



学术园地

用根癌土壤杆菌和发根土壤杆菌 转化马铃薯的初步研究

王春林 朱明凯 程天庆

(中国农科院蔬菜花卉研究所)

摘 要

根癌土壤杆菌菌株T37, Cs8 和B6S3单独或与Cs8 CtpGV 3850::1103neo (带有一嵌合基因NOS—NPT使植物产生卡那霉素抗性) 接种马铃薯块茎盘。每块茎盘肿瘤数因细菌菌株、马铃薯基因型和所取块茎盘在块茎上的位置而变化。T37诱导的品种Desiree的肿瘤分化了芽。大部分肿瘤的芽合成胭脂碱, 表明是经pTiT—DNA转化的。用发根土壤杆菌菌株A₄诱导的毛状根切段培养后再生成株。再生植株具有明显的表型变异, 并有agropine合成, 证明是经pRiT—DNA转化的。

1 前 言

土壤细菌根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)和发根土壤杆菌(*A. rhizogenes*)为双子叶植物及少数几种单子叶植物提供了一个天然的基因转移系统。根癌土壤杆菌带有Ti质粒, 野生型的Ti质粒能使植物在伤口处生长冠瘿瘤或肿瘤[1, 2], Ti质粒上带有一段T—DNA[3~6], 含有生长素和细胞分裂素基因, 转移到植物细胞基因组中引起瘤性生长。改造的Ti质粒更适于外源基因转移。共整合质粒pGV3850::1103neo是由“解除武装的”(disarmed) Ti质粒pGV3850和带有嵌合基因NOS—NPT的质粒PLGVneo1103经过一次单交换产生的[7]。

发根土壤杆菌的Ri质粒作为基因转移的载体[8, 9], 具有以下优点: 转化毛状根在无激素培养基上快速生长, 可作为一明显的转化标记[10, 11]; 且就其组成讲, 是由细菌

胞发育的[12, 13]。可以通过共整合[14, 15]、双元载体[16]、双转化和多转化[17]来利用Ri质粒的基因转移功能。

现有的马铃薯品种存在着产量和营养价值低、不抗病虫等问题, 应用常规育种技术在短时间内很难奏效。利用土壤杆菌的基因转移系统, 可以快速有效地转移少数外源基因。国外在马铃薯遗传转化方面进行了很多工作, 取得了重要进展[18, 19, 20]。我国在这这方面的工作刚刚开始, 报道较少[21], 有必要对转化条件和植株再生等进行研究。

2 材料和方法

2.1 块茎材料

马铃薯四倍体栽培品种 (*Solanum tuberosum* L., $2n=48$) Desiree, Mira和DTO—33等由河北坝上农科所提供。试验主要以Desiree为材料, 该品种再生能力强、具有明显的遗传标记(红皮黄肉), 且有丰富的变异

表型。京丰1号、Premiere等块茎为本所1987年收获的秋薯。

2.2 细菌培养

试验所用的 *A. tumefaciens* 野生型菌株 B6S3、C58、T37 和 *A. rhizogenes* 野生菌株 A₄ 由甘肃农大戴朝曦教授等人赠送, *A. tumefaciens* C58 Cl pGV3850::1103neo 由比利时 Gent 大学 Van Montagu 博士惠赠。

固体培养基 YEB 上培养 2 天的细菌, 在液体 YEB 培养基中振荡培养过夜 (29~30°C), 取 7 000 克以 120 转/分的速度, 离心 10 分钟, 弃去上清液, 用 PBS 溶液稀释到原体积 50 毫升, 备用。

用植板计数法和测定吸光率 (580nm) 来确定细菌浓度。

YEB 培养基: 牛肉膏 5 克、酵母提取液 5 克、酪蛋白 5 克、NaCl 2 克、MgSO₄·7H₂O 1 克 (4mM) 蔗糖 1 克、琼脂 15 克, 配成 1 000 毫升培养基, pH7.2。

