

# 苦楝优良无性系试管苗玻璃化的影响因素

蒋泽平, 梁珍海, 汪有良, 韩杰峰

(江苏省林业科学研究院, 江苏 南京 211153)

**摘要:** 在经选育的苦楝 *Melia azedarach* 优良无性系母株上, 取其腋芽茎段和顶芽作外植体进行离体培养, 探讨 6-苄基腺嘌呤(BA)和萘乙酸(NAA)质量浓度和配比、白砂糖质量分数、琼脂用量、培养容器和封口材料等因素对试管芽苗玻璃化产生的影响。结果表明: BA 对玻璃化具有显著作用, 在  $0.5 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 玻璃苗率随 BA 质量浓度的增加而显著上升, 较高质量浓度的 BA 促进玻璃苗的形成, 在  $0.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA +  $0.015 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 时, 有较高的增殖系数(4.95), 芽苗生长也较为健壮; 白砂糖的质量分数也显著影响玻璃化的发生,  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的白砂糖有利控制玻璃化的发生, 玻璃苗只占 18.33%, 叶色深绿, 生长快; 琼脂的用量对玻璃化的影响不显著; 使用透气性好的容器或封口材料可显著降低玻璃苗率(比使用封闭容器或封口材料平均降低 26.40%), 并且可使离体植株生长良好。表 3 参 9

**关键词:** 森林培育学; 苦楝; 组织培养; 玻璃化

**中图分类号:** S723.1      **文献标识码:** A

苦楝 *Melia azedarach* 生长速度快, 材质优良, 抗逆性强, 树皮、枝叶及花果等具有多种经济用途, 是营建工业原料林和城市绿化的重要树种<sup>[1]</sup>。为了短期内扩大优良无性系的数量, 笔者进行了组培离体快繁研究。在苦楝的离体培养研究中, 已有前人进行了植物生长调节物质对离体苦楝芽苗增殖等情况的研究<sup>[1,2]</sup>。但笔者研究发现, 苦楝的离体培养极易产生玻璃化苗。玻璃化苗是一种生理失调状态, 叶片肿胀或纵向卷曲, 叶易碎, 表皮缺少角质层蜡质, 体内含水量高, 各种营养物质含量低, 分化能力极低, 很难继续用作继代培养的材料。这种现象若不及时加以控制, 会直接影响生产数量和质量, 损失巨大<sup>[3]</sup>。因此, 如何解决培养中产生玻璃化苗的问题是提提高离体培养增殖, 降低培养成本的关键技术。至今尚未有人对苦楝离体芽苗玻璃化现象进行研究。笔者在离体培养成功的基础上, 从植物生长调节物质的种类, 质量浓度和配比, 糖质量浓度, 琼脂用量。培养容器及封口材料等方面入手, 试图找到行之有效的防止或抑制玻璃化苗产生的技术措施。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料系经多年选育的 20 个(7, 18, 19, 20, 23, 24, 26, 38, 47, 63, 73, 74, 76, 77, 91, 102, 117, 118, 130, 134, 156 和 183 等)苦楝优良无性系母株, 取其当年生枝条上的茎段或顶芽, 经组织培养获得一定数量的继代试管苗。培养条件为: 培养温度  $25 \sim 27 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 光强  $2\ 500 \sim 3\ 000 \text{ lx}$ , 每日

收稿日期: 2005-09-12; 修回日期: 2006-03-13

基金项目: 江苏省农业高技术研究计划项目(BG2003302)

作者简介: 蒋泽平, 高级工程师, 从事木本植物组培研究。E-mail: zpjiang1288@hotmail.com

照光 14 h。在 20 个无性系中随机等量选取生长正常的试管苗作试验。

## 1.2 试验方法

白砂糖质量浓度对苦楝试管苗玻璃化及增殖生长的影响试验中, 白砂糖质量浓度梯度为 20, 30, 40, 50  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 培养基为 MS (Murashige and Skoog) + 6-苄基腺嘌呤 (BA) 0.75  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + 萘乙酸 (NAA) 0.15  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 琼脂(福建省石狮市狮头琼脂有限公司出品)用量 6.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 5.8。

BA 与 NAA 质量浓度组合对比对苦楝试管苗玻璃化及增殖生长的影响试验, 采用基本培养基为 MS, 附加 BA (0.50, 0.75, 1.00  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 NAA (0.10, 0.15, 0.20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 进行双因素 3 水平的正交试验, 白砂糖质量浓度为 30  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 琼脂用量 6.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 5.8。

