

用于遗传转化的贯叶连翘组织培养系统的研究

邱璐¹, 罗春梅², 李艳华², 周银燕¹, 黄静¹, 杨启国¹, 吕加燕¹

(1. 云南省楚雄师范学院, 云南楚雄 675000; 2. 云南省楚雄农业学校, 云南楚雄 675000)

摘要: 贯叶连翘恢复生长的能力较强, 用 0.2% HgCl_2 消毒幼茎 3 min 建立无菌苗具有较好效果; 利用 MS 与 1/2MS 作为贯叶连翘的基本培养基均有较好效果; 贯叶连翘的茎和叶均易于形成愈伤组织, 1.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L NAA 不仅能较好地诱导贯叶连翘形成愈伤组织, 而且能较好地诱导愈伤组织形成不定芽; 6-BA 对贯叶连翘不定芽的形成是必要的, 但高浓度的 6-BA 易于导致苗玻璃化, 0.1 mg/L 6-BA + 0.01 mg/L NAA 诱导不定芽形成具有较好效果; 生长素与细胞分裂素的比例为 1:10 时有利于贯叶连翘形成不定芽, 但不定芽生长速度慢; 生长素与细胞分裂素的比例为 1:5 时不定芽形成数量少, 但不定芽生长速度快; 以 50 mg/ml 的 Gent. (庆大霉素) 作选择压力筛选 Gent. 标记的阳性转基因植株效果最好; 200 mg/L 的 Cef. (头孢霉素) 对土壤农杆菌的生长抑制效果较好。

关键词: 贯叶连翘; 遗传转化; 愈伤组织; 不定芽; 抗生素

中图分类号: S567.23*9.035.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-1302(2007)03-0178-03

贯叶连翘 (*Hypericum perforatum* L.) 是藤黄科金丝桃属多年生草本植物, 作为传统中药已收入我国药典, 全草入药。主要用于抗抑郁症、抗病毒、抗菌消炎、收敛止血、解毒消肿、镇痛^[1-2]。目前已从贯叶连翘中分离出金丝桃素, 被认为是一种能影响脑内 5-HT 去甲肾上腺素和多巴胺的物质, 对 RNA、DNA 病毒具有较强抗性^[3]。临床上主要用于治疗抑郁症、甲型肝炎、乙型肝炎、风湿、痛风、调经活血。目前, 贯叶连翘被作为抗艾滋病、抗肿瘤的新药开发^[4]。由于野生资源的极度破坏, 已进行大面积贯叶连翘的人工生产栽培, 利用转基因技术, 研究抗性强、有效成分含量高的新品种已成为发展趋势。

1 材料与方法

1.1 材料

贯叶连翘的茎段采自云南省楚雄农校药园。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗建立 以 MS + 1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L 6-BA 为基本培养基, 以贯叶连翘幼嫩茎段作外植体, 用洗涤剂水清洗外植体 5 min, 再用流

水冲洗 5 min。用 0.2% 的 HgCl_2 作为消毒剂, 消毒时间分别为 2、2.5、3、3.5、4 min, 筛选出最佳消毒时间。消毒后用无菌水冲洗外植体 8~10 次, 接种, 20 d 后统计污染率与成活率。

1.2.2 不同基本培养基对愈伤组织诱导的影响 以贯叶连翘无菌苗的茎段为材料, 以 1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L 6-BA 为激素种类及配比, 分别以 MS、1/2MS 为基本培养基, 接种后给予暗处理, 30 d 后统计愈伤组织诱导结果。

1.2.3 不同外植体部位对愈伤组织诱导的影响 以 MS 为基本培养基, 以 1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L 6-BA 为激素种类及配比, 分别以贯叶连翘无菌苗的茎段、叶为材料, 对它们形成愈伤组织的能力进行比较。

1.2.4 不同激素种类及比对愈伤组织诱导的影响 以无菌苗的茎段为外植体, 以 MS 为基本培养基, 设置 7 组不同种类及配比的激素进行比较试验。

1.2.5 不同激素种类及比对不定芽形成的影响 以贯叶连翘茎段形成的愈伤组织为外植体, 以 MS 为基本培养基, 设置 5 组不同种类及配比的激素进行比较试验。光照时间每天 12 h, 光照强度 2 000 ~ 3 000 lx, 培养温度 (25 ± 1) °C, pH 值 5.8。

