

李翠, 韦莹, 李林轩, 等. 大苞水竹叶组培快繁及再生体系的建立[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(19): 143–146.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.19.031

大苞水竹叶组培快繁及再生体系的建立

李翠^{1,2}, 韦莹¹, 李林轩¹, 郭晓云¹, 赵以民^{1,2}, 张占江^{1,2}

(1. 广西壮族自治区药用植物园/广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 广西南宁 530023;

2. 广西壮族自治区药用植物园药用植物保育实验室, 广西南宁 530023)

摘要:拟采用组织培养快繁技术解决大苞水竹叶种苗短缺和种质资源可持续开发利用的问题, 从而为人工种植提供技术支持。对消毒剂、消毒时间进行筛选, 以大苞水竹叶侧芽为外植体, 以 MS、B5、N6 为基本培养基, 采用正交设计研究植物生长调节剂多因素组合[6-BA、KT、NAA、IAA、IBA、活性炭(AC)]对大苞水竹叶进行初代诱导、不定芽分化和诱导生根的影响。结果表明, 体积分数为 0.1% 的氯化汞为最佳灭菌剂, 灭菌时间为 8 min 时诱导率最高, 最佳培养基为 MS 培养基; 不定芽最佳诱导培养基为 MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 0.4 mg/L KT, 外植体经 15 d 诱导培养, 可分化形成 11 个不定芽; MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.6 mg/L IAA 最利于不定芽继代增殖; MS + 2.0 mg/L IBA + 1.0 mg/L IAA 最适于诱导生根获得再生植株, 生根率 93.1%; 生根苗宜移栽于泥炭 + 黄沙(体积比 3:1)的基质上, 成活率 84%。由结果可以看出, 该组培快繁途径繁殖速度快、再生率高, 有望为栽培大苞水竹叶提供大量种苗, 为壮药深入开发利用研究提供依据。

关键词:大苞水竹叶; 壮药; 组培快繁; 再生体系

中图分类号: Q945.51 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)19-0143-03

大苞水竹叶 {*Murdannia bracteata* (C. B. Clarke) O. Kuntze [*Anilema bracteata* (C. B. Clarke) O. Kuntze]} 为鸭跖草科水竹草属植物^[1], 是著名的壮药痰火草的源植物, 为多年生常绿草本。大苞水竹叶根呈圆柱状, 长 20~30 cm, 花期 5—8 月, 果期 6—9 月, 主要生长在海拔 500~850 m 的水沟边及密林下, 分布于广东、海南、广西、云南等地。收载于《中华本草》《全国中草药汇编》《广西药用植物名录》等。大苞水竹叶多分布于长江以南各省(区), 尤以西南地区为盛。其根入药, 具有较高的药用价值, 售价约 100 元/kg, 具有逐水通便、消肿散结的功效, 主治水肿, 此外还有通经之效, 用于治疗慢性肾炎、晚期血吸虫病腹水或其他肝硬变腹水等症^[2]。近年来, 随着市场需求量的不断增加, 野生大苞水竹叶资源濒临枯竭, 生产上难以实现大面积栽培。采用生物技术组织培养技术, 可以有效快速地提高大苞水竹叶种苗的繁殖速度和质量, 满足大苞水竹叶的市场需求, 也可作为壮药痰火草资源可持续开发利用提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料和基本培养条件

本试验所需材料采集自广西壮族自治区药用植物园引种繁育圃内引种栽培的生长健壮、无病虫害的优良大苞水竹叶

植株, 选取其侧芽作为外植体进行诱导, 先将大苞水竹叶侧芽表面洗净去污, 用浓度为 75% 的乙醇灭菌 30~45 s, 然后用无菌水冲洗 1~3 次, 放入灭菌剂灭菌, 再用无菌水冲洗 2~5 次, 然后用无菌滤纸将侧芽表层的水分吸干, 最后将侧芽置于基本培养基上进行诱导培养, 在平均光照度 2 000 lx 下培养, 光照时间 12 h/d, 温度(24±2)℃。

1.2 适宜灭菌条件的筛选

设计 2 组消毒试验。第 1 组设计不同消毒剂种类: 0.1% HgCl₂ 10 min, 2% NaClO 20 min, 50% 的 84 消毒液 20 min, 2% H₂O₂ 20 min, 从中筛选最适合的消毒剂; 第 2 组设计不同的消毒时间: 5、6、7、8、9、10 min。所有的试验都是在接种后 15 d 对试验对象的污染率、成活率进行统计。

