

三裂叶野葛毛状根的诱导及其固体培养和液体培养

施和平^{1*} 权 宏¹ Spiros Kintzios²

¹(华南师范大学生命科学学院, 广州 510631)

²(Laboratory of Plant Physiology, Department of Agricultural Biotechnology, Agricultural University of Athens, Jera odos 75 - 11855, Athens, Greece)

摘 要 发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*) ATCC15834 感染三裂叶野葛(*Pueraria phaseoloides*) 叶片外植体 20 d 后产生毛状根, 毛状根可直接从叶片外植体叶脉处或从叶脉处产生的愈伤组织上产生。感染 35d 后, 约 85% 的叶片外植体产生毛状根。毛状根能在无外源生长调节剂的 MS 固体和液体培养基上自主生长。PCR 扩增结果表明, 发根农杆菌 Ri 质粒的 *rolB* 和 *rolC* 基因已在三裂叶野葛毛状根基因组中整合并得到表达。与固体培养的毛状根相比, 在液体培养基中培养的毛状根不仅生长迅速, 也不会形成愈伤组织。在无外源生长调节剂的液体 MS 培养基中培养 15d 的三裂叶野葛毛状根的鲜重、干重、可溶性总糖含量及细胞内活性氧(ROS)含量分别为固体培养毛状根的 1.59 倍、1.18 倍、5.25 倍和 1.16 倍。

关键词 发根农杆菌, 三裂叶野葛, 毛状根, 可溶性总糖, 固体培养, 液体培养, 活性氧
中图分类号 Q945 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)03-0307-05

发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*) 侵染植物后, 它所含的 R_i (Root inducing) 质粒的 T-DNA 片段在植物细胞基因组中整合和表达, 形成毛状根 (hairy root)^[1,2]。利用能在无外源激素的培养基上自主生长、次生代谢物产率高而稳定的毛状根培养物来生产药用植物的次生物质, 已有不少报道^[3-5]。三裂叶野葛(*Pueraria phaseoloides*) 是以根入药的豆科药用植物之一, 具有解毒退热、生津止渴、透疹和解酒等功效^[6]。但至今未见利用发根农杆菌 ATCC15834 对三裂叶野葛进行遗传转化的正式报道。

目前, 培养毛状根常用的培养方法有固体培养和液体培养。Shimomura 等^[7]发现紫草毛状根在 MS 固体培养基中培养时, 不能产生任何色素, 而在专门培养根的液体培养基中培养时, 却能产生大量的色素并释放到培养基中。因而已有的研究大都集中在固体和液体培养方式对毛状根生长、形态及其次生代谢产物合成的影响或培养基中培养基成分的代谢变化与毛状根生长及其次生物质产生的相关性^[4,8-10]。而对固体培养和液体培养方式对毛状根本身生理生化特性的影响, 尚缺乏报道。

本文报道发根农杆菌遗传转化三裂叶野葛叶片外植体所产生的毛状根以及固体培养和液体培养对

毛状根生长及其本身生理特性影响的实验结果, 以期为今后选择合适的培养方式, 大规模培养毛状根来生产三裂叶野葛的次生物质奠定基础。

1 材料和方法

1.1 细菌菌株及培养

农杆菌型发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*) ATCC15834 由德国 Martin-Luther Universitaet Halle/Wittenberg 的 Peter Lindemann 博士提供。农杆菌在 AB 培养基上暗培养和保存。挑取该农杆菌单菌落, 接种于添加了 20 μmol/L 乙酰丁香酮的 YEB 液体培养基中 28℃ 震荡 (160 r/min) 培养 30 h, 供感染用。

1.2 外植体的制备

按我们已发表的方法^[11], 获得三裂叶野葛无菌苗。取无菌苗的幼嫩叶片切成具或不具叶柄的叶外植体, 并置于无激素的 MS^[12] 培养基上预培养 24 h 后, 用于转化。

1.3 毛状根的诱导和培养

将上述预培养的三裂叶野葛的具叶柄的叶片外植体浸入用 MS 培养基稀释 5 倍的发根农杆菌 15834 菌悬液中 20 min, 取出、吸干多余菌液并放回原培养基上共培养 2 d 后, 转入 MS + 500 mg/L 头孢

