

毛白杨转 *rolB* 基因植株生根能力的研究

熊瑾¹ 梁机² 陈晓阳¹ 李伟¹ 李慧¹ 刘莹¹

(¹ 北京林业大学生物科学与技术学院, 林木、花卉遗传育种教育部重点实验室 ² 广西大学林学院)

摘要: 为了提高毛白杨的生根能力, 把 *rolB* 基因转入毛白杨中, 获得 7 个转化植株。在无激素培养基上, 转化植株的生根率达到 80%~100%, 而未转化植株的生根率只有 13%~20%。转化植株对生长素表现出高度的敏感性, 当 IBA 浓度达 1.0 mg/L 时, 转化植株的生根受到抑制。移栽后, 1 个转化株系的高生长明显低于对照, 2 个转化株系的茎节数比对照增加, 3 个转化株系的节间长比对照降低, 其他转化植株与对照无明显差异。硬枝扦插试验结果进一步证实了转化植株扦插生根能力显著提高, 扦插生根率达到 74.4%~92.3%, 根的数量也明显增加。

关键词: *rolB* 基因, 毛白杨, 移栽, 硬枝扦插, 生根能力

中图分类号:S792.117 文献标识码:A 文章编号:1000-1522(2005)05-0054-05

XIONG Jin¹; LIANG Ji²; CHEN Xiao-yang¹; LI Wei¹; LI Hui¹; LIU Ying¹. The rooting ability of *rolB* transformed clones of *Populus tomentosa*. *Journal of Beijing Forestry University* (2005)27(5):54~58[Ch, 12 ref.]

¹ Key Laboratory for Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants, Ministry of Education; College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, 100083, P. R. China;

² College of Forestry, Guangxi University, Nanning, 530004, P. R. China.

To improve the rooting ability of *Populus tomentosa*, the *rolB* gene was transformed into the plant and 7 transgenic clones were obtained. The *in vitro* rooting results showed that the rooting rate of transgenic clones ranged from 80% to 100% without auxin, while only 13%~20% for the control plants. Transgenic plants showed a high sensitivity to the auxin. When the concentration of IBA reached 1.0 mg/L, the rooting of the transgenic clones was restrained. Growth analysis showed that the stem length of one transgenic clone was reduced and the node number of two clones was increased and the internode length of three clones was obviously reduced compared with the control plants. The hardwood cutting experiment further confirmed that the increased rooting ability of the transgenic clones ranged from 74.4% to 92.3%, and the root number was also greatly increased.

Key words *rolB* gene, *Populus tomentosa*, transplant, hardwood cutting, rooting ability

毛白杨(*Populus tomentosa*)是我国北方地区重要的工业用材和绿化树种, 具有生长快、寿命长、树干通直、材质好和树姿优美等特点。但毛白杨的插穗生根困难, 扦插成活率低, 影响了该树种的繁殖和推广。为提高毛白杨的扦插成活率, 前人多数采用药剂处理插穗、温床催根、流水浸条、马粪窑藏等方法^[1]。但是这些方法依然存在各自的缺点, 没有彻底解决生根难的问题。

近几十年来, 基因工程的发展为林木改良提供了一条新的途径。发根农杆菌(*Agrobacterium*

rhizogenes)含有能诱导双子叶植物产生不定根的诱根质粒(Root inducing plasmid, Ri)。许多研究表明, Ri 质粒转化植物可以诱导毛状根产生, 促进根的生长发育, 改变根的特性, 且易从毛根获得再生植株。卜学贤和郑均宝等人对扦插生根难的毛白杨进行 Ri 质粒转化, 并对其再生植株进行硬枝扦插生根研究, 结果发现转 Ri 质粒植株其插穗生根成活率显著高于对照^[2]。

发根农杆菌是根瘤菌科农杆菌属的一种革兰氏阴性土壤细菌。发根农杆菌 Ri 质粒上的 T-DNA 在

收稿日期: 2004-07-02

<http://journal.bjfu.edu.cn>

基金项目: 国家自然科学基金项目(30271097)、教育部科学技术研究重点项目(重点 01028)。

第一作者: 熊瑾, 硕士生。主要研究方向: 林木基因工程。电话: 010-62338105 Email: serrulata@tom.com 地址: 100083 北京林业大学林木遗传育种教研室。

