西北林学院学报 2022,37(5):124-128
Journal of Northwest Forestry University

doi:10.3969/j.issn.1001-7461.2022.05.17

优异党参种质“凤党”离体繁殖技术

李娟娟[1],赵文兵[2],周　健[3],周建云[4*]

(1.杨凌职业技术学院,陕西 杨陵 712100;2.汉中市天台山森林公园管理服务中心,陕西 汉中 723000;
3.佛坪秦岭生态保护中心,陕西 佛坪 723400;4.西北农林科技大学 林学院,陕西 杨陵 712100)

摘　要:以“凤党”优株种子离体培养的无菌苗茎段为外植体,研究植物生长调节剂对其愈伤组织诱导及再分化的影响。结果表明,愈伤组织诱导的最适培养基为 MS+0.5 mg·L^{-1} NAA+1.0 mg·L^{-1} 6-BA,芽分化的最适培养基为 MS+0.1 mg·L^{-1} NAA+0.5 mg·L^{-1}6-BA,生根的最适培养基为 1/2 MS+0.2 mg·L^{-1} NAA+0.2 mg·L^{-1} IBA,愈伤组织诱导率、芽分化率及生根率分别可达 91%、100%和 97%。建立的离体再生植株快速繁殖体系,为“凤党”优异种质推广利用和工厂化育苗奠定了基础。

关键词:“凤党”;快繁;愈伤组织;植物生长调节剂;再生

中图分类号:Q943.1　　**文献标志码:**A　　**文章编号:**1001-7461(2022)05-0124-05

In vitro Propagation of An Excellent Germplasma of *Codonopsis pilosula* "Fengdang"

LI Juan-juan[1], ZHAO Wen-bing[2], ZHOU Jian[3], ZHOU Jian-yun[4*]

(1. *Yangling Vocational and Technical College*, *Yangling* 712100, *Shaanxi*, *China*; 2. *Hanzhong Tiantai Mountain Forest Park Management Service Center*, *Hanzhong* 723000, *Shaanxi*, *China*; 3. *Foping Qinling Ecological Protection Center*, *Foping* 723400, *Shaanxi*, *China*; 4. *College of Forestry*, *Northwest A&F University*, *Yangling* 712100, *Shaanxi*, *China*)

Abstract: *Codonopsis pilosula*, a perennial species belongs to genus *Codonopsis* in family Campanulaceae, its root is a traditional tonic medicine used commonly in China. *C. pilosula* that is produced in Fengxian County of Shaanxi Province is named “Fengdang”, also famous for its rare and high quality. In this study, effects of different plant growth regulators on callus induction and redifferentiation were tested by using sterile stem explants *in vitro* that germinated from seeds of superior "Fengdang" plant. The results showed that the optimum medium for callus induction was MS with 0.5 mg·L^{-1} NAA+1.0 mg·L^{-1} 6-BA. The optimal medium for bud differentiation was MS medium with 0.1 mg·L^{-1} NAA+0.5 mg·L^{-1} 6-BA, while shoot rooting was best in the medium of 1/2 MS with 0.2 mg·L^{-1} NAA+0.2 mg·L^{-1} IBA medium. By using the media mentioned above, the rates of callus induction, bud differentiation and rooting could reach 91%, 100% and 97%, respectively. The rapid propagation system of tissue culture established in this study laid foundation for high quality germplasm spread and utilization as well as industrial seedling of "Fengdang".

Key words: *Codonopsis pilosula* "Fengdang"; micropropagation; callus; plant growth regulator; regeneration

党参(*Codonopsis pilosula*)是桔梗科(Campanulaceae)党参属(*Codonopsis*)多年生草本,为中国常用大宗药材。陕西省凤县产的党参俗称“凤党”,据《凤县志》和《凤县民国志》等资料记载:“凤

收稿日期:2022-03-10　**修回日期:**2022-05-06
基金项目:国家林业和草原局国家级科技推广项目(TG20200811)。
第一作者:李娟娟。研究方向:园林植物。E-mail:491707690@qq.com
* **通信作者:**周建云,高级实验师。研究方向:森林植物学。E-mail:442847784@qq.com

