

枸杞试管苗玻璃化影响因素的研究

卢兴霞, 柴慈江, 张 婷, 史燕山, 骆建霞

(天津农学院 园艺园林学院, 天津 300384)

摘 要:以枸杞试管苗为试材, 分别研究了不同的培养瓶封口物、不同 6-BA 浓度(0~0.90 mg/L)、不同琼脂浓度(6.5~8.5 g/L)及不同培养温度对枸杞试管苗玻璃化的影响。结果表明:当 6-BA 浓度为 0.30 mg/L、琼脂浓度为 6.5 g/L、培养温度 23~24℃, 以棉塞或封口膜封口时, 枸杞试管苗玻璃化率较低, 繁殖系数较高。

关键词:枸杞; 组织培养; 玻璃化

中图分类号:Q 949 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)18-0103-04

枸杞(*Cotoneaster hjelmqvistii* Flinck and Turcz)是近年从英国爱丁堡皇家植物园引进的一个枸杞新种, 匍匐生长, 小叶亮绿, 落叶前变为红色, 枝叶密集, 花粉色, 果红色, 是一种观花、观叶、观枝、观果的优良地被植物, 并具有较强的耐寒及耐盐碱能力, 适合天津地区推广应用。为加快其苗木繁殖, 课题组开展了相关的组织培养快繁技术的研究^[1]。但是, 在枸杞组培快繁中存在着试管苗的玻璃化现象, 影响繁殖率的提高。该试验以枸杞试管苗为试材, 对枸杞试管苗玻璃化的影响因素进行探讨, 以期减少枸杞试管苗玻璃化发生提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以在 MS 培养基上(附加 0.75 mg/L 6-BA 和 3%蔗糖)进行 3 次继代培养的枸杞试管苗为试材。

1.2 试验方法

1.2.1 不同的培养瓶封口物对枸杞试管苗玻璃化的影响 以 MS 为基础培养基, 附加 0.75 mg/L 6-BA、30 g/L 蔗糖和 7 g/L 琼脂。常规灭菌后分装到培养瓶中, 并根据不同培养瓶用不同的封口物封口(表 1)。

1.2.2 不同浓度 6-BA 对枸杞试管苗玻璃化的影响 以 MS 为基础培养基, 附加蔗糖 30 g/L、琼脂 7 g/L 和 6-BA(0、0.30、0.60、0.75、0.90 mg/L)共 5 个处理。

表 1 培养瓶与封口物不同的组合方式

Table 1 Combination of the vessel and covering

培养瓶 The vessel	封口物 Covering
100 mL 三角瓶	棉塞
150 mL 三角瓶	1 层硫酸纸+1 层牛皮纸
150 mL 三角瓶	2 层牛皮纸
150 mL 三角瓶	封口膜(北京振泰出品, 下同)
150 mL 三角瓶	1 层封口膜+1 层牛皮纸
200 mL 大口瓶	塑料盖

1.2.3 琼脂浓度对枸杞试管苗玻璃化的影响 以 MS 为基础培养基, 附加 6-BA 0.75 mg/L、蔗糖 30 g/L 和琼脂(6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 g/L)共 5 个处理。以上各处理常规灭菌后, 接入长约 1 cm 的枸杞试管苗茎段, 放于温度 23~28℃、光照强度 3 000 lx、光照时间 14 h/d 的恒温培养室培养。

1.2.4 培养温度对枸杞试管苗玻璃化的影响 以 MS 为基础培养基, 附加 0.3 mg/L 6-BA、30 g/L 蔗糖和 7 g/L 琼脂。常规灭菌后, 接入长约 1 cm 的枸杞试管苗茎段, 然后分别放于培养架的顶层和底层培养, 顶层温度为 24~32℃, 底层温度为 23~24℃。

1.3 数据分析

在以上各种不同处理下培养 40 d 后, 观察并统计试管苗的玻璃化情况, 做单因素方差分析, 并按公式计算: 增殖系数=增殖茎段数/接种茎段数; 玻璃化率(%)=玻璃化茎段数/增殖茎段数×100%。

2 结果与分析

2.1 不同的培养瓶封口物对枸杞试管苗玻璃化的影响

表 2 表明, 不同培养瓶封口物之间的试管苗玻璃化率差异显著。其中, 以塑料盖封口的玻璃化率最高, 达 61.4%; 封口膜+牛皮纸封口的玻璃化率也较高, 为 12.3%; 双层牛皮纸封口的玻璃化率最低, 为 0。其余 3 个处理虽也有玻璃化现象, 但玻璃化率均在 2% 以下。

第一作者简介:卢兴霞(1978-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为观赏植物遗传育种与生物技术。E-mail:luxingxia_@163.com.

