

· 技术方法 ·

胡杨组织培养叶片及插穗毛状根发生

王大鹏¹, 唐嘉泽¹, 邵明成¹, 张文彪², 王华芳^{1*}

¹北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; ²北京市延庆区第一职业学校, 北京 102100

摘要 胡杨(*Populus euphratica*)是唯一分布在干旱沙漠地区的高大乔木, 根蘖能力强, 但自然条件下插穗难以生根, 扦插繁殖困难。该文研究发根农杆菌菌株ATCC11325诱导胡杨发根, 菌液浓度为OD₆₀₀=0.4, 添加100 mg·L⁻¹乙酰丁香酮, 叶片切段划伤预培养后侵染10分钟, 培养20天, 在叶片创伤部位诱导发生无向性的健壮毛状根; 浸染肉质根插穗, 须根发生和植株成活率从20%提高到60%, 且地上部分分枝多, 生长茂盛。该发根农杆菌菌株显著促进胡杨插穗生根成活。

关键词 发根农杆菌, 毛状根, *rolB*基因, 生根, 胡杨

王大鹏, 唐嘉泽, 邵明成, 张文彪, 王华芳 (2017). 胡杨组织培养叶片及插穗毛状根发生. 植物学报 52, 210–217.

胡杨(*Populus euphratica*)为沙漠地区唯一的高大乔木建群树种, 具有抗旱、抗盐碱、抗寒及抗地表温度剧变等特性, 对维护沙漠地区绿色生态以及促进当地经济和社会发展具有重要作用(梁海荣等, 2009)。胡杨的繁殖至今仍然存在问题, 播种实生苗个体间生长差异大, 种苗质量不稳定; 自然条件下根蘖能力强, 可见独树形成的小片纯林, 但根蘖苗造林成活率低; 人工扦插生根困难或不生根(王文彪等, 2013), 嫁接繁殖数量极为有限, 质量不稳定(张平等, 2005), 严重限制了胡杨优质人工林的发展。

胡杨不定根诱导已成为无性繁殖的关注点或突破口。王大为和刘克彪(2015)以4种植物生长调节剂IBA、NAA、ABT及NAA+IBA处理胡杨插穗, 其中, 150 mg·L⁻¹ IBA处理成活率最高, 达86%, 其浓度上下浮动25 mg·L⁻¹, 成活率则降低至40%–60%; 而不同种类的植物生长调节剂协同处理时成活率为33.3% (刘茂秀等, 2015)。前人的研究表明, 植物生长调节剂在一定程度上可促进胡杨扦插生根, 但其种类、剂量、处理方式和条件等影响因素多变且难以掌握, 探索调控胡杨发根的新途径和新方法对其无性繁殖具有重要的理论和现实意义。

发根农杆菌诱导大多数双子叶植物和少数单子叶植物产生毛状根(刘伟和郝建平, 2007), 已被用于植株重建(Cho and Widholm, 2002; Chaudhuri et al.,

2006)、次生代谢物生产(Fujimoto et al., 2000; Oksman-Caldentey and Sévon, 2002; Moyano et al., 2003)及根相关启动子功能鉴定(Xiao et al., 2005)等。此外, 发根农杆菌已用于苹果(*Malus xiaojinensis*)、扁桃(*Amygdalus mongolica*)、胡桃(*Juglans regia*)、枣树(*Ziziphus jujuba*)和希茉莉(*Hamelia Pateue*)等树种的扦插生根(周延清等, 1996; 李玲等, 2001), 对牡丹(*Paeonia suffruticosa*)诱导生根也已进行了初探(杨至德等, 2007)。

本研究以胡杨为试材, 探讨发根农杆菌菌株ATCC11325对叶片和肉质根插穗诱导毛状根发生的作用与处理方法, 为该生物菌剂用于促进难生根树种胡杨无性繁殖提供理论依据与技术基础。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

胡杨(*Populus euphratica* Oliv.) 3年生植株购自内蒙古额济纳旗, 种植于北京市延庆区第一职业学校实训基地; 春季选择5年生健壮植株, 采集无病虫害的健康嫩枝作为外植体建立无菌培养体系。

发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)购自中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 菌种编号为1.2556, 代号为ATCC11325 (以下称为菌株

