

doi:10.11937/bfyy.20170888

桔梗的组培离体再生

刘秀杰^{1,2}, 田 驷 颀², 裴 毅², 汪 吉², 刘艳军², 聂江力²

(1. 天津市翠屏湖科学园, 天津 301908; 2. 天津农学院 园艺园林学院, 天津 300384)

摘 要:以桔梗的子叶和下胚轴为外植体, 采用离体培养的方法, 研究了诱导芽的频率, 找出较为理想的外植体类型和相应的培养条件, 以期建立高效的桔梗组培再生体系, 为桔梗优良株系的繁育和利用提供有效途径。结果表明: 桔梗的子叶、下胚轴均可成功诱导出再生芽, 其中以子叶诱导率最高, 最适合的培养基为 $MS+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ BA}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IAA}$, 在 $MS+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ BA}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IAA}$ 的培养基上桔梗再生芽的生长长度最高。因此, 桔梗的子叶是最理想的外植体类型, 相应的分化培养基组合为 $MS+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ BA}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IAA}$, 伸长培养基组合为 $MS+0.50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ BA}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IAA}$ 。

关键词:桔梗; 培养基; 再生; 无菌苗

中图分类号:S 682.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)17-0040-04

桔梗(*Platycodon grandiflorus*)属桔梗属多年生草本植物, 别名僧帽花、铃铛花, 茎多直立, 株高一般在 20~120 cm, 叶轮生, 无柄, 卵形或卵状椭圆形至披针形, 花蓝紫色, 可作观赏花卉; 其根为常用中药, 具有止咳祛痰、宣肺、排脓的作用^[1]。在我东北地区常被腌制为咸菜, 在朝鲜半岛被用来制作泡菜^[1]。

桔梗分布较广, 对生长环境适应性较强, 以往采用传统育种方法来改良桔梗品种, 但工序比较复杂, 费工费时, 且受地域、气候以及水分等多种环境因素的制约。随着分子生物学的发展和组织培养技术的日趋成熟, 科研人员纷纷把研究方向转向基因工程, 期待在较短时间内改良桔梗品种^[2]。

该研究以桔梗的子叶和下胚轴为外植体, 分析二者诱导芽的频率, 找出较为理想的外植体类

型和相应的培养条件, 以期桔梗优良株系的繁育和利用提供有效途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试桔梗种子购于河北省安国市中药材种植基地。

供试仪器: 超净工作台(江苏苏静 SW-CJ-1B), 光照培养箱(中兴 GZX), 医用高压消毒锅(日本科技株式会社 SM-52-2)。

供试试剂: IAA 试剂(纯度>98%, 上海蓝季生物), BA 试剂(生化试剂, 上海伯奥生物科技有限公司), 琼脂粉(生化试剂, 天津市北方天医化学试剂厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 不同浓度激素对子叶再生芽的诱导

取桔梗的子叶作为外植体, 分别接种到含有不同浓度分裂素 BA 的 MS 分化培养基上, 附加 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖以及一定浓度的 IAA, 具体浓度设置见表 1。将接种的培养基置于培养室, 培养温度控制为 $(23\pm 2)^{\circ}\text{C}$, 光照时间 $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。培养 15 d 后调查再生率及再生芽质量。再生率($\%$)=再生芽外植体数/总接种数 $\times 100$ 。再生芽

第一作者简介:刘秀杰(1965-), 男, 天津人, 本科, 高级工程师, 现主要从事药用植物栽培与管理等研究工作。E-mail: xiujie1@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31100401); 天津市科技计划资助项目(16PTZSTG00020); 天津市科技特派员资助项目(15JCTPJC59500)。

收稿日期:2017-04-17

的生长质量级别如下^[3]:一级为生长正常,健壮,培养后可直接生根的再生芽;二级为生长正常的芽,但芽多为簇生,很难长大并伸长;三级为再生芽生长不正常,为畸形或玻璃化。

1.2.2 不同浓度激素对下胚轴再生芽的诱导

以桔梗下胚轴为外植体,分别接种到含有不同分裂素浓度的 MS 分化培养基上。附加一定浓度的 BA 和 IAA 以及 30 g · L⁻¹ 蔗糖,具体浓度设置见表 2。将接种的培养基放入培养室,培养条件同上。培养 15 d 调查再生率及再生芽质量。

