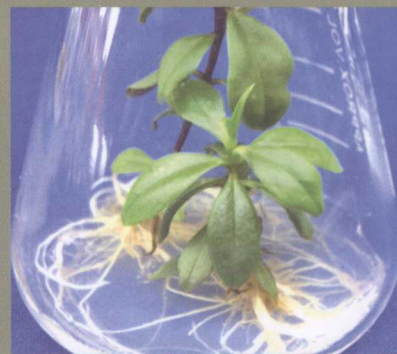


淮北师范大学学术著作基金资助项目

植物组织培养与 工厂化种苗 生产技术

Plant Tissue Culture and Factory Seedling Production Technology

主编◎薛建平 连 勇



中国科学技术大学出版社

淮北师范大学学术著作基金资助项目

植物组织培养与工厂化种苗生产技术

Plant Tissue Culture and Factory Seedling Production Technology

主 编 薛建平 连 勇

副主编 葛 红 杨树华 段永波 盛 玮

编委会 (按姓氏拼音字母排列)

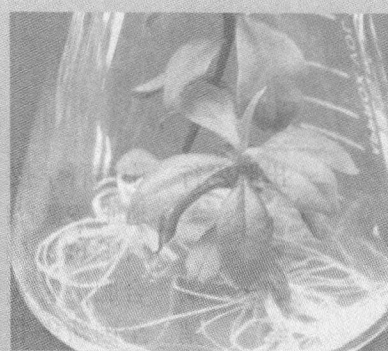
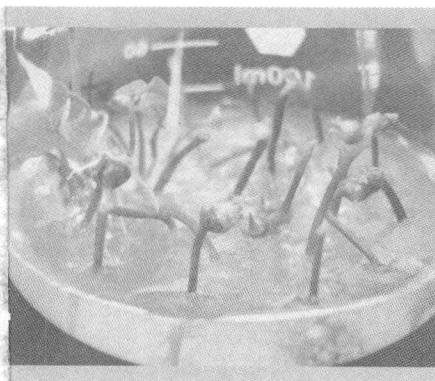
段永波 葛 红 郭玉琼 侯喜林

赖钟雄 连 勇 林思祖 柳 俊

申书兴 盛 玮 孙国庆 滕井通

吴 震 徐 涵 薛建平 杨柏云

杨树华 杨淑燕 张爱民



中国科学技术大学出版社

内 容 简 介

为了总结和交流近年来我国在植物组织培养、脱毒快繁及工厂化生产种苗技术取得的成就,促进我国植物种苗产业化的进一步发展,中国农业生物技术学会植物组培快繁脱毒技术分会,收集、整理、评选推荐出 46 篇论文编辑出版。

该文集基本上反映了我国植物细胞和组织培养研究的最新进展和应用成果,对相关的科研、教学和生产工作者来讲,是一本非常有实用价值的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

植物组织培养与工厂化种苗生产技术/薛建平,连勇主编. —合肥:中国科学技术大学出版社,2013. 11

ISBN 978-7-312-03363-6

I. 植… II. ①薛… ②连… III. ①植物组织—组织培养—文集 ②工厂化育苗—文集
IV. ①Q943. 1-53 ②S35-53

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 256442 号

出版发行 中国科学技术大学出版社

地址:安徽省合肥市金寨路 96 号,邮编:230026

网址:<http://press.ustc.edu.cn>

印 刷 合肥市宏基印刷有限公司

经 销 全国新华书店

开 本 787 mm×1092 mm 1/16

印 张 19.75

字 数 500 千

版 次 2013 年 11 月第 1 版

印 次 2013 年 11 月第 1 次印刷

定 价 70.00 元

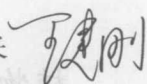
序

植物生物技术是一门以植物组织和细胞的离体操作为基础的实验性学科,它是以植物组织细胞为基本单位,在离体条件下进行培养、繁殖或人为的精细操作,使细胞的某些生物学特性按人们的意愿发生改变,从而改良品种或创造新物种,或加速繁殖植物个体,或获得有用物质的过程。目前,利用植物生物技术使得人们可以从细胞组织水平、染色体水平和基因水平对植物的遗传基础进行改造,为植物品种改良提供强有力的手段;同时,借助植物脱毒快繁技术可以脱除病毒、恢复种性,保存和增殖濒危珍稀植物,大量生产优质的植物种苗;另外,还可以在遗传上改变现有植物的有效成分和附加新的遗传特征,创造新的植物种质资源。

