

培养基组成对桔梗组织培养的影响

吴京姬, 吴基日*, 严一字, 吴松权, 李美善

(延边大学农学院, 吉林 龙井 133400)

摘要:以 MS 和 N_6 为基本培养基, 配置不同激素种类和浓度, 以桔梗的叶片和茎段为外植体, 比较培养基组成对桔梗组织培养的影响. 结果表明: 基本培养基的组成和 2,4-D 浓度对桔梗组织培养的影响较大, 以 N_6 为基本培养基的培养效果明显好于 MS; 低浓度 2,4-D 的培养效果明显好于高浓度的 2,4-D; 以叶片为外植体的培养效果明显好于茎段. 因此, 在桔梗组织培养中以 N_6 为基本培养基, 叶片为外植体, 而生长素则以 NAA 或 IAA 来代替 2,4-D, 能够提高桔梗组织培养的效率.

关键词: 桔梗; 组织培养; 基本培养基; 2,4-D 浓度

中图分类号: S567.5⁺3

文献标识码: A

文章编号: 1004-7999(2006)01-0018-06

桔梗(*platycodon grandiflorum* (Jacp.) A. DC.), 别名铃铛花, 包袱花, 道拉基, 和尚帽等. 其根为著名的中药材, 具有宣肺、祛痰、散寒、镇咳、消肿、排脓等功效^[1]. 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. 此外, 日本学者还将桔梗的提取物用于化妆品和浴液中^[2].

近年来, 一些学者对桔梗的组织培养作了大量的研究^[3-6]. 从目前研究来看, 多数学者在桔梗组织培养中以 MS 为基本培养基, 着重调节植物生长激素, 而忽略了基本培养基的组成以及诱导培养基与分化培养基的互作等方面的研究. Chung 等^[7]以 MS 和 B5 为基本培养基, 在不同激素种类和浓度配比下进行了桔梗叶片、茎段和根段为外植体的愈伤组织诱导和分化试验. 结果表明: 总的趋势是两种培养基差异较小, 但以 MS 为基本培养基的效果略好于 B5. 根据张春华等的研究^[8], MS 培养基中 NH_4^+ 和 NO_3^- 的不同比值对满天星试管苗的增殖有很大的影响, 培养基中 NH_4^+ / NO_3^- 为 20/40 mM, 适合满天星的增殖, 且苗的生长状况良好. Park 等^[9]认为硝态氮有利于器官的分化, 而氨态氮有利于细胞的生长, 且在硝态氮和氨态氮并存时植物对氮的吸收更容易. N_6 培养基是朱至清等^[10]大幅度改变 NH_4^+ 与 NO_3^- 的配比后发明的一种较好的适应性广泛的梗稻花药培养的培养基, 后来也应用于其他植物的组织培养.

本文以 MS 和 N_6 为基本培养基, 配置不同激素种类和浓度的愈伤组织诱导和分化的培养基, 以桔梗的叶片和茎段为外植体, 比较基本培养基的组成、诱导培养基和分化培养基的不同组合、激素种类和浓度以及不同外植体对桔梗组织培养的影响, 旨在为提高桔梗组织培养的效率提供依据.

收稿日期: 2005-11-25

基金项目: 吉林省科技厅资助项目(20040553)

作者简介: 吴京姬(1981—), 女(朝鲜族), 吉林永吉人. 延边大学农学院农学系, 在读硕士. 吴基日为通讯作者,

Tel: 0433-3261752, E-mail: jrwu@ybu.edu.cn.

