

技术与方法 Techniques and Method

培养条件对澳蜡花‘舞后’试管苗玻璃化的影响

孟会, 李青*, 潘会堂

北京林业大学园林学院, 国家花卉工程技术中心, 北京 100083

摘要: 以澳蜡花‘舞后’的试管苗为试验材料, 研究了培养条件对其试管苗玻璃化的影响。结果表明, 当以1/2MS为基本培养基, 附加0.2 mg·L⁻¹ 6-BA、0.01 mg·L⁻¹ IBA、4%蔗糖、0.8%琼脂并在以塑料封口膜为封口材料的三角瓶内培养时, 试管苗的增殖系数较高, 玻璃化率较低。

关键词: 澳蜡花; 试管苗; 玻璃化

Effects of Tissue Culture Conditions on Vitrification of *in vitro* shoots of *Chamelaucium uncinatum* Schauer ‘Dancing Queen’

MENG Hui, LI Qing*, PAN Hui-Tang

National Floriculture Engineering Research Center, College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: *Chamelaucium uncinatum* ‘Dancing Queen’ were chosen as materials to study the effects of different conditions of tissue culture on vitrification. Results showed the optimum medium for proliferation and overcoming vitrification was 1/2MS medium supplemented with 0.2 mg·L⁻¹ 6-BA, 0.01 mg·L⁻¹ IBA, 4% sugar and 0.8% agar, using conical flask closed with good permeability sealing material.

Key words: *Chamelaucium uncinatum*; *in vitro* shoots; vitrification

澳蜡花又称风蜡花, 为桃金娘科(Myrtaceae)澳蜡花属多年生常绿灌木, 是原产于澳大利亚的重要野生木本花卉(李长潇2006), 现已逐渐成为世界流行的新型高档木本切花, 在我国主要用于节日切花。澳蜡花花后无果实, 且种子细小(Lamont 1986), 难以进行播种繁殖, 生产上主要是扦插繁殖, 但繁殖速度慢且生根率较低(周玉珍等2006)。因此, 建立澳蜡花的组织培养快繁体系, 对缩短生产周期、扩大生产规模具有重要意义。

澳蜡花组培过程中试管苗经常发生玻璃化现象, 其中品种‘舞后’(‘Dancing Queen’)的玻璃化现象比较严重, 成为其组培快繁的限制因素。影响试管苗玻璃化的因素主要有基本培养基(秦静远等2004)、植物生长调节剂(周菊华等1990)、蔗糖(Langford和Wainwright 1987)、琼脂(饶雪琴和张曙光2005)、封口材料(李娅莉等2004)等。其中培养基中无机盐含量, 尤其是NH₄⁺浓度, 对玻璃苗的产生影响较为显著(张翠玉和廖晴1991); 不同植物生长调节剂种类与浓度所产生的玻璃化比率不同(李瑶等1997; 赵佐敏2005); 蔗糖浓度、琼脂含量

均与玻璃化苗发生率呈负相关(张燕玲等1997); 透气性较好的封口材料有利于克服玻璃化现象的发生(高疆生等2001)。因此, 我们以‘舞后’试管苗为试材, 探讨了培养条件与其玻璃化发生程度的关系, 为建立有效微繁体系提供依据。

材料与方法

1 澳蜡花(*Chamelaucium uncinatum* Schauer) ‘舞后’试管苗的获得

在启动培养基(1/2MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ IBA+3%蔗糖+0.6%琼脂)上接种的外植体经过7~9 d开始萌发小芽, 4~5周后长成丛生芽, 将其剪切成为大小均等的小苗(高约1.5 cm), 进行各种处理, 每种处理10瓶, 每瓶3株, 重复3次。处理60 d后统计玻璃化率。未进行说明的培养基中, 蔗糖浓度为3%, 琼脂用量为0.6%。培养温度为

收稿 2010-06-04 修定 2010-08-18

资助 国家林业局“948”项目(2007-4-07)。

* 通讯作者(E-mail: wliqing06@sina.com; Tel: 010-62338294)。

(24±2) °C, 光照强度为 30~40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光照时间为 12 $\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

2 影响澳蜡花‘舞后’试管苗玻璃化的因素分析

2.1 基本培养基 通过单因素随机区组试验, 选取 MS、1/2MS、B₅、H、HB 共 5 种基本培养基, 分别附加 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 和 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA。