为了总结和交流近年来我国在植物组织培养、脱毒快繁及工厂化生产种苗技术取得的成就,促进我国植物种苗产业化的进一步发展,中国农业生物技术学会植物组培快繁脱毒技术分会先后在江西、福建、辽宁、宁夏和上海举办了五届“全国植物组培、脱毒快繁及工厂化种苗生产技术学术研讨会”。第六届学术研讨会由淮北师范大学承办,将于2013年11月8日在安徽淮北召开,为了便于会后的技术信息交流和从事相关科研、教学、生产工作者的参考,会议组委会决定将本次会议的论文编辑成《植物组织培养与工厂化种苗生产技术》一书,由中国科学技术大学出版社正式出版发行。该书基本上反映了我国植物细胞和组织培养研究的最新进展和应用成果,对相关的科研、教学和生产工作者来讲,是一本非常有实用价值的参考书。同

时,我相信淮北师范大学通过承办该届学术盛会,必将对我校学科建设起到积极的推动作用。

淮北师范大学校长



2013年10月

目 录

序	(i)
---------	-------

第一部分 植物细胞和组织培养总论和综述

试管苗玻璃化及其活性氧代谢特征研究进展	(3)
植物愈伤组织脱分化与再分化研究进展	(12)
兜兰属植物组织培养研究进展	(17)
果树组织培养中常见的问题及解决方法	(26)
药用植物细胞悬浮培养影响因素的研究进展	(32)
蔷薇属植物体细胞胚发生的研究进展	(43)
柑橘原生质体融合研究进展	(50)
花卉体细胞胚发生及问题和展望	(55)
籼稻成熟胚组织培养研究进展及其限制因子与解决途径	(67)
苦瓜细胞悬浮培养研究进展	(76)
辣椒花药培养及再生植株研究进展	(79)
矿物质元素对植物组织培养影响的研究进展	(84)

第二部分 植物细胞和组织培养研究论文

白菜与黑芥种间异源四倍体的获得及其植物学性状初步观察	(91)
珍珠相思愈伤组织诱导研究	(100)
花药内源激素与小孢子形态发生的实验研究	(105)
黑木相思不同无性系愈伤组织分化诱导研究	(111)
玻璃化法超低温保存龙眼胚性愈伤组织再生体系建立及遗传稳定性检测	(119)
粉蕉等若干香蕉品种花序诱导植株再生	(129)
不同激素水平对台湾金线莲光自养微繁殖生根培养的影响	(137)
光质和光强对福建三明野生蕉(Musa spp. , AB group)试管苗增殖的影响	(145)
马铃薯愈伤组织诱导和继代影响因素的研究	(157)
农杆菌介导玉米胚性愈伤组织遗传转化体系的优化	(162)

植物激素条件对红掌初代培养及愈伤组织诱导的影响	(168)
杜仲愈伤组织继代培养条件的优化	(174)
杜仲愈伤组织诱导和植株再生体系的建立	(180)
多胚亚麻抗冷基因转化	(189)
西兰花离体细胞快繁体系的建立	(195)
亚麻再生体系的优化	(201)
优良牧草百脉根一次性生根成苗组培快繁技术的研究	(210)
一种亲水高分子胶聚物克服香石竹玻璃化现象初探	(216)
火山粉葛试管苗增殖培养技术研究	(221)
TDZ 对几种植物组培的影响	(227)
南高丛蓝莓瓶内生根与瓶外生根组织形态学研究	(232)
光照及继代周期对粉叶复叶槭组培苗生长的影响	(236)
酸浆试管花芽诱导的研究	(240)
草石蚕脱病毒种苗生产及鉴定技术	(246)
金叶矾根的组织培养与快速繁殖	(254)
优良品种红掌的组培快繁技术研究	(259)
红芽芋的组织培养与快繁技术研究	(266)
红掌的离体组织培养与快速繁殖	(271)
二次花鸢尾‘杰尼粉’的组织培养和快速繁殖	(276)
崇明水仙的离体快速繁殖技术研究	(282)
古老月季‘四面镜’的组织培养与快速繁殖	(289)
不同培养条件对雪莲果愈伤组织中低聚果糖含量的影响	(293)
紫色山药组培苗工厂化生产及卧式高效栽培技术研究	(299)
黄山贡菊茎尖脱毒快繁技术研究	(303)

