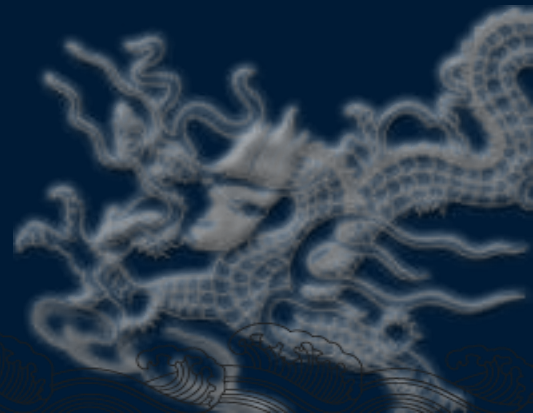


第六章 毛状根培养技术



教学内容

1 毛状根培养技术简介

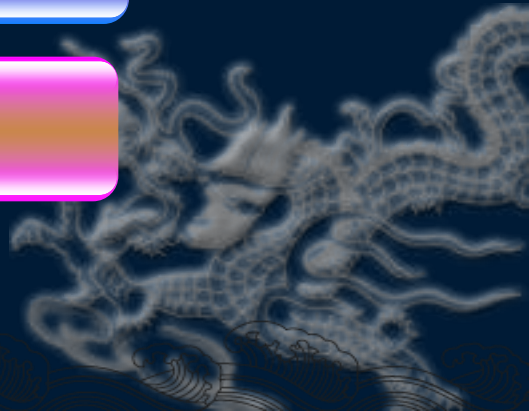
2 毛状根诱导培养体系的建立

3 毛状根培养、筛选和鉴定

4 毛状根培养技术与中药生产

5

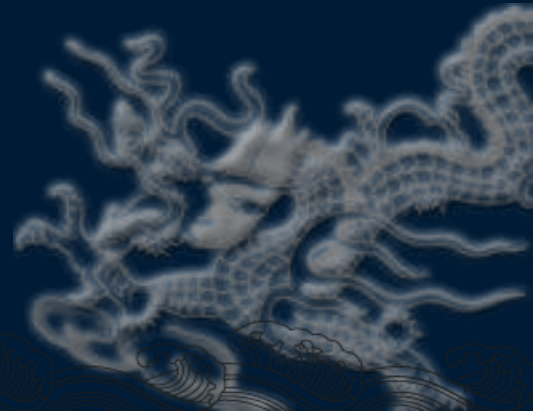
展望



1. 毛状根培养技术简介

毛状根 (hairy root) 概念

毛状根：植物受伤后，被发根农杆菌感染，在伤口处就会形成不定根，并产生多个分枝，呈毛发状；这些不定根又被称为毛状根。



1. 毛状根培养技术简介

发根农杆菌

Agrobacterium rhizogenes

发根农杆菌一种侵染性非常广泛的土壤细菌，革兰氏阴性。发根农杆菌能侵染多种植物，诱发被感染植物的受伤部位长出毛状根，其特征是迅速增生、高度分化出大量不定根。



