

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子。[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 Jianwu (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 agar concn. could change vitrifying frequency, among 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

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 ng/L + NAA 0.05 ng/L 上; 启动后转接于分化培养基: MS + 6-BA 0.50 ng/L + NAA 0.1 ng/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: MS + 6-BA 0.3 ng/L (单位下同) + NAA 0.1; N₆ 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 ng/L, (NH₄)₂SO₄ 463 ng/L; MS 培养基中, KNO₃ 1 900 ng/L, NH₄NO₃ 1 650 ng/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: MS + 6-BA 0.3 + NAA 0.1, MS + 6-BA 0.3 + NAA 0.1 + LH 300, MS + 6-BA 0.3 + NAA 0.1 + LH 300 + 青霉素 10 万单位/L, MS + 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

配方 Prescription	区组 Bock Vitrified seedlings		区组 Bock Vitrified seedlings		区组 Bock Vitrified seedlings	
	玻璃化苗 Vitrified seedlings	污染苗 Contaminated seedlings	玻璃化苗 Vitrified seedlings	污染苗 Contaminated seedlings	玻璃化苗 Vitrified seedlings	污染苗 Contaminated seedlings
	24	0	25	1	25	0
	11	11	14	9	13	8
	22	2	23	3	23	0
	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:MS+KT 0.5+6-BA 0.1+NAA 0.1; MS+KT 0.5+NAA 0.1; MS+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:MS+6-BA 0.3+NAA 0.1+糖50 g/L+琼脂5.0 g/L; MS+6-BA 0.3+NAA 0.1+糖30 g/L+琼脂6.5 g/L; MS+6-BA 0.3+NAA 0.1+糖50 g/L+琼脂6.5 g/L; MS+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、、、、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,其中配方效果最好,配方其次,效果最差的为配方,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				x	柳
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(*Arthurium 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。

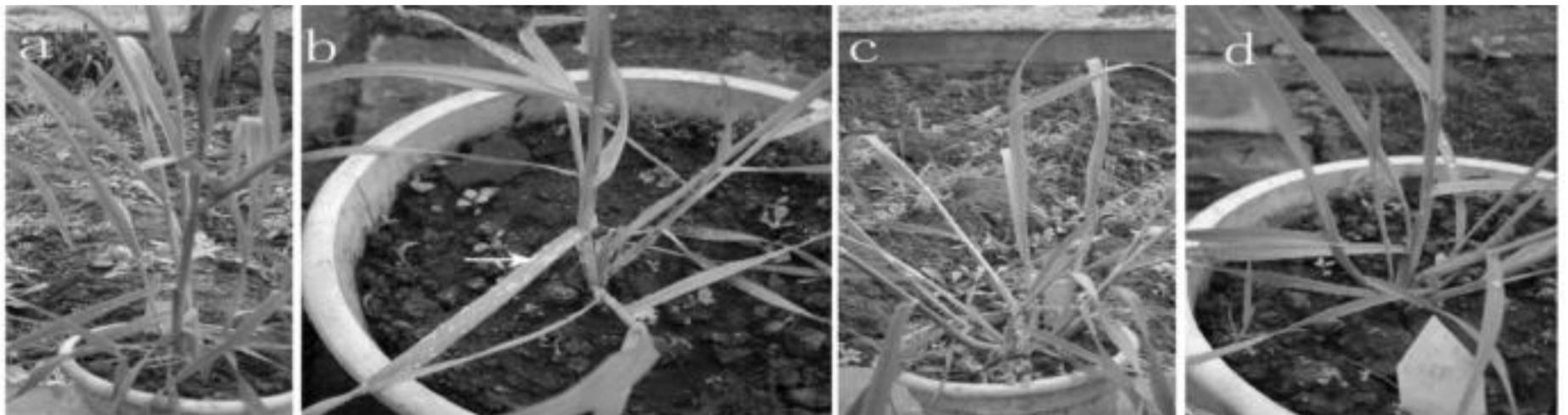
根据该试验,在发生玻璃化时,可采取以下措施以缓解或防止其危害性。增加光照,特别是对喜光植物尤其重要;注意琼脂质量及相应的用量;变换封口材料、改善培养容器的透气性;用KT替代6-BA;降低培养基水势,如

中含有的白粉病抗性基因位于3R和6R染色体上。

3 讨论

探寻新的白粉病抗源是小麦育种中极其重要的一个环节,虽然前人已发现了来源于黑麦的新的白粉病抗性基因^[5-6],但该研究报道的白粉病抗源来自黑麦Imperial及黑麦King,与前人报道的来源不同。另外,该试验将黑麦Imperial及黑麦King中的白粉病抗性基因分别定位在了3R和6R上,而目前已报道的黑麦来源的白粉病抗性基因位于1R、5R和6R染色体上^[5,7-9]。因此,黑麦King的3R染色体上带有的白粉病抗性基因可能是新基因,而两种黑麦6R染色体上带有的抗性基因是否是新基因还有待进一步研究。该研究一方面为小麦育种提供了新的白粉病抗源,另一方面说

