

组培微环境对葡萄风信子组培苗生长 及移栽后生理特性的影响

孙冬青,王 飞*,李新凤

(西北农林科技大学园艺学院,陕西杨凌 712100)

摘 要: 研究了组培微环境对葡萄风信子组培苗生根阶段的苗生长及移栽后生理特性的影响。结果表明,生根培养时,光强和蔗糖对植株生长均有很大的影响,无论是有糖还是无糖培养,高光强均有利于植株干物质的积累,其中添加 3% 蔗糖有利于根的生长,并对根系活力和酶的活性有一定的促进作用,无糖处理有利于株高生长。移栽后,微环境调控对移栽成活率有一定的影响,有糖高光照处理的植株移栽后环境适应能力较强,存活率高,生长较好。

关键词: 风信子;组织培养;微环境;移栽

中图分类号: S682.2⁺9

文献标识码: A

文章编号: 1004-1389(2008)04-0244-05

Effects of in Vitro Microenvironment on the Growth and Physiological Characteristics of Hyacinth Plantlets

SUN Dong-qing, WANG Fei* and LI Xin-feng

(College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract: The influence of in vitro microenvironment on the growth and physiology of hyacinth plantlets during rooting and naturalizing stages was studied. The results indicated that light intensity and sucrose have obvious influence on the plants growth during rooting stage. Higher light intensity was beneficial to the accumulation of solids, either with sucrose or free-sucrose. 3% sucrose was beneficial to the growth of plantlets' roots, 3% sucrose raised the activity of roots and antioxidases, but free-sucrose is beneficial to the growth of plantlets' height. On naturalizing stage, in vitro microenvironment has a certain degree influence on survival after plantlets transfer. Plantlets with 3% sucrose and higher light intensity had the stronger ability to accommodate to circumstances, had the highest survival rate and better growth expression after transfer.

Key words: *Muscari botryoides* Mill; Tissue culture; Microenvironment; Transfer

长期以来,植物组培快繁的研究多注重于组培苗的获得,而忽视组培微环境对组培苗移栽质量的影响。组培苗的移栽驯化是组培程序的关键环节,加深对组培苗移栽驯化过程中形态和生理上的研究,有利于制定更有效的移栽驯化措施,提高组培苗的成活率。但关于组培微环境对组培苗生长和生理方面的研究以及对移栽后生理特性

的影响这方面的研究报道很少。

葡萄风信子(*Muscari botryoides* Mill)的快速繁殖体系已有不少报道^[1],本试验就以脱毒快繁的葡萄风信子组培苗为材料,通过改变生根阶段的光照强度和糖浓度等,研究其对风信子移栽过程中植株生长生理以及成活率的影响,旨在为提高组培苗移栽成活率提供可靠的理论依据与实践经验。

收稿日期:2008-01-09 修回日期:2008-03-04

基金项目:陕西省科技攻关项目“花卉新品种引进与示范”(2002ZK03-G7-4)。

作者简介:孙冬青(1982—),女,山东泰安人,在读硕士,主要从事园林植物生理生态的研究。E-mail: sundongqing82@163.com

* 通讯作者:王 飞,教授,博士生导师,主要从事果树及花卉生理与生物技术育种研究。E-mail: xnwangfei521@126.com

1 材料与方法

1.1 材料和处理

试验分别于2006年9月~2007年2月在西北农林科技大学园艺学院进行,重复2次。供试品种为未生根的风信子组培苗,生根培养基为1/2MS+IBA 1.0 mg/L+活性炭1.0 mg/L+琼脂6 g/L,光照强度设置为86、20、48 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ (光照强度用光强仪测定),蔗糖为3%、0%,共6个处理(表1)。培养容器均采用带滤纸的透气膜封口,保证气体的流通,光照用荧光灯调节。生根时温度为 $23 \pm 2^\circ\text{C}$,光照14 h,环境相对湿度80%。生根培养15 d后各处理分别取150株大小一致的苗,移栽到消毒过的草炭土:珍珠岩(1:1)的栽培基质中,于温室内驯化。

