

发根农杆菌诱导毛酸浆毛状根条件的优化

任如意, 李思璇, 金秋, 梁仕茹, 王珊珊

(牡丹江师范学院 生命科学与技术学院, 黑龙江 牡丹江 157011)

摘要:以4种发根农杆菌 A4、C58C1、R1601、ATCC15834 为诱导菌株侵染毛酸浆叶片、茎段,研究了发根农杆菌种类、外植体类型、不同预培养时间、不同侵染时间、不同共培养时间和乙酰丁香酮对毛酸浆毛状根诱导率的影响,并用 PCR 检测 *rolB* 基因。结果表明:4种发根农杆菌均能诱导毛酸浆外植体产生毛状根,ATCC15834 的诱导率相对较高,叶片优于茎段;最佳侵染时间为 6~8 min;预培养和共培养时间均为 2~3 d 时诱导率较高;乙酰丁香酮(AS)浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 有利于促进毛状根的产生,经 PCR 检测证明,*rolB* 基因已整合到毛酸浆毛状根基因组中。

关键词:毛酸浆;发根农杆菌;毛状根;诱导率

中图分类号:S 641.401 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)08-0115-05

毛酸浆 (*Physalis pubescens* L.) 属茄科 (Solanaceae) 酸浆属 (*Physalis*), 俗称黄姑娘, 我国产地分布在东北三省^[1], 栽培较易, 野生多生于田边或草地, 耐寒, 适应性强。毛酸浆也是黑龙江和吉林重要的药食两用地浆果资源之一, 果实含有丰富的矿物质、微量元素及多种生物活性物质^[2-3], 主要化学成分有酸浆苦素类、睡茄内酯类等, 具清热解毒、消炎、抗肿瘤等功效, 极具开发价值和应用价值^[4]。

发根农杆菌诱导植物可产生毛状根, 毛状根具有许多优点, 如遗传稳定性, 在不含植物激素的条件下能够迅速生长, 可积累大量的次生代谢产物等, 因其合成能力强大, 毛状根培养物被誉为“植物化学工厂”^[4], 产业化生产毛状根将是天然药物来源途径之一。现通过对毛酸浆毛状根诱导条件的研究, 以期建立毛酸浆毛状根培养体系, 为今后毛酸浆的相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试毛酸浆 (*Physalis pubescens* L.) 种子产自黑龙江省牡丹江。发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 菌株: R1601、ATCC 15834、C58C1、A4, 由牡丹

江师范学院实验室保存。*rolB* 引物由上海捷瑞 (Generay Biotech.) 生物工程公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 毛酸浆无菌苗的获得 将当年成熟的毛酸浆果实晾晒, 剥出种子干燥后, 自来水流水冲洗 10 min, 在超净操作台上用无菌水清洗 2 次, 75% 乙醇浸泡 30~40 s, 无菌水清洗 3 次; 用 0.2% HgCl_2 浸泡 8~9 min, 无菌水清洗 4~5 次。用灭菌滤纸将种子表面的水分吸干, 用无菌镊子接种到 MS 固体培养基上, 置于光照强度 2 500 lx (光周期 16 h)、温度 23~25 °C 的培养室中培养, 待长为无菌幼苗。

1.2.2 发根农杆菌的培养与活化 将甘油封存的农杆菌于 -70 °C 冰箱内保存备用。试验时, 取出 R1601、ATCC 15834、C58C1 和 A4 低温保存的 4 种菌种, 在超净操作台内分别将 R1601、A4 接种到附加卡那霉素 (终浓度 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 YEB 固体平板上, ATCC 15834、C58C1 接种到附加利福平 (终浓度 $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 YEB 固体平板上, 均划线培养, 28 °C 恒温暗培养 1~2 d, 待单菌落长出。分别挑取 R1601、A4 单菌落接种到附加卡那霉素 (终浓度 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 液体的 YEB 培养基中, ATCC 15834、C58C1 单菌落接种到附加利福平 (终浓度 $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 液体的 YEB 培养基中, 28 °C、150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 过夜振荡培养, 测定菌液 OD 值, OD_{600} 0.4~0.5, 将菌液分别放到无菌的离心管, 6 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清, 再用 1/2MS 液体培养基重悬, 即可用于侵染。

第一作者简介:任如意(1968-), 女, 博士, 教授, 现主要从事植物基因工程等研究工作。E-mail:swxrry@126.com.

