

蒙古黄芪组织培养及同源四倍体的诱导与鉴定

陈兰兰, 高山林*, 赵慧娜

(中国药科大学, 江苏 南京 210038)

摘要 通过蒙古黄芪组织培养技术的正交试验, 确定了蒙古黄芪最佳繁殖培养基: MS+BA 0.6 mg/L+IAA 0.2 mg/L+PP₃₃₃ 0.2 mg/L; 叶作为诱导愈伤组织的外植体优于茎, 最适培养基: MS+BA 2.0 mg/L+KT1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L; 最佳生根培养基: 1/2MS+IAA 0.5 mg/L+IBA 2.0 mg/L+ABT 2.0 mg/L。建立了蒙古黄芪快速繁殖体系; 在无菌条件下利用秋水仙碱诱导蒙古黄芪, 获得 62 个染色体加倍遗传稳定的变异试管苗株系, 通过试管苗根尖染色体鉴定, 对诱导获得的蒙古黄芪染色体加倍株系进行初步筛选, 为进一步获得蒙古黄芪优良品系奠定基础。

关键词 蒙古黄芪; 组织培养; 愈伤组织; 同源四倍体

中图分类号: R81

文献标识码: A

文章编号: 1005-8915(2006)06-0413-05

蒙古黄芪 (*Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge) Hsiao) 为豆科黄芪属多年生草本植物, 是膜荚黄芪的变种。黄芪始载于《神农本草经》, 已有 2 000 多年的药用史^[1]。现代药理研究表明, 黄芪具有增强机体免疫功能, 强心降压、降血糖、利尿、抗衰老、抗疲劳、抗肿瘤、抗病毒、镇静、镇痛等作用^[2]。蒙古黄芪化学成分众多, 主要含有皂苷、多糖、黄酮、以及氨基酸等多种成分^[3]。

随着保健药日益畅销, 黄芪的用量越来越大, 历史上商品黄芪以野生为主, 但由于长期大量、无节制采挖, 未注意对自然资源的保护, 野生黄芪资源几近枯竭, 大面积成规模的野生黄芪资源已十分少见, 加之, 黄芪用种子繁殖, 从播种到收获一般要 3~5 年, 而且黄芪种子有硬实现象, 出苗率低 (30%~40%), 病虫害严重。

本文在优化蒙古黄芪组织培养技术的基础上, 对蒙古黄芪进行了同源四倍体的诱导和鉴定, 旨在为进一步选育高产、有效化学成分含量高的优良品种。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料蒙古黄芪种子由河北省唐山市农业

科学研究所提供, 栽培于中国药科大学实验苗圃。原植物经中国药科大学中药生物技术教研室鉴定为蒙古黄芪 (*Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge) Hsiao)。

1.2 方法

1.2.1 无菌材料的获得 选择饱满的黄芪种子, 于 30℃~40℃温水中浸泡 4 h, 在超净工作台上将材料置于 75%乙醇浸泡 30 s, 再用 5%次氯酸钠消毒 15 min, 无菌水冲洗 5 次, 接种于添加 6-苄基腺嘌呤 (6-BA) 2.0 mg/L、吲哚乙酸 (IAA) 0.2 mg/L 的 MS 培养基中, 3 d 后种子发芽, 20 d 后试管苗长势良好。

1.2.2 繁殖培养基筛选试验 蒙古黄芪于添加 6-BA 2.0 mg/L、IAA 0.2 mg/L 的 MS 培养基中继代 3 次后发现试管苗有大量丛生芽, 但苗瘦弱、细长, 对繁殖培养基进行初步筛选, 并在此基础上, 以 6-BA、IAA、多效唑 (PP₃₃₃) 3 种激素作为 3 个因素, 设计 3 个水平做正交试验。

以试管苗平均增长率 [平均增长率 = (20 d 后材料重 - 接种时材料重) / 接种时材料重] 为衡量指标, 筛选出最适繁殖培养基。试验因素水平见表 1。

1.2.3 愈伤培养基筛选试验 分别以蒙古黄芪试管苗的叶和茎为外植体在添加不同浓度 6-BA、激

收稿日期: 2006-02-28 修回日期: 2006-04-27

作者简介: 陈兰兰, 女, 1980 年生, 江苏盐城人, 博士研究生, 主要从事中药生物技术研究。

* 通讯作者: 高山林, 博导, 电话(传真): 025-85391288

Tab 1 The factors and levels of orthogonal test of propagation medium of *Astragalus membranaceus* Bge

Levels	Factors		
	A6-BA(mg/L)	BIAA(mg/L)	CPP ₃₃₃ (mg/L)
1	0.2	0	0
2	0.6	0.1	0.2
3	1.0	0.2	0.4

