

物种濒危的主要原因。

本课题组多年研究结果表明,肉苁蓉种内 DNA 分子遗传多样性较丰富,并在形态特征、产量及品质性状等方面多样性显著,说明现阶段该物种的种内丰度较高,其濒危原因不在于此;而肉苁蓉的生境独特、专性寄生、生长缓慢、自然繁殖率低、异花授粉、种子休眠等脆弱的生物学特性影响它们的生存和繁衍,使其在受到长期的人为干扰时自我更新困难,导致濒危。因此,在现阶段建立管理规范的自然保护区,并配合野生抚育,完全能够提高其野生资源的蕴藏量。而由于药材的需求量逐年扩大,必须同时大力发展人工种植,才能满足市场需求,实现资源的可持续利用。而核心种质库的建立、良种繁育和种植基地的规范建设应是肉苁蓉资源保护和利用过程中的重要任务。

References:

- [1] Fu L G. *The Rare and Imminent Danger Plant in China* (中国珍稀濒危植物) [M]. Shanghai: Shanghai Educational Press, 1989.
- [2] Tu P F, He Y P, Lou Z C. Herbageological study on *Cistanche deserticola* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1994, 19 (1): 3-5.
- [3] Vos P, Hoger R, Bleekett M. *et al.* AFLP: A new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23 (21): 4407-4414.
- [4] Portis E, Acquadro A, Comino C, *et al.* Effect of farmers' seed selection on genetic variation of a landrace population of pepper (*Capsicum annuum* L.) grown in North-West Italy [J]. *Genet Res Crop Evolu*, 2004, 51: 581.
- [5] Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1973, 70: 3321-3323.
- [6] Shannon C E, Weaver W. *The Mathematical Theory of Communication* [M]. Urbana: Univ Illinois Press, 1949.
- [7] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, 1978, 89: 583-590.
- [8] Cui G H, Chen M, Huang L Q, *et al.* Study on genetic diversity of *Herba Cistanches* by RAPD [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2004, 29(8): 727-730.
- [9] Li Y L, Zhang K, Wang H X. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Cistanche deserticola* Maenend Ma in two endemic areas of Inner Mongolia [J]. *J Baotou Univ Iron Steel Technol* (包头钢铁学院学报), 2005, 24(2): 185-187.
- [10] Chen J, Liu T N, Cheng H Z, *et al.* Study on the pollination characteristic of *Cistanche deserticola* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(6): 504-506.
- [11] Niu D L, Song Y X, Guo S H, *et al.* Studies on pollen viability of *Cistanche deserticola* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(6): 679-682.

青羊参遗传转化中组织培养系统的研究

邱璐¹, 王波¹, 范树国¹, 罗春梅², 李艳华², 陈凯¹, 周银燕¹, 杨启国¹, 杨福锁¹

(1. 云南省楚雄师范学院, 云南 楚雄 675000; 2. 云南省楚雄农业学校, 云南 楚雄 675000)

摘要:目的 建立用于遗传转化的青羊参组织培养系统。方法 以不同外植体部位、不同消毒剂、不同消毒时间建立无菌苗;以不同外植体部位、不同激素种类及配比、不同质量浓度的 2,4-D 与 KT 诱导青羊参愈伤组织形成、继代、分化;测定青羊参对标记基因分解物庆大霉素(Gent.)的敏感性。结果 以青羊参的种子及茎段做外植体,以 10%次氯酸钠消毒种子 20~30 min,或以 0.2%HgCl₂ 消毒茎段 3 min 建立无菌苗具有最好效果;青羊参的种子、根、茎、叶易于形成愈伤组织;2,4-D 对青羊参愈伤组织的形成是必要的;青羊参对 KT 较为敏感,不论用 KT 诱导青羊参愈伤组织的形成,还是诱导胚芽或腋芽形成,均有较好效果;以 MS 为基本培养基,以 2,4-D 1.0 mg/L+KT 1.0 mg/L 为激素配比诱导青羊参愈伤组织的形成具有较好效果;以 MS+2,4-D 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L 继代愈伤组织具有较好效果;以 MS+KT 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 诱导种子的胚芽或茎段的腋芽萌发具有较好效果;青羊参的愈伤组织不论来源于种子,还是来源于根、茎、叶,不论使用激素 6-BA,还是使用 KT、ZT、2ip 均未观察到愈伤组织分化形成不定芽;100 μg/mL 的庆大霉素是青羊参转基因植株筛选的最佳压力。结论 通过基因枪介导转基因时,选择种子或茎段在 MS+2,4-D 1.0 mg/L+KT 1.0 mg/L 培养基上萌动 14 d,形成愈伤但未形成芽的材料作为基因枪轰击材料较好。