收稿日期:2016-12-07

1.2.3 毛酸浆毛状根的诱导与脱菌培养 在无菌条件下,将毛酸浆无菌苗(图 1-a)的子叶、真叶剪成 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$,下胚轴剪成长度约为 0.5 cm ,外植体组织块分别置于 MS0 固体培养基上,置于 $23\sim 24\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、黑暗条件下预培养 1~4 d。将预培养的外植体转移至活化后的重悬菌液(附加乙酰丁香酮 $0\sim 150\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)中进行侵染,使外植体与菌液充分接触侵染 4~10 min 后,用灭菌滤纸吸干外植体

表面菌液,接种到 MS0 固体培养基上, $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、黑暗条件下共培养 1~4 d,然后转接到含头孢曲松钠($500\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的 MS0 固体培养基上除菌,连续除菌 4~5 次后,可脱净农杆菌,每 7 d 继代 1 次,逐渐降低抗生素,继代 2 次后,统计毛状根的诱导率。待毛状根长至 $3\sim 5\text{ cm}$ 剪下接种到液体培养基中,建立毛状根的离体培养体系。

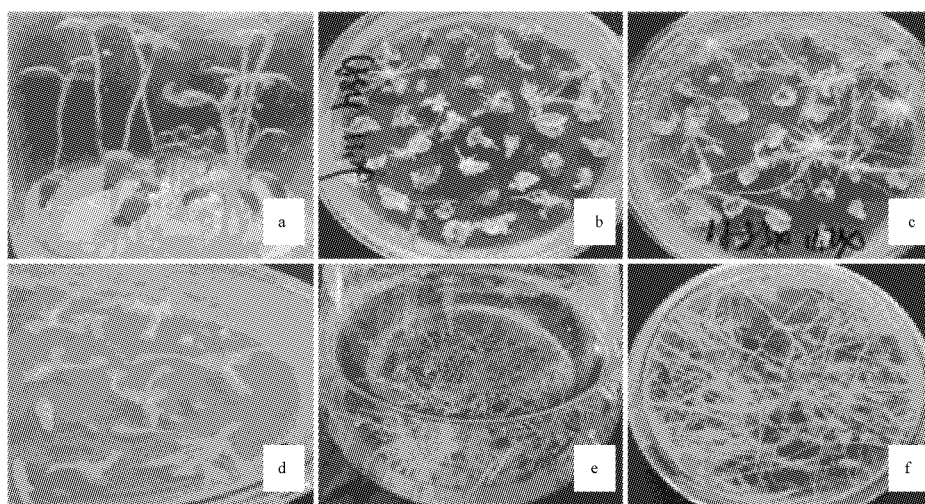


图 1 毛酸浆毛状根的诱导

Fig. 1 Hairy root induced by different *A. rhizogenes* in *Physalis pubescens* L.

1.2.4 毛酸浆毛状根 *rolB* 基因的 PCR 检测 取脱菌完全生长良好的不同克隆系的毛状根约 $500\sim 800\text{ mg}$,用常规的 CTAB 法提取总 DNA,用作 PCR 检测的模板,以 KUŽMA 等^[5]报道的 *rolB* 引物: $5'\text{-GCTCTTGCAGTGCTAGATTT-}3'$ 和 $5'\text{-GAAG-GTGCAAGCTACCTCTC-}3'$ 进行扩增。PCR 反应体系:模板 $1\text{ }\mu\text{L}$,上下游引物各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$,dNTP $1.6\text{ }\mu\text{L}$, $10\times$ buffer $2\text{ }\mu\text{L}$,Taq 酶 $0.5\text{ }\mu\text{L}$,补水 $13.9\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 60 s,30 个循环,最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min。将 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 数据分析

采用 Excel 软件对试验数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同菌种与不同的外植体对毛酸浆毛状根诱导的影响

发根农杆菌的菌种不同对毛酸浆毛状根诱导率不同(图 1-b,c),4 种发根农杆菌都能有效的诱导毛酸浆不同外植体的毛状根(图 1-b,c,d),从图 2 可以看出,C15834 的诱导效果最好,对叶片毛状根的诱导