收稿日期: 2016-02-04; 接受日期: 2016-04-26
基金项目: 国家自然科学基金(No.31370598, No.J1103516)
* 通讯作者。E-mail: hfwang@bjfu.edu.cn

ATCC11325)。

1.2 菌株鉴定

提取发根农杆菌菌株ATCC11325质粒, 根据GenBank中的*rolA*、*rolB*、*rolC*和*MAS*等基因序列设计引物, 并以活化菌液质粒为模板进行PCR扩增, 扩增产物电泳后切胶回收并测序。以NCBI的BlastX程序进行核酸序列及其编码蛋白序列的比对分析(Yang et al., 2014)。

1.3 发根农杆菌ATCC11325诱导组织培养叶片发根

研究发根农杆菌ATCC11325的发根诱导作用。为避免其它微生物干扰, 实验在无菌条件下进行。为避免植株根或茎先成根原基的影响, 实验材料为植物叶片。

1.3.1 组织培养叶片的获得

1.3.1.1 无菌材料的获得

田间采集的胡杨嫩枝用毛刷清洁后, 再用自来水冲洗25分钟, 70%乙醇表面消毒2分钟, 无菌水清洗3次, 每次3分钟; 分别用有效氯浓度为0.5%、1%和1.5%的二氯异氰尿酸钠溶液消毒10、15及20分钟, 无菌水冲洗3次; 进行有效氯浓度和消毒时间的正交因素实验 $L_9(3^4)$, 共9个处理组合, 每组合处理30个外植体, 设3次重复。截取嫩枝中间含1个腋芽(长1–1.5 cm)的茎段, 接种在启动培养基上, 生长20天后统计外植体去污染率和存活率。去污染的外植体转移到新配制的培养基上无菌培养。启动培养基组成为MS+0.75 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA+6.0 g·L⁻¹ 琼脂。

1.3.1.2 试管苗继代培养

为减少胡杨试管苗黄化, 采用波动周期培养法, 更换培养基的间隔时间依次为7和21天。基本培养基为MS, 分别添加0.25、0.5、0.75、1.0 mg·L⁻¹ 6-BA, 0.1、0.2 mg·L⁻¹ NAA+6.0 g·L⁻¹ 琼脂, 进行正交因素实验 $L_9(3^4)$, 共9个处理组合, 每组合培养30个不定芽, 设3次重复。培养条件为光密度36 mol·m⁻²·s⁻¹, 光周期为16小时光照/8小时黑暗, 温度(25±1)°C。统计植株各处理的平均株高和去黄化率, 筛选最佳增殖培养基。

1.3.1.3 试管苗生根

选择生长健壮、高1.5 cm以上的试管苗转入生根培养基, 基本培养基为1/2MS, 分别附加0、0.25和0.5 mg·L⁻¹ IBA; 0和0.1 mg·L⁻¹ NAA+6.0 g·L⁻¹ 琼脂, 将pH值分别调至5.8和6.5, 共10个组合处理。在上述条件下培养30天, 统计小植株数量(已生根的组织培养植株)及生根率, 选择最佳生根培养基。

1.3.1.4 移栽驯化

当胡杨小植株不定根长约1 cm时, 从组织培养室转移至过渡间, 逐渐打开培养瓶封口, 炼苗7天, 移栽到蛭石:珍珠岩为2:1 (v/v)的基质中, 温室养护。

1.3.2 发根农杆菌ATCC11325诱导组织培养叶片产生毛状根

在无菌条件下, 将胡杨叶片切割为0.5–1.0 cm, 作纵切划伤(至维管束组织)和不划伤(对照)两种处理, 叶片近轴面向下, 接种在预培养基上并在组织培养室预培养2天; 待发根农杆菌ATCC11325菌液OD₆₀₀值为0.4时, 添加和未添加100 mg·L⁻¹ 乙酰丁香酮(AS), 分别侵染胡杨叶片5、10和20分钟, 在灭菌滤纸上吸去附着的菌液, 转移到共培养基上, 在28°C黑暗条件下共培养2天; 再转移到含500 mg·L⁻¹ 头孢霉素的培养基上(无植物生长调节剂)培养20天, 观察叶片生根情况, 统计毛状根诱导率。