1.2.6 不同浓度的 6-BA 与 NAA 对芽增殖的影响 以贯叶连翘茎段形成的愈伤组织为材料, 设计 4 组试验进行比较, 以筛选出芽增殖的最佳 BA 和 NAA 浓度。

收稿日期: 2006-12-06

基金项目: 云南省自然科学基金 (编号: 2006C0086M)。

作者简介: 邱璐 (1965—), 女, 重庆人, 硕士, 副教授, 主要从事植物组织培养及转基因研究工作。通讯作者: 罗春梅, Tel: (0878) 3100507; E-mail: qiulu5@vip.sina.com。

1.2.7 生长素与细胞分裂素的比对芽增殖的影响 以贯叶连翘茎段形成的愈伤组织为材料,设计5组试验进行比较,以筛选出芽增殖的最佳生长素与细胞分裂素配比。

1.2.8 贯叶连翘对庆大霉素敏感性测定 以贯叶连翘茎段形成的愈伤组织为材料,以 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA 为基本培养基,在培养基中分别加入 0、25、50、75 mg/100ml 的 Gent. (庆大霉素),以筛选出 Gent. 标记的阳性贯叶连翘转基因植株的最佳选择压力。

1.2.9 土壤农杆菌对头孢霉素敏感性测定 以贯叶连翘茎段形成的愈伤组织为材料,以 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA 为基本培养基,在培养基中分别加入 0、100、200、300、400 mg/L 的 Cef. (头孢毒素),以筛选出有效抑制土壤农杆菌生长的最佳 Cef. 浓度。

2 结果与分析

2.1 无菌苗建立试验结果

从表 1 可看出,贯叶连翘茎段随消毒时间的增加,污染率大幅度降低,但成活率并非递增。综合来

表 1 无菌苗建立试验结果

消毒时间 (min)	接种材料 数(个)	污染材料 数(个)	成活材料 数(个)	污染率 (%)	成活率 (%)
2.0	20	12	8	60	40
2.5	20	6	12	30	60
3.0	20	4	15	20	75
3.5	20	2	2	10	10
4.0	20	1	1	5	5

表 4 不同激素种类及比对愈伤组织诱导的影响

序号	培养基 (mg/L)	愈伤形成时间 (d)	愈伤诱导率 (%)	愈伤长势	愈伤颜色	不定芽形成 (个)
1	MS + 1.0 2,4 - D	8	100	+++	黄白色	1~2
2	MS + 1.0 2,4 - D + 1.0 6 - BA	6	100	++++	黄白色	1~2
3	MS + 1.0 2,4 - D + 1.0 KT	7	100	+++	黄白色	1~2
4	MS + 1.0 2,4 - D + 1.0 ZT	8	100	+++	黄白色	1~2
5	MS + 1.0 2,4 - D + 1.0 Zip	5	100	+++++	黄白色	1~2
6	MS + 1.0 2,4 - D + 1.0 NAA	8	100	+++	黄白色	1~2
7	MS + 1.0 6 - BA + 1.0 NAA	7	100	+++	黄绿色	4~5

2.5 不同激素种类及比对不定芽形成的影响

由表 5 可见,1 号培养基诱导贯叶连翘形成不定芽效果最好,增殖系数高,苗的长势旺;5 号培养基次之;其他几个培养基效果相近,均不如 1 号和 5 号。说明 6-BA 诱导贯叶连翘形成不定芽的效果优于 KT、ZT、Zip。

看,使用 0.2% HgCl₂ 消毒 3 min 效果最好,成活率高达 75%,污染率仅 20%。

2.2 不同基本培养基对愈伤组织诱导的影响

MS 培养基与 1/2MS 培养基对愈伤组织诱导的影响差异不大,愈伤组织形成时间均较早,诱导率均高达 100%,但愈伤组织的长势在 MS 上比在 1/2MS 上好(表 2)。

