

接种密度和蔗糖浓度对桔梗花药诱导率的影响

杨 丽, 黄 华, 金 江 山, 严 一 字

(延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002)

摘 要:以桔梗花药为外植体, 分别在培养基中接种不同密度的花药和添加不同浓度的蔗糖, 研究其对桔梗花药诱导率的影响。结果表明: MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 为诱导培养基时, 愈伤组织诱导率随着接种密度的增加而下降; MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L 2,4-D 为诱导培养基时, 愈伤组织诱导率随着接种密度的增加呈先升高后下降的趋势, 密度为 15 枚/瓶时诱导率最高; 且后者各处理的诱导率均明显高于前者。MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 为诱导培养基, 随着蔗糖浓度的增加, 愈伤组织的诱导率呈先升高后下降的趋势, 蔗糖浓度为 60 g/L 时, 愈伤组织诱导率最高。

关键词:桔梗; 花药; 蔗糖浓度; 接种密度; 诱导率

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)24-0098-04

桔梗(*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC) 属桔梗科桔梗属多年生的草本植物, 别名道拉基、土人参、铃铛花等^[1]。桔梗是一种药食同源的植物, 其根可以入药, 具有宣肺、祛痰、镇咳、消肿的功效^[2]。研究证明, 它还具有抗肿瘤^[3]和降血糖^[4]的作用。同时, 桔梗还是具有朝鲜民族风味的小菜之一^[5]。随着观光旅游的发展, 桔梗被越来越多的用于观赏花卉而进行栽培^[6]。桔梗是异花授粉植物, 自然状态下异交率高^[7-9], 自然界中和生产上推广的桔梗都是混杂的群体, 到目前为止还没有纯系, 这严重影响桔梗遗传规律的研究和杂种优势的利用。通过花药培养不仅能够获得纯系育种材料和进行单倍体育种, 还可以利用杂种优势, 缩短育种年限和提高育种效率。并且, 可以用所获得的纯合二倍体材料进行植物遗传变异规律研究, 使植物育种有坚实的遗传理论基础, 减少育种的盲目性。该研究采用桔梗花药作为外植体, 研究不同的接种密度和蔗糖浓度对花药愈伤组织诱导率的影响, 探索桔梗花药愈伤组织形成的最适宜的接种密度和蔗糖浓度, 以期今后桔梗花药组织培养提供参考。

第一作者简介:杨丽(1989-), 女, 吉林农安人, 硕士研究生, 研究方向为作物遗传育种。E-mail: 956708648@qq.com.

责任作者:严一字(1964-), 女, 黑龙江北安人, 博士, 副教授, 现主要从事中药材桔梗的栽培和育种等研究工作。Email: yiziyuan@ybu.edu.cn.

收稿日期:2015-07-27

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料取自延边大学农学院桔梗试验田种植的一年生“三成紫花”种质资源的花蕾, 花蕾长度为 1.8~2.0 cm, 此时小孢子发育时期为单核靠边期的居多。置于冰箱 4℃ 保存 24 h, 备用。

1.2 试验方法

1.2.1 接种方法 将花蕾置于 75% 的酒精中消毒 1 min, 无菌水冲洗 3 遍, 然后放入 0.1% 的氯化汞溶液中消毒 10 min, 之后用无菌水冲洗 5 遍, 以上操作均在超净工作台上完成。用已经消毒的镊子将花蕾剥开, 取出花药接种于玻璃瓶中, 注意摘除花丝, 以避免体细胞干扰。

1.2.2 接种密度的筛选 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 和 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L 2,4-D 为诱导培养基, 每种培养基中加入蔗糖 30 g/L, 琼脂 8 g/L, pH 5.8。每瓶分别接种 5、10、15、20 枚花药, 共 4 种处理。每处理接种 5 瓶, 重复 3 次, 45 d 后统计愈伤组织诱导率。诱导率(%) = 产生的愈伤组织数/接种花药数 × 100。

