

发根农杆菌促进黑荆树 切根幼苗生根

王敬文 陆秀华 蒋晶

摘要 利用发根农杆菌A₄9402菌株接种黑荆树切根幼苗,在MS培养基上促进其生根,生根率达96%~98%,平均每株苗生根17~19条,且促进幼苗高生长。冠瘿碱检测证明新生根是Ri T-DNA转化根。Ri T-DNA转化细胞生根效应与植物激素有相关性。

关键词 黑荆树、切根幼苗、发根农杆菌、生根、植物激素

发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes* Riker)是一种土壤杆菌,偶尔通过伤口或自然孔口侵入植物根部,引起次生根增生,导致“毛根病”^[1,2],但它从来就没被看作一种病害。虽然其有广泛的寄主范围,但还仅限于双子叶植物。近年来,利用发根农杆菌 Ri T-DNA 转化植物促进生根、增加生物量的研究日益被人们所重视,并有人先后申请了技术专利^[3,4]。美国、日本、以色列学者先后进行了利用发根农杆菌 Ri T-DNA 转化根促进扁桃、苹果、油橄榄、葡萄等作物生长和提高产量的研究^[5,6],显示了在农业、林业和园艺上的重要应用价值。

在农业、林业和园艺实践中,扦插和移栽是最基本的栽培技术,其成败的关键在于生根活力。现在在研究和生产上所应用的生根制剂大都是化学药品配制的,能够不同程度地促进生根活力,而发根农杆菌 *A. rhizogenes* 感染植物促进生根,则是其 Ri T-DNA 转移并整合到植物细胞核基因组中,并得以表达的结果^[7]。农杆菌型 Ri T-DNA 有二个不连续的片段,即 TL-DNA 和 TR-DNA,与根的形态发生有关的 4 个位点 rol ABCD 位于 TL-DNA 片段,生长素合成基因 $t_{ms,1}$ 和 $t_{ms,2}$ 位于 TR-DNA 片段上^[8]。Strobel 等^[9]用 *A. rhizogenes* 促进扁桃(*Prunus amygdalus* Smits)生根和生长,只有携带 Ri T-DNA 的活细菌才能有促进效果,细菌提取物或杀死的细菌没有促进作用。这表明菌株所产生的任何外源激素对促进生根无效,植株的生长效应主要是根系发达改善供水的结果,而顶端生长更旺盛也是个重要原因。然而,虽然根组织发生了遗传转化,但也不能排除植物激素质和量的变化对根和植株的效应。

黑荆树是优良的丹宁树种,无性繁殖困难。本文报道利用发根农杆菌接种黑荆树切根实生幼苗,诱导其生根的部分结果,以探讨黑荆树无性繁殖的新途径。

1992—05—30收稿。

王敬文副研究员,陆秀华,蒋晶(中国林业科学研究院亚热带林业研究所 浙江富阳 311400)。

1 材料和方法

1.1 细菌菌株

本实验所用发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 9402、A₄、15834、1855、8196, 由法国 D. Tepfer 教授提供。细菌在 YM 培养基上 24 °C 培养 72 h, 刮取菌浆放在 YM 培养液中制备悬浮菌液, 细菌密度为 10⁹ 个/ml。

1.2 植物材料

黑荆树 (*Acacia mearnsii* De Wild.) 种子在沸水中烫过使种皮软化, 用纱布搓去表皮胶质, 室温下浸种 3 d, 取出种子用 0.5% 升汞消毒 5 min, 无菌水洗涤 15 min, 接种在经高压灭菌过的 0.8% 琼脂培养基上, 待种子发芽苗高约 5 cm 时进行接种细菌处理。

1.3 细菌接种

将黑荆树幼苗齐茎基切去根系, 切口在细菌悬浮液中蘸一下, 随即插入含或不含激素的 MS 培养基中, 25 °C 每天 16 h 光照下培养, 观测幼苗生根和生长情况。

1.4 冠瘿碱检测

纸电泳分析冠瘿碱 (opine) 按 Petit 等^[9]法, 取 1 g 新鲜根同 50 ml 70% 乙醇研磨匀浆, 在 15 000 g 离心 10 min, 取上清液蒸发至干, 残渣溶于水中 (0.1 ml/g 组织), 在 Whatmann 滤纸上点样进行电泳分析, 电泳条件: 10 V/cm, 150 min, 电泳缓冲液组成为甲酸: 乙酸: 水 = 30:60:910 (V:V:V)。电泳结束后干燥滤纸, 以碱性硝酸银试剂显色。