第一部分

植物细胞和组织培养总论和综述

试管苗玻璃化及其活性氧代谢特征研究进展

刘敏^{1,2} 吴震^{1,2*} 田洁^{1,2} 蒋芳玲^{1,2} 臧玉文^{1,2}

(1. 南京农业大学园艺学院, 南京 210095;

2. 农业部华东地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 南京 210095)

摘要: 试管苗玻璃化是植物组织培养过程中普遍发生的现象, 严重影响植物脱毒、快繁及基因遗传转化, 其发生规律和机理尚不清楚。随着活性氧代谢研究的不断深入, 内源活性氧与试管苗玻璃化的关系逐渐引起人们的关注。本文主要介绍了活性氧在植物中的产生与清除机制及其双重作用, 简述了试管苗玻璃化的研究现状、影响因素、防控措施和恢复方法, 分析了活性氧引发细胞膜结构和功能的异变对试管苗玻璃化发生的影响, 以期为进一步明确试管苗玻璃化机理提供参考。

关键词: 试管苗; 玻璃化; 活性氧代谢; 细胞膜; 膜脂过氧化

Advances in Hyperhydricity and the Metabolic Characteristic of Reactive Oxygen Species of plantlet *in vitro*

LIU Min^{1,2} WU Zhen^{1,2*} TIAN Jie^{1,2} JIANG Fang-ling^{1,2} ZANG Yu-wen^{1,2}

(1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. South Key Laboratory of Genetic Improvement of Vegetable, Ministry of Agriculture, Jiangsu, Nanjing 210095, China.)

Abstract: Hyperhydricity of plantlet *in vitro* is a common phenomenon in plant cell and tissue culture. Plant virus elimination and rapid propagation, together with gene genetic transformation are significantly influenced by hyperhydricity. However, the occurrence rules and the mechanism of hyperhydricity are still unclear. Along with the deepening research of reactive oxygen species (ROS), more and more attention has been pay on the relationship between endogenesis ROS and hyperhydricity. To provide a reference of the mechanism of hyperhydricity, this paper mainly introduces the generation and clearance mechanism of ROS and its dual-role in plant. In addition, we sketch the research status, influencing factors, prevention and control measures and recovery method of hyperhydricity of plantlet *in vitro*. We analyze the effect of abnormality of cell membrane induced by endogenous ROS on hyperhydricity of plantlet *in vitro*.

[基金项目] 南京农业大学国家大学生创新性实验计划项目(091030711); 高校博士点专项科研基金项目(200803071012); 江苏高校优势学科建设工程项目。

[作者简介] 刘敏, 硕士研究生, 主要从事植物生物技术及分子生物学研究, E-mail: 2011104084@njau.edu.cn.

[通讯作者] 吴震, 教授, 博导, 主要从事蔬菜生理生态以及生物技术的研究, E-mail: wzh@njau.edu.cn.

Keyword: Plantlet *in vitro*; Hyperhydricity; ROS metabolize; Cell membrane; Membrane lipid peroxidation

植物组织培养技术不仅是实现大规模脱毒快繁、种质资源保存与创新,以及基因遗传转化的基础,而且为植物遗传学、分子生物学、细胞生物学、生物工程等研究提供了一种快速有效的方法^[1]。试管苗玻璃化是植物组织培养最严重的障碍之一,与污染和褐变现象并称为“植物组织培养和细胞工程的三大难题”^[2]。虽然针对试管苗玻璃化的形态及生理生化特征、影响因素、防控和恢复措施开展了大量研究,但其发生规律和机理至今尚不十分清晰^[3]。

目前已见报道的易发生玻璃化的植物物种有 200 多种,实际发生的可能远远超过这些,几乎涵盖所有重要的经济植物,如马铃薯、大蒜、草莓等^[4]。玻璃化试管苗的共同特征是过度含水,而且不易恢复,组织结构和生理功能异常,分化能力低,增殖、成芽和生根均较困难,移栽成活率低^[5,6]。总之,玻璃化现象发生普遍,影响以植物组织培养为基础的所有过程。

近年来,活性氧物质(reactive oxygen species, ROS)对植物生长发育的影响引起人们的普遍关注。ROS 在植物中的积累水平是动态变化的,ROS 浓度的不同,决定其发挥不同作用:高浓度时会引起氧化伤害,造成代谢紊乱,严重时甚至导致细胞死亡;低浓度时作为第二信使,诱导植物对各种生物和非生物胁迫做出保护性响应^[7]。在植物组织培养中,如果培养基中的生长调节物质、琼脂,以及 H_2O_2 、聚乙二醇 6000(PEG6000)等成分的种类或浓度不适宜,都可以诱导试管苗内源 ROS 以及抗氧化酶活性和抗氧化物质含量发生变化^[8,9],这些变化又会干扰植物体内一系列正常的生理过程,从而使试管苗发生玻璃化^[10]。