1.2.3 蔗糖浓度的筛选 以 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 为诱导培养基, 分别添加不同浓度(30、60、90、120 g/L)的蔗糖, 琼脂 8 g/L, pH 5.8。每组处理接种 5 瓶, 每瓶接种 10 枚花药, 重复 3 次, 45 d 后统计愈伤组织诱导率。

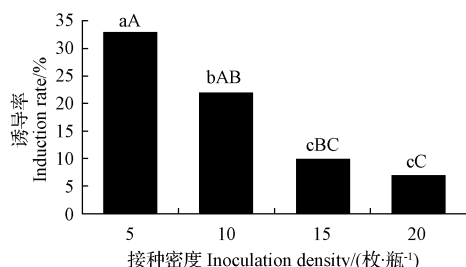
1.3 数据分析

试验数据通过 SPSS 分析软件进行方差分析, 利用新复极差法(LSR)进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同接种密度对桔梗花药愈伤组织诱导率的影响

2.1.1 以 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 为诱导培养基时愈伤组织的诱导率 对不同接种密度进行方差分析,处理间的 F 值为 17.54,大于 $F_{0.01}$,说明处理间达到差异极显著水平。经多重比较分析,其结果如图 1 所示。随着接种密度的提高,愈伤组织的诱导率反而下降。在 5%显著水平上,接种密度为 5 枚/瓶时,诱导率最高,为 33%,显著高于其它接种密度;诱导率最低的是接种密度为 20 枚/瓶的处理,诱导率仅为 7%。在 1%显著水平上,接种密度为 5 枚/瓶时,除了与接种密度为 10 枚/瓶的处理无显著差异外,分别与接种密度为 15、20 枚/瓶的处理之间存在极显著差异。



注:不同小写字母表示显著差异水平($P<0.05$),不同大写字母表示极显著差异水平($P<0.01$)。下同。

Note: Different lowercase and capital letters show signification difference at 0.05 and 0.01 levels, respectively. The same below.

图 1 不同接种密度对桔梗花药愈伤组织诱导率的影响

Fig. 1 The influence of different inoculation density on the induction rate of anther callus of *Platycodon grandiflorum*

2.1.2 以 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L 2,4-D 为诱导培养基时愈伤组织的诱导率 为比较不同接种密度对愈伤组织诱导率的影响,对 4 组数据进行方差分析,得出 F 值为 10.298,大于 $F_{0.01}$,表明处理间存在极显著差异。由图 2 可知,在 5%显著水平上,接种密度为 15 枚/瓶时,其诱导率最高,为 64%;除了与接种密度为 5 枚/瓶的处理之间不存在显著差异外,分别与接种密度为 10 枚/瓶和 20 枚/瓶的处理之间存在显著差异,接种

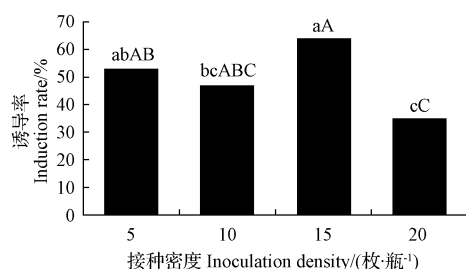


图 2 不同接种密度对桔梗花药愈伤组织诱导率的影响

Fig. 2 The influence of different inoculation density on the induction rate of anther callus of *Platycodon grandiflorum*

密度为 10、20 枚/瓶的处理之间不存在显著差异。在 1%显著水平上,接种密度为 5 枚/瓶的处理除了与接种密度为 20 枚/瓶的处理有极显著差异外,与其它接种密度处理之间无显著差异。

2.1.3 不同激素对桔梗花药愈伤组织诱导率的影响

由表 1 可知,以 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L 2,4-D 为诱导培养基时,4 种不同密度处理的平均诱导率均明显高于以 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 为诱导培养基的各处理的平均诱导率;以 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 为诱导培养基时,其诱导率最高的接种密度是 5 枚/瓶,为 33%;而以 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L 2,4-D 时,接种密度为 15 枚/瓶时,诱导率值最大,为 64%;接种密度为 20 枚/瓶时,2 种不同激素种类的培养基诱导出的愈伤组织都是最少的,即诱导率最低。