1.2.3 不同浓度激素对再生芽伸长生长的诱导

取桔梗再生芽,分别接种到含有不同生长素和分裂素浓度的 MS 生根培养基上,附加 30 g · L⁻¹ 蔗糖,具体浓度设置见表 3。将接种的培养基放入培养室,培养条件同上。培养 15 d 测量生长长度。

2 结果与分析

2.1 不同激素浓度对子叶再生芽诱导的影响

采用桔梗的子叶为外植体,在不同激素浓度培养基上诱导再生芽,由表 1 可知,采用附加生长

素的培养基组合获得的增殖效果要明显好于不加生长素的处理。这说明桔梗内源生长素的合成能力较低,需要在培养基中进行添加;在低浓度的分裂素与生长素比值的情况下,再生效果较低,随着 BA 浓度的增加,再生效果开始变得越来越好,再生率与单个外植体再生芽数都有所增加。但当 BA 的浓度超过 1.0 mg · L⁻¹ 时,虽然再生率也很高,但再生芽质量明显下降,再生芽表现为生长缓慢,出现玻璃化现象,同时随着 BA 浓度的进一步增大,再生率与再生芽数均明显下降,这说明,适宜的分裂素与生长素配比可以获得桔梗离体再生的最佳效果。综上,最好的培养基配方组合为 MS+1.0 mg · L⁻¹ BA+0.5 mg · L⁻¹ IAA,再生率可达 82%。

2.2 不同激素浓度对下胚轴再生芽诱导的影响

采用桔梗的下胚轴为外植体,在不同激素浓度培养基上诱导再生芽,由表 2 可知,单独采用 BA 进行离体再生诱导时,在桔梗下胚轴外植体上没有再生芽出现,相反,下胚轴的两端出现褐变和萎缩的现象,这说明,下胚轴内源生长素合成能

表 1 不同浓度激素对桔梗子叶再生芽的影响

Table 1 Effect of different concentrations of hormones on regeneration of cotyledons of *Platycodon grandiflorus*

培养基配方 Culture medium formula	外植体数 Number of explants	再生芽的外植体数 Number of explants in regenerated buds	再生率 Regeneration rate/%	再生芽的生长质量 Growth quality of regenerated buds
MS+0.5 mg · L ⁻¹ BA+0.5 mg · L ⁻¹ IAA	50	23	46	一级
MS+1.0 mg · L ⁻¹ BA+0.5 mg · L ⁻¹ IAA	50	41	82	一级
MS+2.0 mg · L ⁻¹ BA+0.5 mg · L ⁻¹ IAA	50	33	66	二级
MS+3.0 mg · L ⁻¹ BA+0.5 mg · L ⁻¹ IAA	50	19	38	二级
MS+0.5 mg · L ⁻¹ BA	50	5	10	三级
MS+1.0 mg · L ⁻¹ BA	50	3	6	三级
MS+2.0 mg · L ⁻¹ BA	50	0	0	—
MS+3.0 mg · L ⁻¹ BA	50	0	0	—

表 2 不同浓度激素对桔梗下胚轴再生芽的影响

Table 2 Effect of different concentrations of hormones on regeneration of hypocotyls of *Platycodon grandiflorus*

培养基配方 Culture medium formula	外植体数 Number of explants	再生芽的外植体数 Number of explants in regenerated buds	再生率 Regeneration rate/%	再生芽的生长质量 Growth quality of regenerated buds
MS+0.5 mg · L ⁻¹ BA+0.5 mg · L ⁻¹ IAA	50	19	38	一级
MS+1.0 mg · L ⁻¹ BA+0.5 mg · L ⁻¹ IAA	50	22	44	二级
MS+2.0 mg · L ⁻¹ BA+0.5 mg · L ⁻¹ IAA	50	3	6	三级
MS+3.0 mg · L ⁻¹ BA+0.5 mg · L ⁻¹ IAA	50	0	0	—
MS+0.5 mg · L ⁻¹ BA	50	0	0	—
MS+1.0 mg · L ⁻¹ BA	50	0	0	—
MS+2.0 mg · L ⁻¹ BA	50	0	0	—
MS+3.0 mg · L ⁻¹ BA	50	0	0	—

