



贺强,李小峰,许腾飞,高德航,董振飞,杨芬,李楠,王红清. 草莓试管苗玻璃化现象探究及生理特性分析[J]. 中国农业大学学报,2025,30(02):51-60.
HE Qiang, LI Xiaofeng, XU Tengfei, GAO Dehang, DONG Zhenfei, YANG Fen, LI Nan, WANG Hongqing. Vitrification phenomenon exploration and physiological characteristics analysis of strawberry *in vitro* seedlings[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2025,30(02):51-60.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2025.02.05

草莓试管苗玻璃化现象探究及生理特性分析

贺强^{1,2} 李小峰¹ 许腾飞¹ 高德航¹ 董振飞¹ 杨芬¹ 李楠³ 王红清^{1,2*}

(1. 中国农业大学园艺学院,北京 100193;

2. 四川成都中农大现代农业产业研究院,成都 610041;

3. 北京万德园农业科技发展有限公司,北京 100193)

摘要 为探究草莓试管苗玻璃化现象和生理特性,以‘红颜’‘越秀’‘红珍珠’‘圣诞红’‘光点’‘白雪公主’‘妙香’‘章姬’这8个品种草莓试管苗为试材,分析不同品种草莓试管苗玻璃化差异;通过测定‘红颜’草莓玻璃化试管苗的含水率、叶绿素相对含量、相对电导率、丙二醛含量和氧化酶活性等指标,进一步分析草莓玻璃化试管苗生理性状差异;测定不同外植体消毒液HgCl₂的含量和处理时间对试管苗玻璃化的影响以及不同玻璃化程度的试管苗驯化移栽后的生理性状差异。结果表明:1)不同草莓品种玻璃化率不同,‘白雪公主’草莓玻璃化率最高,为31.0%;‘圣诞红’草莓玻璃化率最低,为14.0%。2)玻璃化草莓试管苗的含水率、相对电导率和丙二醛含量等显著高于正常草莓试管苗,株高和叶绿素相对含量显著低于正常草莓试管苗($P<0.05$)。3)玻璃化草莓试管苗诱导过氧化氢酶(CAT)活性显著降低,过氧化物酶(POD)活性显著升高($P<0.05$)。4)HgCl₂含量越高,消毒时间越长,玻璃化率越高,使用0.5% HgCl₂处理16 min时,‘红颜’草莓玻璃化率达到38.2%。5)重度玻璃化草莓试管苗驯化移栽后,株高、叶绿素相对含量、茎粗和干鲜重等均显著低于正常草莓生根苗($P<0.05$)。综上,草莓试管苗的玻璃化现象可能是一种氧化胁迫反应。

关键词 草莓;玻璃化现象;草莓试管苗;生理特性

中图分类号 S668.4

文章编号 1007-4333(2025)02-0051-10

文献标志码 A

Vitrification phenomenon exploration and physiological characteristics analysis of strawberry *in vitro* seedlings

HE Qiang^{1,2}, LI Xiaofeng¹, XU Tengfei¹, GAO Dehang¹, DONG Zhenfei¹, YANG Fen¹,
LI Nan³, WANG Hongqing^{1,2*}

(1. College of Horticulture, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. CAU-SCCD Advanced Agricultural & Industrial Institute, Chengdu 610041, China;

3. Beijing Wandeyuan Agricultural Science and Technology Development Co., Ltd., Beijing 100193, China)

Abstract In order to investigate the vitrification phenomenon and physiological characteristics of strawberry test-tube seedlings, eight test-tube seedling varieties, ‘Benihoppe’, ‘Yuexiu’, ‘Red Pearl’, ‘Ssanta’, ‘Light Spot’, ‘Snow White’, ‘Miaoxiang’ and ‘Akihime’ were taken as test materials to analyze the vitrification difference of different varieties of strawberry test-tube seedlings. By measuring the moisture content, relative content of chlorophyll, relative conductivity, malondialdehyde content and oxidase activity of the vitrification test tube seedling of ‘Benihoppe’ strawberry, the physiological characteristics of the

收稿日期: 2024-01-11

基金项目: 甘肃省科学技术厅科技特派团专项(22CX8NN231)

第一作者: 贺强(ORCID:0009-0005-4057-1363),硕士研究生,E-mail:heqiang3037@163.com

通讯作者: 王红清(ORCID:0000-0003-3275-6753),教授,主要从事果树生长发育系统调控与高效栽培研究,E-mail:wanghq@cau.edu.cn

vitrification test tube seedling were further analyzed. In addition, the effects of content and treatment time of HgCl_2 on the vitrification of test-tube seedlings and the differences of physiological traits of test-tube seedlings with different degrees of vitrification after acclimation and transplanting were investigated after domestication and transplanting. The results showed that: 1) Different strawberry varieties have different vitrification rates. Among these, the 'Snow White' strawberry had the highest vitrification rate of 31.0%, while the 'Ssanta' strawberry had the lowest vitrification rate of 14.0%. 2) The water content, relative electrical conductivity and malondialdehyde content of vitrification strawberry test-tube seedlings were significantly higher than those of normal strawberry test-tube seedlings, while the plant height and chlorophyll content were significantly lower than those of normal strawberry test-tube seedlings ($P < 0.05$). 3) The induction catalase (CAT) activity of vitrification strawberry tube seedlings decreased significantly, and the activity of peroxidase (POD) increased significantly ($P < 0.05$). 4) The higher the content of HgCl_2 , the longer the disinfection time, and the higher the vitrification rate. After treatment with 0.5% HgCl_2 for 16 min, the vitrification rate of 'Benihoppe' strawberry reached 38.2%. 5) After the domestication and transplanting of severe vitrification strawberry test tube seedlings, the plant height, relative chlorophyll content, thick stem, dry and fresh weight were significantly lower than those of normal strawberry root seedlings ($P < 0.05$). In conclusion, the vitrification of strawberry test tube seedlings may be an oxidative stress reaction.

