

## 4 种发根农杆菌对朱砂根组培无菌 叶片毛状根诱导的影响

胡 菊, 毛美琴, 杨 君, 但 方, 马明东\*

(四川农业大学 风景园林学院, 成都 611130)

**摘 要:**以朱砂根(*Ardisia crenata* Sims)组培无菌叶片为材料,用4种发根农杆菌菌株(A4、ATCC15834、LBA9402和R1601)分别侵染进行毛状根诱导,比较朱砂根叶片毛状根诱导的最适培养基种类、预培养时间、侵染方式、共培养时间以及不同发根农杆菌的致根能力。研究表明:(1)朱砂根无菌叶片毛状根诱导最适培养基为1/2MS培养基,预培养2 d、共培养2 d,毛状根诱导率最高(31.87%)。(2)最佳侵染方式以剪好的幼叶和活化好的菌液(100 mg/L AS)一起在28℃、180 r/min黑暗条件下共振振荡8~15 min。(3)4种发根农杆菌均能诱导朱砂根叶片毛状根产生,但A4、ATCC15834效果最好,其致根能力大小顺序依次为ATCC15834>A4>LBA9402>R1601。(4)PCR分子鉴定表明,发根农杆菌Ri质粒T-DNA已成功整合到宿主细胞核基因组中。

**关键词:**朱砂根;组培无菌叶片;发根农杆菌;毛状根

**中图分类号:**Q813.1<sup>+</sup>2;Q785

**文献标志码:**A

## Four Kinds of *Agrobacterium rhizogenes* on Sterile Leaves Induction of *Ardisia crenata* Sims

HU Ju, MAO Meiqin, YANG Jun, DAN Fang, MA Mingdong\*

(College of Landscape Architecture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

**Abstract:** With sterile leaves of *Ardisia crenata* Sims by tissue culture as explants, we performed hairy root induction by using four kinds of *Agrobacterium rhizogenes* strains, named A4, ATCC15834, LBA9402, R1601, respectively. The investigation selected optimal media types, pre-culture time, infection ways, co-culture time, and the ability of *A. rhizogenes* on hairy root induction. The study showed that 1/2 MS was the better medium for sterile leaves on hairy root induction, and hairy root induction rate was the highest (31.87%) under pre-cultured 2 d and co-cultured 2 d. It was the best way for infection that put sterile leaves and bacteria which was supplied with AS (100 mg/L) co-shake under dark, 28℃ and 180 r/min for 8 to 15 min. All of the four strains could induce hairy root on *A. crenata* Sims, but ATCC15834 was the most effective strain, and A4 followed it. For ATCC15834, A4, LBA9402 and R1601, the ability of hairy root induction on *A. crenata* Sims was declining in turn. It demonstrated that T-DNA on Ri plasmid of *A. rhizogenes* had been integrated into the genome of the host cell successfully through molecular identification by PCR.

**Key words:** *Ardisia crenata* Sims; sterile leaves; *Agrobacterium rhizogenes*; hairy root

朱砂根(*Ardisia crenata* Sims)是隶属于紫金牛科(Myrsinaceae)紫金牛属(*Ardisia*)的双子叶常

收稿日期: 2015-11-20; 修改稿收到日期: 2016-01-13

基金项目: 四川省教育厅攻关项目(2006A016)

作者简介: 胡 菊(1986—), 女, 在读博士研究生, 主要从事园林植物培育与利用。E-mail: 1029191614@qq.com

\* 通信作者: 马明东, 教授, 硕, 博士生导师, 主要从事园林植物培育与利用。E-mail: 1670364138@qq.com

绿小灌木<sup>[1]</sup>,是中国传统的观赏药用植物,分布于长江流域各省以及福建、台湾等地<sup>[2]</sup>。作为园林观赏植物,是紫金牛属植物中最具观果、观叶价值的代表种之一<sup>[3-4]</sup>;而作为传统药用植物,利用历史已有四五百年,在《中国药典》(1997 年版)中,是被收载记录的紫金牛属 2 种药用植物之一<sup>[5]</sup>,通过理化鉴定、显色反应等显示其主要药用成分为岩白菜素和三萜皂苷<sup>[6-7]</sup>,且具有成为继喜树碱和紫杉醇之后的新一代抗 HIV 和抗肿瘤的天然药物的重大潜力<sup>[8]</sup>。

目前对朱砂根的研究主要集中在药理、药材鉴定、化学成分分析方面,少有离体组织培养。随着基因工程的发展,已在多种植物上利用发根农杆菌成功诱导了毛状根,红豆杉<sup>[9]</sup>、喜树<sup>[10]</sup>、银杏<sup>[11]</sup>、杜仲<sup>[12]</sup>、乌柏<sup>[13]</sup>等是木本植物中最具代表性的。朱砂根三萜皂苷主要存在于其根部,而其它部位含量相对较低<sup>[14]</sup>,发根中含有和原植物中相同或相似,含量相当或略高甚至更多,以及分化程度、遗传稳定性高且不易变异的次生代谢产物<sup>[15]</sup>,还可从发根培养物中寻找新的化合物。建立毛状根培养体系,可以为朱砂根三萜皂苷的生产提供一条新途径。因此,通过分子生物技术手段进行朱砂根毛状根诱导显得十分迫切与必要。再者,目前在朱砂根上应用基因工程技术的研究相比于其他一些植物远远落后,建立一种高效、稳定的遗传转化体系,是朱砂根进行转基因技术应用的基础。但目前尚未见报道有关发根农杆菌介导朱砂根的研究。