动素(KT)和萘乙酸(NAA)的 MS 培养基上诱导愈伤组织,记录诱导率和生芽率等指标。

1.2.4 生根培养基筛选试验 继代培养的试管苗长至 3~4 cm 时转入添加不同浓度的 IAA、吲哚丁酸(IBA)、生根粉(ABT)的 1/2MS 培养基中进行生根培养基筛选,进一步作正交试验分析,以生根率为衡量指标。试验因素水平见表 2。

Tab 2 The factors and levels of orthogonal test of rooting culture medium of *Astragalus membranaceus* Bge

Levels	Factors		
	A IAA(mg/L)	B IBA(mg/L)	C ABT(mg/L)
1	0	1.0	0.5
2	0.5	2.0	1.0
3	1.0	3.0	2.0

1.2.5 同源四倍体的诱导 取生长 20 d 后的丛生芽作为无菌材料。试验条件:秋水仙素浓度(%):0.1,0.2,0.3;浸泡时间(h):12,24,36,48,60;共设计 15 个处理,每处理 30 棵单芽。1 个月统计各处理芽的存活率,将存活苗转接到繁殖培养基中继代培养,建立株系。

1.2.6 根尖染色体鉴定 将诱导所得试管苗在生根培养基上诱发生根,约 20 d 后,待根长至 0.5~1.0 cm 时,切取幼根作为试验材料。

上午 9 点左右切取幼根,在饱和对氯二苯溶液中浸泡 4 h 后,用卡诺固定液 0℃ 固定 5 h,蒸馏水洗 3 次,60℃ 水浴 0.2 mol/L 盐酸离析 10 min,蒸馏水洗净低渗 30 min,切取根尖分生组织,置于载玻片上,滴加改良苯酚品红染色液,染色 30 min,压片,用“Olympus BX40”显微镜镜检。

2 结果与分析

2.1 繁殖培养基正交试验结果与分析

正交试验结果与分析见表 3、4。

Tab 3 The result of propagation medium of *Astragalus membranaceus* Bge designed by L₉(3⁴) orthogonal test

No.	Factors			Buds growing rate(Xi) %	Xi ²
	A	B	C		
1	1	1	1	34.45	118.68
2	1	2	2	38.21	146.00
3	1	3	3	37.92	143.79
4	2	1	2	67.72	458.59
5	2	2	3	69.92	488.88
6	2	3	1	60.09	361.08
7	3	1	3	48.74	237.55
8	3	2	1	41.19	169.66
9	3	3	2	53.55	286.76
K1	110.58	150.91	135.73		
K2	197.73	149.32	159.48	K=451.79	
K3	143.48	151.56	156.58		

Tab 4 Variance analysis of propagation medium of *Astragalus membranaceus* Bge

Source of variance	Sum of variance squares	Degree of freedom	Variance	F value	P value
A	1291.17	2	645.58	18.613	P<0.01
B	0.88	2	0.44	0.0127	P>0.1
C	111.91	2	55.95	1.6133	P>0.1
E(error)	26.82	2	13.41		
Sum	138.73	4	34.68		

Note: F_{0.01}(2, 4)=18.0, F_{1-0.05}(2, 4)=6.94, F_{1-0.10}(2, 4)=4.32

从正交分析结果可以看出:3 个因素对生长率的影响次序为 A(6-BA)>C(PP₃₃₃)>B(IAA)。其中 6-BA 的浓度与试管苗生长率极显著相关,9 种培养基中平均生长率最高达 69.92%,结合试管苗的生长状况可以确定黄芪的最佳繁殖培养基为 A₂B₃C₂,即 MS+BA0.6 mg/L+IAA0.2 mg/L+PP₃₃₃0.2 mg/L。用筛选得到的最佳培养基进行蒙古黄芪试管苗继代培养,繁殖效率高(图 1)。

2.2 诱导愈伤培养基筛选试验结果与分析

在诱导愈伤培养基筛选试验中,分别以试管苗的叶和茎作为外植体,设计了 6 种培养基,诱导率和直接分化率结果见表 5。结果可见:(1)在各种激素浓度下,用叶作为外植体都优于用茎作为外植



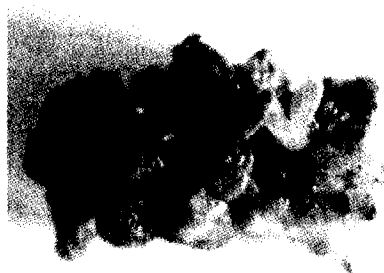
Fig 1 Plantlets in the propagation medium of *Astragalus membranaceus* Bge

