

## 发根农杆菌转化三倍体毛白杨

刘兴菊<sup>1</sup>, 刘英巨<sup>2</sup>, 梁海永<sup>1</sup>, 杨敏生<sup>1</sup>, 周怀军<sup>1</sup>

(1. 河北农业大学 林学院 河北 保定 071000; 2. 天津市津南区农林局 天津 300350)

**摘要:** 分别用发根农杆菌 30148, ATCC15834 和 ZALF3 种菌株感染三倍体毛白杨叶外植体, 获得毛状根。建立三倍体毛白杨毛状根离体培养系统, 在含不同激素的培养基上诱导毛状根再生植株。利用 PCR 方法分别对转化再生植株 rolC, rolD, 及 mas 基因进行了检测, 表明 Ri 质粒的 T-DNA 已整合进再生植株中。

**关键词:** 发根农杆菌; 三倍体毛白杨; 毛状根; PCR 检测

**中图分类号:** S731.5      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1001-7461(2006)01-0076-04

By *Agrobacterium rhizogenes* transformation of Triploid White Poplar  
[(*Populus tomentosa* × *P. alba* L. var. *pyramidalis* Bge.) × *P. tomentosa*]

LIU Xing-ju<sup>1</sup>, LIU Ying-gen<sup>2</sup>, LIANG Hai-yong<sup>1</sup>, YANG Min-sheng<sup>1</sup>, ZHOU Huai-jun<sup>1</sup>

(Forestry College, Agricultural University of Hebei, BaoDing, 071000, China)

**Abstract:** Hairy roots were obtained by using 3 bacterial strains, *Agrobacterium rhizogenes* 30148, ATCC15834 and ZALF to infect the leaf explants triploid white poplar [(*Populus tomentosa* × *P. alba* L. var. *pyramidalis* Bge.) × *P. tomentosa*]. A culture system for hairy root in vitro was established, and regenerated plants were induced in the culture medium with different concentrations of hormone. PCR identification method was used on transplant's rolC, rolD, and mas gene, the results indicate T-DNA of Ri plasmid had already been combined into the transplant.

**Key words:** *Agrobacterium rhizogenes*; triploid white poplar; hairy root; PCR identification

自从 Ackermann 于 1973 年<sup>[1]</sup>第一例成功地用发根农杆菌转化了高等植物以来, 植物遗传转化研究进展十分迅速。在迄今发展起来的转基因技术中, 农杆菌介导的遗传转换仍占主导地位。根瘤农杆菌在上个世纪初就引起了科学家们的注意, 目前对根瘤农杆菌的 Ti 质粒的结构, 功能及转化过程有了比较清楚地了解, 对 Ti 质粒经人工改造也已构建出了一批重要的人工载体。对发根农杆菌的 Ri 质粒的研究要相对滞后<sup>[2]</sup>。目前只有百余种植物感染 Ri 质粒后产生毛状根, 其中有些植物已获得了转化植株<sup>[3]</sup>, 这主要是一些药用植物, 如人参、木樨、黄芪等<sup>[4]</sup>。三倍体毛白杨是一种人工培育的速生树种, 具有很强的速生性, 但它还有明显的缺点, 如扦插成活率低。通过发根农杆菌的转化, 可望提高其扦插生根率<sup>[5]</sup>, 并由于 rol 基因的转入也会引起植株株形及生长的

变化<sup>[4,6]</sup>。以期获得对生产更有利的优良三倍体毛白杨无性系。本研究是利用发根农杆菌 15834, ZALF, 30148 对其三倍体毛白杨进行转化, 从而为该植物进一步的细胞遗传操作奠定了基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 菌株及其培养

发根农杆菌 15834, ZALF, 30148 菌株由德国林业研究所 Eward 教授惠赠。—70℃ 保存在灭菌甘油中, 临用前于 YEB 固体培养基、28℃ 活化 3 次。在超净工作台上, 从 YEB 培养平板上挑取单细胞克隆菌落, 接种于不含抗生素的液体 YEB 培养基中, 在 28℃ 条件下的恒温床振荡 16~20 h。用于感染。

#### 1.2 外植体及其转化

植物材料三倍体毛白杨取自本实验室无菌组培

苗,取一月龄三倍体毛白杨无菌苗真叶,用眼科手术剪沿叶缘横向剪三刀,剪断中脉。将无菌叶片,放在菌液中浸泡 5~10 min,用无菌滤纸吸去多余菌液。接种于 MS0 培养基(不添加任何激素的 MS 培养基<sup>[7]</sup>)中培养,共培养 48 h。培养 2 d 后,将叶片接在 MS0+200~500 mg·L<sup>-1</sup>羧苄青霉素的培养基中培养。诱导毛状根的发生。

