

毛桉初代培养影响因素研究

张 丹, 康永祥, 薛丽艳, 叶新华

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要:以毛桉茎段为外植体,研究了不同消毒方式、不同基本培养基类型、不同取材时间和不同激素组合对毛桉初代培养的影响。结果表明:0.1%氯化汞 10 min 取得了比较理想的消毒效果,污染率和褐化率均较低;MS 培养基为较适宜的初代培养基,其萌发时间、生长状况均优于其它培养基;外植体在 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+IBA 0.1 mg/L 上生长最好。

关键词:毛桉;初代培养;影响因素

中图分类号:S 792.119 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)07-0123-03

毛桉(*Cornus walteri* Wanger.)为山茱萸科桉木属落叶乔木,又名车梁木、小六谷。分布于山东、河北、河南、江苏、安徽、浙江、湖北、湖南、山西、陕西、甘肃、贵州、四川、云南等省。喜阳、耐旱、耐寒,能耐-23℃的低温,在自然界常散生于向阳山坡及岩石缝间。用种子繁殖,4~6 a 可开花结实。枝叶茂密、白花可赏,也可栽作行道树用。木材坚重,供作车辆、家具等用;种子含油 30%~35%,榨油可以食用和作精密机械如钟表等的润滑油;树皮及叶可提栲胶;花为蜜源植物^[1]。由此可见,毛桉是一种不可多得的园林绿化树种和本木油料树种,经济性状非常明显。

能源问题目前已成为一个全球性的问题,煤炭、天然气、石油等能源是有限的,而太阳能、风能等新能源虽然取之不尽,但是其生产与利用又难以控制,不断开发新能源,用可再生能源来取代有限的石化能源是非常必要的^[2-3]。我国人口多耕地少,食用油进口量还在逐年上升,不可能仿效欧美等发达国家大力种植油料作物(油菜、大豆等)的方式来发展生物柴油工业^[4-8]。但是我国山地资源丰富,木本油料植物又具有野生性、耐旱、耐贫瘠等优点,一次栽植,多年受益。毛桉就是一种非常优良的木本油料树种,经济前景非常广阔。目前,毛桉的繁殖方式主要是种子繁殖,但种子繁殖率低,出苗不齐,繁育时间长;虽然可以扦插育苗,但是存活率低,生根也非常困难,又受到了季节和资源的限制,所以就需

要一种行之有效的方法来进行繁育。组织培养简单、迅速、繁殖速度快,可以极大的缩短木本植物的周期,有利于植物的推广和规模化生产。该试验通过对影响毛桉初代培养的因素进行探索和分析,寻求毛桉初代培养最适宜的培养条件,旨在为今后建立稳定而高效的毛桉组织培养技术体系提供依据和参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料来自陕西省杨凌示范区西北农林科技大学林学院毛桉资源圃,外植体采自 2 a 生毛桉实生苗的当年生枝条。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的处理和消毒 选择生长健壮、病虫害少的植株,剪取当年生的枝条,立即带回实验室,剪去叶片,用牙刷蘸洗衣粉水刷洗表面,截取枝条(基部、中部、梢部),剪成 1.5 cm 左右的茎段,流水冲洗 12 h 左右,采用 6 种消毒处理(表 1),各处理均用无菌水冲洗 5 次,然后将茎段两侧与消毒液接触的部位切掉,切成 1 cm 左右的茎段,接种到 MS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 1 mg/L 的培养基中。每升培养基均添加琼脂 6 g,蔗糖 30 g,pH 5.5~6.0,121℃ 灭菌 20 min(以下培养基琼脂、蔗糖含量、pH、灭菌方法均相同)。每个处理接 1 L 培养基,每瓶接种 1 个茎段,3 次重复。7 d 后观察、记录外植体生长情况,统计外植体的污染率和褐化率。