虽然研究者试图从不同角度揭示试管苗玻璃化机理,但由于相关研究还不够系统和深入,目前尚未形成一致的观点。由于 ROS 在植物中的产生及其生理影响引起科学家们的广泛关注,以不同植物物种为对象,不同学者研究了 ROS 产生与清除的机制、ROS 对植物细胞的损伤,以及 ROS 在信号转导、防卫反应和基因表达调控等方面的作用,其中涉及玻璃化试管苗的活性氧代谢特征。有研究表明,在胁迫条件下,试管苗 ROS 积累水平和抗氧化防御系统会发生变化^[9,11,12],但 ROS 发生和积累的规律、调控机理及其与试管苗玻璃化的关系尚不清楚。本文综述了近年来 ROS 代谢及其与试管苗玻璃化的关系,在总结相关研究结果的基础上,尝试提出试管苗内源活性氧代谢影响玻璃化的可能机制,以期揭示 ROS 在试管苗玻璃化中的作用提供参考。

一、ROS 及其作用

ROS 是植物有氧代谢过程中的副产物,主要包括单线态氧(1O_2)、超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)和羟自由基($\cdot OH$)等,是植物体内分子氧(O_2)在相关电子传递链(线粒体、叶绿体、细胞质膜等)中生成的高活性的自由基或分子^[13]。

1. 植物体内 ROS 的产生、清除、运输和传播

不同种类的 ROS 氧化活性不同,而且其相互之间可以转化。 $O_2^{\cdot-}$ 是一种存在周期较短($2-4\mu s$)、氧化活性一般的自由基,它由 O_2 接受一个电子形成,可迅速自发或经超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)催化生成相对稳定的 H_2O_2 。在不同的环境条件下,植物可以通过多条途径生成 ROS。ROS 产生的主要场所是氧化还原代谢频繁或者电子流

密集的细胞器^[13],在植物体内,ROS 主要在叶绿体、线粒体和质膜中产生。此外,与细胞壁结合的过氧化物酶和多胺氧化酶也可催化 $O_2 \cdot^-$ 、二胺和多胺产生 H_2O_2 。ROS 在植物体内的主要生成途径见表 1。

表 1 ROS 在植物体内主要的产生途径^[7]

ROS 产生机制	ROS 产生位置	ROS 主要类型
光合作用电子传递和光系统 I 或 II	叶绿体	$O_2 \cdot^-$
呼吸电子传递	线粒体	$O_2 \cdot^-$
乙醇酸氧化酶	过氧化物酶体	H_2O_2
激发态叶绿素氧化	叶绿体	1O_2
NADPH 氧化酶	细胞膜	$O_2 \cdot^-$
脂肪酸 β -氧化	过氧化物酶体	H_2O_2
草酸氧化酶	质外体	H_2O_2
黄嘌呤氧化酶	过氧化物酶体	$O_2 \cdot^-$
过氧化物酶, Mn^{2+} 和 NADPH	细胞壁	H_2O_2 , $O_2 \cdot^-$
多胺氧化酶	质外体	H_2O_2

植物在长期进化过程中,不仅会自发产生 ROS,而且形成了一套完整的 ROS 清除系统。植物体内 ROS 的清除主要通过酶促和非酶促两种清除机制完成。酶促机制是通过抗氧化酶清除 ROS,主要包括 SOD、过氧化氢酶(catalase, CAT)、过氧化物酶(peroxidase, POD)和抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)、单脱氢抗坏血酸还原酶(monodehydroascorbate reductase, MDHAR)、脱氢抗坏血酸还原酶(dehydroascorbate reductase, DHAR)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPX)和谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)等^[14,15]。非酶促机制是利用抗氧化物质清除 ROS,主要包括抗坏血酸、谷胱甘肽、类黄酮、生育酚和一氧化氮(nitric oxide, NO)等具有还原性的物质。此外,植物的一些次生代谢物(如多酚、单宁、黄酮类物质)则能有效地清除 $O_2 \cdot^-$ 。植物体内常见的 ROS 清除途径见表 2。

