

成年李树茎段周年培养消毒方法研究

邹英宁, 吴强盛 (长江大学园艺园林学院, 湖北 荆州 434025)

王静黎 (山东省烟台市城市园林工程监理有限公司, 山东 烟台 264000)

[摘要]对成年李(*Prunus salicina* Lindl)树茎段周年培养过程外植体的消毒效果进行了研究,结果表明:外植体在生长前期(4~5月)、生长后期(6~11月)及休眠期(12~3月)分别采用 70%酒精 30 s+(0.5%NaClO+吐温-20 2~3 滴)12 min、70%酒精 30 s+(1%NaClO+吐温-20 2~3 滴)15 min、70%酒精 30 s+(5%NaClO+吐温-20 2~3 滴)15 min 进行消毒,均能取得较好的效果。其中,生长前期带菌较少、成活率高、易诱导成苗,为最佳取材时期。

[关键词]成年李(*Prunus salicina* Lindl)树;组织培养;消毒

[中图分类号]Q813.1⁺2

[文献标识码]A

[文章编号]1673-1409(2007)04-S065-03

李(*Prunus salicina* Lindl)原产我国,是适应性很强的果树树种之一,在我国果树生产中占有重要地位。组织培养已成为快速繁殖优良苗木、短期内建立新的栽培种群以及脱去植物体内病毒的有效手段^[1]。多数外植体采用的是田间成年李树,污染现象比较严重,使研究受阻^[2]。外植体消毒是组织培养中的关键环节,本试验对升汞(HgCl_2)和次氯酸钠(NaClO)2种消毒剂在成年李树周年培养过程中外植体的消毒效果进行了研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料取自华中农业大学标本园 3 年生成年海湾红宝石李树(*Prunus salicina* Lindl. cv. Gulf-ruby)。

1.2 试验方法

(1)预处理 将田间取回材料的叶片剪掉,将有腋芽的茎段和茎尖放入稀释的肥皂水浸泡 10 min,然后流水冲洗 1 h,放置于超净工作台上。

(2)无菌操作 无菌条件下先用 70%酒精对外植体进行表面消毒 30 s,然后不同时期的三年生外植体采用不同浓度/时间的 NaClO 消毒:(1)生长前期(4~5月):0.5% NaClO 10 min、12 min、15 min;(2)生长后期(6~11月):0.5% NaClO 、1% NaClO 、2% NaClO 、3% NaClO 15 min;(3)休眠期(12~3月):3% NaClO 、5% NaClO 、8% NaClO 、10% NaClO 、0.1% HgCl_2 15 min。无菌水冲洗 4~5 次,接种于诱导培养基中,弱光下培养 5 d 后置光下培养。培养温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗,光照强度为 3 000 lx。5 d 后开始观察,30 d 后对试验结果进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时间对生长前期外植体培养的影响

4~5 月正值新梢抽生季节,此时进行茎段培养,只采用 0.5% NaClO 消毒就能达到很好的效果,污染率低,成活率高。表 1 结果表明:采用 0.5% NaClO 10、12、15 min 消毒,污染率分别为 20.0%、16.7%、15.0%;成活率分别为 61.7%、66.7%、61.7%,没有差异性。综合考虑,此时期采用 0.5% NaClO 消毒 12 min

[收稿日期]2007-11-15

[第一作者简介]邹英宁(1978-),女,山东烟台市人,农学硕士,助教,研究方向为果树栽培生理。

较适宜,污染率、褐化率均较低,分别为16.7%、26.7%,成活率较高,达66.7%。

2.2 不同浓度的NaClO对生长后期外植体培养的影响

6~11月外植体采用春梢或秋梢,各种真菌、细菌污染较轻,此时期采用0.5%~3.0%NaClO消毒15min就能达到试验要求。表2结果表明:3%NaClO消毒15min污染率最低,仅为13.3%,但褐变率最高,达41.7%;2%NaClO 15min污染率次之(15.2%),褐变率为36.7%;0.5%NaClO 15min污染率最高,达29.2%,褐变率为27.7%。结合成活率,此时期采用1%NaClO消毒15min,效果较好,成活率比0.5%NaClO、2%NaClO、3%NaClO分别提高6个百分点、8.6个百分点和10个百分点,与其他3种处理相比差异性显著。

2.3 不同消毒剂对休眠期外植体培养的影响

12~3月处于休眠期,尤其是3月,处于休眠后期、早春萌动期,藏在鳞片及叶柄处的真菌、细菌在适宜的温度下开始大量繁殖,在培养过程中,外植体污染现象严重(表3)。接种后3d污染现象就表现出来,5d后出现大量污染。此时期采用3%NaClO、5%NaClO、8%NaClO、

10%NaClO、0.1%HgCl₂处理各15min,结果表明,采用NaClO消毒污染率、褐变率均很高,成活率低,且三者之间差异性显著;10%NaClO污染率最低,为46.3%,褐变率高达68.3%,成活率仅为10.0%;3%NaClO、8%NaClO成活率仍很低,为15.0%左右;5%NaClO消毒成活率高于其他浓度,可达到21.7%。而采用HgCl₂消毒虽污染率低,仅为28.0%,但褐变率高,达56.0%,萌芽率低,成活率低,为18.0%,且生长缓慢,叶片畸变,玻璃化现象严重。

因此,此时期不适合田间取材接种。若此时期接种培养,采用5%NaClO消毒15min或将休眠枝条取回,放在室内培养,促进萌发,待抽出新梢后再进行常规消毒接种培养效果较好。