1.3 不定芽诱导分化条件的筛选

本试验基于 MS、B5、N6 培养基, 添加 NAA、IAA、6-BA 这 3 种不同类型激素, 并开展 NAA 浓度(0.5、1.0、1.5 mg/L)、KT 浓度(0.1、0.2、0.4 mg/L)、6-BA 浓度(1.0、1.5、2.0 mg/L)的正交设计(表 1), 研究不同激素组合对大苞水竹叶不定芽诱导的影响, 每个处理 10 瓶, 每瓶 4 个外植体, 20 d 后记录外植体的诱导情况, 比较不同组合诱导不定芽能力的差异。

表 1 不定芽诱导分化条件的因素水平设计

水平	因素			
	A: KT 浓度 (mg/L)	B: 6-BA 浓度 (mg/L)	C: NAA 浓度 (mg/L)	D: 误差项
1	0.1	1.0	0.5	1
2	0.2	1.5	1.0	2
3	0.4	2.0	1.5	3

1.4 不定芽繁殖条件的筛选

在 MS 为基本培养基的基础上, 以 6-BA、IAA 为生长调

收稿日期: 2016-04-28

基金项目: 广西中医药民族医药标准化课题(编号: GZBZ14-15); 广西壮药质量标准研究项目(编号: MZY2013052)。

作者简介: 李翠(1982—), 女, 黑龙江依安人, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为药用植物繁育与保存。Tel: (0771) 5602850; E-mail: licuicui941@aliyun.com。

通信作者: 张占江, 博士, 副研究员, 研究方向为药用资源保护与开发利用。Tel: (0771) 5603824; E-mail: zzzj1811@163.com。

节激素,考察大苞水竹叶不定芽繁殖情况。通过 6-BA (0.5、1.0、1.5 mg/L)、IAA(0.2、0.4、0.6 mg/L)2 种激素浓度组合试验,对大苞水竹叶的繁殖培养基进行优化,每个处理 10 瓶,每瓶 4 个单芽,20 d 后测定试管苗生长情况和芽增殖倍数[芽增殖倍数=(20 d 后芽数-接种时芽数)/接种时芽数],以芽增殖倍数为主要考察指标来优化繁殖培养基。

1.5 生根条件的筛选

为了研究大苞水竹叶无菌苗生根壮苗的最适合培养基,以 MS 为基本培养基,对 IBA 浓度(1.0、2.0 mg/L)、活性炭(AC)浓度(0.5、1.0、1.5 mg/L)进行组合试验,对大苞水竹叶的繁殖培养基进行优化,将生长健壮、高 2~3 cm 的无根苗接种于 4 种不同处理的生根培养基上,每个处理 10 瓶,每瓶 8 个单芽,培养 40 d 后统计结果,计算生根率与生根数平均值,相关公式如下:

生根率=(生根数/接种总数)×100%;
生根数平均值=(总生根数/接种总数)×100%。

1.6 炼苗及移栽

当生根培养的大苞水竹叶瓶苗长至 3~5 cm 高、有 3 张以上叶片和 3~5 条根时,即可出瓶移栽。挑选生长旺盛、根系发达的试管苗,为使无菌苗移栽后适应自然环境,出瓶前在实验室散射光下炼苗 2 d,转移至走廊处炼苗 3 d,其间需向瓶内植株洒水以保持瓶内水分充足,将生根试管苗小心地从培养瓶中取出,用水洗净根部残留的培养基,单株栽入基质($V_{\text{木屑}}:V_{\text{草炭土}}=3:1$),置于室内 1 周,2 d 浇水 1 次,保持土质 80% 左右的湿润度,温度 18~25℃,木屑保水性、透气性都很好。30 d 后统计不同基质中组培苗的成活率。

2 结果与分析

2.1 灭菌条件的选择

如表 2 所示,0.1% HgCl₂ 具有较好的消毒效果,外植体消毒成功率达到 60%;NaClO、84 消毒液、H₂O₂ 消毒效果均不够理想,消毒不彻底,污染率高。由表 3 知:使用 0.1% HgCl₂ 消毒 8 min 成功率最高,达到 90%,低于 8 min 时污染率高,

