

转化毛状根获得萝芙木生物碱的研究

孙 敏 汤绍虎 杨兰英

(西南师范大学生物系, 重庆 630715)

药用植物萝芙木(*Rauvolfia verticillata*)的无菌苗被含有 Ri 质粒的发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)感染后, 诱导出毛状根(Hairy root)。将毛状根分离、除菌后, 在不含激素的MS固体或液体培养基上培养, 从296个株系中筛选出RV 19、RV 26、RV 37和RV 53四个生长速度快、分枝数量多等优良特性的无性系。对毛状根中次生代谢产物的提取和测定表明, 四个无性系均含有原植物体所具有的吲哚生物碱。为应用转化毛状根技术获得植物次生代谢产物开辟了一条新的有效途径。

关键词 转化毛状根; 发根农杆菌; 生物碱; 萝芙木

发根农杆菌(*A. rhizogenes*)侵染植物后, 通过所含的致根(Ri)质粒的一部分(T-DNA)在植物基因组中的整合和表达, 导致毛状根的产生。

近年来, 人们利用发根农杆菌的转化作用, 诱导毛状根产生, 在多种植物中建立了毛状根培养系统, 获得了具有优良特性的无性系并实现了阿托品、东莨菪碱等大批次生代谢产物的高产^[1-3]。

萝芙木(*Rauvolfia verticillata*)为夹竹桃科药用植物, 其根部含有吲哚生物碱, 其中利血平和阿马碱为重要的降压药及安定药^[4]。为了获得萝芙木的药用成分和保护天然植物资源, 本文用发根农杆菌感染萝芙木, 对毛状根进行了诱导、培养、筛选和生物碱的提取与测定。

材 料 和 方 法

(一) 菌种和培养基

发根农杆菌ATCC 15834株(*Agrobacterium rhizogenes*)由美国路易斯安那州立大学植物病理和作物生理系Flores博士提供。在AB-Bio培养基^[10]中暗培

养, 0—4℃保存。接种前置于25±1℃条件下24 h即可用于感染植物材料。

(二) 无菌植株的获得

将萝芙木(*R. verticillata*)种子先用75%乙醇浸泡30s后用无菌水冲洗1次, 然后用0.1%升汞消毒15min, 最后用无菌水冲洗3次。将灭菌后的种子在无菌条件下播种到不含激素的MS培养基上, 置于3 000lx、16 h/日光照、25℃条件下发芽并长成无菌植株。

(三) 毛状根的诱导

在无菌操作条件下, 将无菌植株切除其茎尖、茎基部和叶片, 取其节间部分并在其顶部切口处涂上发根农杆菌, 或从无菌苗上切取适当大小的叶柄、叶片、下胚轴、茎段, 浸于培养24 h后的农杆菌液中15 min, 取出后置无菌滤纸上吸干, 然后移植到不含激素的MS培养基上, 于25℃漫射光下培养, 诱导毛状根的产生。

(四) 毛状根的培养和优良无性系的选择

本文于1992年1月7日收到
国家自然科学基金资助课题。

毛状根培养基为无激素的 MS 培养基, 在培养基中加入羧苄青霉素 ($0.2\mu\text{g}/\text{ml}$), 在 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 全暗条件下培养。将那些生长速度快、分枝数多的毛状根再转移至不含激素的 MS 固体或液体培养基上继续培养, 选择性状保持稳定的毛状根作为优良无性系继续培养。在第三次继代培养后, 当毛状根生长到一定量时, 用纸电泳法测定它们的农杆菌和甘露碱。

(五) 生物碱的提取和测定

毛状根中吲哚生物碱的提取和测定按文献[11,12]方法进行。

结果与讨论

(一) 发根农杆菌侵染后的毛状根诱导

萝芙木茎的无菌切段被发根农杆菌感染后, 在15天后从被感染的部位长出毛状根, 一个月后毛状根可长到3—5 cm (图1)。除了从茎的切段上诱导毛状根外, 还以下胚轴、叶柄和叶片切段进行了诱导。结果发现, 来源于不同器官的外植体被感染诱导产生毛状根的情况也不一样(表1)。这可能是由于外植体的生理状