党”以名贵质优享誉,远销于东南亚、日、韩等地,清末作为上等贡品为朝廷进贡。随着近年来人们对其需求日益增长,野生资源日益减少[1-4]。因此,对“凤党”进行组织快繁培养,以便大面积的人工栽培扩大药源十分必要。与传统繁殖方法相比,植物组织培养快繁技术能在较短的时间内提供大量优异基因型的种苗,在许多植物中广泛应用,越来越受到人们的重视。关于党参的研究报道主要集中在生物学特性、化学成分、栽培技术等方面,对其离体快繁技术鲜有报道[5-8],“凤党”的组织培养研究尚未见报道。本文以“凤党”茎段为外植体,研究植物生长调节剂对愈伤组织诱导和芽分化,以及生根的影响,初步建立植株再生体系,为工厂化生产优质种苗提供依据。

1　材料和方法

1.1　材料

采集陕西省凤县留凤关镇种植基地“凤党”优良单株种子,用自来水冲洗干净,无菌水浸泡过夜。用75%的酒精消毒 30 s 再用 0.1% $HgCl_2$ 溶液消毒 10 min 后,无菌水冲洗 5 次,接种于添加 2%蔗糖和 0.6%琼脂的 MS 基本培养基上进行萌发培养。以种子萌发无菌苗的嫩茎为外植体进行愈伤组织诱导。

1.2　方法

将幼茎切成约 1 cm 的茎段,接种于 MS 基本培养基,其中添加不同质量浓度 NAA(0.1、0.5、1.0 mg·L^{-1})和 6-BA(0.5、1.0、2.0、3.0 mg·L^{-1})组合的愈伤组织诱导培养基上培养 4 周,统计愈伤组织诱导率(出愈率)。

出愈率(%)=(形成愈伤组织的外植体数/接种外植体数)×100　　(1)

将增殖的愈伤组织转入附加不同质量浓度 6-BA(0.2、0.5、1.0 mg·L^{-1})和 NAA (0、0.1、0.5 mg·L^{-1})组合的 MS 基本培养基,诱导不定芽的分化,定期观察并记录分化情况及再生芽的生长状况,4 周后统计分化率[9-10]。

分化率(%)=(出芽块数/接种愈伤组织数)×100　　(2)

再生丛芽生长至 3.0～4.0 cm 高时,切割成单芽,转入不同质量浓度 IBA(0、0.2 mg·L^{-1})和 NAA(0、0.2 mg·L^{-1})组合的 MS、1/2MS 培养基上进行生根培养,30 d 后统计生根率。

生根率(%)=(生根芽数/接种芽数)×100　(3)

所有培养基均添加 30 g·L^{-1} 蔗糖、6 g·L^{-1} 琼脂(产地:北京),pH 调至 5.8,于 121 ℃高压湿热灭菌 20 min。培养条件为培养室温度 25±2 ℃,光强为 2 000 Lx,16 h 光照。每个处理接种 30 瓶,每瓶接种 3 个外植体。

所有数据均在 Excel 2016 软件中完成处理,并以平均值±标准偏差形式表示;SPSS 20.0 软件进行数据统计分析,其中包括方差分析、Duncans 多重比较分析。

2　结果与分析

2.1　植物生长调节剂对愈伤组织诱导的影响

无菌苗幼茎在不同处理培育 4 周后,可看到茎段伤口处凸起,经脱分化形成愈伤组织。方差分析表明,植物生长调节剂对愈伤组织诱导的影响显著($P<0.05$)。培养基中添加 0.5 mg·L^{-1} NAA 和 1.0 mg·L^{-1} 6-BA,愈伤组织长势旺盛,呈亮黄色,出愈率达 99%,当培养基中添加 1.0 mg·L^{-1} NAA 和 3.0 mg·L^{-1} 6-BA 时,出愈率最低(表 1)。

表 1　不同植物生长调节剂处理愈伤组织诱导率

Table 1　The induction rate of callus in differentplant growth regulator combinations

处理	NAA/(mg·L^{-1})	6-BA/(mg·L^{-1})	外植体数/个	出愈数/个	出愈率(%)	长势
1	0.1	1.0	90	64	0.71±0.02c	++
2	0.1	2.0	90	56	0.62±0.03d	++
3	0.1	3.0	90	47	0.52±0.02e	++
4	0.5	1.0	90	89	0.99±0.01a	+++
5	0.5	2.0	90	82	0.91±0.01a	++
6	0.5	3.0	90	72	0.80±0.04bc	++
7	1.0	1.0	90	74	0.82±0.02b	++
8	1.0	2.0	90	68	0.76±0.02bc	++
9	1.0	3.0	90	42	0.47±0.05e	+

