

利用发根农杆菌诱导毛状根的研究进展

孟凡娟¹, 王秋玉¹, 谢立波², 杨传平¹

(1. 东北林业大学 林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040 2. 黑龙江省农业科学院 园艺分院 黑龙江 哈尔滨 150069)

摘要: 对发根农杆菌进行了简单的介绍, 重点综述了利用发根农杆菌产生发根的影响因素以及检测方法及应用情况。

关键词: 发根农杆菌; Ri 质粒; 发状根

中图分类号: Q 949.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)12-0081-03

农杆菌质粒介导的基因转移系统是植物基因工程中比较完善而有效的方法。在转基因植物中有 80% 以上是由农杆菌介导转化的, 但是其中大部分是由根癌农杆菌 *Ti* 质粒介导获得的^[1]。1982 年 Chilton 报道发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 能诱导植物产生发状根 (Hairy root), 这种发状根又称毛状根, 是由发根农杆菌所含有的 Ri 质粒 (Root inducing plasmid) 引起的, Ri 质粒不仅是遗传转化的优良载体, 而且可直接感染植物细胞。

1 发根农杆菌简介

1.1 发根农杆菌的生物学特征及其类型

发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 是一种革兰氏阴性土壤细菌, 它能够感染大多数双子叶植物和少数单子叶植物及裸子植物, 引起寄主植物患毛根病。根据 Ri 质粒转化植物后产生的毛状根合成冠瘿碱 (opine) 的类型不同, 将 Ri 质粒分为 3 种类型, 甘露碱型 (mannopine type), 黄瓜碱型 (cucumopine type) 和农杆菌型 (agropine type), 发根农杆菌的致根特性与其所带的 Ri 质粒类型有关。有人对不同类型的发根农杆菌的致根特性进行了比较, 发现带有农杆菌型 Ri 质粒的农杆菌比带有甘露碱型或黄瓜碱型 Ri 质粒的农杆菌有更广的寄主范围, 即使对同一种农杆菌来说, 致根特性又与被接种的寄主植物及接种的部位有关。

1.2 发根农杆菌的结构特征

与 *Ti* 质粒一样, Ri 质粒为大型质粒, 大小为 200 ~ 800 kb。可分为可转移的 DNA 区 (T-DNA)、毒性区

(Vir 区) 和复制起始区 (Ori) 以及分解冠瘿碱的功能区等, 仅 T-DNA 区 (约 20 kb) 可被转移到寄主植物核基因组中进行整合及表达, 导致毛状根的形成。对农杆菌型 Ri 质粒而言, 其 T-DNA 可分为两个非紧密连接的 DNA 区, 分别称为 TL-DNA 和 TR-DNA^[2], 而四个与植物毛状根的形态发生及其再生植株某些形态特征有关的基因群 *rol ABCD* 都位于 TL-DNA 片段上; 而冠瘿碱合成酶基因 *ags* 和生长素合成基因 *tms1*, *tms2* 则位于 TR-DNA 区^[3]。其它 3 种 Ri 质粒只含有一段连续的 T-DNA 区。

1.3 Ri 质粒转化体的遗传特征

由发根农杆菌感染植物, 诱导产生的毛状根具有生长迅速、多分枝、多根毛、没有向地性等特点, 而且一般没有明显的生长迟滞期, 如黄芪毛状根的悬浮培养中, 毛状根最大生长量可达到初始接种量的 35 倍。毛状根的培养不需要添加外源激素。一条毛状根起源于一个细胞, 具有遗传稳定性。毛状根的这种性质及其特异表型, 为转化体的筛选提供了方便。由毛状根分化产生的再生植株表现为矮化、早熟、世代周期缩短、叶皱缩、节间短、叶幅宽、根系异常发达, 产生大量的不定根等特点。

2 影响毛状根诱导的因素

2.1 菌株

不同菌株对不同植物或不同组织的侵染能力不同。LHA9402、ATCC 15834、81601、TR105、A 41027、A42659、1855、8196、30148 等是近年来转化植物的常用菌株。这些菌株都是野生菌株, T-DNA 上没有连接外源基因。Ri15834 对裸子植物多数物种能诱导出毛状根, 这可能与 Vir 区基因和 TL-DNA 区 *rol* 基因的功能有关。同样, 位于发根农杆菌 TR-DNA 上编码生长素合成酶的基因也使得该菌种的寄主范围比其他发根农杆菌菌种更广^[3-4]。

