

## 锥栗组织培养外植体消毒和选择

冯金玲<sup>1</sup>, 陈辉<sup>1</sup>, 杨志坚<sup>2</sup>, 陈世品<sup>2</sup>

(1. 福建农林大学作物学院, 福建福州 350002; 2. 福建农林大学林学院, 福建福州 350002)

**摘要:** 以锥栗为材料, 研究了锥栗不同外植体与不同消毒方法对离体组织培养的影响。试验结果表明: 胚是离体培养的良好材料; 用 70% 酒精浸 30 s 后, 以 0.2% HgCl<sub>2</sub> + 吐温 80 消毒 7-9 min, 消毒效果最好; 接种方式是远轴面朝上平放最好。

**关键词:** 锥栗; 外植体; 消毒剂; 组织培养

中图分类号: S792.17

文献标识码: A

文章编号: 1001-389X(2006)01-0022-04

## The selection and sterilization of explant of *Castanea henryi* in tissue culture

FENG Jin-ling<sup>1</sup>, CHEN Hui<sup>1</sup>, YANG Zhi-jian<sup>2</sup>, CHEN Shi-pin<sup>2</sup>

(1. College of Crop Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

2. College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** *Castanea henryi* was taken as material cultured in vitro to induce the plant regeneration. The experiments were conducted in order to select the appropriate explants for tissue culture and the method of optimal sterilization of explants. The results showed that the embryo was the optimal explant. The most optimal method of sterilization was dipping embryo in 70% alcohol for about 30 s and then in the solution of 0.2% HgCl<sub>2</sub> and tween-80 for 7-9 min; the most optimal method of inoculation methods was putting abaxial layer upwards.

**Key words:** *Castanea henryi*; explant; disinfectant; tissue culture

锥栗(*Castanea henryi*)属壳斗科栗属,是我国南方著名的木本果材兼用树种,其果实营养丰富,果肉含有大量淀粉、蛋白质、脂肪和水溶性糖,还含有多种维生素,氨基酸和无机盐类。据分析,其中淀粉含 40%<sup>1</sup>-60%,糖 10%-22%,脂肪 20%-40%。其果生食,熟食甜、糯香且脆,风味极佳,明显优于板栗而深受群众喜爱。我国锥栗因甜度大,涩皮易剥,品质优异而居世界食用栗之首,在国际市场有强大的竞争力<sup>[1]</sup>。

锥栗栽培品种多,为了保持其优良品种特性,大部分采用扦插、嫁接等无性繁殖方法,其扩繁速度慢,育苗效率低。在种质资源有限的条件下不能在生产中大量推广,而用组织培养快速繁殖苗木,不仅可以加速良种繁育,而且在离体培养条件下个体小、群体大,实验条件易于控制,不受时间和季节的限制,大大提高繁殖系数和工作效率,并能一定程度上保持母本的优良性状。本文就锥栗离体培养中的外植体选择和消毒进行了探索性的研究,以期锥栗良种的组培快繁提供依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 植物材料

本研究的实验材料为锥栗的腋芽、韧皮部、嫩叶、果实。来源于福建省建瓯市水源乡桃源村。于 10 月下旬至 11 月上旬在健康的,长势好的母株上采集带腋芽的枝梢、嫩叶、果实,带回实验室立即放到 4℃ 冰箱中冷藏保鲜,备用。

#### 1.2 主要的药品和仪器

培养基所需要的常用化学试剂、消毒剂;超净工作台、高压灭菌锅、天平、移液枪、烘干箱、酸碱调节器、人工气候箱和其他实验所需的仪器。

基金项目:福建省农业推广重点基金资助项目(0201E9)。

作者简介:冯金玲(1978-),女,福建尤溪人,助教,从事经济林研究;通讯作者:陈辉(1957-),男,福建福州人,教授,从事经济林研究。

收稿日期:2005-06-06;修回日期:2005-09-27。

### 1.3 试验方法

试验材料腋芽、韧皮部、嫩叶按以下程序进行处理: 流水冲去表面污物→用去污粉浸泡, 同时搅动 5-10 min→自来水冲洗 10-30 min→在无菌条件下用 70% - 75% 酒精表面消毒 30-60 s →用消毒液消毒→用无菌水清洗 4-5 次→浸入无菌水中备用, 消毒后切去材料与药液接触伤口, 再切分接种于无菌培养基上. 种子先用 70% 酒精浸泡 1 min→再用消毒液消毒→用无菌双蒸水冲洗 3 遍→切取种子中的胚接入无菌培养基上<sup>[2-4]</sup>.