责任编辑: 陈晓阳, 博士, 教授。主要研究方向: 林木基因工程。电话: 010-62338005 Email: xychen@bjfu.edu.cn 地址: 同上。

植物细胞基因组的整合和表达导致毛状根的发生和再生转基因植株发育异常。在农杆菌型的T-DNA区鉴定出了4个与发根有关的位点(root locus)rolA、rolB、rolC、rolD。研究表明,在rol基因中,rolB基因是最主要的诱根因子。rolB基因的表达引起转基因植株形成大量毛根,根表现出生长快速、高度分叉、无向地性的特点^[3]。目前,利用单个rolB基因对模式植物和果树等进行转化,提高植株的生根能力的研究已有报道^[4,5],但将rolB基因转入杨树的研究少见报道。为提高毛白杨的扦插生根能力,本实验将rolB基因导入毛白杨,并获得转化植株,本文着重对转化植株的生根能力和生长情况进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本试验以经过Southern blotting检测并证实rolB基因已经整合到基因组中的转基因毛白杨植株为材料^[6]。转化苗在MS+6-BA 0.3 mg/L+NAA 0.1 mg/L的培养基上进行增殖培养。培养温度为(25±2)℃,光周期16 h/d,光强度2 500 lx,每月继代1次。

1.2 转化植株组培苗的生根试验

取转化植株和非转化植株各30株,在无激素培养基1/2MS上培养,4周后观察结果并记录生根情况。试验重复2次,取结果的平均值进行统计。

在不同激素浓度即IBA为0、0.5、1.0、2.0 mg/L的1/2MS培养基上培养转化植株和非转化植株,4周后观察生根情况。试验重复2次。

把转化植株和非转化植株的茎切成0.2 cm厚度的茎片,在IBA为5.0 mg/L的1/2MS培养基中分别培养1、2、3、4、5、6 h,然后转到无激素的1/2MS培养基上培养,4周后观察结果。试验在培养皿中进行,每个培养皿中放置10个茎片,试验重复2次。

1.3 转化植株的移栽及生长量的观测

挑选在生根培养基上具有根长0.1~0.5 cm、叶3~5片的再生植株,用于移栽试验。基质用0.1%的高锰酸钾溶液消毒。将再生植株由培养基中取出,放到20℃的温水中把根部残留的培养基洗净,移栽到盛有基质的10 cm×10 cm塑料盆中,于温室中培养。前4周用透明的塑料杯扣盖保湿,1周后每隔2 d浇灌1次营养液。盆栽基质3种:珍珠岩、蛭石、珍珠岩与蛭石混合(1:1)。炼苗方式3种:不炼苗直接移栽、开盖炼苗和不开盖炼苗。采用析因试验设计,4周后统计成活率,12周后观察转化植株的生长和生根情况。

1.4 硬枝扦插试验

取1年生转化植株与对照植株的枝条,作为扦

插材料。每个株系取30个插条,每个插条长12~15 cm,且具有3个饱满的芽。插条不做任何处理,采回后直接在珍珠岩:蛭石:草炭土为1:1:1的沙床里扦插,株行距为8 cm×10 cm。试验在温室里进行,温度为18~25℃,自然光照。定期浇水,保证湿度在80%左右。实验采用完全随机区组设计,5周后统计生根率、生根的数量及根的长度。

2 结果与分析

2.1 转化植株组培苗的生根

在无激素培养基上,转化植株生根率达到了80%~100%,而未转化植株的生根率却只有13%~20%,转化植株生根的数量也明显比未转化的多(表1)。转化植株还表现出生根快的特点,一般在转接6~8 d后就长根,而未转化植株需要10 d左右。转化植株与对照植株在无激素培养基上生根差异十分显著(图1)。

表1 转化植株和未转化植株的生根效果

TABLE 1 *In vitro* rooting result of the transgenic clones and the control plants

植株	株数	生根株数	生根率/%	每株根数
CK	30	4	13	1.7
CT5-1	30	28	93	6.5
CT5-2	30	30	100	7.6
CT5-3	30	24	80	4.5
CT5-4	30	28	93	4.8
CT5-5	30	30	100	6.8
LT1-1	30	26	86	5.6
LT1-2	30	30	100	5.4

