

## 非洲冰草快速繁殖及试管苗玻璃化的影响因子

陈思<sup>1</sup>, 张君<sup>1</sup>, 黄洲<sup>1</sup>, 饶微微<sup>1</sup>, 薛施施<sup>1</sup>, 庞基良<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州310036; <sup>2</sup>浙江省药用植物种质改良与质量控制技术重点实验室, 杭州310036

**摘要:** 以非洲冰草顶芽为外植体, 建立了非洲冰草的组培快繁体系。结果表明: 非洲冰草种子适宜的消毒方法为70%酒精浸泡30 s后, 用0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒1 min; 种子在含有4 mmol·L<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>的育苗培养基上萌发率可达98%, 且幼苗长势最好; 培养基中添加低浓度的NaCl (40~120 mmol·L<sup>-1</sup>)能有效降低试管苗玻璃化的发生; 幼苗在MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+80 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl+30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+6 g·L<sup>-1</sup>琼脂的培养基上玻璃化率仅为10.83%, 增殖系数可达2.76; 在不添加外源激素的生根培养基上均能获得健壮的生根苗, 生根率达100%; 幼苗经炼苗后进行移栽, 成活率可达71%。

**关键词:** 非洲冰草; 快速繁殖; 玻璃化

非洲冰草, 即冰菜, 又名冰叶日中花(*Mesembryanthemum crystallinum* L.), 为番杏科日中花属一年生肉质草本植物, 耐寒、耐旱、耐盐碱, 为兼性CAM (crassulacean acid metabolism, 景天酸代谢)植物, 生长周期6个月左右, 原产自非洲南部和东部。因其茎叶上有类似冰晶的泡状、反光的隆起而得名。冰菜作为新型保健蔬菜, 富含对人体有益的多羟基化合物(松醇、芒果醇和肌醇)、黄酮类化合物、胡萝卜素及天然植物盐、钙、钾等矿物质(Agaric等2009)。其独特的口感和较高的营养价值已引起各界的关注, 并作为一种极具发展潜力的新兴食材开始商业化种植。

目前, 国内关于非洲冰草的研究报道主要集中在引种栽培方面(于丽艳2016), 而关于组织培养和快速繁殖的研究则比较少。虽然国外早期的研究发现可以通过器官发生途径和胚状体发生途径使冰草再生芽, 但是以子叶节、叶片等外植体的芽再生频率较低(Cushman等2000; Michael等1991)。本研究以非洲冰草种子为材料, 对种子的最佳消毒时间、种子萌发及最适幼苗生长培养基、顶芽的诱导增殖和苗的生根进行了探讨, 旨在筛选出最佳的非洲冰草快速繁殖程序。与此同时, 我们发现在非洲冰草组培快繁中存在着试管苗玻璃化的现象, 影响顶芽的增殖生长。因此, 对影响试管苗玻璃化的因素进行了探究, 以期降低非洲冰草试管苗玻璃化的发生提供依据。

### 材料与amp;方法

#### 1 材料及培养条件

试验材料为原装进口的非洲冰草(*Mesembryanthemum crystallinum* L.)种子, 购自山东省寿光市

菜大妈农业科技有限公司。所有培养材料均置于温度为(24±1)°C、光照时间为12 h·d<sup>-1</sup>、光照强度为100 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>的恒温培养室内培养。

#### 2 方法

##### 2.1 种子消毒

选取饱满的非洲冰草种子, 先用70%酒精浸泡30 s, 再进行0.1% HgCl<sub>2</sub>不同时间(1、1.5和2 min)消毒处理, 然后用无菌水冲洗3次, 每次3~5 min, 用无菌滤纸吸干水分, 接种于萌发培养基上。每个处理接种50粒种子, 重复3次。比较不同消毒时间的效果及对种子萌发的影响。

##### 2.2 育苗培养基的筛选

育苗培养基为MS培养基的Fe盐、微量元素和大量元素(不含KNO<sub>3</sub>), 另添加不同浓度的KNO<sub>3</sub> (0、1、2和4 mmol·L<sup>-1</sup>), 琼脂6 g·L<sup>-1</sup>, pH 5.8, 以MS、1/2MS培养基为对照。将消毒过的种子接入育苗培养基, 暗中培养2 d后, 进行光照培养。培养不同天数后, 记录种子的萌发率及生长状况。