噻肟钠(cefotaxime)的无外源生长调节剂的 MS 培养基上,在 25°C 每天 14 h 散射光下诱导毛状根。切取从外植体产生的毛状根置于含 500 mg/L 头孢噻肟钠的无外源生长调节剂的 MS 培养基上除菌培养,直到获得无菌的毛状根。取等量的无菌毛状根分别置于 26°C 的恒温培养箱中黑暗条件下固体培养或恒温振荡器(100 r/min)中液体培养。固体培养和液体培养均用无外源生长调节剂的 MS 培养基。培养 15 d 后,取出毛状根,用滤纸吸干水分,进行鲜重和干重测量以及毛状根活性氧含量及可溶性总糖含量的测定。

1.4 毛状根的 PCR 检测

取 2 g 无菌三裂叶野葛毛状根,按 Edwards 等^[13]的方法提取三裂叶野葛毛状根基因组 DNA,纯化后用作 PCR 扩增的模板。根据 Fumer 等发表的序列^[14],分别设计并合成扩增 rolB 和 rolC 的 PCR 引物。rolB 引物:P1:5'-GCTCTTGCAGTGCTAGATTT-3';P2:5'-GAAGGTGAAGCTCCTCTC-3'。rolC 引物:P1:5'-CTCCTGACATCAAACCTCGTC-3';P2:5'-TGCTTCGAGTTATGGGTACA-3'。在 0.5 mL 的硅化离心管中加入模板 DNA 50 ng, Taq DNA 聚合酶 2 个单位,PCR 反应总体积为 50 μ L。PCR 扩增参数如下:起始热变性 94°C 3 min 后,接着进行 35 个循环,每个循环包括 94°C 变性 1 min,53.5°C 退火 1 min 和 72°C 延伸反应 1 min。扩增产物采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳和 EtBr 染色进行分析。

1.5 毛状根细胞中活性氧的测定

毛状根细胞中活性氧的测定参考 Cathart 等^[15]的方法。毛状根分别置于液体和固体的 MS 培养基上培养 15 d 后,分别取 300 mg,用滤纸吸干水分后,加入 6 mL PBS 缓冲液,匀浆放置 30 min 后,加入 2',7'-二氯荧光黄乙二酯(H₂DCF-DA,2',7'-dichlorofluorescein diacetate),使其终浓度为 5 μ mol/L,室温放置 30 min 后,DCFH-DA 水解生成非荧光的 DCFH,在活性氧(ROS)氧化下生成发荧光的 DCF,胞内活性氧的变化通过 DCFH-DA 的荧光强度的变化得到反映。所产生的发荧光的 DCF 经 488 nm 波长激发后,用 Jasco FP-920 荧光探测器(Fluorescence detector)在 732 nm 波长下进行测定。

1.6 毛状根中可溶性总糖含量测定

参照张宪政等^[16]的蒽酮法。取经 MS 固体和液体培养基培养 15 d 的三裂叶野葛烘干毛状根约 200 mg,加入适量的 80% 乙醇匀浆抽提后,取 100 μ L 抽提液,加入 5 mL 蒽酮(Anthrone)试剂(150mg An-

throne 溶于 100 mL 70% 的 H₂SO₄ 中),摇匀,90°C 保温 15 min 后,于 620 nm 波长下测定 OD 值,并依葡萄糖标准曲线计算出可溶性总糖含量。

2 结 果

2.1 三裂叶野葛毛状根的诱导和培养

未感染的三裂叶野葛叶片外植体在无外源生长调节剂的 MS + 500 mg/L 头孢噻肟钠的培养基上连续培养 2 个月后无一生根,仅从部分叶片的形态学下端切口中脉处或叶柄切口处产生少量浅黄绿色致密的愈伤组织。而感染发根农杆菌的叶片外植体培养 10 d 后,从其叶片切口中脉处或叶柄切口处附近产生浅黄绿色愈伤组织,随后再从愈伤组织上产生毛状根,或直接由叶柄切口处或附近表面产生毛状根(图 1 A)。将所产生的毛状根切下并置于 MS + 500 mg/L 头孢噻肟钠中除菌培养,每隔 7 d 左右转接 1 次,约 5~6 次后即可完全除菌。无菌的毛状根可在无外源生长调节剂的 MS 培养基上快速自主生长,并且较多分枝。取一部分无菌的毛状根用于转化鉴定,一部分毛状根分别置于 MS 液体和固体培养基中培养 15 d 后,供进行毛状根生长、活性氧水平及可溶性糖含量的测定。