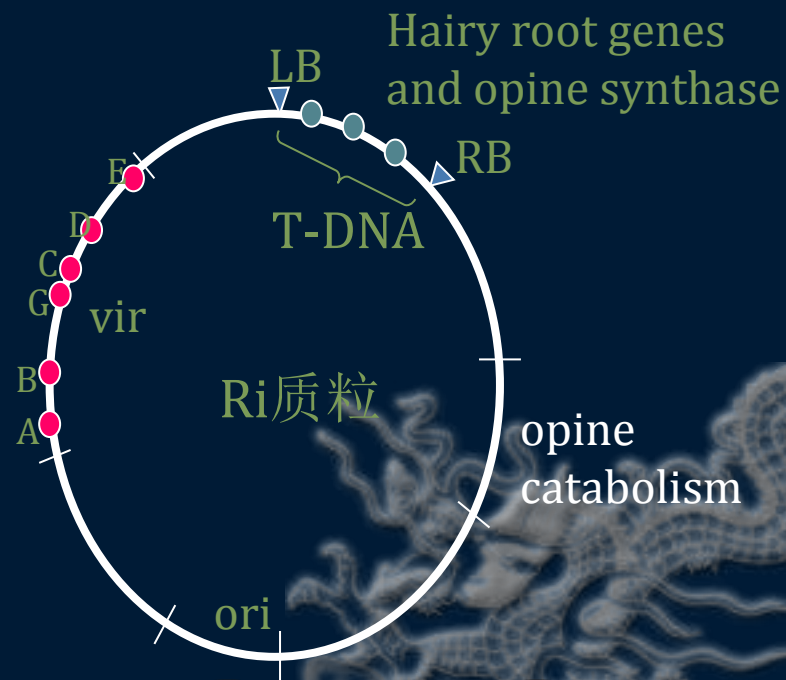
1. 毛状根培养技术简介

发根农杆菌的生物学特性

(1) 发根农杆菌能侵染大多数双子叶植物和少数单子叶植物

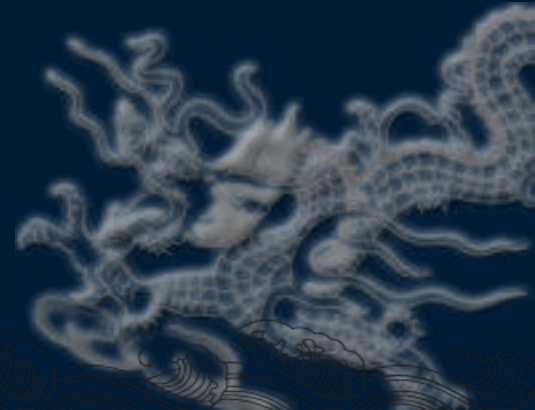
(2) **Ri质粒(root inducing plasmid)** **T-DNA区** (转移区)、**Vir区** (致病区) 两个功能区

Ri质粒



什么是毛状根培养技术？

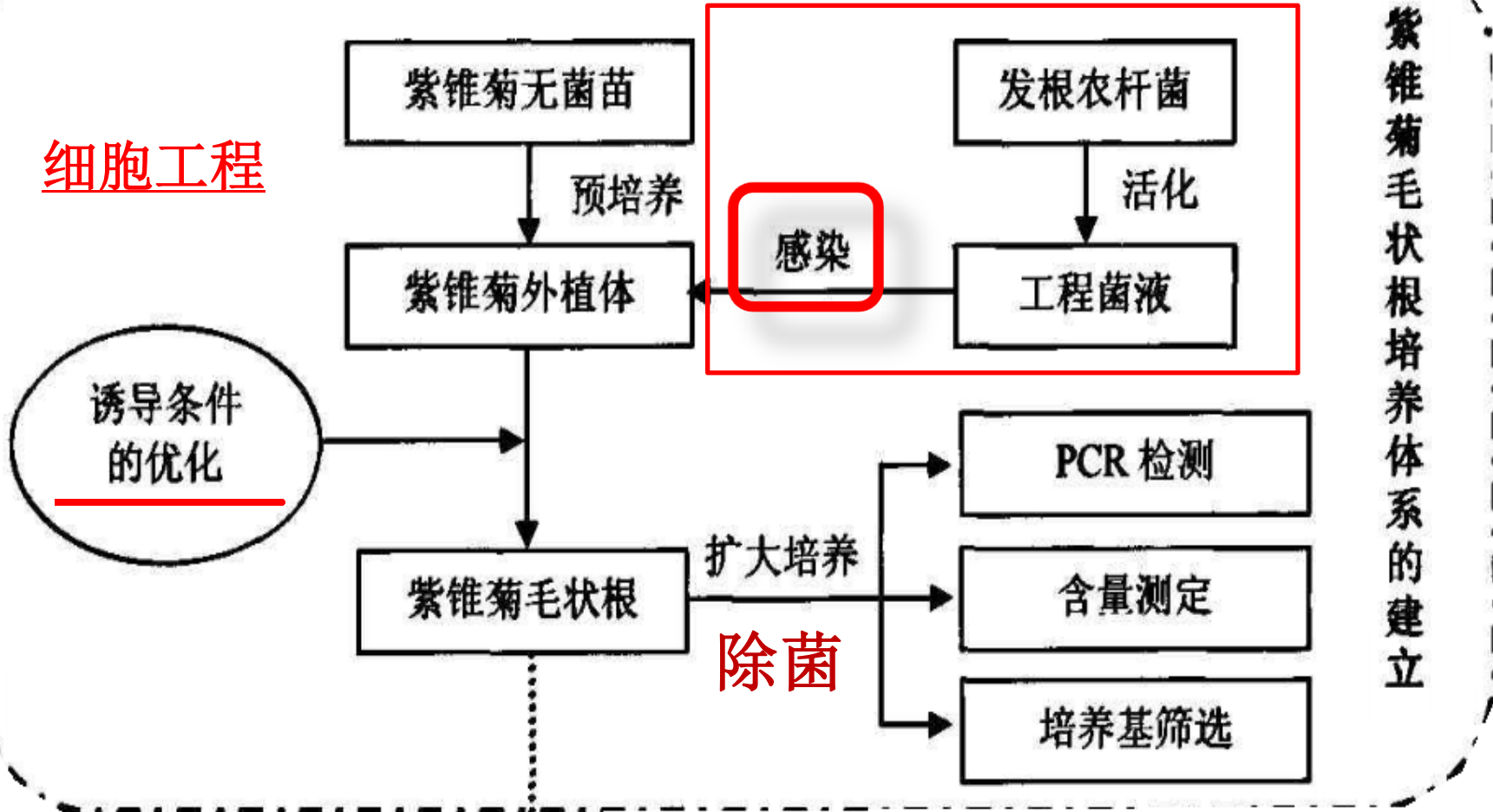
- 毛状根培养技术是20世纪80年代发展起来的**基因工程**和**细胞工程**相结合的一项新技术。
- 利用发根农杆菌的Ri质粒中含有的T-DNA整合到植物细胞上,使植物细胞诱导产生毛状根。



