

影响高山杜鹃试管苗玻璃化的几个因素研究

何芳兰¹, 李毅², 赵明¹, 余秋实¹, 胡相伟³

(1. 甘肃省治沙研究所 荒漠化重点实验室, 甘肃 武威 733000; 2. 甘肃农业大学 林学院, 甘肃 兰州 730070;
3. 红古苗木繁育中心, 甘肃 兰州 730085)

摘要:为了找出能够克服或降低高山杜鹃试管苗玻璃化的最适培养条件, 本文采用单因子实验设计, 以高山杜鹃茎尖作为外植体, Read 为基本培养基, 研究了培养基中添加物 6-BA、蔗糖、琼脂、活性炭的浓度及培养温度等因子对高山杜鹃试管苗生长的影响。结果表明, 6-BA、蔗糖、琼脂、活性炭的浓度及培养温度均对试管苗玻璃化率有显著影响。附加了 1.5~2.0 mg/L 6-BA, 3%~4% 蔗糖, 0.6% 琼脂, 0.3% 活性炭的 Read 培养基和 25℃ 的培养温度能有效得降低高山杜鹃试管苗玻璃化率, 而且增殖系数较高、有效苗生长较快。

关键词:高山杜鹃; 组织培养; 玻璃化; 影响因素

中图分类号:S685.210.35

文献标识码:A

文章编号:1001-7461(2008)01-0104-04

Factors Effecting Vitrification of Tissue Culture of *Rhododendron delavayi*

HE Fang-lan¹, LI Yi², ZHAO Ming¹, YU Qiu-shi, HU Xiang-wei³

(1. Gansu Key Laboratory of Desertification Combating & Gansu Desert Control Research Institute, Wuwei, Gansu 733000, China;
2. College of Forestry, Gansu Agriculture University, Lanzhou, Gansu 730070, China;
3. Center of Forest Breed Honggu, Lanzhou, Gansu 730085, China)

Abstract: In order to find out the most suitable culture condition which can control or reduce the vitrification of *Rhododendron delavayi* in tissue culture, by the design of single factor experiment, the stem apexes of *R. delavayi* were cultured in Read medium, and several factors effecting vitrification of tissue culture of *R. delavayi* were studied. The result showed that concentrations of 6-BA, sucrose, agar and AC in the culture medium and culture temperature had a significant influence on vitrification of tissue culture of *R. delavayi*. The Read medium with 1.5 to 2.0 mg/L 6-BA, 3% to 4% sucrose, 0.6% agar, 0.3% AC and the temperature under 25℃ could effectively decrease the rate of vitrification, the coefficient of proliferation was higher and the growth of plantlet quicker.

Key words: *Rhododendron delavayi*; tissue culture; vitrification; influence factor

高山杜鹃(*Rhododendron delavayi*)是杜鹃花科杜鹃属灌木类高档花卉植物, 花色有红、粉、紫、黄、白等多种, 花色艳丽, 树形优美, 在园林绿化、美化环境中具有很高的价值^[1]。高山杜鹃为杂合体, 种子繁殖后代严重分离, 只供育种使用^[2]; 高山杜鹃通常采用扦插、嫁接繁殖, 但名贵品种难以生根, 同时受季节、母株材料等限制, 因此市场比较紧缺^[3,4]。利用组织培养进行快速繁殖, 可及时大量的生产大批苗木, 但是在组织培养过程中由于各种因素的影响, 导致

试管内丛生苗出现嫩绿透明、愈伤组织出现鲜绿水渍状, 即玻璃化现象^[5]。玻璃化现象是植物组织培养特有的一种生理性病变, 是培养条件的一些物理、化学因素和生化因子共同作用使植物组织新陈代谢紊乱所致^[6]。高山杜鹃离体培养中试管苗的玻璃化很严重, 它使植株的繁殖系数降低, 移栽到田间时, 离体幼苗生长弱, 成活率低, 遭成人力、物力和财力的极大浪费。有关高山杜鹃试管苗玻璃化的研究尚未见报道。为此, 本研究主要对培养基中添加的激素、

收稿日期: 2007-03-19 修回日期: 2007-04-09

基金项目: 科技部支撑项目(2005DKA1003)

作者简介: 何芳兰(1980-), 甘肃陇西人, 硕士, 主要从事林木遗传育种及快繁研究。E-mail: hefanglan2003@126.com.

