

商陆毛状根的诱导、培养及其皂甙的产生

施和平* 梁朋 权宏

(华南师范大学生命科学学院 510631 广州)

摘 要 发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)R1601 感染商陆叶片外植体 1 周后,在其切口处产生毛状根,20d 后产生毛状根的外植体比例达 70%;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。毛状根能在无激素的 MS 培养基上自主生长,其呼吸速率比对照根提高 85.6%。冠瘿碱检测和 PCR 扩增结果表明,发根农杆菌 RiT-DNA 的冠瘿碱合成酶基因及其 Ri 质粒的 *rol* 基因均已在商陆毛状根基因组中得到表达。毛状根中总皂甙含量约为自然根的 1.54 倍,但其多糖含量则仅为非转化根的 70%。

关键词 发根农杆菌;商陆;毛状根;呼吸速率;总皂甙

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)01-0046-04

发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)侵染植物后,它所含的 Ri 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^[1,2]。利用生长迅速、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^[3-6]。但利用发根农杆菌对商陆(*Phytolacca esculenta* van Houtte)的遗传转化,以毛状根来生产商陆的药用成份,至今未见正式的报道。

商陆的根是我国长期应用的一种传统中药。用于治疗水肿满胀、二便不通,也用于治疗慢性气管炎和肿瘤等疾病^[7-9]。本文报道商陆毛状根的诱导、离体培养及从毛状根产生商陆皂甙的部分实验结果,以期为今后利用毛状根大规模生产商陆的次生物质打下基础。

1 材料和方法

1.1 细菌菌株及培养

发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)R1601 菌株,该菌含 Ri 质粒 pRiA4b,并且其中 *Hind* III 片段 21 上整合 NPTII 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* 区的粘性质粒 pTVK291^[10]。感染植物材料之前,将农杆菌接于添加了 20 μ mol/L 乙酰丁香酮的 YEB 液体培养基中 28 $^{\circ}$ C 震荡(160 r/min)培养 30 h。

1.2 外植体制备

按我们已发表的方法^[11],获得商陆无菌苗。取无菌苗的幼叶切成具叶柄或叶脉的 0.5 cm² 叶块,并置于无激素的 MS 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

将上述预培养的叶柄和叶片外植体浸入用 MS 培养基稀释 5 倍的发根农杆菌菌悬液中 5~8min,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)的无激素 MS 培养基上,散射光下诱导毛状根。切取各外植体产生的毛状根置于含 500 mg/L 头孢噻肟钠的无激素的 MS 培养基上除菌培养。无菌的毛状根在 MS 培养基上保存和待用。

1.4 毛状根呼吸强度的测定

用 Warburg 氏检压法测定呼吸强度,呼吸计的反应瓶内放 200 mg 左右的毛状根,蒸馏水 2 mL,小井内加 20% KOH 0.2 mL,在 26 $^{\circ}$ C 恒温下测定耗氧量。重复测定 3 次,取平均值。

1.5 毛状根冠瘿碱的检测

取商陆毛状根约 200 mg 置于 1.5 mL Eppendorf 管中,加 0.1 mol/L HCl 200 μ L,用玻璃棒捣成匀浆。14000 r/min 离心 5min,取上清液 100 μ L 进行高压纸电泳(40V/cm),电泳 90min 取出滤纸,按 Morgan

等^[12]的方法用碱性硝酸银染色。以商陆无菌苗幼芽在 MS + 0.5 mg/L NAA 上形成的不定根作为对照。根据冠瘿碱的有无确定是否是转化毛状根。

1.6 毛状根的 PCR 检测

取 5g 商陆毛状根按 Roger 和 Bendick(1985)^[13] 的 CTAB 法提取商陆基因组 DNA 纯化后用作模板。根据 Furner 等(1986)发表的序列^[14], 分别设计并合成扩增 *rolB*, *rolC* 的 PCR 引物。*rolB* 引物: P1: 5'-GCTCTTGCAGTGCTAGATTT-3'; P2: 5'-GAAGGTG-CAAGCTACCTCTC-3'。*rolC* 引物: P1: 5'-CTCCTGACATCAAACCTCGTC-3'; P2: 5'-TGCTTCGAGTTATGGGTACA-3'。PCR 扩增参数如下: 起始热变性 94℃ 3 min 后, 接着进行 35 个循环, 每个循环包括 94℃ 变性 1 min, 53.5℃ 退火 1 min 和 72℃ 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。