上述过程均须在无菌条件下进行。每种菌株浸染叶片 80~100 个叶片。两周后叶片伤口长出毛状根,待毛状根长到 2 cm 以上时诱导植株再生。

1.3 毛状根再生植株

由毛状根剪取长 3 cm 左右的根段,置于添加有不同配比的苄氨基腺嘌呤(BA)或 TDZ 和 α-萘乙酸(NAA)的 MS 培养基上诱导不定芽,每个处理组 20 个根尖。当不定芽长至 1~2 cm 时,将其剪下,移至 MS0 培养基中生根。

1.4 转化植株的 PCR 检测

再生植株的 DNA 提取采用 CTAB 法,根据 GENE BANK 中 Ri 质粒的基因序列设计了三对引物,分别检测 rolC, rolD, 及 MAS 基因。反应总体积为 20 μL,其中 10×PCR 缓冲液 2 μL, dNTP (25 mmol·L<sup>-1</sup>) 1 μL, 前末端引物 (10 pmol·μL<sup>-1</sup>) 各 1 μL, Tag 酶 1 U, 模板 1 μL, 用无菌水补足到 20 μL, 同时设置从农杆菌中提取的质粒为阳性对照, 未转基因的三倍体毛白杨为阴性对照。实验仪器使用 Biometor T1 型 PCR 基因扩增仪, 反应程序为: 94℃ 预变性 5 min。95℃ 变性 1 min→52℃ 退火 1 min→72℃ 延伸 1 min 20 s, 30 个循环。最后 72℃ 延伸 7 min。反应结束取 10 μL PCR 扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳分析, 恒流 90 mA, 指示剂电泳到凝胶前沿停止。溴化乙锭染色 10 min, 紫外灯下观察拍照。

引物序列分别为: rolD 基因引物 R: 5'(-CAG CTT CTA AAT GTG GTG GAG GCC-3' F: 5'-CCT TGC CGA TTG CCA GTA TGG C-3'

MAS 基因引物 R: 5'-CGG TCT AAA TGA AAC CGG CAA ACG-3' F: 5'-GGC AGA TGT CTA TCG CTC GCA CTC C-3'

rolC 基因引物 R: 5'-ACA AGC CAC TTC TGT TTC CC-3' F: 5'-CAG CGA CTG CAA CCA GTT TA-3'

2 结果与分析

2.1 不同菌株对三倍体毛白杨叶片的转化的影响

发根农杆菌通过伤口侵染植物, Ri 质粒上的 T-DNA 能插入植物基因组, 其上所携带的基因在宿主细胞中整合表达, 使植物产生毛状根。TR-DNA

上带有编码农杆菌碱合成酶基因(ags)和生长素合成酶基因(tms1 和 tms2), 因此转化产生的毛状根是激素自养型的<sup>[6]</sup>。在转化过程中, 诱导叶片产生毛根时, 直接采用 MS0 培养基而无需添加任何激素。培养经转化共培养后的叶片, 在含 500 mg·L<sup>-1</sup>羧苄青霉素的培养基上培养。农杆菌 15834 浸染的叶片转接 6 d 后出现第一个毛状根, 30148 浸染的 10 d 后出现第一个毛状根, ZALF 浸染的叶片转接 15 d 后出现第一个毛状根。发生频率 3 种菌株间有明显差异, 15834 诱导毛根的频率最高, 其次为 ZALF 与 30148。而未经转化的对照叶片均无毛状根产生(表 1)。发现叶片的切口处诱导产生的毛状根生长无向地性, 毛根伸长生长比较旺盛, 并且具有典型叉状根现象。

表 1 发根农杆菌诱导三倍体白杨叶片产生不定根的数量与频率

Table 1 Number and frequencies of *Agrobacterium rhizogenes* induced hairy roots from the triploid white poplar leaves

菌株	接种外植体数目	产生毛根外植体数目	产生毛根的时间/d	诱导毛根的频率/%
15834	100	42	6	42.0
30148	100	31	10	31.0
ZALF	80	36	15	45.0
CK (YEB 培养基)	80	0	—	0

2.2 毛状根进一步培养

由于每条毛根起源于一个细胞, 因而由同一条毛根诱导获得的再生植物也应该起源于一个细胞系。将毛状根剪成 1 cm 左右的根段, 转入含 250 mg·L<sup>-1</sup>羧苄青霉素的培养基上继续培养 3 周以后, 所有培养基上的毛状根表现为无限生长的特点。K1 培养基上长势迅速, 而在 K4 培养基上的毛状根上表现为 43% 的出愈率(表 2)。