1 材料与方法

1.1 试验材料

以桔梗的无菌苗作为供试材料,将延边大学农学院中药材圃内采集的桔梗种子先用75%酒精浸泡1 min,用无菌水冲洗2~3次,再用0.1%升汞消毒5 min,无菌水冲洗5次,用消毒滤纸吸干表面水分,将种子以0.2~0.5 cm的间隔接种于MS固体培养基上,置在25℃,12~14 h光照条件下进行种子萌发及无菌苗的培养。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基配方

1) 愈伤组织诱导培养基

(1)MS+2,4-D 3.0 mg/L+6-BA 0.2 mg/L;

(2)MS+2,4-D 1.0 mg/L+KT 1.0 mg/L;

(3) N_6 +2,4-D 3.0 mg/L+6-BA 0.2 mg/L;

(4) N_6 +2,4-D 1.0 mg/L+KT 1.0 mg/L.

2) 愈伤组织分化培养基

I. MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L;

II. MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.6 mg/L;

III. MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L.

3) 生根培养基 1/2 MS+NAA 0.5 mg/L+IAA 0.1 mg/L

以上各培养基均加入琼脂粉9.0 g/L,蔗糖30 g/L,pH值调为5.8.将配好的培养基注入50 mL三角瓶中,每瓶注入20 mL培养基,在121℃条件下灭菌15 min.

1.2.2 接种及培养方法

1) 愈伤组织的诱导:取日龄30 d左右的无菌苗叶片和茎段为外植体,叶片大小为0.5 cm左右的方块,茎段的长度为1 cm左右.外植体接于50 mL三角瓶,每瓶接5个,每种处理接100个外植体.接种后置于25℃,自然光条件下培养.

2) 愈伤组织的分化:诱导愈伤组织后,按诱导培养基和外植体的种类,分别接到3种不同的愈伤组织分化培养基,在25℃,12~14 h光照条件下进行培养.

3) 生根培养:在分化培养基中的苗长到一定高度后,在无菌条件下转移到生根培养基,待根长出4~5 cm时移栽到土壤中.

2 结果与分析

2.1 不同愈伤组织诱导培养基对桔梗愈伤组织形成的影响

以MS和 N_6 为基本培养基,加不同激素配制成的4种组合培养基上培养7 d后,叶片周围和茎段伤口处的细胞增殖并逐渐变黄,部分叶片和茎段外植体上开始长出淡黄色的愈伤组织,15 d后愈伤组织继续增殖(图1),培养30 d后供培养的外植体上形成愈伤组织的情况见表1.由表1可知,2,4-D浓度为3.0 mg/L的1号培养基和3号培养基上的叶片愈伤组织的诱导率分别为95.0%和88.4%,而2,4-D浓度为1.0 mg/L的2号和4号培养基的诱导率分别为80.0%和86.3%,说明高浓度的2,4-D有利于叶片愈伤组织的诱导.茎段

愈伤组织诱导率与叶片恰好相反,2 号(98%)和 4 号(81%)培养基上茎段的诱导率高于1 号(83%)和 3 号培养基(72%)。

从基本培养基对愈伤组织形成的影响来看,以 MS 为基本培养基的 1 号和 2 号培养基的叶片愈伤组织诱导率分别为 95%和 80%,与以 N₆为基本培养基的 3 号(88.4%)和 4 号(86.3%)培养基相比有高有低.茎段外植体的愈伤组织诱导率,以 MS 为基本培养基的 1 号和 2 号培养基的诱导率分别为 83%和 98%,均高于以 N₆ 为基本培养基的 3 号(72%)和 4 号(81%)培养基.从培养基和外植体的组合来看,1 号培养基上叶片的愈伤组织诱导率最高(95%),2 号培养基上茎段的愈伤组织诱导率最高(98%),如果外植体的生理状况良好,在以上培养基上使诱导率分别达到 100%是有可能的。