##### 2.3 顶芽的增殖培养

增殖培养基为1/2MS培养基, 添加不同浓度的6-BA (分别为0、0.1、0.25、0.5和1.0 mg·L<sup>-1</sup>), 均添加蔗糖30 g·L<sup>-1</sup>、琼脂6 g·L<sup>-1</sup>, pH 5.8。取15 d苗龄带子叶的顶芽, 接种于增殖培养基上, 光照培养。每个处理接种50个材料, 3次重复。每隔30 d左右继代一次, 观察记录再生芽生长情况。

##### 2.4 影响非洲冰草试管苗玻璃化主要因子的筛查

以上述实验培养35 d的正常苗为外植体, 以

收稿 2016-07-28 修定 2016-09-23

资助 杭州市科技计划(20150932H01)。

\* 通讯作者(E-mail: pangrenshuilang@aliyun.com)。

1/2MS为基本培养基, 添加蔗糖 $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、琼脂 $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 5.8, 分别研究培养容器及封口材料、琼脂浓度、大量元素含量及NaCl浓度对非洲冰草试管苗玻璃化的影响。每个处理接种10个材料, 3次重复, 培养30 d后, 统计试管苗的玻璃化率、芽增殖系数及幼苗生长状况。

### 2.5 试管苗的增殖、生根及移栽

取培养35 d的正常苗接入优化培养基中, 另分别添加不同浓度6-BA (0、0.1、0.25、0.5和 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), pH 5.8。光照培养, 每个处理接种10个材料, 3次重复。培养30 d后, 观察记录再生芽生长情况。

将增殖得到的长3 cm左右的苗分割成单株, 接入添加不同浓度NAA的生根培养基。待长出大量根系后, 将封口膜去掉, 于室温下炼苗3 d, 取出试管苗, 用自来水冲洗净根部的培养基, 移栽至已高温灭菌的泥炭:珍珠岩:蛭石=3:1:1的基质中, 每隔15 d施加一次NaCl ( $80 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )的水溶液和1/2 Hoagland营养液。

### 3 数据统计与分析

以胚根长 $\geq 2 \text{ mm}$ 时算作种子萌发, 萌发率(%)=(萌发的种子数/接种的总种子数) $\times 100\%$ ; 丛生芽增殖系数=诱导出的丛生芽总数/外植体数; 玻璃化苗发生率(%)=(玻璃化苗发生数/丛生芽总数) $\times 100\%$ ; 成活率(%)=(成活苗数/移栽苗数) $\times 100\%$ 。

数据分析和处理采用Excel和SPSS 19.0软件, 同列数据后不同小写字母表示经Turkey HSD法检验差异显著( $P<0.05$ )。

## 实验结果

### 1 $\text{HgCl}_2$ 灭菌时间对非洲冰草种子萌发的影响

实验发现, 无污染的种子一般在1 d左右种胚开始膨大, 2 d后接近一半的种子都能萌发, 培养14 d还未萌发的种子以后基本不会再发芽。种子萌发8 d的幼苗见图1-A, 种子萌发14 d的幼苗见图1-B, 此时大多数幼苗已长出顶芽。用0.1%  $\text{HgCl}_2$ 处理1、1.5或2 min均能达到较好的消毒效果, 对种子的萌发率也并无显著性差异, 萌发率均能达到90%以上。即使灭菌时间短至1 min, 也基本无外植体污染, 萌发率为94.69%, 而且幼苗平均高度稍高于其他两种处理。因此, 非洲冰草种子最佳

灭菌条件为70%酒精浸泡30 s+0.1%  $\text{HgCl}_2$  浸泡1 min+无菌水冲洗10 min。

### 2 $\text{KNO}_3$ 浓度对非洲冰草种子萌发率的影响

将0.1%  $\text{HgCl}_2$ 消毒1 min的非洲冰草种子接种于含不同浓度 $\text{KNO}_3$ 的育苗培养基中, 其中MS培养基 $\text{KNO}_3$ 浓度为 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 1/2MS培养基 $\text{KNO}_3$ 浓度为 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。由表1可见, 种子培养的前6 d, 以不加 $\text{KNO}_3$ 或添加 $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{KNO}_3$ 培养基中, 种子萌发率上升较快, 培养6 d时这两种培养基的种子萌发率分别为94%和90%, 其他培养基的萌发率均在90%以下。培养14 d后, 仍以不加 $\text{KNO}_3$ 或添加低浓度 $\text{KNO}_3$  ( $0\sim 4.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )的培养基中, 萌发率比添加10或 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{KNO}_3$ 的高。由此可知,  $\text{KNO}_3$ 影响种子的萌发进度和最终萌发率。此外幼苗的生长状况在不同培养基上也有所差异, 以添加 $4.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{KNO}_3$ 的培养基中生长最好。因此,  $\text{KNO}_3$ 浓度为 $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基最适宜用来育苗。

