

美国红栌组培快繁灭菌措施的研究

姜春武¹ 田成利² 徐六一¹ 傅玉兰²

(¹安徽省林业科学研究院,安徽合肥 230031; ²安徽农业大学林学与园林学院)

摘要 美国红栌的茎段为外植体,运用正交设计对美国红栌在离体初代培养过程中不同灭菌方法的灭菌效果和不同腋芽诱导方法的诱导结果进行了研究。结果表明其最佳灭菌措施为:切取美国红栌茎段→用洗衣粉上清液浸泡 15min,并用毛笔刷去材料表面污垢→自来水冲洗 30min→超净台上用 70%酒精浸泡 10s→无菌水冲洗 2 次→0.1%升汞溶液浸泡 8min→无菌水冲洗 8 次→100mg/L 的 Vc 液浸泡 10min→无菌水冲洗 1 次。

关键词 美国红栌;组培;灭菌措施

中图分类号 S687;S792.11 **文献标识码** A **文章编号** 1007-5739(2008)17-0017-03

美国红栌[Cotinus coggryia (Royal purple)]为漆树科黄栌属美国黄栌(C. coggryia)的一个变种,原产于美国,系亚热带树种。美国红栌,落叶灌木或小乔木,树冠卵圆形至半圆形,小枝紫红色,叶片比普通黄栌叶片大。美国红栌,一年三季之中,叶色富于变化:初春时树体的全部叶片为鲜嫩的红色,或紫色,娇鲜欲滴;春夏之交,叶色红而亮丽;至盛夏时节,树体下部叶片开始渐渐转为绿色,但顶梢新生叶片始终为深红色,或紫色,远看彩色缤纷;而入秋之后随着天气转凉,整体叶色又逐渐转变为深红色,秋霜过后,叶色更加红艳美丽。入冬前,美国红栌叶片挂树时间长于普通黄栌,观景时间更长。美国红栌夏季开花,于枝条顶端花序絮状,有淡紫色羽毛状伸长花梗,宿存树梢较久,观之如烟似雾,故又有“烟树”之称,美不胜收。在园林绿化中宜丛植于草坪、土丘、山坡,或混植于其他树群中,尤其是点缀在长绿树群中,可保持 1 年常红,具有广阔的发展前景。

1 材料与方法

1.1 材料

以安徽省农科院蚕桑所苗圃内发育良好的美国红栌优株茎段为试验材料。

1.2 外植体无菌材料的建立

选取长势良好的美国红栌植株的一年生嫩枝,去除叶片,切成 1.5~2.0cm 长带节的茎段作为外植体。首先用毛笔轻轻刷去外植体表面的灰尘,再将外植体用洗衣粉上清液浸泡 15min,并用毛笔刷洗材料表面;然后用自来水冲洗 0.5h 后,在超净台上将外植体材料经过 9 种不同的灭菌方式处理,每个处理接种 20 瓶。灭菌方式的具体处理如表 1。最后在超静台上将茎段两端切去 0.5cm,并接种于培养基(MS+6-BA 2.0mg/L+NAA 0.1mg/L),置于相同的培养条件下[(25±2)℃、光照 12h/d、光强 2 000~2 500Lx]。每 2d 调查记录 1 次材料污染情况,经过 2 周培养后统计接种材料的灭菌效果,运用 SPSS 软件进行分析,从而筛选出最佳的灭菌措施。

为了解 70%酒精、0.1%升汞和 Vc 以及不同培养条件的处理对美国红栌灭菌效果的影响,本试验采用 4 因素 3 水平正交设计 L₉(3⁴) (见表 1),每瓶接种 1 个美国红栌茎段,

每个处理接种 8 瓶,重复 3 次。70%酒精设置 3 个水平:a₁(10s)、a₂(20s)、a₃(30s);0.1%升汞设置 3 个水平:b₁(6min)、b₂(8min)、b₃(10min);Vc 设置 3 个水平:c₁(5min)、c₂(10min)、c₃(20min);培养条件设置 3 个水平:d₁(15℃暗培养)、d₂(20℃暗培养)、d₃(15℃光照培养)。

表 1 美国红栌茎段灭菌处理

处理序号	70%酒精浸泡时间//s	0.1%升汞浸泡时间//min	Vc 浸泡时间//min	培养条件
1	10	6	5	15℃暗培养
2	10	8	10	20℃暗培养
3	10	10	20	15℃光照培养
4	20	6	10	15℃光照培养
5	20	8	20	15℃暗培养
6	20	10	5	20℃暗培养
7	30	6	20	20℃暗培养
8	30	8	5	15℃光照培养
9	30	10	10	15℃暗培养

