

## • 农业生物技术 •

## 美洲商陆毛状根诱导及其离体培养的影响因素

施和平<sup>1</sup>, 朱远锋<sup>1</sup>, 曾宝强<sup>2</sup>, 周卓辉<sup>2</sup>, 余震傲<sup>1</sup>, 黄胜琴<sup>1</sup>

1 华南师范大学生命科学学院 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广东 广州 510631

2 香港教育学院 科学与环境学系, 香港 新界

施和平, 朱远锋, 曾宝强, 等. 美洲商陆毛状根诱导及其离体培养的影响因素. 生物工程学报, 2017, 33(2): 272–283.

Shi HP, Zhu YF, Tsang PKE, et al. Factors influencing induction and *in vitro* culture of hairy roots in *Phytolacca americana* L. Chin J Biotech, 2017, 33(2): 272–283.

**摘 要:** 为了探讨利用美洲商陆毛状根生产其药用成分的可能性, 研究了美洲商陆毛状根诱导及其离体培养的影响因素。结果表明, 美洲商陆叶片外植体被发根农杆菌 ATCC 15834 感染约 18 d 后, 从其叶片外植体形态学下端叶脉切口处产生毛状根, 其中以预培养 1 d, 农杆菌感染 20 min, 共培养 4 d 时的毛状根诱导率最高, 达到 70%。PCR 扩增和硅胶薄层层析结果显示, 发根农杆菌 Ri 质粒的 *rolC* 基因以及冠瘿碱合成酶基因已在美洲商陆毛状根基因组中整合和表达。所获得的美洲商陆毛状根系都能在无外源激素的 MS 固体培养基上快速自主生长; 其中以毛状根根系 2 的生长速度最快、分生侧根能力最强和根表面的根毛密度最高; 毛状根根表面呈紫红色或呈白色。在供试的 MS、1/2MS、B5 和 6,7-V 液体培养基中, 以无外源激素的 MS 培养基最适合美洲商陆毛状根根系生长。与无外源激素的 MS 培养基相比, 6,7-V 培养基更有利于毛状根中商陆皂苷甲的合成与积累。本文所建立的美洲商陆毛状根诱导及其离体培养的适宜条件为今后利用其毛状根株系的规模培养来生产其药用有效成分商陆皂苷甲奠定了实验和技术基础。

**关键词:** 美洲商陆, 发根农杆菌, 毛状根, 商陆皂苷甲

**Received:** September 15, 2016; **Accepted:** November 30, 2016

**Supported by:** Committee of Science and Technology in Guangdong Province, China (No. 2011B020304006).

**Corresponding authors:** Heping Shi. Tel: +86-20-85214793; E-mail: shihp@scnu.edu.cn

广东省科技计划项目 (No. 2011B020304006) 资助。

# Factors influencing induction and *in vitro* culture of hairy roots in *Phytolacca americana* L.

Heping Shi<sup>1</sup>, Yuanfeng Zhu<sup>1</sup>, Po Keung Eric Tsang<sup>2</sup>, Cheuk Fai Stephen Chow<sup>2</sup>, Zhen'ao Yu<sup>1</sup>, and Shengqin Huang<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, Guangdong, China

<sup>2</sup> Department of Science and Environmental Studies, the Hong Kong Institute of Education, New Territories, Hong Kong, China

**Abstract:** To use hairy roots for producing medicinal ingredients of *Phytolacca americana* L. we studied the factors influencing the induction and *in vitro* culture. Hairy roots could be incited from the veins of cut surface (morphological lower) of *P. americana* L. leaf explants around 18 days after infection with the strain of *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834. The highest rooting rate, 70%, was obtained when leaf explants were pre-cultured for 1 day, infected for 20 min, and co-cultured for 4 days. The transformation was confirmed by PCR amplification of *rolC* of Ri plasmid and silica gel thin-layer chromatography of opines from *P. americana* L. hairy roots. All the hairy root lines could grow rapidly on solid exogenous phytohormone-free MS medium. Among the 9 hairy root lines, the hairy root line 2 had most rapid growth, most branched lateral roots and most intensive root hair; the root surface of some hairy root lines seemed purple or red, while that of the other hairy root line appeared white. Among liquid media MS, 1/2MS, B5 and 6,7-V tested, the best growth for hairy root lines was attained in liquid exogenous phytohormone-free MS medium. Compared with exogenous phytohormone-free MS medium, 6,7-V medium was better for synthesis and accumulation of esculetin side A in hairy roots. The established optimal conditions for induction and *in vitro* culture of *P. americana* hairy roots had laid an experimental and technological foundation for production of medicinal constituents esculetin side A from large scale culture of hairy roots.

**Keywords:** *Phytolacca americana* L., *Agrobacterium rhizogenes*, hairy roots, esculetin side A

毛状根 (Hairy root) 是由发根农杆菌 *Agrobacterium rhizogenes* 感染植物细胞后, 其 Ri 质粒 (Root inducing plasmid, Ri plasmid) 的 T-DNA 片段在植物细胞核基因组中插入、整合与稳定表达的结果<sup>[1]</sup>。到目前为止, 虽然有较多药用植物和园艺植物通过发根农杆菌遗传转化产生了可自主生长毛状根<sup>[2-3]</sup>, 但对某一种发根农杆菌而言, 如何提高其 Ri 质粒对植物细胞的致根效率以及拓宽其寄主范围, 一直是植物遗传转化中亟待解决的问题。一些研究表明, 在发根农杆菌与植物细胞双向作用产生毛状根的复杂过程中, 能否产生毛状根, 不仅取决于发根农杆

