

黄连的组培再生及遗传转化研究

吴平平, 郭惠芳, 简自敏, 姚明镜*

华中农业大学植物科学技术学院药用植物研究所, 湖北 武汉 430070

摘要: 目的 建立黄连的组培再生及遗传转化体系。方法 以黄连子叶和下胚轴为外植体, 用不同的基本培养基添加不同种类及浓度的植物生长调节剂进行组培再生研究; 利用基因枪转化法研究黄连胚性愈伤组织和遗传转化。结果 子叶和下胚轴在 MS 培养基上愈伤诱导率分别可达 86.31% 和 54.34%; 与 MS 培养基相比 6, 7-V 培养基可获得更高的愈伤诱导率和增殖率; 诱导愈伤组织最适宜的激素组合为 0.5 mg/L 2, 4-D+0.5 mg/L KT; 不同细胞分裂素培养的愈伤组织颜色和质地差异明显; 0.5 mg/L KT+0.5 mg/L IAA 与 1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 组合可诱导出胚性愈伤组织, 产生体细胞胚; 无激素的 6, 7-V 培养基可维持胚性愈伤组织的不断生长; 含 1 mg/L GA₃+0.5 mg/L IBA 的 6, 7-V 培养基可使体细胞胚萌发成苗; 转化后的胚性愈伤组织经 3 mg/L 除草剂 Basta 筛选, 检测到 β-葡萄糖苷酸酶 (GUS) 阳性, PCR 检测再生植株膦丝菌素乙酰转移酶基因 (bar) 阳性。结论 建立并完善了黄连的组织培养再生体系, 并在此基础上利用转基因技术获得了具有相关性状的植株, 实现了黄连的遗传转化, 为黄连性状的遗传改良奠定了基础。

关键词: 黄连; 愈伤组织; 体细胞胚; 组培再生; 遗传转化

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)17-2460-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.17.022

Tissue culture regeneration and genetic transformation of *Coptis chinensis*

WU Ping-ping, GUO Hui-fang, LIN Zi-min, YAO Ming-jing

Institute of Medicinal Plant, College of Plant Science and Technology of Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract: Objective To establish the system of tissue culture regeneration and gene transformation for *Coptis chinensis*. **Methods** The cotyledon and hypocotyl of *C. chinensis* were used as explants, and the effects of different basic media with different plant growth regulators on *in vitro* tissue culture regeneration were compared; The embryogenic calli of *C. chinensis* were used as recipients for genetic transformation by particle bombardment method. **Results** The induction rates of cotyledon and hypocotyl were 86.31% and 54.34%, respectively; The 6, 7-V medium was more suitable for callus induction and proliferation rate of *C. chinensis* than the MS medium. The optimal hormone combination for callus induction was 0.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L KT in MS medium; Either the appropriate concentration of cytokinin alone or the combination of both cytokinin and auxin could induce the continuous proliferation of calli; However, only the hormone combination 0.5 mg/L KT + 0.5 mg/L IAA and 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA could generate the somatic embryos. 6, 7-V medium in absence of hormone could maintain the continuous growth of the embryogenic calli. The somatic embryos could germinate and grow up to plantlets on 6, 7-V medium containing 1 mg/L GA₃ + 0.5 mg/L IBA. The embryogenic calli were transformed by particle bombardment method and screened under 3 mg/L Basta, then the activity of β-glucuronidase was detected. PCR analysis showed that the bar gene was successfully transferred to the regenerated plants. **Conclusion** The tissue culture regeneration and genetic transformation system of *C. chinensis* is established, which lays the foundation for its genetic improvement.

