

· 技术方法 ·

北玄参毛状根诱导及其植株再生

任如意*, 薛巨坤, 国会艳, 魏继承

牡丹江师范学院生命科学与技术学院, 牡丹江 157011

摘要 利用发根农杆菌A4和R1601感染北玄参(*Scrophularia buergeriana*)叶片外植体, 诱导产生毛状根, 产生的毛状根可在无激素的液体和固体MS培养基上快速生长。*rolB*基因的PCR检测表明, Ri质粒中的T-DNA片段整合到了北玄参毛状根的基因组中。毛状根在附加0.5 mg·L⁻¹ 6-BA及0.1 mg·L⁻¹ NAA的MS固体培养基上形成绿色愈伤组织, 之后形成不定芽, 并获得再生植株; 毛状根在附加0.5 mg·L⁻¹ 6-BA及0.02 mg·L⁻¹ NAA的MS固体培养基上培养约15–20天可直接形成不定芽, 且不定芽的诱导率达85%。

关键词 北玄参, 发根农杆菌, 毛状根, 植株再生

任如意, 薛巨坤, 国会艳, 魏继承 (2017). 北玄参毛状根诱导及其植株再生. 植物学报 52, 783–787.

北玄参(*Scrophularia buergeriana*)隶属玄参科(Scrophulariaceae)玄参属(*Scrophularia*), 为重要的传统药用植物, 以根入药, 富含许多天然生物活性物质, 如哈巴俄苷、毛蕊花糖苷、肉桂酸和安格洛昔等(Park et al., 2003; 吴喜民等, 2014)。该植物主要分布在我国北方地区及日本、韩国和俄罗斯远东。在我国北方常用其替代玄参入药治疗发烧、肿胀、神经炎、急性淋巴结炎、扁桃体炎和淋巴结结核等(Qian et al., 1992; 张雯洁等, 1994)。

毛状根(hairy root)是发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*) Ri质粒的T-DNA片段插入并整合到植物细胞核基因组表达后产生的不定根。它不仅可在无激素的培养基上快速生长, 合成并积累次生代谢物质; 而且生产能力稳定, 易于天然药物成分的开发利用。目前, 该方法被认为是规模化生产植物次生代谢产物最有效的途径之一(闻玉莉和杨世海, 2010; 吕政等, 2014)。据统计, 现已有150多种植物被发根农杆菌转化成功, 获得了毛状根及其再生转化植株(Lioshina and Bulko, 2014)。已有研究表明, 虽然毛状根为单细胞起源, 但由于Ri质粒的T-DNA插入片段整合在植物基因组中的位置或长度不同, 致使产生的不同毛状根不仅具有不同的遗传背景, 而且在生长或次生代谢产物产率等方面也存在差异(施和平等, 2016)。故从毛状根所产生的再生株系中可筛选到生长更快且药

用成分含量更高的新种质株系, 实现种质资源创新。但目前尚未见有关北玄参毛状根诱导及其植株再生方面的报道。本研究利用发根农杆菌A4和R1601侵染北玄参叶片外植体产生毛状根, 并对毛状根进行离体培养及植株再生, 旨在为今后北玄参药用资源的可持续发展及重要次生代谢产物的商品化生产提供一条有效途径。

1 植物材料

北玄参(*Scrophularia buergeriana* Miq.)种子由牡丹江师范学院分子生物学实验室保存。选取北玄参种子, 用0.1% HgCl₂浸泡6分钟, 无菌水冲洗4–5次, 然后转至无菌水中浸泡3–4小时, 接种至1/2MS培养基上, 25°C黑暗培养2天后, 转到16小时光照条件下培养, 待种子萌发。

2 培养基成分与培养条件

2.1 发根农杆菌菌株及其活化培养

菌株A4和R1601由牡丹江师范学院分子生物学实验室保存。在超净工作台上, 将–70°C冰箱保存的A4和R1601划线接种至固体YEB平板上培养, 28°C恒温暗培养2天左右, 挑取单菌落, 接种于液体YEB培养基

收稿日期: 2016-12-13; 接受日期: 2017-07-04

基金项目: 牡丹江师范学院省级重点创新预研项目(No.SY201318)

* 通讯作者。E-mail: swxry@126.com

中, 28°C, 150 r·min⁻¹过夜震荡培养至对数生长期, 即 OD₆₀₀=0.4–0.6, 收集菌体。之后, 用富含100 μmol·L⁻¹ AS的MS液体培养基重悬, 28°C, 150 r·min⁻¹震荡培养30分钟, 供外植体侵染使用。

