

膜荚黄芪不定根组织培养的研究

廉家盛, 高日, 吴松权, 朴炫春, 廉美兰* (延边大学农学院园艺系, 吉林龙井 133400)

摘要 [目的]建立黄芪不定根培养的无性繁殖体系。[方法]以膜荚黄芪无菌苗的胚根为外植体,诱导了不定根。将长约1 cm的不定根切段接种于4种培养基(B_5 、MS、LS和White)以筛选培养基。然后以 B_5 为基本培养基附加不同浓度IBA(1~6 mg/L)、不同种类糖(蔗糖、葡萄糖、果糖和食用白糖)和不同浓度白糖(20~50 g),研究IBA浓度和糖的种类及浓度对黄芪不定根组织培养的影响。[结果]4种培养基中, B_5 培养基效果最好,切段可分化大量不定根,且生长良好。IBA浓度为2 mg/L时,黄芪不定根生长旺盛。在 B_5 +IBA 2.0 mg/L培养基上,附加30 g/L蔗糖或白糖时不定根生长良好,白糖与蔗糖的效果差异不明显。[结论]在黄芪不定根规模化生产中可用白糖代替培养基中蔗糖,降低培养基成本。

关键词 膜荚黄芪;不定根;组织培养

中图分类号 S567.23+9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)07-02664-02

Preliminary Study on the Tissue Culture of Adventitious Root in *Astragalus membranaceus*

LIAN Jia-sheng et al (Department of Horticulture, College of Agronomy, Yanbian University, Longjing, Jilin 133400)

Abstract [Objective] The study aimed to establish the clone propagation system of adventitious root culture in *Astragalus membranaceus*. [Method] With radicles of aseptic seedlings of *A. membranaceus* as explants, the adventitious roots were induced. The segments with length of about 1 cm of adventitious roots were inoculated on 4 media (B_5 , MS, LS and White) to screen media. Then IBA with different concn. (1~6 mg/L), different kinds of sugar (sucrose, glucose, fructose and edible white sugar) and white sugar with different concn. (20~50 g) were added into B_5 basic media to study the influences of IBA concn., the kind and concn. of sugar on the tissue culture of adventitious roots in *A. membranaceus*. [Result] Among 4 kinds of media, the effect of B_5 medium was best, on which, the segments could differentiate a lot of adventitious roots and they grew well. When IBA was 2 mg/L, the *A. membranaceus* adventitious root grew prosperously. On the medium of B_5 +IBA 2.0 mg/L, when 30 g/L sucrose or white sugar was added, the adventitious root grew well. The difference on the effects of white sugar and sucrose was not significant. [Conclusion] In the scale production of *A. membranaceus* adventitious roots, the sucrose in media could be replaced by white sugar to reduce medium cost.

Key words *Astragalus membranaceus*; Adventitious root; Tissue culture

黄芪是豆科多年生草本植物,根为重要的中药材^[1]。目前我国可供药用的黄芪品种很多,但主要以膜荚黄芪和蒙古黄芪为主。药理研究证明,黄芪具有补益强壮、益气升阳、利尿降压、抗炎、强心及提高机体免疫功能等多种药理作用^[2]。我国黄芪野生资源的蕴藏量为 4.6×10^7 kg,而每年的需求量为 6.0×10^6 kg,野生资源逐年减少。人工栽培黄芪在播种后3~4年才可采收,周期较长^[3]。笔者建立黄芪不定根培养的无性繁殖体系,为开发利用黄芪提供一条可行的新途径,同时为在生物反应器内培养不定根以大量生产次生代谢产物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 将膜荚黄芪 [*Astragalus membranaceus* (fisch.) Bunge.]种子在70%乙醇中浸泡1 min,用无菌水冲洗2次,然后用2%次氯酸钠溶液进行表面消毒30 min后,用无菌水浸洗5次。将已灭菌的种子接入MS培养基(琼脂7 g/L,蔗糖30 g/L, pH值5.8)中,在温度(25±2)℃、相对湿度70%、光照强度3 200 lx、每天光照16 h的条件下培养。4~5 d后种子萌发,约2周2片子叶展开,胚根长2 cm左右。切取无菌苗的胚根(长约1.5 cm),平置于MS+IBA 7.0 mg/L培养基中进行暗培养。待不定根形成后,切分成单根,接种于MS+IBA 3.0 mg/L培养基中进行继代培养,当不定根达到一定量时用作试验材料。