Key words: *Coptis chinensis* Franch.; callus; somatic embryos; tissue culture regeneration; genetic transformation

黄连 *Coptis chinensis* Franch. 为毛茛科黄连属植物, 又名味连、川连、鸡爪连, 具降火燥湿、抗菌止痢等多种药理作用^[1]。黄连市场需求量大, 种质资源相对匮乏^[2]。利用基因工程手段可丰富和优

化黄连种质资源, 解决其资源匮乏和可持续利用等问题。建立有效的离体再生系统可用于黄连濒危种质的保存, 也是实现黄连定向遗传改良的前提。

黄连是极难诱导再生的药材品种之一, 国内对

收稿日期: 2012-12-17

基金项目: 教育部高校自主科研专项华中农业大学资助项目 (52204-07021)

作者简介: 吴平平 (1987—), 女, 湖北黄冈人, 在读硕士研究生, 研究方向为特种植物育种与栽培。E-mail: wppk@163.com

*通信作者 姚明镜 E-mail: mjyao@mail.hzau.edu.cn

其再生的研究大多集中在组织培养及诱导愈伤组织^[2-5], 1989年成功诱导出黄连胚状体^[6-8], 利用转基因技术对黄连进行品种改良则未见报道, 而日本于2005年成功地利用农杆菌介导转化法建立了日本黄连转基因体系^[9]。本实验旨在优化黄连的再生途径, 并对黄连的遗传转化进行探索, 为我国黄连的遗传改良工作奠定基础。

1 材料

供试黄连品种为味连 *Coptis chinensis* Franch., 采自湖北省利川市福宝山, 由华中农业大学植物科学技术学院药用植物研究所王沫教授鉴定。质粒载体为 pCAMBIA3301: T-DNA 中含有 β -葡萄糖苷酸酶基因 (gus) 和膦丝菌素乙酰转移酶基因 (bar)。

2 方法

2.1 培养基配制

MS 培养基: MS 基本培养基^[10]+30 g/L 葡萄糖+6.5 g/L 琼脂, pH 5.8。6, 7-V 培养基: 6, 7-V 基本培养基^[11]+30 g/L 葡萄糖+6.5 g/L 琼脂, pH 5.8。

2.2 愈伤组织的诱导

将种子发芽苗洗净, 依次用 75%乙醇消毒 30 s、0.1%的升汞消毒 7 min, 无菌水洗净后下胚轴切成约 2 mm 的切段、子叶切成约 2 mm×2 mm 的小片为外植体。将外植体置于添加不同质量浓度 2, 4-D (0、0.5、1.0、2.0 mg/L)、KT (0、0.5 mg/L) 的 MS 培养基上诱导愈伤。

2.2.1 培养基的比较 将外植体接种于添加 1.0 mg/L 2, 4-D、0.5 mg/L KT 的 6, 7-V 培养基和 MS 培养基上, 比较不同基本培养基对愈伤诱导的影响。将直径约 2 mm 的愈伤组织团置于添加 0.5 mg/L 2, 4-D、0.5 mg/L KT 的 6, 7-V 培养基和 MS 培养基上, 比较两种基本培养基对愈伤增殖的影响。

2.2.2 愈伤组织的分化 将愈伤组织接种至含不同浓度的激动素 (KT, 0、1、2、3 mg/L)、玉米素 (ZT, 1、2、3 mg/L)、噻重氮苯基脲 (TDZ, 0.5、1、2、3 mg/L)、6-BA (1、2、3 mg/L)、IAA (0.5 mg/L)、NAA (0.5 mg/L)、2, 4-D (0.5、1、1.5 mg/L) 的 6, 7-V 培养基中, 40 d 后统计愈伤组织增殖情况与生长状态。

2.2.3 胚性愈伤组织的增殖 将分化出的胚性愈伤组织及胚状体接种于 6, 7-V 培养基上, 40 d 继代一次。

2.2.4 培养条件 温度 22 °C, 相对湿度约 60%, 16 h 光照/8 h 黑暗培养, 光强 1 200 lx。

2.3 体细胞胚萌发再生

选取成熟的体细胞胚, 接种至含 1 mg/L GA₃+0.5 mg/L IBA 的大量元素减半的 6, 7-V 培养基上, 胚萌发后移至含 0.5 mg/L IBA 的大量元素减半的 MS 培养基上, 待苗长至约 3 cm 高, 炼苗后移栽。