2.毛状根培养体系

基因工程

细胞工程



农杆菌菌株的活化

将菌株在液体培养基上培养（含乙酰丁香酮），
激活**vir**区的基因，为**Ri**质粒的转移提供先决条件。

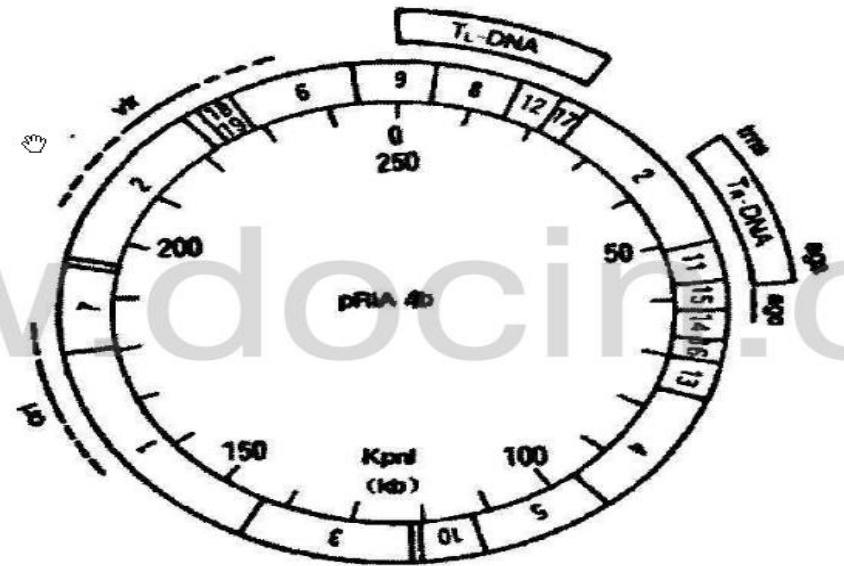
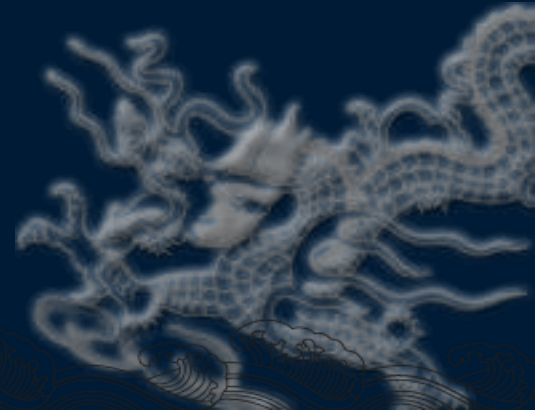


