

# *AmAS1* 与 *Am4'CGT* 基因双价载体构建及在海棠花中的瞬时表达

刘小微<sup>1</sup>, 李厚华<sup>1</sup>, 王冰洁<sup>2</sup>, 费昭雪<sup>2</sup>, 阙 怡<sup>3</sup>

(1. 西北农林科技大学 风景园林艺术学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100;  
3. 重庆大学 城市科技学院, 重庆 402167)

**摘 要:**以黄色金鱼草(*Antirrhinum majus*)、“雪球”海棠(*Malus* ‘Snow drift’)为试材,采用农杆菌介导法,将构建的金鱼草素合酶基因(aureusidin synthase, *AmAS1*)和查尔酮 4'-O-葡萄糖苷转移酶基因(chalcone 4'-O-glucosyltransferase, *Am4'CGT*)双价表达载体在“雪球”活体花瓣上进行瞬时表达,并通过高效液相色谱分析和基因表达分析对瞬时表达效果进行鉴定。结果表明:成功构建双价表达载体 *CGT-AS-pCambia 1302*,农杆菌侵染“雪球”花苞后,花苞呈现淡黄色,表明目的基因已在花瓣内转录并表达。高效液相色谱分析发现,侵染后的花苞出现新的吸收峰,进一步确定花瓣内有橙酮物质的合成。

**关键词:**海棠;橙酮;双价载体;瞬时表达

**中图分类号:**S 681.903.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)14-0097-06

海棠在中国有悠久的栽培历史,是中国传统名花,因其花色娇艳、婀娜多姿而著称,素有“花贵妃”“国艳”的美称,深受人们的喜爱与重视<sup>[1]</sup>。但正如碧桃、樱花等观赏花木一样,观赏海棠仅有白色系和红色系,缺少其它花色,培育新花色来提高其观赏价值是当今研究的趋势。目前草本植物主要采用杂交育种,通过杂交后多次回交的方法获得优良品种,而木本植物运用传统杂交育种周期过长<sup>[2]</sup>;另外其它花色植物并无与观赏海棠亲缘关系较近的种类,因此传统杂交无法解决观赏海棠色系单一的问题。而通过基因工程将外源色素合成相关基因导入海棠植株内并高效表达,可以从根本上解决海棠花色单一的问题。由于木本植物转基因稳定表达需要的周期长,该试验采用外源基因在花器官中瞬时表达的方法,不仅可以快速检验转基因效果,并能直接观察到花色改变状况,以期为本植物花色育种的快速检验提供理论参考。

黄色花令人感觉温暖,充满能量,广受人们的喜爱。近年来育种工作者为培育出新的黄色花品种,对黄色花的形成机制进行了不断探索,为实现黄色花分子育种提供了有益的借鉴。类胡萝卜素以及类黄酮中的查尔酮和橙酮是黄色花色素的主要组成成分<sup>[3]</sup>,并且近年来对这2类色素的相关酶和基因的研究也比较深入,其生物合成途径已基本明确<sup>[4]</sup>。

金鱼草素合酶基因(aureusidin synthase, *AmAS1*)和查尔酮 4'-O-葡萄糖苷转移酶基因(chalcone 4'-O-glucosyltransferase, *Am4'CGT*)是从金鱼草中克隆得到的与黄色花色素-金鱼草素(橙酮类物质)合成相关的2个关键基因<sup>[5-7]</sup>。有研究表明,在基因水平上对植物类黄酮合成途径进行调控,将 *Am4'CGT* 和 *AmAS* 基因转入蓝色花夏堇并过量表达,同时结合 RNA 干扰技术抑制花青素合成,使夏堇开出明亮的黄色花成为可能<sup>[8]</sup>。通过橙酮生物合成途径培育黄色花的育种技术可应用到海棠花色育种上来。现用农杆菌介导法将这2个基因转入白色花观赏海棠品种“雪球”中,使其诱导“雪球”海棠中橙酮的合成,验证橙酮合成基因在海棠花中表达的可行性,以期为后期的转基因试验及橙酮合成基因在海棠花中的稳定表达奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试黄色金鱼草(*Antirrhinum majus*)鲜切花,购于