本研究以朱砂根组培无菌叶片为受体,用 4 种发根农杆菌 A4、ATCC15834、R1601 和 LBA9402 分别侵染,并进行 PCR 分子鉴定。为后续试验准备丰富的试验材料,奠定朱砂根遗传转化与利用发根体系生产朱砂根有用次生代谢产物的基础,为朱砂根可持续开发利用及其次生代谢物质(三萜皂苷)的高效、规模化、工厂化生产提供科学依据和技术支撑,也为其它木本植物进行发根农杆菌转化提供借鉴。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

朱砂根无菌苗在成都市农林科学院林科所组培室,按照马明东等<sup>[16]</sup>方法培育朱砂根无菌苗。

A4、ATCC15834、R1601 和 LBA9402 均购自于 ATCC(美国标准生物品收藏中心),在四川农业大学风景园林学院分子实验室进行活化、超低温保存以及侵染转化。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 菌液制备及活化** 将保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中的 4 种发根农杆菌分别进行 YMB 固体平板划线, $28^{\circ}\text{C}$ 暗培养 1~2 d 后挑取单菌落转入 3 mL YMB 液体培养基中, $28^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 暗培养活化 24 h 后,吸取 0.5~1.0 mL 菌液转入 50 mL YMB 液体培养基中,于  $28^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 黑暗振荡培养,如此反复进行 3 次活化后,测定菌液  $\text{OD}_{600}$  值达 0.5~0.8 时,收集菌液,用于侵染,对照组使用无菌水代替菌液。

**1.2.2 朱砂根叶片毛状根的诱导** 选取朱砂根健壮组培无菌叶片,用 A4、ATCC15834、R1601 和 LBA9402 分别进行侵染,诱导毛状根的产生,筛选毛状根诱导的最适培养基种类、预培养和共培养时间、侵染方式等,并对毛状根进行形态和 PCR 分子检测。

若无特别说明,幼叶的叶正面向上放置;预培养温度设为 $(25\pm 1)^{\circ}\text{C}$ ,黑暗培养。共培养温度设为 $(28\pm 1)^{\circ}\text{C}$ ,黑暗培养。除菌培养、继代培养温度为 $(25\pm 1)^{\circ}\text{C}$ ,光照 8 h/d,光强 1 500~2 000 lx。侵染的菌液以及共培养基均添加 100 mg/L AS。发根时间从侵染的当天开始算起。每组试验生物学重复 3 次,结果取其平均值,CK 则用无菌水代替菌液。

毛状根诱导率(%) = 产生毛状根的外植体数 / 总外植体数  $\times 100\%$

(1)基本培养基 用活化好的  $\text{OD}_{600}$  值为 0.5~0.8 的 4 种发根农杆菌,分别侵染朱砂根无菌叶片(近似  $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ ),比较 MS、1/2MS 培养基对发根诱导的影响,观察比较发根时间及毛状根特点。

(2)预培养时间 预培养的目的是使被侵染的外植体细胞处于感受状态,利于发根农杆菌的吸附、转移和整合。预培养时间设为 0、1、2 和 3 d。

(3)侵染方式 采用 3 种侵染方式:(I)用无菌针管吸取活化好的菌液在剪好的叶片上进行针刺划线;(II)将剪好的叶片浸泡在活化好的菌液中;(III)将剪好的叶片和活化好的菌液一起  $28^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 黑暗共振荡 8~15 min。

(4)共培养时间 发根农杆菌的附着、T-DNA 的转移和整合都是在共培养时间段内完成的,因此整个侵染转化过程中共培养时间的确定是最重要的环节之一。共培养时间设为 1、2 和 3 d。

(5)毛状根的检测 毛状根检测主要包括两方面,即形态特征检测和 PCR 分子检测。形态特征检

测,主要记录和观察出根初始状态、根形态及颜色、向地性、长度等,并与组培苗根、自然根比较来进行初步判断。而分子检测则是收获毛状根,随机选取少量用于 PCR 分子检测。

发根的分子检测,选用 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒(上海生工)提取发根农杆菌的质粒 DNA,而采用改良 CTAB 法<sup>[17]</sup>提取朱砂根毛状根和无菌苗组培根的基因组总 DNA。用于 PCR 的 rolA 基因正向引物为 FrolA (5'-CGTTGTCG-GAATGGCCCAGACC-3'),反向引物为 RrolA (5'-CGTAGGTCTGAATATTCCGGTCC-3')。将质粒 DNA、毛状根 DNA、无菌苗组培根 DNA 进行 PCR 扩增。选用 PCR 扩增体系 25  $\mu$ L: Buffer 2.5  $\mu$ L, dNTPs 2.0  $\mu$ L, 上下游引物各 1.0  $\mu$ L, Taq 酶 0.35  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 16.2  $\mu$ L, 模板 DNA 2.0  $\mu$ L。PCR 扩增程序:95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95  $^{\circ}$ C 变性 30 s;55  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s;34 个循环,72  $^{\circ}$ C 保温延伸 5 min,4  $^{\circ}$ C 下保存。

