

# 桔梗胚珠培养初报

吴京姬<sup>1</sup>, 严一字<sup>2</sup>, 吴松权<sup>2</sup>, 朴雪梅<sup>2</sup>, 吴基日<sup>2</sup>

(1. 延边农业科学院 生物技术研究所 吉林 龙井 133400; 2. 延边大学 农学院 吉林 龙井 133400)

**摘要:** 通过把从4种不同长度桔梗花蕾中取出的未受精胚珠接种在4种不同组合的培养基上诱导愈伤组织, 并把诱导的愈伤组织转接到分化培养基上, 试图得出单倍体植株。结果表明: 诱导率最高(82.9%)的培养基组合是  $N_6 + 2, 4-D \ 1 \text{ mg/L} + 6-BA \ 0.2 \text{ mg/L}$ ; 从长度为 1.8 cm 花蕾中取出的胚珠诱导率最高(82.4%); 在  $N_6 + 6-BA \ 1 \text{ mg/L} + NAA \ 0.5 \text{ mg/L}$  分化培养基上最高分化率可达 74.5%; 经根尖压片检查染色体数目的结果, 分化的绿苗中细弱的植株是单倍体植株。

**关键词:** 桔梗; 胚珠培养; 单倍体

**中图分类号:** S 567.23<sup>+</sup>7 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2010)02-0154-04

桔梗(*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) 根为著名的中药材, 具有宣肺、祛痰、散寒、镇咳、消肿、排脓等功效<sup>[1]</sup>, 桔梗根还可以制成美味的菜肴, 在中国东北地区及日本、韩国、朝鲜等东亚国家被用作常用蔬菜之一<sup>[2]</sup>。桔梗是两性花, 魏建和等<sup>[3]</sup>和作者进行自花授粉试验结果表明, 在自然状态下桔梗的自花授粉结实率很低, 结实主要靠异花授粉。所以在自然界中生长的桔梗种群的遗传基础是高度杂合的, 这给桔梗的遗传研究和育种实践带来很多困难。通过花药培养得到单倍体植株, 再经染色体加倍得到纯合的二倍体, 已在很多植物中获得成功<sup>[4]</sup>。

该试验在通过花药培养得到大量的桔梗单倍体植株的基础上<sup>[5]</sup>, 试图通过未受精胚珠培养得到桔梗单倍体植株, 旨在为今后桔梗的遗传研究和育种实践提供丰富的自交系材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基

**诱导愈伤组织培养基:** 以 MS 和  $N_6$  为基本培养基, 配成不同激素种类和浓度的 4 种培养基。①  $MS + 2, 4-D \ 1 \text{ mg/L} + 6-BA \ 0.2 \text{ mg/L}$ ; ②  $MS + 6-BA \ 1 \text{ mg/L} + NAA \ 0.5 \text{ mg/L}$ ; ③  $N_6 + 2, 4-D \ 1 \text{ mg/L} + 6-BA \ 0.2 \text{ mg/L}$ ; ④  $N_6 + 6-BA \ 1 \text{ mg/L} + NAA \ 0.5 \text{ mg/L}$ 。愈伤组织分化培养基为  $N_6 + 6-BA \ 1 \text{ mg/L} + NAA$

$0.5 \text{ mg/L}$ 。幼苗生根培养基为  $1/2 \text{ MS} + NAA \ 0.5 \text{ mg/L} + IAA \ 0.1 \text{ mg/L}$ 。

### 1.2 材料与方法

接种材料来自于 2 a 生桔梗试验田, 从田间取花蕾后在实验室内以张美萍<sup>[6]</sup>等关于桔梗胚胎学研究为主要依据, 又考虑到种源和气候因素的不同, 该试验选择长度分别为 1.6、1.8、2.0、2.2 cm 的花蕾中取出来的未受精胚珠为接种材料。把挑选好的花蕾先用流水冲洗 30 min 以冲去表面杂物, 然后在超净工作台上, 用 75% 酒精浸泡 1 min, 无菌水中冲洗 2~3 次, 再用 0.1% 升汞消毒 5 min, 无菌水中冲洗 5 次, 用消毒过的滤纸吸干花蕾表面的水分。将消毒好的花蕾用解剖刀剖开, 取出胚珠(图 1)接在培养基上, 每三角瓶接 2 个花蕾的 10 枚胚珠。

