

龙葵毛状根诱导条件的研究

王 丽, 刘 琪, 宁 明 明, 张 卫 东, 戚 小 利, 李 秀 霞

(佳木斯大学 生命科学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘 要:以发根农杆菌 A4、C58C1 和 A1476 为诱导菌株, 探讨外植体类型、发根农杆菌种类、侵染时间、预培养时间、菌液浓度和共培养天数对龙葵毛状根诱导率的影响。结果表明:外植体以叶片诱导率最高;发根农杆菌 A4、C58C1 和 A1476 侵染龙葵叶片均能诱导出毛状根, C58C1 诱导率较高;较佳侵染时间为 5 min;发根农杆菌浓度在 $OD_{600}=0.6$ 时诱导效果较好;预培养和共培养时间均为 2 d 时诱导率较高。该试验为大量生产毛状根, 并利用毛状根培养技术生产药物龙葵碱提供了试验基础。

关键词:龙葵;发根农杆菌;毛状根诱导;条件优化

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)04-0107-05

龙葵(*Solanum nigrum* L.)属茄科茄属 1 年生草本植物,广泛分布于欧、亚、美洲的温带至热带地区^[1],我国各地均有分布^[2],是我国传统的中草药,其全草均可入药。中国龙葵有 3 个种及 1 个变种,分别为龙葵、少花龙葵、红果龙葵和黄果龙葵^[3]。龙葵全草含苷类生物碱、

多糖、矿物质、维生素、色素、氨基酸等多种成分,所含生物碱可抑制肿瘤细胞生长、诱导肿瘤细胞凋亡和抑制肿瘤细胞转移,所含多糖能增强机体的免疫能力^[4-6]。临床中具有抗炎与抗休克、抑菌抗病毒、解热镇痛和祛痰止咳等作用。

发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)属根瘤菌科(Rhizobiaceae)农杆菌属的一种革兰氏阴性土壤细菌,它可以使植物宿主细胞组织产生毛状根瘤。在自然状态下,发根农杆菌通过伤口侵染植物, Ri 质粒上的 T-DNA 能插入植物基因组,其所携带的基因在宿主细胞中整合表达,使植物产生毛状根^[7]。利用毛状根诱导技术已在刺五加(*Acanthopanax senticosus*)、北柴胡(*Bupleurum chinense* DC)和三裂叶野葛(*Pueraria phaseoloides*)等多

第一作者简介:王丽(1988-),女,硕士研究生,研究方向为资源植物学与生物技术。E-mail:917549490@qq.com.

责任作者:李秀霞(1963-),女,博士,教授,现主要从事植物资源学与生物技术等研究工作。E-mail:lixixia2006@163.com.

基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究资助项目(12521523);佳木斯大学研究生科技创新资助项目(LZZ2014_001);黑龙江省高校科技成果产业化前期研发培养资助项目(1253CGZH08)。

收稿日期:2014-11-13

Karyotype and Banding Pattern Analysis of Somatic Cell Chromosome in *Astragalus mongolicus*

LIN Qin, Abudirehemu · REHEMAN, REN Xian

(School of Biological Science and Engineering, Northern University for Nationalities, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: Taking the root tip of seed from *Astragalus mongolicus* as material, the chromosome number, karyotype and zone type of somatic cell were studied by the methods of chemical staining, producer slide, C-banding methods and technology, computer and its software measurement and so on. The results showed that the number of RTC of *Astragalus mongolicus* was 8, and the karyotype formula was $2n=16=2L+4M_1+6M_2+4S$. The karyotype belonged to 2B type; and $A.sK$ (asymmetrical karyotype coefficient) $=16.17/25.63 \times 100\% = 63.09\%$. The total volume of chromosome was $69.0 \mu m^3$. In addition, the C-banding formula was $2n=16=8m+6sm+2sm^{+}sat$. There was a satellite in the segment of short arm of chromosome 3, which would lay the foundation for identifying and utilizing *Astragalus membranaceus* and *Astragalus mongolicus*.

