

江明珠,王跃华,刘涛,等.多倍体川贝母脱毒苗的诱导[J].江苏农业科学,2015,43(3):41-43.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.013

# 多倍体川贝母脱毒苗的诱导

江明珠<sup>1,2</sup>,王跃华<sup>1</sup>,刘涛<sup>1</sup>,马丹炜<sup>2</sup>,王晓蓉<sup>3</sup>,刘银花<sup>1,2</sup>

[1.成都大学生物产业学院,四川成都610106;2.四川师范大学生命科学院,四川成都610101;

3.成都恩威投资(集团)有限公司,四川成都610200]

**摘要:**以有效组分含量高的多倍体川贝母鳞茎芽为研究对象,开展快速获得脱毒苗的培养研究。结果表明,对多倍体川贝母鳞茎芽诱导不定根选取在35℃高温预脱毒处理后,选取生长状况好的不定根,切取其长度为0.4 mm的生长点区域进行培养,不仅愈伤组织诱导率高(57.89%),而且经检测其脱毒效果也最好(脱毒率为92.87%)。最佳多倍体脱毒鳞茎芽诱导培养基为MS+3.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IAA,培养40 d后出芽率达到77.31%;最佳生根培养基为1/2MS+0.2 mg/L NAA+0.2 mg/L IBA,培养30 d后生根率为89.17%。

**关键词:**川贝母;多倍体;脱毒苗;诱导;愈伤组织

**中图分类号:** Q945.39 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)03-0041-02

川贝母(*Fritillaria cirrhosa* D. Don)是百合科多年生草本植物,具有清热润肺、化痰止咳之功效,是稀有的治疗咳嗽等的良药<sup>[1]</sup>,由于川贝母价格昂贵,加上近年来无计划盲目地采挖,使其自然资源日趋枯竭<sup>[2-3]</sup>,这种状况预计在近几十年内也难以缓解。川贝母植物的繁殖常采用以种子进行的有性生殖和以鳞茎进行的无性繁殖2种方式。无论是哪种方式,对于多年生的川贝母植物都会因各种环境因素而使其染上病毒,而且经过长期繁殖,这些病毒会在细胞体内不断累积,从而严重抑制其生长,此外其性状、产量等也会受到影响,最终造成川贝母药材的品质和产量大大地下降。无论是适应性还是生活力,多倍体植物与二倍体植物相比都有许多优势。例如,多倍体植物因基因数目增多、基因活性及酶的差异性增强,其生态适应性和对逆境的抗耐性较高<sup>[4]</sup>;随着药用植物基因倍性的增加,通常还能导致次生代谢产物含量的变化,从而得到有效含量较高的产物。已有报道表明,药用植物多倍体可大幅度提高药材的产量<sup>[5-7]</sup>,而且笔者所在课题组也在前期研究中发现多倍体川贝母的有效含量比自然野生二倍体川贝母高得多。将川贝母植物的脱毒苗培育技术和多倍体诱导技术进行有机结合,能培育出品质优良、生长速度快、有效组分含量高和抗逆性强的多倍体川贝母脱毒苗,有利于川贝母大规模生产。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

本试验材料来自成都大学组培实验室培育的多倍体川贝母鳞茎。

### 1.2 试验方法

收稿日期:2014-05-06

基金项目:四川省成都市经济和信息化委员会资助科研项目;四川省成都市科技计划(编号:12GGYB413SW-001)。

作者简介:江明珠(1989—),女,湖北武汉人,硕士研究生,研究方向为生物技术培养。E-mail:1031049047@qq.com。

1.2.1 多倍体不定根的获得 将多倍体川贝母组培鳞茎先接种于1/2MS+0.2 mg/L IBA的培养基中,在培养温度为21℃、光照时间6 h/d且光照度为1 000 lx的条件下继续培养,获得形状粗大的不定根。