表 2 不同培养基对毛状根生长的影响

Table 2 Effects of different culture medium on the growth of hairy roots grow

培养基	添加激素	出愈率/%	根长度/cm
K1	0	0	15.5±4.2
K2	6-BA0.5+NAA0.1	18	10.3±3.8
K3	6-BA1.0+NAA0.1	25	9.0±2.9
K4	6-BA2.0+NAA0.1	43	5.8±2.2
K5	6-BA3.0+NAA0.1	30	3.4±1.7

2.3 毛状根诱导植株再生

由表 3 可看出, TDZ 对诱导毛状根的植株再生效果最好, 它与 NAA 配合使用均能诱导再生不定芽; 但是由 TDZ 诱导不定芽产生时, 一般毛状根首先愈伤化, 再从愈伤组织上产生不定芽。毛状根在含

BA 的培养基上培养,20 d 后开始有毛状根变绿、变粗,1 个月后可直接产生不定芽,没有经过愈伤组织阶段。但是再生频率较低。将不定芽移到生根培养基上培养,获得再生植株,再生植株同正常植株相比,根系普遍生长迅速、多根毛、多分枝、主根不明显,侧根极其发达,在生长到 20 d 左右时,根系条数多得无法计数。在所有转化再生植株中,大部分表现出叶片皱缩,大约占总数的 80%左右。其余植株同正常植株无明显差别。

表 3 不同培养基对毛状根诱导不定芽的作用

Table 3 Effects of different culture medium on the adventitious bud induced from hairy roots

培养基编号	添加激素	不定芽诱导频率%
T1	6-BA1.0+NAA0.1	20
T2	6-BA2.0+NAA0.1	15
T3	6-BA3.0+NAA0.1	6
T4	TDZ0.1+NAA1.0	83
T5	TDZ0.05+NAA0.5	65
T6	0	0

万方数据

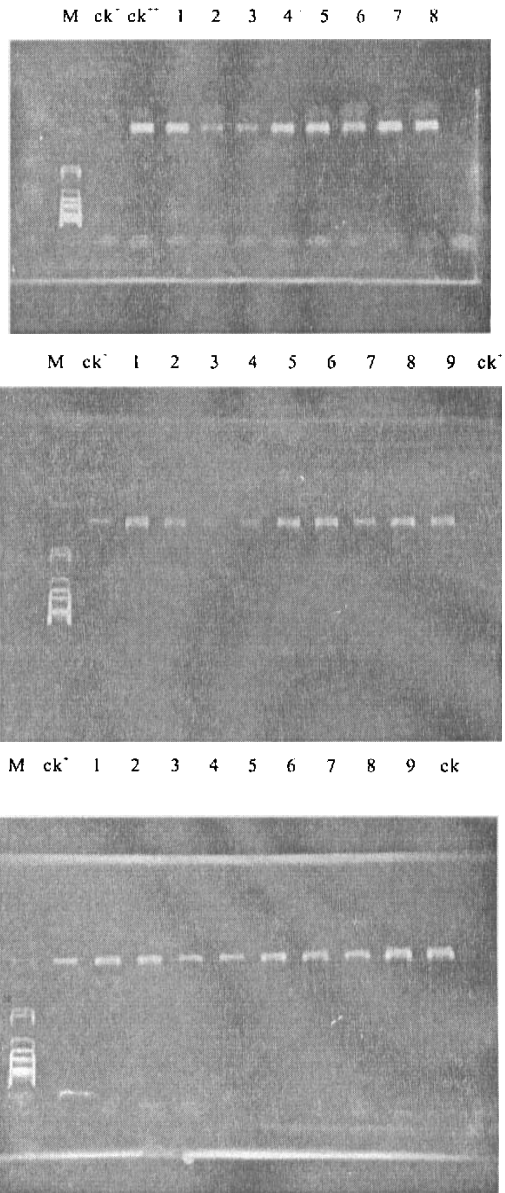
3 PCR 检测结果

转化植株通常由于 TL-DNA 基因群的作用,常表现为叶皱缩、节间短、不定根多等形态特征。但实验中发现有部分转化植株并未表现出上述现象,所以通过表型无法看出 Ri 质粒的 T-DNA 是否转入到植物基因组中。通过提取植物总 DNA,采用 PCR 的方法,分别检测 T-DNA 区上的 rolC, rolD, 及 MAS 基因。如果 3 个基因均存在于植物基因组中,即可证明 Ri 质粒 T-DNA 已整合到植物体内。为避免假阳性的出现,采用了多次重复及三对不同引物的方法。3 个电泳图(图 1)可以看出转化植株的 DNA 经过 PCR 扩增分别扩增出与质粒 DNA 相同的 496 bp,970 bp,564 bp 的目的片断。证明转化植株的 DNA 中,含有与农杆菌相同的基因片断,可证明外源基因已整合到植物的基因组中。