Keywords: *Astragalus mongolicus*; chromosome; karyotype analysis; C-banding

种药用植物中获得成功^[8-10]。龙葵是传统的药用植物之一,目前国内有关于少花龙葵(*S. photeinocarpum*)和褐脉少花龙葵(*Solanum nigrum* L. var *pauciflorum* Liou)的毛状根诱导的研究报道^[11-12],但是关于龙葵毛状根诱导的最佳条件尚鲜见研究报道。现以黑龙江省龙葵为试材,对影响龙葵毛状根诱导的多种因素进行了比较系统的研究,旨在为龙葵的毛状根的进一步研究提供参考,为今后利用龙葵毛状根生产龙葵碱等药物奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

龙葵种子采于黑龙江省佳木斯大学校园,3种发根农杆菌菌株 A4、C58C1 和 A1476 为佳木斯大学生命科学学院实验室保存。

菌种活化培养基:YEB 培养基;预培养基:MS, pH 5.8;共培养基:MS+乙酰丁香酮(AS, 200 mg/L);除菌培养基:MS+400 mg/L 头孢噻肟钠+100 mg/L 羧苄青霉素, pH 5.8;毛状根继代培养基:MS, pH 5.8。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的获得 龙葵种子常规灭菌,于温室内种植于灭菌蛭石中,获得龙葵幼苗,取其幼叶、嫩茎和叶柄作为外植体。

1.2.2 菌种的活化 发根农杆菌 A4、C58C1 和 A1476 用接种环接种于 YEB 液体培养基内,28℃、160 r/min 振荡培养 24 h,用于外植体侵染。

1.2.3 外植体的转化方法 取龙葵苗的幼叶、嫩茎和叶柄作为外植体,经常规灭菌后切成边长为 5~10 mm 的小方块,接种于 MS 培养基预培养 2 d,之后将外植体浸入到活化好的菌液中,5 min 后取出,用无菌滤纸吸干多余菌液再放回到 MS 培养基上。共培养 2 d 后移至除菌培养基进行除菌培养,每隔 5 d 转接 1 次,经反复除菌至培养基看不到农杆菌菌落时再转入 MS 培养基进行继代培养。

1.2.4 各试验条件梯度的设置 试验所用发根农杆菌种类为 A4、C58C1 和 A1476;外植体选用幼叶、嫩茎和叶柄;预培养时间设置为 0、1、2、3、4 d;菌液浓度 OD_{600} 的值设置为 0.3、0.6、0.9、1.2;侵染时间设置为 5、10、15 min;共培养时间设置为 0、1、2、3、4 d。

1.2.5 龙葵毛状根 PCR 的检测 取龙葵无菌毛状根

200 mg,用 CATB^[13]法提取毛状根总 DNA,纯化后作为 PCR 的扩增模板,用 CATB 法提取未转化龙葵根总 DNA 作阴性对照,用纯化质粒 DNA 的提取方法^[14]提取农杆菌质粒作阳性对照。采用 Slighton 等^[15]发表的 rolB 引物:P1:5'-GCTCTTGCAGTGGCTAGATTT-3', P2:5'-GAAGGTGCAAGCTACCTCTC-3';rolC 引物:P1:5'-CTCCTGACATCAAACCTCGTC-3', P2:5'-TGCTTCGAGTTATGGGTACA-3'(引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成)。PCR 反应总体积为 50 μ L。向 0.2 mL 的硅化离心管中加入模板 DNA 1 μ L、 H_2O 34.6 μ L、buffer 5 μ L、 $MgCl_2$ 3 μ L 和 dNTP 1 μ L,引物 P1、P2 分别放入 2.5 μ L、5 单位的 Taq 酶 0.4 μ L。PCR 扩增的反应参数为:94℃起始变性 3 min,进行 35 个循环,每个循环包括 94℃变性 1 min,53.5℃退火 1 min 和 72℃延伸反应 1 min,最后 72℃延伸反应 10 min,扩增产物用 0.9%的琼脂糖凝胶电泳和 EtBr 染色进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同外植体对龙葵毛状根诱导率的影响

表 1 表明,叶片的毛状根诱导率最高,为 51.7%,生根最早;茎段诱导率次之,为 36.7%;叶柄诱导率最低,为 3.3%。试验发现叶片诱导的毛状根粗壮密集、多分支,而茎段和叶柄诱导的毛状根纤细分支少(图 1),且二者生根较叶片晚。试验结果表明,龙葵外植体的类型对毛状根的诱导率存在着一定的影响。

表 1 不同外植体对毛状根诱导率的影响

Table 1 Effect of different explants on the induction rate of hairy root

外植体类型 Explants type	接种数 Total No. plants/个	最早生根天数 The earliest root time/d	生根数 Rooting number/个	诱导率 Induction rate/%
叶片 Leaf	60	5	31	51.7
茎段 Stem segment	60	8	22	36.7
叶柄 Petiole	60	8	2	3.3