注:以上各组培养基均添加蔗糖 30g/L,琼脂 8g/L,pH 值 5.8~6.0。

2 结果与分析

培养 20d 后,统计污染率、成功率、褐变指数(见表 2),并进行方差分析。

表 2 不同灭菌措施对外植体灭菌效果的影响 (3 次重复的统计)

处理序号	污染数 个	萌发数 个	成功率 %	褐化指数	污染率 %
1	7	7	27.7	2.75	27.7
2	8	8	33.3	1.67	33.0
3	2	15	60.0	1.73	7.0
4	4	13	53.3	1.33	13.0
5	2	23	93.3	0.80	7.0
6	0	7	27.0	1.60	0
7	5	8	33.0	1.00	19.0
8	9	7	27.0	1.64	40.0
9	4	18	72.0	1.28	13.0

对褐变指数进行方差分析(见表 3),结果表明处理的总效应和 a 及 d 因素达到显著水平(P≤0.05),这说明在本试验中酒精的浸泡时间、培养条件对美国红栌褐变程度有显著影响,是影响褐变程度的重要因素。b 和 c 因素的效应均未达到显著水平(P>0.05),这说明在本试验中升汞浸泡时间和 Vc 浸泡时间对褐变程度的影响不大,不是主导因素。进一步对 a 因素和 d 因素进行多重比较。

2.1 酒精浸泡时间对褐变程度的影响

收稿日期 2008-07-05

表3 褐变指数方差分析

变异来源	第Ⅲ类型平方和	自由度	均方	F值	P值
校正模型	3.646	8	0.456	1.999	0.046
a(酒精)	2.373	2	1.186	5.203	0.016
b(升汞)	0.069	2	0.035	0.152	0.860
c(Vc)	0.851	2	0.425	1.865	0.184
d(培养方式)	0.353	2	0.177	0.775	0.047
误差	4.104	18	0.228		
总和	75.374	27			
校正总和	7.750	26			

由表4多重比较得知,a因素3水平之间 a_1 和 a_3 水平之间差异极显著, a_1 和 a_2 差异显著。从平均值看 a_1 水平的值最高,所以在灭菌过程中对酒精浸泡时间进行筛选时应选用 a_1 即酒精浸泡10s。

表4 a因素3水平 Duncan 检验(褐变程度)

水平	平均值
a_1	2.00 ^{aA}
a_2	1.44 ^{aAB}
a_3	1.31 ^{bB}

注:右上角不同小写字母数值表示差异显著($P \leq 0.05$),不同大写字母数值表示差异极显著($P \leq 0.01$),下同。

2.2 培养方式对褐变程度的影响

由表5多重比较得知,d因素3水平之间 d_2 和 d_1 、 d_3 水平之间差异显著, d_1 和 d_3 之间差异不显著,这说明对褐变有明显影响的是温度。从平均值看 d_3 水平的值最高,故 d_3 最优,所以在灭菌过程中对培养条件进行筛选时应选用 d_3 ,即15℃光照培养。

表5 d因素3水平 Duncan 检验(褐变程度)

水平	平均值
d_3	1.68 ^{aA}
d_1	1.64 ^{aA}
d_2	1.42 ^{bA}

对污染率进行方差分析结果表明(见表6),处理总效应未达到显著水平($P=0.616 > 0.05$),这说明在本试验中这几种灭菌措施对污染率的控制没有明显的作用。

表6 污染率方差分析结果

变异来源	第Ⅲ类型平方和	自由度	均方	F值	P值
校正模型	0.431	8	0.054	0.793	0.616
总和	2.508	27			
校正总和	1.654	26			

由表7方差分析结果表明:处理总效应和b因素、c因素($P=0.012 \leq 0.05$)的作用达到显著水平。这说明在本试验中升汞浸泡时间和Vc浸泡时间对成功率具有显著的影响。进一步对b因素、c因素进行多重比较。

表7 成功率方差分析

变异来源	第Ⅲ类型平方和	自由度	均方	F值	P值
校正模型	1.540	8	0.193	3.119	0.021
a(酒精)	0.131	2	0.066	1.065	0.365
b(升汞)	0.391	2	0.195	3.164	0.066
c(Vc)	0.701	2	0.350	5.677	0.012
d(培养方式)	0.317	2	0.159	2.571	0.104
误差	1.111	18	0.062		
总和	9.481	27			
校正总和	2.651	26			

2.3 升汞浸泡时间在灭菌过程中对成功率的影响

由表8多重比较得知,b因素3水平之间 b_2 和 b_1 之间差异显著, b_1 与 b_3 之间差异不显著,由于 b_2 的平均值最高,故在筛选b因素时以 b_2 水平为最佳,即升汞浸泡8min。