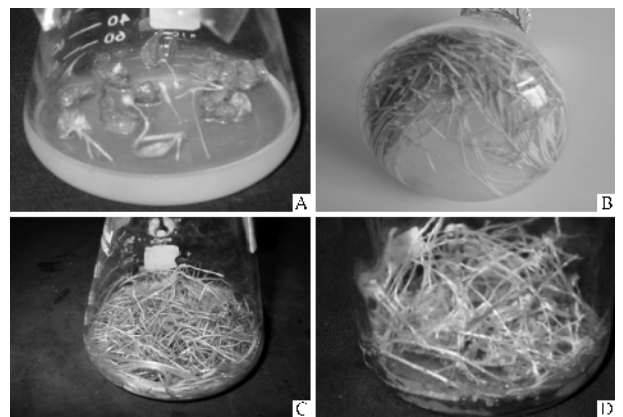


图 1 三裂叶野葛毛状根的诱导和培养

Fig. 1 Induction and culture of *Pueraria phaseoloides* hairy roots

A. Hairy roots from leaf explants 20 days after inoculation with *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834; B. Hairy roots cultured on solid growth regulator-free MS medium for 15 days; C. Hairy roots cultured into liquid growth regulator-free MS medium for 15 days; D. Hairy roots with some callus cultured on solid growth regulator-free MS medium for 30 days

2.2 毛状根中 rol 基因的 PCR 扩增

Rol B 和 rol C 是发根农杆菌 Ri 质粒 TL-DNA (T-DNA 左臂)上的 2 个生根基因。从图 2 可见,我们利用 rolB 和 rolC 的 PCR 引物,能从三裂叶野葛

毛状根的总 DNA 中分别扩增到期望的 540bp 和 770bp 左右的特异性 DNA 片段,而从三裂叶野葛非转化根的总 DNA 中扩增不到任何片段(图 2)。这说明,发根农杆菌的含 *rol* 基因的 RiT-DNA 部分已在三裂叶野葛基因组中整合并得到表达。

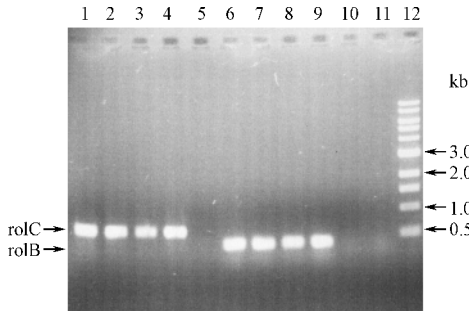


图 2 三裂叶野葛毛状根 PCR 扩增产物的凝胶电泳分析

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR products analysis of *Pueraria phaseoloides* hairy roots

1~4. Fragments from hairy roots with *rolC* primers; 5. Fragments from control roots with *rolC* primers; 6~9. Fragments from hairy roots with *rolB* primers; 10. Fragments from control roots with *rolB* primers; 11. No template DNA control; 12. Marker, 1kb DNA ladder

2.3 固体培养和液体培养对毛状根生长及其细胞中可溶性糖含量的影响

如图 1 所示,无菌的三裂叶野葛毛状根能在无外源生长调节剂的 MS 固体或液体培养基中快速自主生长(图 1, B, C),但毛状根在液体培养基中的生长速度比固体培养的毛状根快。培养至 24 d 后,液体培养的毛状根的老的根段(起始根段)开始褐化,培养基变混浊,而固体培养的三裂叶野葛毛状根培养至 30d 后老的根段才开始变褐,或产生少量呈念珠状的愈伤组织(图 1, D)。培养 15 d 后,取固体培养和液体培养的毛状根进行生长和可溶性总糖测定的结果表明(表 1),固体培养的三裂叶野葛毛状根的可溶性总糖含量仅为液体培养的三裂叶野葛毛状根可溶性总糖的 19%。培养 15 d 后,液体培养的毛状根的鲜重和干重分别为固体培养的 1.59 倍和 1.18 倍。