表 2 不同消毒剂对外植体的消毒效果比较

消毒处理	接种数(个)	污染数(个)	死亡数(个)	成活数(个)	污染率(%)	死亡率(%)	成功率(%)
0.1% HgCl ₂ 7 min	20	3	5	12	15	25	60
2% NaClO 20 min	20	12	2	6	60	10	30
84 消毒液 20 min	20	11	5	4	55	25	20
2% H ₂ O ₂ 20 min	20	14	2	4	70	10	20

表 3 用 0.1% HgCl₂ 消毒不同时间对诱导分化的影响

消毒时间(min)	接种数(个)	污染数(个)	死亡数(个)	成活数(个)	污染率(%)	死亡率(%)	成功率(%)
5	20	20	0	0	100	0	0
6	20	16	0	5	80	0	20
7	20	6	2	12	30	10	60
8	20	1	2	18	5	10	90
9	20	1	6	13	5	30	65
10	20	0	12	8	0	60	40

高于 8 min 时,污染率虽然降低,但是死亡率不断升高。因此,综合比较可知,较好的消毒剂为 0.1% HgCl₂,较好的消毒时间为 8~10 min。

2.2 不定芽的诱导条件选择

将顶芽分化获得的不定芽进行快速繁殖培养,外植体接种到 MS、B5、N6 培养基中,在培养温度为 23~26℃、光照度为 1 400~2 000 lx、光照时间为 10~12 h/d 的条件下培养 15 d,侧芽分化后获得不定芽。B5 培养基中侧芽分化成愈伤褐化,N6 培养基中侧芽分化慢,系数低;MS 培养基中含 0.1~0.4 mg/L KT、1.0~2.0 mg/L 6-BA、1.0~2.0 mg/L NAA、20~30 g/L 蔗糖和 3.8~4.8 g/L 琼脂,培养基的 pH 值为 5.8。观察发现,随着培养基中 6-BA、NAA 浓度的增加,大苞水竹叶不定芽数均增加。由表 4 可以看出,最优组合是 A₃B₂C₁,即在培养基中添加 0.4 mg/L KT、1.5 mg/L 6-BA 和 0.5 mg/L NAA 的不定芽繁殖效果最好,平均分化出 11 个不定芽。组培苗诱导的各个阶段效果见图 1。

