

蒙古黄芪不定根的诱导

马琳¹, 王秀杰^{1*}, 高文远²

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300193)

摘要 以蒙古黄芪无菌芽的下胚轴、无菌苗的根、茎、叶为外植体, 分别接种在不同激素组合的 Murashige 和 Skoog (MS) 培养基中, 在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 条件下暗培养, 蔗糖浓度为 3.0%, pH 值为 5.8, 琼脂的浓度为 0.8%。对蒙古黄芪 (*Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao) 进行愈伤组织诱导。结果表明最适合蒙古黄芪下胚轴愈伤组织诱导的激素组合为 MS+2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 2.0 ml/L+6-苄氨基嘌呤 (6-BA) 0.5 ml/L 和 MS+ α -萘乙酸 (NAA) 3.0 mg/L+6-BA 0.5 ml/L; 最适作为蒙古黄芪愈伤组织诱导的外植体为叶, 最佳培养基为 MS+NAA 3.0 mg/L。综合考虑愈伤组织质地以及后期试验目的, 最终确定蒙古黄芪愈伤组织诱导和增殖培养基为 MS+NAA 3.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L。黄芪愈伤组织生长曲线呈现 S 型, 在 d9 进入快速增长期, 最佳继代时间是在 24 d 左右。

关键词 蒙古黄芪; 不定根诱导; 植物激素; 组织培养

中图分类号: S567 **文献标识码**: A **文章编号**: 1005-8915(2008)05-0355-04

蒙古黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao] 为豆科多年生草本植物, 为中药黄芪主要来源之一。其根具有升举阳气、扶正固表的功效。现代医学研究证明其具有提高人体免疫力的作用。黄芪根主要活性成分有三萜皂苷、黄酮多糖类^[1]。目前市场上对黄芪的需求量大, 为解决资源紧张的问题, 人们研究利用组织培养技术进行黄芪植株再生和器官的培养或细胞悬浮培养技术, 力求更加方便、快捷、大量的得到黄芪的有效成分。然而无论采用何种组织培养途径, 均需首先诱导出黄芪的愈伤组织。因此, 本文以蒙古黄芪无菌芽为外植体, 对愈伤组织的不同诱导方法进行了比较, 并绘制出愈伤组织的生长曲线, 从而确定了蒙古黄芪愈伤组织诱导的最佳条件。

1 材料和方法

1.1 材料

蒙古黄芪种子由山西省五寨县芪参中药材开发中心提供, 经鉴定为蒙古黄芪 (*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.)

Hsiao) 的种子。

1.2 蒙古黄芪种子处理

选择饱满的蒙古黄芪种子, 加 98% 浓硫酸搅拌处理 40 min, 自来水冲洗 5 h, 去离子水浸泡过夜。75% 酒精消毒 30 s, 无菌水冲洗 4~5 次, 每次 2~3 min。

1.3 蒙古黄芪无菌苗的培养

1.3.1 蒙古黄芪无菌芽的获得 将按 1.2 项下处理过的种子, 接种在 MS 培养基上, 在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下暗培养, 4 d 左右得到了蒙古黄芪无菌芽^[2]。

1.3.2 蒙古黄芪无菌苗的获得 将按 1.2 项下处理过的种子, 接种在装有 30 ml MS 固体培养基的 100 ml 锥形瓶中, 25°C 无菌条件下暗培养, 培养 7 d, 待芽长为 3~5 cm 后, 转移到自然光下培养。20 d 左右可得到蒙古黄芪无菌苗。

1.4 蒙古黄芪外植体的获得

取蒙古黄芪无菌芽, 去掉顶端和尾部, 选取中间粗壮部位切成 0.5 cm 的小段, 即得; 取蒙古黄芪无菌苗茎、根分别切成 0.5 cm 的小段, 叶片切成 0.2 cm×0.2 cm 的小块, 即得外植体。

