

发根农杆菌介导的长春花高效转基因体系的建立

杨致荣¹, 王兴春², 薛金爱¹, 李润植^{1,*}

山西农业大学¹分子农业与生物能源研究所, ²生命科学学院, 山西太谷030801

摘要: 以长春花幼叶为外植体建立了发根农杆菌介导的长春花高效遗传转化体系, 主要技术环节为: 用携带有基因表达载体的发根农杆菌R1000侵染幼嫩叶片, 侵染的叶片外植体与发根农杆菌共培养2 d, 外植体移至除菌培养基除菌培养2~3周, 切取外植体上诱导长出的毛状根置于筛选培养基上培养1~2周, 最后对筛选出的阳性毛状根无性系进行扩繁。筛选出的阳性毛状根经GUS染色和PCR分子鉴定表明, 该方法的发根诱导率和阳性转化率分别为 $82\% \pm 2.49\%$ 和100%。该转化方法所获得的毛状根系数量大、质量高、遗传稳定且所需时间短, 明显优于现有的长春花遗传转化技术, 是长春花遗传转化的高效便捷体系。

关键词: 长春花; 发根农杆菌; Ri质粒; 遗传转化; 毛状根

An Efficient Transgenic System of *Catharanthus roseus* Mediated by *Agrobacterium rhizogenes*

YANG Zhi-Rong¹, WANG Xing-Chun², XUE Jin-Ai¹, LI Run-Zhi^{1,*}

¹Institute of Molecular Agriculture & Bioenergy, ²College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China

Abstract: In this study, an efficient genetic transformation system of *Catharanthus roseus* with *Agrobacterium rhizogenes* was developed. The main steps of the system include infecting young leaf explants from the sterilized seedlings of *C. roseus* with *A. rhizogenes* R1000 harboring an expression vector, and then co-culturing the infected leaf explants with the bacteria for two days, followed by disinfecting culture of the infected explants in the disinfected medium for two to three weeks. Putative transformed hairy roots were excised from the explants and further selected in the selection medium containing antibiotics. The positive hairy root lines were used for propagation in liquid medium. The GUS histochemical stain and PCR amplification of the genes in Ri plasmid and expression vector revealed that the induction rate of hairy root and positive transformation rate were $82\% \pm 2.49\%$ and 100%, respectively. The hairy roots obtained by this protocol are high quality, vast growth and genetic stability, and are much better than those obtained by other methods. This transgenic protocol provides a valuable and efficient method for *C. roseus* transformation.

Key words: *Catharanthus roseus*; *Agrobacterium rhizogenes*; Ri plasmid; genetic transformation; hairy root

长春花为夹竹桃科(Apocynaceae)长春花属多年生草本植物。原产于南亚、非洲东部及美洲热带, 我国主要在长江以南地区栽培。长春花既是一种优良的园艺观赏植物, 又是一种重要的药用植物。尤其是长春花植株体内含有长春碱(vinblastine)等70多种萜类吲哚生物碱(terpenoid indole alkaloids, TIAs), 这些生物碱具有广泛的生理活性和重要的药用价值, 是国际上应用最多的抗癌植物药源之一(Zhou等2009)。然而, 这些次生代谢产物在长春花中含量很低, 而且化学结构复杂, 很难化学合成或合成成本很高(Suttipanta等2011)。目前获得这些珍贵次生化合物的主要途径仍是从

长春花中提取(Zhou等2011), 其生产量有限, 不能满足医药市场的需求。

应用基因工程提高长春花植物组织目标生物碱含量是解决长春花生物碱含量低的最佳途径, 这就需要建立长春花植物高效遗传转化技术体系。转基因毛状根(hairy root)的培养是20世纪80年代后期发展起来的一项基因工程和细胞工程相

收稿 2012-08-24 修定 2012-09-13

资助 国家自然科学基金(31100235)、山西省青年科技研究基金(2010021030-1)和中国博士后研究经费(80839)。

* 通讯作者 (E-mail: rli2001@hotmail.com; Tel: 0354-6287191-306)。

结合的技术(陈伟莉等2010),在大规模生产具有重要医用价值的植物次生代谢物方面具有广阔的应用前景(Georgiev等2007)。发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes* Conn.)是根癌菌属的一种土壤细菌,能侵染几乎所有的双子叶植物和少数单子叶植物。发根农杆菌侵染植物后,能将本身细胞中的Ri (root induction)质粒环上的T-DNA片段整合到植物细胞核基因组中,从而诱导植物细胞产生毛状根(于艳丽等2008)。由于发根农杆菌转化植物产生的毛状根来源于同一个植物细胞,因此毛状根的每一个细胞都是转化的,便于遗传操作。发根农杆菌Ri质粒转化所产生的毛状根遗传稳定,生长扩张快,生物量大,适于应用基因修饰技术研究和作为一个独特的生物反应器进行大规模生产。

