

## 新疆雪莲毛状根的诱导及其植株再生体系的建立

付春祥 金治平 杨 睿 吴风燕 赵德修\*

(中国科学院植物研究所,北京 100093)

**摘 要** 利用发根农杆菌 R1601、R1000、LBA9402 感染新疆雪莲的叶片、叶柄和根段外植体,诱导产生毛状根。毛状根接种量为 2.8 g/(L FW)时,20d 生长量可达 66.7 g/L,黄酮含量达到干重的 10.23%。冠瘿碱的检测和 *rol B* 基因的 PCR 分析表明,Ri 质粒中的 T-DNA 片段已经整合到毛状根细胞的基因组中。预培养时间、外植体类型以及发根农杆菌的菌株属性对毛状根诱导有着重要的影响。其中预培养 2 d 的新疆雪莲根段外植体经过 R1601 感染后,毛状根的诱导率可达 100%。诱导产生的毛状根在附加生长素的液体培养基中,有少量愈伤组织产生。由毛状根再生的植株与雪莲外植体再生的植株在形态上无明显区别,但前者的黄酮含量仅为后者的 53%。

**关键词** 新疆雪莲、发根农杆菌、毛状根、黄酮

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)03-0366-06

新疆雪莲(*Saussurea involucreta* Kar. et Kir.)别名雪荷花,为菊科(Compositae)凤毛菊属(*Saussurea* DC.)多年生草本植物。民间常用来治疗风湿性关节炎、妇女小腹冷痛、闭经、胎衣不下、麻疹不透、肺寒咳嗽和高山不适应症等<sup>[1]</sup>。新疆雪莲的主要成分为黄酮类化合物,其中 Hispidulin 和 Jaceosidin 对腹水型肝癌和 S180 癌细胞的 DNA 合成有明显抑制作用<sup>[2]</sup>。然而新疆雪莲生长环境恶劣,人工栽培相对困难,加上近年来的过度采挖,野生资源正面临灭绝的危险。

利用毛状根培养技术生产新疆雪莲中的黄酮类物质,是一条经济有效的途径。毛状根培养系统不但具有生长迅速、次生代谢物质合成能力强的优点,而且生产能力稳定、不需外源激素,利于天然药物的开发和利用<sup>[3]</sup>。因此利用发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)侵染雪莲细胞产生毛状根,并对毛状根进行离体培养,是雪莲药用资源可持续发展的有效途径。到目前为止,关于新疆雪莲的研究仅局限于药用价值、人工栽培与组培苗的快繁三个方面,而涉及毛状根培养方面的研究未见报道。

本文在新疆雪莲组培苗研究的基础上,成功建立起毛状根离体培养系统,初步筛选出三个高产的毛状根系,为新疆雪莲毛状根的大规模培养和产业

化开发奠定了基础。通过适当比例的激素诱导,获得再生植株。对其中的黄酮含量进行检测和比较,提供了 T-DNA 对植物次生代谢物质合成影响的证据。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 菌株及植物材料

农杆菌型发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)菌株 R1601 由北京大学林忠平教授惠赠,R1000 和 LBA9402 由清华大学郭志刚教授惠赠。新疆雪莲(*S. involucreta*)全草采自新疆天山博格达峰,由中科院植物研究所陈艺林教授鉴定。

#### 1.2 方 法

**1.2.1 农杆菌的活化:**从 -70℃ 取出保存菌种,划线接种于 YEB 固体培养基上(R1601 的培养基中添加 100mg/L 卡那霉素),28℃ 培养,活化 2 次。挑取单菌落,接种于附加 50μmol/L 乙酰丁香酮、200mg/L 脯氨酸的 YEB 液体培养基中,28℃ 振荡(180r/min)培养过夜(OD = 0.8)。使用前用 MS 液体培养基稀释 8 倍。

