

西洋参发根器官发生及再生植株研究

谢海云, 王 义, 李 维, 刘伟灿, 孙春玉, 蒋世翠, 张美萍

(吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118)

摘 要:以西洋参播种苗切断儿为外植体,由发根农杆菌 R1601 诱导发状根,通过器官发生途径建立高频再生体系,建立西洋参脱分化快速繁殖体系。结果表明:诱导西洋参发根脱分化成愈伤组织的最佳培养基为:MS+2,4-D 2.0 mg/L+KT 0.5 mg/L;诱导不定芽增殖和分化的培养基为 MS+KT 0.2 mg/L+IBA 0.5 mg/L;诱导生根的培养基为 1/2MS+GA₃ 5.0 mg/L+IBA 0.5 mg/L+NAA 2.0 mg/L。

关键词:西洋参;发根农杆菌;R1601 转化;植株再生。

中图分类号:S 567.5⁺3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)10-0164-03

西洋参(*Panax quinquefolium* L.)是五加科(Araliaceae)人参属植物,又称美国人参,20 世纪 70 年代引入我国,属名贵药材^[1-2]。但由于其田间栽培周期长,受气候、栽培条件以及病虫害的影响,致使质量和产量下降,且给常规育种及种质资源保存带来很大困难。自 20 世纪 80 年代末,Ri 质粒及发状根的研究取得了突破性进展。发状根具有生长快速、激素自主性、遗传性状和生化特性稳定、合成次生代谢物质能力强等诸多优点。目前,发根农杆菌已广泛应用于植物基因工程、植物次生代谢产物生产、植物品种改良和植物栽培等领域^[3]。

我国人参和西洋参关于发根的研究,基本停留在发状根离体培养体系的建立及次生代谢产物的生产与调控方面,虽可有效解决有效成分的生产和需求,但利用发根获得再生植株以及基因工程的研究还处于起步阶段。该试验建立了西洋参发根离体培养体系,并首次通过间接器官发生获得了完整的发根再生植株,为西洋参次生代谢产物生产和生物技术育种开辟新途径,也为下一步的西洋参转基因研究提供高效的转化体系和成熟再生方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

该试验以西洋参的播种苗为材料(西洋参种子购于吉林省靖宇县,由吉林农业大学王义教授鉴定);将经过沙藏层积处理后已经开裂的种子播种到栽培盘中,遮荫培养。待 3 周苗长出后,用 1% 升汞消毒 6 min,无菌水

清洗 5 次。将叶片及幼茎切成 0.5~1 cm 的切段,接种于 MS 培养基上预培养。

1.2 发根农杆菌的活化

将低温保存的发根农杆菌 R1601(吉林农业大学植物细胞工程实验室提供)涂布于 YEB+卡那霉素(Kan)100 mg/L 的固体培养基上暗培养过夜。挑取单菌落接种于 50 mL YEB+卡那霉素(Kan)100 mg/L+乙酰丁香酮(AS)20 mg/L 液体培养基中,28℃ 暗条件,120 r/min 振荡培养,测 OD₆₀₀ 值。待活化菌液达到生长对数期,可用于转化。

1.3 转化方法

将预培养 24 h 的叶片及幼茎切段,分别浸入发根农杆菌 R1601 OD₆₀₀=0.6 的菌液中处理 20 min,取出后用滤纸吸干多余菌液放回原培养基中置于暗处共培养 2 d。共培养后的组织块转入含有 MS+头孢霉素(Cef)100~500 mg/L 的培养基中,每隔 5~7 d 转接 1 次,并以没有感染菌液的组织块作为对照。

1.4 西洋参发根的 PCR 检测

提取上述方法诱导产生的人参发状根的 DNA,制备检测样品;同时提取人参实生苗 DNA 和发根农杆菌 Ri 质粒 DNA,作为阴性与阳性对照。根据 Ri 质粒中 T-DNA 序列上 *rolB* 基因的片段设计引物:引物 1:5'-GCTCTTGCACTGCTAGATTT-3';引物 2:5'-GAAGGTGCAAGCTACCTCTC-3'。目的片段预期长度 423 bp,引物由上海生工生物有限公司合成。