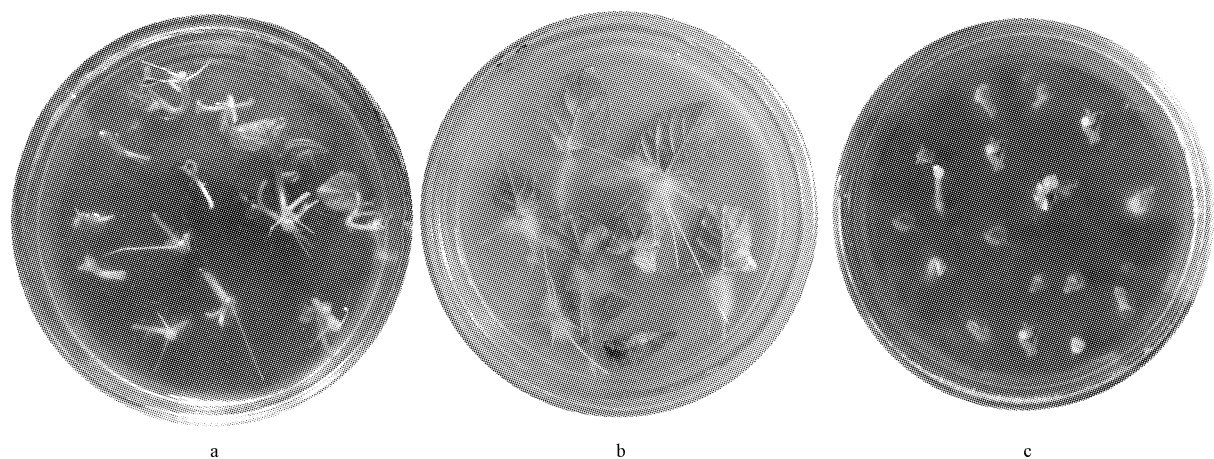
2.2 不同发根农杆菌对龙葵毛状根诱导率的影响

表 2 表明,侵染 1 周后,被 3 种农杆菌侵染的叶片均能诱导出毛状根(图 2),A4 和 C58C1 菌株对龙葵叶片的诱导率分别为 54%和 56%,而 A1476 的诱导率则为 48%,低于前二者,最早生根天数三者差别不大。结果显示,3 种发根农杆菌菌株对龙葵叶片毛状根的诱导率存在着一定的影响。

表 2 不同发根农杆菌对毛状根诱导率的影响

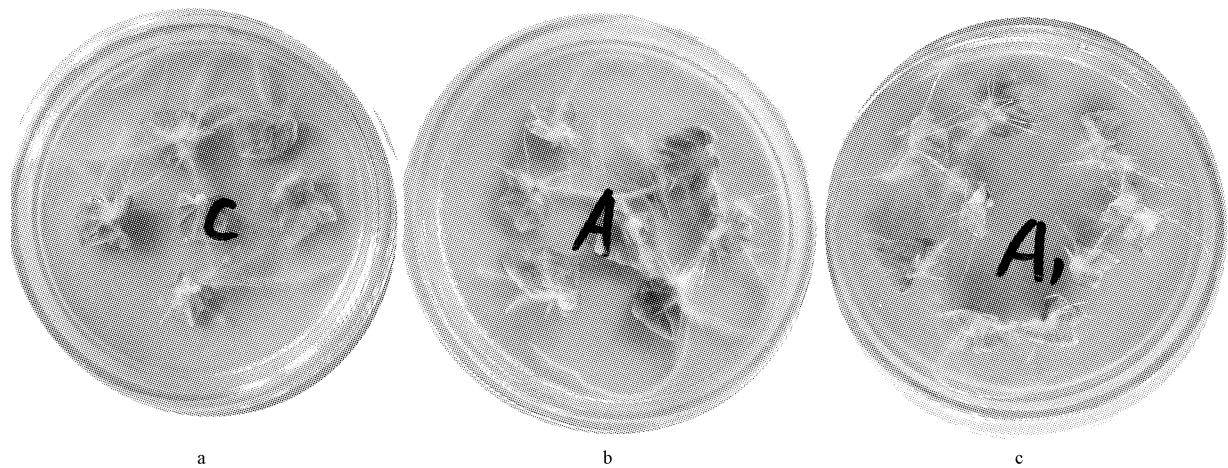
Table 2 Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* on the induction rate of hairy root

农杆菌类型 <i>Agrobacterium rhizogenes</i> type	接种数 Total No. plants/个	最早生根天数 The earliest root time/d	生根数 Rooting number/个	诱导率 Induction rate/%
A4	50	7	27	54
C58C1	50	6	28	56
A1476	50	7	24	48



注:a. 茎段诱导;b. 叶片诱导;c. 叶柄诱导。
Note:a. induction of stems;b. induction of leaves;c. induction of petiole.

