

发根农杆菌诱导玉米毛状根发生及再生植株*

徐洪伟 周晓馥 陆静梅 王俊杰 王兴智**

(东北师范大学生命科学学院, 长春 130024; 吉林师范大学基因工程研究所, 四平 136000)

摘要 发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)侵染玉米愈伤组织 15 天左右获得毛状根. 转化根在不含激素的培养基上快速生长, 并表现出典型的毛状根性状. 在含 ZT 1.6 mg/L 和 NAA 0.4 mg/L 的 MS 培养基上, 毛状根再生成完整转化植株. PCR-Southern 杂交证实 T-DNA 已整合入转化株的染色体组.

关键词 发根农杆菌 玉米 毛状根 PCR-Southern

单子叶植物是人类粮食的主要来源. 因此, 单子叶植物的基因转化研究引起人们广泛重视. 农杆菌介导的基因转化系统是一种天然有效的遗传转化工程系统. 但是由于单子叶植物不是农杆菌的天然寄主, 阻碍了其在单子叶植物上的应用.

上世纪 80 年代初期, 根瘤农杆菌侵染单子叶植物开始获得成功, 利用根瘤农杆菌转化玉米的报道很多^[1,2], 但是发根农杆菌能侵染的寄主植物还仅限于双子叶植物^[3,4]. 然而, cross-inoculation 实验大大地扩大了发根农杆菌的宿主侵染范围. 从上世纪 90 年代初期以来有关发根农杆菌诱导极少数单子叶植物^[5]和多数双子叶植物^[6]产生毛状根的报道开始出现. 发根农杆菌感染寄主时, 被损伤的植物细胞合成特殊的小分子酚类化合物如乙酰丁香酮等, 并与 *virA* 基因产物结合, 诱导其他基因活化, 从而发生感染过程. Ri 质粒不能侵染的单子叶植物可能缺少这种小分子

酚类化合物. 但最近有人报道小麦的种子和胚、玉米幼苗也存在这种小分子酚类化合物. 然而, 迄今为止, 发根农杆菌遗传转化单子叶植物还未见报道^[7-9].

Ri 质粒转化具有很多优点: () Ri 质粒可以不经“解除武装(disarm)”进行转化, 并且转化产生的毛状根能够再生植株; () 毛状根是一个单细胞克隆, 可以避免嵌合体, 并且毛状根每一个细胞都是通过转化而来的有利于遗传操作; () 可直接作为中间载体; () Ri 质粒和 Ti 质粒可以配合使用, 建立双元载体, 拓展了两类质粒在植物基因工程中的应用范围; () 毛状根适于进行离体培养, 而且很多植物的毛状根在离体培养条件下都表现出原植株的所有特征.

由于发根农杆菌 Ri 质粒的 TL-DNA 上有 *rolA-D* 基因群, TR-DNA 有 *tms* 基因, 被感染的寄主植物伤口可产生大量的不定根, 从而改善生根状况, 有益于对于干旱的抵抗^[12], 因此为培育成抗旱型玉米具有重要

2005-06-24 收稿, 2005-09-28 收修改稿

* 国家植物转基因中试及产业化基地(批准号: J99-B-001)资助项目

** 联系人, E-mail: xingzhi@public.cc.jl.cn

意义.

本文利用发根农杆菌侵染玉米愈伤组织, 通过对农杆菌侵染条件的优化以及毛状根生长条件的优化, 诱导了玉米的毛状根发生, 建立了玉米发根农杆菌遗传转化体系, 为培育抗旱型玉米提供可能性.

1 材料与方法

1.1 植物材料

选用玉米自交系 H99 的幼苗叶片和胚性愈伤组织. 愈伤组织呈黄色, 质地松散, 表面有颗粒状的小突起, 生长期限为 6~8 月, 15 天继代一次.

1.2 细菌菌株

R1601, ATCC15834 菌株和 A4 菌株由法国国家科学院生物技术与园艺研究中心 Tepter 博士惠赠.