1.5 西洋参发状根愈伤组织的诱导

以西洋参发状根为外植体,接种于添加不同浓度 2,4-D、BA、KT 组合的 MS 培养基上。置于不同光照条件下,诱导温度为(24±1)℃,25 d 后统计愈伤组织诱导率(产生愈伤组织的外植体数/外植体总数×100%),分析各类生长调节物质与光照对愈伤组织诱导的影响。

第一作者简介:谢海云(1985-),女,在读硕士,研究方向为细胞工程与作物生产。E-mail:jlauxy@163.com。

责任作者:张美萍(1964-),女,博士,教授,博士生导师,研究方向为药用植物功能基因组学。E-mail:wzhaoyun@tom.com。

收稿日期:2011-03-18

1.6 不同激素配比和光照对不定芽生长与分化的影响

将发根愈伤接种于不同浓度配比的 MS+KT+IBA 培养基中,分析生长调节物质对培养物分化和增殖的影响。将培养物培养在黑暗(0 lx)、弱光(约1 000 lx)、强光(约 2 000 lx)3 个光照条件下,光周期为 10 h/d,温度为 (24±1)℃,观察光对培养物的影响。

1.7 不同激素对比对生根的影响

将生长健壮的 2~3 cm 的无菌苗分割成单株,接种到添加不同激素 NAA、IBA 的不含硝酸铵的 1/2MS+GA₃ 5.0 mg/L 培养基里诱导生根。

2 结果与分析

2.1 西洋参发状根的获得

发根农杆菌 R1601 感染西洋参外植体切段,20 d 后在创口的褐化处和膨大的愈伤组织处出现白色的颗粒组织,30 d 后白色颗粒组织伸长生长为尖端为浅黄白色冠帽,躯干透明并带有细小白色根毛的发状根。1 块外植体材料上可产生 1 条至几条发状根。待发状根长 1 cm 以上时切下转接至 MS 培养基。发状根在不含任何植物激素的 MS 固体培养基上和 MS 液体培养基里可持续生长,表现出具有激素自主性生长能力,并且形成很多分枝侧根,生长发育十分旺盛。而未经菌液感染的对照材料没有发状根产生,在 MS 的固体培养基上慢慢褐化死亡。

2.2 西洋参发根的 PCR 鉴定

经 PCR 检测,由发根农杆菌 R1601 诱导产生的西洋参发状根扩增出了与预期相同大小片段,约为 423 bp;以非转化的播种苗 DNA 为模板所做的阴性对照未见条带。由此推测发根农杆菌通过侵染植物伤口进入细胞后,已将 T-DNA 整合到西洋参培养物基因组中(图 1)。

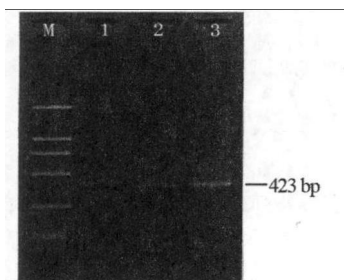


图 1 西洋参发状根 PCR 检测结果

注:M;Marker(DL2000);1. 阴性对照;西洋参实生苗;2. 人参发状根;3. 阳性对照;Ri 质粒。

2.3 不同激素对西洋参发根诱导愈伤组织的影响

西洋参发根愈伤组织的诱导率分析见表 1、2。根据极差的大小顺序得出,影响西洋参发根愈伤组织诱导率的因素为 2,4-D>KT>BA,各因素的最优水平为 A₃B₂C₃,即 2,4-D(2.0 mg/L),BA(1.0 mg/L),KT(0.5 mg/L)。由方差分析可知,对西洋参发根愈伤组织的诱导,2,4-D 的影响最大,达到极显著水平;KT 次之,达到

