

发根农杆菌诱导大豆毛状根体系的建立

宗晓秋 张东升 黄文坤 彭 焕 彭德良

中国农业科学院植物保护研究所/植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193

摘要 选取中国大豆品种中黄 13、黑豆 44 和黑豆 51 的子叶为外植体材料, 用发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*) K599 菌株诱导 3 个大豆品种产生毛状根, 通过 β -葡聚糖苷酶(GUS)染色进行转化效率检测。结果表明: 在 25 ℃、12 h/d 黑暗培养条件下, 黑豆 44 上诱导的毛状根数量最多, 显著多于中黄 13 和黑豆 51; 黑豆 44 诱导的毛状根转化率最高, 显著高于中黄 13, 但与黑豆 51 没有显著差异; 光照或黑暗培养对中黄 13 产生毛状根的效率没有显著影响, 但黑豆 44 和黑豆 51 在黑暗培养条件下子叶产生的毛状根数明显高于光照培养条件下产生的毛状根数; 大豆孢囊线虫(*Heterodera glycines* Ichinohe)能侵染 3 个大豆品种的毛状根, 其中对黑豆 51 的侵染效率显著高于黑豆 44 和中黄 13, 侵染位点主要位于根系的生长点。

关键词 大豆; 毛状根; 大豆孢囊线虫; 发根农杆菌

中图分类号 S 432.4⁺5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)06-0699-05

发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)是根瘤菌科农杆菌属的一种革兰氏阴性细菌, 其细胞中存在一种染色体外自主复制的环形双链 DNA 分子(Ri 质粒)。自然状态下, 发根农杆菌通过伤口侵染植物, Ri 质粒上的 T-DNA 插入到植物基因组, 其上所携带的基因在宿主细胞中整合表达, 诱导植物产生毛状根^[1]。毛状根在形态学上保持了植物根系统的特征并具有遗传稳定性, 是研究植物根部病虫害的良好材料, 现已在茄科、十字花科、旋花科、伞形科、豆科等 160 多种植物上诱导出了毛状根^[2]。发根农杆菌诱导的毛状根系统现已广泛应用于植物抗病性和植物与病原物互作的研究中。

大豆孢囊线虫(*Heterodera glycines* Ichinohe)病是大豆生产上的严重病害, 在中国大豆产区发生较普遍。目前, 防治线虫主要采取化学农药、轮作或种植抗性品种等措施, 但都存在一定的局限性。研究表明, 抗病品种抗性基因的多样性远远小于大豆孢囊线虫致病基因的多样性^[3]。发根农杆菌诱导的毛状根侧根丰富, 可为线虫提供大量的侵染位点, 有利于线虫的侵染。线虫通过口针取食转基因植物, 将寄主体内表达的线虫致病基因双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)或小干扰 RNA

(small-interference RNA, siRNA)传送到线虫体内, 引发体内系统性的 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)反应, 出现寄生、发育、代谢等障碍甚至死亡, 从而使转基因植物对寄生线虫产生抗性^[4-8]。Huang 等^[9]以拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)产生的毛状根为平台, 研究了南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)寄生基因 16D10 在拟南芥体内的 RNAi 效应, Heba 等^[10]利用 William 82 大豆的毛状根, 也研究了南方根结线虫寄生基因的 RNAi 效果, 均发现寄主根系上的根结数量减少, 且根结的直径也缩小。Li 等^[11]利用大豆的毛状根明确了大豆孢囊线虫 *Cpn-1*、*Y25*、*Prp-17* 三种生殖基因 dsRNA 在大豆毛状根中的过量表达, 降低了线虫对寄主植物的侵染率。阮龙等^[12]利用甘薯毛状根成功接种甘薯茎线虫(*Ditylenchus destructor*), 鉴定了不同甘薯品种的抗线虫特性。肖翔等^[13]用胡萝卜毛状根培养甘薯茎线虫, 使其在培养物内完成整个生活史。发根农杆菌不同菌株诱导同一寄主毛状根效率不同^[14]。Narayanan 等^[15]和 Cao 等^[16]先后指出野生型发根农杆菌 K599 在诱导大豆子叶生根方面非常有效, 但诱导其他植物产生毛状根效率较低。

