

## 中药植物黄山药发根基因的遗传转化

顾月华\* 李艳

中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230027

**提要** 以发根农杆菌菌株 A4 转染已预培养 1 d 的黄山药茎段后, 共感染 3 d, 其转化效果最佳; 转化毛状根在无生长调节物质的 MS 培养基上培养可获得丛状芽, 并发育成植株。

**关键词** 黄山药; 发根农杆菌; 转化; 再生植株

## Genetic Transformation of *Dioscorea panthaica* with *Agrobacterium rhizogenes*

GU Yue-Hua\*, LI Yan

School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China

**Abstract** The perfect efficiency of genetic transformation of *Dioscorea panthaica* stem from pre-cultivation 1 d and co-cultivation 3 d, was got by the combination of strain A4 and *Agrobacterium rhizogenes*. Clustered shoots could grow from hairy roots in MS medium without growth regulators and then could form regenerated plants.

**Key words** *Dioscorea panthaica*; *Agrobacterium rhizogenes*; transformation; plant regeneration

黄山药(*Dioscorea panthaica*)的组培快繁国内已有所报道, 但再生植株率不高, 成本较高, 难以在生产中应用<sup>[1]</sup>。因此, 探索其它有效途径解决黄山药的资源问题显得很重要。本文探讨影响发根农杆菌转化黄山药外植体形成再生植株的一些因素。

### 材料与方法

发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)菌株 TR105 和 A4 由合肥工业大学罗建平先生惠赠, 黄山药(*Dioscorea panthaica*)试管苗是我们实验室保存的。

取黄山药试管苗, 在无菌条件下接种到 MS 培养基上扩繁, 留作感染实验。培养温度为 (25±2) °C, 12 h 光照 (光强 36.4 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>)/12 h 黑暗。

发根农杆菌菌株先在 27.5 °C 的黑暗中培养活化 2 d 后, 接种到 LB 固体培养基上, 以相同的条件培养 2~3 d, 得到单菌落, 待用。

分别挑取一定量活化的单菌落, 置于 LB 液体培养基中 (30 mL·瓶<sup>-1</sup>), 于 28 °C 黑暗条件下振荡 (120 r·min<sup>-1</sup>) 培养 24 h。在此过程中, 每隔 2 h 取出 1 瓶, 用分光光度计测其 OD 值 (λ=600 nm), 绘制菌株生长曲线。另挑取两菌株单菌落经液体

培养 (分别为 14 和 20 h, 培养条件同上), 离心 (2 130×g) 取沉淀, 后用 LB 培养基悬浮使其 OD 值 (λ=600 nm) 达到 0.6~0.8, 留作感染<sup>[2,3]</sup>。

发根农杆菌感染植物时, 取扩繁 2 周后的无菌苗, 茎段切成约 1 cm 的小段, 幼叶切成 0.5 cm<sup>2</sup> 大小, 然后以不含生长调节物质的 MS 培养基上分别预培养 0、1、2、3 d 后用于转化。培养条件为: (25±2) °C, 12 h 光照 (光强 36.4 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>)/12 h 黑暗。预培养后的外植体置于备用的菌液中, 处理 20~30 min 后用无菌滤纸吸去表面的菌液, 再置于不含生长调节物质的 MS 培养基上分别共培养 2、3、4、5 d, 后转移到含有头孢噻呋钠 (Cef) 500 mg·L<sup>-1</sup> 的 MS 培养基上。以未感染农杆菌的外植体为对照, 重复 3 次。培养条件为 (25±2) °C, 黑暗。

作毛状根诱导及植株再生时, 感染的外植体培养 1~2 周后, 毛状根陆续出现。每隔 10 d 更换培养基 1 次, Cef 量依次减少, 减至 5 次后即将外植体转移到无 Cef 的 MS 培养基上生长。3 周后, 毛状根处出现丛状芽, 剪下转移到 MS 培养基上, 于 (25±2) °C、12 h 光照 (光强 36.4 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>)/