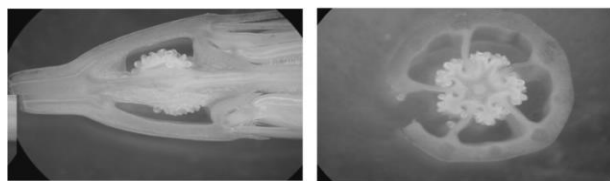


图 1 桔梗未受精胚珠

### 1.3 愈伤组织的分化

愈伤组织诱导率调查后, 把火柴头大小的愈伤组织转接到分化培养基上, 转接共进行 3 次, 即分别于 9 月 7 日、10 月 29 日和 12 月 1 日转接, 过 30 d 后调查, 前 1 次分化率调查后, 把未分化的愈伤组织转接到新鲜的分化培养基上。

### 1.4 生根与移栽

在分化培养基中待苗长到 4~5 cm 时, 将丛生苗在无菌条件下分成细弱的单株和健壮的单株后, 分别转接

**第一作者简介:** 吴京姬(1981—), 女, 实习研究员, 现主要从事马铃薯组织培养研究工作。E-mail: wjjkzx0406@yahoo.com。

**通讯作者:** 严一字(1964—), 女, 副教授, 现主要从事中药材种质资源及遗传育种研究工作。E-mail: yiziyuan@yahoo.com.cn。

**基金项目:** 吉林省科技厅基础处基金资助项目(20040553)。

**收稿日期:** 2009-08-20

到生根培养基上。转接后约过 10 d 开始生根, 生根率可达 100%。待根长至 4~5 cm 时, 揭去铝铂纸练苗 2~3 d 后, 取出小苗用水洗去培养基, 移栽于腐殖土中。

1.5 倍性的鉴定

在生根培养基中无菌苗的根长至 1~2 cm 时, 取根尖 0.5 cm 用 0.05%秋水仙素溶液预处理 4 h, 用卡诺氏固定液固定 24 h, 在常温下转入 1 mol/L 的 HCl 中, 10 min 后放入 45%的冰醋酸中软化 10 min, 用石炭酸品红染色 5~10 min, 常规压片观测染色体数目<sup>[7-9]</sup>。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

2.1.1 培养基种类对愈伤组织诱导的影响 接种的胚珠置于 25℃、自然光照条件下培养 1 周后, 有的胚珠周围开始出现淡黄色的愈伤组织, 开始愈伤组织生长速度缓慢, 但以后逐渐加快, 过 40 d 后调查愈伤组织诱导率的结果(见表 1)。表 1 中的接种数为 4 种长度(1.6、1.8、2.0、2.2 cm)花蕾中取出来的胚珠数的总和。刚开始愈伤组织的发生形态在各处理上无明显差异, 培养 40 d 后即可看到有 2 种类型的愈伤组织出现: 第 1 类为雪花状或棉絮状, 颜色为白色或淡黄色, 质地松软, 生长迅速(图 2), 统计计时为愈伤诱导组织数; 第 2 类为不规则瘤状或颗粒状, 颜色绿色或深绿色, 质地致密, 结构较硬脆, 生长旺盛(图 2), 统计计时为带绿芽点数。从表 1 可

以看出, 诱导率最高的是 N<sub>6</sub>+2, 4-D 1 mg/L+6-BA 0.2 mg/L 培养基(表 1 中的 3 号培养基), 其愈伤组织诱导率为 62.1%, 绿芽点率为 23.8%, 加在一起为 85.9%; 诱导率最低为 MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L 培养基(表 1 中的 2 号培养基), 其愈伤组织诱导率为 25.1%, 绿芽点率为 38.1%, 加在一起为 63.2%。2 种基本培养基的比较结果, N<sub>6</sub>培养基(表 1 中的 3 号、4 号培养基)上平均愈伤组织诱导率为 43.9%, 平均绿芽点率为 40.5%, 加在一起为 84.4%; MS 培养基(表 1 中的 1 号、2 号培养基)上平均愈伤组织诱导率为 40.4%, 平均绿芽点率为 30.4%, 加在一起为 70.8%。在该试验范围内以 N<sub>6</sub>为基本培养基的愈伤组织诱导效果好于以 MS 为基本培养基的效果。从激素种类及其搭配结果来看, 2, 4-D+6-BA 组合(表 1 中的 1 号、3 号培养基)的愈伤组织诱导率分别为 55.7%和 62.1%, 平均为 58.9%, 而绿芽点率分别为 22.7%和 23.8%, 平均为 23.3%; NAA+6-BA 组合(表 1 中的 2 号、4 号培养基)的愈伤组织诱导率分别为 25.1%和 25.6%, 平均为 25.4%, 而绿芽点率分别为 38.1%和 57.1%, 平均为 47.6%。从中可以看出 2, 4-D+6-BA 组合诱导愈伤组织率高于 NAA+6-BA 组合, 而诱导绿芽点率反而低于 NAA+6-BA 组合。说明 2, 4-D 虽然能提高愈伤组织诱导率, 但诱导绿芽点率不如 NAA。