1.2 方法

1.2.1 生长形态指标测定 分别于生根培养15 d和移栽后30 d,各处理均随机取样10株,测定鲜重、干重(烘干法)、株高和根长。

1.2.2 生理指标的测定 生根处理15 d,当叶片约为3片时,每个处理取5株,每株独立测定相关酶的活性、根系活力、叶绿素含量。移栽后每隔5 d测定一次,测定5次。

POD活性参考张志良^[2]的方法;CAT活性参考何文亮等^[3]的方法;叶绿素含量及根系活力均参考高俊凤^[4]的方法。

1.2.3 气孔测量 于测定当天上午10:00左右,在各个光强处理下,取组培苗的第二片叶,迅速用火棉胶固定液涂抹叶下表皮,风干后,剪下叶片用

眼科镊子沿叶片下表皮中脉处小心撕取下表皮条,将其放在载玻片上于光学显微镜下观察并照相,分别取10个视野,用10×40倍镜测量气孔开启的长度和宽度,取其平均数,以公式 $S = \text{长} \times \text{宽} \times \pi \times 1/4$ 计算出气孔面积^[5],比较气孔开启的大小。同时每片叶随机观察50个气孔,统计气孔关闭百分率。

气孔关闭 = 气孔关闭数/观察气孔总数 × 100%

2 结果与分析

2.1 不同组培生根环境对风信子组培苗生长的影响

生根培养15 d后,不同处理对组培苗生长状况均有显著影响。与有糖处理的相比,无糖处理组的组培苗叶色鲜绿,植株略高,根细长;处理IV与处理I相比叶色深绿,根系比较粗壮,生长比较旺盛,株高略低于其他处理。由表1还可以看出,3%蔗糖有利于植物生物量的形成,植株鲜重均以培养基中添加3%蔗糖处理鲜重较高,且处理IV最高;干物质含量以3%蔗糖培养的植株较高,一般可高出无糖培养植株的20%左右。株高及根系以无糖培养的植株株高比有糖培养略高,根长却不如有糖培养的,可见蔗糖促进了植株根系的生长,却降低了株高。高光强对植物生长也有一定的促进作用,与对照相比,在有糖培养下,提高光照强度促进了植株的生长;无糖培养下,植株的干物质含量也以高光照条件下较高。可见,添加蔗糖并适当的提高光照强度有利于组培苗生长。

表1 不同组培微环境对组培苗生长的影响

Table 1 Effects of in vitro microenvironment on the growth of hyacinth plantlets

处理 Treatment	光强 PPFD $/(\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s})$	蔗糖/% Sucrose	鲜样质量/g Fresh mass	干物质含量/% Dry matter percentage	根长/cm Root length	株高/cm Height
I	86	0	0.83cd	8.07bc	3.06bcd	5.89a
II	20	0	0.65e	6.67d	2.71d	5.67a
III	48	0	0.75de	7.81c	3.00cd	5.72a
IV	86	3	1.48a	9.25a	3.61a	4.69b
V	20	3	0.97bc	8.26bc	3.18bc	4.15c
VI	48	3	1.03b	8.76ab	3.41ab	4.48bc

注:根据LSD法分析,表中数字后的字母表示差异显著性($P=0.05$),含相同字母表示处理间无显著差异,下表同。

Note: According to LSD test, in the same column the treatment followed by different means significant difference at $P=0.05$. The same below.