1.7 商陆毛状根皂甙和多糖含量的测定

取 2g 商陆毛状根和对照根(野外采集的自然根)干样品研磨后, 加入 80% 甲醇回流抽提, 合并滤液、减压浓缩至干后, 在水和 n-BuOH 部分减压浓缩至干, 通过称重法确定总皂甙的含量。毛状根干样品用 80% 乙醇和 5% 三氯乙酸提取后, 合并过滤液, 参照张惟杰^[15](1987)的硫酸蒽酮试剂比色法测定其多糖含量。

2 结果及分析

2.1 商陆毛状根的诱导和培养

未感染的商陆叶片外植体在无激素的 MS + 500mg/L 头孢噻肟钠的培养基上连续培养一月后无一生根, 大部分叶片的形态学下端切口中脉处产生紫红色疏松愈伤组织, 叶背面变成紫红色。而感染发根农杆菌 R1601 的叶片外植体培养一周后, 从其切口中脉处或附近产生少量愈伤组织, 再从愈伤组织上产生毛状根; 也可直接从切口叶脉处产生毛状根(图 1), 10d 后生根的外植体比例占 38%, 至 20 d 时达 70%; 毛状根被白色短根毛。此外, 还观察到可直接从叶柄外植体的表面产生毛状根, 且叶柄外植体的生根效果更佳。将毛状根切下置于 MS + 500 mg/L 头孢噻肟钠中除菌培养后, 毛状根可在无外源激素的 MS 培养基上自主生长, 并且较多分枝和根毛(图 2)。非转化根(自然根)不能在无外源激素的 MS 培养基中自主生长, 并随着培养时间延长逐渐褐化、坏死; 而商陆毛状根却能在无外源激素的 MS 培养基中快速自主生长, 培养 3 周后其鲜重增加约 18 倍。

2.2 毛状根中冠瘿碱的检测

通常用冠瘿碱作为 Ri 质粒转化整合的观察指标之一。从图 2 可见, 发根农杆菌 R1601 诱导商陆叶片外植体产生的毛状根能合成农杆菌碱和甘露碱, 而对照根中没有检测到农杆菌碱和甘露碱。这表明发根农杆菌 Ri 质粒 TR-DNA(T-DNA 右臂)区中编码冠瘿碱合成酶的基因已在商陆细胞中得到表达。

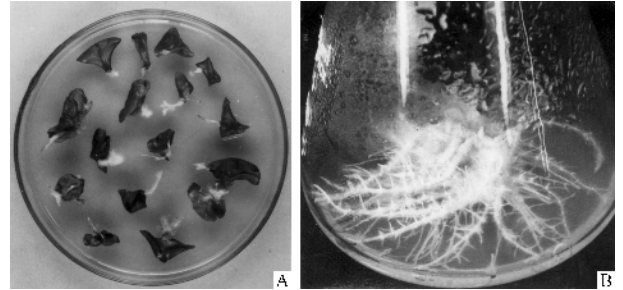


图 1 商陆毛状根的诱导和培养

Fig.1 Induction and culture of *Phytolacca esculenta* hairy roots
A. Hairy roots from leaf explants after inoculation with *Agrobacterium rhizogenes* R 1601;
B. Hairy roots on medium MS without hormones

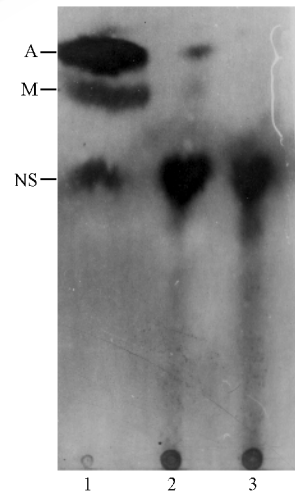


图 2 商陆毛状根中农杆菌碱和甘露碱的检测

Fig.2 Detection of agropine and mannopine in hairy roots of *Phytolacca esculenta*