表 1 愈伤组织诱导培养基上的愈伤组织的诱导率及绿芽点诱导率

序号	培养基种类	接种数	愈伤组织 诱导数	愈伤组织 诱导率/%	带绿芽点数	绿芽点率 /%	诱导率+绿芽点率 /%
1	MS+2, 4-D 1 mg/L+6-BA 0.2 mg/L	548	305	55.7	124	22.7	78.4
2	MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L	598	150	25.1	228	38.1	63.2
3	N <sub>6</sub> +2, 4-D 1 mg/L+6-BA 0.2 mg/L	319	198	62.1	76	23.8	85.9
4	N <sub>6</sub> +6-BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L	861	220	25.6	492	57.1	82.7

注: 愈伤组织诱导率=(愈伤组织诱导数/接种数)×100%; 绿芽点诱导率=(带绿芽点数/接种数)×100%。

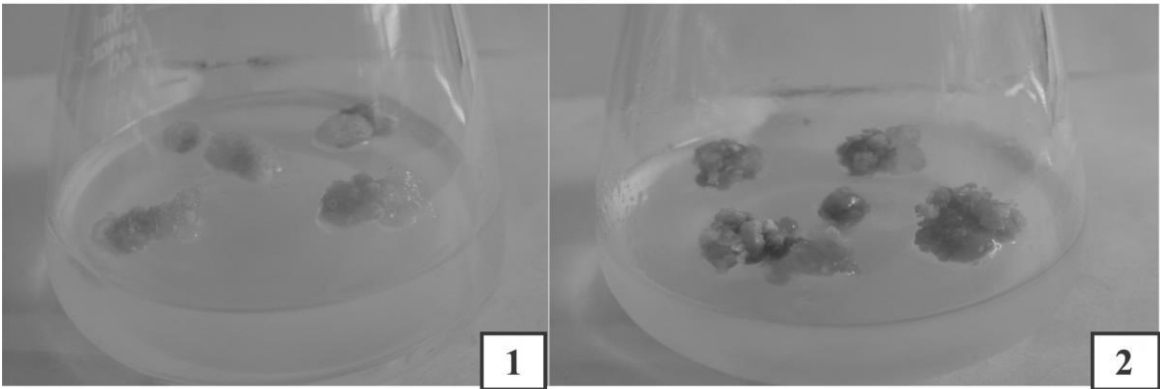


图 2 桔梗胚珠中诱导的 2 种愈伤组织

2.1.2 不同长度花蕾中胚珠对愈伤组织诱导的影响 从表 2 可以看出, 不同长度花蕾中的胚珠诱导愈伤组织

和诱导绿芽率有所不同, 当花蕾长度为 1.8 cm 和 2.0 cm 时诱导愈伤组织率分别为 45.0%和 47.3%, 高于 2.2 cm

和 1.6 cm (32.2%、34.9%)时,而诱导绿芽点率分别为 35.1%和 35.3%,低于 2.2 cm 和 1.6 cm (43.2%、44.9%)时,具体原因待继续探讨。虽然该试验中不同长

度花蕾中的胚珠愈伤组织诱导结果差异不明显,但综合起来认为花蕾长度为 1.8 cm 时的效果略好一些。

表 2 不同花蕾长度对桔梗愈伤组织及绿苗率的影响

花蕾长度 / cm	接种数	愈伤组织数	愈伤组织诱导率 / %	绿芽点数	绿芽点诱导率 / %	愈伤组织诱导率+绿芽点诱导率 / %
2.2	597	192	32.2	258	43.2	75.4
2.0	278	125	45.0	98	35.3	80.3
1.8	404	191	47.3	142	35.1	82.4
1.6	1047	365	34.9	470	44.9	79.8

注:表中数据是以同一长度花蕾在 4 种不同培养基上的数字加在一起为 1 个统计单位来计算的。

2.2 愈伤组织的分化

诱导的愈伤组织分 3 次转接到分化培养基上,过 30 d 后的调查结果见表 3。愈伤组织转接到分化培养基后,已带绿芽点的愈伤组织继续分化出很多绿芽点,已分化出的绿芽点逐渐长成完整的绿芽植株,一块愈伤组织中长出来的小植株数不等,少者几棵,多者十几棵。