**第一作者简介:**刘小微(1988-),女,河北廊坊人,硕士研究生,研究方向为植物分子生物学。E-mail:1030742965@qq.com.

**责任作者:**李厚华(1973-),男,山东济宁人,博士,副教授,硕士生导师,现主要从事植物基因工程和类黄酮次生代谢等研究工作。E-mail:lihoushua73@163.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(K3050215130);中央财政林业推广资助项目([2014]15)。

**收稿日期:**2016-03-14

杨凌阳光花卉公司;“雪球”海棠白色花苞采自西北农林科技大学海棠园。

植物表达载体 pBI121、pCambia 1302、大肠杆菌 *E. coli* Top10、农杆菌 EHA105 均为课题组培养并保存。总 RNA 提取试剂盒,为 OMEGA 公司生产的 E. Z. N. A. Plant RNA Kit 试剂盒。

## 1.2 试验方法

1.2.1 金鱼草 *Am4'CGT* 和 *AmAS1* 基因克隆 选用黄色花金鱼草呈现黄绿色的新鲜花苞,于液氮中研磨,使用试剂盒提取总 RNA,并使用反转录试剂盒进行反转录。参照 GenBank 中金鱼草 (*Antirrhinum majus*) *Am4'CGT* (GenBank accession NO. AB198665) 和 *AmAS1* (GenBank accession NO. AB044884) 基因编码区序列,设计引物(表 1)并进行 PCR 扩增。将扩增产物分别连接 pMD19-T 载体中,送测序公司进行测序,并对其基因序列进行对比。

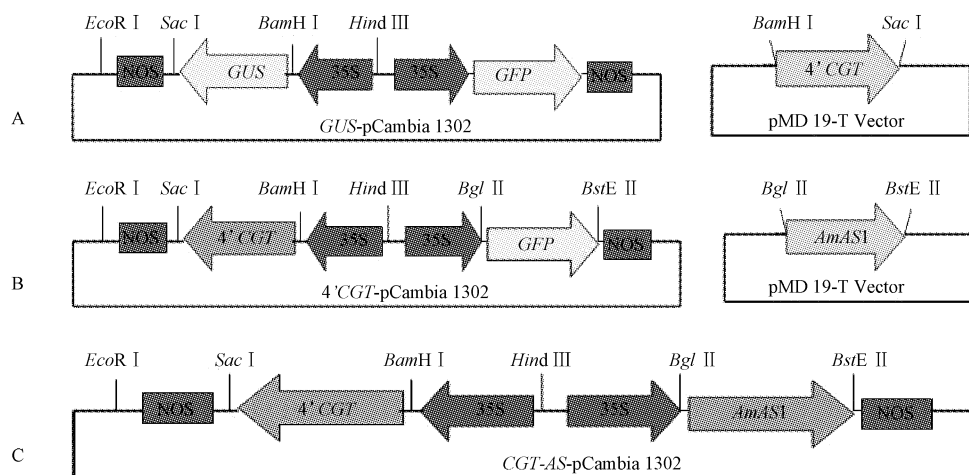
表 1 *AmAS1* 和 *Am4'CGT* 基因  
全长引物序列

Table 1 The sequence of the primers for *AmAS1* and *Am4'CGT* amplification

引物名称 Primer name	引物序列(下划线为引入酶切位点) Sequences of the primers (5'→3')	PCR 产物全长 The length of PCR production/bp
CGTF	CGTGGATCCTATGGGAGAAGAATACAAG (BamHI)	1 392
CGTR	CCGAGCTCTTAACGAGTGACCGAGT (SacI)	
ASF	GGAAGATCTAATGTTCAAAAATCCTAATATCCGC (BglII)	1 714
ASR	CGGTAACCGCATTAGCCATCAAGC (BstEII)	

## 1.2.2 *Am4'CGT* 和 *AmAS1* 双价表达载体构建

首先在 pCambia 1302 的多克隆位点上加入 pBI121 中携带 35S 启动子和 NOS 终止子的 GUS 片段,得到 GUS-pCambia 1302 重组载体,再将 *Am4'CGT* 和 *AmAS1* 基因进行替换,构建 CGT-AS-pCambia 1302 双价表达载体(图 1)。



注:A. GUS-pCambia 1302 重组载体;B. *Am4'CGT*-pCambia 1302 重组载体;C. CGT-AS-pCambia 1302 重组载体。

Note: A. Recombinant vector GUS-pCambia 1302; B. Recombinant vector *Am4'CGT*-pCambia 1302; C. Recombinant vector CGT-AS-pCambia 1302

