

# 膜荚黄芪子叶节植株再生体系的建立

王树斌, 全雪丽, 周玉红, 吴松权

(延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002)

**摘要:**以膜荚黄芪无菌苗子叶节为外植体,建立了简单、高效和稳定的膜荚黄芪再生体系。结果表明:不定芽诱导的最适培养基是 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.10 mg/L,每个子叶节外植体平均出芽数为 3 个以上,再生频率达 75.5%;生根最适培养基为 1/2MS+IBA 0.5 mg/L;移栽后成活率达 75%以上。

**关键词:**膜荚黄芪;子叶节;再生体系

**中图分类号:**S 567.5<sup>+</sup>3 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)06-0177-02

黄芪来源豆科植物膜荚黄芪(*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge)或蒙古黄芪(*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao)的干燥根,为补气之常用中药,具有补气固表、利尿排脓、敛疮生肌的功效<sup>[1]</sup>。随着对黄芪药理作用研究的不断深入和黄芪保健品的开发,对其需求量也越来越大。目前野生黄芪种质资源几近枯竭,难以满足人们保健的需要<sup>[2]</sup>。组织培养是种质资源保存和扩大栽培的有效途径,近年来出现了一些对黄芪植株再生的报道,不过其再生频率较低,最高的仅为 32%,植株再生芽的数量少,难以满足遗传转化的需求<sup>[3]</sup>。无菌苗子叶节具有取材不受季节限制、再生频率高等优点<sup>[4]</sup>。该试验首次以膜荚黄芪子叶节为外植体,研究通过子叶节直接分化出芽,旨在建立一种快速有效的再生体系,为膜荚黄芪的种质资源保存和遗传转化奠定基础。

**第一作者简介:**王树斌(1986-),男,山东烟台人,硕士,现主要从事园艺植物生物技术研究工作。

**责任作者:**吴松权(1972-),男,吉林龙井人,博士,副教授,现主要从事植物基因工程研究工作。

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30860036);吉林省自然科学基金资助项目(201115228)。

**收稿日期:**2012-01-10

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

膜荚黄芪种子由延边大学长白山动植物资源研究中心保存。基本培养基为 MS 培养基,添加不同浓度和组合的植物生长调节剂。培养基中添加 3%的蔗糖和 0.8%的琼脂,调节 pH 至 5.8。组培室温度(25±2)℃,相对湿度 70%,光照强度 1 800 lx,每天光照 16 h。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 种子消毒** 用 70%的酒精表面消毒 30 s,用无菌水冲洗 1 次,加入 2%次氯酸钠消毒 13 min,用无菌水冲洗 4 次。

**1.2.2 外植体获得和不定芽诱导** 消毒后的种子接种在 MS 培养基中培养 2~3 d,待种子吸胀至刚长出胚根,去掉种皮后在子叶和下胚轴连接处去掉下胚轴后就可得到所需的子叶节外植体(每粒种子 2 个子叶节)。以每瓶 5 个外植体接种到 6-BA 1.0 mg/L 附加不同浓度 NAA(0.05、0.10、0.15 mg/L)和 6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.20 mg/L 的诱芽培养基上。3 次重复。

**1.2.3 不定芽生根** 在诱芽培养基中出现大量丛生的不定芽后,待芽长至 1.5 cm 左右时,切下不定芽插入到基本培养基为 1/2 MS 附加不同 IBA(0、0.5、1.0 mg/L)的培养基进行生根培养。

**Abstract:** The antifungal action of three kinds of *Cynanchum komarovii* extracts by using a mycelial growth method were tested against pathogen of *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. The results showed that total alkaloids, steroidal saponins and total flavonoids of *Cynanchum komarovii* extracts had inhibiting effects to the mycelium growth of these pathogen when the extract concentration was 500 mg/L. Among of them, total alkaloids of *Cynanchum komarovii* had a better antifungal activity, and the inhibition rate was 85% against tomatoes pathogen. Meanwhile, the EC<sub>50</sub> of total alkaloids of *Cynanchum komarovii* against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea* were 84.3471 mg/L and 135.8679 mg/L respectively. Total alkaloids of *Cynanchum komarovii* could be botanical fungicide.

**Key words:** *Cynanchum komarovii*; antifungal activity; *Alternaria solani*; *Botrytis cinerea*

1.2.4 移栽 不定芽生根后将瓶盖打开练苗 2~3 d,用镊子小心取出再生苗,洗净根部残留的培养基,然后栽于蛭石的培养钵中室温培养,适量浇水和营养液,待株高 10 cm 左右时移栽。

## 2 结果与分析

### 2.1 不定芽诱导

膜荚黄芪子叶节在 4 种诱芽培养基中,均能分化出不定芽,接种后 3~5 d 外植体的切口部位逐渐膨大,2 周后开始分化出不定芽,也有极个别是先形成愈伤组织后再分化出芽,平均分化出 3 个以上不定芽。由表 1 可知,通过对培养基中 6-BA 和 NAA 浓度分析,膜荚黄芪外植体再生频率与 6-BA/NAA 比值有关,当 6-BA/NAA 为 10 时再生频率高,不过在 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.20 mg/L 培养基上再生的不定芽较易出现玻璃化现象。因此,确定膜荚黄芪子叶节不定芽培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.10 mg/L,其再生频率最高为 75.5%。