**1.2.2 新疆雪莲无菌苗的获得:**选取饱满种子流水冲洗 8h,70%乙醇浸泡 20s,无菌水冲洗 2 次,0.1% HgCl<sub>2</sub>浸泡 25min,无菌水洗涤 6 次,接种于无激素

MS 培养基, 25℃、连续光照条件培养。7d 后, 种子陆续萌发。分别切取 2~3d 苗的子叶、胚根、胚轴, 接种于附加 2.0mg/L BA 和 0.1mg/L NAA 的 MS 培养基上, 诱导丛生芽。切取丛生芽接种于附加 2.0 mg/L IAA 的 MS 培养基上, 诱导生根。

### 1.3 毛状根的诱导

切取 10~15d 再生苗叶片、叶柄及根段为外植体, 置于 N6 无激素固体培养基上进行预培养。将预培养好的上述外植体在制备好的发根农杆菌菌液中侵染 5min, 取出并吸干多余菌液, 放回原培养基。连续光照下共培养 2~3d, 直到外植体周围出现明显菌斑, 转接于附加 500 mg/L 头孢噻肟钠的 N6 固体培养基上, 于 25℃ 暗培养除菌并诱导发根。待毛状根长至 2~3cm 时, 切下转接于附加 500 mg/L 头孢噻肟钠的 N6 液体培养基中, 39℃ 振荡(100r/min) 除菌 48h<sup>[4]</sup>。切取除菌完全的 3~4cm 长的根尖, 转接于无激素 N6 液体培养基中, 25℃、110r/min 暗培养。

### 1.4 毛状根再生苗的获得

切取长 2~3cm 的毛状根根尖, 接种于附加 0.5mg/L IBA 的 N6 液体培养基, 诱导产生愈伤组织。切取部分愈伤组织, 转接于附加 1mg/L BA + 0.1mg/L NAA 的 MS 固体培养基上, 诱导产生丛生芽。切取丛生芽接种于附加 2.0mg/L IAA 的 MS 培养基上, 诱导生根, 获得再生苗。

### 1.5 毛状根的冠瘿碱检测

分别称取 0.4g 鲜重的毛状根、毛状根再生苗叶片于研钵中, 加入 0.4mL 0.1mol/L HCl, 充分研磨后, 转入 1.5mL 离心管, 浸提 24h。12000r/min, 离心 5min, 取上清液 10μL 点样于 Whatman 3 号滤纸上, 参照 Tanaka<sup>[5]</sup> 的方法进行高压纸电泳分析, 以未经感染的再生苗的根与叶片作为阴性对照, 甘露碱(mannopine) 标准品(1mg/mL) 为阳性对照。

### 1.6 毛状根的 PCR 检测

质粒提取参照文献[6], 植物 DNA 提取参照文献[7]。PCR 检测引物参照 *rol B* 基因序列<sup>[8]</sup> 设计, 上游引物: 5'TAC TGC AGC AGG CTT CAT GAC 3'; 下游引物: 5'GCT TTC CCG ACC AGA GAC TG3'。预期产物大小为 862bp。反应条件: 94℃ 预变性 3min; 94℃ 变性 1min, 52℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 1min, 35 个循环, 72℃ 延伸 10min。

### 1.7 毛状根的培养和黄酮含量的测定

收集 N6 液体培养基上生长 20d 的毛状根, 蒸馏水冲洗干净, 滤纸吸干, 称取鲜重。于 50℃ 烘箱中

烘干至恒重, 备用。黄酮含量的测定采用比色法<sup>[9]</sup>, 以芦丁的含量进行换算。芦丁标准品浓度与其吸光度的直线方程:  $Y = 0.06703X + 0.000373$  (其中,  $X$  表示光的吸收变量,  $Y$  表示总黄酮浓度, mg/mL) 相关系数  $r = 0.9991$ , 测定波长 510nm, 仪器型号: Beckman Coulter 的 DU 640 可见-紫外分光光度计。

## 2 结果

### 2.1 新疆雪莲毛状根的诱导和培养

外植体的预培养时间与毛状根的诱导率有密切关系。叶柄外植体经 R1601 感染后 21d 的出根情况统计表明: 在 N6 无激素固体培养基上预培养 2d 的外植体, 毛状根的诱导频率最高 (Table 1)。预培养能够诱导外植体切口处产生细胞分裂活跃的愈伤细胞, 而这些愈伤细胞对发根农杆菌的感染比较敏感<sup>[10]</sup>。