2.2 外植体

致根性也与受体植物的种类有关, 即与被转化的外

第一作者简介: 孟凡娟(1975-), 女, 黑龙江人, 讲师, 主要研究方向为植物育种。E-mail: mfj19751@163.com。

通讯作者: 杨传平。E-mail: mfj19751@126.com。

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目 (200508); 黑龙江省博士后基金资助项目 (LBH-Z06146); 黑龙江省教育厅资助项目 (11533016)。

收稿日期: 2008-08-10

植体有关。迄今为止,由 Ri 质粒成功转化的植物大多数为双子叶植物,草本植物对 Ri 质粒的敏感性比木本植物强。受伤后酚类化合物的合成是影响植物对 Ri 质粒的敏感性的主要因素。外植体的选取十分关键,因为只有处于分裂期的细胞才能实现外源 DNA 的整合。Ackermann 等首次报道了应用发根农杆菌转化高等植物之后,相继有成功的报道,而且转化植物的种类也不再限于双子叶植物,已扩展至玉米、杨树、苹果等植物,在药用植物方面也不乏报道^[5]。

2.3 化学因子

植物受伤细胞分泌的某些酚类化合物对 vir 基因的表达有诱导作用,小分子酚类化合物是诱导 vir 区基因表达所必需的。现已发现有关的植物细胞释放的信号分子有 9 种,均为酚类化合物。目前广泛使用乙酰丁香酮及植物细胞培养液来诱导农杆菌,并在一些转化试验中取得了好的效果^[6-7]。儿茶酚、原儿茶酚、没食子酸、焦性没食子酸和香草酸等 7 种化合物处理农杆菌也可使 vir 基因高效表达^[2]。在共培时间短,难以诱导 vir 基因表达的情况下,酚类物质的使用可能会产生好的效果^[8]。乙酰丁香酮的使用还可以减小植物基因型的差异^[9],但在另一些植物的转化中,乙酰丁香酮的使用无效甚至有害^[10]。

2.4 物理因子

光对诱导毛状根有影响。大多数植物毛状根的诱导在黑暗条件下进行,而黄遵锡等^[11]发现短叶红豆杉在全天 24 h 光照条件下对毛状根的诱导效果最佳,紫苑毛状根在 12 h/d 光照条件下的诱导频率比黑暗条件下高。发根农杆菌的增殖和活力对温度也十分敏感,其最适生长温度为 25~30℃,而 vir 基因在 28℃ 时表达能力最强。pH 值对 vir 基因的活化影响极大,pH 值改变 0.3 即显著影响转化率^[11]。

3 Ri 质粒转化发状根的检测

3.1 形态

转化的毛状根在形态上有典型的症状,可以作为一种简单的目测标准。但是感染材料发根与否及发状根的形态与菌株、宿主类型、生理状态、培养条件、T-DNA 的随机插入位置与完整性等条件有关。有大量的报道植物被发根农杆菌感染以后不表现发根的病症。如 Hemstaf 用发根农杆菌感染葡萄时只出现冠瘿瘤而不出现发根。报道用发根农杆菌感染葫芦巴子叶时,产生了大量的瘤状物,有的子叶在两表面形成很短的根状突起却不能继续伸长为典型发根。

3.2 冠瘿碱检测

转化根的有无可以根据冠瘿碱的有无进行筛选。Ri 质粒 T-DNA 带有合成生长激素的基因(tms1, tms2)和冠瘿碱合成酶(nos)基因,但是该基因需要在真

核启动子的作用下才能表达,所以在原核的农杆菌细胞里不会表达出冠瘿碱。一旦 T-DNA 整合到植物细胞核基因里,在上游的宿主细胞的核启动子的启动下开始表达,产生植物本身不存在的一种低分子量的碱性氨基酸衍生物—冠瘿碱。冠瘿碱合成是转化细胞的重要特征,不但因为冠瘿碱是农杆菌的唯一能源,而且由于某些冠瘿碱能介导 Ti 质粒或者 Ri 质粒在不同农杆菌细胞之间交配转化,另外能影响 Vir 区基因的诱导,总之,冠瘿碱是介导肿瘤或发状根发生的信号分子。大多数的转化发状根都能通过高压电泳或纸层析检测到农杆菌或是甘露碱的存在,但是整合后的 T-DNA 随机性丢失也造成冠瘿碱检测的假阴性。

