

# 不同因素对草莓试管苗玻璃化的影响

周书利<sup>1</sup>, 汤浩茹<sup>1,2</sup>, 代利娟<sup>1</sup>, 罗霞<sup>1</sup>

(1. 四川农业大学 园艺学院, 四川 雅安 625014; 2. 四川农业大学 果蔬研究所, 四川 成都 611130)

**摘 要:**以“丰香”草莓丛生芽为外植体, 采用正交实验设计, 研究了 6-BA、琼脂、铵离子不同浓度组合对草莓试管苗玻璃化的影响, 同时测定了玻璃化试管苗与正常苗的生理指标差异。结果表明: 3 种因素对草莓试管苗玻璃化均有显著影响, 影响大小依次为 6-BA > 铵离子 > 琼脂; 能有效降低试管苗玻璃化的组合为 1.0 mg/L 6-BA + 6.0 g/L 琼脂 + 1 650 mg/L 铵离子, 增殖倍数也较高; 玻璃化苗的组织含水量和膜透性较正常苗高, 可溶性糖含量则相反; 玻璃化苗的叶绿素含量较正常苗显著降低, 叶绿素 a/叶绿素 b 在正常苗与玻璃苗间无显著差异, 玻璃化苗较正常苗超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性降低, 过氧化物酶(POD)活性升高。

**关键词:**草莓试管苗; 正交设计; 玻璃化; 生理生化

**中图分类号:**S 668.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)13-0131-04

草莓(*Fragaria × ananassa* Duch)是世界上重要的水果之一。草莓的浆果不仅柔嫩多汁、酸甜可口, 而且营养丰富, 深受人们喜爱<sup>[1]</sup>。草莓传统分株繁殖的速度慢, 且易造成品种种性退化, 产量品质下降, 从而降低果实的经济价值和商品价值<sup>[2]</sup>。应用植物组织培养技术是解决这一问题的可行方法。近年来, 草莓的组织培养技术在草莓快繁、脱毒、转基因研究、育种等方面得到了广泛的应用和发展。然而, 在组培过程中常会出现试管苗玻璃化现象, 玻璃化试管苗的组织结构和生理功能异常, 移栽大田几乎不能成活<sup>[3-4]</sup>, 在一定程度上影响组培苗规模化生产及其经济价值。在草莓组培中玻璃化现象也很常见, 不同的植物引起玻璃化的主导因素不同, 张敏等<sup>[5]</sup>及曹善东<sup>[6]</sup>通过单因素试验研究表明, 培养基、培养条件等都对草莓试管苗玻璃化有影响。现以“丰香”草莓为试材, 采用正交设计方法, 对草莓试管苗玻璃化的主要影响因素进行了研究, 以筛选降低玻璃化率的培养基组合, 并通过测定玻璃化试管苗与正常试管苗的生理生化指标, 为降低草莓试管苗玻璃化率及玻璃化机理研究提供理论依据, 进而为降低组培苗的损失率、为草莓组培苗的规模化和工厂化生产提供技术参考。

**第一作者简介:**周书利(1988-), 女, 硕士, 研究方向为植物生物技术在果树上的应用。E-mail: 0616101099@163.com.

**责任作者:**汤浩茹(1963-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 现主要从事植物生物技术在果树上的应用与果树种子资源及遗传育种研究工作。E-mail: htang@sicau.edu.cn.

**收稿日期:**2013-03-07

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为“丰香”草莓试管苗, 取自四川农业大学果树生物技术组培室。取大棚中 1 a 生“丰香”草莓匍匐茎茎尖, 经诱导培养基(MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L)培养, 待分化出大量不定芽, 转至继代培养基上(MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L)扩繁, 得到草莓试管苗无性系作为试材。