菌菌株本身的致病力外, 还与感染部位、外植体预培养时间、极性和乙酰丁香酮浓度等生理因素密切相关<sup>[4-5]</sup>。美洲商陆 *Phytolacca americana* L., 又名垂絮商陆, 是一种以根入药的传统中药。其根部药用成分商陆皂苷甲具有免疫调节<sup>[6]</sup>、抗炎<sup>[7]</sup>等多种药效。但目前其生药来源仍主要靠挖掘野生资源为主。由于野生资源极其有限, 挖掘野生资源又易造成水土流失, 破坏环境; 而人工栽培又因生产周期太长, 因而很难满足制药工业的市场需求。而利用发根农杆菌遗传转化产生的可自主快速生长的美洲商陆毛状根来生产其药用有效成分, 无疑是一条合理可行的

可持续的生物技术途径。本文报道发根农杆菌对美洲商陆的遗传转化以及有关毛状根产生及其离体培养的影响因素, 以期为今后利用其毛状根的规模培养来产生其次生物质商陆皂苷等奠定实验技术基础和提供可能性。

## 1 材料与方法

### 1.1 细菌菌株及其活化培养

含野生农杆菌型 Ri 质粒的发根农杆菌 *A. rhizogenes* ATCC15834, 由德国马丁·路德大学药物生物学院 Peter Lindemann 博士提供。挑取其单菌落接种于液体 YEB 培养基中, 于 160 r/min、28 °C 暗培养 30 h 后, 供感染用。

### 1.2 毛状根的诱导及其影响因素

取温室盆栽的美洲商陆 *P. americana* L. 植株的幼嫩叶片, 用 0.1% 升汞消毒灭菌 8–10 min, 无菌水漂洗 4–5 次后, 切成 1–2 cm<sup>2</sup> 左右叶片外植体后, 用于转化。为了探讨发根农杆菌诱导美洲商陆叶片外植体产生毛状根的适宜条件, 研究了外植体预培养 0–4 d 和共培养 2–4 d 等因素对叶片外植体产生毛状根的影响 (图 2 和图 3)。将未预培养或预培养 1–4 d 的叶片外植体浸入用 MS<sup>[8]</sup> 培养基稀释 2 倍的发根农杆菌 ATCC15834 菌悬液中 20 min, 取出、吸干多余菌液并放回原培养基上共培养 2–4 d 后, 转入 MS+500 mg/L 头孢噻肟钠 (Cefotaxime sodium) 的无外源激素的 MS 培养基上, 在 25 °C 每天 14 h 散射光下诱导毛状根。切取从叶片外植体产生的毛状根置于含 500 mg/L 头孢噻肟钠的无外源激素的 MS 培养基上进行单根除菌培养, 直到获得无菌的毛状根。所获得的无菌不定根置于无外源激素的 MS 固体培养基上保存, 供毛状根遗传转化鉴定、毛状根液体培养和商陆皂苷甲含量测定用。

### 1.3 毛状根的遗传转化鉴定

采用 Ri 质粒 TL-DNA (T-DNA 左臂) *rol* 基因的 PCR 扩增和 TR-DNA (T-DNA 右臂) 的冠瘿碱合成酶基因表达产物的硅胶薄层层析来对美洲商陆毛状根进行遗传转化鉴定。

#### 1.3.1 毛状根 *rol* 基因的 PCR 扩增

选取可在无激素 MS 培养基中快速自主生长的 9 个无菌毛状根根系各 100 mg, 按 Edwards 等<sup>[9]</sup>的方法提取毛状根基因组 DNA, 纯化后用作 PCR 扩增的模板。以野生型美洲商陆根的基因组 DNA 作阴性对照, 以发根农杆菌 ATCC15834 的质粒 DNA 为阳性对照。根据 Furner 等<sup>[10]</sup>发表的序列, 设计并合成扩增 *rolC* 的 PCR 引物, *rolC* 引物: P1: 5'-CTCCTGACATCAAACCTCGTC-3', P2: 5'-TGCTTCGAGTTATGGGTACA-3'; (引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成)。在 0.2 mL 的硅化离心管中加入模板 DNA 50 ng, *Taq* DNA 聚合酶 2 个单位, PCR 反应总体积为 50 μL。PCR 扩增参数如下: 94 °C 预热 3 min; 94 °C 变性 1 min, 53.5 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸反应 1 min, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存。扩增产物采用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳和 GoldView (GV) 染色进行分析。

#### 1.3.2 冠瘿碱的硅胶薄层层析

参照 Tanaka 等<sup>[11]</sup>的方法进行并略加修改。

取美洲商陆毛状根根系以及发根农杆菌 ATCC15834 菌体各适量, 充分研磨成粉状后, 加入 70% 乙醇, 浸泡过夜, 次日离心取上清液浓缩, 点样于硅胶薄层层析板 (GF254 型, 10 cm×20 cm, 青岛海洋化工厂分厂出品) 上, 展层、染色和拍照。

### 1.4 培养基类型对美洲商陆毛状根生长和次生物质含量的影响

为了探讨培养基类型对美洲商陆毛状根生

长的影响,选取生长最旺盛的无菌毛状根根系 2 和根系 5,定量接种至盛有 50 mL MS、1/2MS、B5 或 6,7-V<sup>[12]</sup>四种液体培养基的 150 mL 锥形瓶中,起始接种量约为 0.2 g FW/瓶。将培养瓶置于转速为 100 r/min 的旋转式摇床上,于(25±2) °C 下振荡培养。为了测定培养基类型对毛状根次生物质商陆皂苷产生的影响,将生长最迅速的毛状根根系 2 分别接入 MS 和 6,7-V 液体培养基进行液体振荡培养,每瓶起始接种量约为 0.2 g FW,培养条件同上。在为期 25 d 的液体培养过程中,每隔 5 d 随机抽取毛状根培养物 3 瓶,用吸水纸吸去培养物表面的培养液后,称鲜重并置于 60 °C 烘干至恒重后,供测定其商陆皂苷甲含量用。