毛状根诱导率=(产生毛状根的外植体数/接种外植体总数)×100%。

1.4 发根农杆菌ATCC11325诱导插穗发根

发根农杆菌ATCC11325菌液OD₆₀₀值为0.4时, 加入100 mg·L⁻¹ AS, 浸泡胡杨插穗(2年生肉质根插穗, 直径约5 mm, 无须根) 10分钟, 对照浸泡菌液培养基溶液, 扦插于河沙基质中, 每组30株, 设3个重复。在温室(28°C)养护, 每天检测基质湿度并浇水保持湿润。30天后观察统计插穗的生根情况。

生根率=(生根株数/扦插株数)×100%。

1.5 数据统计分析

采用软件SPSS Statistics 17.0进行数据统计分析。

2 结果与讨论

2.1 发根农杆菌ATCC11325发根相关基因的鉴定

购自中国微生物菌种保藏中心的发根农杆菌经PCR鉴定后,电泳分离其产物。基因测序和生物信息学分析表明,菌株ATCC11325含有甘露碱合成酶基因MAS,片段大小为915 bp(图1A);*rolA*、*rolB*和*rolC*基因片段大小分别为274、643和582 bp(图1B–D),与NCBI相关基因及其蛋白序列相似。

2.2 发根农杆菌ATCC11325诱导组织培养叶片发根

2.2.1 组织培养叶片的获得

胡杨外植体表面灭菌的溶液浓度和灭菌时间的 $L_9(3^4)$ 因素实验中,不同处理之间外植体去污染率和萌芽率差异显著。用有效氯浓度为1%的二氯异氰尿酸钠溶液消毒15分钟,去污染率达80%,萌芽率达76.7%,两者的综合去污染萌芽率最大(为61.36%)。

胡杨试管苗增殖培养,在MS培养基中添加植物生长调节剂6-BA和NAA的因素实验 $L_9(3^4)$ 的9个组合,不定芽分化数量和生长量(平均株高)差异显著。培养基组成为MS+0.75 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA+6.0 g·L⁻¹琼脂时,平均株高达到最大值(4.2 cm),不定芽数较多;且无玻璃化现象,叶色鲜绿;未见黄化现象(图2A, B),为最佳增殖培养基。

胡杨试管苗生根,如1.3.1.3节所述,在植物生长调节剂IBA和NAA及pH组合的10种1/2MS培养基上培养30天,生根状况差异显著。培养基组成为1/2MS+0.25 mg·L⁻¹ IBA+0.1 mg·L⁻¹ NAA (pH6.5)时,培养的试管苗生根率最高(达76.64%),生根数达9.96;形态学下端产生愈伤组织较少,属最佳生根培养基(图2C, D)。

2.2.2 发根农杆菌ATCC11325诱导组织培养叶片产生毛状根

上述获得的胡杨组织培养叶片经过预培养(图3A),进行发根农杆菌菌株ATCC11325侵染。在MS基本培养基上培养15天,叶片主脉切口、叶片边缘和叶背中部划伤等处可见白色点状突起,20天后发根伸长达1–2 cm,没有向地性,且未接触培养基(图3B–F)。

发根农杆菌ATCC11325侵染条件和胡杨叶片毛状根诱导率如表1所示,重悬菌液中添加100 mg·L⁻¹ AS的毛状根诱导率达40.21%,明显高于不添加AS(诱导率为5.86%),差异极显著(表1, $P \leq 0.01$),且生根密度大,白色发根细长,呈丛生状。侵染时间分别为5、10和20分钟的处理中,侵染10分钟的叶片组织毛状根诱导率最高(达76.87%)。时间过短或过长均导致诱导率降低,且侵染20分钟的叶片材料出现部分褐化(图3E)。划伤叶片毛状根诱导率为46.7%,高于未划伤的20% (图3F),差异极显著(表1, $P \leq 0.01$)。

2.3 发根农杆菌ATCC11325诱导插穗产生毛状根

发根农杆菌ATCC11325菌液浸染胡杨肉质根插穗,扦插养护30天后的插穗生根率达60%,显著高于对照组的20%;须根数量显著多于对照(图4A–C, $P \leq 0.05$),乳白色且粗壮,长10–30 cm;对照组须根纤细且呈暗褐色,长3–5 cm。

