

发根农杆菌诱导牡丹生根的初步研究

杨至德¹, 王雁^{2*}, 刘雪梅¹, 缪崑², 汤巧香¹

(1. 天津城市建设学院规划与建筑系, 天津 300384; 2. 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091)

关键词: 发根农杆菌; 牡丹; 侵染; 组织培养; 毛状根

中图分类号: S685.11

文献标识码: A

Preliminary Study on Hairy Root Occurrence of Peony Induced by *Agrobacterium rhizogenes*

YANG Zhi-de¹, WANG Yan², LIU Xue-mei¹, MIAO Kun², TANG Qiao-xiang¹

(1. Tianjin Urban Construction Institute, Tianjin 300384, China;

2. Research Institute of Forestry, CAF; Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China)

Abstract: The paper explored the possibility of hairy root occurrence of peony induced by *Agrobacterium rhizogenes*. It showed that R1000 had the highest hairy root inducement with a hairy root rate of 35%, whereas strains A4, MSU-2 and MT232 had little difference in hairy root occurrence. Infect conditions had great influence on hairy root inducement, and the better ones are: acetosyringone concentration, $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; infection time, 15 minutes; and culturing conditions of strains, temperature 28°C , 28 hours shaking culture under dark environment with shaking. Pre-experiment on tissue culture system of peony was conducted, and got better medium composition as: WP + 6-BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IBA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + GA₃ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for base buds, and MS + 6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IBA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + GA₃ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for stem segments.

Key words: *Agrobacterium rhizogenes*; peony; infect; tissue culture; hairy root

长期以来,牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.)以嫁接和分株繁殖为主^[1,2],周期长,繁殖系数低,不能适应市场需求。有关牡丹组织培养无性快繁技术的报道^[3,4],大多数限于实验室阶段,并未真正应用于大规模生产,其主要障碍是牡丹外植体生根困难,发根率极低^[5],而且有些品种,采用以培养基筛选和激素配比筛选为框架的组织培养技术,根本就不能解决生根问题^[6,7]。发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)能诱导植物产生毛状根,并且毛状根不具向地性,可在无外源激素的培养基上生长发育成新的

植株^[8,9]。人参(*Panax ginseng* C. A. Mey)、丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge.)、大黄(*Rheum officinale* Baill.)、碧冬茄(*Petunia hybrida* Vilm.)、葛(*Pueraria edulis* Pamp.)、商陆(*Phytolacca acinosa* Roxb.)和短叶红豆杉(*Taxus brevifolia* Nutt.)等160多种植物用发根农杆菌诱导,均获得了毛状根^[10~14]。牡丹属双子叶植物,用发根农杆菌诱导,有可能产生毛状根。本研究用发根农杆菌诱导牡丹毛状根,以提高牡丹外植体的生根率,探讨建立牡丹组织培养无性快繁的新途径。

收稿日期: 2005-10-19

基金项目: 国家林业局948项目(2004-4-12)的部分研究内容

作者简介: 杨至德(1963—),男,山东章丘人,副教授,主林从事园林植物繁殖工作。

* 通讯作者: wangyan@caf.ac.cn

1 材料与方法

1.1 侵染材料

供试牡丹品种为‘大富贵’(*P. suffruticosa* Andr cv. Da Fu Gui.)和‘紫二乔’(*P. suffruticosa* Andr cv. Zi Er Qiao)。侵染材料分2类:第1类为直接侵染材料。外植体从野外采回,进行消毒处理,直接进行侵染接种试验;第2类为继代侵染材料。首先获得牡丹组织培养继代体系,然后用继代小植株叶片和嫩茎作为侵染材料。

1.2 牡丹组培继代体系

1.2.1 外植体消毒与褐化处理 消毒处理设3种:①2%的次氯酸钠,消毒45 min;②0.1%的升汞,消毒15 min;③0.1%升汞消毒10 min,转入2%次氯酸钠+氨苄青霉素 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,消毒15 min。褐化处理设3个:①流水浸泡24 h+活性炭($3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$);②1% PVP;③流水浸泡24 h+1% PVP+活性炭($3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)。

1.2.2 培养基筛选 在预备试验的基础上,仅对激素进行正交试验筛选。茎段以MS为基本培养基,根际萌蘖芽以WP为基本培养基。正交设计为 $L_8(2^7)$,三因素二水平:6-BA,分别为0.5、2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; IBA 分别为0.1、0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; GA₃为0.5、1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.3 发根农杆菌菌株及培养

