

不同激素对蒙古黄芪愈伤组织诱导的影响

王秀杰^{1*}, 马琳¹, 高文远²

(1. 天津中医药大学中药学院, 天津 300193;

2. 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072)

[摘要] 以蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 无菌芽的下胚轴为外植体, 分别接种在不同激素组合的 MS 培养基中。结果表明最适合黄芪愈伤组织诱导的激素组合为 MS + 2, 4-D 2.0 (mg L⁻¹) + 6-BA 0.5 (mg L⁻¹) 和 MS + NAA 3.0 (mg L⁻¹) + 6-BA 0.5 (mg L⁻¹), 诱导率均达到 100%, 综合考虑愈伤组织质地以及后期试验目的, 最终确定增殖培养基为 MS + NAA 3.0 (mg L⁻¹) + 6-BA 0.5 (mg L⁻¹)。黄芪愈伤组织生长曲线呈现 S 型, 在第 9 天进入快速增长期, 最佳继代时间在 24d 左右。

[关键词] 蒙古黄芪; 组织培养; 愈伤组织诱导; 生长曲线

蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 为豆科多年生本草植物, 具有补气固表, 利尿托毒, 排脓, 敛疮生肌功能。其主要活性成分有三萜皂苷、黄酮以及多糖类^[1]。目前市场上的黄芪都由人工栽培得到, 这样不但浪费宝贵的土地资源, 而且由于栽培土质的不同以及农药的使用, 使得黄芪药材质量得不到保证。因此人们利用组织培养技术进行黄芪植株再生和器官培养, 或利用细胞悬浮培养技术, 更加方便、快捷、大量地得到黄芪有效成分。无论采用何种组织培养途径, 都得先诱导黄芪愈伤组织。本文以黄芪无菌芽为外植体, 对黄芪愈伤组织的不同诱导方法进行了比较, 并绘制其愈伤组织的生长曲线。

1 材料

挑取饱满的黄芪种子, 用 98% 的浓硫酸处理 40min, 自来水冲洗 5h, 去离子水浸泡过夜。75% 乙醇消毒 30s, 无菌水冲洗 4~5 次, 每次 2~3min, 接种在 MS 培养基上, (25 ± 1) °C 暗培养得到无菌芽^[2]。

2 方法

2.1 不同激素组合对黄芪愈伤组织的影响

分别对 2, 4-D、NAA、6-BA、KT 的不同激素浓度进行配比^[3, 4], 如表 1。观察对愈伤组织诱导的影响, 培养条件为 0.8% 的琼脂, 3.0% 的蔗糖, pH 为 5.8, 暗培养, 温度为 (25 ± 1) °C。

表 1 黄芪愈伤组织诱导不同激素组合及其配比

序号	/ mg L ⁻¹			
	2, 4-D	NAA	6-BA	KT
1	1.0		0.5	
2	2.0		0.5	
3	2.0		1.0	
4	1.0			0.2
5	1.5			0.2
6	2.0			0.2
7		2.0	0.5	
8		2.0	1.0	
9		3.0	0.5	
10		2.0	0.2	

2.2 黄芪愈伤组织生长曲线的测定

以黄芪无菌芽的下胚轴为外植体, 接种在 MS + NAA 3.0 (mg L⁻¹) + 6-BA 0.5 (mg L⁻¹) 培养基上, 分别选取培养 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33d 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 30min, 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]。

2.3 计算公式

愈伤组织诱导率 = 愈伤化外植体个数 / 接种的外植体个数 × 100%

3 结果

3.1 不同植物激素对黄芪愈伤组织诱导率的影响

把黄芪无菌芽下胚轴切成 0.5cm 的外植体, 分别

[通讯作者] *王秀杰, E-mail: gjkwxj1102@163.com。

接种在不同激素配比的培养基中，每种激素接种 5 盘，每盘接种 6 个外植体，愈伤组织诱导率结果见表 2。

表 2 不同培养基激素组合和配比的愈伤组织诱导率

序号	植物生长调节剂/ mg L^{-1}	接种块数	愈伤组织数	诱导率/%
1	2, 4-D1.0	30	16	53.33
2	6-BA0.5D1.5 +	30	26	86.67
3	6-BA0.5D2.0 +	30	30	100
4	6-BA0.5 2, 4-D1.0 + KT0.2	30	20	66.67
5	2, 4-D1.5 + KT0.2	30	19	63.33
6	2, 4-D2.0 + KT0.2 NAA2.0 +	30	17	56.67
7	6-BA0.5NAA2.0 +	30	19	63.33
8	6-BA1.0NAA3.0 +	30	25	83.33
9	6-BA0.5 NAA2.0 + KT0.2	30	30	100
10		30	15	50.00

