

根癌农杆菌转化谷子细胞 早期的细胞生物学研究*

余迪求 许耀 李宝健

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

摘要 本文利用光镜、电镜和电镜放射自显影技术观察了有效高活性根癌农杆菌转化谷子培养细胞早期的细胞生物学过程。经复合人工信号物质和天然复合敏感抽提物处理的农杆菌可向不敏感的谷子细胞表面移动、聚集并附着。在靠近谷子细胞一极, 菌体形成颗粒状内含物, 并表现为多形态。在 ^3H -TdR 放射性标记的高活性农杆菌与谷子细胞的共培养过程中, 可依次在谷子细胞的细胞质周缘、核内及核仁区域观察到 T-DNA 银颗粒的分布。

关键词 共培养, 多形态, Ti T-DNA 转移, 根癌农杆菌, 谷子

分类号 Q942

根癌农杆菌 Ti 质粒介导的外源基因转移在双子叶植物基因工程中得到深入广泛的应用。近几年来, 利用这一系统转化个别单子叶植物也取得初步的进展^[1~9]。然而, 农杆菌与双子叶植物细胞相互作用的细胞学观察只有少数报道^[10~13], 与不敏感的单子叶植物特别是禾本科作物细胞相互作用的细胞生物学研究更是少见^[5,10]。许耀等^[14]用特殊处理的农杆菌转化处理几种禾本科作物的培养细胞, 从谷子中获得稳定表达的转化细胞克隆及其再生植株。为了进一步证实和了解这一转化过程的细胞生物学机制, 从而更好地高效利用这一外源基因转化系统, 本文利用光镜和透射电镜等观察了根癌农杆菌与禾本科作物谷子培养细胞的相互作用。在此基础上, 我们又进而利用电镜放射自显影技术, 初步研究了经放射性标记和特殊处理的农杆菌转化谷子细胞早期阶段, Ti T-DNA 在受体细胞内转移和整合的过程。

1 材料和方法

1.1 谷子细胞系的建立

松散状的谷子 (*Setaria italica* 陇谷四号) 愈伤组织系由兰州大学贾敬芬教授提供, 将其置于附加 500 mg/L 水解酪蛋白、250 mg/L 酵母粉、1.0 mg/L 2, 4-D 和 0.2 mg/L 玉

收稿日期: 1992-07-27, 修改稿收回日期: 1993-11-24

* 国家高技术发展计划 (863) 资助项目

米素的MS培养基中进行液体振荡培养. 悬浮细胞系每5~7天用50目的滤网过滤后, 通过加入新鲜培养液进行继代培养.

1.2 菌株

双质粒载体根瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA 101菌株内 pTV4GUS 的 T 区含有可在植物中表达的氨基糖苷磷酸转移酶 (NPTII) 基因和 β -葡糖苷酸酶 (GUS) 基因等. 菌株在附加50mg/L 卡那霉素和50mg/L 氨苄青霉素的 YEP (10g/L 蛋白胨、5g/L NaCl 和10g/L YE) 培养基培养.

1.3 高活性菌液的获得

用于诱导有效活性菌株的复合人工信号物质 (8SSM) 及天然复合敏感抽提液 (NSE) 的制备参见文献^[3], 将一环 EHA101 菌株 (pTV4GUS) 在 YEP 液中振荡培养16h, 作为一级活性菌液. 取出2ml 一级活性菌液加入5倍体积的含8SSM (10mg/L) 和 Y 1/3 NSE 的 YEP 中诱导培养12h, 即为二级活性菌液.

1.4 农杆菌与谷子细胞的共培养程序

当谷子悬浮培养细胞系重新换液培养2天用来共培养处理, 即分别向不同培养瓶中的谷子细胞悬浮液中加入上述二级活性菌液, 每处理含3ml 谷子细胞和0.1ml 活性菌液. 混匀后在28℃100r/min 条件下共培养.