2.4 遗传转化

用胚性愈伤组织和幼小体细胞胚作受体, 0.6 μ m 金粉, 7 678 kPa/6 cm 条件下进行基因枪转化, 3 mg/L 除草剂 Basta 筛选抗性组织。用 β -葡萄糖苷酸酶 (GUS) 组织化学染色法^[12-13]对表现出抗性的胚性愈伤、体细胞胚、幼苗进行染色。用降落式 PCR 法进行 bar 检测。上游引物为 5'-CAAATCTCGGTGACG-GGCAGGA-3', 下游引物为 5'-CTGCACCATCGTC-AACCACTACATCG-3'。扩增片断长度为 489 bp。反应程序: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 重复 2 个循环; 随退火温度递减 2 °C 重复 2 个循环至退火温度为 44 °C 时重复 16 个循环; 72 °C 延伸 5 min, 10 °C 保温 1 h。

2.5 数据分析

实验材料每皿 30 个, 每处理 3~10 皿。采用 SAS 软件进行数据分析。

愈伤诱导率=出愈总数 / 外植体总数

愈伤增殖率=可增殖愈伤组织数 / 接入愈伤组织数

3 结果与分析

3.1 不同激素组合对愈伤诱导的影响

不同激素组合对黄连愈伤组织诱导的影响主要表现为: (1) 不加任何激素时外植体褐化死亡, 愈伤诱导率为 0。(2) 单独加入 0.5、1.0、2.0 mg/L 2, 4-D 能有效诱导愈伤组织形成, 但随质量浓度升高愈伤诱导率降低, 子叶作为外植体差异显著、下胚轴差异不显著。观察发现, 无论子叶还是下胚轴, 在 0.5 mg/L 2, 4-D 下愈伤组织生长状态良好, 质地随 2, 4-D 质量浓度增加愈伤含水量升高, 变得稀疏易褐化。(3) 在 0.5、1、2 mg/L 2, 4-D 作用时添加 0.5 mg/L KT 能有效提高愈伤诱导率。其中 0.5 mg/L 2, 4-D+0.5 mg/L KT 组合作用时, 长势良好, 质地疏松均一, 色泽亮黄, 愈伤诱导率最高, 子叶的愈伤诱导率可达 86.31%, 下胚轴可达 54.34%。综合考虑愈伤诱导率、质地、色泽、大小等指标, 采用 0.5 mg/L 2, 4-D+0.5 mg/L KT 激素组合可获得子叶和下胚轴最佳的愈伤组织诱导效果, 结果见表 1。

3.2 不同培养基对愈伤诱导及增殖的影响

实验结果表明, 在添加 1.0 mg/L 2, 4-D、0.5

表1 不同激素组合对黄连愈伤组织诱导的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of different hormone combinations on callus induction of *C. chinensis* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

外植体	组合	2,4-D/(mg·L ⁻¹)	KT/(mg·L ⁻¹)	愈伤诱导率/%
子叶	1	0	0	0.00±0.00 e
	2	0.5	0	26.61±4.62 c
	3	0.5	0.5	86.31±2.69 a
	4	1	0	9.66±7.18 de
	5	1	0.5	22.38±3.48 cd
	6	2	0	10.82±0.73 de
	7	2	0.5	16.25±2.18 b
下胚轴	1	0	0	0.00±0.00 c
	2	0.5	0	24.25±8.09 b
	3	0.5	0.5	54.34±10.99 a
	4	1	0	19.49±0.82 b
	5	1	0.5	23.93±3.66 b
	6	2	0	17.68±2.10 b
	7	2	0.5	24.95±1.55 b

不同字母表示经 LSD 分析有显著差异 ($P < 0.01$), 下同
 Different letters indicate no significant difference at $P < 0.01$ by LSD tests, same as below

mg/L KT 作用下, 愈伤组织诱导率在 MS 和 6, 7-V 基本培养基之间有显著差异。无论是以子叶还是下胚轴, 6, 7-V 培养基上愈伤诱导率均高于 MS 培养基, 且培养出的愈伤组织生长更快, 体积更大, 质地疏松均匀。在添加 0.5 mg/L 2, 4-D、0.5 mg/L KT 作用下, 愈伤组织增殖率在 MS 和 6, 7-V 基本培养基之间也有显著差异。所以, 与 MS 相比, 6, 7-V 培养基更适合黄连愈伤组织的生长。

3.3 愈伤组织的分化

如图 1 所示, 在不同种类的细胞分裂素作用下, 愈伤增殖率有所不同。加入 KT、6-BA、TDZ、ZT4 种细胞分裂素均能使愈伤组织生长, 其中 3 mg/L KT,

