

外植体龄和蔗糖浓度对黄瓜子叶 产生毛状根的影响

施和平, 李玲, 潘瑞炽

(华南师范大学生物系, 广东广州 510631)

摘要:研究了外植体龄和蔗糖浓度对发根农杆菌 R1601 介导黄瓜子叶产生毛状根的影响。结果表明: 以 10 d 龄子叶外植体产生毛状根的能力最强, 外植体的毛状根诱导率为 88.89%; 20 d 龄子叶外植体的毛状根诱导率比 10 d 龄子叶外植体降低 52.86%; 30 d 龄子叶外植体感染发根农杆菌 R1601 后不产生毛状根。感染发根农杆菌 R1601 的黄瓜子叶外植体在不加或加 1% 蔗糖的 MS 培养基上的毛状根诱导率极低, 子叶外植体逐渐变黄, 腐烂; 而培养基中添加 2%, 3% 或 4% 的蔗糖可显著提高子叶外植体的毛状根诱导率。黄瓜毛状根能在无外源植物激素的 MS 液体培养基中自主生长。冠瘿碱的高压电泳检测表明毛状根已被 RiT-DNA 转化。

关键词: 外植体龄; 蔗糖浓度; 发根农杆菌; 黄瓜; 毛状根

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A

Effects of explant age and sucrose concentration on hairy root formation from cucumber cotyledons

SHI He-ping, LI Ling, PAN Rui-chi

(South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: Effects of explant-age and sucrose concentration on *Agrobacterium rhizogenes* R1601-mediated hairy root formation from cucumber cotyledons were studied. The results showed that the highest rate of hairy root induction, ca 88.89% was visible in 10 day-old cotyledon explants. The rate of hairy root induction of 20 day-old explants was about 52.86% lower than that of 10 day-old one, but no hairy root was obtained from 30 day-old cotyledon explants after inoculation with *A. rhizogenes* R1601. When MS medium supplemented with 0% or 1% sucrose, cotyledon explants infected by *A. rhizogenes* R1601 slowly necrotized and died without any root differentiation. If added 2%, 3% or 4% sucrose to MS medium, the rate of hairy root induction from cotyledon explants infected with *A. rhizogenes* R1601 was enhanced. The hairy root of *Cucumis sativus* L. could have a rapid growth in liquid

收稿日期: 1999-03-29

作者简介: 施和平 (1964-), 男, 博士, 副研究员, 从事植物生理及生物学方面的科研教学工作。

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (990451)

MS medium without exogenous phytohormones. Transformation was confirmed by opines (agropine) analysis with high voltage paper electrophoresis.

Key words: Explant age; sucrose concentration; *Cucumis sativus*; *Agrobacterium rhizogenes*; hairy root

对某一种发根农杆菌而言,如何提高其 Ri (root inducing) 质粒对植物细胞的致根效率,拓宽其寄主范围,一直是植物遗传转化中亟待解决的问题。一些研究表明,在发根农杆菌与植物细胞双向作用的复杂过程中,毛状根的产生除取决于农杆菌菌株致病力外,还与感染部位、植物种类、极性和 NAA 浓度等因素密切相关^[1-4]。黄瓜是一种重要的蔬菜作物,但具有严重的有性不亲和杂交障碍^[5]。目前对黄瓜遗传转化的研究较少。本文报道外植体龄和蔗糖浓度对黄瓜子叶产生毛状根影响的实验结果,为今后用 Ri 质粒载体建立黄瓜的高效遗传转化系统提供可能性。

1 材料和方法

1.1 材料培养

黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 津研四号种子,按不同时间用 0.1% HgCl₂ 消毒 26 min,接种至盛水湿润的无菌脱脂棉的三角瓶中,25 °C 暗萌发 48 h 后,置于光强 2000 lx,每天 12 h 光照 25 °C 下萌发成无菌苗。取萌发 10 d, 20 d 和 30 d 的幼苗子叶分别切成 0.5 cm² 小块置于无激素的 MS 培养基上预培养供感染用。另取萌发 10 d 的幼苗子叶切成 0.5 cm² 小块,分别接至添加 1%, 2%, 3%, 4% 蔗糖的 MS 培养基上预培养供感染用。