2.2 毛状根诱导、鉴定及植株再生

2.2.1 毛状根的诱导

在无菌条件下, 将北玄参无菌苗幼叶剪成1 cm×1 cm的小块, 置于预培养基上培养2–3天。使用含100 μmol·L⁻¹ AS的MS液体培养基重悬的农杆菌菌液侵染10分钟后, 用无菌滤纸吸干外植体表面菌液, 并将外植体接种到1/2MS固体培养基平板上。于23°C暗培养2–3天后, 转接至含有500 mg·L⁻¹ 头孢曲松钠的1/2MS培养基上脱菌培养。每隔2天继代1次, 连续脱菌处理5–6次, 直至外植体完全除菌。切取外植体上长出的3–4 cm长的毛状根, 将一部分转接至1/2MS固体培养基上, 置于23°C培养室中光照培养; 另一部分转接至1/2MS液体培养基中, 于23°C黑暗下震荡培养。

2.2.2 毛状根*rolB*基因的检测

选取自主快速生长的无菌毛状根, 按照Rogers和Bendich (1985)的CTAB法提取DNA。纯化后用作*rolB*基因的PCR扩增模板, 按照Sharafi等(2014)的方法设计*rolB*引物: 5'-GCTCTTGCAGTGCTAGATTT-3'和5'-GAAGGTGCAAGCTACCTCTC-3' (由上海捷瑞生物工程公司合成)。PCR反应体系: 模板1 μL, 上、下游引物各0.5 μL, dNTP 1.6 μL, 10×buffer 2 μL, *Taq*酶0.5 μL, 补水13.9 μL。PCR反应程序为: 95°C5分钟预变性; 94°C30秒, 55°C30秒, 72°C60秒, 30个循环; 72°C5分钟, 保温。将PCR扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测。

2.2.3 毛状根的植株再生

将PCR检测呈阳性的北玄参毛状根剪成2–3 cm长的根段, 接种到MS+0.1–0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.02–0.1 mg·L⁻¹ NAA培养基上进行愈伤组织以及不定芽诱导。待不定芽长至3–4 cm时, 接入1/2MS+0.2 mg·L⁻¹ IBA固体培养基诱导生根, 并获得完整植株。

2.2.4 再生植株的移栽

待北玄参毛状根再生植株长至4–5 cm时, 将培养瓶

封口膜移掉。炼苗2–3天后取出, 洗净根部琼脂, 移植到含沙:泥炭土=1:2 (v/v)的营养钵中。用塑料膜覆盖4–5天后, 移去塑料膜并置于23–25°C的培养室中培养, 每天喷水1次。1周后, 每2–3天浇水1次。

3 结果与讨论

3.1 毛状根的诱导与培养

图1A为发根农杆菌A4感染北玄参叶片外植体后其产生毛状根的结果。发根农杆菌A4和R1601侵染叶片外植体约8天, 从叶片外植体切口中脉处产生白色突起; 约10–12天, 大部分叶片外植体在切口处可产生毛状根; 16–18天后, 约90%的外植体能长出大量的白色毛状根(图1A)。可见, 发根农杆菌A4和R1601能有效诱导北玄参叶片外植体产生毛状根, 诱导率分别为90%和87%, 且二者差异不显著。

将毛状根剪下置于无外源激素的1/2MS固体或液体培养基中培养, 发现毛状根均能快速自主生长; 且新长出的根一般呈白色, 分枝多, 无向地性; 但无论在固体还是液体培养基中, 随着培养时间的延长, 毛状根颜色都会慢慢变深, 并逐渐变褐。

3.2 毛状根与再生植株的*rolB*基因检测

*rolB*基因是Ri质粒T-DNA上与毛状根形成密切相关的基因之一。图2为北玄参毛状根(A4) *rolB*基因PCR扩增产物的凝胶电泳。由图2可知, 毛状根均能扩增出预期的423 bp的特异性条带, 而非转化根不能扩增出特异性条带, 表明Ri质粒含*rolB*基因的T-DNA片段已插入且整合至北玄参毛状根基因组中并且表达。实验证明所获得的可自主生长的毛状根为Ri质粒T-DNA转化毛状根。

3.3 植物生长调节剂对毛状根愈伤组织及不定芽的诱导

将快速生长且转化鉴定呈阳性的毛状根剪切成2–3 cm的根段, 分别转入表1所示的附加不同植物生长调节剂的MS培养基中培养。从表1可以看出, 培养基中生长素的浓度越高, 毛状根产生愈伤组织越快(图1B); 并且随着培养基中细胞分裂素浓度的升高, 芽点出现的速度也越快, 愈伤组织由淡黄、白色逐渐变成绿色。毛状根在MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹

