

王不留行毛状根的诱导及培养

张海弢, 包京珊, 杨世海*, 付娟, 马玲

(吉林农业大学中药材学院, 长春 130118)

[摘要] 目的: 利用4种发根农杆菌 R15834, R1601, R1000, A4 诱导药用植物王不留行产生毛状根, 建立王不留行的毛状根培养体系。方法: 采用共培养法研究不同外植体、菌株、外源激素、侵染时间、预培养时间和共培养时间对王不留行毛状根诱导率的影响。结果: 用王不留行叶片作为外植体, 外植体预培养 60 h, 共培养 48 h, 发根农杆菌 R1601 侵染 10 min, 培养基中添加 0.1 mg·L⁻¹ 吲哚丁酸(IBA) 转化率最高。结论: 王不留行毛状根诱导成功, 为其遗传转化提供了依据。

[关键词] 王不留行; 发根农杆菌; 毛状根; 诱导率

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0141-04

Induction and Culture of Hairy Roots of *Vaccaria segetalis*

ZHANG Hai-tao, BAO Jing-shan, YANG Shi-hai*, FU Juan, MA Ling

(College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

[Abstract] **Objective:** Hairy root of *Vaccaria segetalis* were induced by the infection of four *Agrobacterium rhizogenes* strains R15834, R1601, R1000, A4 and an *in vitro* culture system of the hairy roots was established. **Method:** Hairy roots were induced by co-culture. Effects of explants, *A. rhizogenes*, exogenous phytohormones, infecting time, pre-culture time and co-culture time on growth of hairy root were studied. **Result:** The highest induction frequency was obtained from blade leaves with 60 h pre-culture and 48 h co-culture which were induced by R1601 for 10 mins. The transformation frequency could be raised by culture media with 0.1

[收稿日期] 20120509(013)

[基金项目] 中国博士后科学基金项目(20090461042)

[第一作者] 张海弢, 硕士, Tel: 13610730639, E-mail: zht716@126.com

[通讯作者] * 杨世海, 博士, 教授, 博士生导师, E-mail: jlyangs@163.com

- [5] 马悦颖, 李沧海, 李兰芳, 等. 关于中药复方研究的几点思考[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 11(12):68.
- [6] 刘良. 中药复方基础研究的思路与方法探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 6(4):1.
- [7] 马春涛, 雷燕. 中药复方效应物质基础的研究进展及展望[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(3):46.
- [8] 李雅杰. 关于中药配伍的探讨[J]. 中医中药, 2012, 4:141.
- [9] 陈廷卓, 刘慧君. 论中药配伍与疗效[J]. 陕西中药, 2011, 32(5):616.
- [10] 陈建萍, 吴伟康, 张敏生, 等. 中药复方配伍规律研究的思路与方法[J]. 中国实验方剂学杂志, 2000, 6(1):1.
- [11] 赵琰, 屈会化, 王庆国. 复方配伍实验研究的问题与展望[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(1):51.
- [12] 叶腾辉. 论《金匮要略》治疗妇人妊娠产后腹痛[J]. 四川中医, 2003, 21(8):8.
- [13] 何俊, 廖茂梁, 郝子博, 等. 配伍对三拗汤煎液中5种成分煎出量及指纹图谱的影响[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(1):86.
- [14] 毛幼儿, 周桂芬. 大黄与芒硝药对不同比例配伍对蒽醌苷含量的影响[J]. 时珍国医国药, 2011, 42(338):60.
- [15] 朱永智, 陈鸿英, 张桂贤, 等. 白芍与柴胡不同比例配伍白芍总苷及苯甲酸水煎出量的比较[J]. 天津中医药, 2011, 28(1):78.

[责任编辑 顾雪竹]

mg · L⁻¹ indole-3-batytric acid (IBA). **Conclusion:** The successful induction of *Vaccaria segetalis* hairy roots provided a basis for genetic transformation.

