

红檵木组织培养玻璃化苗发生原因初探

尹恒¹,唐前瑞¹,桂克印²,陈丽¹,吴莉英¹

(1. 湖南农业大学园艺园林学院,湖南长沙 410128;2. 吉首大学城乡资源与规划学院,湖南张家界 427000)

摘要:通过在培养基中加入不同质量浓度6-BA、NAA、蔗糖、琼脂、活性炭并进行正交试验,得出影响红檵木玻璃化苗发生的因素及其影响力大小顺序为6-BA > 活性炭 > 琼脂 > NAA > 蔗糖。6-BA的质量浓度大于2 mg/L,会大大增加玻璃化苗的产生。考虑到增殖率,应适当加入少量活性炭或聚乙烯醇。此外,减少继代次数,选择中部节段作为外植体,也有利于玻璃化率的降低。

关键词:红檵木;玻璃化;6-BA;聚乙烯醇

中图分类号:S687 **文献标识码:**A

A preliminary study on the tissue culture to overcome the vitrification of *Loropetalum chinense* Oliver var *rubrum* Yieh

YIN Heng¹, TANG Qian-rui¹, GUI Ke-yin², CHEN Li¹, WU Li-ying¹

(1. College of Horticulture and Landscape Architecture, HANU, Changsha 410128, China;

2. Faculty of Urban and Rural Resources and landscape Architecture Jishou college, Zhangjiajie 427000, China)

Abstract: Effect of natural substances on the vitrification of plantlets of *Loropetalum chinense* Oliver var *rubrum* Yieh was studied by an orthogonal design experiment. The results showed that: 6-benzyladenine > activated carbon > agaragar > NAA > sugar. And also adds to adequate PVA, choose mid twig might reduce the vitrification rate.

Key words: *Loropetalum chinense* Oliver var *rubrum* Yieh; Vitrificatio; 6-Benzyladenine; Polyvinyl alcohol

红檵木(*Loropetalum chinense* Oliver var *rubrum* Yieh)又称红桤木、红花檵木、红檵花,系金缕梅科(Hamamelidaceae)金缕梅亚科檵木属木本植物^[1],为湖南特有的珍稀观赏树种。花叶俱美,四季景象变化丰富,是园林应用最为广泛的彩叶植物。据报道,在红檵木离体快繁体系的建立过程中玻璃化现象普遍存在^[2-3],严重影响了红檵木高效再生体系的建立。本文针对红檵木组织培养中出现的玻璃化现象,从研究培养基组成成分、外植体取材部位和继代次数几个不同方面找寻玻璃化的影响因素,旨在解决红檵木组织培养过程中的玻璃化现象,为红檵木规模化生产提供参考,为种质离体保存提供前提。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

供试材料为红檵木无菌苗。

1.2 试验方法

1.2.1 材料的获得 供试材料为从湖南农业大学花卉基地采集的红檵木当年生茎段,以自上而下第2节段腋芽为外植体,经流水冲洗40 min,2%的次氯酸钠液消毒4 min,再用0.1%的HgCl₂消毒10 min,然后用无菌水冲洗3~4遍,进行离体培养获得无菌试管苗。初始培养基为MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.05 mg/L+蔗糖3%+琼脂0.8%^[3],培养温度为22℃左右,光照度为2000 lx,每天光照12 h。培养30 d后,接种到相同培养基中进行继代培养,继代2次。

1.2.2 培养基组成成分的设计 将上述继代2次的试管苗分别转移到下述培养基中。

(1)MS培养基中加入6-BA的质量浓度分别为0,0.5,1.0,2.0,3.0 mg/L;KT的质量浓度分别为0,0.5,1.0,2.0,3.0 mg/L,比较不同细胞分裂素类物质对红檵木试管苗玻璃化的影响。

(2)在MS培养基中加入IAA的质量浓度分别为0,0.1,0.5,1.0,1.5 mg/L;NAA的质量浓度分别为0,0.1,0.5,1.0,1.5 mg/L,比较不同细胞生长素类物质对红檵木试管苗玻璃化的影响。

(3)培养基中加入聚乙烯醇(PVA)的质量浓度分别为0,1.0,2.0,3.0 g/L,比较不同质量浓度的6-BA,KT对红檵木试管苗玻璃化的影响。

(4)采用5因素4水平正交设计试验方案(见表1),因素及水平:蔗糖质量分数(2%,3%,4%,6%)、琼脂含量(0.6%,0.8%,1.0%,1.2%)、6-BA(0,0.5,1.0,2.0 mg/L)、NAA(0,0.05,0.1,0.5 mg/L)、活性炭(0,0.1%,0.2%,0.3%),比较不同成分对红檵木试管苗玻璃化的综合影响。

