

红树秋茄愈伤组织诱导的初步研究

黄有军 (浙江林学院林业与生物技术学院, 浙江临安 311300)

摘要 以秋茄顶芽和幼叶为外植体研究了光照和黑暗条件下不同激素对比对愈伤组织形成的影响。结果表明, 外源生长素对秋茄幼叶愈伤组织形成是必需的, 1 mg/L 2,4-D 或 4 mg/L 以上的 NAA 对愈伤组织形成有较好作用, 添加一定量的外源 BA 有助于提高愈伤组织诱导率。2,4-D 较 NAA 有较强的愈伤组织诱导能力。

关键词 秋茄; 组织培养

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)27-08467-01

Preliminary Study on the Induction of Callus in *Kandelia candel*

HUANG You-jun et al (School of Forestry & Bio-technology, Zhejiang Forestry University, Linan, Zhejiang 311300)

Abstract The effect of various hormones ratio combinations under light or dark condition on *Kandelia candel* callus formation was studied with the terminal bud and young leaf as explants. The result showed that: the exogenous growth substances were necessary for callus formation. 1 mg/L 2,4-D or 4 mg/L NAA can promote callus formation better. The addition of BA was helpful to induce callus and 2,4-D was more efficient for callus formation than NAA.

Key words *Kandelia candel*; Tissue culture

秋茄(*Kandelia candel*)是我国东南沿海的主要红树林造林树种^[1], 其自然分布北界位于闽北 27°20'N, 浙江温州有少量人工栽培^[2-3]。浙江及以北海岸线一直缺乏很好的防护林体系^[4-5]。至今尚未见红树秋茄组织培养的报道, 建立秋茄组织培养体系为耐寒株系筛选奠定基础, 也为在沿海盐碱地推广红树秋茄提供技术保障。

1 材料与方法

1.1 试验材料 选自浙江乐清湾人工红树林胚轴, 水培条件培养, 长叶后取其顶芽、幼叶作为外植体进行组织培养。

1.2 试验方法 将外植体放置 4℃ 冰箱 12 h 后, 在洗洁精溶液中浸泡 5 min, 自来水冲洗 2 h, 在无菌条件下将外植体置于 70% 乙醇浸泡 30 s, 然后用 0.2% 升汞溶液消毒 8 min, 无菌水漂洗 4 次, 放入装有无菌水的培养皿中。在无菌水覆盖的前提下用非金属刀切取 2~3 mm 的顶芽、约 9 mm² 大小的叶块接种在不同激素配比的培养基上进行愈伤组织的诱导。

以 MS 为基本培养基, 分别添加不同浓度的外源生长素 2,4-D、NAA 以及不同浓度的外源细胞分裂素 6-BA 作激素配比完全试验(表 1)。并加入琼脂 8 g/L、蔗糖和活性炭 0.1%。置 25℃ 培养, 光暗周期 12 h/12 h, 光强 2 000 lx, 或完全黑暗条件。每处理接种 30 瓶。统计愈伤组织形成率。

2 结果与分析

2.1 光照或黑暗条件对外植体褐化的影响 光照条件下, 其外植体顶芽 7 d 内均完全褐化; 而外植体叶块除切口处稍有褐化外, 材料基本保持绿色不变褐。黑暗条件下, 外植体褐化现象总体上要比光照条件下轻, 但顶芽外植体在十多天后仍然逐渐褐化而死亡。外植体叶块则一般无褐化现象。这可能是因为顶芽取的过大(2~3 mm), 内部已分化形成初生维管束, 有一定的木质化成分, 且次生物质已经开始积累。因此顶芽作外植体组织培养不合适, 但可以尝试用茎尖(< 0.5 mm)培养。用幼叶作外植体能有效避免褐化现象的发生。以下试验均以幼叶为外植体进行。

2.2 愈伤组织发生 接种 20 d 后在切口处略能看到愈伤组织, 30 d 左右愈伤组织逐渐明显, 松散, 呈淡黄色。之后愈伤组织不再扩大, 约 60 d 愈伤组织逐渐变黄变枯死亡。

2.3 不同激素对比对愈伤组织形成的影响 由表 1 可知, 不加激素条件下, 外植体叶块在基本培养基上培养不能形成愈伤组织, 仅施加外源细胞分裂素(BA)而无外源生长素, 同样不能形成愈伤组织, 而在施加外源生长素的前提下, 不论有无 BA, 愈伤组织均可发生, 说明外源生长素对秋茄幼叶的愈伤组织形成是必需的。2,4-D 能诱导愈伤组织的形成, 2,4-D 1 mg/L 较 0.5 mg/L 有更好的诱导率, 如培养基③诱导率(30.8%)较②(18.5%)高, ⑦较⑥高, ⑪比⑩高, ⑮比⑭高。但当 2,4-D 浓度提高到 2 mg/L 时诱导率下降。在不添加外源 BA 的前提下处理②~④, 愈伤组织能够发生, 但形成率不高; 而添加了外源 BA 后, 形成率有一定程度提高, 其中处理⑪最高, 达 57.1%。当 BA 浓度达 4 mg/L 时, 愈伤组织形成率有所下降, 说明一定浓度的 BA 在愈伤组织形成过程中有增进作用, 但浓度不能过高。