图 1 CGT-AS-pCambia 1302 双价载体的构建

Fig. 1 Construction of recombinant vector CGT-AS-pCambia 1302

1.2.3 瞬时表达系统检测 基因瞬时表达系统在 KAPILA 等<sup>[9]</sup>的农杆菌介导法瞬时表达的基础进行优化。将 GUS-pCambia 1302 重组质粒通过电击法转入农杆菌 EHA105 中,用于检测基因瞬时表达系统。将含重组质粒的菌液过夜培养,吸取 100  $\mu$ L 菌液于 20 mL 不含抗生素的 Yep 液体培养基中活化 2~4 h,温度 28  $^{\circ}$ C,转速为 200  $r \cdot min^{-1}$ ,至 OD<sub>600</sub> 值介于 0.6~0.8。选择完全变成白色的“雪球”花苞(小花苞带有粉色),先用吸满活化菌液的注射器针头在花瓣表皮轻轻扎 3~5 个点,将菌液慢慢涂于花瓣表面,然后再用经菌液浸湿的滤纸覆在其表面,用一次性手套封住,2 d 后回收花瓣。GUS 染液检测:将回收的花瓣在 GUS 染液中浸泡过夜,25~37  $^{\circ}$ C 保温,观察花瓣是否变蓝。

1.2.4 目的基因的瞬时表达 通过电击法将 CGT-AS-pCambia 1302 转入农杆菌 EHA105 中用于基因的表达,AS-pCambia 1302、GUS-pCambia 1302 重组质粒作为对照。该试验于“雪球”海棠初花期进行,选择完全变白的大花苞。挑选 3 株花苞长势良好的“雪球”海棠,每株海棠随机选择 9 簇“雪球”花苞,分为 3 组,分别用含 CGT-AS-pCambia 1302、GUS-pCambia 1302、AS-pCambia 1302 的菌液进行侵染。侵染方法同 1.2.3,重复 3 次。瞬时表达 2 d 后收回花瓣,将表达样品放入冰箱保存,用于后期检测。CGT-AS-pCambia 1302-EHA105 和 AS-pCambia 1302-EHA105 菌液侵染的花瓣可用目测法和 PCR 进行检测,目测浸染后的“雪球”花瓣是否有黄色显现。

### 1.3 项目测定

1.3.1 金鱼草素合成检测 随机选取 3 组经过瞬时表达处理的“雪球”海棠花苞,从每组花苞中随机称取花瓣 0.5 g,加入液氮研磨,加入 1.8 mL 酚提取液(甲醇:水:甲酸=70:28:2,4℃保存),充分混匀,20℃ 1 300 r·min<sup>-1</sup>离心 15 min,吸取上清液 1 mL 经 0.22 μm 滤膜过滤后,用高效液相色谱仪检测提取液在 404 nm 下的吸收峰出现时间,并与标样对比,检测是否有金鱼草素合成。所用金鱼草标样由课题组提取制备,检测方法借鉴 ZHANG 等<sup>[10]</sup>并稍作修改。

1.3.2 基因表达检测 分别取瞬时表达试验的不同处理,用 1.2.1 中方法提取 RNA 并反转录。利用 *Am4'CGT* 和 *AmAS1* 基因片段的特异性引物(表 2)进行 PCR 检测,检测目的基因在花瓣中的表达情况。

表 2 基因表达检测的特异性引物序列

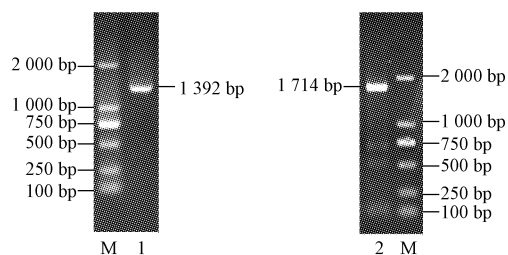
Table 2 The specific primer sequences for gene expression detection

引物名称	引物序列	PCR 产物全长
Primer name	Sequences of the primers(5'→3')	The length of PCR product/bp
ASP1F	CCGACAATACCACTACTCTGAAG	462
ASP1R	GCCACGGAATCTCCACATCT	
CGTPF	ACACCAAACCTGTCGTGGAGAC	329
CGTPR	CAAGCCATGATAGGCATTCG	

