

重金属超富集植物东南景天毛状根的诱导

陈友明^{1*}, 刘静轶^{1,2*}, 张腾¹, 卢倩云¹, 晏琼^{1**}

(1. 北京交通大学理学院, 北京 100044; 2. 水中典型污染物控制与水质保障北京市重点实验室, 北京 100044)

摘要: 为建立重金属超富集植物东南景天(*Sedum alfredii*)的毛状根诱导体系, 采用发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*) A4 侵染叶片, 研究了预培养时间、侵染时间和共培养时间对毛状根诱导率的影响。结果表明, 东南景天叶片外植体的预培养时间为 48 h、农杆菌侵染时间为 6 min、共培养时间为 48 h 是适宜的毛状根诱导时间, 毛状根的诱导率可达 85%。PCR 检测表明诱导的毛状根中存在 *rolB* 基因片段。这是东南景天首次建立用发根农杆菌诱导毛状根体系。

关键词: 重金属超富集植物; 东南景天; 毛状根; 遗传转化

doi: 10.11926/jtsb.3644

Induction of Hairy Roots in Heavy Metal Hyperaccumulator *Sedum alfredii*

CHEN You-ming^{1*}, LIU Jing-yi^{1,2*}, ZHANG Teng¹, LU Qian-yun¹, YAN Qiong^{1**}

(1. School of Science, Beijing Jiaotong University, Beijing 100044, China; 2. Beijing Key Laboratory of Aqueous Typical Pollutants Control and Water Quality Safeguard, Beijing 100044, China)

Abstract: In order to establish induction system of hairy roots of *Sedum alfredii*, the leaves infected by *Agrobacterium rhizogenes* A4 as explants, the effect factors, such as pre-culture time, infection time and co-culture time, on induction rate of hairy roots were studied. The results showed that the hairy roots could be induced after 48 h pre-culture, infection for 6 min and 48 h co-culture with the highest induction rate of 85%. Furthermore, the *rolB* gene could be detected in induced hairy roots by PCR, which confirmed that the transgenic system of *S. alfredii* mediated by *A. rhizogenes* A4 was successful. So, it was the first time for induction system establishment of hairy roots in *S. alfredii* with *A. rhizogenes* A4.

Key words: Heavy metal hyperaccumulator; *Sedum alfredii*; Hairy root; Genetic transformation

近年来转基因毛状根组织在植物修复技术中的应用研究受到广泛关注, 毛状根组织被越来越多地应用于重金属和有机污染物的植物修复技术研究中, 已成为一种便捷的实验室研究工具。目前愈伤组织、细胞悬液、芽、毛状根等离体培养组织都已成功地应用于植物修复重金属和有机污染物研究中^[1], 相对而言, 毛状根在植物修复研究方面具有更大的优势, 首先, 植物直接接触污染物的器官一般都是根系, 而毛状根具有正常根的所有形态和

生理体征, 能够作为根系的模式体系开展植物根系对有毒物质的解毒机制和代谢途径研究; 同时毛状根具有稳定的遗传性状和表型特征, 能够提供稳定的可重复的研究系统; 其次, 毛状根是植物被发根农杆菌侵染后形成的转基因产物, 可以作为重金属超富集植物的转基因研究载体; 进一步可以通过农杆菌 Ri 质粒的直接转化引入植物相关重要金属离子转运蛋白或富集因子的基因, 对植物和重金属超富集植物进行改造, 提高植物的修复潜能, 重建和

收稿日期: 2016-07-08 接受日期: 2016-09-30

基金项目: 中央高校基本科研业务费(2014JBM118)资助

This work was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Grant No. 2014JBM118).

作者简介: 陈友明(1991~), 男, 硕士研究生, 主要从事重金属污染环境植物修复技术的研究。E-mail: 14121578@bjtu.edu.cn

* 共同第一作者

** 通信作者 Corresponding author. E-mail: qyan@bjtu.edu.cn

筛选优良的转基因植株^[2]。目前已从裂叶沙参(*Adenophora lobophylla*)、天蓝遏蓝菜(*Thlaspi caerulescens*)、印度芥菜(*Brassica juncea*)等重金属超富集植物中诱导出毛状根,并开展了相关重金属和有机污染物修复机制的研究^[3]。

