

吉林西部野生桔梗组培苗玻璃化逆转技术研究*

鲁娜, 高金秋, 王丽鑫, 柏慧, 张艺璇

(白城师范学院生命科学学院, 吉林白城, 137000)

摘要: 为摸索野生桔梗不同外植体玻璃化苗的最适逆转条件, 以野生桔梗种子无菌苗的子叶、胚轴、茎诱导分化不定芽过程中产生的玻璃化苗为研究对象, 对 6-BA、NAA、IAA 三种激素不同浓度配比及培养基离子浓度进行筛选。结果表明, 子叶逆转最适条件: 1/4MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+0.1 mg/L IAA+3%蔗糖+1%琼脂; 茎及胚轴逆转最适条件: 1/4MS+0.1 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA+0.1 mg/L IAA+3%蔗糖+1%琼脂。

关键词: 桔梗; 组培苗; 玻璃化; 逆转技术

中图分类号: Q945.45 文献标识码: A 文章编号: 2095-5553 (2018) 08-0071-05

鲁娜, 高金秋, 王丽鑫, 柏慧, 张艺璇. 吉林西部野生桔梗组培苗玻璃化逆转技术研究[J]. 中国农机化学报, 2018, 39(9): 71-75

Lu Na, Gao Jinqiu, Wang Lixin, Bai Hui, Zhang Yixuan. Study on reversal techniques of vitrification in tissue culture of *Platycodon grandiflorum* West Jilin [J]. Journal of Chinese Agricultural Mechanization, 2018, 39(9): 71-75

0 引言

桔梗 (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) 为桔梗科, 桔梗属, 多年生草本植物。桔梗花具有观赏性; 根不但可以入药, 根和嫩叶还具有食用性^[1]。现如今人们的生活水平不断提高, 对生活品质也愈加重视, 野生、绿色食品已备受追捧。野生桔梗作为天然绿色药食, 两用食材已经远远不能满足人们的需求。因此, 野生桔梗的快速繁殖技术已成为解决该问题的重要手段之一^[2-4]。但在桔梗组织培养过程中, 组培苗玻璃化现象严重制约了桔梗的产量^[5]。

因此, 对吉林西部野生桔梗玻璃化组织逆转技术的研究, 不仅为吉林西部野生桔梗快速繁育体系的优化提供一定的理论基础和技术支持, 更为吉林西部野生种质资源多样性的维持及吉林西部经济的发展提供一定的数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验选取的野生桔梗种子采自于吉林省白城市镇赉县巨宝山。

1.2 方法

1.2.1 桔梗不定芽的诱导

1.2.1.1 无菌苗的制备

选取籽粒饱满的桔梗种子, 自来水冲洗 2~4 h, 无菌水冲洗 3~5 次, 25 °C 无菌水浸泡 24 h。70% 乙醇消毒 60 s, 5% 次氯酸钠消毒 5 min, 将消毒后的桔梗种子接种于含有 1% 琼脂, 3% 蔗糖的 MS 培养基中, 每 100 mL 锥形瓶接 20 粒种子。25 °C, 5 000 Lux, 光照 16 h/d, 20 d 左右, 长出健壮的无菌苗。

1.2.1.2 桔梗不定芽的诱导

以含有 1% 琼脂, 3% 蔗糖 MS 培养基为基础培养基, 按照表 1 配制激素培养基; 将无菌苗的胚轴和茎切成 0.5 cm 的小段, 子叶切成 0.5 cm² 的小块 (叶片正面朝上), 接种于上述培养基中, 设 3 个平行组, 每组 10 个外植体, 25 °C, 5 000 Lux, 光照 16 h/d。

1.2.2 桔梗玻璃化组织的逆转

1.2.2.1 培养基离子浓度对桔梗不同外植体玻璃化苗逆转的影响

将桔梗胚轴、子叶、茎诱导不定芽的最适激素浓度配比的培养基离子浓度调整为 1/2MS, 1/4MS, 1/8MS; 再将桔梗不同外植体玻璃化的不定芽分别接种于上述调整后的培养基中 (1% 琼脂, 3% 蔗糖), 设 3

收稿日期: 2018 年 7 月 27 日 修回日期: 2018 年 8 月 17 日

* 基金项目: 吉林省教育厅“十三五”科学技术项目 (JJKH20170002KJ); 白城师范学院 2015 年度校级重点课题 ([2015]A1 号); 吉林省高等学校大学生创新创业训练项目 (2017002)