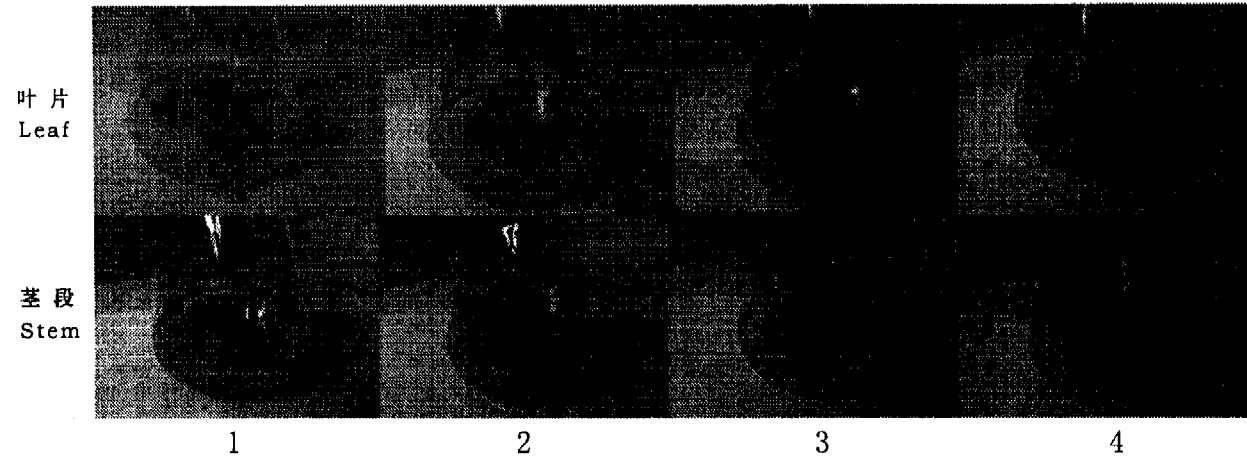


图 1 培养 15 d 后不同组合培养基上长出来的叶片和茎段愈伤组织

Fig.1 Callus of leaves and stems having cultured 15 days in different media constitutes

表 1 不同的诱导培养基对愈伤组织形成的影响
Table 1 Effects of different inducing media on callus

诱导培养基 Inducing medium	叶片 Leaf			茎段 Stem		
	接种数 Inoculation amount	诱导数 Induction amount	诱导率/% Induction rate	接种数 Inoculation amount	诱导数 Induction amount	诱导率/% Induction rate
1	100	95	95.0	100	83	83.0
2	100	80	80.0	100	98	98.0
3	95	84	88.4	100	72	72.0
4	95	82	86.3	100	81	81.0

2.2 诱导培养基和分化培养基的不同组合对桔梗愈伤组织分化的影响

诱导培养基和分化培养基的不同组合对桔梗愈伤组织分化的影响见表 2. 由此可知,叶片愈伤组织的分化率在 46.7%~90.0%内变动,而茎段愈伤组织的分化率在 26.7%~63.3%内变动,说明来源于叶片愈伤组织的分化率明显高于来源于茎段的愈伤组织.为便于分析各种因素对桔梗愈伤组织分化的影响,根据表 2 的结果重新绘制表 3.

为分析愈伤组织诱导培养基对分化的影响,根据表 2 分别求出来源于 4 种诱导培养基的愈伤组织在同一种分化培养基上的平均分化率后列于表 3(诱导培养基间①). 结果表明,来源于 4 号培养基的叶片和茎段愈伤组织平均分化率分别为 87.2% 和 58.3%,均高于其他培养基. 说明诱导培养基的组成对愈伤组织的分化有影响.

表 2 诱导培养基和分化培养基的不同组合对愈伤组织分化的影响
Table 2 Effects of different combinations of iducing media and differentiation media on the differentiation of callus

诱导培养基 Inducing medium	分化培养基 Differentiation medium	叶片愈伤组织 Callus of leaf			茎段愈伤组织 Callus of stem section		
		接种数 Inoculation amount	分化数 Differentiation amount	分化率/% Differentiation rate	接种数 Inoculation amount	分化数 Differentiation amount	分化率/% Differentiation rate
1(MS)	I	60	28	46.7	60	25	41.7
	II	60	42	70.0	60	30	50.0
	III	60	38	63.3	60	21	35.0
2(MS)	I	60	48	80.0	60	24	40.0
	II	60	42	70.0	60	31	51.7
	III	60	48	80.0	60	28	46.7
3(N ₆)	I	60	35	58.3	60	30	50.0
	II	60	39	65.0	60	36	60.0
	III	60	42	70.0	60	16	26.7
4(N ₆)	I	60	53	88.3	60	38	63.3
	II	60	54	90.0	60	32	53.3
	III	60	50	83.3	60	35	58.3