1.2 细菌菌株及培养

发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) R1601 具有质粒 pRiA4b, 并且其中 Hind II 片段 21 上整合 NPT I (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*) 的 vir (virulence, 毒性) 区的粘性质粒 pTVK291^[6]。农杆菌在含卡那霉素的 AB 培养基上暗培养和保存。感染植物材料之前,将农杆菌接于 YEB 液体培养基 28 °C 中暗培养 30 h。

1.3 毛状根的诱导和培养

上述预培养 1 d 的子叶外植体放入含发根农杆菌 R1601 的液体培养基中,取出吸干放回至原培养基上共培养 2 d 后,转入 MS + 500 mg/L 头孢噻肟钠 (cefotaxime) 的培养基上,25 °C 散射光下诱导毛状根。切下毛状根除菌培养后,置于无激素的 MS 液体培养基中振荡培养 (100 r/min)。实验重复 3 次。

1.4 毛状根冠瘿碱的检测

基本参照 Ellis 等的方法^[6]。将毛状根直接研磨成浆状离心,取上清液进行高压纸电泳,电压 40 v/cm, 90 min 后,将纸吹干显色定影水洗后吹干即可显出冠瘿碱带。

2 结果和分析

2.1 外植体龄对黄瓜子叶产生毛状根的影响

从表 1 可见,未感染的萌发 10 d, 20 d 和 30 d 的黄瓜子叶外植体在无激素的 MS 固体培养基上培养后均不生根。而感染发根农杆菌 R1601 后 2~3 d, 10 d 龄, 20 d 龄的子叶外植体的形

