

孙 茜,李丕睿,陈梅香,等. 高产巨大戟醇铁海棠毛状根培养体系的构建[J]. 江苏农业科学,2024,52(1):134-141.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2024.01.020

高产巨大戟醇铁海棠毛状根培养体系的构建

孙 茜^{1,2}, 李丕睿², 陈梅香², 代 炎^{1,2}, 陈鹏旭^{1,2}, 冯 煦², 陈 雨²

[1. 南京中医药大学, 江苏南京 210023; 2. 江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园)/
江苏省中药材生态种植与高值化利用工程研究中心, 江苏南京 210014]

摘要:为构建高产巨大戟醇的铁海棠毛状根培养体系,研究比较了6个不同品种铁海棠茎叶部分的巨大戟醇含量,以含量高的铁海棠原种的花梗及叶盘为外植体,考察不同菌株以及不同侵染条件对其诱导率的影响,筛选适宜铁海棠毛状根生长的液体培养基,并比较了铁海棠毛状根和植株中的巨大戟醇含量差异。结果表明:(1)铁海棠6个品种间巨大戟醇含量存在显著差异,含量最高的为铁海棠原种。(2)以铁海棠原种的花梗为外植体,预培养7 d,以 $D_{600\text{ nm}}=0.6$ 的 Ar A4 菌株侵染6 min,转入1/2MS固体培养基中共培养3 d可获得最佳转化效果,毛状根诱导率最高达68.33%。(3)毛状根在1/2MS液体培养基中生长迅速,长势良好。(4)毛状根中巨大戟醇的含量显著高于铁海棠原种植株中各部位的含量,达到593.14 mg/kg,鲜质量为0.50 g的毛状根经悬浮培养10 d后,可获得132.27 μg 巨大戟醇。铁海棠6个品种中以铁海棠原种巨大戟醇含量最高,利用发根农杆菌 Ar A4 侵染铁海棠原种花梗,成功建立了铁海棠毛状根的高效诱导及悬浮培养体系,且获得的毛状根中巨大戟醇含量高于原植株,为高效获得巨大戟醇提供了新的途径。

关键词:铁海棠;巨大戟醇;毛状根;发根农杆菌;诱导率

中图分类号:S567.1⁺90.43 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2024)01-0134-07

巨大戟醇是巨大戟烷型二萜类活性化合物,是合成巨大戟醇甲基丁烯酸酯的主要原料^[1-2],该成分制成的外用凝胶剂(药品名 Picato)已在国外上市,用于治疗日光性角化病和皮肤癌^[3]。目前原料巨大戟醇主要是从大戟属植物植株中分离得到,然而植株中的巨大戟醇含量很低,全合成法获得巨大戟醇又存在着工艺难度大、成本高等产业化生产难题^[4],因此原料巨大戟醇来源匮乏的问题一直制约着其衍生物的药用价值开发及工业化生产。笔者所在实验室前期测定了大戟科61种植物植株碱水解后的巨大戟醇含量,发现铁海棠(*Euphorbia milii* Ch. des Moulins)中含有相对较多的巨大戟醇,其植株地上部分巨大戟醇含量为136.17 mg/kg(干质量)^[5]。因此,铁海棠可作为巨大戟醇生产研究的理想植物材料。

铁海棠是大戟科(Euphorbiaceae)大戟属

(*Euphorbia*)多年生蔓生灌木,别名虎刺梅、麒麟刺等,原产非洲(马达加斯加),广泛栽培于热带和温带地区^[6]。铁海棠也是一种药用植物,以茎叶、根及乳汁入药,性味苦涩凉,有小毒,入心经,具有解毒活血、排脓逐水等功效^[7]。研究表明铁海棠次生代谢产物的化学成分主要为黄酮类、三萜类、二萜类及酚类等^[8-10],其中包括大戟科植物特有的巨大戟醇酯类化合物。巨大戟醇酯类化合物是以巨大戟醇为母核酯化衍生出的一类大戟大环二萜酯,具有显著的抗癌、抗病毒及生物农药活性等^[11-13],其经碱水解后得到巨大戟醇^[5]。

大量研究表明,利用发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)对药用植物进行毛状根诱导,获得的毛状根生长迅速,无需添加外源植物激素即可自主持续生长,能够合成原植物所含的次生代谢产物,且得到的次生代谢物产量可能高于原植物^[14-15]。利用毛状根培养技术生产活性次生代谢产物已经在蒙古黄芪、甘草、钩藤、王不留行等很多药用植物中成功应用^[16-19]。目前,国内外学者对铁海棠的研究主要集中于其化学成分及药理活性,尚未见关于铁海棠毛状根培养的研究报道。因此,系统研究铁海棠毛状根诱导体系的构建,筛选合适的培养条件从而高效地获得巨大戟醇,为解决巨大戟醇来源匮乏

收稿日期:2023-03-09

基金项目:国家自然科学基金(编号:32270404);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(22)3068]。

作者简介:孙 茜(1998—),女,江西萍乡人,硕士研究生,主要从事植物化学研究。E-mail:1063761910@qq.com。

通信作者:陈 雨,博士,研究员,主要从事天然产物化学研究。
E-mail:ychen@jib.ac.cn。

问题提供了新途径。

本研究选取铁海棠 6 个不同品种植株为试验对象,测定并比较不同品种间巨大戟醇含量差异,筛选出含量最高、最适于进行毛状根诱导的材料后,对影响铁海棠毛状根诱导效率的因素进行优化,同时筛选毛状根液体培养的最适培养基,建立优化铁海棠毛状根培养体系,并比较铁海棠毛状根及原植株中巨大戟醇的总含量,以期获得高产巨大戟醇的毛状根培养体系,为高效获得巨大戟醇提供新的途径,为铁海棠药用资源的开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2021—2022 年在江苏省中国科学院植

