

降低黄芩再生苗玻璃化率及其生根的研究

韩淑兰 王慧梅* 张 丹

(东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室 哈尔滨 150040)

摘 要 为了降低黄芩组培苗的玻璃化率并提高其生根率,本研究以黄芩无菌苗茎段诱导的不定芽为实验材料,分别研究了 6-苄基嘌呤(6-BA)、蔗糖、琼脂及多效唑(PP333)等组培条件对黄芩不定芽玻璃化的影响以及吲哚丁酸(IBA)对再生苗生根的影响。研究结果表明:低浓度的 6-BA 有利于降低不定芽的玻璃化率,当培养基中添加 $0.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 时,不定芽的玻璃化率最低且增殖系数比对照增加 1 倍。随着培养基中蔗糖浓度的升高,不定芽的玻璃化率显著降低,其增殖系数也有所降低。培养基中蔗糖浓度为 $25\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,黄芩不定芽长势最好且玻璃化率为零,增殖系数也最高。培养基中添加 $7.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的琼脂,不定芽的玻璃化率较低,增殖系数也较高。培养基中添加多效唑(PP333)有利于缓解黄芩再生不定芽玻璃化状态,随着 PP333 的浓度增加,玻璃化率也逐渐降低。 $0.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PP333 对黄芩不定芽的壮苗起到了很好的作用,再生苗明显变得粗壮。 $0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IBA 最有利于黄芩再生苗的生根,生根率为 100%,平均生根数为 7,移栽成活率达 95% 以上。

关键词 黄芩 不定芽 玻璃化 生根

中图分类号:Q949.777.6 文献标志码:A doi:10.7525/j.issn.1673-5102.2016.01.013

Decreasing the Hyperhydricity and Rooting of *Scutellariae baicalensis* Georgi

HAN Shu-Lan WANG Hui-Mei* ZHANG Dan

(Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Northeast Forestry University, Harbin 150040)

Abstract For reducing hyperhydric rate and improving rooting percentage of in vitro regenerated shoots from *Scutellariae baicalensis* Georgi, with the regenerated shoots induced from aseptic seedling stems, we studied the effect of N^6 -Benzyladenine (6-BA), sucrose, agar and paclobotrazol (PP333) on hyperhydricity of regenerated shoots in *S. baicalensis* and the effects of IBA on rooting of regenerated shoots. The hyperhydric rate significantly decreased with lower 6-BA concentration on the medium. The lowest hyperhydric rate and the highest multiplication rate were on the medium containing $0.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA. With the sucrose concentration increasing, the hyperhydric rate of *S. baicalensis* adventitious shoots was reduced, while their multiplication coefficient was also reduced. The best multiplication coefficient in vitro shoots without hyperhydricity were found on the medium containing $25\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose. On the medium containing $7.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ agar, the hyperhydric rate of *S. baicalensis* adventitious shoots was the lowest with higher proliferation coefficient. The medium containing PP333 positively affected the hyperhydric occurrence of regenerated shoots. With the increase of PP333 concentration on the medium, the hyperhydric rate was decreased gradually and in vitro shoots were stronger and healthier. The optimal rooting was got from the medium containing $0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA, with the rooting rate of 100% and seven roots per shoot. The survival rate of rooting plantlets was over 95% after transferred to soil.

Key words *Scutellariae baicalensis* Georgi; adventitious shoots; hyperhydricity; rooting

黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)为唇形科 是我国常见药用植物之一^[1]。具有清热燥湿、解毒、止血和安胎的功效^[2]。其提取物黄芩苷和黄芩

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金(DL13EA03-03)和国家自然科学基金(31100457)资助
第一作者简介:韩淑兰(1989—),女,硕士研究生,主要从事植物组织培养及其次生代谢产物研究。
* 通信作者 E-mail:whm0709@163.com
收稿日期:2015-09-22

素均具有抗炎、抗病毒、抗菌和抗肿瘤的作用^[3]。因此,国内外对黄芩中药材需求量日益加大。但是我国野生黄芩资源由于过度使用,导致其产量日趋下降,人工栽培已成为目前黄芩生产的主要途径^[4],但人工栽培受时间、季节及病虫害的限制,而植物组织培养离体繁殖技术能够在短时间内繁殖出生长速度快、次生代谢产物含量高的优良无性系^[5],可以很好地解决黄芩资源紧缺的问题。我们已经建立了黄芩组织培养再生系统,在黄芩的不定芽继代增殖研究中发现,黄芩的不定芽很容易发生玻璃化现象。玻璃化是一种植物在试管环境离体繁殖过程中发生的一种生理和形态异常的状态^[6]。这种异常状态导致再生苗的正常生长能力下降,造成再生苗组织具有不可逆转的伤害和变化^[7],严重阻碍了组培苗的正常生长及快速繁殖。所以在组织培养体系中如何克服再生苗的玻璃化尤为重要。

