

## 甜瓜试管苗继代培养玻璃化现象的研究

戴园园<sup>1</sup>, 孙永林<sup>2</sup>, 周晓阳<sup>1</sup>

(1. 北京林业大学生物学院; 2. 北京林业大学理学院, 北京 100083)

**摘要:** 试管苗玻璃化现象是甜瓜组织基因转化过程中试管苗继代培养过程中的一大障碍, 采用在培养基中提高糖和琼脂的浓度, 添加适当的钙离子, 细胞分裂素 6-BA 含量不超过 0.2mg/L, 生长素 IAA 用量控制在 0.5mg/L, 适当的光, 光照强度和温度对克服甜瓜玻璃苗玻璃化现象有明显的效果。

**关键词:** 甜瓜; 组织培养; 试管苗; 玻璃化现象

**中图分类号:** Q943.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1008-9632(2008)02-0048-02

通过组织培养可以进行快速繁殖, 近几年国内外的一些优质甜瓜品种更是倍受青睐, 通过植物组织培养技术进行离体快繁, 可以大量生产甜瓜苗, 对推动优质甜瓜生产发展具有积极意义。但是目前已经发现在植物进行组织培养时都可能出现玻璃化现象。所谓试管苗玻璃化现象是指试管苗呈半透明状, 外观状态往往异常的现象, 虽然试管苗玻璃化偶尔可在延长培养期间回复正常<sup>[1,4,7]</sup>, 继代培养中仍然形成玻璃苗<sup>[2,5,8]</sup>, 且玻璃苗的分化能力低下, 难以增殖, 也难以发根成苗<sup>[3,6,9,10]</sup>。由于玻璃苗的生理功能异常, 故也难以移栽成活。因此, 玻璃苗的出现对于利用组织培养技术进行甜瓜快速繁殖是不利的。笔者针对甜瓜试管苗与培养环境的关系, 对甜瓜试管苗玻璃化现象的成因及防止方法进行了探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

甜瓜品种为“特大十八里香”, 以其种子为材料。

### 1.2 方法

采用 MS 为基本培养基, 在 MS 培养基中添加细胞分裂素 6-苄基氨基嘌呤, 生长素吲哚乙酸, 蔗糖, 琼脂等。

培养条件为: pH 值为 5.8, 温度 25℃, 光照 4000lx, 光照时间为 10h。

## 2 结果与分析

### 2.1 激素对甜瓜试管苗玻璃化的影响

在 MS 培养基上添加 6-BA、IAA 等, 基本培养基 MS + Su 30g/L + Ag 5g/L + 6-BA 4~7mg/L + IAA 0.25~0.50mg/L, 每个培养皿接切碎的子叶 17 块, 每个处理接种 15 皿, 调查其中的 10 皿, 结果列于表 1、表 2。

实验结果表明: (1) 甜瓜试管苗玻璃化现象发生的比例随 6-BA 浓度的增加而增加。(2) 从诱导率、生长势及玻璃化现象的发生等综合因子分析, 每升培养基中添加 0.2mg 6-BA 较为适宜。(3) 生长素 IAA 的用量虽然对玻璃化现象影响不大, 但对试管苗的诱导率、生长势影响较大, 每升培养基中添加 0.50mg 比较适宜。

表 1 6-BA 用量对甜瓜试管苗玻璃化的影响

Table 1 Effect of 6-BA on vitrification of melon tissue culture

| 处理<br>(6-BA, mg) | IAA<br>(mg) | 玻璃苗的<br>比率(%) | 生长势 |
|------------------|-------------|---------------|-----|
| 0.2              | 0.5         | 2.5           | 优   |
| 1                | 0.5         | 13.4          | 良   |
| 2                | 0.5         | 30.6          | 良   |
| 4                | 0.5         | 37.8          | 良   |

表 2 IAA 用量对甜瓜试管苗玻璃化的影响

Table 2 Effect of IAA on vitrification of melon tissue culture

| 处理<br>(IAA, mg) | 6-BA<br>(mg) | 玻璃苗的<br>比率(%) | 生长势 |
|-----------------|--------------|---------------|-----|
| 0.25            | 0.2          | 95.82         | 差   |
| 0.50            | 0.2          | 39.76         | 优   |

### 2.2 钙离子浓度对甜瓜试管苗玻璃化的影响

基本培养基为 MS + Su 30g/L + Ag 5g/L + 6-BA 0.2mg/L + IAA 0.50mg/L, 在白炽灯光源且日照强度为 3000~4000lx 的条件下, 且每天照光 10h, 添加不同浓度的钙离子, 调查甜瓜试管玻璃化现象, 结果如表 3。

