

# 试管苗玻璃化现象的研究进展

丰 锋

(湛江海洋大学, 广东 湛江 524088)

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2003)03-0071-03

植物组织培养中,常常可以观察到分化形成一些半透明状的畸形试管植物,这类植物体被称为“玻璃苗”,是植物组织培养中常见的现象。在离体培养中,再生植株成长为“玻璃苗”的现象称为“玻璃化现象(vitrification)”。除了在卜学贤等列出的29种植物组培中发现外,目前国内报道的还有油菜、甘蓝<sup>[8]</sup>、西瓜<sup>[12]</sup>、珠美海棠<sup>[11]</sup>、月季、芥菜<sup>[9]</sup>、芦荟<sup>[14]</sup>等。由于玻璃苗的组织结构和生理功能异常,故分化能力低下,难以增殖成芽,也难以生根成苗,移栽大田更难成活,已成为组培工作中亟待解决的一大难题。

自从Phillips和Mathews(1964)、Hackett和Anderson(1967)最早描述了石竹茎尖培养时所出现的半透明状态异常试管苗现象及Debergh等(1981)首次进行系统研究并提出“玻璃化”一词以来,组织培养中玻璃苗发生的原因和防治措施一直受到组培工作者的广泛关注。国内的研究者在玻璃化植株的解剖学特点、生理生化变化、形成原因及控制方法上取得了可喜的进展,但是对于玻璃化发生规律和机理至今尚无定论,只有不同侧面的阐述,尚未找到一个普遍适用的预防性措施和行之有效的解决方法。

## 1 玻璃苗形态解剖学特点

与正常苗相比,玻璃苗在形态解剖学上发生了显著变化,其共同特点是:植株矮小肿胀,呈半透明状;茎短而粗,几乎无节间;叶片厚而狭长,皱缩或卷曲,脆弱易破碎;叶表无角质层,无功能性气孔器,叶仅有海绵组织,没有栅栏组织。此外,刘思颖等观察到丝石竹玻璃苗叶片表皮毛少,气孔开张度小,保卫细胞往往下陷,而正常苗叶片则无此特征。郭东红等则发现玻璃苗顶端分生组织原基原套结构异常和细胞明显液泡化。其苗端原套除表皮层外,第三层原套细胞与基本分生组织难以区分,原套下的细胞也不能构成明显的原基,并且紧靠顶端细胞团下面的细胞内含物消失,细胞质变薄,细胞核解体。师校欣等发现苹果砧木玻璃化后,茎皮层薄壁细胞变形,排列不规则,细胞间隙大,通气组织发达,维管束呈离散分布。部分髓细胞、叶肉细胞也变形,排列零乱。像长期处于淹水状态下的水生植物。这些形态解剖学特点的深入研究,不仅使从形态上判定玻璃苗更为准确,还使从细胞学水平上判定早期未发生形态变化的玻璃苗成为可能。

## 2 玻璃苗生理生化变化

玻璃苗的干物重、叶绿素含量、蛋白质含量下降,且生根性能极差。与木质素合成有关的羟基肉桂酸、COA连接酶和

与木质化进程有关的苯丙氨酸氨解酶的活性比正常苗低得多。玻璃苗中碱性过氧化物酶同工酶活性上升,而酸性过氧化物酶同工酶活性下降。此外,可溶性酚含量发生明显变化。

玻璃苗中元素含量变化较为复杂。丝石竹玻璃苗叶片中P、Fe、Cu、Mn、Co等元素含量比正常苗低,K、Ca则较高。而保卫细胞中P含量比正常苗高。李云等发现珠美海棠玻璃苗中元素含量低于正常苗的有16种。包括Cl、Au、Na、Mo、Sb、Mn、I、K、Fe、As、Zn、Ca、Mg、Co、Al、Br,其含量是正常苗相应元素含量的31%~92%,元素Th和La(镧)高于正常苗含量。值得注意的是各元素在玻璃苗某些部位的分布与总体趋势并不一致。

在玻璃苗中,纤维素及木质素含量下降,珠美海棠玻璃苗中二者合成的速度比正常苗降低10.38%,降解的速度反而增加18.70%,造成玻璃苗中纤维素和木质素含量下降43.68%,而且在去茎基段、茎尖端、去叶茎和叶片等部位中均低于正常苗<sup>[1]</sup>。

