

发根农杆菌 Ri 质粒及其在植物次生代谢物质生产中的应用

林 丽, 范海延, 潘 野, 赵 朔

(沈阳农业大学 生物科学与技术学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要: 阐述了发根农杆菌的生物学特性及 Ri 质粒的结构与功能, 介绍了毛状根的诱导、鉴定及分离培养的具体方法和发状根的特性, 探讨了发根农杆菌转化植物的影响因素, 并对利用植物发状根培养体系进行次生代谢物质生产方面的研究进行了综述和展望。

关键词: 发根农杆菌; Ri 质粒; 发状根; 次生代谢物质

中图分类号: S 154.38⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)11-0094-04

1 发根农杆菌 Ri 质粒

1.1 发根农杆菌的生物学特性

发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)是根瘤菌科(Rhizobiaceae)农杆菌属(*Agrobacterium*)一类革兰氏阴性土壤细菌, 能够侵染大多数双子叶植物和少数单子叶植物及裸子植物, 使植物产生毛状根。

根据转化植物体产生冠瘿碱(Opines)的不同, 发根农杆菌及其 Ri 质粒分为 4 类: 农杆菌型(Agropine type)、甘露碱型(Mannopine type)、黄瓜碱型(Cucumopine type)和异黄瓜碱型(Mikimopine type)等。发根农杆菌对植物细胞的转化能力和致根特性与其所带的 Ri 质粒类型有关, 研究表明农杆菌型的发根农杆菌通常比其它类型的农杆菌有更广的宿主范围。

1.2 Ri 质粒的结构与功能

Ri 质粒是位于发根农杆菌染色体之外的独立的双链环状 DNA, 一般在 180~250 kb 之间, 分为 vir 区(virulanceregion)和 T-DNA 区(Transferred DNA region)。

农杆菌型 Ri 质粒上的 T-DNA 是不连续的, 分为 T_L-DNA 和 T_R-DNA, 两区之间是大约 15kb 的非转移 DNA。T_L-DNA 上有农杆菌素(ags)合成有关的基因和形成发状根及其形态特征的基因 rolA、B、C、D (甘露碱型、黄瓜碱型也存在)。rolA 基因表达使植株矮化、叶片皱缩、花序缩短、缺乏根的生长。在烟草中, rolA 基因可以单独诱导毛状根, 但在高凉菜属中则不能。rolB 是形成毛状根的关键基因, 其表达引起植株产生大量的毛状

根, 根具有生长迅速、高度分叉、斜向生长的特点。此外, rolB 基因表达还可引起愈伤组织中出现细胞坏死和幼嫩植株的叶片上出现枯斑。在胡萝卜、烟草、高凉菜属中 rolB 都可以单独诱导毛状根的形成。rolC 基因在烟草中表达导致植株变矮、顶端优势减弱、叶片色素含量下降、雄性不育。转 rolD 基因植株开花明显提前^[1]。T_R-DNA 上有农杆菌素(ags)合成有关的基因和生长素 IAA 合成基因 tms 1 和 trns 2, 因此转化产生的毛状根在培养时不需要添加外源生长激素, 为激素自养型。在转化过程中, T_L-DNA 的长度具有较高的稳定性, 而 T_R-DNA 则可以缺失或在一定范围内变动。T_L-DNA 和 T_R-DNA 都可单独转化植物产生发状根, 单独的 T_L-DNA 转化植物产生发状根时表现出对生长素的依赖性。T_L-DNA 和 T_R-DNA 共同作用时, 转化能力大大提高, 这表明两者在转化时具有协同作用。甘露碱型和黄瓜碱型 Ri 质粒上是一段长约 20kb 的连续 T-DNA, 其上 T-DNA 不含生长素合成基因, 与农杆菌型 Ri 质粒的 T_R-DNA 没有明显的同源性, 但与 T_L-DNA 具有高度同源的片段, 如果存在 Vilaine 推测的 T_L转化和 T_R转化两种机制, 那么甘露碱型和黄瓜碱型 Ri 质粒则很可能采取与 T_L转化相似的分子机制。甘露碱型 Ri 质粒的致病性较弱, 感染时有外源生长激素的存在可提高毛状根的转化率, 产生的毛状根能够在无激素培养基上迅速增殖。3 种质粒 T-DNA 两端各有 25bp 重复序列(direct repeat sequence), 是 T-DNA 从 Ri 质粒上切出的酶切位点, 此序列不能形成发状根。T-DNA 右端边界存在三叶草式的碱基结构, 感染效率极高^[2]。

3 种 Ri 质粒上的 vir 区具有很高的保守性, 有 virA、B、C、D、E、F、G 七个基因位点。vir 区基因虽不发生转移, 但是它对 T-DNA 的转移却起着非常重要的作用。农杆菌侵染植物时首先是 chv 的参与下吸附到植物细胞壁上, 之后 virA 蛋白感受植物受伤细胞产生的信号

第一作者简介: 林丽(1982-), 女, 辽宁沈阳人, 硕士, 研究方向为植物发育生物学。E-mail: linli_1209@163.com.