许多研究报道了试管苗玻璃化的影响因素和控制方法^[8~10],但由于植物种类的不同,玻璃化的控制方法也不尽相同。有些研究表明玻璃化的发生与许多影响因素有关,例如过剩的营养、高浓度的生长调节剂和相对湿度以及培养基过多的水分等^[11~12],但其诱发机理至今尚无定论。有研究认为培养基中过多的细胞分裂素会促进细胞过度分裂,还可以使细胞体积加大,增加细胞壁的可塑性,细胞壁松弛,使得细胞吸水扩大,表明细胞分裂素等内源激素的调节与玻璃化有直接关系^[8,13]。Kataeva, et al^[8]通过对茶树(*Camellia sinensis*)试管苗玻璃化的控制试验研究中表明降低培养基中细胞分裂素(6-BA)的浓度有利于促进试管苗正常生长和玻璃化状态的恢复。同时适宜浓度的琼脂、蔗糖、铵离子等也是组培苗玻璃化的主要影响因素^[6,10,14~15]。另外有研究表明多效唑(PP333)是一种高效、低毒的植物生长延缓剂和广谱性杀菌剂^[16],在组培培养基中附加一定量的多效唑有利于减缓玻璃化的发生,并且有很好的壮苗效果,使植株生长健壮,叶色浓绿,易于生根移栽^[17]。不定根的形成是组织培养过程中一个非常关键环节,它直接影响到组培苗移栽成活率的高低,关系到组织培养成败。生长素通常用于不定根的诱导,已经证明在大多数植物中 IBA 对不定根的诱导作用效果最好^[18]。因此本研究也研究了 IBA 对黄芩再生苗生根的影响。

本研究对可能影响黄芩再生苗玻璃化的因素

进行了分析,目的是降低黄芩组培苗的玻璃化率,提高增殖系数,同时对黄芩再生苗的生根进行了研究,为黄芩组培苗的快速繁殖打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

以黄芩盆栽 2 个月的实生苗茎段为外植体,诱导愈伤组织,剪取黄芩茎段于 75% 酒精中杀菌 30 s,然后用无菌水清洗 2 遍,再用 3% 的 NaClO 消毒 2 min,无菌水清洗 3 遍,滤纸吸干茎段表面水分,剪成 1 cm 左右的茎段于 MS + 6-BA 1.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.5 mg · L⁻¹ 的培养基上。25 d 后,将愈伤组织转入分化培养基中(MS + 6-BA 0.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.5 mg · L⁻¹),待再生芽长到 1 cm 左右时转到继代增殖培养基 MS + 6-BA 0.5 mg · L⁻¹,蔗糖 20 g · L⁻¹,琼脂 7 g · L⁻¹ (pH5.8 ~ 6.0) 进行继代增殖培养,所获得的生长一致的再生芽用于本次实验。

1.2 不同因素对黄芩苗玻璃化的影响

1.2.1 细胞分裂素 6-BA 的影响

将黄芩再生不定芽接种在 MS 继代培养基上(蔗糖 20 g · L⁻¹,琼脂 7 g · L⁻¹),添加不同浓度的 6-BA(0、0.2、0.5、1.0 mg · L⁻¹)。

1.2.2 蔗糖浓度的影响

在 MS 继代培养基中分别添加不同浓度的蔗糖(10、20、25、30 g · L⁻¹)。

1.2.3 琼脂浓度的影响

在 MS 继代培养基中添加不同浓度琼脂分别为(6、7、7.5、8 g · L⁻¹)。

30 d 后计算其增殖系数和玻璃化率。

1.3 多效唑(PP333)对黄芩玻璃化和壮苗的影响

将幼小黄芩再生芽接种在 MS 继代培养基上,以前面获得的 3 个最适的培养条件为基础,加蔗糖 25 g · L⁻¹,琼脂 7.5 g · L⁻¹,6-BA 的浓度为 0.2 mg · L⁻¹,另添加不同浓度的 PP333(0、0.2、0.5、1.0 mg · L⁻¹)。30 d 后观察黄芩再生芽的玻璃化率和壮苗效果。

1.4 黄芩组培苗的生根实验

取生长状态良好,茎秆粗壮,节间长的黄芩苗,剪去其基部,接种在 1/2MS 培养基上,添加不同浓度 IBA(0、0.05、0.1、0.2、0.5 mg · L⁻¹),两周后统计其生根率和生长状态。