了显著水平;BA 的影响较小,作用不显著。结果表明,西洋参发根诱导愈伤组织的最佳培养基为:MS+2,4-D 2.0 mg/L+KT 0.5 mg/L。

2.4 光照对西洋参发根诱导愈伤组织的影响

不论在光照或黑暗的条件下西洋参发根都能脱分化为愈伤组织(图 2)。但光照对其生长有明显的抑制作用。与光照条件下培养诱导产生的愈伤组织相比,暗培养条件下的愈伤组织颜色较浅,淡黄或浅棕黄色,25 d 左右几乎全部愈伤化,愈伤组织大量形成,生长迅速。而在强光下,其生长受到抑制,40 d 时诱导率仍很低,且生长缓慢。

表 1 正交实验与极差分析

No.	2, 4-D	BA	KT	愈伤组织诱导率/%
1	1(0.5 mg/L)	1(0.5 mg/L)	1(0.1 mg/L)	72
2	1	2(1.0 mg/L)	2(0.2 mg/L)	76
3	1	3(2.0 mg/L)	3(0.5 mg/L)	78
4	2(1.0 mg/L)	1	2	84
5	2	2	3	88
6	2	3	1	82
7	3(2.0 mg/L)	1	3	88
8	3	2	1	82
9	3	3	2	85
均值 1	75.3333	81.3333	78.6667	
均值 2	84.6667	82.0000	81.6667	
均值 3	85.0000	81.6667	84.6667	
R	9.6667	0.3334	6.0000	

表 2 方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
2,4-D	180.667	2	90.333	271.000	0.004
BA	0.667	2	0.333	1.000	0.500
KT	54.000	2	27.000	81.000	0.012

注:(P<0.01)代表极显著水平;(P<0.05)代表显著水平。

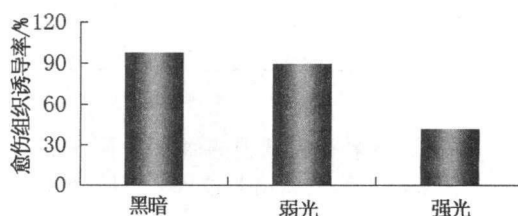


图 2 光照对培养物的影响

2.5 不同激素对比对不定芽的影响

将西洋参发根愈伤组织继代培养在不同浓度的 KT 培养基里,结果见表 3。当 KT 为 0.5 mg/L 时,不定芽的分化率和生长率均较低;KT 为 0.2 mg/L 时,芽的分化率和生长率相对较高;且当 IBA 0.5 mg/L 时,芽的分化率最高,且增值速度较快,长势最好,随着继代次数的增加,可获得大量不定芽丛,用以生根成苗。

表 3 不同激素对比对不定芽的影响

培养基编号	植物生长调节物质/mg·L ⁻¹		芽的分化率	芽的生长率/%
	KT	IBA		
1	0.2	0.2	17	11
2	0.2	0.5	29	17
3	0.5	0.2	12	6
4	0.5	0.5	10	9

2.6 光照对不定芽分化增殖的影响

在黑暗条件下无西洋参发根的不定芽分化,说明西洋参的不定芽分化必须有光的参与。对于不定芽的分化在交替光照时比光照时高,而不定芽增殖在光照条件下比交替光照时要高,表明光照条件有益于发状根愈伤组织不定芽的生长,而光照交替有利于不定芽的分化(图3)。

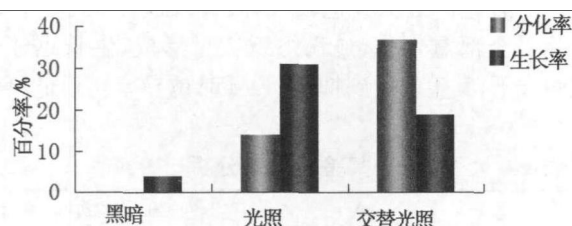


图3 光照对不定芽分化增殖的影响

2.7 不同激素组合对生根的影响

由表4可看出,添加 IBA 0.5 mg/L 和 NAA 2.0 mg/L 时生根效果最好,50 d 在苗基部便可长出大量粗壮肉质根。将形成的完整植株封口膜打开,室温下练苗 2~3 d,将小苗从瓶中取出,洗净根部培养基,在滤纸上吸干水分,再栽入装有消毒基质(珍珠岩:蛭石:砂土=1:1:1)的花盆中,之后定期浇水,用塑料布罩住以保持一定湿度,几天后摘掉,即可移栽。