注:同列相同字母表示差异不显著($P>0.05$)。+为长势弱;++为长势一般;+++为长势旺盛。下同。

2.2　植物生长调节剂对不定芽分化的影响

将增殖的愈伤组织在添加不同浓度 6-BA 和 NAA 激素的 MS 培养基上培养 4 周后都发生了较好的分化,形成了较多的不定芽(表 2、图 1B、C)。其中处理 5(0.1 mg·L^{-1} NAA、0.5 mg·L^{-1} 6-BA)愈伤组织分化率最高,为 100%,产生的芽较

多且壮，处理 7(0.5 mg·L^{-1} NAA、0.2 mg·L^{-1} 6-BA)的分化率最低，为 82%，芽较多且壮。由分化率的显著性分析可知，处理 5 组和 6 组之间的分化率差异不显著且都高于其他组，处理 1、7、8 组之间的分化率差异不显著且都低于其他组。

表 2　不同植物生长调节剂对不定芽分化的影响

Table 2　Effects of different plant growth regulators on adventitious bud differentiation

处理	NAA/(mg·L^{-1})	6-BA/(mg·L^{-1})	接种愈伤组织数/个	再分化愈伤组织数/个	分化率(%)	长势
1	0	0.2	90	76	0.84±0.02d	芽较多、较细弱
2	0	0.5	90	82	0.91±0.02c	芽多、较细弱
3	0	1	90	85	0.94±0.03bc	芽多、细弱
4	0.1	0.2	90	84	0.92±0.01c	芽较多、壮
5	0.1	0.5	90	90	1.00±0.00 a	芽较多、壮
6	0.1	1	90	88	0.98±0.01ab	芽多、较细弱
7	0.5	0.2	90	74	0.82±0.01d	芽较多、壮
8	0.5	0.5	90	75	0.83±0.02d	芽较多、较细弱
9	0.5	1	90	82	0.91±0.01c	芽较多、较细弱

2.3　生根培养

将长至 3.0～4.0 cm 高的丛生芽切割成单芽转入不同质量浓度 IBA(0、0.2 mg·L^{-1})、NAA(0、0.2 mg·L^{-1})组合的 MS、1/2MS 培养基，在一定培养条件下诱导根的发生(图 1)，培养 30 d 后统计其生根率和根的生长情况(表 3、图 1D)。处理 6(1/2MS 培养基、0.2 mg·L^{-1} NAA、0.2 mg·L^{-1} IBA)的生根率最高，为 97%，且与其他处理组的生根率差异显著，根的长势旺盛，处理 1 组的生根率最低，为 37%，根的生长情况一般。

表 3　不同基本培养基及植物生长调节剂对生根的影响

Table 3　Effects of different media and plant growth regulator combinations on rooting

处理	培养基	NAA/(mg·L^{-1})	IBA/(mg·L^{-1})	接种芽数/个	生根芽数/个	生根率(%)	根生长情况
1	MS	0	0.2	90	33	0.37±0.03d	++
2		0.2	0	90	73	0.81±0.04c	+++
3		0.2	0.2	90	79	0.88±0.01b	+++
4	1/2MS	0	0.2	90	34	0.38±0.01d	++
5		0.2	0	90	76	0.84±0.03bc	++
6		0.2	0.2	90	87	0.97±0.02a	+++

2.4　驯化移栽

待根长至 1～2 cm 时，开瓶 2 d，小心洗去上面残留的琼脂培养基，移入体积比(腐殖质)∶体积比(蛭石)=1∶1 的基质中，湿度保持在 90%、自然光 50% 的条件下，培养 15 d 转移到通风透光处，获得“凤党”植株。

