维普资讯 http://www.cqvip.com

广 西 植 物 Guihaia 25(2):121 — 124 2005 年 3 月

根癌农杆菌对苜蓿的转化及其特性

刘明志

(长沙大学生物技术研究所,湖南长沙 410003)

摘 要:通过胭脂碱型根癌农杆菌 C58 和 T37 菌株通过共培养和离体感染苜蓿下胚轴和子叶,研究表明,外植体的生理状态对转化的促进作用明显优于酚类化合物 As 和复合酚类化合物处理。与感受态外植体相比,当外植体处于非感受态时,即使通过酚类化合物活化农杆菌 *vir* 基因,其致瘤率也明显降低。可溶性蛋白质含量和游离氨基酸含分析表明,T37 和 C58 转化细胞系可溶性蛋白含量相近,但 T37 转化细胞系游离氨基酸含量比 C58 转化细胞系高得多,这与 T37 和 C58 转化细胞系生长特性有关。T37 菌株的这种特性对于改良苜蓿品质具有非常重要的现实意义。

关键词:苜蓿;根癌农杆菌;感受态;酚类化合物

中图分类号:Q943 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-3142(2005)02-0121-04

The *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and characteristics of *Medicago sativa*

LIU Ming-zhi

(*Institute of Biotechnology, Changsha University*, Changsha 410003, China)

Abstract: By in vitro infecting hypocotyls and cotyledons with nopaline-type *Agrobacterium tumefaciens* strain C58 and T37, we concluded that the promotional role of physical status of explants was obviously prior to that of acetosyringone and complex phenolic compounds. Compared to competent explants, non-competent explants had an obvious lowered tumorigenic frequency, even if acetosyringone and complex phenolic compounds were treated to activate *vir* gene of *A. tumefaciens*. The analysis of soluble protein contents and free amino acid contents showed that T37 and C58 transformed cell line had similar soluble protein contents, but T37 transformed cell line had much higher free amino acid contents than C58 transformed cell line and this was correlated to their growth characteristics. The characteristic of T37 strain might be used to improve the quality of *Medicago sativa*.

Key words: *Medicago sativa*; *Agrobacterium tumefaciens*; competence; phenolic compounds

苜蓿作为最重要的豆科牧草,在全世界范围内种植。虽然大多数双子叶植物对农杆菌的感染和转化敏感,但是,对于苜蓿来说,农杆菌转化苜蓿获得成功的例子仍然有限(吕德杨等,2000;黎茵等,2003;Shahin 等,1986),大多数情况下,是通过外源基因直接导入原生质体实现转化的(黄绍兴等,1991)。影响农杆菌转化苜蓿的因素目前研究得仍然不多。本实验使用两种野生型 C58 和 T37 转化苜蓿材料,研究了菌株、外植体的生理状态和酚类化合物对转化的影响。同时,通过对两种转化细胞系与正常愈伤组织细胞系的生长特性、可溶性蛋白含量以及游离氨基酸含量进行了分析,研究表明,T37 转化细胞系中总游离氨基酸的含量比正常细胞系和 C58 转化细胞系高得多,目前还不能完全解释导致这种差异的原因,但是 T37 菌株的这种转化特性却是可以利用的,如利用 T37 转化苜蓿后得到转化瘤组

收稿日期:2003-10-27 **修订日期**:2004-03-22

作者简介:刘明志(1963-),男,湖南岳阳市人,博士,副教授,细胞生物学和细胞工程专业。

维普资讯 http://www.cqvip.com

织，通过诱导获得具有高游离氨基酸含量的转化植株，家畜食用经过这种改良苜蓿后，对于提高家畜的瘦肉率和苜蓿作为牧草的价值有非常重要的意义。

1 材料与方法

1.1 供试菌种及其活化

本文使用的供试菌株为野生型根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)C58和T37以及治愈型菌株LBA4011，来自于兰州大学细胞研究室。C58和T37分别含有pTiC58和pTiT37质粒，两者均为胭脂碱型菌株，含有致瘤基因(oncogene)作为选择性标记基因。LBA4011是不含有毒性基因(virulence gene)的菌株。

菌株活化时，从YEB固体培养基取1～2环菌落接种于YEB液体培养基上，于28 ℃ 100 rpm的旋转振荡器上散射光培养，培养16～24 h，当OD值在0.4～0.8时，可进行离体感染。为提高转化频率，在YEB培养基中加入不同的酚类化合物处理以活化*vir*基因。处理为：(1)加入20 μmol/L乙酰丁香酮(As)；(2)分别加入羟基苯甲酸、焦性没食子酸、没食子酸、香草醛及邻苯二酚各50 μg/L；(3)不加任何化合物。