1.5 黄芩组培苗的室外移栽

在生根培养基上培养两周后,将根系发育正

常且生长健壮的生根黄芩再生苗从培养基中取出,用自来水冲洗掉琼脂,移栽到温室含有沙子:土=1:1的基质中。在移栽前两周,生根组培苗用塑料布进行遮阴处理,以防止水分散失,造成小苗枯萎。以后逐渐打开塑料布,4周后,统计移栽成活率。

以上实验均每个处理取黄芩再生苗20株,3次重复。培养条件:培养室内温度为(25±1)℃,光照强度为1500~2000 lx,光周期16/18 h。

1.6 数据统计与分析

采用Excel 2013计算实验数据,对于符合二项分布的数据中小于30%和大于70%的百分率(p)资料,采用反正弦数据转换[$\text{ARCSIN}(P)/2$];对于为0的百分率(p)资料,则采用(p+1)的反正弦转换[$\text{ARCSIN}(p+1)$]。用SPSS17.0软件对转换数据进行统计分析,Duncan多重比较法对数据进行比较分析($P\leq 0.05$),最后将处理的反正弦转换数据的平均数再转换回百分数数据,以用于结果分析。并按以下公式计算:

$$\text{玻璃化苗率} = \frac{\text{玻璃化的苗数}}{\text{生长的苗数}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{增殖系数} = \frac{\text{增殖后的苗数} - \text{接种的苗数}}{\text{接种的苗数}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{生根率} = \frac{\text{接种的植株} - \text{未生根的植株}}{\text{接种的植株}} \times 100\% \quad (3)$$

$$\text{移栽成活率} = \frac{\text{移栽的苗数} - \text{未成活的苗数}}{\text{移栽的苗数}} \times 100\% \quad (4)$$

2 结果与分析

2.1 不同培养条件对黄芩再生苗玻璃化的影响

2.1.1 不同浓度细胞分裂素6-BA的影响

从表1可以看出,以MS为基本培养基,当培养基中6-BA的浓度为0时,再生苗无玻璃化现象,但是其增殖率非常低,仅为2.9%。当培养基中添加6-BA后,随着6-BA浓度的提高,不定芽的增殖率明显提高,同时玻璃化率也明显提高。当6-BA的浓度增加至 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,不定芽的增殖系数为5.95,但玻璃化率增至53%,再生芽呈水浸状,玻璃化严重(如图1A),可见高浓度6-BA明显增加了黄芩再生芽的玻璃化率。和6-BA $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的处理相比,6-BA $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的处理中,虽然再生芽的增殖率有所降低,为5.41,但玻璃化率明显的降低,为2.5%,而且苗的生长状态良好,叶片舒展深绿,茎秆粗壮(如图1B)。

表1 6-BA对黄芩再生苗玻璃化率的影响
Table 1 Effect of 6-BA on hyperhydricity of *S. baicalensis* in vitro

6-BA 浓度 6-BA concentration ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	处理数(株) The treatment number	增殖系数 Proliferation coefficient (%)	增殖系数反正弦转换值 Arcsine transformation of proliferation coefficient	玻璃化率 Hyperhydric rate(%)	玻璃化率反正弦转换值 Arcsine transformation
0.00	60	2.90	9.80c	0.00	0.00d
0.20	60	5.41	13.45a	2.50	9.10c
0.50	60	5.70	13.81b	21.00	27.27b
1.00	60	5.95	14.11a	53.00	46.72a

注:对于符合二项分布的百分数中小于30%和大于70%的百分率(p)资料,采用反正弦数据转换[$\text{ARCSIN}(P)/2$];对于为0的百分率(p)资料,则采用(p+1)的反正弦转换[$\text{ARCSIN}(p+1)$]。采用Duncan检测方法($P\leq 0.05$),小写字母不相同者表示差异显著($P\leq 0.05$),小写字母相同者表示差异不显著($P>0.05$),下同。
Note: For data of percentages(p) that meet the binomial distribution is less than 30% and greater than 70%. The [$\text{ARCSIN}(P)/2$] was used for transformation. The percentage of $(p+1)$ was transformed to [$\text{ARCSIN}(p+1)/2$]. According to Duncan's test($P\leq 0.05$), Different small letters indicate significant differences in treatment($P\leq 0.05$). The same letters indicate no significant difference in different treatment($P>0.05$). The same as below.