表 1 不同激素对桔梗愈伤组织诱导率的影响

Table 1 The influence of different types of hormones on induction rate of anther callus of *Platycodon grandiflorum*

培养基种类	接种密度/(枚·瓶 ⁻¹)	诱导率/%	平均值/%
MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA	5	33	18
	10	22	
	15	10	
	20	7	
MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L 2,4-D	5	53	49
	10	47	
	15	64	
	20	35	

2.2 不同蔗糖浓度对桔梗花药愈伤组织诱导率的影响

对 4 种不同蔗糖浓度处理进行方差分析,结果显示, F 值为 5.934,大于 $F_{0.05}$,但小于 $F_{0.01}$,说明各处理间存在显著差异。由图 3 可知,随着蔗糖浓度的增加,愈伤组织诱导率呈先升高后下降的趋势,在 5%显著水平上,蔗糖浓度为 60 g/L 时诱导率最好,为 21%,虽与蔗糖浓度为 30 g/L 处理之间无显著差异,但与蔗糖浓度为 90、120 g/L 的处理之间存在显著差异;而蔗糖浓度为

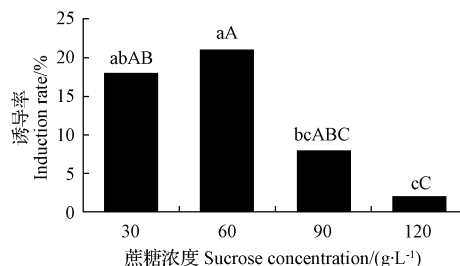


图 3 不同蔗糖浓度对桔梗花药愈伤组织诱导率的影响

Fig. 3 The influence of different sucrose concentration on the induction rate of anther callus of *Platycodon grandiflorum*

90、120 g/L 处理之间诱导率的差异不显著。在 1% 显著水平上,蔗糖浓度为 60 g/L 的诱导率除了与蔗糖为 120 g/L 处理之间有极显著差异外,与其它蔗糖浓度处理均无显著差异。

3 讨论与结论

SUNDERLAND^[10]指出,花药的接种密度对植物的花药培养有一定的作用,认为接种密度与诱导率呈正相关。孙夕^[11]在高山红景天花药组织培养的研究中也得出,高山红景天花药接种密度越大越有利于花药愈伤组织的诱导。孙敬三等^[12]认为花药因子对花药愈伤组织的诱导有促进作用,花药密度越高,花药本身释放到培养基中的花药因子也会更多,花药愈伤组织越易形成。

但在该研究中发现,在以 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 为诱导培养基时,诱导率随着接种密度的增加而下降,而以 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L 2,4-D 为诱导培养基时,诱导率随着接种密度的上升呈先升高后下降的趋势。当接种密度增加到 15 枚/瓶时,诱导率最高,为 64%,而增加到 20 枚/瓶时,诱导率最低,为 35%。原因可能是因为,随着密度的增加,由花药本身释放的化学物质过盛,对愈伤组织的形成反而起到抑制作用。或者由于培养基内空间有限,密度过大时,外植体之间可能产生竞争作用,导致培养基内养分不足,致使诱导率下降。所以为了能够有效的提高桔梗花药愈伤组织的诱导率,以上因素还有待今后进一步探索。

武冲等^[13]认为生长素 2,4-D 可能会影响分化后的植株的倍性,故在筛选蔗糖浓度的试验中以 NAA 为生长素。由于不同植物花粉细胞渗透压的差异,使得不同种类植物花粉培养要求不同的糖浓度^[14],而蔗糖浓度被看作是诱导花粉再生的一个重要因素,在一定蔗糖浓度的范围内,花粉植株的诱导率随着蔗糖浓度的增加而升高。但在该研究中,诱导率随着蔗糖浓度的增加呈现先升高后下降的趋势,当蔗糖浓度增加到 60 g/L 时,诱导率最高,随后开始下降,而浓度增加到 120 g/L 时,诱导率最低,仅为 2%。可能是因为过高浓度的蔗糖经高压灭菌后,会分解更多的果糖和葡萄糖,而这些分解物对花药有毒害作用^[14],而且陈永勤^[15]认为果糖和葡萄糖会降低培养基的 pH 值。因而,蔗糖浓度越高,分解产生的果糖和葡萄糖的含量越多,pH 值下降的越严重。因