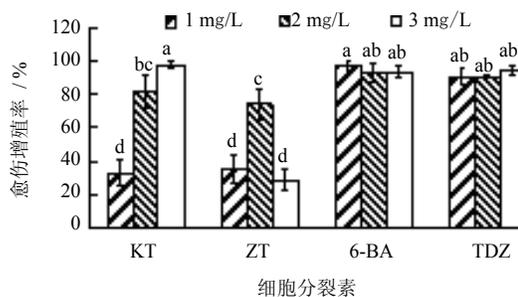


图1 细胞分裂素对愈伤组织增殖的影响

Fig. 1 Effects of cytokininson on callus multiplication

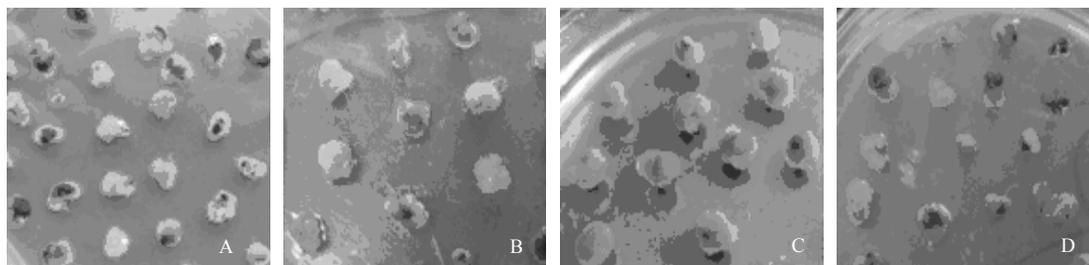
1~3 mg/L 6-BA, 1~3 mg/L TDZ 都可取得极高的增殖率, ZT 的增殖效果相对较差。

在不同种类的细胞分裂素作用下, 原有愈伤组织边缘都能长出新的愈伤组织, 但新增愈伤组织生长状态各异。具体表现为 KT 作用下的新愈伤呈黄绿色, 较致密, 偶有褐化现象出现 (图 2-A); 6-BA 作用下的愈伤淡黄色, 表面平整, 质地疏松, 体积较大 (图 2-B); TDZ 作用下的愈伤组织颜色亮黄, 整齐一致, 能不断增殖且不出现褐化发黑等现象 (图 2-C); ZT 作用下的愈伤组织为黄褐色, 块小, 致密坚硬, 表面极易褐化 (图 2-D)。

4 种细胞分裂素皆不能使愈伤组织分化, 仅能维持非胚性愈伤生长。

将愈伤组织接种至 9 种激素组合的培养基上, 结果表明, 不加任何激素, 愈伤组织不能正常增殖和分化, 逐渐老化死亡; 其余激素组合都能使愈伤增殖, 仅组合 5 和 9 能长出胚性愈伤 (表 2)。

其中 0.5 mg/L 2, 4-D+0.5 mg/L KT 组合最适合用于愈伤的继代培养, 继代培养 3 个月之后可观察到愈伤组织颜色变深至黑褐色, 质地更疏松, 水分充足, 愈伤呈颗粒状 (图 3-D)。



A-KT 作用下的愈伤形态 B-6-BA 作用下的愈伤形态 C-TDZ 作用下的愈伤形态 D-ZT 作用下的愈伤形态
 A-callus cultured with KT B-callus cultured with 6-BA C-callus cultured with TDZ D-callus cultured with ZT