关键词:青羊参;组织培养;愈伤组织;不定芽;遗传转化;选择压力

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)11-1707-06

收稿日期:2007-02-05

基金项目:云南省自然科学基金项目(水稻 RBBI2-3 基因在几种重要彝药中的表达研究,2006C0086M),云南省学术技术带头人后备人才项目资助(2006PY01-61);楚雄师范学院院级重点建设学科项目资助(05YJJXK03)。

作者简介:邱璐(1965—),女,重庆人,云南省楚雄师范学院副教授,硕士,主要从事植物组织培养及转基因研究工作。

Tissue culture system of *Cynanchum otophyllum* in genetic transformation

QIU Lu¹, WANG Bo¹, FAN Shu-guo¹, LUO Chun-mei², LI Yan-hua², CHEN Kai¹,

ZHOU Yin-yan¹, YANG Qi-guo¹, YANG Fu-suo¹

(1. Chuxiong Normal University, Chuxiong 675000, China; 2. Chuxiong Agricultural School, Chuxiong 675000, China)

Abstract: Objective To establish the tissue culture system of *Cynanchum otophyllum* in genetic transformation. **Methods** Asepsis seedling was set up by using different explant parts, disinfectors, and disinfecting time. The callus was induced, bred, and differentiated by using different media, different hormone categories and combinations, and different hormone concentrations of 2,4-D and KT. **Results** It was the best method that asepsis seeding was built up by using seed as the explant and using 10% NaClO to treat the seed for 20—30 min or using 0.2% HgCl₂ to treat the stem for 3 min. The seed, root, stem, and leaf of *C. otophyllum* can form callus easily. The 2,4-D was important in forming callus. *C. otophyllum* was more sensitivity to KT. The effect was better when KT was used to induce callus or adventitious buds. MS+2,4-D 1.0 mg/L+KT 1.0 mg/L was the better medium to induce callus to form. The callus can't be induced to form adventitious buds without reference to using seed or root, stem, and leaf as the explant, without reference to using hormone 6-BA or KT, ZT, 2ip. Gentamicin 100 µg/mL is the optimum pressure in genetic transformation of *C. otophyllum*. **Conclusion** The seed or stem is the ideal material bombarded by particle gun that is induced to form callus for 14 d in the media MS+2, 4-D 1.0 mg/L+KT 1.0 mg/L and without forming adventitious buds.

Key words: *Cynanchum otophyllum* Schneid.; tissue culture; callus; adventitious bud; genetic transformation; optimum pressure

青羊参 *Cynanchum otophyllum* Schneid., 为萝藦科牛皮消属 *Cynanchum* Linn. 的多年生草质藤本, 在《滇南本草》中又名白薇, 在云南丽江又名白首乌, 民间又称之为白岑、奶浆草。分布于云南、四川、广西、贵州、西藏等地, 多生长在海拔 1 100~2 500 m 的亚热带山地草丛中。是一种重要的药用植物, 以根部入药, 但根有毒。民间用作滋补强壮, 治疗腰痛、风湿骨痛、小儿惊风症、头晕、耳鸣、心慌、毒蛇咬伤等。根中主要含青羊参苷甲和青羊参苷乙, 临床上具有较好的抗惊厥作用, 对癫痫和迁延性肝炎有较好疗效。目前, 已从根部提取青羊参总苷生产青羊参片剂与健脑克癲片, 用于癫痫病、脑震荡后遗症、美尼尔氏综合症等^[1]。关于青羊参组织培养的研究报道较少, 而关于青羊参遗传转化的研究未见报道。本实验对青羊参遗传转化中组织培养系统进行了详细研究, 为青羊参遗传转化、离体培养、种质资源开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料: 青羊参的种子及茎段均采自云南省楚雄农校药园。