表 2 不同基本培养基对愈伤组织诱导的影响

基本培养基	愈伤形成时间 (d)	愈伤诱导率 (%)	愈伤长势
MS	3	100	+++++
1/2MS	5	100	+++

2.3 不同外植体部位对愈伤组织诱导的影响

贯叶连翘易形成愈伤组织,茎和叶的愈伤诱导率均高达 100%,但茎形成的愈伤组织长势更旺,有更多不定芽形成(表 3)。

表 3 不同外植体部位对愈伤组织诱导的影响

外植体	愈伤形成 时间(d)	愈伤诱导率 (%)	愈伤 长势	愈伤 颜色	不定芽 形成(个)
茎	4	100	+++++	黄白色	6~10
叶	7	100	+++	黄白色	3~5

2.4 不同激素种类及比对愈伤组织诱导的影响

培养基 1~7 均能 100% 地诱导贯叶连翘形成愈伤组织,愈伤组织大多为黄白色,见光后转化为黄绿色。从愈伤组织的长势和形成时间来看,5 号培养基优于 2 号,2 号优于其他。但 7 号培养基不仅能较好地形成愈伤组织,而且愈伤组织能直接分化形成不定芽,因此可作为首选配方(表 4)。

表 5 不同激素种类及比对不定芽形成的影响

序号	培养基 (mg/L)	不定芽 形成(个)	苗高 (cm)	叶色	苗的长势
1	MS + 1.0 6 - BA + 0.1 NAA	7	6.0	黄绿色	+++++
2	MS + 1.0 KT + 0.1 NAA	3	3.0	黄白色	+++
3	MS + 1.0 ZT + 0.1 NAA	2	1.5	黄白色	+++
4	MS + 1.0 Zip + 0.1 NAA	2	2.5	黄白色	+++
5	MS + 1.0 6 - BA	5	3.5	黄白色	++++

2.6 不同浓度的 6-BA 与 NAA 对芽增殖的影响

随 6-BA 与 NAA 浓度的降低,不定芽形成时间延长,不定芽形成数减少,但苗越来越壮,叶片越来越大,玻璃化现象越来越轻。MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 形成的不定芽虽多,但苗过于纤细;MS + 0.1 mg/L 6-BA + 0.01 mg/L NAA 形成的不定芽数虽不如 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA,但苗壮,无玻璃化现象,可作为首选配方(表 6)。

表 6 不同浓度的 6-BA 及 NAA 对芽增殖的影响

激素种类及配比 (mg/L)	形成不定芽的时间 (d)	形成不定芽数 (个)	不定芽长势	愈伤分化成芽率 (%)	玻璃化现象
MS + 1.0 6-BA + 0.1 NAA	6	7	++++	100	严重
MS + 0.7 6-BA + 0.07 NAA	7	7	++++	100	严重
MS + 0.5 6-BA + 0.05 NAA	7	6	++++	100	轻
MS + 0.3 6-BA + 0.03 NAA	8	5	++++	100	不明显
MS + 0.1 6-BA + 0.01 NAA	8	5	++++	100	无

2.7 生长素与细胞分裂素的比对芽增殖的影响

生长素与细胞分裂素的比例为 1:10 时有利于贯叶连翘形成不定芽,不定芽数多,但不定芽生长速度慢;生长素与细胞分裂素的比例为 1:5 时不定芽形成数少,但不定芽生长速度快(表 7)。

表 7 不同浓度的 NAA 影响芽增殖的试验结果

激素种类及配比 (mg/L)	生长素与细胞分裂素的比例	形成不定芽数 (个)	不定芽长势	苗生长速度
MS + 0.5 6-BA + 0.5 NAA	1:1	3~4	+++	快
MS + 0.5 6-BA + 0.3 NAA	3:5	3~5	+++	稍慢
MS + 0.5 6-BA + 0.1 NAA	1:5	3~5	+++	最快
MS + 0.5 6-BA + 0.05 NAA	1:10	9~10	++++	慢
MS + 0.5 6-BA + 0.01 NAA	1:50	7~8	+++	慢