1.3 发根农杆菌培养

将发根农杆菌 R1601, ATCC15834 和 A4 接种在 YEB 固体培养基上培养, 27 °C 下活化 3 次, 挑取平板上的单菌落, 接种在 25 mL LB 液体培养基上. 在 27 °C, 4000 r/min 黑暗下摇床震荡培养, 继代 3 次后的农杆菌当 A_{600} 值达到 1.0 时用于感染外植体.

1.4 发根农杆菌玉米转化

将玉米愈伤组织和叶片浸入 A_{600} 值为 0.2~1.5 的农杆菌 R1601, ATCC15834 和 A4 菌液中侵染 30 min, 取出用无菌滤纸吸干多余的菌液, 置于 MS+ZT 0.3 mg/L+NAA 0.3 mg/L 培养基上, 黑暗中共培养 3 天, 直至外质体出现菌斑后移至分别含有 20~100 μ mol/L 乙酰丁香酮和 0.5~3 mL/L 烟草浸出液的 1/2MS+头孢霉素 300~50 mg/L 的培养基于 25 °C 散射弱光照除菌培养诱导发根. 每 5 天转一次培养基; 把感染后外植体上长出的毛状根剪下移到新的含抗生素的培养基上, 每周转接 1 次, 直至除菌完成后, 移到不含抗生素和任何激素的 MS 培养基上培养.

1.5 植株再生

将毛状根段接种于含不同激素配比的 1~8 号 MS 培养基: 1. MS+ZT 0.2 mg/L+NAA 1.0 mg/L; 2. MS+ZT 0.8 mg/L+NAA 0.5mg/L; 3. MS+ZT 1.6 mg/L+

NAA 0.3 mg/L; 4. MS+ZT 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L; 5. MS+ZT 2.4 mg/L+NAA 0.08 mg/L; 6. MS+ZT 3.0 mg/L+NAA 0.02 mg/L; 7. MS+ZT 0.2 mg/L+NAA 0.08 mg/L; 8. MS+ZT 3.0 mg/L+NAA 0.08 mg/L. 在 25 °C 连续光照条件下培养. 再生植株在含 ZT 1.0 mg/L 和 NAA 0.2~0.4 mg/L 的 MS 培养基保存和繁殖.

1.6 基因组 DNA 微量提取

参照德国马普国家科学院植物生长发育与表达调控实验室的方法: () 取 2 g 左右新鲜嫩叶片, 放于研钵中, 用液氮研磨. 少量提取时, 取一片叶子放入 EP 管中, 倒入液氮研磨; () 将研磨后的粉末放入预冷的 50 mL 的离心管中; () 用 15 mL(小量时 700 μ L) 的 2 \times CTAB 溶解粉末, 然后于水浴锅中 65 °C 30 min; () 加入 15 mL(小量时 500 μ L) 氯仿:异戊醇 (24:1), 涡旋振荡至形成乳浊液, 静止分层; () 5000 \times g 室温离心 15 min(小量时 5 min); () 将上清液转入新的离心管中, 加入 2 μ L(小量时 1 μ L) 的 RNA 酶 (10 mg/mL), 37 °C 放置 1 h; () 重复氯仿:异戊醇抽提一次, 离心, 将上清液转入无菌离心管; () 加入 0.8 倍体积的异丙醇, 颠倒离心管数次, 离心, 将沉淀 (基因组 DNA) 挑到 1.5 mL 的管中; () 用 70% 的乙醇洗涤沉淀两次, 空气中干燥, 然后向每管中加入 200 μ L(根据所提取的 DNA 量和所需的 DNA 浓度酌情决定) ddH₂O 溶解沉淀.

1.7 聚合酶链式反应(PCR)

取待测材料的基因组 DNA 100 ng 为模板, 未浸染材料(正常玉米苗)作为阴性对照, Ri 质粒为阳性对照. *rolC* 基因的引物序列(宝生物合成): 引物序列 5'-GATATATGCCAAATTTACTACTAG-3'; 引物序列 5'-GTTAACAAAGTAGGAAACAGG-3'.

