

发根农杆菌 A₄ 菌株转化苜蓿悬浮培养物

徐子勤 贾敬芬 胡之德*

(兰州大学生物系细胞生物学研究室和化学系 兰州 730000)

摘 要 将苜蓿无菌苗下胚轴切割后,在附加 2mg/L 2,4-D 的 MS 培养基上诱导愈伤组织。愈伤组织在附加 0.5mg/L 2,4-D 的 SH 培养基中悬浮培养。悬浮培养物在用于转化之前,用 0.45mol/L 甘露醇处理 1h,然后用 0.16mol/L CaCl₂·2H₂O 洗涤两次。预处理后的悬浮培养物用 SH 培养基悬浮(10ml/g 悬浮培养物),再加 0.2ml 农杆菌悬浮液,于 25±2℃ 共培养 2d。共培养的悬浮培养物洗涤后在附加 0.5mg/L 羧苄青霉素的无激素培养基上选择培养。悬浮培养天数、悬浮培养基激素组成和选择培养基种类明显影响转化频率。纸电泳分析表明 70% 的转化体可以合成农杆菌碱和甘露碱。染色体观察显示转化组织细胞存在严重的数目和结构变异。

关键词 悬浮培养物,转化,苜蓿(*Medicago sativa* L.),发根农杆菌,高渗预处理

发根农杆菌含 Ri 质粒,其 T-DNA 在 Vir 基因的协助下可以整合进植物核基因组,引起宿主植物发生毛根(Hairy root)病^[1]。对 T-DNA 进行改造,可以构建出新的具有目的基因和标记基因的 Ri 质粒。用含改造型 Ri 质粒的发根农杆菌感染植物细胞,可以将有用目的基因导入植物组织,并可能再生出转基因植物。所以发根农杆菌为遗传工程改良植物抗性和品质提供了一条十分有效的途径。发状根在形态上不具向地生长性,并且形成很多分枝,离体培养时表现出很强的激素自主性生长能力。同时,离体培养的发状根在无激素培养基上培养时可能自发产生芽点,进而发育成为完整小植株;这些小植株一般具有很发达的根系^[2]。发根农杆菌由于可以诱导产生大量发状根,在难发根植物(如红豆草、龙眼、荔枝等)的遗传工程研究中也具有很高应用价值。但发根农杆菌遗传转化在大多数情况下引起宿主植物细胞在细胞学方面失去稳定性;得到的转基因植物在形态上表现出叶皱缩等不利性状,很难开花结实。

已有不少报道涉及豆科植物的遗传转化,有的实验室还在提高豆科植物结瘤固氮能力方面作了一些尝试^[3]。本工作采用野生型发根农杆菌 A₄ 菌株对苜蓿悬浮培养物进行转化,得到转化根系,并对影响转化的一些因素作了分析研究。

1 材料与方法

1.1 植物材料

中国博士后科学基金资助项目。

本文于 1996 年 1 月 24 日收到。

挑取完整紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 种子, 经 70% 乙醇处理 30s, 随后浸入 0.1% Hg-Cl₂ (含少量 Tween-40) 12~15min。消毒以后的种子用无菌蒸馏水洗涤 5 次, 每次 5min; 然后接种于 MS^[4] 无激素培养基上萌发。

15d 后, 切取无菌苗下胚轴, 接种于含 2, 4-D 2mg/L 的 MS 培养基诱导愈伤组织。愈伤组织在同样培养基上继代培养, 每隔 2 周继代一次。

1.2 细菌活化

将保存于 4℃ 的发根农杆菌 A₄ 菌株, 转接到附加利福平 50mg/L 的 YMB 琼脂斜面上, 于 25℃ 暗培养。挑取单菌落接种于 10ml 液体 YMB 培养基 (含利福平 50mg/L), 在 120r/min、28℃ 暗培养 24h。菌液于 1000r/min 离心 10min, 使菌体沉淀, 沉淀的细菌用少量 (0.5ml 左右) 愈伤组织继代培养基悬浮。