1.2 不同外植体部位、不同消毒剂、不同消毒时间对无菌苗建立的影响: 以 MS 为基本培养基, 以 2, 4-D 1.0 mg/L+KT 1.0 mg/L 为激素配比, 以青羊参的种子、幼嫩茎段作外植体。用 10% NaClO 作为消毒剂, 设置消毒时间为 15、20、25、30 min; 用

0.2% HgCl₂ 消毒, 设置消毒时间为 2、2.5、3、3.5、4 min 进行对照, 以筛选出最佳的外植体部位、最佳消毒剂种类及浓度。消毒后用无菌水冲洗外植体 5~8 次, 茎段直接接种, 种子用无菌水浸泡 5~10 h 后接种。消毒剂消毒前均用洗涤剂水清洗材料 5 min, 再用流水冲洗材料 5 min。

1.3 不同基本培养基对愈伤组织诱导的影响: 以青羊参无菌种子为材料, 以 MS 为基本培养基, 以 2, 4-D 1.0 mg/L+KT 1.0 mg/L 为激素种类及配比, 以 MS、1/2MS (大量元素及微量元素减半, 其他不变) 为对照, 以筛选出诱导愈伤组织的最佳基本培养基。蔗糖 30 g/L, 琼脂 7.5 g/L, pH 值 5.8 (灭菌前), 培养温度 22~25 °C, 接种后暗处理 30 d 进行统计 (以下同)。

1.4 不同外植体部位对愈伤组织诱导的影响: 以 MS 为基本培养基, 以 2, 4-D 1.0 mg/L+KT 1.0 mg/L 为激素种类及配比, 以青羊参的无菌种子及无菌苗的根、茎、叶为材料, 对青羊参的种子、根、茎、叶形成愈伤组织的能力进行对照。

1.5 不同激素种类及配比对愈伤组织诱导的影响: 以种子为外植体, 以 MS 为基本培养基, 设置 7 组不同种类及配比的激素进行对照, 以筛选出最佳激素种类及配比。第 1 组: 2, 4-D 1.5 mg/L; 第 2 组: 2, 4-D 1.5 mg/L+6-BA 1.5 mg/L; 第 3 组: 2, 4-D 1.5 mg/L+KT 1.5 mg/L; 第 4 组: 2, 4-D 1.5 mg/L+ZT 1.5 mg/L; 第 5 组: 2, 4-D 1.5 mg/L+2ip 1.5

mg/L;第 6 组:2,4-D 1.5 mg/L+NAA 1.5 mg/L;第 7 组:6-BA 1.5 mg/L+NAA 1.5 mg/L。

1.6 不同质量浓度的 KT 与 2,4-D 对愈伤组织继代的影响:以无菌苗的茎段为外植体,以 MS 为基本培养基,设置 4 组不同的 KT 与 2,4-D 质量浓度进行对照,以筛选出愈伤组织继代的最佳 KT 与 2,4-D 质量浓度。第 1 组:KT 1.5 mg/L+2,4-D 1.5 mg/L;第 2 组:KT 1.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L;第 3 组:KT 0.5 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L;第 4 组:KT 0.1 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L。

1.7 不同激素种类及配比对不定芽形成的影响:以无菌苗的茎段为外植体,以 MS 为基本培养基,设置 5 组不同种类及配比的激素进行对照,以筛选出不定芽形成的最佳激素种类及配比。第 1 组:6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L;第 2 组:KT 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L;第 3 组:ZT 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L;第 4 组:2ip 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L;第 5 组:6-BA 1.0 mg/L。暗培养 1 周后光照,光照时间 15 h/d,光照强度 2 000 lx(以下同)。

