到新鲜培养基上, 生长会逐渐减慢, 这可能是由于在开始时, 细菌分泌一些化学物质, 促进根的形成和生长, 随着细菌的除去, 这些未转化的根也随之死亡。

露水草毛状根的鉴定

诱导形成毛状根的关键是农杆菌 Ri 质粒的 T-DNA 部分转移到植物细胞内的 DNA 中, 通过基因表达诱导毛状根。因此, 培养物中冠瘿碱 (opine) 及其衍生物的检测及 DNA 分析是鉴定毛状根的重要依据。

甘露碱的检测 分别用 1% 热盐酸和热水从农杆菌诱导的培养根中提取冠瘿碱 (opine) 及其类似物, 纸电泳结果表明, 培养物中除含有甘露碱 (mannopine) 外, 还含有其它冠瘿碱类成分, 见图版 I:4, 由于标准品的限制, 未作进一步鉴定。对照组即正常根培养物中没有发现冠瘿碱类成分。实验表明, 该材料用水提取冠瘿碱, 效果更好, 这与文献报道 (Petit 等, 1983) 是有差别的。

高效薄层层析分析表明, 在毛状根培养物中亦有甘露碱的存在 (图版 I:5)。用 0.5% 茚三酮的丙酮液作显色剂显色效果优于 0.5% AgNO_3 。

DNA 分析 研究结果表明, 农杆菌的 *rolC* 基因存在于毛状根的细胞核中 (图版 I:8), 这表明细菌 Ri 质粒的 T-DNA 部分已导入植物 DNA 中。

毛状根中 β -蜕皮激素含量的测定

高效液相色谱分析结果表明, 毛状根培养物中含有 β -蜕皮激素, β -蜕皮激素的含量为干重的 0.005 mg/g。

讨 论

在双子叶植物中, 通过发根农杆菌的 Ri 质粒转化诱导形成毛状根的例子很多 (Saito 等, 1992), 然而在单子叶植物中, 尚未见成功的报道 (White 等, 1985; 陶余敏等, 1992)。用农杆菌对植物进行有效的遗传转化主要取决于: (1) 农杆菌是否能够将 T-DNA 送入寄主植物细胞; (2) 植物本身是否能够富集具有再生能力与整合转化能力的感受态细胞。农杆菌对单子叶植物细胞的转化频率很低, 可能是由于大多数单子叶植物的感受态细胞不具备有创伤反应 (陶余敏等, 1992)。露水草为鸭跖草科单子叶植物, 我们采用一系列的发根农杆菌菌株进行诱导培养, 仅 pRi 15834 菌株成功地 在无菌苗的刺伤部位诱导毛状根。该毛状根培养系的建立, 为单子叶植物进行诱导培养毛状根提供了一个先例。

采用的 Ri 质粒属农杆菌型 (agropine type), 其 T-DNA 的一部分已导入植物细胞 DNA 中, 该 T-DNA 的 TL (左侧) 部分具有诱导根形成的作用, 其 TR (右侧) 部分含有形成生长素的基因, 这样

有利于根的形成和生长 (White 等, 1985)。T-DNA 的另一个顺序是含有合成冠瘿碱的基因, 这样可以通过检测冠瘿碱的有无来判断根是否被转化, 当然毛状根的鉴定还包括形态学的依据。冠瘿碱是农杆菌生长所需的碳源, 至今还未见到冠瘿碱是否对植物的生长及其次生代谢影响的报道。

通过纸电泳, 毛状根中除了甘露碱, 还有其它与硝酸银显色的物质, 由于没有标准品对照, 未作进一步研究, 据文献报道 (Petit 等, 1983), 这些化合物可能是甘露酸 (mannopinic acid)、农杆菌酸 (agropinic acid)、和农杆菌碱 (agropine)。到目前为止, 还未见到用 HPTLC 方法来鉴定毛状根中冠瘿碱的报道, 本文采用 HPTLC 方法检测毛状根中冠瘿碱的存在, 发现甘露碱很容易与茛三酮反应, 由于 HPTLC 方法简单、经济, 且耗时短, 因此, 可以认为是冠瘿碱性测定的一种行之有效的方法。