因为 $O_2 \cdot^-$ 是带电荷的分子,不能被动跨膜,但它很容易转变成为不带电荷的 H_2O_2 。 H_2O_2 是 ROS 在植物体内的主要运输形式。水通道蛋白是植物细胞中一种质膜内在蛋白,不仅能输导水分子,还可以有选择地运输其他小分子化合物,如 ROS、乙烯、甘油、蔗糖等小分子化合物。它可以不需要能量将 H_2O_2 从高浓度区被动运输到低浓度区^[16]。囊泡运输则是 H_2O_2 主动运输的主要形式^[17],可以定向把 H_2O_2 运输到靶细胞或细胞器。

Mittler^[18]推测 ROS 在植物中以“波”的形式传播。Takeda^[19]观察到,拟南芥根毛不同时间、不同组织和不同细胞中 ROS 积累水平的动态变化表明,ROS 可以在植物体内发生传播。已有研究表明,拟南芥中 ROS 以 $8.4\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度在体内运输^[20]。

表 2 ROS 在植物体内主要的清除途径^[7]

ROS 产生机制	ROS 产生位置	ROS 主要类型
超氧化物歧化酶(SOD)	叶绿体, 细胞质, 线粒体, 过氧化物酶体, 质外体	$O_2 \cdot^-$
抗坏血酸过氧化物酶(APX)	叶绿体, 细胞质, 线粒体, 过氧化物酶体, 质外体	H_2O_2
过氧化氢酶(CAT)	过氧化物酶体	H_2O_2
谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)	细胞质	H_2O_2 、 $ROOH$
过氧化物酶(POD)	细胞壁, 细胞质, 液泡	H_2O_2
硫氧还蛋白过氧化物酶	叶绿体, 细胞质, 线粒体	H_2O_2
抗坏血酸(AsA)	叶绿体, 细胞质、线粒体, 过氧化物酶体, 质外体	H_2O_2 、 $O_2 \cdot^-$
谷胱甘肽(GSH)	叶绿体, 细胞质, 线粒体, 过氧化物酶体, 质外体	H_2O_2
α -生育酚	细胞膜	$ROOH$ 、 1O_2
类胡萝卜素	叶绿体	1O_2

2. ROS 的双重作用

大量研究证明, ROS 对植物具有氧化伤害和信号转导双重作用^[14,15]。

植物具有一种先天的“免疫系统”——氧爆发(oxidative burst), 即植物细胞在胁迫条件下能迅速产生 ROS, 打破植物体内氧化还原状态。这是植物能迅速地感受、识别胁迫并产生相应响应的重要原因。当 ROS 生成量超过了植物自我调节的范围, 就会对植物细胞或组织造成氧化伤害, 表现在 ROS 攻击生物大分子, 造成蛋白质、脂类、核酸发生严重损伤, 其内部表现为细胞结构和功能受损, 其外部表现为植物个体的生长发育受抑^[7]。植物体内 ROS 的积累还会引起膜脂过氧化, 不仅直接影响细胞的正常功能, 过氧化衍生的有毒产物还会进一步加重氧化胁迫^[21]。

ROS 作为信号分子, 参与调节植物的抗逆反应, 启动与植物胁迫相关基因的表达、转录及相应的生化反应, 介导植物的防御反应、胁迫信号转导、细胞程序性死亡、气孔关闭和细胞壁松弛等重要生理过程, 参与木质素和乙烯的合成、调节离子通道活性、调解过剩光能耗散等细胞代谢过程^[7,18]。

ROS 还可作为信号分子参与相关基因表达的调控, 形成基于 ROS 的基因调控网络。在模式植物拟南芥中, 超过 150 个基因与 ROS 产生和清除紧密相关^[15]。

二、植物试管苗玻璃化

Phillips 和 Mathews (1964)^[22]最早在香石竹茎尖培养时发现并报道了试管苗出现的半透明异常现象。1981 年, Debergh^[23]等提出了植物试管苗玻璃化(vitrification)这一概念, 但此时“vitrification”一词已在“低温生物学”中广泛使用。为避免混淆, Debergh(1992)^[2]根

