

酸樱桃组培过程中产生玻璃化苗的影响因子

高红兵, 亓鑫, 王欢, 唐晓杰 (北华大学林学院, 吉林吉林 132013)

摘要 以酸樱桃为研究材料, 分析了酸樱桃组培过程中产生玻璃化苗的影响因子。结果表明: 在影响酸樱桃组织培养苗玻璃化的 4 种因素中, 蔗糖浓度、pH 值、6-BA 浓度的影响都达到了 0.01 水平显著, 而琼脂浓度的影响不明显; 影响程度的强弱次序为蔗糖浓度 > pH 值 > 外源 6-BA 浓度。

关键词 正交试验; 组织培养; 玻璃化; 酸樱桃

中图分类号 Q945 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)01-00031-02

Factors Affecting Vitrification of *Prunus cerasus* Cultured in Vitro

GAO Hong-bing et al (Forestry College of Beihua University, Jilin, Jilin 132013)

Abstract *Prunus cerasus* was selected to study the factors causing vitrification. The results indicated that the sucrose concentration, benzyladenine (BA), and pH had the most significant effect on the vitrification of *Prunus cerasus*. And the gradation of the effect was sucrose concentration > pH > 6-BA. The agar concentration had no remarkable effect.

Key words Orthogonal experiment; Tissue culture; Vitrification; *Prunus cerasus*

“玻璃化作用”这一概念是由德伯格等在 1981 年首次提出的。所谓玻璃化 (Vitrification) 是指试管苗呈半透明水渍状, 叶片脆弱易破碎, 用于描述常规植物组培中那些呈水浸状的、半透明状的或玻璃状的器官组织^[1-3]。关于组培苗玻璃化现象研究报道很多。许多报道指出, 培养基中的细胞分裂素容易导致玻璃化^[4-8]。苏燕钊在香蕉组培试验中指出, pH 值会影响香蕉组培苗的玻璃化率^[9]。张燕玲等研究表明, 蔗糖含量与满天星玻璃化率呈 0.01 水平显著负相关^[10]。韩美丽等认为, 培养基中琼脂浓度对神灯白掌玻璃化苗的发生有一定的影响^[11]。所以, 影响组培苗玻璃化的因素很多, 可能受单一因素或多个因素的影响。

酸樱桃 (*Prunus cerasus*) 是蔷薇科李属的灌木或小乔木。酸樱桃原产于亚洲西部及黑海沿岸, 其栽培品种主要在欧洲和北美洲, 是一种生态适应性较广、利用价值高的经济树木^[12]。酸樱桃果实富含蛋白质和钙、磷、铁、钾、锌、镁等矿物质, 并含有维生素 A、B₁、B₂、B₆、C 等多种维生素以及大量纤维素和糖类, 营养全面, 酸甜爽口, 具有很高的营养保健价值。该试验以酸樱桃为材料, 利用正交试验原理, 从影响组培苗玻璃化的多因素着手, 设计一个四因素四水平的正交试验, 对酸樱桃组培玻璃化进行研究, 探讨酸樱桃组培苗玻璃化的主导因素, 为组织培养中玻璃化苗的形成机理研究奠定理论基础。

1 材料与方

1.1 试验材料 2006 年 4 月 10 日于北华大学林学院西校区花窖取酸樱桃 1~2 年生枝条, 进行水培催芽, 20 d 后将芽作为外植体培养。

1.2 试验设计 以酸樱桃芽为接种材料, 从诱导酸樱桃玻璃化现象发生的诸多因子中选取蔗糖浓度、琼脂浓度、pH 值、6-BA 浓度 4 个因素, 各试验因素设定 4 个水平 (表 1)。根据表 1 培养基配置共可设计 16 个组合 (表 2)。

1.3 接种、培养方法 取水培后酸樱桃枝条上的芽作为外植体, 用自来水加洗洁精清洗材料, 再用自来水冲洗。在超

净工作台上先用 70% 乙醇浸材料 10 s, 再用 0.1% HgCl₂ 表面消毒 8 min, 消毒后用无菌水冲洗材料 5~6 次。将芽接种在 16 种培养基上, 每种培养基设 30 个重复, 分为 A、B 2 个区组, 每个区组 15 瓶, 共接种 480 瓶。培养温度为 (25 ± 2) °C, 每天光照 10~12 h, 光强 2 000~2 500 lx。