表8 b因素3水平 Duncan 检验(成功率)

水平	平均值
b_2	0.67 ^{aA}
b_3	0.46 ^{aAB}
b_1	0.38 ^{bA}

2.4 Vc浸泡时间在灭菌过程中对成功率的影响

由表9多重比较得知,c因素3水平之间 c_1 与 c_2 、 c_3 之间差异极显著, c_2 与 c_3 之间差异显著,由于 c_2 的平均值最高,故在筛选c因素时以 c_2 水平为最佳,即Vc浸泡10min。

表9 c因素3水平 Duncan 检验(成功率)

水平	平均值
c_2	0.62 ^{aA}
c_3	0.53 ^{bA}
c_1	0.30 ^{bB}

综合分析,美国红栎灭菌措施最佳组合是 $a_1 b_2 c_2 d_3$,即自来水冲洗30min→超静台上70%酒精浸泡10s→无菌水冲洗2次→0.1%升汞浸泡8min→无菌水冲洗8次→100mg/L的Vc浸泡10min→接种后放在15℃的条件下光照培养。

3 结论与讨论

3.1 结论

3.1.1 美国红栎组织培养条件。培养条件:温度(25 ± 2)℃、光照时间12~14h/d、光照强度1500~2500Lx。

3.1.2 外植体的选择。美国红栎组织培养的外植体宜选用发育良好的美国红栎优株茎段。

3.1.3 外植体无菌体系的建立。美国红栎最佳灭菌方法是:美国红栎茎段→用洗衣粉上清液浸泡15min,并用毛笔刷去材料表面污垢→自来水冲洗30min→超静台上用70%酒精浸泡10s→无菌水冲洗2次→0.1%升汞浸泡8min→无菌水冲洗8次→100mg/L的Vc浸泡10min,将茎段芽两端各切去约0.5cm→取出吸干水分→接种。

3.2 讨论

3.2.1 外植体的消毒。树木生长周期长,在自然状态下,其各部分表层组织不同程度受到各种微生物的污染。由于枝条长期暴露野外,杂菌污染相当普遍,有些杂菌甚至能够侵入组织内部,导致形成层的内侧均发现有细菌污染,所以在继代过程中也有可能发生细菌污染。

在本试验中,我们尽量避免阴雨天在田间采取外植体,因为材料经过日晒后可杀死部分微生物。选取的外植体是中上部枝条上带腋芽的茎段,从灭菌效果看,成功率最高可达93.3%,如果在继代过程中一旦发生污染,就很难对其进行2次消毒利用,所以必须在初代时严格做好外植体的灭菌工作。

3.2.2 外植体的选择。在以后的试验中,可以尝试采用茎尖、叶片,或采用新生的或新抽的材料如水培抽出的芽条、新萌发的萌条等材料,以获得更高诱导的成功率。

培育无菌苗为外植体是近年来被认为行之有效的办法,

即利用种子在无菌的条件下经严格消毒灭菌后培育成无菌苗,然后采用无菌苗茎尖、茎段、叶片等为材料,既可减少污染,其成功率也较高,在今后的试验中可以考虑采用。

3.2.3 褐化问题。在组织培养过程中,褐化问题是最难克服的问题之一。当外植体被切割和接种时,损伤的切面细胞中酚类物质会在多酚氧化酶的作用下发生氧化反应,形成有毒的醌类物质,发生褐变。醌会逐渐扩散到培养基中,抑制其他酶的活性,导致组织代谢紊乱,对外植体的脱分化产生严重的影响,毒害整个组织。外植体的褐变也与培养基的成分有关。合适培养基的选择是防治褐化的手段之一。过高的无机盐浓度会刺激外植体的伤口释放更多的酚类物质,加重褐变。采用降低无机盐浓度的培养基可以缓解褐化的发生。这种现象在其他木本植物的组织培养中也有报道。

同时,在灭菌过程中,由于消毒剂具有很强的穿透力和杀伤力,容易杀死或损伤细胞,造成细胞长势不良,释放酚类物质导致褐变,所以消毒剂类型的选择和消毒时间的长短也非常重要。

防止外植体褐变,最常用的方法是在培养基中加入抗氧化剂来抑制酚类物的氧化或用酚类物质吸附剂吸收这些

物质。PVP(聚乙烯吡咯烷酮)是酚类物质的专一吸附剂,它可以使多酚化合物不能成为多酚氧化酶的底物,从而抑制褐化的发生。

活性炭是组织培养工作中常用的物质之一,它具有大量小孔和巨大的表面积,吸附能力强,可以吸附一些有害物质的影响,减少其对植株的毒害。但是由于其吸附能力没有选择性,同样会吸附培养基中营养物质和生长激素,从而延缓植株的生长。在本试验中就发现添加活性炭后,丛生芽的增殖低于未添加活性炭的处理组。