1.5 显微与亚显微观察

在供体和受体细胞相互作用过程中, 定期取样、洗涤与固定. 按常规透射电镜程序制样, 材料经 Epon 812 包埋, LKB2088V 型超薄切片机切片, 柠檬酸铅染色. 用日立 HV-12A 型透射电镜观察与拍照. 同一包埋块经 LKB11800 型切片机进行半薄切片, 并经 Giemsa 染色后, 用于光镜观察.

1.6 菌株的放射性标记

将100 μ l 过夜培养的一级活性菌液在含有复合信号物质 (8SSM)、天然复合敏感抽提液 (NSE) 及2 uci/ml [甲基-³H] 胸腺嘧啶核苷 (³H-TdR) 的 YEP 培养液 (具相应抗菌素) 中预处理和放射性标记16h (23℃、150 r/min). 处理后, 用 1×10^{-2} mol 磷酸缓冲液充分洗涤菌体, 完全除去未掺入的³H-TdR. 随后, 将标记的菌体重新悬浮于上述无放射性的复合培养液中 (密度约为 20×10^9 细胞/ml), 立即用于共培养处理.

1.7 电镜放射自显影

按前述共培养程序用放射性标记的菌体转化谷子细胞. 在其相互作用的特定时期, 取样洗涤和固定. 按常规电镜放射自显影程序制样. 将超薄切片喷50Å 的碳膜, 然后用浸涂法涂核乳胶 (HW₄). 4℃下曝光70天后显影和定影, 随后在透射电镜下观察与拍照.

2 实验结果

2.1 谷子细胞与农杆菌相互作用的显微观察

在本实验条件下, 有效活性的农杆菌与谷子细胞共培养10min 时, 谷子细胞团表面及

其周围尚未见农杆菌的分布(图版 I—1);共培养45~60min后,在谷子细胞团周围开始有少许农杆菌(约1~3个)(图版 I—2,箭头);共培养2h后,在植物细胞团周围有许多农杆菌,并有部分细菌附着于谷子细胞表面(图版 I—3,箭头);共培养4h后,附着于谷子细胞表面的农杆菌数量显著增多(图版 I—4,箭头)。此后,附着于谷子细胞表面的农杆菌不仅数量增加,而且具有向细胞表面不断聚集的倾向(图版 I—5)。