在 PCR 扩增产物中加入 5  $\mu$ L Loading Buffer,发根农杆菌质粒 DNA 扩增产物为阳性对照,朱砂根无菌苗组培根 DNA 扩增产物为阴性对照,用 1%

琼脂糖凝胶电泳进行电泳。电泳结果用 EB 染色 10 min 后于凝胶成像系统(UV260 nm)下紫外灯扫描观察分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 发根诱导的培养基筛选

从表 1 可以得知,1/2 MS 培养基是朱砂根叶片毛状根诱导的最佳培养基,不仅出根时间早、根突点数量多且生长情况良好。说明不同无机盐浓度的 MS 培养基对毛状根的诱导有着极大的影响,而 MS 培养基对发根的诱导效果较差,这可能与其所含无机盐浓度过高有关,推测朱砂根毛状根适合在含稍低无机盐浓度的 1/2 MS 培养基上生长。因此,后续试验选用 1/2 MS 培养基进行侵染。

### 2.2 预培养时间筛选

从表 2 可得知,预培养 2 d 是最佳预培养时间,不仅发根诱导率最高达 32%,而且出根时间早、数量多且生长状况良好。适当的预培养时间可以提高转化率,这可能是因为外植体经过一定时间的预处理可以减轻发根农杆菌在侵染过程中对其造成的胁迫伤害,并且能将要转化的外植体细胞进一步调整

表 1 不同培养基对毛状根诱导的影响

Table 1 The effect of different media on hairy root induction

培养基 Medium	菌株 Strain	出根时间 Rooting time/d	发根特点 Character of hairy root	其它 Other
MS	A4	9~12	丛状,短小 Fasciculate,microsoma	淡乳黄色根突点,量少,生长缓慢 Light cream yellow root,less and grew slowly
	15834	7~10	簇状,纤细 Cluster,slender	乳白色根突点,量少,缓慢生长 Milk white root,less and grew slowly
	R1601	14~16	单一根,极短小 A single root,very microsoma	数量极少(一、二根),1 周后停止发育 Few in number (one or two),to stop developing after one week
	9402	13~15	单一根,粗壮 A single root,thick	数量少,1 周后几乎停止发育 Few in number, to stop developing nearly after one week
1/2MS	A4	5~10	丛状,纤细 Fasciculate,slender	乳白色或淡乳黄色根突点,可以继续生长 White or light cream yellow root,grew continually
	15834	5~7	簇状,纤细 Cluster,slender	淡乳黄色根突点,生长并分支 Light cream yellow root, grew and branched
	R1601	10~14	单一根,粗壮短小 A single root,thick and microsoma	根突点稍多,但继续生长发育能力不强 A little more root,but continued growth ability was not strong
	9402	8~13	单一根,粗壮 A single root,	根突点稍多且有个别根可继续生长发育 A little more root,and only one or two root could be grown continued

表 2 预培养时间对毛状根诱导的影响

Table 2 The effect of pre-culture time on hairy root induction

共培养时间 Pre-culture time/d	诱导率 Induction rate/%	褐化率 Browning rate/%	死亡率 Mortality rate/%	其它 Other
0	5	11	17	出根时间晚甚至不出根,生长缓慢甚至停止 Appeared late or not appeared,grew slowly or even stopped
1	13	30	29	出根时间晚,数量较少,生长慢 Appeared late,fewer and grew slowly
2	32	36	20	出根时间早且数量多,簇状,生长较快且长势好 Appeared earlier,quantity, tufted,grew faster and well
3	16	44	28	出根时间晚,数量较少,生长缓慢 Appeared late,fewer and grew slowly

到适宜侵染的生理状态即感受状态。处于感受状态的细胞对发根农杆菌更敏感,更容易整合外源 DNA,从而有利于 Ri 质粒 T-DNA 的转移,提高侵染能力,进而提高转化率。

2.3 侵染方式比较

从表 3 可以得知,3 种侵染方式均能成功诱导产生毛状根,但方式Ⅲ诱导率(36.67%)较其它 2 种方式高得多,是最佳侵染方式。这可能是因为,针刺增加了划伤,使外植体更容易褐化死亡;浸泡虽然可以增加与菌株的接触时间,但是并不代表会有更多的菌株进入外植体;共振荡不仅增加了各个外植体与菌株的接触面积,而且同样增加了单个外植体与发根农杆菌的接触时间,从而增加了二者的亲和性,即增加接触机会,因此转化率得到了提高。