1.2 供试植物材料

本实验所用植物材料为大叶紫花苜蓿(*Medicago sativa* ssp. *sativa*)。

1.3 农杆菌介导的转化

取由种子萌发至第9天和第20天的子叶与下胚轴与农杆菌共培养后，利用羧苄青霉素(Cb)杀死农杆菌，然后在SH(Schenk等，1972)无激素培养培养，30 d后，观察瘤组织的形成。瘤组织转移至不含Cb的SH无激素培养基上继代培养，得到激素自主性生长的瘤组织。在不含农杆菌的相应YEB液体培养基中处理的外植体在SH无激素培养上的生长作为对照。

1.4 苜蓿正常愈伤组织细胞系诱导

苜蓿无菌实生苗下胚轴切段接种于含2.0 g/L CH+4.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L KT的SH培养基上诱导愈伤组织，转移含1.0 mg/L 2,4-D+0.25 mg/L KT的SH培养上继代，得到稳定的愈伤组织细胞系。

1.5 苜蓿转化细胞系与正常细胞系的生长特性测定

在一定时间间隔，苜蓿正常愈伤组织细胞系与C58和T37转化系生长量以鲜重和干重的增加表示。鲜重和干重的增加以终重/始重-1表示。以时间天(d)作为横坐标，以鲜重和干重增加作为纵坐标绘制T37和C58转化瘤组织细胞系和正常愈伤组织细胞系的生长曲线。

1.6 可溶性蛋白质含量测定

(1)组织中的可溶性蛋白质含量测定：参照Bradford(1976)的染料结合法。用BSA作为标准蛋白质。

(2)游离氨基酸含量分析：取1 g材料加入8%的磺基水杨酸在低温(4 ℃)研磨提取，30 000 g离心30 min，上清液加入等体积10%三氯乙酸，过夜，离心除去沉淀，上清液用4%的磺基水杨酸稀释到一定浓度，用日立835-50型氨基酸组成分析仪测定氨基酸的组分与含量。

2 结果与分析

2.1 苜蓿子叶、下胚轴外植体的离体转化

下胚轴和子叶与经活化和未经活化的致瘤农杆菌感染处理后的致瘤率如表1所示。

表1 不同致瘤根癌农杆菌对萌发至第9天的苜蓿下胚轴和子叶致瘤率的比较

Table 1 Comparison of oncogenesis of alfalfa hypocotyls and cotyledons in 9 days after germination induced by different strains of *Agrobacterium*

外植体 Explants	活化处理 Activated treatment	对照 Control	LBA 4011	C58	T37
下胚轴	未活化	0	0	97.7	27.3
Hypocotyls	AS活化	0	0	100	36.7
	复合酚活化	0	0	97.7	42.9
子叶	未活化	0	0	100	7.7
Cotyledons	AS活化	0	0	100	32.1
	复合酚活化	0	0	98.4	30.4

不经农杆菌感染的对照处理以及用治愈型菌株LBA4011感染子叶和下胚轴外植体后，在SH无激素培养基上，不能形成转化瘤组织，然后逐渐褐化坏死。C58菌株为强致瘤性菌株，其致瘤率高达97.7%～100%，且与两类酚类化合物的活化预处理没有直接的关系，即酚类化合物对转化无促进作用。T37菌株为弱致瘤性菌株，其致瘤率要低得多，而经酚类化合物活化处理后，其致瘤率明显升高。此外，As和复合酚类对致瘤率没有明显差别。从上表中

维普资讯 http://www.cqvip.com

可以看出 C58 菌株对萌发至第 9 天的苜蓿下胚轴和子叶的致瘤率几达 100%，这可能与材料的生理状态相关，即材料是否处于适合于转化的感受态。

用强致瘤性 C58 菌株感染萌发至第 20 天的苜蓿下胚轴和子叶，结果表明农杆菌对第 20 天的外植体的致瘤率与第 9 天的外植体的致瘤率有很大不同（表 2）。

表 2　致瘤根癌农杆菌 C58 对萌发至第 20 天的苜蓿下胚轴和子叶的致瘤作用

Table 2 Oncogenesis of alfalfa hypocotyls and cotyledons in 20 days after germination induced by C58 strain of *Agrobacterium tumefaciens*

外植体 Explants	活化处理 Activated treatment	致瘤作用 Oncogenic effect		
		处理数 Numbers of treatment	瘤组织形成数 Numbers of oncogenic tissue	致瘤率 Oncogenic frequencies (%)
下胚轴 Hypocotyls	AS 活化	75	12	16
	复合酚活化	76	6	9.1
	未活化处理	58	8	13.8
子叶 Cotyledons	AS 活化	35	4	11.4
	复合酚活化	31	3	9.7
	未活化处理	24	2	8.3