在实验过程中, 也偶尔碰到这样的情形, 即有些根培养物虽然表现出典型的毛状根生长特性, 用纸电泳和 HPTLC 方法却检测不到任何的冠瘿碱成分, 如果采用 Southern 印迹杂交方法, 可证明农杆菌 DNA 已整入到植物细胞中。这可能是在毛状根诱导形成过程中合成冠瘿碱的基因未能同时导入植物细胞中。因此, 在毛状根的鉴定方面, 尤其是在用其它方法难以鉴定的情况下, DNA 分子杂交不失为一种较为理想的方法。

露水草毛状根培养物, 能和原植物一样产生 β -蜕皮激素, 这为进一步研究蜕皮激素类化合物的生物转化和生物合成、以及毛状根大量培养生产 β -蜕皮激素创造了条件。毛状根培养物中, β -蜕皮激素的含量还比较低, 有待于进一步提高。

致谢 本文的部分工作是在法国 LVMH RECHERCHE 完成的, 得到该研究所 Dr. A. Meybeck, Dr. M. Boulay, Dr. F. Bonte 等诸位先生的大力支持协助。

参 考 文 献

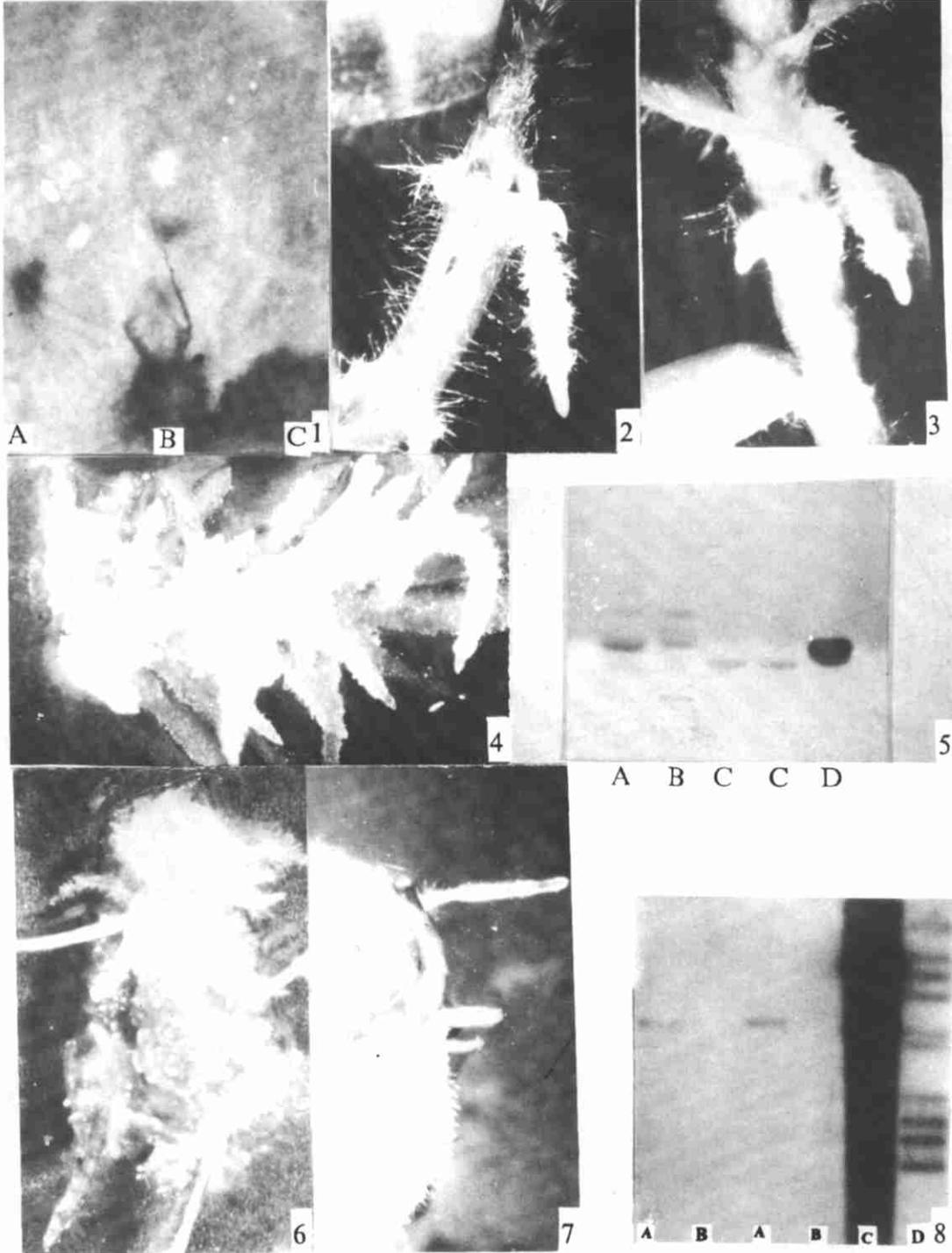
- 周立刚, 杨崇仁, 1996. 露水草的根培养和 β -蜕皮激素的形成. 云南植物研究, **18**(1): 99~104
- 聂瑞麟, 岳远征, 1983. 栽培露水草 β -蜕皮激素含量的测定. 云南植物研究, **5**(3): 317~318
- 陶余敏, 唐锡华, 1992. 农杆菌转化单子叶植物的可能性及问题. 植物生理学通讯, **28**(6): 402~406
- Dahl G A, Guyon P, Petit A. *et al.*, 1983. Silver nitrate positive opines in crown gall tumors. *Plant Sci. Lett.* **32**: 193~203
- Hooykaas-Van Slogteran G M S, Hooykaas P J, Schilperoost R A, 1984. Expression of Ti plasmid genes in monocotyledonous plants infected with *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, **311**: 763~764
- Petit A, David C, Dahl G A *et al.*, 1983. Further extension of the opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Mol Gen Genet*, **190**: 204~214
- Rogers S O, Bendich A S, 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbaceous and mummified plant tissues. *Plant Mol Biol*, **5**: 69~76
- Saito K, Yamazaki M, Murakoshi I, 1992. Transgenic medicinal plants: *Agrobacterium*-mediated foreign gene transfer and production of secondary metabolites. *Journal of Natural Products*, **55**(2): 149~162
- Southern E, 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, **98**: 503~517
- White F F, Taylor B H, Huffmann G A. *et al.*, 1985. Molecular and genetic analysis of the transferred DNA region of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *J Bacteriol*, **164**: 33~44