## 2 结果与分析

### 2.1 金鱼草 *Am4'CGT* 和 *AmAS1* 基因克隆

由图 2 可知,经 PCR 扩增分别得到约 1 300 bp 和 1 700 bp 的目的片段,将得到的目的片段分别连入 pMD19-T 载体中进行测序。测序结果表明,2 个基因的序列与 GenBank 中相对应已知序列完全匹配,表明基因克隆成功,且得到克隆载体 AS1-T 和 4'CGT-T。



注:M, DL 2 000 Marker;1. *AmAS1* 基因 PCR 产物;2. *Am4'CGT* 基因 PCR 产物。

Note:M, DL 2 000 Marker;1. The PCR production of *AmAS1*;2. The PCR production of *Am4'CGT*.

图 2 *Am4'CGT* 和 *AmAS1* 基因 PCR 产物

Fig. 2 PCR productions of *Am4'CGT* and *AmAS1*

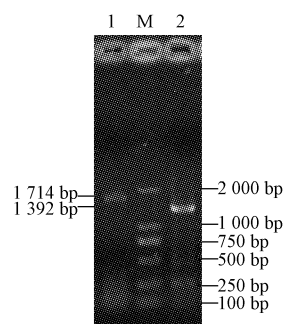
### 2.2 *Am4'CGT* 和 *AmAS1* 双价表达载体构建与鉴定

将 *GUS*-pCambia 1302 和 *CGT*-T 进行双酶切,选择限制性内切酶为 *Bam*HI 和 *Sac*I。割胶回收 *GUS*-pCambia 1302 的 11 500 bp 左右片段和 *CGT*-T 的 1 400 bp

左右片段,将所得基因片段过夜连接并转化大肠杆菌,得到 *CGT*-pCambia 1302 重组载体。

将 *CGT*-pCambia 1302 和 *AS*-T 进行双酶切,选择限制性内切酶为 *Bgl*II 和 *Bst*EII。割胶回收 *CGT*-pCambia 1302 的 12 000 bp 左右长片段和 *AS*-T 的 1 700 bp 左右短片段,将所得到的基因片段过夜连接,转入 Top10 感受态细胞,得到 *CGT*-*AS*-pCambia 1302 双价表达载体。

对转化载体分别用 *AS* 及 *CGT* 的全长引物进行菌液 PCR 鉴定,所得条带与预期条带一致(图 3)。将重组质粒送公司测序,测序结果与预期一致,双价表达载体 *CGT*-*AS*-pCambia 1302 构建成功。



注:M, DL 2 000 Marker;1. 菌液 PCR *AmAS1* 产物;2. 菌液 PCR *Am4'CGT* 产物。

Note:M, DL 2 000 Marker;1. PCR product from bacteria solution of *AmAS1*;2. PCR product from bacteria solution of *Am4'CGT*.

图 3 重组载体 *CGT*-*AS*-pCambia 1302 菌液 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR product from bacteria solution of recombinant vector *CGT*-*AS*-pCambia 1302

### 2.3 瞬时表达系统检测

对 *GUS*-pCambia 1302-EHA105 菌液浸染的花瓣进行 *GUS* 染色试验,在 *GUS* 染液中花瓣有蓝色显现(图 4),表明 *GUS* 基因已成功转入花瓣细胞并表达。