2.4 共培养时间筛选

从表 4 可以得知,共培养 2 d 是最佳共培养时间,毛状根诱导率最高,可以达到 31.87%;3 d 的诱导率次之为 12.36%;而 1 d 的诱导率仅为 8.13%。由此可知,在侵染试验中适当的共培养时间有利于提高外植体转化率,但共培养时间过长,发根农杆菌大量生长会造成外植体严重损伤,从而降低毛状根的诱导率。

2.5 不同菌株对叶片转化的比较

从表 5 和图 1 可以看出,4 种菌株对朱砂根叶片的侵染能力是不同的,其大小顺序是:ATCC15834>A4>LBA9402>R1601。ATCC15834、A4 菌株的致根能力明显比 R1601、LBA9402 强得多,分别为 35.56%、29.35%,相同条件下,R1601、LBA9402 对叶片诱导率低。4 种菌株对朱砂根叶片有不同的转化能力,这可能与其所含 Ri 质粒的性质有关,即 ATCC15834、A4 菌株的 Ri 质粒上编码诱导发根的 T-DNA 片段比 R1601、LBA9402 菌株更容易转移整合到朱砂根细胞核基因组中去;还有可能是因为朱砂根外植体对发根农杆菌有一定的选择性、敏感性。

2.6 毛状根检测

2.6.1 毛状根形态检测 从表 6 可以看出,朱砂根发根颜色偏淡,多为乳白色或乳黄色,粗细因菌株类型而异。丛状或簇状根突点产生的较细发根能够继续发育分化产生分支,生长良好,而较粗毛状根一般在 1 cm 左右长时停止生长。

2.6.2 毛状根分子检测 从 PCR 凝胶电泳分析图(图 2、3)分析,根据发根农杆菌 Ri 质粒 T-DNA 上的 *rolA* 基因合成上、下游 PCR 引物,以毛状根基因

表 3 不同侵染方式对毛状根诱导的影响

Table 3 The effect of different infection methods on hairy root induction

侵染方式 Way of infection	外植体数 No. of explants	感染数 No. of infection	诱导率 Induction rate/%	其它 Other
I	94	6	6.38	出根数量极少且外植体易死亡 Minimum number of root, and explants easily to death
II	93	6	6.45	褐化严重且周围有明显菌斑 Seriously brown and with plaque significantly
III	90	33	36.67	出根数量多成簇状 Few of root and tufted

表 4 不同共培养时间对发根诱导的影响

Table 4 The effect of different co-culture times on hairy root induction

共培养时间 Co-culture time/d	外植体数 No. of explants	感染数 No. of infection	诱导率 Induction rate/%	其它 Other
1	86	7	8.13	出根数量少甚至不出根 Less roots or even not appeared
2	91	29	31.87	出根数量较多 More roots
3	89	11	12.36	出根数量较少 Less roots

表 5 不同菌株对叶片转化的比较

Table 5 Comparison of different *A. rhizogenes* transformed leaves on induction

菌株 Strain	外植体数 No. of explants	感染数 No. of infection	诱导率 Induction rate/%	其它 Other
A4	92	27	29.35	根突点较多,淡乳黄色 More of root, light cream yellow
15834	90	32	35.56	形态明显,有分支 Morphology obviously with branches
R1601	89	4	4.49	出根晚且根突点较少 Short and thick
9402	93	8	8.60	根较粗壮 Appeared late and fewer

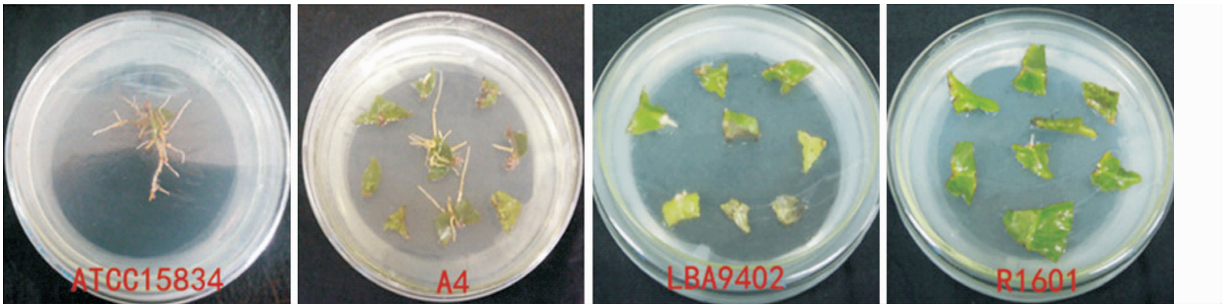


图 1 不同发根农杆菌诱导的毛状根

Fig. 1 Hairy root induced by different *A. rhizogenes*

表 6 毛状根形态记录表

Table 6 Record of hairy roots shape

菌株 Strain	颜色 Color	粗细 Thickness	有无分支 Branch or not	向地性 Geotropism	其它 Other
A4	乳黄色 Cream yellow	细小 Slender	Yes	No	生长良好,丛状根突点多,可继代培养 Grew well, more fasciculate root points, successive culture
15834	淡乳黄色 Light cream yellow	细小 Slender	Yes	No	生长良好,簇状根突点产生分支 Grown well, and the clusters of root points could produce branches
9402	乳白色 Milk white	较粗 Thick	—	—	长至 1 cm 左右停止生长 Stop growing until 1 cm
R1601	乳白色 Milk white	较粗 Thick	—	—	根突点少,未除菌彻底时就停止生长 Less root points, not aseptic thoroughly when they stop growing