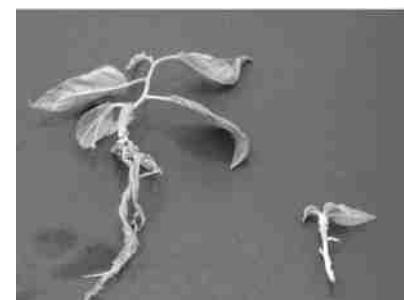


图1 转化植株(左)与未转化植株(右)
在无激素培养基上的生根情况

FIGURE 1 A transgenic clone (left) and an untransformed control plant (right) in the hormone-free medium

转化植株在IBA浓度为0 mg/L时,能长出根;在浓度为0.5 mg/L时仍能长大量的根;当IBA浓度增加到1.0 mg/L时,产生大量愈伤,生根受到抑制,只在培养基表面长出少量毛状根;当浓度为2.0 mg/L时,有大量愈伤,不能生根。作为对照的未转化苗,随着激素浓度的增加,根的数量和长度都增加。激素浓度达到2.0 mg/L时,未转化植株仍能长出大量的

根,并无愈伤组织的形成(图 2).由此说明,与对照相比,转化植株对外源激素反应更敏感.

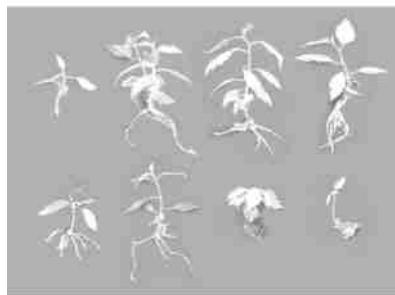


图 2 转化植株(下排)与未转化植株(上排)在不同激素浓度(从左到右, IBA 为 0、0.5、1.0、2.0 mg/L)培养基上的生根情况

FIGURE 2 Rooting ability of transgenic clones(lower) and untransformed control plants(top) on medium with different IBA concentrations (IBA=0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L from left to right)

转化植株的茎片经过 1 h 激素处理后,能长出 2~2.2 条根,随着激素处理的时间增加生根的条数和长度也增加,2 h 处理后是 2.4~3.5 条根,3 h 是 3~4 条根,4 h 是 4.5~5 条根,5 h 就增加到 5~5.3 条,6 h 生根的数量最多,达到 5.5~6 条.转化植株的茎片长出根的数量和长度随着激素处理时间的增加而增加.而未转化植株的茎片在激素处理 1 h 后平均只有 0.8 条,随着激素处理时间的增加,生根的数量变化不大,只有少量的增加,6 h 激素处理后,根的数量只达到 2.2 条(图 3).离体生根试验证明了转化植株的离体对外源激素表现出很高的敏感性.

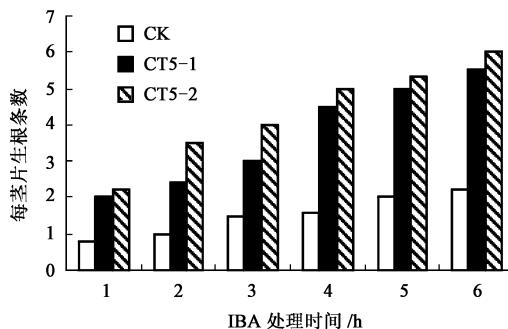


图 3 不同时间 IBA 处理后转化植株与对照(CK)的茎片生根数

FIGURE 3 Rooting ability of stem discs from transgenic clones and untransformed plants treated with different IBA exposure time

2.2 转化植株的移栽

转化植株的移栽是获得大量转化植株的重要环节,其成活率的高低非常重要.统计分析结果表明,基质和炼苗方式及二者的交互效应对移栽成活率都有显著影响.经多重比较,基质以混合的效果最好,其次是蛭石.炼苗以不开盖效果最好,不炼苗效果最差.由于转基因的组培苗比较弱嫩,所以移栽中的炼苗方法、基质种类、湿度和水分的保持都很重要.蛭石不利于透气和透水,所以用其移栽的植株容易烂

根,珍珠岩保水能力差,易导致植株干死,而蛭石和珍珠岩(1:1)的混合正好弥补双方的弱点,可以为移栽苗提供比较好的水分环境和透气性.组培苗从组培室拿到温室移栽,需要适应新的环境,必须先炼苗.开盖炼苗容易使培养基表面发霉,因此不开盖炼苗的效果为最好.