表 1 不同激素对比对愈伤组织诱导的影响

处理号	激素配比 mg/L	形成率/%	光照	黑暗	处理号	激素配比 mg/L	形成率/%
①	2,4-D0 + BA0	0	0		⑮	NAA0 + BA0	0
②	2,4-D0.5 + BA0	18.5	20.3		⑯	NAA1 + BA0	3.9
③	2,4-D1 + BA0	30.8	38.4		⑰	NAA2 + BA0	16.0
④	2,4-D2 + BA0	28.6	33.9		⑱	NAA4 + BA0	18.4
⑤	2,4-D0 + BA1	0	0		⑲	NAA0 + BA1	0
⑥	2,4-D0.5 + BA1	24.0	30.1		⑳	NAA1 + BA1	7.8
⑦	2,4-D1 + BA1	35.7	42.2		㉑	NAA2 + BA1	17.6
⑧	2,4-D2 + BA1	32.0	49.2		㉒	NAA4 + BA1	23.2
⑨	2,4-D0 + BA2	0	0		㉓	NAA0 + BA2	0
⑩	2,4-D0.5 + BA2	18.3	23.5		㉔	NAA1 + BA2	6.7
⑪	2,4-D1 + BA2	57.1	68.4		㉕	NAA2 + BA2	28.2
⑫	2,4-D2 + BA2	44.4	56.1		㉖	NAA4 + BA2	36.5
⑬	2,4-D0 + BA4	0	0		㉗	NAA0 + BA4	0
⑭	2,4-D0.5 + BA4	7.7	13.7		㉘	NAA1 + BA4	0
⑮	2,4-D1 + BA4	16.7	17.8		㉙	NAA2 + BA4	6.6
⑯	2,4-D2 + BA4	18.5	22.5		㉚	NAA4 + BA4	8.1

当外源生长素为 NAA 时, 其愈伤组织发生规律与 2,4-D

(下转第 8486 页)

基金项目 浙江省教育厅(高校青年教师项目)、浙江林学院启动基金(2002f012)资助。

作者简介 黄有军(1971-), 男, 浙江兰溪人, 硕士, 讲师, 从事植物学教研工作。

收稿日期 2007-06-05

2 结果与分析

2.1 不同配方培养基对菌丝生长的影响

2.1.1 母种不同配方培养基菌丝生长情况。采集野生松乳菇子实体进行组织分离。将紫肉和黄肉两种菌孢子实体组织块分别接种到5种不同培养基上,于25℃下恒温培养,3~4 d后即长出菌丝体,15 d左右布满试管斜面,然后提纯扩接。扩接的母种生长速度快,仅4~6 d即可满管。由表1可见,5种母种培养基配方均适宜松乳菇菌丝体的生长,其中配方②生长速度最快,4 d满管,且菌丝生长势强,菌丝粗壮、洁白、浓密;其余依次是配方⑤和配方④、③、①。

表1 在不同培养基对菌丝生长的影响

配方	平均长速 mm/d	满管时间 d	外观长势
①	15.8	6.0	较壮、白、较密
②	23.7	4.0	粗壮、洁白、浓密
③	17.3	5.5	粗壮、较白、较密
④	19.0	5.0	粗壮、较白、较密
⑤	19.0	5.0	粗壮、较白、较密

2.1.2 原种、栽培种不同配方培养基对菌丝生长的影响。由表2可见,7种培养基对菌丝体的生长速度和长势均有显著影响,其中配方⑦菌丝生长速度与生长势均最好,为最佳配方,其余从生长速度来说,依次配方为⑥、⑤、③、②、①、④,但从生长势来看,配方②、③相对较弱,可能与松林土营养成分少有关。原种与栽培种两者的试验结果是一致的。

2.2 模拟栽培驯化试验 在室内人工栽培能观察到有菌丝长出,几天后发现菌丝慢慢消失,此时检查发现菌丝生长过程中有大量虫螨侵害。室外栽培观察,前期有菌丝出现,后期菌丝逐渐变少。半人工模拟栽培亦未取得预期结果,可能与播种后当地气候干旱少雨有关。

(上接第8467页)

效应基本一致,外源NAA能诱导愈伤组织的形成,且随着浓度的提高(0~4 mg/L),其形成率呈上升趋势。另外,相同浓度2,4-D和NAA的愈伤组织诱导率不同,NAA诱导率要低于2,4-D。低浓度的BA在其中起促进作用,高浓度的BA则对愈伤组织形成有阻碍作用。

2.4 光照或黑暗条件对愈伤组织形成的影响 由表1可见,在2,4-D和BA相同配比的前提下,黑暗条件下愈伤组织形成率高于光照条件,说明秋茄树幼叶愈伤组织形成不需要光照的参与,而在黑暗下可能会减少一些体内的消耗,从而促进了愈伤组织的形成。