率最高可达 51.0% ,其次是 C58C1 诱导率为 42.3% ,A4 与 R1601 叶片对毛酸浆毛状根的诱导差异不大,均在 $36.0\%\sim 38.0\%$ 。毛酸浆毛状根诱导试验中 4 种菌株都呈现叶片的诱导率略高于茎段。4 种农杆菌诱导的毛状根在无激素的培养基上均能迅速生长(图 1-e,f)。

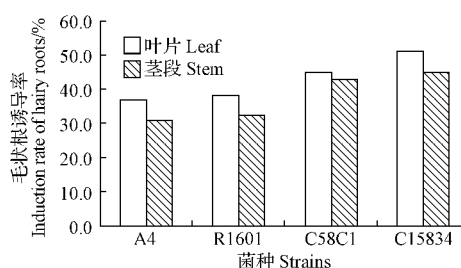


图 2 不同菌种对毛酸浆叶片与茎段毛状根诱导的影响

Fig. 2 Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* on the induction rate of hairy root from leaves and stems

2.2 不同侵染时间对毛酸浆毛状根诱导率的影响

农杆菌对外植体侵染时间是影响遗传转化的重要因素^[6],因而对毛酸浆毛状根诱导率的影响较大。一般而言,侵染农杆菌时间长对外植体的伤害较大,

致死率增高;侵染时间短,质粒的转化效率低,适宜的侵染时间是提高毛状根诱导率的重要因素之一。图3表明,侵染6 min,毛状根的诱导率最高,可达到53.9%,超过10 min诱导率开始下降,不足6 min诱导率也明显降低。

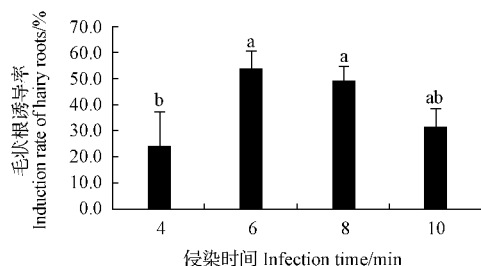


图3 不同侵染时间对毛状根诱导率的影响

Fig. 3 Effect of different infection time on the induction rate of hairy roots

2.3 不同预培养时间对毛酸浆毛状根诱导率的影响

将待侵染的外植体进行预培养,目的之一是诱导外植体细胞处于感受状态,利于发根农杆菌的吸附、T-DNA 的转移与整合,二也会使外植体适应培养环境,提高对农杆菌的抵抗能力,减轻农杆菌在侵染过程中的伤害作用^[7]。从图4可以看出,预培养2~3 d的外植体毛状根诱导率明显增高,预培养3 d以后开始下降,预培养2 d诱导率可达51.43%,预培养3 d的诱导率为40.75%,而不经预培养或预培养1 d的毛状根诱导率都明显降低,为11.48%和30.00%。适宜的预培养时间也是提高毛酸浆毛状根诱导率的重要影响因素之一。

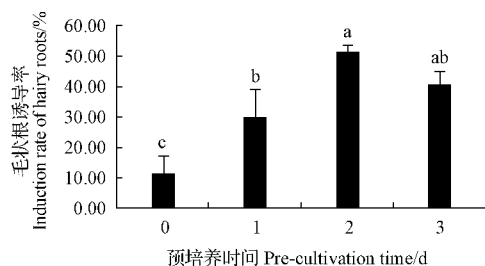


图4 不同预培养时间对毛状根诱导率的影响

Fig. 4 Effect of different pre-cultivation time on the induction rate of hairy roots

2.4 不同共培养时间对毛酸浆毛状根诱导率的影响

共培养时间通常是附着在外植体上的农杆菌将T-DNA 转移到植物细胞内并整合的关键时间,是农杆菌能否成功转化的关键。不同的共培养时间对毛状根诱导率有重要影响,时间短 T-DNA 不能有效的

转移与整合,时间长附着在外植体周围的农杆菌大量增殖,淹没外植体导致外植体的死亡。从图5可以看出,随着共培养时间延长,毛酸浆毛状根诱导率增加,共培养2 d毛状根诱导率最高,为51.43%,但超过3 d诱导率明显下降,共培养4 d诱导率就降到17.45%。