### 1.2 试验方法

以 MS 为基本培养基+IBA 0.1 mg/L+蔗糖 20 g/L, 按照正交实验设计, 分别加入不同浓度组合的 6-BA、琼脂、铵离子(硝酸铵), 将增殖得到的不定芽接种于 9 个正交实验处理的 MS 培养基上。培养瓶、封口材料均相同, pH 5.8~6.0, 培养温度(25±2)℃, 光照强度 2 000~3 000 lx, 光周期 16 h/8h。培养 30 d 后, 统计草莓试管苗的玻璃化率和增殖系数。每处理重复测定 3 次, 玻璃化率=玻璃化苗数/分化苗总数×100%; 增殖系数=总分化苗数/接种苗数。

**表 1** L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交实验设计因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal table

水平	因素		
	A 6-BA/mg · L <sup>-1</sup>	B 琼脂/g · L <sup>-1</sup>	C 铵离子/mg · L <sup>-1</sup>
1	1.0	5.0	825
2	2.0	6.0	1 650
3	3.0	8.0	3 300

### 1.3 项目测定

取处理后的玻璃化苗和正常苗的叶片进行各项生理生化指标的测定。组织含水量参照熊庆娥<sup>[7]</sup>的方法, 采用干重法测定; 叶绿素含量参照许大全<sup>[8]</sup>的方法, 采

用分光光度法测定;可溶性糖含量采用蒽酮比色法<sup>[9]</sup>测定。叶片膜透性测定用 Jenco-3173 型便携式电导率仪,参照陈建勋等<sup>[10]</sup>的方法。粗酶液的提取参照邹琦<sup>[11]</sup>的方法,超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用 NBT 还原法<sup>[11]</sup>。过氧化物酶(POD)活性的测定参照李合生的方法<sup>[9]</sup>。过氧化氢酶(CAT)活性的测定参照邹琦<sup>[11]</sup>的紫外吸收法。参照张敏等<sup>[5]</sup>的方法,根据玻璃化的程度,将玻璃化苗分为:0 级:处理后的正常苗,未发生玻璃化;1 级:仅上部叶片玻璃化,茎未发生玻璃化;2 级:部分叶片和上部(小于 1/3)茎段发生玻璃化;3 级:全部叶片和茎均发生玻璃化。

#### 1.4 数据分析

试验数据采用 DPS 分析软件进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同处理对草莓试管苗玻璃化的影响

草莓试管苗在不同处理培养基上经相同条件培养 30 d 后,观察到各个处理都出现了玻璃化试管苗。由表 2 可知,处理 5 的试管苗玻璃化率最高,达 83.19%,与其它各处理差异极显著,处理 2 的试管苗玻璃化率最低,仅为 26.22%,而其增殖系数却较高。处理 4 的试管苗增殖系数最高,且与其它各处理差异极显著。3 个因素对玻璃化的影响大小依次是 6-BA>铵离子>琼脂,且差异极显著(表 3)。

表 2 不同处理对草莓试管苗玻璃化的影响

Table 2 Effect of different treatments on vitrification of strawberry plantlets

处理	因子			接种数	分化数	玻璃化苗	增殖系数	玻璃化率/%
	A	B	C	/株	/株	数/株		
1	1	5	825	30	68	35	2.27bBC	52.31bcBC
2	1	6	1 650	30	88	23	2.94bB	26.22fE
3	1	8	3 300	30	49	16	1.63cdD	32.67efDE
4	2	5	1 650	30	166	58	5.54aA	35.50efDE
5	2	6	3 300	30	42	35	1.40dD	83.19aA
6	2	8	825	30	52	20	1.73cdCD	38.33deCDE
7	3	5	3 300	30	69	31	2.30bcBCD	45.24cdBCD
8	3	6	825	30	49	29	1.62cdD	59.28bB
9	3	8	1 650	30	54	30	1.80cdCD	55.42cbB

注:数字后的小写英文字母不同表示差异显著( $P \leq 0.05$ ),大写英文字母不同表示差异极显著( $P \leq 0.01$ ),下同。

表 3 正交设计方差分析

Table 3 Analysis of orthogonal design

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值
6-BA	0.1544	2	0.0772	25.7970	0.0001
琼脂	0.1094	2	0.0547	18.2710	0.0001
铵离子	0.1108	2	0.0554	18.5161	0.0001
空白	0.3606	2	0.1803		
误差	0.0539	18	0.0030		