通讯作者: 范海延.

基金项目: 沈阳市科学技术基金资助项目(1053125-1-51)。

收稿日期: 2007-08-06

(酚类化合物、糖类等),自身发生磷酸化,进而将其磷酸基转移 *virG* 蛋白保守的天冬氨酸残基上,使 *virG* 蛋白活化,活化的 *virG* 蛋白以二体或多体的形式结合到其他 *vir* 基因启动子的特定区域,从而激活其他基因转录 *T*-DNA 切割、包装、转移所需的功能蛋白,在活化的 *vir* 区域基因群作用下 *T*-DNA 被切下呈环状 *T*-DNA,环状 *T*-DNA 插入植物基因组 DNA,插入的植物基因组的 *T*-DNA 基因转录与转译,使宿主植物发生表现型的变化(如发生毛状根等)。

2 Ri 质粒的转化及影响因素

2.1 Ri 质粒的转化方法

2.1.1 植物体直接接种法 将植物种子消毒后,在合适的培养基上进行萌发,长出无菌苗。取茎尖继续培养,等无菌植株生长到一定时候,将植株的茎尖、叶片切去,剩下茎杆和根部,在茎杆上划出伤口,将带 Ri 质粒的农杆菌接种在伤口处和茎的顶部切口处,接种后继续培养被感染的植株。经过一段时间培养,在接种部位产生毛状根。这种方法是最为简便的,但它仅适合于可以用茎尖继代培养的植物。

2.1.2 外植体接种法 取植物的叶片、茎段、叶柄等无菌外植体,与农杆菌共同培养 2~3 d,将植物的外植体移到含有抗生素的选择培养基上进行培养,经过不断继代培养,农杆菌被杀死,转化细胞产生愈伤组织,并可诱导产生毛状根。

2.1.3 原生质体共培养法 将愈伤组织按常规方法制备成原生质体,原生质体再生细胞与农杆菌混合,共同培养,农杆菌对原生质体进行转化。经过在含有抗生素的选择培养基上对转化细胞进行筛选,得到转化细胞克隆,最后在分化的培养基上得到完整植株。原生质体共培养法要求原生质体有较高的再生率,对那些原生质体培养还没有成功或再生率很低的植物难于使用这种方法。

2.2 影响转化的因素

2.2.1 植物种类 目前采用转化成功的植物主要是草本植物,尤以双子叶植物为多,也有为数不多的单子叶植物(如桔楼、旱墨莲、露水草)和少数木本植物(如银杏)等诱导成功。

2.2.2 外植体的选择 已成功诱导出毛状根的植物外植体有叶片、茎、子叶、愈伤组织、下胚轴等多种,但不同的外植体发状根的诱导率不同,王跃华等(2006)用 ATCC 15834 对川黄柏子叶、下胚轴、带芽下胚轴、幼茎、根、叶柄不同部位的外植体进行感染诱导,结果表明带芽下胚轴发状根诱导率最高为 43.02%,而子叶、叶柄和根未能诱导出发状根^[3]。究竟植物的哪一部分器官最适合用于转化,并无严格的规律可循,但一般采用的都是较幼嫩的组织,因这些细胞处于旺盛的分裂状态,容易接受外源 DNA。

2.2.3 菌株种类 目前采用的发根农杆菌主要有天然

农杆菌型的 A4、ATCC 15834、16834、LBA9402 及 1601、R1000、R1200 等人工构造质粒;还有黄瓜碱型的 2635、2657、2659 等;以及甘露碱型的 5196、TR101、TR7 等,每一种菌株对不同植物的发根能力是不同的。杨世海等(2006)用发根农杆菌菌株 LBA9402、R1601 感染甘草, LBA 9402 比 R1601 表现出较强的感染力^[4]。胡萝卜和大白菜上,农杆菌型菌株比黄瓜碱型菌株致根力强^[5]。

2.2.4 菌种浓度 一般菌种浓度过大,细菌生长迅速一定程度上抑制细胞代谢过程,且不易除菌;浓度太稀,能附着在细胞的细菌太少,不足以形成足够的毛状根。宋志红等(2004)发现在对数期(OD₆₆₀在 0.5~0.8 之间)转化频率显著提高^[6]。