表4 不同激素组合对生根的影响

基质组成	生根率/%	长势
IBA _{0.5} + NAA _{1.0}	19	生根速度快,根系发达
IBA _{0.5} + NAA _{2.0}	41	生根速度较快,根系较发达
IBA _{1.0} + NAA _{1.0}	38	生根速度较慢,根不发达
IBA _{1.0} + NAA _{2.0}	5	生根速度慢,根较细,不发达

3 讨论

在近 20 a, Ri 质粒及发状根的研究有了突破性的进展。发根农杆菌与植物离体培养技术有机结合,成为当

今的研究热点。到目前为止,对西洋参发根的产生已进行了大量的研究,并取得突破性成就,为西洋参有效次生代谢产物的工业化生产开辟道路。但对西洋参发根基因工程以及再生体系的建立方面的研究甚少。2009 年,王建华^[4]通过体细胞胚胎发生途径由发根获得了人参和西洋参的再生植株。但通过器官发生途径由发根获得再生植株还未见报道。

该试验通过发根农杆菌的感染获得西洋参发根,并以西洋参发根为外植体,综合考虑常量元素、微量元素、碳源、pH 值、光照、温度、生长调节剂或激素基质组成的影响,由间接器官发生途径诱导出不定芽,最终获得再生植株,建立了一种新的西洋参无性快速繁殖体系。为西洋参的转基因研究提供高效的转化体系和成熟的再生方法。

由于发根具有生长繁殖迅速、分根能力强、遗传稳定、可在无激素培养基上生长等优点,可有效解决以组织器官为外植体的生长周期长、存活率低、增殖生长慢、生根困难等问题。此外,发状根及其再生植株即为转化体,转化体多样性原因可能是由于 T-DNA 整合片段的多样性和植物基因型的异质性造成的^[5],需进一步研究。转化体多样性为育种提供了大量的原始材料,将进一步推动 Ri 质粒作为高等植物基因工程载体的广泛应用。

参考文献

- [1] 中国药典委员会. 中国药典 [S]. 1 部. 北京: 中国医药科技出版社, 2005.
- [2] 范代娣, 李宝璋. 西洋参细胞液体培养及动力学研究[J]. 生物工程学报, 1993, 9(4): 361.
- [3] 曹冬梅, 韩振海, 徐雪峰. 发根农杆菌 Ri 质粒研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2003(2): 74-78.
- [4] 王建华. 人参、西洋参发根体细胞胚胎发生及植株再生研究[D]. 长春: 吉林大学, 2009.
- [5] 刘伟华. 植物基因工程中 Ri 质粒的研究与应用[J]. 植物研究, 1995, 15(3): 386.

Study on Organogenesis and Plant Regeneration of Hairy Roots in *Panax quinquefolium* L.

XIE Hai-yun, WANG Yi, LI Wei, LIU Wei-can, SUN Chun-yu, JIANG Shi-cui, ZHANG Mei-ping

(College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract: Took sowed the seeds of *Panax quinquefolium* L. as material, then got the little plants, cut the little plants into segments, deal the segments with *Agrobacterium rhizogenes* R1601, got the hairy roots of *Panax quinquefolium* L. Lastly, obtained the regenerative plants from hairy roots of *Panax quinquefolium* L. by organogenesis, to satablish the efficient transformation system and regeneration methods for transgenic research. The results showed that the best medium from hairy roots to callus was that MS+2,4-D 2.0 mg/L+KT 0.5 mg/L; The best medium from callus to abventitious bud was that MS+KT 0.2 mg/L+IBA 0.5 mg/L; The best medium for inducing roots was that 1/2MS+GA₃ 5.0 mg/L+IBA 0.5 mg/L+NAA 2.0 mg/L.

Key words: *Panax quinquefolium* L.; *Agrobacterium rhizogenes*; R1601 transformation; plant regeneration