3　结论与讨论

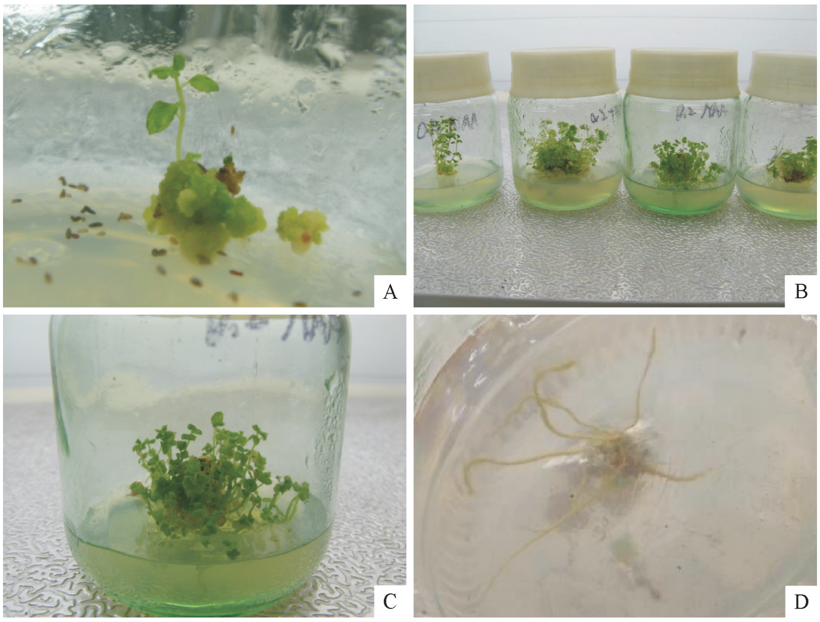
3.1　不同植物生长调节剂处理对植株愈伤组织诱导的影响

在诱导植株愈伤组织和再生体系的形成中，植物生长调节剂的种类和配比是影响其生长的重要因素[1]，通常使用细胞分裂素和生长素相结合的办法提高愈伤组织的愈导率[11-12]，其中 6-BA 是比较常用的细胞分裂素，NAA 和 IBA 是常用的生长素[13-14]。

本研究发现，当 NAA 的浓度为 0.1 mg·L^{-1}，6-BA 质量浓度从 1.0 mg·L^{-1} 逐渐增大时，“凤党”愈伤组织的出愈率逐渐减少，说明高浓度的 6-BA 对“凤党”愈伤组织诱导有不利影响。这与姚凤琴等[4]、鲁青青等[5]的研究结论一致，当 6-BA 浓度不变，NAA 的质量浓度逐渐增大时，茎段出愈率先增加后降低，这有可能是因为只有生长素和细胞分裂素平衡时，才能更好地促进茎段愈伤组织的生长，进一步说明生长素和细胞分裂素的配比是影响植株愈伤组织形成的重要因素[15-17]。

综上所述，本研究中最优组合 MS+0.5 mg·L^{-1}NAA+1.0 mg·L^{-1}6-BA，茎段出愈率最高，为 99%。张延红等[6]利用党参茎段在不同浓度配比的 MS 培养基中得到诱导愈伤组织的最佳组合为 MS+2.0 mg·L^{-1}6-BA+1.5 mg·L^{-1}NAA，出愈率为 90%，唐玉倩等[8]通过 0.5 mg·L^{-1}2,4-D+1.0 mg·L^{-1}6-BA+0.5 mg·L^{-1}KT 的处理得出茎段愈伤组织的诱导率为 90%，彭金环等[9]在轮叶党参再生培养过程中得出 0.5 mg·L^{-1}6-BA+0.2 mg·L^{-1}NAA 可以促进愈伤组织的分化。由此可以

看出,本研究中的激素组合所得的茎段的出愈率最高 99%,明显优于其他几组研究结果。即 MS+0.5 mg·L^{-1}NAA+1.0 mg·L^{-1}6-BA 的组合对于党参茎段愈伤组织的诱导具有很好的效果。



注:A. 愈伤组织上再生植株;B. 不同培养基上再生效果比较;C. 再生芽继代培养;D. 生根状。

图 1　“凤党”愈伤组织形成及植株再生

Fig. 1　Callus induction and plantlet regeneration of “Fengdang”

3.2　不同植物生长调节剂处理对不定芽诱导的影响

仅添加 6-BA 且质量浓度逐渐增大时,芽的分化率依次增大,芽的数目变多、细弱程度增加。当 NAA 质量浓度分别为 0.1 mg·L^{-1}、0.5 mg·L^{-1},6-BA 质量浓度依次增加时,芽的变化情况和 NAA 浓度为 0.0 mg·L^{-1} 基本一致,说明 6-BA 的质量浓度变化对芽生长影响最为显著,NAA 对芽的影响不明显,但低质量浓度的 NAA(0.1 mg·L^{-1})可以降低芽分化中的变异。