基本培养基为改良 MS 培养基, 6-苄氨基嘌呤(BA)、吲哚丁酸(IBA)、维生素(VB)、琼脂粉  $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和蔗糖  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH6.0-6.5, 即改良 MS + BA  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + IBA  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + VB  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的培养基. 培养室温度  $(26 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ , 空气相对湿度 50% - 60%, 光照时间每天 12 h, 光照度  $1500 - 2000 \text{ lx}$ <sup>[5]</sup>. 初代培养 20 d 后, 统计不同外植体污染率, 存活率, 褐变率<sup>[6-7]</sup>.

## 2 结果与分析

### 2.1 外植体的消毒

消毒是植物组织培养的一个重要环节. 在自然条件下作为植物的外植体材料, 不管内部还是外部都带有很多的细菌和霉菌, 因此为了让外植体能够在无菌的条件下生长, 消毒成了组织培养一个必不可少的步骤<sup>[8]</sup>. 不同的植物在自然条件下所带的菌不一样, 这样所采取的消毒方式也有所不同. 因此植物组培材料要选择好消毒剂及其消毒方式(即消毒剂的浓度和消毒时间).

**2.1.1 不同消毒剂对外植体消毒效果的影响** 锥栗的腋芽大, 毛多, 很难将附着其上的微生物彻底消除. 为了找到有效灭菌的方法, 用不同种类消毒剂对外植体消毒效果进行了实验. 将半木质化嫩茎作为外植体, 采用 4 种不同的消毒方法进行消毒, 接种于改良 MS + BA  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + IBA  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + VB  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的培养基上, 统计获得的无菌外植体个数. 实验结果见表 1. 其中 0.2%  $\text{HgCl}_2$  + 吐温 80 的消毒方式锥栗外植体的污染率最低为 0.16, 按污染率从低到高的顺序依次为 0.2%  $\text{HgCl}_2$  的消毒方式, 5% 次氯酸钠 + 0.1%  $\text{HgCl}_2$  消毒方式, 6% 次氯酸钠消毒方式.

**2.1.2 消毒时间对外植体的影响** 这种消毒方式对锥栗组织消毒有良好的效果. 但表面消毒剂对于植物组织可能是有毒的, 因此应当正确选择消毒剂处理的时间, 以尽量减少植物组织的死亡. 外植体在 0.2%  $\text{HgCl}_2$  + 吐温 80 消毒剂中消毒的时间分别为 3、5、7、9、12 min, 设为 1、2、3、4、5 五个处理, 结果见图 1. 由图 1 可以得知, 随着消毒时间的延长, 初代培养物的污染率下降, 在消毒时间 3-7 min 之间, 污染率急剧下降, 之后污染率的变化趋于缓和. 说明当消毒时间达到 7 min 时, 绝大多数污染病菌已被杀死. 但是, 褐变随消毒时间的延长呈直线上升, 存活率随着消毒时间的延长几乎呈直线下降. 原因可能是在灭菌时, 外植体受到汞离子

表 1 不同消毒剂对外植体消毒效果的影响

Table 1 Effects of different sterilizing solution on sterilization of the same explant

消毒方式	消毒时间 /min	接种数 /个	无菌数 /个	污染率
0.2% $\text{HgCl}_2$	7	40	25	0.375
6% 次氯酸钠	7	45	7	0.84
0.2% $\text{HgCl}_2$ + 吐温 80	7	37	31	0.16
5% 次氯酸钠 + 0.1% $\text{HgCl}_2$	7	38	14	0.63

