

江 涛,李晨曦,陈 磊,等.毛竹组织培养中成熟种子消毒方法[J].江苏农业科学,2017,45(4):103-106.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.04.032

毛竹组织培养中成熟种子消毒方法

江 涛¹,李晨曦¹,陈 磊¹,杨兆河¹,苏 军²,刘伯斌¹

(1.福建农林大学林学院,福建福州 350002;2.福建农林大学基础林学与蛋白组学研究中心,福建福州 350002)

摘要:成熟毛竹种子污染严重和萌发率低是制约毛竹组织培养发展的关键因素。研究发现氯气消毒优于常规的次氯酸钠和高锰酸钾消毒法。试验结果表明,氯气消毒毛竹种子未污染率、萌发率分别可达 45.60% ± 2.06%、33.30% ± 5.51%,极显著高于次氯酸钠和高锰酸钾消毒法;并且进一步优化试验条件,经过 1 d 浸种,在 0.01 mol/L 氯气浓度下处理 7 h,毛竹种子的未污染率、萌发率分别可达 96.23% ± 0.19%、74.00% ± 1.89%;且以氯气消毒的种子能发育成实生苗和进行愈伤组织的诱导。成熟毛竹种子的氯气消毒方法,可为今后更好地利用毛竹种子进行组织培养研究奠定基础。

关键词:氯气;毛竹;组织培养;未污染率;萌发率

中图分类号:S795.705 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)04-0103-03

中国毛竹(*Phyllostachys heterocycla* cv. *pubescens*)是一种重要的经济竹种,具有分布广、种植面积大、蓄积量多等特点,具有重要的生态功能和经济社会价值^[1]。目前,生产上主要采用移母竹的繁殖方式,其生产成本低,繁殖率低,很难满足造林地需求^[2-3],通过组织培养进行快速繁殖被认为是发展竹类的新途径^[4],有利于进一步开展基因工程育种。

毛竹组织培养一直是毛竹产业发展的瓶颈^[5]。目前,毛竹组织培养采用的外植体多为种子、鞭笋、冬笋及春笋。以毛竹笋为外植体容易消毒灭菌,但是组织培养中褐化现象严重,且取材受季节限制^[6-8]。已有报道以成熟种子经过愈伤组织成功诱导出不定芽^[9],有研究发现成熟种子可以在液氮中直接保存^[10],从而能使成熟种子长期保存。以成熟毛竹种子为外植体进行组织培养研究不受季节限制,是优良的组织培养材料^[11]。李楠等研究发现,毛竹种子胚乳易受真菌污染,使得在无菌操作中污染率较高^[12-13],极大地增加工作量,故在无菌操作中控制污染成为毛竹组织培养中的关键步骤之一^[14]。为了解决毛竹种子在组织培养过程中无菌操作难的问题,本研究拟通过对不同的消毒方法进行比较,在此基础上进一步优化消毒、萌发条件,以期解决毛竹种子消毒难和萌发率低的问题,为今后更好地利用毛竹种子进行组织培养研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

毛竹种子为福建省林业科学研究院提供的当年采收的毛

竹种子,挑选出饱满且没有霉变的种子作为试验材料。

1.2 方法

1.2.1 外植体消毒方法 (1)高锰酸钾消毒法。预处理后毛竹种子浸泡在 3% 高锰酸钾溶液中消毒 2 h,用无菌水清洗 5 次,每次 7 min,用无菌滤纸吸干水分后,接种于 MS 培养基中培养观察,15 d 后统计未污染率、萌发率。(2)次氯酸钠消毒法。预处理后的毛竹种子浸泡在 30% 次氯酸钠溶液中消毒 40 min,用无菌水清洗 5 次,每次 7 min,用无菌滤纸吸干水分后,接种于 MS 培养基中培养观察,15 d 后统计未污染率、萌发率。(3)氯气消毒法。100 mL 10% 次氯酸钠与 5 mL 36% 浓盐酸制备氯气^[15],将去皮后的毛竹种子置入大培养皿中,然后在密闭的容器中,0.01 mol/L 的氯气浓度下消毒 5 h 后,接种于 MS 培养基中培养,15 d 后统计未污染率和萌发率。