PCR 反应总体系为	50 μ L
Taq Mix(购自宝生物)	25 μ L
引物	2 μ L(20 pmol)
引物	2 μ L(20 pmol)
模板	5 μ L(100 ng)
去离子无菌水	16 μ L

在PCR仪(UNOII, Biometra)中进行反应,反应程序为94℃,45 s;45℃,30 s;72℃,45 s共30个循环,72℃延长10 min.

1.8 探针 DNA 的标记

将Ri质粒PCR反应产物进行电泳,用UNIQ-10柱式DNA回收试剂盒(购于上海生工)回收并纯化扩增出的*rolC*基因片段.然后,按照Alkphos DIRECT试剂盒中的操作说明制备探针.

1.9 PCR-Southern 印迹杂交

将琼脂糖凝胶电泳后的PCR产物转到尼龙膜上,放于杂交缓冲液中,55℃下在杂交炉中进行10 min的预杂交,然后向以上杂交缓冲液中加入制备好的探针(一般1 mL杂交缓冲液加5~10 ng探针),55℃杂交过夜.取出杂交后的膜,分别用初次洗液和二次洗液洗去膜上与DNA非特异性结合的探针.将洗好的尼龙膜用保鲜膜包好,上压一张X光胶片,置于黑暗处曝光2 h.用显影液和定影液冲洗X光胶片,以得到清晰的X光显影胶片.

2 结果与分析

2.1 毛状根的诱导和培养

发根农杆菌不同 A_{600} 值菌液(A_{600} 值为0.2~1.5)感染玉米愈伤组织1~2周后,有的愈伤组织开始生根,当 A_{600} 值为1.0时玉米毛状根诱导率最高(图1).诱导产生的毛状根具有典型的毛状根特征,生长迅速.侵染的玉米幼苗叶片和未被侵染的对照玉米愈伤组织则没有毛状根发生.将毛状根移到不含激素的MS培养基上毛状根生长迅速,分枝多,根毛多,根水平生长或向上生长(图2).种子苗来源的根继代1~2次即停止生长呈水浸状很快死亡(图3).经挑选的玉米毛状根株系反复继代生长迅速.在不含激素的摇瓶MS培养液中亦能快速生长(图4).研究发现ATCC15834对愈伤组织诱导效果最好,A4偶有毛状根发生,R1601没有毛状根发生.

2.2 植株再生

将玉米毛状根和玉米的种子苗根移到MS₀培养基上均不能自发再生出芽.将玉米毛状根和种子苗

根移到含一定激素(ZT 0.2~3.0 mg/L和NAA 0.02~1.0 mg/L)配比的1~8号培养基上,毛状根在3号培养基(ZT 1.6 mg/L和NAA 0.2~0.4 mg/L)上形成愈伤组织并一次成苗(图5~7).正常非转化根则没有变化.从图5和6可以看出Ri质粒诱导产生毛状根的再生植株根系发达生长迅速、根较长、侧根发达,根的节根分节较多.

2.3 毛状根和再生植株的检测

提取毛状根和再生植株的基因组DNA进行PCR检测和PCR-Southern分子杂交检测,以试管苗和试管苗正常根做阴性对照,Ri质粒为阳性对照.所获得的转化毛状根和再生植株PCR检测结果表明,在500 bp处有与*rolC*基因相同大小条带存在.PCR-Southern分子杂交检测进一步证明了该条带是*rolC*基因,Ri质粒的T-DNA整合进玉米基因组中(图8).