图 1 不同外植体的毛状根诱导
Fig. 1 Hairy roots induction of different explants



注:a. C58C1;b. A4;c. A1476。
Note:a. C58C1;b. A4;c. A1476.

图 2 不同发根农杆菌诱导产生的毛状根
Fig. 2 Hairy roots induced by different *Agrobacterium rhizogenes*

2.3 不同侵染时间对龙葵毛状根诱导率的影响

表 3 表明,侵染时间对龙葵毛状根诱导率的影响较大,侵染时间 5 min 时叶片的毛状根诱导率为 56%,诱导率最高;侵染 10 min 及 15 min 的叶片毛状根诱导率分别为 16%和 10%,诱导率与侵染 5 min 的差别较大,最早生根天数三者差别不大。随着侵染时间的增长,诱

表 3 不同侵染时间对毛状根诱导率的影响

Table 3 Effect of different infection time on the induction rate of hairy roots

侵染时间 Infection time/min	接种数 Total No. plants/个	最早生根天数 The earliest rootd time/d	生根数 Rooting number/个	诱导率 Induction rate/%
5	50	7	28	56
10	50	7	8	16
15	50	6	5	10

导率逐步降低,试验中还观察到侵染 15 min 时外植体半数以上表现失去生命力,从而丧失诱发毛状根的能力。

2.4 预培养时间对龙葵毛状根诱导率的影响

表 4 表明,不进行预培养的叶片诱导率最低,为 36%;随着预培养天数的延长诱导率逐渐升高,预培养 2 d

表 4 不同预培养时间对毛状根诱导率的影响

Table 4 Effect of different pre-cultivation time on the induction rate of hairy roots

预培养天数 Pre-cultivation time/d	接种数 Total No. plants/个	最早生根天数 The earliest rootd time/d	生根数 Rooting number/个	诱导率 Induction rate/%
0	50	6	18	36
1	50	7	23	46
2	50	6	26	52
3	50	6	21	42
4	50	7	19	38

时的诱导率最高为 52%。2 d 以后的诱导率又逐渐下降,叶片开始变黄,生命力下降,预培养 3、4 d 的龙葵幼叶诱导率分别为 42%和 38%。结果表明,预培养时间过长或过短都不利于毛状根的诱导。

2.5 菌液浓度对龙葵毛状根诱导率的影响

表 5 表明,不同菌液浓度对毛状根诱导率影响较大, $OD_{600}=0.6$ 时诱导率为 58%,诱导率最高; OD_{600} 为 0.3、0.9、1.2 时诱导率分别为 10%、10%、4%。低浓度的菌液侵染不易成功,诱导率较低, OD_{600} 高于 0.6 以后,随着菌液浓度的增大诱导率急剧下降,说明过高或过低的菌液浓度都不利于毛状根的诱导。

表 5 不同菌液浓度对毛状根诱导率的影响

Table 5 Effect of different concentrations of bacterium on the induction rate of hairy roots

菌液浓度 OD_{600} 值 Concentration of bacterium	接种数 Total No. plants/个	最早生根天数 The earliest rootd time/d	生根数 Rooting number/个	诱导率 Induction rate/%
0.3	50	7	5	10
0.6	50	7	29	58
0.9	50	6	5	10
1.2	50	6	2	4

2.6 共培养时间对龙葵毛状根诱导率的影响

由表 6 可知,不同的共培养时间对龙葵毛状根诱导率有影响。共培养 0~2 d 时间内随共培养天数增加毛状根诱导率逐步增大,共培养 2 d 时毛状根诱导率最高,为 46%;随着共培养时间的延长诱导率逐步下降,共培养 3、4 d 的诱导率分别是 24%和 18%,各试验组最早生根天数差别不大。试验中发现共培养时间长时,一部分外植体会逐步变黄死亡。

表 6 不同共培养时间对毛状根诱导率的影响

Table 6 Effect of different co-cultivation time on the induction rate of hairy roots