本研究利用 9 种不同的培养基诱导不定芽的分化,对比 9 组数据得到 MS+0.1 mg·L^{-1}NAA+0.5 mg·L^{-1}6-BA 培养基为最佳不定芽的诱导培养基,分化率为 100%。张延红等[6]在对芽的诱导中得出最佳激素组合为 MS+0.1 mg·L^{-1}NAA+0.5 mg·L^{-1}6-BA、MS+0.1 mg·L^{-1}NAA+0.1 mg·L^{-1}6-BA,分化率均为 100%,张雪君等[7]在对党参丛生芽的诱导过程中发现 0.1 mg·L^{-1}NAA+0.3 mg·L^{-1}6-BA 组合,分化率最高为 90%,但丛生芽矮化情况严重,当激素组合为 0.1 mg·L^{-1}NAA+0.5 mg·L^{-1}6-BA 时,芽分化率为 62.5%,但丛生芽的生长情况良好,彭金环等[9]在对党参再生苗的诱导中发现,1/2 MS+0.2 mg·L^{-1}NAA+0.5 mg·L^{-1}6-BA 的培养基,分化率最高达 89.4%。通过以上几组数据可以看出,此次芽诱导所选择的激素组合能够高效促进芽的诱导,是较优良的芽诱导激素组合。

3.3　不同植物生长调节剂对生根培养的影响

用 6 种不同的培养基对再生苗进行生根培养。对比观察其生根状况,得出 1/2 MS+IBA 0.2 mg·L^{-1}+NAA 0.2 mg·L^{-1} 为最佳生根培养基,生根率 97%。由表 3 可以看出,不管是 MS 培养基还是 1/2 MS 培养基,2 种激素都添加比只添加 NAA 或 IBA 中一种激素时根的生长情况好,说明在根的生长过程中生长素和细胞分裂素的配比使用有助于促进根优良生长,当 NAA 和 IBA 质量浓度一定(0.2 mg·L^{-1}),1/2 MS 培养基中芽的生长情况优于 MS 培养基。综上所得,培养基的种类、NAA 和 IBA 的浓度对根的生长都有显著的影响。

彭金环等[9]在轮叶党参的组织培养过程中,得到 1/2 MS+0.2 mg·L^{-1} IAA+0.2 mg·L^{-1}NAA 下培养再生苗的生根率最高为 92.5%,张雪君等[7]在对党参不定根的培养中发现 1/2 MS+0.5 mg·L^{-1}NAA+40 g/L 蔗糖为不定根的最佳培养基。综合本研究的最佳培养基(1/2 MS+IBA 0.2 mg·L^{-1}+NAA 0.2 mg·L^{-1})来看,在党参组培中不同的激素组合对不定根的影响较大,且党参最佳基础培养基为 1/2 MS 培养基,其他激素和蔗糖等物质的组合都具体按照外植体种类和生长的环境条件等决定。对比本研究和彭金环等[9]的最佳

生根培养基可以看出，培养基相同，但外植体的采集时间和外植体的种类都有可能影响根的生长。

本研究以优株种子培养所得无菌苗的茎段为材料，MS＋0.5 mg·L^{-1}NAA＋1.0 mg·L^{-1}6-BA培养基中诱导愈伤组织，愈伤组织接种在MS＋0.1 mg·L^{-1}NAA＋0.5 mg·L^{-1}6-BA培养基中诱导植株再生，生根培养基用1/2 MS＋IBA 0.2 mg·L^{-1}＋NAA 0.2 mg·L^{-1}，当根长至1～2 cm时开始炼苗移栽，基质用体积比(腐殖质)∶体积比(蛭石)＝1∶1，建立的优良种质的快速繁殖技术，为“凤党”的标准化栽培奠定了基础。

参考文献：

[1] 严欣，胡蝶，贾瑞瑞，等.海州常山组培再生体系的建立[J].分子植物育种，2022，20(4)：1297-1303.
YAN X，HU D，JIA R R，*et al*. Establishment of tissue culture regeneration system in *Clerodendrum trichotomum*[J]. Molecular Plant Breeding，2022，20(4)：1297-1303.(in Chinese)

[2] 付丽，张东向，刘丽杰，等.甘草外植体诱导愈伤组织形成条件优化[J].种子，2021，40(12)：139-143，148.
FU L，ZHANG D X，LIU L J，*et al*. Optimazation of callus formation conditions induced by *Glycyrrhiza uralensis* explant [J]. Seed，2021，40(12)：139-143，148.(in Chinese)

[3] 李黎，曲彦婷，韩辉，等.植物生长调节剂对萱草不定芽诱导增殖的影响[J].森林工程，2021，37(4)：22-26.
LI L，QU Y T，HAN H，*et al*. Effects of plant growth regulators on adventitious bud induction and proliferation of *Hemerocallis fulva*[J]. Forest Engineering，2021，37(4)：22-26.(in Chinese)