表 1 不同的消毒方法

处理	消毒方法/min		
	75%酒精	84 消毒液	0.1%氯化汞
1	0.5	5	5
2	0.5	10	5
3	0.5	15	5
4	0.5	—	5
5	0.5	—	10
6	0.5	—	15

第一作者简介:张丹(1986-),女,山西运城人,在读硕士,现主要从事组织培养方面的研究工作。

责任作者:康永祥(1963-),男,陕西乾县人,硕士,副教授,硕士生导师,现主要从事树木学研究工作。

基金项目:林业公益性行业专项资助项目(200804010)。

收稿日期:2012-01-11

1.2.2 不同基本培养基对初代培养的影响 采用 MS、1/2MS、WPM 3 种不同类型的培养基,不添加任何激素,以茎段为外植体进行培养。每个处理接 1 L 培养基,每瓶接种 1 个茎段,3 次重复。7 d 后观察、记录外植体生长情况,从外植体开始萌发时间、增殖等方面来进行比较。

1.2.3 不同取材时间对初代培养的影响 从 2010 年 9 月份开始每个月都采集毛桃当年生茎段为外植体,接种到 MS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 1 mg/L 中。每次接 1 L 培养基,每瓶接种 1 个茎段,3 次重复。7 d 后观察、记录外植体生长情况。依次筛选最适宜的取材时间。

1.2.4 不同激素组合对初代培养的影响 采用 $L_9(3^3)$ 正交表进行正交实验,以 MS 为基本培养基,探索 3 种植物激素及其浓度对毛桃初代培养的影响(表 2)。3 次重复,1 个月后观察、记录外植体生长情况,统计诱导率。

表 2 正交实验设计激素浓度

浓度	激素/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$		
	6-BA	NAA	IBA
1	0.1	0.1	0
2	0.5	0.3	0.1
3	1.0	0.5	0.5

2 结果与分析

2.1 不同消毒处理对外植体的影响

用不同消毒方法处理外植体,初代培养 7 d 后,由表 3 可看出,5 号处理污染率和褐化率相对是比较理想;6 号处理污染率很低,但是褐化率非常高;1~4 号处理污染率非常高,培养基上长有黄色、黑色等颜色的霉菌,外植体上出现白色的菌丝,并且逐渐增大,也有少部分培养基是细菌污染,出现白色的脓液,结果表明,毛桃外植体茎段适宜的消毒方法是 0.1% 氯化汞消毒 10 min 左右。

表 3 不同消毒方法的消毒效果

处理	消毒方法/min			污染率/%	褐化率/%
	75%酒精	84 消毒液	0.1%氯化汞		
1	0.5	5	5	81.7	4.2
2	0.5	10	5	80.8	2.5
3	0.5	15	5	74.2	5.8
4	0.5	—	5	79.2	4.2
5	0.5	—	10	42.5	45.0
6	0.5	—	15	27.5	63.3

2.2 不同基本培养基对毛桃初代培养的影响

采用 3 种不同培养基处理培养 7 d 以后,由表 4 可看出,MS 培养基效果较好,在无任何激素处理的情况下,外植体生长状况良好,部分接种的茎段开始慢慢膨大并萌发,叶片缓慢展开;WPM 培养基次之;1/2MS 培养基诱导时间最长,结果表明,MS 培养基是毛桃初代培养最适宜基本培养基。

表 4 基本培养基类型对初代培养的影响

培养基	萌发时间/d	生长状况
MS	5	萌发早,生长健壮
1/2MS	15	生长不良
WPM	9	萌发较早,生长较好

2.3 不同取材时间对初代培养的影响

由图 1 可看出,取材时间对培养效果有一定的影响,在 4~6 月取材培养效果较好,主要表现在污染率、褐化率和存活率上。在 4~6 月取材,外植体较幼嫩、易消毒,污染率和褐变率低,接种后存活率高,长势快、生长能力强。冬季是取材最不适宜时间,此时所取材料还需要解除休眠,而且消毒困难,容易发生污染和褐变,存活率低。因此,4~6 月是毛桃组培快繁取材最适宜时间。