牛自勉等<sup>[2]</sup>用HPLC(高效液相层析)方法测定苹果砧木茎尖培养苗玻璃化过程中内源激素的变化,结果表明,玻璃化苗叶片及茎尖中GA<sub>3</sub>、IAA、ABA含量极显著降低,同时CTK含量显著上升,但在茎叶极度玻璃化时,CTK含量显著下降。他们认为GA<sub>3</sub>/CTK、IAA/CTA比值大于10时茎叶正常,比值2~5是玻璃化的临界值。

玻璃苗的这些生理生化变化,为探讨控制玻璃苗发生的措施和研究玻璃苗的发生机理提供了极有价值的参考。

## 3 影响玻璃苗发生的因素

### 3.1 材料

培养材料种类和外殖体类型及大小显著影响着玻璃苗的发生。当外殖体越幼小,玻璃苗发生概率越大。这可能是外殖体的较老组织中含有防止玻璃苗产生的物质,或者是较大外殖体的分生组织远离培养基表面,而使其生长环境的水分状况得到改善。周菊华<sup>[3]</sup>发现瑞香外殖体取材部位显著影响玻璃苗发生频率,对枝条而言,取芽和茎基之间的中段茎作外殖体易发生玻璃化现象。张翠玉等则根据月季不同品种在不同BA浓度下玻璃化程度,将10种月季分为易、较易和不易玻璃化3类。

### 3.2 培养的环境条件

试管苗培养过程中,光照、温度、湿度、pH值均间接影响着玻璃化的发生<sup>[4,9]</sup>。肖玉兰等<sup>[7]</sup>研究发现,光照强度在10 000~20 000 lx(勒克斯)范围内,随着光照强度提高,玻璃苗显著减少。培养温度相对降低或用40℃热击处理<sup>[3]</sup>,pH

收稿日期: 2002-12-17

值 7.0 培养, 均可消除玻璃化现象。相对湿度降低也可有效防止玻璃苗发生。

### 3.3 培养基成分

研究表明, MS 培养基是控制玻璃化发生的较理想的培养基。培养基中增加 K、P、Fe、Cu、Mn、Zn 元素的含量, 降低 B 含量, 增加硝态氮, 降低铵态氮, 均可避免玻璃苗发生。

### 3.4 琼脂种类和浓度

琼脂作为一种中性支撑物, 在植物组培中已成为公认的事实。但许多研究表明, 琼脂是形成玻璃苗的重要影响因素。戴桂林等发现, 由于琼脂中 Ca、N、Mg、Mn、Fe、B、Zn 等含量的差异, 导致玻璃苗发生率明显不同。可见, 并不是琼脂的物理性质, 而是其化学组成在影响玻璃苗发生。张燕玲等报道, 琼脂浓度与玻璃苗发生率呈极显著负相关( $r = -0.982$ ), 说明提高琼脂浓度是控制玻璃化的有效途径。但琼脂作为培养基的主要凝固剂, 其浓度过高, 会大大降低试管苗的繁殖系数, 且生长缓慢。

### 3.5 碳源和植物激素

糖作为碳源, 除为细胞提供合成新化合物的碳骨架的来源外, 还可以维持一定的渗透压。在 MS 培养基中, 糖浓度与玻璃苗发生率呈极显著负相关( $r = -1.00$ )。

关于植物外源激素, 普遍认为 BA+NAA 比 KT+IBA 易诱发玻璃苗形成, 且随着浓度升高, 玻璃化率升高。这可能是 NAA 诱导了培养物细胞分裂素的驯化, 从而导致内源细胞分裂素较高而发生。而外源赤霉素和乙烯对玻璃化的发生没有显著影响。除此之外, 一些研究者还认为内源根皮苷的含量也会影响玻璃苗的发生。

## 4 玻璃苗发生机制

玻璃苗产生机制目前尚处于探索阶段。张洪胜等研究者认为, 乙烯直接或间接地引起玻璃苗的发生, 但梁海曼等对此作了否定, 认为: ①茎尖、茎段培养时切断了与根的联系, 丧失了由根系承担的对离子选择性吸收和原来由根系供应的分裂素和脱落酸; ②茎尖、茎段培养时由碳源自养变为异养; ③培养时光照远较自然环境为弱, 这 3 种可能因素使外殖体内源激素平衡及与碳代谢有关的生物合成发生改变。并使培养容器内相对湿度过高, 从而导致玻璃化。

