

不同培养条件对菜用大黄组培苗玻璃化的影响

牛延斌,邵珠田,高二娟,姜立娜
(河南科技学院 园艺园林学院,河南 新乡 453003)

摘要:为预防菜用大黄玻璃化苗的产生、提高组培苗的培养质量,以菜用大黄丛生芽为外植体,以 1/2 MS 为基本培养基,研究了蔗糖、琼脂、6-BA 对菜用大黄组培苗玻璃化现象的影响,同时测定了玻璃化苗与正常苗的生理指标差异。结果表明:适于菜用大黄组培苗最大增殖及玻璃化率最小的培养基组合是添加 30 g·L⁻¹ 蔗糖+6 g·L⁻¹ 琼脂+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ NAA 的 1/2 MS 培养基;正常苗的可溶性糖和可溶性蛋白含量明显高于玻璃化苗,而玻璃化苗的组织含水量比正常苗的略高。

关键词:菜用大黄;组织培养;玻璃化

中图分类号:S644.9 文献标识码:A 文章编号:1002-2767(2017)01-0020-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2017.01.0020

菜用大黄 (*Rheum rhaponticum* L.) 是蓼科 (Polygonaceae) 大黄属 (*Rheum*) 中以叶柄作为食用部分的蔬菜栽培种,属于多年生草本植物^[1]。

其叶柄粗大多汁,并且富含维生素 C、维生素 A、钙、磷以及人体所必需的各种氨基酸、琥珀酸等营养物质,是理想的芳香类保健蔬菜;同时其根部具有较高的药用价值,具有广阔的发展前景^[2-3]。

菜用大黄的繁殖方式以分株繁殖为主,但是扩繁速度慢,利用组织培养技术可以加快对新品种的推广和繁殖^[4]。在植物组织培养的过程中,组培苗的玻璃化现象是一种很常见的生理病变^[5]。玻璃化苗主要表现为植株矮小肿胀失绿、叶片皱缩成纵向反卷、呈半透明水渍状并且脆弱

收稿日期:2016-12-15
基金项目:河南省科技厅基础前沿资助项目(122300410134);河南科技学院人才引进资助项目(207010612015);国家级大学生创新训练资助项目(2015CX044)
第一作者简介:牛延斌(1995-),男,河南省郑州市人,在读学士,从事园艺植物遗传育种与生物技术研究。
通讯作者:姜立娜(1985-),女,山东省淄博市人,博士,讲师,从事园艺植物遗传育种与生物技术研究。E-mail: lina-jiang85@163.com。

参考文献:

[1] 关洪江. 食用型向日葵杂交种龙食杂 2 号选育及推广[J]. 中国种业, 2011(5):54-55.

[2] 裴国平,雷建明,张建党,等. 优质冬油菜品种区域试验分

析[J]. 中国种业, 2016(12):56-58.

[3] 蒋华. 福建省春花花生新品种区域试验[J]. 中国种业, 2016(11):49-51.

Regional Test on Edible Sunflower Varieties
of Heilongjiang Province

FAN Li-juan

(Institute of Economic Crops, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: In order to select edible sunflower varieties suitable for cultivation in Heilongjiang province with high quality, high yield and stable yield, strong resistance and wide adaptability, taking Gankui 1 as CK, and 11 sunflower varieties from seven units as materials, the regional comparative experiment was carried out, the reproductive performance, high yield, resistance and adaptability different sunflower varieties in major production areas were identified. The results showed that there were 10 varieties had significant increase in production, good performance and comprehensive traits, SH1082, LSK14, An0610, LS3968 and SH0152 had completed two years regional test, it was suggested to promote the production test next year; CH9148, Longshiza4, Sanrui6, NB8618 and WZ9188 was the first year regional test, it was suggested to continue next year; Output of NB003 had significantly reduction than CK, high rate of sclerotium and the comprehensive characteristic performance was not good, it was suggested to stop next year.

