

四倍体刺槐试管苗玻璃化研究

任建武 (北京林业大学生物学院, 北京 100083)

摘要 [目的] 探索批量组培快繁中的玻璃化的防止方法。[方法] 以四倍体刺槐为材料, 通过大量规范化系统试验研究试管苗玻璃化的影响因素。[结果] 硝态氮与氨态氮处理间差异不显著。培养基中加入水解乳蛋白后玻璃苗减少, 但污染率一直很高。棉塞、纱布封口对减少玻璃苗有明显作用。使用 KT 时玻璃化有所减轻, 但繁殖系数只有 1.5; 使用 6-BA 时玻璃化苗比例较高, 但未发生玻璃化的瓶苗繁殖系数高于 3.5。蔗糖和琼脂浓度都可以改变玻璃化频率, 其中蔗糖的作用更为明显, 但它降低了生长速度。减少玻璃化的温度和光照的最佳组合是温度 23 ℃, 光照时间 14 h/d。[结论] 该研究为防止四倍体刺槐试管苗的玻璃化提供了一些可行的措施。

关键词 刺槐; 玻璃化; 组织培养

中图分类号 S722.3⁺7 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)12-04867-02

Study on the Vitrification of Tube-Cultured Seedlings of Tetraploidy Black locust

REN Jian-wu (College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083)

Abstract [Objective] The purpose of the study was to explore the methods preventing the vitrification in the batch tissue culture of rapid propagation. [Method] With tetraploidy *Black locust* as material, the factors influencing the vitrification of tube-cultured seedlings were studied through a lot of standardized and systematic experiments. [Result] The difference between treatments with nitrate and amino nitrogen was not significant. After hydrolytic lactalbumin was added into media, the vitrified seedlings reduced, but the contamination rate was always very high. Sealing with cotton plug and gauze had significant effects on reducing vitrified seedlings. When KT was used, the vitrification was lightened to some extent, but the propagation coefficient was only 1.5. When 6-BA was used, though the proportion of vitrified seedlings was higher, the propagation coefficients of non-vitrified tube-cultured seedlings were higher than 3.5. Both sucrose and algar concn. could change vitrifying frequency, among them the effect of sucrose was more significant, but it reduced growth velocity. The best combination of temperature and light for reducing vitrification was temperature of 23 ℃ and light time of 14 h/d. [Conclusion] The study provided some feasible measures for preventing the vitrification of tube-cultured seedlings of tetraploidy *Black locust*.

Key words *Black locust*; Vitrification; Tissue culture

刺槐(*Robinia pseudoacacia* L.)别名洋槐(*Black locust*), 为蝶形花科(Papilionatae)落叶乔木, 分布范围北纬 35°~43°。四倍体刺槐是将普通刺槐染色体组经过加倍而获得的新类型, 表现为生长更迅速, 抗旱、耐寒能力更强。北京林业大学良种繁育研究中心于 1997 年 4 月从国外引进 5 个四倍体刺槐无性系。通过试验表明, 四倍体刺槐可忍耐 -34 ℃ 的低温, 在年降水量 200 mm 的地区能够生存, 土壤极度干旱连续 40 d 的情况下也不会死亡, 对天牛具有一定的抗性, 光肩星天牛和黄斑天牛均难以对其构成威胁。

玻璃化(Vitrification)^[1], Hussey 在培养唐菖蒲和葱时^[2], 将该现象描述为“水浸”, Debergh 等(1981)首先进行系统研究并提出玻璃化概念, 此后在植物组织培养中, 玻璃化现象在苹果属、李属以及康乃馨等几十种植物的组培中都有报道, 玻璃化发生的原因和防止措施逐渐受到较多的注意和研究。卜学贤^[3]、梁海曼^[4]、等对玻璃化现象的发生机理进行了较为全面的研究。近年来在瑞香^[5]、苹果^[6]、康乃馨^[7]等植物材料上的玻璃化研究也有报道, 但至今其机理仍未完全研究清楚。由于四倍体刺槐引种数量较少, 前期繁殖手段以组织培养为佳。在组培繁殖过程中, 部分无性系发生玻璃化现象, 经过大量试验, 该问题得到解决, 其研究思路和方法对大规模组培工厂化育苗有一定指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料 供试材料为引进的饲料型四倍体刺槐^[8](*Robinia pseudoacacia* Tetraploid locust)。

