

太白山地区常夏石竹再生植株玻璃化防止研究

袁云香^{1,2}

(1. 渭南师范学院 化学与生命科学学院, 陕西 渭南 714099; 2. 陕西省多河流湿地生态环境重点实验室, 陕西 渭南 714099)

摘 要:在已建立的常夏石竹愈伤组织再分化的基础上,以常夏石竹愈伤组织再生植株为试材,研究不同浓度 6-BA、不同浓度糖和琼脂、培养基中附加不同浓度 PVP 和 AgNO_3 等因素对常夏石竹愈伤组织再生植株玻璃化现象的影响。结果表明:以 MS 为基本培养基,附加 0.3 mg/L 6-BA、50.0 g/L 蔗糖、10.0 g/L 琼脂、30.0 g/L PVP 和 1.0 mg/L AgNO_3 能有效地降低常夏石竹试管苗玻璃化。

关键词:常夏石竹;组织培养;玻璃化

中图分类号:S 681.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)20-0111-04

常夏石竹(*Dianthus plumarius* L.)属石竹科石竹属多年生草本植物,原产西伯利亚、奥地利的高寒地区,具有较强的抗干耐旱能力,能够适应我国华北、东北、西北寒冷及高寒等地。组织培养技术克服了常夏石竹传统繁殖方式速度慢、繁殖量小的缺点,但常夏石竹在快繁过程中容易出现试管苗玻璃化现象。它是植物组织培养中经常出现的一种畸形苗,不易生根、继代,最终导致苗的死亡。如何有效地防止试管苗玻璃化,提高常夏石竹试管苗的数量及质量,建立完善的组织培养快繁体系,对常夏石竹栽培应用具有重要的现实意义。目前,仅有关于常夏石竹的再生研究报道,与其同属的其它种植物的玻璃化防止已有研究报道,如香石竹^[1-10],而有关常夏石竹的玻璃化防止研究至今尚鲜见报道。该研究以太白山地区常夏石竹健壮组培苗为试验材料,在已筛选的最适再分化的基础上,探讨不同浓度 6-BA、不同浓度糖和琼脂、培养基中附加不同浓度聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和 AgNO_3 等因素对常夏石竹愈伤组织再生植株玻璃化现象的影响,以期大量繁殖健壮的常夏石竹试管苗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为太白山地区常夏石竹健壮的愈伤组织

作者简介:袁云香(1980-),女,江西抚州人,硕士,副教授,研究方向为植物分子遗传学。E-mail:yuanyunxiang2006@126.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31000410);陕西省教育厅 2012 年度科学研究计划资助项目(12JK0832);渭南市基础研究计划资助项目(2012JCYY-8);渭南师范学院教育教学改革资助项目(JG201357);渭南师范学院校级理工类科研资助项目(14YKS003)。

收稿日期:2014-06-24

再生植株。

1.2 试验方法

1.2.1 培养条件 取生长状态良好的太白山常夏石竹再生植株进行继代试验,以 MS 为基本培养基,pH 5.8,每瓶接种 5 株苗,每个处理接种 30 株,培养条件为温度 $(22\pm 1)^\circ\text{C}$,光照强度为 1 500~2 000 lx,每天光照时间 12 h。通过 5 个单因素试验对常夏石竹的玻璃化现象进行研究,密切观察再生植株的生长情况,25 d 后统计玻璃化率,每个试验 3 次重复。

1.2.2 不同 6-BA 浓度对组培苗玻璃化的影响 以 MS+0.1 mg/L NAA+30.0 g/L 蔗糖+8.0 g/L 琼脂为基本培养基,添加 6-BA 浓度分别为 0.1、0.3、0.5、1.0、1.2、1.5 mg/L,细致观察 6-BA 浓度对常夏石竹再生植株玻璃化的影响。

1.2.3 不同浓度琼脂对组培苗玻璃化的影响 以 MS+0.3 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+30.0 g/L 蔗糖为基本培养基,附加琼脂浓度分别为 6.0、8.0、10.0、12.0 g/L,比较不同浓度的琼脂对常夏石竹试管苗玻璃化的影响。

