

低能离子束注入芦荟茎尖的组织培养研究

尧俊英¹, 薛建平¹, 李景原^{2*}, 秦广雍²

(1. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450002;

2. 郑州大学 河南省离子束生物工程重点实验室, 河南 郑州 450052)

芦荟 *Aloe* 属百合科芦荟属多年生肉质常绿草本植物, 芦荟属植物含有多种药用成分, 其中主要是蒽醌类物质和多糖。《中国药典》一部 2000 年版记载, 中药芦荟胶具有清肝热、通便之功效^[1]。目前, 有关芦荟的繁殖和组织培养等已有许多研究报道, 但关于芦荟遗传改良方面的报道较为少见。低能离子束诱变技术已在农业和工业微生物育种方面取得了许多研究成果^[2], 但鲜见离子束在药用植物育种上的应用报道。通过低能离子束对芦荟的诱变效应, 有可能培养出活性成分(蒽醌类物质和多糖等)含量较高的芦荟新品种, 为芦荟的遗传改良开辟一条新途径。本实验初步研究了离子束处理芦荟茎尖以后对其组织培养的影响。

1 材料

实验材料选用库拉索芦荟 *A. vera*, 购于郑州市植物园。

2 方法

2.1 材料预处理 取长势良好的库拉索芦荟, 用解剖刀将其外面的叶片层层剥去, 露出茎尖。将剥出的茎尖洗净并稍微晾干后, 作为实验材料待用。

2.2 氮离子束注入 将供试芦荟茎尖进行离子束注入。离子注入在郑州大学离子束生物工程实验室完成, 注入离子为氮离子, 能量为 30 keV, 剂量分别为 3×10^{14} , 5×10^{14} , 1×10^{15} , 2×10^{15} , 1×10^{16} N^+ / cm^2 , 未进行离子束注入的茎尖作为对照。

2.3 材料消毒 离子束注入处理后, 将材料带入已灭菌的超净工作台中, 对材料进行消毒。消毒方法: 首先将茎尖在 70% 乙醇中浸泡 30 s, 再用 0.1% $HgCl_2$ 浸泡 10 min, 无菌水冲洗 6~7 次。将消毒后的茎尖接种到诱导分化培养基上, 放光照培养箱中培养(每瓶接种 3 个茎尖, 每处理 5 瓶), 培养温度

25 °C, 光照强度 1 500 lx, 光照时间 11 h · d⁻¹^[3]。

2.4 丛生芽诱导培养基 选用 MS 为基本培养基, 分别添加不同浓度的植物激素, 蔗糖 2.5%, pH 5.8~6.0, 用约 0.8% 的琼脂固化, 分装后在 121 °C 条件下灭菌 15 min, 见表 1。

表 1 培养基种类和成分 $mg \cdot L^{-1}$

No.	成分
1	MS + 6-BA 2.0 + NAA 0.1
2	MS + 6-BA 3.0 + NAA 0.1
3	MS + 6-BA 4.0 + NAA 0.1
4	MS + 6-BA 2.0 + NAA 0.1 + AC 0.1%
5	MS + 6-BA 3.0 + NAA 0.1 + AC 0.1%
6	MS + 6-BA 4.0 + NAA 0.1 + AC 0.1%
7	MS + 6-BA 2.0 + NAA 0.1 + AC 0.2%
8	MS + 6-BA 3.0 + NAA 0.1 + AC 0.2%
9	MS + 6-BA 4.0 + NAA 0.1 + AC 0.2%

3 结果与分析

3.1 不同剂量氮离子束注入对芦荟茎尖分化率的影响 经培养发现, 低剂量离子束注入过的茎尖, 在培养 1 周后就开始出芽, 比对照启动的还要早。离子束注入后芽的诱导状况见表 2, 生长状况见图 1, 由图可见, 低能离子束注入提高了芦荟组织培养的分化率, 增加了芦荟的分蘖。目前, 在紫外辐射方面的研究表明, UV-B 的增强对绝大部分植物有抑制或损伤作用, 植物通过多种适应机制来避免这种伤害, 如增厚蜡质层和角质层, 株型矮化, 增加分蘖等^[4]。低能离子束也是一种辐射, 芦荟增加分蘖很可能也是受到离子束辐射损伤后的一种适应机制。同时, 对于离子束诱变增加分蘖的现象在其他植物如水稻、小麦等方面也有报道。所以, 研究认为, 低能离子束注入增加了芦荟组培苗的分蘖, 与其他的辐射诱变效应相一致。