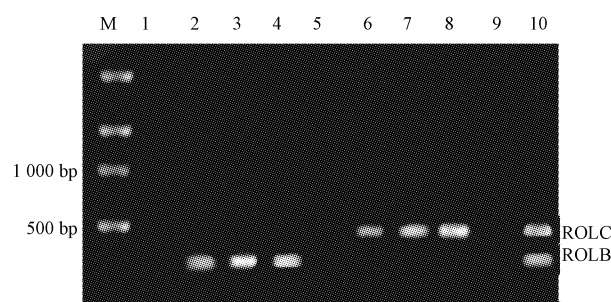
共培养时间 Co-cultivation time/d	接种数 Total No. plants/个	最早生根天数 The earliest rootd time/d	生根数 Rooting number/个	诱导率 Induction rate/%
0	50	6	18	36
1	50	6	19	38
2	50	7	23	46
3	50	6	12	24
4	50	7	9	18

2.7 龙葵毛状根 PCR 的检测结果

通过对龙葵毛状根进行 PCR 检测,从转化获得的龙葵毛状根中检测出了预期的与农杆菌 DNA 中相同的 *rolB*、*rolC* 基因条带,而未转化的龙葵实生根则没有扩增出条带,说明发根农杆菌的 RI 质粒 DNA 已经整合到了龙葵的毛状根基因中(图 3)。

3 讨论与结论

该试验以黑龙江的龙葵为试验材料,利用 3 种不同的发根农杆菌(A4、C58C1、A1476)对龙葵的不同外植体



注:2,3,4,6,7 和 8 为转化植株;1,5,9 为阴性对照;10 为阳性对照;M:DNA 分子量标准。

Note:2,3,4,6,7 and 8 are transgenic plants;1,5,9 are negative control;10 is positive control;M:Marker(DL 2 000).

图 3 龙葵毛状根 PCR 结果

Fig. 3 PCR identification of transgenic hairy roots of *Solanum nigrum* L.

进行侵染得到毛状根。发根农杆菌能够诱导龙葵外植体产生毛状根,而非诱导的外植体不产生根,表明龙葵对发根农杆菌敏感。

选择合适的外植体是建立诱导体系的首要任务。以往研究表明,子叶、茎、叶及果实是使用较多的外植体,不同的植物最适外植体也存在较明显的差异^[16]。该研究选取了龙葵幼苗的幼叶、嫩茎和叶柄 3 种外植体作为转化材料。试验结果表明,用叶片作为感染材料诱导率最高,叶柄的诱导率最低,茎段位于二者之间。试验中观察到,叶片作为外植体得到的毛状根数量多而且根系粗壮发达分支多,而茎段和叶柄得到的毛状根非常纤细并且数量少。可能是因为幼嫩的叶片处于分裂期对农杆菌更敏感所致^[17]。

不同的植物对不同发根农杆菌的敏感程度有所不同^[18]。该试验选取了 C58C1、A1476、A4 3 种发根农杆菌作为侵染菌种,试验表明 3 种发根农杆菌均能使龙葵幼叶诱导出毛状根,其中 C58C1、A4 诱导率较高。原因可能是因为龙葵本身为草本双子叶植物,对普通农杆菌都比较敏感,所以普通的发根农杆菌均能侵染龙葵致使其发根^[19]。

试验结果表明,预培养时间对诱导率也有一定的影响,龙葵毛状根诱导预培养时间在 2 d 时诱导率较高。研究观察到侵染时间也是影响诱导率的一个方面,侵染时间过短容易导致侵染不成功,侵染时间过长会使附着在外植体上的农杆菌过多,农杆菌大量增殖导致叶片死亡,该试验在龙葵的研究中较佳的侵染时间是 5 min。菌液浓度对诱导效果表现一定的影响,过高或过低的菌液浓度都不利于毛状根的诱导。附着在外植体的菌液浓度过高会使叶片丧失活性,不易除菌,过低又起不到感染的目的,试验表明 $OD_{600}=0.6$ 时诱导效果较好,高于 0.6 后诱导效率急剧降低。

共培养时间的长短也是影响龙葵毛状根诱导率的一个因素。共培养时间短不易于农杆菌将发根基因诱导到外植体基因中,共培养时间过长又会导致农杆菌大量繁殖,给以后的除菌带来困难,农杆菌除不净就会使外植体失活,直接影响诱导率,较适宜的共培养时间为2 d。

试验还表明,植株叶龄对诱导率也有一定的影响,过嫩或过老的叶片诱导毛状根效果均不佳,过嫩的很容易受农杆菌的侵染导致死亡。此外,在龙葵毛状根离体培养过程观察到,在MS液体培养基中生长要比在固体MS中生长要快。在龙葵的毛状根继代培养中,毛状根生长快,性状稳定,关于龙葵毛状根的扩大培养以及次生代谢物的提取有待进一步的研究。