东南景天(*Sedum alfredii*)为景天科(Crassulaceae)景天属多年生草本植物,是近年来在中国浙江衢州、湖南郴州古老铅锌矿区发现的一种锌、镉、铅超富集植物,对土壤中过量的锌、镉、铅具有强忍耐能力。与超富集植物天蓝遏蓝菜、印度芥菜、龙葵(*Solanum nigrum*)、宝山堇菜(*Viola baoshanensis*)、商陆(*Phytolacca acinosa*)、红苋菜(*Beta vulgaris var. cicla*)、圆锥南芥(*Arabis paniculata*)等比较,东南景天具有地上部分能积累较多镉的特性,能有效减轻土壤中的重金属污染^[4-5]。目前已有研究者对东南景天富集镉的动力学过程和特点、根系对镉的响应等进行了研究,结果表明东南景天修复效率较大,特别适合修复低中度镉污染土壤^[6-10]。熊愈辉等^[6]采用营养液培养法,在 $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ 的 Cd 水平下,东南景天叶中镉含量可达峰值 5677 mg kg^{-1} ,茎中可达峰值 5274 mg kg^{-1} 。并且东南景天适应性强,耐瘠薄、干旱及强光等恶劣生境,是开展植物修复与生态绿化的优良品种,具有良好的应用潜力。但目前重金属超富集植物要真正大规模应用于实际的污染土壤修复,还需要进一步提高其对重金属的特异性吸收和富集的能力,而构建转基因毛状根体系可为实现重金属超富集植物的真正应用提供优良的实验室研究平台。

能否成功诱导出毛状根取决于植物本身的特性、农杆菌种类和诱导技术,本研究对东南景天毛状根诱导技术中的时间因素进行了研究,建立了东南景天毛状根培养体系,为今后利用东南景天毛状根进行植物富集重金属的代谢机制等研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 无菌外植体的制备

东南景天(*Sedum alfredii*)购自新丝绿花卉公司,采自东北辽宁,为富集重金属型。挑选幼嫩的叶片,用无菌水清洗 3 次,用 75%酒精消毒 60 s,无菌水清洗 3 次;然后用 0.1% NaClO 浸泡 5 min,无菌水冲洗 3 次,用无菌滤纸将叶片表面的水分吸干,在无菌条件下将东南景天无菌苗的幼嫩叶片剪成 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 大小,接种于 MS 固体培养基(不添加任何激素),

25℃ 黑暗预培养 2 d,作为遗传转化用的外植体。

1.2 发根农杆菌的活化

发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*) A4 是致根能力强的农杆菌型菌株,菌株具有卡那霉素抗性。在无菌条件下,用接种针挑取保存的 A4 菌液,在 YEB 固体平板上划线,28℃ 黑暗培养,直到长出单菌落。挑取 1 个单菌落接种于 50 mL 附加有 50 mg L^{-1} 卡那霉素的液体 YEB 培养基中,28℃、 180 r min^{-1} 下培养 24 h 复苏,测定菌悬液 OD 值,OD 值为 1.0 左右时取 1 mL 菌液加入 50 mL YEB 液体培养基中进行第二次活化,28℃、 180 r min^{-1} 下暗培养 12 h,再次测定活化菌液 OD 值,OD 值达到 0.6~0.8 时即为对数生长期,此时菌液可作侵染用。

1.3 发根农杆菌介导的遗传转化

在超净工作台上,将预培养后的无菌外植体转至已灭菌的锥形瓶中,再将活化的侵染菌液倒入锥形瓶中,侵染 10 min 后取出外植体,无菌水清洗 2 遍,用无菌滤纸吸干表面菌液,接种到原 MS 固体平板培养基上,25℃ 黑暗共培养 2 d。转化后的外植体转接到含有 500 mg L^{-1} 头孢噻肟钠的 MS 固体平板培养基上,于 25℃ 黑暗培养,多次继代直至完全除菌后再去掉抗生素继续培养,约 1~2 周可长出毛状根。30 d 后统计诱导出的毛状根数,并计算平均诱导率:诱导率=(长出毛状根的外植体数/接种外植体的总数)×100%。

设置预培养时间、侵染时间、共培养时间对毛状根诱导的影响试验。预培养时间分别为 0、24、48、72、96 h;侵染时间分别为 0、4、6、8、10、12 min;共培养时间分别为 24、48、72、96 h。每个试验取 20 个侵染的外植体统计诱导率,每个试验均重复 3 次。对照均为未受农杆菌侵染的外植体,其他培养条件一致。