1.3 愈伤组织悬浮培养

挑取生长良好的松散颗粒状愈伤组织, 转移到附加 0.5mg/L 2, 4-D 的液体 SH^[5] 培养基中, 于 80r/min 振荡培养, 每周转接一次。转接方法为吸取 2ml 悬浮培养物移至 20ml 新鲜培养基中, 也可以挑取粘在培养瓶瓶壁上的愈伤组织, 在同样条件下振荡培养。每次转接时, 吸取少量悬浮液体, 观察细胞状态。直到等径细胞占绝对优势时, 该悬浮培养物即可用于转化。

1.4 悬浮培养细胞的预处理

将苜蓿愈伤组织悬浮培养物离心, 用含 0.45mol/L 甘露醇的液体 SH 培养基悬浮, 室温放置 1h, 离心后用 0.16mol/L CaCl₂·2H₂O 洗涤两次。再用 SH 液体培养基悬浮 (10ml/g 悬浮培养物)。

1.5 转化

在一瓶悬浮培养细胞中滴入 0.2ml (约两滴) 细菌悬浮液, 于 80r/min、25℃ 振荡共培养 2d。然后离心, 将沉淀愈伤组织和细胞用无菌水离心洗涤 8 次以上, 直至上清液清澈透明。然后用附加 500mg/L 羧苄青霉素或头孢霉素的液体无激素 SH 培养基处理 45min~60min。离心沉淀后, 将愈伤组织和细胞用少量 SH 无激素培养基悬浮, 转移至附加 500mg/L 羧苄青霉素 (cb) 的无激素固体培养基上, 涂布分散于培养基表面进行选择培养。

1.6 转化组织的扩增和分化

在无激素培养基上生长增大的愈伤组织或形成的发状根组织及时转移扩增。继代几次后, 确信无农杆菌污染时, 取消培养基中的抗菌素。扩增以后的转化组织在各种激素组合的培养基上诱导分化。相对生长量为现重与初重之差除以初重。参考 Petit 等^[6] 方法检测转化组织和未转化的对照愈伤组织内的农杆菌碱与甘露碱合成酶活性。1g 待测组织加入 10ml 70% 乙醇进行研磨, 10000r/min 离心 10min 后, 上清液于室温挥发, 干燥产物用少量重蒸水溶解, 取 2μl 点样于新华 1 号滤纸, 400V 电泳 30min。缓冲液为甲醇: 乙酸: 水 (30:60:910)。滤纸吹干后, 用 AgNO₃ 进行染色。

1.7 染色体分析

悬浮培养物、转化愈伤组织和发状根系于 0~4℃ 预处理 1d 后, 在室温下用饱和对二氯苯溶液处理 4h。用卡诺固定液 (乙酸: 乙醇 = 1:3) 固定过夜, 然后在 1mol/L HCl 中于

60℃水解 15min。用蒸馏水充分洗涤后,于铁钒溶液中酶染,再用 0.5% 苏木精染色过夜。经 45% 乙酸分色后压片观察。

2 结果与讨论

2.1 预处理对转化效果的影响

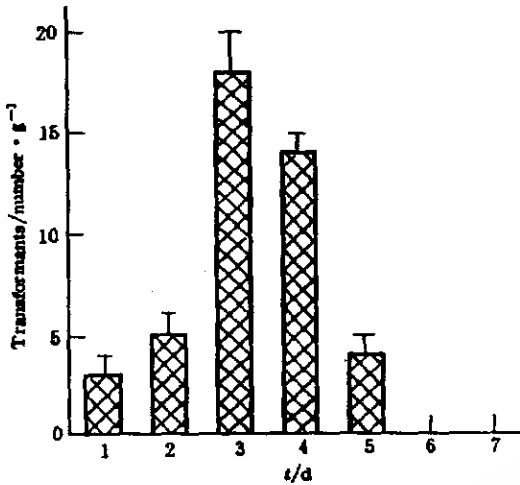


图 1 悬浮培养天数对转化的影响
Fig.1 Influence of suspension culture time on transformation

液体 SH 培养基中每 7d 转代一次。用处于不同培养时间的悬浮培养物进行实验,结果显示转代 3d 的培养物转化频率最高(图 1)。振荡 6d 以后,悬浮培养细胞对发根农杆菌的敏感程度很低,没有得到转化体。

2.2.2 2,4-D 和 6-BA 浓度对转化的影响:以 SH 为基本培养基,配合不同浓度的 2,4-D 和 6-BA 对苜蓿悬浮系进行转代培养,然后用于转化。结果表现 2,4-D 对悬浮系的生长和转化是必需的,其最佳浓度为 0.5mg/L,太高或太低对转化均有抑制作用。2,4-D 组合一定量的 6-BA 对转化也有抑制作用(表 1)。