4 参考文献

- [1] 王少平,赵兰枝,侯富荣,等.彩叶植物在城市园林中的应用初探[J].河南职业技术学院学报,2003,31(1):37-39.
- [2] 侯修胜.美国红栎的栽培及开发价值[J].林业实用技术,2002(7):14-15.
- [3] 崔俊茹,陈彩霞,李成,等.美国红栎的组织培养和快速繁殖[J].植物生理学通讯,2004,40(5):588.
- [4] 郝砚英,吴国智,王芝学,等.美国红栎茎段的离体培养与快速繁殖[J].天津农业科学,2005,11(1):32-33.
- [5] 李双云,冯建华,刘翠兰,等.美国红栎的组培快繁试验[J].山东林业科技,2005(5):18.
- [6] 刘杰,罗晓芳,陈雪梅.美国红栎的组织培养与快速繁殖[J].河北林果研究,2004,19(1):63-65.

(上接第15页)

较对照晚2d,劣质笋率达到13.9%,较对照增加8.7%,茎粗减少0.13cm;尤其培土高度20cm时,初笋较对照延长3d,劣质笋率达到20.4%,较对照增加15.2%,茎粗减少0.20cm。这是由于土壤黏重,紧实程度高,表土易板结,培土垄过高,造成春季地温低,笋萌发晚,笋在破土过程中时间过长,消耗养分过大;在出土后,笋茎易弯曲,笋头开裂,基部易老化,使劣质笋率增加。因此,在春季采笋后,如进行培土防倒伏,在第2年春季采笋之前要进行平垄,所剩垄高不超过10cm,以5cm最好,才能达到缩短初笋时间、增产保质的效果。

3 结论

(1)壮苗是芦笋丰产的基础,盐碱地直接育苗,可以提高幼苗对盐碱的适应能力,盐碱地移栽后成活率高,生长旺盛,达到早发丰产的目的。

(2)由于春季蒸发量大,水盐上移,土表盐分高,加重小

(上接第16页)

从表3可以看出:2003年4月11日茶树嫁接接穗留叶与接穗不留叶存在着显著差异,接穗带叶切接成活率达100%,接穗不留叶成活率达50%。

表3 嫁接接穗的选择(留叶、不留叶)成活率对比

嫁接日期	嫁接方法	接穗	接穗芽质	枝数 枝	成活数 枝	成活率 %
4/11	切接	留半叶单芽短穗	待萌发的芽	20	20	100
4/11	切接	不留半叶单芽短穗	待萌发的芽	20	19	50

分析认为:由于半叶片的存在,光合作用相对于不带叶的枝穗强,叶片蒸发水分产生蒸腾拉力,促进砧木与接穗之间的营养物质上下运输,提高了接穗、砧木形成层细胞分化

表3 盐碱黏土地不同培土高度对笋质量的影响

培土高度 cm	初笋时间 月/日	总笋数 根	劣质笋数 根	劣质笋率 %	茎粗 cm
5	4/8	260.7	16.8	6.4	0.81
10	4/10	247.5	34.5	13.9	0.62
20	4/11	251.2	51.3	20.4	0.55
0(CK)	4/8	252.4	13.2	5.2	0.75

苗的危害,这是造成春季盐碱地直接育苗困难的主要因素,采取降盐避盐育苗,是培育壮苗的关键。沟测法育苗能有效减轻小苗盐碱危害,达到壮苗的目的。

(3)适宜苗龄能提高盐碱地移栽成活率,达到壮苗夺高产、春季促早发的目的。120d龄为盐碱地最佳移栽苗龄,其标准为株高35~40cm、地上茎数7~9个、地下根数10~15条。

(4)在芦笋栽培中,为了防止芦笋倒伏及培育根株,在采笋后一般进行培土,虽进行平垄,但也造成垄台过高,对春季初笋有一定影响。根据黏土地实际状况,5~8cm浅培,可以保护鳞茎盘,同时缩短破土时间,提高质量。

速率,从而提高嫁接成活率。

3 结论

(1)在鹤峰县官鼎村,4月和10月是茶树嫁接的最佳时期,成活率高。

(2)本地茶树种与福云6号、楮叶齐和福鼎大白亲和力极佳。

(3)茶树嫁接最好带叶嫁接。

(4)摸索出茶树嫁接的技术,为恩施州老茶园改造提供一种新的技术。

4 参考文献

- [1] 饶辉福,丁坤明,程繁杨,等.茶树低位嫁接换种试验研究[J].中国茶叶,2007,29(1):36-37.