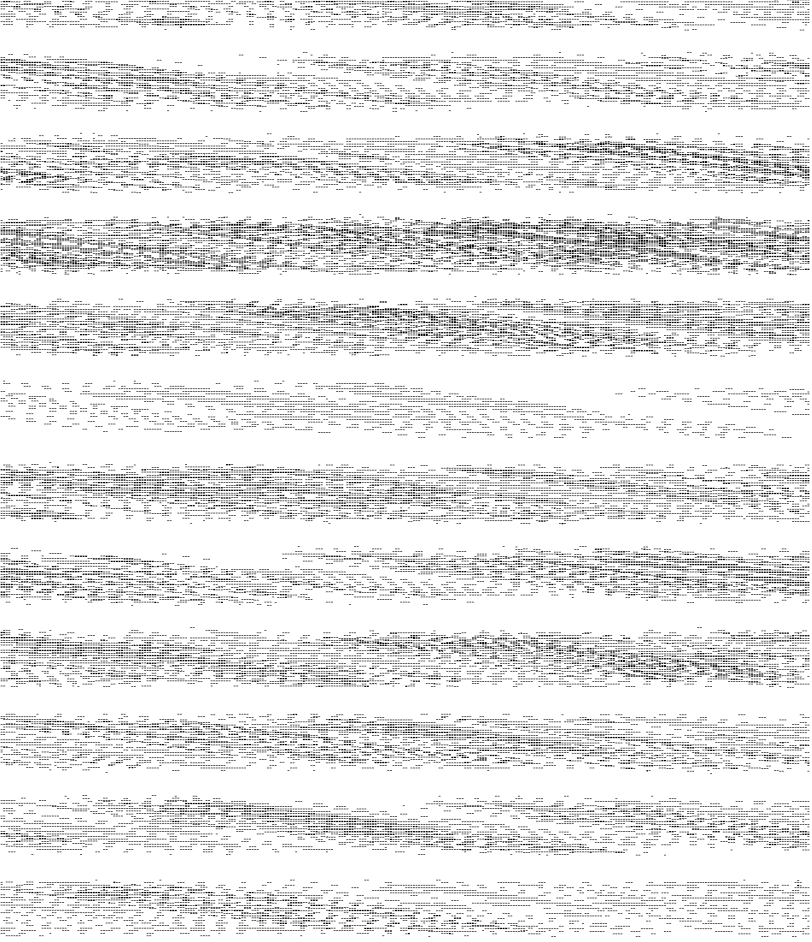
2.2 谷子细胞与农杆菌相互作用的电镜观察

同样,将有效活性的农杆菌与谷子细胞共培养10min,在电镜下观察,未发现谷子细胞团表面及其周围有农杆菌分布。共培养45~60min时,在谷子细胞团周围偶尔观察到1~2个农杆菌,其细胞质分布较为均匀(图版 I—6)。共培养2h后,谷子细胞团周围的农杆菌开始增多,并且农杆菌开始附着于谷子细胞表面。附着处的植物细胞壁较为膨大。同时,菌体内细胞质浓缩,靠近植物细胞一端的菌体细胞壁似有溶解迹象(图版 I—7)。但此阶段“游动”于植物细胞周围的农杆菌形态结构典型,细胞质分布均匀(图版 I—1)。谷子细胞与农杆菌共培养4~6h后,附着于植物细胞表面的菌体结构变化显著,菌体出现颗粒状的浓密内含物,并移向靠近植物细胞的一端(图版 I—8)。在此共培养时期,谷子细胞团周围的有些菌体细胞质浓缩,部分菌体发生质壁分离现象(图版 I—2,无柄箭头);另有一些菌体伸出小纤丝,它们的部分细胞壁溶解(图版 I—2,粗箭头)。此外,还可直接观察到菌体紧贴于植物细胞壁上的情形(图版 I—9)。但共培养24h后,“游动”于植物细胞团附近的菌体部分出现空泡化等衰老现象(图版 I—3)。

2.3 高活性农杆菌转化谷子细胞早期过程的电镜放射自显影

在电镜放射自显影观察中,农杆菌与谷子悬浮培养细胞共培养10min时,在谷子细胞内未见到银颗粒标记物的分布。共培养45~60min时,虽然在光镜和电镜下,观察到有少量农杆菌向谷子细胞表面靠近,但谷子细胞内却仍然未观察到银颗粒标记物。共培养2h后,在谷子细胞团表面聚集许多农杆菌,菌体形态开始演变。但谷子细胞内仍未观察到银颗粒标记物(图版 I—4)。

共培养4h后,在谷子细胞团表面聚集大量农杆菌。同时,在谷子细胞团表层细胞的细胞质周缘可观察到线珠状银颗粒标记物,这种标记物即为 T-DNA。表明标记的 T-DNA 片段已穿过谷子细胞壁并开始转入细胞内(图版 I—5)。另外,在个别谷子细胞的细胞核内也观察到银颗粒标记物的分布(图版 I—5),表明 T-DNA 通过谷子细胞质转移至细胞核内。共培养4~6h后,不仅在谷子细胞团部分表层细胞内而且在较深层的个别细胞内也可观察到银颗粒标记物分布于细胞核区域(图版 I—6),但细胞核的核仁区域尚未观察到线珠状银颗粒标记物。以后,通常在能观察到银颗粒的特定细胞内可观察到1~3个线珠状银颗粒。有时在细胞的不同部份(细胞质、细胞核和核仁中)可同时观察到银颗粒标记物(图版 I—7)。此外,在共培养后期发现银颗粒标记物在谷子细胞核尤其是核仁区域出现的频率高于其他区域,表明 T-DNA 转移与整合的归宿在核基因组中。



体细胞质分布均培养2x,10菌
目倍速观察(无柄箭头),有微速
x 30 000 (无柄箭头).