Keywords strawberry; vitrification phenomenon; strawberry tube seedlings; physiological property

草莓(*Fragaria*×*ananassa* Duch)属于蔷薇科草莓属多年生草本植物。在生产中,草莓育苗繁殖常用匍匐茎繁殖,该育苗方法简单,直接由母株繁殖出幼苗;缺点是培育出的幼苗容易受病虫害的影响,繁殖的新植株品质也不稳定,容易感染病毒^[1]。草莓母株携带的病毒会直接传染给子苗,进而影响草莓子苗生长。为繁育优质草莓苗,采用无病毒种苗是草莓种苗育苗的发展趋势^[2]。脱毒草莓苗生长势强,叶片颜色深,根系健壮发达,且果实较大,含糖量高,有着更高的经济效益。草莓的组培脱毒快繁技术在草莓种苗产业中占有重要地位,无毒种苗成为草莓栽培的发展趋势^[3]。

玻璃化(Vitrification)是植物在组培过程中种苗呈半透明或透明水浸状异常生长形态的一种现象,最早发现于香石竹茎尖培养中^[4]。1992年,Debergh等^[5]对此异常现象进行系统描述,并将其定义为玻璃化。玻璃化现象在植物组培中普遍存在。已知在组培中出现玻璃化现象的植物超过200种,园艺作物中有梨、草莓、西瓜、香石竹和菊花等^[6]。异常的形态结构和生理功能使得玻璃化试管苗增殖系数低、不易生根、移栽成活率低,限制了组培技术的广泛运用^[7]。正常试管苗与玻璃化试管苗在形态和解剖结构上有显著差异,玻璃化试管苗在外观方面有一些共同特征,如植株矮小、节间短、试管苗叶片和茎肿胀,出现半透明或透明水浸状,叶片皱缩、易

碎^[8]。玻璃化苗通过电镜观察发现,其细胞间隙增大,无栅栏组织,叶片有所变厚,气孔发生畸变^[9];茎的维管束发育不良、部分缺失,细胞内液泡体积变大,内含物外溢,叶绿体数量减少,叶肉细胞膨大^[10]。玻璃化试管苗的细胞水势高,自由水含量比正常苗多,这可能是导致水浸状的原因之一;另外,玻璃化试管苗的干物质、蛋白和糖含量降低,说明叶绿素合成系统受损,光合能力降低,而干物质含量的降低会导致试管苗生长减缓,增殖系数降低^[11]。玻璃化试管苗中与木质素合成有关的酶活性降低、果胶甲基酯酶活性增强,使得木质素、果胶以及纤维素含量降低,从而导致细胞壁发育不良^[12]。植物发生玻璃化,除与植物的种类有关外,还与生理状态、取材部位及大小等因素有关。相同物种的不同品种之间,玻璃化率也会存在差异,如蓝莓品种‘美登’的玻璃化率高于‘蓝丰’的玻璃化率^[11]。此外,玻璃化试管苗能否恢复与其玻璃化受损程度有关。研究发现,改善培养条件、调整培养基的成分等有可能改变玻璃化的异常状态,但重度玻璃化试管苗一般难以恢复^[14]。

目前对草莓试管苗玻璃化问题研究较少。为了探究草莓试管苗玻璃化现象和分析其生理特性,本研究拟以8种不同品种草莓为试验材料,探究不同品种草莓试管苗玻璃化差异和玻璃化试管苗的生理特性,测定外植体消毒液 HgCl_2 浓度及处理时间对

草莓试管苗玻璃化的影响以及玻璃化草莓试管苗驯化栽培后的生理性状差异,以期实现草莓组织培养技术的优化,降低草莓试管苗玻璃化的发生,为进一步了解和防治试管苗玻璃化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验于2021年10月—2023年5月在中国农业大学园艺楼实验室组培间进行。供试草莓品种共8种,选择生长健壮、当年生脱毒‘红颜’草莓匍匐茎为主要试验材料,其余草莓品种为‘越秀’‘红珍珠’‘圣诞红’‘光点’‘白雪公主’‘妙香’‘章姬’。本试验所用的草莓匍匐茎均采自北京市昌平区金六环草莓园。取样后带回实验室放置于4℃冰箱保存备用。炼苗驯化后的‘红颜’草莓试管苗种植于中国农业大学科学园日光温室内。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的选择和处理

挑选生长健壮、无病虫害的草莓母株上生长饱满、粗壮的匍匐茎茎尖置于密封袋低温保存带回试验室。剪取带有生长点的茎段约1~2 cm置于烧杯中,用纱布包裹烧杯口并用橡皮筋扎紧放置于自来

水下,冲洗1~2 h,之后再倒入75%酒精浸泡30 s,用无菌去离子水冲洗干净。

1.2.2 外植体消毒和培养

使用 HgCl_2 溶液对外植体进行消毒, HgCl_2 溶液含量为0.05%、0.1%、0.2%和0.5%这4个梯度,对照使用无菌蒸馏水,每种浓度设置2、4、8、12和16 min共5个处理时间。将外植体转入不同浓度 HgCl_2 溶液中,不断晃动烧杯,使溶液与外植体充分接触,经不同时间消毒处理后,用无菌水冲洗干净,最后用无菌滤纸吸干外植体表面水分;在解剖镜下用镊子和解剖针剥取草莓匍匐茎茎尖生长点,接种于初代培养基上并做好标记。初代培养基配方为 $\text{MS}+0.5\text{ mg/L } 6\text{-BA}+8\text{ g/L 琼脂}+30\text{ g/L 蔗糖}$ 。初代培养30 d后选取长势相同或相近的初代苗按照 HgCl_2 溶液含量及处理时间分组进行继代培养。

1.2.3 草莓玻璃化试管苗分级

根据张敏等^[15]研究,草莓试管苗玻璃化程度可分为四类:1)正常苗:未发生玻璃化;2)轻度玻璃化苗:小部分叶片和叶柄发生玻璃化(不超过整个植株的1/3);3)中度玻璃化苗:很大部分叶片和叶柄发生玻璃化(占植株的1/3~2/3);4)重度玻璃化苗:基本全部叶片和叶柄均发生玻璃化(图1)。



图1 草莓试管苗玻璃化分级

Fig. 1 Classification of vitrification of strawberry *in vitro*

1.2.4 草莓试管苗的玻璃化率统计

选取长势基本一致且没有发生玻璃化的草莓初代试管苗,接种在 $\text{MS}+0.5\text{ mg/L } 6\text{-BA}+0.1\text{ mg/L IBA}+8\text{ g/L 琼脂}+30\text{ g/L 蔗糖}$ 的继代培养基上。平均每瓶接种5株,每个品种接种30株,重复3次,培养30 d,统计不同浓度消毒液和不同处理时间的组合下各组间玻璃化率差异。

