

桤叶唐棣组培育苗技术

王希大

(辽宁省清原县夏家堡林场,辽宁清原 113300)

摘要 本文对桤叶唐棣组培育苗技术进行了全面总结,包括所需设备及化学试剂、生产环境及设备消毒灭菌、无菌操作、培养基制作、外植体处理、组织培养程序、炼苗、移栽、移栽后管理和定植等方面内容,以期为优良外来经济林树种的快繁提供技术参考。

关键词 桤叶唐棣;组培;育苗技术

中图分类号 S792.99 **文献标识码** B **文章编号** 1007-5739(2019)03-0125-02

桤叶唐棣(*Amelanchier alnifolia* Nutt.)又名 Saskatoon berry,历史上被称为“蓝莓”,是蔷薇科(Rosaceae)唐棣属的落叶灌木或小乔木,高1.5~3.0 m,果实为小浆果,为北美洲重要的经济林树种,是国际市场新兴的第三代水果的代表^[1]。自1999年承担国家林业局“948”项目的辽宁省干旱地区造林研究所从加拿大成功引种桤叶唐棣后,其展现出良好的发展前景。鉴于桤叶唐棣扦插繁殖和种子育苗皆较困难的现实情况,开展了组培快繁的研究,迄今已实现关键技术的突破,为工厂化育苗奠定了基础。现将桤叶唐棣组培育苗技术总结如下。

1 所需设备及化学试剂

组培实验室必须选建在安静、清洁、无污染的地方,接种设备包括超净工作台、解剖刀、镊子、酒精灯、医用小推车、广口瓶、白瓷碟、无菌滤纸;灭菌设备包括高压蒸汽灭菌锅、紫外线灯、烘干箱;灭菌药剂及辅助剂包括75% C₂H₆O、90% C₂H₆O、0.1% HgCl₂、高锰酸钾、甲醛、84消毒液、洗衣粉、餐洗净等;培养基及植物生长调节剂包括MS培养基、6-BA、NAA、IBA、白糖、琼脂等;培养设备包括300 mL培养瓶、培养架、空调、照明灯管;其他辅助试验设备包括冰箱、电子天平(0.01 mg、0.001 mg)、磁力搅拌器、酸度计、照度计、温湿度表、移液枪、移液管、试剂瓶、容量瓶、烧杯等。

2 生产环境及设备消毒灭菌

2.1 培养瓶清洗与消毒

将使用过的培养瓶或盛培养基和培养物的玻璃器皿中的污物倒掉,再浸入水中进行洗涤。有微生物污染的器皿,必须先进行高压消毒或煮沸,杀死菌体后放入水中洗涤。器皿洗净后,烘干或晾干,放在规定的地方以待取用。

2.2 接种器械灭菌

一是高压蒸汽灭菌。使用前,将接种器械、器皿及定性滤纸用牛皮纸包裹后,再用聚丙烯薄膜裹紧并包扎,然后与分装后的培养基一起放入高压锅的消毒桶内灭菌。锅内灭菌物以不超过灭菌锅容量的3/4为宜,高压灭菌时锅内使用蒸馏水。打开电源加热,压力保持在0.105~0.120 MPa(压力<0.140 MPa),时间为30 min。二是灼烧灭菌。在无菌操作时,将镊子、剪刀、解剖刀等浸入250~500 mL装有75% C₂H₆O的广口瓶中,使用之前取出并在酒精灯外焰处灼烧灭菌,冷却后立即使用。每次重新操作都要将工具放在火焰上消毒。

2.3 准备室消毒

坚持每天用84消毒液(稀释成1 000倍液)或75%

C₂H₆O喷洒、洗涤准备室地面,保持室内清洁。

2.4 接种室及培养室消毒灭菌

房间密闭,将甲醛5~38 mL/m³置于广口容器中,加高锰酸钾5 g/m³氧化挥发,熏蒸2~3 d,通风无味后2~3 d人员方可进入。接种室每30 d用高锰酸钾及甲醛混合熏蒸1次,培养室每60 d用高锰酸钾及甲醛混合熏蒸1次。工作期间每3 d用75% C₂H₆O喷雾消毒1次。转接操作前,接种室、超净工作台等皆要用紫外线灯照射25~30 min。

