

周余华, 金文浩, 邹迎子. 撒瓦那柏芽诱导增殖试验[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(21): 39–41.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.21.010

撒瓦那柏芽诱导增殖试验

周余华, 金文浩, 邹迎子

(江苏农林职业技术学院, 江苏镇江 212400)

摘要:以撒瓦那柏 1 年生茎尖作为外植体, 研究氯化汞对外植体的影响, 并筛选合适的初代和继代培养激素添加。结果发现, 对撒瓦那柏茎尖用 0.1% 氯化汞处理 7~8 min 灭菌效果最好, 用 MS 作为初代培养基, 添加 1 mg/L 6-BA 诱导率达 60%, 添加 0.05 mg/LNAA 诱导率达 80%; 以 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L 为继代培养基, 诱导率达 79.5%。

关键词:撒瓦那柏; 灭菌; 芽诱导; 增殖培养

中图分类号: S687.04⁺3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)21-0039-03

撒瓦那柏(*Chamaecyparis pisifera* cv. *aurea*) 别称金色海岸线、金叶日本花柏、金叶撒瓦那扁柏, 为柏科扁柏属植物, 属于常绿彩化针叶树中的黄化品种。树皮呈薄片红褐色。鳞叶紧贴, 小枝下垂, 细长。3 月开花, 雌球花单生枝顶, 雄球花椭圆形, 雌雄同株, 球果 11 月成熟, 种子有棱角微扁卵圆形, 种鳞盾形木质。温带及亚热带树种, 性喜温暖湿润气候, 喜光, 抗寒耐旱耐半阴, 喜深厚沙壤土, 能适应平原环境。幼苗期每年的生长量较小, 到郁闭后才会进入旺盛生长阶段, 耐修剪。生长高度和蓬径均可达 1.2 m。原产日本, 我国北京、南京、青岛、庐山、上海、杭州等地均有栽培, 上海市绿化管理局推荐的新优植物品种名录中就有该种植物^[1]。撒瓦那柏姿态婆娑, 枝黄纤弱, 观赏价值良好, 可用于多种场合, 如在园林中可从植、群植、孤植于供庭园、门边、屋隅; 花园里可以将其布置成小土丘状, 新叶呈现明亮金黄色, 垂下的枝条好似一个小瀑布姿态优雅, 尽显品味, 可以给人带来惬意舒畅的感觉。因此, 撒瓦那柏是园林中色块运用、模纹镶拼、彩篱构建的绝佳材料, 是稀少的色彩稳定的柏科植物^[2-3]。然而, 由于其繁殖速度缓慢, 市场上还没有销售。

撒瓦那柏可以进行播种、扦插和压条繁殖, 但是都存在一定的不足, 因此通过组织培养加快撒瓦那柏的繁殖速度就成

为一条很重要的快捷途径。本研究对撒瓦那柏采用不同的氯化汞消毒时间, 启动培养和继代培养的培养基和激素添加, 确立最佳氯化汞消毒时间、最佳培养基及激素配比浓度, 为撒瓦那柏组织培养的进一步研究奠定良好基础, 为撒瓦那柏规模化生产和工厂化育苗提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所采用的材料来自江苏农林职业技术学院苗圃, 在连续放晴 4 d 后于 2015 年 3 月 7 日采集撒瓦那柏健壮 1 年生茎段的无病虫害外植体。

1.2 试验设计及方法

1.2.1 外植体的整理 摘取撒瓦那柏 1 年生枝条的茎尖, 剪切成长约 2.5 cm 的茎段, 放入白瓷缸中用加了少量洗衣粉的水搓洗 2 min, 将泡沫淘洗干净后于自来水下流水冲洗 12 h, 待进行消毒处理试验。

1.2.2 消毒处理 先用 75% 乙醇处理 30 s, 再用 0.1% 氯化汞(HgCl_2)进行消毒处理, 时间分别设置为 4、5、6、7、8、9 min 6 个处理, 最后用无菌水冲洗 4 次, 残留的水分用无菌滤纸吸取。将消毒完毕的茎尖置于无菌纸上, 用剪刀、镊子剪去茎尖的下端 0.2 cm, 以免影响其从培养基中吸收养分, 接种于 MS 培养基上, 每处理接种 20 瓶, 每个试管型组培瓶放 1 个外植体。培养基为 MS+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂。每隔 1 d 观察 1 次外植体的污染情况, 8 d 后对外植体的死亡率、污染率和成活率进行统计。

1.3 启动培养

筛选不同的培养基 MS、1/2MS、WPM, 选用不同的 6-BA 2005, 36(2):106–109。

[34] Rose S, Botha F C. Distribution patterns of neutral invertase and sugar content in sugarcane internodal tissues[J]. Plant Physiol and Biochem, 2000, 38(11):819–824.

[35] Debra R, Jens K, C B Frederik, et al. Reduced neutral invertase activity in the culm tissues of transgenic sugarcane plants results in a decrease in respiration and sucrose cycling and an increase in the sucrose to hexose ratio[J]. Funct Plant Biol, 2010, 37(1):22–31.

收稿日期:2016-06-02

基金项目:江苏农林职业技术学院乡土树种种质资源创新团队项目(编号:2013td04)。

作者简介:周余华(1964—), 男, 江苏泰兴人, 博士, 副教授, 主要从事园林植物生理生态研究及教学生产。E-mail: uua16hot@126.com。

[31] Andersen M N, Asch F, Wu Y, et al. Soluble invertase expression is an early target of drought stress during the critical, abortion-sensitive phase of young ovary development in maize[J]. Plant Physiology, 2002, 130(2):591–604.