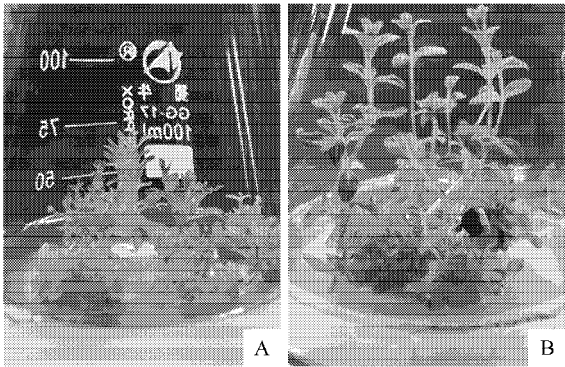


图1 黄芩玻璃化苗(A)和黄芩正常苗(B)
Fig.1 Hyperhydric shoot(A) and the normal shoot(B) of *S. baicalensis*

2.1.2 不同浓度蔗糖的影响

从表2可以看出,随着培养基中蔗糖浓度的升高,再生苗玻璃化率降低,从14.8%降至0。而在 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的处理中,虽然玻璃化率为0,其增殖系数较低,为4.8。在蔗糖浓度为 $25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的处理中,增殖系数较高且与 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的差异性显著,为5.4;玻璃化率也最低,为0。因此选择 $25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的蔗糖浓度为黄芩再生苗的继代增殖培养的最佳浓度。

表 2 蔗糖浓度对黄芩再生苗玻璃化率的影响

Table 2 Effect of sucrose concentration on hyperhydricity of *S. baicalensis* in vitro

蔗糖浓度 Sucrose concentration (mg · L ⁻¹)	处理数(株) The treatment number	增殖系数 Proliferation coefficient (%)	增殖系数反正弦转换值 Arcsine transformation of proliferation coefficient	玻璃化率 Hyperhydric rate(%)	玻璃化率反正弦转换值 Arcsine transformation
10	60	5.5	13.56a	14.80	22.63a
20	60	5.2	13.18b	1.00	5.73b
25	60	5.4	13.44a	0.00	0.00c
30	60	4.8	12.65c	0.00	0.00c

2.1.3 不同浓度琼脂的影响

从表 3 中可以看出,随着 MS 培养基中琼脂浓度的增加,黄芩再生苗的玻璃化率显著地降低。当培养基中的琼脂浓度达到 8 g · L⁻¹ 时,再生苗的玻璃化率为 0,增殖系数也有所降低。而在 7.5 g · L⁻¹ 的处理中,取得了最佳效果,增殖系数最高,为 5.4,且玻璃化率也较低,为 0.8%。因此 7.5 g · L⁻¹ 的琼脂浓度适于黄芩再生苗的继代增殖培养。

表 3 琼脂浓度对黄芩再生苗玻璃化的影响

Table 3 Effect of agar concentration on hyperhydricity of *S. baicalensis* in vitro

琼脂浓度 Agar concentration (mg · L ⁻¹)	处理数(株) The treatment number	增殖系数 Proliferation coefficient (%)	增殖系数反正弦转换值 Arcsine transformation of proliferation coefficient	玻璃化率 Hyperhydric rate(%)	玻璃化率反正弦转换值 Arcsine transformation
6.00	60	4.40	11.54b	15.00a	22.78a
7.00	60	5.30	13.31a	7.00b	15.34b
7.50	60	5.40	13.43a	0.80c	1.62c
8.00	60	5.00	12.92c	0.00d	0.00d

表 4 不同浓度 PP333 对黄芩再生苗的生长和玻璃化率的影响

Table 4 Effect of PP333 concentration on growth and hyperhydricity of *S. baicalensis* in vitro

PP333 浓度 PP333 concentration (mg · L ⁻¹)	处理前苗平均茎高 Average height of stems before treatment (cm)	25 d 后苗平均茎高 Average height of stems after 25 d (cm)	玻璃化率 Hyperhydric rate(%)	玻璃化率反正弦转换值 Arcsine transformation of hyperhydric rate	生长状况 Growth condition
0.00	1.96	9.40b	4.00	11.53a	植株高,叶色绿,茎秆细长 The high plantlets with green leaves and thin and long stems
0.20	2.02	10.70a	2.30	8.72b	植株高,叶色绿,茎秆较粗壮 The high plantlets with high and green leaves and strong stems
0.50	2.03	5.90c	1.20	6.29c	植株较矮,叶色浓绿,茎秆较粗壮 A little short plantlets with dark green leaves and strong stems
1.00	2.08	4.50d	0.00	0.00d	植株矮小,叶色浓绿,茎秆粗壮 The short plantlets with dark green leaves and strong stems
1.50	2.02	3.50e	0.00	0.00d	植株矮小,叶色浓绿,茎秆粗壮 The short plantlets with dark green leaves and strong stems