1.2.2 多倍体脱毒愈伤组织的诱导培养 将多倍体不定根从根基部切下后接入MS+0.3 mg/L 6-BA+150 mL/L甘油的培养基中,设置不同温度条件(35、36、37、38、39、40℃,分别记为A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>、A<sub>4</sub>、A<sub>5</sub>、A<sub>6</sub>处理)且在无光照条件下进行20 d预培养处理,观察不定根的生长状况,20 d后统计经上述不同方法处理的不定根成活率。选取最佳温度处理的不定根,在超净工作台上切取根尖生长点处0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mm区域的细胞(分别记为B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>、B<sub>4</sub>、B<sub>5</sub>处理),将其接入pH值为5.8的愈伤组织诱导培养基中,在温度18℃、光照时间6 h/d、光照度800 lx的条件下培养30 d,获得多倍体愈伤组织,观察统计愈伤组织诱导率和生长情况。

1.2.3 病毒检测 采用双抗体夹心ELISA方法<sup>[8]</sup>(DAS-ELISA)对培育的川贝母多倍体愈伤组织进行病毒检测。

1.2.4 鳞茎芽的诱导 选取质地较紧密、生长速度快且颜色为黄白色或淡黄色的多倍体愈伤组织,将其接入添加0、1.0、2.0、3.0、4.0 mg/L 6-BA,0、0.2 mg/L IAA不同浓度激素的多倍体鳞茎芽诱导MS培养基(分别记为C<sub>0</sub>、C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>处理)中,同时以不添加任何激素的MS培养基为对照,在培养温度为20℃、光照时间16 h/d、光照度为2 000 lx的条件下培养20 d,获得川贝母多倍体鳞茎芽。

1.2.5 多倍体鳞茎芽的生根培养 在超净台上切取生长2.0 cm的多倍体鳞茎芽作为无根苗,将其转入添加不同浓度NAA(0、0.2 mg/L)、IBA(0、0.1、0.2、0.3 mg/L)激素的1/2MS生根培养基(分别记为D<sub>1</sub>、D<sub>2</sub>、D<sub>3</sub>、D<sub>4</sub>处理)中诱导生根,30 d后观察记录鳞茎芽的生根情况。

1.2.6 炼苗和移栽 选取长出2条以上不定根的川贝母多倍体脱毒苗,打开瓶盖,在室内炼苗3~5 d后从培养瓶中取出,洗去不定根上的培养基,移栽至消毒后的松软土壤中生长。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同处理温度对不定根生长的影响

本研究采用高温作为多倍体川贝母脱毒的前期处理方法,从表 1 可以看出,随着温度的增加,外植体的成活率呈现逐渐降低的趋势。当温度为 35 ℃ 时,成活率最高,为 63.09%;而温度升到 40 ℃ 时,成活率最低,只有 27.12%。符国芳曾报道,对外植体的热处理脱毒通常在 35~54 ℃ 较适宜<sup>[9]</sup>,本研究选取了 35~40 ℃ 作为试验条件,虽然有报道称温度越高对脱毒的效果越好,但从试验结果可以看出,高温对外植体存活率的影响也是较大的。综合整体因素考虑认为,35 ℃ 时为不定根前期脱毒的最佳温度。

表 1 不同处理温度对培养 20 d 的不定根生长的影响

处理编号	处理温度 (℃)	成活率 (%)
A <sub>1</sub>	35	63.09
A <sub>2</sub>	36	58.62
A <sub>3</sub>	37	57.85
A <sub>4</sub>	38	50.23
A <sub>5</sub>	39	36.73
A <sub>6</sub>	40	27.12

### 2.2 不同根尖长度对脱毒效果的影响

外植体的大小同样会影响脱毒的效率<sup>[10]</sup>,通常情况下采用茎尖脱毒所选取的茎尖大小一般为 0.1~0.5 mm,高于这个范围值脱毒效果不好,太低又不利于愈伤组织的形成。从表 2 可以看出,选取不同根尖长度对脱毒的影响有着类似的结果,随着根尖长度的不断增加,脱毒率基本逐渐降低,但是愈伤组织诱导率却与之成反比。例如,0.2 mm 根尖长度的脱毒率最好,达到了 95.16%,但是其愈伤组织诱导率只有 22.16%;1.0 mm 根尖长度的脱毒率仅有 63.13%,而愈伤组织诱导率却是所取根尖长度中最高的,达到了 93.64%。综合整体因素考虑可知,选取根尖长度为 0.4 mm 时为最佳,其脱毒率在 5 个处理中较高,为 92.87%,并且其愈伤组织也较易形成,诱导率达到了 57.89%。

