

孝顺竹外植体适宜消毒方法及丛芽诱导培养基的筛选

李云海, 陈丽华, 杨娟, 喻金

(云南师范大学生命科学学院, 云南 昆明 650092)

竹子是一种重要的非木质资源, 其生长快, 用途广, 不仅具有较高的观赏价值, 应用于园林和城市规划, 而且还具有良好的经济效益和社会效益。全世界有竹类植物70余属, 1 200余种, 而中国就有400多种。由于竹子开花周期长, 获取种子较困难, 而传统的“分箨”等繁殖方法繁殖率较低, 因此, 目前市场上对各竹种种苗的需求量均较大。本试验应用现代植物组织培养技术方法, 解决竹子传统繁殖方法繁殖效率较低的问题, 以期获得大量保持母株特性, 患病少且健壮的竹子试管苗, 为竹类的工厂化育苗奠定基础。

孝顺竹 (*Bambusa multiplex* L.) 是禾本科竹亚科的一种丛生竹, 为中国南方暖地竹种, 主产广东、广西、福建等省, 江苏、浙江、安徽南部栽植亦能正常生长。孝顺竹是丛生竹类中较为耐寒者, 性好高爽, 适生于温暖湿润、背风、土壤深厚的环境, 列植于庭园入口及甬道两侧, 枝叶繁茂, 叶色翠绿, 赏心悦目; 也可植于池旁或园中向阳处作境界。因此, 开展孝顺竹的种苗组织培养快速繁殖研究可满足人们生产和城市绿化建设的种苗需求, 有较高的经济价值。

自1982年Metha等首先用印度刺竹种子合子胚诱导愈伤组织, 形成胚芽和再生植株以来, 国内外在这方面开展了20多年的研究。Banik (1983) 以孝顺竹 (*Bambusa multiplex* L.) 带休眠芽的茎秆作为外植体, 诱导产生丛芽, 并生根移植入土, 成功培育出了大量的再生植株。张春晓、杨本鹏等则对培育竹子试管苗健壮植株的培养基配方进行了实验研究筛选。本文参考他们的研究成果, 对采自本地的孝顺竹的外植体材料, 进行了适宜消毒处理方法和丛生芽诱导适宜培养基的评价筛选试验。现将实验初步结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

采自本地某大学校园的孝顺竹幼枝节段。

1.2 方法

1.2.1 外植体的处理及消毒

剪取生长健壮的孝顺竹幼枝→剥去杆箨与前出叶→将枝条剪成带节的小段 (每段带1个节) →用0.1%的洗洁精溶液浸泡30分钟→自来水浸泡10分钟→流水冲洗数次至无泡沫产生→用滤纸吸干表面水分→75%乙醇消毒15秒 (期间不断摇动) →无菌水浸泡10分钟 (期间不断摇动) →采用6种不同消毒液和不同消毒时间组合进行消毒处理 [①0.1%升汞灭菌5分钟; ②0.1%升汞灭菌10分钟; ③2%NaClO₂灭菌5分钟; ④2%NaClO₂灭菌10分钟; ⑤10%CaClO₂灭菌5分钟; ⑥10%CaClO₂灭菌10分钟 (期间不断摇动)] →无菌水冲洗6次 (每次5分钟, 期间不断摇动) →用无菌滤纸吸干表面水分备用。

1.2.2 起始培养

将处理好的外植体材料正向接种到预备好的起始培养基上 (起始培养基为1/2 MS+NAA 0.1 mg/L), 每种处理30个材料 (每瓶接种3个材料, 共接种10瓶), 并置于温度为25~28℃, 光照强度1 500 lux和光照时间12小时/天条件下培养2周。比较不同消毒处理方法下外植体的成活及污染情况。

1.2.3 丛生芽诱导培养

将起始培养15天后仍存活的无菌外植体分别转接到如下丛生芽诱导培养基上:

①MS+6-BA 2.0 mg/L+KT 0.5 mg/L+蔗糖30 g/L+椰子汁100 ml/L;

②MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+蔗糖30 g/L+椰子汁100 ml/L;

③MS+2, 4-D 0.2 mg/L+KT 2.0 mg/L+蔗糖30 g/L+椰子汁100 ml/L;

④1/2 MS+NAA 0.1 mg/L+蔗糖30 g/L+椰子汁100 ml/L (对照)。

培养条件同上, 比较不同培养基情况下出芽率及芽的生长状态。

2 结果与分析

2.1 无菌株系的获得

表1 不同消毒处理方法对外植体污染率的影响

消毒剂	消毒时间 (分钟)	接种数	污染数	污染率 (%)	污染 程度
0.1%升汞	5	30	18	60.0	+++
0.1%升汞	10	30	2	6.7	+
2% NaClO ₂	5	30	24	80.0	+++
2% NaClO ₂	10	30	17	56.7	+++
10% CaClO ₂	5	30	22	73.3	+++
10% CaClO ₂	10	30	15	50.0	++

注: +表示轻微污染; ++表示较严重污染; +++表示严重污染。

表2 不同培养基对孝顺竹丛芽诱导效果的影响

培养基	接种 数	成活 数	出芽 数	丛芽 数	出芽 率(%)	丛芽 率(%)
1	30	30	21	3	70.0	14.3
2	30	30	28	12	93.3	42.9
3	30	29	25	3	86.2	12.0
4	30	24	6	0	25.0	0