1.4 毛状根的 PCR 检测

获得的毛状根是否为发根农杆菌诱导还需要进行鉴定,通过检验发根农杆菌 Ri 质粒中与形态发生相关的基因片段,是转化的可靠分子证据^[11],毛状根分子鉴定方法包括 PCR、Southern Blot 等。本试验采用 PCR 检测发根农杆菌 Ri 质粒中能够整合进入植物基因组中的 *rolB* 片段(540 bp)来鉴定。取 5.0 g 东南景天毛状根,采用 CTAB 法提取基因组

DNA 并纯化。按照 Furner 等^[12]的方法设计并合成 PCR 引物。正向引物为 *frolB*: 5'-TACTGCAGCAG-GCTTCATGAC-3', 反向引物为 *rrolB*: 5'-GCTTTC-CCGACCAGAGACTG-3'。PCR 扩增程序为: 94℃ 变性 3 min; 然后 94℃ 变性 1 min, 53.5℃ 退火 1 min, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 1 min。扩增产物采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳和 Gel Red 染色进行分析。

1.5 数据统计分析

使用 Excel 对数据进行处理和方差分析, 采用 Duncan 多重比较进行差异显著性分析。

2 结果和分析

2.1 毛状根的诱导和鉴定

用培养 5 h 的农杆菌 A4 菌液侵染叶片外植体培养 1 个月, 获得东南景天毛状根(图 1: A)。东南景

天叶片外植体明显发黄并出现褐色斑点, 从切口长出的线状组织便是毛状根, 呈白色线状, 侧根多且短, 根的分枝多, 无向地性, 呈绒毛样, 能够在无激素培养基上旺盛生长, 这些特点符合毛状根生长的特性。未经农杆菌 A4 菌液侵染的叶片外植体培养 1 个月后, 只有 1 块外植体长出 1 条长约 1 cm 左右的根(箭头), 且没有分支, 没有侧根(图 1: B), 不是毛状根。

从图 2 可见, PCR 引物能从 3 株东南景天毛状根中扩增到期望的 540 bp 的特异性 *rolB* 基因片段, 该片段与野生型发根农杆菌 A4 的 Ri 质粒中的特异性片段大小相同, 而对照外植体未扩增出此片段。这表明诱导的东南景天毛状根是转基因产物。

2.2 影响毛状根诱导的时间因素

预培养时间 叶片外植体在侵染前需要进行一定时间的预培养, 以使叶片适应新的培养环

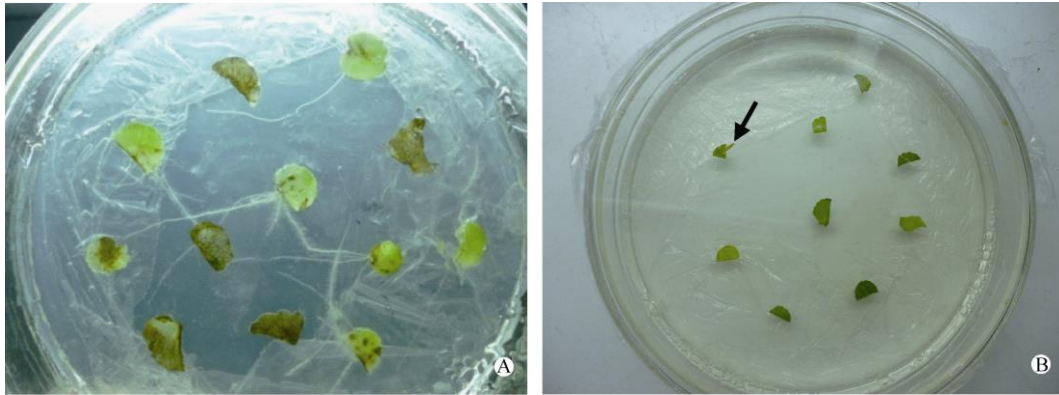


图 1 东南景天毛状根的诱导。A: 农杆菌 A4 诱导的毛状根; B: 对照。

Fig. 1 Induction of hairy roots of *Sedum alfredii*. A: Hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* A4; B: Control.