玻璃化率=出现玻璃化的不定芽数/总的分化不定芽数 $\times 100\%$ (1)

1.2.5 草莓玻璃化试管苗生理指标测定

1.2.5.1 组织含水量的测定 将洗净的铝盒依次进行编号,称重记为 W_1 ;将‘红颜’草莓玻璃化试管苗或正常试管苗迅速放置于铝盒中称重,记铝盒与鲜样品总量为 W_2 ;称取3份,然后放置于100~

105℃烘箱中15 min杀青,再于80~90℃烘干,直至重量恒定,称得铝盒与干样品总重量 W_3 。

叶片组织总含水量=

$$(W_2 - W_3)/(W_2 - W_1) \times 100\% \quad (2)$$

式中: W_1 为铝盒重量,g; W_2 为铝盒与样品鲜重,g; W_3 为铝盒与样品干重,g。

1.2.5.2 叶绿素相对含量(SPAD值)的测定 使用SPAD-502Plus叶绿素仪(柯尼卡,日本)测定‘红颜’草莓玻璃化苗和正常苗叶绿素相对含量,选择面积基本一致的功能叶,每片叶(避开叶脉)测定3次,取平均值,每种试管苗测定6片叶。

1.2.5.3 相对电导率(EC)的测定 叶片细胞膜透性用雷磁DDS-11A型号电导率仪测定。采用浸泡法,分别称取‘红颜’草莓玻璃化和正常试管苗叶片各0.2 g,用滤纸吸干表面水分,称取3份,并剪成大小一致的碎叶片,分别置于装有50 mL去离子水的试管中;浸没样品,充分摇晃,以不加叶片只装有等量去离子水的离心管作对照,盖上盖子置于室温下浸泡处理12 h。后用电导率仪测定电导率 L_1 ,对照电导率 L_0 。将离心管封口移入沸水锅中,沸水浴加热25 min(以试管中开始冒小气泡为计时开始),取出试管,使用冰块快速降温至室温后,在室温条件下平衡10 min,摇匀,再次测定浸提液电导率 L_2 。

$$EC = (L_1 - L_0)/(L_2 - L_0) \times 100\% \quad (3)$$

式中: L_0 、 L_1 和 L_2 均为电导率,S/m。

1.2.5.4 丙二醛含量(MDA)的测定 采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法测定丙二醛含量。称取‘红颜’草莓玻璃化和正常试管苗各0.2 g剪碎,置于液氮预冷的研钵中,加入3 mL 10%三氯乙酸(TCA)溶液,并加入少许石英砂,研磨至匀浆;转入10 mL的离心管中,用2 mL TCA溶液冲洗研钵后,转入同一离心管中,匀浆在4℃下4 000 r/min离心10 min,取上清液为样品提取液。取若干干净试管,用移液枪小心缓慢吸取2 mL上清液至各样品管中(以防吸入下层沉淀),对照管中加蒸馏水2 mL,各样品管再加入2 mL 0.6% TBA,震荡混匀。封口后沸水浴反应20 min,取出放入冰盒中迅速冷却,再4℃,4 000 r/min离心10 min。取上清液,使用分光光度计分别测定532、600和450 nm波长下的吸光度值,以2 mL 10%的TCA和2 mL 0.6%的TBA混合液为空白对照,最后使用双组分分光光度计法计算MDA含量。

比色测定液中MDA浓度计算公式:

$$C_1 = 6.45 \times (A_{532} - A_{600}) - 0.56 \times A_{450} \quad (4)$$

提取液中MDA浓度计算公式:

$$C_2 = C_{MDA} \times V_3 / (V_2 \times 1\,000) \quad (5)$$

样品中MDA含量的计算公式:

$$C_3 = C_{MDA} \times V_1 / W \quad (6)$$

式中: A_{532} 、 A_{600} 和 A_{450} 分别为532、600和450 nm波长下的吸光度值; V_1 为提取液总体积,mL; V_2 为提取液用量,mL; V_3 为反应液体积,mL; W 为样品鲜重,g; C_1 为比色测定液中MDA浓度, $\mu\text{mol/L}$; C_2 为提取液中MDA浓度, $\mu\text{mol/mL}$; C_3 为样品中MDA的含量, $\mu\text{mol/g}$ 。

1.2.6 草莓玻璃化试管苗酶活性的测定

1.2.6.1 粗酶液的提取 从玻璃化的‘红颜’草莓试管苗中称取0.5 g鲜样(叶片和叶柄),加入1 mL磷酸缓冲液(0.05 mol/L,pH=7.8),冰浴研磨;研磨后再加1.5 mL缓冲液,倒入5 mL离心管中,再用2.5 mL缓冲液清洗研钵,倒入离心管中平衡,低温(4℃)离心20 min(10 500 r/min),离心后冷藏保存^[16]。

1.2.6.2 玻璃化草莓试管苗相关酶活性的测定

SOD酶活性采用氮蓝四唑(NBT)法进行测定,POD酶活性采用愈创木酚法进行测定,CAT酶活性采用紫外吸收法进行测定^[16]。待样品处理结束后,使用1510型Multiskan GO全波长酶标仪(Thermo Fisher Scientific)测定样本中SOD、POD和CAT的吸光度值,比色测定波长分别为560、470和240 nm,反应体系均为200 μL 。POD和CAT吸光度值每隔1 min读一次,读取0、1、2和3 min的OD值,利用对应公式计算酶的总活性。

SOD总活性=

$$((A_{ck} - A_E) \times V) / (0.5 \times A_{ck} \times W \times V_t) \quad (7)$$

式中:SOD为超氧化物歧化酶,units/g; A_{ck} 为照光对照管的吸光度; A_E 为样品管的吸光度; V 为样品液总体积,mL; W 为测定时样品重量,g; V_t 为测定时样品用量,mL。

$$\text{POD总活性} = (\Delta OD_{470} \times V) / (a \times W \times t) \quad (8)$$

$$\text{CAT总活性} = (\Delta OD_{240} \times V) / (a \times W \times t) \quad (9)$$

式中:POD为过氧化物酶,U/(g·min);CAT为过氧化氢酶,U/(g·min); V 为样品液总体积,mL; a 为测定时样品用量,mL; W 为测定时样品重量,g; t 为时间,min。