表 1 因子水平

水平	A//g/L	B//g/L	C	D//mg/L
1	20	4	5.5	1.0
2	30	6	6.0	1.5
3	40	8	6.5	2.0
4	50	10	7.0	3.0

注: A 表示蔗糖浓度; B 表示琼脂浓度; C 表示 pH 值; D 表示 6-BA 浓度。下表同。

表 2 L₁₆(4⁴) 正交试验组合

处理	A	B	C	D	处理	A	B	C	D
	g/L	g/L		mg/L		g/L	g/L		mg/L
①	20	4	6.5	1.0	⑨	40	10	6.5	2.0
②	20	6	5.5	1.5	⑩	40	8	5.5	3.0
③	20	8	6.0	2.0	⑪	40	6	6.0	1.0
④	20	10	7.0	3.0	⑫	40	4	7.0	1.5
⑤	30	8	6.5	1.5	⑬	50	6	6.5	3.0
⑥	30	10	5.5	1.0	⑭	50	4	5.5	2.0
⑦	30	4	6.0	3.0	⑮	50	10	6.0	1.5
⑧	30	6	7.0	2.0	⑯	50	8	7.0	1.0

2 结果与分析

2.1 综合效应 从 4 月 25 日接种到 5 月 16 日, 组培苗都存在染菌情况, 但各处理的 2 个区组间的染菌情况差别不明显。截止 5 月 16 日, 各处理的 2 个区组接种瓶数都稳定在 10 瓶左右。5 月 16~19 日各处理均开始出现不同程度玻璃化, 5 月 20~31 日玻璃化苗大量出现, 6 月 10 日之后未出现玻璃化苗, 玻璃化苗统计截至日期为 6 月 10 日。

表 3 表明, 经过 45 d 的培养, 处理②的 2 个区组中玻璃化率最高, 分别达到 88.9% 和 77.8%; 处理⑥、⑩的 2 个区组中玻璃化率最低, 不超过 13%; 大多数处理的区组玻璃化率为 30%~45%。

表 4 表明, 4 种因子对酸樱桃组培苗玻璃化率影响效应

基金项目 吉林省科技厅资助项目 (20010224-1)。

作者简介 高红兵 (1962-), 男, 吉林吉林人, 副教授, 从事植物生理方面的研究。

收稿日期 2006-09-18

依次是蔗糖浓度 > pH 值 > 6-BA 浓度 > 琼脂浓度。其中,前3种因素对酸樱桃组培苗玻璃化率的影响都达到0.01水平显著,而琼脂浓度对酸樱桃组培苗玻璃化率的影响不明显。

表3 酸樱桃组培苗玻璃化率及其反正弦值

处理	A组		B组	
	玻璃化率//%	反正弦转换值	玻璃化率//%	反正弦转换值
①	55.6	48.22	60.0	50.77
②	88.9	0.63	77.8	62.03
③	20.0	26.57	10.0	18.43
④	33.3	35.24	40.0	39.23
⑤	11.1	19.46	20.0	26.57
⑥	11.1	19.46	0	0
⑦	40.0	39.23	30.0	33.21
⑧	0	0	12.5	20.70
⑨	44.4	41.78	33.3	35.24
⑩	37.5	37.76	40.0	39.23
⑪	12.5	20.70	0	0
⑫	10.0	18.43	10.0	18.43
⑬	70.0	56.79	66.7	54.76
⑭	40.0	39.23	37.5	37.76
⑮	44.4	41.78	37.5	37.76
⑯	40.0	39.23	40.0	39.23
⑰			554.53	513.36

表4 酸樱桃组培苗玻璃化试验方差分析

变异来源	SS	df	MS	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
区组	52.96	1	52.96	1.10	4.54	8.68
蔗糖	3527.01	3	1175.67	24.38**	3.29	5.42
琼脂	171.72	3	57.24	1.19		
pH	1448.06	3	482.69	10.01**		
6-BA	1268.71	3	422.90	8.77**		
误差 _{e1}	1769.45	3	589.82	12.23		
误差 _{e2}	723.42	15	48.23			
总变异	8961.34	31				