### 2.2 各单因素对草莓试管苗玻璃化的影响

由表 4 可知,不同 6-BA 浓度对草莓玻璃化的影响不同,其中 1.0 g/L 的 6-BA 对玻璃化的影响最小,且与

其它 2 种浓度差异显著,2.0 g/L 与 3.0 g/L 的 6-BA 对玻璃化影响严重,但二者间差异不显著,可见随着 6-BA 浓度升高玻璃化越重。随着琼脂浓度升高,玻璃化率降低,8.0 g/L 玻璃化率最低,且与 5.0 g/L 和 6.0 g/L 差异显著,后二者间差异不显著。铵离子(硝酸铵)浓度为 1 650 mg/L 时玻璃化率最低,1/2 或 2 倍铵离子浓度时其玻璃化率都升高,且差异极显著。

表 4 各单因素对草莓试管苗玻璃化的影响

Table 4 Effects of single factor on vitrification rate of strawberry

水平	玻璃化率/%		
	6-BA	琼脂	铵离子
1	36.44bB	58.89aA	49.56aA
2	51.78aA	56.00aA	38.33bB
3	53.11aA	41.44bB	53.44aA

### 2.3 玻璃苗(轻、重)与正常苗生理生化指标的差异比较

试验中将 1、2 级视为轻度玻璃化苗,3 级视为重度玻璃化苗。为了探明草莓玻璃化试管苗的生理变化,测定了处理后的 0 级玻璃化苗(处理后的正常苗)、轻度玻璃化苗、重度玻璃化苗及常规正常苗的生理生化指标,结果表明处理后的正常苗的各项指标与常规正常苗差异不显著,轻度玻璃化苗、重度玻璃化苗的生理生化指标与常规正常苗差异显著。

2.3.1 组织含水量、可溶性糖含量、膜透性的比较 由表 5 可知,玻璃化苗与常规正常苗的组织含水量差异极显著,玻璃化严重程度越深叶片组织含水量越高;处理后的正常苗较常规正常苗的组织含水量略低,差异不显著。可溶性糖含量随玻璃化的严重程度加深逐步降低,且差异显著,重度玻璃化苗的可溶性糖含量仅为 5.73%。诱导后的正常苗较常规正常苗的可溶性糖低,但并无显著差异。处理后的正常苗、轻、重度玻璃化苗及常规正常苗四者间的相对电导率呈极显著差异,玻璃化程度越高,相对电导率越大。

表 5 轻、重度玻璃化苗与正常苗组织含水量、可溶性糖、膜透性比较

Table 5 Comparison of content of tissue water, soluble sugar and membrane permeability between vitrified plantlets and normal plantlets

材料	组织含水量/%	可溶性糖含量/%	相对电导率/%
常规正常苗	54.44cC	30.17aA	31.78aA
处理后的正常苗	53.61cC	29.38aA	50.67bB
轻度玻璃化苗	63.78bB	21.58bB	60.66cC
重度玻璃化苗	73.04aA	5.73cC	75.18dD

2.3.2 叶绿素含量的比较 由表 6 可知,玻璃化苗的叶绿素含量较常规正常苗显著降低,玻璃化程度越严重其含量越低,处理后的正常苗叶绿素有所降低,与常规正常苗无明显差异。叶绿素 a/叶绿素 b 在正常苗与玻璃苗间无显著差异。

表 6 玻璃苗与正常苗叶绿素含量比较

Table 6 Comparison of chlorophyll content between vitrified plantlets and normal plantlets

材料	叶绿素 a	叶绿素 b	总叶绿素	叶绿素 a/叶绿素 b
常规正常苗	0.84aA	0.45aA	1.29aA	1.75bA
处理后的正常苗	0.81aA	0.45aA	1.26aA	1.84abA
轻度玻璃化苗	0.51bB	0.26bB	0.77bB	2.07aA
重度玻璃化苗	0.34cC	0.18bB	0.52cC	1.87abA