Keywords: edible; sunflower; new varieties; regional test

易碎,在植物组培快繁中会造成极大的损失^[6]。植物组培苗玻璃化的成因很多,目前研究主要集中在蔗糖浓度、琼脂含量、激素比例、培养条件等^[7]。本文对菜用大黄组培苗玻璃化现象的影响因素进行了研究,以期预防菜用大黄玻璃化苗的产生、提高组培苗的培养质量提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为河南科技学院菜用大黄引种课题组提供的菜用大黄组培苗,品种为“RT”;试验药品有葡萄糖标准溶液、萘酮试剂、标准蛋白质溶液、90%乙醇、考马斯亮蓝 G-250 溶液等。仪器用具包括分光光度计(VIS-7220G)、恒温水浴锅(TL-420)、烘箱、电子分析天平(1/1 000)等。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 以 1/2MS 为基本培养基,在超净工作台上切取大小一致的单芽接种在培养基上,以 6-BA、蔗糖、琼脂为试验因素,设置不同处理进行试验(见表 1)。每瓶接 3 个单芽,每个处理接种 10 瓶。将培养材料置于温度为 21~23℃、空气相对湿度 70%~80%、光照时间 12 h·d⁻¹(光照强度为 3 000 lx)的无菌培养间进行培养。

1.2.2 测定项目及方法 从单芽接种到培养基上开始,每周进行观察,连续观察 4 周,最后统计试验数据。通过统计接种丛生芽总数、诱导出丛生芽总数以及玻璃化苗数,分别计算玻璃化率和芽增殖系数。

玻璃化率/% = 玻璃化苗数/分化苗总数×100

芽增殖系数 = 总分化苗数/接种苗数^[8]

表 2 蔗糖浓度对菜用大黄组培苗增殖和玻璃化的影响

Table 2 Effect of different concentrations of sugar on vitrification of *Rheum rhaponticum* L.

蔗糖浓度/(g·L ⁻¹) Sugar concentration	接种苗数/株 Inoculation number	芽增殖系数 Bud proliferation rate	玻璃化率/% Vitrification rate	组培苗生长状况 Growth status
20	30	2.6	43.0	长势差,叶淡绿
30	30	2.7	18.3	长势好,叶绿
40	30	2.4	22.2	长势较好分化少

2.2 不同琼脂浓度对菜用大黄组培苗玻璃化的影响

由表 3 可以看出,随着琼脂浓度的增加,菜用大黄组培苗的玻璃化率明显下降,但是增殖系数

取处理后的正常苗与玻璃化苗进行可溶性糖、可溶性蛋白质和组织含水量的测定比较。采用萘酮比色法测定可溶性糖含量,考马斯亮蓝法测定可溶性蛋白质含量,干重法测定组织含水量^[9]。

表 1 试验设计

Table 1 Experimental design

处理 Treatments	蔗糖/ (g·L ⁻¹) Sucrose	琼脂/ (g·L ⁻¹) Agar	6-BA/ (mg·L ⁻¹)	NAA/ (mg·L ⁻¹)
CK	30	6	1.0	1
A ₁	20	6	1.0	1
A ₂	40	6	1.0	1
B ₁	30	5	1.0	1
B ₂	30	7	1.0	1
C ₁	30	6	0.5	1
C ₂	30	6	1.5	1

1.2.3 数据分析 试验结果采用 Excel 软件和 DPS 数据处理软件进行显著性测验和分析。

2 结果与分析

2.1 不同蔗糖浓度对菜用大黄组培苗玻璃化的影响

由表 2 可以看出,随着蔗糖浓度的升高,芽增殖系数是先增大后减小,玻璃化率逐渐减小。当蔗糖浓度为 20 g·L⁻¹时,菜用大黄组培苗的芽增殖系数较高,但是玻璃化率也最高,达到了 43%,明显高于其它处理。当蔗糖浓度为 30 g·L⁻¹时,菜用大黄组培苗的芽增殖系数最高但玻璃化率最低,此时组培苗长势较好。蔗糖浓度为 40 g·L⁻¹时,虽然玻璃化率相对较低,但是芽的分化受到抑制。

也下降。当琼脂浓度为 5 g·L⁻¹时,菜用大黄组培苗的玻璃化现象最严重,玻璃化率达到了 56.3%。当琼脂浓度为 6 g·L⁻¹时,菜用大黄组培苗的芽增殖系数较高,此时玻璃化率降低且组培苗叶色绿,

长势好。琼脂浓度增加到 7 g·L⁻¹时,组培苗的玻璃化率最低(8.8%),但芽增值系数较低,说明芽的分化受到了一定的抑制。

表 3 琼脂浓度对菜用大黄组培苗增殖和玻璃化的影响

Table 3 Effect of different concentrations of agar on vitrification of <i>Rheum rhaponticum</i> L.				
琼脂浓度/(g·L ⁻¹) Agar concentration	接种苗数/株 Inoculation number	芽增值系数 Bud proliferation rate	玻璃化率/% Vitrification rate	组培苗生长状况 Growth status
5	30	2.7	56.3	长势差,叶淡绿
6	30	2.7	40.2	长势好,叶绿
7	30	2.3	8.8	长势好,分化少