1.2.7 草莓移栽后生理指标测定

将生根后的‘红颜’草莓正常苗与玻璃化苗驯化移栽至日光温室中,培养40 d后测定相应指标。用直尺测量株高和最大根长;用叶绿素仪测定叶片叶绿素相对含量;用游标卡尺测量草莓根茎粗。测量生物量时,分别选取5株不同玻璃化程度的植株,将其完整取出并洗根,用剪刀从根茎处分开,阴凉处晾干,快速称量地上部和地下部的鲜重;然后在105℃烘箱内烘20 min,最后75℃烘至恒重,再分别称其地上部和地下部的干重。

$$\text{含水率} = (\text{鲜重} - \text{干重}) / \text{鲜重} \times 100\% \quad (10)$$

1.3 数据分析

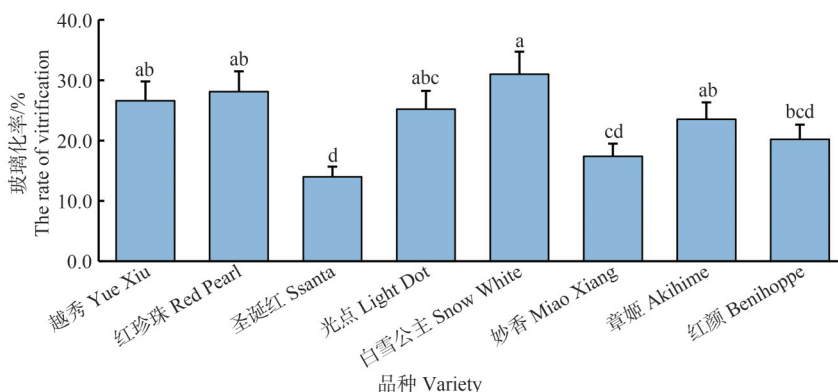
使用Microsoft Excel 2019和GraphPad Prism进行数据统计分析及作图。使用IBM SPSS Statistics 25进

行差异显著性分析,显著性水平为 $P=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 不同草莓品种试管苗玻璃化差异

将8种不同品种的草莓试管苗在继代培养基上培养30 d,继代过程中产生玻璃化情况见图2。‘圣诞红’草莓试管苗玻璃化率显著低于‘越秀’‘红珍珠’‘光点’‘白雪公主’和‘章姬’草莓($P<0.05$),但与‘妙香’和‘红颜’相比则无显著差异。玻璃化率从高到低依次为‘白雪公主’31.0%、‘红珍珠’28.1%、‘越秀’26.6%、‘光点’25.2%、‘章姬’23.5%、‘红颜’20.2%、‘妙香’17.4%和‘圣诞红’14.0%。‘白雪公主’草莓试管苗玻璃化率是‘圣诞红’的2.2倍。



不同小写字母表示不同草莓品种间差异显著($P<0.05$)。下同。

Different lowercase letters indicate significant differences between different strawberry varieties ($P<0.05$). The same below.

图2 不同品种草莓试管苗玻璃化情况

Fig. 2 Vitrification of different strawberry cultivars *in vitro* seedlings

2.2 不同玻璃化程度的‘红颜’草莓玻璃化试管苗和正常试管苗生理性状差异

2.2.1 ‘红颜’草莓试管苗含水率变化

通过测量不同玻璃化程度的草莓试管苗含水率可知(图3(a)),随着玻璃化程度的加剧,含水率逐渐上升,正常试管苗的含水率为83.2%,重度玻璃化苗的含水率为92.3%。玻璃化程度越严重,含水率越高。植物组织中水分过多积累会引起细胞内 O_2 的消耗,导致组织缺氧及水分代谢紊乱,可能会引起一系列生理生化变化及细胞结构的紊乱。草莓玻璃化苗含水量大,可能是导致叶片呈肿胀水浸状的原因。

2.2.2 ‘红颜’草莓试管苗SPAD变化

使用叶绿素仪测定玻璃化草莓试管苗叶片的

SPAD(图3(b))。随着‘红颜’草莓试管苗玻璃化程度的加剧,草莓试管苗SPAD逐渐降低。正常草莓试管苗的SPAD为45.4,轻度、中度和重度玻璃化试管苗的SPAD分别为36.8、30.8和26.1,分别是正常试管苗含量的81.1%、67.8%和57.5%。草莓玻璃化试管苗叶绿素含量降低表明光合系统受阻,影响叶片对光能的吸收和利用,从而影响试管苗的正常增殖。

2.2.3 ‘红颜’草莓试管苗EC值变化

采用浸泡法测定玻璃化草莓试管苗的EC值(图3(c))。随着‘红颜’草莓试管苗玻璃化程度的加剧,草莓试管苗EC值逐渐增高。正常试管苗的EC值为18.2 S/m,轻度、中度和重度试管苗EC值分别为31.1、44.4和62.9 S/m,是正常试管苗EC

值的1.7、2.4和3.5倍。草莓试管苗电导率升高说明试管苗可能处于一种应激状态,出现水分调节机制失衡或细胞膜受损等生理异常。

2.2.4 ‘红颜’草莓试管苗MDA含量变化

采用TBA比色法测定玻璃化的草莓试管苗MDA含量,如图3(d)所示。随着‘红颜’草莓试管苗玻璃化程度的加重,草莓试管苗MDA含量逐渐

增高。正常试管苗的MDA含量为24.7 nmol/g,轻度、中度和重度试管苗MDA含量分别为38.2、45.3和57.9 nmol/g,分别是正常试管苗含量的1.5、1.8和2.3倍。说明草莓试管苗在不适宜的环境条件下可能发生了氧化应激反应或某些生物逆境,导致氧化损伤或细胞膜破坏等,从而导致丙二醛含量增加。