牛自勉等<sup>[10]</sup>研究了苹果砧苗玻璃化与内源激素的关系, 尔后又报道内源激素如 GA<sub>3</sub>、IAA 等含量降低, 使木质素、蛋白质、核酸等生物合成失调, 导致玻璃化发生, 李云等<sup>[11]</sup>发现玻璃苗的产生是光呼吸途径和磷酸戊糖途径(HMP)被抑制的结果。还发现 K、Ca、Mg 等 10 余种元素含量不足, 造成酶活性降低, 光合能力和生长水平下降, 电子传递或 H<sup>+</sup> 的转移受阻, 因而使木质素和细胞壁形成受到影响, 出现玻璃化<sup>[1]</sup>。

苯丙氨酸氨解酶是木质素合成有关的酶, 玻璃苗的苯丙氨酸氨解酶活性比正常苗低, 意味着木质素含量降低, 木质化程度也就降低引起玻璃化的发生; 不同植物玻璃苗与正常苗过氧化物酶活性的变化较为复杂, Keviers (1984) 研究表明: 在 11 种植物测定中, 有 9 种植物的过氧化物酶活性都较正常苗高。Daguin 和 Letouze 等 (1986) 报道玻璃苗过氧化物酶活性较正常苗低。过氧化物酶同工酶谱观察表明, 玻璃苗的碱性过氧化物酶活性增加, 而酸性过氧化物酶活性降低。碱性过氧化物酶同工酶具有 IAA 氧化酶的功能, 并反映了内源 IAA

水平。此外, 罗紫娟等 (1986) 研究表明: 中性过氧化物酶谱带的出现, 反映了内源细胞分裂素水平升高, 所以, 试管苗内源生长素水平下降和内源细胞分裂素水平上升就可能易于出现玻璃化。同时, 酸性过氧化物酶存在于细胞壁中, 碱性过氧化物酶位于液泡中。细胞壁中的酸性过氧化物酶可催化酚类以及木质素、蛋白质、半纤维素的交联, 诱导细胞壁的生物合成, 参与木质化过程。所以碱性过氧化物酶活性增强, 酸性过氧化物酶活性减弱, 易于诱导玻璃化。

Miller 等报道乙烯前体 ACC 和乙烯利可促进莴苣愈伤组织部分木质化, 张昆瑜等发现在烟草愈伤组织分化时, ACC 可促进过氧化物酶和苯丙氨酸裂解酶的活性, 加强磷酸戊糖途径和抗氰交替途径, 前两个酶是促进木质素合成和细胞壁形成的关键酶, 磷酸戊糖途径与叶绿素前体的合成有关, 抗氰交替途径则降低了 ATP 的合成从而抑制了过度的主动吸水, 提高了蛋白质和干物质的含量。

Phan 和 Letouze 发现苹果玻璃苗内源根皮苷含量非常低。培养基中添加这种化合物及其前体可以治愈玻璃苗。Phan 和 Hegedus 认为苹果试管苗内源根皮苷含量与其酶活性呈正相关。在培养基中加入根皮苷可使酶活性增加; 诱导生根也可使酶活性增加。将玻璃苗进行冷处理 (4℃) 能使内源根皮苷含量、蛋白质含量以及一些酶活性增加。

这些研究各自阐述了玻璃化产生机理的不同侧面。结合我们的研究将其机理概括为: 离体培养过程中培养基与外殖体的水势梯度过大, 造成水分失调, 逆境乙烯, 因此而形成并打破内源激素的平衡, 造成某些代谢过程受阻, 代谢过程受阻又反过来抑制离子的吸收, 从而加重生理失调。这一系列犹如链式反应, 是连续和循环的过程, 这样就导致玻璃化。当然, 这当中任何一个环节失调都可能引起玻璃化现象的发生。