2.2 不同组培生根环境对组培苗移栽后生长的影响

由表2可知,生根培养15 d后,风信子组培苗移栽到消毒过草炭土:珍珠岩(1:1)的栽培基

质中,于温室内驯化。移栽30 d后各处理的移栽成活率均达到80%以上,且有一定的差异,但差异不明显,以高光照有糖培养处理IV植株移栽后成活率最高,其次是处理I无糖高光照的,均高于

低光照处理的植株。说明高光照处理对组培苗的成活率有重要的影响。表 2 可以看出,植株在生长形态上的差异也以处理Ⅳ具有最大的鲜重值和干重值。但各处理干物质含量,随着驯化时间的

延长,差异不是十分显著,这与移栽初期已有很大的不同,生根培养结束时风信子组培苗在干物质含量上的差异主要来自培养基中蔗糖含量对其的影响,而移栽过程中蔗糖的影响正逐渐消失。

表 2 不同组培微环境对组培苗移栽后生长的影响

Table 2 Effects of in vitro microenvironment on the growth of hyacinth plantlets after transplant

处理 Treatment	光强 PPFD /($\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$)	移栽成活率/% Survival rate	蔗糖/% Sucrose	鲜样质量/g Fresh mass	干物质含量/% Dry matter percentage	根长/cm Root length	株高/cm Height
I	86	88	0	1.49ab	19.56a	6.22c	14.34b
II	20	82	0	0.91d	20.00a	5.97c	12.58c
III	48	85	0	1.12cd	20.18a	6.20c	14.22b
IV	86	94	3	1.59a	20.69a	8.55a	17.16a
V	20	83	3	1.24bc	20.27a	7.64b	16.63a
VI	48	86	3	1.44ab	20.35a	7.75b	16.87a

2.3 不同组培生根环境对植株移栽驯化过程中叶片色素的影响

图 1 显示,生根培养 15 d 结束时,处理Ⅳ、Ⅴ和Ⅵ,即有糖培养的植株叶绿素含量均高于无糖培养的,并以光照强度为 $86 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的处理含量最高。移栽驯化初期,各处理的叶绿素含量均有轻微的下降。移栽 15 d 后,各处理的叶绿素含量又开始升高,但处理间无显著差异。随着驯化时间的延长,叶绿素含量显著上升。

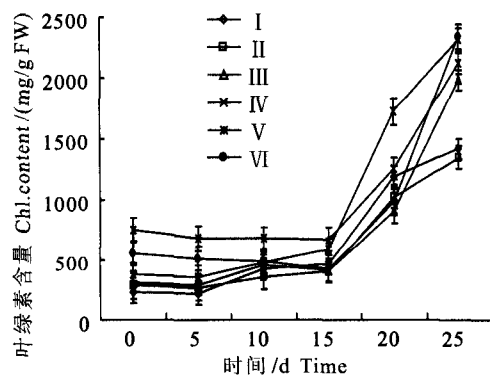


图 1 生根阶段蔗糖和光强处理对风信子组培苗叶绿素含量的影响

Fig. 1 Effects of sucrose supply and light intensity during in vitro rooting on the chlorophylls contents of hyacinth plantlets

2.4 不同组培生根环境对植株移栽驯化过程中抗氧化酶活性的影响

图 2~3 表明,生根阶段不同条件培养的风信子组培苗在移栽驯化过程中抗氧化酶活性有显著的变化,移栽初期活性都有显著上升随着驯化进行又略有降低。生根培养结束时,有蔗糖供应的处理 POD 活性显著高于无糖培养,移栽 5 d 时各处理活性均有显著增加。移栽约 15 d 后各处理活性均表现为轻微的下降,处理间的差异与移栽

时相比已减小。

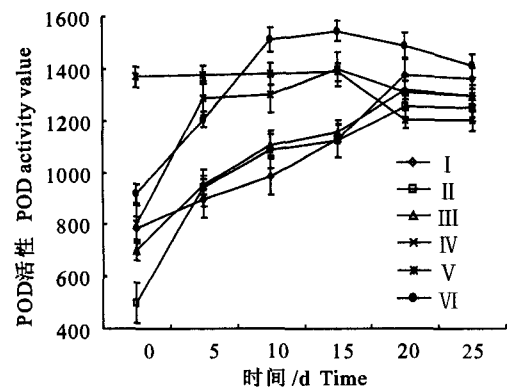


图 2 生根阶段蔗糖和光强处理对风信子组培苗移栽驯化过程中 POD 活性的影响

Fig. 2 Effects of sucrose supply and light intensity during in vitro rooting on the activity of POD of hyacinth plantlets during acclimatization