### 3 6-BA浓度对非洲冰草顶芽增殖的影响

将带有子叶的顶芽(图1-C)置于增殖培养基上培养一段时间后, 发现原先鲜嫩翠绿的外植体开始变得透明, 呈水浸状, 叶片颜色也由鲜绿渐变为淡黄、黄白、乳白, 发生了玻璃化现象。进一步培养发现, 这些生长异常的小苗能够继续分化, 形成多个丛生芽, 但是植株矮小肿胀, 无节间或节间很短, 呈现莲座状, 且新长出的叶片也表现出水浸状、失绿(图1-D和E)。

由表2可见, 顶芽培养20 d后, 非洲冰草玻璃化率均达到了50%以上, 且几乎未见分化, 其中以6-BA浓度为0.1和 $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的玻璃化情况最为严重, 分别达到70.97%和71.73%。继续培养到35 d时, 顶芽初见分化但各个浓度之间没有显著性差异, 玻璃化继续加重, 此时6-BA浓度为 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的玻璃化率相对低一些, 与其他各处理间的差异都达到了显著性水平。随着培养代数的增加, 玻璃化苗增殖后仍为玻璃化苗, 没有发生玻璃化逆转现象。等到培养75 d时, 各处理组间玻璃化率虽有所增加但是不存在显著性差异了, 而芽的增殖分化则出现明显差异, 其中以6-BA浓度为0.5和 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的增殖系数最高, 平均1个芽能分化出4个芽。综合来看, 顶芽的增殖分化随着6-BA浓度的