## 5 防止玻璃苗发生的途径

随着玻璃化产生机理研究的深入, 某些植物的玻璃化已得到了有效的控制。在控制玻璃苗发生时, 大多研究者均采用如下措施: ①选不易玻璃化的基因型及部位做外殖体。②用棉塞代替聚乙烯塑料薄膜作为封口材料, 利用固体培养基, 增加琼脂浓度, 从根本上降低培养基中的水势。陈龙清、杨俊英用棉塞封口, 李瑶采用通风方法, 均有效地降低了玻璃苗的发生频率。③选择适宜的糖源及外源激素的种类和浓度。并注意生长素与分裂素的配合, 尽量兼顾繁殖系数。④用光照培养, 适当提高光照强度。⑤降低培养基中 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 的浓度, 并及时转移, 以免氨累积。适当提高培养基中无机盐含量。⑥添加有机物, 如黄荣韶等<sup>[12]</sup>在培养基中添加青霉素 60 mg/L (毫克/升) 和氯化胆碱, 有效地抑制了玻璃苗形成。⑦添加植物激素合成前体如 ACC 等。这些措施在我们防止芦荟玻璃化时均有效, 但由于个体差异, 并不一定对所有物种都有效, 所以在应用时应加以选择。

## 6 展望

近年来, 国内对玻璃化现象研究愈来愈深入。在研究报道中, 虽有材料的个体差异, 但大多能得到相似的结果, 可以说在某些问题上已达成共识, 更重要的是解决了许多难点。例如, 已证实玻璃化现象只是植株的一种表型特征, 其玻璃化的组织器官在一定条件下仍可“恢复”。柴明良、高国训等<sup>[13]</sup>均将玻璃化苗逆转为正常植株, 说明玻璃化并不能遗传。另

外,叶绿素、蛋白质、木质素、酚、乙烯及各种酶活性变化在玻璃苗形成过程中的作用已基本弄清。因此,在植物生理学、生物化学、组织培养学等多学科的合作下,将会为玻璃苗形成机理、普遍使用且经济有效的预防性措施及玻璃苗逆转等研究提供更有力的证据,使人们的应用组培技术中更为得心应手。

由于植物组织培养是遗传工程必不可少的操作系统,是工厂化育苗及获得某些次生物代谢的重要手段。因此,玻璃化现象的研究具有巨大的应用潜力,它使遗传转化中转基因植株的获得更为容易,可缩小试验规模,节省经费开支。另外,防止产生玻璃苗,可使再生植株的遗传稳定性增加,克服由于玻璃化现象对遗传平衡性的冲击而产生的障碍,还利于无性系的保存,为工厂化育苗提供了有效的手段。在进行次生代谢物生产时,防止玻璃苗产生不仅提高了产量,还可消除细胞中的有毒物质。这一切均显示了其广阔的应用前景。

参考文献

[1] 李云,田砚亭,罗晓芳.玻璃苗中纤维素、木质素及元素含量变化的研究[J].核农学报,1997,11(1):103-111.  
[2] 牛自勉,王贤萍,戴桂林等.苹果砧木玻璃化过程中内源激素的含量变化[J].华北农学报,1995,10(3):15-19.  
[3] 周菊华,林证明,梁海曼.控制瑞香试管苗玻璃化的研究[J].园艺学报,1990,17(3):229-232.  
[4] 刘非燕,郭达初.重瓣丝石竹试管苗玻璃化发生原因初探[J].杭州大学学报,1996,23(4):382-387.

[5] 陈国菊,雷建军.芥菜试管苗玻璃化的控制[J].西南农业大学学报,1992,14(3):253-256.  
[6] 高遐红,李梅,张挂凤.苹果砧木试管苗发生玻璃化的因素及预防[J].北京农学院学报,1997,12(2):16-19.  
[7] 肖玉兰,仇明华,周永和.克服香石竹试管苗玻璃化现象的研究[J].云南农业大学学报,1997,12(3):188-193.  
[8] 赵军良,李昌华,李小川等.结球甘蓝组织培养再生植株及玻璃苗的防治[J].山西大学学报(自然科学版),1995,18(1):52-58.  
[9] 杨俊英.大蒜离体培养中玻璃化的研究[C].西南农业大学园艺系1998届硕士论文.  
[10] 牛自勉,王贤萍,许月明等.苹果砧木茎尖培养玻璃化与内源激素的关系[J].园艺学报,1994,21(4):396-397.  
[11] 李云,田砚亭,罗晓芳.珠美海棠试管苗玻璃化发生机理的初步研究[J].北京林业大学学报,1996,18(1):53-57.  
[12] 黄荣韶,覃伟.无籽西瓜离体培养中玻璃化现象的研究[J].广西农业大学学报,1998,9(3):266-270.  
[13] 高国训,李光晨,张潞生.逆转苹果试管苗玻璃化的研究[J].华北农学报,1997,12(专集):48-51.  
[14] 丰锋,李洪波,谢建英.芦荟组织培养中试管苗玻璃化的发生与防止.西南农业大学学报,2001,23(5):449-451.  
[15] 丰锋,李洪波,吕庆芳.芦荟的组织培养[J].西南农业大学学报,2000,22(2):157-159.  
[16] 周根余等.芦荟的快速繁殖[J].园艺学报,1999,26(6):410-411.

