

# 发根农杆菌转化龙胆再生植株的研究

刘伟华 徐香玲 李集临

(哈尔滨师范大学生物系, 150080)

本文利用具 Ri 质粒的发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 通过叶盘法对药用植物龙胆 (*Gentiana manshurica* Kitagawa) 进行了转化实验, 发根农杆菌 15834 感染龙胆, 诱发生毛状根, 并得到再生的龙胆植株。冠瘿碱检测实验表明, 再生植株显示甘露碱 (mannopine) 带, 说明发根农杆菌 Ri 质粒的 T-DNA 部分已整合到龙胆植物细胞中。再生的龙胆丛生苗可以在不含激素的简化培养基上快速繁殖, 转化的龙胆植株具有发达的根系, 根部龙胆苦甙含量比对照高, 从而为东北龙胆栽培事业的发展以及龙胆有效成份的工业化生产提供了基础资料。

**关键词:** Ri 质粒, 龙胆, 转化

东北龙胆是黑龙江省重要的资源植物, 也是著名的中药, 具有“泻肝胆实火, 除下焦湿热”之功能。近年来由于掠夺性采挖, 龙胆野生资源大量减少, 已出现供不应求的局面, 尽管国内曾有关于龙胆组织培养的报道, 但繁殖系数低、成本高, 难以在生产上应用<sup>[1,4]</sup>, 加之龙胆栽培条件苛刻, 因此, 探讨龙胆的快速繁殖, 有效成份的生产是十分必要的。

近年来, 人们对具 Ri 质粒的发根农杆菌转化植物的研究逐渐增加<sup>[2,5-11]</sup>。发根农杆菌转化植物具有使其产生大量毛状根的特点, 转化的细胞不丧失器官的发生能力, 双子叶植物中由根部合成的次生代谢物都可以用发根培养物来生产。因而利用发根农杆菌转化植物及建立发根培养系, 生产次生代谢产物(如药物, 天然色素, 香料, 天然调味品等)已日益受到重视。

本文对发根农杆菌转化龙胆进行了研究, 在诱导毛状根的基础上, 由毛状根再生出植株, 并建立了一种新的龙胆无性快速繁殖系。

## 材 料 和 方 法

试验用东北龙胆 (*G. manshurica* Kitag.) 由黑龙江省中医学院中药系提供, 发根农杆菌 (*A. rhizogenes*) 15834, A4, 2659 由日本筑波

大学基因工程实验中心提供。

### (一) 东北龙胆无菌苗的获得

龙胆种子经 100ppm 的赤霉素处理 24 小时, 流水冲洗 24 小时, 0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 8 分钟, 无菌水洗 3—4 次, 接种于 MS 基本培养基, 25℃ 条件下培养。

### (二) 叶盘法转化实验

将龙胆无菌苗叶片切成 5mm<sup>2</sup> 的小块, 在 MS 液体培养基中 25℃ 摇床培养 48 小时, 加入活化瓶过夜培养 8 小时的菌株(注菌量为 5—10×10<sup>6</sup>/ml) 共培养 48 小时, 然后转移到加有羧苄青霉素 0.5—1mg/ml 的 MS 基本培养基上, 诱导毛状根的产生。获得毛状根后经离体培养再生植株。

### (三) 龙胆植株及根系的增殖

龙胆植株及根系的增殖, 分别采用 MS、1/2MS 1/4MS 及简化的 2% 蔗糖琼脂培养基进行培养, 根的扩大培养采用相应的固体及液体培养基在光照、黑暗, 离体和非离体等不同条件下进行培养。

Liu Weihua et al.: Studies of *Agrobacterium rhizogenes* Transformation Regeneration Plantlet of *Gentiana manshurica*.