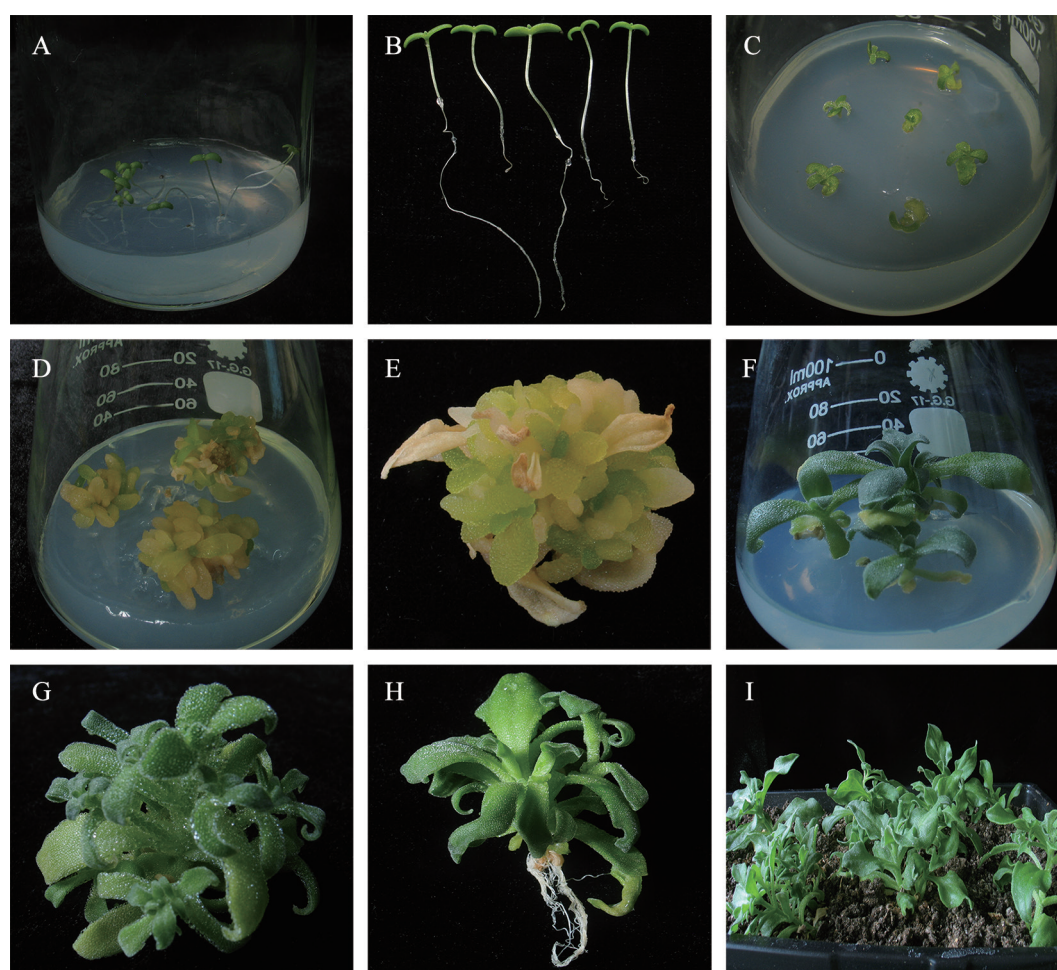


图1 非洲冰草的组织培养过程

Fig.1 Tissue culture process of *M. crystallinum*

A: 种子萌发8 d的幼苗; B: 种子萌发14 d的幼苗, 长出顶芽; C: 刚接种带有子叶的顶芽; D: 培养75 d的试管苗; E: 非洲冰草玻璃化试管苗; F: 移到到优化培养基后, 培养30 d的试管苗; G: 非洲冰草正常试管苗, 有8个丛生芽; H: 移到到生根培养基中, 培养14 d的生根苗; I: 移栽30 d的成活苗。

表1  $\text{KNO}_3$ 浓度对非洲冰草种子萌发率的影响Table 1 Effect of  $\text{KNO}_3$  concentration on the germination rate of *M. crystallinum* seeds

$\text{KNO}_3$ 浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	种子总数/粒	萌发率/%							幼苗平均高度*/cm
		2 d	4 d	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d	
0	50	62	90	94	94	94	96	98	2.4
1.0	50	48	80	90	90	92	96	96	2.4
2.0	50	38	72	80	84	88	90	90	2.3
4.0	50	42	72	82	84	84	92	98	2.4
10 (1/2MS)	50	47	76	85	87	88	91	91	2.2
20 (MS)	50	49	75	85	89	90	90	91	2.2

\*种子培养14 d, 统计幼苗高度。

增加而增加。6-BA浓度在部分程度上影响非洲冰草试管苗玻璃化的发生, 但不是主要因素, 因此

需要筛查影响非洲冰草试管苗玻璃化发生的关键因子。

表2 6-BA浓度对非洲冰草顶芽增殖的影响

Table 2 Effect of 6-BA concentration on the terminal buds proliferation of *M. crystallinum*

6-BA浓度/ mg·L <sup>-1</sup>	外植体 数/个	培养20 d			培养35 d			培养75 d		
		玻璃化率/%	增殖系数	苗高/cm	玻璃化率/%	增殖系数	苗高/cm	玻璃化率/%	增殖系数	苗高/cm
0	150	51.77±4.77 <sup>b</sup>	1.01±0.01 <sup>a</sup>	0.8	60.80±4.40 <sup>bc</sup>	1.24±0.11 <sup>a</sup>	1.1	65.00±2.68 <sup>a</sup>	2.75±0.14 <sup>b</sup>	1.2
0.1	150	70.97±0.93 <sup>a</sup>	1.01±0.01 <sup>a</sup>	0.7	76.70±1.97 <sup>a</sup>	1.21±0.11 <sup>a</sup>	1.0	77.07±9.58 <sup>a</sup>	2.43±0.17 <sup>b</sup>	1.1
0.25	150	71.73±0.66 <sup>a</sup>	1.01±0.01 <sup>a</sup>	0.8	75.50±1.66 <sup>ab</sup>	1.35±0.15 <sup>a</sup>	1.0	90.07±7.11 <sup>a</sup>	2.72±0.15 <sup>b</sup>	1.1
0.5	150	58.90±4.00 <sup>ab</sup>	1.07±0.02 <sup>a</sup>	0.9	66.70±4.53 <sup>abc</sup>	1.45±0.07 <sup>a</sup>	1.1	78.77±5.31 <sup>a</sup>	3.71±0.08 <sup>a</sup>	1.2
1.0	150	57.93±4.20 <sup>ab</sup>	1.03±0.03 <sup>a</sup>	0.9	58.30±3.00 <sup>c</sup>	1.32±0.04 <sup>a</sup>	1.2	64.80±0.55 <sup>a</sup>	4.00±0.09 <sup>a</sup>	1.2