表1 正交培养设计方案 $L_{16}(4^5)$

处理	蔗糖/%	琼脂/%	BA/(mg/L)	NAA/(mg/L)	活性炭/%
D1	2	0.6	0	0	0
D2	2	0.8	0.5	0.05	0.1
D3	2	1.0	1.0	0.10	0.2
D4	2	1.2	2.0	0.50	0.3
D5	3	0.6	0.5	0.10	0.3
D6	3	0.8	0	0.50	0.2
D7	3	1.0	2.0	0.05	0.1
D8	3	1.2	1.0	0	0
D9	4	0.6	1.0	0.50	0.1
D10	4	0.8	2.0	0.10	0
D11	4	1.0	0	0.05	0.3
D12	4	1.2	0.5	0	0.2
D13	5	0.6	2.0	0.05	0.2
D14	5	0.8	1.0	0	0.3
D15	5	1.0	0.5	0.50	0
D16	5	1.2	0	0.10	0.1

1.2.3 不同取材部位的外植体对玻璃化苗发生的影响 以MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.05 mg/L为基本培养基,蔗糖含量为3%,琼脂用量为0.8%,相同条件下继代2次的红檵木,剔除玻璃苗,选择生长健壮的不菌苗,取材分别为0.5~1.0 cm茎尖、自上而下节段、茎段基部,分别接种在培养基MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.05 mg/L中,培养30 d,观察试管苗的生长状况,以茎叶半透明状作为玻璃化的依据,统计增殖率、玻璃化率。

1.2.4 继代次数对红檵木试管苗玻璃化的影响 以

MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.05 mg/L为基本培养基,蔗糖含量为3%,琼脂比例为0.8%,相同条件下继代2,4,6次后,统计试管苗褐化率和玻璃化率。

2 结果与分析

2.1 不同细胞分裂素类物质及其质量浓度对红檵木试管苗玻璃化的影响

据报道,培养基中的细胞分裂素类物质易导致玻璃苗产生^[4-9],但不同种类及其质量浓度对不同植物玻璃化的影响是有差异的。培养基中分别添加不同质量浓度的6-BA、KT,对红檵木玻璃化苗的发生率进行了测定,结果(见表2)表明:当6-BA质量浓度为0.5 mg/L,增殖系数和玻璃化率最低,为1.67和3.3%,随着6-BA质量浓度升高,增殖系数和玻璃化率也逐渐升高,当6-BA质量浓度为3.0 mg/L时,增殖系数和玻璃化率最高,分别为2.79和44.8%。加入KT的培养基,其增殖系数与玻璃化率与KT质量浓度亦呈正相关,KT质量浓度为3.0 mg/L时,增殖系数和玻璃化率最大,分别为2.70和30%,低于6-BA为3.0 mg/L时的玻璃化率。

表2 6-BA,KT质量浓度对红檵木试管苗玻璃化的影响

类别	质量浓度/(mg/L)	接种总数/个	增殖系数	玻璃苗数/个	玻璃化率/%
6-BA	0.5	30	1.67	1	3.3c
	1.0	30	2.30	2	6.70c
	2.0	30	2.50	12	40.0a
	3.0	29	2.79	13	44.8a
KT	0.5	29	1.41	0	0c
	1.0	28	1.75	2	7.1c
	2.0	31	2.26	8	25.8b
	3.0	30	2.70	9	30.0b
CK	0	29	0.86	0	0c

表中小写字母表示差异显著水平 $\alpha=0.05$ 。

2.2 不同细胞生长素类物质及其质量浓度对红檵木试管苗玻璃化的影响

细胞生长素类物质可以诱导培养物内源细胞分裂素质量浓度升高^[10],培养基中分别添加不同质量浓度IAA、NAA,对红檵木玻璃化苗的发生率进行了测定,结果(见表3)表明:随着IAA、NAA质量浓度升高,增殖系数和玻璃化率也逐渐升高。当NAA为1.5 mg/L时,增殖系数和玻璃化率最高,分别为1.77和6.7%。