2.4 固体培养和液体培养对毛状根细胞中活性氧水平的影响

为了研究固体培养和液体培养方式对三裂叶野葛毛状根生长的影响,我们将等量的毛状根置于无外源生长调节剂的 MS 液体培养基和固体培养基上培养,15 d 后取样进行毛状根细胞内活性氧水平的测定。测定结果如图 3 所示,液体培养的三裂叶野葛毛状根细胞内的 DCF 的荧光强度明显比固体培

养的毛状根强,即液体培养的三裂叶野葛毛状根细胞内产生的活性氧(ROS)比固体培养的三裂叶野葛毛状根多,约为固体培养的毛状根细胞产生的活性氧的 1.16 倍(图 3)。

表 1 固体培养和液体培养对三裂叶野葛毛状根生长及其可溶性总糖含量的影响

Table 1 Effects of liquid culture and solid culture on the growth and the total content of soluble sugar of *Pueraria phaseoloides* hairy roots

Culture manner	Fresh weight/g	Dry weight/g	Total soluble sugar (mg/g [*])
Hairy roots in solid medium	4.935	1.236	8.682
Hairy roots in liquid medium	7.847	1.458	45.620

* Dry weight

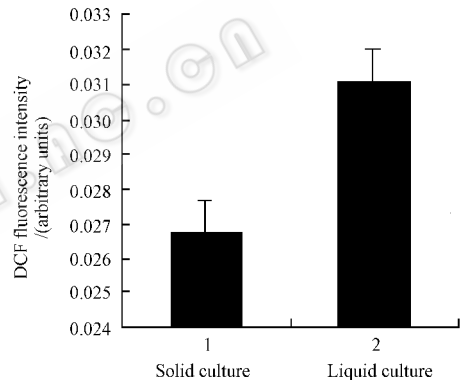


图 3 液体培养和固体培养对三裂叶野葛毛状根细胞内活性氧水平的影响

Fig. 3 Effects of liquid culture and solid culture on the levels of reactive oxygen species in hairy roots of *Pueraria phaseoloides*

3 讨论

利用发根农杆菌 Ri 质粒的 T-DNA 片段在药用植物基因组中的整合和表达所产生的生长迅速的毛状根培养物来生产药用植物的次生物质,已在不少药用植物中获得成功^[4, 5, 9, 10, 17]。本实验中我们通过含农杆菌型 Ri 质粒的发根农杆菌 ATCC15834 对三裂叶野葛具叶柄的叶片外植体的遗传转化,获得了具备无激素自主生长特性的三裂叶野葛毛状根,并能利用该毛状根来生产葛根素等异黄酮类次生物质(该部分结果将另文发表)。

糖是毛状根离体生长必需的重要碳源,已有的研究表明,它在培养基中的代谢变化与毛状根的生长、形态及其次生物质的累积密切相关^[10]。在培养青蒿(*Artemisia annua*)毛状根时发现,在一定的浓度

范围内提高蔗糖浓度能刺激毛状根的生长,但 2% 的蔗糖有利于青蒿素的产生,大于 2% 时,青蒿素含量下降;但当浓度达到 8% 时,根的形态即发生变化,分枝减少,根变粗,极易断裂,颜色由淡黄色变成浅黄色,生长速度也开始下降^[8]。胡之璧等(1993)在培养丹参(*Salvia miltiorrhiza*)毛状根时,发现培养基中的蔗糖在 16 d 内消耗完毕,因此在培养第 14 天时补加糖至 3%,则次生物质二萜化合物的最终积累即大大增加^[4]。在培养天仙子(*Hyoscyamus albus*)毛状根时,培养基中的蔗糖浓度并不明显影响毛状根的生长,但 3% 的蔗糖浓度最适合生物碱的产生^[18]。在培养何首乌毛状根时也证实,培养基中蔗糖的消耗速率与毛状根生物量的积累密切相关^[10]。然而,这些研究都集中在研究培养基中蔗糖浓度的变化及其对次生物质形成的影响,而至于糖类在毛状根细胞内的代谢方式则缺乏研究。在我们的实验中,固体培养基培养的三裂叶野葛毛状根中的可溶性总糖含量仅为液体培养基培养的三裂叶野葛毛状根可溶性总糖的 19%。此外,我们在取毛状根进行研磨制备可溶性总糖测量样品时,发现固体培养基培养的三裂叶野葛毛状根含有较多纤维。因而我们推测,培养在固体培养基中的毛状根利用或代谢糖的能力比液体培养基培养的毛状根强得多。