图2.1 农杆菌型发根农杆菌Ri质粒的结构图^[19]

受体材料的选择及处理

外植体：植物幼嫩的叶片、茎尖、分生组织等；
或愈伤组织；或原生质体

外植体处理：在培养基中进行预培养



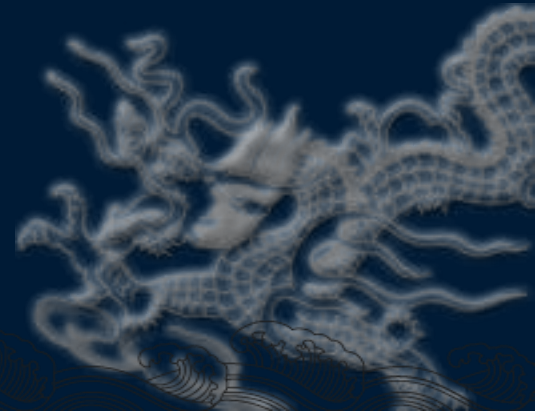
发根农杆菌感染的方法：

三种方法：

1.向植物体直接注射

2.与原生质体共培养

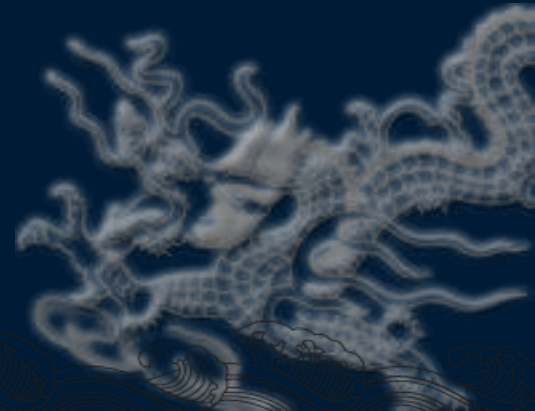
3.对植物外植体进行接种感染



毛状根的培养方法

具体培养方法

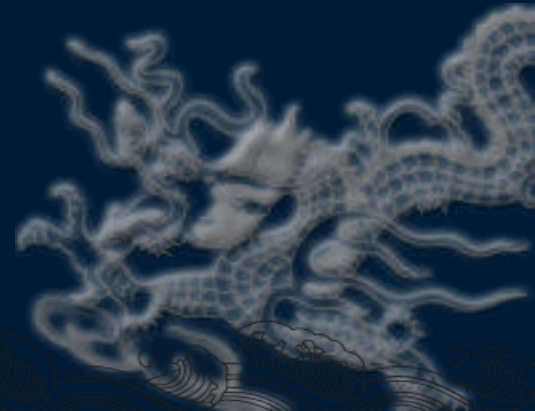
- ✓ 固体培养
 - ✓ 液体培养法
 - ✓ 两相培养法
- 分批培养
 - 连续培养
 - 半连续培养