2.8 贯叶连翘对庆大霉素敏感性测定结果

从表 8 可知,使用 50 mg/ml 的 Gent. 作选择压力筛选 Gent. 标记的阳性转基因植株效果最好。75 mg/ml 及 100 mg/ml 浓度过高,对细胞造成严重伤害,非转基因植物细胞不能正常生长。

表 8 贯叶连翘对 Gent. 敏感性测定

Gent. 浓度 (mg/ml)	非转基因植物长势	Gent. 浓度 (mg/ml)	非转基因植物长势
0	植株绿色,长势较好	75	均死亡,全部白化
25	大多白化,出叶枯叶	100	均死亡,全部白化
50	均死亡,全部白化		

2.9 土壤农杆菌对头孢霉素敏感性测定结果

从表 9 可知,使用 100 mg/L 的 Cef. 不能有效抑

表 9 土壤农杆菌对 Cef. 敏感性测定

Cef. 浓度 (mg/L)	土壤农杆菌生长情况	贯叶连翘不定芽形成情况
0	菌落最多,生长最旺盛	生长良好、最慢
100	菌落较多,生长旺盛	生长良好、较慢
200	菌落多,生长一般	生长良好、慢
300	菌落少,生长慢	生长良好、快
400	菌落极少,生长极慢	生长良好、较快

制土壤农杆菌的生长,影响贯叶连翘不定芽诱导;300 mg/L 的 Cef. 浓度太高,能有效抑制土壤农杆菌的生长,但不定芽形成较快,影响转基因的效果;200 mg/L 的 Cef. 能有效抑制土壤农杆菌的生长,能稳定地进行转基因,同时对贯叶连翘细胞无毒害作用,转基因贯叶连翘细胞能较快形成不定芽。

3 讨论

贯叶连翘植株较矮,离地面较近,被土壤污染的可能性较大,但植株表面光滑,无表皮毛,且对消毒剂的忍耐性较好,自身恢复生长的能力较强,因此在用幼茎做外植体时,用 0.2% HgCl₂ 消毒效果较好。

贯叶连翘易于形成愈伤组织,用 MS 或 1/2MS 为基本培养基,用茎段或叶做外植体,使用生长素 2,4-D 或 NAA,用细胞分裂素 6-BA 或 KT、ZT、Zip,均能较好地诱导贯叶连翘形成愈伤组织。

贯叶连翘形成的愈伤组织易于分化形成不定芽,使用细胞分裂素 6-BA 或 KT、ZT、Zip,均能较好地诱导不定芽,但 6-BA 诱导不定芽形成的效果明显优于 KT、ZT 和 Zip,不仅能较好地形成愈伤组织,而且愈伤组织能直接分化形成不定芽。6-BA 与 NAA 配合诱导愈伤组织分化形成不定芽,在不定芽形成时间及不定芽形成数量上均显著优于 KT 或 ZT、Zip 与 NAA 配合。随着 6-BA 浓度的升高,不定芽形成时间缩短,不定芽形成数增加,但苗越来越纤细瘦弱,玻璃化现象也越来越重。MS + 0.1 mg/L 6-BA + 0.01 mg/L NAA 形成的不定芽数较适中,苗壮,无玻璃化现象,效果最好。

在植物组织培养中,细胞分裂素具有促进芽生长的作用,生长素具有促进根生长的作用,细胞分裂素与生长素的比值高低对外植体的发展方向起着决定性作用^[5]。生长素与细胞分裂素的比例为 1:10 时有利于贯叶连翘形成不定芽,不定芽数多,但不定芽生长速度慢;生长素与细胞分裂素的比例为 1:5 时不定芽形成数少,但不定芽生长速度快。

(下转第 218 页)

表 3 不同种植方式的水稻产量与经济效益

处理	产量 (kg/667m ²)	产值 (元/667m ²)	物耗成本 (元/667m ²)	人工费 (元/667m ²)	净收入 (元/667m ²)	纯收入 (元/667m ²)	劳动生产率 (元/工日)
小麦—水稻	491.55	786.48	355	150	431.48	281.49	86.30
油菜—水稻	501.62	802.59	355	150	447.59	297.59	89.52
黑麦草—水稻	470.76	753.22	355	150	398.22	248.22	79.64
紫云英—水稻	545.41	872.66	325	150	547.66	397.66	109.53
冬闲—水稻	503.66	805.86	355	150	450.86	300.86	90.17

