

水曲柳的组织培养

辛丽红¹, 郑玉石²

(1. 吉林农业科技学院 植物科学系, 吉林 吉林 132101; 2. 吉林省抚余县三岔河镇农业推广站, 吉林 抚余 131200)

摘要:以水曲柳休眠冬芽及萌动后新芽和带芽茎段为材料, 进行组织培养。冬芽消毒以用 0.1% 升汞去芽鳞前后各 5min、3min 为好, 以 SH、WPM 附加不同激素可诱导冬芽的萌动。对于新芽, 以 SH 为基本培养基, 附以 BA、NAA 及谷氨酸, 可诱导愈伤组织及芽枝的生成。WPM 效果不如 SH。

关键词:水曲柳; 组织培养; 愈伤组织; 萌动

中图分类号:S72 **文献标识码:**A

水曲柳 (*Fraxinus mandshurica*) 形体端正, 树干通直, 枝叶繁茂而鲜绿, 耐湿、耐盐碱, 抗性强, 且材质坚硬, 富有弹性, 花纹秀美, 是较好的城市绿化树种及经济价值较高的优良用材树种。但因其为雌雄异株, 结实率低, 种子不易采集, 传统的采集方法常常导致树体的破坏, 且种子有长期休眠的习性, 需经变温层及贮藏处理 270d 以上才能打破休眠。经过处理的种子发芽率也不高, 一般小于 60%, 而且扦插繁殖也很难, 插穗生根率低, 一般不超过 60%。因此组培育苗, 以达快速繁殖为当务之急。

水曲柳及其同属树种的组培国内未见报道。国外只是对白蜡树属中美国白蜡树 (*F. americana*)、欧洲白蜡树 (*F. excelsior*)、洋白蜡树 (*F. pennsylvanica*) 等进行了研究, 但对水曲柳的组培, 国内外尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验取材于吉林农业科技学院南校区月亮湖游园内的水曲柳, 2005 年 3 月、5 月、6 月分别采其冬芽及新生芽, 并对芽的结构进行了观察: 芽的最外层包裹着 2 片黑色大芽鳞, 向内为 2 片小芽鳞, 芽鳞内长满褐色毛, 其内隐藏着生长点。

1.2 初代培养基

以 MS、SH、WPM 为基本培养基, 附加不同激

素, 蔗糖浓度 3%, 琼脂浓度 0.6%, pH 值 5.8~6.0, 并经 120℃、0.15MPa 高温高压处理 20min。各种培养基组成如下(单位 mg/L):

- (1) MS + BA0.2 + NAA0.02
- (2) MS + BA1 + NAA0.1
- (3) SH + BA0.2 + NAA0.02
- (4) SH + BA1 + NAA0.1
- (5) WPM + BA0.2 + NAA0.02
- (6) WPM + BA1 + NAA0.1
- (7) SH + Glu5 + BA1 + NAA0.1
- (8) SH + Glu5 + NAA1
- (9) SH + BA2 + NAA0.2
- (10) WPM + Glu5 + BA1 + NAA0.1
- (11) WPM + Glu5 + NAA1
- (12) WPM + BA2 + NAA0.2
- (13) WPM + Glu5 + BA2 + NAA0.2

注: Glu 为谷氨酸。

1.3 外植体

3 月 15 日、3 月 22 日、6 月 14 日、6 月 20 日采用带一小部分木质部的顶芽或腋芽。5 月 25 日采用带芽的茎段。

1.4 培养条件

每日光照 12h、光强 1 200~1 500Lx, 温度 18~28℃。

2 结果与分析

2.1 成活率调查与分析

2.1.1 冬芽成活情况 3 月 15 日、3 月 22 日接

种,消毒方法为 0.1% 升汞浸洗,4d 后开始出现污染,10d 后基本结束,污染情况见表 1。

表 1 冬芽污染情况

去芽鳞前、后 消毒时间(min)	培养基	接种数	污染数	死亡数	污染率(%)	成活率(%)
前:5	(1)	10	0	2	1.67	73.3
	(2)	10	0	0		
	(3)	10	0	2		
	(4)	10	0	3		
后:3	(5)	10	1	6	10	76.7
	(6)	10	0	3		
前:4	(1)	10	1	2		
	(2)	10	0	0		
	(3)	10	1	3		
后:3	(4)	10	1	4		
	(5)	10	2	4		
	(6)	10	1	1		

水曲柳芽的芽鳞内生有大量褐色毛,这种特殊的芽结构,给外植体的消毒带来一定困难,易出现污染情况。由于 3 月 22 日接种的外植体去芽鳞前消毒时间比前一次缩短,因而增大了污染率。3 月 15 日接种后几天内,并未出现因消毒时间过长而死亡的现象。由此可见,冬芽的适宜消毒方法为去芽鳞前后,分别用 0.1% 升汞消毒 5min、3min。