第一作者: 鲁娜, 女, 1980 年生, 吉林四平人, 硕士, 讲师; 研究方向为植物学。E-mail: 405440375@qq.com

个平行组,每组 10 个玻璃化不定芽,25 °C,5 000 Lux,光照 16 h/d,观察玻璃化的逆转效果。

1.2.2.2 激素对桔梗不同外植体玻璃化苗逆转的影响

将 1.2.2.1 中玻璃化逆转效果最佳的培养基作为基础培养基,按照表 2 添加激素配比,设 3 个平行组,每组 10 个玻璃化不定芽,25 °C,5 000 Lux,光照 16 h/d。观察玻璃化苗逆转的效果。

表 1 不定芽诱导激素配比表

Tab. 1 Effects of different hormone ratios on differentiation of adventitious buds

组合	6-BA/(mg · L ⁻¹)	NAA/(mg · L ⁻¹)	IAA/(mg · L ⁻¹)
1	0.5	0.1	0.5
2	0.5	0.5	0.5
3	0.5	1.0	0.5
4	1.0	0.1	0.5
5	1.0	0.5	0.5
6	1.0	1.0	0.5
7	1.5	0.1	0.5
8	1.5	0.5	0.5
9	1.5	1.0	0.5
10	2.0	0.1	0.5
11	2.0	0.5	0.5
12	2.0	1.0	0.5

表 3 桔梗不同外植体诱导不定芽及不定芽的玻璃化

Tab. 3 Adventitious buds from different explants of *Platycodon grandiflorum* and hyperhydricity of adventitious buds

组别	子叶		茎		胚轴	
	不定芽分化率/%	玻璃化率/%	不定芽分化率/%	玻璃化率/%	不定芽分化率/%	玻璃化率/%
1	66.7	35.0	63.3	26.3	30.0	22.2
2	26.7	37.5	30.0	11.1	86.7	0
3	60.0	83.3	26.7	25.0	70.0	33.3
4	90.0	33.3	76.7	0	86.7	61.5
5	86.7	0	86.7	11.5	86.7	65.4
6	86.7	0	70.0	33.3	70.0	71.4
7	63.3	78.9	60.0	61.1	63.3	68.4
8	26.7	50.0	33.3	30.0	66.7	65.0
9	13.3	25.0	23.3	71.4	60.0	75.0
10	62.5	73.7	63.3	84.2	30.0	50.0
11	50.0	40.0	26.7	37.5	30.0	44.4
12	23.3	42.9	13.3	25.0	26.7	37.5

表 4 桔梗不同外植体诱导分化不定芽的最佳培养基

Tab. 4 Optimum ingredients of culture media for differentiation of adventitious buds from different explants of *Platycodon grandiflorum*

外植体	6-BA/(mg · L ⁻¹)	IAA/(mg · L ⁻¹)	NAA/(mg · L ⁻¹)
子叶	1.0	0.5	0.5
茎	1.0	0.1	0.5
胚轴	0.5	0.5	0.5

表 2 玻璃化逆转激素配比表

Tab. 2 Effects of different hormone ratios on reversion of hyperhydricity

组合	6-BA/(mg · L ⁻¹)	NAA/(mg · L ⁻¹)	IAA/(mg · L ⁻¹)
1	0.1	0.1	0.1
2	0.1	0.2	0.1
3	0.5	0.1	0.1
4	0.5	0.2	0.1
5	1.0	0.1	0.1
6	1.0	0.2	0.1

2 结果与分析

2.1 桔梗不定芽的获得

25 °C,5 000 Lux,光照培养 40 天左右桔梗不同外植体均诱导分化出不定芽,发现桔梗不同外植体诱导分化的不定芽产生了不同程度的玻璃化(玻璃化率=玻璃化数/不定芽数),见表 3。

如表 3 所示,在不同激素浓度配比下,子叶不定芽的诱导率最高为 90.0%,最低为 13.3%,玻璃化率最高为 83.3%,最低为 0%。茎不定芽的诱导率最高为 86.7%,最低为 13.3%,玻璃化率最高为 84.2%,最低为 0%。胚轴不定芽的诱导率最高为 86.7%,最低为 26.7%,玻璃化率最高为 75.0%,最低为 0%。由此得出,桔梗不同外植体诱导分化不定芽的最佳激素配比,见表 4。