表 2 培养 55 d 时不同根尖长度对脱毒的影响

处理编号	根尖长度 (mm)	接种数 (个)	脱毒率 (%)	愈伤组织诱导率 (%)
B <sub>1</sub>	0.2	35	95.16	22.16
B <sub>2</sub>	0.4	35	92.87	57.89
B <sub>3</sub>	0.6	35	80.34	65.41
B <sub>4</sub>	0.8	35	72.65	87.66
B <sub>5</sub>	1.0	35	63.13	93.64

### 2.3 不同激素对比对鳞茎芽的诱导影响

选取经 DAS-ELISA 检测后已成功脱毒的不定根愈伤组织,接入含有不同浓度激素组合的多倍体鳞茎芽诱导培养基中进行培养,40 d 后的观察统计结果见表 4。研究发现 C<sub>0</sub> 培养基在未添加任何激素的情况下,经 40 d 的培养仍能长出新的鳞茎芽,但是其出芽率比 C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub> 处理低得多,仅有 26.36%,说明外源激素对鳞茎芽起着重要的作用。

C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub> 处理是在 C<sub>0</sub> 基础上设置不同 6-BA、IAA 浓度比的培养基,它们的 IAA 浓度都是一样的,都为 0.2 mg/L,而 6-BA 浓度却逐渐增大。从表 4 可以看出,当培养基为 C<sub>3</sub> 时出芽率最高,为 77.31%。可能是因为随着

6-BA 浓度的增加,细胞分裂加快,从而对愈伤组织的诱导起到了促进作用;但是当浓度达到一定值时,高浓度的 6-BA 反而抑制了愈伤组织的生长,这与苏艳等的研究结果<sup>[11]</sup>是一致的。

表 4 培养 40 d 统计不同激素对比对鳞茎芽诱导的影响

处理编号	生长调节物		出芽率 (%)
	6-BA (mg/L)	IAA (mg/L)	
C <sub>0</sub>	0	0	26.36
C <sub>1</sub>	1.0	0.2	56.36
C <sub>2</sub>	2.0	0.2	75.45
C <sub>3</sub>	3.0	0.2	77.31
C <sub>4</sub>	4.0	0.2	67.76

### 2.4 不同激素对比对鳞茎芽生根的影响

将获得的多倍体川贝母鳞茎芽在添加了不同浓度 NAA、IBA 激素的 1/2MS 培养基中进行培养,结果见表 5。研究发现,不同浓度的 NAA 与 IBA 组合对多倍体川贝母鳞茎芽生根的诱导影响也是不同的,其中 D<sub>1</sub> 处理为未添加任何激素的培养基,由于培养基中只含有无机盐,仅能维持植物细胞的正常生长,对鳞茎芽的生根未起任何作用,因此生根率低,仅为 35.67%;而 D<sub>2</sub>、D<sub>3</sub>、D<sub>4</sub> 处理在 D<sub>1</sub> 处理的基础上添加了外源激素。综合结果可知,NAA 与 IBA 相结合有利于根的生长,且采用 D<sub>3</sub> 培养基时,生根效果最好,生根率达到了 89.17%,可作为诱导鳞茎芽生根的最佳培养基。

表 5 培养 30 d 不同激素对比对鳞茎芽生根的影响

处理编号	生长调节物		接种数 (个)	生根率 (%)
	NAA (mg/L)	IBA (mg/L)		
D <sub>1</sub>	0	0	45	35.67
D <sub>2</sub>	0.2	0.1	45	83.14
D <sub>3</sub>	0.2	0.2	45	89.17
D <sub>4</sub>	0.2	0.3	45	84.13