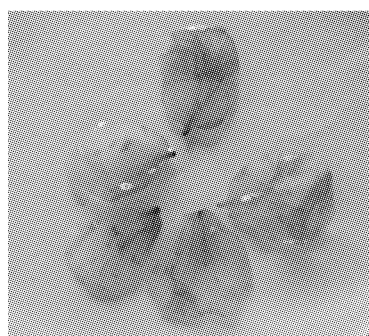


图 4 *GUS*-pCambia 1302-EHA105 菌液侵染花瓣 *GUS* 染色结果

Fig. 4 *GUS* staining result in petals transferred the *GUS* gene

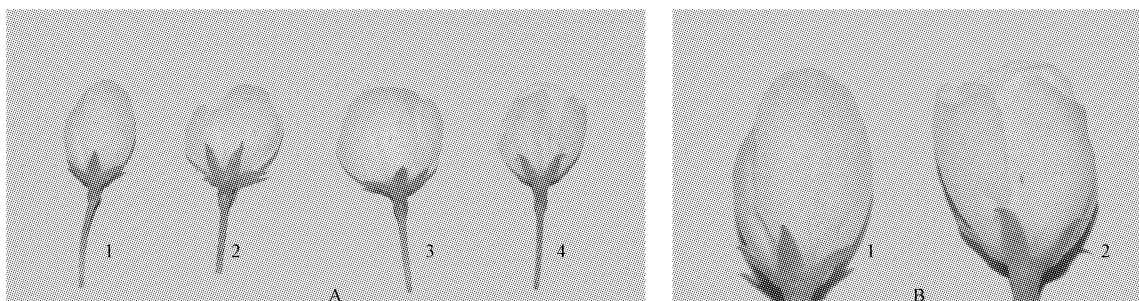
### 2.4 *Am4'CGT* 和 *AmAS1* 的瞬时表达结果

用 *GUS*-pCambia 1302-EHA1053、*AS*-pCambia 1302-



EHA105、CGT-AS-pCambia 1302-EHA105 侵染“雪球”花苞,进行瞬时表达,2 d 后回收侵染花苞。通过目测观察,自然生长的花苞、经过 *GUS*-pCambia 1302-EHA105

和 AS-pCambia 1302-EHA105 侵染的“雪球”花苞,花瓣未出现颜色变化,而由 CGT-AS-pCambia 1302-EHA105 菌液浸染的花瓣有浅黄色显现(图 5)。



注:A-1. 正常生长花苞;A-2. *GUS*-pCambia 1302-EHA105 侵染花苞;A-3. AS-pCambia 1302-EHA105 侵染花苞;A-4. CGT-AS-pCambia 1302-EHA105 侵染花苞。B. 低温处理 3 d 后,B-1. 正常生长花苞,B-2. CGT-AS-pCambia 1302-EHA105 侵染花苞。

Note:A-1. The normal flower;A-2. The sample infected by *GUS*-pCambia 1302-EHA105;A-3. The sample infected by AS-pCambia 1302-EHA105;A-4. The sample infected by CGT-AS-pCambia 1302-EHA105. B-1. The normal flower after 3 days cryogenic treatment;B-2. The sample infected by CGT-AS-pCambia 1302-EHA105 after 3 days cryogenic treatment.

图 5 瞬时表达结果

Fig. 5 Result of the transient expression

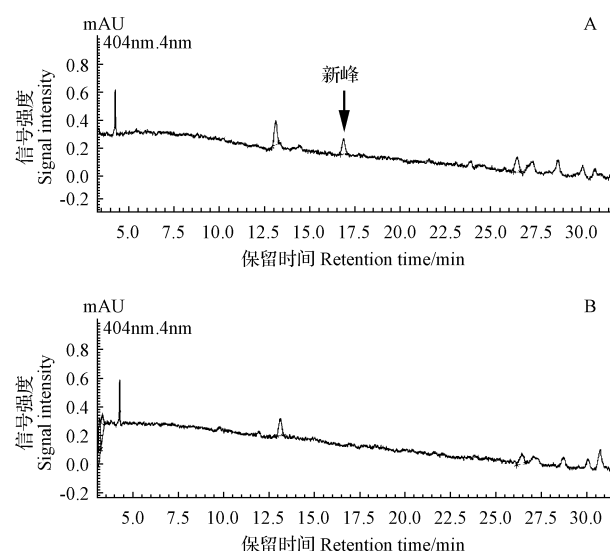
## 2.5 色素分析

取瞬时表达不同处理的花瓣以及自然生长未处理的“雪球”花瓣提取液,经 HPLC 检测的结果表明,在 404 nm 下,双价载体侵染显淡黄色的花瓣的提取液在 17 min 左右有明显的吸收峰,与标样出峰时间基本一致,而在其它对照处理的花瓣和未经瞬时表达处理的花瓣提取液中,均不存在这个吸收峰(图 6)。推测该吸收峰所代表的物质为橙酮类物质,说明 *Am4'*CGT 和

*AmAS1* 2 个基因已经成功在海棠花中瞬时表达,并可能诱导了橙酮类物质的合成。

## 2.6 基因表达分析

取瞬时表达处理后的花瓣,提取总 mRNA 并反转录。利用 *AmAS1* 和 *Am4'*CGT 基因片段的特异引物分别对各处理的 cDNA 进行 PCR 扩增检测。由图 7 可知,*GUS*-pCambia 1302-EHA105(模板 Y1)无目标条带,CGT-AS-pCambia 1302-EHA105(模板 Y2)菌液浸染