强力酵素有机肥在蔬菜上的应用

徐 斌,范玉波

1 试验目的

合理使用肥料是无公害蔬菜生产技术中的重要环节,强力酵素有机颗粒肥料采用有机农产品副产物和矿化物,经过复合酶高温催化发酵制成的一种生产绿色食品的专用肥料,为了验证强力酵素有机颗粒肥料增产效果,特做本试验。

2 材料与方法

2.1 供试材料

由哈尔滨市土肥处提供的强力酵素有机颗粒肥和粉剂两种。

2.2 试验设计

在大棚保护地中进行,采用大区对比法,不设重复。对照以常规施肥为准。强力酵素颗粒用量 40 kg/667 m<sup>2</sup>(公斤/平方米),粉剂用量 400 kg/667 m<sup>2</sup>(公斤/平方米),施肥方法于定植前沟施 15 cm(厘米)。颗粒肥处理面积为 158 m<sup>2</sup>(平方米),粉剂为 216 m<sup>2</sup>(平方米),对照为 293 m<sup>2</sup>(平方米),共计 3 个区。

2.3 试验地基本情况

表 1 试验基本情况调查						
项目	播种期	定植期	开花期	坐果期	始收期	终收期
处理						
颗粒肥	3月2日	4月26日	4月24日	4月28日	5月13日	7月8日
粉剂	3月2日	4月26日	4月24日	4月28日	5月13日	7月8日
CK	3月2日	4月26日	4月26日	4月30日	5月13日	7月8日

试验地在幸福乡光明村前茬柿子,供试品种山东密刺,株行距为 30 cm×70 cm(厘米),保苗 3 180 株。

3 结果与分析

从表 1 中看出用强力酵素有机颗粒肥处理的黄瓜秧苗较对照提前 2 d(天)开花结果。

表 2 田间生育性状调查						
项目	株高	株幅	叶片数	节间长	第三叶面积	单株坐果
处理	cm	cm	个	cm	cm	个
颗粒剂	70.4	48.4	8.7	8.28	19.5×14.0	12.3
粉剂	69.3	47.5	8.5	8.15	19.6×13.9	11.9
CK	66.0	46.9	8.2	8.04	19.4×13.6	10.9

从表 2 中看出,用强力酵素有机颗粒肥处理的黄瓜秧苗,无论是颗粒剂还是粉剂,各项指标都高于对照区,表现出苗高苗壮,为增产奠定了良好的基础。

表 3 强力酵素有机颗粒肥对黄瓜产量影响				
项目	小区面积	平方米产量	折合 667 m <sup>2</sup> 产量	增长率
处理	cm <sup>2</sup>	kg	kg	%
颗粒肥	158	8.99	5996.33	23.8
粉剂	216	8.44	5629.48	16.3
CK	293	7.26	4842.42	

从表 3 中看出颗粒剂较对照增产 1 153.91 kg(公斤),增产 23.8%,粉剂较对照增产 787.06 kg(公斤),增产 16.3%,颗粒剂增产效果好于粉剂,从田间观察来看颗粒剂比粉剂后劲大些。

4 结语

用强力酵素有机颗粒肥处理的黄瓜表现出苗高苗壮,能够调解营养生产和生殖生长,抗病效果较好,可以在生产中推广使用。

(哈尔滨市香坊区农林水务局, 150036)