1. Standard agropine (A) and mannopine (M); 2. Fresh hairy root extracts 3. Control root extracts. N.S. Neutral sugars

2.3 毛状根中 *rol* 基因的 PCR 扩增

利用 *rolB*, *rolC* PCR 引物, 能从冠瘿碱检测呈阳性的商陆毛状根的总 DNA 中分别扩增到期望的 540bp 和 770bp 左右的特异性 DNA 片段, 该片段与从野生型发根农杆菌 15834 的 Ri 质粒 DNA 中扩增出的特异性片段大小相同(图 3)。而商陆非转化根的总 DNA 中扩增不到此片段。这说明, 发根农杆菌的 Ri 质粒 DNA 也已整合入商陆毛状根基因组中。

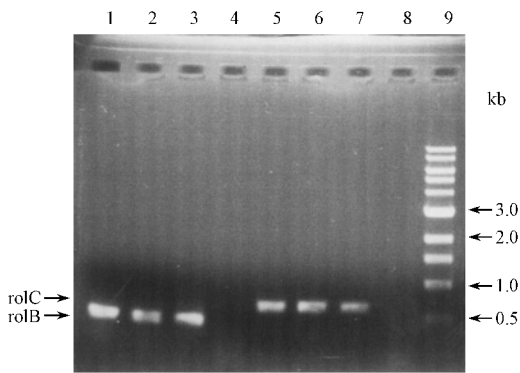


图3 商陆毛状根的 PCR 产物的电泳分析

Fig.3 Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products of *Phytolacca esculenta* hairy roots

1.2. Fragments from Hairy roots with *rol B* primers ;3. Fragments from Ri plasmid with *rol B* primers ;4. Non-transformed roots with *rolB* primers ;5.6. Fragments with *rol C* primers from hairy roots ;7. Fragments from Ri plasmid with *rolC* primers ;8. Non-transformed roots with *rolC* primers ;9. Marker ,1kb DNA ladder

2.4 毛状根呼吸强度的测定

为阐明毛状根快速自主生长的特性,我们测定了毛状根的呼吸速率[每小时每克(FW)中 O_2 的量(μL)],表1表明:毛状根的呼吸强度比正常根(非转化根)增高85.6%。可以推测,毛状根的快速自主生长特性可能与其本身具有较高的呼吸速率有关。

表1 Ri 质粒转化产生的商陆毛状根的呼吸速率的变化

Table 1 Changes in respiration rate between control roots and hairy roots of *Phytolacca esculenta*

Root type	Fresh weight/g	Respiration rate ($\mu L \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$)	Percentage/%
Hairy roots	0.265	28.547	185.6
Control roots	0.215	15.386	100.00

2.5 商陆毛状根中皂甙和多糖含量的分析

取商陆毛状根置于MS液体培养基中培养2周后,取样,烘干后,分别测定毛状根中的皂甙和多糖含量。结果如表2所示。商陆毛状根能合成皂甙和多糖,并且,毛状根中总皂甙含量约为自然根的1.54倍,但其多糖含量则比非转化自然根低,约为自然根的70%。

表2 商陆毛状根和自然根中多糖和总皂甙含量

Table 2 Polysaccharides and total saponin contents in hairy roots and control roots of *Phytolacca esculenta* van. Houtte

Root type	Crude saponin(% of DW)	Polysaccharides(% of DW)
Control roots	2.68 \pm 0.12	8.42 \pm 0.24
Hairy roots	4.13 \pm 0.07	5.89 \pm 0.18