调查表明: (1) 甜瓜试管玻璃苗发生的频率随着钙离子浓度的增加而减少。(2) 甜瓜试管苗的诱导率随着钙离子浓度的提高而降低, 长势也减弱。

所以, 在保证试管苗正常生长的情况下, 添加钙离子的浓度不超过 3.5916mmol/L。

表 3 钙离子浓度对甜瓜试管苗玻璃化的影响

Table 3 Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration on vitrification  
of melon tissue culture

| 处理(Ca, mmol/L) | 玻璃苗的比率(%) | 生长势 |
|----------------|-----------|-----|
| 2.9330         | 50.7      | 优   |
| 3.2923         | 51.2      | 优   |
| 3.5916         | 52.9      | 中   |
| 3.8908         | 58.8      | 差   |

## 2.3 蔗糖浓度和琼脂浓度对甜瓜试管苗玻璃化的影响

基本培养基为 MS + 6-BA 0.2mg/L + IAA 0.5mg/L, 在培养基中添加糖作为碳素来源, 为细胞的呼吸代谢提供食物与能源, 并维持一定的渗透势, 蔗糖浓度分别是 25、30、35g/L, 琼脂浓度分别是 4、5、6g/L, 结果列于表 4。

表 4 蔗糖和琼脂浓度对甜瓜试管苗玻璃化的影响

Table 4 Effect of concentration of sucrose and agarose  
on melon tissue culture

| Ag(g/L) | Su(g/L) | 玻璃苗的比率(%) | 生长势 |
|---------|---------|-----------|-----|
| 6       | 30      | 48.8      | 优   |
| 5       | 30      | 51.0      | 良   |
| 4       | 30      | 51.7      | 中   |
| 5       | 25      | 52.8      | 差   |
| 5       | 30      | 48.6      | 中   |
| 5       | 35      | 48.0      | 优   |

试验结果表明: (1) 试管玻璃苗发生的频率随蔗糖用量的增加而显著降低, 生长势则随蔗糖用量的增加而增强。(2) 甜瓜试管苗玻璃化发生的频率随琼脂用量的增加而降低, 生长势随琼脂用量的增加而增强。究其原因, 琼脂用量低则培养基水势过高。培养器皿内空气湿度大, 导致试管苗水渍逆境中, 因而产生玻璃化现象, 因此在培养基中加大琼脂用量减少培养基水势, 减少培养器皿内空气湿度有利于克服玻璃化现象。

## 2.4 光和光照强度对甜瓜试管苗玻璃化的影响

基本培养基为 MS + Su 30g/L + Ag 5g/L + 6-BA 5mg/L + IAA 0.50mg/L, 用不同颜色的光、光照强度处理。光分别为白光和蓝光, 光照强度分别为 2000lx 和 4000lx, 结果列与表 5。

表 5 光照和光色对甜瓜试管苗玻璃化的影响

Table 5 Effect of density and color of light on melon tissue culture

| 光照(lx) | 光色 | 时间(h/d) | 玻璃苗的比率(%) | 生长势 |
|--------|----|---------|-----------|-----|
| 2000   | 白光 | 10      | 37.5      | 良   |
| 4000   | 白光 | 10      | 19.3      | 优   |
| 2000   | 蓝光 | 10      | 42.3      | 差   |
| 4000   | 蓝光 | 10      | 44.7      | 差   |

实验结果表明: (1) 不同的光和光强度对玻璃苗的发生都有影响。(2) 在蓝光下, 玻璃苗的发生较为严重。(3) 在白色光源照射下, 玻璃苗的发生相对较少, 且随着光照强度的增加, 玻璃苗发生的几率变小。

## 2.5 温度对甜瓜试管苗玻璃化的影响

基本培养基为 MS + Su 30g/L + Ag 5g/L + 6-BA 5mg/L + IAA 0.50mg/L, 用不同的温度处理。结果列与表 6。

表 6 温度对甜瓜试管苗玻璃化的影响

Table 6 Effect of temperature on melon tissue culture

| 温度(℃) | 玻璃苗比率(%) | 生长势 |
|-------|----------|-----|
| 28    | 13.2     | 优   |
| 35    | 50.3     | 差   |

实验结果表明, 高温有利于甜瓜试管苗玻璃化的产生。

## 3 小结

影响试管苗玻璃化现象的原因很多, 本研究主要比较了以植物幼苗为外植体来源时, 不同培养基质的激素含量、钙离子浓度、琼脂和蔗糖的含量以及光和温度对玻璃苗产生的影响。结果表明: 玻璃苗产生的几率与激素含量关系很大, 激素浓度越高, 产生的几率就越大。玻璃苗产生的几率随着钙离子浓度、蔗糖用量、琼脂用量的增加而降低, 有色光和较高的温度有利于试管苗的产生。

所以, 为了防止试管苗玻璃化的产生, 在甜瓜转基因和植株再生的过程中, 用最适宜的培养基 MS + Su 30g/L + Ag 5g/L + 6-BA 5mg/L + IAA 0.50mg/L, 添加的钙离子浓度不超过 3.5916 mmol/L, 在白炽灯每天照射 10h, 4000lx 的光照条件下, 可防止甜瓜苗玻璃化的产生, 从而得到正常的转基因植物。