4 讨论

试验采用 3 种发根农杆菌,即 15834,30148,ZALF。在相同条件下感染三倍体毛白杨的叶片。从产生毛根的频率来看 3 种发根农杆菌菌株间有明显差异,15834 诱导毛根的频率最高,其次为 ZALF 与 30148。。因此,发根农杆菌株系与寄主植物之间的相互作用是决定发根诱导率的主要因素。在许多根癌农杆菌转化植物细胞体系中都得到了验证<sup>[8,9]</sup>。故在建立一个新的转化体系时,有必要用多个发根农杆

菌株系进行试验,以便选择较适宜的菌株系。



M:ADNA-HindIII Marker; CK-;未转基因植株; CK+;Ri 质粒阳性对照; 1、2、3~9 为转基因植株。

图 1 转化植株的 PCR 检测结果

Fig. 1 PCR test in transformed plants

经发根农杆菌转化 2-3 周后的三倍体毛白杨叶片就能发现在转化外植体的伤口部位产生无向地性的毛状根,而对照未见此现象。将毛状根剪碎进一步在培养基上培养 3 周以后,培养基上的毛状根有自主无限生长的特点。与报道的发根农杆菌感染后毛状根的生长特点相似<sup>[10]</sup>。在毛状根继代培养过程中,根系在 K1~K5 系列培养基中均可正常生长。但随 6-BA 浓度的增加根系的伸长则有很大差异。在

毛状根诱导不定芽的过程中,TDZ的添加能够显著提高根系诱导不定芽发生的频率,这可能由于根系内的生长素水平较高,而TDZ则比6-BA有更高的细胞分裂素活性,有利于根系的愈伤化及诱发不定芽的产生。这也说明植物激素在毛状根的植株再生过程中起着关键的作用。

#### 参考文献:

- [1] Ackermann C. Pflanzen Aus., *Agrobacterium rhizogenes* tumorenan *Nicotiana tabacum*[J]. Plant Sci. Lett., 1977, 8: 23-30.
- [2] 张毅,沈文辉. 植物基因工程新载体—农杆菌 Ri 质粒[J]. 生物工程学报, 1989, 5(3): 173-178.
- [3] 曹冬梅,韩振海,许雪峰. 发根农杆菌 Ri 质粒研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(2): 74-78.
- [4] 芮和恺. 药用植物毛状根的研究与应用[J]. 自然杂志, 1997, 19(1): 23-26.
- [5] 郑均宝,王峰,刘群录,等. 毛白杨转基因植株的研究[J]. 林业科学, 1995, 31(2): 181-184.
- [6] 李永芳,周延清. 发根农杆菌及其应用[J]. 生命科学杂志, 2000, 17(6): 29-30.
- [7] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures[J]. Physiol Plant, 1962, 15(4): 473~479.
- [8] Slightom JL, Durand-Tardif M, Jouanin L et al. Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid[J]. J Biol Chem. 1986, 261: 108-121.
- [9] Godwin I, Todd G, Ford-Lloyd B et al. The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium* mediated transformation vary according to plant species[J]. Plant Cell Rep. 1991, 9: 671-675.
- [10] 林荣呈,陈龙清,包满珠,等. 提高根瘤农杆菌介导的香石竹遗传转化效率的研究[J]. 林业科学研究, 2003, 16(2): 123-128.

## 欢迎订阅 2006 年《武汉植物学研究》

### 万方数据

《武汉植物学研究》为科学出版社出版、国内外公开发行的植物学综合性学术期刊(学报级)。主要报道植物学及各分支学科的基础研究和应用研究方面具创新性、有重要意义的最新研究成果,植物学研究的新技术、新方法等。栏目设置有:研究论文、技术与方法、综合评述、研究简报、学术讨论、重要书刊评介、学术动态等。主要读者对象为:从事植物学研究的科技人员、大专院校师生,以及相关学科,包括农、林、牧、医药、轻工、水产和环保等方面的工作者。

本刊为中国科技核心期刊、中国中文核心期刊,被中国科技论文与引文数据库(CSTPCD)、中国科学引文数据库(CSCD)、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)等十多种国内外检索期刊、数据库作为核心期刊或统计源期刊收录。本刊曾获湖北省优秀科技期刊奖、全国优秀科技期刊奖、中国科学院优秀期刊奖。

本刊为双月刊,大16开,双月末出版。国内定价15.00元,全年90.00元。邮发代号38-103,全国各地邮局均可订阅。如漏订,本刊编辑部可办理邮购。

编辑部地址:武汉市武昌磨山中科院武汉植物园内(或武汉市74006信箱);邮政编码:430074;电话:027-87510755;E-mail:editor@rose.whiob.ac.cn