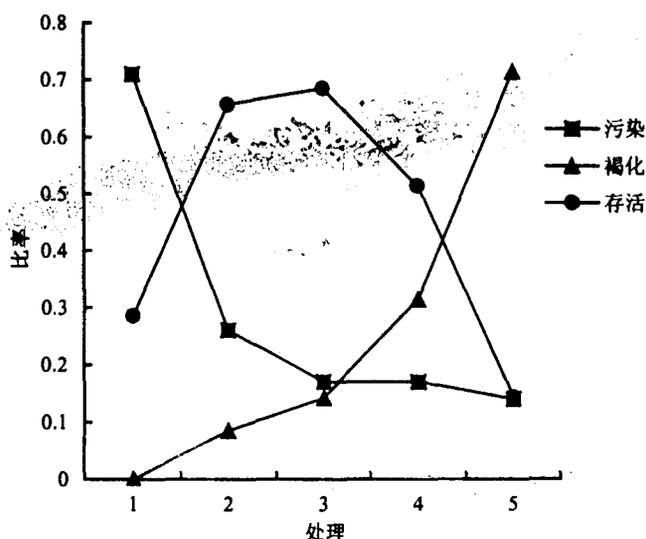


图 1 消毒时间对外植体消毒效果的影响

Figure 1 Effects of the different time on sterilization of explants

的毒害而死亡. 因此, 在考虑降低污染率的措施时, 不宜采用延长时间的办法. 存活率在消毒 7 min 时达到峰值(0.685), 此时褐化率较低, 之后存活率呈下降趋势, 因此对于锥栗初代培养的外植体以 0.2%  $\text{HgCl}_2$  + 吐温为消毒剂时, 消毒时间以 7-9 min 为宜.

## 2.2 外植体选择

取同一植株的不同器官为外植体, 培养结果不同. 可能是因为不同部位的外植体其表达基因不同, 或是产生不同生长物质和次生物质; 同时也有可能是外植体带菌情况的不同影响到了消毒, 反过来消毒影响了外植体的培养结果. 因此外植体的选择也是一个重要的环节.

2.2.1 不同外植体对污染率的影响 把种子、腋芽、韧皮部、叶和茎段, 先预处理, 接着在 0.2%  $\text{HgCl}_2$  + 吐温的消毒剂中消毒 7 min, 用无菌水冲后把腋芽、韧皮部、叶、茎段和胚(种子中取出)分别接入改良 MS + BA 1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + IBA 0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + VB 0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的培养基中, 观察污染率, 褐变率和存活率. 其结果见表 2.

从表 2 可以看出在锥栗的 5 类外植体中胚的存活率最高, 其次为腋芽, 接着是叶, 最差的是韧皮部存活率为 0.

2.2.2 不同外植体对不定芽诱导的影响 由表 3 可以看出, 外植体胚诱导不定芽的能力最强, 其次是腋芽和茎段; 而诱导愈伤组织能力最强的是叶子; 至于韧皮部其褐变率太大, 以致于外植体无法启动生长.

## 2.3 外植体胚接种方式的选择

为了让锥栗胚能按其自身的生长规律进行生长, 本实验对其接种方式进行比较实验. 共设 3 个处理, 分别设为 1、2、3 即(1 为远轴面朝上平放, 2 为近轴面朝上平放, 3 为横放插入培养基)然后把胚接入改良 MS + BA 1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + IBA 0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + VB 0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的培养基中<sup>[9]</sup>. 1 个月后再观察发芽率和长势, 其结果见表 4.

从表 4 的发芽率上看 1 处理好于其它 2 个处理, 从芽的长势看也是 1 处理好于其它 2 个处理. 因此可以说远轴面朝上平放的接种方式最好, 其次是横放插入培养基, 最后才是远轴面朝上平放.

## 3 结论与讨论

外植体的带菌状况直接影响着培养物的建立, 木本植物组织培养中的困难之一是获得无菌材料<sup>[8]</sup>. 为了保证成功地进行培养, 在材料接种前必须消毒, 使材料完全无菌, 这是接种成功的决定因素. 由于锥栗锈毛很多, 这给灭菌带来很大的难度. 研究表明, 用腋芽作外植体时, 在无菌条件下先用 70% 酒精浸润 30 s, 然后用 0.2%  $\text{HgCl}_2$  + 吐温 80 消毒 7 min 效果最好, 获得无菌材料最多. 因为 70% 酒精具有浸润和较强的杀菌双重作用, 但却不能彻底灭菌. 0.2%  $\text{HgCl}_2$  有较好的灭菌作用是因为  $\text{Hg}^{2+}$  可与带负电荷的蛋白质结合, 使细菌蛋白变性, 酶失活. 对于锥栗腋芽还要加入几滴表面活性剂吐温 80 才能达到预期的效果, 主要是因为其可使药剂更易于布展, 更容易浸入到灭菌的材料表面.