[**Key words**] *Vaccaria segetalis*; *Agrobacterium rhizogenes*; hairy roots; induction rate

王不留行为石竹科植物麦蓝菜的干燥成熟种子^[1]。种子具有活血通经、下乳消肿、利尿通淋的功能,用于经闭,痛经,乳汁不下,乳痈肿痛,淋证涩痛,是临床催乳通经良药,与其他中药配合还可以治疗急性腰扭伤,关节炎、面部皮肤过敏等^[2]。它不仅是一种多种妇科中成药的配方原料,而且有抗癌作用;另外,王不留行有催乳作用,也可成为母畜饲料的添加剂。综上所述,中药王不留行具有良好的研究开发利用前景,是一种很有研究价值的药用植物^[3]。王不留行常用种子繁殖,但生长很慢,生物量较小。发根农杆菌具有诱导植物生根的生物学特性,而且所产生的毛状根能合成该植物特征的次生代谢物,因此发根培养技术成为生产次生代谢物的一条可靠和有效途径^[4-5]。

利用发根农杆菌进行次生代谢物质生产,具有许多适应工业化生产的特点,如无需添加外源生长素、迅速自主生长、遗传稳定性高、能合成植物特有的次生代谢物,而且其含量往往比植物自身合成的含量还高^[6]。据不完全统计,已有 31 科 100 余种植物建立了毛状根培养系统,其中不少是药用植物^[7]。黄芪^[8]、曼陀罗^[9]、三角叶黄连^[10]、人参^[11]、莨菪^[12]、长春花^[13]、短叶红豆杉^[14]等毛状根的小规模培养已经成功。人参皂苷、黄连素等已通过毛状根培养法得以工业化生产。目前,国内外学者对王不留行的研究主要集中于化学成分及药理活性的研究,而对王不留行毛状根的研究尚未见报道。本实验利用发根农杆菌侵染王不留行诱导得到毛状根,并考察不同因子对王不留行毛状根的诱导和生长的影响,为进一步筛选适宜的王不留行毛状根培养系统并调控次生代谢产物的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 王不留行无菌苗的培养 供试王不留行 *Vaccaria segetalis* (Neck.) Garcke 种子采自吉林农业大学药植物园,经吉林农业大学中药材学院杨世海教授鉴定。发根农杆菌菌株 *Agrobacterium rhizogenes* R1601, R15834, R1000, A4, 由中国农业微生物研究所菌种保藏中心提供。挑选当年成熟干燥的王不留行种子,温水浸泡 40 min 后,在生物洁净工作台内用无菌水清洗 3 次;75% 乙醇浸泡 30 s,无菌水清洗 3 遍,每次清洗 30 s;然后再用 0.1% HgCl₂ 浸泡 8

min, 无菌水再次清洗 5~6 次,每次清洗 2~3 min。最后用灭菌滤纸将种子表面的水分吸干,用镊子轻轻放置在装有 MS 固体培养基(不添加任何激素)中,置于温度为 24~25 ℃、光强 2 000 lx、光照 12 h · d⁻¹ 黑暗 12 h · d⁻¹ 的条件下交替培养,等待萌发无菌王不留行幼苗,作为遗传转化用的外植体。

1.2 发根农杆菌的活化 在无菌条件下,将保存在 -78 ℃ 下的菌种用接菌针挑出,在已灭菌的发根农杆菌培养基(YEB)固体平皿上划线培养,封口膜封口置于 28~30 ℃ 的恒温培养箱暗培养,1~2 d 即可长出单菌落。无菌条件下,用接菌针挑取一个单克隆菌落接种于装有加有 Kan 的 20 mL YEB 液体培养基中,28 ℃ 恒温摇床,180 r · min⁻¹ 条件下培养 24 h 后,透明的红棕色 YEB 液体培养基颜色变淡,呈现云雾状浑浊,此时证明农杆菌已复苏。菌液还要进行再次活化,将已复苏的菌液取出 1 mL 加入装有 50 mL YEB 液体培养基的锥形瓶中,恒温摇床 28 ℃,180 r · min⁻¹ 再次培养 12 h,此时活化的菌液达到了对数生长期,可以对外植体进行侵染。