物研究所天然产物化学研究中心(32°3′32″N, 118°49′50″E)进行。样品采自中山植物园南园温室,经田梅助理研究员鉴定为大戟科大戟属铁海棠的 6 个不同品种,将其编号为品种 A~F(图 1),分别为大基督虎刺梅(A)、铁海棠原种(B)、凯西虎刺梅(C)、小基督虎刺梅(D)、白花虎刺梅(E)、塔城虎刺梅(F)。发根农杆菌 Ar A4、ATCC 15834、MSU 440 菌株均由笔者所在实验室保存。

试验所用的主要仪器设备有:Agilent 1260 HPLC-DAD-6530 ESI Q-TOF MS 液质联用仪(美国安捷伦公司)、超净工作台 SW-CJ-1FD(苏州安泰空气技术有限公司)、METTLER AE240 电子天平(梅特勒-托利多仪器公司)等;试验用的对照品巨大戟醇购于南京春秋生物工程有限公司。

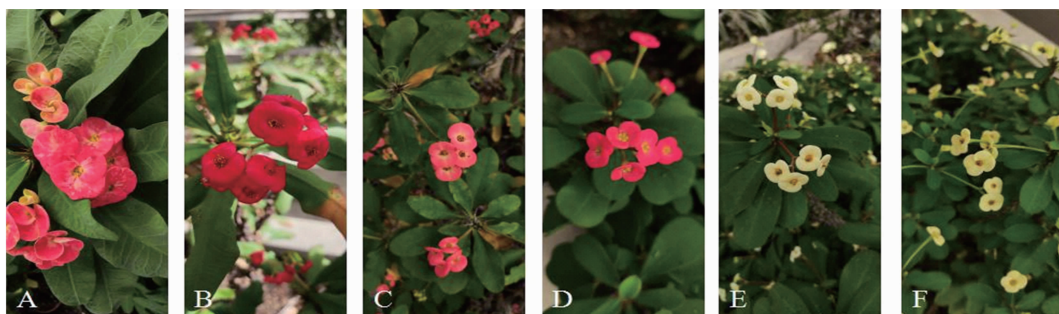


图1 不同品种的铁海棠植株

1.2 试验方法

1.2.1 不同品种的铁海棠植株巨大戟醇含量测定

将以上 6 个品种的铁海棠上部茎叶用清水冲洗后晾干,放入液氮速冻,然后置于冷冻干燥机中进行冻干,冻干完成后用打粉机打成均匀粉末,室温避光贮存于干燥皿中备用。

称取上述样品各 50 mg,按照 Chen 等的方法^[5]进行甲醇提取及碱水解处理,将其制成浓度为 10 mg/mL 的样品,按照“1.2.7”节中的色谱和质谱条件进行巨大戟醇含量测定。利用标准曲线计算巨大戟醇含量。

1.2.2 毛状根的诱导

1.2.2.1 无菌外植体的制备 取铁海棠原种的花梗和叶片,用加有适量洗衣粉的水浸泡 10~15 min,流动自来水冲洗 30 min。将其移至超净工作台中,进行无菌操作。75%乙醇消毒 45 s,无菌水冲洗 2 次,0.1%氯化汞消毒 5 min,无菌水冲洗 4~5 次,用无菌滤纸吸干表面水分。将花梗切成长度为 1 cm 左右的小段,叶片切成 0.5 cm×0.5 cm 大小的叶

盘,接种于 1/2MS 固体培养基中,25℃黑暗条件下预培养 7 d。

1.2.2.2 农杆菌的活化及菌液制备 从-80℃超低温冰箱中取出保存的菌株 Ar A4、ATCC 15834、MSU 440 各 50 μL,分别加至 5 mL YEB 液体培养基中,在含发根农杆菌 Ar A4 和 ATCC 15834 的培养基中各加入 50 mg/L 卡那霉素,含 MSU 440 的培养基中加入 50 mg/L 链霉素,28℃、185 r/min 快速振荡培养 24 h,复苏菌体。每种农杆菌各取 500 μL 复苏菌液加入 50 mL YEB 液体培养基中,培养基中的抗生素浓度与复苏菌体时相同,在 28℃、185 r/min 条件下振荡培养,待菌液 $D_{600\text{ nm}}$ 至 0.4~0.8 时,停止振荡培养。将菌液 5 000 r/min 离心 8 min,弃去上清,随即加入等体积的 MS 液体培养基,并加入 100 μmol/L 乙酰丁香酮(AS),重悬菌体后用于侵染转化。

1.2.2.3 毛状根的诱导 待铁海棠原种的花梗和叶盘预培养结束后,取出外植体放入上述已制备好的侵染菌液中,侵染 4~8 min,取出外植体,用无菌

滤纸将表面的菌液吸干,置于 1/2MS 固体培养基上,25 ℃ 黑暗共培养 2~4 d。共培养结束后,转移至含有 400 mg/L 头孢噻肟钠(Cef)的 1/2MS 固体培养基中继续培养,每 7 d 换 1 次培养基,若无明显菌斑长出,则逐步降低 Cef 浓度,直至不添加 Cef。