从表 2 可以看出，虽然 C58 为强致瘤 C58 菌株，但使用第 20 天的苜蓿下胚轴和子叶外植体作为转化的受体材料，其致瘤率要较第 9 天的下胚轴和子叶的致瘤率要低得多。经用 As 和复合酚类化合物对农杆菌活化预处理后，农杆菌对外植体的致瘤率也没有明显提高。

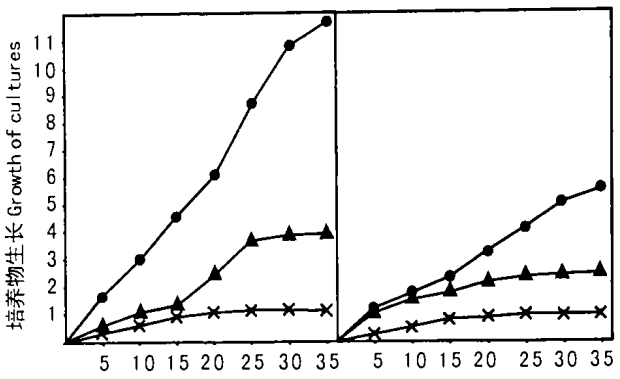

图 1　苜蓿 T37 和 C58 转化细胞系与正常愈伤组织细胞系在无激素培养基上的生长曲线比较

Fig. 1　Comparison of growth curves between alfalfa T37 and C58 transformed cell line and normal callus cell line in hormone-free medium

"●－●"T37 转化细胞系 T37 transformed cell line; "▲－▲" C58 转化细胞系 C58 transformed cell line; "×－×"正常细胞系 Normal callus cell line; 左为鲜重表示的生长曲线 The left one is the growth curve indicated by fresh weight; 右为干重表示的生长曲线 The right one is the growth curve indicated by dry weight.

2.2 苜蓿转化瘤组织的激素自主性生长特性

苜蓿正常愈伤组织细胞系转移到 SH 无激素培养基上后，其生长明显减弱，生长非常缓慢，15 d 后逐渐变白变褐死亡。C58 激素自主性生长的瘤组织在继代培养过程中，由绿色致密状逐渐变为淡绿色较松散的颗粒状。T37 激素自主性细胞系为浅绿色、颗粒状、较致密，同时伴随着少量根的分化。上述激素自主性生长瘤组织，继代培养了一年仍然保持激素自主性生长的特性。

表 3　苜蓿转化细胞系与正常愈伤组织细胞系之间游离氨基酸含量的比较

Table 3　Comparison of different free amino acid contents between transformed cell lines and normal callus cell line of alfalfa

项目 Items	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg	Pro	Cys	总计 Total
正常系	22.2	7.20	17.28	59.52	9.24	17.72	14.7	6.48	6.96	5.76	6.30	11.34	11.76	41.64	6.24	6.30	38.28	290.02
C58 转化系	44.88	5.10	11.82	26.52	3.12	17.04	7.86	3.90	4.86	2.64	4.14	6.48	5.34	2.10	1.68	17.76	28.92	194.16
T37 转化系	102.25	18.65	46.30	107.85	8.75	137.10	36.45	5.35	23.35	39.80	6.00	26.70	23.95	9.00	20.35	212.65	16.05	840.55

C58 和 T37 转化瘤组织和愈伤组织细胞系在无激素培养基上的生长见图 1 所示。

2.3 苜蓿转化细胞系的生化特性

苜蓿正常愈伤组织细胞系的可溶性蛋白含量为 0.95 mg/gFW，C58 转化系和 T37 转化系的可溶性蛋白含量分别为 0.70 mg/gFW 和 0.76 mg/gFW。苜蓿 T37 转化系的可溶性蛋白质含量高于 C58 转化系，但是，两者的可溶性蛋白质含量均低于正常愈伤组织细胞系。

正常愈伤组织细胞系的可溶性蛋白含量以及游离氨基酸含量随培养基的种类和激素配比以及是否在培养基中加入复合添加物所影响。

从表 3 可以看出，C58 转化细胞系总游离氨基酸含量低于正常细胞系，而 T37 转化细胞系总游离氨基酸含量大大高于 C58 转化细胞第和正常细胞系。

此外，苜蓿 T37 转化细胞系除半胱氨酸含量比

维普资讯 http://www.cqvip.com

C58转细胞系低外，其它所有游离氨基酸的含量均比C58转化细胞系高，高几倍甚至十几倍(精氨酸)。C58和T37同为胭脂碱性菌株，其苜蓿转化细胞系在游离氨酸酸含量上为何出现如此差异还不能完全解释。可能的原因是因为C58和T37菌株的TiT-DNA在转化细胞系中差异整合和表达相关。