固体培养和液体培养是利用毛状根生产植物次生物质的两种主要培养方法。但以往的研究大都集中在固体培养和液体培养对提高毛状根中次生物质的含量以及对毛状根形态发生的影响。有报道证实,当绞股蓝毛状根在固体培养基中生长太多时,老的毛状根就开始肿大,产生愈伤组织,但液体悬浮培养的毛状根则不会产生愈伤组织,且液体培养可比固体培养产生更多的皂甙等次生代谢产物^[9]。这与本实验的结果基本一致。我们发现,三裂叶野葛毛状根在固体培养基上培养 1 个多月后,会产生少量呈串珠状的愈伤组织(图 1 D),同时我们观察到,三裂叶野葛毛状根在液体培养基中培养 24d 后老的毛状根就开始褐化,而在固体培养基上则 30~35 d 后老的毛状根(起始根段)才开始褐化肿胀。但至于固体培养和液体培养方式对毛状根本身生理生化特性有何影响,则尚未见报道。

活性氧(Reactive oxygen species)可看成是植物的一种警报信号,在正常的生理条件下,植物代谢过程中产生的活性氧是电子传递系统不可避免的结果,植物的线粒体在正常的呼吸过程中,内膜呼吸链上能产生基态分子氧的单电子还原而生成超氧化物阴离

子自由基^[19,20]。有不少研究证实,所产生的过量活性氧能同许多细胞组分发生反应,从而引起酶失活,色素脱色,蛋白降解和脂质过氧化,膜透性改变和离子的漏失等,并最终导致植物细胞的死亡^[21,22]。在本实验中,我们首次发现,液体培养的三裂叶野葛毛状根所产生的活性氧水平比固体培养的毛状根高,同时我们观察到,液体培养的毛状根在培养过程中开始褐化的时间明显比固体培养的毛状根提早。这种现象是否与液体培养中所产生的较高的活性氧含量有关,尚需进一步研究。

致谢:本研究工作得到了中国科学技术部和希腊发展部的共同资助。德国马丁·路德大学 Peter Lindemann 博士馈赠发根农杆菌菌种 ATCC15834;希腊雅典农业大学农业生物技术学院 Helen Pistola 女士协助进行活性氧的荧光测定,在此一并致谢。

REFERENCES (参考文献)

- [1] White F F, Nester E W. Hairy root: plasmid encodes virulence traits in *Agrobacterium rhizogenes*. *J Bacteriol*, 1980, **41**: 1134 - 1141
- [2] Chilton M D, Tepfer D, Petit A et al. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature*, 1982, **295**: 432 - 434
- [3] Hamill J D, Parr A J, Rhodes M J C et al. New routes to plant secondary products. *Bio/Technology*, 1987, **5**: 800 - 804
- [4] HU Z B (胡之璧), Alfemann A W. Diterpenoid production in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry*, 1993, **32**(2): 699 - 703
- [5] Yoshikawa T, Furuya T. Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep*, 1987, **6**: 449 - 453
- [6] GUO J P (郭建平), SUN Q R (孙其荣), ZHOU Q (周全). Advances of pharmacological research of *Gegen*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (中草药), 1995, **26**(3): 163 - 165
- [7] Shimomura K, Sudo H, Saga H et al. Shikonin production and secretion by hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Reports*, 1991, **10**: 282 - 285
- [8] CAI G Q (蔡国琴), LI G Z (李国珍), YE H C (叶和春) et al. Hairy root culture of *Artemisia annua* L. by Ri plasmid transformation and biosynthesis of Artemisinin. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1995, **11**(4): 315 - 320
- [9] FEI H M (费厚满), MEI K F (梅康凤), SHEN X (沈昕) et al. Transformation of *Gynostemma pentaphyllum* by *Agrobacterium rhizogenes* and saponin production in hairy root cultures. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 1993, **35**(8): 626 - 631
- [10] WANG L (王莉), YU R M (于荣敏), ZHANG H (张辉) et al. Hairy root culture of *Polygonum multiflorum* Thunb and the production of its active constituents anthraquinones. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2002, **18**(1): 69 - 73
- [11] SHI H P (施和平). Plantlet regeneration from the petiole and stem