### 1.5 商陆皂苷甲含量的 HPLC 测定

上述经 MS 和 6,7-V 培养基液体培养 5–25 d 且烘干至恒重的美洲商陆毛状根根系,碾磨成细粉并过 40 目筛后,精密称取毛状根根系过筛后的粉末各 1 g,置于 100 mL 具塞锥形瓶中,用移液管加入 50%乙醇 30 mL 称重并记录带瓶重量,超声(500 W、40 kHz)处理 30 min,放冷至室温后,用 50%乙醇补足至原重量,摇匀,过滤,收集滤液即得待测样品。毛状根样品的商陆皂苷甲含量的 HPLC 测定基本参照赖道万等<sup>[13]</sup>的方法进行。实验条件为:日本 HITACHI L-7110 型高效液相色谱仪,美国 Alltech ELSD-2000ES 型蒸发光散射检测器;色谱柱为 Diamonsil C18 (5 μm×250 mm×4.6 mm);流动相为甲醇-水(75:25);流速为 1.0 mL/min;柱温为室温;进样量 20 μL;漂移管温度 74 °C;载气流速 2.0 L/min。商陆皂苷甲标准品(20 mg/支,购于深圳时得佳科技有限公司)制作标准曲线, $Y=2\ 967.4x-24\ 072$ , $r^2=0.999\ 5$ ;并依据标准曲

线计算各毛状根样品的商陆皂苷甲含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 美洲商陆毛状根的诱导

发根农杆菌 ATCC15834 感染美洲商陆叶片外植体共培养 2 d 后,可见叶片外植体边缘开始向上卷曲,同时叶片周围开始出现少量乳白色的菌落。将外植体转到含 500 mg/L 头孢噻肟钠的 MS 固体培养基上除菌培养 8 d 后,可见部分叶片外植体的近叶柄端切口叶脉处或附近(即形态学下端)表面产生白色根原基。15 d 后出现根尖,根尖部分呈紫红色。18–22 d 后部分叶片外植体的白色根原基发育伸长形成长约 1–3 cm 的不定根(图 1A)。从图 1 可见,几乎所有的主根周围都有较多的侧根,主根大都呈白色、根尖呈浅紫红色、较粗壮、生长速度快。侧根呈白色,根尖部分无明显红色,侧根较细,生长速度较慢。而未经发根农杆菌浸染的美洲商陆叶片外植体置于相同培养基中培养 20 d 后均不生根,且可见部分叶片外植体逐渐黄化或变褐死亡。

为了探讨发根农杆菌诱导美洲商陆叶片外植体产生毛状根的适宜条件,研究了预培养时间和共培养时间对叶片外植体产生毛状根的影响。图 2 为预培养时间对美洲商陆叶片外植体毛状根诱导的影响。从图 2 可见,叶片外植体经不同预培养时间处理后,其毛状根的诱导率不同。未经预培养的叶片外植体感染后,其边缘发生褐化,毛状根诱导率较低;而不同时间预培养的叶片外植体感染发根农杆菌后,以预培养 1 d 的叶片外植体的毛状根诱导效果最好,其毛状根诱导率可达 45%,但随着预培养天数的增加,叶片外植体的毛状根诱导率反而下降,其中预培养 4 d 的叶片外植体甚至不能诱导出毛状根。