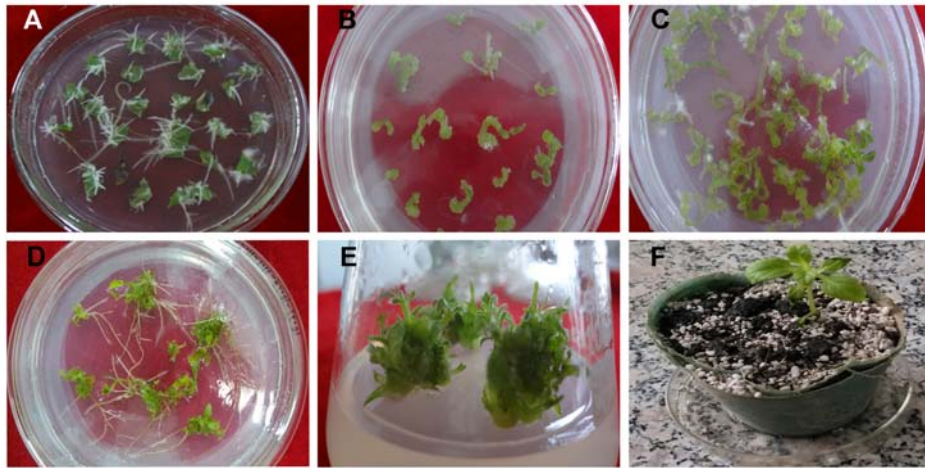


图1 北玄参毛状根的诱导、离体培养与植株再生

(A) 发根农杆菌A4侵染16天后叶片外植体产生的毛状根; (B) MS+0.2 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA培养基上毛状根形成的绿色愈伤组织; (C) MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA培养基上毛状根形成的绿色愈伤组织并有不定芽生成; (D) MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.02 mg·L⁻¹ NAA培养基上毛状根直接长出不定芽; (E) 不定芽形成的芽丛; (F) 再生植株

Figure 1 Induction, *in vitro* culture and plants regeneration of hairy root in *Scrophularia buergeriana*

(A) Hairy root formation from leaf explants 16 days after infection with the strain of *Agrobacterium rhizogenes* A4; (B) Green callus induction on hairy roots in medium MS+0.2 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA; (C) Green callus and adventitious buds induction on medium MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA; (D) Adventitious shoots formation on medium MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.02 mg·L⁻¹ NAA; (E) Adventitious buds; (F) Transplanted plant

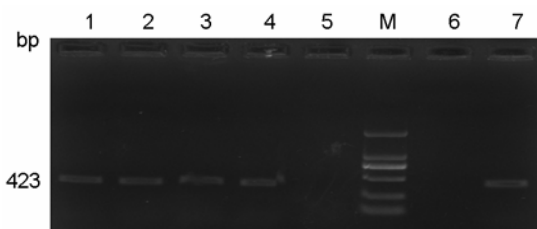


图2 北玄参毛状根(A4) *rolB*基因PCR扩增产物的凝胶电泳
1—4: 毛状根DNA扩增片段; 5, 6: 非转化根DNA扩增结果; 7: 发根农杆菌菌落扩增的片段; M: DL2000 marker

Figure 2 Gel electrophoresis analysis of PCR fragments of *rolB* gene amplified from the genome DNA of hairy roots (A4)

1—4: Fragments amplified from genome DNA of hairy roots; 5, 6: Amplification products from genome DNA of untransformed roots; 7: Fragments amplified from the colony of *Agrobacterium rhizogenes*; M: DL2000 marker

NAA培养基上形成的愈伤组织呈绿色, 继代1—2次就可以出现芽点(图1C); 在MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.02 mg·L⁻¹ NAA培养基上培养约15—20天, 毛状根可直接形成不定芽, 且不定芽诱导率较高, 约为85% (图

1D)。

3.4 不定芽的生根与移栽

将上述毛状根产生的不定芽丛切下, 转接到MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.02 mg·L⁻¹ NAA培养基上进行继代增殖(图1E)。待不定芽长至3—4 cm时, 选取健壮完整的不定芽切下并转接到1/2MS+0.2 mg·L⁻¹ IBA固体培养基上诱导生根。15—20天后, 可观察到不定芽的基部长出大量的不定根, 之后形成完整的再生植株, 生根率达100%。

生根培养20—25天后, 将根系发达且生长健壮的再生植株移栽至土:河沙=2:1 (v/v)的营养钵中(图1F), 炼苗2—3天。之后, 用塑料袋遮盖4—5天。移去塑料袋, 每天喷水, 幼苗移栽的成活率可达95%。