1.8 不同质量浓度的 KT 与 NAA 对不定芽形成的影响:以无菌苗的茎段为外植体,以 MS 为基本培养基,设置 5 组不同质量浓度的激素进行对照,以筛选出不定芽形成的最佳 KT 与 NAA 质量浓度。第 1 组:KT 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L;第 2 组:KT 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L;第 3 组:KT 0.3 mg/L+NAA 0.15 mg/L;第 4 组:KT 0.1 mg/L+NAA 0.02 mg/L。以上培养基细胞分裂素与生长素的比例均为 5:1。

1.9 青羊参对庆大霉素(Gent.)敏感性测定:以青羊参的种子在 MS+2,4-D 1.0 mg/L+KT 1.0 mg/L 上形成的愈伤组织为材料,以 MS 为基本培养基,以 KT 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 为激素种类及配比,在培养基中分别加入 0、25、50、75 μ g/mL 的庆大霉素进行青羊参敏感性对照实验。

1.10 统计方法:使用 Spss13.0 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 不同外植体部位、不同消毒剂、不同消毒时间对无菌苗建立的影响:以青羊参种子为外植体,以 10%NaClO 消毒 20~30 min,有 90%~100%的无菌率,85%~95%的萌发率。10%NaClO 消毒青羊参的茎段 30 min 也有一定的效果,NaClO 对外植体的损伤较小,只要不污染的茎段均能成活,但污染率较高,高达 55%。0.2%HgCl₂ 消毒茎段 3.0 min 效果较好,有 60%的无菌率和 50%的成活率,但 0.2%HgCl₂ 消毒种子,无菌率虽然较高,种子萌发率却较低。对表 1 的无菌率及成活率进行统计分析,结果表明:以种子作外植体,10%NaClO 消毒 30 min 与 0.2%HgCl₂ 消毒 2 min 的无菌率差异极显著, $u_c = 3.179 > u_{0.01}$, $P < 0.01$;萌发率差异也极显著, $u_c = 5.805 > u_{0.01}$, $P < 0.01$,说明 10%NaClO 消毒种子 20~30 min 明显优于 0.2%HgCl₂ 消毒种子 2 min。以茎段作外植体,10%NaClO 消毒 30 min 与 0.2%HgCl₂ 消毒 3 min 的无菌率差异不显著, $u_c = 1.27 < u_{0.05}$, $P > 0.05$;成活率差异也不显著, $u_c = 0 < u_{0.05}$, $P > 0.05$,说明 10%NaClO 消毒茎段 20~30 min 与 0.2%HgCl₂ 消毒 2 min 均有效果。

表 1 不同外植体部位、不同消毒剂、不同消毒时间对无菌苗建立的影响

Table 1 Influence of different explants parts, disinfectors, and disinfecting times on aseptis seedling forming

消毒剂种类	消毒时间/ min	种 子					茎 段				
		接种数	未污染数	成活数	无菌率/%	萌发率/%	接种数	未污染数	成活数	无菌率/%	成活率/%
10%NaClO	15	20	15	13	75	65	20	0	0	0	0
	20	20	18	17	90	85	20	4	4	20	20
	25	20	20	18	100	92	20	7	7	35	35
	30	20	20	19	100	95	20	9	9	45	45
0.2%HgCl ₂	2.0	20	9	10	45	50	20	5	5	25	25
	2.5	20	16	7	80	35	20	8	8	40	40
	3.0	20	18	6	90	30	20	12	10	60	50
	3.5	20	20	5	100	25	20	16	5	80	25
	4.0	20	20	1	100	5	20	18	3	90	15

2.2 不同基本培养基对愈伤组织诱导的影响:愈伤组织在 MS 培养基上不仅形成时间早,而且愈伤诱导率高(97%),愈伤长势旺。而在 1/2MS 培养基上虽愈伤诱导率也较高(95%),但愈伤形成时间晚,愈伤长势不如 MS。对表 2 的愈伤诱导率进行统计分析,结果表明, $u_c = -0.5566 < u_{0.05}$, $P > 0.05$,MS