1.2.4 不同蔗糖浓度对组培苗玻璃化的影响 以 MS+0.3 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+10.0 g/L 琼脂为基本培养基,添加浓度分别为 10.0、30.0、50.0、70.0 g/L 蔗糖,比较不同浓度蔗糖对常夏石竹试管苗玻璃化的影响。

1.2.5 不同 PVP 对组培苗玻璃化的影响 以 MS+0.3 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+50.0 g/L 蔗糖+10.0 g/L 琼脂为基本培养基,附加 PVP 浓度分别为 10.0、20.0、30.0、40.0 g/L,比较不同浓度的 PVP 对常夏石竹试管苗玻璃化的影响。

1.2.6 不同 AgNO_3 对组培苗玻璃化的影响 以 MS+

0.3 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+50.0 g/L 蔗糖+10.0 g/L 琼脂+30.0 g/L PVP 为基本培养基,设置 AgNO₃ 水平分别为 0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L,观察 AgNO₃ 对常夏石竹试管苗玻璃化的影响。增殖系数=增殖芽数/接种苗数;玻璃化率(%)=(玻璃化苗数/总苗数)×100%。

2 结果与分析

2.1 不同 6-BA 浓度对常夏石竹愈伤组织诱导的影响

6-BA 在常夏石竹试管苗继代过程中起着极重要的作用,它能促进细胞分裂,促进侧芽萌发生长,有利于形

成丛生芽并增殖(图 1、2)。从表 1 可以看出,随着 6-BA 浓度与试管苗增殖系数的增加,玻璃苗率也随之呈上升趋势。6-BA 浓度为 0.3 mg/L 时,增殖系数为 5.3,玻璃化率 13.3%。试管苗的生长状态表现较好,叶片深绿,茎秆较健壮。6-BA 达 1.0 mg/L 时,试管苗增殖增多,玻璃化率达到 21.8%;当 6-BA 为 1.5 mg/L 时,虽然芽分化较多,但玻璃化率最高达 31.9%。此时试管苗表现为叶片色泽较淡,甚至失绿泛白,呈透明状(图 3、4)。因此,综合考虑增殖系数和玻璃化率,适宜常夏石竹试管苗增殖的 6-BA 浓度为 0.3 mg/L。

表 1 不同 6-BA 浓度对常夏石竹再生植株玻璃化的影响
Table 1 Effect of different concentrations of 6-BA on vitrification of plant regeneration of *Dianthus plumarius* L.

6-BA 浓度 Concentration of 6-BA/(mg · L ⁻¹)	接种苗数 Inoculation number	增殖芽数 Propagation buds number	增殖系数 Propagation coefficient	玻璃化苗数 Number of vitrification plantlets	玻璃化率 Rate of vitrification/ %
0.1	30	121	4.0	14	11.6
0.3	30	158	5.3	21	13.3
0.5	30	162	5.4	25	15.4
1.0	30	174	5.8	38	21.8
1.2	30	180	6.0	45	25.0
1.5	30	182	6.1	58	31.9



图 1 正常增殖试管苗
Fig. 1 Proliferation of normal plantlets



图 2 正常增殖试管苗
Fig. 2 Proliferation of normal plantlets



图 3 玻璃化试管苗
Fig. 3 Vitrification plantlets



图 4 玻璃化试管苗
Fig. 4 Vitrification plantlets

2.2 不同琼脂浓度对常夏石竹试管苗玻璃化的影响

琼脂是组织培养中最常用的固化剂,对培养物起支撑的作用,琼脂的浓度会影响到试管苗对水分的吸收与利用,并与玻璃苗发生关系密切。该试验发现,培养基中琼脂浓度增加,玻璃化率相应降低。当琼脂浓度为

6.0 g/L 时,培养基较软,试管苗呈水渍状,玻璃化严重;琼脂浓度提高为 8.0 g/L 时,培养基硬度适中,试管苗增长率增加,玻璃化率降低,苗长势正常;当琼脂为 10.0 g/L 时,培养基硬度增加,试管苗增长率变化不大,但玻璃化率降低明显为 11.0%,苗长势较好;而当琼脂浓度提高到

表 2 不同琼脂浓度对常夏石竹再生植株玻璃化的影响

Table 2 Effect of different concentrations of agar on vitrification of plant regeneration of *Dianthus plumarius* L.