境。结果表明, 未经过预培养的叶片受农杆菌 A4 侵染后迅速死亡, 而经过一定时间预培养后能诱导出毛状根, 预培养 48 h 后毛状根的诱导率达 80%, 预培养 24 h 和 72 h 的分别为 45% 和 60%, 而预培养 96 h 的仅为 10%, 说明 48 h 是最佳的预培养时间(表 1)。

侵染时间 适宜的侵染时间有助于农杆菌对植物细胞的附着和转化, 侵染时间太短, 农杆菌来不及侵入细胞内部; 侵染时间太长, 农杆菌易对细胞造成伤害, 导致外植体的存活率下降。从表 2 可见, 农杆菌 A4 对东南景天叶片外植体的侵染时间不宜过长, 侵染 6 min 毛状根的诱导率达到最高

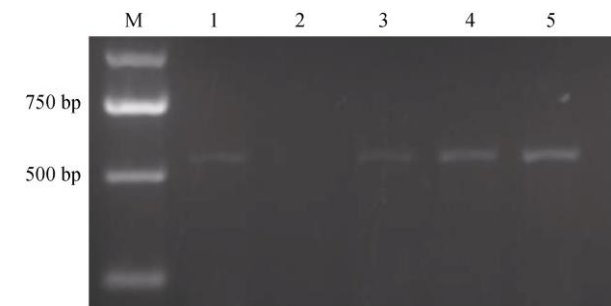


图 2 东南景天毛状根 *rolB* 基因的 PCR 扩增。M: DL 2000; 1: A4 的 Ri 质粒; 2: 对照; 3~5: 毛状根。

Fig. 2 PCR amplification of *rolB* gene from *Sedum alfredii* hairy roots. M: DL 2000; 1: Ri plasmid of A4; 2: Control; 3-5: Hairy root.

(85%)。随着侵染时间的延长毛状根的诱导率逐渐下降, 侵染 12 min 时毛状根的诱导率仅 10%。

表 1 预培养时间对东南景天毛状根诱导率的影响

Table 1 Effect of pre-culture time on induction rate of hairy roots of *Sedum alfredii*

预培养时间 Pre-culture time (h)	侵染外植体数 Number of infected explants	生根外植体数 Number of rooting explants	诱导率 Induction rate (%)
0	20	0 ± 0	0 ^{aA}
24	20	9 ± 1	45 ^{bB}
48	20	16 ± 2	80 ^{cC}
72	20	12 ± 1	60 ^{dB}
96	20	2 ± 0	10 ^{eA}

同列数据后不同大小字母分别表示差异显著 ($P < 0.05$) 和极显著 ($P < 0.01$) (Duncan 多重比较)。下表同。

Data followed different capital and small letters within line indicate significant difference at 0.05 and 0.01 levels by Duncan multiple comparisons, respectively. The same is following Tables.

表 2 侵染时间对东南景天毛状根诱导率的影响

Table 2 Effect of infection time on induction rate of hairy roots of *Sedum alfredii*

侵染时间 Infection time (min)	侵染外植体数 Number of infected explants	生根外植体数 Number of rooting explants	诱导率 Induction rate (%)
0	20	0 ± 0	0 ^{aA}
4	20	10 ± 1	50 ^{bB}
6	20	17 ± 2	85 ^{cB}
8	20	13 ± 2	65 ^{dB}
10	20	6 ± 1	30 ^{eB}
12	20	2 ± 0	10 ^{fA}

表 3 共培养时间对东南景天毛状根诱导率的影响

Table 3 Effect of co-culture time on induction rate of hairy roots of *Sedum alfredii*

共培养时间 Co-cultivation time (h)	侵染外植体数 Number of infected explants	生根外植体数 Number of rooting explants	诱导率 Induction rate (%)
24	20	0 ± 0	0 ^{aA}
48	20	17 ± 1	85 ^{bB}
72	20	9 ± 1	45 ^{cB}
96	20	2 ± 1	10 ^{dA}

共培养时间 由表 3 可见, 侵染后的东南景天叶片外植体经过不同时间的共培养后, 诱导率明显不同。共培养 48 h 东南景天毛状根的诱导率可达到 85%, 共培养超过 72 h 的诱导率明显降低。因此 48 h 是最适宜的共培养时间。

3 结论和讨论

关于重金属超富集植物东南景天毛状根的遗传转化目前还未见相关报道。本研究利用发根农杆菌 A4 转化东南景天叶片外植体, 获得了激素自主、快速生长、多分支、多根毛的毛状根株系, 并经 PCR 鉴定为转基因株系。