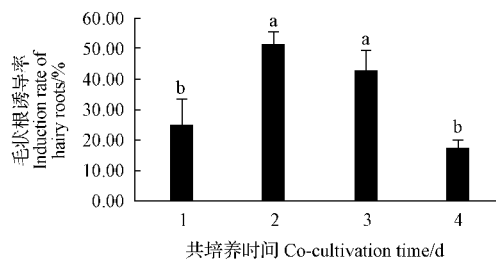


图5 不同共培养时间对毛状根诱导率的影响

Fig. 5 Effect of different co-cultivation time on the induction rate of hairy roots

2.5 添加乙酰丁香酮对诱导毛状根的影响

在菌液重悬与外植体侵染过程中,附加一定浓度的乙酰丁香酮,图6结果表明,添加乙酰丁香酮(AS)能有效地提高毛酸浆毛状根的诱导率,但当乙酰丁香酮浓度过高时,其诱导率又会降低,毛酸浆毛状根的诱导在添加 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的乙酰丁香酮时诱导效率最高,为51.43%。

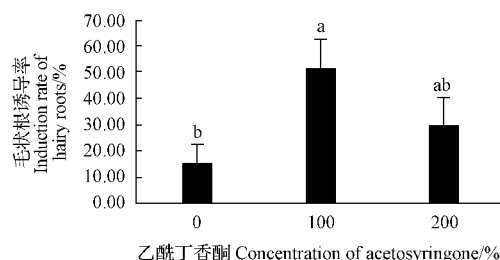


图6 附加不同浓度乙酰丁香酮对毛状根诱导率的影响

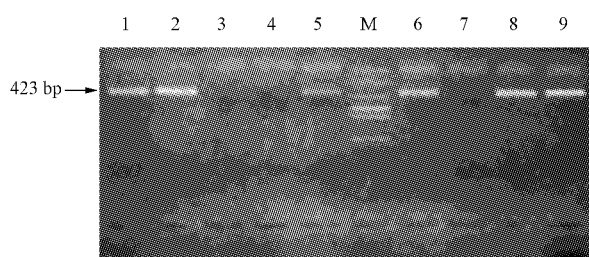
Fig. 6 Effect of different concentrations of AS on the induction rate of hairy roots

2.6 毛酸浆毛状根的分子检测

利用合成的 *rolB* 基因的上下游引物,以毛状根的基因组DNA 为模板,进行PCR 扩增,扩增结果如图7,毛状根的不同克隆能够扩增出423 bp 左右 *rolB* 基因片段,而未转化的自然根则没有扩增出特异性的条带,说明发根农杆菌的 Ri 质粒 T-DNA 已经转移并整合到毛酸浆毛状根基因组。

3 讨论与结论

毛酸浆对发根农杆菌比较敏感,该试验研究了C15834、C58C1、R1601 和A4 等4种发根农杆菌均能有效的侵染毛酸浆外植体致使产生毛状根,C15834



注:M,DL 2 000 Marker;1~2 为阳性对照;3~4 为阴性对照;5~9 为毛状根不同克隆。

Note:M,DL 2 000 Marker;1-2 are positive control;3-4 are negative control;5-9 are transgenic hairy roots.

图7 毛状根 *rolB* 基因 PCR 产物凝胶电泳分析

Fig.7 Gel electrophoresis analysis of PCR amplification products of hairy root *rolB*

的诱导效率最高,达到 51.0%,其次是 C58C1。合适的外植体也是建立毛状根体系的重要因素,不同植物的最适外植体不同,相同植物不同的外植体也有明显差异^[8],该试验选取了毛酸浆的幼叶、嫩茎为转化外植体,试验结果表明,叶片的诱导率均略高于茎段,但是从出根的时间上茎段略早于叶片,该研究结果与龙葵^[9]相似,但与假酸浆^[10]恰好相反,马玲^[10]研究表明,假酸浆诱导毛状根的外植体茎段更好。

很多研究表明,预培养时间、侵染时间和共培养时间对毛状根的诱导率都有一定影响。付春祥等^[11]对新疆雪莲、王丽等^[9]对龙葵的研究都认为预培养 2 d 毛状根诱导率较高,该研究认为毛酸浆外植体预培养 2~3 d 毛状根诱导率相对较高。不同的植物对农杆菌的耐受能力差异明显,因而不同植物侵染时间与共培养时间差异明显,庞滨等^[12]发现,非洲菊侵染 20 min,共培养 2 d,陈宇等^[13]研究白英需要侵染 10 min,共培养 4 d 可获得最佳转化率。而毛酸浆只需要侵染 6~8 min,共培养 2~3 d 毛状根的诱导率相对较高。侵染时间与共培养时间过长,除菌困难,影响毛状根诱导率^[14]。