1.2.2 毛竹种子浸泡处理 在氯气消毒方法中,将毛竹种子分别浸在水中 0、1、2、3 d 后,在 0.01 mol/L 的氯气浓度下消毒 5 h,接种于 MS 培养基中培养观察,15 d 后统计未污染率和萌发率。

1.2.3 氯气消毒浓度与时间组合选择 本试验选择 3 种氯气浓度,分别为 0.005、0.01、0.02 mol/L;选择 1、3、5、7、9 h 5 个梯度消毒时间(表 1)。将浓度与时间进行组合处理,消毒后的毛竹种子接种于 MS 培养基中培养,15 d 后统计未污染率、萌发率。

1.2.4 赤霉素处理 赤霉素有助于种子萌发。首先冲洗种子 2 h,浸种 2 d,200 mg/L 赤霉素浸种 2 h,然后在密闭的容器中,0.01 mol/L 的氯气浓度下消毒 5 h,接种于 MS 培养基中培养,15 d 后统计未污染率、萌发率。

1.3 培养基和培养条件

基本培养基 MS,添加蔗糖 30 g/L,琼脂 9 g/L,pH 值 5.8,121 ℃ 灭菌 20 min。外植体通过以上方法消毒灭菌后,接种于含 1 mL MS 培养基的 2 mL 离心管中。由于毛竹种子污染严重,为避免种子交叉污染,每个离心管中放入 1 粒种子,每个试验 3 次重复,每个重复使用 500 粒种子,25 ℃ 黑暗

收稿日期:2016-06-08

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(编号:31500548);福建农林大学校重点建设专项(编号:6112C035001)。

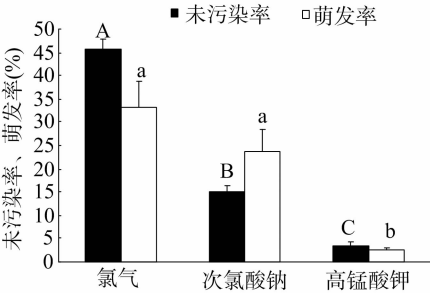
作者简介:江 涛(1993—),男,安徽合肥人,硕士研究生,主要从事植物生长发育与分子机制研究。E-mail:943642464@qq.com。

通信作者:刘伯斌,讲师,主要从事林木分子生物学研究。E-mail:163liubobin0377@163.com。

表 1 氯气消毒毛竹种子浓度与时间

试验组合	氯气浓度 (mol/L)	处理时间 (h)
1	0.005	1
2	0.005	3
3	0.005	5
4	0.005	7
5	0.005	9
6	0.01	1
7	0.01	3
8	0.01	5
9	0.01	7
10	0.01	9
11	0.02	1
12	0.02	3
13	0.02	5
14	0.02	7
15	0.02	9

培养,15 d 后统计未污染率、萌发率。愈伤组织诱导培养基为 MS + 500 mg/L Pro + 500 mg/L Gln + 300 mg/L CH + 4 mg/L 2,4 - D + 0.1 mg/L ZT,继代培养基为 MS + 2.5 mg/L 2,4 - D。



A.不同消毒方法对毛竹种子未污染率和萌发率的影响
不同大写、小写字母分别表示不同消毒方法对毛竹种子未污染率、萌发率间的差异显著性($P<0.01$)

图1 不同消毒方法毛竹种子未污染率和萌发率比较

2.2 浸泡时间对毛竹种子未污染率、萌发率的影响

真菌孢子具有特殊的结构,在消毒中很难被杀死,可能是造成毛竹种子消毒困难的原因之一。而在孢子萌发成营养体后消毒,则可以提高消毒效果。为了提高氯气消毒毛竹种子的未污染率,本研究将在毛竹种子浸泡在水中 0、1、2、3 d 后再进行氯气消毒,发现浸种 1 d 后的毛竹种子未污染率、萌发率分别为 $(97.27 \pm 0.34)\%$ 、 $(65.47 \pm 0.57)\%$ (图 2),极显著高于干种子和浸泡时间为 2、3 d 的种子,结果表明,水中浸种毛竹种子 1 d 可以提高氯气消毒的效果。