收稿日期: 2012-04-17

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(200903040)

宗晓秋, 硕士研究生, 研究方向: 植物病理学。E-mail: zongxiaoliu1986@163.com

通讯作者: 彭德良, 博士, 研究员。研究方向: 植物线虫分子生物学和控制技术。E-mail: dlpeng@ippcaas.cn

笔者以中国大豆品种中黄 13、黑豆 44 和黑豆 51 为供试材料,观察了不同光照条件对诱导毛状根效率的影响,构建了大豆毛状根及其继代培养物体系,旨在为进一步研究大豆孢囊线虫致病机制和大豆品种对孢囊线虫的抗性提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

发根农杆菌 K599 菌株 NCPPB2659 (简称 K599)由中国农业科学院作物科学研究所韩天富研究员惠赠。该菌株为农杆菌碱型,所含载体为 pGFP-GUSPlus,以 β -葡聚糖苷酶(GUS)基因为选择标记。大豆品种中黄 13 由中国农业科学院作物科学研究所培育,黑豆 44 和黑豆 51 由黑龙江省农业科学院大豆研究所于佰双研究员惠赠。试验所用主要试剂购于 Sigam 公司。

1.2 毛状根的诱导与继代培养

将-80℃保藏的菌种在 LB 固体培养基+卡那霉素(50 mg/L)上划线,28℃下过夜培养后挑取单菌落于 LB+卡那霉素液体培养基中,220 r/min、28℃下过夜振荡培养,选取菌落生长旺盛的菌液用于侵染试验。

用氯气将大豆种子消毒 15 h 后直接接种于含 1.5%琼脂的水琼脂培养基上,置于 25℃、12 h/d 光照条件下使其发芽^[17]。将培养 7~10 d 的大豆子叶切下,并在子叶节处深切数刀,在活化的发根农杆菌菌液中浸泡 15 min,随后将子叶置于 1/10 MS (0.44 g MS 粉,30%蔗糖)固体培养基上,25℃下黑暗培养 5 d。用 1/2 MS+羧苄青霉素钠(500 mg/L)液体培养基清洗子叶,滤纸吸干子叶表面的液体,并将子叶置于 1/2 MS+羧苄青霉素钠固体培养基上,25℃、12 h/d 光照条件下诱导产生毛状根。以未经农杆菌处理自然生长的根作为对照。供试 3 个品种中黄 13、黑豆 44 和黑豆 51 均在同等条件下各重复 3 次,每次处理 60 个样品,用以统计不同大豆品种产生毛状根效率的差异。取 3 个大豆品种子叶各 60 个,共培养时分别进行光照和黑暗处理,同等条件下重复 3 次,用以比较光照条件对不同大豆品种产生毛状根效率的影响。

新生毛状根长到 3~5 cm 时,选择生长迅速、粗壮的根,截取 1~2 cm 长的根尖,转移至 1/2 MS+羧苄青霉素钠液体培养基中 25℃下黑暗培养。根系每 4~5 d 转移至新的 1/2 MS+羧苄青霉素钠培

养基中,直到培养基中没有菌斑出现,再转入 1/2 MS 液体培养基中继续培养 30~40 d^[18]。将作为对照的自然生长根移至 1/2 MS 液体培养基中,25℃下黑暗培养 30~40 d。

1.3 转化毛状根的染色和检测

参照 Tirthartha 等^[19]的 GUS 染色方法,将 3 个大豆品种各切取 60 个根尖浸泡在 GUS 染色液中,37℃下染色 3~4 h 后观察染色结果,统计毛状根的转化效率。转化效率=(转化毛状根数/诱导毛状根数)×100%。

1.4 线虫在毛状根上的侵染和发育

用线虫消毒液处理大豆孢囊线虫 4 号小种 2 龄幼虫 10 min,再用无菌去离子水清洗,并将线虫悬浮于其中,密度为 100 头/mL。吸取 1 mL 线虫悬浮液接种于生长旺盛的毛状根上并移至黑暗培养,接种 30 d 后,每个大豆品种随机选取 10 条接种根,对根组织内部线虫用酸性品红法染色^[20],观察线虫是否侵染 3 个大豆品种的毛状根以及侵染位点的差异,记录根组织中线虫数量,计算大豆孢囊线虫的侵染率。侵染率=(根组织中染色的线虫数/接种线虫数)×100%。

