

外植体的选择和消毒对大叶榉组织培养的影响

汪灵丹, 张日清, 金晓玲

(中南林业科技大学资源与环境学院, 湖南 长沙 410004)

摘要: 以大叶榉的顶芽、腋芽、茎段、叶片等为外植体材料, 进行组织培养, 结果表明: 在其他条件一致的情况下, 不同消毒方式、不同采样时期、不同外植体类型对大叶榉组织培养的影响不同。

关键词: 外植体; 大叶榉; 组织培养; 影响

中图分类号: S 792. 189. 04

文献标识码: A

文章编号: 1003-5710(2008)02-0021-03

Effect of selection and disinfection processing on explant of tissue culture of *Zelkova schneideriana*

WANG Lingdan, ZHANG Riqing, JIN Xiaoling

(Resource and Environment College, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China)

Abstract: Using dissimilarity explant of *Zelkova schneideriana* Hand. -Mazz. as a experiment material for tissue culture. The results indicate: Under the situation that other conditions is consistent, different disinfection method, different genotype, different growth stage, different physiology lead different results in tissue culture of *Zelkova schneideriana* Hand. -Mazz.

Key words: explant; *Zelkova schneideriana* Hand. -Mazz.; tissue culture; effect

大叶榉(*Zelkova schneideriana* Hand. -Mazz.) 属榆科(Ulmaceae)榉属(*Zelkova Spach*), 为落叶乔木, 主要分布江苏、浙江、湖南、安徽、广东、广西、云南等地, 是国家二级保护树种。榉属共 6 种, 我国产 4 种, 即大叶榉、大果榉、光叶榉、台湾榉。其中大叶榉材质最优, 木材黄褐色或红褐色, 纹理直, 结构细, 质地硬, 少伸缩, 抗压力强, 耐水湿, 耐腐朽, 刨面光滑, 油漆后光亮度好, 胶粘性能好, 广泛用于造船、高级建筑、高档家具、胶合板高级饰面材等, 被国家有关部门列为家具用材一类材、特级原木。大叶榉抗风抗烟尘, 耐二氧化硫的性能强, 有防风、净化空气的作用, 是绿化、营造防风林的好树种。由于其具有较高经济、生态和景观利用价值, 故被大量的开发和利用, 现存大叶榉资源面临濒危, 亟待保护和发展^[1-3]。组织培养是促进优良种苗快速繁殖与应用, 保护濒危物种等的有效方式。目前关于大叶榉组织培养方面的研究比较少, 据文献记载, 国外只有

日本福冈县林业中心成功地进行了榉树组织培养研究, 而国内只有金晓玲^[4]等对榉树的生物学特性和微繁技术进行了系统研究, 榉树组培仍处于初期阶段。本研究旨在在前人的基础上, 就大叶榉的外植体消毒和选择方面进行实验, 对保护我国珍贵、匮乏的大叶榉资源在理论研究和实际应用中都具有参考意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料来源于中南林业科技大学生态实验站的成年大叶榉和本实验室 3 月上旬播种的实生幼苗大叶榉, 所选外植体种类有成年大叶榉的腋芽、茎段和叶片, 实生幼苗大叶榉的顶芽、茎段、叶片。

1.2 实验方法

1.2.1 外植体的消毒方式对大叶榉组织培养的影响

(1) 先用自来水将外植体表面冲洗干净, 再用洗涤剂(如洗衣粉、洗涤灵等)溶液浸泡 15 ~ 30 min, 同时用毛刷不断搅动, 并用毛刷蘸洗涤剂溶

液仔细轻轻的刷洗,以将外植体表面污垢清洗干净为准,最后用流动的清水平洗 30~60 min。

(2) 在超净台上进行外植体的表面消毒和接种工作。于每个无菌三角瓶(100 mL,以下同)中放置约 10 个外植体准备消毒。先将外植体用 75% 的酒精浸泡 30s 左右,再用 0.1% HgCl_2 对外植体进行消毒,处理时间分别为 6 min、8 min、10 min、12 min,接种在 WPM + BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 的培养基上,诱导愈伤组织,培养基的 pH 值为 5.8,糖浓度 20g/L,琼脂浓度 6.7g/L,培养温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$,光照 2 000 lx,每天光照 12~14 h(如下同),每种处理 20 个样本,重复 3 次。对实验结果进行观察,统计外植体的污染率、死亡率、存活率,寻找最佳的大叶桉组织培养的外植体消毒时间。

1.2.2 外植体的采样时期对大叶桉组织培养的影响 选择 3 月、5 月、8 月、11 月不同时期采集的外植体,在相同培养基、培养时间和培养条件下进行愈伤组织诱导。每处理样本 20 个,重复 3 次。同时,对实验结果进行观察,统计外植体污染率、愈伤组织诱导率及愈伤组织生长情况。