3 结论与讨论

(1)顶芽(2~3 mm)褐化明显,幼叶褐化程度低,可以作为红树秋茄组织培养的的外植体。黑暗条件可以减少褐化现象的发生,与报道相吻合^[6-8]。

(2)外源生长素对秋茄幼叶愈伤组织形成是必需的,这与银杏愈伤组织诱导一致^[9]。当2,4-D浓度在1 mg/L时有较高的愈伤组织诱导率,添加一定量的外源BA有助于提高愈伤组织诱导率,过高的外源BA则抑制愈伤组织的发生^[10]。

表2 不同配方培养基对原种和栽培种菌丝生长的影响

配 方	原种			栽培种		
	平均长 速//mm/d	满袋时 间//d	外观长势	平均长 速//mm/d	满袋时 间//d	外观长势
①	6.67	18.0	较弱、浅白、较密	4.64	28	较弱、浅白、较密
②	7.06	17.0	纤细、浅白、稀疏	5.00	26	纤细、浅白、稀疏
③	7.50	16.0	纤细、浅白、稀疏	5.20	25	纤细、浅白、稀疏
④	5.45	22.0	较弱、浅白、较密	4.33	30	较弱、浅白、较密
⑤	8.28	15.0	较弱、浅白、较密	5.65	23	较弱、浅白、较密
⑥	8.57	14.5	粗壮、较白、浓密	5.91	22	粗壮、较白、浓密
⑦	8.89	13.5	粗壮、洁白、浓密	6.50	20	粗壮、洁白、浓密

3 结论

(1)母种培养基以配方②为最佳,即:马铃薯200.00 g,葡萄糖20.00 g,琼脂20.00 g,蛋白胨2.00 g,硫酸镁1.90 g,磷酸二氢钾3.75 g,VB₁12.5 mg,水1 000 ml。

(2)原种、栽培种培养基配方。试验结果表明,无松林土、有松木屑的培养基,松乳菇菌丝均能生长,其中以配方⑦即棉籽壳88%、松木屑10%、糖2%的最佳,菌丝生长最快,长势最好,菌丝粗壮、洁白、浓密。

(3)经过在室内、室外人工模拟栽培松乳菇,能观察到菌丝体,但未看到子实体形成,有待进一步探讨。

参考文献

- [1] 潘崇环,孙萍,龚翔,等.珍稀食用菌栽培与名贵野生菌的开发利用[M].北京:中国农业出版社,2004:300-309.
- [2] 刘旭东.中国野生大型真菌彩色图鉴[M].北京:中国林业出版社,2004:31-39.
- [3] 彭克俭.松乳菇生物学特性的研究[J].食用菌,1998,20(1):14-16.
- [5] 刘建成.松乳菇深层发酵试验初探[J].中国食用菌,1996,17(2):31-32.
- [6] 傅伟杰,许广波,陈艳秋,等.松口蘑的半人工驯化栽培[J].中国食用菌,1999,18(6):10-11.
- [7] 龚翔.野生虎皮香菇驯化栽培研究[J].食用菌,2000,22(2):8-9.
- [8] 高继俊.杨树木屑栽培平菇配方试验[J].食用菌,2005,153(1):25.

(3)NAA浓度 ≥ 4 mg/L时对秋茄产生较高的愈伤组织诱导率。相同浓度下2,4-D诱导愈伤组织的能力较NAA强。

(4)秋茄愈伤组织形成不需要光的参与。

参考文献

- [1] CHEN LZ, WANG WQ, LIN P. Photosynthetic and physiological responses of Kandelia candel (L.) Druce seedlings to duration of tidal immersion in artificial seawater[J]. Environ Exp Bot, 2005, 54: 256-266.
- [2] 李建清,徐何方,叶丽珍,等.秋茄红树林北移引种造林技术[J].浙江林业科技,2001,21(6):51-53.
- [3] 牟爱友,刘际建,杨建清,等.我国最北缘秋茄红树林引种试验调查[J].防护林科技,2005(1):6-8.
- [4] 周生贤.全面加强沿海防护林体系建设,加快构筑我国万里海疆的绿色屏障[J].世界林业研究,2005,18(4):1-6.
- [5] 黄志伟,余树全,胡庭兴,等.我国沿海防护林植被生态恢复技术研究进展[J].浙江林业科技,2006,26(5):66-70.
- [6] DAN-HUA YU, CAROLE P MEREDITH. The influence of explant origin on tissue browning and shoot production in shoottip cultures of grapevine[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1986, 111(6): 972-975.
- [7] 姚洪军,罗晓芳,田砚亭.植物组织培养外植体褐变的研究进展[J].北京林业大学学报,1999,21(3):78-84.
- [8] 张卫芳,高强生,欧勇慧,等.核桃组培中抑制褐化现象初探[J].中国农学通报,2003,19(5):43-46.
- [9] 徐刚标,何方,陈良昌,等.银杏愈伤组织诱导与继代培养的研究[J].中南林学院学报,1999,19(3):32-36.
- [10] 刘传飞,李玲,施和平,等.生长素和细胞分裂素物质对野葛外植体器官发生的影响[J].华南师范大学学报:自然科学版,1999(2):100-104.