

## 何首乌毛状根的诱导和培养(简报)

施和平 潘瑞炽

(华南师范大学生物系, 广州 510631)

### INDUCTION AND CULTURE OF HAIRY ROOT OF *POLYGONUM MULTIFLORUM* THUNB.

Shi Heping Pan Ruichi

(Department of Biology, South China Normal University, Guangzhou 510631)

分类号 Q944.6

发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 侵染后, 通过其 Ri 质粒的 T-DNA 片段在植物细胞基因组中整合, 诱导形成毛状根 (hairy root)<sup>[1]</sup>。利用生长迅速、生产效能高而稳定的毛状根培养物生产药用植物的次生物质, 已有不少报道<sup>[2-5]</sup>。但未见发根农杆菌对何首乌遗传转化的报道。

何首乌 (*Polygonum multiflorum* Thunb.) 为常用中药, 其块根为乌须发、悦颜色、益精养血和抗衰老的要药。本文报道发根农杆菌对何首乌遗传转化的实验结果, 为今后用毛状根培养物生产何首乌的次生物质打下基础。

#### 1 材料和方法

**细菌菌株及培养** 发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) R1601 具有 pRiA4b, 并且其中 Hind III 片段 21 上整合 Neomycin phospho-transferase II 基因, 染色体背景与 C<sub>38</sub> 相同; 同时该菌还具有超致病根癌农杆菌 (*A. tumefaciens*) pTiBo542 的 Vir 区的粘性质粒 pTVK291<sup>[7]</sup>。农杆菌在含卡那霉素的 AB 培养基上暗培养和保存。感染植物材料之前, 将农杆菌接于 YEB 液体培养基 28℃ 暗培养 30 h。

**外植体的制备** 取何首乌具节茎段用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 12 min, 无菌水洗净后接种至 MS + 6-BA 1.0 mg L<sup>-1</sup> 的培养基上长成无菌苗。将无菌苗幼叶和叶柄分别切成 1 cm<sup>2</sup> 的小块和 1.5 cm 长的小段, 置于无激素的 MS 培养基上预培养 24 h 后用于转化。

**毛状根的诱导和培养** 将上述预培养的叶柄和叶片外植体放入用 1/2 MS 培养液稀释 5 倍的发根农杆菌菌液中 28℃ 保温 20 min, 取出、吸干多余菌液并放回原培养基上共培养 2 d 后, 转入 MS + 500 mg L<sup>-1</sup> 头孢噻肟钠 (Cefotaxime) 的培养基上, 在光强 2000 lx、每天 14 h 光照 28℃ 下诱导毛状根。切取毛状根在含头孢噻肟钠的 N/5MS 培养基 (仅 KNO<sub>3</sub>、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 的浓度为 MS 的 1/5, 1% 的琼脂, 其余成分与 MS 相同) 上除菌培养。

**冠瘿碱的检测** 参照 Ellis 等<sup>[8]</sup> 的方法。以何首乌茎段外植体在 1/2 MS + NAA 2mg L<sup>-1</sup> 的培养基上产生的不定根作为对照。高压纸电泳条件是: 40 v/cm、时间 90 min。根据冠瘿碱

的有无, 确定是否是转化毛状根。

## 2 结果和分析

### 2.1 何首乌毛状根的诱导和培养

非感染的何首乌叶片外植体和叶柄外植体在无激素的 MS 培养基上连续培养一个半月无一生根, 仅部分外植体切口叶脉处产生少量浅绿色或白色愈伤组织。而感染农杆菌 R1601 的叶片外植体培养一周后, 仅从其叶脉处直接产生白色根原

基, 15 d 后发育成毛状根, 根诱导频率为 3-5 条/块, 毛状根密被白色根毛(图 1, A)。但被感染的叶柄外植体是从其形态学下端产生的白色愈伤组织上产生毛状根。毛状根除菌后, 可在无外源激素的 N/5MS 培养基上自主生长, 具较多分枝和根毛, 大部分向上生长(图 1, B)。

### 2.2 毛状根中冠瘿碱的检测

通常用冠瘿碱作为 Ri 质粒转化整合的观察指标。从图 2 可见, 发根农杆菌 R1601 诱导何首乌叶外植体产生的毛状根能合成农杆菌碱和甘露碱, 且农杆菌碱含量明显比甘露碱高; 对照根没有检测到农杆菌碱和甘露碱。这表明 Ri 质粒中编码冠瘿碱合成酶基因的 T-DNA 部分已在何首乌细胞中得到表达。

## 3 讨论

本研究表明, 发根农杆菌感染何首乌叶片外植体和叶柄外植体后都可产生转化毛状根, 但二者毛状根形态发生的方式不同。其中被发根农杆菌感染的叶片外植体不经愈伤组织阶段, 直接从其叶脉处产生根原基, 发育成毛状根。这与 Ri 质粒转化胡萝卜 (*Daucus carota* L.) 块根切