对影响毛状根诱导率的重要时间因素进行分析。结果表明, 东南景天诱导毛状根的适宜预培养时间为 48 h、侵染时间为 6 min、共培养时间为 48 h。有关影响植物毛状根诱导的时间因素的研究已有不少报道, 张悦等^[13]的研究表明, 48~72 h 是黄秋葵 (*Abelmoschus esculentu*) 毛状根诱导的最佳预培养时间, 以 48 h 的诱导率最高。本研究中预培养时间对东南景天毛状根诱导的影响与黄秋葵基本一致, 表明这两种植物外植体适应后续侵染环境的时间要求相似。农杆菌侵染植物外植体的时间十分关键, 侵染时间过短或过长都会对毛状根诱导产生显著的影响。刘静轶等^[11]的研究表明, 农杆菌 ATCC15834 侵染油菜 (*Brassica campestris*) 4 h 的毛状根诱导率最高 (28.9%); 杨世海等报道农杆菌 A4 侵染紫锥菊 (*Echinacean purpurea*) 外植体 12 min 的毛状根诱导率较高 (55.5%)^[14]。农杆菌 A4 对东南景天外植体侵染 6 min 的毛状根诱导率较高 (85%), 比油菜和紫锥菊的侵染时间更短且诱导率更高, 这可能是农杆菌菌种不同和不同植物对农杆菌侵染敏感性不同造成的^[15], 也表明东南景天对农杆菌 A4 的侵染敏感性较高。侵染后农杆菌和外植体的共培养时间也是影响毛状根诱导率的重要因素, 一般不应短于 16 h; 但也不应过长, 否则会造成农杆菌过度生长^[16]。杨世海等^[14]报道共培养 2 d 紫锥菊毛状根的诱导率较高 (50%)。本研究中农杆菌和外植体的共培养时间以 48 h 较适宜, 超过 48 h 毛状根的诱导率明显下降, 这与杨世海等的结果一致。

重金属超富集植物毛状根体系已经在植物修复研究中显示出很好的应用潜力。Nedelkoska 等^[17]的研究结果表明, 吸附在天蓝遏蓝菜毛状根中的 Cd 含量大于其他非重金属超富集植物; 同时对毛状根细胞壁的研究揭示了天蓝遏蓝菜和烟草 (*Nicotiana tabacum*) 毛状根在富集 Cd 过程中的代谢途径不同。因此, 东南景天毛状根体系的成功建立可为实验室开展重金属修复机制研究提供简便的实验体系, 并且为进一步开展重金属超富集植物东