2.2.3 选择培养基对转化的影响:转化处理以后的悬浮培养物,涂布在不含植物生长物质的不同基本培养基上选择培养,反应也不相同。使用

开始时用没有预处理的悬浮培养物进行转化,虽经大量试验,但未能得到转化体。将悬浮培养物用含甘露醇的高渗培养液处理后,得到能在无激素培养基上旺盛生长的愈伤组织和发状根。这一结果说明,高渗处理对悬浮培养物的转化是必须的。预处理实际上是使细胞在短时间内发生质壁分离而处于轻微的受伤状态。这种受伤状态有利于农杆菌感染和 Ri 质粒进入细胞并整合进核基因组。在随后的不同处理实验中,均对悬浮培养物进行了高渗预处理。转化频率的统计为 1g 悬浮培养物产生的转化体数。

2.2 影响转化的因素

2.2.1 培养时间对转化的影响:苜蓿悬浮培养细胞在附加 0.5mg/L 2,4-D 的

表 1 悬浮培养基激素组成对转化的影响*
Table 1 Influence of phytohormone constitution in suspension medium on transformation*

2,4-D/mg · L ⁻¹	6-BA/mg · L ⁻¹	Transformants/number · g ⁻¹
2	0	3a
1	0	17b
0.5	0	21b
0.2	0	5a
0.5	1	5a
0.5	0.5	7ab
0	0.5	0a

* 3-day suspension cultures were used in transformation. The basal medium was SH. Data were means of 3 replicates. Statistical analyses were carried out by Student t-test. Values followed by the different letters were significantly different in the column ($p < 0.05$).

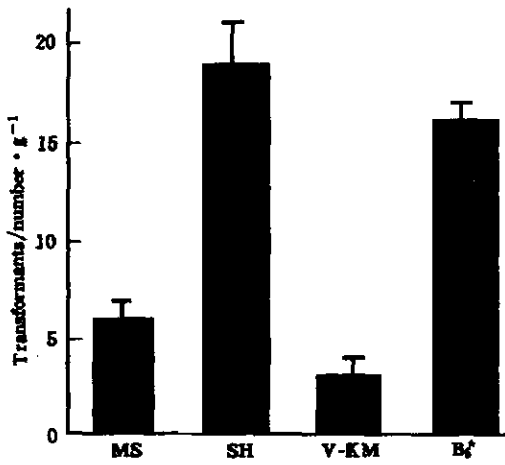


图 2 选择培养基对转化的影响

Fig. 2 Effect of selection media on transformation

的选择培养基包括 MS、SH、V-KM^[7] 和含 MS 铁盐成分的 B₅ 培养基^[8]。在 SH 和 B₅ (含 MS 铁盐) 两种培养基上得到的转化体较多。表明这两种培养基比较适合于转化体的生长(图 2)。

2.3 转化根系的培养和分化

共培养后 2 周, 转移的悬浮培养细胞中有少数开始生长增大, 有的形成发根。将增大的愈伤组织和发状根切割后转至无激素培养基, 60% 以上能持续生长, 并形成大量次生毛根, 具有很密的根毛(图版 I-7)。在无激素 SH 培养基上生长的转化根, 转代后的 10d 以内生长缓慢。生长 20d 时相对生长量为 1.97(图 3)。20d 以后, 生长又趋于缓慢。冠瘿碱分析表

明 70% 以上的转化系能合成农杆菌和甘露碱(图版 I-8)。但没有观察到苜蓿转化组织自发分化芽的现象。用各种激素配比诱导, 也未能实现分化。

2.4 染色体压片分析

在苜蓿悬浮培养物中, 82% 的细胞包含 32 条染色体, 其它 18% 细胞的染色体数目处于 32~96 条之间(图版 I-1~2)。这种染色体数目的变异可能由培养基中附加的植物激素 2, 4-D 引起。在转化愈伤组织细胞中, 染色体数目处于 32~80 条, 并且观察到环状染色体(图版 I-3)、染色体桥(图版 I-4)和染色体缺失(图版 I-5)等结构变异。图版 I-5 中一条染色体上有一段形成环状结构, 这种环状结构有可能脱离原染色体, 成为环状染色体。发状根的染色体数目处于 8~32 条之间(图版 I-6)。以上结果表明 Ri T-DNA 的整合可以引起植物细胞染色体在数目和结构上发生变异, 发状根组织中有严重的染色体丢失现象。