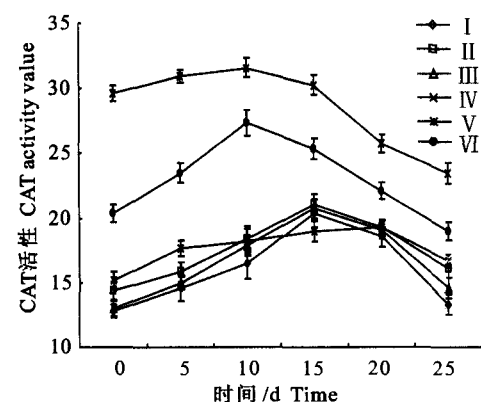


图 3 生根阶段蔗糖和光强处理对风信子组培苗移栽驯化过程中 CAT 活性的影响

Fig. 3 Effects of sucrose supply and light intensity during in vitro rooting on the activity of CAT of hyacinth plantlets during acclimatization

移栽驯化过程中过氧化氢酶 CAT 活性的变化见图 4。与 POD 相似,生根时有蔗糖供应的处

理 CAT 活性显著高于无糖处理。移栽驯化过程中,活性一直缓慢增加,到后期 CAT 活性有所下降。

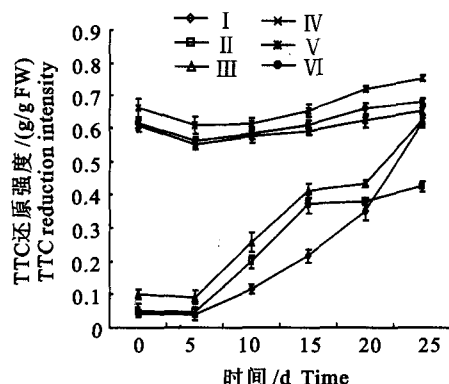


图 4 不同组培微环境对植株移栽驯化过程中根系活力的影响

Fig. 4 Effects of in vitro microenvironment on the activity of hyacinth plantlets root during acclimatization

2.5 不同组培生根环境对植株移栽驯化过程中根系活力的影响

根系活力反映根系对营养物质的吸收与合成能力。图 4 为不同生根环境下组培苗根系 TTC 的还原强度,还原强度越大说明根系的活力越高。从图 4 看出,生根培养 15 d 后,根系活力以有糖供应的最高,是无糖培养的 6 倍左右。这也说明

组培阶段直接吸收培养基中的营养物质是组培苗生长的主要方式。移栽初期,各处理的根系活力均有所降低,但降低幅度不大,这是组培苗从高营养的培养基转移到低营养的基质中根系环境的变化导致的。随着驯化的进行,根系活力各处理又有很大幅度的增加,移栽末期各处理间的差异不显著。

2.6 不同组培生根环境下植株叶片气孔的变化

表 3 为不同组培环境下培养的植株气孔的开张情况。可以看出,6 个处理中培养的组培苗的叶片下表皮细胞气孔大多数处于开放状态。光照强度对气孔开张影响明显,随着光照强度的增加气孔的长度和宽度增加,气孔密度减少。另外,蔗糖对气孔开张也有一定的影响。同样光照条件下,无蔗糖处理的植株叶片气孔长度和宽度均高于有糖处理的,气孔密度要少于有糖处理的。风信子移栽后为适应外界环境气候条件的变化,气孔变化明显。通过显微观察发现各处理移栽后 5 d,气孔大部分仍呈开放状态。较高光照处理的气孔,尤其是高光照有糖处理的自我调节功能恢复较快,大约 10 d 左右气孔开张变化差异已不是很明显,而低光照处理约需要 15 d 左右才恢复正常。