与 1/2MS 的愈伤诱导率差异不显著。但从愈伤组织形成时间、愈伤组织长势来看,MS 培养基明显优于 1/2MS 培养基。

2.3 不同外植体部位对愈伤组织诱导的影响:青羊参的种子、根、茎、叶在 MS+2,4-D 1.0 mg/L+KT 1.0 mg/L 中易于形成愈伤组织。在愈伤组织形成的

表 2 不同基本培养基对愈伤组织诱导的影响

Table 2 Influence of different media on callus inducing

基本培养基	形成愈伤的时间/d	愈伤诱导率/%	愈伤长势
MS	5	97	最好
1/2MS	10	95	好

同时,种子形成的愈伤组织中总有 1 个芽形成,观察发现是胚芽萌发形成;茎段形成的愈伤组织中总有 2 个芽形成,而且是由茎段最基部的两个腋芽形成。根和叶形成的愈伤组织没有观察到芽形成,见图 1。对表 3 的愈伤诱导率进行统计分析,结果表明: $u_c = -0.1613 < u_{0.05}, P > 0.05$,种子、根、茎和叶的愈伤诱导率差异不显著。但从愈伤组织形成的时间、长势及不定芽形成数来看,种子、茎形成愈伤组织的能力优于叶,叶形成愈伤组织的能力优于根。



图 1 青羊参种子在 MS+2,4-D 1.0 mg/L+KT 1.0 mg/L 上形成的愈伤组织

Fig. 1 Callus from *C. otophyllum* seed in media MS+2, 4-D 1.0 mg/L+KT 1.0 mg/L

2.4 不同激素种类及配比对愈伤组织诱导的影响:青羊参的种子在①~⑦号培养基中均能诱导愈伤组织形成,且形成率均高达 100%。但愈伤组织的长势有较大差异,③号培养基中的愈伤组织具有较快的生长速度和较强的生长活性,长势最好,明显优于其他培养基。②、④、⑤培养基诱导愈伤组织的效果不如③,但比①效果好,①效果优于⑥、⑦。①~⑦培养

基中胚芽形成,但都只有一个芽形成。在以青羊参无菌苗的茎段为材料的重复实验中,结果相同,而且③号培养基诱导青羊参愈伤组织形成的优势更为显著,见表 4。

表 3 不同外植体部位对愈伤组织诱导的影响

Table 3 Influence of different explants parts on callus inducing

外植体的部位	愈伤形成时间/d	愈伤诱导率/%	愈伤长势	愈伤颜色	不定芽形成数
种子	7	96	较好	黄白色	1
根	13	100	一般	黄白色	0
茎	9	100	最好	黄白色	2
叶	10	100	好	黄白色	0

表 4 不同激素种类及配比对愈伤组织诱导的影响

Table 4 Influence of different hormone categories and combinations on callus inducing

序号	培养基激素配比	愈伤形成时间/d	愈伤诱导率/%	愈伤长势	愈伤颜色
①	MS+2,4-D1.5	11	100	一般	黄白色
②	MS+2,4-D1.5+6-BA1.5	10	100	好	黄白色
③	MS+2,4-D1.5+KT1.5	8	100	最好	黄白色
④	MS+2,4-D1.5+ZET1.5	10	100	好	黄白色
⑤	MS+2,4-D1.5+2ip1.5	11	100	好	黄白色
⑥	MS+2,4-D1.5+NAA1.5	12	100	差	黄白色
⑦	MS+6-BA1.5+NAA1.5	11	100	差	黄白色

2.5 不同质量浓度的 2,4-D 与 KT 对愈伤组织继代的影响:青羊参的愈伤组织在③号组合 1/2MS+2,4-D 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L 中继代具有最好效果,愈伤长势旺,生命力强,体积成倍增长时间短。在①号组合 1/2MS+2,4-D 1.5 mg/L+KT 1.5 mg/L 中,愈伤也有较旺的长势,但愈伤易老化,变为深黄色,进而变成黑褐色,失去生命力。在②号组合 1/2MS+2,4-D 1.0 mg/L+KT 1.0 mg/L 中继代的愈伤也有一定程度的老化现象,见表 5 及图 1。