1.5 数据分析

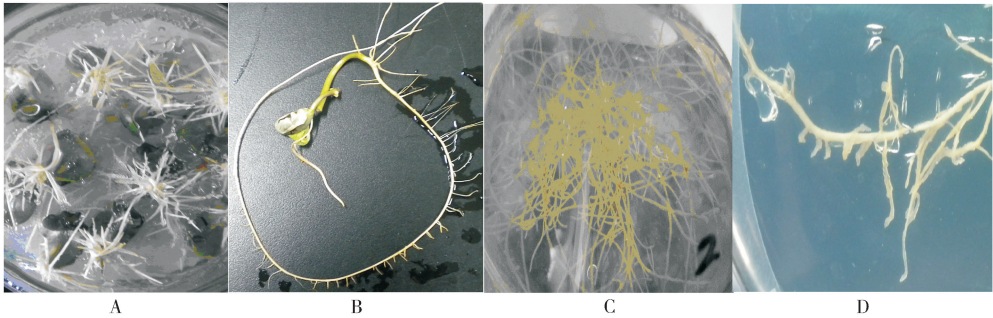
试验数据使用 SAS 9.1.3 软件的邓肯氏新复极差法进行统计分析,比较各处理间在 $P<0.05$ 水平的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 大豆产生毛状根的数量和转化效率

试验结果表明:大豆子叶愈伤组织生长的毛状根主根不明显,侧根细长,分支很多(图 1-A);自然生长的根只有 1 条明显的主根,侧根较少(图 1-B);毛状根根尖在无激素的 1/2 MS 液体培养基中生长旺盛,分支较多(图 1-C);自然根根尖培养一段时间后生长减慢甚至停滞死亡(图 1-D)。

经发根农杆菌 K599 诱导后,3 个大豆品种毛状根形成的数量及转化效率不同(表 1)。中黄 13 和黑豆 51 产生的毛状根平均条数分别为 5.30、4.32;黑豆 44 产生的毛状根平均条数为 7.65,显著高于中黄 13 和黑豆 51 产生的毛状根数量($P<0.05$)。经 GUS 染色,黑豆 44 毛状根转化率最高,为 49.4%,黑豆 51 毛状根的转化率为 47.0%,中黄 13 毛状根阳性率最低为 31.7%,显著低于黑豆 44 和黑豆 51 毛状根转化率($P<0.05$)。



A. 黑豆 44 产生的毛状根；B. 黑豆 44 未经农杆菌处理自然生长的根；C. 黑豆 44 毛状根继代培养根系；D. 黑豆 44 正常生长根继代培养根系。A. Hairy roots induced by Heidou 44；B. Natural roots of Heidou 44 without treatment by *Agrobacterium rhizogenes*；C. Subculture hairy roots of Heidou 44；D. Natural subculture roots of Heidou 44.

图 1 黑豆 44 产生的毛状根及继代培养根系

Fig. 1 Induced hairy roots and the continuous subcultures of Heidou 44

表 1 不同大豆品种毛状根形成的数量及转化效率¹⁾

Table 1 Number of hairy roots and transformation efficiency of different soybean cultivars

品种 Cultivars	毛状根条数 Number of hairy root	转化毛状根条数 Number of tansfered hairy root	转化率/% Efficiency of transformation
中黄 13 Zhonghuang 13	5.30±0.42 a	1.81±0.21 a	31.7 b
黑豆 44 Heidou 44	7.65±0.42 b	3.79±0.30 b	49.4 a
黑豆 51 Heidou 51	4.32±0.24 a	1.93±0.15 a	47.0 a

1)数据后不同字母表示在 5%水平上差异显著(表 2 同)。Data with the different letters in column are significant difference at 5% level (the same as Table 2).