通讯作者: 李毅(1962-), 教授, 博士, 硕士生导师。主要从事林木遗传育种教学工作。

蔗糖、琼脂和活性炭(AC)浓度及培养温度 5 个方面进行研究,以期找出能克服或降低高山杜鹃试管苗玻璃化的最适培养条件,为提高高山杜鹃试管苗的质量提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

采用进口当年生长的高山杜鹃茎尖作为外植体。

1.2 方法

外植体在洗衣粉液中浸泡 20 min,流水冲洗干净,然后将其置于无菌室超净工作台上,按以下程序进行消毒:75%的酒精浸泡 25~30 s,无菌水冲洗 4~5 次,再用 0.1%的 HgCL₂ 消毒 8~10 min,最后用无菌水冲洗 4~5 次后用无菌滤纸将外植体表面的水吸掉。用手术刀剥掉外面 2~3 层叶片,切成0.5 cm 长的茎尖,接种在含 1.2 mg/L 6-BA 和 0.3 mg/L NAA 的 Read 培养基中,于 25℃、光照 12 h/d、光照强度 2 000 lx 的条件下培养一个月后,选取健壮无菌的丛生芽进行继代培养。

以激素(6-BA)、蔗糖、琼脂、活性炭浓度及培养温度作为实验因子;取继代培养 2 周的试管苗接种在不同处理的 Read 培养基中(表 1);其中,各处理 pH 为 5.4,附加 0.3 mg/L NAA,光照强度 2 000 lx;接种 15 株,重复 3 次;培养 30 d 后,观察和统计试管苗的生长状况。用 SPSS(13.0)软件进行数据处理,并按下列公式计算增值系数和玻璃化率:

增值系数=培养 30 d 后的有效苗总数/接种苗数(长度>0.7 cm,直径>0.2 cm 为有效芽)^[7];玻璃化率(%)=培养 30 d 后的玻璃化苗总数/培养 30 d 后的有效苗总数。

表 2 6-BA 浓度对高山杜鹃试管苗玻璃化的影响

Table 2 Effect of 6-BA concentration in culture medium on vitrification of plants of <i>R. delavayi</i> (30 d after inoculation)						
6-BA 浓度/(mg·L ⁻¹)	接种苗/株	有效苗/株	增值系数	玻璃化数/株	玻璃化率/%	有效苗平均长/cm
1.0	15	24.33	1.62a	2.67	11.08a	2.53c
1.5	15	47.00	3.13d	7.00	14.89a	3.23d
2.0	15	64.33	4.28e	9.33	16.82a	2.23c
3.0	15	46.33	3.09d	13.33	28.91b	1.20b
5.0	15	36.67	2.44b	21.33	58.17c	0.73a

注:同一列中不同字母表示差异显著(P<0.05)

2.2 蔗糖浓度对高山杜鹃试管苗玻璃化的影响

当培养温度为 25℃时,在附加了 6-BA 1.5 mg/L、琼脂 0.6%及活性炭 0.3%的培养基中添加不同浓度的蔗糖对高山杜鹃试管苗玻璃化的影响。表 3 表明,当蔗糖浓度为 6%时,玻璃化率仅为 万方数据

表 1 高山杜鹃茎尖组织培养的单因素实验设计

Table 1 The design of single factor experiment for tissue culture of *R. delavayi* shoot-tips

处理号	6-BA 浓度 (mg·L ⁻¹)	蔗糖浓度 /%	琼脂浓度 /%	活性炭 (g·L ⁻¹)	温度 /℃
1	1.0	3	0.6	0.3	25
2	2.0	3	0.6	0.3	25
3	3.0	3	0.6	0.3	25
4	5.0	3	0.6	0.3	25
5	1.5	2	0.6	0.3	25
6	1.5	3	0.6	0.3	25
7	1.5	4	0.6	0.3	25
8	1.5	6	0.6	0.3	25
9	1.5	3	0.4	0.3	25
10	1.5	3	0.8	0.3	25
11	1.5	3	1	0.3	25
12	1.5	3	0.6	0.1	25
13	1.5	3	0.6	0.5	25
14	1.5	3	0.6	0.8	25
15	1.5	3	0.6	0.3	20
16	1.5	3	0.6	0.3	28
17	1.5	3	0.6	0.3	32