2.3 赤霉素处理对毛竹种子未污染率、萌发率的影响

赤霉素能促进种子萌发,在农林业中得到广泛应用。为了提高成熟毛竹种子的萌发率,本研究将浸种 2 d 的毛竹种子用 200 mg/L 赤霉素处理,以未进行赤霉素处理的种子为对照。结果表明,通过赤霉素处理后的毛竹种子萌发率可达 $(70.40 \pm 1.88)\%$,极显著高于未经过赤霉素处理的毛竹种子;未进行赤霉素处理的种子污染率稍有提高,但差异不显著 (图 3)。表明毛竹成熟种子组织培养过程中,可采用赤霉素

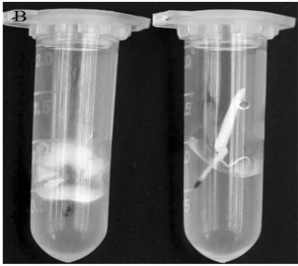
1.4 数据分析

未污染率、萌发率按如下公式进行计算:未污染率 = (未污染数/总接种数) $\times 100\%$;萌发率 = (萌发数/总接种数) $\times 100\%$ 。所有数据均通过 Excel 2003 和 SPSS 19.0 软件进行统计分析。

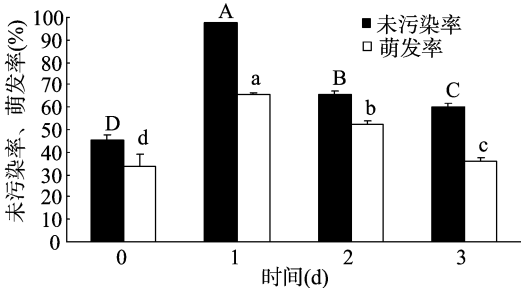
2 结果与分析

2.1 毛竹种子消毒方法的选择

在组织培养中,常用消毒试剂有氯化汞、次氯酸钠、高锰酸钾,氯化汞由于会对环境产生影响,而很少使用。氯气作为一种广谱的消毒剂,具有很强的渗透和杀菌能力,本研究首先采用毛竹干种子,通过对高锰酸钾、次氯酸钠、氯气 3 种消毒方法比较,结果采用高锰酸钾消毒方法,未污染率、萌发率分别为 $(3.23 \pm 0.88)\%$ 、 $(2.46 \pm 0.57)\%$;采用次氯酸钠消毒方法,未污染率、萌发率分别为 $(15.17 \pm 1.20)\%$ 、 $(23.66 \pm 4.58)\%$;采用氯气消毒未污染率、萌发率分别可达 $(45.60 \pm 2.06)\%$ 、 $(33.30 \pm 5.51)\%$ (图 1 - A),氯气消毒方法毛竹种子未污染率极显著高于高锰酸钾、次氯酸钠消毒方法,能有效抑制真菌污染,且经氯气消毒的种子能正常萌发 (图 1 - B),结果表明,与次氯酸钠、高锰酸钾消毒比较,氯气消毒是较优的毛竹种子消毒方法。



B.污染(左)与未污染种子(右)比较



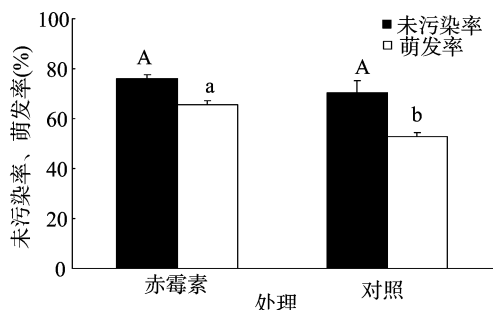
不同大写、小写字母分别表示不同浸种时间对毛竹种子未污染率、萌发率间的差异显著性($P<0.01$)