发根植株地上部分的生长,处理组萌芽早,分枝多,长势旺盛,与对照之间的差异明显(图4D–F)。

2.4 讨论与结论

发根农杆菌的不同菌株对各种植物的发根诱导

表1 发根农杆菌菌株ATCC11325侵染处理因素对胡杨叶片毛状根诱导的影响

Table 1 Effect of *Agrobacterium rhizogenes* ATCC11325 infecting factors on the hairy root induction of *Populus euphratica*

Factors	Treatment	Leaf discs	Rooting rate (%)
AS (100 mg·L ⁻¹)	Add	30	40.21aA
	No add	30	5.86 bB
Infection time (min)	5	30	38.54 bB
	10	30	76.87 aA
	20	30	40.21 bB
Scratch	Scratch	30	46.7 aA
	Unscratch	30	20 bB

同列数据后不同小写字母表示差异显著($P \leq 0.05$),不同大写字母表示差异极显著($P \leq 0.01$) (采用邓肯氏复极差法进行显著性分析)。

Different lowercase letters in the same column indicated significant differences ($P \leq 0.05$), and capital letters indicated extremely significant differences ($P \leq 0.01$) (Duncan's multiple range test).

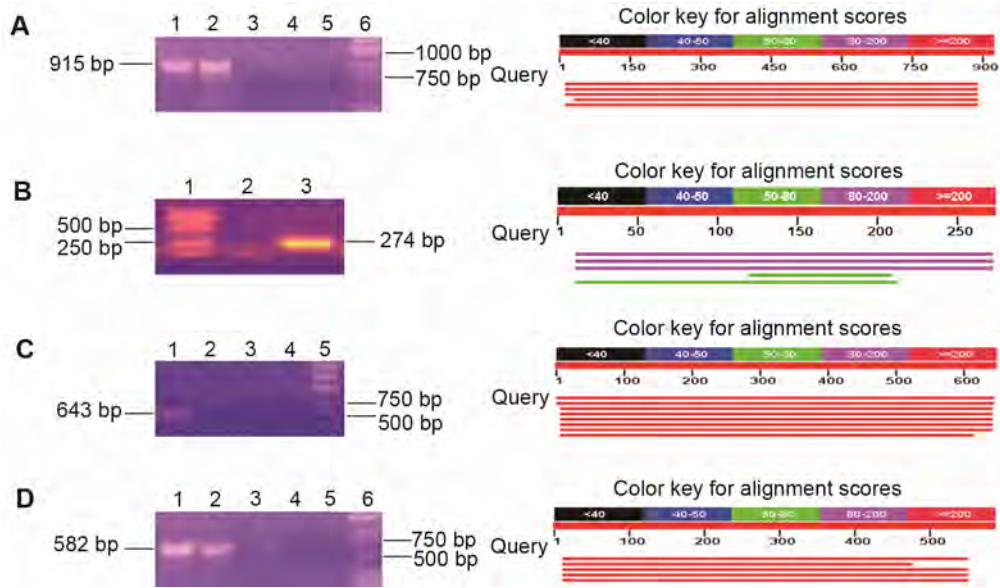


图1 发根农杆菌ATCC11325发根基因PCR产物序列的分子鉴定

(A) MAS基因, 泳道1和2为菌株ATCC11325质粒DNA; 3-5: 阴性对照(ddH₂O); 6: Marker 3000; (B) roIA基因, 泳道1为 Marker 3000; 2: 阴性对照(ddH₂O); 3: 菌株ATCC11325质粒DNA; (C) roIB基因, 泳道1为菌株ATCC11325质粒DNA; 2-4: 阴性对照(ddH₂O); 5: Marker 3000; (D) roIC基因, 泳道1和2为菌株ATCC11325质粒DNA; 3-5: 阴性对照(ddH₂O); 6: Marker 3000。右图: PCR产物序列与NCBI相关基因及蛋白序列相似度。

Figure 1 PCR and sequencing analyses of *Agrobacterium rhizogenes* strain ATCC11325

(A) MAS gene, lane 1-2: ATCC11325 plasmid DNA; 3-5: Negative control (ddH₂O); 6: Marker 3000; (B) roIA gene, lane 1: Marker 3000; 2: Negative control (ddH₂O); 3: ATCC11325 plasmid DNA; (C) roIB gene, lane 1: ATCC11325 plasmid DNA; 2-4: Negative control (ddH₂O); 5: Marker 3000; (D) roIC gene, lane 1-2: ATCC11325 plasmid DNA; 3-5: Negative control (ddH₂O); 6: Marker 3000. Right figures: Similarity of PCR material sequences compared with NCBI accessed gene sequences and their coding amino acid sequences.