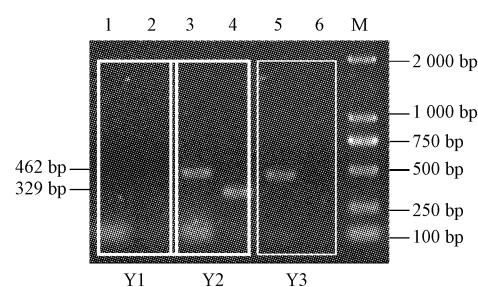


注:A. 瞬时表达显淡黄色花苞提取液;B. 正常生长花苞提取液。

Note:A. The extracting solution of the test sample which showed faint yellow;B. The extracting solution of the normal flowers.

图 6 瞬时表达 HPLC 色素分析

Fig. 6 HPLC result of the transient expression



注:M. DL 2 000 Marker;1. 模板 Y1 用 ASP1F/ASP1R 引物扩增的 PCR 产物;2. 模板 Y1 用 CGTPF/CGTPR 引物扩增的 PCR 产物;3. 模板 Y2 用 ASP1F/ASP1R 引物扩增的 PCR 产物;4. 模板 Y2 用 CGTPF/CGTPR 引物扩增的 PCR 产物;5. 模板 Y3 用 ASP1F/ASP1R 引物扩增的 PCR 产物;6. 模板 Y3 用 CGTPF/CGTPR 引物扩增的 PCR 产物。

Note:M. DL 2 000 Marker;1. PCR product of template Y1 using ASP1F/ASP1R primers;2. PCR product of template Y1 using CGTPF/CGTPR primers;3. PCR product of template Y2 using ASP1F/ASP1R primers;4. PCR product of template Y2 using CGTPF/CGTPR primers;5. PCR product of template Y3 using ASP1F/ASP1R primers;6. PCR product of template Y3 using CGTPF/CGTPR primers.

图 7 瞬时表达 PCR 结果

Fig. 7 PCR results of transient expression products

的花瓣中有 *AmAS1* 和 *Am4'CGT* 2 个基因的条带, AS-pCambia 1302-EHA105(模板 Y3) 菌液浸染的花瓣中有 *AmAS1* 基因的片段条带, 说明 2 个基因已经在花瓣中成功瞬时表达。

### 3 讨论

农杆菌渗入法介导的基因瞬时表达技术与农杆菌浸染叶盘法的稳定遗传转化相比具有操作简便、周期短等优点<sup>[11-12]</sup>。对于木本植物, 其生长周期长, 很难在短时间内做到稳定表达并看到花色表现, 而瞬时表达则是一个简单高效的检测方法。试验中用 *GUS*-pCambia 1302-EHA105 菌液侵染活体花瓣对瞬时表达系统进行检测, *GUS* 染色结果表明所有花瓣均转化成功, 说明该系统适用于基因在“雪球”海棠花中的瞬时表达分析。

据 ONO 等<sup>[8]</sup>的研究, 植物体内橙酮合成需要 2 个基因同时发挥作用, 且 *Am4'CGT* 和 *AmAS1* 基因在植物细胞中的表达具有时空差异性。该试验对不同处理样品中目的基因表达检测结果表明, 单个 *AmAS1* 基因转化或者将 *Am4'CGT* 和 *AmAS1* 基因同时转化的处理都已经将目的基因转入花瓣中并表达。HPLC 检测表明, 当没有 *AmAS1* 和 *Am4'CGT* 基因表达, 或只有 *AmAS1* 基因表达时, 均未检测到橙酮类物质; 只有在 *4'CGT* 和 *AmAS1* 基因同时表达时才诱导了橙酮类物质的合成。不同处理花瓣颜色变化表明, 橙酮积累导致花瓣颜色变黄。而花瓣颜色变化不明显的原因可能是目的基因在短时间内表达量过低, 色素积累量较少, 所以肉眼观察到的黄色较浅。

