

岑湘涛,沈伟,杨美纯,等.木薯组织培养外植体选择和灭菌研究[J].江苏农业科学,2014,42(11):71-72.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.021

木薯组织培养外植体选择和灭菌研究

岑湘涛^{1,2}, 沈伟¹, 杨美纯¹, 农艳丰¹, 苏小茜¹

(1. 广西大学农学院,广西南宁 530005; 2. 百色学院化学与生命科学系,广西百色 533000)

摘要:以木薯品种华南 205 为材料,研究外植体类型与不同灭菌方法对其组织培养的影响。试验结果表明:9—10 月份室外取材灭菌效果最理想,HgCl₂ 灭菌处理 7—8 月份取的外植体的时间需控制在 10 min 内,而灭菌处理 9—10 月份取的外植体的时间需控制在 5 min。此外,室内水培木薯茎段和室外茎段的中部均可作为组织培养的良好材料。

关键词:木薯;外植体;组织培养;灭菌

中图分类号: S533.043 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)11-0071-02

木薯(*Manihot esculenta* Crantz)别称树木薯、树番薯,大戟科木薯属,是世界 3 大薯类作物(马铃薯、甘薯、木薯)之一。木薯耐贫瘠、耐干旱、抗性强,单位面积产量高,淀粉产出量高,素有“地下粮仓”、“淀粉之王”和“能源作物”之美誉^[1]。目前木薯主要用途是食用、饲用和在工业上的开发利用。其中 90% 以上的木薯主要用于淀粉和变性淀粉的生产。近年来用木薯作为能源植物生产燃料乙醇,使得国家可再生能源法将木薯列为发展生物质能源的少数几种植物之一,能源木薯产业显示出极大的发展潜力^[2]。

广西是我国最大的木薯种植省区,其木薯乙醇产量、变性淀粉、山梨醇等产量均居全国前列,木薯及其产品群总值也位居全国之首^[3]。目前生产上木薯多采用成熟的茎段进行营养繁殖,这种方式繁殖率低,导致良种推广速度慢。利用组织培养技术对木薯进行快速繁殖,将是加速木薯良种大面积推广的有效途径^[4-6]。在木薯组织培养中,选择适合的外植体,是其组织培养能否成功的一个关键。此外,木薯外植体表面和内部常携带一些微生物,是组织培养过程的主要污染源,解决外植体污染是木薯组织培养能否成功的另一个关键。因此,在本研究中,针对木薯组织培养中存在的问题,将重点研

究外植体类型和灭菌方法对其组织培养效果的影响,以期为木薯组培快繁提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试品种为华南 205 的室外茎段和水培茎段,室外采样地点为广西大学农学院大田。

1.2 试验方法

1.2.1 室外茎段取材和灭菌 取样时间与灭菌过程:分别于 5—6 月、7—8 月、9—10 月在田间选取木薯健康植株上带芽的茎段作为外植体。将茎段从叶柄基部切除叶片,用洗衣粉溶液浸泡 10~15 min,再用自来水冲洗 10~15 min,然后将茎段切成带 1~2 个芽、长约 1.5 cm 的小段,在超净工作台内进行表面灭菌,方法如下:75% 乙醇漂洗 20 s 后,再加入含有吐温的 0.1% HgCl₂ 溶液中,灭菌时间设 5、7、10 min 3 个处理。灭菌期间不断摇动,使外植体与灭菌剂充分接触。经上述灭菌处理后无菌水冲洗 5~6 次,接种到 MS 培养基中。

外植体类型:将带芽茎段分为 3 个部分,顶芽以下第 1~2 个芽为上部;第 3~6 个芽为中部;第 7 个芽以下为下部。按照上述方法对外植体进行预处理后,用 75% 乙醇进行表面灭菌 20 s,无菌水冲洗 1 次,再加入含有吐温的 0.1% HgCl₂ 的溶液中灭菌 5 min,最后用无菌水冲洗 5~6 次,接种到 MS 培养基中。