3 讨论

本研究表明,发根农杆菌感染商陆叶片外植体和叶柄外植体后,都可以产生转化毛状根,但二者毛状根形态发生的方式不同。其中被发根农杆菌感染的叶柄外植体不经愈伤组织阶段,直接从其切口部分产生根原基,发育成毛状根,而叶片外植体则可直接从切口表面或从形成的愈伤组织上形成毛状根。这与Ri质粒转化胡萝卜(*Daucus carota* L.)块根切片和烟草(*Nicotiana tabacum* L.)茎切段时,形成愈伤组织后再产生毛状根的方式不同^[16],然而马铃薯叶片外植体和块茎切块被发根农杆菌感染后则直接产生毛状根,但其茎段外植体则从形成的愈伤组织上长出毛状根^[17]。不过,发根农杆菌转化甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)子叶和下胚轴时,毛状根既可直接从切口处产生,也可从切口处形成的愈伤组织上长出^[18]。可见,发根农杆菌侵染植物细胞后,毛状根的形态发生方式可因植物种类和感染部位等不同而有所差异。

许多的报道表明,毛状根都能在没有激素的培养基上快速自主地生长,并迅速增殖。据报道,有的植物的毛状根在适宜的条件下,其生长速度可比非转化根快100~1000倍^[18]。但对其快速生长的机理则不清楚。呼吸代谢是植物生理活动的基础,在我们的实验中,商陆毛状根的呼吸强度比正常根(非转化根)增高85.6%。因而推测,毛状根的快速自主生长特性可能与其本身具有较高的呼吸代谢有关。

应用发根农杆菌Ri质粒的T-DNA在药用植物的基因组中的整合,产生生长迅速并能合成与正常亲本植物根中相似(同)次生物质的毛状根,已在不少药用植物中获得成功^[2-6,19]。Mano等(1986)^[20]用含Ri质粒的发根农杆菌转化药用植物莨菪(*Scopolia japonica*)获得了具无激素自主生长特性的毛状根,并从中分离出莨菪碱和天仙子胺。用同样的方法,获得了颠茄(*Atropa belladonna*)的毛状根培养物,而且毛状根中生物碱的含量与正常植株一样,甚至高于后者^[21]。我们以商陆叶片外植体为材料,建立了发根农杆菌对商陆的遗传转化系统,并从商陆毛状根中分离得到了商陆皂甙和多糖,这与上述研究者的结果基本一致。不同的是,在我们的实验中,商陆毛状根不仅能和原植物一样产生皂甙和多糖,并且皂甙的含量比自然根(非转化根)提高约54%,但其多糖含量则仅为非转化根的70%。本实验所建立的商陆毛状根系统,为今后进一步研究毛状根大量培养生产商陆皂甙和多糖奠定了基础。至于毛状根中是否能合成商陆抗病毒蛋白以及如何提高商陆

毛状根中的多糖含量,尚待进一步研究。

致 谢 原中国科学院植物研究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样品。

REFERENCES(参考文献)