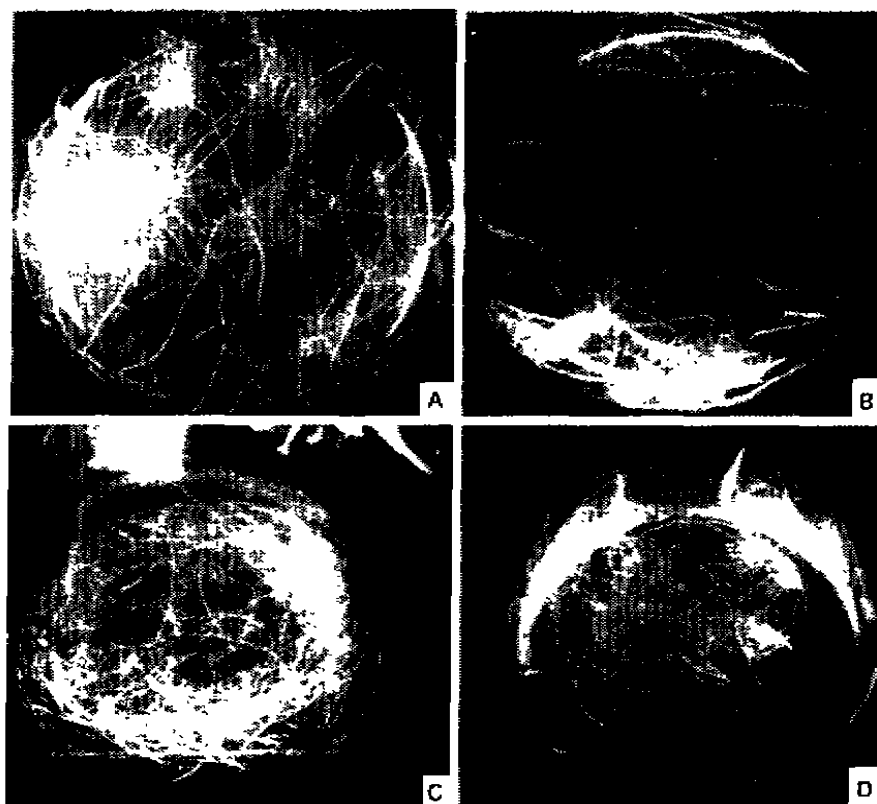


图1 A. 感染发根农杆菌 R1601 的 10 d 龄黄瓜子叶外植体产生的毛状根; B. 感染 R1601 的 20 d 龄黄瓜子叶外植体产生的毛状根; C. 发根农杆菌 R1601 诱导的黄瓜毛状根在无激素的 MS 液体培养基中生长; D. 非转化根 (正常根) 在无激素的 MS 液体培养基中生长。

Fig. 1 A. Hairy roots from 10 day-old cucumber cotyledon explant infected with *Agrobacterium rhizogenes* R1601; B. Hairy roots from 20 day-old cucumber cotyledon explant infected with *A. rhizogenes* R1601; C. Hairy roots with R1601 grew in hormones-free liquid MS medium; D. Non-transformed roots (normal root) grew in hormone-free liquid MS medium.

态学下端中脉处产生白色或淡黄色愈伤组织, 并陆续生根, 至 10 d 时已从愈伤组织上长出许多毛状根 (图 1, A, B)。但 20 d 龄子叶外植体的毛状根诱导率比 10 d 龄子叶降低约 52.86%, 生根频率也降低。30 d 龄的子叶外植体感染发根农杆菌后不生根, 子叶外植体逐渐变黄。黄瓜子叶外植体产生的毛状根在头孢噻肟钠的培养基上 3~4 次除菌培养后, 能在无激素的 MS 液体培养基中快速生长; 对照根 (黄瓜子叶自然生根率极低, 故以 0.1 mg/L NAA (萘乙酸) 诱导子叶产生的不定根作对照) 生长极其缓慢 (图 1, C, D)。

2.2 蔗糖浓度对黄瓜子叶产生毛状根的影响

从表 2 可见, 感染发根农杆菌的子叶外植体在不加或仅加 1% 蔗糖的培养基中的毛状根诱导率较低, 根诱导频率也极低 (仅 1 条根), 且子叶外植体逐渐变黄, 仅在其形态学下端产生很少

表 1 外植体龄对黄瓜子叶产生毛状根的影响
Table 1 Effect of explant age on hairy root formation from cucumber cotyledons

菌株 Bacterium strain	外植体龄 Explant age (d)	外植体数 No. of explants	生根的外植体 % Percentage of the rooted explants
R1601	10	94	88.89 ± 3.72
	20	62	41.90 ± 1.64
	30	78	0
Control	10	90	0
	20	80	0
	30	80	0

黄绿色愈伤组织;随着培养时间的延长,子叶严重缺绿变黄,以致腐烂。经感染的子叶外植体在添加2%、3%或4%蔗糖的培养基中不变黄褪绿,子叶外植体的毛状根诱导率明显提高,且生根部位主要集中在子叶形态学下端切口附近,其中仅添加4%蔗糖培养的子叶外植体的形态学上端和下端均可产生毛状根,但形态学上端产生的毛状根数目明显少于形态学下端。

2.3 毛状根鉴定

从图2可见,发根农杆菌 R1601 感染的黄瓜子叶外植体产生的毛状根能合成农杆菌碱,这表明发根农杆菌 TR-DNA (T-DNA 右臂, the right-hand of transferred DNA of R₁ plasmid) 区编码的冠瘿碱合成酶基因已在黄瓜基因组中表达;对照根未检测到农杆菌碱,也不能在无外源激素的 MS 培养基上自主生长。

表 2 蔗糖浓度对感染发根农杆菌 R1601 的黄瓜

子叶产生毛状根的影响

Table 2 Effect of sucrose concentration on hairy root formation from cucumber cotyledon infected with *Agrobacterium rhizogenes* R1601