1.2 方法 将引进的饲料型四倍体刺槐种条嫁接于普通刺槐上, 待其发芽后取顶芽及带芽茎段, 接种于培养基: MS +

6-BA 0.25 mg/L + NAA 0.05 mg/L 上; 启动后转接于分化培养基: MS + 6-BA 0.50 mg/L + NAA 0.1 mg/L。试管苗分别在北京和河南省洛阳扩繁。针对大量发生的玻璃化现象, 通过改变环境条件以及培养基配方, 进行严格系统的对比试验。该试验开始于 1998 年 5 月, 1999 年 3 月结束, 根据现有植物组织培养中有关玻璃化方面的资料, 取若干因子作为试验观察和统计对象进行试验设计, 对试验结果统计分析, 以便发现与玻璃化相关的因子。

2 结果与分析

2.1 硝态氮和氨态氮对玻璃苗发生频率的影响 培养基配方: ①MS + 6-BA 0.3 mg/L(单位下同) + NAA 0.1; ②N₆ 大量 + MS 其他 + 6-BA 0.3 + NAA 0.1。以上两个配方中, 糖 30 g/L, 琼脂 5 g/L, pH 6.0, 培养温度(25 ± 1)℃, 光照 12 h/d, 光照强度 2 000 lx(如无特殊说明, 该文以下皆同)。试验为完全随机区组设计, 设 2 处理, 5 区组。每个小区均为 30 瓶, 转接 30 d 后记录发生玻璃化瓶数(下文同)。

其中, N₆ 培养基中, KNO₃ 2 830 mg/L, (NH₄)₂SO₄ 463 mg/L; MS 培养基中, KNO₃ 1 900 mg/L, NH₄NO₃ 1 650 mg/L。

试验结果经方差分析表明, 处理间差异不显著。因此在培养基中的供氮形态上改变氨态氮和硝态氮的比例, 并不影响多倍体刺槐玻璃苗的发生频率。

2.2 水解乳蛋白(LH)对玻璃化苗及污染率的影响 完全随机区组设计, 设 4 种不同的培养基配方: ①MS + 6-BA 0.3 + NAA 0.1, ②MS + 6-BA 0.3 + NAA 0.1 + LH 300, ③MS + 6-BA 0.3 + NAA 0.1 + LH 300 + 青霉素 10 万单位/L, ④MS + 6-BA 0.3 + NAA 0.1 + 青霉素 10 万单位/L。3 次重复。

由表 1 可知, 培养基中加入水解乳蛋白后玻璃苗减少, 但同时发现污染率居高不下。分析认为, 由于经过多代继代培养, 部分试管苗本身带菌, 加入水解乳蛋白后, 特别适合细菌生长, 致使原先不易观察到的细菌得以滋生蔓延。调查发

基金项目 国家林业局“948”引进项目。

作者简介 任建武(1967-), 男, 北京人, 副教授, 从事遗传育种方面的研究。

收稿日期 2008-02-27

现,许多瓶中有黄色菌落细菌繁殖速度并不快,经过污染的苗生长缓慢,分化率也低。加入青霉素后污染问题得到有效遏止,而玻璃化现象又迅速增多。似乎生长速度与玻璃化现象有某种联系,有待于进一步探讨。

表 1 水解乳蛋白对玻璃化苗及污染率的影响

Table 1 Effects of hydrolytic lactalbumin on vitrified shoots and contamination rate

Prescription	区组I Block I		区组II Block II		区组III Block III	
	玻璃化苗	污染苗	玻璃化苗	污染苗	玻璃化苗	污染苗
	Vitrified seedlings	Contaminated seedlings	Vitrified seedlings	Contaminated seedlings	Vitrified seedlings	Contaminated seedlings
①	24	0	25	1	25	0
②	11	11	14	9	13	8
③	22	2	23	3	23	0
④	21	0	25	0	25	1