表3 IAA、NAA对红榿木试管苗玻璃化的影响

类别	质量浓度/(mg/L)	接种总数/个	增殖系数	玻璃苗数/个	玻璃化率/%
IAA	0.1	30	0.90	0	0d
	0.5	29	1.07	0	0d
	1.0	28	1.39	1	3.6c
	1.5	30	1.67	2	6.7b
NAA	0.1	31	0.97	1	3.2c
	0.5	30	1.10	0	3.3c
	1.0	30	1.27	2	6.7b
	1.5	30	1.77	2	13.3a
CK	0	29	0.86	0	0d

表中小写字母表示差异显著水平 $\alpha=0.05$ 。

2.3 聚乙烯醇(PVA)对红榿木试管苗玻璃化的影响

随着聚乙烯醇质量浓度的增加,玻璃化发生率呈减少的趋势(见表4)。当PVA质量浓度为21g/L时,玻璃化率降低至3.3%,说明聚乙烯醇对玻璃化的预防有一定的效果。但增殖率又与聚乙烯醇

呈负相关,且质量浓度为1g/L时,出现了试管苗的生根现象,抑制了红榿木的正常分化和生长。

表4 不同聚乙烯醇(PVA)质量浓度对红榿木试管苗玻璃化的影响

PVA/(g/L)	接种总数/个	增殖系数	玻璃苗数/个	玻璃化率/%
1	27	1.11	3	11.1b
2	30	0.77	1	3.3c
3	30	0.53	1	3.3c
CK	30	2.07	7	23.3a

表中小写字母表示差异显著水平 $\alpha=0.05$ 。

2.4 不同含量蔗糖、琼脂、6-BA、NAA及活性炭对红榿木试管苗玻璃化的综合影响

处理D10和D7的玻璃化率最大,分别为14.1%和13.78%,而处理D11、D16的玻璃化程度极显著低于其他处理,但增殖系数较低,分别为1.75和1.14(见表5)。可见,过高的活性炭在降低玻璃化苗产生的同时,也抑制了试管苗的生长。

表5 不同处理组合对红榿木试管苗玻璃化综合影响

处理	蔗糖/%	琼脂/%	BA/(mg/L)	NAA/(mg/L)	活性炭/%	增殖系数	玻璃化率/%
D1	2	0.6	0	0	0	1.31	7.73B
D2	2	0.8	0.5	0.05	0.1	1.11	3.34CDE
D3	2	1.0	1.0	0.10	0.2	1.25	7.41B
D4	2	1.2	2.0	0.50	0.3	1.34	6.43BC
D5	3	0.6	0.5	0.10	0.3	1.09	4.28BCD
D6	3	0.8	0	0.50	0.2	1.52	3.42CDE
D7	3	1.0	2.0	0.05	0.1	1.67	13.78A
D8	3	1.2	1.0	0	0	2.57	4.22BCD
D9	4	0.6	1.0	0.50	0.1	1.83	4.66BCD
D10	4	0.8	2.0	0.10	0	2.95	14.10A
D11	4	1.0	0	0.05	0.3	1.75	0E
D12	4	1.2	0.5	0	0.2	1.23	2.22DE
D13	5	0.6	2.0	0.05	0.2	0.71	5.50BCD
D14	5	0.8	1.0	0	0.3	1.82	4.49BCD
D15	5	1.0	0.5	0.50	0	2.39	7.47B
D16	5	1.2	0	0.10	0.1	1.14	0E

表中大写字母表示差异显著水平 $\alpha=0.01$ 。

方差分析(F检验)(见表6)显示,F值越大,产生玻璃化苗的可能性越大。结果表明:6-BA > 活性

碳 > 琼脂 > NAA > 蔗糖,达到极显著,而蔗糖对玻璃化苗的产生影响则不显著。

表6 玻璃化率的正交设计方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	显著水平
区组	5.3118	2	2.65589		
蔗糖浓度	32.6724	3	10.89081	3.48997	0.02768
琼脂	103.7827	3	34.59424	11.08576	0.00005
6-BA	343.2756	3	114.4252	36.66765	0
NAA	99.5123	3	33.17077	10.6296	0.00006
活性炭	143.1035	3	47.70116	15.28588	0
误差	93.61809	30	3.1206		
总和	821.2764				

对6-BA、活性炭、琼脂、NAA分别进行各水平间差异显著性SSR检验,结果见表7,8,9,10。

表7 6-BA各质量浓度间差异显著性SSR检验

处理	质量浓度/(mg/L)	均值	5%显著水平	1%显著水平
4	2.0	9.949 17	a	A
3	1.0	5.195	b	B
2	0.5	4.328 33	b	BC
1	0	2.786 67	c	C

