

百里香组织培养中克服玻璃化现象的初探*

魏 艳, 赵惠恩*

(北京林业大学园林学院, 北京 100083)

摘要: 通过用聚丙烯封口膜转接玻璃化苗, 以及将玻璃化苗放在自然光下进行处理, 和在培养基中加入不同浓度的糖、琼脂、细胞分裂素(6-BA)进行正交试验3种处理, 得出百里香玻璃化苗的最佳逆转方式是, 将其接入培养基为 MS + 6-BA 1.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L + 10 g/L 琼脂 + 50 g/L 蔗糖的培养基中进行逆转培养, 逆转率为 66.7%。

关键词: 百里香; 玻璃化; 逆转

中图分类号: S603.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-3575(2007)02-0205-04

A PRELIMINARY STUDY ON THE TISSUE CULTURE TO OVERCOME THE VITRIFICATION OF *Thymus serpyllum* L. var. *mongolicus*

WEI Yan ZHAO Hui-en

(College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, 100083, P. R. China)

Abstract: Effect of polypropylene sealing material, illumination, media containing different phytohormones and natural substances on the the vitrification of plantlets of thymes was studied by orthogonal design. The experimental results showed that sugar is the main factor in reversing the vitrification and the best media for controlling vitrification of thyme plantlet with the reversion rate is up to 66.7% is MS + 6-BA 1.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L + 10 g/L agar + 50 g/L sugar.

Key words: *Thymus serpyllum* L. var. *mongolicus*; vitrification reversion

百里香(*Thymus serpyllum* L.)唇型科,百里香属,多年生矮小半灌木或草本,有强烈香气^[1]。目前,主要用于芳香植物提取香精以及药用,近年来经过研究发现适合作为屋顶绿化材料和生态修复先锋植物。因此,采用组织培养技术加速百里香扩繁是必需的,但在组培过程中发现,百里香试管苗玻璃化现象严重,严重降低了组培的效率。本文针对百里香组培过程中出现的玻璃化现象,从研究培养基的细胞分裂素、糖、琼脂浓度、培养瓶和光照几个不同的方面找寻百里香玻璃苗的逆转方法。

1 材料与方法

1.1 材料

取已经完全玻璃化了的试管苗作为研究材料。

1.2 方法

1.2.1 封口膜对百里香玻璃化的作用 百里香组培过程中用的是拧盖的玻璃瓶,瓶内外气体交换困难,湿度过高,有害气体积累,氧气供应不足,光合受阻,极易出现玻璃化^[2],故采用三角瓶用聚丙烯塑料膜封口,将已经玻璃化的百里香试管苗转接到三角瓶中,培养基采用百里香增殖最优培养基 MS + 6-BA 1.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L。处理 15 瓶,温度(24±1)℃,光照时间每天 12 h,光照度 3 600 Lux,培养 7d,15d,30d 后,观察记录玻璃化逆转情况。

1.2.2 光照对百里香玻璃化的作用 自然光照对玻璃化也有抑制作用,玻璃苗放于自然光下几天后茎、叶变红,玻璃化逐渐消失^[2]。试验选择玻璃化的百里香试管苗 15 瓶放于自然光下培养。处理 15 瓶,温度(24±1)℃,培养 7d,15d,30d 后,调查记录

* 收稿日期: 2007-04-10
基金项目: 北京林业大学自选课题资助项目(05jio59)
作者简介: 魏艳,女,硕士研究生,主要从事植物组织培养的研究。
* 通讯作者: E-mail: lzhaohuie@bjfu.edu.cn

玻璃化逆转情况。

1.2.3 不同浓度的激素、糖、琼脂对于百里香玻璃化的作用 利用固体培养基,增加琼脂浓度^[3-5],选择适当的碳源,提高培养基中蔗糖含量^[6,7],从根本上降低培养基中的渗透势,造成细胞吸水阻遏,减少培养基中植物材料可获得的水分,因而可明显降低观赏植物试管苗玻璃化现象。同时,培养基中 BA 是导致试管苗玻璃化的 1 个重要原因^[8-14],选择搭配合适的激素,适当降低培养基中 BA 的浓度均可减轻玻璃苗的出现。

根据以上,试验在原有最优增殖培养基:MS + 6-BA 1.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L + 6 g/L 琼脂 + 30 g/L 蔗糖的基础上,采用正交设计,设置琼脂、糖、激