2.3 封口材料对玻璃化苗发生频率的影响 完全随机区组设计,设 4 种处理:A,棉塞、外罩羊皮纸一层;B,封口膜;C,双层塑料膜;D,纱布八层、外罩羊皮纸;另设对照(CK)为双层羊皮纸,中间隔一层塑料膜。3 次重复。由试验结果可知,处理 A、B、C、D、CK 的玻璃化苗瓶数分别为 17.3、20.3、28.3、18.0 和 23.7 瓶(均为 3 次重复平均值)。其中处理 A 与 D 表现最好,且差异不显著;处理 A 与 B 差异显著,与处理 C、CK 差异极显著;处理 C 表现最差,与其他处理均差异极显著。由此可见,棉塞(A)、纱布(D)封口对减少玻璃化苗有明显作用。其作用的实质就是改善了培养容器的透气性。

2.4 细胞分裂素对玻璃化苗发生频率的影响 设 3 种配方:①MS+KT 0.5+6-BA 0.1+NAA 0.1;②MS+KT 0.5+NAA 0.1;③MS+6-BA 0.3+NAA 0.1。结果认为,采用不同的细胞分裂素,玻璃化现象差异显著,亦即使用 KT 时玻璃化有所减轻,而且试管苗基部愈伤组织很少,不足的是,繁殖系数只有 1.5;使用 6-BA 玻璃化苗比例较高,同时愈伤组织较大,但其中未发生玻璃化的瓶苗繁殖系数高于 3.5,生长速度也较快,组织较幼嫩,操作时易剪切。

2.5 琼脂和糖对玻璃化苗发生频率的影响 设 4 种配方:①MS+6-BA 0.3+NAA 0.1+糖 50 g/L+琼脂 5.0 g/L;②MS+6-BA 0.3+NAA 0.1+糖 30 g/L+琼脂 6.5 g/L;③MS+6-BA 0.3+NAA 0.1+糖 50 g/L+琼脂 6.5 g/L;④MS+6-BA 0.3+NAA 0.1+糖 30 g/L+琼脂 5.0 g/L。试验结果得,各配方①、②、③、④的玻璃化苗分别为 7.7、12.3、3.7 和 24.3 瓶(均为 3 次重复平均值)。方差分析表明,各配方间差异极显著,其中配方③效果最好,配方①其次,效果最差的为配方④,由此可知,蔗糖和琼脂浓度都可改变玻璃化频率,其中蔗糖的作用更为明显。然而,试验中看到,蔗糖和琼脂浓度提高时,试管苗生长速度变得极缓慢,而且提高蔗糖浓度,这种趋势尤为明显,例如:配方③中的试管苗转接 60 d 只生长了 0.4 cm,而一般情况下,生长量达 6.9 cm。

2.6 光照时间、温度对玻璃化苗发生频率的影响 将光照时间和温度分为 8 h(L₁)、12 h(L₂)、14 h(L₃)三个水平;培养温度分为 18 ℃(T₁)、22 ℃(T₂)、25 ℃(T₃)、29 ℃(T₄)四个水平。二因素完全随机区组试验不同光照时间、温度试验,结果见表 2。

表 2 光照时间、温度对玻璃化苗发生频率的影响

Table 2 Effects of illumination time and temperature on occurrence frequency of vitrified seedlings

处理 Treatment	I	II	III	Σx	$\bar{x}$
L ₁ T ₁	21	9	10	40	13.3
L ₁ T ₂	20	10	19	49	16.3
L ₁ T ₃	15	9	12	36	12.7
L ₁ T ₄	24	25	22	71	23.7
L ₂ T ₁	12	16	17	45	15.0
L ₂ T ₂	13	17	21	51	17.0
L ₂ T ₃	20	16	11	47	15.7
L ₂ T ₄	10	9	14	33	11.0
L ₃ T ₁	8	7	13	28	8.7
L ₃ T ₂	0	3	5	8	2.7
L ₃ T ₃	15	18	22	55	18.3
L ₃ T ₄	11	19	20	50	16.7

方差分析表明,温度和光照时间对玻璃化都有一定影响,但并未达到极显著水平,而此二者的交互作用达到极显著水平。表现为:在一定范围内,温度越高玻璃化越严重,低于一定温度,如 25 ℃,则玻璃化有减小的趋势,对刺槐来说,其最适宜的培养温度为 23 ℃;光照时间越长,玻璃化程度越轻,这一点与刺槐原产于北温带而且喜光相吻合。温度与光照时间的交互作用要比其各自单一因子对玻璃化的影响大,亦即特定的温度与光照时间组合对多倍体刺槐试管苗玻璃化的作用极其显著,减少玻璃化的最佳组合是(L₃T₂):温度 23 ℃,光照时间 14 h/d。