细胞遗传组成的稳定性是转化组织能否再生的关键。有研究指出 A₄ 菌株 Ri 质粒 T-DNA 的转移引起苜蓿胚发生能力的下降^[9]。在 *Lycopersicon peruvianum* 转化根中, 染色体的结构发生了变化^[10]。本研究得到的转化组织已失去分化能力, 这可能与其在细胞学方面的变异有关。

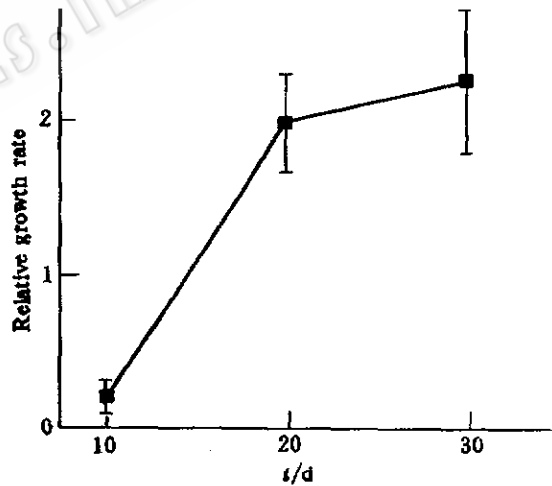


图 3 发状根的相对生长量

Fig. 3 Relative growth rate of hairy roots

参 考 文 献

- [1] Chilton M D, Tepfer D A, Petit A *et al*, *Nature*, 1982, **295**:432~434.
- [2] 徐子勤,贾敬芬. 兰州大学学报, 1994, **30**(2):96~100.
- [3] Beach K H, Gresshoff P M. *Plant Sci*, 1988, **57**:73~81.
- [4] Murashige T, Skoog F. *Physiol Plant*. 1962, **15**:473~479.
- [5] Schenk R U, Hildebrandt A C. *Can J Bot*, 1972, **50**:199~204.
- [6] Petit A, David C, Dahl G *et al*. *Mol Gen Genet*, 1983, **190**:204~214.
- [7] Binding H, Nehls R, Kock R *et al*. *Z Pflanzenphysiol*, 1981, **101**:119~130.
- [8] Gamborg O L, Miller R A, Ojima K. *Exp Cell Res*, 1968, **50**:151~158.
- [9] Thomas M R, Rose R J, Nolan K E. *Plant Cell Rep*, 1992, **11**:113~117.
- [10] Banerjee-Chattopadhyay S, Schwemmin A M, Schwemmin D J. *Theor Appl Genet*, 1985, **71**:258~262.