责任作者:柴慈江(1960-), 男, 硕士, 教授, 研究方向为植物组培技术研究。E-mail:cijiang666@163.com.

基金项目:国家级星火计划资助项目(2008GA610015、2013GA610012); 天津市科委资助项目(08ZXHXNC07000)。

收稿日期:2014-04-24

一般认为,培养瓶通气性差和培养基水势过高都是导致试管苗玻璃化的因素,不同的培养瓶封口物会影响瓶内的通气状况和培养基的水分状况,进而影响到试管苗的玻璃化。在试管苗培养期间,由于培养基失水会导致其体积缩小,其边缘逐渐与瓶壁分离,失水越多,培养基边缘距瓶壁距离越大,因此可用培养基边缘与瓶壁的

距离反映其失水程度。由表 3 可知,在培养 50 d 后,以塑料盖封口的培养基失水最少,其次为封口膜+牛皮纸封口,以双层牛皮纸封口的失水最多,其余 3 个处理间失水程度相似,但都少于双层牛皮纸封口处理。这一结果正好与上述试管苗的玻璃化程度相一致。

表 2 不同培养瓶封口物组合对柃子试管苗玻璃化的影响

Table 2 Effect of different coverings of the vessel on the vitrification

培养瓶封口物 Covering of the vessel	接入茎段数 Number of cultured stem-sections	增殖茎段总数 Number of multiplied stem-sections	玻璃化茎段数 Number of the vitrification stem-sections	茎段玻璃化率 Vitrification rate/%
棉塞	60	406	6	1.5
硫酸纸+牛皮纸	60	432	6	1.4
牛皮纸+牛皮纸	60	324	0	0
封口膜+牛皮纸	60	414	51	12.3
封口膜	60	410	8	2.0
塑料盖	60	246	151	61.4

表 3 不同培养瓶封口物组合对培养基失水的影响

Table 3 Effect of different coverings of the vessel on water loss of culture medium

培养瓶封口物 Covering of the vessel	培养 50 d 后培养基边缘与瓶壁的距离 The distance of the culture medium and the edge of the bottle wall after 50 d/mm	培养基表面边缘与瓶壁距离 The distance of the surface of the culture medium and the edge of the bottle wall	培养基底部与瓶壁距离 The distance of the base of the culture medium and the edge of the bottle wall
棉塞	1.5		1.4
硫酸纸+牛皮纸	1.6		1.5
牛皮纸+牛皮纸	3.5		3.4
封口膜+牛皮纸	0.3		0
封口膜	1.5		1.4
塑料盖	0		0

由上述结果可知,以塑料盖和封口膜+牛皮纸组合封口的容器内因通气性差,培养基水势高,加剧了柃子试管苗玻璃化,因此,这 2 种封口物不适用于柃子试管苗的茎芽增殖培养。双层牛皮纸封口组合虽然未出现试管苗玻璃化,但培养基失水过快,不利于试管苗的生长,导致其增殖的茎段数明显减少,因此,该组合也不适用于柃子试管苗的茎芽增殖培养。其余 3 种封口物:棉塞、封口膜、牛皮纸+硫酸纸封口组合,其试管苗玻璃化率均在 2% 以下,且茎段增殖数较高,这 3 种封口物均适用于柃子试管苗的茎芽增殖培养。