本文于 1991 年 1 月 25 日收到。

#### (四) 冠瘿碱检测<sup>[7]</sup>

待测样品在 MS 加精氨酸的液体培养基中进行过夜预培养,然后用 1% HCl 水溶提取 7—10 分钟,离心后取上清液点样进行高压纸电泳,吹干后进行染色。

#### (五) 龙胆苦甙含量的测定

龙胆根烘干至衡重,通过常规的双波长薄层扫描法进行检测(检测工作由黑龙江省商学院中药系协助完成)。

### 结果及讨论

#### (一) 发根农杆菌感染龙胆实验

利用叶盘法将具 Ri 质粒的发根农杆菌 15834, A4 及 2659 感染龙胆无菌苗叶片,并在含羧苄青霉素 0.5—1mg/ml 的 MS 基本培养基上培养,经过 18—23 天,分别在叶片切口边缘长出毛状根(图版 I, 1, 2),而对照叶片(无农杆菌感染)无毛状根产生,诱导毛状根的频率见表 1。

表 1 不同菌株感染龙胆诱导毛状根的频率

发根农杆菌	感染龙胆叶片数	产生毛状根叶片数	诱导频率(%)
15834	165	111	67.3
A4	118	73	61.9
2659	72	35	48.6

从表 1 中可以看出,发根农杆菌 15834, A4 比 2659 诱导龙胆毛状根产生的频率高。这可能是 15834、A4 菌株的 Ri 质粒编码诱导毛状根的 DNA 片段比 2659 菌株的这段 DNA 更容易整合到龙胆细胞基因组中,或龙胆叶片细胞对菌株有一定的选择性。

#### (二) 龙胆植株的再生及冠瘿碱检测

将叶盘法转化得到的毛状根取下,放在不加任何激素的 MS 基本培养基上离体培养,每隔 7—10 天继代一次,7 周后经感染发根农杆菌 15834 诱导产生的毛状根再生出龙胆的丛生苗(图版 I, 3),频率为 0.9%,再生频率低可能与龙胆自身的遗传背景及培养条件有关。对再生的龙胆植株进行冠瘿碱(opine)检测,纸电泳结果显示甘露碱(mannopine)带(图版 I,

5),表明测试样品能够合成甘露碱,从而说明发根农杆菌 15834 Ri 质粒的 T-DNA 部分已整合到被感染的龙胆细胞中,获得转化的龙胆再生植株。

#### (三) 经转化再生的龙胆丛生苗的快速繁殖

1. 转化的龙胆苗在不同培养基上的生长情况 转化的龙胆苗在 2% 蔗糖培养基中,根的生长速度最快,但长期放在 2% 蔗糖培养基上,龙胆单株可分性差,且叶片由绿变黄或变红,将这样的植株转移到 1/2MS 或 MS 培养基上,叶片重新变绿。在 MS 培养基上培养的植株,单株可分性好,可达 30—40 株,有利于龙胆苗的快速繁殖,但在 MS 培养基上培养的龙胆根系生长速度慢,如表 2。

综合分析,利用 1/2MS 和 1/4MS 培养基培养转化的龙胆苗比较适宜,即可以在较短的时间内得到大量的龙胆苗(图版 I, 4),而且苗的根系也比较发达(图版 I, 7, 8)。

2. 转化龙胆根系的扩大培养 经转化再生的龙胆,根系在固体培养基上培养,离体根系较非离体根系生长缓慢,同时离体根系在液体悬浮培养基中的扩大培养结果表明,第一个月内根生长较快,增长率为 185% (根鲜重增加 1.85 倍),随着培养时间加长,根的生长速度转慢。我们推测,这可能是由于液体培养过程中缺少氧气造成的,如果改善供氧条件,根系的生长速度可能加快。

3. 转化龙胆苗的繁殖速度 转化的龙胆丛生苗可以快速繁殖,每一叶片或每一根段经离体培养均可以得到丛生苗(图版 I, 6),以 1/2 MS 培养基培养的龙胆苗为例计算其繁殖速度,一瓶龙胆苗一个月可繁殖 10 瓶,也就是说,我们通过发根农杆菌转化得到的龙胆丛生苗以每月 10 倍的速度繁殖,这比通过一般组织培养方法进行繁殖要快得多,并且转化的龙胆苗具有显著发达的根系(图版 I, 7, 8)。

#### (四) 转化的龙胆根部龙胆苦甙含量的测定

龙胆苦甙是龙胆主要的药用成份,将 1/2

表2 转化的龙胆在不同培养基上的生长情况

效果 形态	培养基	MS	1/2 MS	1/4 MS	2%蔗糖
根系生长状况		+	++	+++	++++
叶片生长及抽茎		++++	+++	++	+
单株可分性		++++	+++	++	+