南景天的转基因改造奠定理论基础。

参考文献

- [1] DORAN P M. Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: Incentives and limitations [J]. *Biotechn Bioeng*, 2009, 103(1): 60–76. doi: 10.1002/bit.22280.
- [2] van AKEN B. Transgenic plants for phytoremediation: Helping nature to clean up environmental pollution [J]. *Trends Biotechn*, 2008, 26(5): 225–227. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.02.001.
- [3] AGOSTINI E, TALANO M A, GONZÁLEZ P S, et al. Application of hairy roots for phytoremediation: What makes them an interesting tool for this purpose? [J]. *Appl Microbiol Biotechn*, 2013, 97(3): 1017–1030. doi: 10.1007/s00253-012-4658-z.
- [4] YANG X E, LONG X X, NI W Z, et al. *Sedum alfredii* H.: A new Zn hyperaccumulating plant first found in China [J]. *Chin Sci Bull*, 2002, 47(19): 1634–1637. doi: 10.1007/BF03184113.
- [5] YANG X E, LONG X X, YE H B, et al. Cadmium tolerance and hyperaccumulation in a new Zn-hyperaccumulating plant species (*Sedum alfredii* Hance) [J]. *Plant Soil*, 2004, 259(1/2): 181–189. doi: 10.1023/B:PLSO.0000020956.24027.f2.
- [6] XIONG Y H, YANG X E, YE Z Q, et al. Comparing the characteristics of growth response and accumulation of cadmium and lead by *Sedum alfredii* Hance [J]. *J NW Sci-Tech Univ Agri For (Nat Sci)*, 2004, 32(6): 101–106. doi: 10.3321/j.issn:1671-9387.2004.06.023.
熊愈辉, 杨肖娥, 叶正钱, 等. 东南景天对镉、铅的生长反应与积累特性比较 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2004, 32(6): 101–106. doi: 10.3321/j.issn:1671-9387.2004.06.023.
- [7] LI T Q, YANG X E, LONG X X. Zinc Phytoextraction ability from polluted soil of hyperaccumulating ecotype of *Sedum alfredii* Hance [J]. *J Soil Water Conserv*, 2004, 18(6): 79–83. doi: 10.3321/j.issn:1009-2242.2004.06.019.
李廷强, 杨肖娥, 龙新宪. 东南景天提取污染土壤中锌的潜力研究 [J]. *水土保持学报*, 2004, 18(6): 79–83. doi: 10.3321/j.issn:1009-2242.2004.06.019.
- [8] LI J G, JIN L S, CHEN Y Q, et al. Effects of nitrogen fertilizer on the root morphology and cadmium accumulation in low cadmium treatment *Sedum alfredii* Hance [J]. *Chin Agri Sci Bull*, 2007, 23(3): 260–265. doi: 10.3969/j.issn.1000-6850.2007.03.057.
李继光, 金兰淑, 陈禹桥, 等. 氮对低镉处理下东南景天根系形态及镉积累的影响 [J]. *中国农学通报*, 2007, 23(3): 260–265. doi: 10.3969/j.issn.1000-6850.2007.03.057.
- [9] ZHANG Y Y, DOU C Y, YAO F, et al. Nitrogen application to enhance zinc and cadmium uptake by the hyperaccumulator *Sedum alfredii* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2010, 27(6): 831–838. doi: 10.3969/j.issn.2095-0756.2010.06.005.
张圆圆, 窦春英, 姚芳, 等. 氮素营养对重金属超积累植物东南景天吸收积累锌和镉的影响 [J]. *浙江林学院学报*, 2010, 27(6): 831–838. doi: 10.3969/j.issn.2095-0756.2010.06.005.
- [10] JIN X F, YANG X E, ISLAM E, et al. Effects of cadmium on ultra-structure and antioxidative defense system in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator ecotypes of *Sedum alfredii* Hance [J]. *J Hazard Mat*, 2008, 156(1/2/3): 387–397. doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.12.064.
- [11] LIU J Y. Research on *Agrobacterium rhizogenes*-mediated *IRT1* gene transformation in Cd hyperaccumulator *Brassica campestris* L. [D]. Beijing: Beijing Jiaotong University, 2014: 1–35.
刘静轶. 发根农杆菌介导 *IRT1* 基因转化镉超富集植物油菜的研究 [D]. 北京: 北京交通大学, 2014: 1–35.
- [12] FURNER I J, HUFFMAN G A, AMASINO R M, et al. An *Agrobacterium* transformation in the evolution of the genus *Nicotiana* [J]. *Nature*, 1986, 319(6052): 422–427. doi: 10.1038/319422a0.
- [13] ZHANG Y, YANG S H. Induction and *in vitro* culture of *Abelmoschus esculentus* hairy roots [J]. *Lishizhen Med Mat Med Res*, 2011, 22(12): 2991–2994. doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2011.12.074.
张悦, 杨世海. 黄秋葵毛状根的诱导及培养 [J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(12): 2991–2994. doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2011.12.074.
- [14] YANG S H, BI X X, YANG H J. Induction of *Echinaceae purpurea* hairy roots and *in vitro* culture [J]. *Chin Pharm J*, 2011, 46(20): 1557–1562.
杨世海, 毕晓秀, 杨慧洁. 紫锥菊毛状根诱导及离体培养 [J]. *中国药理学杂志*, 2011, 46(20): 1557–1562.
- [15] ZHAO P, WANG K, ZHANG W, et al. Review and inspiration of plant proteins involved in the transformation processing of T-DNA initiated by *Agrobacterium* [J]. *Sci Agri Sin*, 2014, 47(13): 2504–2518. doi: 10.3864/j.issn.0578-1752.2014.13.003.
赵佩, 王轲, 张伟, 等. 参与农杆菌侵染及 T-DNA 转运过程植物蛋白的研究进展和思考 [J]. *中国农业科学*, 2014, 47(13): 2504–2518. doi: 10.3864/j.issn.0578-1752.2014.13.003.
- [16] XU K J, SHI L L, LIU S D, et al. Wheat seed germination and seedling physio-biochemical characteristics with co-cultivation conditions during *Agrobacterium tumefaciens* soaking [J]. *Acta Bot Boreali-Occid Sin*, 2011, 31(4): 697–706.
徐开杰, 史丽丽, 刘曙东, 等. 农杆菌共培养条件对小麦种子萌发和幼苗生理生化特性的影响 [J]. *西北植物学报*, 2011, 31(4): 697–706.
- [17] NEDELKOSKA T V, DORAN P M. Hyperaccumulation of cadmium by hairy roots of *Thlaspi caerulescens* [J]. *Biotechn Bioeng*, 2000, 67(5): 607–615. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(20000305)67:5<607::AID-BIT11>3.0.CO;2-3.