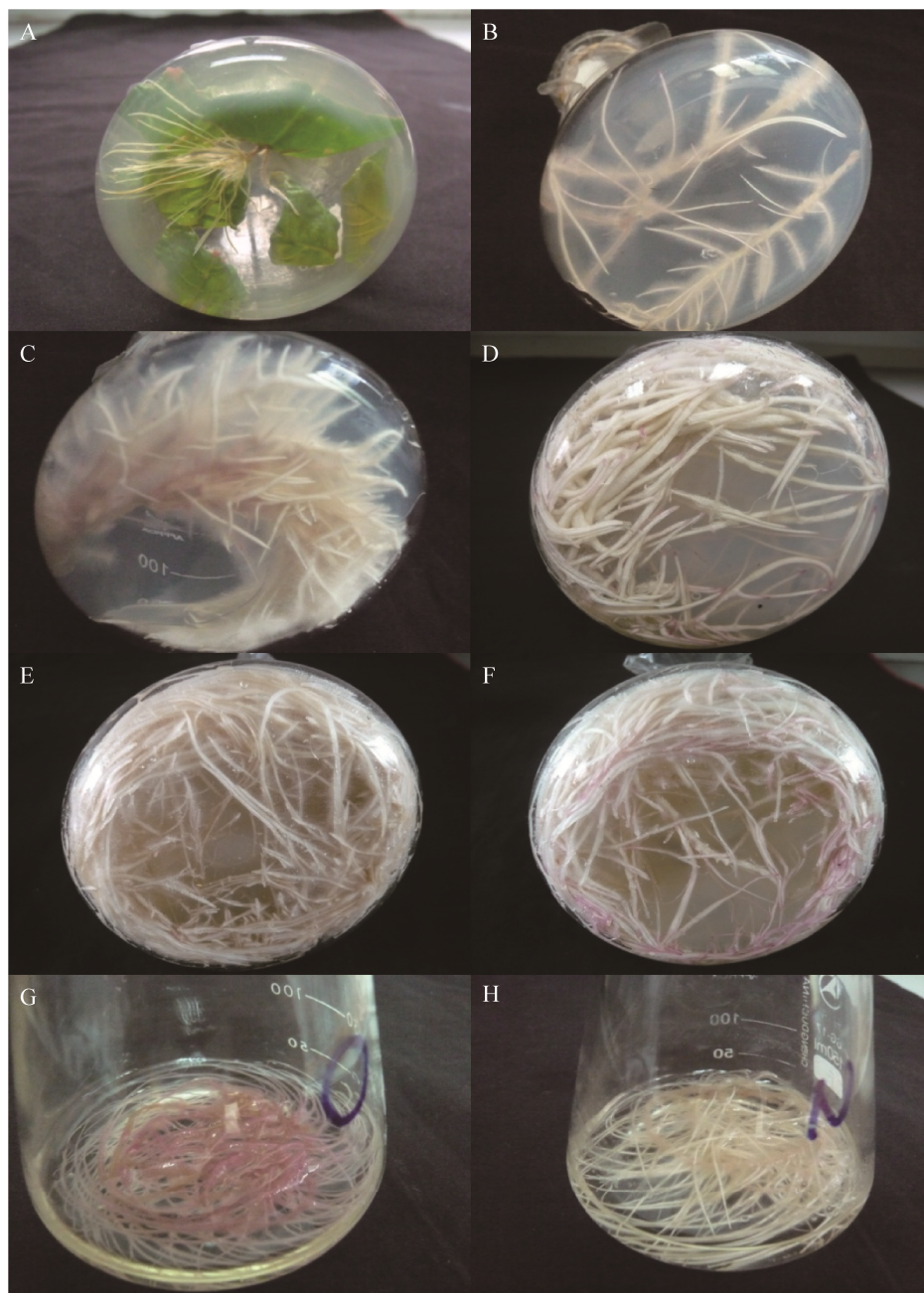


图 1 美洲商陆叶片外植体毛状根的诱导及其离体培养

Fig. 1 Induction of hairy root from leaf explants of *P. americana* L. and its *in vitro* culture. (A) Hairy root formation from leaf explants after infected with *A. rhizogenes* ATCC15834 for 20 days. (B) Hairy root line 1 on solid medium. (C) Hairy root line 2 on solid medium. (D) Hairy root line 3 on solid medium. (E) Hairy root line 4 on solid medium. (F) Hairy root line 5 on solid medium. (G) Hairy root line 6 in liquid medium. (H) Hairy root line 7 in liquid medium.

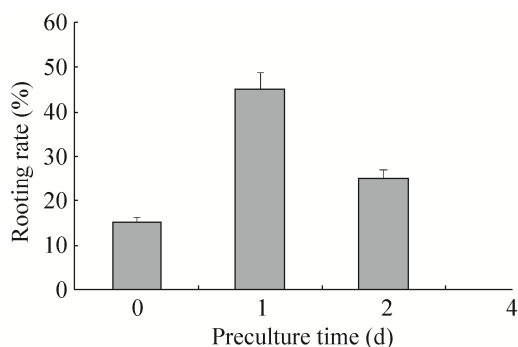


图2 预培养时间对叶片外植体产生毛状根的影响  
Fig. 2 Effect of pre-culture time on the formation of hairy roots from leaf explants.

图3 为发根农杆菌感染后,共培养时间对美洲商陆叶片外植体毛状根诱导率的影响。从图3可见,叶片外植体的毛状根诱导率可因共培养时间不同而有差异。在2~4 d的共培养时间内,随着共培养时间的延长,毛状根的诱导率逐渐上升,其中以共培养4 d时,叶片外植体的毛状根诱导率最高,达70%。但共培养5 d时,叶片外植体的毛状根诱导率则降低至65%。同时还观察到,随着共培养时间的延长,叶片外植体周围长满乳白色农杆菌菌落,进而可见部分叶片外植体逐渐褐化和坏死。

## 2.2 美洲商陆毛状根的固体培养

为了获得无菌的毛状根系,当发根农杆菌感染后从叶片外植体上产生的不定根长到3~5 cm时、分别切下并置于无外源激素的MS+500 mg/L头孢噻肟钠的固体培养基中进行单根除菌培养,每7 d左右转到新的MS+500 mg/L头孢噻肟钠的固体培养基上继续培养,直到获得无菌毛状根培养物。通过形态观察和比较发现,共获得9个可在无外源激素培养基上自主生长但其形态间存在差异的毛状根。其中,无论是固体培养还是液体培养,根系5和6的根表面局

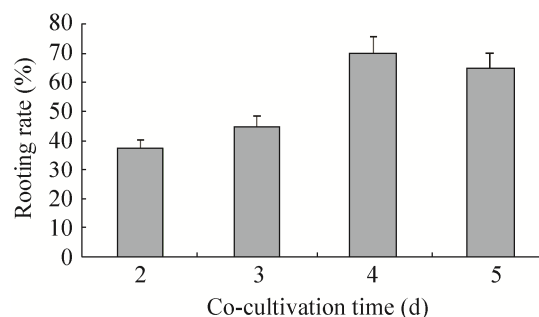


图3 共培养时间对美洲商陆叶片外植体产生毛状根的影响  
Fig. 3 Effect of co-cultivation time on the formation of hairy roots from leaf explants.

部呈现紫红色,且紫红色主要出现在其根尖和离根尖较近的分生区部位(图1F和G);而其余毛状根根系的根表面为白色(图1B、C、D、E和H);在所获得的毛状根系中,以根系2的侧根发生能力最强,侧根最多,根毛分布最密(图1C),而以根系1的侧根最少(图1B)。

## 2.3 美洲商陆毛状根的PCR鉴定

*rolC* 是发根农杆菌 Ri 质粒 T<sub>L</sub>-DNA (T-DNA 左臂) 上的一个生根基因。为了对所获得的9个毛状根系进行遗传转化鉴定,以 *rolC* 的引物分别对美洲商陆野生植株的根部 DNA、美洲商陆毛状根基因组 DNA 及发根农杆菌单菌落 DNA 进行 PCR 扩增。扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析结果如图4。从图4可见,利用 *rolC* 的 PCR 引物能从9个美洲商陆毛状根的总 DNA 及发根农杆菌 ATCC15834 单菌落克隆中扩增到期望的、大小为540 bp 的特异性 DNA 片段;而从美洲商陆野生型植株根部总 DNA 中扩增不到任何片段。这说明,发根农杆菌中含 *rolC* 基因的 Ri 质粒的 T<sub>L</sub>-DNA 片段(T-DNA 左臂)已在美洲商陆毛状根基因组中整合并得到表达。