应用发根农杆菌诱导长春花幼茎产生毛状根的转基因研究已有报道(Choi等2004),但这种方法产生毛状根存在诱导时间较长、假阳性率高和筛选周期长等不足。本文以长春花幼叶为外植体,应用发根农杆菌R1000介导,建立了一套高效毛状根转基因体系。Ri质粒基因及GUS报告基因和抗性基因检测表明长春花发根阳性转化率达100%。与以幼茎为外植体的转基因技术体系相比,该技术体系具有获得的毛状根系数量大、质量高、遗传稳定和所需时间短等优点,为长春花抗癌生物碱的代谢工程及工业化生产提供了一套高效的遗传转化体系。

材料与方 法

1 材 料

实验用双元表达载体为pKYLX71载体,该载体携带GUS报告基因和卡那霉素(Kan)抗性基因。发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes* Conn.)菌株为本实验室保存的R1000。长春花(*Catharanthus roseus* L.)种质材料为‘初吻(绯红)’(first kiss blush)品种。

2 培 养 基

LB培养基: 10 g·L⁻¹ NaCl, 10 g·L⁻¹ 蛋白胨, 5 g·L⁻¹ 酵母提取物, 固体LB添加15 g·L⁻¹ 琼脂粉。

萌发培养基: 1/2 MS盐(Sigma-Aldric, 货号M5524), 10 mg·L⁻¹ VB₁, 1 mg·L⁻¹ VB₃, 1 mg·L⁻¹ VB₆, 100 mg·L⁻¹ 肌醇, 30 g·L⁻¹ 蔗糖, 8 g·L⁻¹ 琼脂粉, pH 5.7。

除菌培养基: 萌发培养基加400 mg·L⁻¹的头孢噻肟钠。

筛选培养基: 1/3 SH盐(Sigma-Aldric, S6765), 10 mg·L⁻¹ VB₁, 1 mg·L⁻¹ VB₃, 1 mg·L⁻¹ VB₆, 100 mg·L⁻¹ 肌醇, 400 mg·L⁻¹ 的头孢噻肟钠, 100 mg·L⁻¹ 卡那霉素, 30 g·L⁻¹ 蔗糖, 8 g·L⁻¹ 琼脂粉, pH 5.7。

3 方 法

3.1 长 春 花 无 菌 苗 的 培 育

长春花种子首先用75% (V/V)乙醇浸泡表面消毒3 min, 然后用30% (V/V)的次氯酸钠加0.1% (V/V) Triton X-100溶液浸泡17 min, 无菌水洗5~6次。消毒后的种子播于萌发培养基。萌发的种子在25 °C培养2 d后, 放入30 °C恒温培养箱暗培养2 d, 最后再转移到25 °C培养室培养成无菌苗。光周期为16 h光照/8 h黑暗, 光照强度100~150 μmol·m⁻²·s⁻¹。选择萌发3~5周的无菌幼苗, 分别取其叶片和幼茎为外植体用于后续遗传转化。

3.2 质 粒 和 发 根 农 杆 菌 的 制 备

将构建的pKYLX71-35S-GUS表达载体通过冻融法转入发根农杆菌R1000感受态细胞, 在含有50 mg·L⁻¹卡那霉素抗性上进行转化体筛选。提取质粒并应用PCR鉴定阳性克隆。

将鉴定的阳性克隆接种到20 mL含有50 mg·L⁻¹卡那霉素的液体LB中, 28 °C 200 r·min⁻¹过夜培养, 待其OD值A₆₀₀达到0.6~0.8时停止培养。菌液6 400×g离心10 min后, 弃上清液。将细胞沉淀重悬至15 mL液体LB培养基中, 调整细胞密度使A₆₀₀大约至0.5时, 用于侵染长春花叶片及茎外植体。

3.3 培 养 基 的 选 择

将无菌培养20 d的长春花幼苗叶片切成约0.5 cm×0.5 cm小块, 在野生型发根农杆菌R1000 LB溶液中浸泡10 min后取出, 用灭菌滤纸吸干叶片表面的菌液。带菌叶片外植体分别在不含任何激素和抗生素的1/2 MS、1/2 B5和1/3 SH培养基上暗培养2 d后, 将叶片用无菌水洗2~3次, 然后在含800 mg·L⁻¹的头孢噻肟钠溶液中浸泡30 min。取出叶片外植体, 用无菌水冲洗5~6次, 灭菌滤纸吸干叶表面水分后, 分别培养在含400 mg·L⁻¹头孢噻肟钠的1/2 MS、1/2 B5或1/3 SH固体培养基上。25 °C暗培养, 每2周换一次新的培养基。每种培养基一个