2.3 不定芽壮苗条件选择

将“2.2”节中得到的试管苗不定芽置于 MS 壮苗培养基

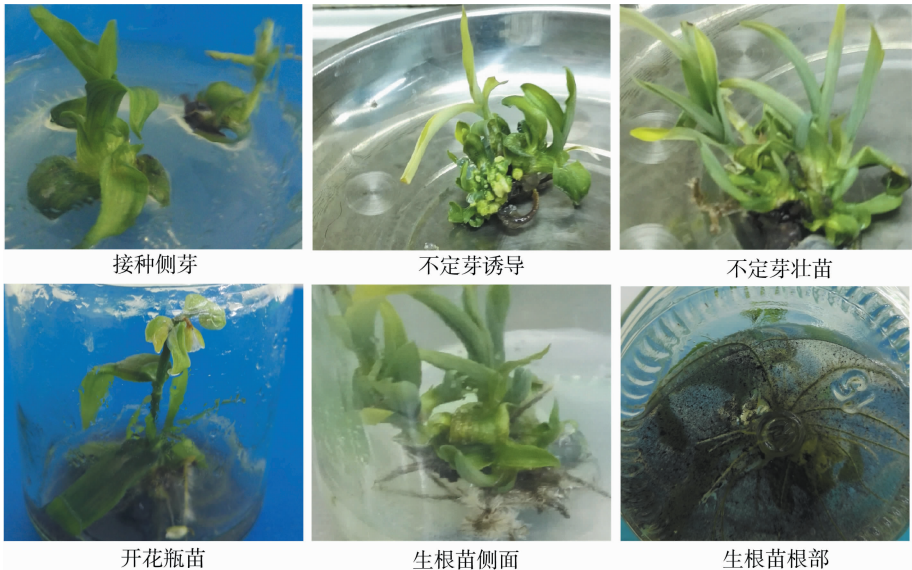


图1 丛生芽诱导的各个阶段效果

表 4 不同激素对大苞水竹叶组织培养快速繁殖效果的影响

试验编号	A;KT 含量	B;6-BA 含量	C;NAA 含量	D;误差项	芽繁殖倍数 (倍)
1	1	1	1	1	3.31
2	1	2	2	2	3.89
3	1	3	3	3	4.24
4	2	1	2	3	4.68
5	2	2	3	1	5.14
6	2	3	1	2	4.75
7	3	1	3	2	4.92
8	3	2	1	3	4.81
9	3	3	2	1	4.56
k_1	3.31	4.68	4.92	13.01	
k_2	3.89	5.14	4.81	13.56	
k_3	4.24	4.75	4.56	13.73	
R	0.31	0.15	0.12	0.24	

中,在培养温度 23 ~ 26 ℃、光照度 1 400 ~ 2 000 lx、光照时间 10 ~ 12 h/d 的条件下培养 40 d,得到健壮植株,其中 MS 壮苗培养基中含 0.5 ~ 1.5 mg/L 6-BA、0.2 ~ 0.6 mg/L IAA、20 ~ 30 g/L 蔗糖和 3.8 ~ 4.8 g/L 琼脂,培养基的 pH 值为 5.8,观察发现,培养基中添加 1.0 mg/L 6-BA 和 0.6 mg/L IAA 时壮苗效果最好,株高达到 5.37 cm(表 5)。

表 5 不同激素水平对大苞水竹叶不定芽壮苗效果的影响

试验编号	6-BA 浓度 (mg/L)	IAA 浓度 (mg/L)	株高 (cm)	长势
1	0.5	0.2	3.47	生长慢,弱黄绿色
2	0.5	0.4	4.51	生长较慢,黄绿色
3	0.5	0.6	4.88	生长较快,绿色
4	1.0	0.2	4.27	生长较快,绿色
5	1.0	0.4	4.92	生长快,翠绿色
6	1.0	0.6	5.37	生长快,翠绿色
7	1.5	0.2	4.68	生长较快,绿色
8	1.5	0.4	4.90	生长较快,绿色
9	1.5	0.6	5.13	生长较快,绿色

2.4 健壮植株生根培养条件选择

将得到的健壮植株置于生根培养基中,在培养温度 23 ~ 26 ℃、光照度 1 400 ~ 2 000 lx、光照时间 10 ~ 12 h/d 的条件下培养 40 d,得到带根的完整植株,其中 MS 生根培养基中含 0.5 ~ 1.5 mg/L IAA、1.0 ~ 2.0 mg/L IBA、25 ~ 30 g/L 蔗糖和 3.8 ~ 4.8 g/L 琼脂,培养基的 pH 值为 5.8。观察发现,随着培养基中 IAA 浓度增加,组培苗的生根率也提高;培养基中添加 2.0 mg/L IBA 和 1.0 mg/L IAA 的生根效果最好,生根率达 93.1%,平均根长达到 4.49 cm(表 6)。

表 6 不同激素水平对大苞水竹叶组培苗生根效果的影响

试验编号	IBA 浓度 (mg/L)	IAA 浓度 (mg/L)	生根率 (%)	平均根长 (cm)
1	1.0	0.5	88.9	3.66
2	1.0	1.0	89.5	4.07
3	1.0	1.5	92.1	4.41
4	2.0	0.5	91.3	3.96
5	2.0	1.0	93.1	4.49
6	2.0	1.5	92.7	4.37

2.5 试管苗移栽条件

经生根培养后的大苞水竹叶,挑选生长旺盛、根系发达的试管苗移入常温室内放置,拧松盖子,2 d 后掀开盖子让大苞水竹叶幼苗与空气完全接触,其间需向瓶内的植株洒水以保持瓶内的水分充足。3 d 后从瓶内取出幼苗,洗净根部的培养基,移栽于消过毒的泥炭、泥炭 + 蛭石(体积比 3 : 1)、泥炭 + 黄沙(体积比 3 : 1)3 种不同基质上,适度遮阴,并保持一定的湿度。30 d 后统计生根率和生长率。由表 7 可以看出,不同基质成活率的高低顺序为泥炭 + 黄沙(体积比 3 : 1) > 泥炭 + 蛭石(体积比 3 : 1) > 泥炭。因此,试管苗移栽最好的基质为泥炭 + 黄沙(体积比 3 : 1),移栽 30 d 成活率为 84%。