1.2 方法

1.2.1 培养基种类筛选方法。将不定根切成约1 cm大小,接入含有100 ml培养基的500 ml锥形瓶中培养。培养基种

类设置为MS、LS、 B_5 和White培养基。每种基本培养基中均加入吲哚丁酸(IBA)3.0 mg/L、蔗糖30 g/L和琼脂7 g/L, pH值调节为5.8。

1.2.2 IBA浓度试验。依据培养基种类筛选结果,在以 B_5 为基本培养基的基础上,添加IBA 1、2、3、4、5和6 mg/L,以不添加IBA处理为对照。培养基的其他成分为蔗糖30 g/L,琼脂粉7 g/L, pH值调节为5.8。

1.2.3 糖种类和浓度试验。在 B_5 +IBA 2 mg/L培养基中分别加入蔗糖、葡萄糖、果糖和食用白糖,浓度均为30 g/L;在 B_5 +IBA 2.0 mg/L培养基中分别加入食用白糖20、30、40和50 g/L。培养基内均加入琼脂7 g/L, pH值调节为5.8。

1.2.4 培养条件。所有试验处理均接种5瓶,每个培养瓶内接入4个根段。在温度为(25±2)℃、相对湿度70%的条件下暗培养,培养30 d后调查不定根生长情况。

1.3 数据分析 试验数据利用SAS(Statistical Analysis System, Cary, NC, USA)程序分析,采用邓肯氏新复极差法进行比较,显著水平为0.05。

2 结果与分析

2.1 培养基种类筛选 将膜荚黄芪长约1 cm的不定根切段,接种于 B_5 、MS、LS和White培养基中,发现培养10 d时接入的不定根切段组织开始软化,并有些膨大,进而在不定根的一些部位形成愈伤组织,约15 d时在愈伤组织和原根段组织上均形成不定根。在不同培养基,不定根生长能力不同。由表1可知,在 B_5 培养基中不定根分化多,饱满,白嫩,培养30 d不定根布满培养基表面,鲜物重可达13.3 mg,为MS培养基的2.0倍,分别为LS和White培养基的6.1倍和7.3倍。将不定根在60℃烘干箱中干燥24 h后测定干物重,发现 B_5 培养基中不定根干物重在0.05水平显著高于MS、LS和White培养基,其干物率达到9.0%。MS、LS和White培养基

基金项目 延边大学科技发展计划项目(延大科合字2007第2号);延边大学学和创新教育实践课题(延大教发2007第3号)。

作者简介 廉家盛(1984-),男,吉林白山人,本科生,专业:生物技术。在药用植物上的应用。*通讯作者。

收稿日期 2008-02-08

中也可诱导不定根,但不定根生长慢,分化的根数少,尤其是 LS 和 White 培养基,培养 30 d 接种的根段大部分因老化呈褐色。

表 1 培养基种类对膜荚黄芪不定根生长的影响

Table 1 Effects of medium species on adventitious root growth of *A. membranaceus*

培养基种类	鲜物重	干物重	干物率
Medium species	Fresh weight	Dry weight	Dry matter
	mg/vessel	mg/vessel	content// %
B ₅	13.3 a	1.2 a	9.0
MS	6.3 b	0.6 b	8.8
LS	2.2 c	0.2 b	8.7
White	1.8 c	0.2 b	8.8

注:同列不同小写字母表示差异在 0.05 水平显著。下同。
Note: Values in same column followed with a different lowercase letter represent significantly different at 0.05 probability level. The same as below.