1.2.3 铁海棠毛状根 PCR 鉴定 分别取铁海棠的毛状根和铁海棠原种植株根,用 TIANGEN 试剂盒(DP305)提取基因组 DNA,以发根农杆菌 Ar A4 质粒作为阳性对照,铁海棠原种植株根为阴性对照,PCR 扩增发根农杆菌 Ri 质粒 T-DNA 上的 *rolB* 和 *rolC* 基因序列,所用 *rolB* 基因的上游引物为 5'-CGAGGGGATCCGATTTGCTTT-3',下游引物为 5'-GACGCCCTCCTCGCCTTCCT-3';*rolC* 基因的上游引物为 5'-CTCCTGACATCAAACTCGTC-3',下游引物为 5'-TGCTTCGAGTTATGGGTACA-3'。PCR 反应条件为 95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,35 个循环;72 ℃ 终延伸 10 min。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.4 铁海棠毛状根液体培养 在无菌条件下,取长势良好的铁海棠毛状根 0.50 g,分别转移至不含激素的 MS、1/2MS 和 White 3 种液体培养基中,每组 3 瓶,蔗糖浓度为 30 g/L,pH 值为 5.8,25 ℃、120 r/min 进行振荡暗培养,考察不同液体培养基对铁海棠毛状根生长的影响。培养 10 d 后观察铁海棠毛状根的生长情况及增殖倍数,筛选出最适液体培养基。

1.2.5 铁海棠毛状根中巨大戟醇含量测定 为了比较铁海棠毛状根及铁海棠原种植株中巨大戟醇及其衍生物的含量,将铁海棠毛状根及铁海棠原种植株的根、茎、叶、花苞及花放入液氮速冻,然后置于冷冻干燥机中进行冻干,冻干完成后用打粉机打成均匀粉末,室温避光储存于干燥皿中。分别称取以上冻干粉末各 50 mg,按照 Chen 等的方法^[5]进行甲醇提取及碱水解处理,将铁海棠毛状根以及铁海棠原种的根、茎制成浓度为 2 mg/mL 的样品,叶、花苞及花制成浓度为 50 mg/mL 的样品,按照“1.2.7”节中的色谱和质谱条件进行含量测定。

1.2.6 标准品溶液的制备 精密称取巨大戟醇对照品 8.0 mg,置于 25 mL 容量瓶中,加色谱甲醇超声振荡溶解,定容至 25 mL,配制成浓度为 0.32 mg/mL 的对照品母液。取巨大戟醇对照品母液,采用梯度稀释法,由高到低用色谱甲醇分别稀释成 5 个浓度梯度:2.000、1.000、0.500、0.250、0.125 μg/mL。按

照“1.2.7”节中的色谱和质谱条件进行测定。

1.2.7 色谱和质谱条件 检测仪器:安捷伦 HPLC-Q-TOF-MS/MS(1260 HPLC + 6530 Q-TOF);色谱柱:Agilent C18 column(2.7 μm,4.6 mm × 100 mm);流动相:水(0.1% 甲酸,A 相),甲醇(0.1% 甲酸,B 相),检测程序:0~5 min,40%~75% B;5~15 min,75% B;15~30 min,75%~100% B;30~40 min,100% B;40~50 min,40% B;流速:0.5 mL/min;进样量:5 μL;检测波长:280 nm。

质谱离子源:电喷雾离子源(ESI),正离子模式;气体流速:10.0 L/min;离子源温度:350 ℃;毛细管电压:3 500 V;毛细管出口电压:130 V;锥孔电压:65 V;八极杆电压:750 V;雾化器压力:50 psig;采集范围:质荷比 100~1 300;碰撞能量:30 eV。

1.3 数据处理与分析

探究不同因素对毛状根诱导率的影响时,每组试验均重复 3 次,每次统计 20 个外植体的数据,3 次重复共计 60 个外植体。采用 Excel 2016 和 SPSS 26.0 对数据进行统计整理和方差分析,采用 Origin 2022 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制

按照“1.2.7”节中的色谱和质谱条件测定各个浓度梯度的峰面积,以巨大戟醇浓度(μg/mL)为横坐标(x),提取巨大戟醇特征离子(质荷比 313.00),以峰面积积分值为纵坐标(y),绘制标准曲线。如图 2 所示,巨大戟醇标准曲线的线性回归方程为 $y = 795\,599x + 77\,929$, $r^2 = 0.999\,3$ 。线性范围为 0.125~2.000 μg/mL。

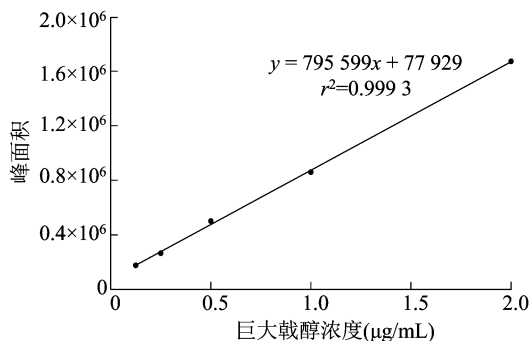
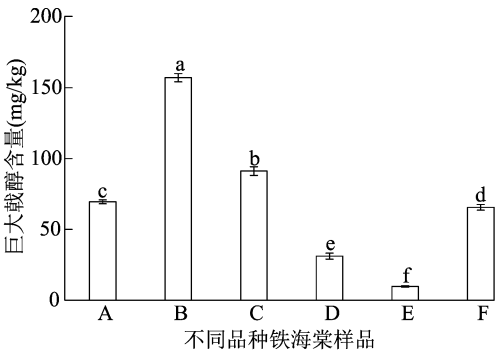


