

提高桔梗组织培养效率的研究

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, 配制不同激素种类和浓度的培养基, 以桔梗的叶片、茎段和根段为外植体, 探索通过诱导胚状体直接分化出小苗的路子。结果表明: 在添加 0.5 mg/L NAA 和 1.0 mg/L 6-BA 的 MS 和 N_6 培养基上, 以叶片为外植体时, 能诱导胚状体并直接分化出小苗; 以茎段为外植体时, 部分细胞团通过胚状体直接分化出小苗, 另一部分细胞团中长出愈伤组织; 以根段为外植体时只长出愈伤组织; 在添加不同浓度 2,4-D 的培养基上只长出愈伤组织, 不直接分化出小苗。

关键词 桔梗; 组织培养; 胚状体; 培养效率

中图分类号 Q943.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)12-03565-01

Study on the Efficiency of the Plant Tissue Culture of *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC

WU Jing-ji et al (Agricultural College of Yanbian University, Longjing, Jilin 133400)

Abstract In order to increase the efficiency of somatic cell culture of *platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC., the direct method of differentiation of young sprout by inducing embryoid was used with the basic MS and N_6 culture medium with the different sorts and concentrations of phytohormone and with leaf, stem section and root section as the explant. The results showed that embryoid was induced and the young sprout formed from leaf explant with the basic MS and N_6 culture medium with 0.5 mg/L NAA and 1.0 mg/L 6-BA; the young sprout from some stem explants and only callus from root explants. The culture medium with the different concentrations of 2,4-D was for callus growing but young sprout.

Key words *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.; Tissue culture; Embryoid; Efficiency of culture

桔梗 [*platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.], 具宣肺、祛痰、散寒、镇咳、消肿、排脓等功效, 桔梗根还可制成美味的菜肴^[1]。对桔梗的组织培养已有大量的研究^[2-6]。为提高花药培养直接产生花粉小植株的频率, 林恭松等(1983)通过调节培养基激素配比和改善培养条件等措施, 直接获得大量健壮的绿色植株, 其中关键因素是大幅度降低 2,4-D 浓度, 同时提高 NAA 和 KT 的浓度^[7]。笔者以 MS 和 N_6 为基本培养基, 以调节 2,4-D 浓度为重点, 配制不同激素种类和浓度的培养基, 并以桔梗的叶片、茎段和根段为外植体, 探索通过诱导胚状体直接分化出小苗, 旨在提高桔梗体细胞组织培养效率。

1 材料与方法

1.1 材料 桔梗种子在 MS 基本培养基上无菌萌发。以无菌苗的叶片、茎段和根段作为试验材料。

1.2 培养基配方

1.2.1 诱导培养基(mg/L)。①MS + NAA 0.5 + 6-BA 1.0; ②MS + 2,4-D 3.0 + 6-BA 0.2; ③MS + 2,4-D 1.0 + KT 1.0; ④ N_6 + NAA 0.5 + 6-BA 1.0; ⑤ N_6 + 2,4-D 3.0 + 6-BA 0.2; ⑥ N_6 + 2,4-D 1.0 + KT 1.0。

1.2.2 生根培养基(mg/L): 1/2 MS + NAA 0.5 + IAA 0.1。

以上各组培养基均加入琼脂粉 10.0 g/L, 蔗糖 MS 30.0 g/L, N_6 50.0 g/L, pH 值 5.8。培养基配制后注入 50 ml 三角瓶中, 每瓶注入 20 ml, 在 121℃ 条件下灭菌 15 min。

1.3 接种方法 取日龄 30 d 左右的无菌苗的叶片、茎段和根段。叶片切成 0.5 cm 见方的小片, 茎段和根段切成约为 0.5 cm, 分别接种于 6 组不同诱导胚状体的培养基中培养。每瓶接 5 个, 每处理接 100 个外植体。

1.4 培养条件 培养温度 25℃, 光照 16 h/d, 光强 2 000 lx。

基金项目 吉林省科技厅项目(20040553); 延边大学重点项目[延大科合字(03)07号]。

作者简介 吴京姬(1981-), 女, 朝鲜族, 吉林吉林人, 硕士研究生, 研究方向: 桔梗种质资源。* 通讯作者, E-mail: wujiri@yahoo.com.cn。