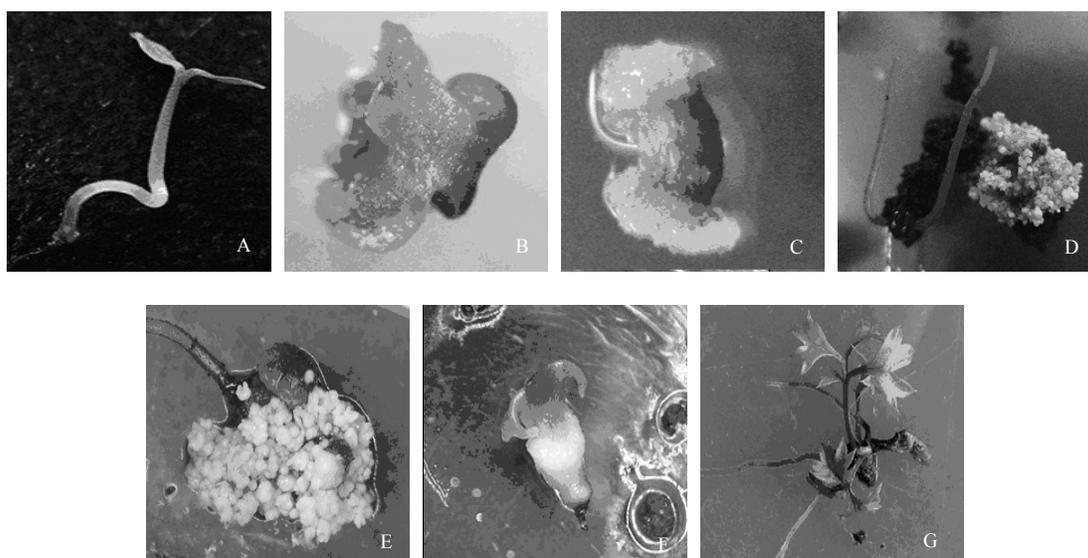
图2 不同细胞分裂素作用下愈伤组织的增殖

Fig. 2 Proliferation of calli treated with different cytokinins

表2 细胞分裂素与生长素组合作用对愈伤组织增殖率及分化的影响

Table 2 Effects of different combinations of auxins and cytokinins on callus multiplication rates and adventitious shoots

组合	激素 / (mg·L ⁻¹)							愈伤增殖率 / %	愈伤分化情况
	KT	NAA	ZT	6-BA	TDZ	IAA	2, 4-D		
1	0	0	0	0	0	0	0	0.00±0.00 d	愈伤变黑死亡
2	0.5	0	0	0	0	0	0.5	95.80±3.02 a	未见分化
3	0.5	0	0	0	0	0	1.0	66.51±6.68 c	未见分化
4	0.5	0	0	0	0	0	1.5	77.49±9.80 bc	未见分化
5	0.5	0	0	0	0	0.5	0	75.99±2.52 bc	分化出体细胞胚
6	0.5	0	0	0	0.5	0	0	8.49±1.36 d	未见分化
7	0	0.5	0	0	1.0	0	0	85.20±8.83 ab	未见分化
8	0	0.5	1.0	0	0	0	0	66.55±9.97 c	未见分化
9	0	0.5	0	1.0	0	0	0	81.57±6.62 abc	分化出体细胞胚



A-种子发芽幼苗 B-子叶诱导出的愈伤组织 C-下胚轴的愈伤组织 D-胚性愈伤形态 E-老胚膨大裂开, 空腔内出现大量的新胚 F-体细胞胚分化出叶与根 G-再生苗
 A-seedling B-callus induced from cotyledons C-callus induced from hypocotyls D-embryogenic callus E-somatic embryo expanded and dehisced, many embryogenic calli were produced F-somatic embryos germinated into normal plants G-regenerated plantlets

图3 黄连再生过程

Fig. 3 Regeneration process of *C. chinensis*

3.4 胚性愈伤的增殖

将胚性愈伤组织接种至不添加任何激素的6, 7-V培养基上, 持续培养, 可使胚性愈伤组织不断增殖。观察发现, 此种胚性愈伤组织可分化出大量的体细胞胚, 随着培养时间的增长体细胞胚能不断增多并长大。如果发育成熟的体细胞胚不能及时萌发成苗则体积不断膨大, 表面褐化并裂开, 在其裂开的空腔内可观察到大量的体细胞胚(图3-E), 此生长过程可不断循环, 2~3个月1个周期。

