

量高时,植株体内磷量相应提高,根细胞膜磷脂成分随之增加,根细胞膜透性降低,宿主向根外分泌的菌根菌赖以生存的光合产物数量减少,导致侵染率降低。在高磷条件下,植物根系无需菌根帮助就可吸收所需的全部磷素,而菌根菌则需相当数量的光合产物维持其生长发育。同时,菌根化的根比非菌根化的根消耗更多能量^[8]。因此,AM 真菌与宿主对光合产物的竞争导致了植株生长量的降低。由此可见,过高施磷量不利于 AM 真菌生长发育及对宿主植物的侵染,甚至对宿主植物生长有抑制作用。本试验结果也证明了这一点。

柴胡接种 AM 真菌后,提高了植株叶片光合色素和植株可溶性糖的量,并且同一施磷水平下接种株各指标明显优于非接种株。这可能缘于 AM 真菌促进了柴胡根系对土壤矿质元素(特别是磷素)的吸收,提高了柴胡体内磷素等营养元素的量,而柴胡磷量的提高,不仅有利于光合磷酸化等许多与光合作用有关的环节正常运行,也可促进光合产物的运输和分配^[9],光合产物向根的运输和分配又促进了 AM 真菌的生长发育和对宿主根系的侵染^[10],如在本试验中,由于 AM 真菌的旺盛生长依赖于宿主根系光合产物的供应,造成接种混合菌剂的柴胡根系可溶性糖的量始终低于对照株。

试验结果表明,不仅施磷量与 AM 真菌对柴胡生长有明显的交互作用,而且不同菌种对柴胡的接种效果也不同,即宿主植物和 AM 真菌之间存在一定的选择性。总体而言,施磷与 AM 真菌两者组合比不接种相应施磷水平的组合提高了柴胡根干质量和各生理指标量。

不论是柴胡根干质量,还是各生理指标的量,接种株在低磷条件下的测定值都接近或超过高磷水平下未接种株的测定值,并且施磷量与 AM 真菌之间存在最佳组合关系。因此,接种 AM 真菌不仅对优质柴胡生产有积极效应,而且在促进柴胡生长的同时,能够提高磷肥利用率,减少磷肥用量。

References:

- [1] Singh J, Aneja K R. *From Ethnomycology to Fungal Biotechnology Exploiting Fungi from Natural Resource for Novels Products* [M]. New York: Plenum Press, 1999.
- [2] He X L, Zhao F G, Li B, et al. Effects of AM fungi on the growth and chemical composition of tobacco leaf under different P levels [J]. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 2001, 12(5): 761-764.
- [3] Phillips J M, Hayman D S. Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection [J]. *Trans Br Mycol Soc*, 1970, 55: 158-161.
- [4] Gao J F. *Plant Physiology Experiment Technology* (植物生理学实验技术) [M]. Xi'an: World Publishing Corporation, 2000.
- [5] Nanjing Soil Institute of Academy of Sciences of China. *Physical and Chemical Analysis of Soil* (土壤理化分析) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1978.
- [6] Tarafdar J C, Marschner H. Phosphatase activity in the rhizosphere and hyphosphere of VA mycorrhizal wheat supplied with inorganic and organic phosphorus [J]. *Soil Biol Biochem*, 1994, 26(3): 387-395.
- [7] Graham J H, Leonard R H, Merge J A. Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of VAM formation [J]. *Plant Physiol*, 1981, 67: 548-552.
- [8] Pang P C. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhiza on ¹⁴C and ¹⁵N distribution in nodulated faba beans [J]. *Can J Soil Sci*, 1980, 60: 241.
- [9] Zhang J S. *Plant Physiology* (植物生理学) [M]. Xi'an: World Publishing Corporation, 1999.
- [10] Jakobsen I, Rosendahl L. Carbon flow into soil and external hyphae from root of Mycorrhizal cucumber plants [J]. *New Phytologist*, 1990, 115: 77-83.