2.1.2 新生芽及带芽茎段的成活情况 5 月 25 日接种的带芽茎段,消毒方法为 0.1% 升汞消毒 5min。光照 2d 后开始出现污染,6~8d 达高峰,10d 左右基本停止,半月后再无污染情况发生。同时接种后即发生褐化,至第 10d,褐化死亡 13 瓶。见表 2。

表 2 带芽茎段成活情况

培养基	接种数	污染数	褐化死亡数	褐化死亡率(%)	污染率(%)	成活率(%)
(7)	19	4	7	36.8	63.64	20.91
(8)	19	9	0	0		
(9)	18	10	4	22.2		
(10)	18	16	0	0		
(11)	18	15	1	5.5		
(12)	18	17	1	5.5		

此次接种污染率很高。分析原因,一是天气炎热,易发生污染;二是外植体较大,且留下的一小段叶柄处易形成“死角”,影响升汞的进入。所以这种外植体处理方法不好,应减小外植体体积并去掉外皮及芽鳞。这样也有利于芽的提早萌发。

从几次实验看来,水曲柳易发生褐化,由表 2 可见,SH 培养基的褐化率普遍高于 WPM,推测是

由于 SH 培养基中硝态氮含量远比 WPM 培养基为高,易形成酚类物质,具体原因待查。但这一次褐化较其它为重,笔者认为最主要的原因还是消毒方法上的不妥。升汞易残留,危害较大,因此以别的药品代替升汞进行消毒,很值得一试。

基于上述分析,于 6 月 14 日、6 月 20 日接种去外皮及芽鳞,只带一小部分木质部的芽。6 月 14 日以升汞消毒 2.5min、6 月 20 日 1.5min,结果消毒

时间过长,全部死亡。以次氯酸钠消毒 6min,则全部污染。因此,升汞的消毒时间要小于 1.5min,次氯酸钠要大于 6min。

2.2 不同诱导培养基的诱导情况

2.2.1 冬芽的诱导情况 接种后,冬芽长期无反应。2 个月后,共存活 84 个,有的芽萌发,但长势依然很慢。各种培养基诱导情况见表 3。

表 3 冬芽的诱导情况调查

培养基	接种成活数	诱导成功数	诱导成功率(%)
(1)	15	0	0
(2)	20	0	0
(3)	14	2	14.3
(4)	13	4	30.8
(5)	7	3	42.9
(6)	15	2	13.3

(1)、(2)以 MS 为基本培养基。MS 对草本植物的诱导成功很多,但因矿质盐含量较高,对木本植物有毒害作用,因此不利于水曲柳芽的诱导。以 SH 及 WPM 为基本培养基,都可诱导芽的萌发,且成功率差别不是很大。因此,SH、WPM 都可诱导水曲柳冬芽的萌发。

冬芽的萌动生长很困难。2 月后,共萌发 11

个芽。5 月 25 日进行转接,转接情况见表 4。

表 4 冬芽的转接情况调查

培养基	转接芽数	生长状况
(7)	15	转接后长势依然很慢。
(8)	20	(12)培养基中有 3 芽长势较好,其中 2 芽的小叶长近 1cm,
(9)	14	另 1 芽小叶展开 1cm 后死亡。
(10)	13	至 6 月 18 日只剩 2 芽,长势也
(11)	7	逐渐衰弱。
(12)	15	

Silveira, C. E., 等(1994 年)曾用 WPM 培养基培养欧洲白蜡树的休眠顶芽,证明其有利于萌生苗的生长。由实验可知,水曲柳休眠芽的萌动生长用 WPM 培养基与欧洲白蜡树无重复性,芽的萌动很困难转接后又大量死去,原因尚待查明。初步推测几种培养基都不利于冬芽的萌发生长。

2.2.2 带芽茎段及新芽的诱导情况 带芽茎段接种 3d 后,皮孔开始膨大,叶柄出现离层,开始脱落。8、9d 左右,皮孔及叶柄脱落处出现愈伤组织。半月后,含 BA 的培养基中侧芽萌动,20d 后顶芽萌动,但与顶芽相邻的侧芽仍不萌动。不含 BA 的培养基中 22d 后侧芽萌动,28d 后顶芽也见萌动。生长情况如表 5。

表 5 带芽茎段的诱导情况

培养基	存活芽数	萌动芽数(%)	芽萌动率	形成愈伤组织芽数	愈伤组织生成率(%)	长势
(7)	8	5	62.5	6	75	* A
(8)	10	3	30	6	60	* B
(9)	4	3	100	4	100	* C
(10)	2	1	50	2	100	* D
(11)	2	1	50	1	50	* E
(12)	0	--	--	--	--	--
(13)	1	0	0	1	100	* F