3.5 体细胞胚萌发成苗与移栽

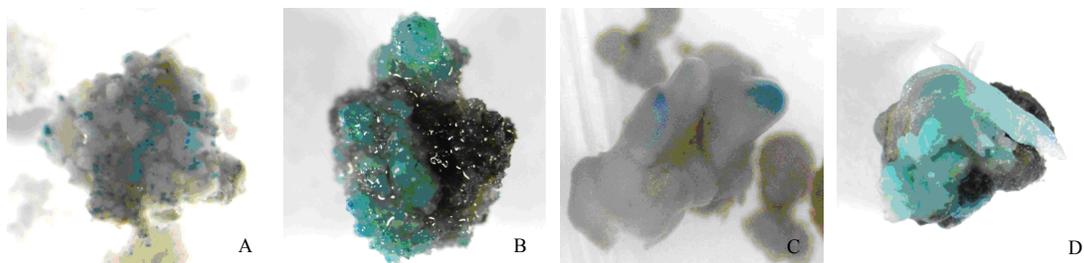
体细胞胚接种至含1 mg/L GA₃和0.5 mg/L IBA的6, 7-V培养基上约10 d就可观察到胚萌发, 根和叶片都开始伸展(图3-F)。分化出根和芽的胚可在添加1 mg/L IBA的1/2 MS培养基上长大。待其长至约3 cm高时, 即可进行移栽(图3-G)。

3.6 遗传转化

对筛选后存活组织进行GUS组织化学染色可见GUS阳性。筛选时间的长短与GUS阳性组织量的多

少密切相关, 筛选 40 d 的愈伤组织见图 4-A, 经过 80 d 筛选得到的愈伤组织见图 4-B, 有些胚染色后也可见蓝色(图 4-C), 再生苗也检测到 GUS 活性(图 4-D)。

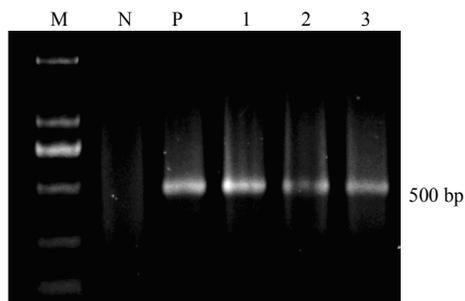
对再生苗叶片 DNA (CTAB 法) 进行 PCR 检测, 检测到 3 个样品扩增出明显的目标带(图 5)。表明目的基因已成功整合入黄连再生植株中。



A-筛选 40 d 的 GUS 阳性愈伤组织 B-筛选 80 d 的 GUS 阳性愈伤组织 C-黄连 GUS 阳性体细胞胚 D-黄连 GUS 阳性幼苗
A-GUS positive callus from 40 d herbicide screening B-GUS positive callus from 80 d herbicide screening
C-GUS positive somatic embryo D-GUS positive plantlets

图 4 黄连 GUS 检测结果

Fig. 4 GUS detection of *C. chinensis*



M-Marker N-空白对照 P-质粒样品 1~3 转基因黄连样品
M-Marker N-negative control P-positive control of plasmid
1-3 transgenic *C. chinensis*

图 5 转基因黄连 PCR 检测结果

Fig. 5 PCR detection of transgenic *C. chinensis*

4 讨论

黄连的再生受外植体来源、培养基成分、激素种类、浓度与配比等诸多因素的影响。前人研究黄连的再生主要采用的外植体有嫩叶、叶柄、茎^[7], 花葶、花蕾^[6]等, 都成功诱导出了愈伤组织, 但国内仅桂耀林等人采用叶片成功诱导黄连体细胞胚^[10]。本实验选用了子叶、下胚轴为外植体, 研究发现子叶愈伤诱导率比下胚轴高, 且子叶和下胚轴诱导出的愈伤组织在合适的激素作用下都可转化为胚性愈伤并发育成体细胞胚, 最终诱导成苗。本研究表明以黄连子叶和下胚轴为外植体可以有效的诱导出胚状体, 为黄连体细胞胚的诱导拓宽了外植体来源。