琼脂用量对苦楝试管苗玻璃化及增殖生长的影响, 采用 6.0, 8.0, 10.0, 12.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的琼脂, 培养基为 MS + 0.75  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA + 0.15  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA, 白砂糖 30  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 5.8。

封口膜与培养容器对试管苗玻璃化及增殖生长的影响, 采用透气封口膜(北京振泰园艺设施有限公司生产, 规格为 4 孔 12 cm × 12 cm) 与封闭封口膜为材料的传统瓶式培养及封闭袋状容器和我们自行研制的专利产品透气的袋状容器(专利号: ZL02257668.1) 进行培养。处理 1: 三角瓶封闭式封口材料; 处理 2: 三角瓶透气式封口材料; 处理 3: 全封闭的膜袋容器; 处理 4: 透气的膜袋容器。培养基为 MS + 0.75  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA + 0.15  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA, 琼脂用量 6.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 白砂糖 30  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 5.8。

试验中, 每个培养容器分装 35 mL 培养基, 经 121  $^{\circ}\text{C}$  高压灭菌 20 min 后备用。每处理 10 瓶, 每瓶 3 株, 3 次重复, 接种 25 d 后统计结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 白砂糖质量浓度对苦楝组培苗玻璃化及生长的影响

从表 1 可看出, 当白砂糖质量浓度在 20.0 ~ 40.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  范围内, 玻璃化苗发生的频率随质量浓度的增加而显著降低, 且各处理间的差异显著。其中处理 1 即白砂糖的质量浓度为 20.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 玻璃化苗率极显著高于其他处理。可以看出白砂糖质量浓度是影响玻璃化苗发生的重要因素, 较高质量浓度的处理可减少玻璃化的发生, 处理 3 和 4 差异不显著而且生长情况类似, 故可选白砂糖 40.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  作为继代培养适宜的质量浓度。采用处理 3 较为经济。

### 2.2 BA 和 NAA 质量浓度对比对苦楝组培苗玻璃化苗率和增殖生长的影响

采用正交设计试验结果见表 2。可知, BA 和 NAA 配比显著影响试管苗的玻璃化苗发生频率。BA 为 1.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和 NAA 为 0.1 ~ 0.2  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组合时, 玻璃化显

表 1 不同白砂糖质量浓度对苦楝组培苗玻璃化及生长的影响

Table 1 Effects of sugar concentration on the rate of vitreous shoots and the plantlet growth from *Melia azedarach* tissue culture

| 处理 | 白砂糖质量浓度/( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | 玻璃化苗率/% | 芽苗生长情况          |
|----|------------------------------------------|---------|-----------------|
| 1  | 20                                       | 38.33 a | 玻璃苗多, 叶色浅绿, 生长快 |
| 2  | 30                                       | 23.67 b | 有玻璃苗, 叶色绿, 生长快  |
| 3  | 40                                       | 18.33 c | 玻璃苗少, 叶色深绿, 生长快 |
| 4  | 50                                       | 16.67 c | 玻璃苗少, 叶色深绿, 生长快 |

说明: 玻璃化苗率 = 玻璃化苗数量/总苗数。

著上升, 最高达 54.80%。级差比较发现, BA 对玻璃化苗发生频率的影响高于 NAA。这说明 BA 对玻璃化发生起主要作用。当 BA 质量浓度小于 0.75  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 对玻璃化影响差异不显著, BA 质量浓度小于 0.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 对玻璃化的形成没有明显的影响。但随着质量浓度的增加, 玻璃化苗率上升, 玻璃化现象加重。

植物生长调节物质质量浓度和配比虽然没有对有效苗增殖率造成明显影响, 但随着 BA 质量浓度的增加, 玻璃化加重, 试管芽苗生长受到严重影响。当 BA 为 1.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 芽苗生长不良, 叶色浅, 苗茎细弱。因此高质量浓度的 BA 不适宜试管芽苗生长。在 0.75  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA + 0.15  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA 时, 既有较高的增殖系数, 芽苗生长也较为健壮。