2.2 6-BA 浓度对柃子试管苗玻璃化的影响

表 4 表明,柃子试管苗玻璃化率随着 6-BA 浓度的

增加而增加,6-BA 浓度对柃子试管苗玻璃化影响的差异达到了显著性水平,0.30 mg/L 处理的茎芽增殖系数除与 0.60 mg/L 处理的差异不显著外,与其它各处理间的差异都达到了显著水平。当 6-BA 浓度为 0 mg/L 时,柃子试管苗无玻璃化现象,但试管苗增殖系数最低;当 6-BA 浓度为 0.30 mg/L 时,试管苗开始出现玻璃化,但玻璃化率较低,其茎芽增殖系数最高,为 5.6。随着 6-BA 浓度的增加柃子试管苗玻璃化也增加,当 6-BA 浓度为 0.90 mg/L 时,柃子玻璃化率达到 20.2%。以增殖系数和玻璃化 2 个指标进行综合分析,6-BA 为 0.30 mg/L 时是增殖系数最高、玻璃化率最低。

表 4 不同浓度的 6-BA 对柃子试管苗的生长及玻璃化的影响

Table 4 Effect of different 6-BA concentrations on *Cotoneaster hjelmqvistii* plantlet growth and vitrification

6-BA 浓度 Concentration of 6-BA /(mg · L ⁻¹)	接种茎段数 Number of cultured stem-sections	增殖茎段数 Number of multiplied stem-sections	增殖系数 The multiplication coefficient	玻璃化茎段数 Number of the vitrification stem-sections	玻璃化率 Vitrification rate /%
0	30	64	2.1 c	0	0 e
0.30	30	169	5.6 a	4	2.4 d
0.60	30	127	4.2 ab	6	4.7 c
0.75	30	124	4.1 b	9	7.3 b
0.90	30	99	3.3 bc	20	20.2 a

注:表中同列数据后不同的小写字母表示差异显著($P < 0.05$),下同。

Note: Different lowercase letters show significant difference at 0.05 level, the same below.

2.3 琼脂浓度对枸杞子试管苗玻璃化的影响

由表 5 可知,枸杞子试管苗玻璃化率随着琼脂浓度的增加出现先升高后降低的现象。在琼脂浓度为 7.0 g/L 时玻璃化率达到最高,此时观察到试管苗的生长较快,但试管苗叶色微黄,长势较差。琼脂浓度为 6.5 g/L 和 8.0 g/L 处理之间的玻璃化率差异不显著,但琼脂浓度为 6.5 g/L 时的茎段增殖系数显著高于琼脂浓度为 8.0 g/L 的处理。当琼脂浓度达到 8.5 g/L 时,虽然有效地降低了试管苗的玻璃化率,但由于琼脂浓度过高导致

表 5 不同琼脂浓度对枸杞子试管苗生长及玻璃化的影响

琼脂浓度 Agar concentration /(g·L ⁻¹)	接种茎段数 Number of cultured stem-sections	增殖茎段数 Number of multiplied stem-sections	增殖系数 The multiplication coefficient	玻璃化茎段数 Number of the vitrification stem-sections	玻璃化率 Vitrification rate /%
6.5	36	303	8.42 a	17	5.61 c
7.0	36	195	5.42 b	16	8.21 a
7.5	36	175	4.86 c	12	6.86 b
8.0	36	161	4.47 c	8	4.97 c
8.5	36	131	3.64 d	3	2.29 d

2.4 培养温度对枸杞子试管苗玻璃化的影响

植物组织培养所需温度一般要求恒定在 25℃ 左右,但在实践中,培养室内的不同部位常存在温度不均匀的现象。该试验中,在培养室内没有风扇搅动空气的情况下,培养架的上下层之间温差明显,上层温度较高而且温度变化大,下层温度较低而且稳定。培养架上

表 6 不同温度对枸杞子的生长及玻璃化的影响

培养温度 Culture temperature /℃	接种茎段数 Number of cultured stem-sections	增殖茎段数 Number of multiplied stem-sections	增殖系数 The multiplication coefficient	玻璃化茎段数 Number of the vitrification stem-sections	玻璃化率 Vitrification rate /%
23~24	30	169	5.6a	4	2.3 b
24~32	30	129	4.3b	37	28.7 a