明3R和6R染色体上的白粉病抗性基因可在小麦背景中得到表达。黑麦1RS染色体臂上的抗白粉病基因的抗性已丧失,对3R、6R染色体上携带的白粉病抗性基因的开发利用有利于小麦白粉病抗性育种。外源染色体导入普通小麦遗传背景中,育成部分双二倍体、异附加系、异代换系等是转移外源基因的重要方式,其中最具有利用价值的是附加一对外源染色体的二体异附加系,它不仅可用于进一步创造异代换系和易位系,同时也可用于物种间染色体组遗传关系研究^[10-11]。因此,该研究中的小麦-黑麦3R和6R附加系对小麦育种有重要的应用价值,它们可作为直接的桥梁材料,将黑麦白粉病抗性基因导入小麦基因组中,从而培育出抗白粉病的小麦品种。



注:a,黑麦King(对白粉病免疫);b,7R附加系(高感白粉病,箭头示白粉病);c,3R附加系(对白粉病免疫);d,6R附加系(对白粉病免疫)。所示附加系都来自Hidfast × King。

Note :a, Rye King (resistance to powdery mildew) ;b, 7R addition line (high sensitive to powdery mildew) ,arrow head shows the powdery mildew ;c, 3R addition line (immune to powdery mildew) ;d, 6R addition line (immune to powdery mildew) .The addition lines all came from Hidfast × King .

图1 供试材料白粉病抗性鉴定

Fig.1 Identification of powdery mildew resistance of tested materials

参考文献

- [1] 解超杰,杨作民,孙其信.小麦抗白粉病基因[J].西北植物学报,2003,23(5):822-829.
- [2] HSAMS L K,LAPOCHKINAI F,ZELLER F J. Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (Triticum aestivum L. em. Thell.) gene Pm32 in a wheat-Aegilops speltoides translocation line [J]. Euphytica, 2003, 133(3):367-370.
- [3] 邱永春,张书绅.小麦抗白粉病基因及其分子标记研究进展[J].麦类作物学报,2004,24(2):127-132.
- [4] 林小虎,王黎明,李兴锋,等.抗白粉病八倍体小偃麦和双体异附加系的鉴定[J].作物学报,2005,31(8):1035-1040.
- [5] 符书兰,唐宗祥,张怀琼,等.含白粉病基因的黑麦染色体小片段向小麦的转移[J].遗传,2006,28(11):1396-1400.

- [6] 张怀渝,任正隆.威岭栽培黑麦抗白粉病特性导入小麦的研究[J].分子细胞生物学报,2007,40(1):31-38.
- [7] WANG Z L,LI L H,HEZ H,et al. Seeding and adult plant resistance to powdery mildew in Chinese bread wheat cultivars and lines [J]. Plant Disease, 2005, 89(5):457-463.
- [8] 任正隆,张怀琼.小麦-黑麦染色体小片段易位的诱导[J].中国科学,1997,27(3):113-118.
- [9] 邱永春,张书绅.小麦抗白粉病基因及其分子标记研究进展[J].麦类作物学报,2004,24(2):127-132.
- [10] 王洪刚,刘树兵,亢增军,等.中间偃麦草在小麦遗传改良中的应用研究[J].山东农业大学学报:自然科学版,2000,31(3):333-336.
- [11] 林小虎,王黎明,李兴锋,等.抗白粉病小麦-中间偃麦草双体附加系的鉴定[J].植物病理学报,2005,35(1):60-65.

(上接第4868页)

提高碳源浓度;调整培养温度,使其达到植物生长最适值。

应该看到,有些措施尽管在实际应用中有一定作用,但只要不能最大限度地满足培养植物的需要,即便勉强获得试管苗,也很难看到生长健康的壮苗。

而光照强度与玻璃化的关系以及不同培养基的渗透势、水势及生长于其上的试管苗水势的测定,进而确定此三者与玻璃化试管苗的关系尚待进一步研究。

参考文献

- [1] 曹汝义,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,1996:60.

- [2] HUSSEY G. Vegetative propagation of plants by tissue culture [M] // YEOMAN. Plant cell culture technology. Oxford London Edinburgh: Backwell Scientific Publications, 1986:33-34.
- [3] 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.
- [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(8):281-288.
- [5] 周菊华,林证明.控制瑞香试管苗玻璃化的研究[J].园艺学报,1990(8):229-232.
- [6] 程家胜,史忠,张志云.苹果组织培养中的玻璃苗问题 简报[J].植物生理学通讯,1990(1):33-35.
- [7] 李瑶,徐根娣.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.
- [8] 王树芝,田砚亭,罗晓芳.宽叶刺槐和四倍体无性系的组织培养[J].植物生理学通讯,1999,35(3):204-205.