2 结果和分析

2.1 6-BA 浓度对高山杜鹃试管苗玻璃化的影响

当培养基中添加蔗糖 3%、琼脂 0.6%、活性炭 0.3%,培养温度调为 25℃时,不同浓度的 6-BA 对高山杜鹃试管苗玻璃化的影响。由表 2 可看出,高山杜鹃试管苗玻璃化率随 6-BA 浓度的增大而增大,尤其是当 6-BA 浓度达到 3.0 mg/L¹以上时,玻璃化率显著提高;当 6-BA 浓度低于 2.0 mg/L 时,增值系数随其浓度逐渐增大;此外,有效芽平均长度随 6-BA 浓度增大先增大后减小,其中 6-BA 浓度为 1.5 mg/L 时有效芽平均长度最长,达 3.23 cm。以上数据可得出,培养基中添加 1.5~2.0 mg/L6-BA 不但有利于高山杜鹃茎尖增殖培养,而且玻璃化率较低,苗体生长速度较快。

5.87,但增值系数极低,苗体生长较慢;增值系数和有效苗长度随蔗糖浓度的增大而先增大后减小,其中蔗糖浓度为 3%~4%时增值系数和有效苗平均长度达到最大,增值系数超过 2.73,有效苗平均长度 3.3 cm。

表 3 蔗糖浓度对高山杜鹃试管苗玻璃化的影响

Table 3 Effect of sucrose concentration in culture medium on vitrification of plants of *R. delavayi* (30 d after inoculation)

蔗糖浓度/%	接种苗/株	有效苗/株	增殖系数	玻璃化苗/株	玻璃化率/%	有效苗平均长/cm
2	15	28.67	1.91b	9.00	31.14c	1.97a
3	15	47.00	3.13d	7.00	14.89b	3.23c
4	15	41.00	2.73c	5.00	12.21b	3.30c
6	15	28.00	1.53a	1.67	5.87a	2.80b

注：同一列中不同字母表示差异显著($P<0.05$)

综合以上数据资料得出,蔗糖浓度为 3%~4% 时有利于高山杜鹃茎尖增殖培养,且玻璃化率相对较低,苗体生长速度快。

2.3 琼脂浓度对高山杜鹃试管苗玻璃化的影响

不同浓度的琼脂对高山杜鹃试管苗玻璃化的影响。由表 4 结果得出,培养基中添加 6-BA1.5 mg/L、蔗糖浓度 3%、活性炭浓度 0.3%,并置于 25℃ 的条件下,增大培养基中琼脂浓度,高山杜鹃试管苗玻

璃化率明显降低,当琼脂浓度高达 1.0% 时,试管苗玻璃化率仅为 7.23,但增殖系数均低于其他处理,有效苗生长较慢;当琼脂浓度达到 0.6% 时,试管苗的增殖系数高于其他处理,且有效苗生长速度较快,有效苗平均长度长达 3.33 cm;当琼脂浓度为 0.4% 时,苗体呈莲花状,叶片半透明状淡绿色,玻璃化率高达 33.32%。

表 4 琼脂浓度对高山杜鹃试管苗玻璃化的影响

Table 4 Effect of agar concentration in culture medium on vitrification of plants of *R. delavayi* (30 d after inoculation)

琼脂浓度/%	接种苗/株	有效苗/株	增殖系数	玻璃化苗/株	玻璃化率/%	有效苗平均长/cm
0.4	15	36.00	2.40b	12.00	33.32c	1.73a
0.6	15	47.00	3.13c	7.00	14.89b	3.23c
0.8	15	37.30	2.49b	5.00	13.39b	3.31c
1.0	15	27.67	1.85a	2.00	7.23a	2.70b