体,后者在培养过程中存在不同程度的褐化现象,诱导愈伤能力较弱,诱导率最高为 42.11%。此外,叶作为外植体各种培养基中形成的愈伤组织都有直接分化出绿色芽,茎产生的愈伤颜色较淡且无新芽长出(图 2)。

(2) 愈伤在 BA 为 2.0 mg/L 的培养基上的诱导率普遍高于 BA 为 1.0 mg/L 的培养基,经过综合比较得出,5 号培养基即 MS+BA2.0 mg/L+KT1.0 mg/L+NAA0.5 mg/L 是最适合外植体诱导愈伤的培养基。愈伤诱导率为 94.44%,直接分化出绿芽的出芽率为 36.66%。

Tab 5 The effects of different combinations and concentrations of phytohormone on the induction of the callus of *Astragalus membranaceus* Bge

No. of medium	Concentrations of phytohormone(mg/L)			Inducing rate of callus(%)		Rate of shoot buds regeneration(%)	
	6-BA	KT	NAA	Stem	Leaf	Stem	Leaf
1	1.0	0.5	1.0	36.23	73.68	0	21.40
2	1.0	1.0	0	23.52	64.71	0	16.83
3	1.0	2.0	0.5	30.00	77.78	0	19.47
4	2.0	0.5	0	33.33	85.71	0	13.52
5	2.0	1.0	0.5	42.11	94.44	0	36.66
6	2.0	2.0	1.0	32.61	89.76	0	20.00



Callus induced from Leaf



Callus induced from stem

Fig 2 The callus induced from the leaf and stem of *Astragalus membranaceus* Bge

2.3 生根培养基正交试验设计及结果表

正交试验结果与分析见表 6,7。

从正交分析结果可以看出:3 个因素对生长率的影响次序为 A(IAA)>B(IBA)>C(ABT)。IAA 的浓度与生根率极显著相关,蒙古黄芪生根需要较高浓度的生长素,这与包英华等^[4]试验结果一致,但随着生长素浓度的增加试管苗基部会出现白色愈伤组织势必影响到试管苗的移栽存活率,结合试管苗生长状况,确定蒙古黄芪最适生根为 A₂B₂C₃,即 5 号培养基:1/2MS+IAA0.5 mg/L+IBA2.0 mg/L+ABT2.0 mg/L,生根率高达 93.5%。高于文献报道水平,用筛选得到的最佳培养基进行蒙古黄芪试管苗生根培养,根生长状况良好。

2.4 蒙古黄芪四倍体诱导试验结果

蒙古黄芪四倍体诱导试验结果见表 8。

由结果可以看出,随着秋水仙碱浓度和浸泡时间增加,芽的死亡率亦增加,蒙古黄芪单芽在含 2%二甲基亚砷和 0.2%秋水仙碱溶液浸泡 36 h 效

Tab 6 The result of rooting culture medium of *Astragalus membranaceus* Bge designed by $L_9(3^4)$ orthogonal test

No.	Factors			Rooting rate(%)	χ^2
	A	B	C		
1	1	1	1	53.33	118.68
2	1	2	2	60.60	146.00
3	1	3	3	56.45	143.79
4	2	1	2	86.21	458.59
5	2	2	3	93.50	488.88
6	2	3	1	87.00	361.08
7	3	1	3	73.33	237.55
8	3	2	1	75.76	169.66
9	3	3	2	60.78	286.76
K1	170.38	212.87	216.09	K=599.35	
K2	266.71	229.86	207.59		
K3	209.87	204.23	223.28		

Tab 7 Variance analysis of rooting culture medium of *Astragalus membranaceus* Bge

Source of variance	Sum of variance squares	Degree of freedom	Variance	F value	P value
A	1563.30	2	781.65	41.95	$P < 0.01$
B	113.35	2	56.67	3.04	$P > 0.1$
C	41.12	2	20.56	0.89	$P > 0.1$
E(error)	33.39	2	1.10		
Sum	74.52	8	18.63		

Note: $F_{1-0.01}(2, 4) = 18.0$, $F_{1-0.05}(2, 4) = 6.94$, $F_{1-0.10}(2, 4) = 4.32$

果最好,非常接近半数致死量,诱导率最高,可以确定诱导蒙古黄芪多倍体的最佳条件是在 2% 二甲基亚砷和浓度为 0.2% 的秋水仙碱中浸泡 36 h,四倍体诱导率高达 39.99%。