图2 巨大戟醇标准曲线

2.2 不同品种的铁海棠植株中巨大戟醇含量

将不同品种的铁海棠上部茎叶充分碱水解后,进行液质检测。根据巨大戟醇的标准曲线,分别计

算出不同品种铁海棠上部茎叶中总巨大戟醇的含量,结果如图 3 所示。不同品种的铁海棠上部茎叶中巨大戟醇含量存在显著差异($P<0.05$),其中,以铁海棠原种上部茎叶中巨大戟醇的含量最高,为 157.09 mg/kg。因此,后续毛状根诱导试验用铁海棠原种的花梗及叶片进行。



不同小写字母表示品种间差异显著($P<0.05$)。图 6 同
图3 不同品种铁海棠样品中巨大戟醇含量

2.3 毛状根的诱导

2.3.1 不同发根农杆菌类型对毛状根诱导率的影响 本试验选用 3 种发根农杆菌 Ar A4、ATCC 15834、MSU 440 分别侵染铁海棠原种花梗。如表 1 所示,3 种发根农杆菌菌株都可以有效诱导铁海棠原种花梗产生毛状根,但不同类型发根农杆菌菌株的毛状根诱导率显著不同,这可能是由于植物细胞对不同菌株的敏感性不同。3 种菌株的诱导率由大到小依次为 Ar A4 > MSU 440 > ATCC 15834,其中 Ar A4 对花梗毛状根的诱导率可达 66.67%,为诱导铁海棠原种花梗形成毛状根的最佳发根农杆菌菌株。因此,后续试验用发根农杆菌 Ar A4 进行。

表 1 不同发根农杆菌菌株的铁海棠毛状根诱导率

发根农杆菌菌株	侵染外植体总数(个)	发根外植体数(个)	毛状根诱导率(%)
MSU 440	60	25	41.67 ± 2.89b
ATCC 15834	60	16	26.67 ± 5.77c
Ar A4	60	40	66.67 ± 2.89a

注:同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。表 3 至表 6 同。

2.3.2 外植体类型对毛状根诱导率的影响 以发根农杆菌 Ar A4 分别侵染铁海棠原种的花梗和叶盘。由表 2 可知,Ar A4 对花梗和叶盘的诱导能力不同,这说明外植体不同,对毛状根诱导的影响较大。其中,花梗的诱导率较高,诱导率可达 66.67%。因此,用花梗作为铁海棠毛状根的诱导材

表 2 外植体类型对诱导率的影响

外植体类型	侵染外植体总数(个)	发根外植体数(个)	毛状根诱导率(%)
花梗	60	40	66.67 ± 2.89
叶盘	60	25	41.67 ± 2.89

料更合适。
2.3.3 发根农杆菌 Ar A4 菌液浓度对毛状根诱导率的影响 发根农杆菌菌液的浓度对毛状根的诱导率也有一定的影响。由表 3 可知,当菌液浓度为 $D_{600\text{ nm}}=0.6$ 时,诱导率最高,可达 66.67%。当菌液浓度过低时,农杆菌数量少,诱导率低,当农杆菌浓度升高后,诱导率随之提高,但当菌液浓度过高时,外植体易褐化且除菌困难,诱导率降低。因此,在本试验中,菌液浓度为 $D_{600\text{ nm}}=0.6$ 左右时,是适合诱导铁海棠花梗产生毛状根的菌液浓度。

表 3 菌液浓度对诱导率的影响

菌液浓度	侵染外植体总数(个)	发根外植体数(个)	毛状根诱导率(%)
$D_{600\text{ nm}}=0.4$	60	13	21.67 ± 2.89c
$D_{600\text{ nm}}=0.6$	60	40	66.67 ± 2.89a
$D_{600\text{ nm}}=0.8$	60	24	40.00 ± 5.00b

2.3.4 侵染时间对毛状根诱导率的影响 试验设置 4 组不同的侵染时间,分别为 4、6、8、10 min,20 d 后分别统计各组的毛状根发根数量。由表 4 可知,侵染 6 min 时诱导率最高,为 68.33%。侵染时间过长和过短都不利于毛状根的诱导,侵染时间短,质粒的转化效率低,毛状根诱导率低;随着侵染时间进一步延长,对外植体伤害较大,诱导后出现花梗两端边缘变黑且菌体过度繁殖等情况,毛状根的诱导率下降。结果表明,侵染 6 min 时诱导率最高,是诱导铁海棠毛状根适合的侵染时间。

表 4 侵染时间对诱导率的影响

侵染时间(min)	侵染外植体总数(个)	发根外植体数(个)	毛状根诱导率(%)
4	60	27	45.00 ± 5.00b
6	60	41	68.33 ± 2.89a
8	60	17	28.33 ± 7.64c
10	60	5	8.33 ± 2.89d

2.3.5 共培养时间对毛状根诱导率的影响 共培养时间是发根农杆菌将 T-DNA 转移并整合到植物细胞基因组的时间,共培养时间对毛状根的诱导率

有重要影响。本试验设置共培养时间分别为 2、3、4 d,并统计其诱导率。从表 5 可以看出,3 个共培养时间均能诱导铁海棠原种花梗产生毛状根,随着共培养时间的延长,铁海棠毛状根的诱导率先上升后下降,其中共培养 3 d 时毛状根的诱导率最高,可达 66.67%,共培养 4 d 时诱导率降到 36.67%,与 3 d 相比,降低了 45.00%。因此,选用 3 d 作为诱导铁海棠毛状根的共培养时间最合适。

表 5 共培养时间对诱导率的影响

共培养时间 (d)	侵染外植体 总数(个)	发根外植体数 (个)	毛状根诱导率 (%)
2	60	31	51.67 ± 2.89b
3	60	40	66.67 ± 2.89a
4	60	22	36.67 ± 7.64c

