

文章编号:1001-7380(2007)06-0007-05

楸树的初代培养研究

王改萍, 杨 燕, 祁丽丽, 彭方仁

(南京林业大学森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

摘要:以楸树的4个品种(类型)(圆基长果楸、豫楸1号、豫楸2号和梓树)为材料进行组织培养研究,试验结果表明:(1)通过豫楸1号和圆基长果楸在MS、1/2MS、 N_6 、WPM、 B_5 5种基本培养基上的诱导率和启动时间确定了该实验的最佳培养基为 N_6 ,其诱导率达80%,接种后2 d即启动。(2)外植体的消毒方式采用75%的酒精和0.1% $HgCl_2$ 双步消毒,4个品种(类型)中豫楸2号的成活率最高,污染率最小。而不同品种(类型)最适消毒时间分别为:圆基长果楸5 min、豫楸1号8 min、豫楸2号7 min、梓树9.5 min。(3)大田栽培的圆基长果楸的污染率是温室栽培下的4~6倍,而成活率仅为温室栽培下的1/4,温室栽培的材料更适于进行组织培养。(4)豫楸1号在30 d内的污染率动态变化表明,外植体在接种7 d后出现污染,而主要污染发生在接种后的第14 d和第21 d。

关键词:楸树;组织培养;培养基;消毒时间

中图分类号:S687;Q943.1 **文献标识码:**A

Study on primary in vitro culture of *Catalpa bungei* C. A. Mey

WANG Gai-ping, YANG Yan, QI Li-li, PENG Fang-ren

(College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210013, China)

Abstract: A study of the tissue culture on 4 varieties of *Catalpa* (including Yuanjichangguoqiu, Yuqiu-1, Yuqiu-2, and *Catalpa ovata*) showed that the best medium for tissue culture was N_6 (N_6 + 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.01 mg/L + sucrose 30 g/L + agar 7 g/L) among 5 basic media of MS, 1/2MS, N_6 , WPM and B_5 , based on the inductive rate and the initial time of inductivity of Yuqiu-1 and Yuanjichangguoqiu, which was 80% and two days after incubation respectively. By method of sterilization of 75% ethanol and subsequent 0.1% $HgCl_2$ to the explants, the contamination rate of Yuqiu-2 was the lowest in the 4 varieties of *Catalpa*, and the most suitable times of sterilization in 4 varieties were 8 min for Yuqiu-1, 7 min for Yuqiu-2, 5 min for Yuanjichangguoqiu, 9.5 min for *Catalpa ovata* respectively. It was also found that the contamination rate of the explants of Yuanjichangguoqiu from the field condition was 4~6 times, and the survival rate was only one fourth, compared with that from the greenhouse respectively, indicating that the explants from the greenhouse were better for in vitro culture than those from the field condition. The dynamic contamination of 30 days for Yuqiu-1 explants illustrated that the explants began to be contaminated in the first week after incubation, and got more serious in the second week and the third week.

Key words: *Catalpa bungei* C. A. Mey; Tissue culture; Culture medium; Sterilization time

楸树(*Catalpa bungei* C. A. Mey)是紫葳科梓树属的落叶乔木,树干通直,生长迅速,特别是前期生长较快,材质特别优良,被誉为“木王”。其产于黄

河至长江流域各地,生于海拔1 500 m以下山坡林中,在我国分布甚广,具有很大的发展潜力。但长期以来,人们对它采伐利用过多,栽培发展相对较少,

收稿日期:2007-08-14;修回日期:2007-09-26

基金项目:国家科技部“十一五”科技支撑项目“优良抗逆生态和珍贵用材树种新品种选育”(2006BAD01A16);江苏省高技术研究项目“楸树优良无性系及苗木标准化生产技术研究”(BG2006319)