注: **表示差异0.01水平显著。

2.2 蔗糖浓度对酸樱桃组培苗玻璃化的影响 表5表明,20和30 g/L蔗糖对酸樱桃组培苗玻璃化的影响0.01水平显著,而30和40 g/L蔗糖对酸樱桃组培苗玻璃化影响不明显。

张燕玲等研究表明,蔗糖含量与丝石竹玻璃苗率呈0.01水平显著负相关,在含蔗糖20 g/L的培养基中玻璃苗率为100%,含蔗糖60 g/L的培养基中玻璃苗率则降至70%^[9]。这一结果与该试验结果一致。作为组织培养中的碳源,蔗糖对细胞的碳结构和渗透势都有很大的影响。蔗糖浓度引起玻璃化现象的原因:①由于培养基中含碳量低,细胞结构的建成受到影响,造成组培苗干物质积累少,从而引起了玻璃化现象;②蔗糖浓度会影响培养基水势,低浓度蔗糖导致培养基水势升高,植物组织吸水过多易出现玻璃化现象。

表5 不同蔗糖浓度下酸樱桃组培苗玻璃化率的差异显著性

蔗糖浓度//g/L	\bar{X}_i	差异显著性	
		0.05	0.01
20	43.89	a	A
30	43.32	a	A
40	26.45	b	B
50	19.83	b	B

2.3 6-BA浓度对酸樱桃组培苗玻璃化的影响 表6表明,3.0和2.0 mg/L 6-BA对酸樱桃组培苗玻璃化的影响0.01水平显著,1.0和1.5 mg/L 6-BA对酸樱桃组培苗玻璃化影响不明显。

一般认为,随着6-BA浓度的升高,组培苗的玻璃化率也明显升高。该试验也验证了这一结论。在试验中3.0 mg/L 6-BA对酸樱桃组培苗的玻璃化影响明显高于6-BA浓度为1.0、1.5、2.0 mg/L的3个处理。

表6 不同6-BA浓度下酸樱桃组培苗玻璃化率的差异显著性

6-BA浓度//mg/L	\bar{X}_i	差异显著性	
		0.05	0.01
3.0	41.93	a	A
2.0	36.89	a	A
1.5	27.47	b	B
1.0	27.20	b	B

2.4 pH值对酸樱桃组培苗玻璃化的影响 表7表明,pH值6.5和6.0处理对酸樱桃组培苗玻璃化影响0.01水平显著,pH值5.5和7.0处理对酸樱桃组培苗的玻璃化影响不明显。

苏燕钿在香蕉组培试验中得出pH值在5.5~5.8范围内较适宜,随着pH值的升高组培苗的玻璃化率也升高^[8]。试验表明,当pH值达到6.5时,玻璃化率显著性高于pH值5.5和6.0,说明pH值对诱导产生玻璃化苗具有重要作用;当pH值达到7.0时,玻璃化率显著性反而下降,原因是此时酸樱桃组培苗体内酶的活性及其生长都受到了很大影响,表现出生长缓慢特征。

表7 不同pH值下酸樱桃组培苗玻璃化率的差异显著性

pH值	\bar{X}_i	差异显著性	
		0.05	0.01
6.5	41.70	a	A
6.0	38.26	a	A
5.5	27.21	b	B
7.0	26.31	b	B

3 结论与讨论

研究表明,在4种因素对酸樱桃组培苗玻璃化的影响程度上,蔗糖浓度、pH值、6-BA浓度的影响都达到了0.01水平显著,而琼脂浓度对组培苗玻璃化的影响不明显。其中,蔗糖浓度、pH值、6-BA浓度这3个因素的作用强弱依次为蔗糖浓度 > pH值 > 6-BA浓度。研究还表明,蔗糖浓度为20和30 g/L的处理对酸樱桃组培苗的玻璃化影响0.01水平显著;6-BA浓度为3.0和2.0 mg/L的处理对酸樱桃组培苗的玻璃化影响0.01水平显著;pH 6.5、6.0的处理对酸樱桃组培苗的玻璃化影响0.01水平显著。由此可见,酸樱桃组培苗玻璃化现象受多因素的影响,并不是由某一单因素决定。所以,在今后的组培工作中,应合理控制各因素水平,以达到降低玻璃化率的目的。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 梁海曼,周菊华.试管苗玻璃化现象的生理生化和机理讨论[J].武汉植物学研究,1994,12(3):281-287.