据玻璃化试管苗的特征,提出用“超度含水态(Hyperhydricity)”代替“vitrification”,但国内依然习惯称之为“玻璃化”。

1. 玻璃化试管苗的基本特征

玻璃化试管苗具有典型而独特的形态、解剖和生理生化特征:和正常试管苗相比,玻璃化器官或组织呈现半透明水浸状,叶色浅,节间短或没有节间,茎粗而短,叶片肿胀肥厚,常皱缩并纵向卷曲,脆弱易破碎,叶片表皮毛少;气孔开张度小,保卫细胞下陷,功能性气孔减少,细胞间隙大,通气组织发达,输导组织发育不良,导管和管胞木质化不完全,细胞壁发育不良;组织和细胞高度含水,水势高,组织木质化程度低,干物质、叶绿素、蛋白质、纤维素和木质素含量低,可溶性糖、蔗糖和还原性糖含量高,K、Ca和Cl等含量高,叶片及茎尖中 GA_3 、IAA、ABA含量低,细胞分裂素和乙烯含量高;生理功能失调,分化能力低,难以增殖成芽和生根成苗,恢复困难,移栽后成活率低,后期生长差,死亡率高^[2,24,25]。

2. 试管苗玻璃化发生的影响因素

大量研究涉及试管苗玻璃化发生的影响因素。到目前为止,玻璃化发生的影响因素仍是众说纷纭,尚无明确的结论。

相关研究证明,不同植物种类、不同基因型、外植体类型和大小(组织和生理状态)、培养基类型和成分(如离子种类和浓度、蔗糖浓度、植物生长调节剂、氮源及凝固剂种类和浓度等)、培养条件(温度、湿度、光照、光强、光周期,培养容器通气情况、培养基pH值和渗透压等)、外源添加物质(PEG6000、 H_2O_2 、AsA、SA、间苯三酚)等多种内外因素都会影响玻璃化的发生,这充分说明试管苗玻璃化影响因素的复杂性和多样性^[4,5,26-30]。

3. 试管苗玻璃化的防控

目前,有关植物玻璃化调控的研究主要集中在对玻璃化发生的预防上。研究者针对不同诱因,提出了相应的措施:

- (1) 改善培养环境,如增加培养容器的空气流动、调整光周期、增加光照强度或光照时间、适当低温处理等^[28-30];
- (2) 调整培养基组分,如降低培养基中 NH_4^+ 的浓度、增加 Ca^{2+} 的浓度、适当增加蔗糖浓度、适当提高微量元素和某些维生素浓度、适当降低培养基中细胞分裂素和赤霉素浓度、适当提高琼脂和其他凝胶剂的浓度等^[5,9,24,28-31];
- (3) 加入外源添加物,如在培养基中添加、AsA、间苯三酚、根皮苷、水杨酸(SA)、 $AgNO_3$ 、吸水树脂、活性炭、甲硫氨酸、麦芽糖、山梨醇等^[8,32];
- (4) 采用无糖培养技术,改善通气环境,将 CO_2 作为唯一碳源^[3];
- (5) 采用间歇浸没的方法避免生物反应器中的培养物长期处于液体培养基中^[33];
- (6) 减少继代次数^[34];
- (7) 通过基因工程手段调控,如转入反义抑制chCu/ZnSOD基因,抑制试管苗叶绿体内 $O_2\cdot^-$ 转化为 H_2O_2 ^[35]。

虽然,以上措施对试管苗玻璃化的防控有一定的效果,但仍有限。而且,因玻璃化率降低的同时常常伴随着试管苗增殖系数的降低^[4,36],限制了这些技术的实际应用。

三、内源 ROS 与试管苗玻璃化的关系

1. 试管苗内源 ROS 的变化

外植体切割伤害、环境湿度高、气体交换少、光照强度弱、氧气浓度低、培养基含氮量高、植物生长调节剂浓度高、碳源单一等因素,都会使试管苗长期处于胁迫中^[4]。胁迫很容易引起 ROS 产生和清除的失衡,进一步导致 ROS 过量积累,造成氧化胁迫,氧化胁迫如不能消除,又进一步引起代谢失调。

逆境下,生物体瞬时的 ROS 积累和细胞内氧化还原状态的改变是普遍存在的。环境胁迫对植物细胞的伤害在很大程度上是由于 ROS 浓度快速上升引起的。在组织培养条件下,试管苗不可避免的处于某种胁迫状态,很容易受 ROS 的危害^[37]。Franck 最早在甜樱桃的玻璃化试管苗中发现 ROS 积累水平的上升和 SOD 活性的增强^[38]。此后,越来越多研究结果证实,在组织培养环境下,试管苗普遍存在 ROS 和丙二醛(MDA)的累积,甚至产生 ROS 代谢紊乱和氧化伤害^[9,12,25,37,39,40]。陈丽娟^[26]研究表明,在易导致玻璃化发生的培养基琼脂浓度、pH 值及 BA 浓度下,大蒜试管苗内 $O_2 \cdot^-$ 的产生速率、 H_2O_2 的含量极显著高于其他处理。在培养基中添加较高浓度的外源 H_2O_2 可显著提高大蒜试管苗玻璃化率和 H_2O_2 含量,而添加适宜浓度的活性氧清除剂 AsA 可缓解玻璃化^[8,41]。玻璃化植株的过量吸水引起组织缺氧^[9],干扰呼吸作用的电子传递,造成低氧胁迫,进一步导致氧化胁迫产生过量 ROS,ROS 长时间的过量积累加重氧化伤害^[39]。