2.5 蒙古黄芪根尖染色体鉴定结果

将诱导得到的株系在生根培养基上诱导生根,待根长为 0.5~1.0 cm 时切取根尖,进行染色体鉴定,结果表明,蒙古黄芪二倍体植株根尖细胞染色体数目为 $2n = 2x = 16$,四倍体植株根尖细胞染色体数目为 $2n = 4x = 32$,染色体数目增加了 1 倍(图 3)。

经 3 次以上鉴定为四倍体的株系,予以保留繁殖,进一步进行田间农艺性状鉴定和化学成分的测

定,以期从中选育出产量高,有效化学成分含量高的四倍体优良品系。

Tab 8 The results of the experiments on buds with different concentration colchicines solution to induce the polyploidy of *Astragalus membranaceus* Bge

No.	Concentrations of colchicine(%)	Duration of immersion(h)	Death rate(%)	Tetraploids rate(%)
1	0.1	12	3.33	0.00
2		24	13.33	9.99
3		36	16.67	20.01
4		48	20.00	20.01
5		60	30.00	30.00
6		12	20.00	20.01
7	0.2	24	30.00	20.01
8		36	46.66	39.99
9		48	63.33	9.99
10		60	66.67	20.01
11		12	70.00	9.99
12		24	83.33	6.67
13		36	96.67	0.00
14		48	100.00	0.00
15		60	100.00	00.00

Diploid ($2n=16$)Polyploid ($4n=32$)Fig 3 The Identification of the polyploid of *Astragalus membranaceus* Bge

3 讨论

组织培养中激素的种类、浓度和配比对试验结果有相当大的影响。本试验采用正交设计试验方式,能够在传统的单因子比较方法的基础上容纳更多的因素和水平,大大减少试验次数,提高准确率。在繁殖培养基筛选过程中,蒙古黄芪生长旺盛且丛生芽较多,可能该植物体内含较多的植物内源激素,本研究用较低浓度的 6-BA 和 IAA 配比,得到了非常好的培养效果。虽然高浓度的 6-BA 对丛生芽的诱导有利,但若长期使用含高浓度的 6-BA 培养基,芽生长过快,易出现玻璃化现象。在愈伤组织诱导试验中,选择叶片作为外植体优于茎,且愈伤诱导率和直接分化出芽的能力较高。

在生根培养基筛选时发现,蒙古黄芪试管苗生根需要与高浓度的生长素配合使用,但过高的生长素又会使之产生畸形根,不利于生产移栽。

根尖染色体鉴定是多倍体育种过程中的重要步骤之一,对试管苗根的预处理及水解的控制对制片的效果有很大的影响。

参考文献

- [1] 阴健. 中药现代研究与临床应用[M]. 北京:学苑出版社, 1993, 593.
- [2] 潘飞,冯毓秀,张颖. 黄芪研究的概况[J]. 国外医药. 植物药分册, 1995, 10(3): 110.
- [3] 齐宗韶. 黄芪化学成分的研究概况[J]. 中草药, 1987, 18(5): 41.
- [4] 包英华,苏格尔. 蒙古黄芪的组织培养研究[J]. 韶关学报, 2002, 23(9): 70.

Studies on Tissue Culture of *Astragalus Membranaceus* Bge

CHEN Lan-lan, GAO Shan-lin, ZHAO Hui-na

(China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

Abstract The fittest media for rapid-propagation of *Astragalus membranaceus* was established by orthogonal test in tissue culture process. The results indicated that the strong green clump-buds could be induced on the MS media containing BA 0.6 mg/L, IAA 0.2 mg/L and PP₃₃₃ 0.2 mg/L. Leaves were the best explants of inducing callus on the MS media containing BA 2.0 mg/L, KT 1.0 mg/L, NAA 0.5 mg/L. The strong root was induced on the 1/2MS media containing IAA 0.5 mg/L, IBA 2.0 mg/L and ABT 2.0 mg/L. The immersing buds in colchine solution, and 62 lines of autotetraploid plants were obtained for further selection and breeding into new varieties for commercial production.

Key words *Astragalus membranaceus*, Tissue culture, Callus, Autotetraploid

· 信 息 ·

- 2006-186 一种用蚕生产抗肿瘤治疗药物的方法
- 2006-187 小麦细胞周期蛋白基因及其分离方法与应用
- 2006-188 一种重组人甜菜碱高半胱氨酸甲基转移酶的制备及应用
- 2006-189 用于生物技术获得的有用物质及其含水制剂的脱臭和稳定化方法
- 2006-190 人参寡糖素、人参单体寡糖及其制备工艺和应用
- 2006-191 5种尿激酶变体基因及在大肠杆菌中的表达
- 2006-192 聚合凝胶生物相容性载体制品的制备工艺
- 2006-193 抗人肝癌单克隆抗体 HAb18 放射免疫治疗剂