表 5 不同质量浓度的 2,4-D 与 KT 对愈伤组织继代的影响

Table 5 Influence of different hormone concentrations of 2, 4-D and KT on callus breeding offspring

序号	培养基激素配比	愈伤形成时间/d	愈伤体积翻倍增加所需时间/d	愈伤长势	愈伤颜色	愈伤老化
①	MS+2,4-D1.5+KT1.5	3	14	最好	深黄色	明显
②	MS+2,4-D1.0+KT1.0	3	15	最好	黄白色	不明显
③	MS+2,4-D0.5+KT0.5	3	17	较好	黄白色	无
④	MS+2,4-D0.1+KT0.1	3	20	好	黄白色	无

2.6 不同激素种类及配比对不定芽形成的影响:青羊参的种子在②号培养基 MS+KT 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 中成苗最快,苗最高,长势最好,但只有胚芽形成的一个苗,无不定芽形成。在以青羊参无菌苗的茎段为材料的重复实验中,结果相同,②号培养基诱导茎段的腋芽成苗具有显著优势,每个茎段最基部的一个腋芽均能形成苗,但无不定芽形成。

在以青羊参在 MS+2,4-D 1.0 mg/L+KT 1.0 mg/L 上继代的愈伤组织为材料的重复实验中,不论愈伤组织是来源于茎段,还是来源于叶、根、茎、种子,均无不定芽形成,而且愈伤组织很难由黄白色转变为绿色,见表 6,图 2~4。

2.7 不同质量浓度的 KT 与 NAA 对不定芽的影响:①~④号组合均不能诱导愈伤组织形成不定芽,但均

表 6 不同激素种类及配比对不定芽形成的影响
Table 6 Influence of different hormone categories and combinations on adventitious bud inducing

序号	培养基激素配比	形成胚芽的时间/d	形成苗数	苗高	叶宽	苗的长势
①	MS+6-BA1.0+NAA0.2	14	1	3.5	0.35	好
②	MS+KT1.0+NAA0.2	8	1	6.0	0.40	最好
③	MS+ZT1.0+NAA0.2	15	1	3.0	0.30	一般
④	MS+2ip1.0+NAA0.2	12	1	2.5	0.20	一般
⑤	MS+6-BA1.0	17	1	1.5	0.10	差

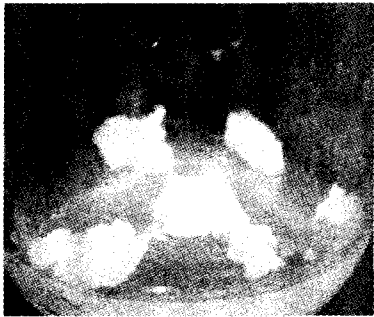


图 2 青羊参在 MS+2,4-D 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L 上继代的愈伤组织

Fig. 2 Callus breeding offspring of *C. otophyllum* in media MS+ 2,4-D 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L



图 3 愈伤组织在培养基 MS+KT 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 未分化成苗

Fig. 3 Callus unforming adventitious buds in media MS+KT 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L



图 4 种子在 MS+KT 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 中形成愈伤组织和苗

Fig. 4 Callus and adventitious buds from seed in media MS+KT 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L

能 100% 诱导腋芽萌发, ②号组合 MS+KT 0.5+NAA 0.1 诱导青羊参腋芽萌发的效果最好。不仅腋

芽萌发所需时间最短, 而且芽长势最好。①号组合 MS+KT1.0+NAA0.2 诱导芽萌发也有较好效果, 但苗在生长后期有枯叶现象。③、④号培养基中苗的长势均不如②号, 见表 7。

表 7 不同质量浓度的 KT 与 NAA 对腋芽的影响
Table 7 Influence of different concentrations of KT and NAA on axillary bourgeoning