2.2.5 预培养时间 外植体产生伤口后在愈合过程中会形成乙酰丁香酮等物质并释放出来作为诱导发根农杆菌识别的信号分子,因此发根农杆菌侵染前要经过一定时间预培养,使受体能形成并释放这种信号分子,提高转化率。同时经农杆菌感染的外植体伤口处细胞因为过敏反应而可能导致褐化,严重影响根的形成及转化效率,预培养也能较好的解决褐化问题。韩晓玲等(2003)利用野生型发根农杆菌 15834 菌株感染小冠花 15 日龄无菌苗子叶和下胚轴切段,发现预培养 2d 的子叶和下胚轴转化频率最高,分别为 58%和 41.2%,未经预培养或预培养时间超过 4 d 转化频率均较低^[7]。

2.2.6 浸泡和共培养时间 用烟草叶片在菌液中分别浸泡 1、5、10、30、60 min 后进行转化,结果表明 5 min 可达到较高转化率,时间过长超过 30 min 叶片死亡率上升^[11]。转化后叶片共培养 1~4 d 有不同的转化率,共培养 2 d 转化率最高,过早的结束共培养,转入抗生素虽可抑制菌的增殖,但也明显降低了发根诱导率,共培养时间过长,由于农杆菌过量增殖而致使叶片组织死亡率升高,而且增加了除菌的难度,转化率也大幅下降。

2.2.7 诱发因子 外源激素影响:在共培养阶段加入适量外源激素,对转化也有一定影响。王冲之等(1999)用添加 2,4-D 1 mg/L,KT 0.1 mg/L 的 MS 培养基上为不能诱导出毛状根,而在添加 NAA 6 mg/L 的 MS 培养基上进行农杆菌和外植体共培养,则成功获得了毛状根^[8]。酚类物质的使用:植物受伤后产生的酚类物质能激活 *vir* 基因,促使 Ri 质粒向植物细胞转移,在转化系统中加入某种酚类物质可以促进基因转化。目前广泛使用的是 AS、羟基乙酰丁香酮(OH-AS)和香草酚等酚类物质。添加适量 AS 能显著提高发状根的转化效率,但是过量的 AS 对外植体有毒害作用,影响转化效果。此外采用渗透保护剂甜菜碱和脯氨酸也可诱导 *vir* 基因的表达,其作用可能与加强细菌对渗透压的耐性有关^[9],添加适当的表面活性剂也可以促进 *T*-DNA 的转化^[10]。糖类物质:发根农杆菌 Ri 质粒的 *rolC* 生根基因的启动子活性受蔗糖浓度的调节^[11],糖类物质可以协助

乙酰丁香酮等物质诱导产生高水平的 *vir* 区基因表达, 从而提高转化率。

2.2.8 培养基组成 一般而言, 高盐培养基如 MS、LS 等有助于毛状根的形成, 而低盐培养基如 B5 等则有助于细菌增殖。在毛状根形成后的除菌过程中, 除菌比较困难。

2.2.9 超声波和真空渗透处理 赵东利等(2002)采用真空 7.0×10^4 Pa 渗透 15 min 可有效提高发根农杆菌对苦豆子的转化频率^[12]。真空渗透处理在植物材料表面产生很多微损伤, 抽真空后形成的负压使农杆菌更紧密地吸附于外植体伤口及伤中内细胞间隙, 促进 T-DNA 向植物细胞的导入。超声波处理也可在外植体上产生许多微小伤口, 从而提高农杆菌与外植体之间的接触面积, 提高转化频率^[13]。

