

几种因素对银杏毛状根诱导和黄酮含量的影响

邵菊芳, 朱红威, 张 智, 滕婷婷, 邓焕平, 杨海松, 贺正旺
(中国矿业大学 化工学院, 徐州 221008)

摘要: 考察了发根农杆菌菌种、侵染时间、外植体类型、培养基类型和乙酰 香酮 5 个因素对银杏毛状根诱导的影响, 以及比较了后二因素对毛状根黄酮积累的影响。结果表明: 以银杏胚为外植体, A4 活化菌液中加入乙酰 香酮 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 侵染 15 min, 再在 MS 培养基上培养发根率最高。乙酰 香酮对毛状根中黄酮的积累没有显著促进作用, 浓度高于 $120\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 还会严重抑制发根。
关键词: 因素; 银杏; 毛状根; 诱导
中图分类号: S792.95.08 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2008)06-0010-03

Effects of Several Factors on Hairy Root Inducement and Flavone Content of *Ginkgo biloba*

SHAO Ju-fang, ZHU Hong-wei, ZHANG Zhi, TENG Ting-ting
DENG Huan-ping, YANG Hai-song, HE Zheng-wang

(Chemical Engineering and Technology College of China University of Mining and Technology, Xuzhou 221008)

Abstract: Five factors which influence inducement of *Ginkgo biloba* hairy roots including Agrobacterium rhizogenes types intrusion time, explant types, medium types and AS were reviewed in this article. The effect of the two later factors on flavones content in hairy roots was also compared. The results showed that: Rooting rates was the highest in the track that embryo intruded by activity A4 with $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AS for 15 minutes and then cultured on MS medium. There was no markedly simulative function of AS for flavone accumulation in hairy roots. At the same time, rooting rate was badly restrained when AS content was higher than $120\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.
Key words: factor; *Ginkgo biloba*; hairy root; inducement

随着研究的不断深入, 利用植物组织培养和细胞工程的方法生物合成药用植物次生代谢物的技术引起人们的极大兴趣, 同时也得到日益发展和成熟, 但是要形成工业化生产也受到诸多因素的限制, 首先是生产周期长, 前期投入大; 其次是在组织培养的前期, 常常得到的愈伤组织不产生目的产物或目的产物含量与天然植物含量相比极低, 并且因其生长需要激素, 故投资成本大。而发根在生物合成次生代谢产物上的优越性, 为其开辟了一条生产次生代谢产物的新途径, 同时对工业化生产具有更大的潜在效应。

收稿日期: 2008-03-21
基金项目: 中国矿业大学科技基金项目“银杏转基因发根培养研究”(OH061009); “高产银杏黄酮悬浮细胞系的建立”(OH060101); 中国矿业大学大学生科研训练计划项目(070604)
第一作者简介: 邵菊芳(1978-), 女, 湖北鄂州人, 博士, 讲师, 主要从事植物细胞工程研究。E-mail: shaojufang@webmail.hzau.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

选择发根农杆菌 A4、ATCC1.2556 (西南大学杨晓红教授赠送) 作为试验菌种。

1.1.2 银杏种子

银杏种子为江苏省的优良品种“佛手”, 购于徐州市七里沟农贸市场。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化

将 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的发根农杆菌于 YEB 固体平板上划线, 置于培养箱中 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 暗培养 48 h。取 YEB 液体培养基 20 mL 于离心管中, 挑取 YEB 平板上的单菌落于离心管中, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 恒温震荡培养 24 h 至培养基出现白色浑浊, 此时再挑取少量菌液于 YEB 固体平板上划线培养 48 h, 如此反复活化共培养 3 代。

1.2.2 测定菌种生长曲线

YEB 液体培养基活化菌种过程中, 从培养 10 h 时开始以灭过菌的 YEB 液体培养基为空白, 利用 721 型分光光度计测定菌液吸光值 OD_{600} , 每隔 2 h 测一次, 绘制发根农杆菌

的生长曲线。

1.2.3 银杏无菌苗的制备 按照 MS 培养基配方配置培养基, 三角瓶分装, 121℃灭菌 15 min, 冷却备用。取银杏种子, 先用清水洗净, 剥去骨质外皮后再用 75% 的酒精浸泡 1 min, 用去离子水冲洗种子数次, 再用次氯酸钠浸泡消毒 10 min, 倒掉次氯酸钠, 于无菌操作台中用无菌水漂洗 5 次, 并从种子中将胚取出置于培养基中, 封口膜封三角瓶口, 光照培养箱中 25℃, 16 h 光照 8 h 黑暗培养。

1.2.4 银杏毛状根的诱导 将外植体消毒后, 用刀片在其上切出若干伤口, 置于活化好的菌悬液中, 再捞出外植体并用无菌滤纸吸干多余菌液, 置于培养基上, 28℃恒温培养, 每日 16 h 2 000 lx 光照, 8 h 黑暗培养, 观察并 3 周后统计转化率。转化率(%) = 产生发根的外植体的总数/接种的外植体总数。实验中分别考察侵染时间、外植体类型、发根农杆菌菌种、培养基成分和乙酰丁香酮 5 个因素对银杏转化的影响, 5 个处理均重复 10 次(见表 1)。