1989 年方周伯等^[4]的研究表明, 6, 7-V、ER、MS 3 种基本培养基中 6, 7-V 最适合用于培养黄连。

本研究对黄连子叶和下胚轴的培养也证明 6, 7-V 培养基比 MS 培养基更适合于黄连的组织培养。

黄连的组织培养在不同阶段对外源激素的需求不同。在愈伤组织诱导阶段, 2, 4-D 是有利的, 但浓度不宜过高; 加入合适浓度的 KT 可提高愈伤诱导率和生长速度, 改进愈伤质地。在愈伤增殖期间, 6-BA、KT、ZT、TDZ 等不同的细胞分裂素明显的影响了黄连愈伤组织的生理状态, 颜色和质地有明显差异, 特别是在 TDZ 作用下愈伤组织能在很多次继代和长时间培养的情况下保持相对快速、稳定和一致的状态。因此通过不同激素组合进行细胞培养, 研究黄连的次生代谢产物的诱导及产生机制等值得探讨。例如小檗碱的诱导和产生, 找到适合的培养条件和生产工艺, 建立植物生产发生器实现工厂化生产。胚性愈伤的产生与合适的激素组合密切相关, 诱导产生的愈伤组织转换成为胚性愈伤调控机制复杂, 桂耀林等^[6]采用 6-BA+NAA 组合诱导出胚状体, 本实验用 6-BA+NAA 和 KT+IAA 2 种组合都诱导出胚性愈伤组织和体细胞胚。分化出的胚状体可在无激素的 6, 7-V 的培养基上不断增殖, 培养 60~90 d 为一个周期, 在此过程中可观察到球形、心形、鱼雷型、及子叶期等各阶段的胚状体, 且此现象可不断循环。此生长状态至少能保持 3 年, 可用于黄连胚胎发育的相关研究。在体细胞胚萌发成苗阶段, 本研究尝试过单独使用 0.2~1.0 mg/L 的 IBA 以及 0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IBA 组合使用, 但结果均失败。1 mg/L GA₃+0.5 mg/L IBA 可以使胚状体发育成植株, 与前人研究结果一致^[10]。但

6-BA 对胚的成熟和长大有一定的促进作用。分化出芽和根的幼苗接入 1 mg/L IBA+1/2 MS 的培养基中可以得到较健壮的再生苗。

本研究采用基因枪转化方法成功将目的基因转入黄连, 为今后黄连的遗传转化工作提供重要的理论基础与技术支持。但因黄连生长种植周期在 5 年以上^[1], 获得可稳定遗传的转基因黄连品系和黄连的遗传改良工作仍然任重而道远。

参考文献

- [1] 吴德成. 利川黄连志 [M]. 北京: 中国文史出版社, 2004.
- [2] 胡之璧, 顾者珉, 黄炼栋, 等. 黄连的组织培养及有效成分的产生 [J]. 植物生理学通讯, 1988(6): 34-35.
- [3] 芮和凯, 忻晓君, 顾慧芬, 等. 中国黄连组织培养研究 II 中国黄连叶片愈伤组织培养中的激素调节 [J]. 中药材, 1989, 12(5): 12-13.
- [4] 方周伯, 卢萍, 杨斌, 等. 中国黄连愈伤组织的诱导及次生代谢产物 [J]. 西南农业学报, 1989, 2(4): 51-55.
- [5] 毛堂芬, 颜谦, 方周伯, 等. 黄连细胞培养物中小檗碱的分离与鉴定 [J]. 生物工程学报, 1997, 13(3): 284-288.
- [6] 桂耀林, 侯嵩生, 柯善强, 等. 黄连体细胞胚胎发生的研究 [J]. 植物学报, 1989, 31(12): 923-927.
- [7] 侯崇生, 桂耀林, 柯善强, 等. 黄连体细胞胚胎发生和植株再生 [J]. 武汉植物学研究, 1991, 9(2): 199-200.
- [8] 柯善强, 吴立东, 桂耀林, 等. 黄连体细胞胚胎发生的同步控制 [J]. 武汉植物学研究, 1992, 10(1): 1-4.
- [9] Shitan N, Kiuchi F, Sato F, *et al.* Establishment of Rhizobium-mediated transformation of *Coptis japonica* and molecular analyses of transgenic plants [J]. *Plant Biotechnol*, 2005, 22(2): 113-118.
- [10] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J]. *Physiol Plant*, 1962, 15: 473-497.
- [11] Veliky I A, Martin S M. A fermenter for plant cell suspension cultures [J]. *Can J Microbiol*, 1970, 16: 223-226.
- [12] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1987, 5: 387-405.
- [13] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants [J]. *EMBO J*, 1987, 6: 3901-3907.