2.2 桔梗玻璃化苗的逆转

2.2.1 培养基离子浓度对桔梗不同外植体玻璃化苗逆转的影响

根据表 4 最适激素浓度配比,通过调整 MS 培养基的离子浓度,获得桔梗子叶、胚轴、茎不定芽玻璃化逆转结果,见图 1。

如图 1 所示,1/2 离子浓度的 MS 培养基中,子叶

恢复率为 6.7%；胚轴恢复率为 6.7%；茎恢复率为 13.3%。1/4 离子浓度的 MS 培养基中，子叶恢复率为 26.7%；胚轴恢复率为 16.7%；茎恢复率为 23.3%。1/8 离子浓度的 MS 培养基中，子叶恢复率为 23.3%；胚轴恢复率为 13.3%；茎恢复率为 6.7%。由此可见，1/4 离子浓度的 MS 培养基是桔梗不同外植体玻璃化苗逆转恢复的最佳离子浓度培养基。

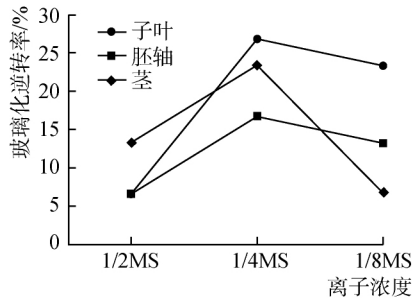


图 1 不同离子浓度培养基对桔梗不同外植体玻璃化苗的逆转恢复

Fig. 1 Effects of ion concentration of culture medium on reversion of hyperhydricity from different explants of *Platycodon grandiflorum*

2.2.2 激素对桔梗不同外植体玻璃化苗逆转的影响

2.2.2.1 6-BA 对不同外植体玻璃化逆转的影响

如图 2 所示，当 IAA 浓度为 0.5 mg/L 时，6-BA 浓度为 1 mg/L 时，子叶、茎玻璃化程度最低，分别为 11.10%和 14.93%。6-BA 浓度为 0.5 mg/L 时，胚轴玻璃化程度最低为 18.50%。

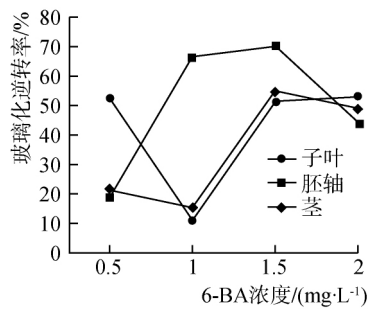


图 2 6-BA 浓度对桔梗不同外植体玻璃化的影响

Fig. 2 Effects of 6-BA concentration on hyperhydricity from different explants of *Platycodon grandiflorum*

2.2.2.2 NAA 对不同外植体玻璃化逆转的影响

如图 3 所示，当 IAA 浓度为 0.5 mg/L 时，NAA 浓度为 0.5 mg/L 时，子叶、胚轴、茎玻璃化程度均最低，分别 31.88%、43.70%、22.53%。

2.2.2.3 激素配比对不同外植体玻璃化苗逆转的影响

以含有 1%琼脂，3%蔗糖的 1/4 离子浓度 MS 培养基为基础培养基，按表 2 调整激素配比，桔梗不同外植体玻璃化逆转结果见图 4。

如图 4 所示，当调整激素浓度配比后，IAA 浓度为 0.1 mg/L 时，6-BA 浓度为 0.5 mg/L+NAA 浓度为

0.1 mg/L 时，子叶玻璃化苗逆转率最高，为 83.3%。而胚轴和茎则为 6-BA 浓度为 0.1 mg/L+NAA 浓度为 0.2 mg/L 时，玻璃化苗逆转率最高，分别为 76.7%、83.3%。

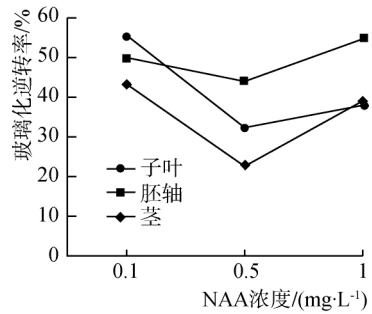


图 3 NAA 浓度对不同外植体玻璃化逆转的影响

Fig. 3 Effects of NAA concentration on hyperhydricity from different explants of *Platycodon grandiflorum*

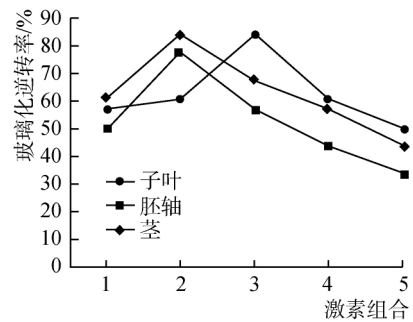


图 4 激素配比浓度对桔梗不同外植体玻璃化苗的逆转影响

Fig. 4 Effects of hormone concentration on reversion of hyperhydricity from different explants of *Platycodon grandiflorum*