序号	培养基激素配比	形成不定芽的时间/d	芽诱导率/%	苗长势	有无愈伤形成
①	MS+KT1.0+NAA0.2	8	100	较好	有
②	MS+KT0.5+NAA0.1	9	100	最好	有
③	MS+KT0.3+NAA0.15	11	100	好	有
④	MS+KT0.1+NAA0.02	12	100	一般	有

2.8 青羊参对庆大霉素敏感性测定: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的庆大霉素为转基因植物最佳选择压力, 在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度的培养基中, 所有愈伤均褐变死亡。而在 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度的培养基中, 仍有 20% 的愈伤能正常生长, 因此不宜作为最佳选择压力。对表 8 的死亡率进行统计分析, 结果表明, $\chi^2 = 275.64 > \chi^2_{0.01} = 13.28, P < 0.01$, 说明不同庆大霉素质量浓度间差异极显著。

表 8 青羊参对庆大霉素敏感性测定
Table 8 Measurement of *C. otophyllum* sensitivity on Gentamicin

庆大霉素/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	非转基因材 料的 颜色	非转基因材 料的 长势	死亡率 /%
0	愈伤黄白色	较好	0
25	大多黄白色	好	20
50	大多黄白色	一般	40
75	少数为黄白色	差	80
100	黑褐色	较差	

3 讨论

3.1 青羊参的果实为闭果, 种子具有较高的清洁度。另外, 青羊参为草质攀援藤本, 茎尖离地面较远, 植株表面无毛状附属物, 其幼茎也具有较好的清洁度。因此, 以青羊参的种子或幼茎作外材, 易于消毒。使用 10% NaClO 对青羊参的种子进行消毒, 具有较高的无菌率, 同时又不毒害种子, 具有较好的萌发率。10% NaClO 对幼茎的毒害较小, 但消毒效果不够理想, 无菌率低, 仅 45%。0.2% 的 HgCl_2 消毒幼茎 3 min 效果较好, 超过 3 min, 无菌率虽高, 但材料中毒现象明显, 死亡率较高。0.2% 的 HgCl_2 不仅对幼茎有毒害作用, 而且对种子的毒害作用更大, 0.2% 的 HgCl_2 消毒种子, 虽然无菌率很高, 但萌发率较低。

3.2 青羊参易于形成愈伤组织, 不论是青羊参的种子, 还是根、茎、叶均易形成愈伤组织。在表 4 的实验

中,有 2,4-D 的①~⑤号培养基效果优于无 2,4-D 的⑥与⑦号,说明 2,4-D 对青羊参愈伤组织的形成是必要的,其效果优于 NAA。②、④、⑤培养基诱导愈伤组织的效果优于①、⑥及⑦号,说明生长素 2,4-D 与细胞分裂素配合诱导青羊参愈伤组织的形成是必要的,其效果优于生长素 2,4-D 与生长素 NAA 配合^[2]。青羊参对细胞分裂素 KT 较为敏感,不论 KT 与 2,4-D 配合诱导愈伤组织形成,还是 KT 与 NAA 配合诱导腋芽萌发,均有较为显著的效果。

3.3 青羊参不易形成不定芽,青羊参的愈伤组织不论来源于种子,还是来源于根、茎、叶;不论使用激素 6-BA,还是使用 KT、ZT、2ip,均未观察到愈伤组织分化形成不定芽。而且愈伤组织在光照条件下由黄色转变为绿色速度极慢,转化率极低。在由种子、茎段直接诱导芽形成中,除种子的顶芽、茎段基部的腋芽能萌发成苗外,没有观察到不定芽的形成。在由种子、茎段诱导愈伤组织的形成中,每粒种子形成的愈伤组织中总有一个苗形成,每个茎段形成的愈伤中也总有一个苗形成。经研究发现,这些苗来源于种子的胚芽、茎段最基部的腋芽,不是来源于愈伤组织。这与青羊参在遗传上具有较强的顶端优势有较大关系^[1],顶端优势抑制了靠近顶芽的腋芽萌发,只有距顶芽最远的腋芽萌发成苗。