表 1 预培养时间对 R1601 转化叶柄外植体产生发状根的影响

Table 1 Effect of preculturing time on transformation frequency of stem segment with R1601

Preculturing time/d	No. of explants inoculated	No. of explants with hairy root	Transformation frequency/%
0	60	0	0
2	60	46	76.7
6	60	30	50
15	60	6	10

Basal medium: N6 + 3% sucrose + 0.8% agar, pH 5.6~5.8

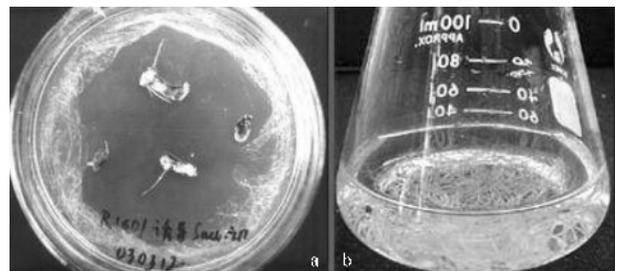


图 1 新疆雪莲毛状根培养体系的建立

Fig. 1 Establishment of *S. involucrata* hairy root cultures

a: sterile hairy roots of *S. involucrata* from leaves, petioles and roots at 15 days after inoculation with *Agrobacterium rhizogenes* strain R1601 b: sterile hairy roots cultured in a liquid culture of N6 hormone-free medium.

外植体的类型影响发根农杆菌的感染效率。在叶片、叶柄、根段三种的外植体中, 根段的诱导效率

最高,可达 100%(Table 2);其次是叶柄,叶片的诱导效率最低,且容易褐化死亡。

共培养后的外植体接种于 N6 无激素培养基上 4~5d 后,大多数外植体的切口边缘有疏松的愈伤组织产生。2 周后,愈伤组织逐渐长出长 2~3cm,直径约 1mm 的毛状根。出根部位因外植体类型的不同呈现明显差异。对于叶片外植体,出根部位在外植体的形态学下端,这可能与生长素的极性分布有关<sup>[11]</sup>。少数叶片外植体,能够在两端产生毛状根,叶柄外植体,出根部位位于外植体的形态学下端或两端,而根段外植体的出根部位,在中间膨大的愈伤组织处。有部分叶片、叶柄外植体产生的愈伤组织比较致密,不能产生毛状根。经继代培养后,有疏松愈伤组织产生的外植体,仍可见到毛状根的出现;有致密愈伤组织产生的外植体,则逐渐褐化死亡。

获得的毛状根形态不一,有的呈光滑无根毛状,有的则生有细密的根毛(Fig. 1-a)。未经发根农杆菌侵染的外植体,不能产生毛状根。将毛状根切下接种于 N6 无激素液体培养基,1 周后部分毛状根产生分枝,增长速度加快,3 周后可以布满培养瓶的底部(Fig. 1-b),还有一部分毛状根不出现分枝,生长缓慢。来自再生苗的根在 N6 无激素液体培养基中不能生长,必须添加 1mg/L IBA,才能维持生长,但它的形态与毛状根有着明显的区别:侧根细嫩,主根膨胀。

发根农杆菌的种类与毛状根的联系有着重要的联系。在 3 种农杆菌感染新疆雪莲外植体的研究结果中,R1601 感染效率最高,且率先出现毛状根(Table 2),而 R1000 和 LBA9402 则直到 20d 后才有毛状根出现。

表 2 3 种发根农杆菌对叶片、叶柄和根段外植体感染的结果

Table 2 Effect of different explants infected by three strains of *Agrobacterium rhizogenes*

Co-cultivation medium/explants type	No. of sample tested	No. of explants transformed	Transformation rate/%	Roots formation/d
1. R1601				
a. Leaves	60	42	70	15
b. Petioles	60	46	76.7	13
c. Roots	60	60	100	8
2. R1000				
a. Leaves	60	14	23.3	27
b. Petioles	60	20	33.3	25
c. Roots	60	35	58.3	20
3. LBA9402				
a. Leaves	60	3	5	40
b. Petioles	60	5	8.3	35
c. Roots	60	8	13.3	30

\* Data represent the mean values of three independent experiments.