注: * A:2 芽愈伤组织旺,一顶芽萌发近 2cm,一侧芽萌发枝高 6cm

* B:1 芽枝长 1.5cm,2 芽刚刚萌动

* C:2 芽愈伤组织旺,1 芽枝长近 5cm

* D:1 芽愈伤组织旺

* E:1 芽刚刚萌动

* F:长势一般。此芽因褐化于 6 月 6 日由(7)培养基中转入

由上可见,以 MS 及 SH 为基本培养基,附以不同激素,都可诱导带芽茎段的切伤处、叶柄离层处及皮孔处形成愈伤组织。加入 BA 的培养基,可较快诱导侧芽及顶芽萌发,且侧芽的萌发早于顶芽。

(7)、(9)培养基中的芽长势较旺,推测(7)中 BA 浓度小,但有谷氨酸存在,故长势较好,而(9)中 BA 含量较高,因此,以 SH 为基本培养基,配以 BA 及谷氨酸,将有利于芽的萌发而成苗。

3 讨论与建议

3.1 消毒方法

建议外植体采用去外皮及芽鳞,只带有一部分木质部的芽。并试用药性温和、毒害小的药品进行消毒。可用次氯酸钠,消毒时间大于6min。如使用升汞,要小于1.5min。

3.2 培养基

3.2.1 矿质元素 此次实验证明,MS矿质盐浓度过高有毒害作用,应适当调整培养基,如使用1/2、1/3或1/4MS,也可再试用其它培养基。对于冬芽的诱导,找到适宜的培养基配方是关键所在。

3.2.2 有机质 维生素类可考虑加入抗坏血酸。一方面可防维生素缺乏,另一方面抗坏血酸有很强的还原力,可防止组织氧化变褐,用量建议试用100~500mg/L。

氨基酸类可加大甘氨酸、谷氨酸的用量至10mg/L。对于肌醇,MS与WPM中用量为100mg/L,而SH用量为1000mg/L,且肌醇为白蜡树属所必需,此次实验中SH效果也较好,因此可增大其它培养基中肌醇用量。另外,腺嘌呤及其盐酸盐可促进芽的形成和生长,还有椰子乳、香蕉汁、蜂王浆等天然物质往往有很好的效果,都可尝试。

3.2.3 糖 糖的作用是提供碳源、能量及维持细胞渗透势。冬芽转接后大量死亡,也许与渗透势有关。此次实验所用糖浓度为30mg/L,可增大至50mg/L或减小至20mg/L。

3.2.4 生长调节物 细胞的分裂素可促进细胞分裂与扩大,诱导芽的分化,促进侧芽的萌发生长。Silveira, C. E., Cottignies(1994年)在WPM培养基上对欧洲白蜡树培养苗继代培养时,所用BA浓度为3~4mg/L, Tabrett, A.等(1992年)所用欧洲白蜡树继代培养基为DKW + BA5。此次实验中可见,含BA的培养基中芽的萌发较早,长势也较好。因此建议继代培养基中适当提高BA浓度,还可试用KT、2-ip、TDZ等。

冬芽接种后长期没有反应,这就有生长素用量不足或种类不当的可能。可增大用量或改用IAA、IBA以及2,4-D。特别是2,4-D,很多人认为是诱导胚状体发生的必需因子。如果水曲柳能经胚状体成苗,此种方式也不失为一种很好的快繁方法。

另外,建议加入赤霉素类生长调节物。赤霉

素可解除芽的休眠,提早萌发。加入GA3希望对冬芽的诱导有效。但应注意赤霉素加热易失效,应使用过滤灭菌法。

3.2.5 其它成分 建议加入活性炭,以及防止酚污染的添加剂。植物组织在切割时会溢泌一些酚类物质,氧化为醌类,即发生褐化。水曲柳的组培易出现褐化现象。活性炭有强大的吸附力,可减少褐化,有利于形态发生和器官形成。抗酚类氧化药剂有半胱氨酸及其盐酸盐,可用200mg/L的浓度洗涤刚切割的外植体伤口表面,或过滤灭菌后加入固体培养基的表层。其它抗氧化剂有二硫苏糖醇、谷胱甘肽、硫乙醇、抗坏血酸及二乙基二硫氨基甲酸酯等。

3.3 外植体来源、生理年龄

带芽茎段接种后,有侧芽不萌发、皮孔长出愈伤组织的情况。除生长素、细胞分裂素用量过多的原因外,很可能是采样枝条过嫩的原因。所以可采些生理年龄较大枝条上的芽作为外植体。另外,采雌株或雄株以及不同部位的枝条,效果也可能不同。

