

桔梗不育系的组织培养和快速繁殖技术研究

陈庆亮, 单成钢, 朱彦威, 王志芬

(山东省农业科学院农产品研究所, 山东省农业科学院 药用植物研究中心 山东 济南 250100)

摘要:以桔梗雄性不育系为材料, 对其组培快繁技术进行研究。结果表明:带腋芽的幼嫩茎段以组培快繁技术保存、扩繁桔梗雄性不育系是可行的;最适愈伤培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L, 分化率为 93.6%;最适增殖培养基为 MS+6-BA 0.3 mg/L+NAA 0.1 mg/L, 增殖系数为 6.7;适合其生根的培养基是 1/2MS+PP₃₃₃ 0.3 mg/L+NAA 0.2 mg/L, 平均每株生根数为 8.6 条, 平均根长 6.3 cm, 生长的根较粗壮;练苗 7 d 后, 移入蛭石和草炭土 (1:1) 的营养土中, 移栽成活率 87%。

关键词:桔梗; 雄性不育系; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号: S 682.1⁺9 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)16-0142-03

中药桔梗为桔梗科桔梗 (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) 的干燥根, 有宣肺、祛痰、排脓之功效^[1]。随着中药产业的发展, 桔梗已成为极具开发前景的一种药、食、赏三用经济作物。为满足市场对桔梗质量、产量、新品种的要求, 桔梗种质资源成为研究热点^[2-7]。种质资源研究中, 雄性不育材料的发现为桔梗杂交育种及生物学研究奠定了基础^[8-10]。然而, 因雄性不育植株的不育性和连续种植后根腐病发生严重等原因, 导致桔梗不育植株数量减少。因此, 现以不育桔梗幼嫩茎段为材料, 研究其离体培养试验及优化快繁技术, 为增加其繁殖系数、缩短育苗周期提供依据。

第一作者简介: 陈庆亮(1972-), 男, 博士, 助理研究员, 现从事药用植物生理及育种工作。E-mail: cqleau@126.com。

通讯作者: 王志芬(1963-), 男, 硕士, 研究员, 研究方向为药用植物品种选育栽培及药用植物标准化。

基金项目: 山东省农业良种工程资助项目 (2005L208-02); 山东省农业科学院高新技术自主创新基金资助项目 (2006YC X008); 山东省农业科学院博士科研启动基金资助项目 (2006YBS003)。

收稿日期: 2010-03-31

1 材料与方法

1.1 试验材料

不育桔梗 (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) 株系, 来源于山东省农业科学院药用植物研究中心试验田 (济南)。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒处理 从田间采摘桔梗雄性不育材料幼嫩主茎或侧枝, 用中性洗涤液刷洗干净后, 流动的自来水冲洗 0.5 h, 吸干水分, 经 75% 酒精表面灭菌 30 s, 无菌水冲洗 5 次, 再用 0.1% HgCl₂ 消毒 10 min, 无菌水冲洗 5 次, 切成 0.5~1 cm 的小段, 且每段要带 1 个腋芽。

1.2.2 愈伤诱导培养 取消毒后长 0.5~1 cm 桔梗茎段接种于 ① MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.05 mg/L; ② MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L; ③ MS+6-BA 1 mg/L+IAA 0.1 mg/L 的培养基上诱导。记录出现愈伤时间(接种的茎段有 50% 出现愈伤的时间), 分化率 (40 d 时愈伤发生分化的茎段数与形成愈伤的总茎段数比值) 等。

1.2.3 增殖培养 40 d 后将分化的丛生芽切成 0.5 cm

Study on Rooting Culture Techniques of *Vaccinium ashei* Reade Shoots *in vitro*

WANG Da-ping

(Institute of Life Science and Technology, Chongqing University of Arts and Sciences Yongchuan, Chongqing 402160)

Abstract: Effects of basic media, plant growth regulators and activated charcoal on *Vaccinium ashei* Reade shoots rooting induction *in vitro* were studied. The results showed that the rooting rate reached 78.7% in 1/2 WPS medium with IBA 0.5 mg/L and 0.3% activated charcoal, mean number of roots was 5.8, root length was 3.3 cm.