3 无菌操作

入无菌室前洗手,去掉指甲中的污物;入室时要穿戴上经过消毒的工作服、帽子、口罩和鞋子等;工作人员进行无菌操作前,要用75% C₂H₆O擦洗双手,并用75% C₂H₆O擦拭操作台面及内壁;操作中要经常用75% C₂H₆O擦洗手。操作时,右手拿培养瓶,左手轻轻拉开瓶口绑绳放在台面上,再用左手中指和无名指夹住封口膜后掀开,将培养瓶口倾斜靠近酒精灯火焰上旋转灼烧数秒,用灼烧消毒冷却后的镊子将转接材料接种至培养基中,每个培养容器中接种小芽丛或单芽3~4株,且分布均匀,接种后盖上封口膜包扎,并标注日期;接种时,在无菌滤纸上切取材料,刀和镊子等接种工具每次使用后即放入75% C₂H₆O中浸泡,然后灼烧放凉备用。接种时,超净工作台上的风机要始终保持开启状态,确保通风顺畅;操作过程中不准讲话,亦不准对着操作区呼气。每次接种完毕后,用75% C₂H₆O将工作台台面及内壁擦拭干净,并将接种器皿及接种工具重新进行消毒处理。

4 培养基制作

4.1 培养基母液的配制与保存

选用试剂纯度为化学纯或分析纯的化学药品,根据MS培养基配方,分别配制大量元素(10倍)、微量元素(100倍)、铁盐(100倍)、有机物(100倍),母液配制使用蒸馏水或去离子水。配制好的培养基母液要分别贴上标签,标注名称、配制倍数和日期,置于2~4℃环境下保存。铁盐应储存在棕色容器中。

4.2 植物生长调节剂母液的配制与保存

桤叶唐棣组培中用到的植物生长调节剂有NAA、IBA和6-BA。配制NAA、IBA母液时,可先用少量95% C₂H₆O溶解,再加蒸馏水定容;配制6-BA母液时,可先用少量0.1 mol/L HCl溶解,再加蒸馏水定容。母液配制好后储存在棕色容器中,贴好标签并置于冰箱内保存,温度控制在0~4℃之间。

4.3 培养基的配制、灭菌及保存

根据培养基配方需求,称取琼脂(8 g/L)、白糖(30~35 g/L),

用最终培养基体积 70%~80%的水加热溶解,然后按计算的量依次加入 MS 母液、植物生长调节剂,定容后用 0.1 mol/L NaOH 或 0.1 mol/L HCl 溶液调节 pH 值至 5.5~5.8,定量分装至培养瓶中并封口、标记。瓶装培养基应在 12 h 内完成灭菌程序,采用高压蒸汽灭菌方式灭菌,在压力 0.105 MPa、温度 121 ℃条件下灭菌 15~20 min。灭菌后的培养基放入接种室,避光、防尘保存,常温条件下保存,7 d 内使用完;2~4 ℃条件下保存,14 d 内使用完。

5 外植体处理

5.1 外植体采集

生长旺季,在晴天或露水干后剪取生长健壮母株上较幼龄的最幼态部位作为外植体。外植体宜当天采集、当天处理,运输过程中要注意低温、保湿,迅速带回组培室。

5.2 外植体茎段修剪

剪下植株后去除叶片,留取有用茎段。茎段长度 4~5 cm,剪段要求留 1~2 个出芽点。

5.3 外植体清洗

修剪好的茎段按木质化程度放置于不同的烧杯中,加入餐洗净进行表面冲洗。冲洗 1~2 h 后,置于超净工作台(已开机、灭菌 20 min 以上)备用。

5.4 0.1%升汞配制

称取 1 g 升汞,加蒸馏水溶解,定容至 1 L,装入棕色瓶中,用封口膜扎紧瓶盖,贴上标签,标明配制浓度、日期。注意使用升汞消毒液应按照国家有关剧毒化学药品使用的法规进行作业,详情可参见《医疗用毒性药品管理办法》。

5.5 无菌水准备

将纯净水装入玻璃瓶中,扎紧封口膜,放入高压锅内灭菌 30 min,保持锅内气压在 0.10~0.11 MPa(120~122 ℃)。

5.6 外植体表面灭菌

用 75% C_2H_5O 浸泡 30 s,无菌水冲洗 2~3 次,然后按材料的木质化程度分别用 0.1 HgCl₂ 浸泡 6~8 min,最后用无菌水冲洗 5~6 次。

6 组织培养程序

6.1 无菌培养体系的建立

①诱导培养基配方。MS+6-BA 0.6 mg/L+NAA 0.12 mg/L+IBA 1.4 mg/L+糖 35 g/L+琼脂 8 g/L。②外植体接种。将表面消毒的外植体切去两端,切成 1~2 cm 长单芽,按照正常生长方向接入腋芽诱导培养基中诱导营养芽。③培养条件。培养室温度设定为(25±2) ℃,光照强度为 2 500~3 000 lx,光照时间为 14~16 h/d。④培养周期。培养时间为 40~50 d。⑤褐化苗处理。关闭照明电源,进行暗培养;降低培养室温度至 15~20 ℃;将褐变苗转入新培养基,然后每天继续转 1 次,连续转 7 d。