PBS 溶液: KH₂PO₄ 0.34 克, Na₂HPO₄ 1.48 克、NaCl 7.2 克、配成 1 000 毫升蒸馏水溶液, pH7.2。

对于 C58 Cl pGV3850::1103neo, 培养基中加入 50 毫克/升硫酸卡那霉素 (Kanamycin sulfate)。

2.3 转化

2.3.1 野生 Ti 质粒单转化

将表面消毒的块茎削去纵向两端的表皮, 用打孔器打取直径为 1 厘米的柱体, 再用解剖刀将其切成 2~3 毫米厚的圆片, 分别浸入 T37、C58 和 B6S3 的 PBS 溶液中 (浓度约 10⁸ 个/ml), 轻轻振荡溶液, 10 分钟后, 将块茎盘取出, 吸干表面菌液, 平放在 90 毫米玻璃培养皿的固体 MS (0) (不加蔗糖和肌醇) 培养基表面, 每皿 9 块, 用透明胶带封口。培养皿放在 27°C、16 小时光照的生

化培养箱中培养。诱导产生的肿瘤长到 2~3 毫米时, 将肿瘤切下, 放置在加有 1 000 毫克/升羧苄青霉素 (Carbenicillin, cb) 的 MS (0) 培养基上杀菌 2 天, 然后转移到加有 200 毫克/升 cb 的 MS (30) 或同样水平 cb 的 SH (MS + BA2 毫克/升 + GA35 毫克/升 + 蔗糖 30 克/升) 培养基上促进芽的再生。

2.3.2 双转化

将 T37、C58 和 B6S3 与 C58 Cl pGV3850::1103neo 按 1:1 (10⁸/ml) 的比例接种于块茎盘。得到的肿瘤先在加有 500 毫克/升 Claforan (Cefotaxime Sodium Hoechst) 的 MS (30) 培养基上杀菌, 然后转移到加有 100mg/l 硫酸卡那霉素和 200 毫克/升 Claforan 的 MS (30) 培养基上筛选抗性肿瘤 (双转化体), 在 SH 培养基上再生芽。

2.3.3 用发根土壤杆菌转化品种 Desiree

共培养方法同 1。诱导产生的毛状根长到约 1cm 长时, 切下 1 毫米左右的根尖, 在无抗菌素的 MS (30) 培养基上培养 3~4 天, 观察无菌落产生时, 将根尖转移到 MS (30) 培养基上扩大繁殖。产生菌落的根, 取根尖 1 毫米, 放在加有 1 000 毫克/升 cb 的 MS (30) 培养基上培养 3~4 天, 取其尖端 1 毫米放在不加 cb 的 MS (30) 培养基上测试是否完全脱菌。这样经过几轮培养, 就可得到无菌的毛状根培养物。

将毛状根切成段 (0.5cm), 培养在几种诱导愈伤的培养基上, 培养 4 周后长出愈伤组织, 将愈伤组织连其切段转移到培养基 SH 上生芽。从生芽达到 1 厘米高时, 切下转移到 MS (30) 培养基上生根。

2.3.1 冠瘿碱 (opine) 测定

胭脂碱 (nopaline) 和章鱼碱 (octopine) 测定

T37 和 C58、C58 Cl 均为 nopaline 型, 合成胭脂碱, E6 3 为 octopine 型, 合成章鱼碱, A4 为 agropine 型, 合成 agropine。

根据white等 (1987)〔22〕所述的方法, 将新鲜组织(肿瘤、茎、叶和根) 100~200毫克放在一个无菌的离心管中, 用玻璃棒捣碎。在小型离心机上离心15分钟, 取其上清液5 μ l在Whatman 3MM层析滤纸上点样, 样点之间相距1厘米, 用吹风机迅速吹干。分别用0.02% nopaline和0.02% octopine (Sigma) 作为标样。400V, 20毫安电泳1小时。电泳液为甲酸、乙酸和水 (1:3:16, V/V) 的混合液。将滤纸吹干, 并用新配制的0.02%菲醌的纯酒精液和10% (W/V) NaOH 60%酒精液1:1混合液染色。吹干的滤纸在紫外光下观察并拍照。

Agropine测定

根据Morgan (1987)〔15〕所述, 基本方法同上, 标准样为0.02% agropine。得到的电泳滤纸吹干后浸入碱性硝酸银溶液中 (0.25 ml水中含0.625g AgNO₃, 加入50毫升丙酮, 一滴滴加入蒸馏水直到银沉淀溶解), 风干20分钟, 然后在10毫升20%NaOH与90毫升甲醇混合液中浸一下。风干30分钟, 浸在硫代硫酸钠溶液 (5%W/V) 中, 流水冲洗3~4小时之后风干, 观察, 照拍。