2 结果和讨论

2.1 菌株的差异

A. rhizogenes 不同菌株的 Ri 质粒类型不同, 感染和遗传转化不同寄主的能力是不同的, 明显地表现出对寄主植物的种属特异性。在所试验过的菌株和寄主中, 不同菌株感染和转化蔷薇科、桑科等的能力都比较强, 感染和转化毛茛科、罂粟科等的能力都相当弱, 而对豆科植物的不同属种的寄主, 不同菌株的能力有强有弱^[10,11]。不同菌株对黑荆树幼苗促进生根的能力也不相同 (表 1)。从表 1 可以看出, *A. rhizogenes* 农杆菌型 (Agropine-type) 菌株 A₄、9402 促进黑荆树切根苗生根的能力比其他几个菌株强得多, 有一定的应用价值。Strobel 等^[3,5] 已从农杆菌型 *A. rhizogenes* TR105 菌株中筛选出超级菌株 *A. rhizogenes* 232, 在扁桃、油橄榄上用于促进生根、生长和提高产量的田间试验。由于 *A. rhizogenes* A₄、9402 促进生根, 增加了根系对营养物质和水分的吸收, 黑荆树切根幼苗的生长量也显著增加了 (表 2), 对照切根苗由于缺乏根系吸收, 仅维持存活, 生长量没有增加。

表 1 *A. rhizogenes* 不同菌株促进黑荆树切根幼苗生根的结果

菌株	接种苗数 (株)	平均生根 株数(株)	每株平均 根数(条)	根平均长 度(cm)
YM 培养液	100	0	0	—
1855	100	12	3	1.2
9402	100	82	18	2.2
A ₄	100	96	19	2.7
15834	100	19	3	1.2
8196	100	27	4	1.4

注: 切根苗在 MS 培养基上 21 d 的结果。

表2 *A. rhizogenes* A₄、9402促进黑荆树切根幼苗生长

菌株	平均苗高 (cm)	平均叶数 (张/株)
YM培养液	5.2±0.4	4.4±0.3
A ₄	6.3±0.3	6.2±0.3
9402	6.1±0.3	6.2±0.2

注：在MS培养基上培养26d的结果。

rhizogenes 处理大豆的幼苗，其异常生长是由于细菌产生的植物激素的结果，而不是由于遗传转化所促进的^[12]将菌株培养物经高温(120℃, 10 min)杀死细菌，或经微孔滤膜(0.45 μm)过滤灭菌的培养滤液来处理黑荆树切根幼苗，其结果如表3。结果表明，只有活细菌才能促进黑荆树切根苗生根，这就暗示菌株侵染了幼苗切口组织的细胞，Ri T-DNA已插入感染细胞核基因组中，已转化的细胞表现出生根的功能，这是Ri T-DNA在转化细胞中表达的结果。在一般情况下，*A. rhizogenes* Ri T-DNA转化组织的典型表征是出现毛状根，但在黑荆树切根苗上诱发的根是正常根(详情另报)，如图1，在扁桃^[8]；油橄榄^[6]；葡萄、苹果、郁金香^[4](插穗)上诱生的次生根都是有正常机能的正常根。转化组织器官发生的机制是十分复杂的，与转化组织细胞存在的状态、部位、极性、激素运转等有密切的关系^[11]，与Ri T-DNA的插入长度、插入数目也有关系，有时两个或两个以上的*A. rhizogenes* Ri T-DNA同时转化一个细胞，有时同一个细菌的几个T-DNA片段都整合到一个植物细胞的核基因组中(Depicker, A. et al., 1985)。农杆菌型*A. rhizogenes* A₄、9402 Ri T-DNA包括二个不连续的区段，即左区的TL-DNA和右区的TR-DNA，与诱导生根有关的4个位点rol ABCD位于TL-DNA片段中，编码生长素和冠瘿碱合成酶的基因位于TR-DNA片段中。TL-DNA和TR-DNA都有促进生根的功能，但对大多数植物种来说，对于诱导生根TL-DNA比TR-DNA更为重要，而TL-DNA和TR-DNA这二个区段之间的协同作用能产生最为健壮的根^[13]，这种根还有正常根的结构和功能。

2.3 冠瘿碱合成

经纸电泳分析(图2)，接种*A. rhizogenes*

2.2 *A. rhizogenes* 转化黑荆树根组织

该菌接种黑荆树切根苗，促进其生根和生长，可以设想黑荆树根组织发生了遗传转化，促进了根系生长和吸收，但还不能排除这种促进效应是由于植物激素在质或量上的变化所引起的结果。因存在于切根苗切面和根系的*A. rhizogenes*所产生的植物激素促进了生根和生长，例如以高密度的*A.*