图2 浸泡时间对毛竹种子氯气消毒未污染率、萌发率的影响

处理促进毛竹种子萌发。

2.4 氯气不同浓度和消毒时间对毛竹种子未污染率、萌发率的影响

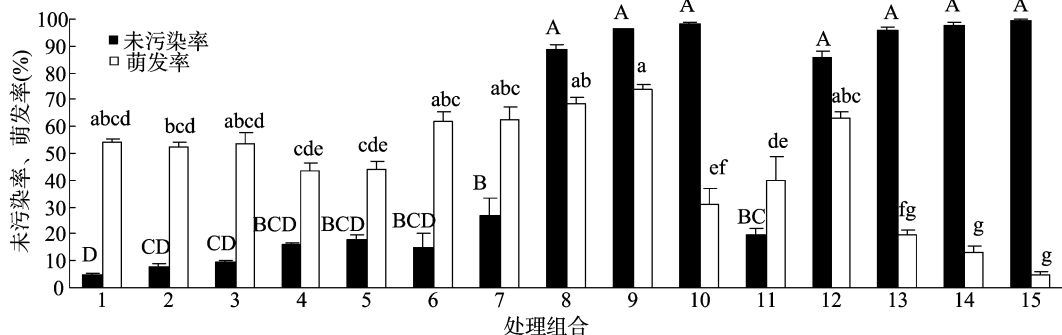
浸种后再进行氯气消毒可能会对毛竹种子造成伤害,从而影响萌发率。本研究对氯气不同浓度和消毒时间进行进一步优化,试验结果 (图 4) 表明,在 0.005 mol/L 的氯气浓度



不同大写、小写字母分别表示赤霉素处理对毛竹种子未污染率、萌发率间的差异显著性($P < 0.01$)

图3 赤霉素处理对毛竹种子的未污染率和萌发率的影响

下,随着消毒时间延长,未污染率提高,而萌发率没有显著变



不同大写、小写字母分别表示处理组合对未污染率、萌发率间差异显著性($P < 0.01$); 以浸种 1 d 为试验材料

图4 不同浓度氯气与消毒时间对毛竹种子未污染率、萌发率的影响

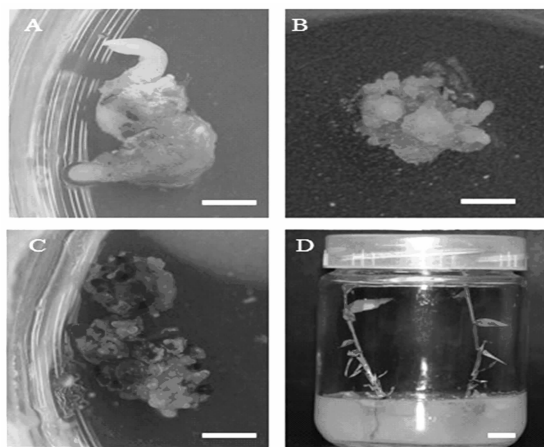
2.5 氯气消毒的毛竹种子成功诱导愈伤组织和无菌苗

氯气消毒的毛竹种子能正常萌发,为验证氯气消毒会不会影响后期愈伤组织诱导和对实生苗产生影响,本研究进一步将所获得萌发的毛竹种子接种至愈伤组织诱导培养基中进行培养,25 d 后发现萌发的毛竹种子在根和下胚轴部分膨大,产生致密淡黄色的愈伤组织(图 5-A),经过 50 d 的进一步继代培养,能成功诱导出颜色淡黄、疏松的胚性愈伤组织(图 5-B),进一步继代诱导 30 d 可以发现类似体胚的组织形成(图 5-C)。然后在接下来的 4 个月的继代培养中,发现胚状体分化出不定芽。除此之外,将萌发的种子直接接种 MS 培养基,可以形成正常的实生无菌苗(图 5-D)并且可以进行扩繁。表明氯气消毒法不会对后续的愈伤组织诱导和实生苗的培养造成影响。

3 结论与讨论

毛竹种子表面和胚乳中伴生着真菌^[6],毛竹组织培养中,种子消毒是关键的第一步。在常规消毒方法中,氯化汞为剧毒物质,会对环境产生一定危害^[14],乙醇和次氯酸钠消毒法被认为是毛竹外植体消毒的主要方法,但是效果欠佳^[15]。本研究首先通过次氯酸钠和盐酸制备产生氯气与常规次氯酸钠和高锰酸钾的消毒方法比较,结果氯气消毒效果显著高于次氯酸钠、高锰酸钾,未污染率、萌发率分别可以达到(45.60 ± 2.06)%、(33.30 ± 5.51)%,这可能是由于氯气具有很强的渗透能力^[16],能杀死隐藏于毛竹种子腹缝沟中的真菌,从而提高其杀菌效果。经过 1 d 的浸种,再使用氯气处理,未污染率、萌发率分别可达(97.27 ± 0.34)%、(65.47 ± 0.57)%,