该试验只用 1 种分化培养基(N<sub>6</sub>+6-BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L),所以主要探讨愈伤组织诱导阶段的各种因素对分化的影响。如表 3 所示,3 次转接

分化的效果有所不同,3 次转接的平均分化率最高的是来自 3 号诱导培养基的愈伤组织,其平均分化率为 74.5%,平均分化率最低的是来自 4 号诱导培养基的愈伤组织,其分化率仅为 19.7%,前者是后者的 3.78 倍。试验中发现,随着分化继代次数的增加,来自 1 号和 3 号诱导培养基的愈伤组织分化率逐渐升高,相反来自 2 号和 4 号诱导培养基的愈伤组织分化率逐渐下降,并且死亡的愈伤组织也越来越多,其原因待深入探讨。

表 3 分化培养基上绿苗的分化

培养基序号	第 1 次转接			第 2 次转接			第 3 次转接			C 平均
	A	B	C/ %	A	B	C/ %	A	B	C/ %	
1	382	198	51.8	92	68	73.9	85	74	87.1	71.0
2	485	165	34.0	78	20	25.6	83	18	21.7	27.1
3	439	262	59.7	82	64	78.0	85	73	85.9	74.5
4	630	236	37.5	86	10	11.6	72	7	10.0	19.7

注:表中“A、B、C”依次为“接种愈伤组织数、绿苗分化数、绿苗分化率(%)”。

2.3 生根与移栽

分化的单株有些比较细弱,有些比较健壮,待分化培养基中的苗长到 4~5 cm 时,将丛生苗在无菌条件下分成细弱和健壮 2 组,分别转接到生根培养基上。转接后约过 10 d 开始生根,生根率可达 100%。待根长至 4~5 cm 时,揭去铝铂纸练苗 2~3 d 后,取出小苗用水洗去基部培养基,移栽于腐殖土中。

2.4 倍性的鉴定

移栽前分别取细弱单株和健壮的单株的根尖,经压片检查染色体,结果表明细弱单株大多数是单倍体植株,健壮单株大多数是二倍体植株。单倍体植株和健壮单株的比例大致相同。

3 讨论与小结

张美萍等<sup>[6]</sup>研究桔梗胚胎学的结果,花蕾长度为 1.6~1.7 cm 时,功能大孢子增大,细胞质中形成了大液泡,发育成单核胚囊;当花蕾长 1.7~1.8 cm 时,单核胚囊经 1 次有丝分裂形成二核胚囊;当花蕾长 1.9~2.0 cm 时,二核胚囊的核同时分裂形成四核胚囊;当花蕾长 2.0~2.2 cm 时,四核胚囊的核同时分裂形成八核胚囊。该试验没有对拟接的胚珠进行压片观察确定胚囊的发育时期,主要依据张美萍等研究结果,同时考虑到种质

资源和气象因素的影响,选取长度分别为 1.6、1.8、2.0、2.2 cm 的花蕾。试验结果表明花蕾长度为 1.8 cm 的效果比其它长度略好一些。但今后需要用压片法来探讨花蕾长度和胚囊发育时期以及桔梗胚囊发育时期和诱导愈伤组织的关系。

该试验中 MS 和 N<sub>6</sub> 为基本培养基都可以诱导桔梗胚珠的愈伤组织分化出绿苗,但以 N<sub>6</sub> 为基本培养基的效果好于 MS,且以 N<sub>6</sub>+2,4-D 1 mg/L+6-BA 0.2 mg/L 培养基组成的效果最好,此结果与桔梗花药培养的结果相一致<sup>[5]</sup>。分化出的绿苗中有细弱的植株和健壮的植株,经根尖压片检查染色体数目认定细弱的植株是单倍体植株,为今后肉眼判断桔梗单倍体植株奠定了基础。单倍体植株今后经染色体加倍可以得到大量的纯合二倍体,为桔梗的新品种选育和遗传规律研究提供丰富的原始亲本和试验材料。

参考文献

[1] 刘德军,冯维希.桔梗[M].北京:中国中医药出版社,2001:1-10.  
[2] 舒雯,高山林.桔梗研究进展[J].中国野生植物资源,2001,20(2):4-6.  
[3] 魏建和,黄璐琦,陈士林,等.桔梗柱头、花粉生活力及自交亲和性研究[J].中国中药杂志,2006,31(5):366-368.  
[4] 王延玲,丰震,赵兰勇.植物花药培养研究进展[J].山东农业大学学报(自然科学版),2006,37(1):149-151.