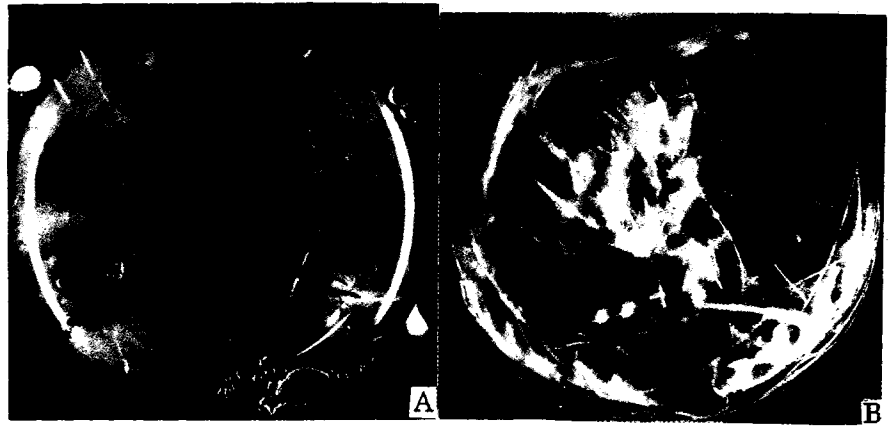


图 1 何首乌毛状根的诱导和培养

Fig. 1 Induction and culture of hairy root of *Polygonum multiflorum* Thunb. A: 发根农杆菌 R1601 感染的何首乌叶片外植体产生毛状根; B: 毛状根在无激素的 N/5 MS 培养基上继代培养。A: Hairy root from leaf explant after inoculation with the strain of *Agrobacterium rhizogenes* R1601; B: Hairy root subcultured on solid hormone-free N/5 MS medium.

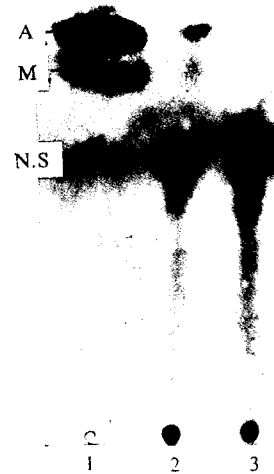


图 2 何首乌毛状根中冠瘿碱的高压纸电泳检测

Fig. 2 Opine analysis of hairy root of *Polygonum multiflorum* Thunb. by high-voltage paper electrophoresis

- 1: 含农杆菌碱 (A) 和甘露碱 (M) 的标准品;  
2: 毛状根提取物; 3: 对照根提取物。  
1: Standard containing agropine (A), mannopine (M) and neutral sugars (N. S); 2: Hairy root extract; 3: Control root extract.

片和烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 茎切段形成愈伤组织后再产生毛状根的方式不同<sup>[9]</sup>。然而, 马铃薯叶片外植体和块茎切块被发根农杆菌感染后是直接长出毛状根, 但其茎段外植体则从形成的愈伤组织上长出毛状根<sup>[10]</sup>。发根农杆菌转化甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) 子叶和下胚轴时, 毛状根既可直接从切口处产生也可从切口处形成的愈伤组织上长出<sup>[11]</sup>。这说明毛状根的形态发生方式可因植物种类和感染部位等不同而有所差异。

### 参考文献

- 1 White F F, Nester E W. Hairy root; plasmid encodes virulence traits in *Agrobacterium rhizogenes*. *J Bacteriol*, 1980, 141:1134-1141
- 2 Yoshikawa T, Furuya T. Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports*, 1987, 6:449-453
- 3 张荫麟, 吕桂兰, 周新华等. 金荞麦发状根培养的研究. *植物学报*, 1992, 34(8):603-608
- 4 费厚满, 梅康凤, 沈昕等. 发根农杆菌对绞股兰的转化及毛状根中皂苷的产生. *植物学报*, 1993, 35(8):626-631
- 5 Hamill J D, Parr A J, Rhodes M J C et al. New routes to plant secondary products. *Bio/Technology*, 1987, 29(5):800-804
- 6 邓小龙, 龚世蓉. 何首乌研究进展. *中草药*, 1987, 18(3):42-46
- 7 Pythoud F, Sinkar V P, Nester E W et al. Increased virulence of *Agrobacterium rhizogenes* conferred by the vir region of pTiBo542: application to genetic engineering of poplar. *Bio/Technology*, 1987, 29(5):1323-1327
- 8 Ellis D, Roberts D, Sutton B et al. Transformation of white spruce and other conifer species by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 1989, 8:16-20
- 9 Bercetche J, Chriqui D, Adam S et al. Morphogenetic and cellular reorientations induced by *Agrobacterium rhizogenes* (strains 1855, 2659 and 8196) on carrot, pea and tobacco. *Plant Science*, 1987, 52:195-210
- 10 Ottaviani M P, Schel J H N, Hänisch ten Cate Ch H. Variation in structure and plant regeneration of *Agrobacterium rhizogenes* transformed and control roots of the potato cv. Bintje. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1990, 20:25-34
- 11 陈士云, 候嵩生, 桂耀林等. 发根土壤杆菌体外转化甘草子叶及下胚轴. *武汉植物学研究*, 1991, 9(4):301-304