2.2 不同浓度 PP333 对黄芩再生苗生长和玻璃化率的影响

黄芩再生苗在继代增殖过程中,通常长得细长,不利于生根移栽,而且仍有玻璃化苗的存在。在本研究中发现,添加一定量的多效唑(PP333)不仅对黄芩再生苗有明显的壮苗效果,对抑制玻璃化也有一定作用。由表 4 可知,当培养基 PP333 浓度为零时,其玻璃化率为 4%,而随着 PP333 浓度的升高,黄芩再生苗玻璃化率逐渐降低且生长越来越茁壮。但是,高浓度的多效唑(PP333)对黄芩再生苗的矮化作用过于显著,当添加 1.0、1.5 mg · L⁻¹ 的 PP333 的再生苗不但植株矮小且节间短,同样不利于黄芩苗的生根。而添加 0.2 mg · L⁻¹ 的 PP333 黄芩再生苗平均茎高较高,为 10.7 cm,且玻璃化率较低,为 2.3%,与对照组相比不但改善了再生苗的玻璃化状态,而且壮苗的效果极为显著,茎秆粗壮,节间长,且叶片颜色浓绿(图 2),明显改善了黄芩再生苗的质量。

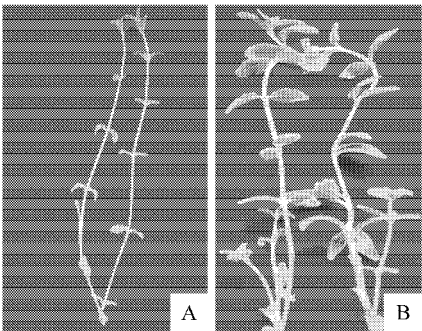


图 2 对照苗(A)和 0.2 mg · L⁻¹ PP333 处理后的苗(B)

Fig. 2 The control shoots(A) and the stronger shoots (B) after treatment by 0.2 mg · L⁻¹ PP333 of *S. baicalensis*

2.3 IBA 对黄芩再生苗生根的影响

由表 5 可知 较低浓度的 IBA($<0.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 对黄芩再生苗的生根起到了明显地促进作用。在 IBA $0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的处理中 ,取得了最佳的生根效果 ,生根率为 100% ,平均生根数为 7。随着 IBA 浓度的升高 ,IBA 对生根起到了明显的抑制作用。当培养基中 IBA 的浓度为 $0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 ,对黄芩再生苗的生根起到了完全的抑制作用 ,生根率为 0 ,再生苗的基部长出了明显的愈伤组织。可见低浓度的 IBA 有促进黄芩再生苗的生根的作用 ,而高浓度的 IBA 有抑制作用。玻璃化逆转后的黄芩再生苗生长状态良好 ,叶色浓绿 ,茎秆粗壮 ,节间长 ,易生根(图 3)。

表 5 IBA 对黄芩再生苗的生根的影响
Table 5 Effect of IBA concentration on rooting of *S. baicalensis* in vitro

IBA 浓度 IBA concentration ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	生根率 Rooting rate (%)	生根率的 反正弦转换值 Arcsin transformation of rooting rates	根条数(条/株) The number of roots(strip/plant)	根的状态 The state of root growth
0.00	90.00	71.56c	5bc	细长 Slender
0.05	93.00	74.65b	6b	细长 Slender
0.10	100.00	90.00a	7a	粗长 Thick long
0.20	86.70	68.61d	4c	粗短 Thick short
0.50	0.00	0.00e	0d	愈伤状态 Basal callus status

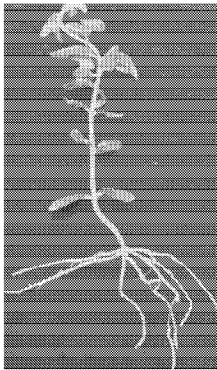


图 3 黄芩生根苗

Fig.3 Rooting shoot of *S. baicalensis*

2.4 黄芩再生苗生根后移栽

挑选生长比较健壮 ,根系发育正常的生根黄芩再生苗进行移栽 ,发现只要在前两周组培苗周围保持相对较高湿度($\text{RH} < 80\%$) ,黄芩组培苗很容易移栽成活并保持旺盛生长 ,移栽成活率达 95% 以上。