作者简介:王改萍(1970-),女,山西榆社人,讲师,博士研究生,研究方向:经济林木的营养生理研究。

致使自然分布面积及数量不断减少^[1-2]。由于楸树自花不育或自花结实率低,种子发芽率低,且扦插生根困难,苗木发展相对困难,造成目前市场上楸树木材奇缺,绿化苗木供不应求,造林用苗几乎没有来源,同时价格又居高不下,因而利用组织培养技术进行快繁为国内市场提供种苗尤为重要。

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物材料为2006年夏季在南京林业大学树木园扦插池进行嫩枝扦插繁殖的苗木,同年秋有部分移到营养钵中在大棚内继续培育。试验材料包括圆基长果楸、豫楸1号、豫楸2号和梓树4个品种(类型)。

1.2 试验方法

1.2.1 取材及消毒 选择长势良好植株,采集刚抽梢的嫩枝,去叶留叶柄,外植体材料为距顶芽5 cm以内幼嫩部分,在实验室将其剪成长2~3 cm的小茎段,放入罐头瓶中,加入少量洗涤剂,瓶口用一层纱布封好,置于流水下冲洗2~3 h。之后在超净工作台上消毒,先用75%酒精消毒30 s,立即用无菌水冲洗3次,再用0.1% HgCl₂进行消毒,各楸树品种(类型)消毒时间根据相关文献^[3-4]及预试验情况采用单因素设置(见表1),经HgCl₂消毒后立即用无菌水冲洗4次。每个处理接种20瓶,30 d后统计污染率和枯死率。

表1 楸树不同品种(类型)消毒时间单因素设计

品种/类型	消毒时间/min		
圆基长果楸	4.0	5.0	6.0
豫楸2号	5.0	7.0	9.0
豫楸1号	6.0	8.0	10.0
梓树	8.0	9.5	10.5

同时观察豫楸1号(HgCl₂消毒8 min)在接种30 d内的污染情况,每5 d统计1次。观察分别来自温室和大田的圆基长果楸材料经过相同消毒处理后两者的污染差异。

1.2.2 培养基及培养条件 基本培养基为MS、1/2MS、N₆、WPM、B₅,附加6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.01 mg/L + 蔗糖30 g/L + 琼脂7 g/L。选用圆基长果楸和豫楸1号的双因素对比试验,进行培养基的筛选。培养基均在121℃下灭菌15 min。

培养温度为25~28℃,光强为2 000 lx,光照时间12 h/d。

2 结果与分析

2.1 不同培养基选优

将豫楸1号和圆基长果楸2个品种的小茎段分别在MS、1/2MS、N₆、WPM、B₅5种培养基上进行诱导,统计其诱导率及启动时间。试验结果表明,在5种培养基上均可诱导出芽,但是诱导率显著不同(见图1)。从图1中可清晰的看出,2树种均表现为在N₆培养基上其芽的诱导率最高,豫楸1号达到80%以上,圆基长果楸也达到76%。其次是WPM的诱导率较高,豫楸1号和圆基长果楸都在75%左右。而诱导最差的是MS培养基,其诱导率约为30%左右。对5种培养基的诱导率比较分析可知,诱导率由高到低为:N₆ > WPM > B₅ > 1/2MS > MS。

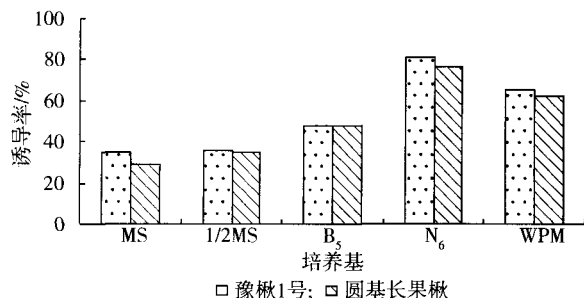


图1 不同培养基对芽诱导率的影响

同时对5种培养基的芽诱导启动时间的分析表明,两者在N₆培养基上的启动时间最短,均在接种2 d后就开始启动(见表2)。从表2中也可得出,在不同培养基上启动时间一般集中在5~10 d,一般接种后14 d内都能在培养基的诱导下启动。

