

影响千层金腋芽萌发及愈伤组织诱导因子初探

曲 芬 霞

(广西贺州学院 化生系, 广西 贺州 542800)

摘 要: 为建立千层金高效的离体再生体系, 用新生顶芽和侧芽为外植体, 研究了灭菌剂、取材季节、植物生长调节剂种类和浓度、硝酸银浓度对千层金腋芽萌发及愈伤组织诱导的影响。结果表明: 与使用 0.1% 氯化汞 64% 的存活率相比, 5% 的次氯酸钙是最环保有效的灭菌剂, 用其浸泡 5 min, 有 60% 存活率; 在春秋两季取材, 平均诱导率在 92.0% 以上; 最适宜的诱导培养基是 MS + KT 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L; 使用 3% 的硝酸银, 与对照相比, 诱导率从 70% 提高到 92%, 玻璃化率从 33.7% 下降到 10%。

关键词: 千层金; 愈伤组织; 诱导率; 存活率

中图分类号: S 792.119 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)08-0152-03

千层金 (*Melaleuca bracteata*) 为桃金娘科白千层属的常绿乔木。其主干直立, 嫩枝红色, 枝条密集且细长柔软, 金黄或鹅黄色叶片密集分布于锥形树冠, 树形十分优美, 分枝性能好又耐修剪, 生长速度快, 广泛用于庭院景观、小区绿化、道路美化, 林相改造。千层金对气候和土质适应范围非常广, 耐高温, 也可忍受 $-10 \sim -17^{\circ}\text{C}$ 左右的低温; 就土壤而言, 酸性土壤、石灰岩、盐碱地都能很好的适应; 耐旱耐涝, 树枝韧性好, 抗风力强, 是沿海地区绿化造林及防护林的首选树种。千层金除了极富观赏价值外, 又有极高的经济价值, 枝叶均为插花的上好材料, 叶片芳香宜人, 含有芳香油, 是最珍贵的天然化妆品香料之一, 也是一种优良的天然抗菌剂, 广泛用于医药、化妆品、日用化工等行业, 因此成为目前世界上最流行、最珍贵、视觉效果最好的彩叶芳香乔木新品种, 市场前景十分广阔^[1-3]。

当前有关千层金离体快繁技术研究报道很少, 且诱导率较低, 仅为 67%^[3-4], 为了提高千层金腋芽萌发及愈伤组织诱导率, 从取材季节、灭菌剂选用、植物生长调节剂种类和浓度等方面进行该项研究, 旨在为建立和完善千层金组培快繁技术提供科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料来源于 2 a 生千层金的扦插苗新生顶芽和侧芽, 把供试材料剪成适宜大小, 在自来水下冲洗 10 min。

作者简介: 曲芬霞(1977-), 女, 硕士, 讲师, 现主要从事种苗培育栽培及生物技术研究工作。E-mail: qufenxia@126.com。

基金项目: 广西高校重点建设实验室资助项目 (2009sys [2] 01)。

收稿日期: 2009-12-27

带回接种室进行灭菌处理, 在灭菌溶液中加入几滴吐温-80, 灭菌后用无菌水漂洗 3~4 次, 把消毒过的材料放到培养皿中, 用滤纸吸干表面的水分, 用刀片切掉茎段两头及顶芽与药液接触的部分, 然后接入已灭菌的启动培养基上。

1.2 试验方法

1.2.1 灭菌剂 外植体先用 75% 酒精浸 30 s, 然后做以下 4 种处理: A: 用 0.1% 的升汞浸泡 5 min; B: 5% 的次氯酸钙浸泡 5 min; C: 10% 过氧化氢浸 5 min; D: 2% 次氯酸钠浸泡 5 min。