力极弱,从而导致伤口细胞在 BA 的作用下出现死亡现象。当培养基中加入 IAA 后这一现象有所改进,但从再生率和单个外植体获得的再生芽数量来看明显低于子叶外植体,其中再生效果最好的为 $MS+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ BA}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IAA}$,但其再生率仅为 38%,并且随着 BA 浓度的增加,外植体多数出现玻璃化现象,因此根据以上试验结果,在选用不同外植体进行桔梗离体再生研究中,子叶是最理想的外植体类型。

2.3 不同浓度激素对桔梗再生芽伸长生长的影响

由表 3 可知,分裂素与生长素配比对于再生芽的伸长影响显著。首先,较低的比值对于再生芽的生长效果较好。分析原因,低浓度的分裂素降低了细胞的分化水平,同时较高浓度的生长素刺激了细胞的快速膨大,从而使得再生芽表现出快速生长的现象;其次,BA 与 IAA 的使用浓度也对桔梗再生芽的生长影响较大。综上,对于桔梗再生芽伸长生长效果最好的培养基组合为 $MS+0.50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ BA}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IAA}$,再生芽的生长长度可达 3.3 cm。

表 3 不同浓度激素对桔梗再生芽伸长生长的影响

Table 3 Effect of different concentrations of hormones on growth of regeneration bud of *Platycodon grandiflorus*

培养基 Culture medium ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	接种芽数 Number of inoculated buds	生长长度 Growth length/cm	生长效果 Growth effect
$MS+0.10\text{ BA}+0.5\text{ IAA}$	50	1.2	一级
$MS+0.15\text{ BA}+0.5\text{ IAA}$	50	1.8	一级
$MS+0.25\text{ BA}+1.0\text{ IAA}$	50	2.7	一级
$MS+0.50\text{ BA}+1.0\text{ IAA}$	50	3.3	一级
$MS+1.00\text{ BA}+2.0\text{ IAA}$	50	2.1	二级
$MS+1.50\text{ BA}+2.0\text{ IAA}$	50	1.8	三级

3 讨论

3.1 外植体选择对再生效果的影响

在选用不同外植体进行再生培养中经常会发现,有些外植体再生能力较强,有些较弱,有些甚至根本不能再生,其中原因很多,主要可以概括为以下几点:一是外植体的生长势,生长势强的外植体一般再生能力也强,主要原因是外植体对高浓度激素的耐受性较强,一般离体再生培养时均采用较高浓度的分裂素,如果外植体生长势较弱,就

会造成外植体的毒害作用,在没有再生前就会出现褐变死亡的现象,因此在进行植物离体再生培养中一定要考虑外植体的生长势,尽可能选择生长健壮的外植体;第二,影响外植体分化能力的因素还有外植体的年龄,一般幼嫩组织易于分化,而老化组织再生能力较弱^[4-6]。分析原因主要由于幼嫩组织生长势较强,分生组织多于衰老组织造成的,所以在进行植物离体再生培养时尽可能选用幼嫩组织。三是外植体含有的分生组织的多少对再生影响较大^[5]。一般含有分生组织较多的外植体分化能力较强,因为分生组织是分化的主体,在没有分生组织的外植体一般不具有分化能力,一般要诱导其再次产生分生组织才能恢复分化能力,所以一定要尽可能选用分生组织较多的外植体作为离体再生的材料。在该试验中发现,带有叶柄的子叶再生能力较高,相反不带叶柄的基本不能进行再生芽的分化,因为在叶柄中含有较多的分生组织,容易分化出再生芽^[5]。

3.2 分裂素浓度对外植体再生的影响

在该试验中,主要研究了不同浓度分裂素对植物外植体再生的影响。分裂素对植物外植体再生的影响与对分生组织的增殖培养不同,一般需要较高浓度的分裂素,同时也附加一定浓度的生长素^[5-7]。在试验中一般先选用 BA 为分裂素进行再生的诱导,当 BA 浓度增加到一定水平,且外植体开始出现褐变或玻璃化后仍然没有再生芽产生,说明 BA 不适合该种植物,这时可以选用其它类型的分裂素,如改用 KT 或 TDZ。其它分裂素的使用原则也与 BA 相同,并在适宜的浓度下使用。当分化的再生芽数量极多,聚集在一起且生长缓慢时,在培养基中也可以加入一定量的生长素来促进再生芽的快速生长,以便进行后续试验,提高实际的增殖效果。该试验中采用 BA 配合一定浓度的 IAA,获得的分化效果较好。