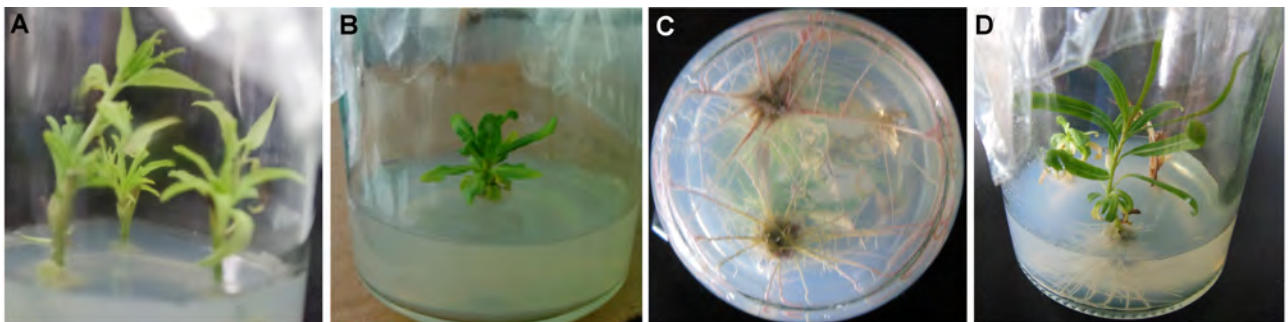


图2 胡杨组织培养体系

(A) 初代培养; (B) 继代培养; (C), (D) 生根小植株

Figure 2 Establishment of *in vitro* culture systems in *Populus euphratica*

(A) Initiation; (B) subculture; (C), (D) Plantlets from shoots

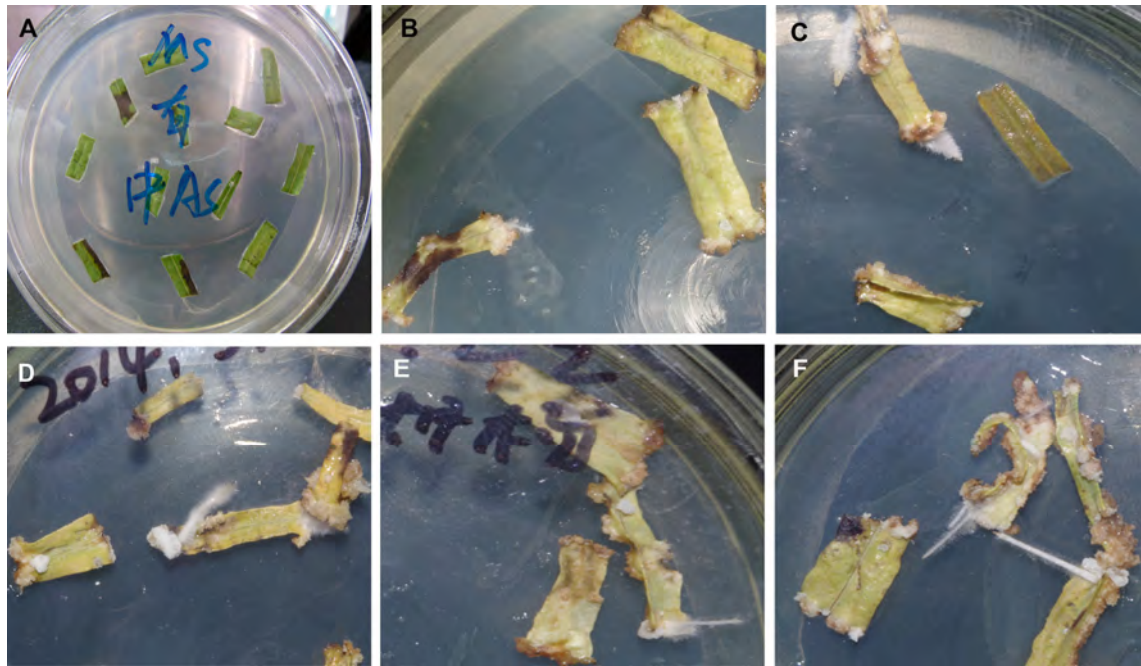


图3 发根农杆菌诱导胡杨组织培养叶片产生毛状根

(A) 预培养叶片; (B) 侵染5分钟的叶片; (C), (D) 侵染10分钟的叶片; (E) 侵染20分钟的叶片; (F) 划痕侵染的叶片

Figure 3 Hairy roots induced from leaf discs of *Populus euphratica* by *Agrobacterium rhizogenes*