表2 不同品种(类型)在不同培养基中启动时间

品种(类型)	不同培养基启动时间/h				
	MS	1/2MS	B ₅	N ₆	WPM
豫楸1号	6~12	6~12	5~12	2~10	4~10
圆基长果楸	6~12	5~12	5~12	2~10	3~11

综合高诱导率和较快的启动2因素,可得出N₆为本次基本培养基筛选的最优选择,即本试验的最适合的基本培养基配方为:N₆ + 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.01 mg/L + 蔗糖30 g/L + 琼脂7 g/L。

方差分析结果也表明,豫楸1号不同培养基间

($F=61.84, P<0.0001$)的诱导率差异达极显著,圆基长果楸不同培养基间($F=76.86, P<0.0001$)诱导率差异也达极显著。

2.2 不同消毒时间对各品种(类型)接种效果的影响

2.2.1 不同消毒时间对圆基长果楸接种效果的影响

随着消毒时间的延长,圆基长果楸的污染率降低,但其总体污染率较高,在消毒4 min时,污染率为80%,在消毒6 min时污染率也在60%(见图2)。对其枯死率统计发现,其随消毒时间延长略升高,直接导致圆基长果楸外植体成活率较低,约为20%,最高成活率消毒时间为5 min,成活率达到26.67%。

2.2.2 不同消毒时间对豫楸2号接种效果的影响

不同消毒时间对豫楸2号外植体的污染率有显著影响(见图3)。随消毒时间延长,污染率呈直线下降。在消毒5 min时,污染率为37%,而消毒9 min时污染率仅为3.7%,说明绝大多数病原菌已被杀死。对其枯死率的分析可得出,随消毒时间的延长枯死率明显上升,尤其是在消毒9 min时,枯死率急剧增加,达到63%,而消毒5 min时,枯死率为16%。之后对不同消毒处理下的成活率统计表明,在消毒7 min时成活率高达70%左右,远高于另外2个处理。因此最佳处理时间是7 min。

2.2.3 不同消毒时间对豫楸1号接种效果的影响

对豫楸1号外植体采用不同的消毒处理,试验结果表明消毒时间越长,其污染率显著下降(见图4)。在消毒6 min时污染率为68%,8 min时比前述下降近10%,到10 min时污染率下降20%。其枯死率亦随消毒时间的延长增加,由6 min到8 min处理变化不大,但由8 min到10 min变化显著,枯死率上升了22%。在各消毒处理下的成活率表现与枯死率呈负相关,在6 min和8 min 2处理下,成活率较高,约30%,但消毒时间达到10 min时成活率仅0.23%。反映其消毒时间太长,即使污染率得到控制,但其成活率仍会降低。综合分析,可得出其最佳处理时间是8 min。

2.2.4 不同消毒时间对梓树的影响

不同的消毒时间处理对梓树外植体的污染率影响较大(见图5)。污染率随消毒时间的延长而下降显著,由最高值50%下降到14%左右,其枯死率仍随消毒时间的延长而增加,在消毒8 min时枯死率为0,而到10.5 min时,枯死率达到21%。反观其成活率在各