## 3 结论与讨论

近年来热处理结合茎尖培养是获得无病毒植株的重要途径之一<sup>[12]</sup>,而本研究除用高温处理以外还选用不定根为外植体,这是因为川贝母的鳞片叶比较厚,且将茎尖一层一层包裹在中心,要将茎尖剥离出来非常困难且耗时很长,而不定根直接暴露在外,只须将根冠切除就可以,既简单又高效。此外,由于茎尖是由鳞片叶一层层包裹而成,脱毒时难以完全处理干净。最后,因为本研究采用的是多倍体不定根,此根外形粗大,外围无任何包裹,脱毒效果明显,从结果上也可看出,当热处理温度为 35 ℃、切取不定根长度为 0.4 mm 时脱毒效果最佳。

研究还发现,外源激素的浓度对鳞茎芽的诱导起重要的作用,过高或过低的激素浓度都会影响芽增殖及生长效果<sup>[13]</sup>。由研究结果可知,随着 6-BA 浓度的增加,鳞茎的出芽率出现了先提高后降低的变化,可能是由于低浓度的 6-BA 对鳞茎愈伤组织的分化起促进作用,当浓度达到一定量时,反而抑制了细胞的分裂。

NAA、IBA 是 2 种重要的具有调节植物生根作用的外源激素。IBA 是常用的生根激素,能够诱导不定根的形成<sup>[14]</sup>,且 NAA 对细胞分裂及伸长均有促进作用<sup>[15]</sup>,本研究通过将 2 种激素进行不同组合后发现最佳生根培养基为 1/2MS + 0.2 mg/L NAA + 0.2 mg/L IBA,在此培养基上长出的根生长状况良好,不仅提高了移栽苗的生根率,还为苗移栽之后的存

李晓君,周文吉,周启武,等. *ShSAPI* 的原核表达及多克隆抗体的制备[J]. 江苏农业科学,2015,43(3):43-45.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.014

# *ShSAPI* 的原核表达及多克隆抗体的制备

李晓君<sup>1</sup>,周文吉<sup>1</sup>,周启武<sup>1</sup>,王文荣<sup>2</sup>

(1. 临沧师范高等专科学校农学系,云南临沧 677000; 2. 云南省临沧市甘蔗技术推广站,云南临沧 677000)

**摘要:**将 *ShSAPI* 的阅读框连接到原核表达载体 pET32a(+) 中,构建成 *ShSAPI* 原核表达载体 PET-*ShSAPI*, 然后将其转入宿主菌 BL21, 经 IPTG 诱导后,宿主菌表达出与预期分子量大小相符的 35 ku 的融合蛋白;将纯化后的融合蛋白免疫家兔,获得了 *ShSAPI* 的特异性抗血清;以融合蛋白作抗原,用间接 ELISA 法测定其抗血清效价为 1:25 000。

**关键词:**甘蔗;*ShSAPI*; 锌指蛋白;原核表达;多克隆抗体

**中图分类号:** Q331 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)03-0043-03

逆境相关蛋白(stress associated protein, SAP)是植物中一类含有 A20 与 AN1 锌指结构的蛋白,该蛋白家族与植物的非生物胁迫应答密切相关。SAP 基因的表达能够被 1 种或多种非生物胁迫诱导,转基因研究发现 SAP 家族基因可以增强转基因植物的对 1 种或多种胁迫的抗性<sup>[1]</sup>。目前关于 SAP 的作用机制还不是很清楚,研究发现 SAP 可能通过泛素蛋白酶途径、蛋白相互作用或作为氧化还原感受器参与植物的逆境应答过程<sup>[2-4]</sup>。*ShSAPI* (GenBank 登录号 HM991960.1)是由