此,这是否是造成诱导率下降的原因还有待今后进一步研究。

诱导培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 时,愈伤组织诱导率随着密度的增加而下降,密度为 5 枚/瓶时诱导率最高,达到 33%,诱导率最低的接种密度为 20 枚/瓶的处理,仅为 7%。诱导培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L 2,4-D 时,愈伤组织的诱导率随着密度的增加呈先升高后下降的趋势,密度为 15 枚/瓶时诱导率最高,为 64%,最低的为密度为 20 枚/瓶的处理,为 35%。以 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L 2,4-D 为诱导培养基时,4 种不同的密度处理的平均诱导率均明显高于以 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 为诱导培养基的各处理的平均诱导率。在以 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 为诱导培养基时,随着蔗糖浓度的增加,愈伤组织诱导率呈先升高后下降的趋势。蔗糖浓度为 60 g/L 时,愈伤组织诱导率最高,达到 21%。当蔗糖浓度为 120 g/L 时,诱导率最低,为 2%。

参考文献

- [1] 中国药材公司. 中国常用中药材[M]. 北京:科学出版社,1995.
- [2] 刘德军,马维希. 桔梗[M]. 北京:中国中医药出版社,2001.
- [3] 李伟,齐云,王梓,等. 桔梗皂苷体外抗肿瘤活性研究[J]. 中药药理与临床,2009,25(2):37-40.
- [4] 陈美娟,俞斌,江亚兵,等. 桔梗水提醇沉上清部分对链脲菌素致糖尿病大鼠糖耐量影响的研究[J]. 中药药理与临床,2010,26(1):52-55.
- [5] 周涛. 桔梗系列保健食品的开发[J]. 农牧产品开发,2000(5):44-47.
- [6] 张永清. 药用观赏植物栽培与利用[M]. 北京:华夏出版社,2000.
- [7] 吴基日,严一字,吴松权,等. 桔梗自花传粉结实率低的原因及解决方法[J]. 延边大学农学报,2005,27(1):56-60.
- [8] 李今,邵锦霞. 药用植物桔梗的传粉效率与结实率研究[J]. 湖南师范大学自然科学报,2001,24(2):73-75.
- [9] 魏建和,杨世林,李先恩,等. 桔梗不同种质的比较研究:桔梗的杂交及花色、种色的新类型分离[J]. 中草药,2002,33(3):455-458.
- [10] SUNDERLAND N. Strategies in the improvement of yields in anther culture. In: Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture[M]. Peking China: Science Press, 1978:65-86.
- [11] 孙夕. 高山红景天花药组织培养的研究[D]. 延边:延边大学,2014.
- [12] 孙敬三,桂耀林. 植物细胞工程试验技术:常用培养基配方[M]. 北京:科学出版社,1995.
- [13] 武冲,唐树梅,张勇,等. 植物花粉培养研究进展[J]. 农业基础科学,2008,24(11):146-149.
- [14] 王蒂,陈劲枫. 植物组织培养[M]. 北京:中国农业出版社,2013.
- [15] 陈永勤. MS 培养基凝固效果和高温灭菌后 pH 值变化的研究[J]. 湖北大学学报,2001,23(3):282.

Influence of Inoculation Density and Sucrose Concentration on Induction Rate of Anther of *Platycodon grandiflorum*

YANG Li, HUANG Hua, JIN Jiangshan, YAN Yizi
(Agricultural College, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002)

兔眼蓝莓‘顶峰’的离体快繁技术研究

李 森¹, 高丽霞², 刘 念³, 张施君³

(1. 仲恺农业工程学院 科技处, 广东 广州 510225; 2. 仲恺农业工程学院 健康农业研究所, 广东 广州 510225;

3. 仲恺农业工程学院 园艺园林学院, 广东 广州 510225)