- [1] White F F , Nester E W . Hairy root ; plasmid encodes virulence traits in *Agrobacterium rhizogenes* . *J Bacteriol* ,1980 ,**141** :1134 - 1141
- [2] Yoshikawa T ,Furuya T . Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes* . *Plant Cell Reports* ,1987 ,**6** :449 - 453
- [3] FEI H M (费厚满) ,MEI K F (梅康凤) ,SHEN X (沈昕) *et al* . Transformation of *Gymnostemma pentaphyllum* by *Agrobacterium rhizogenes* and saponin production in hairy root cultures . *Acta Botanica Sinica*(植物学报) ,1993 ,**35** (8) :626 - 631
- [4] SUN M (孙敏) ,TANG S H (汤绍虎) ,YANG L Y (杨兰英) . Studies on the alkaloids from transformed hairy root of *Rauwolfia verticillata* by *Agrobacterium rhizogenes* . *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) 1993 ,**9** (3) :287 - 290
- [5] Yazaki K , Tanaka S , Matsuoka H *et al* . Stable transformation of *Lithospermum erythrorhizon* by *Agrobacterium rhizogenes* and shikonin production of the transformants . *Plant Cell Reports* , 1998 ,**18** :214 - 219
- [6] Saito K , Sudo H , Yamazaki M *et al* . Feasible production of camptothecin by hairy root culture of *Ophiorrhiza pumila* . *Plant Cell Reports* 2001 ,**20** :267 - 271
- [7] Shan Xi Basic and clinical research group of chronic bronchitis (陕西省慢性气管炎基础临床研究协作组) . Extraction of the active constituents of *Phytolacca esculenta* van Houtte and its pharmacodynamics and clinical curative effect . *ZhongCao YaoTong Xun*(中草药通讯) ,1973 (1) :13 - 16
- [8] Jiang Su New medical college (江苏新医学院) : A dictionary of Chinese Traditional Medicine(中药大辞典) Vol. II , P2245 - 2247 Shanghai People ' s Publishing House , 1977
- [9] Misawa M , K , Sako , M . Hayashi . 1974 . Production of antibiotic substance . *Japan Patent*(Kokai) 74 - 126 894 ,1974
- [10] Pythoud F , Sinkar V P , Nester E W *et al* . Increased virulence of *Agrobacterium rhizogenes* conferred by the vir region of pTiBo 542 : application to genetic engineering of poplar . *Bio/technology* 1987 ,**29** (5) :1323 - 1327
- [11] SHI H P (施和平) . Tissue culture and plant regeneration of *Phytolacca esculenta* van Houtte . *Chinese Traditional and Herbal Drugs*(中草药) ,1998 ,**30**(supplement) :178 - 179
- [12] Morgan A J , Cox P N , Turner D A *et al* . Transformation of tomato using an Ri plasmid vector . *Plant Science* 1987 ,**49** :37 - 49
- [13] Rogers S O , Bendich A J . Extraction of DNA from milligram amounts of fresh , herbarium and mummified plant tissues . *Plant Mol Biol* , 1985 ,**5** :69 - 76
- [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] ZHANG W J (张惟杰) . Biochemical Research Techniques for Complex polysaccharide(复合多糖生化研究技术) Shanghai Scientific and Technological Publishing House , 1987 .
- [16] Bercetche J , Chriqui D , Adam S *et al* . Morphogenetic and cellular reorientation induced by *Agrobacterium rhizogenes*(strains 1855 , 2659 and 8196) on carrot , pea and tobacco . *Plant Science* ,1987 ,**52** :19 - 210
- [17] Ottani M P , Schel J H N , Hamisch ten Cate Ch H . Variation in structure and plant regeneration of *Agrobacterium rhizogenes* transformed and control roots of the potato cv. Bintje . *Plant Cell Tissue and Organ Culture* ,1990 ,**20** :25 - 34
- [18] CHEN S Y (陈士云) , HOU S S (侯嵩生) , GUI Y L (桂耀林) *et al* . *In vitro* transformation of cotyledons and hypocotyls of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by *Agrobacterium rhizogenes* . *Journal of Wuhan Botanical Research*(武汉植物学研究) ,1991 ,**9** (4) :301 - 304
- [19] Hamill J D , Parr A J , Rhodes M J C *et al* . New routes to plant secondary products . *Bio/Technology* ,1987 ,**29** (5) :800 - 804
- [20] Mano Y , Nabeshima S , Matsui C *et al* . Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia japonica* . *Agric Biol Chem* , 1986 ,**50** :2715 - 2722
- [21] Kamada H , Okamura N , Satake M *et al* . Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna* . *Plant Cell Rep* ,1986 ,**5** :239 - 242

Induction and Culture of Hairy Boots in *Phytolacca esculenta* and Its Saponin Production

SHI He-Ping* LIANG Peng QUAN Hong

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

Abstract Hairy roots appeared *in vitro* 20 days after inoculation of *Phytolacca esculenta* leaf explants with the strain of *Agrobacterium rhizogenes* R1601. The frequency of leaf explants transformed by R1601 was up to 70% . Hairy roots can be incited directly from the veins of explants or via callus. Hairy roots induced by R1601 grew rapidly on medium MS without hormone and were 85.6% higher in respiration rate than control roots. Transformation was confirmed by opine detection and the amplification of *rol B* and *rol C* genes from the hairy roots of *P. esculenta* . The total saponin content in hairy roots of *P. esculenta* was about 1.54 times as much as in natural roots whereas polysaccharides content was about 70% times as much as in the natural roots.

Key words *Agrobacterium rhizogenes* , *Phytolacca esculenta* hairy roots , respiration rate , total saponin