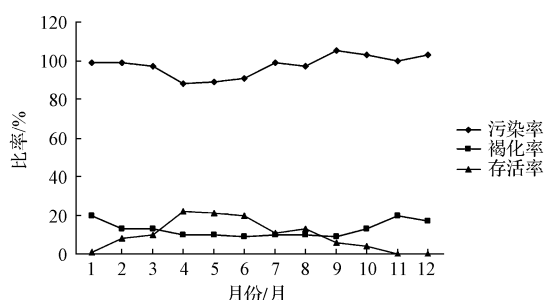


图 1 不同取材时间对毛桃初代培养的影响

2.4 不同激素组合对初代培养的影响

由表 5 可知,用不同激素组合处理,接种 1 个月后统计结果,发现 6-BA、NAA、IBA 均能诱导茎段萌发,但各自诱导能力存在一些差异。

表 5 不同激素组合试验结果

处理	激素/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$			接种外植体数量	诱导芽数/个	诱导率/%
	6-BA	NAA	IBA			
1	0.1	0.1	0	120	16	13.3
2	0.1	0.3	0.1	120	5	4.2
3	0.1	0.5	0.5	120	5	4.2
4	0.5	0.1	0.1	120	22	18.3
5	0.5	0.3	0.5	120	17	14.2
6	0.5	0.5	0	120	19	15.8
7	1.0	0.1	0.5	120	7	5.8
8	1.0	0.3	0	120	4	3.3
9	1.0	0.5	0.1	120	5	4.2

由表 6 可知,6-BA 的诱导作用达到显著,NAA 和 IBA 的诱导作用不显著,3 种激素作用的强弱依次是:6-BA>NAA>IBA。处理 4 生长最好,生长旺盛,颜色嫩绿,叶片舒展。其它处理长势较弱,叶片呈卷曲状,几

表 6 方差分析

激素	SS	df	MS	F	$F_{0.05}$
6-BA	222.57	2	111.29	28.76	19.00
NAA	47.44	2	23.72	6.13	
IBA	11.77	2	5.89	1.52	
误差	7.74	2	3.87		
	289.52	8			

乎无伸长生长,有的处理有很多茎段没有萌发。6-BA、NAA、IBA 3 种激素均能诱导茎段出芽,但各自诱导能力却存在很大差异。6-BA 的诱导能力比较强,但高浓度的植物激素反而抑制了生长。

3 结论与讨论

3.1 消毒方法的选择

外植体消毒成功与否是建立组培快繁体系很重要的一个条件。试验中采用 0.1% 氯化汞消毒 10 min 取得了不错的消毒效果。6 号处理褐化率高的原因可能是消毒剂处理时间过长,产生了毒害作用。总得来说毛株的污染率还是比较高,原因可能是一方面木本植物生长周期长,次生代谢物分泌较多,而且毛株自身覆盖有一层绒毛,容易滋生细菌,且不易消除;另一方面外植体采集于野外,自身携带的菌类比较多^[9],而在组织培养中由于材料内部(细胞内或细胞间)的内生细菌也不能被一般的表面灭菌方法所清除,也会引起培养材料的污染;此外消毒剂处理时间也不能过长,会对植物组织和细胞有杀伤作用,外植体会吸收或者残留部分重金属而死亡,酒精也能导致外植体烧苗而死亡^[10]。

3.2 基本培养基对初代培养的影响

不同种植物对培养基的需求也不相同,只有选择适宜的培养基才能保证培养材料的生长。试验结果表明,MS 培养基较适宜于毛株的组织培养,其各项指标均高于 1/2MS、WPM。这和前人的研究结果较为一致,木本植物组织培养中应用最为广泛的是 MS 培养基,它的无机盐(如钾盐、铵盐及硝酸盐)含量均较高,微量元素种类较全,浓度也较高,我国近年来在树种成功的离体培养中,多数选用 MS 培养基^[11]。