2.2 细胞分裂素 将 0.2、0.5、1.0、2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 6-BA 和 0.2、0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 KT 分别附加 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA 进行配比试验, 比较不同细胞分裂素的影响。

2.3 IBA 浓度 将 4 种不同浓度的 IBA 分别附加 0.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 进行配比试验, 比较不同浓度的 IBA 的影响。

2.4 蔗糖浓度 设蔗糖浓度为 1%、2%、3% 和 4%, 培养基为 MS+0.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+0.02 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA, 琼脂用量为 0.6%, 比较蔗糖浓度的影响。

2.5 琼脂用量 在培养基中分别添加 0.5%、0.6%、0.7% 和 0.8% 的琼脂, 培养基为 MS+0.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+0.02 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA, 蔗糖浓度为 3%, 比较琼脂用量的影响。

2.6 封口材料与培养容器 采用牛皮纸加玻璃纸为封口材料的三角瓶、塑料封口膜为封口材料的三角瓶以及用塑料盖密封的玻璃罐头瓶作为培养容器进行培养, 培养基为 MS+0.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+0.02 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA。比较封口材料与培养容器的影响。

3 计算与分析

增殖系数和玻璃化率按照以下方法进行计算, 增殖系数 = 增殖后的苗数 / 原接种苗数; 玻璃化率 (%) = 玻璃化的苗数 / 总苗数 × 100。

结果与讨论

1 基本培养基对澳蜡花‘舞后’试管苗玻璃化的影响

由表 1 可知, 以 HB 为基本培养基, 试管苗无

玻璃化现象发生, 但增殖系数低, 为 0.29, 几乎不生长, 最后死亡。以 MS、B₅ 为基本培养基时, 试管苗玻璃化程度严重, 基部茎叶肿胀并出现透明现象。在 H 基本培养基中, 试管苗的玻璃化程度为中度, 基部茎叶肿胀未出现透明现象, 但在该培养基中的试管苗玻璃化率在 5 种基本培养基中最高, 为 85.37%。选择 1/2MS 为基本培养基, 玻璃化苗率较低, 为 16.81%, 同时其玻璃化程度较轻, 基部茎叶微肿胀, 且试管苗增殖效果较好, 增殖系数为 3.29, 而且植株健壮。MS 基本培养基属于富集元素平衡培养基, B₅ 属于高硝酸钾含量培养基, H 为中等无机盐含量的培养基(王关林和方宏筠 2002), 这可能是因为 MS 和 B₅ 中无机盐含量较高, 较易诱发澳蜡花‘舞后’发生玻璃化现象, 在 HB 中试管苗死亡率较高, 可能是 HB 中无 NH_4^+ , N 元素均以 NO_3^- 状态存在的原因。

2 细胞分裂素对澳蜡花‘舞后’试管苗玻璃化现象的影响

由表 2 可知, 在澳蜡花‘舞后’的组织培养过程中, 使用细胞分裂素 KT, 试管苗发生玻璃化的比率与程度均低于同浓度 6-BA。当 6-BA 浓度由 0.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加到 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 试管苗发生玻璃化的比率随之升高, 由 16.25% 上升到 76.15%, 并且玻璃化程度随之加重。在 6-BA 浓度为 0.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 玻璃化苗率最低为 16.25%, 玻璃化程度较轻, 基部枝叶出现微肿胀, 但试管苗生长健壮, 增殖系数较高 (5.10)。这与 Bornman 和 Vogelmann (1984)、杨雪等(2009)对云杉和红叶石楠试管苗玻璃化的研究结果一致。Kevers 等(1984)指出, 培养基中的细胞分裂素容易导致玻璃化, 而且玻璃化苗发生百分率和细胞分裂素浓度成正相关, 因为玻璃苗一般表现为茎节短、分枝多的特性, 这可能与细胞分裂素的主

表 1 基本培养基对澳蜡花‘舞后’试管苗玻璃化的影响

Table 1 Effect of different basic media on vitrification of *C. uncinatum* ‘Dancing Queen’

培养基	增殖系数	玻璃化率 / %	玻璃化程度	生长状况
MS	3.42 ^{Aa}	73.76 ^{Bb}	重: 基部茎叶肿胀并透明	长势较弱, 叶鲜绿
1/2MS	3.29 ^{Ab}	16.81 ^{Dd}	轻: 基部茎叶微肿胀	植株健壮, 叶深绿
B ₅	2.71 ^{Bc}	33.56 ^{Cc}	重: 基部茎叶肿胀并透明	植株健壮, 叶鲜绿
H	1.43 ^{Cd}	85.37 ^{Aa}	中: 基部茎叶肿胀	植株矮小, 叶绿色
HB	0.29 ^{De}	0 ^{Ee}	无玻璃化现象	几乎无生长现象, 最后死亡