培养皿接种10个叶片外植体,重复10次。通过观察统计叶片外植体诱导愈伤组织以及愈伤组织形成毛状根所需时间和生长状况确定最佳培养基。

3.4 卡那霉素筛选浓度的确定

将野生型农杆菌诱导产生的毛状根切下,转移至含有400 mg·L⁻¹头孢噻肟钠和0、25、50、100和150 mg·L⁻¹卡那霉素的1/3 SH培养基上进行筛选培养,每种处理接25个毛状根系,重复4次。观察统计其生长状况,确定筛选转基因毛状根所需的最佳抗生素浓度。

3.5 毛状根的离体培养和优良无性系的选择

用含有GUS基因表达载体(pKYLX71)的发根农杆菌对长春花叶片外植体进行侵染和转化。将长春花无菌幼叶外植体在LB稀释的菌液中浸泡10 min后取出,用无菌滤纸吸干叶片表面的菌液。带菌的叶片外植体在不含抗生素的最佳培养基上暗培养2 d后,将叶片用无菌水润洗2~3次,然后在含800 mg·L⁻¹的头孢噻肟钠溶液中浸泡30 min。取出叶片外植体,用无菌水冲洗5~6次。无菌滤纸吸干叶表面水分后,置于含有400 mg·L⁻¹头孢噻肟钠的相应培养基上进行除菌培养。

2~3周后长出愈伤组织,并开始分化产生毛状根。将毛状根切下,转移至含有400 mg·L⁻¹的头孢噻肟钠和最佳卡那霉素筛选浓度的1/3 SH培养基进行抗性筛选培养。1~2周后,选择生长较快,开始分枝的阳性毛状根进行继代单独培养。3~4周更换一次培养基,待其大量分枝生出后,切取一段于含有25 mL 1/3 SH液体培养基(只含有400 mg·L⁻¹的头孢噻肟钠)的三角瓶中扩繁培养。3~4周更换一次新鲜培养基,以获得大量优质无性毛状根系。

3.6 转基因毛状根的检测

3.6.1 转基因毛状根的形态鉴定 对比观察含有GUS基因表达载体(pKYLX71)的发根农杆菌R1000感染幼茎和叶片外植体在含有抗生素Kan的1/3 SH培养基上的毛状根诱导和生长速度、毛状根形态及分支量等生长表型。

3.6.2 GUS染色 将培养2~3周的出现分枝的白色毛状根切取一段,置于加有1 mL 5-溴-4-氯-3-吲哚葡萄糖苷(X-gluc)染液[50 mmol·L⁻¹磷酸缓冲溶液(pH 7.0), 1 mg·mL⁻¹ X-gluc]的Eppendorf管中, 37 °C

保温5~8 h,观察显色反应。呈蓝色反应的为转基因GUS株系,可作为阳性转基因毛状根于新的固体培养基中独立培养。

3.6.3 PCR检测 按DNA提取试剂盒(Qiagen,货号69104)提取GUS染色阳性的毛状根核基因组DNA。扩增农杆菌Ri质粒基因引物(rolB-f: 5' CT-TATGACAACTCATAGATAAAGGTT 3'和rolB-r: 5' TCGTAACTATCCAACCTCACATCAC 3'; rolC-f: 5' CAACCTGTTTCCTACTTTGTAAAC 3'和rolC-r: 5' AAACAAGTGACACACTCAGCTTCT 3'; virC-f: 5' GGCTTCGCCAACCAATTTGGAGAT 3'和virC-r: 5' TTTTGCTCCTTCAAGGGAGGTGCC 3')和载体pKYLX71上抗性基因及报告基因(Kan-f: 5' TCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAGGCG 3'和Kan-r: 5' ATGGCATACTTATCCGCAACTTC 3'; GUS-f: 5' ACGGATGGTATGTCCAAAGC 3'和GUS-r: 5' AACGTATCCACGCCGTATTC 3')。用“PCR Master Mix”试剂盒,以毛状根核基因组DNA为模板进行PCR扩增。PCR反应体系(20 μL)为:模板10 ng, 10 μmol·L⁻¹上下游引物各0.5 μL, Master Mix 10 μL。扩增条件为:95 °C预变性3 min;按95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 35个循环。反应结束后,在含溴化乙锭的0.8%的琼脂糖凝胶上电泳检测,紫外灯下观察、拍照。