### 2.3 琼脂用量对苦楝组培苗玻璃化及生长的影响

琼脂是一种固持物质, 其用量直接影响培养基水势, 进而影响试管苗生长的微环境。单因子 4 水

表2 BA和NAA对苦楝组培苗玻璃化苗率和增殖生长的影响

Table 2 Effects of BA and NAA on the rate of vitreous shoots and the plantlet multiplication from *Melia azedarach* tissue culture

| 处理 | BA/ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | NAA/ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | 玻璃化苗率/% | 有效增殖系数 | 生长状况           |
|----|---------------------------------------|----------------------------------------|---------|--------|----------------|
| 1  | 1 (0.50)                              | 1 (0.10)                               | 20.20 b | 3.12   | 生长慢, 分化少       |
| 2  | 1                                     | 2 (0.15)                               | 20.40 b | 3.78   | 生长慢, 分化少       |
| 3  | 1                                     | 3 (0.20)                               | 20.60 b | 3.94   | 生长慢, 分化少       |
| 4  | 2 (0.75)                              | 1                                      | 22.40 b | 4.82   | 生长较快, 分化多, 苗壮  |
| 5  | 2                                     | 2                                      | 23.67 b | 4.95   | 生长较快, 分化多, 苗壮  |
| 6  | 2                                     | 3                                      | 24.62 b | 4.78   | 生长较快, 分化多, 愈伤大 |
| 7  | 3 (1.00)                              | 1                                      | 42.60 a | 3.11   | 丛状, 苗弱         |
| 8  | 3                                     | 2                                      | 44.92 a | 3.64   | 丛状, 苗弱         |
| 9  | 3                                     | 3                                      | 45.18 a | 3.78   | 丛状, 愈伤大, 苗弱    |

说明: 有效增殖系数 = 正常苗数量/原接种苗数量。

平试验结果见表3。

由表3可知, 随着琼脂用量的增加, 玻璃化发生呈下降趋势, 但各处理间差异不显著。故琼脂用量虽然对玻璃化有影响, 但并非主要影响因子。试验还发现, 过高的琼脂用量对试管芽苗生长不利, 培养基中以维持  $6.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  用量为宜。

表3 琼脂用量对苦楝组培苗玻璃化苗率及生长的影响

Table 3 Effects of agar density on the rate of vitreous shoots and the plante growth from *Melia azedarach* tissue culture

| 处理 | 琼脂用量/ ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | 玻璃化苗率/% | 生长情况         |
|----|----------------------------------------|---------|--------------|
| 1  | 6.0                                    | 23.67   | 增殖好, 生长快     |
| 2  | 8.0                                    | 20.12   | 增殖好, 生长快, 苗壮 |
| 3  | 10.0                                   | 18.35   | 苗壮, 叶色浅绿     |
| 4  | 12.0                                   | 16.92   | 高生长快, 有落叶症状  |

## 2.4 封口材料及培养容器对苦楝组培苗玻璃化及生长的影响

培养容器内的湿度和透光率等因素直接影响试管芽苗的生长。培养容器及封口材料不同造成培养物所处的微环境差异。试验发现: 处理1玻璃化苗率为48.28%, 处理2为23.67%, 处理3为48.20%, 处理4为20.02%。经方差分析, 各处理间差异显著, 处理1和处理3的玻璃化苗率显著高于其余处理。说明处于封闭状态下, 2种容器内部微环境湿度大, 气体缺乏交换, 不利试管出的健壮生长, 容器内生长的芽苗细弱, 叶色浅。用透气膜为封口材料和具透气孔的膜袋容器, 由于具有良好的透气性, 降低了微环境中的湿度, 利于试管芽苗呼吸交换, 容器内生长的芽苗, 叶色浓绿健壮。

## 3 讨论

玻璃化现象多发生在植物的离体培养中。玻璃化苗生理功能异常, 分化能力低, 难以生根成活, 是提高试管植物的增殖率, 降低生产成本的主要障碍<sup>[3-5]</sup>。但迄今为止, 对玻璃苗发生规律及机理缺乏真正的了解。其影响因素复杂, 在外部因素的研究中, 多数结果认为外源植物生长调节物质尤其是细胞分裂素类物质起主导作用。该试验的结果也验证了这个观点, BA对玻璃化发生的作用具有显著影响, 在较低且合适的质量浓度时作用不明显, 但BA质量浓度达  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 影响极为显著。也有认为NAA等植物生长调节物质过量会导致玻璃化<sup>[4,6]</sup>。在该试验范围内, 当BA质量浓度一定时, 随着NAA质量浓度的增加, 玻璃化苗率呈上升趋势, 但总体差异不显著, 就苦楝无性系离体培养而言, BA对其玻璃化率起主导作用。