图版说明

图版 I 1. 露水草毛状根水提取物的纸电泳, A: 标准样品甘露碱, B: 毛状根提取物, C: 正常根提取物。2,3. 从无菌苗茎节处诱导出毛状根。4. 毛状根在无激素的 MS 固体培养基上生长。5. 毛状根水提取物的高效薄层层析, A: 毛状根提取物, B: 正常根提取物, C: 标准样品甘露碱, D: 谷氨酸。6. 从根外植体诱导出毛状根。7. 从茎外植体诱导出毛状根。8. Southern 印迹杂交, A: 毛状根样品, B: 正常根样品, C: 非标记 rolc, D: 标准 DNA 片段。

Explanation of Plates

Plate I 1. Paper electrophoresis of water extracts of hairy roots of *Cyanotis arachnoidea*. A: standard mannopine, B: hairyroot extract, C: normal plant root extract. 2, 3. The roots emerged from the infected area. 4. hairy roots subcultivated on MS hormone free agar medium. 5. HPTLC of water extracts of the roots. A: transformed roots, B: normal plant roots, C: mannopine, D: glutamine. 6. hairy roots induced from stem explants. 7. hairy roots induced from leaf explants. 8. Southern blots of roots. A: hairyroots, B: normal plant roots, C: non labelled probe rolc, D: standard fragments of DNA



See explanation at the end of text