表3 *A. rhizogenes* 各菌株制备物对黑荆树切根苗生根的作用

菌株制备物	生根率 (%)	平均根数 (条/株)
YM培养液	0	0
A ₄	94	17
A ₄ , 高温灭菌	0	0
A ₄ , 过滤灭菌	0	0
9402	82	14
9402, 高压灭菌	0	0
9402, 过滤灭菌	0	0

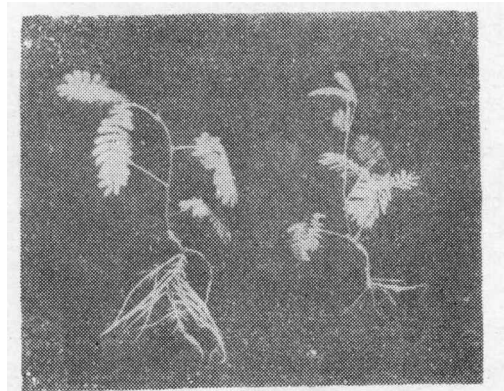


图1 接种*A. rhizogenes*黑荆树切根幼苗诱导生根表型

左：在含激素的MS培养基上培养26d

右：在无激素的MS培养基上培养26d

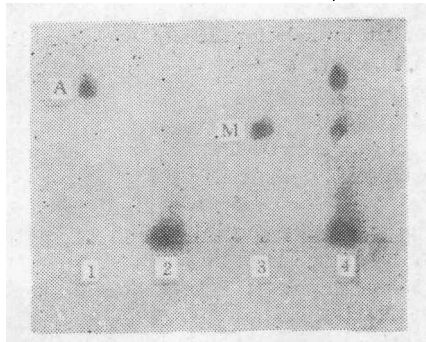


图2 接种 *A. rhizogenes* 诱发的黑荆树切根幼苗根提取物纸电泳分析

1. 农杆菌 agropine 标准样品
2. 甘露碱 mannopine 标准样品
3. 没接种 *A. rhizogenes* 黑荆树幼苗的正常根
4. 接种 *A. rhizogenes* 黑荆树切根幼苗诱发的根

细胞分裂素(6-BA)的MS培养基上,接种 *A. rhizogenes* 的切根苗生根率高达96%~98%,每株苗平均生根数也多达17~19条,而且根也粗壮,苗木生长旺盛,而在无激素的MS培养基上切根苗生根状况明显弱化。生长素在 *A. rhizogenes* Ri T-DNA 诱导生根机制中的作用需要进一步深入研究。

Haisingh 和 Durbin^[14]的研究指出,单独使用天然的或合成的生长素对胡萝卜、甜菜、芜菁、马铃薯和其他材料的切片都没有明显诱导生根的效果,但同时也指出生长素对于 *A. rhizogenes* Ri T-DNA 转化细胞诱导生根又是必不可少的。Maura 等^[15]的研究指出,生长素本身没有明显的诱导生根作用,但它象扳机那样启动了转化细胞开始分化出根。Maura 等利用含不同补体和构件的 Ri T-DNA 的 *A. rhizogenes* 菌株和胡萝卜切片顶侧和基侧生长素极性不同的性质,研究了生长素和 T-DNA 在诱导生根中的相关性,结果也证明植物激素和 T-DNA 二者对于诱导生根都是必不可少的。单独添加生长素(IAA)或同细胞分裂素(6-BA)联合使用,都不能诱导未转化细胞生根,仅有含生长素合成基因的 T-DNA 所转化的细胞也难以分化生根。在无内源或外源激素的情况下转化细胞不能分化出根,当给这些转化细胞供给生长素时就能分化出根。但是,植物激素的作用与 T-DNA 转化和表达并没有直接关系,只能说以目前还不了解的方式作用于 T-DNA 转化细胞。

利用 *A. rhizogenes* 促进黑荆树硬枝插穗生根尚有一定困难,主要是插穗切口细胞木质化和多酚类分泌物,这使细菌难以存活和发生侵染。在农业、林业和园艺栽培实践中,包括扦插和移栽, *A. rhizogenes* 是日益受到重视的细菌,它的促进生根的功能有重要的应用价值,在此方面的研究和应用将会越来越多。