2.3.5 染色体计数

取新鲜的根尖, 在饱和的对二氯代苯溶液中保存2小时, 在卡诺固定液 (乙醇: 冰醋酸液 = 3:1) 中过夜。然后在1N HCl溶液中60°C水解10分钟, 用卡宝品红液染色, 在Olympus显微镜下观察并拍照。

3 结果与讨论

3.1 野生Ti质粒单转化

在27°C, 16小时光照的条件下, 感染的块茎6天以后就可以见到小突起, 3天以后从块茎上大量产生肿瘤。T37、C58和B6S3诱导产生肿瘤的时间没有明显的区别, 但3种肿瘤的形态则有所不同。T37和C58诱导的

肿瘤均为白色, 结构紧凑, 生长较慢, B6S3的肿瘤初为半透明状, 4周后逐渐变为褐色, 且生长较快, 在肿瘤表面密集成一片。

3.1.1 不同基因型对同一菌株诱导肿瘤的反应

统计发生的肿瘤数, 发现同一菌株对不同基因型的肿瘤诱导效果不同。如用T37诱导3个基因型, 得到表2的结果。其它菌株与之相似 (资料略)。

表1 不同基因型对PTi T37诱导肿瘤的反应 (共培养20天后)

基因型	接种块茎盘数	产生肿瘤数	每块茎盘肿瘤数
DTO-33	14	25	2.5 a*
Desiree	15	75	5.0 b
Premiere	14	224	16.0 c

*t-测验, 显著水平0.05, 不同字母表示差异显著

3.1.2 不同菌株对同一基因型的诱导效果

表3资料表明, 根癌土壤杆菌不但对寄主植物的范围有一定要求, 而且对植物不同基因型的反应也有显著差异。在进行遗传转化时, 选择敏感的基因型, 可以提高转化效果。

3.1.3 不同部位的块茎盘对根癌土壤杆菌诱导肿瘤的反应

从块茎的中心轴打取的柱状体, 切成块茎盘感染细菌20天后, 统计依次排列的块茎盘上的肿瘤数, 发现从块茎生物学上端到下端肿瘤数逐渐减少; 而在垂直于中心柱方向, 从块茎纵向长度1/2处打取的柱状体, 各块茎盘产生的肿瘤数没有明显的差异 (表2)。各菌株的诱导效果都有相同的趋势。发根土壤杆菌诱导毛状根的情形与之相似 (后述)。

表2 品种Desiree块茎不同部位对B6S3诱导肿瘤的反应(共培养20天)

方向	块茎盘序号												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
纵向 (上-下)	57	51	39	40	36	37	35	28	29	23	21	11	9
横向 (左-右)	37	38	40	41	37	40	35	42	36	42	40	41	

以上资料表明,位于块茎前端的块茎盘对两种土壤杆菌的反应要比末端的反应敏感,这可能是由于前端比较幼嫩,而末端老化,各自处于不同的生理状况所致。由此看来,选择幼嫩的组织或器官(块茎前端、芽尖和子叶等)作为转化材料,可能会提高转化效率。已有报道未曾提及以上现象,因此还需进行深入研究。

3.1.4 胭脂碱分析

Desiree经T37诱导的肿瘤,在不加激素的MS(30)培养基上培养3个月后,有1个肿瘤分化出芽。各个肿瘤块分化芽的数量差异很大(表3),其中3个肿瘤块的分化芽切下后转移到MS(30)或生根培养基(MS+NAA0.5mg/l)上不能生根,但这些芽及其肿瘤块都检测到胭脂碱,由于胭脂碱是T-DNA上的基因在植物细胞中表达合成的,非转化组织中未检测到胭脂碱,可以证明这些再生芽是经过T-DNA转化的。

已有资料表明,Ti质粒诱导的肿瘤是由正常细胞和转化细胞组成的嵌合体,而这些转化细胞也是由不同结构的T-DNA单独转化的[23, 24, 25]。被T37 T-DNA转化的细胞所产生的促进芽分化的植物激素,不但可以表3 T37诱导的Desiree肿瘤分化的芽

肿瘤号	分化苗数	特征	在培养基MS(30)上生根	胭脂碱
DES T ₁	25	丛生芽	-	+(1株)
DES T ₂	3		-	+
DES T ₃	2		+	-
DES T ₄	1	独芽	-	+