3.7 总生物碱的提取和检测

分别随机选取25个叶片和茎诱导产生的毛状根无性系以及无菌幼苗为试材,测定每个样品中总生物碱的含量。生物碱的提取及测定参照Suttipanta等(2011)的方法并适当修改。将样品冷冻干燥至恒重,于研钵中研碎。称取1.00 g样品,加入10 mL甲醇过夜提取,离心后取甲醇提取液50 °C减压蒸干,残渣用水溶解,并用HCl调节pH至3.0,再以石油醚萃取。水相用1 mol·L⁻¹ NaOH调节pH至8.5后用CH₂Cl₂萃取,减压蒸干CH₂Cl₂提取液并称重即为长春花各材料中总生物碱含量。

实验结果

1 长春花不同外植体发根诱导率和生长速率比较

分别以长春花无菌苗的叶片和幼茎为外植体,用含GUS基因的发根农杆菌R1000感染。发根诱导率统计分析表明,叶片和茎的发根诱导率分别

为 $82\% \pm 2.49\%$ 和 $63\% \pm 6.33\%$, 以幼叶为外植体的诱导率明显高于幼茎。野生型发根农杆菌R1000和转*GUS*基因发根农杆菌R1000感染发根诱导率无明显差异(表1)。

表1 长春花叶片和茎外植体的毛状根诱导率

Table 1 The induction rates of hairy roots from leaf and stem explants of *C. roseus*

农杆菌	外植体类型	侵染的外植体数/个	重复次数/次	生根的外植体数/个	诱导率/%
含表达载体农杆菌	叶片	10	10	8.2±0.25	82±2.49
含表达载体农杆菌	茎	10	10	6.3±0.63	63±6.33
无表达载体农杆菌	叶片	10	10	8.1±0.18	81±1.80

诱导率(%)=产生发根的外植体数/接种外植体数×100。

由叶片外植体产生的毛状根生长迅速, 多分支, 根呈白色且多毛(图1-B~E)。而由茎外植体诱导的毛状根多数生长缓慢, 分支少或不分支, 在连续抗性培养基上培养的过程中逐渐褐化死亡(图2-B~D)。在相同培养条件下, 叶片诱导产生的毛状根的生物量也高于茎外植体诱导的毛状根(图3), 其中培养28 d的尤为明显, 此时叶片外植体产生的毛状根是茎外植体的1.68倍。

2 毛状根培养条件的优化

2.1 培养基的选择

三种不同的培养基上诱发产生毛状根生长情况分析表明, 不同培养基对发根的诱导及毛状根生长的影响差异明显(表2)。虽然3种培养基都能

诱导外植体长出愈伤组织, 但在随后的培养中, 表型差异开始显现。1/2 MS培养基上愈伤组织分化生根速度快, 毛状根生长迅速, 生根的叶片逐渐变绿, 切除毛状根后的叶片一周后再次诱导产生毛状根。1/2 B5培养基上产生的毛状根生长较1/2 MS培养基上速度慢, 生根的叶片逐渐变黄, 切根后的叶片再次诱导产生毛状根的速度较慢。1/3 SH培养基上愈伤组织诱导生根最慢, 生根叶片很快变为褐黄色, 根逐渐失去营养停止生长。不同培养基毛状根诱导率有较大差别, 其中1/2 MS高达 $82\% \pm 2.49\%$ 。可见, 1/2 MS是3种培养基中的最佳诱导长春花叶片产生毛状根的培养基。这与Sutti-panta等(2011)选用的幼茎培养基一致, 表明幼叶和

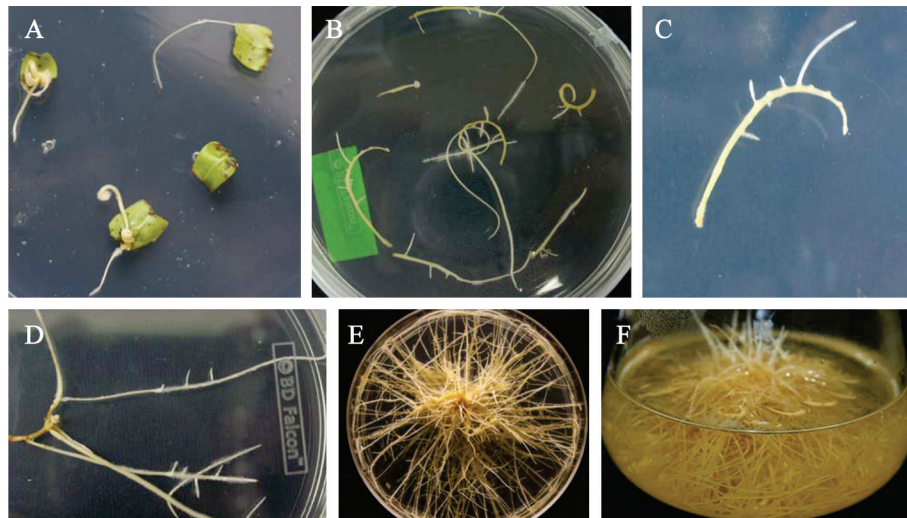


图1 长春花叶片诱导产生毛状根培养体系的建立

Fig.1 Establishment of hairy root lines from leaf explants of *C. roseus* infected by *A. rhizogens* R1000