表 1 毛状根诱导处理

处理	侵染时间 / min	外植体 类型	菌种	培养基 类型	乙酰丁香酮 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
1	10	幼叶	A4	1/3MS	80
2	15	幼茎	ATCC	1/2MS	100
3	20	胚	—	2/3MS	120
4	25	—	—	MS	140
5	30	—	—	3/2MS	160

其中乙酰丁香酮的添加分为培养基中添加和菌液中添加两种, 各 5 个浓度(见表 1), 分别设为 A1、A2、A3、A4、A5、B1、B2、B3、B4、B5, 以不加乙酰丁香酮为对照。

1.2.5 毛状根中黄酮含量的测定 毛状根中黄酮提取及测定参照庄向平等的方法^[1]。

2 结果与分析

2.1 发根农杆菌生长曲线的测定

由于发根农杆菌侵染银杏外植体存在一个最佳状态, 即对数期。因此, 需要测定发根农杆菌的生长曲线来确定对数期, 以获得对数期的菌浓, 选择最佳浓度的菌液用于侵染外植体。经检测, 发根农杆菌 ATCC1.2556 及 A4 菌的生长曲线如图 1 所示:

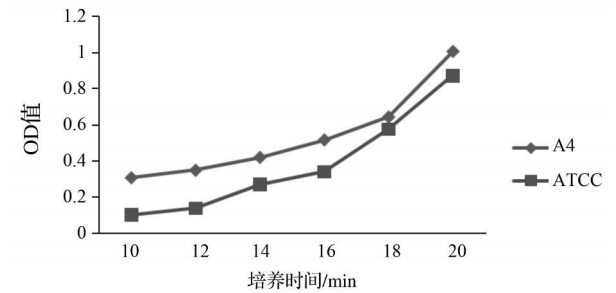


图 1 ATCC 及 A4 菌的生长曲线

由图 1 可知, 发根农杆菌 ATCC 1.2556 及 A4 浓度均随着时间的增多而增加。对比二菌株, ATCC 1.2556

的生长速度要比 A4 的生长速度快。且在 YEB 固体培养基上培养时, 同样的培养时间, ATCC1.2556 菌落要明显的比 A4 菌落直径大, 说明 ATCC 1.2556 比 A4 生长能力强, 生长速度快。赵东利等的研究表明, OD_{600} 为 0.6 时最有利于转化^[2]。由图 1 可得知, 发根农杆菌 A4 液体培养 18 h, ATCC 1.2556 液体培养 16 h 可达到最佳侵染状态。

2.2 无菌苗的制备

培养过程中观察到无菌胚在 5~6 d 内不断膨胀长大, 从第 6~8 天开始底部长出根, 顶部开始发芽(见图 2 左), 大概 15~20 d 左右陆续长成完整的植株(见图 2 右), 为发根农杆菌的侵染实验提供外植体



图 2 不同时期的无菌苗

2.3 侵染时间对转化的影响

由图 3 可知, A4 菌侵染银杏胚发根率最高可以达到 27.90%, ATCC1.2556 菌最高在 20.75%, 两菌种最佳侵染时间均为 15 min。

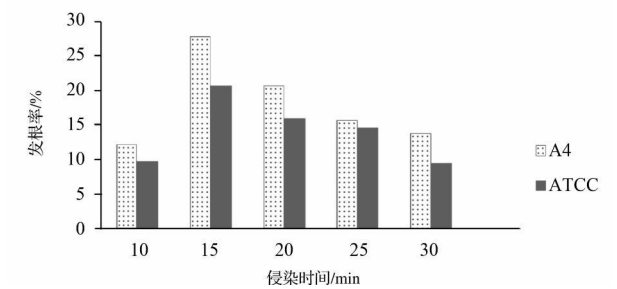


图 3 不同侵染时间对银杏发根率的影响

另外在侵染后的培养过程中, 被两菌侵染的外植体均有愈伤化现象发生。A4 的平均愈伤化比率在 21.67%, ATCC1.2556 的平均愈伤化比率为 23.73%。关于银杏愈伤组织的诱导研究很多, 其中朱红威等的研究表明, 银杏愈伤组织的诱导在 2, 4-D、KT 和 BA 的参与下效果比较好^[3], 该试验中是否是发根农杆菌向培养基中分泌了激素还有待进一步试验考察。

2.4 不同外植体和菌种对发根的影响

以银杏胚、幼茎、幼叶为外植体, A4 及 ATCC1.2556 侵染 15 min, 培养 30 d, 统计发根率(见表 2)。

由表 2 可知, 用 A4 和 ATCC1.2556 转化银杏胚、幼茎和幼叶三种外植体, 银杏胚的发根率分别为 29.41% 和 19.64%。采用叶片与茎段作为侵染材料培养 30 d, 均陆续褐化干枯, 并最终死亡, 没有获