Key words: *Vaccinium ashei* Reade; basic media; plant growth regulators; activated charcoal; rooting

方块接种于①MS+6-BA 0.3 mg/L+NAA 0.1 mg/L; ②MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L; ③MS+6-BA 0.3 mg/L+IAA 0.1 mg/L的培养基上培养。记录15~20 d的愈伤分化状况和30 d的增殖系数(每接种块上的丛生芽数)。

1.2.4 生根培养 30 d后切取生长一致、2.5 cm以上的壮苗接种于①1/2MS+IAA 0.5 mg/L+ABT 0.1 mg/L+PP₃₃₃ 0.3 mg/L; ②1/2MS+NAA 0.2 mg/L+PP₃₃₃ 0.3 mg/L; ③1/2MS+NAA 0.5 mg/L+PP₃₃₃ 0.3 mg/L培养基上培养。记录其生根时间(接种的苗有50%生根的时间), 平均根条数, 平均根长, 平均生根率(生根的苗数与接种的苗数比值), 生根状况(30 d)。试验所用培养基, 均加入3%蔗糖和0.75%琼脂, pH 5.8。培养温度(25±2)℃, 连续光照12 h/d, 光照强度30~40 μmol·m⁻²·s⁻¹。

1.2.5 练苗与移栽 30 d后将培养瓶放到培养室外, 先拧松培养瓶盖, 3 d后瓶盖完全拧松, 且不要取下练苗。练苗7 d后用镊子把苗从培养瓶中取出, 轻轻去除根部

琼脂, 移入蛭石和草炭土(1:1)的营养土中。移栽后7 d内每天喷雾2 h, 注意保持营养土水分。

2 结果与分析

2.1 诱导愈伤培养

由表1可知, ②与①相比, 随着6-BA和NAA浓度的提高, 出现愈伤时间缩短, 生成愈伤的茎段数和分化率提高, 应选择②; ③与①相比, 当6-BA浓度相同时, 添加NAA和IAA的组合出现愈伤时间和分化率基本一致, 但添加NAA的培养基生成愈伤的茎段数高于IAA培养基的茎段数, ①优于③。上面分析可知, ②为适宜组合, 产生的愈伤结果见图1。

表1 不同植物激素组合对桔梗不育系茎段诱导愈伤的影响

| 处理 | 茎段数 | 出现愈伤时间/d | 生成愈伤的茎段数 | 分化率/% |
|----|-----|----------|----------|-------|
| ① | 50 | 15 | 39 | 76.9 |
| ② | 50 | 12 | 47 | 93.6 |
| ③ | 50 | 14 | 34 | 76.4 |



图1 桔梗不育系愈伤培养



图2 桔梗不育系增殖培养

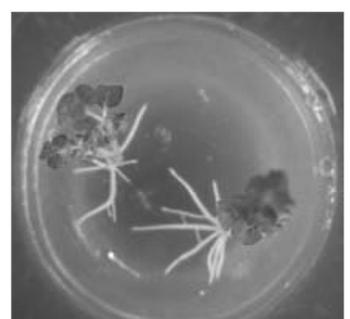


图3 桔梗不育系生根培养

2.2 增殖培养

由表2可知, 随着6-BA和NAA浓度提高, ①组合的分化状况优于②, 但①组合的增殖系数小于②, 考虑到生理状态一致的苗有利于后期生根培养等原因, 应该选择①; ①和③的激素添加物相比只是把①的NAA更替为IAA, 结果是①的分化状况和增殖系数都优于③。因此, ①分化出的苗健壮且生长一致, 增殖系数高, 增殖培养结果见图2。

表2 不同植物激素组合对桔梗不育系丛生芽增殖的影响

| 处理 | 分化状况 | 增殖系数 |
|----|-------------------------|------|
| ① | 丛生芽生长一致, 粗壮, 颜色深绿, 叶片较大 | 6.7 |
| ② | 丛生芽株高差异较大, 颜色深绿 | 7.2 |
| ③ | 丛生芽较瘦弱, 个别出现玻璃化 | 5.4 |

2.3 生根培养

从表3可知, ABT和IAA的共同作用下, ①生根数和生根率都大于②, 但是①生根时间长于②、平均根长

小于②, 而且②生根状况明显优于①, 因生根状况是影响组培苗成活率的主要指标, 应该选择②; ③与②相比随着NAA浓度的升高生根时间延长, 生根数、平均根长、平均生根率都明显降低, 且生根状况也降低。因此, 应选择②作为生根处理, 生根状况见图3。

表3 不同植物生长调节剂对桔梗不育系茎段不定芽根再生的影响

| 处理 | 株数 | 生根时间/d | 平均生根数/条 | 平均根长/cm | 平均生根率/% | 生根状况/30 d |
|----|----|--------|---------|---------|---------|---------------|
| ① | 30 | 14 | 15.6 | 3.2 | 96.7 | 簇生、最短最细、数量最多 |
| ② | 30 | 12 | 8.6 | 6.3 | 90 | 非簇生、最长较粗、数量次之 |
| ③ | 30 | 18 | 4.5 | 5.8 | 83.3 | 非簇生、较长最粗、数量最小 |