3 讨论

在成年李树组织培养中,外植体所带的外生菌和内生菌导致材料污染严重,是首先遇到的一个难题。通过成年李树周年试验,为防止材料污染,取材时期十分关键,过早取材带菌较多,不易杀死,成活率低;过晚取材芽多数处于休眠状态,较难诱导成苗^[3]。本试验认为在4~5月取材,此时外植体正处于萌发生长阶段,带菌较少,成活率高,易诱导成苗。6~11月取材,除个别月份污染率较高、成活率略有降低外,也能达到较为满意的培养效果。

需要注意的是,表面消毒剂对于植物组织也是有伤害的。因此,应当正确选择消毒剂的浓度和处理时

表1 生长前期不同消毒方法对外植体培养的影响

Table 1 The effect of different sterilizing methods on explant culture at the early stage

处理	接种数	污染率/%	褐变率/%	成活率/%
0.5%NaClO 10 min	60	20.0 a	25.0 b	61.7 a
0.5%NaClO 12 min	60	16.7 b	26.7 b	66.7 a
0.5%NaClO 15 min	60	15.0 b	30.0 a	61.7 a

注:部分外植体同时发生污染和褐变。同一列数字后的不同小写字母表示差异显著(LSD分析, $P < 0.05$)。下同。

表2 生长后期不同消毒方法对外植体培养的影响

Table 2 The effect of different sterilizing methods on explant culture at the late stage

处理	接种数	污染率/%	褐变率/%	成活率/%
0.5%NaClO 15 min	65	29.2 a	27.7 c	50.7 b
1%NaClO 15 min	60	20.0 b	28.3 c	56.7 a
2%NaClO 15 min	79	15.2 c	36.7 b	48.1 b
3%NaClO 15 min	60	13.3 c	41.7 a	46.7 b

表3 休眠期不同消毒方法对外植体培养的影响

Table 3 The effect of different sterilizing methods on explant culture during dormancy

处理	接种数	污染率/%	褐变率/%	成活率/%
3%NaClO 15 min	60	66.7 a	50.0 c	16.7 b
5%NaClO 15 min	60	55.0 b	53.3 bc	21.7 a
8%NaClO 15 min	60	48.3 c	58.7 b	15.0 b
10%NaClO 15 min	60	46.3 c	68.3 a	10.0 c
0.1%HgCl ₂ 15min	50	28.0 d	56.0 b	18.0 ab

间,以尽量减少组织的死亡,对于鳞片包裹的芽可用较高浓度的消毒剂进行较长时间处理叶片外植体,幼嫩的材料应该用较低浓度的消毒剂消毒,并掌握适当的消毒时间^[4]。加入表面活性剂如吐温-20能使消毒剂更好地与材料表面接触,促进消毒剂与材料地粘合,加快消毒进程,使消毒效果更好^[5]。植物组织培养的材料,通常都以 HgCl_2 或 NaClO 进行灭菌^[6,7]。前者灭菌效果好,但较难彻底清除残留的汞,导致外植体褐化严重,生长缓慢或停滞,抑制甚至会杀死丛芽,同时玻璃化现象严重,并出现叶片畸形(图 1A),可能是汞在体细胞内残留,影响细胞分化有关^[8]。后者较易清除残留物,对材料的杀伤力也远远小于前者,但灭菌效果不如前者。本研究选择了伤害低的 NaClO ,取得了较好效果(图 1B)。

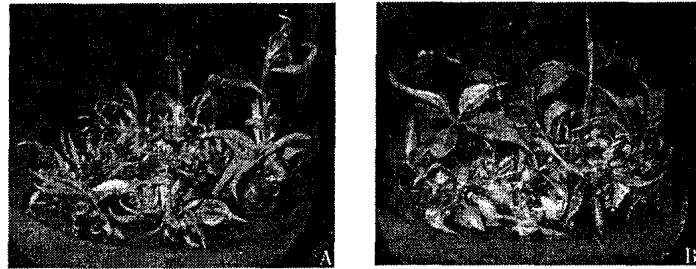


图 1 0.1% HgCl_2 (A) 和 1% NaClO (B) 消毒 15 min 后的茎段生长状况
Figure 1 Growth status of stem segment sterilized by 1% NaClO (B) and 0.1% HgCl_2 (A) for 15 min^{*}

[参考文献]

- [1] 王国平, 洪 宽. 果树的脱毒与组织培养[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 1~100.
- [2] 王子成, 李忠爱, 邓秀新. 柑橘成年态茎段外植体消毒方法研究[J]. 河南大学学报, 2005, 35(2): 58~60.
- [3] 江虎军, 潘季淑, 孟新法. 桃(*Prunus persica* L.) 茎尖培养技术的研究[J]. 北京农业大学学报, 1993, 19(1): 49~52.
- [4] 朱至清. 植物细胞工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003. 1~215.
- [5] 任敬民, 陈跃进, 郭丽明. 台湾青枣组织培养地消毒方法[J]. 湖北农业科技, 2004, (1): 65~68.
- [6] Huang R F, Zhu M J, Kang Y, et al. Identification of plasma membrane aquaporin in guard cells of *Vicia faba* and its role in stomatal movement[J]. Acta Bot Sin, 2002, 44: 42~48.
- [7] Fouad M M, Gomaa A H, Abd El Zaher M H. Factors influencing *in vitro* establishment and multiplication stages of peach[J]. Acta Hort, 1995, 409: 191~196.
- [8] 王爱勤, 何龙飞, 裴润梅, 等. 组培条件对不同品种芦荟试管苗玻璃化的影响[J]. 中国农学通报, 2002, 18(5): 46~52.