3 结论与讨论

试管苗的玻璃化现象是植物组织培养中普遍发生的一种形态和生理性的变异。玻璃苗的形态异常,生长缓慢,生根率、成活率很低,限制了某些植物微繁技术在产业化中的推广应用^[2]。到目前为止,引起玻璃化的最主要的原因是植物生长调节剂的过量使用、培养基的水势和组培容器中比较大的相对湿度、MS 培养基中大量的矿物离子(主要是 NH₄⁺ 和 Cl⁻)等。这些因素主要是通过启动过氧化物-IAA-氧化酶系统诱导生成过量的乙烯,从而使植物产生非特异性应激反应,出现玻璃化现象^[3-6]。尽管这些因素的作用机制和互作效应仍然不清楚,但是植物生长调节剂特别是细胞分裂素的作用效果是有据可查的,而且 6-BA 的影响最大^[2,7-8]。

有研究认为,对幼苗玻璃化影响最关键的因素有 2 个:幼苗茎尖的生理状态(活跃的细胞分裂是由于内源

培养基水分含量低,使试管苗生长缓慢。

一般来说,琼脂的浓度会影响培养基的水势。琼脂浓度低,培养基水势较高,试管苗易于产生玻璃化现象。在该试验中,琼脂浓度 7.0~8.5 g/L 时的试管苗玻璃化趋势基本符合上述规律,但是,琼脂浓度 6.5 g/L 的处理玻璃化率显著低于 7.0 g/L 和 7.5 g/L 处理,显然与上述规律不符,其原因尚待作进一步研究。在该试验中,以增殖系数和玻璃化 2 个指标进行综合分析,琼脂浓度为 6.5 g/L 是增殖系数高、玻璃化率低的最佳处理。

玻璃化产生了明显的影响。表 6 结果显示,培养温度为 23~24℃(下层温度)时,试管苗玻璃化率显著地低于 24~32℃(上层温度),增殖系数则显著地高于 24~32℃。对增殖系数和玻璃化 2 个指标进行分析,表明采用 23~24℃ 的较低温度对枸杞子试管苗的茎芽增殖培养较为有利。

细胞分裂素升高)和培养瓶内比较高的相对湿度,这 2 个因素中的任何一个因素不具备,都会显著的降低植物的玻璃化现象。培养基中的细胞分裂素 6-BA 会很容易地被植物吸收,然后迅速被代谢为多种化合物。其中,苯基裂解后可能会形成细胞分裂素合成的前体—腺嘌呤。因此,内源细胞分裂素水平的升高可能是由于外源激素激发了内源细胞分裂素的合成途径或者是 tRNA 逆转录的增加,从而生成了细胞分裂素类物质。细胞中内源细胞分裂素水平的升高可以维持分生组织细胞处于积极的分化状态,新生的细胞由于只含有少量的木质素和纤维素,还缺乏细胞壁的充分保护。如果这些细胞处在相对湿度比较高的环境中,水分就会渗透到这些细胞中,从而在分生组织区内就会出现高度空泡化的细胞,使得试管苗的茎尖结构发生改变。过量的内源激素促进具有不正常茎尖结构的试管苗生长,从而导致试管苗

玻璃化现象的发生。这也可能是为什么正在生长的植物材料会发生玻璃化现象的原因^[9]。

在该研究中, 枸杞子试管苗玻璃化率也随着 6-BA 浓度的升高玻璃化率显著增加, 与前人的报道基本一致^[10-12]。枸杞子试管苗 6-BA 为 0.30 mg/L 时增殖系数最高、玻璃化率最低。但其作用机理是否为通过外源激素 6-BA 刺激诱导内源激素升高, 在高湿的环境下, 使试管苗茎尖细胞发生空泡化, 其结构发生改变, 从而导致玻璃化现象的发生还有待进一步研究。

组织培养所需温度一般在 22~28℃, 在这个温度范围内, 试管苗生长正常, 超过这一温度范围, 就易产生玻璃化现象。这可能与幼苗茎尖的生理状态有关, 因为低温使植物体代谢缓慢, 新生的幼苗细胞分化不完全, 从而导致玻璃化; 而高温则刺激细胞新陈代谢, 细胞快速分裂, 愈伤组织疏松, 从而导致玻璃化。该试验证明, 培养温度为 23~24℃ 时比较适合枸杞子试管苗生长, 玻璃化现象较轻, 且茎芽增殖系数较高。