2.2 光照条件对大豆产生毛状根的影响

试验结果表明,与发根农杆菌共培养时,光照培养和黑暗培养条件对中黄 13 产生毛状根效率没有显著影响($P>0.05$),但黑豆 44 和黑豆 51 在光照条件下产生的毛状根显著高于黑暗培养条件下产生的毛状根数量($P<0.05$)(表 2)。

表 2 不同光照条件下每株大豆毛状根形成的条数

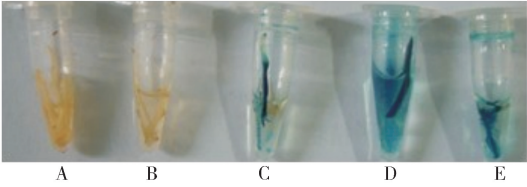
Table 2 Number of hairy roots per plant under different light conditions

条件 Condition	中黄 13 Zhonghuang 13	黑豆 44 Heidou 44	黑豆 51 Heidou 51
光照(12 h/d) Light	5.10±0.46 a	1.40±0.27 b	1.60±0.22 b
黑暗 Darkness	5.70±0.72 a	7.00±0.58 a	4.60±0.48 a

2.3 转化毛状根的检测

试验结果表明,3 个大豆品种转化毛状根的根尖被 GUS 染色液染成深蓝色(阳性),而非转化或是自然生长的根在 GUS 染色液中颜色不变(图 2)。经 GUS 染色,中黄 13 GUS 染色呈阳性的根尖数为

19 个、黑豆 51 为 28 个、黑豆 44 为 29 个,3 个大豆品种的转化率分别为 31.7%、47.0%、49.4%。



A. 非转化的毛状根；B. 自然生长的根；C,D,E. 转化的毛状根。A. Non-transformed hairy roots；B. Natural roots；C,D,E. Transformed hairy roots.

图 2 黑豆 44 转化毛状根的 GUS 染色

Fig. 2 GUS stain transformed hairy root of Heidou 44

2.4 线虫在毛状根上的侵染和发育效率

观察结果表明,3 个大豆品种的毛状根均可被大豆孢囊线虫侵染。线虫对黑豆 51 的侵染率高达 82.9%,黑豆 44 的侵染率为 60.8%,中黄 13 的侵染率为 41.4%,3 个大豆品种的侵染率存在显著差异($P<0.05$)。线虫聚集在根中维管束周围(图 3-A),3 个大豆品种的毛状根侵染位点没有差异,侵染位点主要位于根系生长点部位(图 3-B),在根系中能观察到大豆孢囊线虫的 3 龄幼虫(图 3-C)。

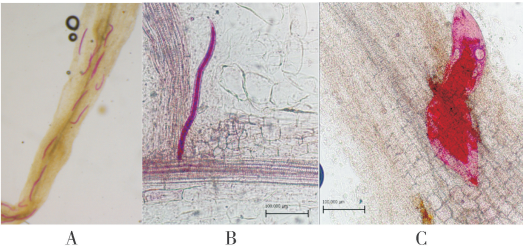


图 3 大豆孢囊线虫侵染黑豆 44 毛状根

Fig. 3 Hairy root of Heidou 44 infected by soybean cyst nematode

3 讨 论

研究大豆孢囊线虫抗性基因在寄主植物中的表达和寄主抵抗线虫侵入时的基因调节都需要大量独立的转化根系^[15],发根农杆菌诱导 3 个大豆品种中黄 13、黑豆 51 和黑豆 44 在短时间内能产生大量的毛状根,由此推断诱导产生的毛状根是单一独立的转化事件。毛状根培养过程中不易变异且性状稳定^[21],可为研究植物寄生线虫致病基因功能提供良好的材料。