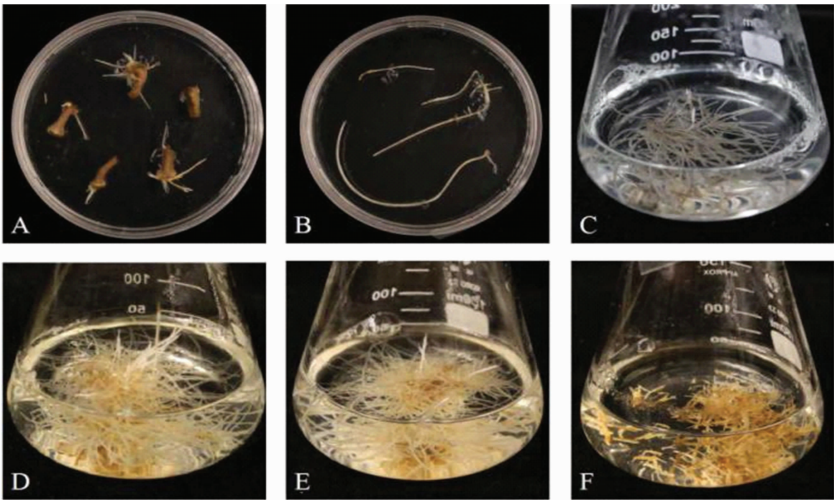
2.4 铁海棠毛状根液体培养基的筛选

共培养结束后将外植体转到添加 400 mg/L Cef 的 1/2MS 除菌培养基培养,约 10 d 后可观察到花梗两端长出白色毛状根(图 4 - A),截取生长良好的毛状根在除菌培养基上单独培养(图 4 - B),待其生长 2 周后转入液体培养基进行悬浮培养(图 4 - C)。毛状根液体培养基筛选试验结果(图 4 - D 至

图 4 - F,表 6)显示:1/2MS 和 MS 液体培养基中的毛状根生长状态良好,呈黄白色,具有很多细小分枝,增殖倍数分别为 4.66 和 4.50;White 液体培养基中铁海棠毛状根呈黄色,生长状态不佳且缓慢,增殖倍数只有 2.18。说明培养基不同,对铁海棠毛状根的生长有较大的影响。结果表明,与 White 培养基相比,1/2MS 和 MS 液体培养基更适于铁海棠毛状根的生长。比较这 3 种培养基的配方发现,其无机盐的种类和浓度不同,说明 1/2MS 和 MS 培养基中所含的无机盐可能更适于铁海棠毛状根的生长。铁海棠毛状根在 1/2MS 液体培养基中增殖倍数高于 MS 液体培养基,推测可能是无机盐浓度稍低更适于铁海棠毛状根的生长。因此,筛选出 1/2MS 液体培养基为适宜铁海棠毛状根悬浮培养的最适培养基。

表 6 培养基种类对铁海棠毛状根的影响

培养基	接种量 (g)	鲜质量 (g)	增殖倍数	生长情况
1/2 MS	0.50	2.33 ± 0.02a	4.66 ± 0.03a	黄白色,生长旺盛
MS	0.50	2.25 ± 0.03b	4.50 ± 0.07b	黄白色,生长旺盛
White	0.50	1.09 ± 0.03c	2.18 ± 0.07c	黄色,生长缓慢



A. 发根农杆菌 Ar A4 侵染铁海棠花梗长出毛状根; B. 1/2MS 固体培养基上毛状根培养; C. 1/2MS 液体培养基的毛状根; D~F 分别为 1/2MS、MS 和 White 液体培养基中培养的铁海棠毛状根

图4 铁海棠毛状根在不同培养基中的生长情况

2.5 铁海棠毛状根 PCR 鉴定

以铁海棠原种植株根作为阴性对照,以发根农杆菌 Ar A4 质粒作为阳性对照,PCR 扩增发根农杆菌 *rolB* 和 *rolC* 基因。如图 5 所示,2 个铁海棠毛状根株系 DNA 均扩增出了 *rolB* 和 *rolC* 基因片段,和发根农杆菌 Ar A4 质粒 DNA 扩增出的 *rolB* 和 *rolC* 基因片段大小一致(*rolB*:622 bp;*rolC*:586 bp),正

常植株根 DNA 未扩增出 *rolB* 和 *rolC* 的基因片段。表明发根农杆菌 Ar A4 中 Ri 质粒的 T - DNA 已被成功整合到铁海棠毛状根基因中。