蔗糖浓度 (%) Sucrose concentration	外植体数 No. of explants	生根的子叶外植体 % % of rooted cotyledon explants		
		3(d)	5(d)	10(d)
0.0	40	5.00	5.00	5.00
1.0	54	3.70	3.70	3.70
2.0	52	51.91±5.23	73.10±3.02	86.54±4.79
3.0	60	40.00±4.20	68.89±0.78	88.89±4.51
4.0	35	31.43±1.54	60.50±3.18	77.14±4.72

3 讨 论

有关外植体龄对黄瓜子叶产生毛状根的影响目前尚未见正式报道。但有研究表明,不同苗龄的外植体的器官或胚胎发生的潜力不同。3~7 d 龄的黄瓜幼苗子叶可100%地再生出芽,但7 d 龄以上的幼苗子叶的芽再生能力却显著降低,甚至于完全丧失^[7]。用根癌农杆菌转化生菜叶外植体时,以1~3 d 苗龄的子叶转化效果最佳,4~5 d 龄的子叶未能得到转基因植株^[8]。甜瓜,西瓜的遗传转化也以5~6d 苗龄的子叶再生和转化效果最好(贾士荣等1995)。以花生3~10 d 龄的叶片作外植体进行转化时,根癌农杆菌感染和转化效果以萌发10 d 的深绿色幼叶最好^[9],这与本实验的结果类似。在本实验中发根农杆菌 R1601 感染幼嫩的10 d 龄黄瓜子叶外植体的转化效果最好,20 d 龄子叶外植体的转化效果次之,而感染30 d 龄的子叶外植体就不能产生毛状根。这表明外植体龄可明显影响发根农杆菌的遗传转化效率。同时也说明外植体的发育时期不同,对农杆菌感染可能存在一个最佳感受态的问题。

在研究 Ti (tumor inducing) 质粒 vir 基因激活实验中发现,某些糖类和植物酚类化合物之间具有协同作用^[10],但它们对非诱导表达的 vir 基因不产生作用,而且某些被农杆菌利用的单糖如 D-核糖, D-阿拉伯糖和 L-甘露糖及一些还原糖如 D-山梨糖醇,甘露醇及蔗糖和乳糖等

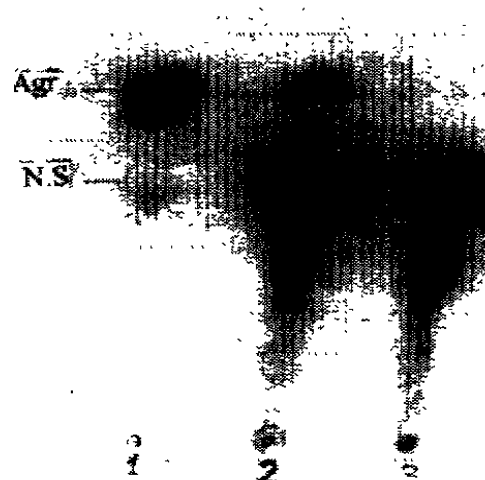


图2 黄瓜毛状根中冠瘿碱(农杆菌碱)的检测

1道 标准品; 2道. R1601诱导的毛状根提取液;

3道. 0.1 mg/L NAA 诱导的黄瓜不定根提取液、

Agr, 农杆菌碱; N. S., 中性糖。

Fig. 2 Detection of opines (agropine) in hairy roots of *Cucumis sativus* L.

lane 1 standard agropine; lane 2 extracts of hairy roots with R1601; lane 3. extracts of adventitious roots induced by 0.1 mg/L NAA. Agr., Agropine, N. S., neutral sugars