糖对试管芽苗作用主要为其生长提供碳源和调节渗透势, 作为三磷酸腺苷(ATP)的供给者, 糖对离体培养物的生长具有重要作用。该试验发现提高白砂糖的质量浓度对控制玻璃化有促进作用, 但并不能完全抑制玻璃化的发生。过高的白砂糖质量浓度培养会抑制试管芽苗的生长, 说明玻璃化的发生不光是能量的不足, 可能与代谢紊乱有关。

琼脂用量的多少对苦楝无性系试管芽苗玻璃化的发生没有明显作用, 但通过不同封口材料及容器试验表明, 培养的试管芽苗生长效果的差异是由于透气状况不同引起的。其原因与较高质量浓度的细胞分裂素类物质导致玻璃化原因类似, 有可能是在封闭状况下, 较高质量浓度的 BA 加快了试管苗生长速度, 芽苗呼吸作用大大增强, 需要在培养的微环境中进行气体交换(水蒸汽、氧气、二氧化碳和乙烯等)<sup>[7~9]</sup>。在封闭状况下, 容器内外气体得不到有效交换, 无法满足试管芽苗生长需求, 导致玻璃化。采用透气类型的封口膜或容器, 改善了通气状况, 促进了呼吸, 使 ATP 供给较为丰富, 满足了芽苗对 ATP 以及呼吸代谢产物的要求, 试管植株生长健壮。

该试验针对苦楝优良无性系离体快繁中出现的玻璃苗现象进行探讨, 提出了离体快繁中, 采用  $MS + 0.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA} + 0.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA} + 40.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的白砂糖培养基, 整个培养过程选用透气的封口膜或有透气孔的袋式容器, 能有效控制玻璃化苗的发生, 试管芽苗生长健壮, 移栽成活率高。

### 参考文献:

- [1] 邢世岩, 梁玉堂, 龙庄如. 苦楝和臭椿微体快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 1989 (3): 45 - 46.
- [2] 邢世岩, 龙庄如, 梁玉堂. 植物激素在离体培养苦楝中对芽及嫩梢的增殖效应[J]. 山东农业大学学报, 1989, 20 (3): 56 - 60.
- [3] 李云, 田砚亭, 罗晓芳. 珠美海棠试管苗玻璃化发生机理的初步研究[J]. 北京林业大学学报, 1996, 18 (1): 52 - 59.
- [4] 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.
- [5] 及华. 刺槐玻璃苗愈伤组织分化再生正常植株[J]. 河北林学院学报, 1994, 9 (2): 102 - 104.
- [6] 吴月燕, 陶伟芳. 葡萄离体培养及快速繁殖[J]. 浙江林学院学报, 2001, 18 (2): 188 - 192.
- [7] 钟士传, 曹帮华. 控制毛白杨新无性系试管苗玻璃化的研究[J]. 山东林业科技, 2000 (2): 17 - 19.
- [8] 王哲之, 胡正海. 槐树组织培养中超度含水态苗发生与防治研究[J]. 应用与环境生物学报, 1998, 4 (3): 227 - 231.
- [9] MATTHIEU F, DANIEL C, ROSE G. A method for the study of  $\text{CO}_2$  exchange in vitro cultured *Vitis rupestris* plantlets [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1991, 27: 175 - 181.

## Factors influencing vitreous shoots of fine *Melia azedarach* clones in vitro

JIANG Ze-ping, LIANG Zhen-hai, WANG You-liang, HAN Jie-feng

(Jiangsu Forestry Academy, Nanjing 211153, Jiangsu, China)

**Abstract:** With the nodal segments and apical buds from fine mother stocks of *Melia azedarach* clones as explants, the effects of such factors as BA and NAA concentration ratio, sugar and agar concentration, culture vessel and sealing materials on the vitreous shoots of *Melia azedarach* in vitro were studied. The results indicated that BA had an evident effect on the vitrification of shoots. When BA was at the concentrations between  $0.5 - 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , vitreous shoots increased significantly with the increasing concentration of BA. The shoots in the culture media supplemented with  $0.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{BA} + 0.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}$  could get a considerable multiplication coefficient (about 4.95), and also grew robustly. Mass fraction of sugar also had an evident effect on the vitrification of shoots.  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  sugar helped control the shoot vitrification, vitreous shoots only accounting for 18.33%. Agar concentration had no evident effect. The containers or sealing materials with good air-permeability could significantly reduce the vitreous shoots and promote robust growth of the shoots. [Ch, 3 tab. 9 ref.]

**Key words:** silviculture; *Melia azedarach*; tissue culture; vitrification