收稿 2005-03-28 修定 2005-08-29

\*E-mail: yhgu@ustc.edu.cn, Tel: 0551-3601446

12 h 黑暗条件下进行诱导分化培养, 再生植株。

## 结果与讨论

### 1 发根农杆菌的生长

如图1所示, TR105菌株和A4菌株生长速率分别于14和20 h达到最大值, 是菌株生长最旺盛阶段, 对外植体细胞的附着和T-DNA的转化十

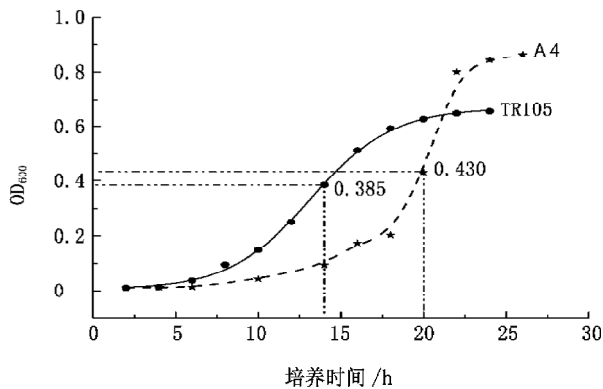


图1 TR105和A4菌株生长进程

Fig. 1 Growth course of *A. rhizogenes* TR105 and A4 strains in LB liquid medium

分有利, 在离体感染中转化效率较高<sup>[4]</sup>。

### 2 毛状根的诱导

外植体经菌液感染6~7 d后, 其切口处开始膨大突起, 这些突起在无生长调节物质的MS培养基上3 d后即诱导出现毛状根(图2-a); 也有些转化的外植体在切口处膨大伸长, 长出的愈伤组织变成淡黄色, 后出现毛状根。诱导出的毛状根呈乳白色且粗壮, 表面有白色细小绒毛, 根向地性生理特征消失, 向培养基各个方向辐射生长(图2-b、c)。对照组外植体约在1个月后分化长出正常根, 根呈黑褐色细长状, 并有明显的向地生长特性。

### 3 影响毛状根诱导的因素

**3.1 菌株和外植体** 菌株TR105感染的外植体一般在12 d出现毛状根, 菌株A4则稍早些(大约为9 d)。感染菌株TR105的茎段发根的致根率显著低于菌株A4。从对单个外植体诱导来看, 菌株TR105的发根诱导密度也低于菌株A4。显示菌株A4诱导毛状根的效果较强于菌TR105。叶片在感染2种菌液后都未长出毛状根(表1)。

表1 菌株和外植体对黄山药毛根诱导的影响

Table 1 Induction of hairy root from stem and leaf explants of *D. panthaica* infected by *A. rhizogenes* TR105 and A4

处理	茎段					叶片				
	处理数/个	产生毛根外植体数/个	毛根总数/个	致根率/%	毛根诱导密度	处理数/个	产生毛根外植体数/个	毛根总数/个	致根率/%	毛根诱导密度
对照	411	0	0	0	0	210	0	0	0	0
TR105	420	43	62	10.2	1.4	205	0	0	0	0
A4	415	74	156	17.8	2.1	200	0	0	0	0

表中为菌液感染外植体后1个月的统计结果。致根率(%)=(产生毛根外植体数/处理数)×100, 发根诱导密度=毛根总数/产生毛根外植体数。

**3.2 预培养时间** 从表2可见, 茎经预培养1 d后诱导效果最好, 致根率和发根密度都最高。

**3.3 共培养时间** 经过共培养的茎段, 其与TR105菌株共培养5 d的诱导效果最好, A4菌株以共培养3 d的效果最佳。从致根率和毛根诱导密度来看, 随着菌株TR105与茎段共培养时间的增加, 菌液的诱导效果逐渐增强, 5 d达到最高。A4菌株从2 d起诱导效果逐渐增强, 3 d最强, 后明显下降(表3)。这与前人的结果<sup>[5,6]</sup>基本一致。

表2 预培养时间对毛根诱导的影响

Table 2 Effect of pre-cultivation time of explants on induction of hairy root by *A. rhizogenes* TR105 and A4

预培养时间/d	致根率/%		毛根诱导密度	
	TR105	A4	TR105	A4
0	11.0	20.5	1.2	1.3
1	16.6	24.3	1.7	2.7
2	8.0	14.4	1.1	1.2
3	4.0	11.0	1.0	1.0

#### 4 植株再生

外植体感染2周后在无生长调节剂的MS培养基上生出的毛状根逐渐长芽,毛状根周围呈簇状。再将从状芽剪下接种到无生长调节剂的MS培养基上,约7~8 d后转化芽开始生根,呈毛状。继代后,转化苗出现大量正常根,有些植株的茎节处还会长出新的毛状根(图2-f)。约1个月,转化苗可再生成植株。转化与未经转化无菌苗,在形态上有一些差异,转化苗的叶片大而略微有皱

表3 共培养时间对茎毛状根诱导的影响

Table 3 Effect of co-cultivated time of explants with *A. rhizogenes* TR105 and A4 on induction of hairy root