但是随着注入剂量的增加, 开始诱导出芽的时间在延长, 当注入剂量达到 $1 \times 10^{16} N^+ / cm^2$ 时, 从接种到外植体开始分化需要 2~6 个月之久。另外, 随着注入剂量的增加, 外植体的褐化现象较为严重、成

[收稿日期] 2007-08-16

[通讯作者] * 李景原, Tel: (0371) 67766804, E-mail: ljybot@

sina.com

活率也在降低,见图1。由此可见,低剂量离子束注入芦荟茎尖,能够促进芽的诱导,而当注入离子剂量太高时,对芽的形成则有抑制作用。因此,选择合适的诱变剂量也是离子束诱变育种成功的关键因素。本实验中挑选出的适合芦荟组织培养且组苗分化率高的离子注入剂量为 5×10^{14} , 1×10^{15} N^+/cm^2 。

表2 不同剂量离子束注入对芦荟茎尖出芽的影响

剂量/ N^+/cm^2	接种茎尖数/个	出芽时间/d	每株出芽数/个
0	15	6	5
3×10^{14}	15	7	20
5×10^{14}	15	9	25
1×10^{15}	15	8	30
2×10^{15}	15	15	22
1×10^{16}	15	65	18

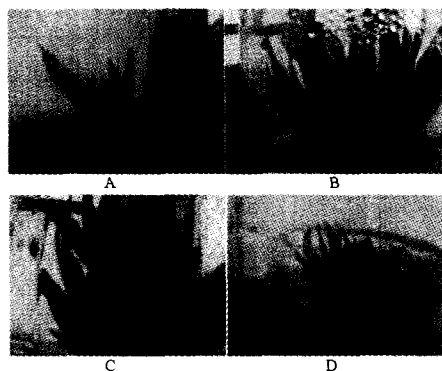


图1 不同剂量氮离子注入后丛生芽的生长情况

离子注入剂量: A. 3×10^{14} N^+/cm^2 , B. 5×10^{14} N^+/cm^2 , C. 1×10^{15} N^+/cm^2 , D. 1×10^{16} N^+/cm^2

3.2 活性炭和6-BA, NAA 组合诱导出芽的效果
将离子束注入过的茎尖接种到1~9号培养基上培养,经培养发现,4号培养基和5号培养基诱导出芽效果最好,出芽率最高。但5号培养基出现轻微褐化现象,最终选取芽诱导培养基为4号培养基,增殖培养基为5号培养基,因此时外植体诱导出的丛生芽生长已经比较健壮,基本不会出现褐化现象。

3.3 活性炭对芦荟组培苗生长分化的影响 实验中,1~3号培养基活性炭为0,即为空白对照组,4~6号培养基活性炭为0.1%,7~9号培养基活性炭0.2%。分别在各培养基中接入经离子束注入过的芦荟茎尖,观察比较3类培养基外植体在出芽,生长态势,褐化等方面的表现见表3。从实验中明显可以看出,仅过了14 d,1~3号的全部外植物体基部褐化,外植体长出的叶片部分深绿而略带枯黄,培养基变成淡黄色,并逐渐变褐;而4~6号和7~9号培养基中的外植体褐化不明显,长出的叶片葱绿粗壮,

尤其以4号培养基为最好。可见活性炭的加入可以有效的防止外植体褐化,而防止褐化效果尤以活性炭为0.1%的几种培养基为好。在诱导外植体出芽方面,实验中发现,活性炭的加入对出芽率并没有太大的影响,见表4。

表3 活性炭及激素组合对离子束注入后芦荟茎尖出芽率的影响

No.	接种茎尖数/个	出芽茎尖数/个	出芽率/%
1	12	11	41.7
2	12	10	50.0
3	12	8	33.3
4	12	12	100.0
5	12	12	100.0
6	12	6	66.7
7	12	10	83.3
8	12	10	83.3
9	12	7	66.7

表4 活性炭对离子束注入后芦荟茎尖出芽率的影响

活性炭质量分数/%	接种茎尖数/个	出芽茎尖数/个	出芽率/%
0	12	9	75.0
0.1	12	10	83.3
0.2	12	9	75.0

4 讨论

经低能离子束辐射处理以后,外植体可能出现各种各样的变化,如果仍然按照常规的方法来培养,则不能使外植体达到最佳的生长条件。另外,离子束诱变技术虽然已经比较成熟,但该技术的诱变对象一般选用作物的干种子,很少直接选用活体材料为诱变对象。因为活体材料含水量高,离子注入机抽真空会非常困难,并且含水量高的活体材料较为幼嫩,受到的辐射损伤也会比较严重,所以将很难培养成活^[5-8]。在本实验中,选取芦荟的茎尖为诱变材料,在进行离子注入之前,将茎尖在培养间内晾2~3 h,使之流失部分水分,以保证离子注入过程中的真空度。根据前人的经验,本实验选取了中等大小的几个剂量点,经过对离子注入后比较分析,最终选择 5×10^{14} , 1×10^{15} N^+/cm^2 2个剂量点。该剂量点对外植体有一定的诱变效果,但又不至于造成太大的损伤。