摘 要:以兔眼蓝莓‘顶峰’的带芽茎段为外植体,研究了腋芽诱导、增殖、生根和出瓶移栽的最佳培养条件,建立了‘顶峰’的离体快繁技术体系。结果表明:适宜芽诱导的培养基为 WPM+ZT 0.5 mg/L;适宜苗增殖的培养基为 WPM+ZT 1 mg/L;适宜组培苗生根的培养基为 WPM+ZT 1.0 mg/L+IBA 0.5 mg/L。在生根培养基中用河沙代替琼脂粉固定植株,易于清洗出瓶苗根系上粘附的培养液,避免损伤不定根系,60 d 后组培苗的移栽成活率达 80%。

关键词:兔眼蓝莓;离体繁殖;生根

中图分类号:S 663.203.6 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2015)24-0101-03

蓝莓(*Vaccinium* spp.)属杜鹃花科越橘属的小浆果灌木。蓝莓叶片卵圆形,互生,叶片大小不等,3.0~8.0 cm,视品种而定。总状花序,侧生或顶生,花单生或双生在叶腋间。果实呈蓝色,被一层白粉,营养成分丰富,不仅是一种果品,还是一种流行的保健和功能食品^[1-2]。兔眼蓝莓(*Vaccinium ashei*)是从野生兔眼越橘品种中选育出来的栽培品种,果实成熟前其颜色红如兔眼,因此得名。‘顶峰’(Climax)是兔眼蓝莓中的优良品种之一,寿命长,果实质量在 1 g 以上,多汁并有香味,风味佳。其繁殖技术通常采用播种或扦插方法,繁殖速度

慢,生产规模难以扩大。通过组织培养技术能够在短期内获得大量种苗,且操作不受季节限制。目前蓝莓‘顶峰’的组织培养和快速繁殖研究尚鲜见报道,该试验旨在提供蓝莓‘顶峰’的组织培养快速繁殖技术,为该品种的大规模繁殖和开发利用奠定试验和技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

蓝莓‘顶峰’外植体取自仲恺农业工程学院的钟村农场,于晴天剪取健壮优株萌发的新枝条作为外植体备用。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体处理 去除枝条上的叶片,保留腋芽,将枝条剪切成长约 2 cm 的茎段,用自来水冲洗干净,在超净工作台上用浓度为 75% (v/v) 的酒精浸泡 30 s,再用 0.1% (w/v) HgCl₂ 浸泡 2~3 min,无菌水冲洗 5~6 次,无菌滤纸吸干水分。

1.2.2 腋芽的诱导 将消毒处理过的茎段分别接种于不同的诱导培养基,观察腋芽的诱导和生长情况,30 d 后统计污染率和萌芽率。污染率(%) = 污染外植体总数/总外植体数 × 100,萌芽率(%) = 萌芽外植体总数/总

第一作者简介:李森(1982-),男,硕士,助理研究员,现主要从事园艺植物良种繁育与商品化生产研究及科研管理等工作。E-mail: 88045361@qq.com.

责任作者:张施君(1974-),女,博士,副研究员,现主要从事园艺植物育种与栽培等教学与科研工作。E-mail: guanyehuaazu@163.com.

基金项目:广东省科技计划资助项目(2013B020304006);广东省科技厅产学研合作资助项目(2013B090200065)。

收稿日期:2015-07-27

Abstract: Using the anther of *Platycodon grandiflorum* as explants, different density of anther were inoculated and different concentrations of sucrose were added respectively in the culture medium, and their effect on induction rate of anther was studied. The results showed that MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA as induction medium, with the increase of density callus induction rate was decreased; MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L BA+2,4-D as induction medium, callus induction rate first increase and then decrease with the increase of density, when the density reach to 15, the induction rate was the highest; and the induction rate of the latter were significantly higher than that of the former induction rate. MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA as induction medium, attaching different concentrations of sucrose, with the increase of sucrose concentration, callus induction rate showed a trend of rise after the fall of the first, while the concentration of sucrose reached to 60 g/L, the induction rate was the highest.

Keywords: *Platycodon grandiflorum*; anther; concentrations of sucrose; inoculated density