2.2 IBA 浓度对膜荚黄芪不定根生长的影响 IBA 对膜荚黄芪不定根生长影响很大。当培养基中 IBA 浓度大于 3 mg/L 时,不定根段在培养 10 d 开始表现松软,产生愈伤组织,进而形成不定根。而在低于 3 mg/L IBA 处理中,则不出现这种现象。不定根在接种的根段周围形成,形成的不定根较为紧实。当培养基中不添加 IBA 时,不定根分化少,生长不良。

由表 2 可知,培养 30 d 后,在 IBA 0~2 mg/L 范围内,随着 IBA 浓度的升高,不定根的鲜物重和干物重增加,IBA 2 mg/L 时出现最大值;当 IBA 浓度继续升高时,不定根鲜物重和干物重呈下降趋势,尤其是 IBA 浓度为 5 mg/L 时,不定根鲜物重和干物重分别仅为 IBA 2 mg/L 处理的 55.6% 和 50.0%。干物率变化在 IBA 浓度处理间不明显。虽然未添加 IBA 处理干物率值较高,但是不定根干物重少。因此,在膜荚黄芪不定根培养时,在 B₅ 培养基中以加入 2 mg/L IBA 最为适宜。

表 2 IBA 浓度对膜荚黄芪不定根生长的影响

Table 2 Effects of IBA concentration on adventitious root growth of *A. membranaceus*

IBA 浓度	鲜物重	干物重	干物率
IBA concentration	Fresh weight	Dry weight	Dry matter
mg/L	mg/vessel	mg/vessel	content// %
0	5.9 e	0.6 e	9.8
1	10.5 d	0.9 c	8.7
2	15.1 a	1.4 a	8.9
3	13.4 b	1.2 b	8.7
4	11.4 c	1.0 c	8.6
5	8.4 f	0.7 d	8.8

2.3 糖种类和白糖浓度对膜荚黄芪不定根生长的影响 为了探明糖种类对膜荚黄芪不定根生长的影响,比较了蔗糖、葡萄糖、果糖和食用白糖的效果,发现在蔗糖和白糖培养基中不定根生长良好,而在果糖和葡萄糖培养基中不定根生长不良,尤其是果糖处理,不定根生成少,且培养 30 d 时培养体呈黄褐色。由表 3 可知,培养 30 d 后,在蔗糖和白糖培养基中不定根鲜物重和干物重为在果糖和葡萄糖培养基中的 3 倍左右,而且两者间无显著性差异。

由表 4 可知,当白糖浓度较低(20 g/L)时,不定根分化少,黄褐色,出现枯萎现象;当白糖浓度为 30 g/L 时,不定根鲜物重和干物重分别为 13.4 和 1.2 mg,在 0.05 水平显著高于其他处理,且不定根分化多,白嫩,生长旺盛;当培养基中糖浓度高于 30 g/L 时,不定根鲜物重和干物重减少,且随着糖浓度的增加不定根生长受抑制现象严重,不定根干物率均可达 8% 以上。

表 3 糖种类对膜荚黄芪不定根生长的影响

Table 3 Effects of sugar types on adventitious root growth of *A. membranaceus*

种类	鲜物重	干物重	干物率
Sugar type	Fresh weight	Dry weight	Dry matter
	mg/vessel	mg/vessel	content// %
蔗糖 Sucrose	13.4 a	1.1 a	8.5
葡萄糖 Fructose	4.4 b	0.4 b	8.6
果糖 Glucose	3.4 b	0.3 b	9.0
食用白糖 Edible sugar	13.3 a	1.2 a	8.9

表 4 食用白糖浓度对膜荚黄芪不定根生长的影响

Table 4 Effects of edible sugar concentration on adventitious root growth of *A. membranaceus*

浓度	鲜物重	干物重	干物率
Concentration	Fresh weight	Dry weight	Dry matter
g/L	mg/vessel	mg/vessel	content// %
20	4.0 d	0.3 d	7.7
30	13.4 a	1.2 a	8.6
40	11.0 b	1.0 b	8.3
50	8.1 c	0.7 c	8.6