桔梗试管苗茎尖玻璃化法超低温保存及植株再生

艾鹏飞¹, 卢利平²

(1. 河北科技大学生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050018; 2. 河北科技大学 图书馆, 河北 石家庄 050018)

摘要:目的 为桔梗 *Platycodon grandiflorum* 种质资源的保存提供一条新途径。方法 采用玻璃化法研究了桔梗试管苗茎尖超低温保存及植株再生。结果 桔梗嫩梢在培养基(MS+5%DMSO+103 g/L 蔗糖)上培养 3 d, 切取 2~3 mm 茎尖, 室温(20 ℃)下装载液(60%PVS₂)过渡 20 min, 0 ℃下玻璃化液(PVS₂)处理 90 min, 投入液氮保存 1 d 后, 40 ℃水浴化冻, 含 410 g/L 蔗糖的 MS 培养基洗涤 20 min, 接种于含 0.6 mg/L KT、0.2 mg/L BA、0.05 mg/L NAA 的 MS 培养基表面的滤纸上, 暗处理 1 d 后转移到新鲜的上述再生培养基中, 暗培养 1 周后转到正常光下, 80%以上成活, 植株生长正常。结论 桔梗种质资源的玻璃化法超低温保存操作简单、成活率高、再生植株正

收稿日期: 2005-12-16

基金项目: 校博士基金项目(QD200309)

作者简介: 艾鹏飞(1974—), 男, 湖北浠水人, 副教授, 博士, 从事植物细胞工程与分子生物学教学、科研工作, 在该领域已发表论文 10 余篇。 Tel: (0311)88632163 Fax: (0311)88632642 E-mail: apf2002@sina.com

常,可用于生产实践。

关键词:超低温保存;玻璃化法;试管苗茎尖;桔梗

中图分类号:R282.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)09-1409-04

Cryopreservation of *in vitro* shoot-tips of *Platycodon grandiflorum* by vitrification and plant regeneration

AI Peng-fei¹, LU Li-ping²

(1. College of Biological Science and Technology, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang

050018, China; 2. Library, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China)

Abstract: Objective To get a new approach to conserve the germplasm of *Platycodon grandiflorum*.

Methods A method of vitrification was studied to cryopreserve *in vitro* shoot-tips of *P. grandiflorum*, and the regenerated plantlets were observed subsequently. **Results** Shoot-tips, 2—3 mm length, gotten from *in vitro* shoots of *P. grandiflorum* precultured on MS medium supplemented with 5% DMSO and 103 g/L sucrose for 3 d, were loaded with the 60% PVS₂ for 20 min at 20 °C, and incubated in PVS₂ for 90 min at 0 °C prior to a direct plunging into liquid nitrogen (LN) and keeping for 1 d. After rapid thawing in water at 40 °C, the shoot-tips were rinsed in the MS medium supplemented with 410 g/L sucrose for 20 min, and plated on the filter paper sustained by the MS regeneration medium supplemented with 0.6 mg/L KT, 0.2 mg/L BA, and 0.05 mg/L NAA for 1 d in dark and subcultured on the above regeneration medium for one week in dark prior to exposure to the light. The survival of shoot-tips was up to 80%, and they grew normally. **Conclusion** The method of vitrification to cryopreserve the germplasm of *P. grandiflorum* is simple in handling with high in survival and normal in regeneration and can be applied in practice.

Key words: cryopreservation; vitrification; shoot-tips; *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.

桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. 为桔梗科桔梗属多年生草本植物,其根是我国名贵药材之一^[1]。近年来,由于肆意采伐,造成其野生资源濒危灭绝。其种子保存有效期一般为一年,当年的发芽率也只有 70% 左右;且种子繁殖易导致种性退化和混杂现象,限制了生产的发展^[1,2]。桔梗的组织离体培养已见报道^[2]。常规的离体保存需经常继代,耗费大量人力、物力,且易污染和变异。玻璃化法超低温保存是当前植物种质资源长期保存的理想途径,已成功地应用于柑橘^[3]、柿^[4]、地黄^[5]、马铃薯^[6]和芒果^[7]等茎尖的保存。本研究以桔梗试管苗为试材,研究影响其茎尖玻璃化法超低温保存的一些因素,以期为桔梗茎尖超低温保存提供理论依据和实践借鉴。