为分析不同浓度的 NAA 对愈伤组织分化的影响,根据表 2 分别求出来源于 4 种诱导培养基的愈伤组织在同一种分化培养基上的平均分化率后列于表 3(分化培养基间②). 结果表明,虽然 3 种不同分化培养基上来源于叶片和茎段愈伤组织的分化率有差异,但其变化无规律性.

表 3 培养基组成对愈伤组织分化的影响
Table 3 Effects of compositions of media on the differentiation callus

外植体 Explant	诱导培养基① Inducing media				分化培养基② Differentiation media			基本培养基③ Basic media		2,4-D 浓度/(ng/L)④ Concentration of 2,4-D	
	1	2	3	4	I	II	III	MS	N	1.0	3.0
叶片 Leaf	60.0*	76.7	64.4	87.2	68.3	73.8	74.2	68.4	75.8	82.0	62.2
茎段 Stem section	42.2	46.1	45.6	58.3	48.7	55.0	41.6	44.2	52.0	52.3	43.9
平均 Average	56.3	63.9	53.1	67.1	58.6	44.4	57.9	60.1	60.1	65.5	54.7

注:①1 号平均分化率为表 2 中的 (I + II + III) ÷ 3, 以下类推;② I 号平均分化率为表 2 中的 (1 + 2 + 3 + 4) ÷ 4, 以下类推;③MS 上的平均分化率 = (1 号平均分化率 + 2 号平均分化率) ÷ 2, 以下类推;④1.0 mg/L 浓度的平均分化率 = (2 号平均分化率 + 4 号平均分化率) ÷ 2, 以下类推.
Note:① Average differentiation rate of No. 1 was (I + II + III) ÷ 3 in table 2, and on the analogy of others. ②Average differentiation rate of No. I was (1 + 2 + 3 + 4) ÷ 4 in table 2, and on the analogy of others. ③Average differentiation rate of MS was (average differentiation rate of No. 1 + average differentiation rate of No. 2) ÷ 2, and on the analogy of others. ④Average differentiation rate of 1.0 mg/L was (average differentiation rate of No. 2 + average differentiation rate of No. 4) ÷ 2, and on the analogy of others.

为分析诱导培养基中的基本培养基组成(MS和 N_6)对愈伤组织分化的影响,根据表2分别求出来源于1号和2号(MS)培养基的平均分化率的平均数和3号和4号(N_6)平均分化率的平均值后列于表3(基本培养基间③).结果表明,来源于以 N_6 为基本培养基的叶片愈伤组织的平均分化率为75.8%,茎段愈伤组织的平均分化率为52%,均高于以MS为基本培养基的68.4%和44.2%.说明诱导愈伤组织的基本培养基会影响愈伤组织的分化.

为分析诱导培养基中的2,4-D浓度对愈伤组织分化的影响,根据表2分别求出来源于2,4-D浓度高的1号和3号培养基平均分化率的平均数和来源于2,4-D浓度低的2号和4号培养基平均分化率的平均值后列于表3(2,4-D浓度间④).结果表明,来源于2,4-D浓度低的诱导培养基中的叶片和茎段愈伤组织平均分化率分别为82.0%和52.2%,明显高于来源于2,4-D浓度高的诱导培养基中的叶片和茎段愈伤组织的平均分化率(分别为62.2%,43.9%).说明诱导培养中的2,4-D浓度对愈伤组织分化的影响较大.