琼脂浓度 Concentration of agar/(g · L ⁻¹)	接种苗数 Inoculation number	增殖芽数 Propagation buds number	增殖系数 Propagation coefficient	玻璃化苗数 Number of vitrification plantlets	玻璃化率 Rate of vitrification/%
6.0	30	152	5.1	32	21.1
8.0	30	158	5.3	21	13.3
10.0	30	172	5.7	19	11.0
12.0	30	148	4.9	12	8.1

12.0 g/L 时,玻璃化率虽然降低明显,降低到 8.1%,但由于琼脂浓度过高,导致培养基过硬,影响了试管苗营养物质的吸收,苗的长势较差,生长延缓,增殖系数只有 4.9。从试验结果得出,10.0 g/L 琼脂为最适的常夏石竹试管苗增殖浓度。

2.3 不同蔗糖浓度对常夏石竹组培苗玻璃化的影响

蔗糖在植物组织培养中作为碳源,为细胞提供合成新化合物的碳骨架,同时可以维持培养基的渗透压,调

节可利用水分从而达到控制水势变化的目的。适当提高培养基蔗糖的浓度,可以降低培养基的渗透势,对培养物造成水分胁迫来降低玻璃化。由表 3 可知,蔗糖浓度为 10.0~50.0 g/L 时,随着蔗糖浓度的增加,增殖系数也增加,而玻璃化系数却减小;蔗糖浓度为 50.0 g/L 时,增殖系数最大达 6.2;当蔗糖浓度达 70.0 g/L 时,玻璃化率最小为 7.1%,但增殖系数也变小。因此,蔗糖浓度为 50.0 g/L 时适宜常夏石竹再生植株增殖。

表 3 不同蔗糖浓度对常夏石竹再生植株玻璃化的影响

Table 3 Effect of different concentrations of sucrose on vitrification of plant regeneration of *Dianthus plumarius* L.

蔗糖浓度 Concentration of sucrose/(g · L ⁻¹)	接种苗数 Inoculation number	增殖芽数 Propagation buds number	增殖系数 Propagation coefficient	玻璃化苗数 Number of vitrification plantlets	玻璃化率 Rate of vitrification/%
10.0	30	155	5.2	21	13.6
30.0	30	172	5.7	19	11.0
50.0	30	186	6.2	16	8.6
70.0	30	170	5.7	12	7.1

2.4 不同 PVP 浓度对常夏石竹组培苗玻璃化的影响

聚乙烯吡咯烷酮(PVP)不但能防止褐化,而且也能抑制试管苗的玻璃化。PVP 和聚乙烯醇(PVA)都是一种水分胁迫剂,适量的浓度能改善培养基的透气性。由表 4 可知,适宜浓度的 PVP 可以抑制常夏石竹试管苗的玻璃化,当 PVP 浓度为 30.0 g/L 时,玻璃化率明显降低为 5.9%,增殖系数最高达 6.8;随着 PVP 浓度增加到

40.0 g/L 时,试管苗生长态势呈下降趋势。这可能是由于高浓度的 PVP 吸收了培养基中的植物生长添加剂的缘故。综合考虑试验结果,PVP 浓度为 30.0 g/L 时有利于常夏石竹试管苗增殖及玻璃化防止。戴丽娜等^[11]研究薰衣草组培苗玻璃化逆转时发现,PVP 浓度对组培苗玻璃化逆转效果极显著,该试验与其结果较一致。

表 4 不同 PVP 浓度对常夏石竹再生植株玻璃化的影响

Table 4 Effect of different concentrations of PVP on vitrification of plant regeneration of *Dianthus plumarius* L.