A: 农杆菌侵染叶片产生毛状根; B: 毛状根的离体及抗生素培养基筛选培养; C: 选择毛状根在抗性培养基上独立培养; D: 在抗性培养基上独立培养的毛状根开始分枝, 根白色多毛状; E: 抗性培养基上独立培养的毛状根生长迅速, 成簇状; F: 切取段独立培养的阳性转基因簇状毛状根于液体培养基大量扩繁和培养。

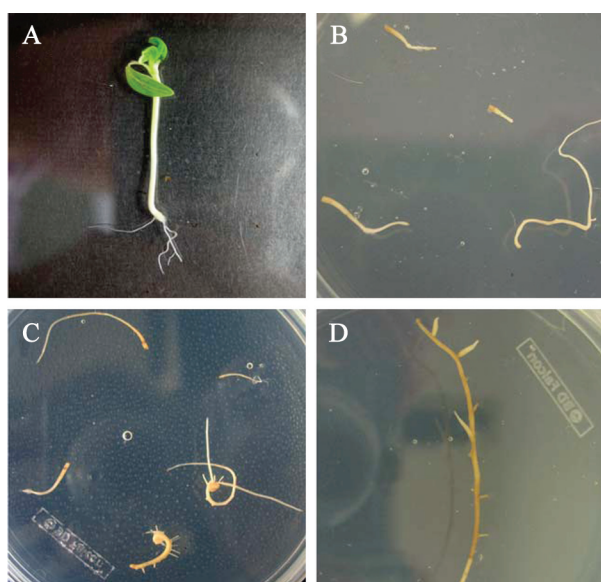


图2 农杆菌R1000诱导长春花幼茎产生的毛状根
Fig. 2 Hairy roots from stem explants of *C. roseus* infected by *A. rhizogens* R1000

A: 农杆菌感染幼茎产生的毛状根; B和C: 毛状根在含有抗生素培养基上的离体筛选培养; D: 独立培养的假阳性毛状根在抗性培养基上生长时褐化。

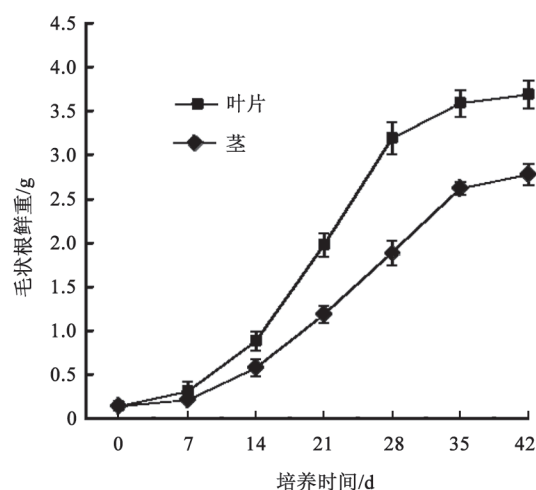


图3 长春花叶片和茎外植体产生的毛状根液体培养生长曲线
Fig.3 The growth curve of hairy roots from leaf and stem explants of *C. roseus* in liquid culture

幼茎所需培养条件是相同的。

2.2 卡那霉素最适筛选压

在不含卡那霉素的培养基上, 97%以上野生农杆菌诱导产生的毛状根都能生长。当卡那霉素

表2 不同培养基上长春花毛状根的诱导率

Table 2 Induction rate of hairy roots of *C. roseus* infected by *A. rhizogens* on different media

培养基	侵染的外植体数/个	重复次数/次	生根的外植体数/个	诱导率/%	诱导生根的时间/d
1/2 MS	10	10	8.2±0.25	82±2.49	15.2±0.29
1/2 B5	10	10	5.2±0.51	52±5.12	18.7±0.33
1/3 SH	10	10	3.4±0.34	34±3.40	25.3±1.09

浓度为50 mg·L⁻¹时, 将近一半的毛状根生长受到抑制。卡那霉素浓度为100 mg·L⁻¹及以上时, 几乎所有的根失去生长能力。因此, 我们选用100 mg·L⁻¹的卡那霉素作为转基因毛状根的筛选浓度。