M, DL1000;1. A4 的 roIA 扩增产物(阳性对照);2. 组培苗根 roIA 扩增产物(阴性对照);3~6. 毛状根 roIA 扩增产物(A4)

图 2 毛状根 roIA 基因的 PCR 扩增产物凝胶电泳分析(A4)

M, DL1000;1. The roIA amplification products of A4 (positive control);2. The roIA amplification products of *A. crenata* roots (negative control);3-6. The roIA amplification products of hairy roots (A4)

Fig. 2 Gel electrophoresis analysis of PCR amplification products of hairy root roIA (A4)

组 DNA 为模板(3~6 号为 4 个重复),菌株 Ri 质粒总 DNA 为阳性对照,朱砂根组培苗根总 DNA 为阴性对照,从毛状根的总 DNA 中扩增出了与阳性对照菌株 Ri 质粒总 DNA 扩增的特异性 T-DNA 片段大小一致约 258 bp 左右的特异性 DNA 片段。即 A4、ATCC 15834 所含的 *roIA* 基因目的条带已经转移并整合到了朱砂根叶片毛状根基因组中。

毛状根的检测是对侵染结果的检验。本试验中 4 种发根农杆菌都能侵染朱砂根无菌叶片,从形态

M, DL1000;1. ATCC15834 的 roIA 扩增产物(阳性对照);2. 组培苗根 roIA 扩增产物(阴性对照);3~6. 毛状根 roIA 扩增产物(ATCC15834)

图 3 毛状根 roIA 基因的 PCR 扩增产物凝胶电泳分析(ATCC15834)

M, DL1000;1. The roIA amplification products of ATCC15834 (positive control);2. The roIA amplification products of *A. crenata* roots (negative control);3-6. The roIA amplification products of hairy roots (ATCC15834)

Fig. 3 Gel electrophoresis analysis of PCR amplification products of hairy root roIA (ATCC15834)

上判断都是毛状根,而对 A4、ATCC15834 侵染幼叶产生的毛状根进行的 PCR 分子检测,同样证实了发根农杆菌 Ri 质粒上的 T-DNA 已整合进入宿主细胞。

### 3 讨 论

自然界中,植物被认为是大量具有多种生物活性的次生代谢产物生物合成的化学工厂,但利用完整植株进行分离提取会对植物自然种质资源造成巨

大威胁。由于遗传稳定、生长迅速等使得毛状根培养成为植物细胞培养中一个引人注目的体系,不仅可以避免因过度开发而对自然资源生物多样性造成损坏,还可以不依赖于季节性和地理差异性。本研究成功获得了激素自主、多分支的朱砂根毛状根,这使得开发并利用朱砂根毛状根进行工业化生产其所含的次生代谢产物三萜皂苷具有了可能性和发展潜力。毛状根的诱导受到多种因素的影响,包括外植体种类、培养基种类、预培养及共培养时间、侵染方式、菌株种类及活性等。

### 3.1 培养基种类、预培养及共培养时间对毛状根诱导的影响

毛状根的生长对不同培养基成分表现出一定的差异性<sup>[18]</sup>。陈永芳等<sup>[19]</sup>研究发现在 1/2 MS、MS、B5 等固体或液体培养基中,MS 液体培养基最有利于新疆紫草毛状根诱导。郭生虎等<sup>[20]</sup>研究表明乌拉尔甘草在 1/2 MS、MS、B5、1/2 B5 培养基中的 1/2 MS 培养基上生长最好、增殖率最高为 79.2%。本研究中 1/2 MS 培养基更有利于朱砂根毛状根诱导,同样是对不同培养基成分效应的适应的结果。

大量研究表明,预培养时间对毛状根诱导率有一定的影响。王丽等<sup>[21]</sup>探讨龙葵毛状根诱导的研究表明不进行预培养诱导率最低,预培养 2 d 诱导率最高,而 3 d、4 d 则依次降低。本研究中预培养 2 d 可提高朱砂根毛状根诱导率达 32%。共培养时间也是影响毛状根诱导率的一个方面。于艳丽等<sup>[22]</sup>对小金海棠的研究表明过早(1 d)转入除菌培养,虽可有效抑制细菌增殖,但明显降低了诱导率;过晚(4 d),细菌过度增殖,导致除菌较困难且诱导率大幅下降;适当的共培养时间(2 d)则可达最佳效果。本研究结果与此结果一致,共培养 2 d 朱砂根毛状根诱导率最高为 31.87%。发根农杆菌转化所进行的组织培养不同于纯粹的组织培养,需要经过外植体吸附菌株、外植体与菌株共培养,因此选择适当的预培养及共培养时间有助于提高发根诱导率。