2.3 不同 6-BA 浓度对菜用大黄组培苗玻璃化的影响

由表 4 可以看出,随着 6-BA 浓度的升高,组培苗的玻璃化率先上升后下降。6-BA 浓度为

0.5 mg·L⁻¹和 1.5 mg·L⁻¹时,玻璃化率较低,但芽增值系数也较低。当 6-BA 浓度为 1.0 mg·L⁻¹时,组培苗的玻璃化率相对较高,芽增值系数也相对较高,植株长势好。

表 4 6-BA 浓度对菜用大黄组培苗增殖和玻璃化的影响

Table 4 Effect of different concentrations of 6-BA on vitrification of <i>Rheum rhaponticum</i> L.				
6-BA 浓度/(mg·L ⁻¹) 6-BA concentration	接种苗数/株 Inoculation number	芽增值系数 Bud proliferation rate	玻璃化率/% Vitrification rate	组培苗生长状况 Growth status
0.5	30	2.0	25.4	长势差,叶淡绿
1.0	30	2.7	40.2	长势好,叶绿
1.5	30	1.7	20.0	长势好,分化少

2.4 菜用大黄正常苗与玻璃化苗生理特性的比较

由表 5 可知,菜用大黄正常苗的可溶性糖和可溶性蛋白含量明显高于玻璃化苗,且在 5%水平时差异显著。玻璃化苗的组织含水量比正常苗略高,但是差异不显著。

表 5 菜用大黄正常苗与玻璃化苗生理特性的比较

Table 5 Comparison of physiology and biochemistry between vitreous and normal shoots			
材料 Materials	可溶性糖/ (mg·g ⁻¹) Soluble sugar content	可溶性蛋白 质/(mg·g ⁻¹) Soluble protein content	组织含 水量/% Water content
正常苗 Normal	125.15 aA	131.76 aA	93.62 aA
玻璃化苗 Vitrification	88.81 bA	113.83 bA	94.15 aA

不同大、小写字母表示 1%、5%差异显著水平。
Different capital letters and lowercases mean significant difference at 0.01 and 0.05 level.

3 结论与讨论

本试验研究结果表明,菜用大黄组织培养中发生玻璃化现象是多种因素综合作用的结果。综

合分析,确定以 1/2MS 培养基分别添加 30 g·L⁻¹蔗糖+6 g·L⁻¹琼脂+1.5 mg·L⁻¹6-BA+1.0 mg·L⁻¹NAA,并于温度为 21~23 ℃、空气相对湿度 70%~80%、光照强度为 3 000 lx(光照时间 12 h·d⁻¹)的条件下进行组织培养,菜用大黄组培苗的玻璃化率低,增值系数较高,组培苗长势较好,培养效果最好。

对培养基中的渗透压起决定性作用的主要是蔗糖,所以培养基中蔗糖的多少严重影响了植物细胞的脱分化与再分化以及新器官的形成。该试验中随着蔗糖浓度的增加,玻璃化率明显下降,这一结果与张丽珍等^[9]对青蒿研究相似。所以适当提高培养基中蔗糖浓度,可以降低其渗透势从而降低玻璃化率。

琼脂作为凝固剂在培养基中除了支撑组培苗平衡的作用外,也影响着培养基中的水分状况。琼脂浓度低时,培养瓶中湿度过大影响组培苗的生长和分化,最终导致出现玻璃化。琼脂浓度过高时,培养基变硬,营养物质很难被组织吸收和利用,导致芽分化能力减弱,增值系数降低。本试验中随着琼脂浓度的增加,玻璃化率下降其增值系数也降低,这与魏琴^[10]、胡淑英^[11]等人的研究成果比较相似。

不少研究报道表明在植物组织培养过程中,高浓度的 6-BA 会导致组培苗玻璃化现象严重,从而使组培苗培养失败^[12-13]。在此试验中,随着 6-BA 浓度的增高,组培苗的玻璃化率出现先升高后降低的趋势,但是高浓度的 6-BA($1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)会影响组培苗的芽增殖系数,这与刘丽^[5]的结果不一致,可能是不同的植物材料对外源激素的响应不一样引起的。