1.2.2 取材季节 分别在 3 月 20 日、6 月 27 日、9 月 27 日、11 月 18 日, 选取外植体进行接种试验。

1.2.3 植物生物调节剂种类和浓度 KT 和 BA 的浓度均为 0.5、1.0、1.5 mg/L, 分别与浓度为 0.1、0.5 mg/L NAA 组合。

1.2.4 硝酸银 把 1%、3%、5% 的硝酸银过滤灭菌, 注入已灭菌的培养基, 再设对照处理。

1.3 培养条件

除了试验处理, 其它条件均在最适宜状态, 以 MS 为基本培养基, 蔗糖为 30 g/L, 琼脂粉 3 g/L (国药集团化学试剂有限公司), pH 5.8; 培养室温度 $(23 \pm 2)^{\circ}\text{C}$, 光照时间 16 h/d, 随机区组试验设计^[5], 每处理 20 瓶, 重复 3 次, 30 d 后调查结果, 试验统计数据用 SPSS 分析软件^[6] 进行分析。褐化率 = (褐化的外植体数 / 接种总外植体数) $\times 100\%$; 存活率 = (未污染未褐化的外植体数 / 接种总外植体数) $\times 100\%$; 愈伤组织及腋芽萌发诱导率 = (诱导外植体数 / 存活总外植体数) $\times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 灭菌剂对污染率的影响

接种防污染是组培快繁的关键技术, 而外植体灭菌

剂的选择与植物的生物学特性密切相关。选用 4 种灭菌剂对千层金外植体进行消毒处理,从表 1 可知,不同灭菌剂处理均达到比较理想的效果,用 0.1%升汞处理存活率最高,为 64%。其次为次氯酸钙,存活率仅比前者低 4%,消毒相对较差的是过氧化氢,存活率为 46%。但是升汞是由重金属汞离子来达到灭菌的,从材料中去除升汞残毒很难,而且会对环境造成污染,因此,筛选出 5%的次氯酸钙是较佳灭菌剂。

| 表 1 不同灭菌剂对千层金污染率的影响 | | | | | |
|---------------------|-----|-------|-----|-----|-----|
| 灭菌剂 | 浓度 | 消毒时间 | 污染率 | 褐化率 | 存活率 |
| 种类 | / % | / min | / % | / % | / % |
| 氯化汞 | 0.1 | 5 | 35 | 1 | 64 |
| 次氯酸钙 | 5 | 5 | 40 | 1 | 60 |
| 过氧化氢 | 10 | 5 | 51 | 3 | 46 |
| 次氯酸钠 | 2 | 5 | 46 | 1 | 53 |

2.2 取材时期对诱导率、褐化率的影响

在植物的离体培养中,在适宜的季节取材,能提高诱导成功率,降低褐变程度。褐变是组培快繁中常见的一种现象,通常是植物体内的酚类化合物(PPO)被多酚氧化酶氧化,生成的醌类化合物使其它酶系丧失活性,从而毒害组织,使繁殖材料变褐最终死亡的现象。取材时期与植物的基因型密切相关,吴幼媚^[7]对巨尾桉的研究表明,春季萌动率最高,而王续衍^[8]对苹果茎尖离体培养中,发现冬春时间取材褐化率最低。从表 2 可以看出,在一年中不同的月份取材,千层金的褐化率均较低,冬季快繁时,褐变率才仅为 4%,其它时期则更低,通

| 表 3 不同浓度 KT 和 BA 与 NAA 组合对腋芽萌发及愈伤组织诱导影响 | | | | | | | | | | | | | |
|---|------------------------|---------|----|-----|------|--------|------------------------|------------------------|---------|-----|-----|-------|----------------------|
| KT | NAA | 诱导率 / % | | | 平均 | 备注 | BA | NAA | 诱导率 / % | | | 平均 | 备注 |
| / mg · L ⁻¹ | / mg · L ⁻¹ | I | II | III | / % | | / mg · L ⁻¹ | / mg · L ⁻¹ | I | II | III | / % | |
| 0.5 | 0.1 | 60 | 68 | 61 | 63.0 | 13 d 后 | 0.5 | 0.1 | 68 | 61 | 63 | 64.0 | 8 d 出现愈伤组织, 玻璃化略高于前者 |
| 0.5 | 0.5 | 58 | 56 | 54 | 56.0 | 腋芽开 | 0.5 | 0.5 | 71 | 72 | 69 | 70.7 | |
| 1.0 | 0.1 | 96 | 99 | 98 | 97.7 | 始萌动 | 1.0 | 0.1 | 78 | 79 | 75 | 77.3 | |
| 1.0 | 0.5 | 94 | 93 | 91 | 92.7 | 基部出 | 1.0 | 0.5 | 89 | 95 | 88 | 90.7 | |
| 1.5 | 0.1 | 86 | 78 | 81 | 81.7 | 现愈伤 | 1.5 | 0.1 | 96 | 97 | 94 | 95.7 | |
| 1.5 | 0.5 | 78 | 79 | 89 | 82.0 | 组织 | 1.5 | 0.5 | 100 | 100 | 100 | 100.0 | |