(A) The pre-cultured leaves; (B) Leaves infected 5 min; (C), (D) Leaves infected 10 min; (E) leaves infected 20 min; (F) Scratched and infected leaves



图4 发根农杆菌菌株ATCC11325浸染胡杨插穗的发根和地上部分生长情况

(A) 扦插前的插穗; (B) 扦插对照; (C) 扦插处理; (D) 扦插前的地上部形态; (E) 对照地上部; (F) 处理地上部

Figure 4 Stock roots and aboveground part from fleshy root cuttings in *Populus euphratica* infected with *Agrobacterium rhizogenes* ATCC11325

(A) Before cutting; (B) Roots from control; (C) Roots from the cuttings infected with *Agrobacterium rhizogenes* ATCC11325; (D) Aboveground parts before cutting; (E) Aboveground parts of controls; (F) Aboveground parts of infected cuttings with *Agrobacterium rhizogenes* ATCC11325

效果不同。菌株R1205、R1000、R1601、ACCC10060及ZALF已分别用于诱导向日葵(*Helianthus annuus*) (陶均等, 2006)、黄瓜(*Cucumis sativus*) (施和平等, 1998; 陶均和李玲, 2005)、桑树(*Morus alba*) (孔卫青等, 2010)、山定子(*Malus baccata*) (武姣等, 2008)及三倍体毛白杨(*Populus tomentosaxP. alba var. pyramidalis*) \times *P. tomentosa*) (刘兴菊等, 2006)发生毛状根。*rolA*基因可导致植株矮化、叶片皱缩、花序缩短及开花延迟等。*rolB*可诱导植株产生大量毛根, 根生长快速且高度分叉, 叶片和花器官形态发生变化等。*rolC*基因可促进植株根的生长和分枝, 增加地上部分分枝, 节间缩短, 顶端优势减弱等(Schmülling et al., 1988)。据报道, *rolB*基因是诱导毛状根的关键基因(周达锋等, 1993), 在741杨(*P. alba*(*P. davidiana*+*P. simonni*) \times *P. tomentosa*, poplar741) (王连荣等, 2010)、烟草(*Nicotiana tabacum*)和胡萝卜(*Daucus carota*) (Michael and Spena, 1995)中诱导产生了毛状根, 且转*rolB*基因741杨株系生根率及根系生长量均明显高于转*rolC*基因株系(王连荣等, 2010)。毛白杨*rolB*基因多拷贝株系生根率高于*rolC*基因多拷贝株系(郝宇, 2009)。本研究结果表明, 发根农杆菌菌株ATCC11325含有甘露碱合成酶基因MAS, 发根基因*rolA*、*rolB*和*rolC*能诱导胡杨无菌苗叶片产生毛状根, 并诱导肉质根插穗产生毛状根(即不定根)。

胡杨扦插难以生根, 以发根农杆菌开展相关研究, 建立胡杨无菌培养体系, 便于在无菌和正常的生理条件下阐释其诱导细胞分化和再分化机制。胡杨组织培养材料易黄化, 张平冬等(2003)对多种增殖途径做了研究, 为解决该问题提供了基础。本研究以7-21天波动周期培养法, 在MS+0.75 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA+6.0 g·L⁻¹琼脂和1/2MS+0.25 mg·L⁻¹ IBA+0.1 mg·L⁻¹ NAA+6.0 g·L⁻¹琼脂(pH6.5)培养基上获得了黄化明显减少的组培材料。ATCC11325菌液浓度光密度OD₆₀₀值为0.4 (经预实验确定), 加入100 mg·L⁻¹ AS, 叶片划伤、预培养后侵染10分钟, 组织培养20天获得毛状根, 且毛状根主要集中于形态学下端的叶脉切口处。这与对大豆(*Glycine max*) (宗晓秋等, 2012)、地黄(*Rehmannia glutinosa*) (刘连旺等, 2015)、丹参(*Salvia miltiorrhiza*) (周伟等, 2007)及茶树(*Camellia sinensis*) (张广辉等, 2006)等的研