1.3 王不留行毛状根的诱导 在无菌条件下将王不留行无菌苗的幼嫩叶片剪成 0.5 cm² 大小的片段,茎段剪成长约 0.5 cm 的小段。每个样品在 MS(不添加任何激素)固体平板培养基上接种 10 片(段),并且每个样品均做 5 次平行,黑暗中 24 ℃ 下预培养 60 h。在超净工作台上将预培养后的外植体(叶片、茎段)转移至已灭菌的锥形瓶中,再将活化好的发根农杆菌菌液倒入其中,侵染 10 min。在侵染过程中,轻轻地摇晃锥形瓶,后用无菌滤纸吸干表面菌液,接种到原固体平板培养基上,在 24 ℃ 黑暗条件下共培养 48 h,再转接到含有 500 mg · L⁻¹ Cef 的 MS(不添加任何激素)固体平板培养基上于 24 ℃ 黑暗条件下培养,同时以未被菌液感染的外植体作为对照。每周转接 1 次,待开始发根后,逐步降低抗生素浓度,及时转移和扩增在无激素 MS 培养基上,多次继代直至达到完全除菌后再去掉抗生素继续培养。21 d 后统计诱导出的毛状根数,并且计算平均诱导率。王不留行毛状根诱导率按以下公式计算。

毛状根诱导率 = 长出毛状根的外植体数 / 接种外植体的总块数 × 100%

取完全除菌后的毛状根转移到 MS(不添加任

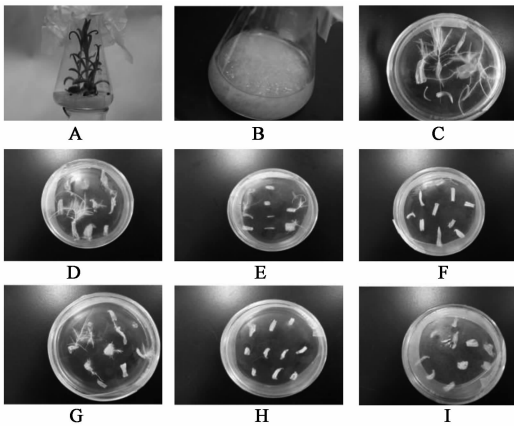
何激素)液体培养基中,建立毛状根离体培养体系。

2 结果与分析

2.1 种子灭菌方法 用 10% 双氧水和 0.1% 升汞灭菌,将种子接种到 MS 基本培养基,10 d 后,实验结果见表 1。表 1,图 1A 显示种子消毒时使用 0.1% 升汞消毒效果好于 10% 双氧水,为了避免升汞对种子的毒害,8 min 最为合适。

表 1 不同处理方法对种子污染率的影响 %

消毒剂	消毒时间/min				
	2	4	6	8	10
10% 双氧水	100	100	82	80	73
0.1% 升汞	85	70	25	0	0



A. 无菌苗;B. 毛状根大量增殖;C. R1601 侵染;
D. A4 侵染;E. R1000 侵染;F. R15834 侵染;
G. 添加 IBA;H. 添加 NAA;I. 添加 2,4-D

图 1 毛状根的诱导和培养

2.2 发根农杆菌菌株和外植体对王不留行毛状根诱导率的影响 利用 R15834, R1601, R1000, A4 4 种发根农杆菌采用共培养法对王不留行的不同外植体(叶片、茎段)进行诱导,以未被任何菌株感染的外植体空白对照组。从图 1 中不同菌种的诱导率情况可以看出,这 4 种菌株对王不留行的茎段诱导率都为 0,可能是这 4 种菌株对其茎段没有诱导能力。R15834 对叶片和茎段的诱导率都为 0,可能是该菌种对王不留行叶片和茎段没有诱导能力。R1601 对叶片的诱导率最高,达到 82%,而菌株 A4(54%),R1000(12%),R15834(0%)。因此,R1601 是诱导王不留行的最佳菌种,最佳外植体是叶片(因此后续试验均采用 R1601 菌种侵染叶片)。