化,经过 9 h 消毒未污染率、萌发率分别达到(18.00 ± 1.63)%、(44.23 ± 2.56)%;在 0.01 mol/L 氯气浓度下,随着消毒时间延长,未污染率提高,最高可达(98.23 ± 0.78)%,随着氯气处理时间的延长,萌发率先上升后下降,经过 7 h 消毒未污染率、萌发率分别达到(96.23 ± 0.19)%、(74.00 ± 1.89)%,延长消毒时间至 9 h,未污染率没有显著性提高,但是萌发率急剧下降至 30% 左右;当进一步增加氯气浓度,在 3 h 未污染率、萌发率达最高,分别为(86.00 ± 1.89)%、(62.90 ± 2.70)%,但进一步延长消毒时间,萌发率极显著下降,在消毒 9 h 时,萌发率仅为(5.00 ± 1.25)%,表明增加氯气浓度、延长氯气消毒时间会提高未污染率,同时也会抑制种子萌发。结果采用 0.01 mol/L 浓度的氯气,处理 7 h,是最适当的消毒组合方法。



A—膨大后的根与下胚轴; B—淡黄色疏松愈伤;

C—体胚形成初期; D—无菌苗

图5 成功诱导的毛竹胚性愈伤组织和无菌苗

极大提高了毛竹种子未污染率、萌发率。可能经过 1 d 浸种,真菌孢子在合适的温湿度条件下开始萌发成营养体^[17]而增强氯气消毒效果。为了进一步提高毛竹种子萌发率,优化氯气浓度和消毒时间,0.01 mol/L 的氯气浓度下,经过 7 h 处理,未污染率、萌发率分别可达(96.23 ± 0.19)%、(74.00 ± 1.89)%,再次提高毛竹种子的萌发率,远高于李楠等的研究结果^[12,15],并且还可使用赤霉素处理进一步提高萌发率,经过氯气消毒后的成熟毛竹种子可以成功诱导出愈伤组织和实生苗。本研究解决了毛竹种子在组织培养过程中污染严重和萌发率低的问题,为今后毛竹高效再生体系的建立和基因工程研究奠定了基础。

朱文彬,王长林. 种子引发对盐碱地夏枯草出苗质量的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(4):106-108.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.04.033

种子引发对盐碱地夏枯草出苗质量的影响

朱文彬¹, 王长林²

(1. 江苏省射阳县洋马镇农林技术推广中心, 江苏射阳 224335; 2. 南京农业大学中药材研究所, 江苏南京 210095)

摘要:为探讨夏枯草种子预处理方法, 提供苏北盐碱地引种夏枯草的理论参考。分别运用不同浓度的 PEG、GA₃ 和复合盐 KNO₃ - KH₂PO₄ 对夏枯草种子进行引发处理, 田间考察夏枯草种子在盐碱地的出苗质量。结果显示, 3 种引发处理对夏枯草种子在盐碱地中出苗质量均有显著性提高作用; 400 ~ 550 mg/L GA₃ 引发的夏枯草种子出苗率和出苗势最高; 1.5% ~ 2.0% 复合盐 KNO₃ - KH₂PO₄ 引发的夏枯草种子出苗整齐度最好; 400 ~ 550 mg/L GA₃ 引发的夏枯草幼苗生物量最大; 1.5% ~ 2.0% 复合盐 KNO₃ - KH₂PO₄ 引发的夏枯草根冠比最大。因此, 种子引发显著提高了盐碱地夏枯草出苗质量, 以 400 ~ 550 mg/L GA₃ 引发效果最佳。

关键词: 夏枯草; 种子引发; 盐碱地; 出苗质量

中图分类号: S567.23*9.04 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)04-0106-03

夏枯草 (*Prunella vulgaris* L.) 为唇形科夏枯草属多年生草本植物, 以干燥果穗入药, 具有清火、明目、散结、消肿的功能^[1]。现代药理研究表明, 夏枯草主要具有抗肿瘤、抗炎、抗菌、抗病毒、降血压、降血糖、调节免疫、保肝等药理作用^[2-4]。夏枯草已被广泛应用于医药卫生和食品饮料行业^[5], 其基原主要来自于人工栽培, 主产于安徽、湖北、河南