由表 2 可知，2, 4-D 与 KT 组合，无论比例多大诱导率均不是很高，且从诱导愈伤组织诱导过程来看，这个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，且愈伤组织发生时间短，愈伤组织颜色较深，但是当 2, 4-D 的浓度达到 2.0mg L^{-1} 时，诱导愈伤组织质地较疏松；NAA 与 6-BA 组合愈伤组织发生较慢，但它不容易褐化，随着 NAA 浓度的增加愈伤组织由黄褐色变成黄白色，质地由较坚实变成疏松；NAA 与 KT 组合的诱导率低于其他组合。所以最适合黄芪愈伤组织诱导的激素组合为 $\text{MS}+2, 4\text{-D}2.0(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})+6\text{-BA}0.5(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$ 和 $\text{MS}+\text{NAA}3.0(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})+6\text{-BA}0.5(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$ 。

3.2 愈伤组织增殖培养基选择

$\text{MS}+2, 4\text{-D}2.0(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})+6\text{-BA}0.5(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$ 和 $\text{MS}+\text{NAA}3.0(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})+6\text{-BA}0.5(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$ 对黄芪无菌芽下胚轴外植体的诱导率均为 100%，但 2, 4-D 不利于下一步器官分化试验，所以选择 $\text{NAA}(3.0\text{mg/L})+6\text{-BA}0.5(\text{mg/L})$ 作为增殖培养基。

3.3 黄芪愈伤组织生长曲线

培养不同天数的黄芪愈伤组织鲜重和干重数据见表 3，生长曲线见图 1。

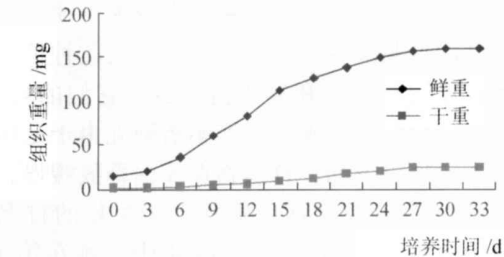


图 1 黄芪愈伤组织生长曲线

从黄芪愈伤组织生长曲线图可见，黄芪组织从接种第 6 天开始较快增长，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，从第 9 天到第 24 天进入快速增长时期，从第 27 天开始进入稳定期。因此可知，黄芪愈伤组织在第 24 天左右继代较为合适。

表 3 不同培养时间黄芪愈伤组织干重和鲜重

培养时间/d	组织干重/mg	组织鲜重/mg
0	14.1	1.01
3	20.3	1.61
6	35.6	2.47
9	60.3	3.87
12	82.0	5.90
15	110.7	9.03
18	125.0	12.1
21	137.3	17.9
24	147.5	20.7
27	155.0	24.3
30	158.8	24.5
33	158.5	24.4

4 讨论

4.1 黄芪种子的处理方法

曾经对黄芪种子不用浓硫酸处理以及用浓硫酸处理 30min 和 40min 3 种方法进行比较，结果浓硫酸处理 40min 的发芽率高。

4.2 琼脂浓度的选择

在 MS 培养基中分别添加 1.0% 和 0.8% 的琼脂，观察其对培养基的影响。结果发现添加 1.0% 琼脂的培养基质地比较坚硬，不利于营养物质的吸收，所以最终确定选择添加 0.8% 的琼脂。

4.3 愈伤组织诱导过程中的光照

在黄芪愈伤组织诱导过程中进行过光照，结果愈伤组织全部褐化，说明愈伤组织诱导过程中不能进行光照。

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),2003,34(4):425-428.

[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):713-715.

[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):97-98.

[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):77-81.

[5] Xianfu Gao, Chunbao Zhu, Wei Jia, et al. Induction and characterization of adventitious roots directly from the explants of Panax notoginseng[J]. Biotechnology Letters 2005 27:1771-1775.

(收稿日期 2007-07-19)