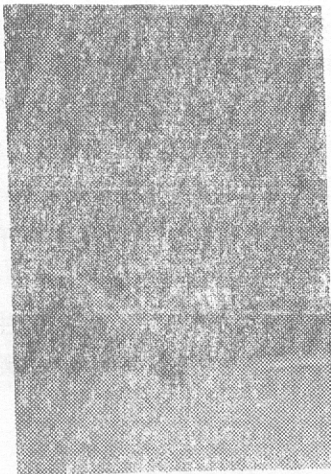


图1 茎切段上诱导出的毛状根
Fig. 1 Hairy roots on stem segment

况不同所致, 或者是对不同的外植体应有不同的筛选条件。

表1 ATCC 15834对不同外植体的转化效果

Table 1 Root induction from explants of *R. verticillata* by *Agrobacterium rhizogenes* strain ATCC 15834

Explants	Hypocotyl cuttings	Stem cuttings	Petiole cuttings	Leaf fragments
Percents of rooted explants (%)	64.5	52.3	47.1	17.8

(二) 转化毛状根的分离、培养和选择

在无菌条件下将毛状根分离, 移植到含有抗生素的MS培养基上, 发根农杆菌被抑制, 毛状根继续生长并长出许多侧根(图2、3)。在培养过程中, 若发现有

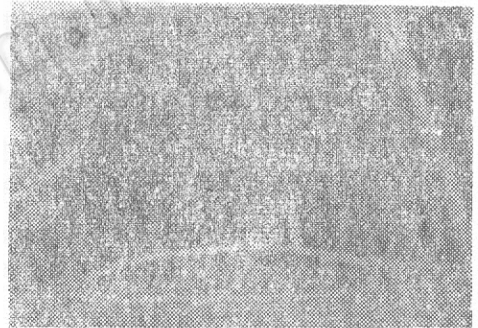


图2 在不含生长素的MS培养基上毛状根的生长情况

Fig. 2 Hairy roots on hormone-free MS medium



图3 毛状根无性系RV 37的生长情况

Fig. 3 Growth condition of hairy roots clone RV 37

发根农杆菌生长, 应再次转移到含抗生素的培养基上, 直到完全除菌为止。根据前人对 Ri 质粒转化植物的遗传分析, 曾证明一条毛状根起源于一个细胞^[18]。所以我们把外植体上的每一条根逐一分开, 作为一个克隆进行培养。在培养过程中, 我们按照 Dawson “根的生长率、干重和分枝数与根的次生代谢产物含量之间具有十分密切的相关性”的观点^[14], 从296个株系中选取了RV 19、RV 26、RV 37和RV53四个具有生长速度快、分枝数多等优良特性的无性系。通过纸电泳测定, 这四个优良无性系均含有农杆菌碱和甘露碱(图4)。毛状根的产生可作为Ri质粒转化的形态上的证据, 而在被测试的毛状根中都能合成农杆菌碱和甘露碱, 则进一步说明发根农杆菌含有的Ri质粒的T-DNA 部分已转化到萝芙木细胞的DNA中。

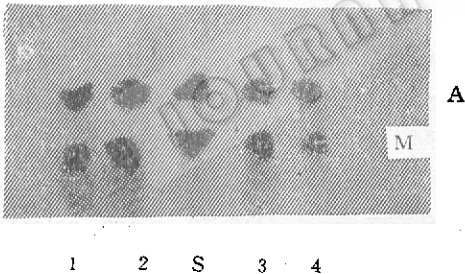


图4 萝芙木毛状根提取物中的农杆菌碱和甘露碱滤纸电泳

Fig. 4 Paper electrophoresis of agropine and mannopine in the extracts of the hairy roots of *R. verticillata*

A. Agropine, M. Mannopine, S. Authentic sample 1—4 Samples of clone RV 19, RV 26, RV 37 and RV 53

(三) 转化毛状根中生物碱的测定

转化毛状根培养50天后, 将毛状根收

获, 冷冻干燥后作生物碱总碱提取以及利血平与阿马碱含量分析, 结果见表2。

表2 萝芙木转化毛状根培养物中的利血平和阿马碱含量

Table 2 Reserpine and Ajmaline contents in hairy roots cultures of *Rauwolfia verticillata*