### 3.2 不同菌株对毛状根诱导的影响

不同发根农杆菌菌株具有不同的致根能力,可能与不同菌株对不同宿主细胞的敏感性不同有关<sup>[23]</sup>。Moumita 等<sup>[24]</sup>选用 3 种发根农杆菌菌株(ATCC15834、A4、LBA9402)以及 2 种外植体种类(叶片和茎段)对紫花丹进行毛状根诱导,结果表明 ATCC15834 侵染叶片诱导的毛状根出现时间最

早、转化频率最高。发根农杆菌 Ri 质粒 T-DNA 片段上 Vir 区编码的产物肩负接收外界信号、加工 T-DNA、转移及整合等功能,因此,不同 Ri 质粒类型决定发根农杆菌不同的致根能力。王跃华等<sup>[25]</sup>选用 A4、R1601、ATCC15834、R1000 对川黄柏的毛状根研究表明 ATCC15834 致根效果最好。Wu<sup>[26]</sup>在对杜仲无菌真叶毛状根诱导的研究中发现,所选的 5 种菌株 LBA9402 诱导率最高为 100%,ATCC15834 次之为 80%,其次是 ATCC39207、ATCC31798,而 ATCC11325 最低为 0。本研究选用的 4 种发根农杆菌 A4、ATCC15834、LBA 9402、R1601 均是农杆菌型菌株,致根能力最强,是建立发根培养体系的首选菌株<sup>[27]</sup>,结果也表明对于朱砂根无菌幼叶而言,4 种菌株均能侵染,但致根能力不同,最有效的是菌株 ATCC15834。

### 3.3 毛状根的形态为非典型毛状根

本研究中所获得的毛状根均无根毛,为非典型毛状根,这与李想韵等<sup>[28]</sup>获得的桑树毛状根形态相一致。发根农杆菌侵染植物诱导的毛状根存在很大的异质性,究其原因最可能是 Ri 质粒上的 T-DNA 片段转移整合到植物细胞核基因组中是随机的,T-DNA 片段整合到同一条染色体的不同位点上或者不同染色体上,产生的发根的性状都会不同,可能只有其中一种或几种整合方式能够表现出符合我们需要的性状。

乙酰丁香酮、光照、蔗糖浓度、外源激素等都会影响毛状根诱导。例如乙酰丁香酮是农杆菌毒性基因的酚类诱导剂之一。添加此化学试剂,发现可提高根癌农杆菌对拟南芥和颠茄的转化率<sup>[29-30]</sup>。研究显示,乙酰丁香酮对发根农杆菌介导转化胡萝卜<sup>[31]</sup>有促进作用。因此研究过程中加入适量的乙酰丁香酮有助于提高发根的诱导率。

本研究首次对园林观赏药用植物朱砂根进行毛状根诱导,选用的培养基、预培养及共培养时间、侵染方式、发根农杆菌菌株等是适合朱砂根叶片毛状根诱导的。本试验虽成功诱导了毛状根,但是从数量和质量上都有待提高,且很多介导因素还需更加完善,尤其是发根继代和增殖培养。要想使朱砂根的遗传转化研究取得长足发展,达到理想的转化水平,需进一步从相关因素着手分析原因,优化毛状根离体培养,从而去探寻新的生物视野。