子叶不定芽玻璃化逆转见图 5。茎不定芽玻璃化逆转见图 6。胚轴不定芽玻璃化逆转见图 7。



图 5 子叶不定芽玻璃化逆转

Fig. 5 Reversion of hyperhydricity of adventitious buds from cotyledon explants



图 6 茎不定芽玻璃化逆转

Fig. 6 Reversion of hyperhydricity of adventitious buds from stem explants



图7 胚轴不定芽玻璃化逆转

Fig. 7 Reversion of hyperhydricity of adventitious buds from hypocotyl explants

3 结论与讨论

玻璃化苗的发生受多种因素的影响,如外植体的类型、培养基的种类与浓度、激素质量浓度及配比、琼脂的浓度、蔗糖的浓度以及温度、光照等^[6-12]。王爱芝等^[13]在花楸组织培养研究中指出培养基的种类和激素的质量浓度是导致组培苗玻璃化现象的主要因素。龚明霞^[14]在洋桔梗逆转玻璃化,赵佐敏^[15]在非洲菊逆转玻璃化,尹恒^[16]在红檫木逆转玻璃化等研究中,分别指出6-BA和NAA的浓度对组培苗玻璃化程度有影响。本文就MS培养基的离子浓度及6-BA、NAA、IAA激素的配比浓度对吉林西部野生桔梗玻璃化逆转技术进行初探。结果表明:当MS培养基的离子浓度调整到1/4MS,且琼脂、蔗糖浓度不变时,子叶的玻璃化苗逆转恢复率为26.7%,茎的玻璃化苗逆转修复率为23.3%,胚轴的玻璃化苗逆转修复率为16.7%。当以1/4MS+1%琼脂+3%蔗糖为基础培养基,调整6-BA、NAA、IAA激素配比浓度时,子叶、胚轴、茎的玻璃化苗逆转恢复率都有所提高。这也与王爱芝、龚明霞、张天翔等人的研究结果一致。本试验同时也表明,IAA对吉林西部野生桔梗组培苗玻璃化逆转过程有影响,且随着IAA浓度的降低,桔梗玻璃化苗的比例呈降低趋势。此外,本次试验获得的吉林西部野生桔梗组培苗玻璃化逆转效率较高,这与其他植物组培苗玻璃化逆转率较低有很大差异,有待于后续继续探讨和研究。

参 考 文 献

[1] Gao W Y, Li Z L, Xiao P G. Modern progress of *Platycodon grandiflorum* A. DC. [J]. Primary J Chin Mater Med (基层中药杂志), 1996, 10(2): 48-50.
 [2] 韩蕊,李爽,杨柳,等. 桔梗组织培养技术研究进展[J]. 人参研究, 2018(2): 48-51.
 [3] 刘秀杰,田隰嶝,裴毅,等. 桔梗的组培离体再生[J]. 北方园艺, 2017(17): 40-43.
 Liu Xiujie, Tian Ludi, Pi Yi, et al. Tissue culture and regeneration of *Platycodon grandiflorus* in vitro [J]. North-