2.6 铁海棠植株及毛状根中巨大戟醇含量测定

将铁海棠原种的根、茎、叶、花苞、花以及发根农杆菌 Ar A4 诱导的毛状根进行充分碱水解,巨大戟醇酯全部水解为巨大戟醇后,进行液质检测。根

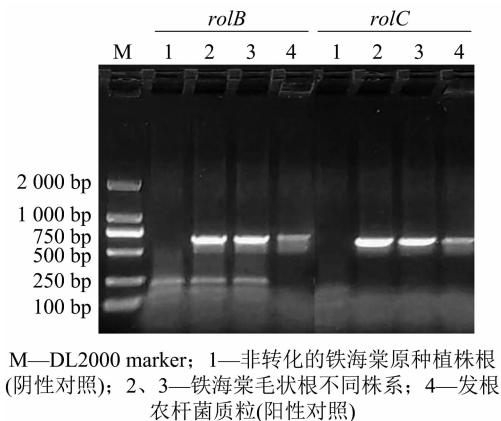


图5 铁海棠毛状根的 PCR 检测

据巨大戟醇的标准曲线,分别计算出铁海棠毛状根和铁海棠原种根、茎、叶、花苞及花中总巨大戟醇的含量,结果如图 6 所示。铁海棠毛状根的巨大戟醇含量显著高于铁海棠原种植株各组织部位中的巨大戟醇含量,达到 593.14 mg/kg,分别是根、茎、叶、花苞及花中的 1.72、3.73、42.61、39.49 倍。鲜质量为 0.50 g 的铁海棠毛状根在 1/2MS 液体培养基中悬浮培养 10 d 后,生长状态良好,由原来的 0.50 g 增殖到 2.33 g,铁海棠毛状根含水量约为 90%。因此,通过计算可以得出,0.50 g 铁海棠毛状根经悬浮培养 10 d 后,即可获得 132.27 μ g 巨大戟醇。由此可见,通过建立优化铁海棠毛状根诱导培养体系,获得的毛状根能够生产出高于铁海棠正常植株中的巨大戟醇积累量,且与植株相比,毛状根具有生长迅速、生长周期短等优点。因此,该体系的建立为高效获得巨大戟醇提供了新的途径。

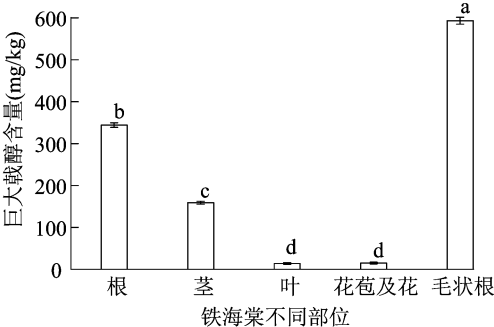


图6 铁海棠毛状根及植株中巨大戟醇含量

3 讨论

毛状根是生产次生代谢产物较理想的原材料,具有生长迅速、无需外源激素等特点,且能合成与原植物相同甚至更高含量的次生代谢产物^[19]。本研究成功获得了高产巨大戟醇的铁海棠毛状根诱

导及培养体系,为利用铁海棠毛状根工业化生产巨大戟醇等次生代谢产物奠定了基础。毛状根的诱导及培养受到许多因素的影响,如外植体类型、发根农杆菌类型、菌液浓度、侵染时间、共培养时间、培养基种类等。

3.1 外植体的选择

铁海棠品种较多,本研究测定了铁海棠 6 个不同品种茎叶部分的巨大戟醇含量,结果表明,不同品种的铁海棠之间巨大戟醇含量存在显著性差异。为获得高产巨大戟醇的铁海棠毛状根培养体系,本研究以巨大戟醇含量最高的铁海棠原种为植物材料,进行毛状根诱导试验。

利用发根农杆菌进行遗传转化时,根、茎、叶、果实等均可作为外植体,对于同一植物,外植体不同,其诱导率也有一定差异。如何凤发等以绞股蓝组培苗的叶片、叶柄、茎段作为转化材料时发现叶片的诱导率最高^[20]。贾春秋等以苦参根、茎和幼芽切段为外植体,发现幼芽的诱导率较高^[21]。本研究发现,以铁海棠原种的花梗和叶盘作为外植体均能诱导出毛状根,但以花梗为外植体诱导产生毛状根的诱导率可达 66.67%。

3.2 发根农杆菌类型、菌液浓度、侵染时间、共培养时间对诱导率的影响

对于同一植物细胞,不同发根农杆菌菌株具有不同的毛状根诱导能力。薛雯心等使用发根农杆菌 Ar A4、C58C1 和 A1476 对党参进行毛状根诱导,结果表明 Ar A4 诱导效果最好^[22]。向倩倩等利用发根农杆菌 C58C1 和 ATCC 15834 诱导三叶青叶片,发现 ATCC 15834 在试验条件下不能诱导三叶青产生毛状根,而 C58C1 则可以^[23]。本研究选用的 3 种发根农杆菌(Ar A4、ATCC 15834、MSU 440)均为农杆菌型菌株,致根能力强,结果表明这 3 种菌株均能诱导铁海棠原种产生毛状根,但诱导能力不同,其中 Ar A4 的诱导率最高。

研究表明,菌液浓度、侵染时间、共培养时间等都会对毛状根诱导率有一定的影响。王丽等诱导龙葵毛状根时发现菌液浓度为 $D_{600\text{ nm}}=0.6$ 时诱导率最高^[24]。刘连旺等对地黄的研究结果表明侵染时间为 10 min 时,诱导效果最佳^[25]。林志豪等研究发现,黄瓜中国龙毛状根诱导适宜的共培养时间为 2 d,此时诱导率较高且受到农杆菌的污染较少^[26]。本试验发现发根农杆菌 Ar A4 在菌液浓度为 $D_{600\text{ nm}}=0.6$,侵染时间为 6 min,共培养时间为

3 d 时,对铁海棠原种花梗的诱导率最高。菌液浓度低,侵染时间和共培养时间短时,毛状根诱导率低;但当菌液浓度过高,侵染时间和共培养时间过长时,则会导致菌体大量繁殖,外植体褐化死亡。因此,合适的菌液浓度、侵染时间以及共培养时间能够提高毛状根的诱导率。

3.3 培养基种类对毛状根生长的影响

当培养基成分不同时,毛状根的生长表现出一定的差异性^[27]。李云芳研究发现,在 MS、1/2MS、B5、N6 液体培养基中,1/2MS 液体培养基最利于三七毛状根的生长^[28]。高帅等分别用 MS、1/2MS、B5、6-7-V 和 White 等 5 种培养基培养金铁锁毛状根,发现其在 B5 培养基中生长最快,而对于毛状根总皂苷的积累而言,则是在 1/2MS 培养基中的积累量最高,在 B5 培养基中总皂苷的积累最少^[29]。在本研究中,与 MS、White 培养基相比,1/2MS 液体培养基更有利于铁海棠毛状根的生长。