个处理都较高,最低为处理8 min时的50%,最高为在9.5 min时68.4%。综合考虑其污染率、枯死率和成活率情况,认为梓树最佳消毒时间是9.5 min。

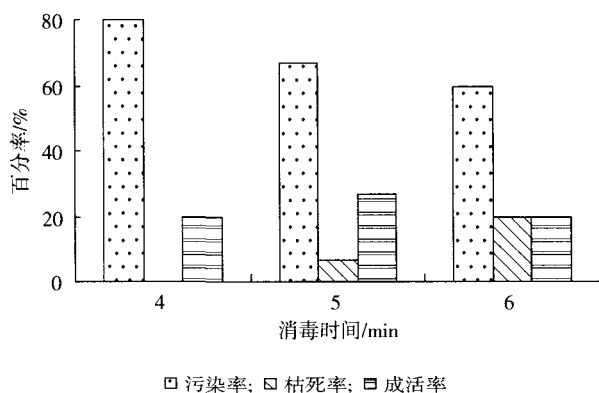


图2 不同消毒时间对圆基长果楸接种效果的影响

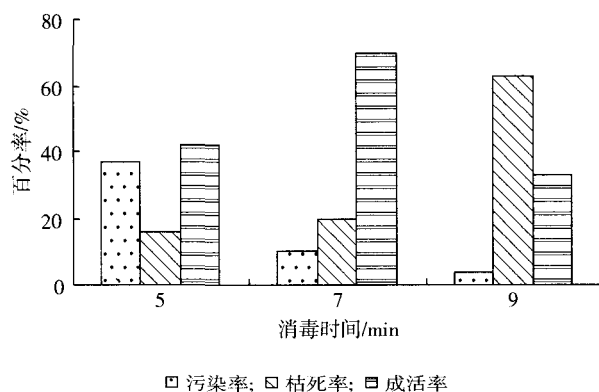


图3 不同消毒时间对豫楸2号接种效果的影响

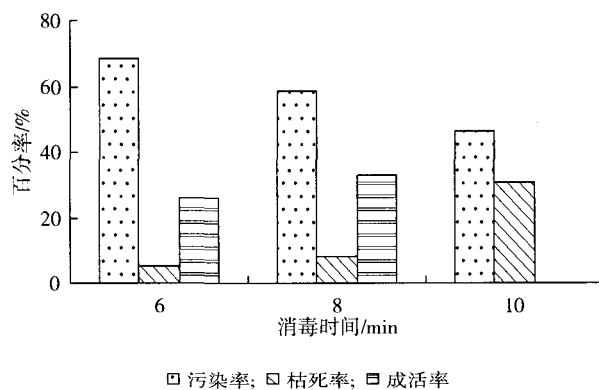


图4 不同消毒时间对豫楸1号接种效果的影响

2.3 不同栽培植株上取材对污染率的影响

取材于大田栽培与温室栽培下的圆基长果楸植株在相同的处理条件下其污染率差异显著(见图

6)。在大田栽培下,污染率最大达到 80%,最小也在 60%左右,而温室栽培下污染率最大值 26%,最小值 10%。在不同消毒处理下两者的枯死率变化不大,在消毒 4 min 处理下枯死率为 0,在消毒 6 min 时达到最大值 20%。但 2 者的成活率变化较大,大田栽培下成活率均在 20%左右,而温室栽培时成活率均大于 70%,最大值为 86%,即在相同处理下,温室栽培下的圆基长果楸的成活率是大田栽培的 4 倍。