另外, 该试验在活体花苞上进行, 由于春季温度、农杆菌以及机械损伤的多重作用的影响, 不允许试验处理时间太长, 否则花瓣会腐烂。所以在瞬时表达 2 d 后将试验花苞取回, 放在 -80 °C 冰箱低温保存。然而在低温保存的过程中, 发现低温保存 3 d 后用 *CGT*-pCambia 1302-EHA105 菌液浸染的花瓣和未处理花瓣对比, 处理花瓣黄色加深, 这可能是由于在较低的温度下, 依旧存在基因表达和色素积累, 而且低温下更容易诱导植物内花色素苷的合成<sup>[14]</sup>。

北方春季常见观花小乔木中缺乏黄色花品种, 如樱

花、碧桃、梅花等。该试验在“雪球”海棠花中成功瞬时表达出橙酮类物质, 为下一步橙酮合成基因在海棠体内的稳定表达及获得黄色海棠奠定了基础, 同时也可为其木本花卉的黄色花新品种培育提供借鉴。

### 参考文献

- [1] 李厚华, 赵冰, 李鹏民. 中国海棠[M]. 北京: 中国林业出版社, 2014: 1-13.
- [2] 高立旦, 童再康, 曹件生, 等. 彩叶木本植物育种研究进展[J]. 浙江林业科技, 2006, 26(4): 77-82.
- [3] TANAKA Y, SASAKI N, OHMIYA A. Biosynthesis of plant pigments; anthocyanins, betalains and carotenoids[J]. The Plant Journal, 2008, 54: 733-749.
- [4] 周琳, 王雁, 彭镇华. 黄色花形成机制及基因工程研究进展[J]. 林业科学, 2009, 45(2): 111-119.
- [5] TANAKA Y, ONO E, NAKAMURA N, et al. Method for producing yellow flower by controlling flavonoid synthetic pathway: US 7750209 B2 [P]. U. S. Patent, International Flower Developments Proprietary Limited.
- [6] NAKAYAMA E. Enzymology of aurone biosynthesis[J]. Journal of Bio-science and Bioengineering, 2002, 94(6): 487-491.
- [7] NAKAYAMA T, SATO T, FUKUI Y, et al. Specificity analysis and mechanism of aurone synthesis catalyzed by aureusidin synthase, a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration[J]. FEBS Letters, 2001, 499(1-2): 107-111.
- [8] ONO E, FUKUCHI-MIZUTANI M, NAKAMURA N, et al. Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(29): 11075-11080.
- [9] KAPILA J, RYCKE R D, MONTAGU M V, et al. An agrobacterium mediated transient gene expression system intact leaves[J]. Plant Science, 1997, 122: 101-108.
- [10] ZHANG Y Z, LI P M, CHENG L L. Developmental changes of carbohydrates, organic acids, amino acids, and phenolic compounds in 'Honeycrisp' apple flesh[J]. Food Chemistry, 2010, 123: 1013-1018.
- [11] 宋建, 刘仲齐. 农杆菌介导的基因瞬时表达技术及其应用[J]. 天津农业科学, 2008, 14(1): 20-22.
- [12] 邱初, 陶刚, 李奇科, 等. 农杆菌渗入法介导的基因瞬时表达技术及应用[J]. 分子植物育种, 2009, 7(5): 1032-1039.
- [13] NAKAYAMA T, YONEKURA-SAKAKIBARA K, SATO T, et al. Aureusidin synthase: A polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration[J]. Science, 2000, 290(5494): 1163-1166.
- [14] OREN S M, LEVI N A. Temperature effect on leaf pigmentation of *Cotinus coggygri* 'Royal Purple'[J]. Journal of Horticulture Science, 1997, 72: 425-432.

## Construction of Recombinant Vector of *AmAS1* and *Am4'CGT* Genes and the Transient Expression in *Malus* Flowers

LIU Xiaowei<sup>1</sup>, LI Houhua<sup>1</sup>, WANG Bingjie<sup>2</sup>, FEI Zhaoxue<sup>2</sup>, QUE Yi<sup>3</sup>

(1. College of Landscape Architecture and Arts, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100; 2. College of Forestry, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100; 3. City College of Science and Technology, Chongqing University, Chongqing 402167)

DOI:10.11937/bfyy.201614025

# 不同处理对三种药用植物外植体生长发育的影响

李景蕨, 叶春宇, 马维波, 王春云

(湖北第二师范学院 化学与生命科学学院, 湖北 武汉 430205)