甘蔗(*Saccharum officinarum* L.)中克隆到的 SAP 家族基因,研究发现该基因的表达具有逆境应答特性<sup>[5]</sup>,目前正在开展 *ShSAPI* 的转基因功能分析。本研究构建了 *ShSAPI* 的原核表达载体,通过大肠杆菌原核表达系统进行 *ShSAPI* 的蛋白表达与纯化,并通过免疫家兔获得了抗血清,为 *ShSAPI* 蛋白功能研究及的后续的转基因检测打下了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

原核表达载体 pET32a(+) 由中国热带农业科学院热带生物技术研究所刘志昕实验室惠赠,大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$  和 BL21(DE3)感受态细胞感受态购自天根生化科技有限公司。rTaq 酶购自大连宝生物工程有限公司,限制性内切酶, T<sub>4</sub> 连接酶购自 Fermentas 公司,PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒购自 Axygen 公司,蛋白 Marker、蛋白纯

收稿日期:2014-05-06

基金项目:现代农业产业技术体系(甘蔗)建设专项资金(编号:CARs-20-6-14);临沧师范高等专科学校校级课题(编号:LCSZL2013001)。

作者简介:李晓君(1985—),女,云南临沧人,博士,讲师,主要从事植物生物技术与种质创新方面研究。E-mail:lxj-148@163.com。

通信作者:王文荣。E-mail:lchgks@163.com。

活率奠定了基础,也为以后大规模种植提供了依据。

此外,多年来用于研究脱毒的材料均为二倍体,而本研究以多倍体不定根为外植体,将川贝母植物的脱毒苗培育技术与多倍体诱导技术进行有机结合,培育出品质优良、生长速度快、有效组分含量高和抗性强的川贝母多倍体脱毒苗,不仅缩短了川贝母的生长周期,还大大提高了川贝母的生产质量,对于今后研究资源较为匮乏的药用植物具有重要的意义。

## 参考文献:

- [1]王强,兰利琼,傅华龙. 秋水仙素诱导川贝母(*Fritillaria cirrhosa* D. Don)愈伤组织多倍体的研究[J]. 武汉植物学研究,2002,20(6):449-452.
- [2]赵高琼,任波,董小萍,等. 川贝母研究现状[J]. 中药与临床,2012,3(6):59-64.
- [3]阎博华,丁红,丰芬,等. 不同基源川贝母研究进展[J]. 四川中医,2010,28(5):48-50.
- [4]闫秋洁,杨琼. 秋水仙素对蚕豆胚根生长的影响及多倍体诱导效应分析[J]. 广西植物,2012,32(3):385-391.
- [5]段英姿,客绍英,曹静,等. 秋水仙碱诱导南丹参多倍体的研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(6):445-448.
- [6]张海凤,郑辉,陈新华,等. 药用植物多倍体研究进展[J]. 河

北林果研究,2008,23(2):169-172,175.

- [7]周春娥,路淑霞,周延清,等. 药用植物人工诱导多倍体育种的研究进展[J]. 安徽农业科学,2008,36(33):14600-14601,14646.
- [8]崔德才,徐培文. 植物组织培养与工厂化育苗[M]. 北京:化学工业出版社,2003:133-135.
- [9]符国芳,李青. 植物组织培养脱毒方法综述[J]. 福建林业科技,2007,34(3):255-258.
- [10]葛胜娟. 植物组织培养中的快繁与脱毒技术及其应用[J]. 中国农学通报,2005,21(5):104-107.
- [11]苏艳,马双喜,瞿素萍,等. 黄柏(*Phellodendron amurense* Rupr.)枝条组培快繁技术研究[J]. 西南农业学报,2008,21(6):1679-1681.
- [12]刘健. 草莓热处理结合茎尖脱毒繁育体系的建立[D]. 杭州:浙江大学,2008.
- [13]陆文樑,白书农,张宪省. 外源激素对风信子再生花芽发育的控制[J]. 植物学报,2000,42(10):996-1002.
- [14]戴云新,张健,李敏,等. NAA 和 IBA 对非洲菊组培苗生根的影响[J]. 安徽农业科学,2009,37(19):8845-8847.
- [15]Campanoni P, Nick P. Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways[J]. Plant Physiology,2005,137(3):939-948.