

山豆根组培快繁技术优化的研究

姚绍嫦¹, 凌征柱¹, 蓝祖栽¹, 马小军^{1,2}

(1. 广西药用植物园 广西 南宁 530023; 2. 中国医学科学院 药用植物研究所 北京 100193)

摘要:以药用植物山豆根为材料,通过探讨不同部位、基本培养基、6-BA 浓度和继代代数对有效繁殖系数和成苗质量的影响,以优化山豆根的组培快繁技术。结果表明:顶芽茎段为诱导的最佳部位;改良 B5 低氮盐,为最适基本培养基;6-BA 2.0 mg/L 对芽分化和苗的质量较优;较为合适的继代代数为 10~15 代。

关键词:山豆根;试管苗;有效繁殖系数;成苗质量

中图分类号:S 793.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)06-0136-04

山豆根为豆科灌木状植物越南槐(*Sophora tonkinensis* Gapnep.)的干燥根及根茎,为传统中药,主产于广西^[1],具有清热解毒、消肿利咽等功效^[2]。传统用于治疗火毒蕴结、咽喉肿痛、牙龈发炎等。近代临床还常用其治疗湿热黄疸、湿热带下以及钩端螺旋体病、心率失常、膀胱癌、喉癌、恶性葡萄胎等症^[3]。其有效成分为苦参碱和氧化苦参碱^[4]。山豆根分布范围很窄,零星

生长于石山岩缝之中,目前掠夺性的采挖已经使野生资源濒临枯竭^[5]。自然繁育完全依靠种子,然而开花结荚期病虫害严重和种子成熟时自然脱落的特性常造成种子产量非常低,生产上无法实现大面积栽培。植物组织培养技术为山豆根的快速繁育提供了一条实用而高效的途径。课题组从 2005 年起开展山豆根的组织培养研究,虽然再生系统已经初步建立^[5],但是繁殖系数低和成苗质量不好是制约其实现工厂化育苗的瓶颈。

试管苗的繁殖速度和成苗质量受多种因素的影响,如基因型、外植体部位、年龄、来源、取材季节、培养基和培养条件以及培养代数等,应通过具体试验来摸索每种植物最快最好的繁殖方法^[6]。该试验在原有的研究基础上,进一步探讨不同部位、基本培养基、6-BA 浓度和继

第一作者简介:姚绍嫦(1980-),女,广西容县人,硕士,助理研究员,现主要从事药用植物组织培养方面的研究工作。E-mail: yaoshaochang@163.com。

基金项目:国家科技重大专项资助项目(2009ZX09308-002);国家发改委中药材扶持资金资助项目(发改运行[2007]2706号)。

收稿日期:2011-01-17

Transform and Expression of RNA Interferential Targeting CMV-Coat Protein Gene in Tomato

PAN Yong-ming¹, ZHANG Li-hua², LI Chun-yan³, ZHOU Yan¹

(1. Mudanjiang Normal University, Mudanjiang, Heilongjiang 157012; 2. Mishan 8511 Farm Forestry Bureau, Mishan, Heilongjiang 158308; 3. Mudanjiang Medical University, Mudanjiang, Heilongjiang 157011)

Abstract: The coat protein gene of cucumber mosaic virus (CMV) was targeted for RNA interference in this paper. The partial sequence of CMV coat protein gene cDNA was obtained by the RT-PCR with the primers which designed according to the high homologous sequences of three CMV three strains. The target sequences were prepared by PCR and inverted repeat in plasmid to build the RNA interference binary vector. The tomato were genetic modified via binary vector of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. The resistance to CMV of transgenic tomato was identified by artificial inoculation. The expression of RNA interference effect of the transgenic tomato were evaluated by realtime PCR analysis. The results showed that RNAi-transgenic tomato showed ability of different levels of anti-virus, the quantitative PCR analysis for transgenic tomatoes antiviral capacity showed that the transgenic tomatoes target gene transcription mRNA exist a certain degree of degradation, and the degree of degradation was positive correlation to antiviral capacity.

