

文章编号: 1001-1498(2007)02-0292-04

## 发根农杆菌诱导牡丹生根的初步研究

杨至德<sup>1</sup>, 王雁<sup>2\*</sup>, 刘雪梅<sup>1</sup>, 缪崑<sup>2</sup>, 汤巧香<sup>1</sup>

(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-de<sup>1</sup>, WANG Yan<sup>2</sup>, LIU Xue-mei<sup>1</sup>, MIAO Kun<sup>2</sup>, TANG Qiao-xiang<sup>1</sup>

(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 mg · L<sup>-1</sup>; 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 mg · L<sup>-1</sup> + BA 0.1 mg · L<sup>-1</sup> + GA<sub>3</sub> 0.5 mg · L<sup>-1</sup> for base buds, and MS + 6-BA 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + BA 0.1 mg · L<sup>-1</sup> + GA<sub>3</sub> 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 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<sup>[1,2]</sup>,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<sup>[3,4]</sup>,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<sup>[5]</sup>,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<sup>[6,7]</sup>。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<sup>[8,9]</sup>。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<sup>[10~14]</sup>。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:2%的次氯酸钠,消毒 45 min; 0.1%的升汞,消毒 15 min; 0.1%升汞消毒 10 min,转入 2%次氯酸钠+氨基青霉素  $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,消毒 15 min。褐化处理设 3 个:流水浸泡 24 h+活性炭 ( $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ); 1% PVP; 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  $0.5, 2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; BA 分别为  $0.1, 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{GA}_3$  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, HZ200LB 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  $28\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  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 WP<sub>0</sub> 和 MS<sub>0</sub> 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 号消毒方法,成活率可以达到 3%,而用 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		200	199	1	0.5
		200	199	0	0.0
		200	198	2	1.0
根际萌蘖芽		200	197	3	1.5
		200	197	3	1.5
		200	194	6	3.0

注: 2%的次氯酸钠,消毒 45 min; 0.1%的升汞,消毒 15 min; 0.1%升汞 10 min,转入 2%次氯酸钠+氨基青霉素  $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,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  $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +BA  $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + $\text{GA}_3$   $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

$L^{-1}$ 和  $MS + 6BA 20 mg \cdot L^{-1} + BA 0.1 mg \cdot L^{-1} + GA_3 0.5 mg \cdot L^{-1}$ 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  $19 g \cdot kg^{-1}$ ,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, 号和 号处理效果较好,而 号处理效果不明显(表 2)。

表 2 接种后不同时间段的褐化程度

处理	时段 /h			
	6	24	48	144
轻	轻	中	中	中
轻	中	中	重	重
轻	轻	轻	中	中

注: 为流水浸泡 24 h+活性炭 ( $3 g \cdot L^{-1}$ ); 为 1% PVP; 为流水浸泡 24 h+1% PVP+活性炭 ( $3 g \cdot L^{-1}$ )。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  $40 mg \cdot L^{-1}$ 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  $20 mg \cdot L^{-1}$ 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  $30 mg \cdot L^{-1}$ 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<sup>[15]</sup>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<sup>[16]</sup>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(A<sub>s</sub>)对毛状根诱导的影响

浸蘸时 间/min	A <sub>s</sub> 浓度 / ( $mg \cdot L^{-1}$ )	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 h,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%,但只要为数瓶成活,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  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + BA  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + GA<sub>3</sub>  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和 MS + 6-BA  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + BA  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + GA<sub>3</sub>  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

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]. B loem Bollencultuur 1989, 100(23): 16~17
- [6] Bouza L, Jacques M, Miginac 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.发根农杆菌对烯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