收稿日期: 2007-06-27 修回日期: 2008-01-03

基金项目: 天津市高等学校科技发展基金(编号: 20050325)。

作者简介: 马琳, 1963 年生, 天津中医药大学中药学院, 副教授, 硕士。研究方向: 中药生物工程。

* 通讯作者: 王秀杰, 1981 年生, 天津中医药大学 2005 级中药硕士, E-mail: gjkwxj1102@163.com。

1.5 不同激素组合对蒙古黄芪下胚轴愈伤组织诱导的影响

分别对 2,4-D、NAA、6-BA、KT 进行不同激素浓度配比^[3,4](表 1),观察不同激素组合对蒙古黄芪愈伤组织诱导的影响,培养条件为:琼脂浓度为 8.0 g/L,蔗糖浓度为 30 g/L,pH 值为 5.8,在 (25±1)°C 下暗培养。

Tab 1 Various plants growth regulator combination on callus induction of *A. membranaceus var. mongholicus*

Plant hormone	Concentration of plant hormone(mg/L)									
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	A ₉	A ₁₀
2,4-D	1.0	2.0	2.0	1.0	1.5	2.0				
NAA							2.0	2.0	3.0	2.0
6-BA	0.5	0.5	1.0				0.5	1.0	0.5	0.5
KT				0.2	0.2	0.2				

1.6 不同植物激素组合对蒙古黄芪不同外植体愈伤组织诱导的影响

取蒙古黄芪根、茎、叶外植体分别接种在含 2,4-D 2.0 mg/L, NAA 3.0 mg/L, 2,4-D 2.0 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L / KT 0.1 mg/L, 6-BA 0.5 mg/L + NAA 2.0 mg/L / 3.0 mg/L 的培养基中(表 2)。

Tab 2 Various plants growth regulator combination on callus induction of *A. membranaceus var. mongholicus*

Plant hormone	Concentration of plant hormone(mg/L)					
	B1	B2	B3	B4	B5	B6
2,4-D	2.0	2.0	2.0	—	3.0	—
NAA	—	—	—	3.0	—	2.0
6-BA	—	0.5	—	—	0.5	0.5
KT	—	—	0.1	—	—	—

1.7 蒙古黄芪愈伤组织生长曲线的测定

以蒙古黄芪无菌芽的下胚轴为外植体,接种在 MS+NAA 3.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 培养基上,分别选取培养 0,3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33 d 的愈伤组织测其鲜重,每次取 2 盘,每盘 5 个外植体,取其平均值。相同的外植体在 105°C 下灭活 30 min,60°C 下干燥至恒重,测其干重,以生长天数为横坐标,以愈伤组织鲜重和干重为纵坐标做黄芪愈伤组织的生长曲线^[5]。

1.8 愈伤组织诱导结果统计

愈伤组织诱导率 = 愈伤化外植体个数 / 接种

的外植体个数 × 100%。

2 试验结果

2.1 不同植物激素对蒙古黄芪下胚轴愈伤组织诱导率的影响

将蒙古黄芪无菌芽下胚轴切成 0.5 cm 长的小段的外植体,分别接种在不同激素配比的培养基中,每种激素接种 4 盘。愈伤组织的诱导率见表 3。

Tab 3 The percentage of callus induction using various plants growth regulator combination

Num	Combination of plant hormone(ml/L)	Num of explants on every dish	Num of callus	Percentage of induction(%)
A1	2,4-D 1.0+6-BA 0.5	10±0.50	6±0.58	53.39±0.047
A2	2,4-D 1.5+6-BA 0.5	10±0.96	9±1.00	83.13±0.084
A3	2,4-D 2.0+6-BA 0.5	10±0.58	9±0.96	97.22±0.056
A4	2,4-D 1.0+KT 0.2	9±0.82	7±0.96	75.21±0.10
A5	2,4-D 1.5+KT 0.2	10±0.50	7±1.29	63.18±0.10
A6	2,4-D 2.0+KT 0.2	10±0.95	6±0.96	58.96±0.076
A7	NAA 2.0+6-BA 0.5	10±1.29	6±0.96	65.98±0.080
A8	NAA 2.0+6-BA 1.0	11±1.29	8±1.26	78.46±0.045
A9	NAA 3.0+6-BA 0.5	10±0.966	10±0.58	97.73±0.045
A10	NAA 3.0+KT 0.2	10±1.295	5±0.50	55.65±0.052