屯市的部分生态型按采集地点的远近又分为两小类,亲缘关系相近;而黑龙江省东部地区虎林市的杂草稻与吉林省东部的嫩化、安图杂草稻亲缘关系相近。

吉林的 2 个杂草稻品种聚为一小类说明遗传距离较近;黑、内的部分品种按采集地点的远近而又分为两小类;说明了亲缘关系的远近。

从遗传距离和聚类图的结果表明,15 个材料间遗传距离在 0.028~0.694,说明遗传差异较小,亲缘关系较近。

3 讨论

(1)研究利用 RAPD 技术对我国东北地区杂草稻以及栽培稻品种进行分析,在 DNA 水平上探讨了东北杂草稻的来源问题,为我国杂草稻的研究和利用提供了一定的分子水平的证据。RAPD 结果也表明,形态相似、地理分布相同或相近的物种聚类在一起。以遗传距离 0.5 为分界点将供试的 15 份材料分为三大类:第 1 类为杂草稻;第 2 类为普通粳稻生态型 10 号和 14 号;第 3 类为普通粳稻长粒型品种五优稻 15 号。

(2)在我国辽宁省也对其境内的杂草稻做过 RAPD 以及 SSR 分析,结论为杂草稻的多样性较低但群体间特别是地区间分化较大,优以丹东与沈阳两地之间的分化最为明显;此外韩国 Suh 等对来自世界各地的 152 份杂草稻样品进行了 14 个同工酶位点分析,并且对其中 24 个样品的 EST-10 位点、6 个 RAPD 位点、1 个叶绿体的 ORF-100 位点进行了分析,结果说明杂草稻存在粳型与籼型的分化。这一结论也被美国 Vaughan 等利用德克萨斯州、密西西比州、阿肯色州、路易斯安那州等 4 个州的杂草稻通过微卫星分子标记(SSR)研究得到证实。试验通过对东北地区杂草稻 RAPD 分析,详尽地得出东北地区杂草稻与栽培稻之间的亲缘关系。此外,在试验期间,找到了引物 S 67 在分子片段为 500 bp 左右可以将辽宁省的两个杂草稻与其他生态型杂草稻、普通稻区分开;以及引物 S 83 可以在碱基片段小于 564 bp 的位置将 13 个杂草稻按采集地区分;用引物 S 85 可以在大小片段为 2322 bp 处区分杂草稻与普通水稻。

(3)杂草稻的来源及防除问题仍是当今世界研究的主流,但对杂草稻的利用和开发报道较少。由于杂草稻经过长期的自然选择,适应性和抗逆性较强,如耐旱、耐淹、耐盐碱、

抗病虫等,有待于鉴定利用和开发。试验的 RAPD 结果也说明了东北杂草稻与栽培稻之间存在一定的特异性基因,这些特异性基因是否与杂草稻的外观形态以及抗逆性、落粒性、休眠性等一些生物学特性相关,仍需深入研究,目前笔者正对其盐碱抗性进行试验,其部分结果已表现出杂草稻的抗性突出。

(4)东北稻区自然生存多态性杂草稻(weedy rice)。据文献记载和实地考察,1994 年之前松花江灌区已经有了杂草稻,在灾害年可以把杂草稻为食。一些地方把杂草稻又称“假稻”、“赤稻”、“疯稻”等,有些研究人员为了便于区别南方杂草稻把北方杂草稻通称为“落粒粳”,说明杂草稻在东北地区繁衍的历史已超过 50 多年。由于东北地区还没有野生稻的历史,排除在当地野生稻与栽培稻种间自然异交产生杂草稻的可能性。是否东北地区有杂草稻(返祖变异)或是否通过引种(特别是南方加代繁育)从籼稻种植区域传播过来等问题,有望通过南北方不同生态型杂草稻资源的 DNA 指纹和遗传距离分析得到正确的答案。