2,4-D 对大多植物愈伤组织的形成是必要的,但 2,4-D 的使用往往导致某些植物愈伤组织不能分化成芽^[3],这可能是该实验中未观察到愈伤组织分化成芽的一个原因。

生长素的浓度与木质部分化过程之间存在着一种反比关系,而木质部中管胞的分化率与细胞分裂素的浓度成正相关^[3]。本实验使用了 1:5 的生长素与细胞分裂素诱导不定芽形成,该比例不够恰当,细胞分裂素的浓度不够高,而生长素的质量浓度不够低可能是该实验中未观察到愈伤组织分化成芽的第 2 个原因。

糖的种类和质量浓度对愈伤组织的分化有较大影响,不同植物愈伤组织分化所需的糖质量浓度各不相同,有的植物 1.5% 的蔗糖便能促进木质部分化,而有的植物要 8% 的蔗糖才能促进木质部分化^[3]。本实验仅使用了 3% 的蔗糖,蔗糖质量浓度的梯度范围不够,可能是该实验中未观察到愈伤组织分化成芽第 3 个原因。

高质量浓度的还原态氮有利于胚胎发生,一般还原态氮和氧化态氮的最适合比例为 10 mmol/L NH_4Cl 和 40 mmol/L KNO_3 ^[3] 即 $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^- = 1 : 4$ 。本实验使用了 $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^- = 1 : 2$, NH_4^+ 与 NO_3^- 的绝对质量浓度及比例的不恰当可能是该实验中未观察到愈伤组织分化成芽第 4 个原因。

有报道在一个马铃薯品种叶肉原生质获得的愈伤组织中,只有在培养基中加入 0.2~0.3 mol/L 的甘露醇才可能出现茎芽的分化,否则愈伤组织不能变绿,而愈伤组织变绿是芽分化的前提^[3]。本实验中发现青羊参的愈伤组织不易变绿,有必要在培养基中添加甘露醇开展进一步的研究。

另外加入水解酪蛋白,提高培养基中 PO_4^{3-} 的水平,减少愈伤组织继代次数也能促进芽分化^[3],这些因素是否有助于青羊参的愈伤组织分化成芽将在下一步的实验中作进一步的研究。

3.4 青羊参通过基因枪介导转基因时,选择种子或茎段在 MS+2,4-D 1.0 mg/L+KT 1.0 mg/L 培养基上萌动 14~15 d 形成愈伤(表 5),但未形成苗的材料作为基因枪轰击材料较好。植物转基因过程中,常在目的基因上携带抗生素抗性基因作为转基因识别标志,如庆大霉素抗性基因。因此常在培养基中加入抗生素作为转基因抗性植物的选择压力,凡被基因枪轰击而成功转基因的胚芽细胞或腋芽细胞能在含有庆大霉素的选择培养基中正常成苗,而未被成功转基因的细胞不能在选择培养基中成活^[4~6]。100 $\mu\text{g/mL}$ 的庆大霉素是青羊参转基因植株筛选的最佳压力。

References:

- [1] Li Q Z. *The Study on the Planting Technology of Cynanchum otophyllum Schneid* [D]. Kunming: Yunnan Agricultural University, 2005.
- [2] Zhao P J, Gan F Y, Zhu N, et al. Studies on the tissue culture of *Cynanchum otophyllum* and calli chemical constituents [J]. *Chin Bull Bot*, 2003, 20(5): 565-571.
- [3] Xiong L, Wu L F. *The Tissue Culture and Mass Produce of Admire Flower* (观赏花卉的组织培养与大规模生产) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003.
- [4] Gu H Y, Qu L J, Ming X T, et al. *Plant Genes and Molecular Manipulations* (植物基因与分子操作) [M]. Beijing: Peking University Publishing House, 1995.
- [5] Qu L J, Gu H Y, Fu P, et al. *Introduction to Modern Biotechnology* (现代生物技术介绍) [M]. Beijing: Higher Education Publishing House, 2002.
- [6] Qiu L, Qu L J. The study of tissue culture system on *Erigeron breviscapus* (Vant) Hand.-Mazz. in genetic transformation [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2006, 34(1): 19-22.