Key words: RNA interference; cucumber mosaic virus; gene transformation; gene expression

代代数等因子对有效繁殖系数和成苗质量的影响,旨在完善和优化山豆根组培快繁技术,为进一步实现山豆根试管苗工厂化生产提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

材料采自广西那坡县龙合乡石山区的野生越南槐的种子,种子播种于 MS 基本培养基,发芽后获得无菌苗,再选取无菌苗的不同部位进行丛生芽诱导培养。

1.2 试验方法

1.2.1 培养条件 在超净工作台上将种子于 0.1%升汞溶液中消毒 12 min,用无菌水泡洗 4 次,1~2 min/次,播种于 MS 基本培养基。培养基含 2.5%蔗糖和 0.5%琼脂, pH 5.8,经 1.1~1.5 kgf/cm² 高压灭菌 20 min。采用人工光照封闭式培养室,光照强度 1 500~2 000 lx,光照时间 12 h/d,温度 (26±2)℃。每 30 d 继代 1 次,每个试验接种 30 瓶,每瓶接种 3 簇(3 个芽 1 簇),30 d 后统计有效繁殖系数和平均苗高。

1.2.2 不同部位对愈伤组织和丛生芽诱导的影响 选取种子萌发后的叶片(约 1.0 cm²)、子叶(约 1.0 cm²)、顶芽茎段(约 1.0 cm)和侧芽茎段(约 1.0 cm)4 个不同部位作为外植体,接种于 MS+6-BA 2.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基进行诱导培养,随后统计愈伤组织数、丛生芽数、有效繁殖系数,从中筛选出最佳的外植体类型。

1.2.3 基本培养基对有效繁殖系数和成苗质量的影响 以 MS、1/2MS、改良 MS(NH₄NO₃ 减半)、B5、改良 B5(KNO₃ 减半)为基本培养基进行培养,30 d 后对有效繁殖系数和平均苗高进行方差分析及多重比较,并对试管苗质量进行分级比较,筛选出最佳基本培养基。

1.2.4 6-BA 对有效繁殖系数和成苗质量的影响 用 6-BA 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/L 与 NAA 0.2 mg/L 配成 5 个不同的激素浓度组合进行培养,30 d 后对有效繁殖系数和平均苗高进行方差分析及多重比较,并对试管苗质量进行分级比较,筛选出最适合的 6-BA 浓度水平。

1.2.5 继代代数对有效繁殖系数和成苗质量的影响 将代数为 0、3、5、10、15、20、25 的丛生芽转接到最佳基本培养基并添加最适合的激素浓度水平下进行培养,30 d 后对有效繁殖系数和平均苗高进行方差分析及多重比较,并对试管苗质量进行分级比较,筛选出最适宜的继代代数。

1.3 试管苗质量分级标准

根据试管苗的生长状态,将其分为 4 个等级:I 级苗:苗高 5~8 cm,叶片完全展开,大小中等,茎粗壮,茎基部半木质化,生长旺盛,生根率 90%以上。II 级苗:苗高 3~5 cm,叶片完全展开,茎较细弱,茎基部未木质化,生根率 50%以上。III 级苗:苗高 2~3 cm,叶片未完全展开或有轻微玻璃化症状,呈黄绿色,茎脆嫩易折断,生根率

20%以上。IV 级苗:苗高 1~3 cm,叶片未展开或有玻璃化症状,呈水渍状绿色,茎半透明易折断,生根率 20%以下。

1.4 统计方法

各阶段试验均采用单因素完全随机设计,3 次重复,数据采用 DPSv 2.00 数据处理软件进行显著性差异分析,采用 LSD 法进行多重比较,不同小写字母表示差异显著性 ($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 不同部位对丛生芽诱导和有效繁殖系数的影响

由表 1 可知,不同部位在诱导培养基中形成愈伤组织和丛生芽的情况相差甚远。叶片和子叶均仅形成愈伤组织但不能分化出芽,培养一段时间后褐化而坏死。顶芽茎段和侧芽茎段均可直接培养形成丛生芽,诱导率达 100%,但顶芽和侧芽茎段产生的系数有很大差异,顶芽茎段(3.62)明显大于侧芽茎段(1.85)。因此,在山豆根丛生芽诱导中,最佳的外植体部位是顶芽茎段。

表 1 不同部位对丛生芽诱导和有效繁殖系数影响

部位	有效外植体数 /块	愈伤组织数 /块	丛生芽数 /块	有效繁殖系数
叶片	30	23	0	0
子叶	30	28	0	0
顶芽茎段	30	0	30	3.62
侧芽茎段	30	0	30	1.85