注：同一列中不同字母表示差异显著($P<0.05$)

2.4 活性炭浓度对高山杜鹃试管苗玻璃化的影响

培养基中添加 6-BA1.5 mg/L、蔗糖浓度 3%、琼脂浓度 0.6%,并置于 25℃ 的条件下,改变培养基中活性炭的含量对高山杜鹃试管苗玻璃化的影响表 5 结果显示,培养基中活性炭的浓度与高山杜鹃试管苗玻璃化率呈负相关,当培养基中活性炭浓度为

0.8%,试管苗玻璃化明显低于其他处理,玻璃化率仅为 6.04%,但试管苗增殖系数和有效苗平均长度次于其他处理,仅为 1.82 和 2.3;当培养基中活性炭浓度等于 0.3% 时,试管苗增殖系数和有效苗平均长度均高于其他处理,分别为 3.13 和 3.23 cm,试管苗玻璃化率相对较低。

表 5 活性炭浓度对高山杜鹃试管苗玻璃化的影响

Table 5 Effect of AC concentration in culture medium on vitrification of plants of *R. delavayi* (30 d after inoculation)

活性炭浓度/%	接种苗/株	有效苗/株	增殖系数	玻璃化苗/株	玻璃化率/%	有效苗平均长/cm
0.1	15	37.00	2.47c	13.00	35.15c	2.70b
0.3	15	47.00	3.13d	7.00	14.89b	3.23c
0.5	15	32.00	2.09b	4.67	13.56b	2.77b
0.8	15	27.33	1.82a	1.67	6.04a	2.30a

注：表中所有数据均为 3 次重复的平均值,同一列中不同字母表示差异显著($P<0.05$)

2.5 培养温度对高山杜鹃试管苗玻璃化的影响

不同植物增殖的最适温度不同,一般采用 25℃ ±2℃ 的温度。在其他培养条件一定的前提下,改变培养温度。从表 6 可看出,培养温度对试管苗玻璃苗率有极显著影响,降低培养温度(20℃)可减少玻璃

苗的发生,玻璃苗率降低,但分化芽数减少,生长缓慢;升高培养温度(32℃)玻璃苗率达 60.10%,有效苗生长极缓慢,大部分植株呈现莲花形,叶片卷缩浸水状;当培养温度 25℃ 时,虽然玻璃苗率不是最小,但正常苗数最多,苗体发育健壮,生长速度较快。

表 6 培养温度对高山杜鹃试管苗玻璃化的影响
Table 4 Effect of culture temperatures on vitrification of plants of *R. delavayi* (30 d after inoculation)

温度/℃	接种苗/株	有效苗/株	增殖系数	玻璃化苗/株	玻璃化率/%	有效苗平均长/cm
20	15	29.00	1.93a	2.33	8.01a	2.40c
25	15	47.00	3.13b	7.00	14.89b	3.23d
28	15	52.67	3.51c	19.33	36.82c	1.60b
32	15	45.67	3.05b	27.33	60.10d	0.90a

注:表中所有数据均为 3 次重复的平均值,同一列中不同字母表示差异显著($P<0.05$)

3 讨论和结论

产生试管苗玻璃化现象的因素曾多有报道,有人认为是试管苗玻璃化是内部生理失调的外在表现,也有人认为是形态结构上的畸形导致了功能上的障碍,Curtis 等^[8]认为是试管内的小环境,特别是湿度是引起玻璃苗的主要原因,Mujib 等^[9]认为 BA 才是试管苗玻璃化的根源,一定的 BA 浓度诱导细胞分裂活性增强,加上衬质势高,新分裂的细胞膨胀、伸长,打乱了正常的生长发育过程,出现不平衡,产生玻璃苗。在本试验过程发现,6-BA 浓度越高,玻璃化苗率越高,这一现象有可能是 Mujib 所说的原因所导致的。综合考虑增殖系数和植株生长情况,培养基中 6-BA 浓度应该在 1.5~2.0 mg/L 之间,高山杜鹃增殖系数高,苗体生长速度较快,同时玻璃化率较低。