将不同消毒方法处理后的材料正向接种于起始培养基2周后, 外植体材料被霉菌或细菌污染及成活的情况统计如表1所示。从表1可以看出, 由于消毒处理方法的不同, 起始培养的外植体材料污染率在6.7%~80.0%。污染率最低的消毒灭菌方法是用0.1%升汞处理10分钟, 污染率仅6.7%; 污染率较高的消毒灭菌方法是用10%CaClO₂处理5分钟和用2%NaClO₂处理5分钟(污染率73.3%和80.0%); 其余处理方式污染率中等, 为50.0%、56.7%和60.0%, 比较而言, 用0.1%升汞处理10分钟且经过多次无菌水漂洗后的成活外植体材料无褐变等现象。因此, 在本实验中, 我们得出用0.1%升汞处理10分钟的方法是孝顺竹外植体较适宜的消毒灭菌方法, 可为下一步丛芽诱导培养等奠定良好的基础。

2.2 丛芽诱导培养基的确定

不同激素组合的培养基对孝顺竹丛芽诱导的影响结果见表2。从表2可以看出, 2号培养基对孝顺竹的丛芽诱导效果最好, 其外植体材料的出芽率最高, 为93.3%; 且诱导出的丛芽率也是最高的, 为42.9%。其余培养基, 如1号培养基和3号培养基, 与对照培养基相比, 虽然出芽诱导率较高(70.0%和86.2%), 但丛芽诱导率较低(14.3%和12.0%)。因此, 我们认为2号培养基(MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+蔗糖30 g/L+椰子水100 ml/L)为本实验孝顺竹丛芽诱导较适

宜的培养基。

3 讨论

竹子作为重要的林木资源, 在以伐代木、退耕还林、园林绿化、保护生态环境和提供绿色食品等方面均有重要的作用, 因此生产上需要大量的优质良种竹苗。传统的竹苗繁殖主要采用分箨、埋竹节或枝条扦插等方法, 一些竹种也采用种子繁殖的方法, 但较难得到种子且繁殖率或出芽率均较低。另外, 许多竹品种的枝条扦插生根困难, 其繁殖速度远远不能满足生产的需要。因此, 利用组织培养方法进行竹子种苗的快速繁殖, 以解决生产中这一问题, 已成为人们的共识。本实验以孝顺竹的幼枝节段作为外植体材料, 对外植体的消毒处理方法和丛芽诱导培养基等进行了筛选试验, 获得了适宜的消毒处理方法和丛生芽诱导培养基, 分别为0.1%升汞处理10分钟和MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+蔗糖30 g/L+椰子水100 ml/L。培养成活的外植体材料和诱导出的丛生芽为快速增殖和生根诱导培养等提供了基础。

提高蛋鸡产蛋率6法

1 选择轻型蛋鸡

实践表明, 产蛋相同的母鸡, 体重每增加0.25 kg, 每年约多耗料3 kg。因此, 生产上应选择体型较小的品种, 同一品种以中等体重为宜, 成年鸡体重约2 kg。

2 科学配制日粮

蛋鸡产蛋初期饲料中的蛋白质含量应稍高于饲养标准, 产蛋高峰期应将日粮中蛋白质的含量提高到19%。最好将饲料加工成直径0.5 cm的颗粒料, 以利于提高饲料的适口性, 减少浪费。

3 精心饲喂

据饲养实践, 饲槽加满料, 饲料浪费40%; 加料2/3, 浪费12%; 加料1/2, 浪费5%; 加料1/3, 浪费2%。因此, 添加饲料时要做到少量多次, 每次加料不宜超过料槽的1/3。同时要供给充足洁净的饮水, 补喂优质新鲜的青绿多汁饲料。另外, 要给蛋鸡提供直径4~5 mm的砂粒, 让鸡自由采食, 以利于食物消化。育成期蛋鸡可限喂20%~30%的饲料, 以控制其体重。一般以产蛋高峰为界(40周龄左右), 前期限喂量宜小, 后期限喂量宜大, 控制饲料用量6%~10%。

4 增加添加剂

在日粮加入3%~5%的油脂, 可提高产蛋率10%~12%; 在日粮中添加0.02%~0.1%的维生素C, 可提高产蛋率4%, 提高饲料利用率8%~10%; 在日粮中添加50 mg/kg的色氨酸, 可提高产蛋率10%。此外, 在日粮中添加杆菌肽锌、北里霉素等, 既可防病又能提高产蛋率。

5 科学管理

鸡产蛋前的适宜温度为13~23℃, 温度为50%~55%, 过高或过低的温度、湿度会导致饲料利用率、产蛋量下降。蛋鸡可采用间隙光照, 每天16小时, 光照强度以鸡能看见觅食为准。饲养密度: 夏季圈养以4~6只/m²为佳, 笼养以不超过10只/m²为好; 冬季饲养密度可提高30%左右。雏鸡7日龄左右要断喙, 防止产生啄癖。采用底尖肚大口小的船形长食槽最好, 装料多且不易外撒。每天清扫鸡舍, 严格消毒, 每2个月给鸡驱虫1次, 搞好疫病的免疫接种工作, 禁止滥用药物。经常观察鸡群, 发现病鸡及时隔离诊治。

6 强制换羽

当蛋鸡产蛋量下降50%时, 可采取人工手段使鸡体重下降30%, 让蛋鸡在短时间内换羽, 经过40~50天, 产蛋量可恢复60%, 进入第2个产蛋期。另外, 在日粮中添加2.5%氧化锌, 可促进蛋鸡换羽, 缩短换羽时间, 促其提前产蛋。

洪学 (吉林省大安市龙沼镇农技服务站畜牧组 131300)