3.3 不同取材时间对初代培养的影响

取材时间对培养效果有一定的影响,4~6 月份是毛株的生长季节,新的枝条开始萌发,所采集外植体比较幼嫩,带菌较少,较短的消毒时间就能达到很好的效果,毒害作用也相对减弱。木本植物在冬季要进行休眠,枝条不易解除休眠,而且也不易消毒,消毒时间过长,植物大都发生褐变导致死亡。

3.4 不同植物激素对初代培养的影响

正交实验法要求任意因素都是全面试验,而且试验点的分布也是均衡的。该试验考察了 3 种植物激素 3 个浓度组合的 9 组试验,每组试验都有很强的代表性,能够比较全面地反映优选区内的大致情况。在只有 1~2 个因素起主要作用,而试验之前又不知道哪个因素起主要作用的情况下,正交实验法能保证主要因素的各个可能搭配都不会漏掉^[12]。通过方差分析,看出处理 4 是最佳组合,萌发时间早,长势好,诱导率也高。另外,在 1 L 培养基中添加 2 g PVP 或者 2 g 活性炭对褐化现象有一定的抑制作用。外植体生长一段时间,叶片发生黄化蜷曲现象,此时将外植体下端发黑的部位切除并转接有一定的抑制作用。

综上所述,该试验通过对消毒方式,培养基,取材时间以及植物激素 4 个方面的研究,对毛株初代培养的影响因素进行了初步的研究,为将来建立一整套组培体系奠定了一定基础,还存在一些问题,有待今后进一步的研究探讨。

参考文献

- [1] 陈有民. 园林树木学[M]. 北京:中国林业出版社,2006:616-617.
- [2] 沈裙裙,迟晓元,杨庆利,等. 生物柴油的研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2006,26(11):87-90.
- [3] Ma F, Hanna M A. Biodiesel production a review [J]. Bioresour Technol, 1999, 70:1-15.
- [4] 王涛. 中国主要生物质燃料油木本能源植物资源概况与展望[J]. 科技导报, 2005, 25(3):12-14.
- [5] 赵宗保,华艳艳,刘波. 中国如何突破生物柴油产业的原料瓶颈[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(11):1-6.
- [6] 贾虎森,许亦农. 生物柴油利用概况及其在中国的发展思路[J]. 植物生态学报, 2006, 30(2):221-230.
- [7] 李高扬,李建龙,王艳. 优良能源植物筛选及评价指标探讨[J]. 可再生能源, 2007, 25(6):84-89.
- [8] 罗艳,刘梅. 开发木本油料植物作为生物柴油原料的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(7):68-70.
- [9] 王水琦. 植物组织培养[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2007:61.
- [10] 陈振光. 枇杷离体培养研究进展[J]. 福建农学院学报, 1991, 20(4):422-426.
- [11] 何松林,十鸟三和子,孔德政,等. 基本培养基及凝固剂对文心兰试管苗生长发育的影响[J]. 北京林业大学学报, 2001, 23(1):29-31.
- [12] 毛碧增. 花叶开唇兰的快速繁殖[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 1999, 25(5):527-528.

Study on the Influencing Factors of Initial Culture of *Cornus walteri* Wanger.

ZHANG Dan, KANG Yong-xiang, XUE Li-yan, YE Xin-hua

(College of Forestry, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: Taking the stems of *Cornus walteri* Wanger. as explants, the disinfection methods, basic medium, different sampling time and different hormone affect the primary culture of *Cornus walteri* Wanger. were studied. The results showed that the best disinfection method was using 0.1% HgCl₂ for 10 minutes, it had lower contaminated rate and browning rate; MS medium was the best one for primary culture, the germination time and growth conditions were better than other medium; explants grew well in the medium of MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+IBA 0.1 mg/L.

Key words: *Cornus walteri* Wanger. ; initial culture; influencing factors