- 草药) 2000, **31**(7): 550-552
- [12] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 1962, **15**: 473-479
- [13] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucl Acids Res*, 1991, **19**: 1349
- [14] Furner I J, Huffman G A, Amasino R M *et al.* An *Agrobacterium* transformation in the evolution of the genus *Nicotiana*. *Nature*, 1986, **319**: 422-427
- [15] Cathart R, Schwiers E, Ames BN. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal Biochem*, 1983, **134**(1): 111-116
- [16] ZHANG X Z (张宪政), CHEN F Y (陈凤玉), WANG R F (王容富). A Text-Manual of Plant Physiology. Shenyang: Liaoning Science and Technology Publishers, 1994. pp. 144, 133-136
- [17] ZHANG Y I (张荫麟). The transference of Ri plasmid from *Agrobacterium rhizogenes* to *Scopolia lurida* revealed by the hairy root cultivation and the alkaloids production. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 1988, **30**: 368-371
- [18] Christen P, Aoki T, Shimomura K. Characteristics of growth and tropane alkaloid production in *Hyoscyamus albus* hairy roots transformed with *Agrobacterium rhizogenes* A4. *Plant Cell Reports*, 1992, **11**: 597-600
- [19] Rich P R, Bonner WDJR. The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria. *Biochem Biophys*, 1978, **13**: 206-213
- [20] DU X M (杜秀敏), YIN W X (殷文璇), ZHAO Y X (赵彦修) *et al.* The production and scavenging of reactive oxygen species in plants. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2001, **17**(2): 121-125
- [21] WANG A G (王爱国), LUO G H (罗广华), SHAO C B (邵从本) *et al.* Oxygen metabolism of plant and the injury of cells by the activated oxygen. *Acta Botanica Austro Sinica of South China Institute of Botany Sinica* (中国科学院华南植物研究所集刊), 1989, the fifth volume: pp. 11-24
- [22] Elstner E F. Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annu Rev Plant Physiol*, 1982, **33**: 73-76

Induction of Hairy Roots of *Pueraria phaseoloides* and Its Culture in Liquid and Solid Medium

SHI He-Ping^{1*} QUAN Hong¹ Spiros Kintzios²

¹(School of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

²(Laboratory of Plant Physiology, Department of Agricultural Biotechnology, Agricultural University of Athens, Iera odos 75-11855, Athens, Greece)

Abstract An efficient transformation system for genetic transformation of medicinal plant, *Pueraria phaseoloides* which contains puerarin and daidzein with hypothermic, spasmolytic, hypotensive and anti-arrhythmic activities, by using agropine-type *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 was developed. Hairy roots could be obtained directly from the cut edges of petioles of leaf explants of *P. phaseoloides* or via callus 20 days after inoculation with agrobacterium. The percentage of rooted leaf explants 35 days after infection was about 85%. Hairy roots could have a rapid growth on solid or liquid growth regulator-free MS medium. The transformation of hairy roots was confirmed by PCR amplification of rol B and rolC genes of Ri plasmid from *A. rhizogenes*. To investigate the physiological difference between solid and liquid culture, the biomass (fresh weight and dry weight), the reactive oxygen species (ROS) and the total content of soluble sugar in hairy roots cultured for 15 days in solid and liquid medium were detected, respectively, by the method of fluorescence labeling of 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (2', 7'-DCFH-DA) and by the anthrone colourimetry. Compared to hairy roots in solid medium, hairy roots grew more rapidly in liquid medium but formed no callus and appeared to become brown earlier during culture. The fresh weight, the dry weight, the total content of soluble sugar and the levels of reactive oxygen species of hairy roots cultured into liquid medium MS without plant growth regulators for 15 days were 1.59 times, 1.18 times, 5.25 times and 1.16 times, respectively as much as that of hairy roots cultured onto solid medium. Our results firstly indicate that *P. phaseoloides* hairy roots in solid medium can utilize or metabolize more soluble sugar but produce less reactive oxygen species than that in liquid medium. This may be related to the fact that hairy roots are easier to turn brown in liquid medium than that onto solid medium. Our results have laid a foundation for defining optimum culture manner for large-scale cultivation and large-scale production of secondary metabolites of *P. phaseoloides* hairy roots.

Key words *Agrobacterium rhizogenes*, *Pueraria phaseoloides*, hairy roots, total soluble sugar, solid culture, liquid culture, reactive oxygen species (ROS)