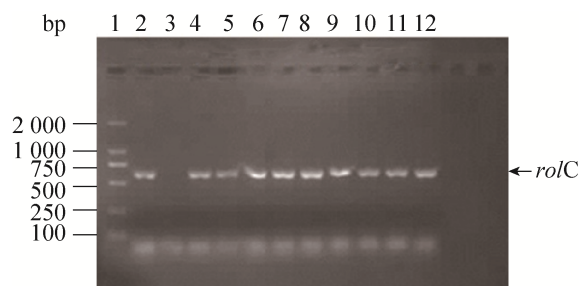


图4 美洲商陆毛状根根系1-9的 $rolC$ 基因PCR扩增产物的凝胶电泳分析

Fig. 4 Gel electrophoresis analysis of PCR fragments of  $rolC$  genes amplified from the genomic DNA of *P. americana* L. hairy root line 1-9. 1: 2 000 bp DNA marker; 2: *A. rhizogenes* ATCC15834; 3: untransformed root of *P. americana* L.; 4-12: hairy root lines 1-9 of *P. americana* L.

当发根农杆菌 Ri 质粒的  $T_R$ -DNA ( $T$ -DNA 右臂) 部分整合到宿主植物细胞 DNA 后, 在转化细胞中就能合成特异的冠瘿碱 (Opines); 而发根农杆菌 Ri 质粒本身虽有冠瘿碱合成酶基因, 但该基因只在真核生物中表达, 其自身 (菌体) 不能合成冠瘿碱<sup>[14]</sup>。如果美洲商陆毛状根为 Ri 质粒所转化, 那么其细胞中就会有冠瘿碱的合成, 硅胶薄层层析显色结果应为阳性。因而, 冠瘿碱的有无也可作为 Ri 质粒转化的指标之一。图 5 为美洲商陆毛状根根系冠瘿碱的硅胶薄层层析检测结果。从图 5 可见, 上述经  $rol$  基因 PCR 扩增呈阳性的发根农杆菌 ATCC15834 菌株诱导美洲商陆叶片外植体产生的毛状根系均能检测到冠瘿碱 (甘露碱), 而对照根系及发根农杆菌菌体中则检测不到冠瘿碱 (甘露碱); 这说明, 除发根农杆菌 Ri 质粒的  $rol$  基因外, Ri 质粒的含编码冠瘿碱合成酶基因的  $T_R$ -DNA 也已在美洲商陆毛状根系中整合并得到表达; 而所获得的可自主生长的毛状根系均为 Ri $T$ -DNA 转化毛状根。

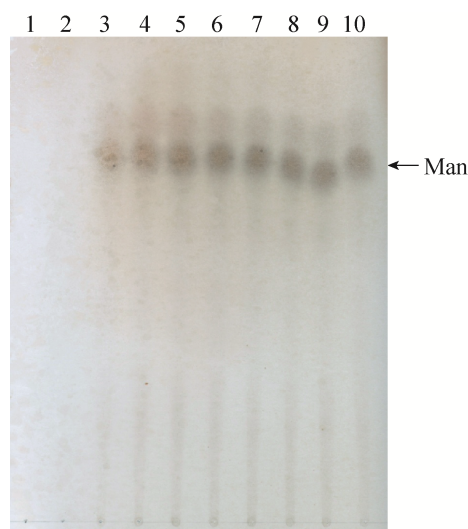


图5 美洲商陆毛状根冠瘿碱的硅胶薄层层析检测

Fig. 5 Detection of opines in hairy roots of *P. americana* by silica gel thin layer chromatography. 1: extract of agrobacterium; 2: control root extract; 3-10: extract of hairy root lines; Man: mannopine.

## 2.4 培养基类型对毛状根生长的影响

为了研究液体培养基类型对美洲商陆毛状根生长的影响, 将在固体培养中生长快的毛状根系 2 和 5 分别置于 MS、6,7-V、1/2MS 和 B5 液体培养基中振荡培养。图 6 为根系 2 和根系 5 分别在 MS、6,7-V、1/2MS 和 B5 四种培养基中培养 20 d 的生长情况 (结果以鲜重增值倍数表示)。从图 6 可见, 在 MS 培养基中培养 20 d 后, 毛状根根系 2 的鲜重增值倍数达到了 37.81 倍, 而毛状根根系 5 则增加了 29.34 倍; 在 6,7-V 培养基中, 毛状根根系 2 的鲜重增值倍数达到了 21.09 倍, 而毛状根根系 5 则增加了 24.57 倍。在 1/2MS 培养基液体培养 20 d 后, 毛状根根系 2 的鲜重增值倍数达到了 23.45 倍, 而毛状根根系 5 则只增值了 18.67 倍; 而在 B5 培养基中, 毛状根根系 2 的鲜重增值倍数为 16.89 倍, 而毛状根根系 5 则只增加了 15.92 倍。可见, 在供试

的 4 种培养基中, 无论是毛状根根系 2 还是毛状根根系 5, 均以 MS 培养基为其最适合生长的培养基。对毛状根根系 2 而言, 培养基对其生长促进的影响顺序为:  $MS > 1/2MS > 6,7-V > B5$ ; 而对毛状根根系 5 而言, 培养基类型对其生长影响的顺序为:  $MS > 6,7-V > 1/2MS > B5$ 。而这表明培养基类型对毛状根生长的影响可依毛状根株系不同而异。