3 讨论

玻璃化现象为植物组织培养过程中所特有的现象,到目前为止还没有关于自然界发生玻璃化现象的报道。我们的研究及其他许多相关研究表明,玻璃苗是在试管内培养植物的产物,是人工提供的培养基和培养条件不完全符合培养物固有要求的结果。然而不同植物甚至同一植物的不同发育阶段的需求各不相同,因此玻璃化现象实质是处于异养状态下的试管苗因其易于受环境条件影响而在环境条件与其自身生长需求不相吻合时产生的异常生理反应。该试验发现,玻璃化均发生于炎热的夏季,多倍体刺槐正受到玻璃化的严重危害时,同一培养室中的绿帝王蔓绿绒(*Philodendron* spp.)、绿巨人(*Spathiphyllum floribundum* cv.)、火鹤(*Anthurium scherzerianum*)等植物生机盎然。因此,在组织培养中,不同植物的特殊性应该受到密切关注。

另外,大规模的生产型组培室与用于科研的小型组培室在管理方法和操作技术方面有很大不同,最突出的一点就是培养室面积越大,其温度、光照等环境指标的稳定性、均一性的控制难度愈大,特别是在高温季节,又使这种状况更趋恶化,所以多倍体刺槐组培苗玻璃化肆虐的成因实质就是高温、弱光照以及二者的交互作用。

根据该试验,在发生玻璃化时,可采取以下措施以缓解或防止其危害性。①增加光照,特别是对喜光植物尤其重要;②注意琼脂质量及相应的用量;③变换封口材料、改善培养容器的透气性;④用 KT 替代 6-BA;⑤降低培养基水势,如

⁶⁰Co- γ 射线辐照对云烟 87 烟苗某些生理抗性指标的影响

罗以贵, 强继业*, 闫芳芳, 刘 芮 (云南农业大学烟草学院, 云南昆明 650201)

摘要 [目的]探讨了 γ -射线作为提高烟苗抗逆、抗病性手段的可行性。[方法]以云烟 87 漂浮苗为供试材料, 研究了⁶⁰Co- γ 射线辐射剂量处理(20、40、60、80、100、150、200 Gy)对烟苗某些生理抗性指标的影响。[结果]云烟 87 烟苗的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性随辐射剂量的增加而升高;⁶⁰Co- γ 射线辐射剂量小于 40 Gy 的处理不会对烟苗造成伤害, 但提高烟苗抗性的效果不显著; 大于 100 Gy 的辐射处理会造成云烟 87 烟苗有害物质增加; 60 Gy 是最佳的辐射处理剂量, 丙二醛(MDA)含量比对照降低了 40.77%, SOD 活性比对照提高了 5.13%, POD 活性是对照的 1.43 倍, CAT 活性是对照的 1.24 倍。[结论]云烟 87 的最佳辐射剂量为 60 Gy, 可降低烟苗有害物质含量, 提高各保护性酶活性, 增强烟苗的抗逆性和抗病性。

关键词 云烟 87; 烟苗; ⁶⁰Co- γ ; 几种保护性酶; MDA 含量

中图分类号 S572 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)12-04850-02

Effects of ⁶⁰Co- γ Ray Irradiation on Some Physiology Resistance Indexes of Yunyan87 Tobacco Seedling

LUO Yi-gui et al (Tobacco College of Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201)

Abstract [Objective] The objective of the research was to explore the feasibility of Taking γ ray as way for increasing stress resistance and disease resistance of tobacco seedling. [Method] With Yunyan 87 floating seedlings as tested material, the effects of ⁶⁰Co- γ ray irradiation dosage(20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 Gy) on some physiology resistance indexes of Yunyan 87 tobacco seedling were studied. [Result] The activity of SOD, POD and CAT was increased along with the increment of irradiation dosage. The irradiation dosage of lower than 40 Gy was not harm for the tobacco seedling, but it had no obvious effect on the resistance of tobacco seedling. The irradiation dosage of more than 100 Gy could cause the increase of harmful material in tobacco seedling. 60 Gy was the optimum irradiation dose, by which, compared with CK, MDA content was decreased by 40.77%, SOD activity was increased by 5.13%, the activities of POD and CAT were increased by 1.43 and 1.24 times resp. [Conclusion] The optimum irradiation dose for Yunyan 87 was 60 Gy, which could decrease harmful material in tobacco seedling, increase the activities of various protective enzymes and enhance stress resistance and disease resistance of tobacco seedling