等省。江苏省苏北沿海地区有中药材种植传统, 主要以药用菊花为主, 是我国药用菊花的生产中心。夏枯草自然分布广泛, 苏北沿海地区具有种植夏枯草的生态条件, 是夏枯草自然分布区之一, 且夏枯草属于冬性作物, 种植时间与药用菊花互补, 可与药用菊花连茬。苏北沿海地区引种夏枯草不仅可以丰富当地的药材种类, 而且增加了菊花地的生物多样性, 对克服药用菊花连作障碍有潜在的促进作用。但苏北沿海地区土地盐碱化严重, 夏枯草在盐碱地引种栽培尚未有先例, 相应的种植技术也未见报导。夏枯草人工栽培历史较短, 驯化程度不高, 播种出苗是引种夏枯草首要解决的关键。已有较多的研究探讨了夏枯草种子的预处理技术, 对提高夏枯草在逆境条件下发芽能力有很好的参考价值, 但所有研究结果均是由室内条件下的发芽试验所得^[6-9], 未能在田间条件下得以验

收稿日期: 2015-12-16

基金项目: 江苏省苏北科技发展规划 (编号: BN2013069)。

作者简介: 朱文彬 (1963—), 江苏射阳人, 高级农艺师, 主要从事中药材生产技术研发与推广工作。Tel: (0515) 82632151; E-mail: ym_zwb@126.com。

通信作者: 王长林 (1971—), 安徽怀宁人, 博士, 副教授, 主要从事中药材研究。Tel: (025) 84396591; E-mail: wangcl@njau.edu.cn。

参考文献:

- [1] 杨清平, 陈双林, 郭子武, 等. 近海迎风面毛竹林竹材物理力学性质的研究[J]. 林业科学研究, 2012, 25(6): 784-788.
- [2] 蔡春菊, 彭镇华, 高健, 等. 毛竹种子萌发特性研究[J]. 中国农学通报, 2008, 24(12): 163-167.
- [3] 戴启惠. 丛生竹“节间切口带莖埋秆”育苗[J]. 内蒙古林业科技, 1981(1): 193-195.
- [4] 薛萍, 伍征明. 毛竹实生苗造林主要技术[J]. 林业科技开发, 2001, 15(5): 37-38.
- [5] 李蓉, 曾炳山, 何高峰, 等. 竹子组织培养的研究进展及趋势[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(11): 4405-4407, 4434.
- [6] 韩文军, 周宏, 何钢. 毛竹愈伤组织培养中褐变现象的研究[J]. 湖南林业科技, 2004, 31(3): 4-5.
- [7] 岳晋军. 毛竹再生体系构建的初步研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2008.
- [8] 周宏, 何钢. 毛竹愈伤组织培养研究[J]. 湖南林业科技, 2005, 32(4): 41-42.
- [9] Yuan J L, Yue J J, Wu X L, et al. Protocol for callus induction and somatic embryogenesis in Moso Bamboo[J]. PLOS One, 2013, 8(12): e81954.
- [10] 王青. 毛竹种质资源保存研究——种子、花粉、试管苗保存技术[D]. 北京: 北京林业大学, 2012.
- [11] 黄朝朝. 毛竹种子组织培养研究[D]. 桂林: 广西师范大学, 2013.
- [12] 李楠, 金群英, 彭华正, 等. 毛竹种子发芽特性和愈伤组织诱导能力初探[J]. 浙江林业科技, 2009, 29(3): 73-76.
- [13] 谢庆华, 邢溪燕, 谭汝学. 毛竹种子组培技术初步研究[J]. 林业科技通讯, 2000(12): 18-20.
- [14] 高志民, 谢锦忠. 竹子组织培养技术研究进展[J]. 世界竹藤通讯, 2013, 11(2): 1-6.
- [15] 李蓉, 郭起荣, 曾炳山, 等. 毛竹种子“以芽繁芽”组培快繁初步研究[J]. 世界竹藤通讯, 2008, 6(6): 9-13.
- [16] 刘坤, 卫志明. 一种大豆成熟种子的消毒方法[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(3): 260-261.
- [17] 吴小双, 张亚波, 吴盼盼, 等. 温湿度及土壤类型对土壤中绿僵菌孢子萌发的影响[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(6): 766-771.