PVP 浓度 Concentration of PVP/(g · L ⁻¹)	接种苗数 Inoculation number	增殖芽数 Propagation buds number	增殖系数 Propagation coefficient	玻璃化苗数 Number of vitrification plantlets	玻璃化率 Rate of vitrification/%
10.0	30	188	6.3	16	8.5
20.0	30	194	6.5	14	7.2
30.0	30	203	6.8	12	5.9
40.0	30	185	6.2	10	5.4

2.5 不同 AgNO₃ 浓度对常夏石竹组培苗玻璃化的影响

AgNO₃ 作为乙烯合成的抑制剂,可有效地防止植物细胞在离体培养中乙烯的积累对外植体生长和不定芽分化的影响,能有效地防止外植体褐化。在植物离体培养时培养基中添加 AgNO₃ 可以明显促进器官发生、体细胞胚胎形成和离体植株的再生^[12]。试验中添加不同浓度的 AgNO₃,发现较低浓度的 AgNO₃ 能有效地抑制试管苗玻璃化的发生,随着 AgNO₃ 浓度的增加而玻璃化率降低,增殖系数变化不明显。当 AgNO₃ 浓度为

1.0 mg/L 时,增殖系数为 6.8,玻璃化率降低到 4.9%;AgNO₃ 浓度增加到 1.5~2.0 mg/L 时,虽然玻璃化率降低明显,但不利于试管苗的生长,增殖系数却降低到 5.5,可能是与过高浓度的银离子对植株造成了伤害有关。因此,在常夏石竹试管苗增殖时附加 1.0 mg/L 的 AgNO₃,在保证增殖系数的同时能有效地降低玻璃化率。

3 讨论

玻璃化现象是影响植物组织培养成败的三大难题之一,克服玻璃化现象可以提高组培苗的产量和质量,

表 5

不同 AgNO_3 浓度对常夏石竹再生植株玻璃化的影响Table 5 Effect of different concentrations of AgNO_3 on vitrification of plant regeneration of *Dianthus plumarius* L.

AgNO_3 浓度 Concentration of $\text{AgNO}_3 / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	接种苗数 Inoculation number	增殖芽数 Propagation buds number	增殖系数 Propagation coefficient	玻璃化苗数 Number of vitrification plantlets	玻璃化率 Rate of vitrification/ %
0.5	30	202	6.7	11	5.4
1.0	30	205	6.8	10	4.9
1.5	30	188	6.3	8	4.3
2.0	30	165	5.5	7	4.2

使植物组织培养发挥更广阔的应用前景。玻璃化现象的产生与多种因素有关,如植物激素、琼脂与糖的用量、各种附加物质、培养温度、光照及通风条件等^[13-14]。程云清等^[10]研究中国石竹快繁时发现,玻璃化苗发生率随着 6-BA 浓度的增加而加大,培养基中的琼脂浓度与蔗糖浓度分别增加至 8 g/L 和 40 g/L 时,可有效降低玻璃化苗发生率。廖晴等^[15]研究樱桃砧木吉赛拉快繁时发现,适宜的 6-BA、蔗糖及琼脂浓度能有效地防止玻璃化。戴丽娜等^[11]研究薰衣草组培苗玻璃化逆转时发现,PVP 对组培苗玻璃化逆转效果极显著,不同浓度 6-BA 和 KT 对于玻璃化苗的逆转均有显著影响,而 MS 大量元素、蔗糖和活性炭不显著。朱新霞等^[16]研究表明,培养基中的 6-BA 浓度偏高、琼脂浓度偏低以及蔗糖浓度偏低或偏高等可导致玻璃化苗的增加。秦永华等^[12]研究 AgNO_3 对草莓试管苗抗氧化酶活性的影响,发现根系含水量则随着 AgNO_3 浓度的增加逐渐降低。叶片中抗氧化酶活性随着 AgNO_3 浓度的增加而增加。该研究发现,在培养基中添加 0.3 mg/L 6-BA、50.0 g/L 蔗糖、10.0 g/L 琼脂、30.0 g/L PVP 和 1.0 mg/L AgNO_3 能有效控制太白山常夏石竹再生植株玻璃化现象,提高试管苗增长率,减少玻璃化苗的发生,为常夏石竹试管苗大规模繁殖提供依据,而关于试管苗玻璃化发生的具体机制,目前尚无一致定论,还有待于更深入地研究。