2.3.3 SOD、POD、CAT 活性的比较 由表 7 可知,玻璃化苗较正常苗超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性降低,且其酶活随着玻璃化程度严重而下降,差异极显著;诱导后的正常苗的 SOD 和 CAT 活性略低,与常规正常苗差异不显著。诱导后的正常苗和玻璃化苗其过氧化物酶(POD)活性较常规正常苗都升高,差异显著。

表 7 玻璃苗与正常苗及 SOD、POD、CAT 活性比较

Table 7 Comparison of activities of SOD,POD and CAT between vitrified plantlets and normal plantlets

材料	SOD 活性 /U·g <sup>-1</sup> FW	POD 活性 /U·g <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup>	CAT 活性 /U·g <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup>
常规正常苗	259.0aA	17.18cB	38.97aA
处理后的正常苗	258.5aA	19.84bB	38.57aA
轻度玻璃化苗	180.1bB	27.12aA	18.29bB
重度玻璃化苗	113.1cC	28.01aA	11.36cC

### 3 结论与讨论

试管苗玻璃化现象是植物组织培养中普遍发生的特有的一种生理性病变,草本植物更易出现玻璃化<sup>[12]</sup>。草莓属草本植物,在组织培养的过程中也常出现玻璃化现象,前人多是通过一些影响草莓组培苗玻璃化的单因子试验来研究草莓组培苗玻璃化的问题<sup>[4-5]</sup>,效果不是很理想。该试验以 6-BA、琼脂和铵离子 3 因素设计正交实验,研究了几种因素不同含量水平的组合对‘丰香’草莓试管苗玻璃化的影响。结果表明,琼脂浓度、6-BA 浓度、铵离子浓度对草莓试管苗玻璃化均有影响,细胞分裂素 6-BA 的浓度对影响草莓试管苗玻璃化的发生最为显著,其次是铵离子和琼脂。增加培养基中细胞分裂素 6-BA 的浓度,草莓试管苗的玻璃化率有明显的提高,这与李海刚等<sup>[13]</sup>对牡丹和赵佐敏<sup>[14]</sup>对非洲菊研究相似。这可能是因为细胞分裂素促进细胞的分裂,细胞大量生长,而营养元素供应不上,生长势弱,抵抗力差,而表现出玻璃化。铵离子对试管苗玻璃化也有较大影响,该试验发现,铵离子浓度为 1 650 mg/L 时试管苗的玻璃化率最低,铵离子浓度过高或过低都导致玻璃化率升高,可见随着铵离子浓度升高,玻璃化发生严重,这与李佳莹等<sup>[15]</sup>的研究相似,同时试验也发现过于降低铵离子浓度反而加重了草莓试管苗玻璃化的发生,推测这可能与盐离子供应平衡有关及不同材料有关。从该试验来看,琼

脂对试管苗玻璃化的影响不大,随着琼脂浓度升高,玻璃化率降低,但差异不显著,在琼脂用量较多的情况下,瓶内空气湿度小,试管苗玻璃化现象就少<sup>[6]</sup>。正交实验得出玻璃化率最高组合为处理 5 即 2.0 mg/L 6-BA+6 g/L 琼脂+3 300 mg/L NH<sub>4</sub><sup>+</sup>,最低组合为处理 2 即 1.0 mg/L 6-BA+6.0 g/L 琼脂+1 650 mg/L NH<sub>4</sub><sup>+</sup>,处理 2 不仅是玻璃化率较低的组合,而且还有利于增殖,为草莓组培中较佳的组合。