2.3 不同侵染时间对王不留行毛状根诱导率的影响 适宜的侵染时间有助于发根农杆菌对植物细胞的附着和转化。侵染时间的长短与诱导率的高低有着直接联系。如果侵染时间过短,发根农杆菌无法

及时侵染植物细胞;侵染时间过长则菌株对植物细胞造成无法恢复的损害,致使外植体无法存活。采用共培养方法,用发根农杆菌 R1601 分别侵染王不留行一定量的叶片 0,4,6,8,10,12 min,30 d 后计算诱导率。由图 2 可知,不同侵染时间对发根诱导率的影响特别明显。随着侵染时间的增加,诱导率也随之升高,侵染 10 min 后诱导率开始急剧下,并且杂菌大量生长,外植体软腐,部分死亡。因此,侵染时间 10 min 为宜。

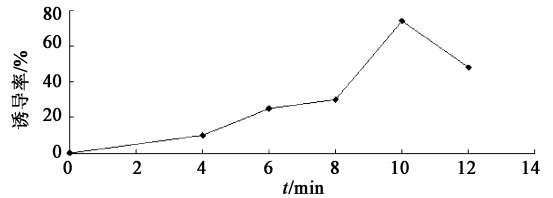


图 2 不同侵染时间对王不留行毛状根诱导率的影响

2.4 外源激素对王不留行毛状根诱导率的影响 在发状根的诱导过程中,添加适当浓度的外源激素对于提高发状根的诱导频率有明显的促进作用。把感染后的外植体分别共培养在 MS, MS + IBA 0.1 mg·L⁻¹, MS + 2,4-D 0.1 mg·L⁻¹, MS + NAA 0.1 mg·L⁻¹ 的培养基上。其结果见表 2,图 1,在 MS + IBA 0.1 mg·L⁻¹ 的培养基上,毛状根的诱导率达到 74%,效果很明显。而 2,4-D 和 NAA 两种激素的添加对毛状根的诱导没有促进作用,反而使外植体愈伤化比较严重。这说明在适当的植物激素作用下,王不留行组织块可以启动细胞分裂,而处于 DNA 合成和细胞分裂高峰期的外植体较易进行外源 DNA 的导入与整合,从而促进根的诱导。

表 2 不同外源激素对王不留行毛状根诱导率的影响

培养基	感染外植体数/个	生根外植体数/个	诱导率/%
MS	50	23	46
MS + IBA	50	37	74
MS + NAA	50	0	0
MS + 2,4-D	50	0	0

2.5 外植体预培养和共培养时间对王不留行毛状根诱导率的影响

2.5.1 预培养时间 外植体产生伤口后,在愈合过程中会形成并释放出乙酰丁香酮等酚类物质,以此作为诱导发根农杆菌识别的信号分子。发根农杆菌侵染前需经过一定时间预培养,使受体能形成并释放这种信号分子,从而提高转化率。另外,经农杆菌感染的外植体伤口处细胞可能因为过敏反应而褐化,甚至死亡,会严重影响转化效率及毛状根的形成。

成,预培养也能较好地解决褐化问题。本实验对王不留行叶片分别进行 0, 24, 48, 72, 96 h 的预培养,然后分别用发根农杆菌 R1601 进行侵染 20 d 后观察其转化结果。

由图 3 数据可以看出,王不留行叶片经过不同的预培养时间培养后,转化率有所不同。60 h 前,诱导率随着预培养时间的增加而增加,但 60 h 后,诱导率随预培养时间的增加而减小。由此可以得出,60 h 是王不留行叶片的最佳预培养时间。