类别	A4			ATCC1.2556		
	胚	幼叶	幼茎	胚	幼叶	幼茎
总外植体数/个	51	80	80	56	80	80
发根数/个	15	0	0	11	0	0
发根率/%	29.41	0	0	19.64	0	0

得转化幼茎和幼叶发根的结果。文欣等转化银杏采用叶片与茎段作为侵染材料,发根率分别为0.31%和0.12%^[4],发根率相对很低。这说明银杏幼叶和幼茎不适合作为诱导毛状根的外植体。但施和平等用发根农杆菌菌株 R1000、R1601 分别感染少花龙葵的叶片、茎段,叶片的发根率均达到90%以上^[9]。也就是说,不同植物的叶片诱导毛状根的发根率差异很大。同时从表2中还可以看出,A4 侵染银杏胚的发根率高于 ATCC1.2556 侵染银杏胚的发根率,就侵染银杏胚来说,发根农杆菌 A4 的侵染效率要高于 ATCC1.2556 的效率。这说明不同菌种侵染同一外植体,发根率是不同的,这一结论与徐铁锋等^[6]的研究结论一致。

2.5 培养基对转化和产黄酮的影响

以发根农杆菌 A4 侵染银杏胚。培养基设为1/3MS、1/2 MS、2/3 MS、MS、3/2MS 5 种。其结果显示,5 种培养基中以 MS 培养基的发根率最高,达到36.67%,显著优于其它四种培养基,但3/2MS 培养基的黄酮含量最高,为0.098%。综合考虑,在

培养基	外植体 总数/个	发根数/个	发根率/%	黄酮含量/%
1/3MS	60	6	10.00	0.036
1/2MS	60	7	11.67	0.052
2/3MS	60	15	25.00	0.067
MS	60	22	36.67	0.081
3/2MS	60	12	20.00	0.098

以生产次生代谢物为主的生产实际中,以 MS 培养基最佳。这与孙敏等^[7]研究长春花的毛状根诱导结果不符,可能是因为不同的植物适合的诱导培养基不同。

2.6 乙酰丁香酮对发根和黄酮的影响

一般认为,人为的在转化系统中加入某种酚类物质,如乙酰丁香酮和香草酚等可以起到促进基因转化的作用。从本实验结果看来,80、100 和 120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三个浓度的乙酰丁香酮不论是加在侵染菌液中还是加在培养基中都能提高发根率,其中侵染菌液中添加 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的处理发根率最高,达到38.33%。而浓度高于 120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 则发根率都为0。外植体发根的同时还有愈伤化现象,总的来说,乙酰丁香酮的加入降低了愈伤率,超过 120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度愈伤率下降更快。10 个处理中除未发根的处理外,其它处理的毛状根中黄酮含量差异不大。说明乙酰丁香酮的添加量对产黄酮没有影响。

AS/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	外植体总数/个	发根数/个	发根率/%	愈伤数/个	愈伤率/%	黄酮含量/%
CK	60	18	30.00	13	21.67	0.078
A1	60	19	31.67	12	20.00	0.078
A2	60	20	33.33	10	16.67	0.080
A3	60	14	23.33	7	11.67	0.077
A4	60	0	0	3	5.00	—
A5	60	0	0	0	0	—
B1	60	21	35.00	9	15.00	0.081
B2	60	23	38.33	5.00	8.33	0.080
B3	60	13	21.67	3	5.00	0.079
B4	60	0	0	0	0	—
B5	60	0	0	0	0	—

3 结论

在利用发根农杆菌介导植物的遗传转化时,影响因素很多。在该实验中,研究了影响几个银杏发状根体系建立的因素,即侵染时间、不同菌株、不同外植体、培养基成分及乙酰丁香酮5个因子。结果证明5个因素都对银杏毛状根诱导有不同的影响,根系中黄酮活性物质的含量也有。A4 活化菌液中加入乙酰丁香酮 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 侵染银杏胚 15 min,再在 MS 培养基上培养发根率最高,可达到36.67%。乙酰丁香酮对毛状根中黄酮的积累没有显著促进作用,浓度高于 120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 还会严重抑制发根。

参考文献:

[1] 庄向平,虞杏英,杨更生,等.银杏叶中黄酮含量的测定和提取

方法[J].中草药,1992,23(3):122-124.

[2] 赵东利,张春广,王新宇,等.发根农杆菌对苦豆子高频转化条件的优化[J].药物生物技术,2002,9(4):220-223.
[3] 朱红威,邵菊芳,李庆,等.不同培养条件对银杏愈伤组织生长及黄酮含量的影响[J].食品科学,2007,28:102-105.
[4] 文欣,温尚昆.Ri 质粒转化银杏及影响其产生黄酮的研究[J].山东农业大学学报(自然科学版),2006,37(1):21-24.
[5] 施和平,梁朋.三裂叶野葛毛状根的培养及葛根素的产生[J].实验生物学报,2003,36(6):407-412.
[6] 徐铁锋,张磊,张权明.药用植物商陆毛状根培养系统的建立[J].第二军医大学学报,2003,24(10):1112-1115.
[7] 孙敏,汪洪,王颖.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):549-552.