2. 试管苗 ROS 代谢及膜脂过氧化

植物对胁迫的响应往往与抗氧化酶系统活性的增强和抗氧化物质含量升高相关。研究表明,组织培养的生长环境可诱导试管苗组织的氧化胁迫和抗氧化防御系统的激活^[42]。其他学者也获得相似的研究结果,即组织培养的环境可引起试管苗 ROS 的积累,进而激活抗氧化防御系统^[9,39]。

细胞膜的完整性是保持生物体功能正常的前提条件。同时,细胞膜也是最易受到 ROS 攻击的部位,其结构的损伤对试管苗玻璃化的影响更大^[37]。在玻璃化发生过程中,试管苗因 ROS 代谢失调而产生和积累过量的 ROS,ROS 则直接或间接启动膜脂过氧化过程。膜脂过氧化的最终产物 MDA,是酶促反应和氧自由基诱导脂质过氧化的副产物,常被用作植物氧化胁迫的指标。在组织培养环境下,试管苗普遍存在 MDA 的累积^[9,25,39,43]。玻璃化苗的电解质渗透率高于正常苗,表明膜系统受损;超微结构观察也显示,玻璃化试管苗存在细胞膜破损现象^[39]。

四、问题与建议

虽然前人在试管苗玻璃化机理方面进行了一定的研究和探讨,不同学者分别从物种特性、培养环境、ROS 伤害等方面提出相关研究结果,但玻璃化机理还没有明确,迄今还缺少比较系统的假说和推断,进而导致玻璃化现象的防控也局限在“头痛医头,脚痛医脚”,还不能从根本上解决玻璃化防控的难题。

鉴于近年来 ROS 代谢理论及其信号转导功能已成为植物学的热点研究领域之一,ROS 伤害与试管苗玻璃化的关系已经得到证实,可以推测 ROS 在试管苗玻璃化过程中扮演重要角色,但试管苗中 ROS 发生和积累的规律、调控机理及其与试管苗玻璃化的关系仍不清晰。为了明确试管苗玻璃化的机理,建议今后应在试管苗 ROS 代谢特征、氧化胁迫与膜脂过氧化对试管苗玻璃化的影响和内源 ROS 调控试管苗玻璃化的机理等方面加强研究。

参 考 文 献

- [1] 刘庆昌. 植物细胞组织培养[M], 北京: 中国农业大学出版社, 2010.
- [2] Debergh P, Aitken-christie J, Cohend, et al. Reconsideration of the term 'vitricification' as used in micropropagation[J]. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 1992, (30):135-140.
- [3] Teixeira da Silva JA, Dobránszki J, Ross S (2013) Phloroglucinol in plant tissue culture[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 49:1-16.
- [4] Casanova E, Moysset L, Trillas MI. Effects of agar concentration and vessel closure on the organogenesis and hyperhydricity of adventitious carnation shoots[J]. *Biologia Plantarum*, 2008, 52(1): 1-8.
- [5] 陈兵先, 黄宝灵, 吕成群, 等. 植物组织培养试管苗玻璃化现象研究进展[J]. *林业科技开发*, 2011, 1:1-5.
- [6] Huang, Y C., Chiang, C H., Li, C M., Yu, T A. Transgenic watermelon lines expressing the nucleocapsid gene of Watermelon silver mottle virus and the role of thiamine in reducing hyperhydricity in regenerated shoots[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2011, 106, 21-29.
- [7] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance[J]. *Trends Plant Sci*, 2002, 7:405-410.
- [8] 靳慧卿. 外源 H_2O_2 和 AsA 对大蒜试管苗玻璃化及内源活性氧代谢特征的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
- [9] Saher S, Piqueras A, Hellin E, et al. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress[J]. *Physiologia Plantarum*, 2004, 120:152-161.
- [10] Franck T, Kevers C, Gaspar T, Dommès J, Deby C, et al. Hyperhydricity of *Prunus avium* shoots cultured on gelrite: a controlled stress response[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2004, 42:519-527.
- [11] Kevers C, Franck T, Strasser RJ, Dommès J, Gaspar T Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2004, 77:181-191.
- [12] Hassannejad S, Bernard F, Mirzajani F, Gholami M. SA improvement of hyperhydricity reversion in *Thymus daenensis* shoots culture may be associated with polyamines changes[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2012, 51:40-46.
- [13] Harir Y, Mittler R. The ROS Signaling Network of Cells[J]. 2009, 165-174.
- [14] Foyer CH, Noctor G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses[J]. *Plant Cell*, 2005, 17:1866-1875.
- [15] Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants[J]. *Trends Plant Sci*, 2004, 9:490-498.
- [16] Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses[J]. *Plant Cell Environ*, 2010, 33:453-467.
- [17] Leshem YM, Cagnac OR, Nishri YS, Cohen GL. Suppression of Arabidopsis vesicle-SNARE expression inhibited fusion of H_2O_2 -containing vesicles with tonoplast and increased salt tolerance[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2006, 103:18008-18013.
- [18] Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, et al. ROS signaling: the new wave