离子注入后芦荟组织培养的褐化现象更为严重,因此实验中在培养基中添加了活性炭,对褐化现象起到了一定的遏制作用。培养基中细胞分裂素和细胞生长素分别选取6-BA和NAA,并且在不影响

外植体生长分化的情况下,尽量降低激素的用量,以减少褐化现象。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2000:129.
- [2] 余增亮,何建军,邓建国,等.离子注入水稻诱变育种机理初探[J].安徽农业科学,1989,39(1):12.
- [3] 丰峰,李洪波,吕庆芳,等.芦荟的组织培养[J].西南农业大学学报,2000,22(2):157.
- [4] 姚银安,祖艳群,李元,等.紫外线B辐射与植物体内酚类次生代谢的关系[J].植物生理学通讯,2003,39(2):179.
- [5] 袁成凌,余增亮.低能重离子生物学研究进展[J].辐射研究

与辐射工艺学报,2004,22(1):1.

- [6] 余增亮.离子束生物技术引论[M].合肥:安徽科技出版社,1998:250.
- [7] Vilathong T, Yu L D, Apavatjirut P, et al. Heavy ion induced DNA transfer in biological cells[J]. Radiat Phys Chem, 2004, 71:927.
- [8] Yu Z L, Yang J B, Wu Y J, et al. Transferring Gus gene into intact rice cells by low energy ion beam[J]. Nucl Instrum Methods Phys Res B, 1993, 81:1328.

[责任编辑 张宁宁]

复黄片提取工艺路线的比较研究

王誉洁¹, 周明眉², 陆金根³, 邱明丰^{1*}, 谢国祥¹, 贾伟¹

(1. 上海交通大学药学院, 上海 200240;

2. 上海中医药大学中医方证与系统生物学研究中心, 上海 201203;

3. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032)

复黄片是在上海中医药大学附属龙华医院的医院制剂基础上研制的复方中药新药,由蒲黄炭、地榆炭、槐角、大黄等药物组成,功能凉血止血、清热通便,用于治疗血热妄行之便血,且未发现有明显不良反应^[1,2]。为保证复黄片临床疗效、用药方便,本研究进行了该制剂提取工艺路线的优选,通过止血作用的药效指标和定性定量指标,比较了醇提法、水提法、水提醇沉法、醇水双提法等4种不同提取工艺路线。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); AL204 型电子天平(Mettler Toledo); KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); UNIC UV-2102 PCS 型紫外-可见分光光度计(美国 UNIC 公司); D2F-6050 型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司); R50-2B 型旋转蒸发器(上海申生科技有限公司); Sartorius AR10611UF 超纯水器(德国 Sartorius 公司), Bayer

Advia 120 血球计数仪(德国拜耳公司)。

大黄酸、槐角苷、没食子酸、异鼠李素对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 0757-200206, 111695-200501, 110831-200302, 110860-200406)。蒲黄炭、地榆炭、槐角、大黄购自上海华宇药业有限公司,经上海交通大学王梦月博士鉴定符合药典 2005 年版一部各项下有关规定。肾上腺色腺片[上海(医药)集团有限公司心意制药总厂委托上海信宜九福药业有限公司],痔宁片(湖南三九南开制药有限公司),复黄片 4 个不同工艺路线样品 A、B、C、D。硅胶 G、硅胶 H 及硅胶 GF254 薄层预制板(100 mm×200 mm,0.2 mm)购自烟台市化学工业研究所。乙腈、甲醇为色谱纯(Merck 公司);超纯水(实验室自制);其余试剂均为分析纯。

实验动物小鼠生产许可证号 SCXK(沪)2003-0002。

2 方法与结果

2.1 不同提取工艺路线样品制备

2.1.1 醇提法供试液制备 全方饮片 70%乙醇回流 3 次,滤过,离心,回收乙醇并浓缩溶剂至 1:1,得供试液 B,备用。

[收稿日期] 2007-06-27

[基金项目] 上海市重点学科建设项目(T0304)

[通讯作者] *邱明丰, Tel: (021) 62932292, E-mail: mfqiu@sj-

tu.edu.cn