究结果类似, 胡杨叶片发根侵染条件的确定为研究发根相关基因的功能奠定了基础。

吴红雪等(2010)用生根粉ABT1号和ABT2号使胡杨硬枝扦插生根率达42.1%。王大为和刘克彪(2015)以150 mg·L⁻¹ IBA处理的胡杨嫩枝成活率达86%。本研究采用发根农杆菌ATCC11325诱导根插穗生根, 生根率从对照的20%提升到60%, 显著增强了地上部分的生长发育(图4F), 所含*rolA*、*rolB*和*rolC*基因可能对胡杨扦插苗形态建成具有地上和地下的双向调控作用, 且用发根农杆菌ATCC11325诱导发根操作方便, 对菌液浓度范围要求较广, 成本低廉, 对胡杨的苗木生产具有应用价值。

参考文献

- 郝宇 (2009). 多拷贝*rol*基因在杨树中表达差异分析. 硕士论文. 保定: 河北农业大学. pp. 1-48.
- 孔卫青, 杨金宏, 卢从德 (2010). 发根农杆菌诱导桑树毛状根体系的建立. 西北植物学报 30, 2317-2320.
- 李玲, 谢文军, 于树宏, 刘慧丽 (2001). 发根农杆菌对烯茉莉插条不定根发生的影响. 华南师范大学学报(自然科学版) (3), 23-25.
- 梁海荣, 吴红雪, 杨雪芹, 白莹, 张晓丽 (2009). 胡杨硬枝嫩枝扦插对比试验. 内蒙古林业科技 35(3), 32-35.
- 刘连旺, 张永清, 祁建军, 孙鹏, 廖登群, 庞小存, 李先恩 (2015). 地黄毛状根的诱导及条件优化. 山东农业科学 47, 47-50.
- 刘茂秀, 史军辉, 王新英 (2015). 植物生长调节剂对胡杨嫩枝扦插生根特性的影响. 防护林科技 (3), 9-11.
- 刘伟, 郝建平 (2007). 发根农杆菌的研究进展及其应用. 山西农业科学 35(7), 13-16.
- 刘兴菊, 刘英巨, 梁海永, 杨敏生, 周怀军 (2006). 发根农杆菌转化三倍体毛白杨. 西北林学院学报 21, 76-79.
- 施和平, 李玲, 潘瑞焱 (1998). 发根农杆菌对黄瓜的遗传转化. 植物学报 40, 470-473.
- 陶均, 李玲 (2005). 发根农杆菌菌株的综合鉴定及活力比较. 亚热带植物科学 34(2), 11-14.
- 陶均, 谭汝芳, 李玲 (2006). 发根农杆菌介导的向日葵遗传转化. 作物学报 32, 743-748.
- 王大为, 刘克彪 (2015). 四种生长调节剂对胡杨嫩枝扦插成苗的影响. 甘肃科技 31(6). pp. 142-145.
- 王连荣, 缪丽萍, 张晓军, 杨敏 (2010). 转不同*rol*基因741杨