- [J]? Trends Plant Sci, 2011, 16:300-309.
- [19] Takeda S, Gapper C, Kaya H, Bell E, Kuchitsu K, et al. Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells[J]. Science, 2008, 319:1241-1244.
- [20] Miller G, Schlauch K, Tam R, Cortes D, Torres MA, et al. The Plant NADPH Oxidase RBOHD Mediates Rapid Systemic Signaling in Response to Diverse Stimuli[J]. Science Signaling, 2009, 2.
- [21] Suzuki N, Koussevitzky S, Mittler R, Miller G. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress[J]. Plant Cell Environ, 2012, 35:259-270.
- [22] Phillips DJ, Matthews GJ. Growth and development of carnationshoot tips in vitro[J]. Botanical Gazette, 1964, 125:7-12.
- [23] Debergh P, Harbaoui Y, Leneur R. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential[J]. Physiol Plant, 1981, (53):181-187.
- [24] 蔡祖国, 徐小彪, 周会萍. 植物组织培养中的玻璃化现象及其预防[J]. 生物技术通讯, 2005, 16(3): 353-355.
- [25] Wu Z, Chen L J, Long Y J. Analysis of ultrastructure and reactive oxygen species of hyperhydric garlic (*Allium sativum* L.) shoots[J]. In Vitro Cellular Developmental Biology Plant, 2009, 45: 483-490.
- [26] 陈丽娟. 不同培养条件对“二水早”大蒜试管苗玻璃化与过氧化影响的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2005.
- [27] Kadota M, Niimi Y. Effects of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in in vitro pear cultivar shoots[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2003, 72: 261-265.
- [28] 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 Tissue and Organ Culture, 2008, 92:227-231.
- [29] Ivanova M, Staden J. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schönland ex Pillans[J]. Plant Growth Regulation, 2009, 60:143-150.
- [30] Ivanova M, Van Staden J. Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2011, 104:13-21.
- [31] Wu HJ; Yu XN; Jaime; GuangPei Lu. Direct shoot induction of *Paeonia lactiflora* ‘Zhong Sheng Fen’ and rejuvenation of hyperhydric shoots[J]. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 2011, 39:271-278
- [32] 杨芸, 吴震, 李翠花, 等. 外源 H₂O₂ 胁迫对大蒜试管苗玻璃化的影响[J]. 西北植物学报, 27(8): 1637-1642.
- [33] Pérez M, Bueno MA, Escalona M, Toorop P, Rodríguez R, et al. Temporary immersion systems (RITA®) for the improvement of cork oak somatic embryogenic culture proliferation and somatic embryo production[J]. Trees, 2013.
- [34] Sivanesan I, Jeong BR. Identification of somaclonal variants in proliferating shoot cultures of *Senecio cruentus* cv. Tokyo Daruma[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2012, 111:247-253.
- [35] Yadav M K, Gaur A K, Garg G K. Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2003, 72:153-156.
- [36] Gupta SD, Prasad VS. Matrix supported liquid culture and machine vision analysis of regenerated shoots of *gladiolus*[J]. Methods Mol Biol, 2010, 589:97-107.
- [37] Balen B, Tkalec M, Stefanic PP, Vidakovic-Cifrek Z, Krsnik-Rasol M. In vitro conditions affect