1.2.3 外植体的类型对大叶桉组织培养的影响 选择大叶桉实生幼苗的顶芽、茎段和叶片以及成年大叶桉当年萌发的腋芽、嫩茎和叶片,在相同培养基、培养时间和培养条件下进行愈伤组织诱导培养。每处理样本 20 个,重复 3 次。同时,对实验结果进行观察,统计接种数,诱导愈伤组织数、愈伤组织诱导率、污染率和褐变率。

2 结果与分析

2.1 外植体的消毒方式对大叶桉组织培养的影响

由表 1 可以看出,成年大叶桉腋芽的消毒以 0.1% HgCl_2 处理 10~12 min 效果最佳,其污染率低,萌芽率最高。其中,用 0.1% HgCl_2 消毒处理 12 min 时,芽组织的存活率最高,达 72%,污染率较低,为 15%,用 0.1% HgCl_2 消毒处理 10 min 时,腋芽芽组织的成活率为 68%,污染率为 20%。而当 0.1% HgCl_2 处理 6~8 min 时,虽然对外植体伤害不大,但污染率很高。所以,对成年大叶桉腋芽的消毒液宜选择 0.1% HgCl_2 消毒 12 min。而幼年大叶桉顶芽消毒以 0.1% HgCl_2 消毒 10 min 效果最佳,存活率为 83%,污染率为 5%。由表 2 可以看出,大叶桉茎段和叶片的消毒,以 0.1% HgCl_2 处理 10 min 最为适宜。其污染率、死亡率较低,萌芽率最高。其

表 1 消毒处理对腋芽(成)和顶芽(幼)的影响

0.1% HgCl_2 处理时间(min)	腋芽			顶芽		
	污染率 (%)	死亡率 (%)	存活率 (%)	污染率 (%)	死亡率 (%)	存活率 (%)
6	45	5	50	35	8	57
8	34	5	61	15	10	75
10	20	12	68	5	12	83
12	15	13	72	2	34	64

表 2 消毒处理对叶片和茎段的影响

0.1% HgCl_2 处理时间(min)	茎段			叶片		
	污染率 (%)	死亡率 (%)	存活率 (%)	污染率 (%)	死亡率 (%)	存活率 (%)
6	33	8	59	27	7	66
8	15	11	74	12	10	78
10	5	10	85	5	13	80
12	3	27	67	2	37	58

中茎段用 0.1% HgCl_2 消毒 10 min,污染率为 5%,存活率达 85%;叶片用 0.1% HgCl_2 消毒 10 min,污染率为 5%,存活率达 80%。可见,成年大叶桉的外植体消毒所需时间相对较长,原因可能是生长于野外的自然环境,带有的杂菌较多;而所采集于组培室的幼嫩实生苗,一方面外植体生长环境由人工控制,污染较少;另一方面外植体刚刚长出来,感染杂菌的机率也低,所以所需的消毒时间较短。

2.2 外植体采样时期对大叶桉组织培养的影响

一年内的不同时期采集外植体,其诱导率、污染率和生长情况均有较大差异,由表 3 可知,3 月是大叶桉最好的采样时期,愈伤组织诱导率最高,为 95.8%,污染率最低,为 3%,且生长良好。5 月和 8 月外植体愈伤组织诱导率较高,但污染率也高。而在 11 月份采样,愈伤组织诱导率高达 93.1%,且污染率也较低。方差分析结果表明,8 月采集的外植体,其愈伤组织诱导率与 3 月份的存在极显著差异(a),5 月和 11 月的也存在显著差异(b)。可能的原因是:3 月是大叶桉的萌芽生长季节,生命力比较旺盛,抽出的新枝幼嫩且带菌少,而且此时大部分病菌还未到发生季节,所以污染率低,萌芽率高;而 5 月和 8 月正是高温高湿的季节,此时外植体的表面滋生有大量的微生物,而且生长繁育快,所以污染率比初春高,但这时也是植物旺盛生长的时期,植物本身积累了大量的营养物质和内源激素,所以萌芽率也较高;11 月份大叶桉冬季枝取于休眠期,此时气温低、雨水少、病菌等不易滋生、材料不易污染。此结论与金晓玲等^[4]的研究结论一致。但与大多数研究者得出的在生长末期,或已进入休眠期取材,外植体对诱导反应迟钝或无反应而应在生长季节开

表3 采样时期对大叶桉组织培养的影响

采样时期(月)	愈伤组织诱导率(%)	污染率(%)	生长情况
3	95.8±1.43 ^a	3	出愈时间较快,长势好,黄绿色
5	90±2.13 ^b	15	出愈时间较快,长势好,黄绿色,易褐化
8	79.1±0.93	35	出愈时间慢,长势弱,黄色,易褐化
11	93.1±1.14 ^b	5	出愈时间较慢,长势好,黄绿色