20菌体出现空泡共培养24h 后
1的电镜照相在直径微米级标尺
菌体细胞内可见有膜包裹的颗粒
在细胞核内细胞膜边缘处
观察到许多颗粒分胞核内箭头也
指向膜包裹的颗粒箭头观察在
膜包裹的颗粒细胞核边缘区
与宽分别为原图版本图版的长

3 讨 论

曾有作者^[5,10,11,15]借助于扫描电镜观察了根癌农杆菌与植物细胞的相互关系,但更加详细的细胞生物学研究尚未见报道。我们采用光镜透射电镜及电镜放射自显影技术,较为系统地观察了农杆菌与禾本科作物谷子培养细胞相互作用的关系及其转化的早期过程,进一步从细胞生物学角度证实了特殊预处理的农杆菌能够转化禾谷类作物谷子细胞。PUPPKE等^[15]认为,对农杆菌敏感的植物细胞壁包含一个特异的附着位点,而不敏感植物细胞壁缺乏此位点。但是,高活性的农杆菌与谷子细胞共培养后,我们观察到农杆菌可向不敏感的谷子细胞表面靠近、聚集并附着。

在透射电镜下,我们观察到,农杆菌与谷子细胞共培养过程中,农杆菌变化最显著的是其形态结构及内含物。在靠近谷子细胞一端,菌体内形成颗粒状浓密内含物,有些菌体部分细胞壁溶解(图版 I—7,8)。农杆菌侵染葡萄叶柄组织和豌豆幼苗组织时也发现有类似的变化^[13,16]。Tarbah等^[13]认为,细菌体内颗粒状内含物的形成是菌体对受伤植物细胞所释放的物质反应。受伤的植物组织能诱使邻近的农杆菌演变成多型态。另外,农杆菌形成颗粒状内含物及部分细胞壁溶解可能为 T—DNA 释放及避免核酸酶降解提供一种机制^[13]。因此,我们推测根癌农杆菌 T—DNA 转移至植物细胞内在细胞学方面包括两个关键过程。首先,农杆菌附着于植物细胞表面并开始特定结合;其次,宿主细胞诱使附着的农杆菌演变成多型态,即在菌体内形成颗粒状内含物,随后菌体部分细胞壁溶解并释放出 T—DNA。

在葡萄叶柄组织与农杆菌相互作用 18h 后菌体形态开始发生演变^[13]。而我们的实验揭示,高活性的农杆菌与谷子悬浮细胞共培养 2h 后菌体形态即发生演变(图版 I—7),说明本转化程序不仅能诱使农杆菌附着于谷子细胞表面,而且能诱使菌体形态演变提前发生。

经³H—TdR 标记和特殊处理的农杆菌与谷子细胞共培养不同时间后, T—DNA 银颗粒在谷子细胞内的分布顺序为,细胞质周缘、细胞质内、核内、核仁区域。随后,在细胞团中较深的细胞内也有类似的顺序。在共培养后期,银颗粒在细胞特别是核仁区域出现的频率较高,表明 T—DNA 最终转至并整合进核 DNA 中,其中与核仁有关的基因群内插入位点可能居多。Ambros 等用染色体原位杂交技术证实: 17kb 的质粒 T—DNA 主要插入 *Crepis capillaris* 的根尖染色体的临近核仁组织者区域的近着丝点处^[6]。继而,他们又证实: 每一条 *Crepis capillaris* 的根尖染色体均可作为 Ri T—DNA 插入的靶位点,并且可多次插入相同基因群(相同的或不同的染色体上^[7])。