参考文献

- [1] Engstrom P, Zambryski P, Montagu M V, et al. Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* virulence proteins induced by the plant factor acetosyringone[J]. Journal of Molecular Biology, 1987, 197: 635-645.
- [2] 李秀霞,张海洋. 龙葵的药理作用及临床应用[J]. 佳木斯医学院学报, 1998, 21(1): 102.
- [3] 张海洋,姜祥君,董锡文,等. 中国产龙葵数值分类的研究[J]. 植物研究, 1999, 19(2): 127-131.
- [4] 曹熙敏,范翠丽. 野生龙葵的开发利用研究进展[J]. 广东农业科学, 2011(3): 40-41.
- [5] 李宇彬,王胜惠,高世勇,等. 龙葵碱对 H22 荷瘤小鼠细胞膜流动性和膜蛋白水平的影响[J]. 中草药, 2005, 36(2): 239-241.
- [6] 安磊,唐劲天,刘新民,等. 龙葵抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(15): 1225-1226.
- [7] 刘伟,郝建平. 发根农杆菌的研究进展及其应用[J]. 山西农业科学, 2007, 35(7): 13-16.
- [8] 罗丽,周正渝. 刺五加毛状根诱导条件的研究[J]. 中国农学通报, 2013, 29(10): 178-181.
- [9] 孙晶,徐洁森,赵立子,等. 北柴胡毛状根诱导及其植株再生体系的建立[J]. 药学报, 2013, 48(9): 1491-1497.
- [10] 陈永芳,芦韦华,王芳,等. 新疆紫草毛状根的诱导及培养[J]. 西北植物学报, 2008, 28(12): 2423-2428.
- [11] Argolo A C, Charlwood B V, Pletsch M. The regulation of solasodine production by *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Solanum aviculare*[J]. Planta Med, 2000, 66: 448-451.
- [12] 龚玉莲,施和平,李玲,等. 少花龙葵毛状根的诱导和次生代谢物的产生[J]. 热带亚热带植物学报, 2002, 10(1): 58-62.
- [13] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues[J]. Plant Mol Biol, 1985, 5(2): 69-70.
- [14] 单斌,陈端,骈淮燕,等. 细菌质粒提取方法的研究[J]. 昆明医学院学报, 2001(1): 42-44.
- [15] Slighon J L, Durand T M, Jouanin L, et al. Nucleotide sequence analysis of T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agro-pine type plasmid: Identification of open reading frames[J]. Biol Chem, 1986, 261(1): 108-121.
- [16] 孟凡娟,王秋玉,谢立波,等. 利用发根农杆菌诱导毛状根的研究进展[J]. 北方园艺, 2008(12): 82-82.
- [17] 王泓,廖志华,田桂香,等. 发根农杆菌介导云南萝芙木的遗传转化[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2006, 31(2): 137-141.
- [18] 黄建安,刘仲华. 毛状根培养与植物次生代谢物的生产[J]. 微生物学杂志, 2003(5): 36-38.
- [19] 陶钧,李玲. 发根农杆菌对蓝猪耳的遗传转化及毛状根再生植株的初步研究[J]. 植物生理学通讯, 2004(6): 29.

Study on Inducing Hairy Roots of *Solanum nigrum* L.

WANG Li, LIU Qi, NING Ming-ming, ZHANG Wei-dong, QI Xiao-li, LI Xiu-xia
(College of Life Science, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

Abstract: *Agrobacterium rhizogenes* strains of A4, C58C1, A1476 were selected to discuss effect of explants types, *Agrobacterium rhizogenes* species, infection time, pre-culture time, concentration of bacterium, co-cultivation period on hairy roots inductivity of *Solanum nigrum*. The results showed that with leaf as explants, the inductivity was the highest. *Agrobacterium rhizogenes* strains of A4, C58C1, A1476 could all induce hairy roots, but inductivity of C58C1 was higher. Better infection time was 5 minutes. The inductivity at $OD_{600} = 0.6$ was better performing. The inductivity was higher when the time of pre-culture and co-cultivation was 2 days. It provided experimental basis for the mass production of hairy roots and alkaloid of *Solanum nigrum* production which used hairy root culture techniques.

Keywords: *Solanum nigrum*; *Agrobacterium rhizogenes*; hairy roots inducement; condition optimization