## 2.2 毛状根再生苗的获得

经过继代培养的毛状根在附加 0.5mg/L IBA 的 N6 液体培养基中有少量愈伤组织产生。这些愈伤组织在附加激素的 MS 固体培养基上能够分化出芽,并生根成苗。由于雪莲生长环境要求较为特殊,再生苗的移栽具有一定的难度,有关该方面的研究尚在进行中。但在组培条件下,该再生苗在形态上与未经感染的再生苗无明显区别,而前者黄酮类物质的含量仅为后者的 53%(Table 3)。

## 2.3 毛状根及其再生植株中 *rol B* 基因的 PCR 扩增

*Rol B* 是发根农杆菌 Ri 质粒 TL-DNA 上与发根

形密切相关的基因<sup>[13]</sup>,利用 *rol B* 基因序列设计的引物,能够从 R1601 菌株质粒和毛状根及其再生植株的总 DNA 中,扩增出 862bp 的特异性片段(Fig. 2-2、4、5),而未经转化的叶片总 DNA 中无特异性条带出现(Fig. 2~3),进一步证明 TL-DNA 上的 *rol B* 基因整合到了毛状根及毛状根再生植株的基因组中。

## 2.4 毛状根及其再生植株中甘露碱的纸电泳分析

农杆菌型发根农杆菌 TR-DNA 中存在甘露碱合成酶基因。当 T-DNA 整合到植物细胞基因组中并表达后,能够利用植物细胞提供的物质和能源合成甘露碱。利用高压纸电泳技术检测转化根系中甘露碱的存在,能够判断毛状根基因的转入<sup>[12]</sup>。在毛状

根和毛状根再生植株的提取物中,利用高压纸电泳检测到甘露碱( Fig. 3-2 A)的存在,而未经转化的叶片、根段,未出现阳性斑点( Fig. 3-1, 5),从而说明 TR-DNA 上的甘露碱基因已导入毛状根。

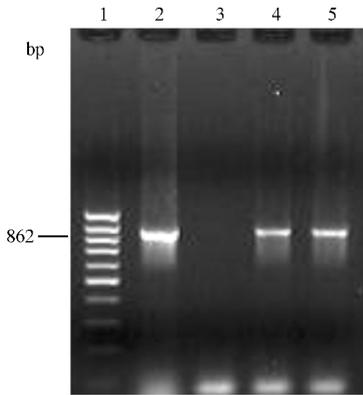


图2 新疆雪莲毛状根中 *rol B* 基因的 PCR 检测

Fig.2 PCR detection of the *rol B* gene fragment in transformed tissue of *S. involucrata*

1: molecular weight marker, 1Kb ladder; 2: fragment from plasmid of *A. rhizogenes* R1601; 3: fragment from Non-transformed leaves of *S. involucrata*; 4: fragment from hairy roots of *S. involucrata*; 5: fragment from regeneration plantlets from callus of hairy roots of *S. involucrata*

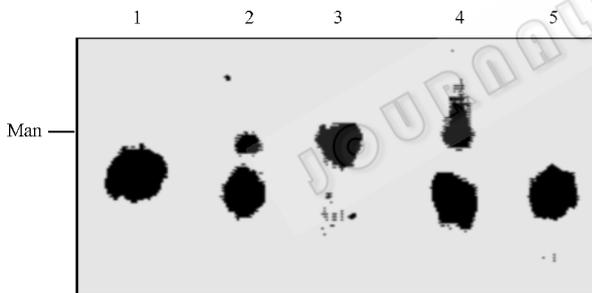


图3 新疆雪莲毛状根中冠瘿碱的高压纸电泳分析

Fig.3 Opine analysis of hairy root of *S. involucrata* by highvoltage paper electrophoresis