表中不同大小写字母分别表示同列数据在 0.01 和 0.05 水平有差异显著性, 下表同此。

表2 细胞分裂素对澳蜡花‘舞后’试管苗玻璃化的影响

Table 2 Effect of cytokinin on vitrification of *Chamaelucium uncinatum* ‘Dancing Queen’

细胞分裂素	浓度/mg·L ⁻¹	增殖系数	玻璃化率/%	玻璃化程度	生长状况
6-BA	0.2	5.10 ^{Aa}	16.25 ^{Dd}	轻: 基部茎叶微肿胀	植株健壮, 叶绿色
	0.5	4.00 ^{Bb}	34.01 ^{Cc}	中: 基部茎叶肿胀	枝叶簇生状, 叶绿色
	1.0	3.01 ^{Cc}	69.01 ^{Bb}	重: 基部茎叶肿胀并透明	枝叶簇生状, 低矮, 叶绿色
	2.0	2.28 ^{Dd}	76.15 ^{Aa}	重: 基部茎叶肿胀并透明	枝叶簇生状, 未伸长, 低矮, 叶绿色
KT	0.2	0.28 ^{Ff}	0 ^{Ff}	无玻璃化现象	均无生长现象, 后死亡
	0.5	0.44 ^{Ee}	12.57 ^{Ee}	轻: 基部茎叶微肿胀	66.7% 无生长现象, 其余生长缓慢, 叶绿色

要作用: 促进芽的分化, 打破顶端优势, 促进腋芽发生相关(蔡祖国等 2005)。

3 IBA 对澳蜡花‘舞后’试管苗玻璃化现象的影响

由表 3 可知, 随着 IBA 浓度的升高, 试管苗发生玻璃化的比率上升, 当其浓度为 0.01 mg·L⁻¹ 时, 玻璃化率为 13.62%, 当浓度升高至 0.2 mg·L⁻¹ 时, 玻璃化率升高为 39.85%。试管苗玻璃化程度也发生了相应的变化, 在 IBA 浓度为 0.01 mg·L⁻¹ 和 0.05 mg·L⁻¹ 时玻璃化程度较轻, 基部枝叶发生微肿胀现象, 其增殖系数相对较高; 浓度为 0.1 mg·L⁻¹ 和 0.2 mg·L⁻¹ 时, 玻璃化程度为中度, 基部枝叶肿胀现象较为明显; IBA 浓度为 0.2 mg·L⁻¹ 时的增殖系数显著低于其他浓度, 为 4.32。

4 蔗糖浓度对澳蜡花‘舞后’玻璃化现象的影响

由表 4 的结果可知, 随着培养基中蔗糖浓度的

增加, ‘舞后’试管苗的玻璃化率显著降低。当蔗糖浓度为 3% 时, 玻璃化率为 16.25%, 玻璃化程度为中度, 基部茎叶肿胀未出现透明现象。而当蔗糖浓度为 1%、2% 时, 试管苗玻璃化程度严重, 基部茎叶肿胀并伴随透明现象发生, 玻璃化率分别为 52.84%、34.63%。因此, 当蔗糖浓度较低时, 玻璃化率高, 玻璃化程度较重。当其浓度增加至 4% 时, 玻璃化率极显著低于其他处理, 玻璃化程度较轻, 基部茎叶微肿胀, 然而其生长势一般, 叶为黄绿色, 但试管苗增殖系数与其他处理无显著差异, 均较高。这与王小敏等(2006)、马济民(2009)对薄荷、桉树试管苗玻璃化的研究结果一致, 这可能是因为蔗糖对调节培养基的渗透压起着决定性的作用, 适当的提高蔗糖浓度, 可以降低培养基的渗透压, 从而使玻璃化苗率降低。

表3 IBA 浓度对澳蜡花‘舞后’试管苗玻璃化的影响

Table 3 Effect of IBA concentration in culture medium on vitrification of *C. uncinatum* ‘Dancing Queen’