侵染用菌株为A4、MSU-2、R1000和MT232,由课题组从美国ATCC公司引进。菌株活化:取0~4℃保存的菌株,转接入预先配制并消毒的液体培养基上,25℃摇床振荡暗培养48 h,转接到琼脂平板培养基上备用。菌株MSU-2和MT232采用ATCC 1701培养基活化;菌株A4和R1000采用YEB培养基活化。

1.4 药品及主要仪器

主要仪器与药品:PVP,德国进口分装;乙酰丁香酮,美国进口分装;HP1500GS智能人工气候箱, HZ2001B恒温摇床。

1.5 培养时间与菌株侵染活力试验

设24、28、32、36 h 4个不同培养时间,在28℃、 $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下振荡培养。

1.6 侵染诱导

1.6.1 直接侵染材料 首先按组织培养程序,对外植体进行消毒处理,然后将消过毒的外植体进行创伤处理(茎段穿刺、叶片打孔),并用浸蘸法进行发根农杆菌侵染。置28℃黑暗人工气候箱中,共培养48 h后,转入光照下继续培养,观察记载菌株和外植体生长情况。培养3~4 d后,取出外植体,无菌水

冲洗数次,转入新鲜培养基中作继代培养,转接4~5次。12~15 d毛状根长出,约1 cm长时转入含头孢霉素 $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养基上杀菌,转接3~4次。

1.6.2 继代侵染材料 取继代小植株叶片和嫩茎,超净工作台上打孔、穿刺。叶片长4~11 cm,嫩茎长3~6 cm。小于5 cm的叶片,打孔2个;大于5 cm的叶片,打孔4个。嫩茎穿刺4~5次,两端剪口平滑。侵染、培养及观察同直接侵染材料。

1.6.3 卡那霉素抗性鉴定 剪下毛状根,长2~3 cm,分别植入含有卡那霉素的WP和MS培养基以及不含卡那霉素的WP₀和MS₀培养基上培养。卡那霉素含量为20、40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。观察毛状根生长情况。

2 结果与分析

2.1 供试品种外植体培养体系的建立

2.1.1 不同消毒方式对外植体成活率的影响 从表1中看出,根际萌蘖芽用③号消毒方法,成活率可以达到3%,而用①号消毒方法,成活率为1.5%。与茎段相比,根际萌蘖芽成活率高,但是,总的来说,牡丹外植体消毒成活率很低。其原因:一是外植体表面带菌量高,表面消毒困难。根段长期与土壤接触,茎段长期暴露于空气中,自然就感染了大量的病菌;二是牡丹内部带菌问题。‘过消毒’(有意加大消毒剂浓度和消毒时间)试验中,4%次氯酸钠消毒45 min+0.1%升汞消毒45 min,接种10~15 d后外植体变黑死亡,但外植体上仍会长出白色的真菌菌丝体来。作者认为,长期以来牡丹的繁殖靠嫁接和分株,潜伏于牡丹体内的病菌就会因嫁接和分株一代代向下传,导致内部带菌,仅作表面消毒处理不能杀死外植体内部的病原菌。

表1 大富贵外植体不同消毒处理对接种成活率的影响

外植体类型	消毒方式	接种/瓶	污染/瓶	成活/瓶	成活率/%
茎段	①	200	199	1	0.5
	②	200	199	0	0.0
	③	200	198	2	1.0
根际萌蘖芽	①	200	197	3	1.5
	②	200	197	3	1.5
	③	200	194	6	3.0

注:①2%的次氯酸钠,消毒45 min;②0.1%的升汞,消毒15 min;③0.1%升汞10 min,转入2%次氯酸钠+氨苄青霉素 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,消毒15 min。

2.1.2 培养基筛选结果 外植体培养以WP和MS为基本培养基。WP用于根际萌蘖芽的培养,MS用于茎段培养。通过正交试验对激素种类和激素配比进行筛选后发现,用于根际萌芽和茎段的培养基分别以WP+6-BA 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +IBA 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +GA₃ 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

L^{-1} 和 $MS + 6-BA 2.0 \text{ mg} \cdot L^{-1} + IBA 0.1 \text{ mg} \cdot L^{-1} + GA_3 0.5 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 为最好。 GA_3 对促进外植体萌发伸长生长的效果特别明显,加入 GA_3 的根际萌蘖芽外植体,接种 30 d 后,芽伸长生长可达 10 ~ 15 cm。

2.1.3 不同处理对褐化程度的影响 牡丹外植体酚类物质含量高,仅丹皮酚的含量就可达到 $19 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,此外,还有牡丹酚苷、芍药苷等。这些化学物质极易引起外植体的褐化,影响牡丹组织培养无性繁殖体系的建立。在减轻褐化所采取的 3 种处理当中,①号和③号处理效果较好,而②号处理效果不明显(表 2)。