表7表明:6-BA的4个质量浓度中,0.5 mg/L和1.0 mg/L在0.5水平上差异不显著,0和0.5 mg/L在0.01水平上不显著,0.05水平上差异显著。所以,6-BA浓度为2 mg/L时,组织培养苗玻璃化率达到最高值。

表8 活性炭各含量间差异显著性SSR检验

处理	含量/%	均值	5%显著水平	1%显著水平
1	0	8.380 83	a	A
2	0.1	5.442 5	ab	B
3	0.2	4.637 5	bc	B
4	0.3	3.798 33	c	B

表8表明:活性炭的4个含量中,含量为0的组织培养苗玻璃化率极显著高于对照,含量为0.3%时,组织培养苗玻璃化率最低。但过高含量的活性炭会减少培养基中的水分,进而影响增殖率。所以活性炭的含量应控制在0.1%以内。

表9 琼脂各含量间差异显著性SSR检验

处理	含量/%	均值	5%显著水平	1%显著水平
3	1.0	7.164 17	a	A
2	0.8	6.334 17	ab	A
1	0.6	5.540 83	b	A
4	1.2	3.22	c	B

表9检验结果表明:当琼脂含量增加到1.2%时,组织培养苗玻璃化率达到最低值,具有极显著差异。而含量0.6%与0.8%,0.8%与1.0%水平之间无显著差异。

表10 NAA各质量浓度间差异显著性SSR检验

处理	质量浓度/(mg/L)	均值	5%显著水平	1%显著水平
1	0.00	7.055	a	A
3	0.10	6.446 67	ab	A
4	0.50	5.492 5	b	A
2	0.05	3.265	c	B

表10检验结果表明:质量浓度为0.05 mg/L的NAA在0.01水平上差异极显著。过高或过低质量浓度的NAA,都会提高玻璃化苗的发生率。

2.5 不同取材部位的外植体对玻璃化苗发生的影响

茎尖外植体与基部节段外植体的玻璃化苗差异很大。基部节段的外植体玻璃化率为0,中部节段分别为12.9%和13.3%,茎尖外植体的玻璃化率最高,达34.5%(见表11)。这一结果表明,茎尖外植体最容易诱导产生玻璃化苗。

表11 不同取材部位的外植体对玻璃化苗发生的影响

外植体材料	接种总数/个	增殖系数	玻璃苗数/个	玻璃化率/%
茎尖	29	3.10	10	34.5a
第1节段	31	2.26	4	12.9b
第2节段	30	1.70	4	13.3b
基部节段	30	1.07	0	0c

表中小写字母表示差异显著水平 $\alpha=0.05$ 。

2.6 继代次数对红檵木试管苗玻璃化的影响

随着继代次数的增加,玻璃化现象明显加剧,且褐化率也不断增加,继代次数为第6代时,玻璃化率和褐化率达到最大值,分别为46.7%和40.0%(见图1)。

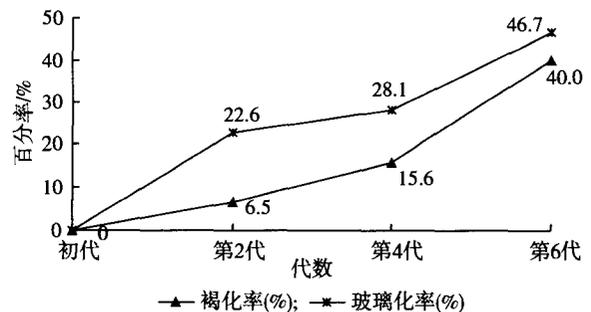


图1 继代次数对红檵木试管苗玻璃化、褐化的影响

3 小结

对于6-BA和KT,6-BA对红檵木试管苗玻璃化有明显促进作用,如果质量浓度控制在0.5~1.0 mg/L之间,可明显控制玻璃化苗的产生,又有利于增殖。NAA对红檵木玻璃化苗的产生效应大于IAA。

适宜质量浓度的聚乙烯醇可以达到抑制红檵木试管苗玻璃化的作用。这与张胜珍等^[11]在培养基中添加聚乙烯醇可抑制菘蓝组培苗玻璃化的结果相同。因为聚乙烯醇是一种水分胁迫剂,而在培养基