3 结论与讨论

离体条件下不定根的形成受许多因素的影响,如外植体类型、培养基种类、植物生长物质的种类及浓度、碳源等。该试验从无菌种子苗的胚根诱导了不定根,比较了 4 种基本培养基对不定根生长的影响。结果表明,B₅ 培养基可分化大量不定根,且生长良好。在黄芪不定根分化与生长过程中,生长素 IBA 效果明显。当 IBA 浓度为 2 mg/L 时,黄芪不定根生长旺盛;IBA 浓度低于或高于 2 mg/L 均不利于不定根生长。这与高先富等对三七的研究结果^[4]类似,但与朴炫春等人参的研究结果^[5]有差异。这说明植物生长物质对不定根诱导的效应可能与植物种属差异有关。

经高压灭菌后,组织培养中蔗糖部分分解为葡萄糖和果糖。一般,这更有利于植物体吸收和利用。但从试验结果来看,对于黄芪不定根培养,葡萄糖和果糖的单独存在不利于不定根的生长,只有当葡萄糖或果糖与部分蔗糖共存时才有利于不定根的生长。这与王蒂的研究结果^[6]相一致。此外,对黄芪不定根培养,蔗糖和白糖效果相近,但食用白糖价格仅为蔗糖的 1/10。在培养基中添加 30 g/L 食用白糖,既可促进不定根生长,又可降低培养基成本。

不定根的培养属于分化水平高的植物器官培养。一般,分化水平高的植物器官次生代谢产物更易于产生和大量积累,而关于黄芪不定根有效成分的含量及其与药材、悬浮细胞培养体系的比较有待于今后进一步研究。

分别为 0.1、0.3、0.5、0.8 时,蓝色斑点数依次为 3.2、6.3、9.4、5.7 个。由此可知,当农杆菌生长到对数生长期($D_{600\text{ nm}} = 0.5$)时,转化效率最高,平均每个外植体上出现 9.4 个蓝色斑点;当农杆菌生长到对数生长后期($D_{600\text{ nm}} = 0.8$)时,转化效率又下降。菌液浓度高时,靶组织上吸附的农杆菌很难用抗生素杀死,常常导致材料污染死亡,从而降低了转化效率。

2.3 侵染时间对转化效率的影响 侵染时间对 GUS 瞬时表达效率也有影响。由图 1 可知,在 5、10、30、60、120、180 min 6 个不同侵染时间中,侵染时间为 60 min 时转化效率最高。30、120、180 min 3 个侵染时间对 GUS 瞬时表达效率的影响相近。当农杆菌侵染时间过长时,由于农杆菌过度繁殖而造成抑菌困难或因农杆菌毒性过强而使外植体褐化死亡,因此农杆菌侵染时间不易过长。从该试验的结果来看,较适宜的农杆菌侵染时间为 30~60 min。

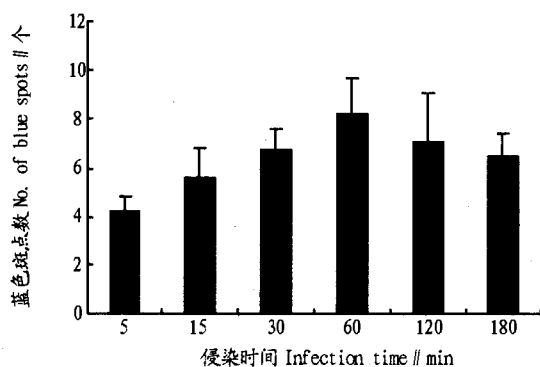


图 1 侵染时间对转化效率的影响

Fig.1 Effects of infection time on transformation efficiency

3 结论与讨论

影响农杆菌介导的大豆遗传转化效率的因素很多,笔者仅对共培养基中乙酰丁香酮浓度、农杆菌侵染时间及菌液浓度等因素进行了研究。农杆菌浓度、侵染时间、共培养时间等决定着感染植物细胞的菌数多少和 T-DNA 转移的机会^[14]。

不同生长时期的农杆菌均能够侵染大豆,但是转化效率明显不同。一般农杆菌生长到对数期和对数后期时活力高、侵染能力强。侵染时间也是影响转化效率的一个重要因素^[9]。侵染时间过短,农杆菌不能充分吸附到外植体上或吸附到外植体上的农杆菌较少,使得 T-DNA 不能有效地转移或被转化的细胞不够多,从而降低了转化效率;相反,如果农杆