1.2.2 水培茎段取材与灭菌 田间采集的茎段经剪裁处理

收稿日期:2014-02-07

基金项目:国家自然科学基金(编号:31160300)。

作者简介:岑湘涛(1984—),女,广西百色人,硕士研究生,主要从事植物组织培养研究。E-mail:18379905@qq.com。

生大量水分,叶片利用二氧化碳、阳光进行光合作用,消耗营养,导致叶片在消耗水分、养分,但是根部又供应不上。岩黄连所生之处主要集中在山岩边缘等危险、阴凉区域。因此在栽培中要保持一定的湿度及温度,每天给叶片喷洒少量水,移栽 5 d 后可在水中加入少量液体生根培养基促进根的生长。

参考文献:

- [1] 文和群,许兆然, Villa-Lobos J, 等. 中国南部石灰岩稀有濒危植物名录[J]. 广西植物, 1993, 13(2): 110-127.
- [2] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准[M]. 南宁:广西科学技术出版社, 1992.

- [3] 毛宇昂,梁永红. 岩黄连的研究综述[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(4): 630-631.
- [4] 蒋水元,胡兴华,赵瑞峰. 岩黄连引种栽培研究[J]. 广西植物, 2002, 22(5): 469-473.
- [5] 姜灵敏,徐有明,张冬梅,等. 红刺玫愈伤组织诱导再生体系的建立[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(4): 914-916.
- [6] 苏 钰,黄宁珍,付传明. 匙羹藤组织培养条件优化研究[J]. 广西植物, 2009, 29(1): 87-91.
- [7] 陈 豫,胡 伟,何 磊. 不同浓度激素对胡萝卜愈伤组织诱导的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(2): 54-56.
- [8] 王菲彬,王 斐,管玲玲,等. 植物激素对东方百合试管苗鳞片分化不定芽的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(6): 53-55.

后,将茎段基部浸入清水中 5 cm 左右,2 d 换水 1 次,4 d 修剪枝条基部截面 1 次,并小心刷净枝条基部污垢,以防导管堵塞,影响水分吸收。待水培芽长至 15 cm 左右时剪下作为接种外植体。灭菌方法如下:0.1% HgCl₂ 灭菌 4、5、6 min,然后无菌水冲洗 5~6 次,之后接种到 MS 培养基中。培养 天后统计污染率和成活率。

1.2.3 培养条件 接种后的材料均在 25±5℃ 的培养室中培养,每天以 1 600~2 000 lx 的光照强度照射约 10 h。

1.2.4 数据统计 以上试验均于 1 周内统计结果。污染率=污染株数/接种的外植体总数×100%;成活率=成活数/(外植体总数-污染数-死亡数)×100%。

2 结果与分析

2.1 取样和灭菌时间对外植体培养的影响

从表 1 可知,取样时间和灭菌时间共同影响外植体培养效果,其中 5—6 月污染控制难度大,3 个灭菌处理控制污染的效果均不理想,污染率最高达到 100%;7—8 月污染控制较为容易,随着灭菌时间的增加,污染率从 66.7%降到 44.1%;9—10 月份污染控制效果最理想,污染率最低为 35.0%。为将污染率和死亡率控制到最低,不同取样时期需要不同的 HgCl₂ 处理时间,其中 7—8 月份取样时 HgCl₂ 处理时间需控制在 10 min 内,9—10 月份取样时 HgCl₂ 处理时间需控制在 5 min。

表 1 取样和灭菌时间对外植体培养的影响

取样时间	处理时间 (min)	外植体数 (个)	污染率 (%)	成活率 (%)
5—6 月	5	30	100.0	0
	7	27	92.6	75.0
	10	25	80.0	70.0
7—8 月	5	30	66.7	75.0
	7	23	56.5	65.0
	10	34	44.1	60.5
9—10 月	5	22	41.0	84.0
	7	59	39.0	75.0
	10	40	35.0	66.7