3.3 报告基因检测

改造的 Ri 质粒带有合适的选择标记,如新霉素磷酸转移酶(NPT II 基因)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)基因等抗生素基因可以有效地用于选择转化细胞。1,3-葡萄糖苷酶(GUS)基因、荧光蛋白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。Ri 质粒的 T-DNA 上带有一些特有的基因(rol A、rol B、rol C、rol D 等),这些基因的表达使植物表现出发根症状,它们分别定位于农杆菌型 Ri 质粒上 TL-DNA 内第 10、11、12、13 开放读码框,由于序列已经清楚,可通过设计 rol 基因的特异引物,用 PCR 提供分子生物学上的证据。

4 发根农杆菌遗传转化的应用

自 1973 年 Ackemann 首次报道了发根农杆菌转化高等植物以来,迄今为止已经有 160 多种植物成功地利用 Ri 质粒进行了转化。据报道,目前利用发根农杆菌浸染获得转化植株或毛状根的植物,主要集中在双子叶植物 30 余科 40 个属中^[12],其中绝大部分属于草本植物。在木本植物中,利用 Ri 质粒对木本植物成功转化已经有一些报道。迄今为止,利用发根农杆菌的遗传转化已在多种植物中取得成功。如康乃馨(*Dianthus caryophyllus* L.)、长春花(*Catharanthus roseus* L.)、矮牵牛(*Petunia*)、金鱼草(*Antirrhinum majus* L.)、亚美尼亚壶花(*Muscari armeniacum*)等的遗传转化系统已经建立并(或)获得了其转化再生植株^[12,4]。

除利用发根农杆菌作为植物遗传转化的载体外,更多的研究集中在利用毛状根来生产药用植物的次生代谢物或进行次生代谢物的生物转化等。与愈伤组织和细胞悬浮培养相比,毛状根具有无激素快速自主生长、遗传稳定、处于分化状态,而且拥有亲本植株的特征次生代谢途径等特点;更重要的是毛状根的次生代谢物的含量不仅更高,而且还能产生某些植物愈伤组织所不能合成的有效成分。至今为止,国内外已有 26 科 92 种药用植物如人参(*Panax ginseng*)、紫草(*Lithospermum*

erythrorhizon), 丹参(*Salvia miltiodrrhiza*), 天仙子(*Hyoscyamus muticus* and *H. albus*), 罂粟(*Opium poppy*, *papaver somni ferum* L.), 三裂叶野葛(*Pueraria phase-
oloides*)及新疆雪莲(*Saussurea involucrate* Kar. et Kir.)
等的毛状根诱导获得成功^[11-13]。

5 Ri 质粒遗传转化现状

随着研究的不断深入, 利用植物组织培养和细胞工程的方法合成药用植物次生代谢产物的技术得到日益发展和成熟, 其巨大的应用前景引起人们极大的兴趣。但是要形成工业化生产也受到了诸多因素的限制, 首先是生产周期长、前期投入大, 其次是在组织培养的前期, 常常得到的愈伤组织不产生目的产物, 或目的产物含量与天然植物含量相比含量极低; 第三, 研制和生产适应植物细胞生长的生物反应器价值不菲。所以在今后的工作中应该进一步简化转化手段, 降低成本, 使得其转化程序能够简单、方便、低廉。

参考文献

[1] 郑秀芳, 金治平. 植物遗传转化技术研究概况[J]. 河西学院学报, 2002, 10(5): 66-70.
[2] Stadel S E, Nerster E W, Zambryski P C. A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens* vir gene expression[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 379-383.
[3] Chilton M D, Tepfer D A, Petit A. *Agrobacterium rhizogenes* insert