## 参考文献:

- [1] Leshem B. The cartion succulent plantlet-a stable teratological growth[J]. Ann Bot, 1993, 52: 873 ~ 876.
- [2] Leshem B, Sachs T. Vitrified dianthus ~ teratomata in vitro due to growth factor imbalance[J]. Ann Bot, 1985, 56: 613 ~ 617.
- [3] 王果萍. 西瓜高效组织培养技术体系研究[J]. 中国西瓜甜瓜, 2002(2): 1 ~ 3.
- [4] 王家旺, 等. 几种因素对油菜茎尖培养中玻璃化作用的影响[J]. 植物生理学通讯, 1991, 27: 288.
- [5] 郭达初, 等. 培养基对香石竹试管苗生长及其玻璃化的影响[J]. 浙江农业学报, 1990, 2: 174 ~ 180.
- [6] 周菊花, 等. 控制瑞香试管苗玻璃化的研究[J]. 园艺学报, 1990, 17: 229 ~ 232.
- [7] 王家旺, 等. MS 和 B5 培养基对油菜茎 (下转 39 页)

- (13);8770~8779.
- [2] 石远凯,孙 燕.造血生长因子在肿瘤化疗中应用的研究进展[J]. 癌症进展,2003,1(2):91.
- [3] Lee G K. PEG conjugation moderately protects adenoassociated viral vectors against antibody neutralization[J]. Biotechnol Bioeng, 2005, 92(1):24~34.
- [4] Veronese F.M, Pasut G. PEGylation, successful approach to drug delivery [J]. Drug Discov Today, 2005, 10(21): 1451~1458.
- [5] Richard B G, Greenwald, Yun I C, et al. Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2003, 55(2):217~250.
- [6] Laemmli U K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227(8):680~685.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 北京:科学出版社,1989:888~898.
- [8] 中国生物制品标准化委员会编. 中国生物制品规程[S]. 北京:化学工业出版社,2000:672~673.
- [9] Shirafuji N, Asano S, Matsuda S, et al. A new bioassay for human granulocyte colony stimulating factor (H<sub>g</sub>-CSF) using murine myeloblastic NFS-60 cells as male healthy person and patients with infectious and hematological disorders[J]. Exp Hematol, 1989, 17(2):116~125.
- [10] Francis C E, Fisher D, Delgado C, et al. PEGylation of cytokines and other therapeutic proteins and peptides: the importance of biological optimization of coupling techniques [J]. Int J Hematol, 1998,68(3):1~8.

## Expression, purification and PEGylation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor

ZHANG Bing<sup>1</sup>, ZOU Wen-yi<sup>2</sup>, RONG Long-fu<sup>2</sup>,  
FAN Qing-lin<sup>2,3</sup>, SONG Li-hua<sup>2,3</sup>

(1. School of Basic Medical Science, Anhui Medical University, Hefei 230032; 2. Anke Biotechnology (Group) Co., Ltd, Hefei 230088; 3. Biology Institute of Anhui Province, Hefei 230088, China)

**Abstract:** Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) expressed in *Escherichia coli* in form of inclusion body was modified by monomethoxy polyethylene glycol (mPEG20k-NHS) after denaturation, renaturation and purification. The modified rhG-CSF (PEG20k-rhG-CSF) was obtained by purification of modified product. Compared with unmodified rhG-CSF, the modified rhG-CSF had 20% biologic activity of unmodified rhG-CSF in vitro, but it had significantly prolonged action time in vivo with obviously elevating pharmacodynamics.

**Keywords:** rhG-CSF; expression; purification; monomethoxy polyethylene glycol; biological activity

- (上接49页)尖培养中玻璃化作用的影响[J]. 植物生理学通讯,1990,(3):35~36.
- [8] 李胜,等. 植物试管苗玻璃化现象研究进展[J]. 甘肃农业大学学报,2003,38(1):1~16.
- [9] 卜学贤,陈维伦. 试管植物的玻璃化现象[J]. 植物生理学通讯,1987,(5):13~18.
- [10] 黄宇翔,等. 香石竹茎尖试管苗继代培养玻璃化现象的研究[J]. 中国农学通讯,2005,(2):81~83.

## Research on vitrification of melon tissue culture

DAI Yuan-yuan<sup>1</sup>, SUN Yong-lin<sup>2</sup>, ZHOU Xiao-yang<sup>1</sup>

(1. College of Biological Sciences and Biotechnology; 2. College of Sciences, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** Vitrification of shoot regeneration in vitro is a big barrier of keeping culture in melon gene transformation. By increasing density of sugar and agar in media, adding suitable calcium ion, keeping the density of indole-3-acetic acid not exceeding 0.5 mg/L, the obvious effect on the vitrification of shoots regenerated in vitro was obtained.

**Keywords:** melon; tissue culture; shoots regenerated in vitro; vitrification