参考文献

- [1] BAKER J B, SONNIER E A, SHREFLER J W. Integration of molinate use with water management for red rice (*Oryza sativa*) control in water-seeded rice (*Oryza sativa*) [J]. *Weed Sci*, 1986, 34: 916-922.
- [2] 许聰, 吴万春. 杂草稻的分类地位和利用途径探讨[J]. 海南大学学报, 1996, 14(2): 146-151.
- [3] SUH H S, SUH J P, AHN S N, et al. QTL analysis on cold tolerance at seedling stage of Korean weedy rice [J]. *Korean weedy rice*. *Korean J Breeding*, 1999, 31(4): 434-439.
- [4] 中国农业科学院作物品种资源研究所. 作物品种资源研究[M]. 北京: 农业出版社, 1984: 35-44.
- [5] 蒋荷, 季和标, 王象坤, 等. 江苏地方稻种资源酯酶同工酶分析初报[J]. 作物品种资源, 1989(4): 8-10.
- [6] TANG L H, MORISHIMA H. Characteristics of weed rice strains [J]. *rice genetics newsletter*, 1988(5): 70-72.
- [7] 蒋荷, 吴竞仑, 王根来, 等. 连云港稻种研究[J]. 作物品种资源, 1985(2): 4-7.
- [8] CHANG T T. Crop history and genetic conservation rice—a case study [J]. *Iowa State Journal of Research*, 1985, 59(4): 425-455.
- [9] SHARMA S D, SV SHASTRY. Taxonomic studies in Genus *Oryza* L. III. *O. rufipogon* Griff. *usu stricto* and *Onivara Sharma et Shastry nom. nov.* [J]. *Indian J Gene Pl Breed*, 1965, 25(2): 157-167.
- [10] SAMBLUK J. Molecular cloning a laboratory manual [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 1565-1590.
- [11] CHENG F S, BROWN S K, WEEDEN N F. A DNA extraction protocol from various tissues in woody species [J]. *HortScience*, 1997, 32(5): 921-922.

(上接第 32 页)

- [3] DEBERPH P C. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): Evaluation of deferent hypothesis to overcome vitrification with special reference to water potential [J]. *Physiol Plant*, 1981, 53: 181-187.
- [4] KEVERS C. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured in vitro [J]. *Physiol Plant*, 1984(61): 69-74.
- [5] 丰锋, 李红波, 谢建英. 芦荟组织培养中试管苗玻璃化的发生与防止 [J]. 西南农业大学学报, 2001, 23(5): 449-451.
- [6] 韩美丽, 陆荣生, 黄华艳. 绿巨人组织苗继代过程中玻璃化苗及细菌污染的消除方法研究 [J]. 广西林业科学, 1999, 28(1): 16-19.
- [7] 李任珠, 杨跃标. 美国芦荟离体培养中玻璃苗的复壮及快速繁殖的研究 [J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2001, 19(3): 240-245.

- [8] 饶雪琴, 张曙光. 番木瓜组织培养中玻璃化苗的发生与预防 [J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(3): 331.
- [9] 苏燕钿, 胡美蓉, 郭晓玲. 香蕉组培苗玻璃化现象成因之一——培养基 pH 值 [J]. 广西热带农业, 2005, 5: 13-18.
- [10] 张燕玲, 姚军, 王润珍, 等. 满天星植物培养中克服玻璃化现象的初探 [J]. 广西植物, 1997, 17(3): 246-248.
- [11] 韩美丽, 唐玉贵, 黄华艳. 神灯自掌组培苗体系的建立与玻璃化现象的控制 [J]. 广西林业科学, 2000, 29(3): 111-114.
- [12] 林宝山. 欧洲酸樱桃品种伊温斯引种栽培初报 [J]. 中国果树, 2005, 6: 36-37.

本刊提示 参考文献只列主要的、公开发表的文献, 序号按文中出现先后编排。著录格式(含标点)如下: (1) 期刊——作者(不超过 3 人者全部写出, 超过者只写前 3 位, 后加“等”)。文章题名 [J]. 期刊名, 年份, 卷(期): 起止页码。(2) 图书——编者。书名 [M]. 版次(第一版不写)。出版地: 出版者, 出版年: 起止页码。(3) 论文集——析出文献作者。题名 [C]//主编。论文集名。出版地: 出版者, 出版年: 起止页码。