2.2 基本培养基对有效繁殖系数和成苗质量的影响

由表 2 可知,基本培养基对试管苗的有效繁殖系数影响差异较大,B5、改良 B5 和改良 MS 培养基均有较好的增殖效果,有效繁殖系数均在 4.0 以上,与其它处理差异达显著水平,该 3 种培养基的氮盐含量均较低,对山豆根品种的离体培养均表现出明显的促进增殖作用,其中改良 B5 表现最好,有效繁殖系数为 4.46,表现最差的是 1/2MS。从平均苗高来看,改良 B5 培养基的平均苗高为 3.29 cm,显著高于 MS 和 1/2MS,但改良 B5 与 B5、改良 MS 之间相比差异不显著,平均苗高均超过 3.0 cm,这表明培养基中低浓度的氮盐不但有益于山豆根丛生芽的诱导,同时也有利于试管苗茎的伸长。

将丛芽中长度 1.0 cm 以上的不定芽全部切下,按照试管苗质量分级标准进行分级,每种处理切取的总芽数达到 100 个以上,分别统计 I、II、III、IV 级苗所占比例。由图 1 可知,不同基本培养基影响试管苗的分化质量差异较大,在改良 B5 培养基中生长的试管苗不会出现玻璃化现象,I 级苗的分化率稳定在最高的水平。其次是改良 MS 培养基,试管苗出现玻璃化现象也较少,I 级苗的分化率也处在较高的水平。MS 和 1/2MS 培养基的 III、IV 级苗所占比例增大,出现玻璃化现象也较多。综合分析认为,改良 B5 是试管苗继代增殖的最适基本培养基,其次是改良 MS。

表 2 不同基本培养基对试管苗有效繁殖系数和平均苗高的影响

基本培养基	接种数/ 瓶	有效繁殖系数	平均苗高/ cm
改良 B5	30	4. 46a	3. 29a
改良 MS	30	4. 15a	3. 05ab
B5	30	4. 15a	2. 95ab
MS	30	3. 19b	2. 72b
1/ 2MS	30	2. 93b	2. 10c

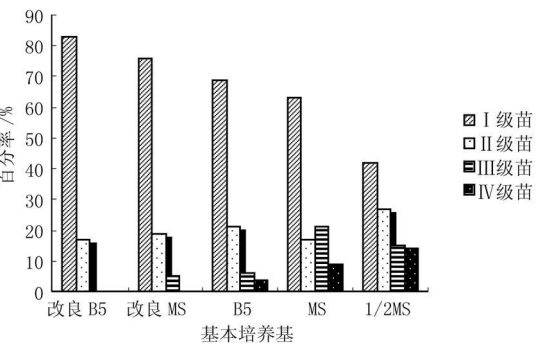


图 1 不同基本培养基对试管苗质量分级的影响

2.3 6-BA 对试管苗有效繁殖系数和成苗质量的影响

由表 3 可知, 随着 6-BA 浓度的增加, 试管苗的有效繁殖系数呈上升趋势, 以 2.0 mg/L 最高, 为 5.49, 与较低 6-BA 质量浓度水平的处理差异显著。当 6-BA 超过 2.0 mg/L 时, 有效繁殖系数开始呈下降趋势。不同的植物品种对激素 6-BA 的浓度适应要求不一样, 在药用植物山豆根上以 2.0 mg/L 为宜。从平均苗高来看, 随着 6-BA 浓度的增加, 试管苗的平均苗高也表现出上升趋势, 当 6-BA 2.0 mg/L 时达到最佳效果, 平均苗高最大, 为 3.49 cm, 显著高于其它各处理。6-BA 超过 2.0 mg/L, 平均苗高也出现下降趋势, 表明 6-BA 在一定范围内不仅能促进丛生芽增殖, 还能促进不定芽的伸长。

表 3 6-BA 对试管苗有效繁殖系数和平均苗高影响

6-BA 浓度 /mg · L ⁻¹	NAA 浓度 /mg · L ⁻¹	接种数 /瓶	有效繁殖系数	平均苗高 /cm
0.5	0.2	30	2.94c	1.10c
1.0	0.2	30	4.16b	1.49c
1.5	0.2	30	4.22b	2.89b
2.0	0.2	30	5.49a	3.49a
2.5	0.2	30	4.85ab	2.52b