1 材料和方法

1.1 材料:以桔梗栽培品种腋芽为外植体,参照文献方法^[2]建立桔梗茎尖试管苗无性系。

1.2 方法

1.2.1 茎尖的预培养:切取继代 4 周龄的桔梗试管苗嫩梢(8~10 mm),接种到添加有 5% 二甲基亚砜

(DMSO)和不同质量浓度蔗糖的 MS 培养基中,于低温(6±1) °C 和弱光照 800 lx (12 h/d) 下培养 1~5 d。

1.2.2 装载与脱水:切取不同大小的茎尖,转移到 1.8 mL 冻存管中(每管不少于 10 个茎尖),加入装载液 60% PVS₂(含 51 g/L 蔗糖的 MS 液体培养基与 PVS₂ 溶液体积比为 40:60),室温(20 °C)过渡 10~60 min,玻璃化液 PVS₂(30% 甘油+15% 乙二醇+15% DMSO+137 g/L 蔗糖)于室温或 0 °C 下脱水处理不同时间后,换成新鲜的 PVS₂ 后迅速投入液氮保存。每次处理 2 管,重复 3 次。

1.2.3 化冻、恢复培养与植株再生:保存 1 d 后,从液氮中取出冻存管,分别于 0~80 °C 水浴解冻(冻存管中的 PVS₂ 刚好全部呈液态状)后吸去 PVS₂,410 g/L 蔗糖的 MS 培养液洗涤 2 次,每次 10 min。取出茎尖,无菌滤纸吸去残留在其表面上的洗液,接种到恢复培养基(MS+0.6 mg/L KT+0.2 mg/L BA+0.05 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖)的滤纸上暗处理 1 d,转接到新鲜的恢复培养基中,暗培养 1 周后转入光下[(25±2) °C,1 500 lx],1 周后统计成活率[成

活率=(长芽+长愈伤的茎尖数)/总茎尖数×100%]。再生植株和对照(未冻存植株)在增殖培养基 MS+0.5 mg/L BA+0.05 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖和生根培养基 1/2MS+0.8 mg/L NAA+20 g/L 蔗糖中进行比较实验。

2 结果与分析

2.1 蔗糖浓度和预培养时间对茎尖保存后成活率的影响:8~10 mm 桔梗试管苗嫩梢接种到添加有不同质量浓度蔗糖的 MS 培养基(含 5%DMSO)中,低温培养 1~5 d,切取 2 mm 茎尖于室温 60% PVS₂ 装载 20 min,0 °C 下 PVS₂ 处理 90 min,液氮保存后的结果见表 1,较高的蔗糖质量浓度(171 g/L)下培养 1 d 和适中的蔗糖质量浓度(103 g/L)下培养 3 d,两种组合处理都能获得较高的成活率(75%以上)。但较高的蔗糖质量浓度(171 g/L)下培养 1 d 的处理出现了不同重复间的试验结果一致性较差。故以蔗糖 103 g/L,预培养时间 3 d 更可取。

2.2 装载时间对茎尖保存后成活率的影响:桔梗试管苗茎尖 2mm,室温下 60% PVS₂ 中装载 0~60

表 1 蔗糖质量浓度和预培养时间对茎尖超低温保存后成活率的影响

Table 1 Effect of sucrose concentration and preculture time on survival rate of shoot-tips after cryopreservation

预培养时间/d	蔗糖不同质量浓度下成活率/%			
	0 g/L	34 g/L	103 g/L	171 g/L
0	5.87±3.33	6.21±3.12	5.65±3.45	6.70±3.23
1	6.13±3.42	33.63±4.14	41.52±4.32	75.38±8.63
3	6.33±3.21	61.12±5.21	78.81±4.23	55.32±5.21
5	5.96±3.45	62.11±5.30	58.77±4.53	40.23±4.83

表 2 PVS₂ 处理温度和时间对茎尖超低温保存后成活率的影响

Table 2 Effect of temperature and time of exposing with PVS₂ on survival rate of shoot-tips after cryopreservation

温度/°C	成活率/%					
	0 min	10 min	30 min	60 min	90 min	120 min
0	0	11.87±3.13	21.87±3.37	62.85±4.31	81.67±4.32	60.57±4.01
20	0	15.13±3.42	30.13±4.41	45.13±3.61	29.31±3.25	11.31±2.31