大豆孢囊线虫能够有效地侵染 3 个大豆品种的毛状根,但侵染效率不同,这可能是由于大豆孢囊线虫对不同大豆品种侵染能力不同造成的^[22]。Dessaux 等^[23]曾报道,农杆菌对单子叶植物不能或很难侵染,可能是不同基因型对农杆菌的敏感程度不同造成的。植株器官的分化能力也会影响毛状根的转化率。王傲雪等^[24]的研究结果表明,外植体自身的品质影响产生毛状根的效率,自身品质好的外植体产生毛状根效率高。外植体的品质好,外来细菌的入侵对其伤害不大,植株在短时间内恢复正常的生理代谢,大大提高了产生毛状根的几率。本试验结果中黑豆 44 诱导出的毛状根数和毛状根转化率最高,这可能是由于黑龙江土地肥沃、雨水充沛、种植的大豆自身品质好,故产生毛状根效率高^[25]。中黄 13 与黑豆 51 产生的毛状根数没有显著差异,但黑豆 51 的转化率显著高于中黄 13,推测 3 个品种毛状根的转化率与毛状根数不成比例关系。

发根农杆菌菌液与大豆子叶共培养的目的旨在促进农杆菌侵入植物组织,从而将其自身携带的 T-DNA 整合到植物基因组中诱导产生毛状根。光照可加速子叶自身的生长,提高对发根农杆菌的防御,抑制发根农杆菌侵入到子叶中,降低农杆菌进入植物细胞的几率,从而降低大豆产生毛状根的效率。黑豆 44 和黑豆 51 是种植于黑龙江的品种。黑龙江位于我国东北部,属于长日照区域^[23],光照处理更加速了子叶的修复能力,提高了对发根农杆菌的防御,抑制发根农杆菌侵入到子叶中,降低了大豆产生毛状根的效率,因此,黑暗共培养更有利于诱导大豆子叶产生毛状根。

黑豆 44 是建立大豆发根体系的良好材料,但大豆毛状根的转化率有待于进一步提高。将表达线虫致病基因的 dsRNA 导入到农杆菌中,继而整合到植物基因组,完成线虫致病基因 dsRNA 向线虫体

内输送的过程,通过 RNAi 效应抑制致病基因的表达,可为大豆孢囊线虫的防治提供新的途径。

参 考 文 献

- [1] CHILTON M D, EPFER D A, PETIT A, et al. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cell [J]. *Nature*, 1982, 295: 432.
- [2] GEORGIEV V. Improved procedure for nucleus extraction for DNA measurements by flow cytometry of red beet (*Beta vulgaris* L.) hairy roots [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2009, 107: 439-441.
- [3] DONG K, BARKER K R, OPPERMAN C H. Genetics of soybean *Heterodera glycines* interactions [J]. *Nematol*, 1997, 29: 509-522.
- [4] DALZLL J J, MCMASTER S, FIEMING C C, et al. Short interfering RNA-mediated gene silencing in *Globodera pallida* and *Meloidogyne incognita* infective stage juveniles [J]. *Journal of Parasitology*, 2010, 40: 91-100.
- [5] ROSSOM N, DUBRANA M P, CIMBOLINI N, et al. Application of RNA interference to root knot nematode genes encoding esophageal gland proteins [J]. *MPMI*, 2005, 18(7): 615-620.
- [6] CHARLTON W L, HARL H M. Additive effects of plant expressed double-stranded RNAs on root-knot nematode development [J]. *International Journal for Parasitology*, 2010, 40: 855-864.
- [7] DALZLL J J, MASTER S M, JOHNSTON M J. Non-nematode-derived double-stranded RNAs induce profound phenotypic changes in *Meloidogyne incognita* and *Globodera pallida* infective juveniles [J]. *International Journal for Parasitology*, 2009, 39: 1503-1516.
- [8] 王秉宇, 彭德良, 黄文坤, 等. 马铃薯腐烂茎线虫类毒液过敏原蛋白基因 cDNA 全长的克隆与序列分析 [J]. *华中农业大学学报*, 2011, 30(2): 182-186.
- [9] HUANG G Z. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene [J]. *PNAS*, 2006, 103: 14302-14306.
- [10] HEBA M M, IBRAHIM A C, NADIM W, et al. Post-transcriptional gene silencing of root-knot nematode in transformed soybean roots [J]. *Experimental Parasitology*, 2010, 127: 90-99.
- [11] LI J R, TIMOTHY C, TODD T. Host-derived suppression of nematode reproductive and fitness genes decreases fecundity of *Heterodera glycines* Ichinohe [J]. *Planta*, 2010, 232: 775-785.
- [12] 阮龙, 吴飞, 姜疆, 等. 基于发根培养体系的甘薯品种抗线虫特性鉴定研究 [J]. *激光生物学报*, 2008, 17(1): 104-109.
- [13] 肖翔, 阮龙, 王钰. 胡萝卜发根培养甘薯茎线虫体系研究 [J]. *高技术通讯*, 2005, 9(15): 67-70.
- [14] PAK H K, SIM J S, HA S H, et al. Hairy root induction in *Oriental melon* (*Cucumis melo*) by *Agrobacterium rhizogenes*