表 7 不同基质对移栽成活率的影响

移栽基质	移栽苗数 (株)	成活苗数 (株)	成活率 (%)	生长率 (%)
泥炭	50	29	58	13
泥炭 + 蛭石(体积比 3 : 1)	50	42	84	19
泥炭 + 黄沙(体积比 3 : 1)	50	49	98	22

3 讨论

鸭跖草科植物均为草本,主要分布于热带,少数种产于亚热带、温带地区,中国产 13 属 49 种,多分布于长江以南各省(区),尤以西南地区为盛。目前对鸭跖草科植物的研究开展的较少,仅有关于其生物学特性^[1-2]、分布与分类^[3]、种植栽培、病虫害^[4]、化学成分^[5-7]、药理作用的报道^[8],未见有关组培的报道。本研究采用大苞水竹叶侧芽为外植体,以芽繁芽,未经过愈伤组织阶段,对侧芽分化及植株再生方法进行探讨,建立了大苞水竹叶的离体再生体系,有利于保持大苞水竹叶的遗传稳定性,不但满足了工厂化生产的需求,还具有实际意义。

植物生长调节剂是培养基中的关键物质,能以极微小的量影响植物的细胞分化、分裂和发育,在植物离体培养中起重要调节作用^[9]。当细胞分裂素/生长素的比值合适时,能诱导芽的形成和促进芽的生长。6-BA 是重要的细胞分裂素,能促进细胞分裂、非分化组织分化、侧芽生长等;NAA 是植物生长调节剂,具有促进细胞分裂与扩大、诱导形成不定根等作用;IAA 是植物生长素,能促进细胞分裂与细胞生长,诱导形成不定根^[10-11]。多种激素组合能更有效地促进植物的生长,因此在 MS 培养基中加入 6-BA、IAA 配合使用,对大苞水竹叶生长均具有较大的影响。本研究得出,大苞水竹叶增殖的最适培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.6 mg/L IAA,在此培养基上增值率为 6.5 且芽苗翠绿粗壮。试验中不定芽生根率达 93.1%,移栽成活率为 98%,生产出的种苗,既可满足人们对大苞水竹叶的用途需求,又可保护珍稀濒危种质资源,同时还为丰富我国园林植物种类提供保障。本研究为著名壮药植物大苞水竹叶的保护和可持续开发利用开辟了一条新的途径,同时可为同属其他物种的组织培养研究提供借鉴。

参考文献:

[1]《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编 下册[M]. 北京:人民卫生出版社,1996:645.
[2]国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1998:305.

赵烨清, 石 莉, 欧阳臻, 等. 化学-渗透压法温和破碎处理下大肠杆菌细胞胞内蛋白质的释放率[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(19): 146-149. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.19.032

化学-渗透压法温和破碎处理下大肠杆菌细胞胞内蛋白质的释放率

赵烨清, 石 莉, 欧阳臻, 闻崇炜

(江苏大学药学院, 江苏镇江 212013)

摘要:恰当的细胞破碎工艺是获取胞内蛋白质的必需环节,然而现有细胞破碎技术仍有较多不足。为了研究合适的细胞破碎方法,拟通过化学法与渗透压法的联用,建立化学-渗透压法温和高效破碎大肠杆菌细胞的新工艺。结果表明:(1)单用化学法处理大肠杆菌细胞,最高仅能释放 37.3% 的胞内蛋白质,而化学-渗透压法最高可以释放 84.2% 的胞内蛋白质;对渗透压处理环节进行优化后,胞内蛋白质释放率提高至 93.1% 及以上;(2)以优化的化学-渗透压法释放重组原动蛋白 2 β (PK2 β)工程菌细胞的胞内蛋白质,其中 70.5%~80.2% 重组 PK2 β 呈可溶性,而超声法处理的样品中不含有可溶性重组 PK2 β ,表明化学-渗透压法不仅简便高效、成本低廉,而且有利于保留可溶性重组蛋白质,而超声破碎法会导致可溶性蛋白发生变性沉淀而增加蛋白质分离的难度。综合分析可知,化学-渗透压法在基因工程及生物工程中具有良好的应用前景。