图 7 为美洲商陆毛状根根系 2 在 MS 和 6,7-V 培养基中的商陆皂苷甲含量动态变化。从图 7 可见, 当美洲商陆毛状根根系 2 在 MS 培养基中培养时, 其商陆皂苷甲含量从培养后第 5 天开始上升, 10–15 d 期间, 其商陆皂苷甲含量几乎保持不变, 处于平台期, 而 15 d 以后, 其商陆皂苷甲含量开始迅速下降, 在第 20 天时, 商陆皂苷甲含量为 1.211%, 至第 25 天时, 则下降至 1.16%。而与 MS 培养基相比, 6,7-V 培养基培养时, 不仅毛状根的商陆皂苷甲含量变化曲线与其生长曲线基本保持一致, 而且其商陆皂苷甲含量随着培养时间的延长而逐渐升高, 培养至

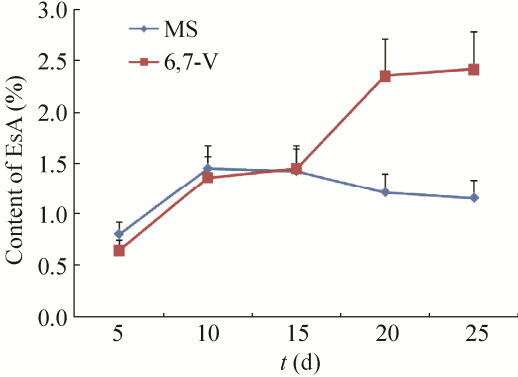


图 7 美洲商陆毛状根根系 2 在 MS 和 6,7-V 培养基中的商陆皂苷甲含量动态变化

Fig. 7 Dynamic variation of EsA content in *P. americana* L. hairy root line 2 cultured in MS and 6,7-V medium.

25 d 时, 其商陆皂苷甲含量达到 2.42%, 约为同时期 MS 培养基培养的毛状根商陆皂苷甲含量的 2.09 倍。表明, 6,7-V 培养基比 MS 培养基更有利于商陆毛状根商陆皂苷甲的合成。

### 3 讨论

发根农杆菌遗传转化产生毛状根的过程是发根农杆菌和植物细胞相关作用的复杂生物学过程。有研究表明, 感染前对外植体进行预培养能够提高外植体的毛状根诱导率, 且外植体预培养的最佳时间通常约为 1–3 d<sup>[15]</sup>。如预培养 2 d 的新疆雪莲 *Saussureain volucrata* Kar.et Kir. 根段外植体被发根农杆菌菌株 R1601 感染后, 其毛状根的诱导率可达 100%<sup>[16]</sup>; 但外植体预培养超过 3 d 时, 则会降低外植体的毛状根诱导率<sup>[17]</sup>; 然而利用发根农杆菌菌株 A4 和 R1601 诱导曼陀罗 *Datura stramonium* L. 嫩叶外植体产生毛状根时, 其外植体的最佳预培养时间为 4 d<sup>[18]</sup>。而这显然与本实验的结果不完全一致。本实验中,

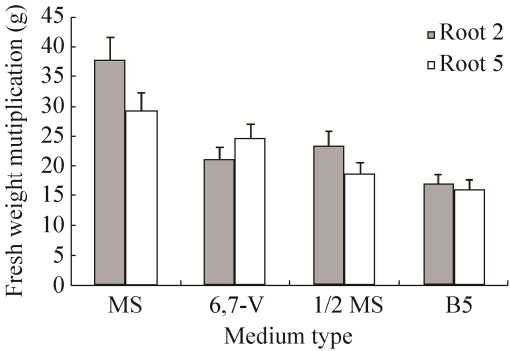


图 6 培养基类型对美洲商陆毛状根根系 2 和 5 生长的影响

Fig. 6 Effect of medium types on the growth of *P. americana* hairy root line 2 and 5.



发根农杆菌 ATCC15834 诱导美洲商陆叶片外植体产生毛状根时,其最适预培养时间为 1 d;但若预培养时间过长,叶片外植体的毛状根诱导率反而下降,预培养 4 d 的外植体甚至不能产生毛状根。这表明,通过外植体预培养可提高其毛状根诱导率,但其影响程度可因植物类型、外植体类型以及农杆菌菌株类型不同而有差异。

在发根农杆菌遗传转化产生毛状根的过程中,通常将被发根农杆菌感染后的叶片外植体置于无抗生素培养基中培养 2–3 d,让发根农杆菌 Ri 质粒 T-DNA 的基因切割,转移整合到植物基因组中的过程,称为“共培养 (Co-cultivation)”。以往的研究表明,发根农杆菌感染外植体后,通常需要的共培养时间一般为 2–3 d<sup>[19]</sup>。然而在利用发根农杆菌对白芥 *Sinapis alba* 外植体产生毛状根时,其外植体的最佳共培养时间则为 4–5 d<sup>[20]</sup>。而这与本实验的结果类似。在本实验中,感染发根农杆菌后,美洲商陆叶片外植体的最佳共培养时间为 4 d,其毛状根的诱导率达到最高,约为 70%;但超过 4 d 则外植体的毛状根诱导率反而下降;甚至会出现因发根农杆菌过度生长,导致外植体出现毒害、褐化甚至死亡。可见,在利用发根农杆菌遗传转化植物外植体产生毛状根时,其最佳共培养时间的长短可因植物类型而异。

已有的研究表明,在发根农杆菌介导的遗传转化过程中,由于 T-DNA 插入植物基因组的位置、长度和拷贝数千差万别,植物感染部位就会产生在生长形态、生理生化特性和次生代谢产物含量等方面各异的毛状根克隆<sup>[21]</sup>。如利用发根农杆菌 A4 菌株感染黄瓜叶片<sup>[22]</sup>或利用农杆菌碱型菌株 R1000 感染黄瓜子叶<sup>[23]</sup>后都能得到 3 种具有明显形态差异的毛状根;而通过发