素 3 个因素,每个因素各 3 个水平(表 1),共 9 种不同的玻璃化逆转培养基(表 2)。每个处理 15 瓶,培养温度为(24±2)℃,空气湿度,光照 3 600 Lux,光质为荧光灯,每日光照 15h。7d,15d,30d 观察记录逆转瓶数,计算逆转率,正交试验找出最佳的逆转培养基。在试验基础上,得出最佳逆转培养基的逆转率。

表 1 正交试验因子与水平

Tab. 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	琼脂(g/L)	蔗糖(g/L)	激素 6-BA (mg/L)
1	6	30	1.5
2	8	40	1.0
3	10	50	0.5

表 2 百里香玻璃化逆转培养基

Tab. 2 The reversion vitrification culture medium of *Thymus serpyllum* L. var. *mongolicus*

编号	培养基成份
1	MS + 6-BA1.5mg/L + IBA0.1mg/L + 30g 蔗糖 + 6g 琼脂
2	MS + 6-BA1.0mg/L + IBA0.1mg/L + 30g 蔗糖 + 8g 琼脂
3	MS + 6-BA0.5mg/L + IBA0.1mg/L + 30g 蔗糖 + 10g 琼脂
4	MS + 6-BA1.0mg/L + IBA0.1mg/L + 40g 蔗糖 + 6g 琼脂
5	MS + 6-BA0.5mg/L + IBA0.1mg/L + 40g 蔗糖 + 8g 琼脂
6	MS + 6-BA1.5mg/L + IBA0.1mg/L + 40g 蔗糖 + 10g 琼脂
7	MS + 6-BA0.5mg/L + IBA0.1mg/L + 50g 蔗糖 + 6g 琼脂
8	MS + 6-BA1.5mg/L + IBA0.1mg/L + 50g 蔗糖 + 8g 琼脂
9	MS + 6-BA1.0mg/L + IBA0.1mg/L + 50g 蔗糖 + 10g 琼脂

2 试验结果

2.1 封口膜对百里香玻璃化的作用

试验表明,在转接到三角瓶里 7d 以后,15 瓶中有 3 瓶逆转成功;15d 再记录,发现逆转成功 5 瓶,剩余的 10 瓶中有 7 瓶一半逆转,3 瓶未见变化;30d 观察,完全逆转的有 5 瓶,7 瓶逆转一半,2 瓶褐化,1 瓶未见变化,逆转率 33%。

2.2 光照对百里香玻璃化的作用

试验表明,放于自然光下 7d 以后未见变化,15d 后,有 1 瓶逆转成功,30d 后,有 3 瓶逆转成功,剩余未见变化,1 瓶褐化,逆转率 20%。

2.3 不同浓度的激素、糖、琼脂对于百里香玻璃化的作用

表 3 不同浓度的激素、糖、琼脂相互作用对百里香玻璃化的影响

Tab. 3 Effect of different concentration of hormone sugar and agar

编号	7d 逆转数(瓶)	15d 逆转数(瓶)	30d 逆转数(瓶)	30d 褐化(瓶)	逆转率(%)
1	1	4	4	1	20.0
2	1	3	4	0	26.7
3	3	6	7	3	26.7
4	1	3	7	4	20.0
5	1	2	9	5	26.7
6	2	4	11	3	53.3
7	0	2	6	1	33.3
8	1	4	8	2	40.0
9	6	11	14	9	40.0

试验发现,在 15d 的时候,9 号培养基逆转瓶数最高,其次是 3 号和 6 号。但是到 30d 后再观察,发现之前逆转成功的试管苗开始出现褐化现象,各组均有不同程度的褐化,最为严重的是 9 号,褐化了 11 瓶,其次是 5 号,导致完全逆转的瓶数减少,逆转率下降。上表的试验结果直观的表明,逆转率最大的是 6 号,达到峰值 53.3%。下面进行极差分析。

表 4 不同浓度的激素、糖、琼脂相互作用对百里香玻璃化影响的极差分析
Tab.4 Analysis of different concentration of hormone sugar and agar

	I 琼脂(g)	II 蔗糖(g)	III 6-BA(mg/L)	结果逆转率(%)
1	6	30	1.5	20.0
2	8	30	1.0	26.7
3	10	30	0.5	26.7
4	6	40	1.0	20.0
5	8	40	0.5	26.7
6	10	40	1.5	53.3
7	6	50	0.5	33.3
8	8	50	1.5	40.0
9	10	50	1.0	40.0
K1	73.4	63.3	123.3	Σ652.1
K2	100	93.4	86.7	
K3	113.3	120	86.7	
X1(平均值)	24.5	21.1	41.1	
X2	33.3	31.1	28.9	
X3	37.8	40.0	28.9	
R(极差)	13.3	19	12.2	