参 考 文 献

- 1 Riker, A J. Studies on infectious hairy root of nursery apple trees. Journal of Agricultural

诱发的黑荆树切根幼苗的根中含有农杆菌碱(agropine)和甘露碱(mannopine),这是Ri T-DNA所携带的编码冠瘿碱合成基因在黑荆树根细胞中表达的产物,证明Ri T-DNA已插入根细胞核基因组中,而没接种菌株的对照根中没有检测到这二种冠瘿碱成分。

2.4 生长素的作用

黑荆树切根幼苗接种 *A. rhizogenes* A₄ 或9402菌株后,插入含和不含植物激素的培养基中,其诱导生根的效果是显著不同的(表4)。在含有1 mg/L 2,4-D和0.5mg/ml

表4 生长素对 *A. rhizogenes* Ri T-DNA 诱导黑荆树切根苗生根的促进作用

菌 株	MS培养基 (2,4-D 1 mg/L 6-BA 0.5 mg/L)		MS培养基 (无2,4-D 无6-BA)	
	生根率 (%)	生根数 (条)	生根率 (%)	生根数 (条)
YM 培养液	0	0	0	0
A ₄	98	18	36	9
9402	87	14	27	6

- Research, 1930, 41: 507~540.
- 2 Hildebrand, E M. Life history of the hairy-root organism in relation to its pathogenesis on nursery apple trees. *Journal of Agricultural Research* 1934, 48, 857~885.
 - 3 Strobel, G. Development of plant roots. Eur. pat. 1984, 0137035.
 - 4 松井千秋, 植物的生长促进方法。公开特许公报昭, 1984, 59-191306.
 - 5 Strobel, G, Nachmias, A, Hess W M. Improvements in the growth and yield of olive trees by transformation with the Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *Can. J. Bot.*, 1988, 66, 2581~2585.
 - 6 Strobel, G, Nachmias, A. *Agrobacterium rhizogenes* promotes the initial growth of bare root stock almond. *Journal of General Microbiology*, 1985, 131: 1245~1249.
 - 7 Chilton, M D, Tepfer, D, Petit, A. *Agrobacterium rhizogenes* insert T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature*, London, 1982, 295: 432~434.
 - 8 Slighton, J I, Durand-Tardif, M, Jouanin, L. Nucleotide sequence analysis of TL DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid; identification of open-reading frames. *J. Biol Chem*, 1986, 261: 103~121.
 - 9 Petit, A, David, C, Dail, G. Further extension of the opine concept; plasmid in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Mol. Gen. Genet*, 1983, 190: 204~214.
 - 10 Mugnier, J. Establishment of new axenic hairy root line by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant cell Repots*, 1988, 7: 9~12.
 - 11 Tepfer, D. Ri T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes*; A source of genes having applications in rhizosphere biology and plant development, ecology, and evolution, In: *plant-Microbe Interactions* (T. Kosuge and E. W. Nester, eds.), McGraw-Hill Publishing Company, 1989.
 - 12 Jaynes, J M. The position of *Agrobacterium rhizogenes*. *International Review of Cytology* (Suppl.), 1981, 13: 105~125.
 - 13 Cardarelli, M., Spano, L, De Paolis, A. Identification of the genetic locus responsible for non-polar root induction by *Agrobacterium rhizogenes* 1855. *Plant Mol. Biol.* 1985, 5: 385~391.
 - 14 Huisingh, D, Durbin, R D. Some physiological effects of *Agrobacterium rhizogenes* on tomato. *Phytopathol* 1970, 60: 1101~1104.
 - 15 Cardarelli, M, Spano, L, Mariotti, D. The role of auxin in hairy root induction. *Mol. Gen. Genet*, 1987, 208: 457~463.

Agrobacterium rhizogenes Riker Promotes the Rooting of Root-cut Seedling of *Acacia mearnsii* De Wild

Wang Jingwen Lu Xiuhua Jiang Jing

Abstract Root-cut seedling of *Acacia mearnsii* were inoculated with *Agrobacterium rhizogenes* A₁, 9402, and rooting was promoted on MS medium. The rooting ratio was 96%~98%, and the average number of new roots per seedling was 17~19, but the root-cut seedling treated with medium alone didn't root. Opine assay indicated that there was stable maintenance of T-DNA in these new roots. There was some relationship between auxin and *A. rhizogenes* T-DNA in the induction of rooting.

Key words *Acacia mearnsii* seedling cuted of root, *Agrobacterium rhizogenes*, rooting, phytohormone