根农杆菌 R1601 菌株对青蒿外植体的遗传转化所获得的 220 个青蒿毛状根系之间,无论在生长还是侧根分支能力均存在差异<sup>[24]</sup>。这些与本试验的结果类似。在本试验中,发根农杆菌感染美洲商陆叶片外植体后获得了 9 个具有明显形态差异的毛状根。有研究表明,同一菌株感染黄瓜同一外植体后,黄瓜 3 种表型毛状根的产生可能与 Ri 质粒的 T<sub>L</sub>-DNA (T-DNA 左臂) 和含 AUX 基因的 T<sub>R</sub>-DNA 同时被转入并不同程度表达有关<sup>[22]</sup>;然而,在发根农杆菌遗传转化芸薹 *Brassica napus* 时,无论 T<sub>L</sub>-DNA 和 T<sub>R</sub>-DNA 是否同时被转入,都不会出现黄瓜转化所产生的毛状根表型差异<sup>[25]</sup>。因而,本试验中发根农杆菌遗传转化美洲商陆叶片外植体后 9 种不同形态差异毛状根根系的产生,除可能与 Ri 质粒的 T-DNA 片段插入位点和长度的多态性有关外,还可能与美洲商陆本身的遗传特性有关。

虽然毛状根可在无激素培养基上自主快速生长,但有研究表明,培养基类型是影响毛状根生长和次生代谢的重要因素之一<sup>[26-27]</sup>。如西洋参 *Panax quinquefolium* L. 毛状根在 SJ-1 培养基中生物量月增长倍数达到 31.1,而在 B5 和改良 Nisch 培养基中的月增长倍数则分别为 17.9 和 15.9 倍<sup>[26]</sup>。而采用 MS 液体培养基、White 和 B5 培养基分别培养人参毛状根 6 周后,其干重增加量分别约为起始接种量的 83.9、44.6 和 41.9 倍,但该毛状根在 6,7-V 培养基上则几乎不生长<sup>[27]</sup>。而这与本实验的结果不完全一致。在本实验供试的 MS、1/2MS、6,7-V 和 B5 培养基中,无论是毛状根根系 2 还是毛状根根系 5,均以 MS 培养基为其最适合生长的培养基。对毛状根根系 2 而言,培养基对其生长促进的影响顺序为:MS>1/2MS>6,7-V>B5;而对毛状根根

系 5 而言,培养基类型对其生长影响的顺序为: MS>6,7-V>1/2MS>B5。表明,培养基类型对毛状根生长的影响效果还与植物种类以及其毛状根类型有关。然而,除可影响毛状根的生长和形态外,培养基的类型还会影响毛状根次生物质的产生与积累。如 White 培养基培养 6 周后,人参毛状根的人参总皂苷含量可达到 5.60%,而 MS 培养基培养时,其毛状根中人参总皂苷含量仅为 4.85%<sup>[27]</sup>。此外,液体培养 44 d 后,6,7-V 培养基培养的丹参毛状根的生物量(鲜重)增殖倍数达到 370.5,丹参酮含量达到 0.041%(干重);而 MS 培养基培养的毛状根生物量(鲜重)增殖倍数为 194.7,丹参酮含量则达到 0.068%,表明 6,7-V 培养基适合丹参毛状根的生长,而 MS 培养基更有利于丹参毛状根内丹参酮的积累<sup>[28]</sup>。而这与本研究美洲商陆毛状根的培养结果不一致。在本实验中,美洲商陆毛状根中商陆皂苷甲的合成和积累不仅与培养基类型的影响有关,而且 6,7-V 培养基比 MS 培养基更有利于商陆毛状根商陆皂苷甲的合成。培养至 25 d 时,其商陆皂苷甲含量达到 2.42%,约为同时期 MS 培养基培养的毛状根商陆皂苷甲含量的 2.09 倍。而这表明,培养基类型对毛状根的生长和次生代谢产物积累的影响效果可因植物种类以及毛状根根系的不同而有差异。

本文所建立的美洲商陆毛状根诱导及其离体培养的适宜条件为今后利用其毛状根株系的规模培养来生产其药用有效成分商陆皂苷甲奠定了实验和技术基础。

## REFERENCES

- [1] Petit A, David C, Dahl GA, et al. Further extension of the opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Mol Gen Genet*, 1983, 190(2): 204–214.
- [2] Shi HP, Long YY, Sun TS, et al. Induction of hairy roots and plant regeneration from the medicinal plant *Pogostemon cablin*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2011, 107(2): 251–260.
- [3] Hou LL, Shi HP, Yu W, et al. Induction of polyploid in hairy roots of *Nicotiana tabacum* and its plant regeneration. *Chin J Biotech*, 2014, 30(4): 581–594 (in Chinese).  
侯丽丽, 施和平, 余武, 等. 烟草毛状根多倍体诱导及其植株再生. *生物工程学报*, 2014, 30(4): 581–594.
- [4] Chen SY, Hou SS, Gui YL, et al. *In vitro* transformation of cotyledons and hypocotyls of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by *Agrobacterium rhizogenes*. *J Wuhan Bot Res*, 1991, 9(4): 301–305 (in Chinese).  
陈士云, 侯嵩生, 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): 301–305.
- [5] Shi HP, Li L, Pan RC. Effects of polarity and NAA concentration on transformation of cucumber cotyledons by *Agrobacterium rhizogenes*. *J Trop Subtrop Bot*, 1997, 5(3): 43–47 (in Chinese).  
施和平, 李玲, 潘瑞炽. 极性和 NAA 浓度对发根农杆菌遗传转化黄瓜子叶的影响. *热带亚热带植物学报*, 1997, 5(3): 43–47.
- [6] Xiao ZY, Zheng QY, Zhang JP, et al. Effect of esculentoside A on autoimmune disease mice model. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2003, 24(10): 1108–1111 (in Chinese).  
肖振宇, 郑钦岳, 张俊平, 等. 商陆皂苷甲对自身免疫综合征模型小鼠的疗效. *第二军医大学学报*, 2003, 24(10): 1108–1111.
- [7] Zheng QY, Mai K, Pan XF, et al. Antiinflammatory effect of esculentoside A. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 1992, 6(3): 221–223 (in Chinese).