# 四种补血草组织培养的比较研究

徐美隆<sup>1,3</sup>, 李永华<sup>2,3</sup>, 吴建华<sup>1,2</sup>

(1. 种苗生物工程国家重点实验室, 银川 宁夏 750004; 2. 国家经济林木种苗快繁工程技术研究中心, 宁夏 银川 750004;

3. 宁夏林业研究所(有限公司), 宁夏 银川 750004)

**摘要:**以叶片和带腋芽的花茎为外植体对不同补血草品种(P104、UH4、429、867)进行组织培养比较研究。结果表明:在培养基 MS+6-BA 0.3 mg/L+NAA 0.6 mg/L 上,品种均能通过带腋芽的花茎分化出芽,出芽率依次为 P104>UH4>867>429,但污染严重;“情人草”品种 P104、UH4 能通过叶片诱导出愈伤组织,而“勿忘我”品种不能;在生根培养基 1/2MS+IBA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+Vc 200 mg/L+PP<sub>33</sub> 0.2 mg/L 中,4 个品种均能生根,其生根率依次为 P104>UH4>429>867。

**关键词:**补血草;组织培养;品种差异;比较研究

**中图分类号:**S 681.903.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)02-0157-04

补血草(*Limonium*)属蓝雪科(*Plumbaginaceae*)多年生或 2 a 生草本植物,该属有近 20 种可作观赏用。因其花朵细小,干膜质,色彩淡雅,观赏时期长,与满天星一样,是重要的配花材料。除作鲜切花外,还可制成自然

干花,用途更为广泛,是近年来发展较快的一类新型配花类鲜切花。当前,补血草属植物作为各种类型插花作品的优良配花正受到越来越多的人喜爱。

补血草属植物一般采用种子繁殖。但补血草属植物的遗传性十分特殊,其花粉有 A、B 型之别,柱头有玉米状、乳头状和头状之分,其杂交亲和性取决于花粉和柱头的形态组合;同时补血草具有大量的不孕枝和同型杂交不孕的特性,种子结实少,所以补血草若用种子繁殖,种子来源的可靠性就限制了批量生产<sup>[1]</sup>。当前,植

**第一作者简介:**徐美隆(1979—),男,四川大竹人,硕士,助理研究员,现主要从事植物组织培养方面研究工作。E-mail: xml1106007@163.com。

**收稿日期:**2009-08-20

[5] 吴京姬,吴基日,吴松权,等.桔梗花药培养初报[J].植物研究,2008 28(1):79-81.

[6] 张美萍,申家恒,管贺群.桔梗胚胎学研究[J].吉林农业大学学报 1992 14(2):31-34.

[7] 杨九艳,王连侠,李凤云.桔梗的染色体核型分析[J].内蒙古医学院

学报,1998,20(3):185-186.

[8] 赵华,杨培君,李慧宁.三种植物染色体组型分析[J].汉中师范学院学报(自然科学),2004 22(1):70-73.

[9] 朱徵.植物染色体及染色技术[M].北京:科学出版社,1982:42-93.

## Preliminary Study of Ovule Culture of *Platycodon grandiflorum*

WU Jing-ji<sup>1</sup>, YAN Yi-zi<sup>2</sup>, WU Song-quan<sup>2</sup>, PIAO Xue-mei<sup>2</sup>, WU Ji-rui<sup>2</sup>

(1. Yanbian Agricultural Research Institution of Biological, Longjing, Jilin 133400; 2. Agricultural College of Yanbian University, Longjing, Jilin 133400)

**Abstract:** Ovule of *Platycodon grandiflorum* growing to of different length was inoculated in four differentiation culture medium and induced callus, the induced callus was transfered in differentiation culture, trying to get haploidy in this study. The results showed that the culture medium of the highest (82.9%) induced rate of callus was N<sub>6</sub>+2,4-D 1 mg/L+6-BA 0.2 mg/L; induced rate the highest (82.4%) from ovule to 1.8 cm length flower bud, the highest differentiation rate was 74.5%; in the culture of N<sub>6</sub>+6-BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L, puny green plant in differentiation was haploid with the result of chromosome number of root.

**Key words:** *platycodon grandiflorum*; ovule culture; haploid