同列数据后不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著,下表同此。

#### 4 不同处理对非洲冰草试管苗玻璃化的影响

##### 4.1 培养容器及封口材料对非洲冰草试管苗玻璃化的影响

由表3可见,不同的培养容器及封口材料对试管苗增殖系数的影响差异不显著,但对试管苗玻璃化的发生存在影响。其中,100 mL锥形瓶+透气封口膜的玻璃化率最低,显著低于以塑料盖密封的玻璃化率,但与另外2个处理之间没有显著性差异。试验中发现,使用塑料盖密封的塑料容器时,通气性较差,瓶内湿度较大,瓶壁上有较多水珠,且透光性低于其他3种玻璃容器,植株平均高度也较低;另外3种处理虽然同样用玻璃材质作为培养容器且均以相同孔径大小的透气封口膜密封,但是由于容器体积的差异,导致瓶内相对湿度存在差异,所以玻璃化率会有不同。综合分析认为,培养容器选择100 mL的玻璃锥形瓶,以封口膜作为封口材料较为适宜。

##### 4.2 培养基中琼脂及大量元素含量对非洲冰草试管苗生长及玻璃化的影响

一般而言,琼脂的浓度会影响培养基的水势。琼脂浓度低,培养基水势较高,试管苗易于产生玻璃化现象。但是本实验发现,琼脂浓度为6、8或10 g·L<sup>-1</sup>之间的玻璃化率差异并不显著,均达到40%左右,并且对试管苗的增殖也不存在显著性影

响。当琼脂浓度达到10 g·L<sup>-1</sup>,由于培养基水分含量低,且在试管苗培养期间会逐渐失水,不利于幼苗生长。因此,综合增殖系数和玻璃化两个指标来看,选择琼脂浓度为6 g·L<sup>-1</sup>是比较适宜的。

与1/2MS相比,MS培养基中尽管大量元素加倍了,但是玻璃化率并没有得到改善,依然在40%左右,且增殖系数也没有增加。由此可知,大量元素并不是影响非洲冰草试管苗玻璃化发生的关键因子。此外在实验中我们发现,MS培养基中的试管苗叶片黄化情况低于1/2MS培养基。考虑到在离体条件下,植物器官发生要求培养基中有较高浓度的Mg<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和Mn<sup>2+</sup>等,不定芽产生后其生长发育所必需的营养元素都来源于外植体对培养基中营养元素的吸收。因此,选择MS培养基作为较适诱导培养基。

##### 4.3 NaCl浓度对非洲冰草试管苗生长及玻璃化的影响

表4表明,NaCl浓度显著影响非洲冰草玻璃化的发生及其增殖生长。当NaCl浓度为40~120 mmol·L<sup>-1</sup>,玻璃化率显著低于其他3种处理。其中NaCl浓度为80 mmol·L<sup>-1</sup>时玻璃化率只有17%,同时增殖系数也是最高的,达到2.27。当幼苗在含有80 mmol·L<sup>-1</sup>的NaCl培养基中再培养一代时,玻璃化率可下降至0,并且增殖系数达到5.0左右。由此说明

表3 培养容器及封口材料对非洲冰草试管苗生长及玻璃化的影响

Table 3 Effect of the vessel and seal material on the growth and vitrification of *M. crystallinum*

培养容器	封口材料	外植体数/个	玻璃化率/%	增殖系数	苗高/cm
200 mL塑料圆口瓶	塑料盖	30	62.20±2.35 <sup>a</sup>	1.87±0.12 <sup>a</sup>	1.2
200 mL玻璃圆口瓶	透气封口膜	30	49.93±1.21 <sup>ab</sup>	2.27±0.15 <sup>a</sup>	1.5
100 mL锥形瓶	透气封口膜	30	43.10±2.50 <sup>b</sup>	2.23±0.09 <sup>a</sup>	1.5
250 mL锥形瓶	透气封口膜	30	52.27±7.76 <sup>ab</sup>	2.00±0.15 <sup>a</sup>	1.5

表4 NaCl浓度对非洲冰草试管苗生长及玻璃化的影响

Table 4 Effect of NaCl concentration on the growth and vitrification of *M. crystallinum*

NaCl浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	外植体数/个	玻璃化率/%	增殖系数	苗高/cm
0	30	43.10±2.50 <sup>b</sup>	2.23±0.09 <sup>a</sup>	1.5
40	30	20.90±4.54 <sup>c</sup>	2.13±0.32 <sup>a</sup>	1.4
80	30	17.00±5.57 <sup>c</sup>	2.27±0.15 <sup>a</sup>	1.5
120	30	19.33±5.21 <sup>c</sup>	2.17±0.17 <sup>a</sup>	1.5
240	30	53.43±5.17 <sup>ab</sup>	1.30±0.12 <sup>b</sup>	1.0
400	30	67.60±2.01 <sup>a</sup>	1.13±0.09 <sup>b</sup>	0.8