毛状根的除菌方法

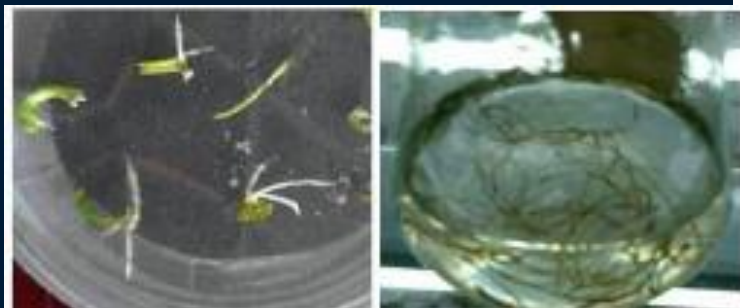
◆ 抗生素除菌法

抗生素除菌法是将毛状根转移至含有抗生素的培养基上，经数代转移直到完全无菌为止，常用的抗菌素有青霉素、头孢霉素等；





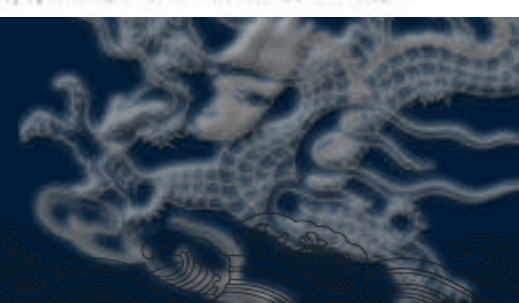
无菌苗



诱导出的毛状根
进行液体培养



图2 黄芪毛状根大量培养后的毛状根球
3 L培养瓶培养 15 d, 鲜重 285 g。



毛状根诱导的分子机理

1

发根土壤杆菌**识别**受伤植物释放的诱导物（乙酰丁香酮等酚性物质）

2

发根土壤杆菌识别信号分子后,向受伤细胞作趋化性运动,并与宿主细胞发生粘接。

3

发根土壤杆菌**Ri**质粒上的**vir**区（致病区）基因被乙酰丁香酮等物质活化,使**Ri**质粒上的**T-DNA**片段被切割下来并转入植物细胞,但**vir**区本身不转入。