2.3 生长的观测

移栽中 CT5-5 丢失,生长统计在其他 6 个系号与对照中进行.移栽 12 周后,未转化的对照植株(CK)高度为 8.4 cm,转基因植株 LT1-1 为 6.89 cm,LT1-2 为 9.59 cm,CT5-1 为 9 cm,CT5-2 为 8.3 cm,CT5-3 为 5.83 cm,CT5-4 为 7.88 cm.经统计分析,转化植株 CT5-3 的高生长比对照显著降低,其他转化植株与对照均无明显差异.另外,未转化植株的茎节数为 3.85,转化植株 LT1-1、CT5-1、CT5-3、CT5-4 的茎节数分别为 4.4、4.57、4.33 和 4,与对照无明显差异;只有 LT1-2,CT5-2 的茎节数比对照有明显增加,分别为 5.18 和 5.6(图 4).在节间长度上,CT5-2 为 1.38 cm,CT5-3 为 1.5 cm,CT5-4 为 1.5 cm,均比对照 2 cm 有所降低,但其余转化植株都与对照无显著差异(图 5).转化植株的根数量较未转化植株有所增加,在形态上并无明显差别.

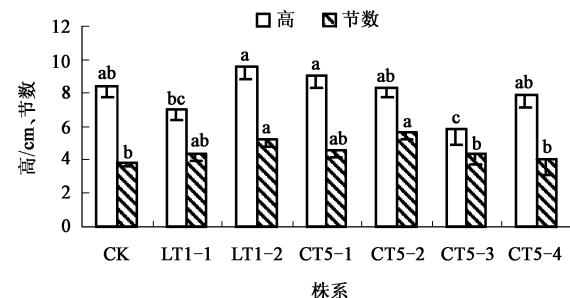


图 4 转化植株与对照(CK)的高、节数

FIGURE 4 Stem length and node number of the transgenic clones and control plants (CK)

注:小写字母表示 $P=0.05$ 显著水平,相同字母之间表示差异不显著,不同字母之间表示差异显著(图 5 同).

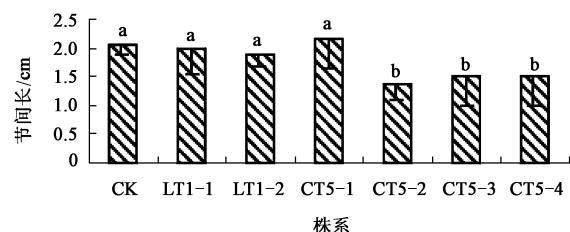


图 5 转化植株与对照(CK)的节间长

FIGURE 5 Internode length of the transgenic clones and the control plants (CK)

2.4 扦插生根

转化植株与对照硬枝扦插的生根情况如表 2 所示,转化植株的扦插生根率比对照显著提高,为

74.4%~92.3%,而对照只有42.6%.转化植株插条的生根数量比对照有显著增加(图6),每株达到12~18条,根密布在插条切口的周围.而未转化植株每株只有5条,一般分布在切口的一侧.转化植株插条的生根长度比对照也有增加.另外,观测到部分转化植株的插条基部有愈伤组织形成,而对照植株插条上并未发现长愈伤的现象.