非洲冰草是一种喜盐植物, NaCl对其正常生长是必不可少的。但是当NaCl浓度继续增加至240或400  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 高浓度的NaCl胁迫则明显抑制非洲冰草的生长, 植株表现为矮小、基本不分化且玻璃化加重。因此, 在培养基中添加低浓度的NaCl (40~120  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )能够降低非洲冰草玻璃化率且促进其分化和生长。

#### 5 芽的诱导增殖和试管苗生根、移栽

表5为优化培养基MS+80  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl+30  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖+6  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂上培养的结果, 与表2的结果相比较, 在相同的6-BA浓度下, 非洲冰草试管苗玻

璃化率显著降低, 不同处理组的玻璃化率均低于20%。在后期实验中我们发现已经玻璃化的苗, 无论是轻度的还是重度的, 即使放在优化培养基中培养, 也不能使其玻璃化情况改善, 但是正常的苗随着培养代数的增加玻璃化率接近于0。另外, 表5还表明, 施加不同浓度的6-BA显著影响芽的增殖。当6-BA浓度为0.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 不仅玻璃化率低、苗生长健壮(图1-F和G), 而且增殖系数最高, 达到2.76, 与其他处理有显著性差异。因此, MS+0.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA+80  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl+30  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖+6  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂的培养基适宜作为非洲冰草顶芽增殖培养基。

表5 6-BA浓度对非洲冰草丛生芽增殖的影响

Table 5 Effect of 6-BA concentration on the multiple shoots proliferation of *M. crystallinum*

6-BA浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	外植体数/个	玻璃化率/%	增殖系数	苗高/cm
0	30	15.33±4.41 <sup>a</sup>	2.33±0.12 <sup>bc</sup>	1.7
0.1	30	14.90±2.76 <sup>a</sup>	2.00±0.05 <sup>c</sup>	1.6
0.25	30	20.60±4.33 <sup>a</sup>	2.40±0.05 <sup>b</sup>	1.8
0.5	30	10.83±2.09 <sup>a</sup>	2.76±0.12 <sup>a</sup>	2.0
1.0	30	11.90±3.99 <sup>a</sup>	2.23±0.13 <sup>bc</sup>	1.7

在生根实验中, 我们发现非洲冰草幼苗较易生根。在不添加激素的生根培养基中, 1周左右即可长出须根, 继续培养1周根数增加并且变得粗壮(图1-H), 此时即可进行移栽试验。但是添加0.5或1.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA的生根培养基反而不利于非洲冰草幼苗生根, 即使培养了2周也没有或者只有极少数幼苗生根。故选择MS+80  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl+30  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖+6  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂为生根培养基。

非洲冰草组培苗经炼苗后移栽在泥炭:珍珠岩:蛭石=3:1:1的基质中, 置于人工气候室中, 定期浇水施肥, 培养30 d后, 统计平均成活率为71%, 植株生长状况较好(图1-I)。

## 讨 论

在进行植物组织培养时, 外植体的消毒是关键性步骤之一。本试验所采用的0.1%  $\text{HgCl}_2$ 消毒1 min, 不仅用时短而且见效好, 污染率接近于0, 萌发率十分可观, 达到94.69%, 对非洲冰草种子基本无伤害。要获得健壮的无菌苗, 同时也涉及到育苗培养基的选择。研究结果发现 $\text{KNO}_3$ 浓度明显影响非洲冰草种子的萌发进程和萌发率, 以及幼苗的生长状况。 $\text{NO}_3\text{-N}$ 可以直接被植物吸收, 并且协同促进阳离子的吸收, 如钾、钙、镁;  $\text{K}^+$ 能够促进子叶的叶绿素合成、硝酸还原酶活性和光合活性(庞基良等1994)。