3 转基因毛状根的分子检测

非转基因的根系GUS染色后仍为白色。随机选取65个由叶片外植体单独培养的转基因毛状根系进行GUS染色, 所有的根都呈蓝色。由此判断65个根系都是转基因的阳性系(图4-A、B)。同样随机选取65个由茎外植体培养的转基因毛状根系进行GUS染色, 76.9%毛状根系呈蓝色(图4-C)。

选取GUS染色阳性的毛状根, 提取核基因组DNA并PCR检测。结果表明, 由叶片外植体来源的转基因根系中均扩增出了Ri质粒*rolB*和*rolC*及

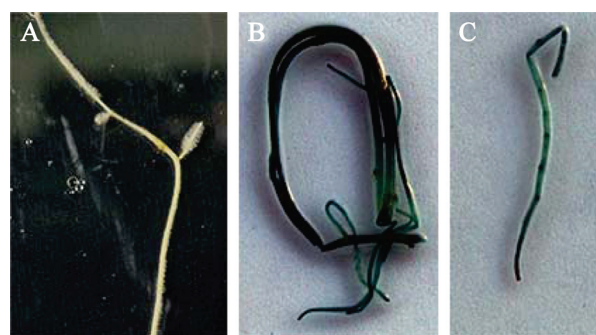


图4 发根农杆菌诱导长春花毛状根的GUS染色
Fig.4 GUS histochemical staining of the hairy root of *C. roseus* induced by *A. rhizogens*

A: 野生发根农杆菌诱导叶片产生毛状根时无GUS染色反应(对照); B: 叶片外植体转基因毛状根的GUS染色反应; C: 茎外植体转基因毛状根的GUS染色反应。

表达载体所带*GUS*及卡那霉素抗性基因特异性条带(图5-A、B), 进一步证实叶片外植体毛状根转基因阳性转化率为100%。

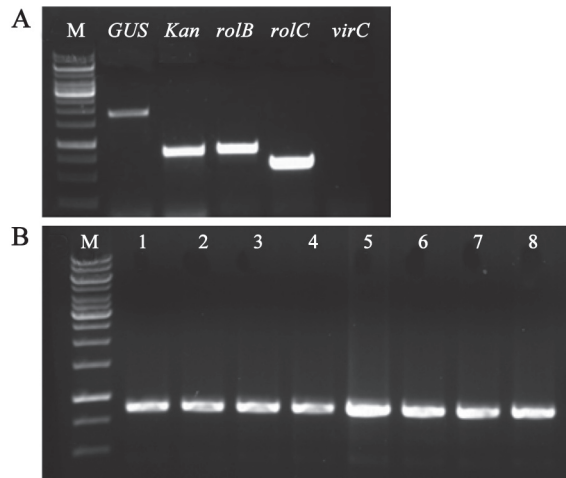


图5 转基因毛状根的PCR鉴定

Fig.5 PCR verification of the transgenic hairy roots

A: 随机选取一个*GUS*染色阳性的转基因毛状根的*GUS*、*Kan*、*rolB*、*rolC*和*virC*基因PCR检测结果; B: 随机选取8个*GUS*染色阳性的叶外植体毛状根的*Kan*基因的PCR扩增结果; M: GeneRuler™1 kb的DNA分子量标准。

4 毛状根中总生物碱含量的测定

将叶片和茎外植体诱导转基因毛状根在1/3 SH液体培养35 d后, 收获毛状根, 冷冻干燥后提取总生物碱。同时也测定长春花无菌幼苗植株体内总生物碱含量。由叶片外植体诱导转基因毛状根中总生物碱含量最高, 达 $39.78 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW) (表3)。这是原无菌苗中总生物碱含量的13.34倍, 亦稍高于由茎外植体诱导转基因毛状根中总生物碱含量。另外, 由叶片外植体诱导转基因毛状根中总生物碱含量在不同转基因系之间无明显差异, 即含量稳定。由此可见, 由叶片外植体诱导的毛状根系是研究长春花生物碱代谢调控的良好活体系

表3 长春花幼苗和毛状根中生物碱平均含量

Table 3 Average content of alkaloid in seedling and hairy roots of *C. roseus*

样品	样品重量/g	生物碱平均含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)
无菌幼苗	2.0	2.98±0.13
茎诱导毛状根	1.0	30.18±1.43
叶诱导毛状根	1.0	39.78±2.18