3.4 培养温度

冬芽接种后长期无反应,也有可能是温度不适造成的。调整培养温度,或许也有利于对冬芽的诱导。

参考文献:

- [1] 赵玉慧,李森.解除水曲柳种子休眠的方法的研究[J].林业科技,1989,(2):3.
- [2] Piotto B. Effects of temperature on germination of stratified seeds of three ash species[J]. Seed Science and Technology, 1994, 22(3): 519 ~ 529.
- [3] Tylkouski Tl. Storage of stratified seeds of European ash (*Fraxinus excelsior* L.)[J]. Arboretum Komickie(1990 publ 1991), (33): 259 ~ 266.
- [4] Tylkouski T. Mediumless stratification and dry storage of after-ripened seed of *Fraxinus excelsior* [J]. Arboretum Komickie (1990 publ 1991), (35): 143 ~ 152.
- [5] Silveira, C. E., Nougarede A. Micropropagation of *Fraxinus excelsior*: the multiplication phase a focal point for the initiation of various morphogenetic pathways[J]. Sciences de la Vie, 1995, 318(2): 199 ~ 207.
- [6] 文澄,戴策刚.观赏植物组织培养技术[M].中国林业出版社,1996,54~357.

责任编辑:吴艳玲

(下转第8页)

参考文献:

- [1] 冲增哲. 魔芋科学[M]. 四川大学出版社, 1990, 89 ~ 95.
- [2] 楼文高, 柏春祥, 殷肇君. 国内外魔芋的开发和利用[J]. 中国畜产与食品, 1999, 6(1): 23 ~ 24.
- [3] 曹涤环. 魔芋食品倍受青睐[J]. 特种经济动物, 2001, (7): 25.
- [4] 危贵茂. 魔芋精粉在食品工业中的应用[J]. 中国畜产与食品, 1997, 4(5): 232.
- [5] 李 蜜. 魔芋栽培与加工实用技术[M]. 湖南科学技术出版社, 1994, 20 ~ 24.
- [6] 李 波, 谢笔均. 魔芋葡甘聚糖可食性膜材料研究(I)[J]. 食品科学, 2000, 21(1): 19 ~ 20.
- [7] 鲁文秀, 侯自力. 魔芋精粉在肉糜制品及冰淇淋制品中的应用[J]. 食品工业科技, 1997, 10(5): 18 ~ 19.
- [8] 陈运中. 魔芋精粉与黄原胶的协同增效作用及应用研究[J]. 食品科学, 1999, (9): 12 ~ 14.
- [9] 刘佩英. 中国魔芋科学技术的研究与应用[J]. 西南农业大学学报增刊, 1995, (11): 1 ~ 13.
- [10] 王贞富. 国内外魔芋的开发和利用[J]. 食品与机械, 1990, (2): 4 ~ 7.

责任编辑: 王丽萍

The effect of alkali on the physical nature of gel of *Amorpho phallus Verieri*

Lü Hongying¹, SONG Xiuwen²

(1. Jilin Agricultural Science and Technology College Department of Bioengineering, Jilin 132109, P.R. China;

2. Xilin Cake Food House of Jilin City, Jilin 132011, P.R. China)

Abstract: Three varieties of alkali and different amount of each variety are selected as gelation reagent in making gel of *Amorpho phallus Verieri*. The Result indicates that different alkali and different alkali amount all affect the physical nature of gel of *Amorpho phallus Verieri*, and as a whole, Sodium Carbonate(Na_2CO_3) is the most suitable gelation reagent.

Key words: alkali; *Amorpho phallus Verieri*; gel

(上接第 4 页)

Tissue culturing of *Fraxinus mandshurica*

XIN Lihong¹, ZHENG Yushi²

(1. Jilin Agricultural Science and Technology College Department of Plant Science, Jilin 132101, P.R. China;

2. Sanchahe Town Agricultural Technology Spreading Center in Fuyu County, Fuyu 131200, P.R. China)

Abstract: In the test of tissue culturing of *Fraxinus mandshurica*, with dormant and newly - born buds, or part stalk with buds as materials, shows that the best sterilizing methods to dormant buds is in 0.1% HgCl_2 for 5 minutes first, then for 3 minutes after being cut off scales, SH and WPM medium with different growth regulator can induce dormant buds sprout, and to newly - born buds, SH medium with BA, NAA and Glu can induce callus and sprouting shoots produced, and the effect on SH is better than that on WPM.

Key words: *Fraxinus mandshurica*; tissue culture; callus; sprout