3.5 讨论

利用生长迅速、次生代谢物产率高且稳定的毛状根培养物生产药用植物的次生物质已有不少报道(施和平等, 2003; 付春祥等, 2004)。但利用发根农杆菌对北玄参进行遗传转化, 用毛状根生产其药用成分至今未

表1 6-BA和NAA组合对北玄参毛状根愈伤组织诱导及植株再生的影响**Table 1** Effect of 6-BA and NAA on callus induction and adventitious shoots formation of hairy roots in *Scrophularia buergeriana*

Med-ium	6-BA (mg·L ⁻¹)	NAA (mg·L ⁻¹)	Change of hairy roots
1	0.1	0.02	Few adventitious buds induced
2	0.1	0.1	Formation of light yellow callus
3	0.2	0.02	Few adventitious buds induced
4	0.2	0.1	Formation of green callus
5	0.5	0.02	More adventitious buds developed
6	0.5	0.1	Firstly formed green callus, then developed more adventitious buds

见正式报道。本研究结果表明,发根农杆菌A4以及R1601感染北玄参叶片外植体后都可高效地诱导其产生毛状根,且毛状根都是从被感染叶片外植体的切口处未经愈伤组织阶段直接形成。这与Ri质粒转化胡萝卜(*Daucus carota*)块根切片和烟草(*Nicotiana tabacum*)茎切段时,先形成愈伤组织,再产生毛状根的方式不同(Bercetche et al.,1987)。然而,发根农杆菌侵染五寸石竹(*Dianthus chinensis*)叶片外植体后,毛状根是从外植体切口处直接产生(施和平等,2016);但新疆雪莲(*Saussurea involucrata*)外植体感染发根农杆菌后,即从外植体切口处形成愈伤组织,之后产生毛状根(付春祥等,2004)。而发根农杆菌感染商陆(*Phytolacca acinosa*)叶片外植体时,毛状根既可直接从叶片切口处直接产生,也可从叶片切口处形成的愈伤组织上长出(施和平等,2003)。可见,发根农杆菌侵染植物细胞后,毛状根的形态发生方式会因植物种类和感染部位等不同而有所差异。

能否从毛状根获得再生植株,是利用毛状根进行植物种质创新的前提。已有研究表明,毛状根可通过直接产生不定芽或通过先形成愈伤组织再分化出不定芽的方式进行植株再生(付春祥等,2004;施和平等,2016)。例如,新疆雪莲毛状根在附加0.5 mg·L⁻¹ IBA的N₆培养基中培养后先形成愈伤组织,该愈伤组织在MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA分化培养基中的幼芽分化率可达80% (付春祥等,2004);而五寸石竹毛状根在MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA固体培养基上产生出疏松的绿色愈伤组织,接种至MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.02 mg·L⁻¹ NAA固体培

养基上可产生不定芽,进而得到再生植株(施和平等,2016),与本研究结果不同。本实验中,发根农杆菌A4以及R1601诱导的北玄参毛状根接种至MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA培养基后,先形成绿色愈伤组织,之后通过继代培养从愈伤组织产生不定芽,获得再生植株。此外,北玄参毛状根也可以在MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.02 mg·L⁻¹ NAA培养基上培养约15–20天直接产生不定芽(形成频率较高),发育成再生植株。然而,张继栋等(2008)的研究表明,木本曼陀罗(*Datura arborea*)的毛状根也能直接形成不定芽或经愈伤组织阶段再产生不定芽,实现植株再生,表明毛状根的植株再生方式会因植物类型和激素组成不同而异。此外,本实验中,6-BA是北玄参毛状根不定芽形成的重要激素,而毛状根愈伤组织的形成与生长素浓度直接相关,一定浓度的6-BA与低浓度的NAA结合可导致毛状根的高频植株再生,这与牛至(*Origanum vulgare*) (Habibi et al., 2016)、五寸石竹(施和平等,2016)、垂枝山荆子(*Malus baccata*) (Wu et al., 2012)和黄花乌头(*Aconitum coreanum*) (刘莉莉等,2015)等毛状根的再生情况相似。

本研究利用发根农杆菌A4和R1601介导的遗传转化,获得可自主生长的北玄参毛状根及其再生植株,为今后利用毛状根技术规模化生产北玄参药用组分及培育北玄参新种质奠定了实验和技术基础。