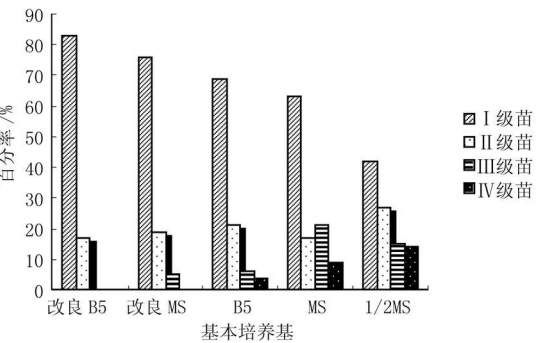


图 2 不同 6-BA 浓度对试管苗质量分级的影响

通过统计 I、II、III、IV 级苗所占比例发现(图 2), 培养基中 6-BA 含量主要影响试管苗的分化质量。6-BA 浓度在 0.5~2.0 mg/L 范围内出现玻璃化较少, I 级苗所占比例随着浓度增加而呈上升趋势, 以 6-BA 2.0 mg/L 最高, 达到 80% 以上。当 6-BA 浓度超过 2.0 mg/L I 级苗的分化率急剧下降, 仅为 51%, 玻璃化苗也迅速增加。综合分析认为, 山豆根试管苗继代培养中 6-BA 含量以 2.0 mg/L 效果最好, 有效繁殖系数和平均苗高均最大, 成苗质量最好。

2.4 继代数对有效繁殖系数和成苗质量的影响

对继代 0、3、5、10、15、20、25 代的试管苗有效繁殖系数和平均苗高进行统计(表 4), 结果表明, 有效繁殖系数与继代数密切相关。培养的最初 2 代, 试管苗有效繁殖系数不大, 在 3.6 以下; 5~10 代间有效繁殖系数迅速增加, 以第 10 代最高, 达到 6.4; 第 10 代以后试管苗进入分化高峰期, 一直延续到 15 代, 稳定在 6.0 以上, 显著高于其它代数; 15 代以后又开始呈缓慢减少趋势, 到 20 代有效繁殖系数降至 4.9; 20 代以后有效繁殖系数迅速开始减少, 到 25 代降至 2.2。结合平均苗高指标分析, 山豆根的继代增殖代数为 10~15 代时, 有效繁殖系数较大, 同时平均苗高也较大, 变化趋势基本上与有效繁殖系数的一致。

通过统计 I、II、III、IV 级苗所占比例发现(图 3), 随着继代数增加, 试管苗质量有所下降。0~5 代, 试管苗质量最好, 无玻璃化苗出现, I 级苗的所占比例也达到 90% 以上; 5~15 代, 处于有效繁殖系数较高的时期, 试管苗质量虽有所下降, 但是玻璃化苗出现比例较小 I 级苗的所占比例也达到 75% 以上; 15~25 代 I 级苗的所占比例开始减小, II、III、IV 级苗比例越来越大, 至 25 代时, I 级苗仅为 52%, IV 级苗 14%。综合分析认为, 山豆根试管苗继代培养中最佳继代代数为 10~15 代。

表 4 继代数对试管苗有效繁殖系数和平均苗高的影响

继代数	接种数/ 瓶	有效繁殖系数	平均苗高/ cm
0	30	1.0f	2.80c
3	30	3.6d	3.20bc
5	30	4.1c	3.86a
10	30	6.4a	3.58ab
15	30	6.2a	3.16bc
20	30	4.9b	2.72c
25	30	2.2e	2.72c

3 结论与讨论

不同的植物、器官和组织的形态发生能力颇不相同。在植物组织高度分化的细胞中, 人工能使它脱分化, 从而恢复旺盛的分生能力, 但是由于现有技术和试验条件的限制, 目前还不能轻而易举地使每一种植物的任何一个部位的细胞都恢复分生能力。所以, 在植物组