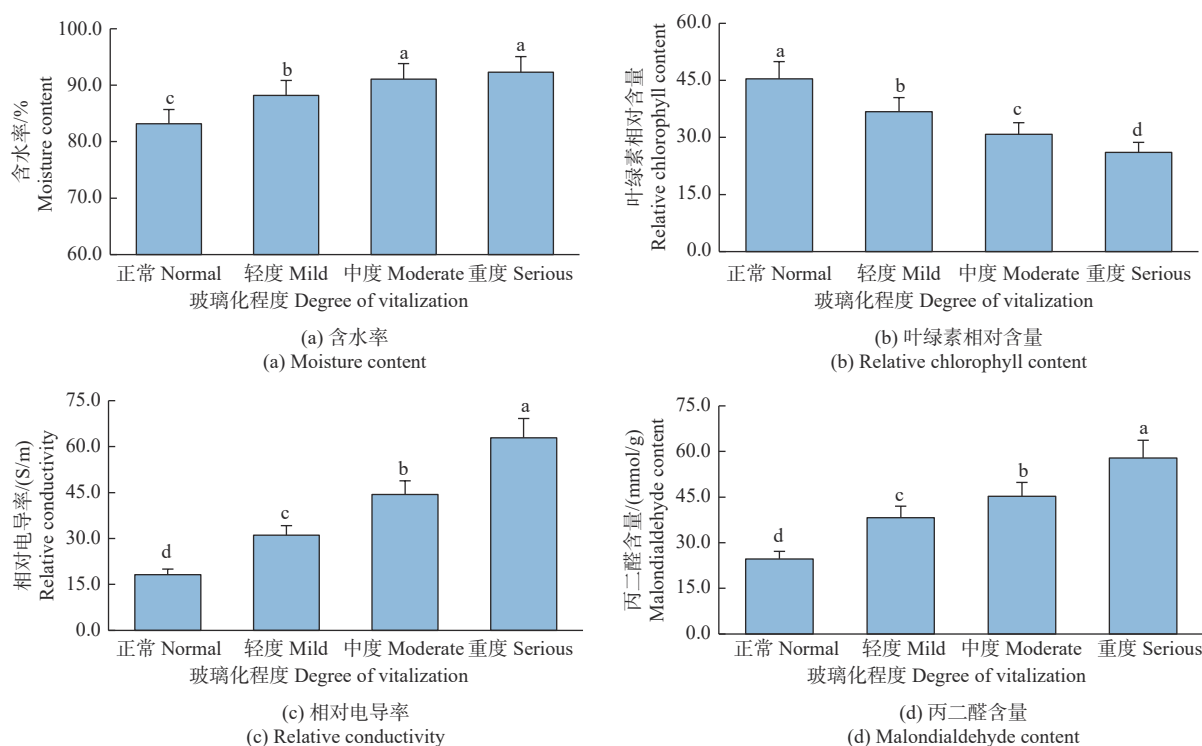


图3 不同玻璃化程度的‘红颜’草莓试管苗生理性状

Fig. 3 Physiological characteristics difference of ‘Benihoppe’ strawberry test tube seedling with different degree of vitrification

2.3 ‘红颜’草莓玻璃化试管苗中SOD、POD和CAT总活力差异

通过测定‘红颜’草莓玻璃化试管苗中SOD、POD和CAT酶活性,进一步分析草莓玻璃化试管苗中活性氧代谢情况及清除能力(图4)。相较于正常草莓试管苗,玻璃化试管苗小叶和叶柄中POD活性显著升高($P < 0.05$),CAT活性显著降低($P < 0.05$),但SOD活性没有显著变化。草莓试管苗玻璃化可能是由于试管苗发生了氧化应激反应或者某种生物逆境,使酶活性发生变化,导致活性氧清除能力下降,活性氧和过氧化氢含量过度积累,造成试管苗氧化损伤,从而发生玻璃化现象。

2.4 HgCl_2 消毒处理对‘红颜’草莓试管苗玻璃化的影响

‘红颜’草莓茎尖消毒处理后,继代增殖过程中产生玻璃化情况见表1。相同处理时间时,含量为0.5%的 HgCl_2 与含量为0.05%的 HgCl_2 处理之间具有显著性差异($P < 0.05$)。总体来看,草莓试管苗玻璃化率随 HgCl_2 含量的升高而升高。低含量 HgCl_2 不同处理时间玻璃化率差异不显著,在0.2%和0.5%时,不同处理时间之间玻璃化率存在显著性差异($P < 0.05$),随着处理时间变长,玻璃化率升高。

2.5 ‘红颜’草莓玻璃化苗和正常苗田间生长发育状况

将不同程度草莓玻璃化苗和正常苗接种到生

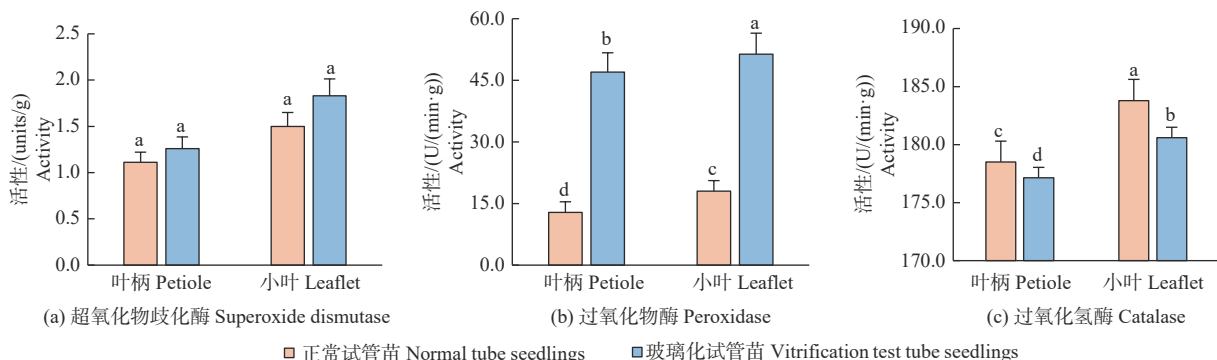


图 4 ‘红颜’草莓玻璃化与正常试管苗叶片和叶柄中酶活性比较

Fig. 4 Comparison of enzyme activities in leaves and petioles of vitrified and normal test tube seedlings of ‘Benihoppe’ strawberry

表 1 不同 HgCl₂ 浓度及消毒时间对‘红颜’试管苗玻璃化率的影响

Table 1 Effect of different HgCl₂ concentrations and disinfection time on the vitrification rate of ‘Benihoppe’ *in vitro* seedlings %