试管苗玻璃化主要是由于培养体系的水分状况不适而导致的一种生理性病变^[5]。培养环境中的水分受培养基的琼脂浓度和蔗糖浓度,培养容器的相对湿度等的影响。增加蔗糖和琼脂浓度,降低培养基的衬质势,减少培养基中植物材料可获得得水分,造成水分胁迫^[10]。但蔗糖和琼脂浓度过高,尤其是琼脂浓度,培养基内可利用水分减少,营养物质难以被培养的组织吸收利用,芽分化力减弱,增殖系数降低,植株生长缓慢^[11]。本试验结果表明:增加蔗糖和琼脂的浓度,可以不同程度地减少高山杜鹃试管苗玻璃化的发生;在培养基中加入 3%~4%蔗糖和 0.6%琼脂时,高山杜鹃增殖系数较高,植物生长较快,而玻璃化率较低。

在植物组织培养中,经常使用 AC,一般认为 AC 是通过吸附而发生作用的。AC 对培养基中有害物质、生长调节剂及其它培养成分的吸附没有选择性^[12]。在本研究中,在 0.1 g/LAC 的培养基上,苗发黄,长势弱,甚至畸形,玻璃化比较严重;而在含有 0.8 g/L AC 的培养基上,丛芽生长一段时间后生长缓慢,培养基易变干硬;而 0.3 g/LAC 的培养基上试管苗增殖系数,生长快,玻璃化较低率。

不同植物增殖的最适温度不同,大多采用 25± 万方数据

2℃的温度。温度过低时,培养的组织生长出现停滞,温度过高将不利于培养材料生长,甚至会导致试管苗玻璃化现象加重^[13]。从本试验结果看出,培养温度为 20℃,高山杜鹃试管苗玻璃化率降低,但分化芽数减少,生长缓慢;培养温度为 32℃时,玻璃苗率达 60.10%,有效苗生长极缓慢,大部分植株呈现莲花形,叶片卷缩浸水状;当培养温度 25℃时,虽然玻璃苗率不是最小,但正常苗数最多,苗体发育健壮,生长速度较快。

本文仅仅对影响高山杜鹃试管苗玻璃化的几个因素—培养基中 6-BA、蔗糖、琼脂和活性炭浓度以及培养温度进行了分析研究,而高山杜鹃玻璃苗形态结构及发生机理有待进一步的研究。

参考文献:

[1] 沈荫椿. 杜鹃花[M]. 北京:中国建筑工业出版社. 1985,3-6.
[2] 张长芹. 杜鹃花的种子繁殖[J]. 云南植物研究,1992,14(1): 17-18.
[3] 汤桂钧,张建安. 高山杜鹃的组织培养快速繁殖技术研究[J]. 上海农业学报. 2004,20(3): 15-18.
[4] 曹孜义,刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州:甘肃科技出版社. 1996(57):212,316.
[5] 郭东红. 某些因素对玻璃化形成的影响和玻璃苗在形态解剖上的特点[J]. 植物学通报,1987(3):151.
[6] Kever C. et al, Physiological and Biochemical Events Leading to Vitrification of Plant Cultured in Vitro[J]. Physiol. Plant. 1984, 61: 69-74.
[7] 周俊彦,郭扶兴. 植物快速营养繁殖及产率的计算[J]. 热带作物学报,1993,41(2):105-107.
[8] Curtis O F, Sbetty K. Growth medium effects of vitrification,total phenolicd, chlorophy II ,and water content of in vitropropagated oregano clones [J]. Acta Horticulture, 1996, 426: 489-497.
[9] Mujib A, Pal A K. Inter varietal variation in response to in vitro cloning of carnation[J]. Crop Research Hisar,1995,10: 190-194.
[10] 张敏,张曙光,孙红绪,等. 对影响草莓组织苗玻璃化若干因素的探讨[J]. 湖北农业科学,2002(6):82-83.
[11] 周莉娟,姜秀勇. 影响香石竹组培苗玻璃化现象的若干因素[J]. 福建农业学报,1999(14):102-106.
[12] 刘用生,李友用. 植物组织培养中活性炭的使用[J]. 植物生理学通讯,1994,30(3):214.
[13] 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.