注:水稻价格按 1.6 元/kg 计。

表 4 不同种植方式的年经济效益

种植方式	夏收作物 (kg/667m ²)	水稻 (kg/667m ²)	产值 (元/667m ²)	物耗成本 (元/667m ²)	人工费 (元/667m ²)	净收入 (元/667m ²)	纯收入 (元/667m ²)	劳动生产率 (元/工日)
小麦—水稻	325.0	491.55	1 241.5	560.0	210.0	681.5	471.5	97.4
油菜—水稻	88.5	501.62	1 052.2	485.0	270.0	567.2	297.2	63.0
黑麦草—水稻	4 253.5(鲜)	470.76	753.2	355.0	150.0	398.2	248.2	79.6
紫云英—水稻	2 402.1(鲜)	545.41	872.7	355.0	155.0	537.7	382.7	104.1
紫云英—水稻*		545.41	872.7	331.0	151.0	541.7	390.7	107.6
冬闲—水稻		503.66	805.9	355.0	150.0	450.9	300.9	90.2

注: * 为紫云英一次播种多年(以 5 年计)繁殖利用的经济效益。

紫云英—水稻优于油菜—水稻、冬闲—水稻。

3 结论与讨论

尽管小麦—水稻种植方式的 N、P₂O₅ 径流损失较大,但其净收入、机械化生产程度、劳动生产率都很高,仍是当地稻田种植方式的首选。

油菜—水稻种植方式的 N、P₂O₅ 径流损失大,经济效益也不高。冬闲—水稻虽然 N、P₂O₅ 流失较少,但经济效益低。因此,在经济发达地区稻田应减

少和限制油菜—水稻、冬闲—水稻种植方式的应用。

紫云英—水稻种植方式 N、P₂O₅ 流失少,具有良好的生态效益,且经济效益较好,可逐步替代冬闲—水稻和油菜—水稻种植方式,尤其在水体富营养化比较严重的地区,以及与水体接壤地带的稻田,应优先应用。

同时,应加强紫云英—水稻种植方式配套技术的研究和示范,如通过紫云英一次播种多年繁殖利用技术,以降低紫云英生产成本等。

(上接第 180 页)

植物转基因过程中,常在目的基因上携带抗生素抗性基因,作为转基因识别标志。因此须在培养基中加入抗生素作为转基因抗性细菌或植物的选择压力^[6]。使用 50 mg/ml 的庆大霉素作选择压力筛选庆大霉素标记的贯叶连翘阳性转基因植株效果最好。

在植物转基因过程中,用携带目的基因的土壤农杆菌侵染植物时,一方面土壤农杆菌要有一定的浓度,确保有效地进入植物细胞,另一方面土壤农杆菌在细胞中大量生长繁殖,会导致植物细胞死亡。为防止土壤农杆菌大量繁殖对植物细胞的破坏作用,须在培养基中加入一定浓度的头孢霉素抑制土壤农杆菌^[7]。头孢霉素具有广谱抗性,能有效抑制土壤农杆菌生长,同时对贯叶连翘的细胞无毒害

作用。

参考文献:

- [1] 贾永蕊,胡然,库宝善. 贯叶连翘的中枢神经药理作用研究进展[J]. 国外医学:精神疾病学分册,2004,31(4):216-218.
- [2] 将尊成. 贯叶连翘研究进展[J]. 中成药,1999,2(6):328-329.
- [3] 吴敏,王霞,许平. 贯叶连翘的研究进展[J]. 中成药,2004,26(9):760-763.
- [4] 李宏,姜怀春,邹国林. 贯叶连翘活性成分研究新进展[J]. 中草药,2001,32(7):657-660.
- [5] 严昌敬. 植物组织培养手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1990:320-340.
- [6] 顾红雅,瞿礼嘉,明小天,等. 植物基因与分子操作[M]. 北京:北京大学出版社,1995:237.
- [7] 瞿礼嘉,顾红雅,胡平,等. 现代生物技术导论[M]. 北京:高等教育出版社,2002:243-249.