研究表明,乙酰丁香酮能激活 Ri 质粒 T-DNA 上的 *Vir* 基因,但不同的植物在农杆菌转化的过程中,最适宜的乙酰丁香酮浓度也不相同,周伟等^[15]研究 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的乙酰丁香酮可促进丹参毛状根的转化,李林轩等^[16]添加 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的乙酰丁香

酮诱导山豆根的毛状根,在该研究中毛酸浆毛状根的诱导添加 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的乙酰丁香酮诱导效率相对较高。

以毛酸浆为试材,建立其毛状根诱导体系,优化影响毛状根诱导的各因素,可为进一步利用毛酸浆毛状根提取次生代谢产物奠定基础。

参考文献

- [1] 王晓英,刘长蛟,段连海,等. 毛酸浆开发利用的研究进展[J]. 中国酿造,2014,33(2):5-8.
- [2] 李良,何畔,傅礼玮,等. 响应面法优化毛酸浆黄色素的提取[J]. 东北农业大学学报,2014,45(7):112-116.
- [3] WARAPORN P, PREEYAPORN P, HIROYUKI T, et al. Solasodine glycoside production by hairy root cultures of *Physalis minima* Linn. [J]. Biotechnology Letters, 2004, 26:545-548.
- [4] AGOSTINI E, TALANO M A, GONZÁLEZ P S, et al. Application of hairy roots for phytoremediation; what makes them an interesting tool for this purpose? [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97: 1017-1030.
- [5] KUŹMA Ł, KISIEL W, KRÓLICKA A, et al. Genetic transformation of *Salvia austriaca* by *Agrobacterium rhizogenes* and diterpenoid isolation[J]. Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011, 66(11):904-907.
- [6] 刘连旺,张永清,祁建军,等. 地黄毛状根的诱导及条件优化[J]. 山东农业科学, 2015, 47(1):47-50.
- [7] 胡菊,毛美琴,杨君,等. 4 种发根农杆菌对朱砂根组培无菌叶片毛状根诱导的影响[J]. 西北植物学报, 2016, 36(2):411-418.
- [8] 任艳,李磊,崔潇,等. 发根农杆菌诱导花生发根的条件优化[J]. 核农学报, 2012, 26(3):439-443.
- [9] 王丽,刘琪,宁明明,等. 龙葵毛状根诱导条件的研究[J]. 北方园艺, 2015(4):107-111.
- [10] 马玲. 假酸浆毛状根诱导培养体系优化及次生代谢产物的研究[D]. 长春:吉林农业大学, 2013.
- [11] 付春祥,金治平,杨睿,等. 新疆雪莲毛状根的诱导及其植株再生体系的建立[J]. 生物工程学报, 2004, 20(3):66-71.
- [12] 庞滨,张文斌,钟春梅,等. 非洲菊转基因毛状根诱导系统的建立[J]. 植物生理学报, 2016, 52(9):1449-1456.
- [13] 陈宇,董瑜,张楷燕,等. 白英毛状根的培养与薯蓣皂苷元的测定[J]. 中草药, 2016, 47(7):1199-1203.
- [14] 林志豪,邓钰宏,赵静. 黄瓜‘中国龙’毛状根诱导体系的建立[J]. 中国瓜菜, 2016, 29(2):6-9, 19.
- [15] 周伟,姚倩雯,钱忠英,等. 丹参毛状根诱导条件的优化[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 2007, 36(2):93-98.
- [16] 李林轩,韦坤华,姚绍嫦,等. 山豆根毛状根培养体系的建立与优化[J]. 贵州农业科学, 2016, 44(1):27-31.

Optimization of Hairy Root Induction by *Agrobacterium rhizogene* in *Physalis pubescens* L.