注:培养基 WPM;a 表示 0.01 水平的极显著差异,b 表示 0.05 水平的显著差异。

始取材的结论不一致,其原因可能与大叶桉的生理特性有关,尚待进一步研究^[5-6]。

2.3 外植体类型对大叶桉组织培养的影响

由表 4 可以得出,大叶桉幼年型外植体材料的愈伤组织诱导率明显高于成年型材料,而污染率和褐变率低于成年型材料。幼年型材料实生苗的顶芽、茎段和叶片的愈伤组织诱导率分别是 98.0%、80%、66.7%,明显高于成年型材料。而污染率和褐变率,幼年型外植体材料明显低于成年型外植体材料,特别是褐变率,幼年型材料的褐变率未超过 5%,而成年大叶桉外植体的褐变率高达 30%~40%。可能的原因是:成年型外植体的树龄较老,木质化程度高,内源激素也不同,加之生长于外界自然条件下,所以容易污染和褐化。根据外植体选取的污染少易启动原则^[7-8],综合以上的实验结果得出,幼年型的大叶桉实生苗的顶芽、茎段和叶片在大叶桉组织培养中都是很好的外植体,而成年型大叶桉的外植体材料易污染和褐变,组培不易成功,所以,在后期的组织培养过程中主要采用幼年型大叶桉的外植体作为实验材料。

表4 外植体类型对大叶桉组织培养的影响

外植体	接种数(块)	出愈数(块)	诱导率(%)	污染率(%)	褐变率(%)
顶芽(幼)	50	49	98.0	5	3
茎段(幼)	48	47	80.0	5	3
叶片(幼)	30	23	66.7	6	5
腋芽(成)	25	23	92.0	15	35
茎段(成)	40	38	71.4	9	38
叶片(成)	40	30	42.3	10	45

3 结论与讨论

外植体的消毒和选择对组织培养快速繁殖是非常重要的。不同的消毒方式、不同采样时期、不同外植体类型对大叶桉组织培养的影响不同。外植体取样时植株的年龄、发育阶段和生长季节不同,可导致外植体生理生化状态差异,从而影响组织培养的形态发生,如外植体大小、极性状况及其腋芽在母枝上所处的段位等对外植体的诱导、生长与发育都有影响。

(1) 外植体消毒时,消毒药剂浓度太低,时间太短,不利于污染的控制;消毒药剂浓度太高,时间太长,会破坏外植体的细胞,由于细胞对自身的保护,细胞就不断的产生大量次生物质,从而引起细胞毒害,产生褐化甚至死亡,导致外植体的存活率下降。在本实验中,采用 70% 酒精 30s,0.1% 升汞消毒 10~12 min 左右,基本上能达到较好的消毒效果。

(2) 外植体采集的季节不同,组织培养效果不同。我们分别于 3 月、5 月、8 月、11 月进行外植体采集,实验结果表明,大叶桉较适宜的采样季节是 3 月,萌芽率较高,达 95.8%,组织培养容易成功。

(3) 培养条件相同,不同类型的外植体愈伤组织诱导率不同。从实验结果看,幼年型材料的愈伤组织诱导率明显高于成年型材料;幼年型材料中,不同类型的外植体诱导率也不同,按愈伤组织诱导率大小排序依次为:顶芽>茎段>叶片,结果与杨乃博^[9-10]等人研究结论一致,这说明同一植株不同器官虽然携带着相同的全套基因,但其组织培养结果不一样,可能是与植物激素的分布有关,因植物体内内源激素分布不均,导致了基因表达不一致。

参考文献:

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第二十二卷) [M]. 北京:科学出版社,1999.

[2] 方元平,葛继稳,项俊,等. 国家二级重点保护植物桉树的开发利用[J]. 中国野生植物资源,2002,21(5):20-21.

[3] 方元平,葛继稳,袁道凌,等. 湖北省国家重点保护野生植物名录及特点[J]. 环境科学与技术,2000(2):14-17.

[4] 金晓玲. 桉树的生物学特性和微繁殖技术的研究[D]. 长沙:中南林业科技大学研究生处,2003.

[5] 陈振光. 园艺植物离体培养学[M]. 北京:中国农业出版社,1996.

[6] 孙三静,桂耀林. 植物细胞工程技术[M]. 北京:科学出版社,1995.

[7] 桂耀林,马诚. 植物组织培养[M]. 北京:科学出版社,1985.

[8] 翟应昌,等. 金合欢属的组织培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯,1984,(4):32.

[9] 韦三立. 花卉组织培养[M]. 北京:中国林业出版社,2000.

[10] 杨乃博. 几种木本植物的组织培养及器官发生[J]. 植物生理学通讯,1982(4):23-27.