关键词:化学-渗透压法;细胞破碎;温和高效;胞内蛋白质;可溶性

中图分类号: Q939.97 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)19-0146-04

大肠杆菌(*Escherichia coli*,简称 *E. coli*)是基因工程与生物工程中表达重组蛋白质最常用的宿主菌。重组蛋白质通常被表达在 *E. coli* 胞内,必须进行细胞破碎后才能进行相应的分离纯化^[1]。现有的细胞破碎方法分为机械法、化学法、物理法及生物酶法四大类,在实际应用中这些方法仍有较多不足。例如,机械法破碎效率高,但是需要高速珠磨机、高压匀浆机等贵重设备,同时由于发热大,可能重组蛋白质的生物活性^[2-3];化学法简便,但所用有机溶剂及变性剂也可能影响重组蛋白质的生物活性^[4-5];物理法条件温和,但破碎效率较

低^[6];生物酶法条件温和、破碎效率较高,但碎菌成本较高^[7]。因此可见,开发温和且具有高破碎效率的简便工艺在基因工程及生物工程中有较高的应用价值。

形态结构学研究表明,*E. coli* 细胞壁是由脂多糖层、磷脂层与肽聚糖层组成的复合结构,具备较强的抗拉伸与抗剪切能力。渗透压法利用渗透压差破碎细胞,条件温和,可以很好地保留蛋白质的生物活性,但是作用力较弱,不足以完全破碎 *E. coli* 细胞壁,目前仅用于释放出周质空间的蛋白质^[8]。本试验拟研究将化学法与渗透压法联用(本研究均简称为化学-渗透压法),从而实现既高效彻底破坏 *E. coli* 细胞壁,又完全释放胞内蛋白质,同时能保留蛋白质生物活性的可能性。本研究为该法处理 *E. coli* BL21(DE3)、重组原动蛋白 2 β (PK2 β)工程菌的试验结果。

1 材料与方法

1.1 材料

E. coli BL21(DE3)为笔者所在研究室保存,重组质粒 pET-28-PK2 β 为笔者所在研究室构建,按常规方法转化获得相应重组工程菌^[9]。

学报:理学版,2013,51(4):724-726.

[8] 庄雅玲,郭月雄,郭宗甫. 中草药白花水竹草(*Tradescantia albiflora* Kunth)降低血液尿酸之功能及抗氧化性研究[C]//中国畜牧兽医学会中兽医分会学术年会. 兰州,2015.

[9] 林夏斌,黄华达,黄怀妹,等. 白花拟万代兰(*Vandopsis undulata*)组培苗的增殖、生根与炼苗[J]. 江苏农业科学,2016,44(2):56-59.

[10] 杨 涛,钱 蕾,吕永桂,等. 丰花月季低成本组织培养快繁的研究[J]. 江苏农业科学,2015,43(8):53-55.

[11] 黎海利,谭飞理,刘锴栋,等. 聚花过路黄的组织培养和快速繁殖[J]. 江苏农业科学,2015,43(6):51-53.

收稿日期:2016-05-04

基金项目:国家自然科学基金(编号:81573529);江苏大学高层次人才启动基金(编号:1281370001);江苏省 2015 年度普通高校研究生实践创新计划(编号:SLX15_0512);江苏大学第 14 批大学生科研立项项目(编号:14A441)。

作者简介:赵烨清(1992—),女,江苏南通人,硕士研究生,主要从事食源性功能肽的研发工作。E-mail:18796020517@163.com。

通信作者:闻崇炜,博士,副教授,主要从事食源性功能肽的研发工作。E-mail:wenchw@ujs.edu.cn。

[3] Faden R B. The author and typification of *Tradescantia zebrina* (Commelinaceae)[J]. Kew Bulletin, 2008, 63(4): 679-680.

[4] 王大绍. 曲膝水竹草及水竹草属在我国的传播、危害和防治[C]//第十届全国生物多样性保护与持续利用研讨会论文集. 哈尔滨,2012.

[5] 樊效琪,徐亚铭,刘星谱. 水竹草抗肿瘤成分的研究,中成药, 1992, 14(2): 34-35.

[6] 杨春欣. 水竹草抗心律失常成分的分离及鉴定,天然产物研究与开发, 1996, 8(3): 17-19.

[7] 汤 峰,吴静义,张 剑,等. 水竹叶的化学成分[J]. 吉林大学