却对提高 Ti 质粒的 vir 基因表达没有作用; 相反, 不能被农杆菌代谢的 α -脱氢-D-葡萄糖却能产生作用, 但这种糖效应在 virA 蛋白胞外质部位编码区缺失的突变体中则不复存在, 而乙酰丁香酮仍可诱导 vir 基因在这类突变体中表达^[11]。考虑到这些单糖在 1 mmol/L 时就可产生诱导活性, 因而排除它们是仅通过影响渗透压的变化而发挥作用。最近的研究发现, 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^[12~13]。在本实验中不加蔗糖或少加蔗糖预培养和共培养的黄瓜子叶外植体被发根农杆菌感染后, 不仅子叶外植体的毛状根诱导率极低, 且子叶很快缺绿变黄, 腐烂; 而高浓度 (4%) 蔗糖却能使黄瓜子叶外植体形态学上端也产生毛状根。因此我们认为蔗糖对感染发根农杆菌的黄瓜子叶产生毛状根的影响, 除其主要起维持渗透压和提供碳源的作用外, 还可能与其调节 rolC 基因表达水平有关。

致谢 原中科院植物所林忠平先生和法国国家科学研究中心 Jacques Tempé 先生分别馈赠发根农杆菌菌种和冠瘿碱标准品。

参考文献:

- [1] De Cleene M, de Ley J. The host range of infectious hairy root [J]. *The Botanical Review*, 1981, 47: 147~194
- [2] Ryder M H, Tate M E R, Kerr A. Virulence properties of strains of *Agrobacterium* on the apical and basal surface of carrot root disc [J]. *Plant Physiol*, 1985, 77: 215~221
- [3] 施和平, 李玲, 潘瑞炽. 极性和 NAA 浓度对发根农杆菌遗传转化黄瓜的影响 [J]. *热带亚热带植物学报*, 1997, 5 (3): 43~47
- [4] Den Nijs A P M, Custers J B M. Introducing resistances into the Cucumber by interspecific hybridization [C]. In: Bates DM des., *The Biology and Chemistry of the Cucurbitaceae* Itaca [M]. New York: Cornell University Press, 1990. 382~396
- [5] Pythoud F, Sinkar VP, Nester EW, et al. Increased virulence of *Agrobacterium rhizogenes* conferred by the vir region of pTiBo542: application to genetic engineering of poplar [J]. *Bio/Techn*, 1987, 5: 1323~1327
- [6] Ellis D, Robert D, Sutton B et al. Transformation of white spruce and other conifer species by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Cell Rep*, 1989, 8: 16~20
- [7] Colijn-Hooymans J, Hakkert C, Jansen J et al. Competence for regeneration of cucumber cotyledons is restricted to specific developmental stages [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1994, 39: 211~217
- [8] Torres AC, Cantliffe DJ, Laughner B, et al. Stable transformation of lettuce cultivar south bay from cotyledon explants-Lactuca sativa transformation optimization using *Agrobacterium tumefaciens* carrying vector plasmid pTiT37-SE with plasmid pMON9749 or plasmid pMON9793 transgenic plants [J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1993, 34 (3): 279~285
- [9] Mansur EA, Lacorte C, de Freitas VG, et al. Regulation of transformation efficiency of peanut (*Arachis hypogaea* L) explants by *Agrobacterium tumefaciens*-effect of culture medium composition, cocultivation period, tissue type, bacteria inoculum concentration and acetosyringone pretreatment [J]. *Plant Sci*, 1993, 89 (1): 93~99
- [10] Cangelosi CA, Ankenbauer RG, Nester EW. Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein [J]. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87: 6 708~6 712
- [11] Shimoda N, Toyoda-Yamamoto A, Nagamine J, et al. Control of expression of *Agrobacterium* vir genes by synergistic action of phenolic signal molecules and monosaccharides [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 1990, 87: 6 684~6 688
- [12] Nilsson O, Little CHA, Sandberg G, et al. Expression of two heterologous promoters, *Agrobacterium rhizogenes* rolC and Cauliflower mosaic virus 35S in the stems of transgenic hybrid aspen plants during the annual cycle of growth and dormancy [J]. *Plant Mol. Biol*, 1996, 31: 887~895
- [13] Yokoyama R, Hirose T, Fujii N, et al. The rolC-promoter of *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid is activated by sucrose in transgenic tobacco plants [J]. *Mol. Gen Genet*, 1994, 244: 15~22