在快速繁殖中, 污染、褐化和玻璃化是公认的三大难题。尤其针对玻璃化问题, 没有一套通用有效的解决方法。目前报道易发生玻璃化试管苗的植物有80多种, 影响玻璃化发生的因素归纳起来主要有: 外植体类型和大小; 培养的环境条件, 包括光照、温度、湿度、pH值; 培养基成分, 包括铵根离子浓度、琼脂种类和浓度、碳源和植物激素等(梁海曼和周菊华1994)。针对诱导顶芽产生不定芽的过程中出现的玻璃化问题, 我们对其发生的关键因子进行了逐一甄别。研究发现, 降低培养环境中的湿度、增加培养基中的大量元素、增加琼脂含量降低水势以及改变外源激素6-BA浓度都不能十分有效地控制非洲冰草玻璃化的发生, 但是添加一定浓度的NaCl之后, 试管苗玻璃化率明显低于其他处理。至于NaCl这一关键因子如何降低非洲冰草试管苗玻璃化发生的机制尚不明确。吕敏等(2014)认为玻璃化和氧化胁迫有关。试管苗在离体培养条件下有过量的氧自由基胁迫, 会发生脂质过氧化伤害。随着玻璃化的加重, 抗氧化酶系统严重失衡。张静雪等(2015)在研究石竹苗玻璃化发生的原因时, 也证实了活性氧代谢异常会加剧玻璃化的发生。李广鲁等(2015)在探求冰叶日中花耐盐的生理机制时发现, 冰叶日中花在快速响应盐胁迫时能够迅速提高其体内渗透调节物质含量及抗氧化酶系统的活性。结合三者的观点可以推测, 添加NaCl之所以能够降低玻璃化率, 是因为非洲冰草试管苗在受到盐胁迫时, 启动了防御机制, 抗氧化酶系统活性增强, 清除活性氧的能力增强, 从而中和了氧化胁迫带来的伤害。然而事实是否如此, 需要进一步试验论证。有研究认为, 与光合作用有关的产物积累与试管苗玻璃化有关(常有宏等2011)。非洲冰草作为兼性CAM植物, 若在干燥或有盐分的环境中生长, 会以CAM途径进行光合作用, 而不在干燥或有盐分的环境中生长, 将会进行一般的C<sub>3</sub>植物光合作用。两种代谢途径所积累的代谢物质的差异可能造成非洲冰草形态结构及生理生化的变化。

丛生芽或不定芽的形成与增殖主要受生长物质种类、水平、配比控制, 6-BA是组织培养时常用的植物生长调节剂, 对促进细胞分裂和诱导芽的分化具有重要作用(朱桥等2014)。在诱导顶芽

增殖时, 考虑到顶端优势作用, 虽然只施加了单一激素6-BA, 但是却满足其增殖生长需要。研究发现顶芽分化频率达100%, 培养3代增殖系数可达5.0左右。试管苗生根一般采用施加IBA、NAA或者IAA。本研究中发现, 有外源激素NAA存在的条件下非洲冰草幼苗生根情况十分不理想, 反而在无激素的培养基中幼苗生根率可达100%, 这一结果和Michael等(1991)的实验结果相一致。由此可以推测, 非洲冰草组织的内源生长素含量较高, 已经足够满足其自身生根需要。非洲冰草性喜凉爽气候, 忌高温多湿, 喜排水良好的沙质土壤, 因此移栽苗应放置在干燥、通风、光线充足、温度适宜的环境中。

本研究在综合前人研究的基础上, 首次建立了以非洲冰草顶芽为外植体的组培快繁体系。诱导顶芽直接产生不定芽的快繁方式, 省略了愈伤组织诱导及再分化的过程, 缩短了非洲冰草快繁的周期。然而这一体系并不完美, 存在着些许问题需要优化。例如, 研究虽找到了解决非洲冰草试管苗玻璃化问题的方法, 但是此方法制约了顶芽的增殖与分化, 实验中明显发现, 玻璃化苗的增殖系数高于正常苗, 如何实现降低玻璃化的同时提高增殖系数仍需进一步探究。

### 参考文献

- Agarie S, Kawaguchi A, Koder A, Sunagawa H, Kojima H, Nose A, Nakahara T (2009). Potential of the common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum* as a new high-functional food as evaluated by polyol accumulation. *Plant Prod Sci*, 12 (1): 37–46
- Chang YH, Zhang YJ, Li XG, Lin J, Yang QS, Wang ZH, Wang HW (2011). Comparative study on physiological and ultra-structure in normal and hyperhydric shoots *in vitro* of 'huangguan' pear. *Acta Horti Sin*, 38 (2): 225–232 (in Chinese with English abstract) [常有宏, 张玉娇, 李晓刚, 蔺经, 杨青松, 王中华, 王宏伟 (2011). '黄冠'梨正常试管苗与玻璃化苗生理生化及超微结构的比较研究. *园艺学报*, 38 (2): 225–232]
- Cushman JC, Wulan T, Kuscuoglu N, Spatz MD (2000). Efficient plant regeneration of *Mesembryanthemum crystallinum* via somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep*, 19: 459–463
- Li GL, Hu ZH, Leng PS (2015). The physiological responds of *Mesembryanthemum crystallinum* L. to NaCl stress. *J Beijing Univ Agric*, 30 (1): 64–70 (in Chinese with English abstract) [李广鲁, 胡增辉, 冷平生 (2015). 冰叶日中花对NaCl胁迫的生理响应. *北京农学院学报*, 30 (1): 64–70]
- Liang HM, Zhou JH (1994). Physiological, biochemical characteristics and mechanism exploration of shoot vitrification. *J Wuhan Bot Res*, 12 (3): 281–288 (in Chinese with English abstract) [梁