## 参考文献:

- [1] 江香梅. 富贵籽 *Ardisia crenata* Sims[J]. 江西林业科技, 2003, (4): 58.  
JIANG X M. *Ardisia crenata* Sims[J]. *Jiangxi Forestry Science and Technology*, 2003, (4): 58.
- [2] 吴克智. 富贵籽管理措施[J]. 中国花卉园艺, 2001, (12): 18-19.  
WU K Z. Management and implementation of *Ardisia crenata* Sims[J]. *China Flowers & Horticulture*, 2001, (12): 19-20.
- [3] 张金锋. 优良的室内常绿木本观果花卉——富贵籽[J]. 西南园艺, 2006, **34**(1): 44-49.  
ZHANG J F. Excellent indoor evergreen woody viewing fruit flower——*Ardisia crenata* Sims[J]. *Southwest Horticulture*, 2006, **34**(1): 44-49.
- [4] 邓素芳, 黄 焱, 赖钟雄, 等. 朱砂根的药用价值与观赏价值[J]. 亚热带农业研究, 2006, **2**(3): 176-178.  
DENG S F, HUANG X, LAI Z X, *et al.* Progress in them edicinal and ornamental values of *Ardisia crenata* Sims[J]. *Sub-tropical Agriculture Research*, 2006, **2**(3): 176-178.
- [5] 刘 姝, 李 颖, 郭济贤, 等. 中国紫金牛属的分类及其岩白菜素的含量[J]. 上海医科大学学报, 1993, **20**(1): 49-53.  
LIU N, LI Y, GUO J X, *et al.* Studies on the taxonomy of the genus *Ardisia* (Myrsinaceae) form China and the occurrence and quantity of bergenin in the genus[J]. *Acta Academiae Medicinae Shanghai*, 1993, **20**(1): 49-53.
- [6] 靳志娟. 紫金牛属植物化学成分和药理作用的研究进展[J]. 实用医技杂志, 2008, **15**(25): 3 432- 3 436.  
JIN Z J. Development of chemical and pharmacological of *Ardisia* [J]. *Journal of Practical Medical Techniques*, 2008, **15**(25): 3 432-3 436.
- [7] ZHANG P C, ZHENG C F, WU C S, *et al.* Mass spectral fragmentation analysis of triterpene saponins from *Ardisia crenata* Sims by electrospray ionization Fourier transformion cyclotron resonance mass spectrometry[J]. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 2010, **12**(1): 64-69.
- [8] 张 伟, 李 锐, 李 东, 等. 朱砂根化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, **17**(11): 279-282.  
ZHANG W, LI K, LI D, *et al.* Development of chemical and pharmacological of *Ardisia crenata* [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2011, **17**(11): 279-282.
- [9] JUNG A K, KWANG H B, YOUNG M S, *et al.* Hairy root cultures of *Taxus cuspidate* for enhanced production of paclitaxel [J]. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 2009, **52**(2): 144-150.
- [10] 王 伟, 陆 扬, 李 礼, 等. 喜树毛状根的诱导及其喜树碱含量分析[J]. 西北植物学报, 2008, **28**(12): 2 416-2 422.  
WANG W, LU Y, LI L, *et al.* Induction of hairy roots from *Camptotheca acuminata* and the content of camptothecin[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*, 2008, **28**(12): 2 416-2 422.
- [11] 刘树楠, 孙天恩, 李根保. 银杏发根的转化及其悬浮培养无性系的建立[J]. 武汉大学学报·自然科学版, 1998, **44**(4): 238-240.  
LIU S N, SUN T E, LI G B. Transformation of Ginkgo hairy root and establishment of its suspension culture clone [J]. *Journal of Wuhan University (Nat. Sci. Edi.)*, 1998, **44**(4): 238-240.
- [12] 杨 蕊, 张家辉, 孙雪梅, 等. 杜仲毛状根培养条件优化及其桃叶珊瑚苷药用成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2009, **34**(15): 1 902-1 905.  
YANG R, ZHANG J H, SUN X M, *et al.* Hairy root culture optimization and aucubin medical composition production of *Eucommia ulmoides* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2009, **34**(15): 1 902-1 905.
- [13] 黄素梅, 石丸幹二. 乌柏毛状根培养与次生代谢产物累积研究[J]. 北方园艺, 2011, (22): 103-105.  
HUANG S M, ISHIMARU K. Study on cultivating the hairy roots of *Sapium sebiferum* and its second metabolites accumulation[J]. *Northern Horticulture*, 2011, (22): 103-105.
- [14] KOIKE K, JIA Z H, OHURA S, *et al.* Minor triterpenoid saponins from *Ardisia crenata* [J]. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1999, **47**: 434-435.
- [15] CHILTON M D, TEPFER D A, PETIT A, *et al.* Agrobacterium rhizogenes inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells[J]. *Nature*, 1982, **295**: 432.
- [16] 马明东, 刘均利, 蒲尚饶. 朱砂根的组织培养与植株再生[J]. 中国中药杂志, 2009, **34**(16): 2 043-2 046.  
MA M D, LIU J L, PU S R. Tissue culture and plant regeneration of *Ardisia crenata* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2009, **34**(16): 2 043-2 046.
- [17] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 16-17.
- [18] 于树宏, 刘传飞, 李 玲, 等. 野葛毛状根离体培养与异黄酮生产[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2002, **28**(4): 281-286.  
YU S H, LIU C F, LI L. Pueraria lobata hairy root culture in vitro and isoflavone production[J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2002, **28**(4): 281-286.
- [19] 陈永芳, 芦韦华, 王 芳, 等. 新疆紫草毛状根的诱导及培养[J]. 西北植物学报, 2008, **28**(12): 2 423-2 428.  
CHEN Y F, LU W H, WANG F, *et al.* Induction and culture of hairy roots from *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*, 2008, **28**(12): 2 423-2 428.
- [20] 郭生虎, 王敬东, 马洪爱. 乌拉尔甘草毛状根的诱导及培养体系的建立[J]. 西北农业学报, 2012, **21**(12): 138-141, 157.  
GUO S H, WANG J D, MA H A. Inducement of hairy roots and establishment of culture system in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch [J]. *Acta Agriculturae Boreal-Occidentalis Sinica*, 2012, **21**(12): 138-141, 157.
- [21] 王 丽, 刘 琪, 宁明明, 等. 龙葵毛状根诱导条件的研究[J]. 北方园艺, 2015, (4): 107-111.  
WANG L, LIU Q, *et al.* Study on inducing hairy roots of *Solanum nigrum* L. [J]. *Northern Horticulture*, 2015, (4): 107-111.
- [22] 于艳丽, 王 忆, 韩振海, 等. 发根农杆菌介导转化小金海菜的影响因素[J]. 核农学报, 2008, **22**(5): 621-625.  
YU Y L, WANG Y, HAN Z H, *et al.* Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of *Malus xiaojinensis* Cheng et Jiang [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Science*, 2008, **22**(5): 621-625.