中加入了聚乙烯醇,可改善培养基的透气性,这也很好地解释了出现生根现象的原因。但聚乙烯醇含量过高,增殖率会降低,应综合考虑 PVA 的正负效果,酌量添加。

对于茎尖、第2及3节段、基部节段3个不同材料为外植体材料,结果表明茎尖最易出现玻璃化,第2,3节段次之,基部节段没有玻璃化现象。这与周菊华等^[8]、吴若箐等^[12]的结果不一致。茎尖材料幼嫩体积小,与培养基表面接触面大,长期处于较高水分的环境,玻璃苗发生机率大^[13]。

结果还表明,琼脂、活性碳含量也影响红榿木玻璃苗的发生,蔗糖含量对红榿木玻璃化的影响不大。故培养基中加入少量活性碳,适当提高琼脂含量,可以降低玻璃苗的发生。

参考文献:

- [1] 中国植物志编辑委员会. 湖南植物志[M]. 长沙:湖南科技出版社,2000.
- [2] 彭尽晖. 榿木芽变生物学特性及离体培养研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2004.

- [3] 李琦. 红榿木组织培养及其对叶色影响的研究[D]. 成都:四川农业大学,2006.
- [4] 李瑶,王利华,叶鸣明,等. 影响香石竹试管苗玻璃化的因素[J]. 植物生理学通讯,1997,33(4):256-258.
- [5] 卜学贤,陈维伦. 试管植物的玻璃化现象[J]. 植物生理学通讯,1987(5):13-18.
- [6] 梁海曼,周菊华. 试管苗玻璃化现象的生理生化和机理探讨[J]. 武汉植物学研究,1994,12(3):281-288.
- [7] 张翠玉,廖晴. 月季试管苗玻璃化原因及控制方法研究[J]. 新疆农业科学,1991(2):76-78.
- [8] 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.
- [9] Kevers C, Coumans M, Coumans-Gilles M F, et al., Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured in vitro[J]. Physiol Plant, 1984, (61):69-74
- [10] Leshem P. The effects of growth regulators on vitrification in melon and carnation[J]. Ann Bot, 1988(62):271-276.
- [11] 张胜珍,容绍英,祝维芳,等. 聚乙烯醇对菘蓝组培苗玻璃化现象发生的影响[J]. 唐山师范学院学报,2007,9(29):5,36-38
- [12] 吴若箐,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.
- [13] 秦静远. 植物及植物生理[M]. 北京:化学工业出版社,2004.

(上接第9页)

经综合评价和选择,初选出生长表现良好的柳树无性系9个,其中SH24、D1、JS12、J172(对照)等4个无性系生长表现突出,前3个无性系平均苗高年生长量为271.3cm,高出对照10.4cm。选择这3个无性系和生长好的9个无性系进行试验,其所获得的苗高、地径的苗期遗传增益分别为8.1%,11.8%和10.5%,14.8%。

3 结论与讨论

(1)45个柳树无性系间的苗期生长表现出无性系间的显著差异,且具有较高的变异水平,苗高和地径的遗传方差在表型方差中分别占73%和72.9%,苗高的广义遗传力为73%,遗传变异系数为7.78%,地径广义遗传力为72.2%,遗传变异系数为9.3%。广义遗传力和遗传变异系数都较高,从中进行苗期选择,会取得较大的遗传改良效果。

(2)经综合评价并初选出的9个无性系,可用于多点造林试验,据此估算的苗高遗传增益为

8.1%,地径的遗传增益为10.5%。

(3)试验对照品种为J172,系全国重点推广良种,早期速生。本试验对照标准高,可以保证试验结果的可靠性。

(4)生长量是苗期选择的重要指标,并非唯一指标。本研究仅从苗高、地径2个指标对柳树无性系进行分析选择并不全面。但为选择速生丰产柳树良种,该试验结果可提供一定依据。

参考文献:

- [1] 涂忠虞,黄敏仁. 旱柳、垂柳、白柳和爆竹柳的遗传改良[M]//阔叶树遗传改良. 北京:科学技术文献出版社,1991:142-166.
- [2] 周永学,苏晓华. 引种欧洲黑杨无性系苗期生长测定与选择[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2004,32(10):102-106.
- [3] 马育华. 植物育种的数量遗传学基础[M]. 南京:江苏科学技术出版社,1980.
- [4] 王明麻,黄敏仁. 黑杨派无性系研究: I 苗期选择[J]. 南京林业大学学报,1987,11(2):1-12.