

楸树组培中材料灭菌的研究

费鹏飞 傅玉兰*

(安徽农业大学林学与园林学院, 安徽合肥 230036)

摘要:以楸树茎段为材料,研究了不同灭菌方法对离体组织培养的影响,结果表明采用 1.25g/l 多菌灵浸泡 30min + 酒精棉球擦拭外植体 + (400mg/l 青霉素 + 200mg/l 链霉素) 浸泡 20min + 0.1% 升汞 8min 灭菌效果最好。

关键词:楸树;茎段;灭菌方法;成功率

中图分类号 Q944.6

文献标识码 B

文章编号 1007-7731(2007)08-57-02

楸树(*Catalpa bungei*)属紫葳科梓树属的落叶乔木,原产我国,已有 2000 多年的栽培历史,是我国传统栽培的珍贵优质用材树种和著名园林观赏树种,自古就有“木王”之称。其木材具有质地坚韧致密,不易虫蛀、耐磨、耐腐、防潮等特性,因而被广泛应用于建筑、家具、工艺等行业。楸树树体高大挺拔,树冠浓密,枝、叶和花都具有很高的观赏价值,而且楸树具有滞尘、吸收有害气体等多方面功能,因而它在绿化美化城市的同时,可以明显改善市区的生态环境^[1]。但是,由于楸树自花不孕,往往开花不结实,种子发芽率低,扦插生根困难,再加上楸树因材质优良而加剧了人们对它的开发利用,致使一名贵资源正在面临枯竭的危险^[2]。常规的繁殖方法已经不能满足生产对楸树的需要,利用快繁手段可以克服常规繁殖的不足,大大缩短繁殖周期,可在较短时间内获得大量优质的小苗^[3]。本试验旨在解决楸树初代培养中的污染问题,为其后的继代增殖打下良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料 以安徽农科院蚕桑所苗圃内发育良好的楸树优株茎段为试验材料。

1.2 方法 选取长势良好的楸树植株的 1 年生嫩枝,去除叶片,留叶柄,切成 1.5cm 长带有 3 个芽的茎段作为外植体。首先用牙刷轻轻刷去外植体表面的灰尘,再将外植体用洗衣粉饱和上清液浸泡 30min,并用毛笔刷洗材料表面,然后用自来水冲洗半小时后在超净台上将外植体材料经过 9 种不同的灭菌方式处理,每个处理接种 20 瓶。灭菌方式的具体程序如表 1 所示。最后将茎段接种于培养基(MS + 6-BA4.0mg/l + IBA0.2mg/l),置于相同的培养条件下[(25±2)℃、光照 12h/d、光强 1500-2000Lx]。每 2d 调查记录 1 次材料污染情况,经过 14d 培养后统计接种材料的灭菌效果,运用 SPSS 软件进行分析,从而筛选出最佳的灭菌措施。

1.3 试验结果统计方法

污染率 = (污染外植体数/接种外植体数) × 100%;

褐变率 = (褐变外植体数/接种外植体数) × 100%;

成功率 = (萌芽不污染外植体数/接种外植体数) ×

100%。

2 结果与分析

对 9 个灭菌处理进行卡方检验,由表 3 知, Sig = .000 < 0.01, 表明各处理间差异极显著。

表 1 楸树茎段灭菌程序

处理序号	灭菌措施
1	70% 酒精浸 15S + 0.1% 升汞浸 5min
2	70% 酒精浸 10S + 0.1% 升汞浸 5min
3	70% 酒精浸 10S + 0.2% 升汞浸 5min
4	70% 酒精浸 10S + 0.1% 升汞浸 2min30S
5	0.01% NaClO 浸 6min + 0.1% 升汞浸 5min
6	70% 酒精浸 5S + 200mg/l 头孢浸 20min + 0.1% 升汞浸 4min 1.25g/l 多菌灵浸 30min + 酒精棉球擦拭外植体 +
7	(400mg/青霉素 1 + 200mg/l 链霉素) 浸 20min + 0.1% 升汞浸 8min
8	1.25g/l 多菌灵浸 30min + 酒精棉球擦拭外植体 + 200mg/l 头孢浸 20min + 0.1% 升汞浸 8min
9	酒精棉球擦拭外植体 + 200mg/l 头孢浸 20min + 0.1% 升汞浸 8min

2.1 不同灭菌措施对外植体灭菌效果的影响 由表 2 可以看出,对外植体采用常规灭菌措施时,处理 1 没有出现污染,但是材料全部褐化,没有外植体萌发。处理 5 的褐化率最低,但是材料大部分污染。这 2 个处理均没有获得无污染成活的外植体。处理 4 和处理 6 灭菌后的材料也大部分污染或者褐化,最后只有 10% 外植体能成活。

表 2 不同灭菌措施对外植体灭菌效果的影响

处理序号	污染数 (个)	褐化数 (个)	萌发数 (个)	污染率 (%)	褐化率 (%)	成功率 (%)
1	0	20	0	0	100	0
2	6	14	0	30	70	0
3	4	15	1	20	75	5
4	10	8	2	50	40	10
5	19	1	0	95	5	0
6	8	10	2	40	50	10
7	7	1	11	35	5	55
8	6	2	8	30	10	40
9	5	1	7	25	10	35

2.2 综合灭菌措施对外植体灭菌效果的影响 由表 2 可看出,处理 7、8、9 的成功率均显著高于 1-6 组常规灭菌

措施。处理 7 的污染率较高为 35%，而且褐化率低为 5%，所得到的萌发材料也是最多的，成功率达到 55%。处理 8 的污染率虽然高于处理 9，但是它的成功率仍高于后者，达到 40%。

