

二种槭树有效获得无菌试管苗的研究

叶景丰¹, 陈 罡¹, 马冬菁¹, 潘文利¹, 范俊岗¹, 祁 爽²

(1. 辽宁省林业科学研究所, 辽宁 沈阳 110032; 2. 辽宁省生态公益林项目中心, 辽宁 沈阳 110036)

摘 要:以挪威槭的成熟种子、自由人槭的顶芽、幼嫩茎段为外植体, 研究了 0.1% 升汞不同消毒时间、不同培养条件、不同培养基对 2 种槭树有效获得无菌试管苗的影响。结果表明: 挪威槭种子用 0.1% 升汞消毒 8 min, 在 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 的培养基上, 黑暗条件、温度 24~26℃下, 有效的获得了无菌试管苗; 自由人槭以顶芽为外植体, 0.1% 升汞消毒 6 min, 在 MS+6-BA 0.5(0.2)mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基上, 光照 3 000~5 000 lx、温度 24~26℃下, 同样有效的获得了无菌试管苗。

关键词: 槭树; 外植体; 消毒时间; 培养基; 培养条件
中图分类号: S 792.35 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)12-0117-03

槭树植物是槭树属(*Acer*)的泛称, 其木材质地坚硬, 材质细密, 是良好的家具、农具、枕木及建筑用材, 树冠冠幅较大, 树姿优美, 叶形秀丽, 秋季树叶渐变为红色或黄色, 为著名的秋色叶树种, 是理想的行道树或城市绿化庭园树种, 在各地风景园林中得到普遍应用^[1-3]。挪威槭(*Acer platanoides* Linnd)和自由人槭(*Acer freemanii* Autumn Blaze)是由北美引进的槭树中的经典品种, 该试验介绍这 2 种槭树组织培养初代培养的研究, 有效的获得了 2 种槭树的无菌试管苗, 为这 2 种槭树的组织培养快繁技术研究提供了参考。

1 材料与方法

选取饱满的挪威槭种子和自由人槭顶芽、幼嫩茎

段, 用清水冲洗 2~3 h, 在超净工作台上, 去除挪威槭种子外种皮, 剪取自由人槭顶芽和幼嫩茎段, 75% 酒精浸润 30 s, 无菌水冲洗 2~3 次, 0.1% 升汞消毒 4~12 min, 清水冲洗 3~4 次, 接种于添加 2 种不同植物生长调节剂的 2 种不同培养基中(培养基添加蔗糖 30 g/L、琼脂 6 g/L, pH 调至 5.8, 选用正交试验表 L₄(2³)和 L₈(2⁷), 试验因素和水平见表 1), 放置在温度 22~28℃, 光照条件分别为 3 000~5 000 lx 光照和黑暗的环境中培养, 重复 3 次, 1 周后统计无菌率, 2 周后, 去除污染中毒的统计萌发率, 4 周后统计萌发芽的成苗率。

表 1 试验因素与水平设计

水平	6-BA/mg · L ⁻¹	NAA/mg · L ⁻¹	培养基	外植体
1	0.5	0.2	MS	顶芽
2	0.2	0.1	B5	幼嫩茎段

2 结果与分析

2.1 升汞不同消毒时间对无菌率和中毒率的影响

Explore About the Method for Extracting DNA of Ornamental Bromelia

SHEN Xiao-lan^{1, 2}, GE Ya-ying², YU Xin-ying², WANG Wei-yong², MAO Bi-zeng¹

(1. Institute of Biotechnology, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310029, China; 2. Zhejiang Academy of Agriculture Science Flower Research Center, Xiaoshan, Zhejiang 311202, China)

Abstract: The leaves of ornamental Bromelia plants were coriaceous and rich in fibre and secondary metabolism compounds, which lead the DNA extraction unefficient and low quality, and influence the following enzyme digestion and PCR amplification. We chose several genuses of Bromelia plant, use different part of the matierials, compared with different buffer solutions, trituration methods and deposition time, and summarized a efficient method of DNA extraction for Bromelia plants.

Key words: Bromeliaceae; DNA extraction

表 2 升汞不同消毒时间对挪威槭和自由人槭外植体无菌率和中毒率的影响

树种	外植体	消毒时间/min													
		2	4	6	8	10	12	14							
挪威槭	种子	90	0	95	0	97	0	100	0	100	2	100	2	100	3
自由人槭	顶芽	90	0	92	0	95	0	96	5	97	8	99	13	100	15
人槭	茎段	76	0	89	0	92	1	94	4	95	4	97	10	99	12

注 左边为无菌率, 右边为中毒率, 单位(%)。

从表 2 中得出, 挪威槭以种子为外植体, 升汞消毒时间在 8 min 以上时, 无菌率达 100%, 但中毒率随着消毒时间的增加而增高, 升汞消毒时间在 8 min 以下时, 无中毒现象, 但无菌率随着时间的减少而降低, 升汞消毒时间在 8 min 时无菌率最高, 中毒率最低, 得出挪威槭以种子为外植体, 升汞消毒时间在 8 min, 消毒效果最佳。