3 讨论

发根农杆菌是一种寄主非常广泛的土壤细菌,能够侵染几乎所有双子叶植物和少数单子叶植物.它的致病特征结构包括染色体毒性基因(chromosomal virulence, *chv*)和Ri质粒两部分.*chv*是农杆菌的染色体基因,它的活化表达关系着发根农杆菌与植物细胞壁的附着,是致病早期阶段的必要步骤.发根农杆菌感染寄主时,被损伤的植物细胞合成特殊的小分子酚类化合物乙酰丁香酮等,并与*virA*基因产物结合,诱导其他基因活化,从而发生感染过程^[10].但是,单子叶植物不含有小分子酚类化合物,被转化的报道极少.我们利用玉米愈伤组织为外植体在添加乙酰丁香酮情况下诱导产生毛状根.选用表面具有瘤状突起、松散、胚性、色泽淡黄的玉米愈伤组织为外植体.由于利用玉米愈伤组织,可能是细胞在感受态状态下,有利于发根农杆菌的附着^[11],又由于乙酰丁香酮的添加并与*virA*基因产物结合,诱导其他基因活化,启动与调节*virD*基因将T-DNA 25 bp重复序列切断,使T-DNA转移,诱导玉米愈伤组织产生毛状根.研究发现,单子叶植物玉米在诱导的过程中愈伤组织的感受态、菌液的 A_{600} 值和乙酰丁香酮浓度(50 μmol/L)具有重要的作用.双子叶植物毛状根诱导时农杆菌的 A_{600} 值一般为0.2~0.5之间,高 A_{600} 值的菌液和



图 1 愈伤组织侵染产生的毛状根

从图中看出毛状根在菌液侵染程度高的水浸状的愈伤组织上发生毛状根的效率, 侵染程度低的淡黄色愈伤组织几乎不产生毛状根



图 2 毛状根在 MS₀ 培养基上快速生长

毛状根在 MS₀ 培养基上快速生长、分枝多



图 3 种子苗根在 MS₀ 培养基停止生长

种子苗根停止生长, 有的部位出现水浸状, 经过几天就褐化死亡



图 4 毛状根在摇瓶中快速生长

经挑选的生长速度快的毛状根株系在摇瓶中快速生长



图 5 毛状根形成愈伤组织并一次分化成苗



图 6 毛状根诱导的再生苗形成的发达的根系



图 7 毛状根再生植株的保存和繁殖

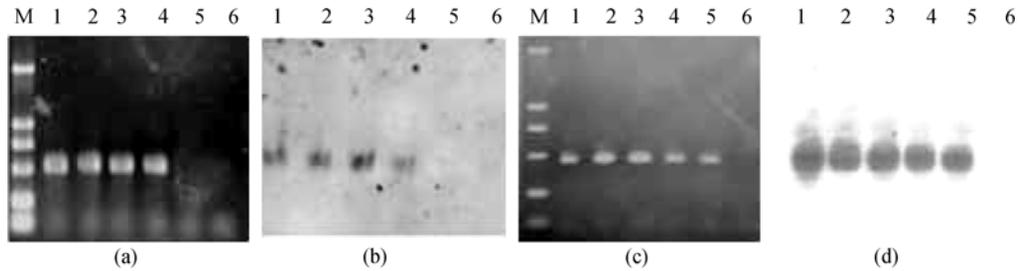


图8 玉米毛状根和再生植株的PCR检测和PCR-Southern分子杂交检测结果

(a) M 示 Marker(DL2000), 1~3 示 Ri 质粒转化的毛状根样品, 4 示 Ri 质粒阳性对照, 5 和 6 示种子苗根阴性对照; (b) 1~3 示 Ri 质粒转化的毛状根样品, 4 示 Ri 质粒阳性对照, 5 和 6 示种子苗根阴性对照; (c) M 示 Marker(DL2000), 1~4 示毛状根再生植株叶片样品, 5 示 Ri 质粒阳性对照, 6 示种子苗叶阴性对照; (d) 1~4 示毛状根再生植株叶片样品, 5 示 Ri 质粒阳性对照, 6 示种子苗叶阴性对照