表 3 生根阶段蔗糖和光强对叶片气孔的影响

Table 3 Effect of sucrose and light intensity during rooting on stomatal of leave

处理 Treatment	光强 PPFD /($\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$)	蔗糖 / % Sucrose	气孔长度/ μm Stomatal length	气孔宽度/ μm Stomatal width	气孔面积/ μm^2 Stomatal area	气孔密度/(个/ mm^2) Stomatal density	气孔关闭率 Percentage of stomatal closed
I	86	0	9.98a	5.74a	57.41a	4.96f	0
II	20	0	8.64f	5.25b	45.37d	9.54a	0
III	48	0	9.26c	5.28b	48.93b	7.62d	0
IV	86	3	9.51b	4.97c	47.32c	6.15e	0
V	20	3	8.97e	4.53e	40.67f	9.33b	0
VI	48	3	9.17d	4.77d	43.74e	8.63c	0

3 讨论

3.1 不同光照强度对组培苗生长的影响

光环境是影响组培苗光合作用和生长的内在因素,适度提高光照可使桅子组培苗结构发育更好地趋向于光合自养^[6]。Matysisk 等^[7]观察到,150 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 光照与 50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 的相比显著提高了玫瑰组培苗的干重。在烟草组培苗生根阶段进行 60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 和 200 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 两种光强处理,发现以光合兼养式,同时提高光强培养利于试管苗的移栽及随后的生长^[8]。增加光照对地黄组培苗也有促进生长的作用^[9]。本试验中,不同光照强度下风信子组培苗

生长指标差异显著。与传统环境相比,提高光照促进了风信子的生长。无论是有糖培养还是无糖培养,强光照下,组培苗的干物质含量和株高均高于低光照处理,这表明强光照对风信子组培苗干物质的积累能力有一定的增强作用,这与杨艳琼等^[10]的研究结果相同。

3.2 糖含量对组培苗生长的影响

培养基中的糖分在常规培养中是不可缺少的。它既是供给培养体碳素的来源,又是能量代谢的源泉。有研究指出,糖分的供应影响到试管苗的光合作用。不含蔗糖的培养基中生长的植株有较高的净光合速率。较高的蔗糖含量(3%)增加了地黄根的重量,但茎重降低^[9]。

周明等^[11]研究发现,高光强下姜试管苗的茎叶鲜重、根鲜重等随着蔗糖浓度的降低而降低。本试验培养基添加 3% 蔗糖对风信子组培苗的生物量形成有积极的影响。高光条件下,蔗糖的添加对植株生长有更显著的影响,培养基中添加 3% 蔗糖提高了风信子组培苗的根系活力,这表明直接吸收培养基中的蔗糖仍是组培苗获取生长所需碳源的方式之一。叶绿素是光合作用过程中能将光能转变为化学能并用于物质合成的关键物质。一般情况下,叶绿素含量可在一定程度上反映叶片的光合能力^[12]。本试验以有糖高光培养下的植株叶绿素含量较高,说明其在瓶内生长时有一定的光合能力。适宜的蔗糖供应可能保证了植株多种保护和修复机制的运作^[13]。本试验中添加蔗糖的处理其 POD 和 CAT 酶活性均高于无糖处理,说明蔗糖对酶活性有一定的促进作用。

3.3 组培微环境对组培苗移栽后生长特性的影响

组培苗的移栽驯化要求其完成由“兼养”向“自养”转变的过程。组培环境下,一般叶片的碳同化只占小植株碳代谢的极少部分。而在离开培养基后,植株则需要通过光合作用完成自养。一般认为,具较强光合能力的试管苗在移栽后的生长和恢复优于兼养培养的苗,可提高成活。但也有人认为,试管苗在移栽时是否有积极的光合并不是最重要的,而试管苗在培养阶段积累的营养是否能维持移栽初期的消耗才是关键^[14]。本试验中仍以兼养程度较高的植株,即有糖高光处理的在培养阶段积累了足够的营养,移栽后具有较高的存活率。