3.4 铁海棠毛状根体系的价值

许多研究表明,利用发根农杆菌诱导得到的毛状根可以用于生产原植物所含的次生代谢产物,其含量甚至高于原植株。如张弘弛等对恒山黄芪毛状根的总黄酮和总皂苷含量进行测定表明,其含量分别是自然根中的 1.72 倍和 2.31 倍^[30]。吴顺等对钩藤带钩枝条、幼根和毛状根的钩藤碱进行含量测定,发现其毛状根中钩藤碱含量最高可达带钩枝条的 2.06 倍^[18]。本研究通过测定比较铁海棠毛状根及铁海棠原种植株根、茎、叶、花苞及花中巨大戟醇的总含量发现,铁海棠毛状根的巨大戟醇含量高于铁海棠原种植株各组织部位中的巨大戟醇含量,分别是根、茎、叶、花苞及花中的 1.72、3.73、42.61、39.49 倍,达到 593.14 mg/kg。0.50 g 铁海棠毛状根经悬浮培养 10 d 即可获得 132.27 μg 巨大戟醇,利用铁海棠毛状根体系生产巨大戟醇,具有生长速度快、巨大戟醇含量高、不受环境因素影响等优点,这为利用铁海棠毛状根工业化生产巨大戟醇等次生代谢物奠定了重要基础。

4 结论

本研究首次对大戟科植物铁海棠进行毛状根诱导,对外植体、发根农杆菌菌株、菌液浓度等条件进行筛选,成功构建了铁海棠毛状根的高效诱导及悬浮培养体系。该体系具有生产巨大戟醇等大戟二萜类次生代谢物的应用潜力,为高效获得巨大戟

醇提供了新的途径。后期还可对铁海棠毛状根进行目的产物的诱导子筛选、毛状根植株再生体系及转基因植物培育等研究,充分利用毛状根技术的优势,为进一步开展该类活性物质生物合成研究和铁海棠药用资源的开发利用奠定基础。

参考文献:

- [1] Leo P. A method of producing ingenol - 3 - angelate; WO, 2012010172 [P]. 2012 - 01 - 26.
- [2] 李彦赞,杨 昱,孙传腾,等. 巨大戟醇甲基丁烯酸酯有关物质的合成[J]. 天津药学,2022,34(4):1 - 5.
- [3] Rosen R H, Gupta A K, Tyring S K. Dual mechanism of action of ingenol mebutate gel for topical treatment of actinic keratoses: rapid lesion necrosis followed by lesion - specific immune response[J]. Journal of the American Academy of Dermatology, 2012, 66 (3): 486 - 493.
- [4] Jørgensen L, McKerrall S J, Kutttruff C A, et al. 14 - Step synthesis of (+) - ingenol from (+) - 3 - carene [J]. Science, 2013, 341 (6148): 878 - 882.
- [5] Chen M X, Tian M, Liu F, et al. Distribution of ingenol derivatives in Euphorbia plants and UV - dependent promotion of ingenol production in greenhouse - grown Euphorbia plants [J]. Industrial Crops and Products, 2021, 173: 114111.
- [6] 中国科学院中国植物志委员会. 中国植物志:第四十四卷第三分册[M]. 北京:科学出版社,1997:58 - 60.
- [7] 张笑宇,陈恩慧,李 瑞,等. 铁海棠药学研究概况[J]. 安徽农业科学,2014,42(2):383 - 384,386.
- [8] Kamurthy H, Dontha S, Rajani K. Phytochemical screening on *Euphorbia milii* Red flowers - isolation of terpenoids, flavone and phenols[J]. American Journal of Ethnomedicine, 2015, 2(6): 322 - 332.
- [9] Yu H F, Cheng Y C, Wu C M, et al. Diverse diterpenoids with α - glucosidase and β - glucuronidase inhibitory activities from *Euphorbia milii* [J]. Phytochemistry, 2022, 196: 113106.
- [10] Liu S N, Hu J Y, Tan S H, et al. ent - Rosane diterpenoids from *Euphorbia milii* showing an Epstein - Barr virus lytic replication assay[J]. RSC Advances, 2017, 7(74): 46938 - 46947.
- [11] Kupchan S M, Uchida I, Brannan A R, et al. Antileukemic principles isolated from Euphorbiaceae plants[J]. Science, 1976, 191(4227): 571 - 572.
- [12] Nascimento B A, Zani C L. A simple high pressure liquid chromatographic method for the quantitative determination of the molluscicide milliamine L in the latex of *Euphorbia splendens* [J]. Phytochemical Analysis, 1999, 10(2): 93 - 96.
- [13] Shi J X, Li Z X, Nitoda T, et al. Three antineoplastic diterpenes from *Euphorbia kansui* [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2007, 71(4): 1086 - 1089.
- [14] 翁颖妮,朱 婧,王琴波,等. 黄花倒水莲毛状根诱导及其愈伤组织总皂苷的测定[J]. 中药材, 2020, 43(9): 2099 - 2102.
- [15] 陈 宇,董 瑜,张楷燕,等. 白英毛状根的培养与薯蓣皂苷元的测定[J]. 中草药, 2016, 47(7): 1199 - 1203.