ern Horticulture, 2017(17): 40-43.
 [4] 张江丽,李培飞,苑雄雄,等. 桔梗高效离体再生体系的建立[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(21): 5436-5438, 5488.
 Zang Jiangli, Li Peifei, Yuan Xiongxiong, et al. Establishment of a highly efficient in vitro regeneration system for *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2015, 54(21): 5436-5438, 5488.
 [5] 艾鹏飞,卢利平. 桔梗试管苗茎尖玻璃化超低温保存及植株再生[J]. 中草药, 2006, 37(9): 1409-1412.
 Ai Pengfei, Lu Liping. Cryopreservation of in vitro shoot-tips of *Platycodon grandiflorum* by vitrification and plant regeneration [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2006, 37(9): 1409-1412.
 [6] 龚明霞,陈小凤,方锋学,等. 洋桔梗组培苗玻璃化原因及恢复的研究[J]. 西南农业学报, 2009, 22(6): 1718-1721.
 Gong Mingxia, Chen Xiaofeng, Fang Fengxue, et al. Study on cause and recovery of vitrification in tissue culture of *Eustoma grandifloru* [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2009, 22(6): 1718-1721.
 [7] 赵鑫闻,梁德军. 甜杨离体再生中玻璃化苗的发生与防治[J]. 中国农学通报, 2017, 33(15): 71-75.
 Zhao Xinwen, Liang Dejun. The occurrence and control of vitrification shoots of *Populus suaveolens* in vitro regenerative culture [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2017, 33(15): 71-75.
 [8] 戴丽娜,于志鹏,吕国华,等. 薰衣草玻璃化组培苗逆转技术研究[J]. 新疆农业科学, 2012, 49(11): 2054-2061, 2157.
 Dai Lina, Yu Zhipeng, Lv Guohua, et al. The study on reversal technique of vitreous tissue-culturing plantlets of lavender [J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2012, 49(11): 2054-2061, 2157.
 [9] 李瑶,王利华,叶鸣明,等. 影响香石竹试管苗玻璃化的因素(简报)[J]. 植物生理学通讯, 1997, 33(4): 256-258.
 Li Yao, Wang Lihua, Ye Mingming, et al. The factors influencing vitrification of *Dianthus caryophyllus* tissue culture [J]. Plant Physiology Communications, 1997, 33(4): 256-258.
 [10] 王爱勤,何龙飞,裴润梅,等. 组培条件对不同品种芦荟试管苗玻璃化的影响[J]. 中国农学通报, 2002, 18(5): 46-48, 52.
 Wang Aiqin, He Longfei, Pei Renmei, et al. Study on the vitrification of *Aloe* varieties plantlet in tissue culture [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2002, 18(5): 46-48, 52.
 [11] 张红,王万新. 香石竹组培中的玻璃化现象及防止[J]. 北方园艺, 2008(8): 196-197.
 Zhang Hong, Wang Wanxin. The phenomenon and preventing of vitrification in tissue culture of *Dianthus caryophyllus* [J]. Northern Horticulture, 2008(8): 196-197.
 [12] 何芳兰,李毅,赵明,等. 影响高山杜鹃试管苗玻璃化的几个因素研究[J]. 西北林学院学报, 2008, 23(1):

- 104—107.
He Fanglan, Li Yi, Zhao Ming, et al. Factors effecting vitrification of tissue culture of *Rhododendron delavayi* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2008, 23 (1): 104—107.
- [13] 王爱芝, 沈海龙, 张鹏, 等. 花楸组织培养中玻璃化现象的发生与防治[J]. 东北林业大学学报, 2009, 37(10): 18—22.
Wang Aizhi, Shen Hailong, Zhang Peng, et al. Vitrification and its prevention in tissue culture of *Sorbus pohuashanensis* [J]. Journal of Northeast Forestry University, 2009, 37(10): 18—22.
- [14] 龚明霞, 陈小凤, 方锋学, 等. 洋桔梗组培苗玻璃化原因及恢复的研究[J]. 西南农业学报, 2009, 22(6): 1718—1721.
Gong Mingxia, Chen Xiaofeng, Fang Fengxue, et al. Study on cause and recovery of vitrification in tissue culture of *Eustoma grandiflorum* [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2009, 22(6): 1718—1721.
- [15] 赵佐敏. 非洲菊组培苗玻璃化控制研究初报[J]. 贵州农业科学, 2005, 33(3): 77.
Zhao Zuomin. Preliminary results of tissue culture of *Gerbera Jamesonii* Bolus [J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2005, 33(3): 77.
- [16] 尹恒. 秋水仙素对红檵木离体材料生长发育的影响及其玻璃化现象研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2008.
Yi Heng. Effects of colchicines on the growth and vitrification in vitro induction of *Loropetalum chinense* var. *rubrum* [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2008.

Study on reversal techniques of vitrification in tissue culture of *Platycodon grandiflorum* West Jilin

Lu Na, Gao Jinqiu, Wang Lixin, Bai Hui, Zhang Yixuan

(College of Life Sciences, Baicheng Normal University, Baicheng, 137000, China)

Abstract: In order to confirm the optimal conditions of reversion in tissue culture of hyperhydric *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC., cotyledons, hypocotyls and stems of aseptic seedling were used as explants to induce hyperhydric seedlings on media in different ratios of concentration hormones of 6-BA, NAA and IAA as well as the different ion concentration of media. Results showed that the optimum condition of reversion for cotyledons was 1/4 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+0.1 mg/L IAA+3% sucrose+1% agar; the optimum culture condition of reversion for hypocotyls and stems was 1/4 MS+0.1 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+0.2 mg/L IAA+3% sucrose+1% agar.

Keywords: *Platycodon grandiflorum*; tissue seedlings; vitrification; reversal techniques