致谢: 广州仲恺农业技术学院张志宇、中山大学测试中心夏锋、钟素娜等协助超薄切片及电镜观察。

参 考 文 献

- 1 邓万银, 林晓影, 邵召全. 致瘤农杆菌能够转化大麦和小麦. 中国科学, 1989 (2): 171~175
- 2 许耀, 贾敬芬, 郑国钊. 酚类化合物促进根瘤农杆菌对植物离体外植体高效转化. 科学通报, 1988, 33 (22): 1745~1748
- 3 Xu Y, Li B J, Jia J F. A novel system for *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) cells. *Cell Research*, 1993 (3): 49~60
- 4 李宝健, 欧阳学智, 许耀. 应用农杆菌 Ti 质粒系统将外流基因转入水稻细胞研究. 中国科学, 1990, B 辑 (2), 144~149
- 5 欧阳学智, 许耀, 李宝健. 小麦悬浮培养细胞与根瘤农杆菌相互作用的亚显微生物学研究, I. 农杆菌附着于小麦细胞的扫描电镜观察. 中山大学学报论丛, 1992, 8 (4): 55~60
- 6 Ambros P F, Matzke M A, Matzke A J M. Detection of a 17kb unique sequence (T-DAN) in plant chromosomes by in situ hybridization. *Chromsoma (Berl)*, 1986, 94: 11~18
- 7 Ambros P F, Matzke A J M, Matzke M A. Localization of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in plant chromosomes by in situ hybridization. *EMBO J*, 1986, 5: 2073~2077
- 8 Raineri D M, Bottino P, Gordon M P *et al.* *Agrobacterium*-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.). *Bio/technol*, 1990, 8: 33~38
- 9 Schafer W, Gorz A, Crunter K. T-DNA integration and expression in monocot crop plant after induction of *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 1987, 327: 529~532
- 10 Graves A E, Goldman S L, Banks S W *et al.* Scanning electron microscope studies of *Agrobacterium tumefaciens* attachment to *Zea mays*, *Gladiolus*. S. P. and *Triticum aestivum*. *J Bacterial*, 1988, 106: 2395~2400
- 11 Lippincott B B, Lippincott J A. Bacterial attachment to a special wound sites as an essential stage in tumor initiation by *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacterial*, 1969, 97: 620~628
- 12 Tarbah F A, Goodman R N. Anatomy of tumor development in grape stem tissue, inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* biover 3, strain Ag63. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1988, 32: 455~466
- 13 Tarbah F A, Goodman R N. Ultrastructural observations of the process of *Agrobacterium tumefaciens* biover 3 infection of grape cv. chancellor. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1988, 32: 437~453
- 14 Xu Y, Jia J F, Zheng G C. Interaction and transformation of cereal cells with phenolics-pre-treated *Agrobacterium tumefaciens*. *Chin J Bot*, 1990, 2 (2): 81~87
- 15 Pueppke S G, Hawes M C. Understanding the binding of bacteria to plant surfaces. *Trends in Biotechnol*, 1985, 3: 310~313
- 16 Macnocha M S. Introduction of phage-like particles in *agrobacterium* by wounded host tissue. *Canadian J Microbiol*, 1971, 17: 819~820

Cell Biological Study on the Early Process of Transformation of Millet (*S. italica*) Cells With *Agrobacterium tumefaciens*

Yu Diqiu * Xu Yao Li Baojian

Abstract By light and electron microscopic as well as EM autoradiography technique, we observed systematically the early cell biological process of the transformation of millet (*S. italica*) cells with high-effective *Agrobacterium tumefaciens*. The *Agrobacteria* pretreated with complex synthetic signal material (8SSM) and natural sensitive extractions (NSE) could move toward, gather and attach to non-sensitive millet cell surfaces. The electron microscopic observation demonstrated the bacteria became pleomorphic and formed granular inclusions that migrated to the polar position which neared plant cells. During co-cultivation between the high-effective bacteria cells labeled by ^3H -TdR and millet cells, we observed that T-DNA silver grains exist successively in the cytoplasm, nuclei and nucleoli regions.

Keywords co-cultivation, pleomorphism, Ti T-DNA transference, *Agrobacterium tumefaciens*, *setaria italica*

* Biotechnology Research Centre, Zhongshan University, Guangzhou 510275