4

T-DNA基因进入寄主细胞的细胞核,并**整合**到核基因组中,然后在寄主细胞中**表达**,从植物的感染点诱导毛状根。

毛状根的筛选与鉴定

筛选：选择生长速度较快、分枝较多的毛状根株系进行扩大培养

鉴定：

形态学水平：激素自养，根丛生，多分枝，多根毛，无向地性

细胞水平：冠瘿碱的测定（硝酸银染色）



毛状根培养反应器

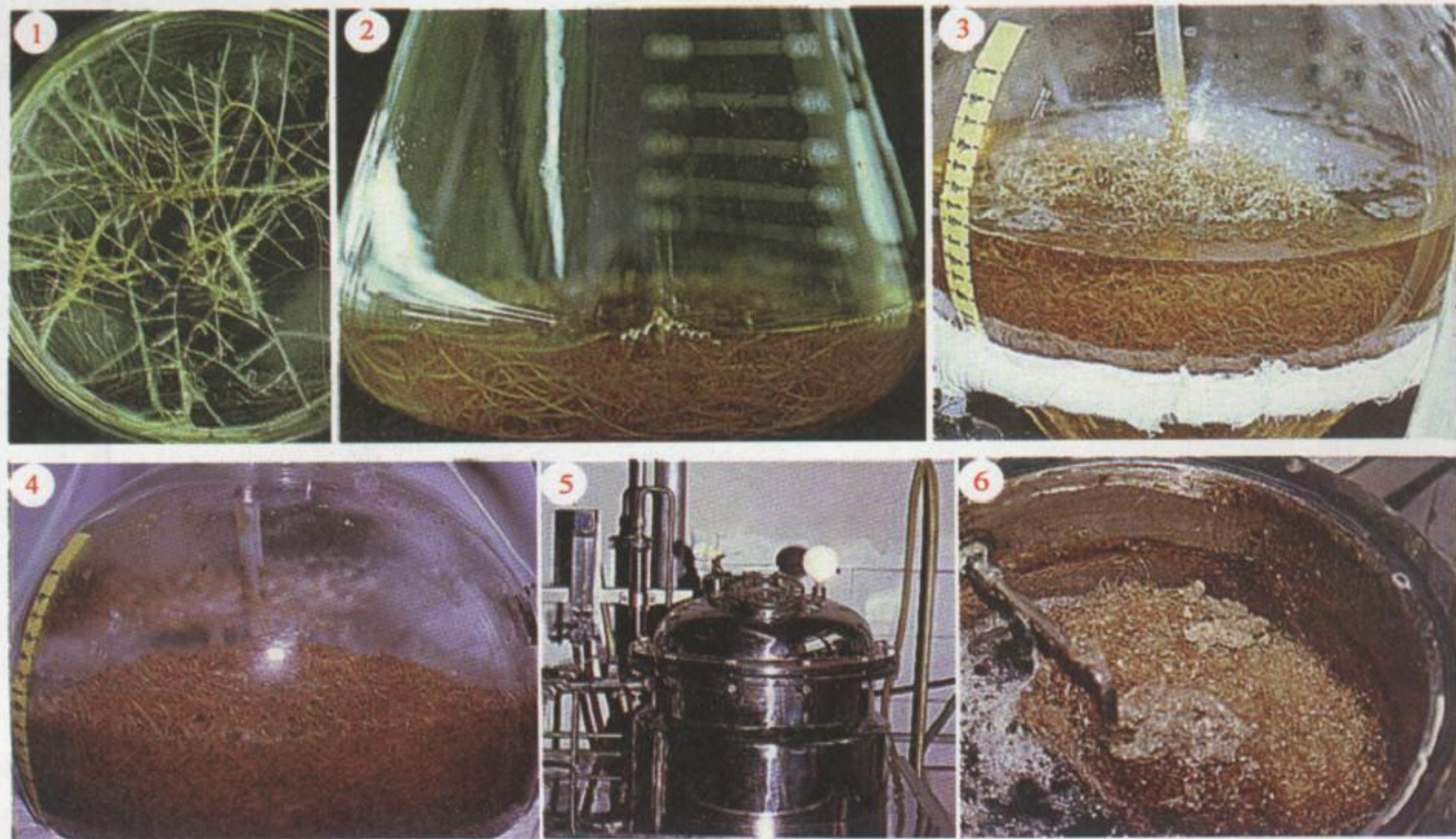


图 1 丹参毛状根的培养过程

注:1、固体培养基上的毛状根;2、三角瓶中的毛状根;3、10L 气升式反应器培养 25d 时的毛状根;4、10L 气升式反应器培养 50d 时的毛状根;5、75L 气升式反应器;6、75L 气升式反应器培养 50d 时的毛状根

毛状根培养技术的优点

优点

1. 生长速度快

毛状根有大量的分枝和根毛，生长快，可用于大量培养。

2. 激素自养性

毛状根中的T-DNA片段上有生长素合成酶基因。

3. 遗传稳定性

毛状根是细胞分化而来的根组织，属于单克隆，具有遗传稳定性。

4. 可塑性

发根农杆菌中的Ri质粒是一个很好的转基因载体，可把目的基因导入植物细胞中

5.毛状根与中药现代化生产

次生代谢产物的规模化生产

生产药用植物的活性成分

成功应用于工业生产的例子

药用植物人参、紫草、长春花、甜菜、胡萝卜(**Daucus carota**)、黄芪等植物的毛状根能够通过生物反应器培养来进行其次生物质的规模化生产。

展望

- **优：**毛状根培养体系是一种非常有潜力的生产次生代谢物的生物技术，其次级代谢物质的生产能力、遗传及生化稳定性、增加生物量的可操作性等特点都引起了人们相当大的兴趣。
- **缺：**目前的**生物反应器还难以满足毛状根大规模培养**的要求，主要限制因素为物质的转移，毛状根生长时易成团，限制了营养和氧气的进入。
- **缺：**由于目前对农杆菌不同菌株间侵染物种能力的差异机理还不够了解，并且不同物种间诱导形成毛状根的能力也不同，目前为止仅应用于部分的双子叶植物和少部分的单子叶植物及裸子植物，应用范围较窄。
- **因此，如何更好的开发和利用毛状根培育技术，使其能够达到基础研究和大规模工业化生产的要求还需要进一步探讨**