Key words Yunyan 87; Tobacco seedling; ⁶⁰Co- γ ; Some protective enzymes; MDA content

自从 19 世纪发现天然放射性物质以来, 核辐射的生物学效应引起了科学家们极大的关注, 辐射技术应用的研究也取得了长足的进展。20 世纪 50 年代, 国外已开展了电离辐射对植物体内酶系统影响的研究, 我国在这方面做了很多努力^[1]。目前, 辐射技术在农业科学研究方面取得了其他方法无法代替的作用。该试验通过对 γ -射线引起云烟 87 漂浮苗体内几种保护性酶及丙二醛含量变化的研究, 从生理学角度探讨了 γ -射线的作用机理及其作为提高烟苗抗逆、抗病性手段的可行性, 为今后的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 供试品种为云烟 87 漂浮苗壮苗, 苗龄 70 d。

1.2 辐射处理方法 在云南辐射应用中心用⁶⁰Co- γ 射线进行辐射处理, 剂量分别为 20、40、60、80、100、150、200 Gy, 并设对照株(未照射), 4 次重复。

1.3 测定指标 测定辐照后烟苗中多酚氧化酶(PPO)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)活性及丙二醛(MDA)含量的变化。

1.4 测定方法 MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸(TBA)法; PPO 活性测定采用比色法; SOD 活性测定采用氮蓝四唑法; POD 活性测定采用愈创木酚法; CAT 活性测定采用紫外吸收法^[2-3]。

2 结果与分析

云烟 87 苗经 20~80 Gy 剂量的⁶⁰Co- γ 射线辐照后有害物质 MDA 含量降低, 其中以 60 Gy 处理降低的最多, 比对照降低了 40.77%, 100~200 Gy 辐照的烟苗 MDA 含量增加, 其中 150 Gy 处理增加最多, 是对照的 1.15 倍。方差分析表明, 150 和 200 Gy 处理的 MDA 含量间差异不显著, 其他各处理间均存在极显著差异。研究表明, 大于 100 Gy(包括 100 Gy)剂

表 1 云烟 87 烟苗经⁶⁰Co- γ 射线辐照后抗性指标变化

Table 1 Changes of physiological indices in seedling of tobacco Yunyan 87 after ⁶⁰Co- γ irradiation

剂量// Gy Dosage	MDA 含量// $\mu\text{mol}/\text{mg}$ MDA content	PPO 活性// U/mg PPO activity	SOD 活性// U/mg SOD activity	POD 活性// $\text{U}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ POD activity	CAT 活性// U/mg CAT activity
CK	12.19 bB	11.22 bB	351.60 gG	1 638.02 hH	319.71 gG
20	10.69 dD	6.08 eE	359.62 eE	2 271.59 eE	424.36 aA
40	11.37 cC	14.73 aA	363.68 dD	2 422.77 cC	274.04 hH
60	7.22 fF	10.62 cC	369.65 aA	2 339.47 dD	397.92 bB
80	7.76 eE	6.32 eE	356.16 fF	1 921.64 gG	381.43 cC
100	12.47 bB	7.33 dD	367.97 bB	2 680.85 aA	327.53 eE
150	14.06 aA	3.82 fF	365.31 cC	2 538.47 bB	320.19 fF
200	13.82 aA	3.25 gG	363.57 dD	2 257.98 fF	370.88 dD

量的⁶⁰Co- γ 射线辐射会对烟苗造成伤害。PPO 活性除了 40 Gy 处理极显著高于对照外, 其他各处理与对照相比均极显著减小, 其中 150 和 200 Gy 减少的较多, 其活性仅为对照的

作者简介 罗以贵(1969-), 男, 云南镇雄人, 讲师, 从事作物遗传育种研究。* 通讯作者。

收稿日期 2008-02-25