刘彦岑,郭俊先,郭 阳,等. 基于熵权-TOPSIS 的哈密瓜田间水肥耦合评价[J]. 江苏农业科学,2024,52(1):141-147.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2024.01.021

基于熵权-TOPSIS 的哈密瓜田间水肥耦合评价

刘彦岑¹,郭俊先¹,郭 阳¹,史 勇¹,黄 华²,李龙杰¹,张振振¹

(1. 新疆农业大学机电工程学院,新疆乌鲁木齐 830052; 2. 新疆农业大学数理学院,新疆乌鲁木齐 830052)

摘要:为探究新疆大田哈密瓜科学水肥管理方式,以金华蜜 25 号为试验材料,设置 2 个灌水时长(低水、高水,分别记作 W_1 、 W_2)、3 个追肥水平(低肥、中肥、高肥,分别记作 N_1 、 N_2 、 N_3),研究不同水肥条件对哈密瓜生长表型(茎粗、株长、叶绿素含量)与果实品质(瓜质量、长径、短径、可溶性固形物含量、果肉硬度)的影响,分析生长表型与果实品质之间的相关性,并运用多指标综合评价模型确定最优水肥方案。研究表明,相较于增加施肥量,增加灌水量更能促进哈密瓜生长表型与果实品质的增长。各生长表型与果实品质的相关性存在差异,茎粗与株长分别对果实外观品质与风味品质的影响较大。利用熵权系数法对各品质指标赋权,其中果肉硬度(3.23%)权重最小,可溶性固形物(45.59%)权重较大,提供的信息最丰富。基于熵权-TOPSIS 模型对哈密瓜田间水肥耦合评价可知,高水中肥(W_2N_2)得分最高(0.271 082),即灌水时长为 128 h、总追肥量为 280 kg/hm^2 的水肥耦合方案最佳,该研究可为大田哈密瓜的田间水肥管理提供参考。

关键词:大田哈密瓜;生长表型;果实品质;相关性;熵权-TOPSIS

中图分类号:S652.104 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2024)01-0141-07

新疆哈密瓜别称厚皮甜瓜,是新疆瓜果产业重要的经济支撑之一^[1]。目前,新疆大多地区还以单一的果实外观品质作为哈密瓜质量的评价标准,许

多瓜农为了经济利益,片面追求大而好看的瓜形,在栽培过程不断增大施肥量,再加上田间灌水不当,使得果实长势不齐,品质下降,极大地影响了哈密瓜的种植效益^[2-3]。因此,科学的多指标评价方法,对哈密瓜产业的可持续发展尤为重要。

优劣解距离法(TOPSIS)模型是多指标决策分析中的常用方法,可以根据评价对象与最优解和最差解的距离进行排序^[4]。熵是热力学中系统内在混乱度的一个度量,指标混乱度越大,提供的信息

收稿日期:2023-03-11

基金项目:新疆维吾尔自治区教育厅自然科学重点项目(编号:XJEDU2020I009);国家自然科学基金面上项目(编号:61367001)。
作者简介:刘彦岑(1997—),男,重庆人,硕士研究生,主要从事作物表型研究。E-mail:1015431957@qq.com。

通信作者:郭俊先,博士,教授,博士生导师,主要从事作物无损检测研究。E-mail:junxianguo@163.com。

[16]姚庆收,陈向明,马玉娥,等. 蒙古黄芪毛状根的高效诱导及毛状根生物量和总黄酮含量的比较分析[J]. 中药材,2017,40(8):1753-1757.

[17]卢虹玉,刘敬梅,张海超,等. 甘草毛状根诱导培养及其黄酮含量检测的研究[J]. 中国药理学杂志,2011,46(11):814-818.

[18]吴 顺,孙建春,周 凯,等. 钩藤毛状根的诱导及其钩藤碱含量的测定[J]. 北方园艺,2019(15):49-54.

[19]包京姗,张海澍,徐大卫,等. 王不留行毛状根培养体系建立及其黄酮苷的测定[J]. 中草药,2016,47(1):138-142.

[20]何凤发,田 恬,王贵学,等. 不同理化因子对绞股蓝毛状根诱导的影响[J]. 中药材,2010,33(11):1675-1677.

[21]贾春秋,赵 雪. 苦参毛状根的诱导培养及氧化苦参碱含量的测定[J]. 人参研究,2014,26(3):39-42.

[22]薛雯心,刘立业,袁金月,等. 党参毛状根诱导条件研究[J]. 安徽农业科学,2017,45(10):121-123,146.

[23]向倩倩,杨佳瑶,侯梓淇,等. 三叶青毛状根的诱导及其液体培

养体系的研究[J]. 林业科技,2019,44(4):5-9.

[24]王 丽,刘 琪,宁明明,等. 龙葵毛状根诱导条件的研究[J]. 北方园艺,2015(4):107-111.

[25]刘连旺,张永清,祁建军,等. 地黄毛状根的诱导及条件优化[J]. 山东农业科学,2015,47(1):47-50.

[26]林志豪,邓钰宏,赵 静. 黄瓜‘中国龙’毛状根诱导体系的建立[J]. 中国瓜菜,2016,29(2):6-9,19,3.

[27]胡 菊,毛美琴,杨 君,等. 4 种发根农杆菌对朱砂根组培无茵叶片毛状根诱导的影响[J]. 西北植物学报,2016,36(2):411-418.

[28]李云芳. 三七细胞及毛状根液体培养的研究[D]. 大连:大连工业大学,2014:45.

[29]高 帅,王洪峰,侯丽丽,等. 不同培养条件对金铁锁毛状根生长的影响[J]. 广东林业科技,2012,28(2):16-21.

[30]张弘弛,刘 瑞,高志慧,等. 恒山黄芪毛状根遗传转化体系的建立及活性成分含量测定[J]. 北方园艺,2022(9):93-99.