- 海曼, 周菊华(1994). 试管苗玻璃化现象的生理生化和机理探讨. 武汉植物学研究, 12 (3): 281–288]
- Lü M, Xia XY, Xu PS, Li B, Guo ZD (2014). Changes in microstructure and physiological-biochemical characteristics of hyperhydric shoots of blueberry (*Vaccinium* Spp.) *in vitro*. Plant Physiol J, 50 (4): 453–460 (in Chinese with English abstract) [吕敏, 夏秀英, 徐品三, 李波, 郭照东(2014). 蓝莓玻璃化试管苗的显微结构及生理生化特性变化. 植物生理学报, 50 (4): 453–460]
- Michael SM, Thomas JC, Bohnert HJ, Cushman JC (1991). Regeneration of multiple shoots and plants from *Mesembryanthemum crystallinum*. Plant Cell Rep, 9: 563–566
- Pang JL, Sun JH, Liang HM (1994). Effect of potassium nitrate on early growth and development of aseptic seedlings of cucumber. Plant Physiol Commun, 30 (4): 260–262 (in Chinese with English abstract) [庞基良, 孙坚红, 梁海曼(1994). 硝酸钾对黄瓜无菌苗早期发育进程的影响. 植物生理学通讯, 30 (4): 260–262]
- Yu LY (2016). The high-yield cultivation technique of African *Mesembryanthemum crystallinum* L. Nor Hort, (17): 62–63 (in Chinese with English abstract) [于丽艳(2016). 非洲冰菜高效栽培技术. 北方园艺, (17): 62–63]
- Zhang JX, Gao HY, Xin XR, Xia XY (2015). Changes in water and reactive oxygen species metabolism in hyperhydric *Dianthus chinensis*. Plant Physiol J, 51 (8): 1315–1321 (in Chinese with English abstract) [张静雪, 高弘扬, 辛学锐, 夏秀英(2015). 石竹玻璃化苗的水分及活性氧代谢变化. 植物生理学报, 51 (8): 1315–1321]
- Zhu Q, Ding JW, Yang XW, Liang L, Shao L (2014). Tissue culture rapid propagation of *Ludisia discolor*. Plant Physiol J, 50 (6): 805–809 (in Chinese with English abstract) [朱桥, 丁俊伟, 杨学文, 梁廉, 邵玲(2014). 血叶兰的组织培养与快速繁殖. 植物生理学报, 50 (6): 805–809]

## Rapid propagation and factors of vitrification *in vitro* of *Mesembryanthemum crystallinum*

CHEN Si<sup>1</sup>, ZHANG Jun<sup>1</sup>, HUANG Zhou<sup>1</sup>, RAO Wei-Wei<sup>1</sup>, XUE Shi-Shi<sup>1</sup>, PANG Ji-Liang<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China; <sup>2</sup>Zhejiang Province Key Laboratory of Medicinal Plant Germplasm Improvement and Quality Control Technology, Hangzhou 310036, China

**Abstract:** An efficient plant regeneration procedure has been established from terminal bud explants of the common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum*. The best protocol for seed sterilization was that the seeds were immersed in 70% alcohol for 30 seconds, then were disinfected by dipping into 0.1% HgCl<sub>2</sub> for 1 min. The optimum medium of growing seedlings was MS medium supplemented with 4 mmol·L<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>. In this medium, the seedling germination rate was up to 98%, and the seedlings grew best. Medium supplemented with 40–120 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl could effectively reduce the occurrence of vitrification. The suitable proliferation medium was MS medium supplemented with 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA, 80 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 30 g·L<sup>-1</sup> sucrose and 6 g·L<sup>-1</sup> agar, on which the terminal bud's vitrification rate was only 10.83% and proliferation coefficient reached 2.76. Without growth regulators, regenerated plants rooted on MS medium with 100% efficiency. Mature, regenerated plants were fertile and the survival rate could reach 71%.

**Key words:** *Mesembryanthemum crystallinum*; rapid propagation; vitrification

Received 2016-07-28 Accepted 2016-09-23

This work was supported by Science and Technology Planning Project of Hangzhou (Grant No. 20150932H01).

\*Corresponding author (E-mail: pangrenshuilian@aliyun.com).