IBA 浓度/mg·L ⁻¹	增殖系数	玻璃化率/%	玻璃化程度	生长状况
0.01	5.21 ^{ABab}	13.62 ^{Dd}	轻: 基部茎叶微肿胀	植株生长较健壮, 叶绿色
0.05	5.33 ^{Aa}	14.32 ^{Cc}	轻: 基部茎叶微肿胀	植株生长较健壮, 基木质化, 叶绿色
0.10	5.10 ^{Bb}	16.25 ^{Bb}	中: 基部茎叶肿胀	植株生长健壮, 叶绿色
0.20	4.32 ^{Cc}	39.85 ^{Aa}	中: 基部茎叶肿胀	植株生长较健壮, 叶绿色

表4 蔗糖浓度对澳蜡花‘舞后’试管苗玻璃化的影响

Table 4 Effect of sucrose concentration in culture medium on vitrification of *C. uncinatum* ‘Dancing Queen’

蔗糖浓度/%	增殖系数	玻璃化率/%	玻璃化程度	生长状况
1	5.17 ^{Aa}	52.84 ^{Aa}	重: 基部茎叶肿胀并透明	植株生长势一般, 叶黄绿色
2	5.29 ^{Aa}	34.63 ^{Bb}	重: 基部茎叶肿胀并透明	植株生长健壮, 叶绿色
3	5.10 ^{Aa}	16.25 ^{Cc}	中: 基部茎叶肿胀	植株生长健壮, 叶绿色
4	5.33 ^{Aa}	9.85 ^{Dd}	轻: 基部茎叶微肿胀	植株生长势一般, 叶黄绿色

5 不同琼脂用量对澳蜡花‘舞后’玻璃化现象的影响

由表5可知,当琼脂用量为0.6%时,玻璃化率为16.25%,玻璃化程度为中度,基部茎叶肿胀未出现透明现象。当琼脂用量为0.5%时,玻璃化率显著高于其他处理,为36.51%,玻璃化程度严重,基部茎叶肿胀并有透明现象。当琼脂用量升高至0.8%时,玻璃化率显著低于其他处理,为5.10%,玻璃化程度较轻,增殖系数显著高于其他处理,这与丰锋等(2001)对芦荟试管苗玻璃化现象研究结果一致,因为培养容器内相对空气湿度提高容易产生玻璃化苗(蔡祖国等2005)。

6 封口材料与培养容器对澳蜡花‘舞后’玻璃化现象的影响

由表6可知,使用不同的封口材料与培养容器对试管苗玻璃化现象的发生有不同的影响。使用罐头瓶作为培养容器,由于其透气性差,玻璃化率

最高为36.54%,玻璃化程度严重,基部茎叶肿胀并出现透明现象。使用牛皮纸加塑料纸为封口材料的三角瓶,其玻璃化率有所降低为16.25%,玻璃化程度中度。使用塑料封口膜为封口材料的三角瓶,透气性好,加强了与外界空气的流通,有效的降低了容器中的相对湿度,玻璃化率显著低于其他处理为9.65%,玻璃化程度也较轻,同时其增殖系数较高为4.97。这与李云等(1996)对珠美海棠试管苗玻璃化的研究一致。因为试管苗生长期间,要求足够的气体交换,气体交换的好坏取决于外植体生长量、瓶内空间、培养时间和瓶盖种类等(王爱芝等2009)。

综合考虑澳蜡花‘舞后’试管苗的玻璃化现象、增殖情况及生长状况,克服玻璃化苗的适宜培养基为以1/2MS为基本培养基,附加0.2 mg·L⁻¹ 6-BA、0.01 mg·L⁻¹ IBA、4%蔗糖和0.8%琼脂并在以塑料封口膜为封口材料的三角瓶内培养。

表5 琼脂用量对澳蜡花‘舞后’试管苗玻璃化的影响

Table 5 Effect of agar concentration in culture medium on vitrification of *Chamelaucium uncinatum* ‘Dancing Queen’

琼脂用量 /%	增殖系数	玻璃化率 /%	玻璃化程度	生长状况
0.5	4.86 ^{Cc}	36.51 ^{Aa}	重: 基部茎叶肿胀并透明	4种情况生长状况相近,
0.6	5.10 ^{Bb}	16.25 ^{Bb}	中: 基部茎叶肿胀	植株生长健壮, 叶绿色
0.7	5.10 ^{Bb}	11.39 ^{Cc}	中: 基部茎叶肿胀	
0.8	5.67 ^{Aa}	5.10 ^{Dd}	轻: 基部茎叶微肿胀	