表 1 不同培养基对膜荚黄芪子叶节不定芽诱导的影响

6-BA 浓度/mg · L <sup>-1</sup>	NAA 浓度/mg · L <sup>-1</sup>	再生频率/%
1.0	0.05	46.7
1.0	0.10	75.5
1.0	0.15	42.1
2.0	0.20	68.4

注:再生频率(%)=(再生 3 个以上芽的外植体数/外植体总数)×100%。

### 2.2 IBA 浓度对不定芽生根的影响

丛生的不定芽在生根培养基中逐渐伸长,展出新叶,并在基部生根,经 20~25 d 培养即可形成完整的再生植株。由表 2 可知,当生根培养基中不添加 IBA 时,部分外植体能正常生根,生根率为 24.5%。添加不同浓度 IBA 后,生根率明显升高,当 IBA 浓度为 1.0 mg/L 生根率为 48.0%,当 IBA 浓度为 0.5 mg/L 时,生根率最高达到 71.3%。另外试验还显示,添加 IBA 可缩短根分化的启动时间,并且诱导出的根与不添加 IBA 相比更粗壮。

### 2.3 移栽

当试管苗根长到 2~3 cm 左右时开瓶,将其移栽到

表 2 不同 IBA 浓度对不定芽生根的影响

6-BA 浓度/mg · L <sup>-1</sup>	接种的外植体数/株	生根的外植体数/株	生根率/%
0	98	24	24.5
0.5	101	72	71.3
1.0	98	47	48.0

盛有蛭石的培养钵中练苗培育。因试管苗比较娇嫩,应特别注意保温保湿,约 2 周左右幼苗生长正常后,让幼苗在自然光下健壮生长,1 个月之后可移栽到大田中,成活率可达 75%以上。

## 3 讨论与结论

植物生长调节剂的种类和浓度对组织培养成功与否起着重要的作用,6-BA 和 NAA 是黄芪组织培养中常用的细胞分裂素和生长素,二者的比例决定外植体分化出芽、愈伤组织或者根<sup>[3]</sup>。由该试验可知,适合膜荚黄芪子叶节不定芽诱导的 6-BA/NAA 比值为 10,6-BA/NAA 比值过高或过低都不利于不定芽的诱导。

试管苗玻璃化是植物组织培养中常出现的现象,有研究认为细胞分裂素容易导致玻璃化,培养基中 6-BA 浓度和玻璃化发生率呈正相关,6-BA 浓度越高发生玻璃化苗的频率越大<sup>[5]</sup>。该试验中玻璃化苗的产生也主要与 6-BA 浓度过高有关,因为玻璃化苗是在高浓度的细胞分裂素(6-BA 2.0 mg/L)存在下产生,而在低浓度细胞分裂素(6-BA 1.0 mg/L)存在下不发生或偶尔发生。

该研究首次以膜荚黄芪子叶节为外植体建立了简单、高效和稳定的植株再生体系,其再生频率达 75%以上,是良好的离体再生体系和遗传转化受体系统。

### 参考文献

- [1] 吴松权,祖元刚,管清杰,等.膜荚黄芪苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与序列分析[J].中草药,2010,41(3):456-460.
- [2] 赵明,段金殿,黄文哲,等.中国黄芪属(*Astragalus* Linn.)药用植物资源现状及分析[J].中国野生植物资源,2000,19(6):5-9.
- [3] 冉懋熊.中药组织培养实用技术[J].北京:科学技术文献出版社,2004.
- [4] 寇坤,刘丽君,曲姗姗,等.大豆新品系黑农 56 子叶节再生体系的优化[J].大豆科学,2009,28(3):401-402.
- [5] 李胜,李唯,杨德龙,等.植物试管苗玻璃化现象研究进展[J].甘肃农业大学学报,2003,38(1):1-16.

## Establishment of Plantlet Regeneration System of Cotyledon Node for *Astragalus membranaceus*

WANG Shu-bin, QUAN Xue-li, ZHOU Yu-hong, WU Song-quan  
(College of Agriculture, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002)

**Abstract:** The cotyledon node obtained from aseptic seedling of *Astragalus membranaceus* were used as the explant and a simple, stable and high efficient regeneration system for *A. membranaceus* were established. The results showed that the optimum medium for adventitious shoot regeneration was MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.10 mg/L, the average number of differential buds per cotyledon node was above 3, and the regenerated frequency was 75.5%. The suitable rooting medium was 1/2MS+IBA 0.5 mg/L and the survive rate was above 75% after transplantation.

**Key words:** *Astragalus membranaceus*; cotyledon node; regeneration system