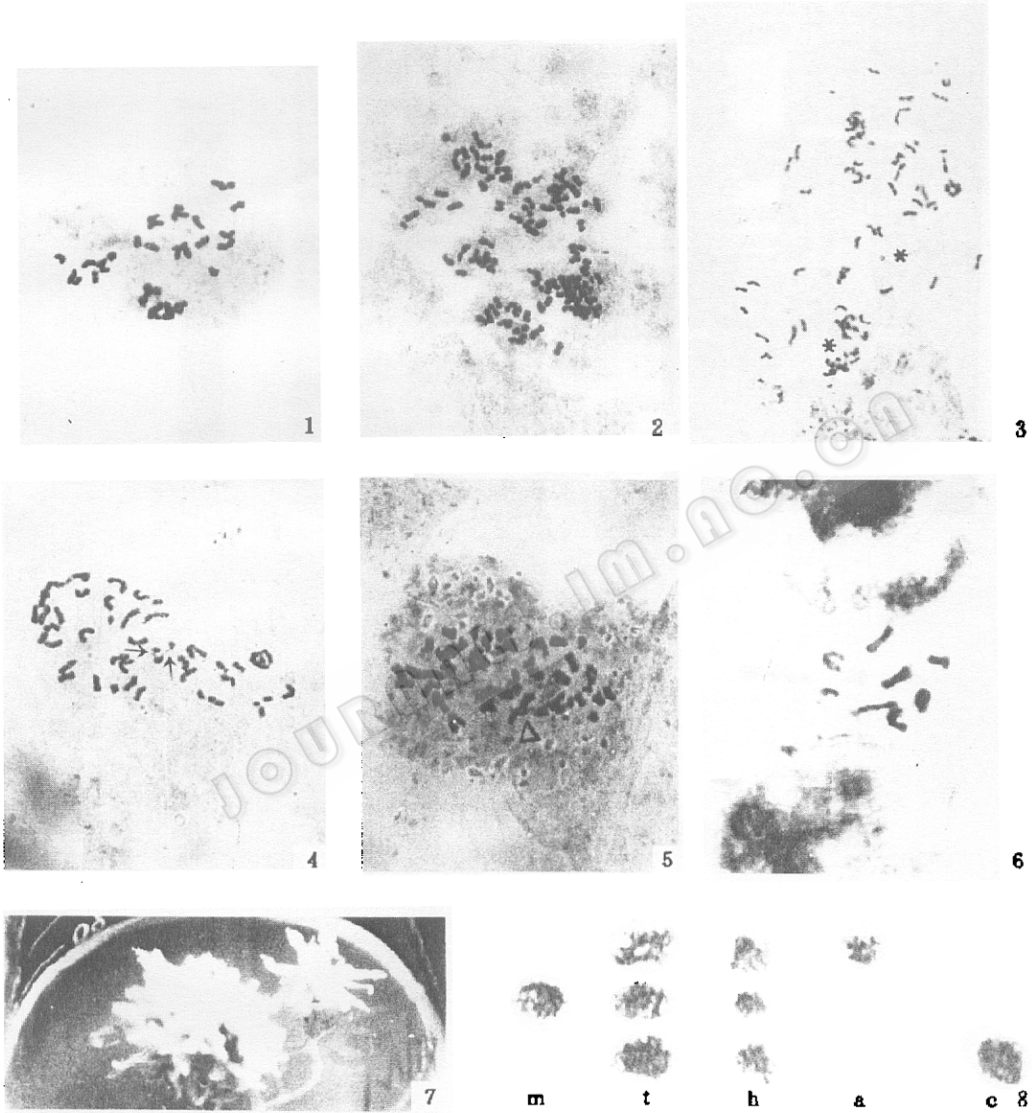
Transformation of Alfalfa Suspension Cultures by *Agrobacterium rhizogenes*

Xu Ziqin Jia Jingfen Hu Zhide

(Cell Biology Laboratory of Biology Department and Chemistry* Department of Lanzhou University, Lanzhou 730000)

Abstract Seeds of alfalfa were germinated on MS medium without phytohormones. The hypocotyls of seedlings were excised and cultured on MS medium with 2mg/L 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid to induce callus. Calluses were suspended and cultured in SH medium supplemented with 0.5mg/L 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. Before transformation, alfalfa suspension cultures were treated with 0.45mol/L mannitol for 1h, and washed with 0.16mol/L CaCl₂·2H₂O for two times. After pretreatment, the pellets were resuspended in SH medium without phytohormone (10ml/g suspension cultures), and 0.2ml of *Agrobacterium rhizogenes* suspension was added. Mixture of alfalfa cells and *Agrobacteria* was co-cultured at 25 ± 2℃ for two days. Transformed calluses and hairy roots were obtained by hormone-free selection. Several factors, such as culturing time of suspension cultures, phytohormone constitution of suspension medium and basal selection medium, affected the transformation frequency apparently. Paper electrophoresis revealed that over 70% transformants could synthesize agropine and mannopine. A comparative cytological observation revealed number and structural alterations of chromosomes in the resulting materials.

Key words *Agrobacterium rhizogenes*, alfalfa (*Medicago sativa* L.), high-osmotic pretreatment, suspension cultures, transformation



1~2. Chromosomes of suspension cells

3~5. Chromosomes of transformants, cycle chromosomes were signed by star, chromosome bridge was signed by arrow, triangle showed structural alteration through cyclization

6. A tip of hairy roots had eight chromosomes

7. Hairy root cultures on hormone-free medium

8. Paper electrophoresis, m-mannopine, t-transformed calli

h. hairy root, a-agropine, c-control