MS培养基培养2个月,经15834菌株转化的龙胆苗的试管根和同样由1/2MS培养基培养2个月,未经转化的对照龙胆苗的试管根取样,经黑龙江省商学院中药系利用双波长薄层扫描法3次重复分析提供的实验报告,结果表明,转化龙胆苗根部龙胆苦甙含量为3.36%,而未经转化的对照苗根部龙胆苦甙含量仅为2.59%。这可能是由于转化苗比未经转化的对照苗根系粗壮、发达的原因。由此可见,转化的龙胆苗不仅繁殖速度快,而且药用成份含量也很高。

通过组织培养的方法进行快速繁殖是组织培养应用于生产极有前途的一个方面,目前,国外已利用这种方法进行兰花,草莓,脱毒马铃薯等植物的商品化生产,国内的一些研究单位也相继开展了这方面的工作<sup>[3]</sup>。植物快速繁殖可以通过不定芽,胚状体以及愈伤组织三种途径进行。利用具Ri质粒的发根农杆菌感染植物诱导不定芽,胚状体再生植株,国外已进行了许

多工作,但在国内这方面的研究还很少。本文利用发根农杆菌15834转化龙胆,经毛状根再生植株得到的一种新的龙胆无性快速繁殖系进一步说明这一方法是很有前途的。

### 参 考 文 献

[1] 刘鸣远等:1988。哈尔滨师范大学自然科学学报,4(3):80—89。  
 [2] 何玉科:1990。生物工程学报,6(2):120—125。  
 [3] 杨乃博等:1979。植物生理学报,5(4):369—377。  
 [4] 张治国:1986。浙江药学,3(2):7—10。  
 [5] 张阴麟:1988。植物学报,30(4):368—372。  
 [6] Bercetche, J. et al.: 1987. *Plant Science*, 52: 195—210。  
 [7] Kamada, H. et al.: 1986. *Plant Cell Reports*, 5: 239—242。  
 [8] Kitisri, S. et al.: 1987. *Plant Mol. Biol.*, 8: 209—216。  
 [9] Lise, J.: 1987. *Plant Science*, 53: 53—63。  
 [10] Teruo, N. et al.: 1987. *Plant Cell Reports*, 6: 283—286。  
 [11] Wei Zhiming et al.: 1986. *Plant Cell Reports*, 5: 93—96。