关于玻璃化苗和正常苗可溶性糖含量差异方面的研究不多,并且研究结果有很大的差异。孙庆春等^[14]研究发现菊花玻璃化苗的可溶性糖含量高于正常苗,而本试验发现菜用大黄玻璃化苗的可溶性糖含量明显低于正常苗的可溶性糖含量,与周书利^[15]等在草莓上的研究相同,这可能是不同植物种类造成的。在植物的生命的活动中,蛋白质参与了几乎所有的生命和过程并且通过一系列的降解为植物的生命活动提供物质和能量。本试验中正常苗可溶性蛋白含量明显高于玻璃化苗,这一结果与谢芝馨^[16]等对大葱的研究结果一致,说明了玻璃化组培苗中蛋白质的合成出现了异常,使得蛋白含量降低。水分直接参与了植物体内许多重要的生理生化过程,大多数的代谢过程也都是在介质中进行的。试验发现玻璃化苗的组织含水量比正常苗的组培苗含水量高,这与陈兵先^[17]等的研究相同。玻璃化苗的水分含量异常可能是由于植物体内的水分代谢异常引起的。

参考文献:

- [1] 蔡祖国,周岩,卢莉,等.不同激素对菜用大黄茎尖离体再生的影响研究[J].广东农业科学,2010(3):132-134.
- [2] 张有铎,蔡祖国,赵一鹏,等.生根基质对菜用大黄组培苗生根及移栽成活率的影响[J].广东农业科学,2010(9):89-95.
- [3] 卢莉,赵一鹏.菜用大黄的研究进展[J].广东农业科学,2008(2):19-21.
- [4] 王小敏,李维林,赵志强,等.不同培养条件对薄荷试管苗玻璃化现象的影响[J].植物资源与环境学报,2006,15(3):51-54.
- [5] 刘丽.培养条件对黑木相思组培苗玻璃化的影响[J].黑龙江农业科学,2015(5):29-32.
- [6] 张有铎,蔡祖国,赵一鹏.菜用大黄组培苗生根特性研究[J].湖北农业科学,2009,48(11):2759-2761.
- [7] 马晓菲,张家菁,于元杰,防风(*Saposhnikovia divaricata*)组织培养中的玻璃化现象研究[J].分子植物育种,2013,11(3):421-430.
- [8] 王爱芝,沈海龙,张鹏,等.花楸组织培养中玻璃化现象的发生与防治[J].东北林业大学学报,2009,37(10):18-22.
- [9] 张蜀秋.植物生理学实验技术教程[M].北京:科学出版社,2011:187-201.
- [10] 张丽珍,杨东业,靳振江,等.青蒿组织培养中克服玻璃化现象研究[J].北方园艺,2010(23):120-122.
- [11] 魏琴,周黎军,宣朴,等.组培养条件对油樟试管苗玻璃化的影响[J].四川师范大学学报,2006,29(5):606-608.
- [12] 胡淑英,张春红,王小敏,等.滨梅组培苗玻璃化成因及其克服技术研究[J].中国南方果树,2013,42(5):37-41.
- [13] 潘雨梅,马小军,莫长明,等.不同培养条件对罗汉果组培苗玻璃化的影响[J].中国种业,2011(2):43-45.
- [14] 孙庆春,郑成淑,丰震.菊花玻璃化苗与正常苗的生理特性比较[J].山东农业科学,2009(5):51-53.
- [15] 周书利,汤浩茹,代利娟,等.不同因素对草莓试管苗玻璃化的影响[J].北方园艺,2013(13):131-134.
- [16] 谢芝馨,张玉喜,于元杰.大葱组织培养中玻璃苗特性研究[J].西北植物学报,2004,24(11):2146-2149.
- [17] 陈兵先,黄宝玲,吕成群,等.植物组织培养试管苗玻璃化现象研究进展[J].林业科技开发,2011,25(25):1-5.

Effects of Different Conditions on Tissue Culture Vitrification of *Rheum rhaponticum* L.

NIU Yan-bin, SHAO Zhu-tian, GAO Er-juan, JIANG Li-na

(College of Horticulture and Landscape Architecture, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003)

Abstract: In order to prevent vitrification seedling of *Rheum rhaponticum* L., and improve the quality of somaclone, taking *Rheum rhaponticum* L. buds as explants, with 1/2MS as the basic culture medium, the effects of sucrose, agar and 6-BA on the vitrification of tissue cultured seedlings were studied. Meanwhile, physiological and biochemical indexes between vitrification shoots and normal seedlings were determined and compared. The results showed that the high coefficient of proliferation and the low rate of vitrification was cultured in 1/2 MS medium supplemented with $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose, $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ agar, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA and $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA. The soluble sugar and soluble protein content of the normal seedlings was significantly higher than that of the vitrification shoots, while the water content of the tissue was slightly higher than that of the normal seedlings.

Keywords: *Rheum rhaponticum* L.; conditions of tissue culture; vitrification