2.4 硝酸银对诱导率的影响

在植物组培快繁中,叶片和嫩枝呈透明或半透明水浸状的培养物称为玻璃化苗,它是组培苗的一种生理失调现象^[10]。为了减轻玻璃化对诱导率的影响,在培养基中加入过滤灭菌的硝酸银,从表 5 中看出,与对照相比,加入 1%的硝酸银后,诱导率提高了 28.7%,高达 99%,当浓度提高到 3%,诱导率下降到 92%,而这时的玻璃化率却是最低的,仅为 10%;当硝酸银的浓度增加到 5%,诱导率仅为 64%,比对照的诱导率还低 6%。可能是硝酸银抑制乙烯的活性从而提高了诱导率并降低了玻璃化的产生,但是银离子浓度过高,则对植物细胞产生毒害,诱导率反而下降。

常对离体培育不会产生不利影响。存活率从大到小分别是春、秋、夏、冬;诱导率春、秋 2 个时期最高,分别为 100%、93%,最低是冬季,诱导率为 64.7%。

表 2 不同取材时期对腋芽萌发和愈伤组织诱导的影响

| 取材时期 /月-日 | 诱导率 / % | | | 平均 / % | 褐化率 / % | | | 平均 / % | 存活率 / % |
|--------------|---------|-----|-----|-----------|---------|----|-----|-----------|------------|
| | I | II | III | | I | II | III | | |
| 3-20 | 100 | 100 | 99 | 100 | 1 | 0 | 0 | 0.3 | 68 |
| 6-27 | 88 | 76 | 77 | 80.3 | 3 | 1 | 2 | 2.0 | 62 |
| 9-20 | 97 | 92 | 93 | 94.0 | 1 | 2 | 1 | 1.3 | 58 |
| 11-25 | 68 | 67 | 59 | 64.7 | 4 | 2 | 6 | 4.0 | 46 |

2.3 植物生物调节剂浓度和种类对腋芽萌发及愈伤组织诱导影响

在植物组培快繁中,愈伤组织诱导成败的关键是培养条件,其中激素的种类和浓度最为重要^[9]。在试验中,发现无论是 KT 还是 BA 与 NAA 组合,均能成功的诱导腋芽萌发和愈伤组织,此后愈伤组织逐渐增大呈不规则块状,上有不定芽产生,浅绿色丛生芽结构紧密,呈莲座状。但从表 3 可以看出,最佳的诱导培养基是 MS +KT 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L,虽然腋芽萌动和愈伤形成时间相比较长,可是诱导率高达 97.7%,且玻璃化相对 BA 较低。 $F_{KT}=241.2>F_{0.01}(2,10)=7.6^{**}$, $F_{NAA}=67.8.2>F_{0.01}(1,10)=10.0^{**}$,说明 KT 和 NAA 不同浓度组合对千层金诱导均有显著影响,而 KT 在诱导过程中起主导作用。

表 4 不同浓度硝酸银对诱导率及玻璃化的影响

| 硝酸银 / % | 平均诱导率 / % | | | 平均诱导率 / % | 平均玻璃化率 / % |
|------------|-----------|----|-----|--------------|---------------|
| | I | II | III | | |
| 0(对照) | 70 | 72 | 68 | 70.0 | 33.7 |
| 1 | 99 | 98 | 99 | 99.0 | 26.3 |
| 3 | 94 | 92 | 90 | 92.0 | 10.0 |
| 5 | 67 | 65 | 60 | 64.0 | 24.0 |

3 结论与讨论

在植物组培离体再生体系的建立中,最为关键的一环是无菌培养物产生,而外植体的表面灭菌是否成功就显得尤为重要。植物种类和外植体类型不同,所适用的灭菌剂也不尽相同。对千层金新生顶芽和茎段来说,较适宜的灭菌剂是 5%次氯酸钙,环保并能达到 60%的存活率。

在千层金的组培离体培育中,存活率最高的季节是

春、夏时期, 而诱导率最高的却是春秋 2 季, 分别为 100% 和 94.0%, 这也许是千层金生物学特性决定了自身的生理状态, 可能此时正处于高生长期, 植物体内的内源激素水平相对较高, 对外源激素的诱导敏感, 因而腋芽和愈伤组织诱导率高。