表 2 接种后不同时段褐化程度

处理	时段/h			
	6	24	48	144
①	轻	轻	中	中
②	轻	中	中	重
③	轻	轻	轻	中

注:①为流水浸泡 24 h + 活性炭 ($3 \text{ g} \cdot L^{-1}$); ②为 1% PVP; ③为流水浸泡 24 h + 1% PVP + 活性炭 ($3 \text{ g} \cdot L^{-1}$)。轻度褐化:外植体周围培养基浅黄色,散射分布,不连续,范围不超过 1 mm;中度褐化:外植体周围培养基黄褐色,沿外植体形成 1 圈,直径 1 ~ 2 mm;重度褐化:外植体周围培养基褐色,以外植体为中心成环状,直径大于 2 mm,外植体切口变黑。

表 3 不同发根农杆菌菌株对‘大富贵’毛状根诱导的影响

菌株	外植体	接种数/ 瓶	产生毛状根 外植体数	发根率/ %	培养基 类型	菌株培养		侵染时间/min
						温度/℃	时间/min	
A4	茎段	60	0	0	1/2 MS + AS	28	28	15
	叶片	60	4	7	MS + AS	28	28	15
MSU-2	茎段	60	3	5	1/2 MS + AS	28	28	15
	叶片	60	6	10	MS + AS	28	28	15
R1000	茎段	60	17	28	1/2 MS + AS	28	28	15
	叶片	60	21	35	MS + AS	28	28	15
MT232	茎段	60	2	3	1/2 MS + AS	28	28	15
	叶片	60	0	0	MS + AS	28	28	15

接种在含有 $40 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 卡那霉素的 WP 培养基上的诱导毛状根,6 ~ 7 d 后有少量死亡,平均存活率达到 69%,而牡丹正常根接种在同样培养基上,12 ~ 14 d 后全部死亡。卡那霉素用量为 $20 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 时,对正常根的杀死所需时间较长(18 ~ 21 d),作用不明显。

乙酰丁香酮对毛状根的发生有一定影响(表 4)。当用 R1000 菌株诱导时,在培养基中加入 $30 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 乙酰丁香酮,叶片毛状根诱导率可以达到 35%,而不加乙酰丁香酮诱导率仅为 15%;但对于菌株 A4、MSU-2 和 MT232,用同样浓度和相同方

2.2 发根农杆菌侵染和毛状根诱导

菌株培养时间对菌株侵染活力的影响试验表明,培养 28 h 时菌株侵染力最强,32 h 后菌液混浊、变黄,侵染力减弱。

在培养基类型、菌株培养时间、叶片打孔数目和茎穿刺数目都相同的情况下(表 3),R1000 菌株的毛状根诱导率最高,叶片外植体诱导率达到 35%。外植体均为继代培养幼小植株的茎和叶片,直接接种外植体成活率低,侵染成活率也低。卜学贤^[15] 等报道用 R1000 侵染毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.),叶片切段毛状根发生率可以达到 59%。本试验用相同类型的 R1000 菌株,但毛状根诱导率较低,可能是由于牡丹本身生根率较低所致。在该试验中,MSU-2 和 A4 诱导毛状根产生的效果不明显,MT232 未见其明显促进毛状根发生的效果,但 Strobel^[16] 用萝卜圆盘所做的试验表明,其诱导萝卜的发根量比 TR105 高 1 倍。本试验中 MT232 的毛状根诱导率低,可能是由于牡丹体内含有大量的酚类物质,造成生根困难所致。

法诱导时,乙酰丁香酮的作用不明显。

表 4 不同浓度乙酰丁香酮(As)对毛状根诱导的影响

浸蘸时 间/min	As 浓度/ ($\text{mg} \cdot L^{-1}$)	外植体 数/个	产生毛状根外 植体数/个	发根率/ %
15	60	60	7	12
	30	60	21	35
	0	60	9	15

从表 5 看出,浸蘸 15 min 最好,浸蘸 30 min 时,外植体本身所含的酚类物质从切口处外渗增多,使菌液变混浊,严重影响菌株的侵染能力。

表5 不同外植体浸蘸时间对‘紫二乔’
毛状根诱导的影响

浸蘸时间/min	外植体数/个	产生毛状根外植体数/个	发根率/%
3	30	5	17
15	30	9	30
30	30	2	7

注:菌株为 R1000,培养基中加入浓度为 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮

另外,外植体刺伤处理时,叶片打孔或茎段穿刺太多,严重影响外植体的活力,有时会造成外植体死亡,不利于发根农杆菌的侵染。叶片打孔时,要将圆孔打在叶脉处,此处含有中柱鞘,是发根农杆菌侵染的主要途径。不含中柱鞘的部位,发根农杆菌基本不能侵入。叶柄切口处比叶片圆孔处产生的毛状根多。诱导毛状根成功的外植体,65%的毛状根都生长自叶柄切口处。茎段两端切口处毛状根发生率也高于中间穿刺点,但上下切口之间毛状根的数量和生长状况无明显差别,说明根的生长已失去了极性现象。