自由人槭以顶芽为外植体随着升汞消毒时间的增加, 无菌率也随着增加, 消毒时间在 6 min 以下, 中毒率为 0, 说明随着升汞消毒时间的增加杂菌被杀死的比率

在升高, 但消毒时间过长, 顶芽的细胞和组织发生了严重的中毒现象, 升汞消毒时间在 6 min 时, 无菌率最高, 中毒率最低, 得出自由人槭以顶芽为外植体, 升汞消毒 6 min 消毒效果最佳; 自由人槭以幼嫩茎段为外植体时, 升汞消毒时间较顶芽时间要长, 原因是茎段较顶芽木质化程度高, 茎段的细胞和组织较耐杀毒且所含的杂菌多, 综合各因素得出, 自由人槭以细嫩茎段外植体时, 升汞消毒 10 min, 消毒效果最佳。

2.2 不同温度和光照条件对萌发率的影响

表 3 不同光照条件和温度对挪威槭和自由人槭外植体萌发率的影响

树种	外植体温度 / °C	黑暗						光照 3 000 ~ 5 000 lx					
		20	22	24	26	28	30	20	22	24	26	28	30
挪威槭	种子	93	95	98	98	96	94	88	91	95	94	92	90
自由人槭	顶芽	92	93	97	96	94	93	93	96	98	97	96	94
	幼嫩茎段	92	94	95	95	93	92	93	93	96	95	94	92

由表 3 得出, 挪威槭种子在黑暗条件下, 平均萌发率为 95.67%, 在光照 3 000 ~ 5 000 lx 平均萌发率为 91.67%, 当温度在 24 ~ 26 °C 时, 平均萌发率最高达到 96.25%, 表明挪威槭种子在黑暗条件下, 更有利于种子的萌发, 温度在 24 ~ 26 °C 时, 适于种子的萌发。同样, 由表 3 数据得出, 自由人槭的顶芽和幼嫩茎段在黑暗条件和有光条件下平均萌发率很接近, 但在黑暗条件下, 顶芽和幼嫩茎段萌发出的芽弱。自由人槭以顶芽为外植体萌发率明显高于以幼嫩茎段为外植体, 原因是顶芽具有顶端优势, 萌动力强。温度在 24 ~ 26 °C 时, 自由人槭以顶芽和幼嫩茎段平均萌发率最高。综合各因素得出, 自由人槭以顶芽为外植体更有利于芽的萌发, 温度在 24 ~ 26 °C 光照条件下为最适的培养温度。

2.3 不同培养基和外植体对成苗率的影响

2.3.1 不同培养基类型和激素浓度对挪威槭种子成苗率的影响 4 周后, 新芽长出 2 片子叶, 高在 1 cm 以上

时, 统计挪威槭种子和自由人槭不同外植体成苗率。由表 4 得出, 外植体在 MS 培养基中的平均成苗率最高达 96.5%, 细胞分裂素 BA 为 0.5 mg/L 时, 平均成苗率最高达 96%, 生长素 NAA 为 0.2 mg/L 时, 平均成苗率为 95%, 略高于生长素为 0.1 mg/L 时的成苗率。综合 3 个因素得出, 选用 MS 培养基, 添加 0.5 mg/L 的 6-BA 和 0.2 mg/L 的 NAA 有利于挪威槭种子的成苗。

表 4 不同培养基类型和激素浓度对挪威槭种子成苗率的影响

实验号	培养基	6 BA	NAA	成苗率
		/mg · L ⁻¹	/mg · L ⁻¹	/%
1	(1)	(1)	(1)	98
2	(1)	(2)	(2)	95
3	(2)	(1)	(2)	94
4	(2)	(2)	(1)	92
X(1)	96.5	96	95	—
X(2)	93	93.5	94.5	—



图 1 自由人槭顶芽萌发



图 2 自由人槭试管苗



图 3 挪威槭种子萌发

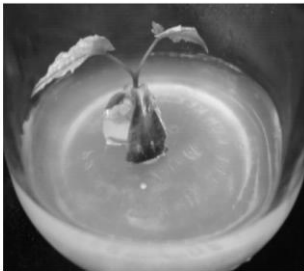


图 4 挪威槭试管苗

表 5 不同培养基类型、激素浓度和自由人槭外植体对成苗率影响

实验号	培养基	6-BA/ mg · L ⁻¹	NAA/ mg · L ⁻¹	外植体	成苗率/ %
1	(1)	(1)	(1)	(1)	98
2	(1)	(1)	(2)	(2)	94
3	(1)	(2)	(1)	(2)	93
4	(1)	(2)	(2)	(1)	97
5	(2)	(1)	(1)	(2)	95
6	(2)	(1)	(2)	(1)	97
7	(2)	(2)	(1)	(1)	98
8	(2)	(2)	(2)	(2)	92
平均(1)	96	95. 5	96	97. 5	—
平均(2)	95	95. 5	95	93. 5	—