试验发现玻璃化苗的组织含水量与正常苗的组织含水量差异极显著,重度玻璃化苗较正常苗高出 18.6%,玻璃化苗的叶片、茎呈水渍状,与曹天旭等<sup>[16]</sup>和孙庆春等<sup>[17]</sup>的研究相似,玻璃化苗水分含量异常可能是因为植物水分代谢出现异常。玻璃化苗体内由于自由水含量及水势增高,束缚水含量降低,导致玻璃苗水分生理异常,生理代谢水平下降,所以玻璃苗的组织含水量明显高于正常。可溶性糖含量随玻璃化的严重程度逐步降低,并且差异显著,重度玻璃花苗的含量仅为 5.73%。这与周菊花等<sup>[18]</sup>在香石竹上的研究结果相反,可能玻璃化试管苗是糖代谢异常与光合作用减弱相互影响的结果。膜透性反映植物受逆境的受害程度,结果表明,玻璃化越严重,细胞膜透性越大,受伤程度越严重,细胞吸水而玻璃化。叶绿素是光能吸收和转化的原初物质,能在一定程度上反应植物的光合强弱。试验表明,玻璃化苗的叶绿素含量较正常苗显著降低,诱导后的正常苗叶绿素有所降低,但不明显。但是叶绿素 a/叶绿素 b 在正常苗与玻璃苗间无显著差异。这与曹天旭等<sup>[16]</sup>在满天星中的研究类似,然而,孙庆春等<sup>[17]</sup>在菊花玻璃苗研究时发现菊花玻璃苗叶绿素含量虽然显著低于正常苗,但玻璃苗叶绿素 a、b 的比值却低于正常苗,分别为 2.803、3.463。这可能是不同材料所致。试验表明,在同一时期,草莓玻璃化苗较正常苗超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性降低,而过氧化物酶(POD)活性升高。这与杨芸等<sup>[19]</sup>在研究外源 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 胁迫对大蒜试管苗玻璃化的影响时得出玻璃化苗的 SOD、POD、CAT 活性均升高的结论不一致,而客绍英等<sup>[20]</sup>提出在菘蓝组培苗培养过程中 SOD、POD、CAT 变化不一致,随着培养时间的延长,正常苗与玻璃苗中 SOD 活性均呈现上升的趋势;POD 活性先降低后迅速升高,而 CAT 活性则呈现先升高后降低的趋势。这可能是由于不同植物玻璃苗的过氧化物酶总活性的变化趋势完全不同。由于不同植物玻璃苗的过氧化物酶总活性的变化趋势完全不同。王继芳等<sup>[21]</sup>认为,过量外源激素破坏植物体内过氧化保护酶系统的平衡(即 SOD、CAT 和 POD 三者的活性不协调),这说明环境的胁迫可能诱导了自由基较多的产生,SOD 同工酶效能的降低又导致过氧化物得不到及时清除。活性氧自由基的积累,使得膜



脂不饱和脂肪酸的过氧化增强,使之形成更多过氧化产物,如MDA等,而MDA是一种能强烈地与细胞内各种成分发生反应的物质,因而会引起酶和膜的严重破坏,使膜失去正常膨压,组织吸水失控,便产生了玻璃苗的肿胀现象。

近年来,国内对玻璃化现象研究越来越深入。从已有研究报道中了解到许多难题已经基本上得到解决,目前也有研究表明玻璃化苗在一定程度上及一定条件下仍可恢复。但是如果能从试管苗的增殖培养的培养条件就开始注意,尽量选择能避免或较少引起玻璃化并且同时不影响试管苗增殖的培养条件的话,也可以说是从根本减少组培中的这一不利因素,减少人力、物力、财力的极大浪费。因该试验因素所限,要较彻底的解决这一问题,尚需进行多方面的深入研究。