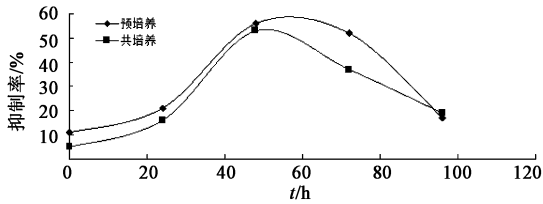


图 3 预培养和共培养时间对王不留行毛状根诱导率的影响

2.5.2 共培养时间 共培养是农杆菌将其携带的外源基因向外植体转化的过程,适当的共培养时间是农杆菌能否将外源基因成功转化的关键。共培养时间的长短与转化效率密切相关,时间太短,农杆菌来不及把基因片段整合到植物 DNA 上。但共培养时间过长,可使发根农杆菌过度生长,而严重毒害外植体使转化难以实现。本实验对王不留行叶片分别进行 0, 24, 48, 72, 96 h 共培养的观察,从图 3 可以看出,共培养 48 h 诱导率最高,而 55 h 后随共培养时间的增加而减少。

3 讨论

关于王不留行的遗传转化目前还没有报道。本研究利用发根农杆菌 R1601 转化王不留行叶片,获得了激素自主、快速生长、多分支、多根毛的毛状根株系,且在 MS 液体培养基中都能很好的生长,为今后进行王不留行有效成分研究和规模化生产提供了方法。预培养能够较好地解决外植体伤口处的细胞因为过敏反应而导致的褐化问题,而且利用含一定植物激素的培养基,会使植物细胞对农杆菌的感染更加敏感;被菌液感染的外植体需放在无抗菌素的培养基上共培养后,再进行除菌,才能保证发根农杆菌 T-DNA 的充分转化与整合。

综合上述各因素的影响,得出了诱导王不留行毛状根的最佳条件:用王不留行叶片作为外植体,外植体预培养 60 h,共培养 48 h,发根农杆菌 R1601 侵染 10 min,培养基中添加 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA。该试

验为以后进行王不留行次生代谢产物的规模化生产提供了依据。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:49.
- [2] 贲爱玲,蔡小宁,任源浩,等. 中药王不留行的组织培养技术初探[J]. 南京晓庄学院学报,2006(6):54.
- [3] 李帆,梁敬钰. 王不留行的研究进展[J]. 海峡药学,2007,19(3):1.
- [4] Georgiev M I, Pavlov A I, Bley T. Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2007,74(6):1175.
- [5] 贺金华,芦韦华,王芳. 高效液相色谱法测定新疆紫草毛状根中乙酰紫草素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(10):38.
- [6] Bais H P, Sudha G, George J, et al. Influence of exogenous hormones on growth and secondary metabolite production in hairy root cultures of *Cichorium intybus* L. Cv. Lucknow local [J]. Cell Dev Biol Plant, 2001, 37:293.
- [7] 陈伟莉,牟旭鹏,刘冬影. 毛状根在植物次生代谢产物生产方面应用的研究进展[J]. 黑河学院学报,2010,4(1):122.
- [8] 郑志仁,彭估松,刘涤,等. 黄芪毛状根的大量培养[J]. 植物生理学通讯,1997,33(2):133.
- [9] 彭春秀,张梅,刘庆丰,等. 曼陀罗毛状根的诱导及其悬浮培养合成天麻素初探[J]. 云南农业大学学报,2008,23(4):492.
- [10] 徐瑞超,马云桐,陈新,等. 三角叶黄连愈伤组织诱导和培养条件的优化[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(1):113.
- [11] 刘峻,丁家宜,徐红,等. Ri 质粒人参转化系统的建立及鉴定[J]. 中国中药杂志,2001,26(2):95.
- [12] 孟超,左旭,王莉,等. 唐古特山莨菪毛状根中东莨菪碱产生的研究[J]. 天然产物研究与开发,2002,14(1):21.
- [13] 孙敏,汪洪,王颖,等. 长春花转化毛状根诱导及培养条件的优化[J]. 西南师范大学学报,2002,27(4):549.
- [14] 黄遵锡,慕跃华,周玉敏,等. 发根农杆菌对短叶红豆杉的转化及毛状根中紫杉醇的产生[J]. 云南植物研究,1997,19(3):292.

[责任编辑 邹晓翠]