- 郑钦岳, 麦凯, 潘祥福, 等. 商陆皂甙甲的抗炎作用. 中国药理学与毒理学杂志, 1992, 6(3): 221–223.
- [8] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 1962, 15(3): 473–497.
- [9] Edward K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(6): 1349.
- [10] Furner IJ, Huffman GA, Amasino RM, et al. An *Agrobacterium* transformation in the evolution of the genus *Nicotiana*. *Nature*, 1986, 319(6052): 422–427.
- [11] Tanaka N, Hayakawa M, Mano Y, et al. Infection of turnip and radish storage roots with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep*, 1985, 4(2): 74–77.
- [12] Veliky IA, Martin SM. A fermenter for plant cell suspension cultures. *Can J Microbiol*, 1970, 16(4): 223–226.
- [13] Lai DW, Sun WJ. HPLC-ELSD determination of esculentoside A in different parts of *Phytolacca acinosa* Roxb. and *P. americana* L.. *Chin J Pharm Anal*, 2008, 28(9): 1466–1469 (in Chinese).  
赖道万, 孙文基. HPLC-ELSD 法测定商陆不同部位中商陆皂甙甲的含量. 药物分析杂志, 2008, 28(9): 1466–1469.
- [14] Li JL, Xu XL, Chen JS. Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* and its application. *Prog Biotechnol*, 1993, 14(2): 8–14 (in Chinese).  
李集临, 徐香玲, 陈金山. 发根农杆菌 Ri 质粒及其应用. 生物工程进展, 1993, 14(2): 8–14.
- [15] Estell V, Frederic D, Rajabir S, et al. Role of the host cell cycle in the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Petunia*: evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer. *Planta*, 1997, 201(2): 160–172.
- [16] Fu CX, Jin ZP, Yang R, et al. Establishment of *Saussurea involucre* hairy roots culture and plantlet regeneration. *Chin J Biotech*, 2004, 20(3): 366–371 (in Chinese).  
付春祥, 金治平, 杨睿, 等. 新疆雪莲毛状根的诱导及其植株再生体系的建立. 生物工程学报, 2004, 20(3): 366–371.
- [17] Yang SH, Bi XX, Yang HJ. Induction of *Echinacea purpurea* hairy roots and *in vitro* culture. *Chin Pharm J*, 2011, 46(20): 1557–1562 (in Chinese).  
杨世海, 毕晓秀, 杨慧洁. 紫锥菊毛状根诱导及离体培养. 中国药理学杂志, 2011, 46(20): 1557–1562.
- [18] Peng CX, Zhang M, Liu QF, et al. Study on the hairy root induced from *Datura tatula* L. and production of gastrodin through suspension culture of hairy roots. *J Yunnan Agric Univ*, 2008, 23(4): 492–497 (in Chinese).  
彭春秀, 张梅, 刘庆丰, 等. 曼陀罗毛状根的诱导及其悬浮培养合成天麻素初探. 云南农业大学学报, 2008, 23(4): 492–497.
- [19] David C, Chilton MD, Tempé J. Conservation of T-DNA in plants regenerated from hairy root cultures. *Nat Biotechnol*, 1984, 2(1): 73–76.
- [20] Hadfi K, Batschauer A. *Agrobacterium*-mediated transformation of white mustard (*Sinapis alba* L.) and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep*, 1994, 13(3/4): 130–134.
- [21] David C, Petit A, Tempé J. T-DNA length variability in mannopine hairy root: more than 50 kilobase pairs of pRi T-DNA can integrate in plant cells. *Plant Cell Rep*, 1988, 7(2): 92–95.
- [22] Amselem J, Tepfer M. Molecular basis for novel root phenotypes induced by *Agrobacterium rhizogenes* A4 on cucumber. *Plant Mol Biol*, 1992, 19(3): 421–432.
- [23] Shi HP, Li L, Pan RC. Genetic transformation of *Cucumis sativus* by *Agrobacterium rhizogenes*. *Acta Botan Sin*, 1998, 40(5): 470–473 (in Chinese).  
施和平, 李玲, 潘瑞炽. 发根农杆菌对黄瓜的遗传

- 传转化. 植物学报, 1998, 40(5): 470–473.
- [24] Xie D, Ye HC, Li GF, et al. Selection of hairy root clones of *Artemisia annua* L. for artemisinin production. Israel J Plant Sci, 2001, 49(2): 129–134.
- [25] Jouanin L, Guerche P, Panboukdjian N, et al. Structure of T-DNA in plants regenerated from roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes* strain A4. Mol Gen Genet, 1987, 206(3): 387–392.
- [26] Wang CZ, Ding JY. Effects of different media and phytohormones on the growth and ginsenoside content of *Panax quinquefolium* L. hairy root. J Plant Resour Environ, 2001, 10(4): 1–4 (in Chinese). 王冲之, 丁家宜. 不同培养基及外源激素对西洋参毛状根的生长和皂甙含量的影响. 植物资源与环境学报, 2001, 10(4): 1–4.
- [27] Sun BX, Yang GX, Wang QL, et al. Study on *Panax ginseng* hairy root and glycoside production. Chin Trad Patent Med, 2003, 25(9): 746–748 (in Chinese). 孙彬贤, 杨光孝, 汪沁琳, 等. 人参毛状根合成人参皂苷培养条件的优化. 中成药, 2003, 25(9): 746–748.
- [28] Zhang YL, Song JY, Lv GL, et al. Establishment of hairy root culture of *Salvia miltiorrhiza* Bunge and its production of tanshinones. China J Chin Mater Med, 1995, 20(5): 269–271 (in Chinese). 张荫麟, 宋经元, 吕桂兰, 等. 丹参毛状根培养的建立和丹参酮的产生. 中国中药杂志, 1995, 20(5): 269–271.

(本文责编 陈宏宇)