琼脂和不同的培养瓶封口物对培养基中的可利用水分和培养瓶中的相对湿度易产生影响, 使植物对营养和矿物质元素的吸收降低, 影响植物的代谢, 影响试管苗的正常生长。有研究表明, 培养基中琼脂的浓度与植物对 BA 的吸收量呈负相关; 用棉塞作封口物的玻璃化率比用铝箔作封口物的玻璃化率下降了 2~3 倍, 其主要原因是棉塞封口物可以有效地降低培养瓶内的相对湿度^[9]。该试验表明, 琼脂含量在 7.0~8.5 g/L 时, 试管苗玻璃化是随着琼脂浓度的增加而下降, 但琼脂含量 6.5 g/L 的处理玻璃化率则明显低于 7.0 g/L 和 7.5 g/L 处理, 其原因尚待进一步研究; 采用通气性好的封口材料如纱布和脱脂棉做成的棉塞代替聚乙烯塑料膜作为封口材料, 可有效降低培养瓶内的相对湿度, 从而减轻枸杞子试管苗玻璃化现象的发生。

参考文献

- [1] 柴慈江, 史燕山, 骆建霞, 等. 枸杞子的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(3): 484.
- [2] Aremu A O, Bairu M W, Dole al K, et al. Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges? [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2012, 108: 1-16.
- [3] Borkowska B, Opilowska M. Influence of BA and other cytokinins on proliferation and metabolic status of sour cherry cultures cultivated *in vitro* [J]. Fruit Sci Rep, 1988(15): 147-156.
- [4] Pasqualetto P L, Zimmerman R H, Fordham I. The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars *in vitro* [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1988(14): 31-40.
- [5] Daguin F, Letouzé R. Ammonium-induced vitrification in cultured tissues [J]. Physiol Plant, 1986, 66: 94-98.
- [6] Barbara R, Marco S. Physiological and biochemical analysis of growth abnormalities associated with plant tissue culture [J]. Hort Environ Biotechnol, 2013, 54(3): 191-205.
- [7] Bairu M W, Stirk W A, Dolezal K, et al. Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: Can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 2007, 90: 15-23.
- [8] 王庭辉, 马晖玲. 和田苜蓿组织培养中玻璃化现象研究 [J]. 草原与草坪, 2012, 32(5): 58-66.
- [9] Kataeva N V, Alexandrova I G, Butenko R G, et al. Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured *in vitro* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1991, 27: 149-154.
- [10] 李会珍, 徐东进, 陈登金, 等. 不同植物生长调节剂对脱毒红颊草莓组培快繁的影响 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41(2): 43-45.
- [11] 马晓非, 张家菁, 于元杰. 防风 (*Saposhnikovia divaricata*) 组织培养中的玻璃化现象研究 [J]. 分子植物育种, 2013, 11(3): 421-430.
- [12] Bornman C H, Vogelmann T C. Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification *in vitro* in *Picea abies* [J]. Physiol Plant, 1984, 61: 505-512.

Study on the Vitrification of *Cotoneaster hjelmqvistii* Plantlet *in vitro*

LU Xing-xia, CHAI Ci-jiang, ZHANG Ting, SHI Yan-shan, LUO Jian-xia
(College of Horticulture and Landscape, Tianjin Agriculture College, Tianjin 300384)

Abstract: Taking *Cotoneaster hjelmqvistii* plantlet *in vitro* as materials, the effect of coverings of the vessels, 6-BA concentrations (0~0.90 mg/L), agar concentrations (6.5~8.5 g/L) and shoots culture temperature on its vitrification phenomenon were studied. The results showed that the vitrification rate was lower, and the propagation coefficient was higher when the *Cotoneaster hjelmqvistii* plantlet was cultured on MS basal salts containing 0.30 mg/L 6-BA and 6.5 g/L agar concentration, in 23~24℃ cultured temperature and in the vessels covering with cotton plug or sealing film.

Keywords: *Cotoneaster hjelmqvistii* Flinck and Turcz; tissue culture; vitrification phenomenon