2.3.2 不同培养基类型、激素浓度和外植体对自由人槭成苗率影响 由表 5 得出, 自由人槭以顶芽为外植体时平均成苗率最高达 97.5%, 在 MS 培养基中平均成苗率最高达 96%, 当 NAA 浓度为 0.2 mg/L 时平均成苗率最高达 96%, 当 6-BA 浓度分别为 0.5 mg/L 和 0.2 mg/L 时, 平均成苗率均为 95.5%, 表明 6-BA 浓度的高低对自由人槭成苗率没有显著的影响。综合各因素得出, 以顶芽为外植体选用 MS 培养基添加 0.5 mg/L 或 0.2 mg/L 的 6-BA 和 0.2 mg/L 的 NAA, 有利于自由人槭顶芽的成苗。

Establishing Two Kinds of Maples Sterile Eullune System

YE Jing-feng¹, CHEN Gang¹, MA Dong-jing¹, PAN Wei-li¹, FAN Jun-gang¹, QI Shuang²
(1. Liaoning Research Academy of Forestry Sciences, Shenyang, Liaoning 110032, China; 2. Liaoning Ecological Commonweal Forest Centre of Project, Shenyang, Liaoning 110036, China)

Abstract: Explants from mature seeds of *Acer platanoides* Linnd, terminal bud and stem segments of *Acer freemanii* Autumn Blaze, key technology of establishing two kinds of maples sterile culture system was studied. The result showed that sterilized mature seeds of *Acer platanoides* Linnd with 0.1% mercuricchloride in 8 minutes, sterilized the best explant terminal bud of *Acer freemanii* Autumn Blaze with 0.1% mercuricchloride in 6 minutes, cultured two kinds of explants at the MS medium supplied with with 6-BA 0.5 mg/L, NAA 0.2 mg/L, the germfree young plant of test tube was effective obtained same.
Key words: Maple; Explant; Sterilization time; Mediation; Culture condition

大白菜苗期管理措施

大白菜从播种到生长至 7~8 片真叶为幼苗期, 大体时间为 20~25 d。由于大白菜苗期正是高温多雨的季节, 虫害多, 幼苗易感染病毒病。因此, 加强苗期管理是大白菜稳产高产的关键。

1 间苗定植 一般直播后 3 d 出苗, 7~8 d 进行第一次间苗, 苗距 6~7 cm; 真叶 4~5 片时, 进行第 2 次间苗, 苗距 10~12 cm。团棵时根据不同品种, 按一定株距定株或定植, 并在苗期补栽缺苗, 更换弱苗、病苗。

2 小水勤浇 苗期虽需水量不大, 但气温高, 勤浇小水, 保

3 结论

挪威槭以种子为外植体, 0.1% 升汞消毒 8 min, 消毒效果最佳, 无菌率达 100%, 中毒率为 0; 自由人槭以顶芽为外植体, 0.1% 升汞消毒 6 min, 无菌率达 95%, 中毒率为 0。挪威槭种子在黑暗条件下, 温度在 24~26℃ 时萌发率最高达 98%; 自由人槭以顶芽为外植体, 温度在 24~26℃ 光照 3 000~5 000 lx 条件下为最适的培养条件, 平均萌发率最高达 97.5%。选用 MS 培养基, 添加 0.5 mg/L 的 6-BA 和 0.2 mg/L 的 NAA 有利于挪威槭种子的成苗, 平均成苗率在 95% 以上; 自由人槭以顶芽为外植体, 选用 MS 培养基, 并添加 0.5 mg/L 或 0.2 mg/L 6-BA, 0.2 mg/L NAA 浓度, 成苗率在 95% 以上。

参考文献

[1] 石柏林, 吴家森, 钟泰林. 6 种槭树属植物种子特性及其发芽试验 [J]. 浙江林业科技, 2006, 26(3): 38-40.
[2] 李冬林, 王宝松, 韩杰峰, 等. 观赏槭树的苗期试验初报 [J]. 江苏林业科技, 2007, 34(1): 10-14.
[3] 喻苏琴, 袁利洪. 江西野生观赏槭树资源 [J]. 江西林业科技, 2002(6): 6-17, 19.
[4] 张彦妮. 复叶槭组织培养再生体系建立及其遗传转化初步研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学博士学位论文, 2005.

持土壤湿润, 可减轻高温危害, 降低病毒病的感染率。苗期雨水少时, 利用停雨间隙及时间苗, 增施提苗肥, 667m² 施尿素 3~4 kg。

3 中耕施肥 定苗后若田间幼苗生长不整齐, 可对生长偏弱的小苗, 点浇 2~3 次 200~300 倍的尿素水, 促使弱苗快长。苗期中耕 1 次, 并在苗周围培土。结合浇水施 1 次催苗肥和 1 次发棵肥, 每次 667m² 施尿素 5~6 kg。

4 及时防治病虫害 苗期为害大白菜的主要病虫害是病毒病、蚜虫、菜青虫、蟋蟀等。苗期不仅直接为害大白菜, 还容易传播病毒病, 要尽早防治。