收稿日期 2006-12-19

2 结果与分析

不加 2,4-D 的①和④培养基上, 接种 7 d 后的叶片周围伤口处的细胞团中不长出愈伤组织, 直接分化出小苗; 而茎段伤口处的部分细胞团中长出愈伤组织, 另一部分细胞团中直接分化出小苗; 根段伤口处的细胞团中只长出愈伤组织, 不分化出小苗。15 d 后已分化的小苗周围的细胞团中继续分化出小苗, 30 d 后变成丛生苗。每一丛生苗中的小苗少则几棵, 多则十几棵(图 1, 2)。

添加不同浓度 2,4-D 的②、③、⑤、⑥培养基上接的叶片、茎段和根段中只长出愈伤组织, 不直接分化出小苗。

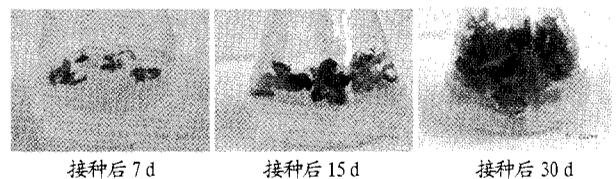


图 1 培养基①和④叶片中分化出的小苗

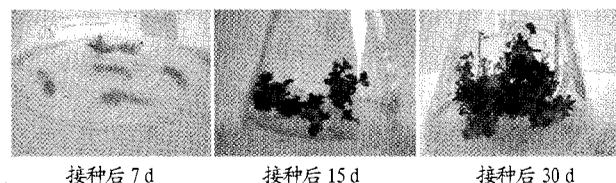


图 2 培养基①、④茎段中长出的愈伤组织和分化出的小苗

该文只统计不加 2,4-D 的①和④培养基的叶片和茎段上分化出的小苗丛数和成苗率。由表 1 可见, 叶片成苗率在 MS 培养基上为 43% (I)、55% (II) 和 49% (平均), 在 N_6 培养基上分别为 73% (I)、83% (II) 和 78% (平均); 茎段的成苗率在 MS 培养基上分别为 86% (I)、79% (II) 和 82.5% (平均), 在 N_6 培养基上分别为 40% (I)、52% (II) 和 46% (平均), 说明基本培养基组成和外植体之间存在互作现象。也就是说, 在桔梗组织培养中以叶片为外植体直接诱导小苗的时候 N_6 作为基本培养基为好, 以茎段为外植体直接诱导小苗的时候用 MS 作为基本培养基为好。

(下转第 3572 页)

2.3 不同积雪覆盖条件对土壤冻融期间水分状况的影响

将 2004 年 1 月 9 日(上冻未积雪前)、2 月 2 日(积雪未融化前)、2 月 19 日(积雪融化中)、3 月 19 日(积雪全部融化)、5 月 5 日(冻土全部融化)各区的土壤含水率(总含水率)剖面示于图 3。将同一时间不同区的土壤含水率(总含水率)剖面对比示于图 4。

由图 3 可见,在冻结过程中,在温度梯度作用下,各区土壤水分向冻层迁移,随冻结深度逐渐增大,冻结带含水量增大比较明显。随水分逐渐向冻结带迁移,在冻结面下方出现了一个明显的水分低含量带。1 月 9 日到 2 月 2 日 70~110 cm 各区含水率变化较大,总含水率增大了约 5%,主要是因为温度下降多,冻结速度快,导致水分迅速向冻结带迁移,使总含水率增大。在冻结土壤融化过程中,3 月 19 日到 5 月 5 日 0~50 cm 总含水率下降了约 7%,50~100 cm 下降了约 4%,这是由于积雪全部融化,因受太阳辐射影响土壤表面温度升高较快,而中部土壤相对缓慢,冻土段内的水分在温度梯度的作用下,从高温端向冻土层内迁移。

由图 4 可见,在上冻未积雪前 3 个区的初始表层含水率基本相同是因为 3 个区的自然状况基本相同,3 区略低是由于测点位置不同造成的。积雪后,随着时间的推移在积雪融化过程中 3 个区的表土含水率比初始值都有所增大,但增幅不同,1 区增加得最多,约 4%,这是因为气温升高积雪融化,融雪下渗到土壤中使表土含水率增大。在积雪融化过程中 3 区含水率变化较明显,在 80~100 cm 含水率骤然降低 8%,2 区降低 3%,1 区仅降低 1%,这是积雪厚度不同使地温产生差异,影响了冻结速度,造成了水分迁移速度和迁移量的不同。积雪全部融化后,气温回升使地温升高,冻土层开始融化,各区 20~40 cm 土壤含水率都有所增加,这一方面是融雪下渗造成的,另一方面是在融化过程中,聚集在冻土中的冰体从表面开始融化,由于受到下层未融化层的阻隔,在温度