参考文献

- 付春祥, 金治平, 杨睿, 吴风燕, 赵德修 (2004). 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 **20**, 366–371.
- 刘莉莉, 卢淑波, 徐佳萍, 张庆田, 李昌禹 (2015). 以黄花乌头发根为外植体的再生培养体系建立. 植物学报 **50**, 623–627.
- 吕政, 张淑丽, 路放, 杨世海 (2014). 关苍术毛状根培养体系建立及其多糖含量测定. 中国药学杂志 **49**, 1386–1392.
- 施和平, 梁朋, 权宏 (2003). 商陆毛状根的诱导、培养及其皂甙的产生. 生物工程学报 **19**, 46–49.
- 施和平, 王蓓, 杨树楠, 郭亚鹏 (2016). 五寸石竹毛状根诱导及其植株再生. 植物学报 **51**, 363–368.
- 闻玉莉, 杨世海 (2010). 罗勒毛状根的诱导及培养. 安徽农业科学 **38**, 1727–1730.
- 吴喜民, 张刘强, 陈小冲, 冯丽, 邢旺兴, 李医明 (2014). 北

- 玄参根中的一个新环烯醚萜衍生物. 药学学报 **49**, 1019–1021.
- 张继栋, 杨雪清, 乔爱民, 孙敏, 何生根, 雷枢, 尹彩霞 (2008). 木本曼陀罗毛状根植株再生体系的建立. 热带亚热带植物学报 **16**, 480–485.
- 张雯洁, 刘玉青, 李兴从, 浦湘渝, 金永清, 杨崇仁 (1994). 中药玄参的化学成分. 云南植物研究 **16**, 407–412.
- Bercetche J, Chriqui D, Adam S, David C (1987). Morphogenetic and cellular reorientations induced by *Agrobacterium rhizogenes* (strains 1855, 2659 and 8196) on carrot, pea and tobacco. *Plant Sci* **52**, 195–210.
- Habibi P, de Sa MFG, da Silva ALL, Makhzoum A, da Luz Costa J, Borghetti IA, Soccol CR (2016). Efficient genetic transformation and regeneration system from hairy root of *Origanum vulgare*. *Physiol Mol Biol Plants* **22**, 271–277.
- Lioshina LG, Bulko OV (2014). Plant regeneration from hairy roots and calluses of periwinkle *Vinca minor* L. and foxglove purple *Digitalis purpurea* L. *Cytol Gen* **48**, 302–307.
- Park SU, Chae YA, Facchini PJ (2003). Genetic transformation of the figwort, *Scrophularia buergeriana* Miq., an oriental medicinal plant. *Plant Cell Rep* **21**, 1194–1198.
- Qian JF, Hunkler D, Rimpler H (1992). Iridoid-related aglycone and its glycosides from *Scrophularia ningpoensis*. *Phytochemistry* **31**, 905–911.
- Rogers SO, Bendich AJ (1985). Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol Biol* **5**, 69–76.
- Sharafi A, Sohi HH, Azadi P, Sharafi AA (2014). Hairy root induction and plant regeneration of medicinal plant *Draacocephalum kotschyi*. *Physiol Mol Biol Plants* **20**, 257–262.
- Wu J, Wang Y, Zhang LX, Zhang XZ, Kong J, Lu J, Han ZH (2012). High-efficiency regeneration of *Agrobacterium rhizogenes*-induced hairy root in apple rootstock *Malus baccata* (L.) Borkh. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **111**, 183–189.

Induction of Hairy Roots of *Scrophularia buergeriana* and Its Plant Regeneration

Ruyi Ren^{*}, Jukun Xue, Huiyan Guo, Jicheng Wei

College of Life Sciences and Technology, Mudanjiang Normal University, Mudanjiang 157011, China

Abstract Hairy roots were induced by infecting leaf explants of *Scrophularia buergeriana* with *Agrobacterium rhizogenes* strains A4 and R1601. Hairy roots could grow rapidly and autonomously in liquid or solid plant-growth regulator-free MS medium. The transformation was confirmed by PCR amplification of the *rolB* gene of the Ri plasmid from *S. buergeriana* hairy roots. Hairy roots could form green callus in MS medium with 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA and 0.1 mg·L⁻¹ NAA, then regenerated plantlets were induced from the callus. A whole transgenic plantlet was obtained. Adventitious buds could be directly induced from hairy roots in MS medium with 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA and 0.02 mg·L⁻¹ NAA after about 15–20 d, with the induction rate of buds up to 85%.

Key words *Scrophularia buergeriana*, *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root, plant regeneration

Ren RY, Xue JK, Guo HY, Wei JC (2017). Induction of hairy roots of *Scrophularia buergeriana* and its plant regeneration. *Chin Bull Bot* **52**, 783–787.

* Author for correspondence. E-mail: swxrry@126.com

(责任编辑: 孙冬花)