### 参考文献

- [1] 万清林,赵书清.草莓果实营养成分的分析[J].北方园艺,1994(6):34-35.
- [2] 郭月玲,解振强,王永平.我国草莓组织培养生产研究现状及前景[J].浙江农业科学,2010(6):1211-1215.
- [3] 李胜,李唯,杨德龙,等.植物试管苗玻璃化现象研究进展[J].甘肃农业大学学报,2002,3(1):1-6.
- [4] 杨俊英,罗庆熙,宋明,等.大蒜试管苗玻璃化机理的研究[J].西南农业学报,2005,18(6):801-805.
- [5] 张敏,张曙光.对影响草莓组培苗玻璃化若干因素的探讨[J].湖北农业科学,2002(6):82-83.
- [6] 曹善东.组培条件对草莓脱毒试管苗玻璃化影响的研究[J].山东农业大学学报(自然科学版),2006,37(2):172-174.
- [7] 熊庆娥.植物生理学实验教程[M].成都:四川科学技术出版社,2003:19-20.
- [8] 许大全.叶绿素含量的测定及其应用中的几个问题[J].植物生理学通讯,2009,45(9):896-898.
- [9] 李合生,孙群,赵世杰,等.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2000:195-197.
- [10] 陈建勋,王晓峰.植物生理学实验指导[M].2版.广州:华南理工大学出版社,2006:64-66.
- [11] 邹琦.植物生理学实验指导[M].北京:中国农业出版社,2000:163-165,168-169.
- [12] 陈兵先,黄宝灵,吕成群,等.植物组织培养试管苗玻璃化现象研究进展[J].林业科技开发,2011,25(1):1-5.
- [13] 李海刚,孔祥生.牡丹试管苗玻璃化的研究[J].生物学杂志,2010,27(5):35-42.
- [14] 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.
- [15] 李佳莹,俞明亮,马瑞娟,等.桃组织培养中影响玻璃化产生的因素分析[J].江苏农业科学,2009(5):47-49.
- [16] 曹天旭,朴炫春,廉美兰,等.满天星试管苗玻璃化苗与正常苗的比较研究[J].黑龙江农业科学,2009(5):86-88.
- [17] 孙庆春,郑成淑,丰震.菊花玻璃化苗与正常苗的生理特征比较[J].山东农业科学,2009(5):45-47.
- [18] 周菊花,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.
- [19] 杨芸,吴震,李翠花,等.外源H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>胁迫对大蒜试管苗玻璃化的影响[J].西北植物学报,2007,27(8):1637-1642.
- [20] 客绍英,张胜珍,刘玉军.松蓝试管苗玻璃化过程中抗氧化酶活性的变化[J].华北农学报,2009,24(3):154-158.
- [21] 王继芳,李锡香,贾春兰.丝石竹玻璃苗生理特性和形成机理初探[J].农业生物技术学报,1997(1):72-78.

## Effects of Different Factors on Vitrification of Strawberry Shoots

ZHOU Shu-li<sup>1</sup>, TANG Hao-ru<sup>1,2</sup>, DAI Li-juan<sup>1</sup>, LUO Xia<sup>1</sup>

(1. College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014; 2. Institute of Pomology and Olericulture, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130)

**Abstract:** Taking 'Toyonoka' strawberry bud as explants, by method of orthogonal design, different combinations of 6-BA, agar, ammonium ion (ammonium chloride) were added to subculture medium of strawberry, the effects on vitrification of strawberry shoots were studied. Meanwhile, physiological and biochemical indexes between vitrification shoots and normal plantlets were determined and compared. The results showed that there were significant differences in the vitrification rate of shoots among 9 treatments. Analysis of variance showed that 6-BA was the most significant impactor on strawberry vitrification, the second was ammonium ion, and agar affected least. The optimum one was 1.0 g/L 6-BA + 6.0 g/L agar + 1 650 mg/L ammonium ion and the vitrification rate only was 26.22%, with higher proliferation ratio. Organization moisture content and membrane permeability of vitrification shoots were higher than normal plantlets, soluble sugar on the contrary. Chlorophyll content of vitrification shoots was significantly lower than normal plantlets, but there had no significant differences of Chla/Chlb between normal plantlets and vitrification shoots. Oxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity of vitrification shoots were reduced compared with normal plantlets, while peroxidase (POD) activity increased.

**Key words:** strawberry shoot; orthogonal design; vitrification; physiology and biochemistry