处理时间/min Processing time	HgCl ₂ 浓度 HgCl ₂ concentration				
	0	0.05	0.10	0.20	0.50
2	16.9±7.2aA	20.5±9.0aAB	19.1±8.0aA	23.0±11.6aB	28.7±6.7aC
4	16.4±7.1aA	17.0±4.2aA	21.1±10.2aB	27.1±5.8aC	34.5±8.7bD
8	15.5±6.9aA	18.4±3.5aA	21.8±4.3aB	32.2±7.1bcC	37.0±7.7bcC
12	18.1±8.4aA	21.1±7.5aAB	23.5±7.7aB	31.7±6.2bC	39.4±12.6cD
16	16.9±7.2aA	22.3±5.8aB	24.2±10.4aB	36.4±10.5cC	38.2±6.4bcC

注：不同小写字母表示不同处理时间显著差异 ($P < 0.05$)；不同大写字母表示不同浓度 HgCl₂ 处理显著差异 ($P < 0.05$)。

Note: Different lowercase letters indicate significant differences in different treatment times ($P < 0.05$). Different capital letters indicate significant differences between different concentrations of HgCl₂ treatment ($P < 0.05$).

根培养基上,待试管苗生根后,将这些生根苗进行驯化并移栽至日光温室(中国农业大学科技园)。40 d后,记录其生长状态,分别测量和统计各草莓植株的株高、叶绿素相对含量、根茎粗、最大根长、地上部干鲜重和地下部干鲜重等指标(表2)。重度玻璃化的草莓试管苗经驯化移栽40 d后,草莓植株株高、叶绿素相对含量、根茎粗、最大根长、地上部干重和鲜重、地下部干重均显著低于正常苗($P < 0.05$),草莓试管苗重度玻璃化显著影响草莓植株生长;此外,轻度和中度玻璃化的草莓试管苗驯化移栽后,会使叶片叶绿素相对含量显著降低($P < 0.05$),对其他生长指标也具有一定的影响,但无显著性差异。草莓试管苗的玻璃化严重抑制了驯化后草莓地上部及地下部生长,结合图3(b)和表2的叶绿素相对含量指标,重度和中度草莓苗的叶绿素相对含量分别从26.1和30.8上升到34.9和33.4,可见这些试管苗已经有所恢复。

3 讨论与结论

近年来,‘红颜’草莓备受消费者青睐,在市场上占有很大的比重,北京地区草莓主栽品种也以‘红颜’为主。因此,本研究以‘红颜’草莓为主要试材,研究发现其玻璃化的试管苗含水率、EC值和MDA含量等显著高于正常草莓试管苗,株高和SPAD则显著低于正常草莓试管苗($P < 0.05$)。一些研究认为氧化胁迫是造成试管苗玻璃化的重要原因^[17],玻璃化的本质是一种与氧化应激反应有关联的生理状态,组织培养中组培瓶内湿度高、植物激素含量高和渗透压改变等不利条件会引起质外体H₂O₂的产生和积累,引起活性氧(ROS)过量爆发,破坏细胞膜脂,导致结构受损,进而引起细胞过度吸水,最终诱发玻璃化现象。试管苗玻璃化的发生与活性氧代谢之间的关系,最早在1995年便有报道,Franck等^[18]在对甜樱桃组织培养的研究中测得,玻璃化苗的SOD活性相比正常苗

表2 ‘红颜’玻璃化草莓苗移栽后40 d生长指标
Table 2 Growth indicators of ‘Benihoppe’ vitrified strawberry seedlings after transplantation for 40 days

玻璃化程度 The degree of vitalization	株高/cm Plant height	叶绿素相对含量 SPAD	根茎粗/mm Rhizome wide	最大根长/cm The biggest root long	地上部鲜重/g Overground part fresh weight	地下部鲜重/g Subterranean part fresh weight	地上部干重/g Overground part dry weight	地下部干重/g The lower ground dry repeat
正常 Normal	14.9±2.1b	37.8±3.6c	6.6±0.5b	29.8±4.9b	4.0±0.8b	1.8±0.4ab	1.4±0.2b	1.1±0.3b
轻度 Mild	11.6±1.1ab	36.2±2.1ab	6.5±0.6b	25.3±3.1ab	4.4±1.0b	2.2±0.4ab	1.5±0.2b	1.1±0.1b
中度 Moderate	12.7±2.7b	33.4±1.7a	6.0±0.2b	27.1±3.3ab	4.2±0.9b	2.6±0.5b	1.3±0.3ab	1.1±0.2b
重度 Serious	9.5±0.9a	34.9±1.5ab	5.2±0.6a	23.7±4.0a	2.3±0.4a	1.5±0.3a	0.8±0.2a	0.7±0.2a

注:不同小写字母表示不同玻璃化程度间差异显著($P<0.05$)。
Note: Different lowercase letters indicate significant differences between different degrees of vitrification ($P<0.05$).

显著上升,他认为玻璃化是由植株中的SOD活性升高,从而导致H₂O₂积累;吕敏等^[19]通过对蓝莓玻璃化试管苗的研究,发现抗氧化酶系统中POD活性显著升高,SOD和CAT活性显著降低,O₂⁻产生速率、H₂O₂积累量及MDA含量明显增加,推断玻璃化的发生可能是由于SOD活性降低,活性氧过度积累,从而引起的氧化损伤。本研究也发现‘红颜’草莓玻璃化试管苗的POD活性显著升高,CAT活性显著降低($P<0.05$),SOD活性则没有显著性变化。推测可能是由于不同植物不同品种SOD总活性变化趋势不相同,胁迫超过植株可调控阈值,丧失自我修复能力;还可能受基因翻译后的修饰调控等因素的影响^[20],因此测定酶活性变化难以确切了解玻璃化发生的原因。

本研究通过测定叶片内膜脂过氧化物MDA和外渗液EC值含量变化,发现二者均显著升高($P<0.05$)。可能是因为保护酶系统失衡,植株体内清除活性氧能力下降,造成具有强氧化作用的多种自由基对膜造成损伤、水分调节机制失衡等生理异常,从而导致试管苗玻璃化的发生。有学者认为玻璃化是由于胁迫导致内源乙烯形成,乙烯通过减小细胞气孔开度降低失水率和增强水孔蛋白磷酸化水平,提高细胞吸水能力,导致试管苗玻璃化;或质外体超度含水导致组织缺氧和呼吸电子传递链受阻,引起氧化胁迫发生,最终导致试管苗的玻璃化^[22];除此之外,培养基的成分也是影响组培苗玻璃化发生的一个重要因素,如琼脂浓度^[21]、大量元素浓度和蔗糖浓度^[22]、硝态氮和铵态氮的比例^[23]、