REN Ruyi, LI Sixuan, JIN Qiu, LIANG Shiru, WANG Shanshan

(College of Life Science and Technology, Mudanjiang Normal University, Mudanjiang, Heilongjiang 157011)

苹果树叶片上锈病斑的空间分布特征

唐晓琴, 卢杰, 臧建成

(西藏农牧学院, 西藏 林芝 860000)

摘要:苹果树为藏东南地区经济林的主要树种,近年来锈病危害严重。以藏东南地区苹果树为研究对象,基于野外调查,采用扩散系数 C 、Morisita 指数 I 、Cassie 指标 Ca 、平均拥挤度 M^* 、Lloyd 聚块性指标、负二项参数 K 、Iwao 回归分析法、Taylor 幂指数方法,研究了藏东南工布自然保护区苹果树叶片上锈病的空间分布格局规律。结果表明:苹果树叶片上锈病斑数量表现为树中部>树下部>树上部,树西面>树东面>树北面>树南面。锈病斑数量在苹果树叶片上中部占 39.33%,其中左中部占 19.32%、右中部为 20.01%;叶下部占 31.53%,其中左下部为 15.37%、右下部为 16.16%;叶上部占 29.14%,其中左上部为 14.70%、右上部为 14.44%。叶左边占 49.39%,右边占 50.61%。苹果树叶片上锈病斑主要以 10~40 个聚集的形式存在。以 $30 \leq b < 40$ 为最多,锈病斑数量占总锈病斑数比率的 17.36%。苹果树叶片上锈病斑空间分布呈聚集型,但聚集强度不大,锈病斑个体群大小不是一成不变的,而是随着锈病斑密度的增加而增大,其平均个体群大小为 48.42。苹果树叶片上锈病斑的空间格局 Iwao M^*-m 回归模型为 $M^* = 0.997 2 + 5.686 8m (R^2 = 0.999 9)$, Taylor 幂模型为 $\log(S^2) = 0.148 3 + 1.633 2 \log m (R^2 = 0.956 8)$, 2 个模型均判定锈病斑在所有密度下均呈聚集分布,随着锈病斑密度增大,聚集强度也增大。

关键词:苹果树;锈病斑;空间分布特征;工布自然保护区;西藏

中图分类号:S 436.611.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)08-0119-05

苹果锈病(*Gymnosporangium yamadae*)又称苹果赤星病、羊胡子,因其秋冬为害桧柏,春夏为害苹果,又称苹果桧锈病。苹果锈病病原为苹果东方胶锈

菌或称山田胶锈菌,属于担子菌亚门冬孢菌纲锈菌目。苹果锈病菌除为害苹果外,还可为害海棠、沙果、山定子等,该病害近年来发生普遍,危害严重,并呈逐年上升趋势。目前苹果锈病在许多苹果产区大面积发生,严重时,叶片大量变黄脱落、果实畸形,对苹果的树势、产量、品质和花芽分化均造成不同程度的影响^[1-5]。近年来山东、陕西、甘肃等苹果主产区不断出现新的发病区,且发病程度逐年加重,已成为苹果上的一种主要病害^[6-11]。经济林产业为藏东南

第一作者简介:唐晓琴(1977-),女,硕士,副教授,研究方向为植物保护。E-mail:74143648@qq.com

责任作者:卢杰(1973-),男,硕士,副教授,研究方向为植物生态与植物保护。E-mail:tibetlj@163.com

基金项目:西藏自治区自然科学基金资助项目(2014-2015)。

收稿日期:2016-12-05

Abstract: *Agrobacterium rhizogenes* strains of A4, C58C1, R1601, ATCC15834 were used to infect the explants of *Physalis pubescens* L., then the influences of different *Agrobacterium rhizogenes* species, explants types, different preculture times, different infection times and co-culture times and acetosyringone on hairy root induction rate were researched. Using PCR technique to identify the induced hairy roots. The results showed that *Agrobacterium rhizogenes* strains of A4, C58C1, R1601, ATCC15834 all could induce hairy roots, but inductivity of ATCC15834 was higher. The inductivity of leaf was higher than stem. The best induction conditions of hairy roots were preculturing for 2—3 days, infecting for 6—8 minutes, co-culturing for 2—3 days. Acetosyringone $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ would be necessary to upgrade transformation frequencies. PCR detection results indicated that the *rolB* gene in Ri plasmid of *A. rhizogenes* had integrated into the genome of *P. pubescens* and been expressed.

Keywords: *Physalis pubescens* L.; *Agrobacterium rhizogenes*; hairy root; induction rate