1: leaves of the explants; 2: hairy root cultures of *S. involucrata*; 3: authentic mannopine; 4: regeneration plantlets from callus of hairy roots of *S. involucrata*; 5: non-transformed ordinary roots

## 2.5 毛状根中黄酮含量的测定

将发根农菌 R1601 感染叶片、叶柄和根段外植

体产生的毛状根系,进行离体扩大培养,并对其生长动态和黄酮含量进行测定,获得 3 个高产的根系。其中两个根系来源于根段外植体,一个根系来源于叶片外植体。选择来源于根段外植体的毛状根系进行研究,发现该根系 20d 的生长速率可达到鲜重接种量(2.8g/L)的 24 倍,其中黄酮含量是野生雪莲根的 8.6 倍,是野生雪莲叶片的 2.9 倍( Table 3 )。

## 3 讨论

发根农杆菌种类、被感染部位细胞类型以及生理状况等方面的不同,使 T-DNA 插入植物基因组的位置、长度和拷贝数千差万别<sup>[14]</sup>。因此植物感染部分就会产生在形态、生长和有效成分含量等方面各异的毛状根系。将这些毛状根系分别进行离体培养,并对它们的生物量和产量进行动态分析,就可以筛选出高产根系。本实验对新疆雪莲毛状根系进行筛选,得到三个生长迅速、黄酮含量高的优良根系。这些根系在无激素培养基中均能旺盛生长,表现出典型的发根特征,而未经感染的根系在无生长素附加的培养基中不能正常生长。这与 Ri 质粒 T-DNA 上携带的 *rol* 基因和生长素合成酶基因( *tms1*, *tms2* )有关<sup>[15]</sup>。

发根农杆菌致根性与所含 Ri 质粒的类型有密切关系,本实验利用农杆菌型发根农杆菌( R1601、R1000、LBA9402 )侵染新疆雪莲的不同外植体,发现不同菌株对新疆雪莲侵染能力不同,其中 R1601 效率最高,这与其 Ri 质粒上整合有超致病根瘤农杆菌( *A. tumefaciens* ) pTiBo542 的 Vir 区粘性质粒 pTVK291 有关<sup>[16]</sup>。即使同一种发根农杆菌对不同植物或同一植物不同器官的敏感性也不同。到目前为止,已经在 31 个科 100 多种植物中实现了毛状根的转化,但多数集中在双子叶植物和裸子植物范围内,单子叶植物诱导成功的例子不多。在已获得的药用植物的毛状根中,大多采用无菌苗的叶片作外植体进行诱导,其中相当一部分植物毛状根的诱导率低于 60%。我们首次利用根段外植体进行诱导,其诱导率可达到 100%,说明根中含有某些利于发根农杆菌侵染的信号物质。对这些物质深入研究,能够在

表 3 野生新疆雪莲和新疆雪莲培养物中总黄酮的含量

Table 3 The contents of flavonoid in wild and their culture plant

	Leaf of wild plant	Root of wild plant	Hairy root of culture plant	Regeneration plantlet untransformed	Regeneration plantlet transformed
Contents of flavonoid %	3.55	1.19	10.23	1.97	1.05

其他一些难于诱导的植物组织、器官和种属里实现 Ri 质粒的成功转化。

Ri 质粒 T-DNA 的 *rol* 基因与植物激素间的相互作用,影响植物细胞分化和植株再生,从而间接影响某些次生代谢产物的合成。张荫麟等利用丹参毛状根,在无激素培养基上分化得到丹参酮含量高于原植株的再生植株<sup>[17]</sup>。我们得到来自新疆雪莲根段外植体的一个高产毛状根系,其愈伤组织在附加 1.0mg/L BA 和 0.1mg/L NAA 的 MS 固体培养基上,再生率可以达到 80%,而其他毛状根系的分化能力则远远低于该根系(数据未列出)。通过高压纸电泳和 PCR 的方法证明了毛状根中 T-DNA 的转化,但在新疆雪莲毛状根的植株再生过程中,仍存在 T-DNA 丢失的可能。为此利用高压纸电泳和 PCR 对再生苗进行检测,发现其中仍含有甘露碱和 *rol B* 基因,证明获得的是转化苗。在获得的毛状根根系中,有些在无激素添加的培养基上也会分化出芽,但分化率低,需要时间长,加入适当比例的激素后,能够提高分化率。