生长调节剂的种类和浓度^[24]对试管苗玻璃化的发生均有影响,继代培养次数^[25]和培养环境也会影响玻璃化的发生。

本研究还发现接种前使用不同含量HgCl₂对‘红颜’草莓茎尖进行消毒处理,不同含量HgCl₂处理和不同处理时间对‘红颜’草莓试管苗玻璃化均具有一定影响,HgCl₂含量越高,消毒时间越长,玻璃化率越高,但也要注意控制HgCl₂含量和处理时间。此外,将重度玻璃化的草莓试管苗驯化栽培后,发现其生长指标会受到影响。试管苗玻璃化严重影响试管苗的进一步增殖以及后期的驯化栽培,为避免发生资源浪费和财产损失,在草莓组织培养过程中,可以采取优化培养条件和调整培养基成分等措施来降低玻璃化的发生,如增加光强^[26]、适当降温、增加通风^[27]和减少继代培养的次数等方式降低玻璃化发生率或改善玻璃化程度,也可通过在培养基中添加活性炭、聚乙烯醇、钙离子^[28]和使用适宜含量的外植体消毒剂等降低试管苗玻璃化发生,以促进草莓试管苗的健康生长。

综上所述,草莓试管苗玻璃化可能由于受到氧化胁迫的影响,致使其生理特性发生变化,保护酶系统失衡,从而出现透明水浸状异常生长的现象。另外,不同草莓品种试管苗玻璃化率不同,在日常培养繁殖过程中,接种前可使用适宜含量的HgCl₂进行消毒处理以减轻玻璃化的发生,达到优化草莓组织培养技术的目标。

参考文献 References

- [1] 王燕, 陈丙义, 章镇, 高志红, 乔玉山. 黄毛草莓组织培养与快繁技术研究[J]. 西南农业学报, 2012, 25(1): 252-256
Wang Y, Chen B Y, Zhang Z, Gao Z H, Qiao Y S. Study on tissue culture and rapid propagation technique of *Fragaria nilgerrensis* [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 25(1): 252-256 (in Chinese)
- [2] 孙恒. 草莓的未来前景[M]. 南京: 南京大学出版社, 2001
Sun H. *The Future Prospects of Strawberries* [M]. Nanjing: Nanjing University Press, 2001 (in Chinese)
- [3] 司长征, 蔡联军, 李国强. 红颜草莓组培脱毒壮苗快繁技术与应用[J]. 中国果菜, 2013, 33(4): 6-9
Si C Z, Cai L J, Li G Q. Tissue culture, virus-free and strong seedling rapid propagation technology and application of Benihoppe strawberry [J]. *China Fruit Vegetable*, 2013, 33(4): 6-9 (in Chinese)
- [4] Phillips D J, Matthews G J. Growth and development of carnation shoot tips *in vitro* [J]. *Botanical Gazette*, 1964, 125(1): 7-12
- [5] Debergh P, Aitken-Christie J, Cohen D, Grout B, von Arnold S, Zimmerman R, Ziv M. Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1992, 30(2): 135-140
- [6] 赵一鸣, 隋宝凤, 张欣燕, 侯凯琳, 刘柏玲. 组织培养中玻璃化现象的研究进展[J]. 国土与自然资源研究, 2019(6): 68-74
Zhao Y M, Sui B F, Zhang X Y, Hou K L, Liu B L. Research progress of vitrification in plant tissue culture [J]. *Territory & Natural Resources Study*, 2019(6): 68-74 (in Chinese)
- [7] 陈兵先, 黄宝灵, 吕成群, 杨来安, 陈文军, 任苓, 王劲松. 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, 25(1): 1-5
Chen B X, Huang B L, Lü C Q, Yang L A, Chen W J, Ren L, Wang J S. Research progress on vitrification of plant tissue culture test-tube seedlings [J]. *China Forestry Science and Technology*, 2011, 25(1): 1-5 (in Chinese)
- [8] Sreedhar R V, Venkatachalam L, Neelwarne B. Hyperhydricity-related morphologic and biochemical changes in *Vanilla* (*Vanilla planifolia*) [J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2009, 28(1): 46-57
- [9] Dewir Y H, Chakrabarty D, Ali M B, Hahn E J, Paek K Y. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2006, 58(1/3): 93-99
- [10] 谢芝馨, 张玉喜, 于元杰. 大葱组织培养中玻璃苗特性研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24(11): 2146-2149
Xie Z X, Zhang Y X, Yu Y J. Studies on vitrification characteristics of *in vitro* cultured Chinese onion (*Allium fistulosum*) [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2004, 24(11): 2146-2149 (in Chinese)
- [11] 孙庆春, 郑成淑, 丰震. 菊花玻璃化苗与正常苗的生理特性比较[J]. 山东农业科学, 2009, 41(5): 45-47
Sun Q C, Zheng C S, Feng Z. Comparison of physiological characteristics between *Chrysanthemum vitrified* and normal shoots [J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2009, 41(5): 45-47 (in Chinese)
- [12] Saher S, Piqueras A, Hellin E, Olmos E. Prevention of hyperhydricity in micropropagated carnation shoots by bottom cooling: Implications of oxidative stress [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2005, 81(2): 149-158
- [13] Gao H Y, Li J W, Ji H N, An L J, Xia X Y. Hyperhydricity-induced ultrastructural and physiological changes in blueberry (*Vaccinium* spp) [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2018, 133(1): 65-76
- [14] 常有宏, 张玉娇, 李晓刚, 蔺经, 杨青松, 王中华, 王宏伟. '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[J]. 园艺学报, 2011, 38(2): 225-232
Chang Y H, Zhang Y J, Li X G, Lin J, Yang Q S, Wang Z H, Wang H W. Comparative study on physiological and biochemical characteristic and ultra-structure in normal and hyperhydric shoots *in vitro* of 'Huangguan' pear [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2011, 38(2): 225-232 (in Chinese)
- [15] 张敏, 张曙光, 孙红绪, 方毅, 杨玉萍. 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, 41(6): 82-83
Zhang M, Zhang S G, Sun H X, Fang Y, Yang Y P. Study on several factors caused vitrification in strawberry tissue culture seedling [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2002, 41(6): 82-83 (in Chinese)
- [16] 宋磊. 分根交替灌溉对大棚草莓生长、光合作用和氧化酶活性的影响[D]. 泰安: 山东农业大学, 2008
Song L. Effects of alternative partial rootzone irrigation (APRI) on growth, photosynthesis and the pntioxidant enzyme activity of strawberry in greenhouse [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2008 (in Chinese)
- [17] 张换换, 孙丹, 夏秀英. 质外体过氧化氢对石竹玻璃化的影响[J]. 分子植物育种, 2021, 19(3): 954-961
Zhang H H, Sun D, Xia X Y. Effect of H₂O₂ in apoplast on hyperhydricity of *Dianthus chinensis* L [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19(3): 954-961 (in Chinese)
- [18] Franck T, Kevers C, Gaspar T. Protective enzymatic systems against activated oxygen species compared in normal and vitrified shoots of *Prunus avium* L L raised *in vitro* [J]. *Plant Growth Regulation*, 1995, 16(3): 253-256
- [19] 吕敏, 夏秀英, 徐品三, 李波, 郭照东. 蓝莓玻璃化试管苗的显微结构及生理生化特性变化[J]. 植物生理学报, 2014, 50(4): 453-460
Lü M, Xia X Y, Xu P S, Li B, Guo Z D. Changes in microstructure and physiological-biochemical characteristics of hyperhydric shoots of blueberry (*Vaccinium* spp) *in vitro* [J]. *Plant Physiology Journal*, 2014, 50(4): 453-460 (in Chinese)
- [20] 崔世瑞, 陈辉, 陈明杰, 汪虹, 冯志勇. 肥皂草素对斑玉蕈菌丝体抗氧化酶活性及相关基因表达量的影响[J]. 微生物学通报, 2015, 42(8): 1466-1473
Cui S R, Chen H, Chen M J, Wang H, Feng Z Y. Effects of saponin on activities and gene expressions of antioxidant enzyme in *Hypsizygus marmoreus* Mycelium [J]. *Microbiology China*, 2015, 42(8): 1466-1473 (in Chinese)
- [21] van den Dries N, Gianni S, Czerednik A, Krens F A, de Klerk G J M. Flooding of the apoplast is a key factor in the development of hyperhydricity [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(16): 5221-5230
- [22] 曹善东. 组培条件对草莓脱毒试管苗玻璃化影响的研究[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2006, 37(2): 172-174, 180
Cao S D. Study of influence of tissue culture condition on vitrification of strawberry virus-free cuvette plantlet [J]. *Journal of Shandong Agricultural University: Natural Science Edition*, 2006, 37(2): 172-174, 180 (in Chinese)
- [23] El-Dawayati M M, Zayed Z E. Controlling hyperhydricity in date palm *in vitro* culture by reduced concentration of nitrate nutrients [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2017, 1637: 175-183