- [23] DREWES F E, STADEN J V. Initiation of and solasodine production in hairy root cultures of *Solanum mauritianum* Scop [J]. *Plant Growth Regul.*, 1995, **17**(1): 27-31.
- [24] MOUMITA G, SAIKAT D, SOMNATH B, *et al.* Effect of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* and nature of explants on *Plumbago indica* hairy root culture with special emphasis on root biomass and plumbagin production[J]. *Natural Product Communications*, 2010, **5**(12): 1 913-1 916.
- [25] 王跃华, 苟小军, 吴洁, 等. 川黄柏毛状根的诱导及活性成分的产生[J]. 中国中药杂志, 2006, **31**(22): 1 853-1 856.  
WANG Y H, GOU X J, WU J, *et al.* Hairy roots induction of *Phellodendron chinense* and production of its active constituents[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2006, **31**(22): 1 853-1 856.
- [26] XIAO J W. Establishment and chemical analysis of hairy roots of *Eucommia ulmoides*[D]. USA: Louisiana State University, 2007.
- [27] SEVÖN, OKSMAN C KM. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids[J]. *Planta Medica*, 2002, **68**(10): 859-868.
- [28] 李想韵, 朱鸿, 孙一铭, 等. 桑遗传转化体系的建立及槲皮素合成的研究[J]. 中国中药杂志, 2010, **35**(11): 1 391-1 394.  
LI X Y, ZHU H, SUN Y M, *et al.* Establishment of transformation system in mulberry and biosynthesis of quercetin[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2010, **35**(11): 1 391-1 394.
- [29] SHEIKHOLESLAM S N, WEEKS D P. Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Plant Molecular Biology*, 1987, **8**(8): 291-298.
- [30] MATHEWS H, BHARATHAN N, LITZ R E, *et al.* The promotion of *Agrobacterium* mediated transformation in *Atropa belladonna* L. by acetosyringone[J]. *Journal of Plant Physiology*, 1990, **136**(4): 404-409.
- [31] MARIMUTHU S, KRISHNAMURHTY K, KARUNANANDHAM K, *et al.* Influence of acetosyringone concentration on induction of carrot hairy root by *Agrobacterium rhizogenes* [J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2014, **8**(26): 2 486-2 491.

(编辑: 宋亚珍)

## 封面植物介绍——陕西羽叶报春

陕西羽叶报春(*Primula filchnerae* Knuth)隶属于报春花科报春花属, 一年生草本, 株高 8~40 cm, 全株被多细胞柔毛。地上茎短或者近于无, 须根少数或多数。叶多枚簇生, 叶片卵形或卵状披针形, 带叶柄长 3.5~15 cm, 宽 2~5 cm, 先端圆钝, 羽状全裂, 羽片 3~4 对, 长 8~25 mm, 小裂片再不整齐浅裂; 裂片两面均密生灰白色短茸毛; 叶柄长 2.5~5.5 cm, 被腺毛, 基部宽扁。花葶高 8~40 cm, 常 1~多数自叶丛中抽出, 中空, 外被银白色粗腺毛。伞形花序具 3~10(~12)花, 花梗长 1.5~2.5 cm; 苞片线状披针形, 长 8~10 mm; 花萼圆锥状, 长 5~10 mm, 外被粗毛, 宽约 4 mm, 先端 5~6 裂, 裂片披针形, 果期增大成圆锥状钟形; 花冠初开时为紫色, 开放后为粉红色, 冠檐直径 1.5~2.5 cm, 下部呈管状, 管部长 5~8 mm, 冠筒长于花萼约 1/4; 上部花冠于花萼外 5 深裂, 裂片倒心形, 每裂片先端再 2 浅裂, 裂片先端圆, 粉红并略带蓝紫色, 裂片基部有倒心形先为橘黄色后渐变为紫红色的彩斑。花柱异长, 长花柱花: 雄蕊着生于冠筒近中部, 花丝短或者近无; 花药黄色; 花柱长约 6~8 mm, 柱头略高于筒口; 短花柱花: 雄蕊常生于近花冠裂口处内侧; 花柱内藏于花冠筒下部, 长 4~5 mm, 柱头圆形, 绿色。子房球状, 胚珠多数, 特立中央胎座。蒴果球形, 外果皮膜质, 成熟后不裂或者顶裂; 种子圆球状, 直径 1.5 mm, 成熟后黑褐色, 有皱纹。花期 2~4 月, 果期 3~5 月。

陕西羽叶报春为中国特有物种, 陕西省地方重点保护植物。一般生于海拔 900~1 000 m 天然次生落叶阔叶林下、湿润且多砂石土壤上。分布地较为狭窄, 自 1904 年 2 月德国植物学家 W. Filchner 在陕西南部的秦岭山区采到模式标本后, 百余年来再未见到存活的植物。2006 年在湖北省重新发现, 2015 年 3 月在陕西省也被重新发现。

(图文由陕西师范大学生命科学学院 张建强提供)