[4] 姚凤琴，林发壮，钟琳珊，等.红掌自交系胚芽愈伤诱导、不定芽增殖及壮苗生根的优化[J].分子植物育种，2022，20(10)：3313-3318.
YAO F Q，LIN F Z，ZHONG L S，*et al*. Optimization of initiation culture medium on embryogenic callus induction，adventitious bud proliferation and seedling rooting in *Anthurium andraeanum* inbred Line[J]. Molecular Plant Breeding，2022，20(10)：3313-3318.(in Chinese)

[5] 鲁清清，王华芳，邹凯，等.‘凤丹’牡丹胚芽愈伤诱导及不定芽的分化[J].分子植物育种，2021，19(7)：2300-2304.
LU Q Q，WAN H F，ZOU K，*et al*. Callus induction and adventitious bud differentiation of ‘Fengdan’ peony[J]. Molecular Plant Breeding，2021，19(7)：2300-2304.(in Chinese)

[6] 张延红，郭清毅，高素芳，等.党参丛生芽的诱导和增殖培养[J].时珍国医国药，2020，31(8)：1978-1980.
ZHANG Y H，GUO Q Y，GAO S F，*et al*. Studies on primary culture and subculture of *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research，2020，31(8)：1978-1980.(in Chinese)

[7] 张雪君，李肖肖，吉娇娇，等.党参丛生芽诱导及不定根培养体系研究[J].中药材，2017，40(10)：2270-2274.

[8] 唐玉倩，彭金环，于元杰.轮叶党参不同外植体愈伤诱导比较[J].分子植物育种，2010，8(5)：951-957.
TANG Y Q，PENG J H，YU Y J，*et al*. Comparation on inducing callus with different explants of *Codonopsis lanceolata* [J]. Molecular Plant Breeding，2010，8(5)：951-957.(in Chinese)

[9] 彭金环，于元杰，张美珍.轮叶党参的组织培养及植株再生研究[J].西北植物学报，2010，30(1)：184-189.
PENG J H，YU Y J，ZHANG M Z，*et al*. Study on tissue culture and plantlet regeneration of *Codonopsis lanceolata*[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica，2010，30(1)：184-189.(in Chinese)

[10] 高素芳，张延红，何春雨，等.贝母组织培养研究进展[J].甘肃农业科技，2021，52(12)：81-88.
GAO S F，ZHANG Y H，HE C Y，*et al*. Research progress of tissue culture of fritillaria[J]. Gansu Agricultural Science and Technology，2021，52(12)：81-88.(in Chinese)

[11] 刘璇，徐娇，金钺，等.党参种质资源与优良品种选育研究进展[J].农学学报，2018，8(7)：36-41.
LIU X，XU J，JIN Y，*et al*. Germplasm resources and cultivar breeding of codonopsispilosula：research progress[J]. Journal of Agriculture，2018，8(7)：36-41.(in Chinese)

[12] 周莉英，王西芳.不同类型陕产凤党的质量比较研究[J].中医药导报，2015，21(14)：42-44.
ZHOU L Y，WANG X F. Quality comparison study of different types of Shaanxi *Codonopsis* tangshen[J]. Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy，2015，21(14)：42-44.(in Chinese)

[13] 苏锦松，秦付营，张艺，等.党参的化学成分研究[J].中药材，2018，41(4)：863-867.
SU J S，QING F Y，ZHANG Y，*et al*. Compounds of *Codonopsis* radix[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials，2018，41(4)：863-867.(in Chinese)

[14] 曹晓燕，王喆之.陕西凤县栽培党参中宏量和微量元素含量测定[J].中国农学通报，2009，25(16)：136-138.
CAO X Y，WANG J Z. Determination of macro-and traceelements in radix *Codonopsis* cultivated in fengxian，Shaanxi Province[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin，2009，25(16)：136-138.(in Chinese)

[15] 许丁帆，刘艳军，何远秦，等.金银木松散型胚性愈伤组织的诱导[J].森林工程，2022，38(2)：27-33.
XU D F，LIU Y J，HE Y Q，*et al*. Induction of loose embryogenic callus of *Lonicera maackii*[J]. Forest Engineering，2022，38(2)：27-33.(in Chinese)

[16] 史国民，巨秀婷，杨莉娜，等.唐古红景天愈伤组织诱导及植株再生[J/OL].分子植物育种，2022，1(24)：1-13. https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20211216.0913.003.html

[17] 李今.药用植物党参传粉效率和结实率的研究[J].曲阜师范大学学报：自然科学版，2001(4)：73-75.
LI J. Pollination rates and seed set in *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. [J]. Journal of Qufu Normal University：Natural Science，2001(4)：73-75.(in Chinese)