梯度的作用下,融水向表层迁移并快速蒸发。

3 结论

积雪覆盖对土壤温度、冻土深度、冻结速率、水分迁移等均有显著影响。积雪的弱导热性和大热容量,很大程度上阻隔了地层热能的散失。当近地面日平均气温在 $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右时,雪层厚度大于 25 cm 时,气象条件的变化对土壤热状况的影响极其微弱。试验结果表明,雪覆盖 40 cm,最大冻深只有 40 cm 左右;雪覆盖 20 cm,最大冻深在 80 cm 左右;而无雪覆盖处理的最大冻深则达到 140 cm。

在冻结过程中,由于积雪的覆盖,保持了地温,减缓了土壤冻结速度,影响了水分迁移过程。地温是影响水分迁移的主导因素,气温降低引起部分液态相变成冰,土壤冻结,冻结带土壤水势降低,由此产生的土水势梯度使水分由高土水势未冻带向低土水势的冻结带迁移。土壤在冻结过程中水分向冻结界面迁移的现象十分明显,土温越低,冻结速度越快,原位冻结的水分越多,向冷端迁移水量减少;反之,土温越高,冻结速度越慢,原位冻结的水分越少,向冷端迁移水量增多。通过裸地和有积雪覆盖的情况对比可知,由于裸地无积雪覆盖保护,表层土壤温度急剧下降,表层土壤的大部分水分未来得及迁移就原位冻结,因此,总含水量明显比有雪覆盖的处理低,但是裸地处理的冻结深度远远大于有雪覆盖的处理,加上较深土层处的冻土层温度不低,只是稍低于 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$,因此,其较深冻土层中的总含水量明显高于有雪覆盖的处理。

参考文献

- [1] 徐学祖,王家澄,张立新.冻土物理学[M].北京:科学出版社,2001:130-135.
- [2] 张立新,韩文玉,顾同欣.冻融过程对景电灌区草窝滩盆地土壤水盐动态的影响[J].冰川冻土,2003,25(3):297-302.
- [3] 樊贵盛,郑秀清,贾宏骥.季节性冻融土壤的冻融特点和减渗特性的研究[J].土壤学报,2000,37(1):24-32.
- [4] 马虹,胡汝骥.积雪对冻土热状况的影响[J].干旱区地理,1995,18(4):23-27.

(上接第 3565 页)

表 1 不同培养基分化小苗的成苗率 %

培养基	外植体	I	II	平均
①(MS)	叶片	43	55	49.0
	茎段	86	79	82.5
②(N ₆)	叶片	73	83	78.0
	茎段	40	52	46.0

注:重复 I、II 接种数均为 100。

在三角瓶中苗长到 4~5 cm 的时候,将健壮的丛生苗在无菌条件下分成单株,转到生根培养基,经 10 d 开始长根,生根率可达 100%。待根长至 4~5 cm 时,揭去铝箔纸纸苗 2~3 d,移栽到装有腐殖土的小盆中,最后移栽到田间。

3 小结与讨论

(1)舒变等认为 2,4-D 不宜用于桔梗的快速繁殖^[4]。该研究表明:MS 或 N₆ 为基本培养基,生长素中去除 2,4-D,添加 NAA 和 IAA 的培养基上可以直接诱导胚状体并分化出丛生苗和粗壮的根。在约为 0.5 cm² 的叶片或者约为 0.5 cm 长的茎段上可以获得十几棵乃至几十棵小苗,既节省培养时间又提高了培养效率。

(2)基本培养基组成与外植体间存在互作关系,以叶片为外植体直接诱导小苗时 N₆ 培养基的效果较好,以茎段为外植体直接诱导小苗时 MS 培养基的效果较好。

(3)关于组织培养中供体植株的生长条件和生理状态影响愈伤诱导和分化方面的报道较多^[8]。该研究 2 次试验所用的外植体都来源于桔梗的无菌苗,但无菌苗的生长状况重复 II 好于重复 I,这可能是导致重复 II 的成苗率普遍高于重复 I 的原因。

参考文献

- [1] 刘德军,马维希.桔梗[M].北京:中国中医药出版社,2001:1-5.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 向邓云.桔梗愈伤组织诱导及不定芽形成研究[J].重庆师范学院学报:自然科学版,2001,18(2):92-94.
- [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] 林恭松,周叔月,王忠阁.水稻花药培养第一次成苗研究[M]//沈锦骅.水稻花药育种研究.北京:农业出版社,1983:84-94.
- [8] 胡舍,陈瑛.植物体细胞遗传与作物改良[M].北京:北京大学出版社,1988:27-33.