使转化细胞生芽(这种芽不易生根),而且可促进其它细胞再生芽[26]。DES T3再生的芽可能就是由非转细胞产生的,再生芽能正常生根。

转化芽被离体原接到正常小植株上,以其得到转化植株。

3.1.5 不同基因型的肿瘤块的分化能力

T37诱导的肿瘤中,只有Desiree的肿瘤培养3个月后分化了芽,而其它品种的肿瘤均未分化。这可能是由于不同基因型的肿瘤的分化能力有差异。马铃薯的组织培养中,基因型的“组织培养能力”(Tissue Culture Ability)对分化再生起着十分重要的作用[27, 28]。现已报道的马铃薯遗传转化主要在容易再生的Desiree, Maris bard和Bintje等品种上取得成功。

3.2 用野生菌株和改造菌株进行双转化

当一野生型的Ti质粒与一改造的带有目的基因的Ti质粒混合感染植物细胞时,有些细胞可能会同时被两种Ti质粒的T-DNA转化。这种双转化的细胞既能在不加植物激素的培养基上自主生长并分化,同时又带有要导入的目的基因,对目的基因进行筛选,可以得到双转化植株。

表4列出了不同野生型菌株与带有共整合质粒的根癌土壤杆菌混合感染品种DIO-33 20天后诱导产生的肿瘤数。可以看出,两个胭脂碱型的菌株,双转化比单转化诱导产生的肿瘤数明显减少,而章鱼碱型的菌株B613的双转化比单转化诱导的肿瘤数无明显增加,这可能是由于两类菌株与带有共整合质粒的根癌土壤杆菌相互作用不同的结果。

将混合接种诱导的肿瘤转移到加有100毫克/升硫酸卡那霉素的培养基上时,2周以后,就可看到有部分肿瘤继续生长,另一部分肿瘤则停止生长,逐渐变为褐色,最后死亡。表5给出了在选择培养基上筛选6周以后的抗性肿瘤数及其百分率。单独接种产生

的肿瘤均不抗卡那霉素。

表4 单独和混合接种对品种DTO—33产生肿瘤数的影响(培养20天后)

组 合	接种块茎盘数	诱导肿瘤数	每块茎盘肿瘤数
1 T ₃₇	28	70	2.5 a**
2 C ₅₈	30	276	9.2 b
3 B ₆ S ₃	30	272	9.0 b
4 T ₃₇ +3850*	29	30	1.0 c
5 C ₅₈ +3850	30	167	5.6 d
6 B ₆ S ₃ +3850	29	333	11.5 b

*3850: pGV3850 :: 1103neo;

**t—测验, 显著水平0.05

T₃₇的肿瘤有自然发生芽的能力, 对T₃₇混合感染得到的抗性肿瘤, 进行继代培养以得到转化植株。

抗性肿瘤是否是经过双转化的还要进行NPT II酶活性测定和Southern blotting分析。但online分析表明, T₃₇, C₅₈单独或与C₅₈CI混合诱导的肿瘤, 都有nopaline, B₆S₃单独诱导的肿瘤都有octopine存在, 而与C₅₈CI混合诱导的肿瘤含有nopaline和octopine, 可作为双转化的一个佐证。

表5 不同肿瘤对卡那霉素的抗性(筛选6周)

组 合	肿瘤数	抗性肿瘤	抗性肿瘤百分率(%)
1 T ₃₇	20	0	0
2 T ₃₇ +3850	39	15	50.0
3 C ₅₈	50	0	0
4 C ₅₈ +3850	127	64	50.0
5 B ₆ S ₃	136	0	0
6 B ₆ S ₃ +3850	333	171	51.3

3.3 用发根土壤杆菌A₄转化马铃薯品种Desiree

用A₄感染Desiree块茎盘, 27℃, 16小

时光照下。第6天即有很小的毛状突起产生, 第8天开始便有大量的毛状根产生。2周以后, 很少有新根产生, 原来产生的根便开始分枝。毛状根上密被短而细的绒毛。毛状根向地性减弱, 往往向上突起, 而不是伸向培养基。用PBS处理的对照不产生根。

Desiree 30个块茎盘的平均毛状根数(培养20天后)为11.9±9.7。各块茎盘上产生毛状根的条数差异很大。从块茎的生物学上端到末端毛状根数逐渐减少, 这与用野生Ti质粒诱导肿瘤的情况相似。