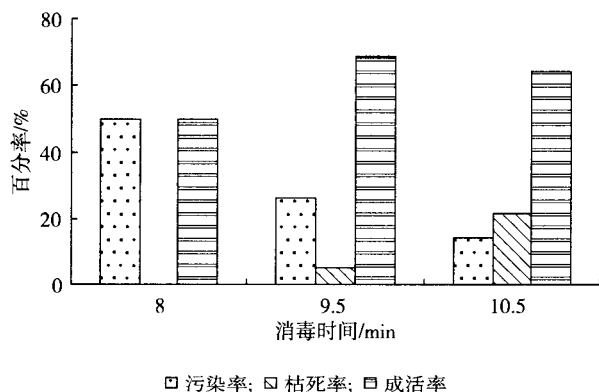


图 5 不同消毒时间对梓树接种效果的影响

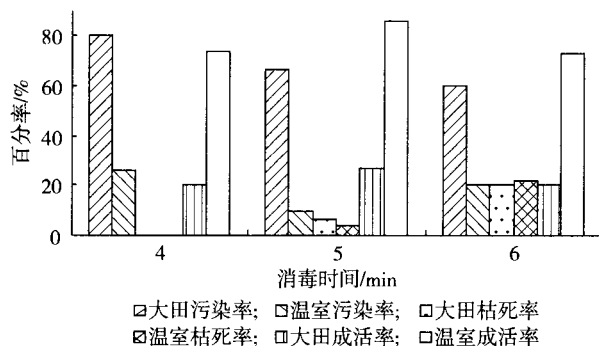


图 6 在不同栽培植株上取材对污染率的影响

2.4 污染率的动态变化

对豫楸 1 号在 30 d 内的污染率研究表明,随着时间的推移,污染率呈现不同的变化趋势(见图 7)。在接种 5 d 内没发现污染,即污染率为 0。接种 7 d 后出现污染现象,在第 10 d 其污染率为 4%。然后污染率大幅上升,在第 15 d 时污染率为 46%,到 20 d 时污染率达到最大值 58%。从 20 d 以后到实验结束,其污染率处于相对稳定状态,保持在 58%左右。从结果中也可看出,楸树组织培养的污染主要发生于材料接种后的第 14 d 和第 21 d。

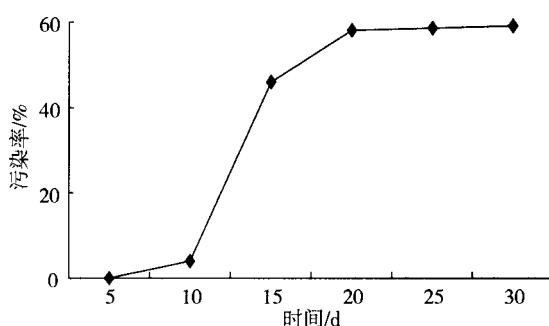


图 7 豫楸 1 号污染变化

3 结论与讨论

3.1 培养基确定

培养基提供了植物生长发育所需的营养元素,培养基是否适宜是决定组织培养成败的关键。在离体培养条件下,由于各种植物的遗传特性、生物学特性和生态学特性不一致,它们对营养的要求也不相同,因此选择适宜的培养基对植物组织培养至关重要^[5]。通过对豫楸 1 号和圆基长果楸在 MS、1/2MS、N₆、WPM、B₅ 5 种培养基下的诱导试验,得出 5 种培养基的诱导率由高到低为: N₆ > WPM > B₅ > 1/2MS > MS。外植体接种后最快在 2 d 后开始启动,而不同楸树品种的启动时间集中在 5 ~ 10 d,一般接种后 14 d 内都能在培养基的诱导下启动。根据其最终的芽诱导率高低和诱导时启动快慢,筛选出了最适于楸树组织培养的基本培养基为 N₆,确定了本试验的最适培养基配方为 N₆ + 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.01 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 7 g/L。

3.2 不同消毒时间对楸树各品种的影响

植物组织培养中,外植体的消毒是最基础同时也是非常重要的一环,其处理效果直接影响试验的结果和进程^[6]。而影响消毒效果的因素除树种本身特性外,还与其木质化程度有关。试验所选材料的繁殖方式及苗龄完全相同,同时作为外植体材料部分的茎段木质化程度也基本近似,从而消除了木质化程度对消毒效果的影响。本试验楸树 4 个品种(类型)的研究结果表明,随着消毒时间的延长,污染率显著降低,而其枯死率逐渐升高。4 个品种的污染率由高到低的顺序为:圆基长果楸 > 豫楸 1 号 > 梓树 > 豫楸 2 号。由于不同品种的枯死率变化不同,其成活率变化不同,4 品种成活率由大到小为豫楸 2 号 > 梓树 > 圆基长果楸 > 豫楸 1 号,因此得出本试验中豫楸 2 号表现最好。对消毒处理的不同反

应与消毒处理时间选择有关,圆基长果楸污染率很高(最高达80%),是否与其消毒时间短有关,还有待进一步研究。但在试验中也发现消毒时间若太长,对外植体的成活率也产生显著的负反应,如梓树在10.5 min消毒时,虽然其污染率明显降低,但枯死率显著提高,导致其成活率很低。结合在不同消毒时间的污染率和成活率情况,各树种相对最好的处理是圆基长果楸消毒5 min、豫楸2号消毒7 min、豫楸1号消毒8 min和梓树消毒9.5 min,此时它们的污染率相对较低,且成活率较高。