**摘 要:**以红豆杉、无花果、大叶黄杨的植物茎段为外植体,研究了不同浓度琼脂与不同灭菌时间处理对3种药用植物外植体褐化、污染及发芽情况的影响。结果表明:随着琼脂浓度的升高,褐化率、褐化等级、污染率和发芽率均呈下降趋势;综合各项指标分析,以琼脂浓度  $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  效果较好。随灭菌时间增加,褐化率、褐化等级上升,但污染率、发芽率均急剧下降,综合各项指标分析,以灭菌时间 5~10 min 的处理效果较好。

**关键词:**琼脂浓度;灭菌时间;外植体;褐化;污染率;发芽率

**中图分类号:**R 282.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)14-0102-04

红豆杉(*Taxus chinensis* (Pilger) Rehd.)属红豆杉属植物,又名紫杉,是濒临灭绝的古老孑遗树种。用红豆杉植物中提取的紫杉醇(paclitaxel)制备的抗癌药物Taxol,是治疗肺癌、卵巢癌、乳腺癌的一线临床用药,且对恶性黑色素瘤、头颈部肿瘤、白血病、结肠癌等也有明显疗效<sup>[1-3]</sup>。红豆杉是世界公认的天然珍稀抗癌植物,应用人工繁殖方法是解决红豆杉资源短缺、加快红豆杉药用林建设最有效的途径之一<sup>[4]</sup>。红豆杉组培具有可以人为控制、生长周期短、繁殖率高、方便管理、便于自动化操作等优点<sup>[5-6]</sup>。大叶黄杨(*Euonymus japonicus* Thunb.)属卫矛科,为南方常见栽培植物,既可观赏又可入药,民间常以茎皮及枝叶采收晒干备用。据《中华本草》记载,性味苦、辛、微温;具有祛风温、强筋骨、活血止血之功效。利用组织培养技术,可分批分期进行扩大繁殖,缓解苗木供求紧张状况,以保证苗木的周年供应,可在短期内获得大量的脱毒优质苗<sup>[7]</sup>。通过组织培养建立大叶黄杨无性繁殖体系是获得高产高质最有效的途

径。无花果(*Ficus carica* L.)属桑科榕树属落叶灌木或小乔木,现代药理研究发现,其果实具有健胃清肠、消肿解毒、抗肿瘤、降压、轻泻、催乳、助消化等药用价值。植物组织培养是快速繁殖、加大栽培规模的重要方法,但是外植体出现褐化及污染是导致组培失败的最主要原因,故防止外植体褐化及污染显得尤其重要<sup>[8-9]</sup>。

现以红豆杉、无花果、大叶黄杨的茎段为外植体,在不同琼脂浓度、不同灭菌时间处理下进行外植体褐化、污染及发芽情况的研究,以期对药用植物优质种苗生产提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为湖北第二师范学院校园及苗圃内种植的红豆杉、无花果、大叶黄杨的植物茎段。将选取的外植体剪去叶片、保留叶柄,用自来水冲洗干净后,在超净工作台上将其剪成10 cm长带腋芽的茎段,放入经高温灭菌的瓶中,加入75%的酒精浸摇30 s,倒出酒精,然后用0.1%的升汞溶液消毒8~10 min,用无菌水冲洗5次,待接种。诱导芽分化,以MS为基本培养基,加入激素6-BA  $1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA  $0.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,再向其中加入蔗糖20 g,制成固体培养基,用圆形培养瓶分装,每瓶30 mL,灭菌后备用。

**第一作者简介:**李景蕨(1967-),男,博士,副教授,研究方向为药用植物学与园艺学。E-mail:15527608267@163.com.

**基金项目:**湖北第二师范学院建设资助项目。

**收稿日期:**2016-03-26

**Abstract:** Taking *Antirrhinum majus* and *Malus* 'Snow drift' as materials, using agrobacterium-mediated method, the recombinant vector containing *Am4'* CGT and *AmAS1* was expressed in *Malus* flowers, the instantaneous expression effect was identified by HPLC and PCR analysis. The results showed that the recombinant vector CGT-AS-pCambia 1302 was built successfully, after infected by EHA105, the *Malus* flowers appeared to be light yellow, and it indicated that the target genes were transcribed and expressed in *Malus* flowers. A new absorption peak was found by HPLC analysis, the result indicated that there were aurones accumulated.

**Keywords:** crabapple; aurones; bivalent expression vector; transient expression