表6 封口材料与培养容器对澳蜡花‘舞后’试管苗玻璃化的影响

Table 6 Effect of sealing material on vitrification of *Chamelaucium uncinatum* ‘Dancing Queen’

处理	增殖系数	玻璃化率 /%	玻璃化程度
牛皮纸+塑料纸	5.10 ^{Aa}	16.25 ^{Bb}	中: 基部茎叶肿胀
封口膜	4.97 ^{Aa}	9.65 ^{Cc}	轻: 基部茎叶微肿胀
罐头瓶	4.56 ^{Bb}	36.54 ^{Aa}	重: 基部茎叶肿胀并透明

参考文献

蔡祖国, 徐小彪, 周会萍(2005). 植物组织培养中的玻璃化现象及其预防. 生物技术通讯, 16 (3): 353~355
 丰锋, 李洪波, 谢建英(2001). 芦荟组织培养中试管苗玻璃化的发生与防止. 西南农业大学学报, 23 (5): 449~451
 高疆生, 张卫芳, 段黄金, 赵书珍(2001). 克服香石竹试管苗玻璃化研究. 北方园艺, (3): 34~36
 李长潇(2006). 新型木本切花植物——淘金彩梅的栽培. 中国花

卉园艺, (16): 29~31
 李娅莉, 张健, 潘远智(2004). 观赏植物组织培养过程中玻璃化现象与解决措施进展. 四川农业大学学报, 22 (3): 278~281
 李瑶, 王利华, 叶鸣明, 沈大棱, 徐根娣(1997). 影响香石竹试管苗玻璃化的因素. 植物生理学通讯, 33 (4): 256~258
 李云, 田亭, 罗晓芳(1996). 珠美海棠试管苗玻璃化发生机理的初步研究. 北京林业大学学报, (1): 52~58
 马济民(2009). 桉树组织培养中的“玻璃化”现象及其克服措施. 安徽农业科学, 37 (27): 12930, 12988

- 秦静远, 王军利, 王富容(2004). 植物组织培养中的玻璃化现象. 杨凌职业技术学院学报, 3 (2): 51~53
- 饶雪琴, 张曙光(2005). 番木瓜组织培养中玻璃化苗的发生与预防. 植物生理学通讯, 41 (3): 331
- 王爱芝, 沈海龙, 张鹏, 尹永花, 李长海(2009). 花楸组织培养中玻璃化现象的发生与防治. 东北林业大学学报, 37 (10): 18~22
- 王关林, 方宏筠(2002). 植物基因工程. 北京: 科学出版社, 352~353
- 王小敏, 李维林, 赵志强, 梁呈元, 房海灵(2006). 不同培养条件对薄荷试管苗玻璃化现象的影响. 植物资源与环境学报, 15 (3): 51~54
- 杨雪, 吴国盛, 范加勤(2009). 红叶石楠组培苗玻璃化影响因子及其克服技术研究. 江西农业大学学报, 31 (5): 906~910
- 张翠玉, 廖晴(1991). 月季试管苗玻璃化原因及控制方法研究. 新疆农业科学, (2): 76~78
- 张燕玲, 姚军, 王润珍, 唐高凤, 黄素梅(1997). 满天星组织培养中克服玻璃化现象的初探. 广西植物, 17 (3): 246~248
- 赵佐敏(2005). 非洲菊组培苗玻璃化控制研究初报. 贵州农业学报, 33 (3): 77
- 周菊华, 林证明, 梁海曼(1990). 控制璃香试管苗玻璃化的研究. 园艺学报, 17 (3): 229~232
- 周玉珍, 史骥清, 滕士元, 陈建芳(2006). 澳洲植物——蜡花的引种栽培和繁殖. 中国城市林业, 4 (5): 51~54
- Bornman CH, Vogelmann TC (1984). Effects of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification in *Picea abies*. *Physiol Plant*, 61: 505~512
- Kevers C, Coumans M, Coumans-Gilles MF, Gaspar T (1984). Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro*. *Physiol Plant*, 61: 69~74
- Lamont GP (1986). Evaluation of growth retardants for controlling height of Geraldton Wax flowers (*Chamelaucium uncinatum* Schauer.). *Scientia Horticulturae*, 29 (4): 363~371
- Langford PJ, Wainwright H (1987). Effects of sucrose concentration on the photosynthetic ability of rose shoots *in vitro*. *Ann Bot*, 60: 633~640