此外, 其他转基因方法或某些物理因素与农杆菌介导转化技术联用也能有效地提高转化效率。

3 发状根的培养

3.1 发状根的鉴定

被诱导出的毛状根和正常根在形态上存在着很大的差异, 毛状根在无激素的培养基上生长迅速, 并具有多根毛、多分枝、无向地性等特点。毛状根在液体培养基中生长速度, 往往大于相应的细胞培养物或未转化的根培养物, 这些表型为判定毛状根提供了简单而又方便的依据。同时, 发状根根尖没有典型的根冠结构, 分生区与伸长区之间的界限也不明显。于静等对膜荚黄芪发状根根冠细胞的亚显微结构进行研究发现: 发状根根尖没有分化出典型的根冠结构; 根冠平衡囊细胞中淀粉粒分布无极性, 散布于细胞质; 细胞中未发现粗面内质网, 仅有滑面内质网的存在; 高尔基体分泌功能不旺盛, 无肥大的液泡; 细胞壁较薄, 纵向壁略加厚, 其间无粘液积累; 根冠外周细胞透渐老化, 但细胞壁不溶解, 老化的细胞不脱落, 且根冠细胞层数不增加^[14]。Ri 质粒 T-DNA 带有冠瘿碱合成酶基因, 转化的植物细胞可以产生冠瘿碱。目前, 常常用高压纸电泳法进行冠瘿碱的检测, 用硝酸银试剂或磷钼酸试剂染色。另外, 使转化细胞带有合适的选择标记, 如新霉素磷酸转移酶(NPT-I)基因、氯霉素乙酰转移酶(CAT)基因等抗生素抗性基因可以有效选择转化细胞, β -葡萄糖苷酸酶(GUS)基因、荧光素酶基因等报告基因的应用, 能直接检测外源基因的表达, 对于鉴别转化子十分重要。经过上述方法的筛选、鉴别, 在抗性克隆及其再生植株中, 仍会存在一定比例的假阳性, 需进一步作点杂交、Southern blotting 杂交分析, 才能最终确定外源基因是否整合到受体细胞染色体组中。

3.2 发状根的分离培养

由于一条毛状根起源于一个细胞, 所以将每条毛根作为一个克隆在含抗生素的培养基上培养, 直到完全除菌, 也可用高温(37~40℃)除菌。转化根在不加外源激

素的培养基上可快速生长, 多分支, 无向地性。建立发根培养系统要选择生长速度快, 分支较多的毛状根进行扩大培养, 对生长速度慢的根要剔除。

毛状根的增值培养常在低盐浓度的液体培养基中, 黑暗、恒温条件下进行悬浮振荡培养, 适当通入氧气有利于根的生长。

4 利用发状根培养生产次生代谢物质

发状根培养技术具有如下特点: 毛状根培养不需加外源激素和暗培养的情况下生长迅速、分支多; 毛状根培养次生代谢物质含量一般远高于细胞悬浮培养且含量稳定; 利用毛状根进行生物转化研究, 可以产生某些新奇的化合物, 为制药提供新的试材; 毛状根易于分离且容易获得再生植株, 对于获得转基因药用植物或把外源基因转到可由根再生的植株具有重要的意义; 毛状根培养生产药物类次生代谢产物同样也受营养成分、诱导子、前体和基因操作等因素的影响。

由于毛状根培养的技术优势, 目前被认为是极好的获得植物次生代谢产物的原材料。同时许多过去被认为应用细胞培养技术难以合成的次生代谢物质通过毛状根技术实现了生产^[15]。近年来通过培养珍贵药用植物毛状根来获取次生代谢产物成为国内外研究的重点。到上世纪末全世界已建立了分属于 31 个科的 100 余种植物毛状根的培养系统, 其中大多数是珍贵药用植物, 如黄花烟草、曼陀罗、颠茄、莨菪、长春花、紫草、红豆杉、人参、黄连等。我国的科研工作者相继成功建立了大黄、栝楼、松蓝、野葛、决明子、龙葵、何首乌、商陆等毛状根培养系统^[16]。

利用发根农杆菌转化植物发状根为生产那些结构复杂、难于合成、在植物中含量极低、自然资源匮乏的植物次生代谢物提供了新的途径。但利用毛状根培养生产次生代谢物质大多处于试验研究阶段, 而且发根土壤杆菌对单子植物及木本植物诱导成功的例子还很少, 因此更加艰巨的任务是在优化毛状根诱导及培养条件, 提高次生物质含量的基础上, 建立起毛状根大规模培养体系, 并能利用该体系生产出人们所企盼的高含量的次生物质。

参考文献

- [1] Nilsson O. Getting to the root: the role of the *Agrobacterium rhizogenes* rol genes in the formation of hairy roots[J]. *Physiol Plant*, 1997, 100: 463-473.
- [2] 杜旻. 发根农杆菌 Ri 质粒及其在植物基因工程中的应用[J]. *药物生物技术*, 2005, 12(3): 193-196.
- [3] 王跃华. 川黄柏毛状根的诱导及活性成分的产生[J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(22): 1853-1856.
- [4] 杨世海. 甘草 Ri 质粒转化及不同理化因子对甘草毛状根生长的影响[J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(11): 875-878.
- [5] 张乐民. 发根农杆菌对胡萝卜及大白菜的转化[J]. *核农学报*, 1992, 6(4): 252-253.
- [6] 宋志红. Ri 质粒转化烟草影响因素的研究[J]. *河南农业大学学报*, 2004, 38(3): 259-262.
- [7] 韩晓玲. 农杆菌转化的小冠花发状根的诱导及其植株再生[J]. *生物*