菌侵染时间过长,由于农杆菌过度繁殖而造成抑菌困难或因农杆菌毒性过强而使外植体褐化死亡,两者均可导致转化效率下降。因此,对侵染时间进行研究,确定最佳侵染时间是十分必要的。结果表明,当农杆菌 $D_{600\text{ nm}}$ 值为 0.5 时,转化效率最高,农杆菌侵染时间以 30~60 min 较适宜。

越来越多的研究表明,在大豆转化的共培养基中添加乙酰丁香酮可以部分克服农杆菌介导的大豆转化的种和组织的特异性,是农杆菌介导的大豆转化成功的重要因素^[12-13]。该试验结果表明,添加 200 $\mu\text{mol/L}$ 的乙酰丁香酮能够有效地提高转化效率。

参考文献

- [1] 王连铮,尹光初,罗教芬,等.大豆致瘤及基因转移研究[J].中国科学(B辑),1984(2):137-141.
- [2] OWENS L D, CRESS D E. Genotypic variability of soybean response to *Agrobacterium* strains harboring Ti or Ri plasmids[J]. Plant Physiol, 1985, 77: 87-94.
- [3] MCKENZIE M A, CRESS D E. The evaluation of South African cultivars of soybean for their susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and the production of transgenic soybean[J]. S A J Sci, 1992, 88:193-196.
- [4] BAILEY M A, BOERMA H R, PARROTT W A. Inheritance of tumor formation in response to *Agrobacterium tumefaciens* in soybean[J]. Crop Sci, 1994, 34: 514-519.
- [5] DROSTE A, BODANESE ZANETTI M H, MUNDSTOCK E, et al. Susceptibility of Brazilian soybean cultivars to *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Rev Brail Genet, 1994, 17:83-88.
- [6] MAURO A O, PFEIFFER T W, COLLINS G B. Inheritance of soybean susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and its relationship to transformation[J]. Crop Sci, 1995, 35:1152-1156.
- [7] DONALDSON P A, SIMMONDS D H. Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean[J]. Plant Cell Rep, 2000, 19:478-484.
- [8] HINCHEE M A W, CONNOR-WARD D V, NEWELL C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer[J]. Biotechnology, 1988, 6:915-922.
- [9] ZHANG Z, XING A, STASWICK P E, et al. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean[J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 1999, 56:37-46.
- [10] OLFHOFF P M, LIN K, GALBRAITH J, et al. The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells[J]. Plant Cell Rep, 2001, 20:731-737.
- [11] OLFHOFF P M, FLAGEL L E, DONOVAN C M, et al. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method [J]. Planta, 2003, 216:723-735.
- [12] XUE R G, XIE H F, ZHANG B. A multi-needle-assisted transformation of soybean cotyledonary node cells[J]. Biotechnol Lett, 2006, 28:1551-1557.
- [13] XUE R G, ZHANG B, XIE H F. Overexpression of a N1R1 in transgenic soybean confers tolerance to water stress[J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 2007, 89:177-183.
- [14] 朱玉贤,李敏.现代分子生物学[M].北京:高等教育出版社,1997.

(上接第 2665 页)

参考文献

- [1] 樊锐锋,梁冰,李海燕,等.黄芪属(*Astragalus* Linn)植物生物学特性及组织培养技术研究进展[J].东北农业大学学报,2006,37(2):258-262.
- [2] 张树森,卢恭信.论黄芪的药用价值[J].海峡药学,2001,13(4):124-125.

- [3] 李雅丽,张凯.用农杆菌 Ri 诱导蒙古黄芪发根培养的研究[J].云南植物研究,2005,27(2):204-210.
- [4] 高先富,徐朝晖,刘佳健,等.三七不定根的离体诱导与培养[J].中国中药杂志,2006,31(18):1485-1488.
- [5] 朴炫春,廉美兰,王守明.利用生物反应器大量生产人参不定根[J].林业科技,2007,32(6):54-56.
- [6] 王蒂.植物组织培养[M].北京:中国农业出版社,2004:22.