统, 亦可用作经遗传修饰后大量生产目标生物碱的生物反应器。

讨 论

发根农杆菌可侵染450多种高等植物, 它本身的Ri质粒可将其上的T-DNA整合到寄主核基因组中, 诱发植物生成大量毛状根(Park等2011)。导入人工构建的双元表达载体的发根农杆菌还能将载体上携带外源目的基因的T-DNA插入到植物基因组, 从而实现寄主植物的遗传转化。正是由于发根农杆菌具有这种独特转移DNA片段的能力, 有关发根农杆菌介导植物产生毛状根系及其遗传转化的研究已成为一个活跃领域, 特别是在药用植物次生代谢物合成调控机制和大规模生产研究方面的应用日渐增多, 显示出良好的前景(曹冬梅等2003)。李雅丽和张凯(2005)用农杆菌Ri诱导蒙古黄芪产生毛状根, 并从毛状根培养物中分离出主要药用成分黄芪甲甙。赵寿经等(2010)利用农杆菌Ri诱导西洋参根外植体, 成功获得了人参皂苷含量较高的西洋参发根系。发根农杆菌介导的药用植物*Linum album*中转基因毛状根积累大量的木酚素(lignans) (Chashmi等2011)和鬼臼脂素(podophyllotoxin) (Baldi等2008)。发根农杆菌诱导植物产生的毛状根还可用来生产一些植物本身不能合成的药物。例如, 发根农杆菌介导人类干扰素 α -2b转基因胡萝卜毛状根中合成积累了干扰素 α -2b (Luchakivskaya等2012)。

长春花因其能合成多种具有药理活性的生物碱而备受关注, 发根农杆菌诱导毛状根及遗传转化也已应用于长春花萜类吲哚生物碱次生代谢合成及其调控研究。Suttipanta等(2007)用发根农杆菌诱导幼茎产生转基因毛状根体系, 分析鉴定了萜类吲哚生物碱合成途径的限速酶香叶醇10-脱羧酶(G10H)基因的启动子和参与调控该途径的转录因子CrWRKY1 (Suttipanta等2011)。共表达1-脱氧-木酮糖合酶(DXS)和G10H酶或邻氨基苯甲酸酯合酶(ASA)基因导致长春花毛状根系中萜类吲哚生物碱含量提高(Peebles等2011)。然而, 超表达转录调控因子ORCA3则减低长春花毛状根系中长春新碱等几种生物的合成(Zhou等2010)。这些研究的实施都需要建立长春花稳定的转基因毛状根系。

本研究主要采用长春花无菌幼苗的叶片和茎段作为外植体制备毛状根。这两种外植体在毛状根发生率、生长表型及转基因阳性率等方面存在差异。从茎段外植体长出的毛状根主要从伤口表面和切面处出现,但数量较少(图2-A)。从叶片外植体的受伤部位长出的毛状根主要从叶片外植体近叶柄端的叶片切口表面长出,而极少在叶片远叶柄端长出(图1-A)。这可能是由于叶片近叶柄端生长素含量较高,而适当含量的生长素可使诱导毛状根生成的*rolB*和*rolC*基因的表达增强。叶片外植体毛状根诱导率高达 $82\% \pm 2.49\%$,明显高于茎段外植体($63\% \pm 6.33\%$) (表1)。这可能是不同的外植体其生理状态不同所致,或者是对不同的外植体应有不同的筛选条件。通过对所获毛状根的GUS染色、*Kan*及*rolB*等基因PCR检测(图5),发现叶片外植体毛状根的转基因阳性率达100%,而茎段外植体毛状根则有23.1%的假阳性。对转化的毛状根中总生物碱测试(表3)表明,叶和茎两种外植体来源的毛状根中总生物碱含量明显高于长春花无菌幼苗植株的含量。叶片外植体毛状根总生物碱含量稍高于茎段外植体毛状根,但未达统计学差异性($P < 0.05$)。有关长春花毛状根的一些研究亦指出,发根农杆菌介导长春花毛状根总生物碱高于长春花植株本身含量(Suttipanta等2007, 2011; Zhou等2010; Peebles等2011)。此外,叶片外植体毛状根生长快,生物量明显高于茎段外植体(图3)。可见,无菌幼苗叶片是发根农杆菌诱导长春花毛状根的适宜外植体。除了长春花外,幼叶也是发根农杆菌诱导其他一些植物如小金海棠(于艳丽等2008)和金铁锁(李景滨等2011)毛状根形成的最佳外植体。

抗性筛选压和培养基的优化是建立发根农杆菌诱导植物毛状根的重要因素。这与所用发根农杆菌菌株、植物材料及其外植体有关(李雅丽和张凯2005; 李景滨等2011; 芦韦华等2012)。本文选用的是农杆菌型发根农杆菌R1000菌株,转基因表达载体携带有抗*Kan*基因。通过对这些条件的对比分析,确定筛选阳性转基因毛状根系的最佳*Kan*浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,这与Suttipanta等(2011)和Zhou等(2010)诱导长春花茎产生毛状根的最佳筛选浓度一致。不同培养基中的不同成分对毛状根的生