Material	Reserpine (% dwt)	Ajmaline (% dwt)
RV 19	0.084	0.078
RV 26	0.069	0.058
RV 37	0.124	0.179
RV 53	0.093	0.050
Roots of Original plant(CK)	0.037	0.056
Callus(CK)	0.0032	0.0027

从表2可以看出: 转化毛状根的四个无性系均含有原植物所具有的生物碱——利血平和阿马碱, 而且四个无性系中利血平与阿马碱的含量均比原植物体高, 其中RV 37 无性系的利血平含量达到干重的0.124%, 是原植物根的3.3倍。萝芙木毛状根和愈伤组织培养相比, 毛状根的生长不需要外源激素, 生长比(培养三周后培养物鲜重与接种物鲜重之比)为4.25, 而愈伤组织培养需外源激素, 生长比为2.16。同时, 在愈伤组织中生物碱的含量甚微, 这是由于次生代谢产物的产生, 往往需要伴以细胞分化或器官化。所以在植物组织培养中, 组织培养物的分化, 有利于次生代谢产物的形成和积累^[16-17]。从萝芙木转化毛状根与愈伤组织中生物碱含量的差异也可以看出, 次生代谢产物的形成与根的组织分化是密切相关的。

参 考 文 献

[1] Flores, H. et al., *Tibtech*, 5:64—69, 1987.

- [2] Hamill, J. et al., *Biotechnology*, 5:800—804, 1987.
- [3] 张荫麟: 植物学报, 30(4):368—372, 1988.
- [4] 孙 敏, 汤绍虎, 植物生理学通讯, 27(3):236, 1991.
- [5] Wei, Z.M., et al., *Plant Cell Reports*, 5:93—96, 1986.
- [6] Flores, H. et al., *Primary and Secondary Metabolism in Plant Cell Culture*, Berlin, Springer-Verlag, pp. 174—186, 1985.
- [7] Kamada, H. et al., *Plant Cell Reports*, 5:239—242, 1986.
- [8] Mano, Y. et al., *Agri. Biol. Chem.*, 50:2715—2722, 1986.
- [9] 谢启昆: 药用植物组织培养, 上海科学技术出版社, 上海, p.85, 1986.
- [10] 龚联遂: 西南师范大学学报(自然科学版)43(3):58—65, 1988.
- [11] Arthur, et al., *Aust. J. Chem.*, 21:1399, 1968.
- [12] 沙世炎等: 药学通报, 17:9—11, 1982.
- [13] 张 毅、沈文辉: 生物工程学报, 5:173—178, 1989.
- [14] Dawson, R., *Amer. J. Bot.* 29:813—815, 1942.
- [15] Garre, R. et al., *Planta Medica*, 40:92—103, 1980.
- [16] 张荫麟、李英: 药学通报, 19:220—221, 1984.
- [17] Tabata, M. et al., *Phytochemistry*, 11:949—955, 1972.

Studies on the Alkaloids from Transformed Hairy Root of *Rauvolfia verticillata* by *Agrobacterium rhizogenes*

Sun Min Tang Shaohu and Yang Lanying

(Department of Biology, Southwest Normal University, Chongqing 630715)

Transformed hairy roots have been induced in *Rauvolfia verticillata* by *Agrobacterium rhizogenes* strain ATCC 15834. The frequency of the hypocotyl cuttings transformed was up to 64.5%. The hairy roots grew well in medium either of hormone free MS agar or suspension culture. According to the growth rate, dry weight and branch numbers of hairy root, four clones, RV 19, RV 26, RV37 and RV 53 were selected from 296 root lines. As a result, the hairy root was shown to yield alkaloids, such as reserpine and ajmaline, and the content of reserpine of clone RV 37 was up to 0.124% dry weight. Since agropine and mannopine were also detected in the hairy root culture, it is clearly demonstrated that the T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* Ri-plasmid transformed into the genomic DNA of *Rauvolfia verticillata*.

Key words Transformed hairy root; *Agrobacterium rhizogenes*; alkaloid; *Rauvolfia verticillata*