2.4 茎尖大小对茎尖保存后成活率的影响:材料大小对保护性脱水程度影响较大。材料大,不易脱水;材料小,易于脱水,但冷冻保护剂对其毒害作用加大。本试验采用预培养后的约 1、2、3、4.5 mm 4 种长度桔梗试管苗茎尖,60%PVS₂ 20 min,0 °C 下 PVS₂ 90 min 后液氮保存,结果如图 2 所示,1、4.5 mm 左右的茎尖成活率相对较低,2、3 mm 左右的较高,二者都在 80% 以上。故茎尖大小宜在 2~3 mm。

2.5 化冻温度对茎尖保存后成活率的影响:化冻温度是影响材料超低温保存效果的重要环节。本试验

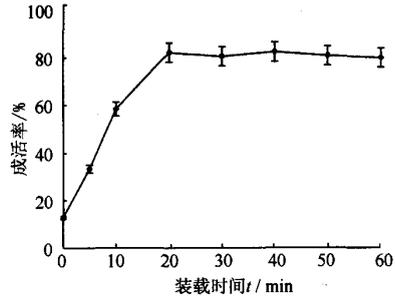


图 1 装载时间对茎尖超低温保存后成活率的影响

Fig. 1 Effect of loading time with 60% PVS₂ on survival rate of shoot-tips after cryopreservation

min,0 °C 下 PVS₂ 处理 90 min 后液氮保存,结果如图 1 所示,0~20 min 内,茎尖成活率随装载时间的延长在增高,20~60 min 内,茎尖成活率基本保持不变,故桔梗试管苗茎尖于室温下 60%PVS₂ 中装载 20 min 即可。

2.3 PVS₂ 处理温度和时间对茎尖保存后成活率的影响:玻璃化液保护性处理是玻璃化法超低温保存最关键的步骤之一。本试验采用桔梗预培养后的 2 mm 茎尖,60%PVS₂ 预处理 20 min,分别于 0、20 °C 下 PVS₂ 处理 0~120 min 后液氮保存,结果见表 2。没有经过 PVS₂ 处理的材料不能成活,经 PVS₂ 处理后材料的成活率随处理温度和时间而变化,0 °C 相对 20 °C,处理效果普遍要好,其中 0 °C 下 90 min 的处理成活率最高(81%左右)。这可能是 PVS₂ 对茎尖组织保护性脱水的同时引起了其化学毒害作用,而 0 °C 条件下化学毒害作用比在 20 °C 下要小得多的缘故。因此,0 °C 下 PVS₂ 保护性脱水 90 min 更可取。

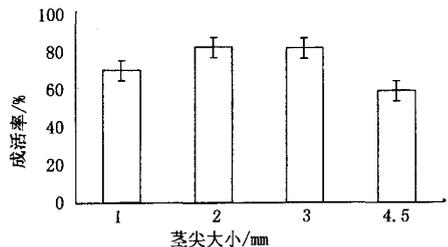


图 2 茎尖大小对茎尖超低温保存后成活率的影响

Fig. 2 Effect of size of shoot-tips on survival rate of shoot-tips after cryopreservation

设计了 4 个化冻温度,结果表明,液氮超低温保存后的桔梗试管苗茎尖,随着化冻温度的升高,其成活率相应增高,但过高的化冻温度(80 ℃)导致试验的重复性差(表 3)。这可能是因为茎尖化冻是一个瞬间过程,化冻温度过低引起组织的次生结冰,而过高又难以掌握,加剧化学性的生理毒害。故选择 40 ℃ 的化冻温度更理想。

表 3 化冻温度对茎尖超低温保存后成活率的影响
Table 3 Effect of thawing temperature on survival rate of shoot-tips after cryopreservation

处理	不同化冻温度下的成活率/%			
	0 ℃	20 ℃	40 ℃	80 ℃
1	11.23	35.11	81.58	91.98
2	12.11	37.24	82.37	75.23
3	10.05	33.98	80.96	85.35
平均数	11.13±1.03	35.44±1.66	81.64±0.71	83.19±8.41