消毒剂的消毒时间对外植体的消毒效果有明显的影响, 随着消毒时间的延长, 污染率降低, 褐化死

表 2 不同锥栗外植体的消毒情况

Table 2 Results of sterilization of variant explants

外植体类型	污染率/个	褐变率/%	存活率/%
胚	5	10	85
腋芽	17	17.2	65.8
韧皮部	20	93.7	0
叶	12	45.6	42.4
茎段	25	67.3	7.7

表 3 不同外植体对不定芽诱导的影响

Table 3 Results of induction of adventitious buds from variant explants

类型	接种数/个	发芽数/个	发芽率/%	生长状况
胚	45	31	68.89	3-4 个丛芽, 芽健壮, 常伴有愈伤
腋芽	45	23	51.11	大部分单芽, 芽弱, 常伴有愈伤
韧皮部	45	0	0	全部褐死
叶	45	0	0	外植体长黄绿色, 颗粒细小的愈伤
茎段	45	24	53.33	大部分单芽, 芽较壮, 常伴有愈伤

表 4 锥栗胚接种方式对不定芽诱导的影响

Table 4 Results of induction of adventitious buds from different inoculation methods

处理	接种数/个	发芽数/个	发芽率/%	芽的长势
1	32	23	71.88	芽翠绿, 直立, 有正常叶
2	27	7	25.93	芽是往培养基中长, 只有节间无叶
3	35	14	40.00	芽小, 远轴处抽长根

亡率升高。本实验得到较好的消毒时间为 7-9 min。因此为达到理想的消毒效果, 必须根据材料的具体情况确定最佳的消毒方法和时间。

自然条件下的胚、腋芽、韧皮部、叶子和茎段作为外植体, 实验结果得出胚为最好的外植体。其主要原因是胚为幼年态组织或器官, 易于再分化, 而其它外植体是成年态组织或器官, 再分化难。除此之外还有其它原因影响了外植体分化, 1) 是植物激素的分布梯度, 当植物内的某些激素以一定状态的相对浓度存在时, 植物体内源激素分布就不均匀, 最终导致了基因表达的不一致; 2) 是可能胚在消毒时被破坏的程度最低(在果实内)<sup>[10]</sup>。因此锥栗外植体选择实验中得到胚是最好的外植体。

实验得出, 锥栗外植体的接种方式是远轴面朝上平放的接种方式最好。每一种植物都有生长极性, 这是因为高等植物的生长发育受激素的广泛调控, 其中生长素的作用尤为独特, 因为生长素在植物组织内的浓度梯度是由其极性运输维持的, 而正是激素在植物组织的相对含量决定了该组织的发育命运<sup>[11]</sup>。远轴面朝上平放时可能生长素在远轴端集中较多所以此时外植体的发芽势更好。

### 参 考 文 献:

- [1] 陈 辉. 锥栗人工林生态培育[M]. 北京: 中国林业出版社, 2000.
- [2] 李 群, 陈丽萍, 石轶松. 马蹄莲组培过程中真菌和细菌污染的消除方法研究[J]. 四川师范大学学报: 自然科学版, 2001, 24(6): 607-609.
- [3] Merel L G. Hot water treatment before tissue culture reduces initial contamination in lillium and ace[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1998, 52: 75-77.
- [4] Kritizinger E M, Van Vuuren J R, Woodward B, et al. Elimination of external and internal contaminants in rhizomes of *Zantedechia aethiopica* with commercial fungicides and antibiotics[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1998, 52: 61-65.
- [5] 冯金玲, 陈 辉, 陈世品, 等. 锥栗成熟胚离体培养初报[J]. 经济林研究, 2004, 22(3): 29-31.
- [6] 高国训. 植物组织培养中的褐变问题[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(6): 501-506.
- [7] 何道一, 程炳嵩. 植物组织培养材料分化与脱分化过程中的生理生化变化[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 1992, 23(3): 327-331.
- [8] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986.
- [9] 张 松, 温孚江, 魏毓棠. 外植体处理及接种方式对大白菜植株再生的影响[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2001, 32(1): 78-80.
- [10] 许智宏, 刘春明. 植物发育的分子机理[M]. 北京: 北京科技出版社, 1999.
- [11] 倪为民, 陈晓亚, 许智宏, 等. 生长素极性运输研究进展[J]. 植物学报, 2002, 42(3): 221-228.

(责任编辑: 江 英)