参考文献

[1] 胡庆阳,于志华,郑宏红,等. 温度对香石竹组织培养及其试管苗玻璃化的影响[J]. 应用基础与工程科学学报,1996,4(3):303-306.

- [2] 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.
- [3] 叶祖云,陈爱萍. 几种因子对香石竹组培玻璃苗形成的影响[J]. 宁德师专学报(自然科学版),1998,10(4):286-288.
- [4] 高疆生,张卫芳,段黄金,等. 克服香石竹试管苗玻璃化研究[J]. 北方园艺,2001(3):34-36.
- [5] 廖飞雄,王代容,徐维杰,等. 香石竹试管苗培养性状及与玻璃化发生关系分析[J]. 江西农业大学学报,2005,27(6):836-838.
- [6] 赵艳岭,刘志强,邢红华,等. 克服香石竹组织培养中玻璃苗的研究[J]. 河南科学,2005,23(5):689-691.
- [7] 黄宇翔,李章汀,张晓耕. 香石竹茎尖试管苗继代培养玻璃化现象的研究[J]. 中国农学通报,2005,21(3):81-83,171.
- [8] 黄宇翔,吴祖建,柯昉,等. 组织培养技术筛选香石竹低玻璃化无性系初报[J]. 中国农学通报,2006,22(8):88-90.
- [9] 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.
- [10] 程云清,刘剑锋,刘春明,等. 中国石竹离体快繁与试管苗玻璃化研究[J]. 广西植物,2012,32(4):531-535.
- [11] 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.
- [12] 秦永华,张上隆,胡桂兵,等. AgNO_3 对草莓试管苗生长及抗氧化酶活性的影响[J]. 果树学报,2006,23(5):715-719.
- [13] 胡继金. 青霉素在香石竹组织培养中的作用[J]. 园艺学报,1991,18(1):87-90.
- [14] 李娅莉,张健,潘远智. 观赏植物组织培养过程中玻璃化现象与解决措施进展[J]. 四川农业大学学报,2004,22(3):278-282.
- [15] 廖晴,玛尔哈巴·吾斯满,王继勋. 樱桃砧木吉赛拉组培快繁生产中玻璃化及污染分析[J]. 新疆农业科学,2012,49(3):537-541.
- [16] 朱新霞,孙黎,陶春萍. 甜瓜离体再生继代培养中玻璃化现象的研究[J]. 西北植物学报,2006,26(7):1468-1472.

Study on Preventing of Vitrification of Plant Regeneration of *Dianthus plumarius* L. from Taibai Mountain

YUAN Yun-xiang^{1,2}

(1. College of Chemistry and Life Science, Weinan Teachers University, Weinan, Shaanxi 714099; 2. Key Laboratory for Eco-environment of Multi-River Wetlands in Shaanxi Province, Weinan, Shaanxi 714099)

Abstract: The shoots of *Dianthus plumarius* L. were taken as explants to study the proliferation and its vitrification. On the established regeneration medium, the different concentrations of 6-BA, sucrose, agar, PVP and AgNO_3 were supplemented to test their effects on the vitrification of *Dianthus plumarius* L. The results showed that the basic culture medium was MS containing 6-BA 0.3 mg/L, sucrose 50 g/L, agar 10.0 g/L, PVP 30 g/L and 1.0 mg/L AgNO_3 , it could effectively prevent seedling vitrification from occurring.

Keywords: *Dianthus plumarius* L.; tissue culture; vitrification