3 小结

用发根农杆菌诱导牡丹外植体产生毛状根,毛状根诱导率随菌株不同而有所变化。R1000 菌株的侵染力最强,侵染发根率最高可以达到 35%。毛状根诱导率受浸蘸时间、菌株培养时间、外植体刺伤处理情况和某些化学物质的影响。本研究所得到的较好的发根条件是:培养基中乙酰丁香酮的加入量为 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,外植体浸蘸时间为 15 min,菌株培养时间为 28°C 振荡暗培养 28 h。

牡丹外植体表面消毒后直接用发根农杆菌侵染,成功率极低。一方面是因为外植体消毒困难,成活率低;另一方面是因为发根农杆菌的侵染成功率也不高。牡丹外植体组织培养体系的建立,是发根农杆菌诱导毛状根发生的基础。牡丹外植体接活成功率虽然很低,最高只有 3.0%,但只要有数瓶成活,再用发根农杆菌诱导毛状根就容易成功。牡丹根际萌蘖芽和茎段的较好培养基分别为:WP + 6-BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IBA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + GA₃ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 MS + 6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IBA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + GA₃ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

用发根农杆菌诱导牡丹外植体产生毛状根,是

牡丹通过组织培养技术实现工厂化生产的重要途径之一。另外,牡丹毛状根诱导后,由毛状根再产生的植株,株型明显缩小。这有利于矮化牡丹品种的培育,牡丹盆栽的前景广阔。

参考文献:

- [1] 李艳敏,罗晓芳. 牡丹离体培养与快速繁殖研究进展[J]. 西南林学院学报,2004,24(1):70~73
- [2] 郭绍霞,张玉刚,任茹. 中国牡丹研究进展[J]. 莱阳农学院学报,2003,20(2):116~121
- [3] 李玉龙,黄守印. 牡丹试管苗繁殖技术的研究[J]. 科学通报,1984(8):500~502
- [4] 孔祥生,张妙霞. 牡丹离体快繁技术研究[J]. 西北园艺,1998(3/4):87~89
- [5] Kunnemen B P, Albers M R. Tissue culture of peony is not yet producing plants [J]. Bloem Bollencultuur 1989,100(23):16~17
- [6] Bouza L, Jacques M, Miginiac E. Requirements for in vitro rooting of *P. suffruticosa* Andr. cv. Mme de vaty [J]. Scientia Horticulture, 1994,58(3):223~233
- [7] Harris R A, Mantel S H. Effects of stage (II) subculture durations on the multiplication rate and rooting capacity of micropropagated shoots of tree peony (*P. suffruticosa*) [J]. Journal of Horticultural science, 1991,66(1):95~100
- [8] 戴均贵,朱蔚华. 发根培养技术在植物次生代谢物生产中的应用[J]. 植物生理学通讯,1999,35(1):69~76
- [9] 刘传飞,于树宏,李玲,等. 发根土壤杆菌对葛属药用植物的遗传转化[J]. 植物学报,2000,42(9):936~939
- [10] 张汉明,许铁峰,丁如贤,等. 发根农杆菌 Ri T-DNA 对墨旱莲的遗传转化[J]. 中草药,2001,32(10):924~926
- [11] 徐子勤,贾敬芬,胡之德. 发根农杆菌 A4 菌株转化苜蓿悬浮培养物[J]. 生物工程学报,1997,13(1):53~57
- [12] Park SANG-UN, Facchini P J. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of opium poppy, *Papaver somniferum* L., and California poppy, *Eschscholzia californica* Cham., root cultures [J]. Journal of Experimental Botany, 2000,51(3):1005~1016
- [13] 胡忠,杨军,郭光沁,等. 宁夏枸杞发根农杆菌转化系的建立及影响转化因素的研究[J]. 西北植物学报,2000,20(5):766~771
- [14] 李玲,谢文军,于树宏,等. 发根农杆菌对雌茉莉插条不定根发生的影响[J]. 华南师范大学学报(自然科学版),2001(3):23~25
- [15] 卜学贤,林忠平,陈维伦. 农杆菌对毛白杨的转化及完整转化植株的获得[J]. 植物学报,1991,33(3):206~213
- [16] USPTO patent full text and image database [M]. United States Patent, 1986:4,588,693