长有利或不利的一面,从而导致毛状根的生长速率不同。本实验选用植物组织培养常用的培养基即1/2 MS、1/2 B5和1/3 SH,建立了交替、组合应用这几种培养基对发根农杆菌诱导长春花幼叶外植体毛状根及其无性系大量培养的操作流程(图1)。总之,本研究建立了以长春花无菌幼苗幼叶为外植体,应用发根农杆菌R1000介导毛状根生成及其遗传转化的简单、快速和有效的技术体系,可应用于研究长春花生物碱合成调控机制及其相关基因功能鉴定,以及目标抗癌生物碱的大量生物合成和生产。

参考文献

- 曹冬梅, 韩振海, 许雪峰(2003). 发根农杆菌Ri质粒研究进展. 中国生物工程杂志, 23: 74~78
- 陈伟莉, 牟旭鹏, 刘冬影(2010). 毛状根在植物次生代谢产物生产方面应用的研究进展. 黑河学院学报, 1: 122~126
- 李景滨, 刘同祥, 王培忠, 张宗申(2011). 金铁锁毛状根诱导及培养体系的建立. 中国中药杂志, 36: 547~551
- 李雅丽, 张凯(2005). 用农杆菌Ri诱导蒙古黄芪发根培养的研究. 云南植物研究, 27: 204~210
- 芦韦华, 陈永芳, 王芳, 代宁波, 郝爱花, 李翠芳, 嘉素尔(2012). 理化条件对新疆紫草毛状根培养及紫草素含量的影响. 华中农业大学学报, 31: 50~54
- 于艳丽, 王忆, 韩振海, 李天忠, 孔瑾, 许雪峰(2008). 发根农杆菌介导转化小金海棠的影响因素. 核农学报, 22: 621~625
- 赵寿经, 侯艳, 贾冬梅, 徐立新, 钱延春(2010). 西洋参发根的诱导及不同外源物质对发根生长和皂苷含量的影响. 天然产物研究与开发, 22: 98~103
- Baldi A, Srivastava AK, Bisaria VS (2008). Improved podophyllotoxin production by transformed cultures of *Linum album*. Biotechnol J, 3: 1256~1263
- Chashmi NA, Sharifi M, Yousefzadi M, Behmanesh M, Palazon J (2011). The production of cytotoxic lignans by hairy root cultures of *Linum album*. World Acad Sci Eng Technol, 80: 401~402
- Choi PS, Kim YD, Choi KM, Chung HJ, Choi DW, Liu JR (2004). Plant regeneration from hairy-root cultures transformed by infection with *Agrobacterium rhizogenes* in *Catharanthus roseus*. Plant Cell Rep, 22: 828~831
- Georgiev MI, Pavlov AI, Bley T (2007). Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. Appl Microbiol Biotechnol, 74: 1175~1185
- Luchakivskaya YS, Olevinskaya ZM, Kishchenko EM, Spivak NY, Kuchuk NV (2012). Obtaining of hairy-root, callus and suspension cell cultures of carrot (*Daucus carota* L.) able to accumulate human interferon alpha-2b. Cytol Genet, 46: 15~20
- Park NI, Tuan PA, Li X, Kim YK, Yang TJ, Park SU (2011). An efficient protocol for genetic transformation of *Platycodon grandiflorum* with *Agrobacterium rhizogenes*. Mol Biol Rep, 38:

- 2307~2313
- Peebles CAM, Sander GW, Hughes EH, Peacock R, Shanks JV, San KY (2011). The expression of 1-deoxy-D-xylulose synthase and geraniol-10-hydroxylase or anthranilate synthase increases terpenoid indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Metab Eng*, 13: 234~240
- Suttipanta N, Pattanaik S, Gunjan S, Xie CH, Littleton J, Yuan L (2007). Promoter analysis of the *Catharanthus roseus* geraniol 10-hydroxylase gene involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1769: 139~148
- Suttipanta N, Pattanaik S, Kulshrestha M, Patra B, Singh SK, Yuan L (2011). The transcription factor CrWRKY1 positively regulates the terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol*, 157: 2081~2093
- Zhou ML, Shao JR, Tang YX (2009). Production and metabolic engineering of terpenoid indole alkaloids in cell cultures of the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Madagascar periwinkle). *Biotechnol Appl Biochem*, 52: 313~323
- Zhou ML, Zhu XM, Shao JR, Tang YX, Wu YM (2011). Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture. *Appl Microbiol Biotechnol*, 90: 1229~1239
- Zhou ML, Zhu XM, Shao JR, Wu YM, Tang YX (2010). Transcriptional response of the catharanthine biosynthesis pathway to methyl jasmonate/nitric oxide elicitation in *Catharanthus roseus* hairy root culture. *Appl Microbiol Biotechnol*, 88: 737~750