2.3 生根培养

当分化培养基上的苗长到4~5 cm时,将健壮的丛生苗在无菌条件下分成单株后,转接到生根培养基,约过10 d后开始生根,生根率达100%.待根长至4~5 cm时,揭去铝铂纸练苗2~3 d后,取出小苗,洗去基部培养基,移栽于腐殖土中,最后移栽到田间,成活率达80%以上.

3 讨论与结论

1)基本培养基组成对桔梗组织培养的影响

以MS和 N_6 为愈伤组织诱导的基本培养基,只就愈伤组织的诱导率而言,MS的诱导率略高于 N_6 ,但结合愈伤组织诱导培养基对愈伤组织分化的影响来看, N_6 明显好于MS基本培养基.据此,今后在桔梗组织培养中以 N_6 为基本培养基为好.

2)2,4-D浓度对桔梗组织培养的影响

诱导培养基中高浓度的2,4-D有利于桔梗愈伤组织的诱导,但对愈伤组织的分化有明显抑制作用.这个试验结果和舒变等^[5]的试验结果一致.本试验中在诱导培养基上用的2,4-D只有2个浓度,虽然浓度梯度少一些,但今后在桔梗组织培养中以NAA或IAA来代替2,4-D的效果可能好一些.

3)愈伤组织诱导培养基对愈伤组织分化的影响

来源于不同诱导培养基的愈伤组织转移到分化培养基后,分化率有明显的差异,诱导培养基的间接影响大于分化培养基本身的影响.本试验中分化培养基的组成比较简单,只有一种基本培养基和一种激素的不同浓度,今后有必要扩大培养基的组成、激素种类和浓度,进一步探讨愈伤组织诱导培养基对愈伤组织分化的影响.

4)外植体种类对桔梗组织培养的影响

叶片外植体的愈伤组织诱导率和分化率明显好于茎段外植体,这可能与叶肉组织中薄壁细胞较多有关,与李玉芬等^[4]的试验结果一致.

参考文献:

- [1] 刘德军,马维希.桔梗[M].北京:中国中医药出版社,2001.
- [2] 赵淑春.桔梗等 3 种植物营养成分的测定[J].食品科学,1994(4):47.
- [3] 李晶,李世承,李金祥.桔梗叶片、茎段的离体培养和植株再生[J].植物生理学通讯,1993,29(2):107.
- [4] 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.
- [5] 舒变,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.
- [6] 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.
- [7] Jin-Hwan Chung, Sung Hwan Cho. Tissue Cultures of *Platycodon grandiflorus* DC[J]. Journal of Agriculture & Life Sciences, 2002, 36(4): 9-18.
- [8] 张春华,朴炫春,廉美兰,等.培养基组成对满天星试管苗增殖的影响[J].延边大学农学学报,2005,27(1):35-39.
- [9] Park H S, Sul J H, Chiang M H. Effect of ammonium and nitrate on callus growth of tobacco and soybean and activities of nitrogen metabolizing enzymes[J]. Plant Tiss. Cult, 1998(25): 61-67.
- [10] 朱至清.通过氮源比较试验建立一种较好的水稻花药培养基[J].中国科学,1975(5):484-490.

Effects of media compositions on tissue culture of *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.

WU Jing-ji, WU Ji-ri*, YAN Yi-zi, WU Song-quan, LI Mei-shan
(Agricultural College of Yanbian University, Longjing Jilin 133400, China)

Abstract: The effects of media compositions on tissue culture of *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC were compared, using the basic MS and N₆ medium of different sorts and concentrations of phytohormone in the explants of leaves and stems. The results showed that the compositions of media and concentrations of 2,4-D had distinct effects on the tissue culture; N₆ tissue culture had better effect than MS tissue culture; lower concentration of 2,4-D had better effect than higher concentration, and the explant of leaves had better effect than that of stem. Therefore, N₆ tissue culture with NAA or IAA instead of 2,4-D in the explants of leaves could increase the efficiency of tissue culture of *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.

Key words: *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.; tissue culture; basic medium; 2,4-D concentration