表2 转化植株与对照(CK)扦插生根结果

TABLE 2 Result of *ex vitro* rooting by cuttings from transgenic clones and controls

植株	生根率/%	每株根的数量/条	根的长度/mm
CK	46.2 a	5 a	28 a
LT1-1	88.7 bc	12 b	105 b
LT1-1	74.4 b	13 b	89 b
CT5-4	89.7 bc	14 b	96 b
CT5-1	92.3 c	18 b	113 b

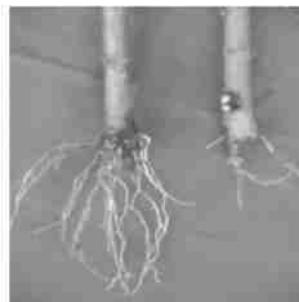


图6 转化植株(左)与未转化植株(右)的扦插生根情况

FICURE 6 Rooted plant from cuttings of the transgenic plant (left) and the untransformed control (right)

3 讨论

未转化植株需要在添加外源激素的培养基上才能生根,而转化植株在无激素条件下就能生根,且生根率达到80%~100%,生根的数量也有明显增加.扦插试验中,未经处理的转化植株插条生根率达到74.4%~92.3%,进一步说明转入rolB基因的毛白杨生根能力比未转化植株明显提高.

低浓度生长素可以诱导转化植株根的发生,而当生长素浓度超过1.0 mg/L就抑制了其根的生成.而未转化植株在生长素浓度达到2.0 mg/L时,还能生成大量的根.高浓度的生长素使转化植株形成愈伤的频率增加,且生根的数量减少,证明转化植株对外源生长素表现出高度的敏感性.在用茎片作为材料的试验中,随着激素处理时间的增加,转化植株的茎片生根的数量有明显增加.而未转化植株在同样处理后,生根的数量变化不明显.同样说明转化植株比未转化植株对外源生长素表现更为敏感.

rolB基因的导入提高了植株对生长素的敏感性,这可能是导致转化植株生根能力提高的重要原

因^[7].有试验证明转入Ri质粒植株的根对外源生长素的敏感性要比普通植株的根高100~1 000倍.转化植株相对非转化植株对外源激素敏感性的区别在于它的根细胞生理受外源激素的影响更早^[8].rolB基因的表达可能导致植株受伤部位生长素的积累,从而导致根的产生^[9,10].

转化植株的生根能力比未转化植株有很大提高,但转化植株不同无性系之间又存在着差异,这说明rolB基因在不同转化植株中的表达存在差异.有的转化植株生根能力没有明显增强,可能是由基因沉默或基因失活导致.有学者认为,转基因在多拷贝时,转移基因的失活频率最高,这种失活与T-DNA的甲基化有关^[11].

转化植株生长形态上的变化可能由于rolB蛋白参与了生长素感受—转导过程,改变了激素的平衡.现已证实,rolB基因编码蛋白定位于质膜上,具有蛋白质酪氨酸磷酸酯酶(PTP)活性.在植物生长素作用机理中,也可能有一个激酶/PTP级联放大系统在起重要作用^[12].另外,转化植株表型的变化与转移基因插入植物基因组的位置有关.

许多难生根木本植物的插穗都需要外源激素的处理,导致不定根的形成,而转rolB基因植株免除了繁殖中对外源激素的需要.通过转入rolB基因来提高难生根木本植物的生根能力,是一条有效途径.

参 考 文 献

- [1] 齐康学,贾小明,张廷桢,等.石蜡处理插穗提高毛白杨扦插成活与生长的研究[J].西北林学院学报,2001,16(3):23~25.
QI K X, JIA X M, ZHANG T Z, et al. Studies on the raising hardwood cuttings survival rate and young plant growth of *Populus tomentosa* by treating cuttings with paraffin wax [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2001,16(3):23~25.
- [2] 郑均宝,王峰,刘群录.毛白杨转基因植株的研究[J].林业科学,1995,31(2):181~184.
ZHENG J B, WANG F, LIU Q L. Studies on the clones of gene-transformed *Populus tomentosa* [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 1995, 31(2):181~184.
- [3] 梁机,陈晓阳,林善枝,等.发根农杆菌Ri质粒rol基因研究进展及在林木改良中的应用[J].植物学通报,2002,19(6):650~658.
LIANG J, CHEN X Y, LIN S Z, et al. Advance of studies on *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid rol genes and their applications for forest tree genetic improvement [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2002, 19(6):650~658.
- [4] ZHU L H, HOLEFORS A, AHLMAN A, et al. Transformation of the apple rootstock M.9/29 with the rolB gene and its influence on rooting and growth [J]. *Plant Sci*, 2001, 160: 433~439.
- [5] ZHU L H, LI X Y, AHLMAN A, et al. The rooting ability of the dwarfing pear rootstock BP10030(*Pyrus communis*) was significantly increased by introduction of rolB gene [J]. *Plant Sci*, 2003, 165: 829~835.