2.4 练苗与移栽

练苗后移栽成活率87%以上, 生长状况见图4。

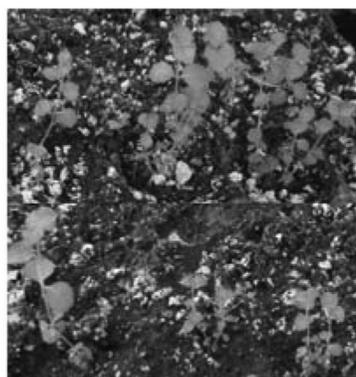


图4 练苗移栽

3 结论与讨论

以桔梗种子萌发的无菌苗叶片、根段、茎段和茎尖为外植体进行组织培养已有报道^[11,12]。试验中不育材料没有种子,外植体只能来源于大田。与室内无菌苗作为外植体相比,田间材料作为外植体污染率高、成功率低。外植体消毒是否成功,是试验成败的关键。试验在前人消毒方法的基础上,增加了流动水冲洗,并延长HgCl₂消毒时间,降低了外植体污染率,克服其消毒的难关。

李美善等发现桔梗种质资源间组织培养有一定差异,在试验中也得到了验证^[12]。桔梗雄性不育材料愈伤的产生、增殖、生根等过程中,激素添加量和种类与前人的研究结果有相似性又有差别。该试验针对生根培养后,无菌苗瘦弱及植株过高,导致练苗移栽成活率低的

现象,采取向生根培养基中添加多效唑,促进无菌苗植株矮化粗壮,提高了练苗移栽的成活率。

通过组织培养快繁技术,获得大量桔梗雄性不育系植株,为桔梗育种和分子生物学提供试验材料。更重要的是,它完全保持了母株的特性,为桔梗杂交制种纯度的保持及不育系选育奠定了基础。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 1部. 北京: 化工医药出版社, 2005: 461.
- [2] 王志芬, 苏学合, 单成钢等. 不同产区桔梗主要产量性状的比较研究[J]. 山东农业科学, 2007(6): 57-58.
- [3] 魏建和, 杨成民, 陈士林等. 桔梗栽培及野生种质遗传多样性的RAPD分析[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2006, 8(3): 37-41.
- [4] 严一字, 吴基日, 孙丽娜. 桔梗种质资源的RAPD分析[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(16): 3908-3910.
- [5] 巩毅刚, 王俊杰. 中国长白山中的一颗明珠—野生桔梗“九桔兰花”[J]. 农业与技术, 1998(2): 5.
- [6] 李挺, 宫光前, 李从勇. 药食兼用桔梗太桔1号及高产栽培技术[J]. 中国农技推广, 2004(3): 56.
- [7] 朱彦威, 单成钢, 倪大鹏等. 桔梗新品种鲁梗1号的选育及栽培技术[J]. 山东农业科学, 2009(1): 115-116.
- [8] 王志芬, 苏学合, 单成钢等. 桔梗雄性不育材料的发现与鉴定[J]. 现代中药研究与实践, 2007, 21(5): 8-9.
- [9] 吴基日, 严一字, 朴锦等. 桔梗雄性不育种质JXB-1的发现与鉴定[J]. 延边大学学报, 2007, 29(4): 245-248.
- [10] 刘自刚, 张雁, 杨亚丽. 桔梗雄性不育突变体的发现与鉴定[J]. 北方园艺, 2009(1): 40-43.
- [11] 唐伟斌, 石晓云. 药用植物桔梗组培快繁体系的建立[J]. 河北师范大学学报, 2006, 30(5): 599-601.
- [12] 李美善, 吴京姬, 吴基日. 桔梗种质资源间组织培养特性[J]. 北方园艺, 2008(3): 192-194.

Tissue Culture and Rapid Propagation of a Male Sterile Line of *Platycodon grandiflorum*

CHEN Qing-liang, SHAN Cheng-lang, ZHU Yan-wei, WANG Zhi-fen

(Institute of Agro-food Science and Technology; Research Center for Medicinal Plants Shandong Academy of Agricultural Sciences Jinan, Shandong 250100)

Abstract: Tissue culture and rapid propagation of a male sterile line of *Platycodon grandiflorum* were studied. The results showed that the method of taking stem section with an axillary bud to conservation and enlarged propagation of male sterile line of *Platycodon grandiflorum* was feasible. The fit culture for stem section to induce callus was MS supplemented with 2.0 mg/L 6-BA and 0.2 mg/L NAA. Its differentiation rate was 93.6%. The fit culture medium for stem section to proliferate was MS supplemented with 0.3 mg/L 6-BA and 0.1 mg/L NAA. Its proliferation coefficient was 6.7. The fit rooting culture medium for stem section was 1/2MS supplemented with 0.3 mg/L PP₃₃₃ and 0.2 mg/L NAA, means of root quantity was 8.6 per plantlet and length 6.3 cm. The roots of culture-bottle plant were thicker compared with those in other culture mediums. After culture-bottle seedlings hardened for 7 d, they were transplanted into nutrient soil(vermiculite and peat soil, 1:1). Their survival rate was up to 87%.

Key words: *Platycodon grandiflorum*; male sterile line; tissue culture; rapid propagation