将脱菌的毛状根培养物切成0.5厘米长的切段, 接在含有BA, ZT, KT(1~4mg/l)和IAA、NAA(0.01~0.1mg/l)的8种不同培养基上, 培养2周后, 除在ZN培养基(MS+ZT1mg/l+NAA0.01mg/l+蔗糖20g/l)上在切段的生物学上端形成愈伤组织外, 在其余的培养基上切段之一端或两端均产生次生的毛状根, 继续培养2周, 愈伤组织增大到2~3毫米大小, 将愈伤组织连其切段一起转移到生芽培养基SH上, 2~3周以后便有丛生芽产生。

从随机取的毛状根克隆及其愈伤组织和再生芽的切段都检测到agropine的存在。这表明毛状根是经pRi T—DNA转化的, T—DNA稳定整合到植物细胞中, 可以通过愈伤组织传递到再生芽中。被pRi T—DNA转化的另外一个结果是将T—DNA上的生长素基因带到植物细胞中并表达, 使产生的毛状根可以在不加植物激素的培养基上快速生长, 而且在毛状根切段产生愈伤的时候也起作用。Desiree的正常根在MS+BA1毫克/升+IAA1毫克/升培养基上培养6周后生芽, 而培养在此培养基上的毛状根切段只产生次生的毛状根, 说明由于T—DNA上生长素基因的表达而使毛状根细胞有较高水平的内源生长素。在试验中观察到, 在ZN培养基上, 只在根切段之一端(幼嫩的一端)长出愈伤组织, 在另一端则很少产生愈伤。而培养在ZN

培养基上的正常根, 膨大并在两端产生愈伤(虽然幼嫩端较多)。这也表明, 由于Ri T-DNA的作用, 改变了正常根所具有的激素平衡。

ZN培养基上根切段产生愈伤的频率达到100%。在转移到生芽培养基SH上的根切段中, 有74%的根段再生了芽, 但再生芽的多少有差异, 最多达22个, 最少仅1个。

已分析的10个转化小植株, 根尖染色体均为48条, 当然这还不能说明所有再生的转化植株没有染色体数目变异。

发根土壤杆菌诱导毛状根的再生植株, 也有一定程度的染色体变异。Ooms等^[29]在含有ZT和2,4-D的MS培养基上使Desiree的毛状根产生愈伤, 然后在SH培养基上生芽。总共至少需要14周的时间。本试验最快可以在6~7周内得到再生芽。而且在有限的观察群体中未发现染色体变异, 可能是由于再生时间比较短的缘故。因为愈伤组织再生时间越长, 发生变异的可能性越大。

在毛状根培养过程中, 发现有少数毛状根可以自然发生芽。这种现象在烟草^[15]、花椰菜^[30]和马铃薯^[31]上也有报道。而且马铃薯的毛状根可以通过体细胞发生再生芽^[32]。

再生芽在MS (30) 培养基上生长比正常芽快, 而且小植株比较健壮。转移到温室的转化植株, 叶片缢缩, 根系发达, 表现出明显的表型变异。

4 小 结

本试验分别用根癌土壤杆菌 (T37) 和发根土壤杆菌 (A₄) 转化了马铃薯品种Desiree, 外源基因在再生植株中得到表达。

双转化由于要经过较长时间的瘤性生长才能分化植株, 可能产生较大的染色体变异^[32, 33, 34], 有必要对其它转化系统如叶盘法^[35, 36]和块茎盘法^[19, 20]进行研究。