- [6] 梁机·转 *rolB* 基因改良毛白杨生根能力研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2004.
- LIANG J. Study on genetic transformation of *Populus tomentosa* with *rolB* gene and improving its rooting ability [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2004.
- [7] SPANO L, MARIOTTI D, CARDARELLI M, et al. Morphogenesis and auxin sensitivity of transgenic tobacco with different complements of Ri T-DNA[J]. *Plant Physiol.*, 1988, 87: 479-483.
- [8] WEN H S, PETIT A, GUERN J, et al. Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1988, 85(3): 417-421.
- [9] CARDARELLI M, MARIOTTI D, POMPONI M, et al.
- Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype [J]. *Mol Gen Genet*, 1987, 209: 475-480.
- [10] SPENA A, SCHMÜLLIN T, KONCZ C, et al. Independent and synergistic activity of the *rol A*, *B* and *C* loci in stimulating abnormal growth in plants [J]. *EMBO J.*, 1987, 6(3): 891-899.
- [11] HOBBS S L A, KPODAR P, DELONG C M O. The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformation [J]. *Plant Mol Biol*, 1990, 15: 851-864.
- [12] FILIPPINI F, ROSSI V, MARIN O, et al. A plant oncogene as a phosphatase [J]. *Nature*, 1996, 379: 499-500.

(责任编辑 董晓燕)

关于召开“森林文化学术研讨会”的正式通知

2005年3月北京林业大学提出召开首届“全国森林文化学术研讨会”的倡议,得到了全国各有关单位和个人的积极响应。根据征文和报名情况,会议定于2005年9月24—25日在北京召开。现将研讨会的有关事项通知如下:

1 研讨会的主题

- 1) 森林文化的概念、内涵、外延及研究意义;
- 2) 森林文化研究与生态文明建设的关系;
- 3) 森林文化在社会主义先进文化建设中的地位和作用;
- 4) 森林文化研究的范畴与理论框架;
- 5) 不同树种、林种、森林动植物、森林生态系统和森林景观的文化研究;
- 6) 国内不同历史阶段、区域、民族、宗教的森林文化研究;
- 7) 国外森林文化及中外森林文化比较研究;
- 8) 如何研究和弘扬我国古代优秀的森林文化传统;
- 9) 森林经营、自然保护、森林旅游与森林文化及森林美学的关系;
- 10) 林业高等学校、研究院所、林业企事业单位、新闻媒体、森林公园和国家风景名胜区等有关机构如何开展森林文化教育;
- 11) 如何传播森林文化(包括学术传播和大众传播等);
- 12) 如何开展森林文化学术研究和宣传教育的国际交流与合作;
- 13) 其他与森林文化有关的问题。

2 会议地点和时间

会议地点: 北京(详细地址将于9月5日前后直接通知与会者)

报到时间: 2005年9月24日上午8:30—9:30

报到地点: 北京林业大学办公楼118室

撤离时间: 2005年9月25日晚餐后

3 其他重要事项

- 1) 所有征文将根据审稿意见, 分期在《北京林业大学学报(社会科学版)》上发表。
- 2) 会议代表需要交纳500元会议费。
- 3) 接此通知的同志, 请于2005年8月31日前通过信函、Email、传真或电话与会议筹备组联系, 告知您是否与会、发言及论文的题目等。会议筹备组也会及时向您通报会议的准备情况。如您知道其他同志有参加会议的愿望, 请代为转达此通知内容, 并请他们与会议筹备组联系。
- 4) 京外代表如需联系9月23日或25日在北京林业大学或其周边的住宿, 请提前与会议筹备组联系。
- 5) 此通知可以复印, 可以从 <http://journal.bjfu.edu.cn/> 下载。

4 会议筹备组联系方式

联系电话: 010-62337919 传真: 010-82373371 Email: sheke@bjfu.edu.cn

回执寄: 100083《北京林业大学学报(社会科学版)》编辑部 何晓琦 孔艳

特此通知!

北京林业大学
2005年7月11日