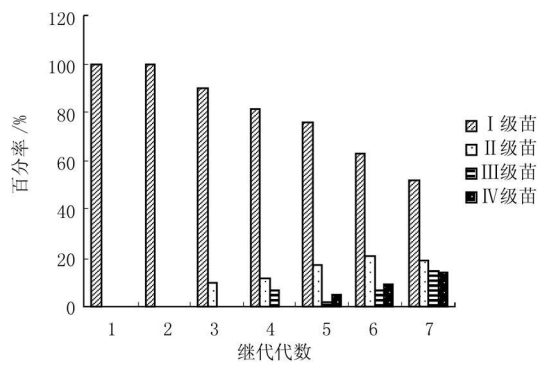


图3 继代数对试管苗质量分级的影响

组织培养中外植体的选择显得相当重要,该试验通过用4种不同的外植体研究发现,以顶芽茎段进行诱导比较好,得到较大的有效繁殖系数。

植物离体培养成功与否,除培养材料本身的因子外,第2个因子就是培养基。该试验通过采用不同的基本培养基研究发现,低浓度氮盐较为适合山豆根的诱导和增殖培养,特别是低氮盐的改良B5培养基对山豆根的培养最合适,主要表现在有效繁殖系数大(4.46)、平均苗高大(3.0 cm)、成苗质量好(I级苗占83%)。

植物生长调节剂是培养基中的关键物质,能以极微量的量影响到植物的细胞分化、分裂和发育,在离体繁殖中起着重要的调节作用。试验中6-BA对山豆根离体繁殖有明显的影响,6-BA在一定范围内不仅能促进丛生芽增殖还能促进不定芽的伸长,这与及华等^[7]在梨S系矮化砧组培苗上的研究结果相似。6-BA超过2.0 mg/L,不利于丛生芽增殖和茎的伸长,玻璃化苗的分化率明显升高。由此可见,芽增殖阶段细胞分裂素浓度的

确定应同时考虑有效繁殖系数和成苗质量的综合效应。山豆根继代增殖阶段在多种6-BA浓度中,以6-BA浓度为2.0 mg/L最适。

试管苗在长期的继代培养过程中,材料自身内部要发生一系列生理变化,其中包括形态发生能力的丧失。不同的植物其保持再生能力的时间是不同的,而且差异很大。该试验中山豆根试管苗在继代培养15代以后,增殖系数开始下降。有关形态发生能力衰退的原因目前尚无定论,但不少研究表明该现象更多地发生在细胞培养和愈伤组织继代中,可能与材料自身的分生组织在重复继代中逐渐减少或丧失有关,也可能与内源生长调节物质的减少或丧失有关。另外,许多研究证实,培养材料继代时间越长遗传变异率越高,会出现细胞染色体畸变、数目增加或丢失的现象。因此,在试管苗快繁过程中,应尽量采用以芽生芽的增殖途径和适宜的继代数,以保持试管苗遗传稳定性和旺盛的分生能力。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 2010年1部. 北京: 中国医药科技出版社, 2009: 25-26.
[2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(4)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 652-654.
[3] 李希新. 广豆根的研究概况[J]. 山东中医药大学学报, 2000, 24(3): 235.
[4] 张涛. 山豆根药理作用与临床应用研究近况[J]. 广西中医学院学报, 2008, 11(3): 110-111, 117.
[5] 覃文流, 凌征柱, 许鸿源, 等. 山豆根组织培养获得再生植株[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(4): 303-304.
[6] 曹孜义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1998: 41-53.
[7] 及华, 张海新, 赵玉芬, 等. 梨S系矮化砧组培苗有效繁殖系数和质量的影响因子[J]. 河北农业科学, 2004, 8(2): 40-44.

Optimization of Tissue Culture on *Sophora tonkinensis* Gapnep.

YAO Shao-chang¹, LING Zheng-zhu¹, LAN Zu-zai¹, MA Xiao-jun^{1,2}

(1. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning, Guangxi 530023; 2. Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100094)

Abstract: The effect of several factors such as different positions, basic media, 6-BA concentration and subculture times on effective propagation coefficient and seedling quality was discussed in this paper by using tube seedlings of *Sophora tonkinensis* Gapnep. The results showed that the stem with terminal bud was the best position. Medium which had lower concentration of nitrogen was beneficial to propagation and seedling quality, so that improved B5 medium was the most suitable one. When 6-BA concentration was 6-BA 2.0 mg/L and the subculture times were 10 ~ 15, the effective propagation coefficient and seedling quality were both significantly better than others.

Key words: *Sophora tonkinensis* Gapnep.; tube seedling; effective propagation coefficient; seedling quality