参 考 文 献

- 1 Caplan A et al. Science, 1983, 222: 815~821
- 2 Nester E W and Kosuge T. Ann Rev Microbiol, 1981, 35: 531~565
- 3 Bevan WB and Chilton MD. Ann Rev Genet, 1982, 367~384
- 4 Binns A N. Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology, 1984, 1: 133~160
- 5 Cheyzen G et al. Genetic Flux in Plants, Springer Verlag, Wien, PP. Holn B, Dennis ES (eds) Advances in Plant Gene Research, 1985, 2: 11~47
- 6 Zambryski P et al. Mobile Genetic Elements New York: Academic Press, 1983
- 7 Hain et al. MGG, 1985, 199: 161~163
- 8 Birot AM et al. Plant Physiol Biochem, 1987, 4: 853~859
- 9 Tepfer M and Cassin-deibart F. Microbiol Sci, 1987, 4: 24~28
- 10 Akiyoshi D et al. PNAS, 1984, 81: 5994~5998
- 11 Buchmann I et al. EMBO J, 1985, 4: 853~859
- 12 Constantino P et al. J Mol Appl Genet, 1984 2(1): 43~51
- 13 David C et al. Biotech, 1984, 2: 73~76
- 14 Camai L et al. Nature, 1985, 37: 741~744
- 15 Morgan AJ et al. Plant Sci, 1987, 49: 37~49
- 16 Simpson RB et al. Plant Mol Biol, 1986, 6: 403~415
- 17 Sacristan MD and Melchers G. MGG, 1987, 152: 111~117
- 18 Jaynes JM et al. TIBTECH, 1986, 314~320
- 19 Sheerman S and Bevan M W. Plant Cell Rep, 1988, 7: 13~16
- 20 Stiekema W J et al. Plant cell Rep, 1988, 7: 47~50
- 21 Dai C X and Pueppke S P. CMCN, 1986, 2(1): 43~45
- 22 White DWR and Greenwood D. Plant Mol Biol, 1987, 8: 461~468
- 23 Ooms G et al. Cell, 1983, 30: 589~597
- 24 Schafer W et al. Nature, 1987, 327: 529~532
- 25 Van Slogteren G M S et al. Plant Mol Biol, 1983, 2: 321~335

- 26 De Grave H et al. Nature, 1982, 300 : 752~755
- 27 Uhrig H and Salamini I. Z Pflanzenzueh, 1987, 91: 211~218
- 28 Wenzel G and Uhrig H. TAG, 1981, 59: 333~340
- 29 Ooms G et al. Potato Res, 1986, 29: 367~370
- 30 David C and Tempe J. Plant Cell Rep, 1988, 7: 88~91
- 31 Hanischten Cate C H et al. Plant Sci, 1987, 49: 217~222
- 32 Hanischten Cate CH and Ramulu K S. Plant Sci, 1987, 49: 209~216
- 33 Ooms G and Lenton J R. PMB Plant Mol Biol, 1985, 5: 205~212
- 34 Ooms G. TAG, 1987, 73: 744~750
- 35 Horsch R B et al. Science, 1985, 227: 1229~1231
- 36 Shahin E A et al. Hort Sci, 1986, 21: 1199~1201

POTATO GENETIC TRANSFORMATION USING AGROBACTERIUM TUMEFACIENS AND A. RHIZOGENES.

Wang Chunlin, Zhu Mingkai and Cheng Tianqing

(Vegetable Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing)

ABSTRACT

Wild strains of *Agrobacterium tumefaciens* T37, C58 and B6S3 (with pTiT37, pTiT58 and pTiB6S3 Plasmids resp.) independently or in combination with a "disarmed" *A. tumefaciens* strain C58Cl pGV3850:: 1103nco containing a chimaeric gene NOS—NPT conferring plant kanamycin resistance were inoculated to and cocultured with tuber discs of tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) cultivars DIO—33, Desiree, etc. Tumours with different habitus were produced from surface of the tuber discs within 1~2 weeks. Transformation efficiency in terms of the number of tumours per disc inoculated varied with bacterium strains, potato genotypes and position of discs dissected from tubers. Mixed—inoculation of wild and disarmed strains decreased the number of tumours induced by T37 and C58 alone. High ratio of complete and partial kanamycin resistant tumours indicated a significant interaction between two *A. tumefaciens* strains when they transformed plant cells. Multiple shoots were regenerated from 4 of Desiree T37 induced tumours, of which 3 regenerated rootless and nopaline—positive shoots and 1 formed nopaline—negative shoots with roots.

Tuber discs of Desiree inoculated with *A. rhizogenes* A4 containing pRi A4 plasmids sprouted hairy roots after incubated for 1~2 weeks. Root segments developed green calli at one end of the segment when cultured on ZN medium (MS+ZT 1mg/l+NAA0.01 mg/l+Sucrose 10g/l) within 2 weeks. When callusing segment were cultured for further 2~3 weeks, then transferred to the shoot—inducing SH medium (MS+BA 2 mg/l+GA₃ 5mg/l+Sucrose 20 g/l), multiple shoots appeared 2~3 weeks later. Randomly selected hairy root clones, their calli and regenerated shoots tested were all agropine—positive. This confirmed the transformation of hairy roots by pRi A4 T—DNA integration of the T—DNA into potato genome and stable transmission through mitosis.