3 讨论

植物组织培养离体繁殖技术已成为许多资源匮乏的药用植物快速繁殖的一条主要途径 ,但是植物组织培养过程中再生苗出现玻璃化现象是非常普遍的生理性病变 ,草本植物更易出现玻璃化^[19]。玻璃化被认为是在组织培养过程中的一种形态和生理的紊乱 ,是对组培环境中各种生理生化因素的反应^[6,20]。在组织培养过程中 ,一旦形成玻璃化苗 ,其增殖系数会明显下降 ,不利于继代和生根培养 ,其再生能力和移栽成活率都受其严重阻碍^[21]。所以如何降低玻璃化率和提高增殖系数在一些物种的组织培养中已成为非常关键的问题。一些研究学者认为玻璃化与外界培养环境和内源激素调节有密切的关系^[6,10,22~23]。Ivanova and Van Staden^[10]曾报告添加适量的铵离子、琼脂和细胞分裂素可减少多叶芦荟(*Aloe polyphylla*)组培苗的玻璃化现象 ;王庭辉和马晖玲^[15]研究了蔗糖、琼脂、细胞分裂素的浓度和光照强度对紫苜蓿试管苗玻璃化的影响 ,结果表明适当增加蔗糖和琼脂浓度可降低玻璃化率 ,添加少量 6-BA ,NAA ,光照强度为 $1\,000 \sim 12\,000\text{ lx}$ 可有效降低紫苜蓿再生苗玻璃化现象。Wang 等^[24]报道说通过添加稀土元素减少了组培过程中的玻璃化现象。可见 ,培养环境对组培苗的玻璃化现象有显著的控制作用。

本研究表明 ,添加适量的细胞分裂素(6-BA)、蔗糖和琼脂可有效抑制黄芩再生苗的玻璃化现象 ,并且提高其增殖能力。6-BA 是组培再生苗可从培养基中迅速吸收的细胞分裂素 ,它对于组培再生苗玻璃化的影响有着显著的作用^[8]。由本实验结果显示黄芩再生苗的增殖系数和玻璃化率会随着 6-BA 浓度的增加而不断提高。当添加低浓度的 6-BA($0.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)能有效增加再生苗的繁殖数量 ,且玻璃化率较低 ,再生苗的生长状态良好 ,叶色绿。而添加高浓度的 6-BA($1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)会使玻璃化率显著增高 ,此结果与 Ivanova and Van Staden^[10]的研究结果一致。其原因可能是高浓度的细胞分裂素促使黄芩再生苗的细胞增殖 ,产生更多的不定芽 ,但是由于细胞分裂过快 ,生长迅速 ,新生成的细胞没有形成完好的细胞壁 ,其在高湿度的微环境中 ,导致过量水分进入细胞 ,因此诱导新分裂的细胞肿大且液泡化 ,从而引起玻璃化现象(图 1A)。所以降低培养基中细胞分裂素的

含量有利于降低玻璃化率。王庭辉和马晖玲^[15]认为在培养基中增加蔗糖和琼脂浓度可以在一定程度上减少紫苜蓿(*Medicago sativa*)组培苗玻璃化的发生。在本研究结果中随着蔗糖浓度的不断升高虽降低了玻璃化的产生,但是黄芩再生苗的增殖系数也降低了,而加入适量的蔗糖时,苗的增殖系数较高且玻璃化率最低。有研究表明蔗糖为植物新陈代谢过程中提供碳源,所以适量的蔗糖能使植物代谢正常,有利于其分化和生长^[25],而过量的碳源会使其代谢负重,增殖率下降甚至出现苗的萎蔫干黄的现象^[26]。所以添加适宜浓度的蔗糖对于再生苗的生长与繁殖至关重要。对于不同的植物添加的量不同,这可能是因植物不同而异^[15 17 26]。另外,培养基中较高的相对湿度会使植物体内乙烯产量增加,从而影响再生苗的木质化程度,也会使植物组织吸收水分能力增加,过多吸收水分后,会产生玻璃化细胞^[27]。所以在培养基中增加一定量的琼脂增加培养基的固化程度,降低试管内湿度,会使培养体系中组培再生苗对可利用水和溶解物质的吸收减少,从而降低玻璃化的发生^[14]。Ivanova and Van Staden^[6]对多叶芦荟(*Aloe polyphylla*)和 Perez-tornero, et al^[9]对杏树(*Armeniaca vulgaris*)组织培养研究中发现,适当增加琼脂的浓度可以减少试管苗的玻璃化的发生。同样在我们的实验结果中发现在培养基中添加高浓度琼脂($8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)处理时,培养两周后,玻璃化率为0,但是部分再生苗发生萎蔫,分析原因可能是高浓度的琼脂使培养基中水分减少,再生苗得不到充足的水分进行代谢,无法吸收足够的矿物质和其他营养物质引起的。所以适当增加琼脂浓度可降低黄芩再生苗的玻璃化率。另外本实验还研究了不同浓度的 PP333 对黄芩再生苗玻璃化率的影响及其壮苗的效果。多效唑(PP333)也是一种植物生长调节剂,是内源赤霉素合成的抑制剂,具有延缓植物生长,缩短节间,增加植物抗逆性,促进花果生成以及生根作用^[4 28]。本实验中在培养基中附加一定浓度的 PP333 有效的改善了黄芩再生苗的玻璃化现象,而且对黄芩再生苗起到了很好的壮苗作用(图 2B),继代后的黄芩再生苗不再呈玻璃化状态,而且生长快,植株高且粗壮,叶片浓绿,节间长,有利于生根。有研究表明吲哚乙酸(IAA)是促进不定根形成的最主要内源激素^[29],IAA 与不定根原基的发生有密切关系,与新的形成层位点诱导和第一次细胞分裂的启动有