移栽后叶绿素含量先下降后上升,反映出移栽后植株对光照条件的适应性调节,使植株能充分吸收有限的光照,提高对光能的利用。移栽的压力主要来自光照强度的改变和水分散失造成的胁迫,这也是诱导植株体内活性氧产生的主要原因。本试验组培苗移栽后 POD 和 CAT 活性升高,15 d 左右达到最高,显示了组培苗抗氧化酶系统对新环境的一种反应。

气孔是 CO₂ 和水进出植物体的主要通道,气孔的开闭将直接影响到植物的光合及蒸腾等一系列生理活动。而常规培养条件下的试管苗气孔密度比较大,功能不完善,在移栽驯化过程中很难适应外界环境,使光合能力降低,而且容易出现过度失水等问题,直接影响试管苗的移栽成活率,因此

研究不同培养条件对气孔影响具有重要意义。苹果试管苗随移栽时间延长,气孔开度减小,蒸腾速率降低。在锻炼直至移栽后 30 d 的整个过程中,移栽初期试管苗的气孔开度最大,蒸腾速率达到峰值,试管苗处于失水最快的状态^[15]。本试验各处理在生根培养时气孔基本上全部处于开放状态,开度较大。随着驯化时间的延长,气孔开度明显下降,关闭比率升高,尤其是有糖高光处理的植株,自我调节功能恢复较快,防失水能力提高。

组培环境和外界环境的差异使组培苗对新环境必须有一个适应的过程。移栽驯化过程是组培苗组织结构分化发育日趋完善,逐渐适应外界环境的过程。本次试验中,生根培养时添加蔗糖并适当提高光照强度使其更接近外界环境,促进了组培苗生长,增强了干物质的积累能力,对维持移栽初期的生长消耗积累了足够的营养,使其在移栽过程中能较快地适应环境的变化,表现出较好的生长势。

参考文献:

- [1] 王 飞,许 胜,牛秀玲. 葡萄风信子叶片、鳞茎不定芽再生体系的建立[J]. 西北农业学报,2006,15(3):149-152.
- [2] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,1990.
- [3] 何文亮,黄承红,杨颖利,等. 盐胁迫过程中抗坏血酸对植物的保护功能[J]. 西北植物学报,2004,24(12):2196-2201.
- [4] 高俊凤. 植物生理学实验技术[M]. 世界图书出版公司,2000.
- [5] 龚富生,张嘉宝. 植物生理学实验(第一版)[M]. 北京:气象出版社,1995. 21-22; 16-17; 73-76; 79-80.
- [6] Serret MD, Trillas MI. Effects of light and sucrose levels on the anatomy, ultrastructure, and photosynthesis of *Gardenia jasminoides* Ellis leaflets cultured in vitro [J]. *International Journal of Plant Sciences*,2000,161(2):281-289.
- [7] Matysiak B, Kubik M, Podwyszynska M, et al. Effect of photon flux density on CO₂ fixation and growth of *Rosa hybrida* White Gem' microcuttings [J]. *Acta Horticulture*, 1997, 418: 103-106.
- [8] Kadlec P, Ticha I, Haisel D, et al. Importance of in vitro pretreatment for ex-vitro acclimatization and growth [J]. *Plant Science*, 2001, 161(4):695-701.
- [9] Cui Y Y, Hahn E J, Kozai T, et al. Number of air exchanges, sucrose concentration, photosynthetic photon flux, and differences in photoperiod and dark period temperatures affect growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets in vitro. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2000,62(3):219-226.

(下转第 262 页)