共培养时间/d	致根率/%		毛根诱导密度	
	TR105	A4	TR105	A4
2	6.23	9.56	1.01	1.31
3	9.22	25.11	1.16	2.97
4	10.19	13.27	1.35	1.71
5	15.37	6.53	1.82	1.66

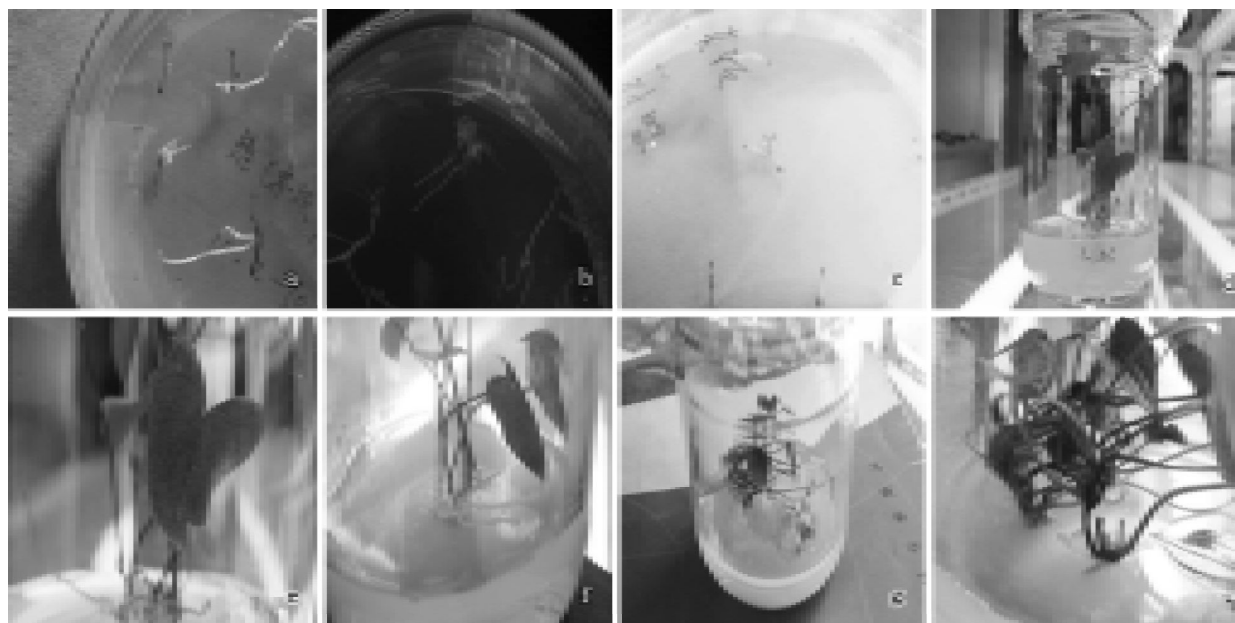


图2 毛状根诱导和植株再生

Fig. 2 Induction of hairy roots and plant regeneration

a: 感染菌液 14 d 后的茎段出现的毛状根; b: 感染菌液 20 d 的茎段出现的毛状根; c: 未感染菌液的茎段; d: 转化植株(整体图); e: 转化植株(局部图); f: 转化植株(有毛根); g: 未转化植株(整体图); h: 未转化植株(局部图)。

缩,茎可伸长,根有分叉<sup>[7]</sup>(图2-d~h),可以发育成植株。

#### 参考文献

- 马林, 张玲, 李卫峰. 黄山药丛生芽诱导与植株快速繁殖. 生物技术, 2004, 14(2): 53~54
- 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术. 北京: 科学出版社, 1998. 219~220
- 范芙蓉, 李广武, 沈萍. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 1993. 117~119
- 许耀, 贾敬芬, 郑国锴. 根癌农杆菌T-DNA在向日葵离体组织中的转移与表达. 云南植物研究, 1998, 10(2): 159~166
- Holford P, Hernandez N, Newbury HJ. Factors influencing the efficiency of T-DNA transfer during co-cultivation of *Antirrhinum majus* with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep, 1992, 11: 196~199
- Muthukumar B, Mariamma M, Veluthambi K et al. Genetic transformation of cotyledon explants of cowpea (*Vigna Unguiculata* L. Walp) using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep, 1996, 15: 980~985
- Akasaka Y, Masahiro MH, Daimon H. Morphological alterations and root nodule formation in *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transgenic hairy roots of peanut (*Arachis hypogae* L.). Ann Bot, 1998, 81: 355~362