3 讨论

研究证实，酚类化合物As和复合酚物活化*vir*区基因的表达是T-DNA的转移和加工所需的(Stachel等，1985；Bolton等，1986)。许多研究证实，酚类化合物As和复合酚类化合物对农杆菌介导的遗传转化具有明显的促进作用(刘明志，1996；Godwin等，1990；Mathens等，1990)。因而酚类化合物被广泛用于促进农杆菌介导的遗传转化实验。

酚类化合物对转化的促进作用主要表现在弱致瘤菌株T37菌株上。T37菌株对苜蓿外植体的致瘤率，总的来说维持在较低的水平，其致瘤率为7.7%～27.3%。酚类化合物As和复合酚类化合物活化T37菌株后，对转化频率有比较明显的提高(32.1%～42.9%)。另一方面，农杆菌介导的遗传转化与菌株的寄主范围、外植体材料的生理状态以及pH值等密切相关。当苜蓿外植体处于非感受态时(第20天时)，即使用强致瘤性根癌农杆菌菌株C58和经过酚类化合物活化预处理，其致瘤率仍然较低(9.7%～16%)，甚至因酚类化合物的不良影响，其致瘤率还有所降低(表2)。因此，外植体材料的生理状态对转化的影响明显优于酚类化合物As和复合酚类化合物。

第20天的苜蓿种子无菌苗外植体处于对农杆菌的非感受生理状态。此时外植体由代谢活跃状态转变为非活跃状态，对受伤反应已不那么敏感，可能不能产生足够的酚类化合物活化农杆菌。但是，加入酚类化合物活化农杆菌后，对非感受态苜蓿外植体的转化却没有明显促进作用。由此可见，非感受态苜蓿外植体的致瘤率之所以低，不仅仅因为非感受态外植体受伤后未能产生足够量的酚类化合物以活化农杆菌*vir*基因和促进T-DNA转移，而且与受伤后的非感受态外植体细胞未能进行有效的细胞分裂和进行T-DNA的加工整合相关。

从生长特性来看，虽然C58为强致瘤性菌株，但其苜蓿转化系在无激素培养基上的生长远远不及T37转化系。从游离氨基酸含量来看，T37转化系的高生物生长量特性与其高游离氨基酸含量密切相关。

参考文献：

Bolton GW, Nester EW, Gordon MP. 1986. Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence[J]. *Science*, **232**: 983－985.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein ultilization the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, **72**: 248－254.

Godwin I, Todd G, Ford-Lloyd B, *et al*. 1990. The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated transformation according to plant species[J]. *Plant Cell Rep*, **9**: 671－675.

Huang SX(黄绍兴), Lü DY(吕德扬), Shao JH(邵嘉红), *et al*. 1991. Regeneration of transgenic plants by protoplast of *Medicago sativa*(紫花苜蓿原生质体转基因植株再生)[J]. *Chian Sci Bull*(科学通报), **17**: 1 345－1 348.

Li Y(黎 茵), Huang X(黄 霞), Huang XL(黄学林). 2003. Transformation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos mediated by *Agrobacterium tumefaciens*(根癌农杆菌介导的苜蓿体细胞胚转化)[J]. *J Plant Physiol Molec Biol*(植物生理与分子生物学学报), **29**(2): 109－113.

Liu MZ(刘明志). 1996. Promotion of carrot suspension cell transformation and plant regeneration by *Agrobacterium harboring* binary vector pretreated with phenolic compounds(酚类化合物促进含双元载体农杆菌对胡萝卜悬浮细胞的转化和植株再生)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), **38**(3): 203－208.

Lü DY(吕德扬), Fan YL(范云六), Yu MM(俞梅敏), *et al*. 2000. Regeneration of HNP transgenic alfalfa by *Agrobacterium* mediated gene transfer(含高硫氨基酸蛋白转基因植株再生)[J]. *Acta Genetica Sin*(遗传学报). **27**(4): 331－337.

Mathews H, Bharathan H, Litz Narayanan, *et al*. 1990. The promotion of Agrobacterium mediated transformation in Atropa belladonna L by Acetosyringone[J]. *J Plant Physiol*, **136**: 404－409.

Schenk RV, Hildebrandt AC. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures[J]. *Can J Bot*, **50**: 199－204.

Shahin EA, Spielmann A, Sukhapinda K, *et al*. 1986. Transformation of cultivated alfalfa using dismarmed *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Crop Sci*, **26**: 1 235－1 239.

Stachel SE, Messens E, van Montaga M, *et al*. 1985. Identification of signal molecular produced by wounded plant cells that activated T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Nature*, **318**: 624－629.