以千层金新生顶芽和侧芽为外植体, 最佳的诱导培养基是 MS+KT 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L, 诱导率为 97.7%。在培养基中添加适当的硝酸银, 能提高诱导率并降低玻璃化率, 当使用 1% 的硝酸银时诱导率最高, 为 99%, 此时玻璃化率也较高, 为 26.3%; 当浓度增加到 3% 时, 诱导率为 92%, 玻璃化率降到 10%, 综合考虑, 最适宜千层金组培诱导的硝酸银浓度应该是 3%。

参考文献

[1] 范仲先. 珍稀彩叶芳香乔木新品种: 千层金[J]. 农村新技术, 2005(7): 31.

- [2] 戴英祥. 最新色叶树种—千层金[J]. 广东园林, 2003(1): 43.
- [3] 陈克翔, 陈存及, 谢玉英等. 千层金组织培养技术[J]. 林业科技开发, 2007(1): 84-85.
- [4] 刘俊武, 李永红, 郭康等. 黄金香柳的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(3): 497.
- [5] 洪伟, 吴孙祯. 实验设计与分析—原理·操作·案例[M]. 北京: 中国林业出版社, 2004.
- [6] 卢纹岱. SPSS 统计分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 262-265.
- [7] 吴幼媚, 王以红, 蔡玲等. 巨尾桉优株芽器官的组培快繁技术研究[J]. 西部林业科学, 2009, 38(3): 28-38.
- [8] 王续衍, 林秦碧, 徐碧玲. 苹果组织培养研究简报[J]. 四川农业大学学报, 1988(1): 46-48.
- [9] 李俊明, 朱登云. 植物组织培养教程[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [10] 李永文, 刘新波. 植物组织培养技术[M]. 北京: 北京大学出版社, 2007.

Preliminary Studying Factor on Effects Germination and Calls Inducing of *Melaleuca bracteata*

QU Fen-xia

(Department of Chemistry and Biology, Hezhou College, Hezhou, Guangxi 542800)

Abstract: The regeneration of *Melaleuca bracteata* the effects of the disinfectant, drawing explants period, the types and concentration of plant growth regulators and silver nitrate on its induction germination and calls were studied with the buds and tender stem segments as explants in this paper. The results showed that 0.1% mercuric chloride with the use of the survival rate of 64% compared to 5% of the calcium hypochlorite is the most environmentally friendly and effective disinfectant, it has the survival rate of 60% when soaked 5 min. The best tissue culture period is the spring and autumn, with an average induction rate of 92.0% over. The best suitable inducing medium was MS+KT 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L. The use of 3% silver nitrate, compared with the control, the induction rate from 70% to 92%, vitrification rate from 33.7% down to 10%.

Key words: *Melaleuca bracteata*; calls; induction rate; survival rate

启 示

本刊对来稿一律采取责编初审、编委学术审、主编终审的审稿程序, 并严格按照核心期刊的标准审阅所有稿件。审稿周期为 20 个有效工作日。同时我刊还利用“学术不端文献检测系统”对所有来稿在初审后进行期刊不端行为检索。

为保证您的论文及时送审, 请仔细检查文章必要信息是否完整, 缺项将不能送审。

必要信息(正文脚注)

1. 基金项目: 标明课题来源及项目编号; 不是回答否。
2. 第一作者简介: 出生年、性别、学历、职称、研究方向、现从事工作、电子信箱、电话及详细通讯地址。(如有通讯

作者格式同第一作者)。

文章书写格式

1. 研究论文: 题目、作者、单位、中文摘要、关键词、正文、正文脚注、参考文献、英文(题目、姓名、单位、摘要、关键词)。
2. 综述类文章: 题目、作者、单位、中文摘要、关键词、正文、正文脚注、参考文献(不少于 5 个)。
3. 栽培技术类文章: 题目、作者、单位、正文、正文脚注、参考文献(可选)。

请在稿件篇头或篇尾注明邮寄期刊的详细地址、邮编, 文章联系人姓名、单位、电话、E-mail。因本刊印数有限, 若因地址不详导致样刊丢失, 恕不补寄。

本刊投稿邮箱: bfybjb@163.com

录退稿信箱: bfybjb@yahoo.com.cn

《北方园艺》编辑部