T- DNA into the genomes of the boat plant root cells[J]. *Nature*, 1982, 295: 432-434.
[4] Parsons T J, Sinkar V P, Stettler R F. Transformation of poplar by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Bio Technology*, 1986, 4: 533-536.
[5] 周达锋, 卜学贤, 陈维伦. 发根农杆菌 Ri 质粒的分子生物学及其应用前景[J]. *植物学通报*, 1993, 10(2): 24-27.
[6] Bolton G W, Nester E W, Gordon M P. Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needs for virulence[J]. *Science*, 1986, 232: 983-985.
[7] Van Roekel J S C, Melchers J D L, Hoekema A. Factors influencing transformation frequency of tomato (*Lycopersicon esculentum*) [J]. *Plant cell Rep*, 1993, 12: 644-647.
[8] 毛善平, 许智宏, 卫志明. 毛白杨叶外植体的遗传转化[J]. *植物学报*, 1990, 32(3): 172-177.
[9] Delzer B W, Somers D A, Olf J H. *Agrobacterium tumefaciens* susceptibility and plant regeneration of 10 soybean genotypes in maturity groups to III[J]. *Crop Sci*, 1990, 30: 320-322.
[10] Catlin D, Ochoa O, Mconnick S. Celery transformation by *Agrobacterium tumefaciens*: cytological and genetic analysis of polygenes plantst[J]. *Plant Cell Rep*, 1988(7): 100-103.
[11] 黄遵锡, 慕跃林, 周玉敏. 发根农杆菌对短叶红豆杉的转化及毛状根中紫杉醇的产[J]. *云南植物研究*, 1997, 19(3): 292-296.
[12] 陶钧, 李玲. 发根农杆菌对蓝猪耳的遗传转化及毛状根再生植株的初步研究[J]. *植物生理学通讯*, 2004(6): 29.
[13] 于树宏, 刘传飞, 李玲. 影响发根农杆菌对野葛遗传转化效率的因素[J]. *应用与环境生物学报*, 2001, 7(5): 474-477.

Progress on the Induction of Hairy Root by *Agrobacterium rhizogenes*

MENG Fan-juan¹, WANG Qiu-yu¹, XIE Li-bo², YANG Chuan-ping¹

(1. Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotchnology, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040, China; 2. Horticultural Sub- Academy, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150069, China)

Abstract: *Agrobacterium rhizogenes* was introduced in this article, the focal point of which was the influencing factors on hairy root production, detection methods and application.

Key words: *Agrobacterium rhizogenes*; Ri plasmid; Hairy root

《国家粮食安全中长期规划纲要》公布

国家发展和改革委员会 13 日公布了《国家粮食安全中长期规划纲要(2008~2020 年)》。

这份纲要全文约 16 900 字, 包括前言、我国粮食安全取得的成就、我国粮食安全面临的挑战、保障粮食安全的指导思想和主要目标、保障粮食安全的主要任务和保障粮食安全的主要政策和措施等 5 大部分和 5 大专栏。

这份纲要介绍了我国粮食安全取得的成就: 粮食综合生产能力保持基本稳定; 粮食流通体制改革取得重大突破; 粮食安全政策支持体系初步建立; 粮食宏观调控体系逐步完善。

这份纲要强调了我国粮食安全面临的 7 大挑战: 消费

需求刚性增长; 耕地数量逐年减少; 水资源短缺矛盾凸现; 供需区域性矛盾突出; 品种结构性矛盾加剧; 种粮比较效益偏低; 全球粮食供求偏紧。

这份纲要还详细介绍了保障粮食安全的 6 大主要任务: 提高粮食生产能力; 利用非粮食物资源; 加强粮油国际合作; 完善粮食流通体系; 完善粮食储备体系; 完善粮食加工体系。

《纲要》最后介绍了保障粮食安全的 8 大主要政策和措施: 强化粮食安全责任; 严格保护生产资源; 加强农业科技支撑; 加大支持投入力度; 健全粮食宏观调控; 引导科学节约用粮; 推进粮食法制建设; 制定落实专项规划。