2.2 外植体部位对其组织培养效果的影响

从表 2 可看出,外植体部位对其组织培养效果影响很大,其中靠近顶芽的茎段太幼嫩,虽然污染少,但由于组织太幼嫩,很容易被乙醇和 HgCl₂ 损伤,所以接种后大部分茎段褐化死亡,因此不适合作为组织培养的外植体;第 7 位及以下的芽位茎段中大部分是海绵状的髓部,很难彻底消毒,所以也不适合作为外植体;而顶芽以下第 3~6 个芽较幼嫩,成活率相对较高,而且容易灭菌,适合作为外植体。

表 2 不同部位外植体污染率和成活率

取样部位	外植体数 (个)	污染率 (%)	成活率 (%)
上部	40	27.5	44.8
中部	64	32.8	76.7
下部	48	39.6	75.9

2.3 灭菌时间对水培外植体组织培养效果的影响

由于水培的木薯茎段组织幼嫩,因此不采用乙醇和 HgCl₂ 结合的灭菌方法。单独使用 0.1% HgCl₂ 溶液处理时,随着处理时间的延长,污染率降低,但其成活率也相应降低,当处理时间达到 6 min 时,成活率为 70.0%(表 3)。综合比较,0.1% HgCl₂ 处理 5 min 是水培芽最适宜的灭菌方法。

表 3 HgCl₂ 处理时间对木薯水培外植体组织培养效果的影响

处理时间 (min)	外植体数 (个)	污染率 (%)	成活率 (%)
4	36	33.3	100.0
5	30	13.3	73.3
6	20	5.0	70.0

3 结论与讨论

外植体选择是影响组培微繁效果的一个非常重要的因素。本试验结果表明,不同来源的外植体污染率存在很大差异,用水培方法获得的外植体污染率低、存活率高,而室外茎段由于长时间暴露在田间,菌类孳生,作外植体时,污染率较高。尽管水培茎段培养具有污染率低、存活率高等优点,但水培茎段受时间条件制约,同时水培时间较长时自身储藏的营养物质被消耗而影响外植体质量。对于组织培养工厂化育苗来说,要求年繁殖数达到百万株或者更多,用水培茎段做外植体则远远不能满足要求。因此,将 2 种外植体同时用于实践,在各个时期相互补充,才能不断满足木薯种苗周年生产的要求。在用室外茎段做外植体时,外植体选取的时期、部位对污染的影响都至关重要^[7]。应根据取材时间外植体污染控制的难易程度,充分考虑污染因素,调整灭菌方案。植物组织培养中外植体种类的选择以污染少、易启动为原则^[8-9]。本试验通过对外植体部位对组织培养效果影响的研究,发现木薯顶芽以下第 3~6 个芽较幼嫩,成活率相对较高,而且容易灭菌,适合作为外植体。

参考文献:

[1]甘 骞. 木薯的种植与利用[J]. 云南农业科技,1996(5):28-30.
[2]王建梅. 木薯将成发展生物能源的生力军[J]. 中国农业信息,2006(12):12-13.
[3]木薯淀粉酒精网. 广西木薯产业发展引起国内外专家热议[EB/OL]. (2009-03-06)[2014-09-05]. <http://www.vnsugar.com>.
[4]覃 艳,陈 宇. 木薯组织培养快速繁殖的研究[J]. 广西农业科学,2007,38(1):35-37.
[5]李 斌,黄永才,覃剑锋,等. 木薯优良品种“华南 124”的组织培养[J]. 广西热带农业,2008(4):9-11.
[6]何承光. 木薯良种 GR891 组织培养与快速繁殖技术[J]. 南方农业学报,2011,42(5):471-474.
[7]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.
[8]曹教义,刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社,1996.
[9]潘瑞炽. 植物组织培养[M]. 广州:广东高等教育出版社,2000.