由上表可以看到,第 2 因素(蔗糖)的极差最大(19),其次是第 2 因素(琼脂,15.4),说明蔗糖浓度对玻璃化影响最大,其次是琼脂的浓度。从平均值看,第 1 因素的第 3 水平最好,第 2 因素的第 3 水平最好,第 3 因素的第 1 因素最好。也就是说,各种因素的最好搭配时 I₃ II₃ III₁,即在培养基内加入 10g/L 的琼脂和 50g/L 的蔗糖和 1.5mg/L 的 6-BA。

试验总结,由下表可以看出,几种处理方式中,将百里香玻璃化苗转接到 MS + 6-BA 1.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L + 10 g/L 琼脂 + 50 g/L 蔗糖的培养基中,最为有效,逆转率达到 66.7%。

表 5 不同处理对玻璃化苗逆转率的对比
Tab.5 The reversion rate contrast of various methods on the of vitric plants

处 理	天数(d)	逆转率(%)
聚氯乙烯封口膜	30	33
自然光	30	20
MS + 6-BA 1.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L + 10 g/L 琼脂 + 50 g/L 蔗糖	30	66.7

3 讨论

在玻璃化逆转试验中,发现 15d 后逆转成功的试管苗在 30d 后产生褐化,有的逆转成功后褐化一半,有的全部褐化,最严重的 1 组褐化率达到了 57%,严重影响了逆转率。分析原因可能是百里香组织中含有某些酚类物质,由于酪氨酸酶或多酚氧

化酶的氧化作用,产生醌类物质抑制氧化的结果。以后可采用抗氧化剂如半光氨酸处理以延缓酚氧。也可直接加入 10 mg/L ~ 50 mg/L,在切割或处理材料时,可在含抗氧化剂 50 mg/L ~ 100 mg/L 的溶液中进行,也有人加入 1 % ~ 2 % 的活性炭以防抑制物质的积累。

参 考 文 献:

- [1] 内蒙古植物志编辑委员会. 内蒙古植物志(第八卷) [M]. 内蒙古人民出版社, 1985.
- [2] 李娅莉, 张健, 潘远智. 观赏植物组织培养过程中玻璃化现象与解决措施进展[J]. 四川农业大学学报, 2004, 9(3): 278 - 282.
- [3] 韩美丽, 唐玉贵, 黄华艳. 神灯白掌组培再生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.
- [4] 周莉娟, 姜秀勇. 影响香石竹组培苗玻璃化现象的若干因素[J]. 福建农业学报, 1999, (14): 102 - 106.
- [5] 张晓军. 香石竹离体快繁过程中玻璃化现象的研究[J]. 牡丹江师范学院学报, 1999, (2): 14 - 15.
- [6] 张敏, 张曙光, 孙红绪, 等. 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.
- [7] Langford P J, Wainwright H. Influence of sucrose concentration on the photosynthetic ability of in vitro grown rose shoots[J]. Acta Horticult urae, 1988, 227, 305 - 310.
- [8] 王爱勤, 何龙飞, 裴润梅, 等. 组培条件对不同品种芦荟试管苗玻璃化的影响[J]. 中国农学通报, 2002, 18(5): 46 - 52.
- [9] 周菊华, 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.
- [10] 吴若箫, 尤华明, 彭东辉. 香石竹组培苗玻璃化控制的研究[J]. 福建林学院学报, 1995, 15(4): 360 - 363.
- [11] 王春彦, 高年春, 张效平, 等. 非洲菊组织培养工厂化育苗关键技术研究[J]. 南京农专学报, 2003, 19(2): 32 - 42.
- [12] 丰锋, 李洪波, 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.
- [13] 韩美丽, 陆荣生, 黄华艳. 绿巨人组培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.
- [14] 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.
- [15] 续九如, 黄智慧. 林业试验设计[M]. 中国林业出版社.
- [16] 金青, 蔡永萍, 文汉, 等. 利用正交法筛选试管米麻增殖生长的培养[J]. 安徽农业大学学报, 2004, 31(2): 219 - 222.