关^[30]。而 IBA 是一种由 IAA 转变而来的内源生长素,能刺激 IAA 向基部运输,外施 IBA 能转运到插条基部组织并进一步转变为 IAA^[31]。明显提高植物生根期内源激素 IAA 含量,缩短生根周期,提高生根率^[32]。本研究中也发现适量的添加外源激素($0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)IBA 处理会显著提高黄芩再生苗的生根率。而较高浓度($0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)IBA 处理不但不会促进生根,反而使其基部长出明显的愈伤组织。分析原因可能是,低浓度 IBA 处理会适当提高黄芩再生苗向基部运输的 IAA 含量,从而提高其生根率;而添加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IBA 时,使 IAA 过度增加,由于 IAA 可促使植物细胞分裂,因此加快了黄芩再生苗基部的细胞分裂,使再生苗基部形成愈伤,无法生根。所以在 MS 基本培养基中附加低浓度的 IBA 可提高黄芩再生苗的生根率和生根数量。这一可重复并高效的生根方法不仅对于黄芩且对于大多数植物的快速繁殖都是非常有益的。

综上所述,黄芩试管再生苗玻璃化现象与其分化生长过程中的激素的调节、琼脂浓度、蔗糖浓度等有密切的关系。本研究筛选出能改善黄芩再生苗玻璃化并且提高其增殖率的最佳培养条件,MS + 6-BA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 琼脂 $7.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + PP333 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。同时建立了完整的生根及移栽培养体系,移栽成活率可达 95% 以上。在黄芩野生资源逐渐匮乏的情况下,本研究为短期内繁殖优良的黄芩资源提供很好的途径和基础数据。

参 考 文 献

1. 罗毓健,袁媛,黄璐琦. 两来源黄芩再生体系培养条件的研究[J]. 中国中医科学院中药研究所 2008, 07(1): 607 - 611.
2. Cao H B, Jiang Y J, Chen J J, et al. Arsenic accumulation in *Scutellaria baicalensis* Georgi and its effects on plant growth and pharmaceutical components[J]. Journal of Hazardous Materials 2009, 171(06): 508 - 513.
3. Mahmood N, Pizza C, Aquino R, et al. Inhibition of HIV infection by flavanoid[J]. Antiviral Res 1993, 22: 189 - 99.
4. 张延红,高素芳,陈红刚,等. 黄芩变异种质的生根壮苗研究[J]. 中药材 2013, 36(4): 511 - 514.
5. Brearley T A, Vaidya B N, Joshee N. Cytokinin, Carbon Source, and Acclimatization Requirements for in Vitro Propagation of *Scutellaria barbata* D. Don and *Scutellaria racemosa* Pers[J]. American Journal of Plant Sciences,