3.3 再生芽伸长培养的意义

在该试验获得再生芽后又进行了再生芽的伸长培养,这一试验步骤对于植物离体再生培养十分必要。首先在较高浓度分裂素的培养基上进行一段时间的培养后,外植体内含有高浓度的分裂素,如果此时进行生根培养,势必造成生根困难,不能获得较好的生根结果;其次,在高浓度分裂素作用下,再生芽分裂趋势不减,在接下来的试验

中,再生苗生长不但受到抑制,还会造成玻璃化或褐变现象,因此,在较低浓度分裂素的培养基上过渡一下,可以使得植物体内的内源激素可达到较低的水平,分裂素与生长素达到平衡状态,有利于植物生长和生根培养^[8]。另外,经过伸长培养还可以使得再生芽快速长大,易于分割成单个植株,同时加快了试验进程,因此说,再生芽的伸长培养是再生培养中不可缺少的一个环节。

4 结论

以桔梗子叶和下胚轴为外植体,比较再生率可知,桔梗子叶的再生率最高;不同生长激素浓度培养基诱导桔梗再生芽伸长生长的结果显示在 $MS+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ BA}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IAA}$ 培养基上桔梗再生芽的伸长生长效果最好。

综上,总结出的桔梗离体再生的较佳途径:第一,选取颗粒饱满的桔梗种子,将其消毒处理之后,接种到培养基上;第二,切取桔梗的子叶接种到 $MS+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ BA}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IAA}$ 的分化培养基上诱导出再生芽;第三,将再生芽接种到 $MS+0.50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ BA}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

IAA 培养基上诱导伸长生长。

桔梗离体再生技术的建立可以使其遗传转化更加顺利地进行,获得较高的转化率和转化效果,该研究可为桔梗在采用现代生物技术手段育种方面奠定基础。

参考文献

- [1] 高文远,李志亮,肖培根. 桔梗现代研究进展[J]. 基层中药杂志,1996,10(2):40-50.
- [2] 舒姿,高山林. 桔梗的组织培养[J]. 植物资源与环境学报,2001,10(3):63-64.
- [3] 刘艳军,杨静慧,李建科,等. 加拿大枫树离体再生体系的建立[J]. 天津农学院学报,2013,20(4):18-20.
- [4] 吴京姬,吴基日,严一字,等. 培养基组成对桔梗组织培养的影响[J]. 延边大学农学学报,2006,28(1):18-23.
- [5] 朱玉灵,吴涛,范泽民. 桔梗外植体的离体培养和植株再生[J]. 安徽农业科学,2000,28(1):93-94.
- [6] 唐伟斌,石晓云,宋玉玲,等. 桔梗快速繁殖试验体系的建立[J]. 安徽农业科学,2005,33(4):644-645.
- [7] 李玉芬,弭晓菊. 桔梗愈伤组织诱导及植株再生研究[J]. 哈尔滨师范大学(自然科学学报),1998,14(1):81-83.
- [8] 杨耀文,钱子刚,李保军,等. 药用植物桔梗的组织培养初步研究[J]. 云南中医学院学报,2002,25(4):9-10.

Tissue Culture and Regeneration of *Platycodon grandiflorus* in vitro

LIU XiuJie^{1,2}, TIAN Ludi², PEI Yi², WANG Ji², LIU Yanjun², NIE Jiangli²

(1. Tianjin Cuiping Lake Science Park, Tianjin 301908; 2. College of Horticulture and Landscape, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384)

Abstract: Cotyledons and hypocotyls of *Platycodon grandiflorus* were used as explants to analyze the bud induction frequencies of them by *in vitro* culture method, so as to find out the ideal plants types and the corresponding culture conditions. In order to establish an efficient regeneration system of tissue culture of *Platycodon grandiflorus* and provide an effective method for the breeding and utilization of fine strains. The results showed that both the cotyledons and hypocotyls of *Platycodon grandiflorus* regenerated buds successfully. Cotyledons' induction rate was the highest, the most suitable medium for the $MS+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ BA}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IAA}$, the highest growth of *Platycodon grandiflorus* regeneration bud length in the medium of $MS+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ BA}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IAA}$. Thus, the cotyledon explants of *Platycodon grandiflorus* was the most ideal explant type, the corresponding differentiation medium was $MS+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ BA}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IAA}$, elongation medium combination $MS+0.50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ BA}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IAA}$.

Keywords: *Platycodon grandiflorus*; culture medium; regeneration; sterile seedling