2.6 再生植株的扩增、生根:液氮超低温保存后的桔梗试管苗茎尖转接到恢复培养基 MS+0.6 mg/L KT+0.2 mg/L BA+0.05 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖,暗培养 1 周后转入正常光照下培养,2~3 d 后茎尖转变为绿色;1 周后,茎尖的叶原基发育成新叶(图 3-A);4 周后,茎尖直接发育成植株。再生植株转接到增殖培养基 MS+0.5 mg/L BA+0.05 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖中进行扩繁。4 周后,增殖倍数达到 16~20 倍(图 3-B)。再生植株与对照植株转接到生根培养基 1/2MS+0.8 mg/L NAA+20 g/L 蔗糖诱导生根,2 周后,二者均能正常生根,生根率都在 95% 以上(图 3-C)。目前,再生植株生长和分化正常,进一步遗传稳定性检测在进行中。

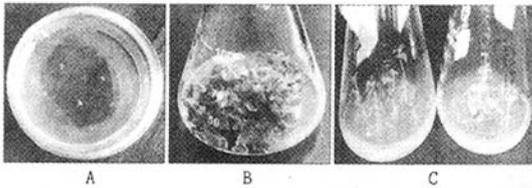


图 3 桔梗试管苗茎尖超低温保存后的再生

Fig. 3 Regeneration of cryopreserved *in vitro* shoot-tips of *P. grandiflorum* by vitrification

3 讨论

材料预培养是超低温保存的重要环节^[8]。不同的植物材料,预培养方式也不相同。柑橘^[3]试管苗茎尖超低温保存中,5%DMSO 预培养 3 d 成活率最高;柿^[4]茎尖超低温保存中,103、171、239g/L 蔗糖

各 1 d 的效果最好。而本试验中,在预备试验时单独添加 DMSO、甘油或蔗糖预培养,均没有提高保存后材料的成活率,而用 5%DMSO 和 103 g/L 蔗糖的组合处理中成活率得到了大幅度提高,且与培养温度也有较大相关性。其原因可能是不同的植物材料对预培养保护性脱水的“敏感度”不尽一样。DMSO 属于渗透性的保护剂,易渗透到细胞内使其脱水不彻底;蔗糖是非渗透大分子物质,能让细胞胁迫脱水,二者组合处理更能达到保护性脱水的目的。具体原因有待探讨。

植物茎尖超低温保存中,不同材料、不同方法最适 PVS₂ 处理时间也不相同^[8]。一般来讲,较低温度下(0 ℃左右)处理时间长些;较高温度下(20 ℃左右)处理时间短些,但较高温度下加剧了对材料的化学毒害作用。柑橘^[3]、柿^[4]、地黄^[5]、马铃薯^[6]和芒果^[7]等茎尖的超低温保存中,选用的 PVS₂ 处理时间各不一样。本试验结果也证实了这一点。

本试验采用玻璃化法超低温保存桔梗试管苗茎尖,不仅成活率高,且保存后的再生植株生长和分化正常,快速繁殖效率也高。其原因可能是低温保存过程本身的筛选效应和低温处理的后滞效应共同导致的结果。相关研究有待开展和深入。

References:

- [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] Shu L, Gao S. The tissue culture of *Platycodon grandiflorum* A. DC. [J]. *J Plant Res Environ* (植物资源与环境学报), 2001, 10(3): 63-64.
- [3] Wang Z H, Deng X X. Cryopreservation of citrus shoot-tips by vitrification and regeneration [J]. *Acta Horti Sin* (园艺学报), 2001, 28(4): 301-306.
- [4] Ai P F, Luo Z R. Cryopreservation of dormant shoot tips of persimmon by vitrification and plant regeneration [J]. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2003, 36(5): 553-556.
- [5] Xue J P, Zhang A M, Liu J, et al. Cryopreservation of *Rehmannia glutinosa* shoot-tips *in vitro* growth by vitrification [J]. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), 2003, 11(4): 430-431.
- [6] Pennycooke J C, Towill L E. Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] by vitrification [J]. *Plant Cell Reports*, 2000, 19: 733-737.
- [7] Channuntapipat C, Collins G, Bertozzi T, et al. Cryopreservation of *in vitro* almond shoot tips by vitrification [J]. *J Horti Sci & Biotechnol*, 2000, 75(2): 228-232.
- [8] Wang J H, Huang C N. Vitrification—a new approach for cryopreserving shoot-tips and meristems of horticultural crops [J]. *Acta Horti Sin* (园艺学报), 1994, 21(3): 277-282.