- 2014 5 3662 – 3672.
6. Ivanova M ,Van Staden J. Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla* [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult 2011 ,104 :13 – 21.
7. Gaspar T ,Kervers C ,Bisbis B ,et al. Loss of plant organogenic totipotency in the course of in vitro neoplastic progression[J]. In Vitro Cell Dev Biol Plant ,2000 ,36(3) : 171 – 181.
8. Kataeva N V ,Alexandrova I G ,Raisa 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 Culture ,1991 27(2) :149 – 154.
9. Perez-Tornero O ,Egea J ,Olmos E ,et al. Control of hyperhydricity in micropropagated apricot cultivars[J]. In vitro cell Dev Biol. -plant 2001 37(2) 250 – 254.
10. Ivanova M ,van Staden J. Effect of ammonium ions and cytokinins on hyperhydricity and multiplication rate of in vitro regenerated shoots of *Aloe polyphylla*[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult 2008 92 227 – 231.
11. Ziv M ,Ariel T. Vitrification in relation to stomatal deformation and malfunction in carnation leaves in vitro[M].// Debergh P C ,Zimmerman R H. Micropropagation technology and application. Kluwer Academic Publishers ,Dordrecht ,The Netherlands ,1973 45 – 69.
12. Fujiwara K ,Kozai T. Physical microenvironment and its effects[M].//Aitken-Christie J ,Kozai T ,Smith M L ,et al. Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture. Dordrecht :Kluwer Academic Publishers ,1995 : 319 – 369.
13. 吴晓玲 ,谢亚军 ,巫鹏举 ,等. 植物生长调节剂对银柴胡细胞生长特性的影响[J]. 植物研究 2005 25(2) :173 – 176.
14. Smith M A ,Spomer L A. Vessels ,gels ,liquid media ,and support systems[M].//Aitken-Christie J ,Kozai T ,Smith M L ,et al. Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture. Dordrecht :Kluwer Academic Publishers , 1995 371 – 404.
15. 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 – 61.
16. 王文静 ,李维强 ,王鹏. 多效唑预处理对红金银花直接培养成壮苗的影响[J]. 北方园艺 ,2012(09) :184 – 185.
17. 邢琳 ,李青. 中国石竹试管苗玻璃化影响因素的研究 [M].//张启翔. 中国观赏园艺研究进展. 北京 :中国林业出版社 2009 :198 – 201.
18. Fracro F ,Echeverrigaray S. Micropagation of *Cunila galioides* a popular medicinal plant of South Brazil[J]. Plant Cell Tiss Org Cult 2001 64(1) :1 – 4.
19. 周书利 ,汤浩茹 ,代利娟 ,等. 不同因素对草莓试管苗玻璃化的影响[J]. 北方园艺 2013 (3) :131 – 134.
20. Mayor M L ,Nestares G ,Zorzoli R ,et al. Reduction of hyperhydricity in sunflower tissue culture[J]. Plant Cell ,Tissue and Organ Culture 2003 72(1) 99 – 103.
21. Debergh P ,Aitken-Christie J ,Cohen D ,et al. Reconsideration of the term ‘ vitrification ’ as used in micropropagation [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult ,1992 ,30(2) :135 – 140.
22. Brand M H. Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity ,tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry(*Amelanchier arborea*) shoots in vitro[J]. Plant Cell ,Tissue and Organ Culture ,1993 35(3) 203 – 209.
23. Casanova E ,Moysset L ,Trillas M I. Effects of agar concentration and vessel closure on the organogenesis and hyperhydricity of adventitious carnation shoots[J]. Biologia Plantarum 2008 52(1) :1 – 8.
24. Wang Y L ,Wang X D ,Zhao B ,et al. Reduction of hyperhydricity in the culture of *Lepidium meyenii* shoots by addition of rare earth elements[J]. Plant Growth Regul 2007 , 52(2) :151 – 159.
25. 吕复兵 ,朱根发. 芦荟的组织培养与快繁技术[J]. 北方园艺 2000(4) 32 – 33.
26. 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.
27. Olmos E ,Piqueras A ,Martõ Áñez-Solano J R ,et al. The subcellular localization of peroxidase and the implication of oxidative stress in hyperhydrated leaves of regenerated carnation plants[J]. Plant Sci ,1997 ,130(1) 97 – 105.
28. Križan B ,Ondrušiková E ,Dradi G ,et al. The effect of paclobutrazol on in vi tro rooting and growth of GF-677 hybrid peach rootstock[J]. Acta Physiologiae Plantarum , 2006 28(1) 21 – 26.
29. 袁利利 ,张林 ,王厚新 ,等. 华北五角枫‘京2’插穗生根过程中内源激素变化[J]. 中国农学通报 ,2012 ,28 (13) 61 – 64.
30. Kesley D ,Chaldecott M A. The role of endogenous auxin in root initiation. II Sensitivity and evidence from studies on transgenic plant tissues[J]. Plant growth regulation ,1993 , 13(1) 77 – 84.
31. Van Der Krieken W M ,Breteler H ,Visser M ,et al. The role of the conversion of IBA into IAA on root regeneration in apple :Introduction of test system[J]. Plant Cell Rep , 1993 ,12 203 – 206.
32. 宋鹏飞 ,陈华江 ,姜燕琴 ,等. IBA 对兔眼蓝浆果嫩枝扦插生根及内源激素变化的影响[J]. 中国农学通报 , 2014 16(16) :117 – 122.