3.3 在不同栽培植株上取材对污染率的影响

目前,按植物生长环境的不同,可将植物的栽培模式分为大田栽培和温室栽培。本试验研究了不同栽培模式下圆基长果楸在相同处理下,其成活率、污染率和枯死率的变化。试验结果表明:大田栽培的材料其污染率是温室栽培的4~6倍,而成活率仅为温室的25%左右,因此可得出温室栽培材料更适于进行组培试验。这主要是因为大田栽培植物受外界环境的影响大,其带菌情况相对严重,更易出现污染。而温室栽培下的植物受外界杂菌的侵袭机会少,污染率低。相关文献报道,良好的植物生长环境对组织培养的成败起着至关重要的作用^[7]。因此在条件允许的情况下,应尽量取室内苗进行试验,可

以大大提高成活率,节约成本。

3.4 污染率的动态变化

对豫楸1号在30 d内的污染率动态变化表明,经2步骤消毒后,外植体在接种7 d后发生污染,而第14 d和第21 d是发生污染的最主要阶段,之后污染率保持稳定水平,不再升高。胡凯等^[6]认为组织培养周期一般在30 d左右,因此在前2~3 d污染发生的概率比此后的概率低得多,一般在培养较长时间后才观察到菌落的出现。

参考文献:

- [1] 张 锦.“材”貌绝伦的楸树[J]. 森林与人类,2003(3): 34-35.
- [2] 杨玉珍,王顺财,彭方仁. 我国楸树研究现状及开发利用策略[J]. 林业科技开发,2006,20(3):4-7.
- [3] 韩创举,杨培华,樊军锋,等. 楸树组培技术研究[J]. 西北林学院学报,2006,21(1):80-81.
- [4] 翟晓巧,范国强,贺窑青,等. 金丝楸茎段组织培养及植株再生技术研究[J]. 河南农业大学学报,2002,36(4):319-321.
- [5] 赵贤慧,刘庆华,张德锋. 红金银花组织培养外植体灭菌的研究[J]. 江苏林业科技,2007,34(1):23-25.
- [6] 胡 凯,张立军,白雪梅,等. 植物组织培养污染原因分析及外植体的消毒[J]. 安徽农业科学,2007,35(3):680-681.
- [7] 许红梅. 植物组织培养中的污染及防止措施[J]. 北方园艺,2006(6):148-149.

· 征订启事 ·

欢迎订阅 2008 年《江苏林业科技》

《江苏林业科技》为国内外公开发行的综合性林业科学技术刊物。1974年创刊。为全国中文核心期刊、《中国学术期刊(光盘版)》入编期刊、全国优秀期刊、江苏省优秀期刊、全国优秀农业期刊。2001年加入“万方数据——数字化期刊群”。在中国期刊网等网站上运行。

《江苏林业科技》主要刊登良种选育、育苗造林、园林绿化、林副特产、森林经营、森林保护、调查设计、林业机械、野生动物等方面的学术论文、科研报告、经验总结,以及林业新成果、新技术,有较强的指导性、技术性、实用性,是林业科研、教学工作者、管理部门及广大林业战线职工不可少的参考资料。欢迎订阅,欢迎投稿,欢迎刊登广告,宣传产品等。

《江苏林业科技》为双月刊,大16开本,国内外公开发行。国内统一刊号:CN 32-1236/S,国际标准刊号:ISSN 1001-7380,每期定价6.00元,全年订费36.00元。全年办理订阅手续,需订阅者请到当地邮局订阅或将订款汇至南京市江宁区东善桥江苏省林业科学研究院本刊编辑部,邮政编码211153。电话(025)52745438,52744011。由银行或邮局汇寄均可。开户银行:南京市农业银行金鹰支行,户名:江苏省林业科学研究院,帐号:033151051040000010。邮发代号:28-303。