济南市年宵花卉销售状况调查报告

陈 银, 刘 艳

(山东聊城大学 农学院园艺工程系, 山东 聊城 252000)

摘 要:通过对济南市花卉市场类型及竞争格局、2007 年年宵期间花卉产品结构、花卉消费情况、济南市花卉业存在的主要问题及对策几方面进行调查分析,发现2007 年年宵期间济南花卉市场总体形势走高,济南花卉市场已成为华东地区较大的花卉集散地并进一步扩大。但同时也存在一些问题;如品种老化、专业化水平低;由此提出一些分析和建议,以期使人们对济南花卉市场有深层次的了解。

关键词: 年宵花卉; 市场类型; 消费情况

中图分类号: S 68(252) **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2007)11—0097—05

济南市目前已是华东地区较大的花卉集散地,市场规模较大,消费群体也在逐步拉大。济南市花卉市场目前呈现一派旺盛势头,其市场规模仍在进一步增大;投资商大量涌入,客源的增多,原有市场的发展。对济南花卉市场的调查可使人们对济南花卉市场有更深入全面的认识,对于引导投资是十分有意义的。目前济南花卉市场也存在着一些问题,通过对问题的揭示和分析起到正确的导向作用,引导市场朝着健康稳定的方向发

展,实现效益格局的最优化。

1 济南市花卉市场类型及竞争格局

目前山东花卉生产面积已达 2.67 万 hm², 花卉市场 400 余个,成为北京、天津、郑州等大中城市客商重要的花卉货源集散地^[1]。

1.1 济南市花卉市场类型

济南市现有百合花卉市场、富莱花卉市场、解放桥花卉水族市场、千荷花卉市场、京林花卉市场、花园庄花卉市场、淘淘花卉市场、千佛山花卉市场、丹霞花卉市场、凤凰山花卉市场、千合花卉市场等数十家较大型的花卉市场。现就部分花卉市场进行较为详细的介绍。

1.1.1 千佛山花卉市场 位于千佛山脚下,总面积

第一作者简介: 陈银(1969-),女,本科,讲师,主要从事植物遗传育种学和园林苗圃学的教学科研工作。

收稿日期: 2007—07—31

工程学报, 2003, 22(1): 107-112.

[8] 王冲之. Ri 质粒转化西洋参的研究. 西洋参毛状根培养系统的建立及鉴定[J]. 药物生物技术, 1999, 6(2): 80-84.

[9] James D J, Uratsu S, Cheng J S, et al. Acetosyringone and osmoprotectants like betaine or proline synergistically enhance Agrobacterium-mediated transformation of apple[J]. Plant Cell Rep., 1993, 12: 559-563.

[10] 刘庆法. 农杆菌介导的小麦遗传转化条件的研究[J]. 复旦学报(自然科学版), 1998, 37(4): 569-572.

[11] Yokoyama R, Hirose T, Fujii N, et al. The rol C-promoter of Agrobacterium rhizogenes Ri plasmid is activated by sucrose in transgenic tobacco plants[J]. Mol. Gen. Genet., 1994, 244: 15-22.

[12] 赵东利. 发根农杆菌对苦豆子高频转化条件的优化[J]. 药物生物技术, 2002, 9(4): 220-223.

[13] 姚春娜. 超声波辅助的发根农杆菌对黄瓜的遗传转化[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 2004, 37(5): 77-81.

[14] 于静. 发根农杆菌 Ri 质粒诱导的黄芪发状根根冠细胞亚显微结构研究[J]. 复旦学报(自然科学版), 1996, 35(2): 189-194.

[15] R Rao S, Ravishankar G A. Plant cell culture: Chemical factories of secondary metabolites[J]. Biotechnology Advances., 2002; 20: 101-153.

[16] 张广求. 提高毛状根中次生代谢产物含量的方法与技术[J]. 重庆大学学报, 2005, 28(6): 121-124.

Studies on Agrobacterium Rhizogenes and Its Application to Plant Secondary Metabolites

LIN Li, FAN Hai-yan, PAN Ye, ZHAO Shuo
(Biotech College of Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: This article was a review about the characters of Agrobacterium rhizogenes, the structure and function of its Ri plasmid, the transferring method of hairy root and factors influencing transformation, the methods of culture and identifying hairy root and the application of Ri plasmid to plant secondary metabolites.

Key words: Agrobacterium rhizogenes; Ri plasmid; hairy root; Secondary metabolites