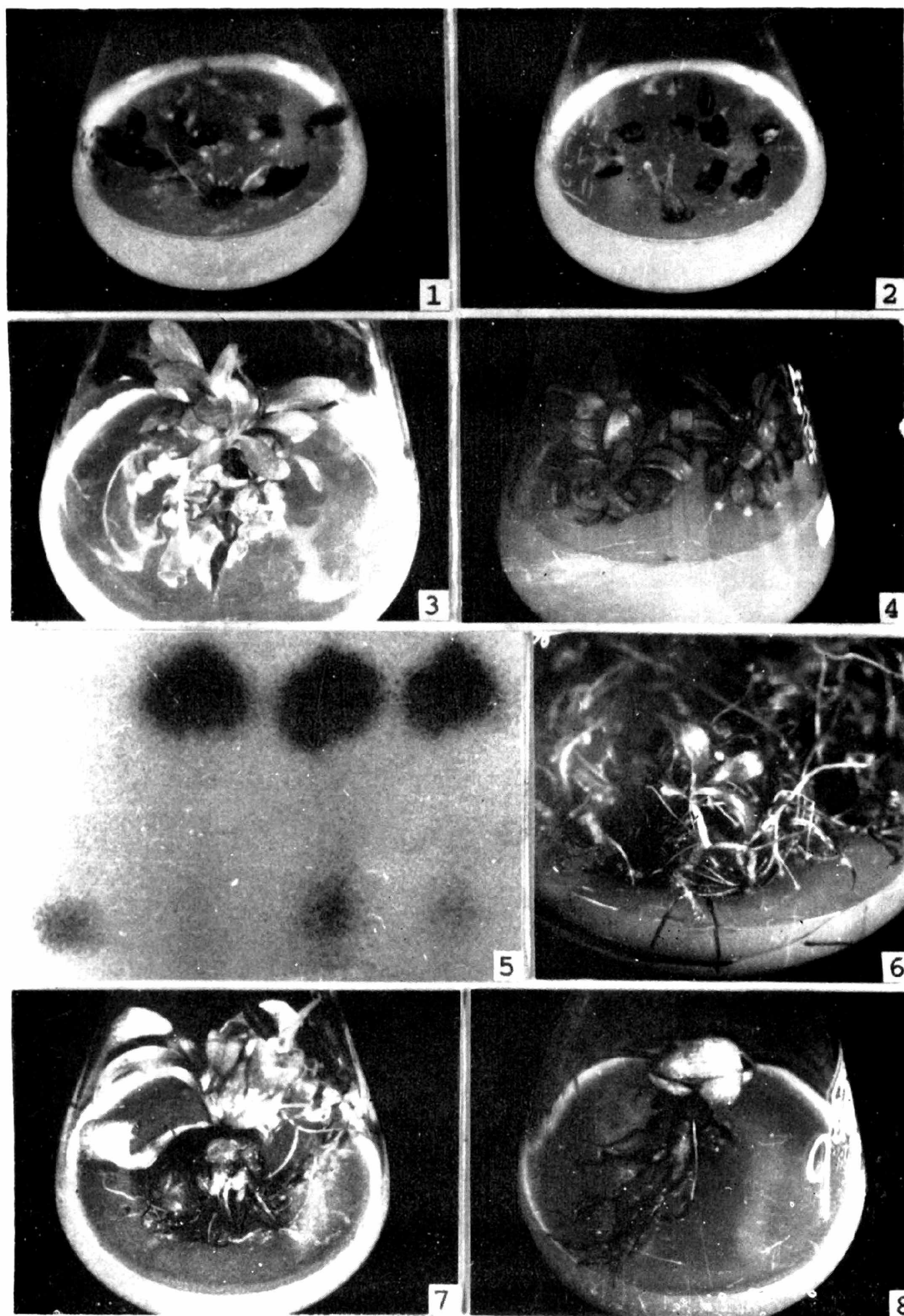
## 中国遗传学会第四届全国肤纹学学术交流会在郑召开

中国遗传学会第四届全国肤纹学学术交流会于1992年5月6—8日在河南郑州举行。来自全国22个省、市、自治区的90位专家、学者参加了这一空前的盛会。

大会共录选了113篇论文,邀请了吕学晓、郭汉壁、张海国、邵紫苑等4位专家分别就肤纹遗传学研究进展、肤纹与癌症、中国各民族肤纹学研究的现状和肤纹与运动员选材方面作了综述性专题发言,并以大会、小会形式交流了涉及遗传学、医学、胚胎学、人才学、痕迹学、方法学、动物学等各个领域的49篇论文。其中,体育界运动员选材的肤纹应用研究;一批博士、硕士研究生等年青学者在肤纹研究的深度和方法学上的进展;结合优生优育进行的肤纹应用于婚前检查;肤纹与智能的相关性研究;民族肤纹调查等方面的新研究成果引起了与会学者的关注和重视。大会还播放了两部肤纹学基础知识的科普录相片。

代表们就肤纹学的研究方向展开了广泛的讨论,认为互通信息,加强与国内、外同行的交流;在注重肤纹应用研究的同时,必须有重点的进行肤纹学基础研究;尽快开展对门巴族的肤纹研究,以完成我国完整的民族肤纹学数据库的建立;开发肤纹研究的新指标;统一肤纹学名词标准和技术标准等任务均已迫在眉捷。会议还向中国遗传学会提出了换届选举的候选人名单。

(邵紫苑)



1. *A. rhizogenes* 15834 转化龙胆诱导出毛状根； 2. *A. rhizogenes* A4 转化龙胆诱导出毛状根； 3. 经转化再生的龙胆丛生苗； 4. 再生的龙胆苗分株繁殖； 5. 对再生苗进行 opine 检测显示甘露碱带（左为甘露碱标准样）； 6. 由根段上再生的龙胆苗； 7. 8. 经转化再生的龙胆植株具有发达的根系。