and reproduction of the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2009, 98: 219-228.

[15] NARAYANAN R A, ATZ R, DENNYN D, et al. Expression of soybean cyst nematode resistance in transgenic hairy roots of soybean [J]. *Cell Biology & Molecular Genetics*, 1999, 39: 1680-1686.

[16] CAO D, HOU W S, SONG S, et al. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2009, 96: 45-52.

[17] KERESZT A, LI D X, INDRASUMUNAR A. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology [J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(4): 948-952.

[18] SUDHA C G, OBUL R B, RAVISHANKAR G A, et al. Production of ajmalicine and ajmalicine in hairy root cultures of *Rauwolfia micrantha* Hook f., a rare and endemic medicinal plant [J]. *Biotechnology Letters*, 2003, 25: 631-636.

[19] TIRTHARTHA C, SHEULI R, ADINPUNYA M, et al. Development of a transgenic hairy root system in jute (*Corchorus capsularis* L.) with gus A reporter gene through *Agrobacterium rhizogenes*-mediated co-transformation plant [J]. *Plant Cell Reports*, 2010, 10: 485-493.

[20] 高崇省. 一种改进的根组织中线虫的染色方法[J]. *植物检疫*, 1994, 8(6): 341.

[21] NAM P P, TUAN A, LI X, et al. An efficient protocol for genetic transformation of *Platycodon grandiflorum* with *Agrobacterium rhizogenes* [J]. *Un Park Springer Science Business Media*, 2010, 10: 2307-2313.

[22] MARTIN J, WUBBEN F E, CALLAHAN B A. Phenotypic and molecular evaluation of cotton hairy roots as a model system for studying nematode resistance [J]. *Plant Cell Reports*, 2009, 28: 1399-1409.

[23] DESSAUX Y, PETIT A, TEMPE J. Chemistry and biochemistry of opines [J]. *Phytochemistry*, 1993, 34: 31-38.

[24] 王傲雪, 李景富, 徐香玲, 等. 发根农杆菌介导的抗病毒基因导入番茄转化系统的建立[J]. *东北农业大学学报*, 2000, 31(3): 233-240.

[25] 李静, 宋戈. 建三江垦区土地利用/覆盖变化与生态环境效应作用机理研究[J]. *经济地理*, 2011, 31(5): 816-821.

Establishment of soybean hairy root system induced by *Agrobacterium rhizogenes*

ZONG Xiao-qiu ZHANG Dong-sheng HUANG Wen-kun PENG Huan PENG De-liang
Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences/State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Beijing 100193, China

Abstract Seedling cotyledons of the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe)-susceptible cultivars of Zhonghuang 13, Heidou 44 and Heidou 51 were co-cultured with *Agrobacterium rhizogenes* strain K599 under dark conditions. Transformation efficiency was tested through GUS staining. The results showed that there were significant differences among soybean genotypes in their susceptibility to *A. rhizogenes*. The conditions of 25 °C and 12 h/d light were found to be optimal for hairy root induction of Heidou 44. The transformation efficiency of Heidou 44 had no significant difference with that of Heidou 51, while it was significantly higher than that of Zhonghuang 13. Light or darkness had no effect on Zhonghuang 13, but the inducing efficiency of Heidou 44 and Heidou 51 in the dark conditions were significantly higher than that in light condition. The infective efficiency of Heidou 44 was significantly higher than that of Heidou 51 and Zhonghuang 13.

Key words soybean; hairy root; soybean cyst nematode; *Agrobacterium rhizogenes*

(责任编辑:陈红叶)