长时间的共培养对 Ri 质粒的转化有利。可是, 农杆菌浓度太高以及共培养时间过长影响外植体的生活力难以诱导成功, 但在诱导玉米愈伤组织时 A_{600} 值低的菌液对诱导无效。致密、胚性不强、泛白色的愈伤组织没有毛状根的发生。最近有人报道小麦的种子和胚、玉米幼苗也存在有这种小分子酚类化合物, 但没有发根农杆菌转化成功的报道, 因此, 乙酰丁香酮和发根农杆菌的附着均是诱导毛状根产生的必要条件。添加 0.5~3 mL/L 的烟草浸出液的培养基对玉米毛状根的诱导作用不大。一定的农杆菌浓度(A_{600} 值为 1.0)和较长的共培养时间(3 天)对玉米愈伤组织的毛状根诱导有利。

由于Ri质粒侵染产生毛状根是单细胞克隆^[9], 因此, 由毛状根产生的植株是单细胞来源因而不存在嵌合现象, 其转化的植株具有原生质体转化系统的特点, 易于在相对稳定和均匀的同等控制条件下进行准确的转化和鉴定。

根系是作物直接吸收土壤水分的器官, 因此, 作物根系发育、根群分布、不同生育期根系活力与植物抗旱性具有密切的关系, 根系大、深、密是抗旱的基本特征^[13,14]。由毛状根诱导产生的植株根系发达, 分枝多, 植株节间缩短矮壮, 叶片和茎的夹角变小, 结实正常, 为培育抗旱型玉米提供可能。

致谢 感谢法国国家科学院生物技术与园艺研究中心 Tepter 博士提供发根农杆菌菌株。

参 考 文 献

- Hansen G, Shillito R D, Chilton M D. T-strand integration in maize protoplasts after codelivery of a T-DNA substrate and virulence genes. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 11726~11730[DOI]
- Srivastava V, Ow D W. Single-copy primary transformants of maize obtained through the co-introduction of a recombinase-expressing construct. Plant Molecular Biology, 2001, 46: 561~566[DOI]
- De Cleene M, De Ley J. The host range of infectious hairy root. Botanical Reviews, 1981, 47: 147~193
- Strobel G A, Nachmias A. *Agrobacterium rhizogenes*: A root inducing bacterium. In: Davis T D, Haissig B E, Sankhla N, eds. Adventitious Root Formation in Cuttings. Oregon: Dioscorides Press, 1988. 284~288
- Porter J R. Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*. Critical Reviews in Plant Sciences, 1991, 10(4): 387~421
- McAfee B J, White E E, Pelcher L E, Lapp M S. Root induction in pine (*Pinus*) and larch (*Larix*) ssp. using *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Tissue Organ Cult, 1993, 34(1): 53~62[DOI]
- Bassil N V, Proebsting W M, Moore L W, Lightfoot D A. Propagation of hazelnut stem cuttings using *Agrobacterium rhizogenes*. HortScience, 1991, 26(8): 1058~1060
- Hatta M, Beyl C A, Garton S, Diner A M. Induction of roots on jujube softwood cuttings using *Agrobacterium rhizogenes*. The Journal of Horticultural Science, 1996, 71(6): 881~886
- White F F, Taylor B H, Huffman G D, Gordon M P, Nester E W. Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. J Bacteriol, 1985, 164: 33~44
- Aoyama T, Takanami M, Oka A. Signal structure for transcriptional activation in the upstream regions of virulence genes on the hairy root inducing plasmid A4. Nucl Acids Res, 1989, 17: 8711~8725
- 张毅, 沈文辉. 植物基因工程的新载体——农杆菌 Ri 质粒. 生物工程学报, 1989, 5(3): 173~178
- Lambert C, Tepfer D. Use of *Agrobacterium rhizogenes* to create chimeric apple trees through genetic grafting. Biotechnology, 1991, 9: 80~83[DOI]
- Hurd E A. Phenotype and drought tolerance in wheat. Agric Meteorol, 1974, 14: 39~45
- Nour A E, Wiebel D E. Evaluation of root characteristics in grain sorghm. Agron J, 1987, 70: 217~218