由表 3 可知,2,4-D 与 KT 组合,无论比例是多大,诱导率均不是很高,且从诱导愈伤组织的形成过程来看,该组合诱导的愈伤组织易褐化;2,4-D 与 6-BA 组合,当生长素/分裂素比例越高,愈伤组织的诱导率就越高,且愈伤组织形成的时间短,颜色较深,但是当 2,4-D 的浓度达到 2.0 mg/L 时,诱导的愈伤组织质地较疏松;NAA 与 6-BA 组合使愈伤组织的形成较慢,但不容易褐化,随着 NAA 浓度的增加愈伤组织由黄褐色变成黄白色,质地由较坚实变得疏松。NAA 与 KT 组合的诱导率均低于其它组合。综上所述最适合蒙古黄芪愈伤组织诱导的激素组合应为 MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 和 MS+NAA 3.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L。

2.2 不同植物激素对蒙古黄芪不同外植体愈伤组织诱导率的影响

把根、茎、叶外植体分别接种在含不同激素的培养基上,每种激素组合重复 3 次,诱导率见表 4。

Tab 4 The percentage of callus induction using various explants on different hormones

	B1	B2	B3	B4	B5	B6
Num of leaf explant	12±1.53	11±0.58	12±0.58	12±1.15	10±1.00	9±1.00
Num of callus	12±1.00	10±0.58	7±0.58	9±1.00	9±1.53	9±0.58
Percentage of induction(%)	97.62±0.04	96.97±0.05	62.87±0.04	77.16±0.05	92.96±0.06	96.67±0.06
Num of root explant	14±0.58	13±1.00	11±1.15	10±1.53	11±1.15	13±0.58
Num of callus	13±0.58	11±0.58	8±0.58	10±1.00	6±0.58	11±0.58
Percentage of induction(%)	97.62±0.04	87.33±0.04	73.89±0.07	97.22±0.05	53.33±0.06	80.04±0.04
Num of stem explant	10±1.15	12±1.00	12±1.53	11±0.58	13±0.58	10±1.53
Num of callus	10±1.00	10±1.53	8±1.53	10±0.00	11±0.58	10±1.73
Percentage of induction(%)	96.97±0.05	85.82±0.06	65.30±0.05	88.38±0.04	89.53±0.04	96.67±0.06

在接种 d4 后,各种外植体开始变大,叶外植体开始卷曲。在培养 2 周后各种外植体在切口处开始出现愈伤化现象。

试验结果显示:叶最适合做诱导愈伤组织的外植体,培养基中最佳的激素组合为 MS+2,4-D 2.0 mg/L、MS+NAA 2.0 mg/L、MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L;中片愈伤组织的颜色为淡绿色。最适合根的愈伤组织诱导的培养基中激素组合为 MS+2,4-D 2.0 mg/L 或 MS+NAA 3.0 mg/L,培养 20 d 后诱导率均达到 100%;愈伤组织的颜色为黄色,在第 4 周有红色出现,愈伤组织的质地较疏松。以茎作为外植体的最适合诱导

愈伤组织的激素组合为 MS+2,4-D 2.0 mg/L 或 MS+NAA 2.0 mg/L;诱导出的愈伤组织颜色为黄白色,其质地较紧密。

2.3 愈伤组织的增殖培养

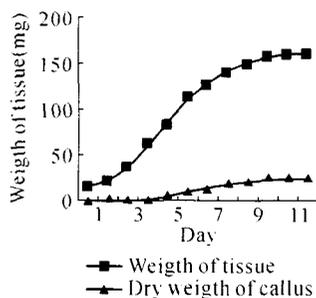
以 NAA 3.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 作为增殖培养基,用无菌芽的下胚轴作为外植体进行蒙古黄芪愈伤组织的增殖培养。其愈伤组织诱导率可以达到 100%,诱导的愈伤组织黄白色,质地紧密,而且愈伤组织褐化率低。

2.4 蒙古黄芪愈伤组织生长曲线

不同培养天数的蒙古黄芪愈伤组织鲜重和干重数据见表 5,生长曲线见图 1。

Tab 5 The weight of callus on different days

Day of culture	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33
Weight of callus(mg)	14.1	20.3	35.6	60.3	82.0	110.7	125.0	137.3	147.5	155.0	158.8	158.5
Dry weight of callus(mg)	1.01	1.61	2.47	3.87	5.90	9.03	12.1	17.9	20.7	24.3	24.5	24.4