6.2 继代增殖

①培养基配方。MS+6-BA 2.5 mg/L+IBA 1.0 mg/L+糖 35 g/L+琼脂 8 g/L。②丛生芽接种。当初代诱导的不定芽长到 1.5 cm 及以上时,将萌发的幼芽从基部切下,去掉茎尖,并接种到继代培养基中进行不定芽的增殖培养。③培养条件及培养周期。培养条件同 5.1,培养周期 30~45 d。④继代苗质量标准。无污染、无玻璃化、叶鲜绿、生长健壮。⑤玻璃化苗处理。

低温处理,增加琼脂浓度,增加光照。

6.3 生根培养

①生根培养基配方。1/2 MS+NAA 1.5 mg/L+IBA 1.5 mg/L+糖 30 g/L+琼脂 8 g/L。②生根苗接种。将 1.5 cm 以上、生长健壮的芽切或单芽接种在生根培养基中。③接种株数。每瓶接种 10 株或 15 株(以方便计数)。④培养条件及培养周期。培养条件同 5.1,培养周期 45~60 d。⑤生根率及生根苗质量标准。生根率≥90%,生根苗质量标准为叶片绿色、株高≥3.0 cm、根茎粗≥0.1 cm、节间 2~3 个、单株复叶数≥4 片、根白色柔软、根数≥6 条、平均根长 1.5~2.0 cm^[2-3]。

7 炼苗

炼苗季节为 4—6 月或 8—9 月。一是强光闭瓶锻炼。将瓶装试管苗移至日光温室或大棚,温度控制在 35 ℃以下,保留瓶盖继续培养 10 d 左右。二是强光开瓶锻炼。闭瓶锻炼结束后,除去瓶盖继续锻炼 2~5 d,在培养基表面出现大量杂菌前进行移栽^[4]。

8 移栽

移栽基质配方为草炭土:细河沙:壤土=3:5:2。基质过筛后混匀,混匀过程中喷洒 0.2%代森锰锌水溶液消毒,混匀后覆膜堆沤、压严,3 d 后装杯。

移栽容器为塑料营养钵,规格为 8 cm×6 cm×7 cm。

移栽前,用自来水将根系上的培养基冲洗干净,再用 0.1%多菌灵溶液浸泡组培苗根部 3~5 s,然后栽入已准备好的营养钵中。

9 移栽后管理

温度控制在(30±2) ℃。栽完 1 个苗床,浇足定根水后搭建高 50 cm、宽 1.2 m、长 6.0 m 的塑料小拱棚。移栽后前 3 d,每天早、晚各喷 1 次水,保持空气湿度 80%~90%;3 d 后,逐渐揭膜通风直至完全去除塑料薄膜。移栽后的前 20 d,用遮光率为 75%的遮阳网进行遮荫;20 d 后,逐渐卷起遮阳网增加透光率,直至完全去掉遮阳网。根腐病防治措施为栽后马上喷施 1:1:100 的波尔多液预防,以后每隔 7 d 喷施 1 次;发病初期用采用 0.1%甲基托布津或 0.1%多菌灵溶液交替喷洒根茎部,连续防治 2~3 次,间隔期为 7 d。根部虫害防治措施为喷施 0.1%毒死蜱,连续防治 2~3 次,间隔期为 7 d。移栽 20 d 后,叶面喷施 0.3%磷酸二氢钾;移栽 30 d 后,配合浇水,水中适量加入磷酸二铵,亦可每隔 20 d 喷施 1 次 1/8MS 母液 1 000 倍液。

10 定植

在翌年春末至夏初(5—6 月),选择苗高 15~20 cm、根茎粗≥0.5 cm、根系发达的苗木定植。定植方法为将组培苗带移栽基质定植至苗圃,并喷施 0.05%~0.10%的抗蒸腾剂 CaCl₂ 或 NaHSO₃。

11 参考文献

- [1] 王占龙,黄立华,龙忠伟.桉叶唐棣组培技术[J].林业科技开发,2013,27(3):123-125.
- [2] 王丽冬.桉叶唐棣扦插育苗技术研究[D].北京:中国农业科学院,2013.
- [3] 杜保国,杨锋利,杨途熙,等.桉叶唐棣生根培养及移栽试验[J].北方园艺,2011(16):155-157.
- [4] 于春辉,王占龙,于耀峰.桉叶唐棣组培苗微扦插及移栽炼苗技术[J].防护林科技,2017(4):123-124.