- [24] 付崇毅,姜伟,王建国,杜金伟. 草莓茎尖组织培养防褐化及玻璃化研究[J]. 北方农业学报, 2016, 44(1): 46-51
Fu C Y, Jiang W, Wang J G, Du J W. Study on preventing browning and vitrification for strawberry in stem-tip culture[J]. *Journal of Northern Agriculture*, 2016, 44(1): 46-51 (in Chinese)
- [25] 金真,王康丽,梁佳惠,梁树乐. 培养基和外源激素对‘章姬’草莓茎尖培养的影响研究[J]. 农学学报, 2015, 5(8): 73-77
Jin Z, Wang K L, Liang J H, Liang S L. Effects of exogenous hormones and medium on stem tip germination ‘Akihime’ strawberry[J]. *Journal of Agriculture*, 2015, 5(8): 73-77 (in Chinese)
- [26] Qing D J, Yang Z, Li M Z, Wong W S, Guo G Y, Liu S C, Guo H W, Li N. Quantitative and functional phosphoproteomic analysis reveals that ethylene regulates water transport via the C-terminal phosphorylation of aquaporin PIP2; 1 in *Arabidopsis* [J]. *Molecular Plant*, 2016, 9(1): 158-174
- [27] Kevers C, Gaspar T. Vitrification of carnation *in vitro*: Changes in ethylene production, ACC level and capacity to convert ACC to ethylene [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1985, 4(3): 215-223
- [28] 周书利. 草莓试管苗玻璃化的发生及其恢复技术研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2013
Zhou S L. Vitrification in *in vitro* culture of strawberry and its recovery technology research [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2013 (in Chinese)

责任编辑: 董金波



第一作者简介: 贺强, 硕士研究生, 毕业于中国农业大学园艺学院果树系农艺与种业专业。硕士期间曾担任果树系第三团支部书记、园艺学院研究生会学术部负责人以及实验室安全员等职务, 荣获中国农业大学“硕士一等学业奖学金”“三好学生”荣誉。本科就读于山东农业大学, 曾主持了省级大学生创新创业训练计划项目、校级大学生创业训练项目、发展性资助项目以及多项“互联网+”创新创业比赛类项目。曾先后荣获2次省级奖项, 10余次校级奖项, 6次校级奖学金以及校级“优秀毕业生”“优秀学生团干部”“优秀学生”等荣誉称号。



通讯作者简介: 王红清, 博士, 教授, 博士生导师。担任中国园艺学会草莓分会常务理事, 中国设施园艺分会委员会委员, 全面负责中国农业大学新农村发展研究院“草莓教授工作站”工作。主持了国家自然科学基金项目、国家重点研发项目(子课题)、科技部863项目(子课题)、国家科技攻关项目、农业科技成果转化基金项目和北京市科委项目等多项课题。被聘为北京市科委农村发展中心咨询专家。曾担任“第七届世界草莓大会”“北京农业嘉年华”技术指导专家。参编了《草莓园艺工》《园艺植物栽培学总论》《园艺植物生物学》《桃树学》《中国草莓》《草莓栽培手册》等书籍。