Fig 1 The growth curve of *A. membranaceus*

从蒙古黄芪愈伤组织生长曲线图可见,从接种 d6 开始愈伤组织增长较快,从干重和鲜重增加的百分比可以看出,这个增长很有可能是外植体从培养基中吸水的原因,从 d9 到 d24 进入快速增长时

期,从 27 d 开始进入稳定期。因此可知,黄芪愈伤组织在 24 d 左右继代较为合适。

3 讨论

3.1 蒙古黄芪种子的处理方法

曾经对黄芪种子不经 98% 浓硫酸处理,直接用去离子水浸泡过液,与用 98% 浓硫酸处理 30 min 和 40 min 方法进行比较,结果用 98% 浓硫酸处理 40 min 的发芽率高于用 98% 浓硫酸处理 30 min 的,不经浓硫酸处理的发芽率最低。

3.2 琼脂浓度的选择

在 MS 培养基中分别添加 10 g/L 和 8.0 g/L 的琼脂,观察其对培养基的影响。结果发

现添加 10 g/L 琼脂的培养基质地比较坚硬,不利于培养物营养物质的吸收。所以最终确定选择添加 8.0 g/L 的琼脂。

3.3 诱导愈伤组织外植体的选择

从实验数据中可以看出蒙古黄芪无菌苗的叶和根做外植体时,叶的愈伤组织诱导率很高,但由于无菌苗的培养需要很长时间,且叶、根外植体和无菌芽下胚轴外植体诱导的愈伤组织在质地上没有很大的差别,所以我们选择蒙古黄芪无菌芽的下胚轴为外植体。

3.4 愈伤组织增殖培养的选择

虽然 MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 和 MS+NAA 0.3 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 对黄芪无菌芽下胚轴外植体愈伤组织诱导效果都很好,但 2,4-D 不利于下一步的器官分化试验;所以最终选择 NAA 3.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 作为增殖培

养基,根、茎和叶愈伤组织的诱导效果也很好,但培养无菌苗所需时间较长,所以无菌芽的下胚轴作为外植体,进行黄芪愈伤组织的增殖培养。

参 考 文 献

- [1] 包英华,苏格尔. 蒙古黄芪不同外植体愈伤组织中黄芪甲苷含量比较[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2003, 4(34):425.
- [2] 陈巍,于泉林,高文远,等. 甘草愈伤组织培养研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(9):713.
- [3] 胡海英,吴晓玲. 膜荚黄芪愈伤组织诱导培养[J]. 江苏农业科学, 2005, 2:97.
- [4] 周吉源,戴均贵. 不同植物生长调节物质对华黄芪愈伤组织形成及器官发生的效应[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 1997, 31(1):77.
- [5] Gao XF, Zhu CB, Jia W. *et al.* Induction and characterization of adventitious eoots directly from the explants of *Panax notoginseng* [J]. *Biotechnology Letters*, 2005, 27:1771.

Callus Initiation of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*

MA Lin¹, WANG Xiu-jie¹, GAO Wen-yuan²

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, tianjin 300193, China; 2. School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin university, tianjin 300193, China)

Abstract Using hypocotyl segments obtained from sterilized bud of *A. membranaceus* var. *mongholicus* and root, stem and leaf from sterilized plants as explants, then germinating explants on MS medium supplemented with different combinations and concentrations of hormone. The temperature was controlled (25 ± 1)°C under dark conditions, the suger was 3.0%, pH was 5.8 and agar was 0.8%. To induce callus of *A. membranaceus* var. *mongholicus*, the maximum and the best callus were achived on MS medium with 2.0 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L 6-BA, and the other culture could receive the same yield of callus wad MS medium supplamented with 3.0 mg/L NAA and 0.5 mg/L 6-BA. On both medium and the explants could initate 100%. The optimal explant was leaf and the medium was MS + NAA 3.0 mg/L. We chose MS+NAA 3.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L as callus subculture and hypocotyl segments as explant. Callus growth curve of *A. membranaceus* var. *mongholicus* showd "S". The time of logarithim growth appeared after being cultured for 9 days, we confirmed that about 24 days were the time of exchange medium.

Key words *Astragalus membranaceus* var. *mogholicus*, Tissue culture, Initiation of callus, Callus grow curve

· 信 息 ·

2008-89 一种防治心脑血管疾病及糖尿病的药物组合物

2008-90 一种治疗糖耐量异常的药物组合物及其制备方法