野生雪莲叶片中黄酮类物质的含量大约是来源于种子萌发所得到的再生苗叶片的 2 倍,这与野生环境与组织培养条件的差异有关<sup>[18]</sup>。毛状根愈伤组织分化出的再生苗与未经发根农杆菌侵染的再生苗在形态上没有明显差别,但前者黄酮含量仅为后者的 53%,这与张荫麟、Tepfer 等<sup>[19]</sup>报道的关于毛状根再生植株叶片边缘皱缩、节间缩短、植株矮化、不定根多、目的物含量提高等现象并不一致。其中原因尚待进一步研究。

致 谢 发根农杆菌 R1601 由北京大学林忠平教授惠赠, R1000、LBA9402 由清华大学郭志刚教授惠赠。甘露碱标准品由中国医学科学院药用植物研究所宋经元博士惠赠,特此致谢!

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Li GH(李观海), Liu F(刘发), Zhao RC(赵荣春). Studies on pharmacological actions of *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. ex Maxim. *Acta Pharmaceutica Sin*(药学报), 1980, **15**: 368 - 369
- [ 2 ] Liu LS(刘力生), Xiao XH(肖显华), Zhang LX(张龙弟) et al. Effect of the flavonoids from *Saussurea involucrata* on DNA synthesis of cancer cells. *J Lanzhou Univ Natu Sci*(兰州大学学报自然科学版), 1985, **21**: 80 - 83
- [ 3 ] DAI JQ(戴均贵), ZHU WH(朱蔚华). Application of hairy root culture technology to production of plant secondary metabolites. *Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯), 1999, **35**(2): 69 - 76
- [ 4 ] XU TK(许铁峰), Zhang HM(张汉明), Zhang W(张威) et al. Establishing better lines and regenerating system of hairy roots of *Isatis indigotica* with Ri T-DNA. *Acad J Sec Mil Med Univ*(第二军医大学学报), 2000, **21**(10): 907 - 910
- [ 5 ] Tanaka N, Hayakawa M, Mano Y, Ohkawa H, Matsui C. Infection of turnip and radish storage roots with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports*, 1985, **4**: 74 - 77
- [ 6 ] Sambrook J, Russell David W. *Molecular cloning: A Laboratory Manual* 3rd ed. pp: 35 - 37, by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001
- [ 7 ] Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990, **12**: 13 - 15
- [ 8 ] Slightom J L, Durand-Tardif M, Jouanin L, Tepfer D. Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid: Identification of open reading frames. *J. Biol. Chemistry*, 1986, **261**: 108 - 121
- [ 9 ] Guan JY(关家彦), Wang WW(王玮文), Ma M(马慕提) et al. Investigation of technological preparation on soak of *Saussurea involucrata*. *J Shenyang Pharma Univ*(沈阳药科大学学报), 1995, **12**: 209 - 211
- [ 10 ] Shi H F(施和平), Li L(李玲), Pan RZ(潘瑞炽) Effect of explant age and sucrose concentration on hairy root formation from cucumber cotyledons. *Guhai*(广西植物), 2000, **20**(4): 356 - 360
- [ 11 ] Shi H F(施和平), Li L(李玲), Pan RZ(潘瑞炽) Effect of polarity and NAA concentration on transformation of cucumber cotyledons by *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*(热带亚热带植物学报), 1997, **5**(3): 43 - 47
- [ 12 ] Dessaux Y, Petit A. Opines as screenable for plant transformation. *Plant Molecular Biology Manual*, 1994, **C3**: 1 - 12
- [ 13 ] Di Cola, A, Costantino P, Spanò L. Cell commitment and *rolB* gene expression in the induction of root differentiation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1996, **46**: 203 - 209
- [ 14 ] David C, Petit A, Tempe J. T-DNA length variability in mannopine hairy root: more than 50 kilobase pairs of pRi T-DNA can integrate in plant cells. *J Plant Cell Reports*, 1988, **7**: 92 - 95
- [ 15 ] Liang J(梁机), Chen XY(陈晓阳), Lin SZ(林善枝), Xie SM(谢响明) et al. Advance of studies on *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid *rol* genes and their applications for forest tree genetic improvement. *Chinese Bulletin of Botany*(植物学通报), 2002, **19**(6): 650 - 658
- [ 16 ] Pythoud F, Sinkar V P, Nester E W et al. Increased virulence of *Agrobacterium rhizogenes* conferred by the vir region of pTiBo542: application to genetic engineering of poplar. *Bio/Techno*, 1987, **5**: 1323 - 1327
- [ 17 ] Zhang YL(张荫麟), Song JY(宋经元), Qi JJ(祁建军) et al. Plant regeneration from *Salvia miltirohiza* Bunge transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *China Journal of Chinese Materia Medica*(中国中药杂志), 1997, **22**(5): 274 - 275
- [ 18 ] Zhu C(朱晨), Jiang XY(姜湘英), Zhou PW(周丕文). Comparison of the contents of total flavone between artificial cultivated and wild *Saussurea involucrata*. *Chin Pharm J.*(中国药学杂志), 2002, **37**(2): 98 - 99
- [ 19 ] Tepfer D. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell*, 1984, **37**: 959 - 967