表 3 9 组间卡方检验

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	47.777 (a)	8	.000
Likelihood Ratio	51.090	8	.000
Linear-by-Linear Association	30.134	1	.000
N of Valid Cases	180		

表 4 卡方检验

编号	1-7	2-7	3-7	4-7	5-7	6-7	8-7	9-7
Asymp. Sig.	.000	.000	.002	.007	.000	.007	.527	.340

2.3 各处理间的卡方检验 选取表 2 中成功率最高的第 7 组为基准，分别进行卡方检验。因其样本量 < 45 ，卡方需进行校正，选用连续性卡方检验值 (Continuity Correction)，P 值也需校正为： $p/df = 0.05/8$ 。由表 4 可以得出，1-6 组常规灭菌措施处理与处理 7 对比 Sig 值均小于 0.01，差异均极显著。这表明处理 7 采用的灭菌方法明显优于常规灭菌措施。处理 8、9 与处理 7 比较，Sig 值均大于 0.05，这表明在使用抗生素的灭菌过程中，各处理间的差异不显著。

3 结论与讨论

根据上述研究结果，可以得知，在楸树茎段的灭菌过程中，以 1.25g/l 多菌灵浸 30min + 酒精棉球擦拭外植体 + (400mg/l 青霉素 + 200mg/l 链霉素) 浸 20min + 0.1% 升汞浸 8min 的处理最佳，成功率可以达到 55%。

在本试验中，常规的升汞加酒精的灭菌方式无法获得

满意的灭菌结果，外植体不是污染就是褐化，存活下来的外植体也由于被灭菌剂杀伤而没有萌发，无法为下一步试验的展开提供材料。

在灭菌过程中减少酒精的灭菌时间并且使用抗生素后，灭菌效果有了很大的提高，处理 7 的灭菌方式可以使超过一半以上的外植体萌发。这表明在楸树茎段的灭菌过程中，抗生素的使用可以有效的抑制菌类的滋生并且对外植体的伤害较小。但是通过统计分析发现，使用不同的抗生素对成功率的影响没有显著性差异，这需要在以后的试验中，进一步对抗生素的种类和使用时间进行试验，从而筛选出最佳的抗生素种类和灭菌时间。

对于从田间直接采取的外植体，特别是对成年态木本植物茎段来说，由于携带大量的微生物，在进行组织培养时，如何成功的对其灭菌，是进行后续研究的前提^[4]。同时由于茎段比较幼嫩，在灭菌过程中极易被灭菌剂损伤，造成外植体无法萌发。为了保证成功地进行培养，在筛选最佳灭菌措施时，不仅要考虑无污染率，更应考虑灭菌后材料的萌发率^[5]。

参考文献

- [1] 乔勇进, 夏阳. 试论楸树的生物生态学特性及发展前景[J]. 防护林科技, 2003, 57(4): 23-24
- [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] 谭文澄. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991
- [4] 李群. 植物组织培养中控制污染技术研究[J]. 四川林业科技, 1999, 20(4): 22-26
- [5] 王子成, 李忠爱, 邓秀新. 柑橘成年态茎段外植体灭菌方法研究[J]. 河南大学学报(自然科学版), 2005, 35(2): 57-60

(上接 139 页) 多次采摘茶叶, 降低害虫口密度; 改变不采秋茶老观念, 采制秋茶, 减少害虫食源, 增加茶叶产量。科学进行茶树整枝修剪, 注意剪除蛀梗虫枝、枯枝、病枝, 及时清理出园, 防止病虫蔓延。二是人工捕杀与机械透杀。冬季摘除茶毛虫越冬卵块和蓑蛾越冬虫袋及各种病叶。茶季采取科学采摘茶叶措施, 虫口夺茶。在虫害发生时及时组织人工捕杀幼虫、扑杀成虫, 刮除虫卵等措施防治虫害。推广应用杀虫灯透杀。近年来太湖县在重点茶场安装“佳多”频振式杀虫灯, 对茶毛虫、茶尺蠖、刺蛾类成虫透杀效果较好, 有效降低了害虫密度。三是引进示范生物防治技术。以益虫治害虫, 如绒茧蜂防治茶尺蠖和茶细蛾, 黑卵蜂防治茶毛虫, 瓢虫防治茶蚜等; 以有益微生物防治害虫, 示范推广应用白僵菌、苏云金杆菌、核型多角体病毒制剂防治害虫。使用生物源农药防治害虫, 以苦参素、鱼藤酮和“Bt”, 防治咀嚼式害虫及刺吸式害虫效果较好。

2.2.3 限制使用化学防治 对虫害大发生年或其他措施

防治不力、顽固性害虫造成严重危害时, 采取适当的化学农药防治。按照科学合理、安全高效的施药原则, 提高使用农药技术和效率, 尽可能减少化学防治次数和用药量。禁用高毒、剧毒、高残留农药和农业部明令禁止的农药, 严禁使用甲胺磷等 5 种剧毒农药。每年 11 月上旬普遍喷石硫合剂封园, 茶园周围树木涂白, 能有效降低翌年病虫害发生。化学农药选用对天敌安全、分解快、残留低的 35% 赛丹乳油, 防治茶尺蠖、茶毛虫、刺蛾类和绿小叶蝉效果较好, 年使用不超过 2 次, 与敌百虫农药混用, 减少害虫抗药性。采用化学农药防治要特别注意配药浓度和保证采摘安全间隔期。

2.2.4 加强监管, 确保茶叶卫生质量安全 茶区要制定禁止使用化学农药村规民约, 加大化学农药防治监管力度。加大宣传, 提高茶农遵守无公害农产品、绿色食品卫生质量安全标准意识。同时有关部门及执法单位, 加大对环境、市场监管执法力度, 实施源头全程监控, 确保茶叶卫生质量安全。(顾燕枝)