- 株系相关性状比较分析. 植物遗传资源学报 **11**, 451–456.
- 王文彪, 梁超, 张吉树 (2013). 我国胡杨繁育技术研究进展. 江西农业学报 (3), 46–49.
- 吴红雪, 潘玉怀, 梁海荣 (2010). 不同浓度生根粉对胡杨硬枝扦插的影响. 内蒙古林业科技 **36**(4), 21–26.
- 武姣, 孔瑾, 王忆, 韩振海, 许雪峰 (2008). 发根农杆菌介导山定子遗传转化及发根再生植株. 园艺学报 **35**, 959–966.
- 杨至德, 王雁, 刘雪梅, 缪晔, 汤巧香 (2007). 发根农杆菌诱导牡丹生根的初步研究. 林业科学研究 **20**, 292–295.
- 张广辉, 梁月荣, 陆建良 (2006). 发根农杆菌介导的茶树发根高频诱导与遗传转化. 茶叶科学 **26**, 1–10.
- 张平冬, 康向阳, 高鹏, 韩锦 (2003). 胡杨离体培养分化增殖途径的比较研究. 北京林业大学学报 **25**(6), 50–54.
- 张平冬, 康向阳, 韩锦 (2005). 胡杨嫁接繁殖研究初报. 干旱区资源与环境 **19**(4), 197–200.
- 周达锋, 卜学贤, 陈维伦 (1993). 发根农杆菌Ri质粒的分子生物学及其应用前景. 植物学通报 **10**(2), 24–34.
- 周伟, 姚倩雯, 钱忠英, 沈亚芳, 刘园园, 张磊, 周根余, 开国银 (2007). 丹参毛状根诱导条件的优化. 上海师范大学学报(自然科学版) **36**(2), 93–98.
- 周延清, 张根发, 苑保军 (1996). 发根农杆菌研究进展. 遗传 **18**(4), 45–48.
- 宗晓秋, 张东升, 黄文坤, 彭焕, 彭德良 (2012). 发根农杆菌诱导大豆毛状根体系的建立. 华中农业大学学报 **31**, 699–703.
- Chaudhuri KN, Ghosh B, Tepfer D, Jha S (2006). Spontaneous plant regeneration in transformed roots and calli from *Tylophora indica*: changes in morphological phenotype and tylophorine accumulation associated with transformation by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep* **25**, 1059–1066.
- Cho HJ, Widholm JM (2002). Improved shoot regeneration protocol for hairy roots of the legume *Astragalus sinicus*. *Plant Cell Tiss Org* **69**, 259–269.
- Fujimoto Y, Ohyama K, Nomura K, Hyodo R, Takahashi K, Yamada J, Morisaki M (2000). Biosynthesis of sterols and ecdysteroids in *Ajuga* hairy roots. *Lipids* **35**, 279–288.
- Michael T, Spena A (1995). The plant oncogenes *rol A*, *B*, and *C* from *Agrobacterium rhizogenes*. *Agrobacterium Protocols* **44**, 207–222.
- Moyano E, Jouhikainen K, Tammela P, Palazón J, Cusidó RM, Piñol MT, Teeri TH, Oksman-Caldentey KM (2003). Effect of *pmt* gene overexpression on tropane alkaloid production in transformed root cultures of *Datura metel* and *Hyoscyamus muticus*. *J Exp Bot* **54**, 203–211.
- Oksman-Caldentey KM, Sévon N (2002). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. *Planta Med* **68**, 859–868.
- Schmülling T, Schell J, Spena A (1988). Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. *EMBO J* **7**, 2621.
- Xiao K, Zhang C, Harrison M, Wang ZY (2005). Isolation and characterization of a novel plant promoter that directs strong constitutive expression of transgenes in plants. *Mol Breeding* **15**, 221–231.
- Yang Y, Jiang XT, Zhang T (2014). Evaluation of a hybrid approach using UBLAST and BLASTX for metagenomic sequences annotation of specific functional genes. *PLoS One* **9**, e110947.

Rooting Induced on *in vitro* Leaves and Fresh Cuttings of *Populus euphratica*

Dapeng Wang¹, Jiaze Tang¹, Mingcheng Shao¹, Wenbiao Zhang², Huafang Wang^{1*}

¹College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; ²Beijing Yanqing District First Vocational School, Beijing 102100, China

Abstract *Populus euphratica* is the unique natural distribution arbor tree growing in the dry desert environment, with root suckering, but cuttings of roots are difficult to grow. This study explored the new ways of rooting induced by *Agrobacterium rhizogenes*. The strain ATCC11325 can induce hairy roots with no-tropism on *in vitro* leaf sections. The leaves were cut, scarred, co-cultivated, soaked for 10 min in the microbial agent at OD₆₀₀=0.4 with AS 100 mg·L⁻¹ added and cultured on tissue culture media for 20 days. Hairy rooting occurred on fresh cuttings soaked with the *A. rhizogenes* strain solution. The rooting and survival rate reached 60%, and aboveground parts developed more branches and showed vigorous growth. The *A. rhizogenes* strain promoted rooting of poplar tree fresh cuttings.

Key words *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root, *rolB* gene, rooting, *Populus euphratica*

Wang DP, Tang JZ, Shao MC, Zhang WB, Wang HF (2017). Rooting induced on *in vitro* leaves and fresh cuttings of *Populus euphratica*. *Chin Bull Bot* **52**, 210–217.

* Author for correspondence. E-mail: hfwang@bjfu.edu.cn

(责任编辑: 朱亚娜)