## Establishment of *Saussurea involucrata* Hairy Roots Culture and Plantlet Regeneration

FU Chun-Xiang JIN Zhi-Ping YANG Rui WU Feng-Yan ZHAO De-Xiu \*

( Institute of Botany , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100093 ,China )

**Abstract** Hairy root clones of *Saussurea involucrata* transformed with *Agrobacterium rhizogenes* strains R1601 , R1000 , and LBA9402 were established to investigate the flavonoid production. Opine synthesis and PCR analysis confirmed the integration of the T-DNA fragment of Ri plasmid from *A. rhizogenes* strain R1601 into the transformed root genome. The frequency of hairy root formation from root segments , which were pre-cultured 2 days in N6 solid medium without plant growth regulators , amounted to 100% following infection with R1601 strain of *A. rhizogenes*. The transformed roots were kept in hormone-free N6 liquid medium in the dark at 25°C , 110r/min and routinely subcultured every 20 ~ 24 days. One hairy root clone , which grew vigorously with lateral branches , was periodically examined for the ability to produce flavonoid. The maximum of biomass and flavonoid yield achieved 66.7 g/L ( fresh weight ) and 102.3mg/g dry weight after incubation 20 days. The calli were induced from the hairy root culture in the presence of 0.5mg/L IBA and intact plantlets were regenerated from these calli. The regeneration plantlets from hairy roots , in which the flavonoid content were 53% in that of untransformed plants , weren't different in growth and morphology of the untransformed plantlets. Therefore plant regeneration from hairy roots may be also a means for producing transformed *S. involucrata* plants. Hairy root cultures of *S. involucrata* clearly showed higher flavonoid contents compared to the wild plant or the regeneration seedlings. As the wild *S. involucrata* grows only in special regions with peculiar climate , and cultivation of this species in a normal climate has been unsuccessful so far. The success in obtaining a method for high production of flavonoid might very well be one of the solutions for this problem in the future.

**Key words** *Saussurea involucrata* , *Agrobacterium rhizogenes* , hairy roots , flavonoid

Received : 10-27-2003

This work was supported by Grant from Natural Science Foundation of China ( No.39970896 ).

\* Corresponding author. Tel 86-10-62591431ext6201 ; Fax : 86-10-62590833 ; E-mail : zhaody@ns.ibcas.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>