[32] 黄诚梅, 杨翠芳, 潘有强, 等. 可溶性酸性转化酶 SAI 基因在不同甘蔗基因型中表达分析[J]. 中国糖料, 2013(2):21–24.

[33] 姚瑞亮, 李杨瑞, 黄玉辉, 等. 甘蔗生长后期乙烯利处理对节间转化酶活性的影响及与蔗糖分积累的关系[J]. 广西农业科学,

和 NAA 的浓度:6-BA 浓度分别为 0.5、1.0、1.5 mg/L,NAA 的浓度分别是 0.05、0.10、0.20 mg/L,共计 18 种处理,每种处理 20 瓶,每试管瓶置 1 个外植体(表 1)。研究不同激素不同浓度下外植体萌芽情况。萌芽率=萌发数/接种数×100%。

表 1 启动培养试验方案

培养基	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	处理编号
MS	0.5		1
	1.0		2
	1.5		3
		0.05	4
		0.10	5
		0.20	6
1/2MS	0.5		7
	1.0		8
	1.5		9
		0.05	10
		0.10	11
		0.20	12
WPM	0.5		13
	1.0		14
	1.5		15
		0.05	16
		0.10	17
		0.20	18

1.4 继代增殖培养技术研究

将启动培养中的撒瓦纳柏茎段枯黄部分剪去,将诱导的芽体接入 6-BA 和 NAA 混合激素的 MS 培养基中,诱导其产生丛生芽并使其扩繁。继代增殖培养采用 3 种激素浓度的方法进行梯度试验,共计 9 种处理,每种处理 20 瓶,培养基 20 mL/瓶(表 2)。诱导率=新芽发生数/接种数×100%(接种 30 d 后统计成苗数)。

表 2 继代培养试验方案

处理编号	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)
1	0.5	0.05
2	0.5	0.10
3	0.5	0.20
4	1.0	0.05
5	1.0	0.10
6	1.0	0.20
7	1.5	0.05
8	1.5	0.10
9	1.5	0.20

1.5 培养条件

培养基内均添加 7 g/L 琼脂和 30 g/L 蔗糖,调节 pH 值为 5.8~6.0,在 121 ℃ 高压下灭菌 25 min。将接种后的植物体置于培养室内,光照 16 h/d,光照度约为 2 000 lx,温度控制在(25±2) ℃。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时间对撒瓦那柏茎尖污染的影响

不同氯化汞消毒时间对撒瓦那柏茎尖污染率、死亡率有明显影响(表 3)。对外植体处理效果最好的是处理 4 和处理

5,成活率达到 57.0% 和 57.2%,污染率最高的也是处理 1,达 52.5%,而死亡率最高的是处理 6,达 41.2%,毫无疑问死亡率随氯化汞处理时间的延长而升高,污染率反而下降,这表明随着氯化汞处理时间越长,对外植体的伤害也就越大,使植物的细胞失去活力。从表 3 中各项指标综合起来可以看出,处理 4 和处理 5 是最好的处理条件,也就是在 75% 的乙醇处理 30 s 后,用 0.1% 氯化汞处理 7~8 min 外植体的成活率最大。

表 3 不同消毒时间对撒瓦那柏茎尖污染的影响

处理	乙醇处理 时间(s)	0.1% 氯化汞处理 时间(min)	污染率 (%)	死亡率 (%)	成活率 (%)
1	30	4	52.5	4.2	43.3
2	30	5	47.1	12.3	40.6
3	30	6	32.2	21.8	46.0
4	30	7	13.4	29.6	57.0
5	30	8	6.5	36.3	57.2
6	30	9	6.8	41.2	52.0

启动培养中污染多为真菌污染和细菌污染。其中细菌污染占 25%,其菌落较小,嗅一下有臭味,表面呈乳脂状光泽。真菌污染占 17.2%,其菌落大,颜色多样,多为黄、白、灰、黑等颜色,表面呈毛绒状,嗅之一般有霉味。造成污染的来源有很多,有外植体、培养基 pH 值、激素浓度、操作人员的不恰当操作、培养瓶、接种工具等多方面因素。

2.2 启动培养基及激素添加

撒瓦纳柏启动培养总的芽诱导率相对较低,诱导率最高的也仅有 80%,植株长势也不乐观,进一步说明柏类植物组织培养较难成活。从培养基及激素对芽诱导率的影响(表 4)来看,MS 培养基(处理 1~处理 6)上总新芽发生数为 55 个,1/2MS 培养基上新芽发生总数为 44 个,而 WPM 培养基上新芽发生总数为 23 个,所以 MS 是最适合的培养基,更易诱导芽的生长。从激素的配比来看,6-BA 中处理 2 对芽诱导率最高,达到 60%,最佳浓度为 1 mg/L;NAA 中处理 4 对芽诱导率最高,达 80%,说明 NAA 最佳浓度为 0.05 mg/L。另外 1/2MS 培养基上 6-BA 和 NAA 的诱导率其最高值分别是 50%、65%,WPM 培养基上 6-BA、NAA 的诱导率其最高值分别是 25%、40%。因此合适的培养基是 MS,激素添加 1 mg/L 6-BA 或 0.05 mg/L NAA 最好。

2.3 增殖培养基及激素组合

经过 1 个月对撒瓦纳柏继代增殖培养的分析调查,撒瓦纳柏芽诱导率处理 1 最高,达到 79.5%,最低的处理 5 仅为 18.2%,从方差分析来看,处理 1 处于 A 层,比处理 2 高出 55.27%,更明显高于其他处理(表 5)。从结果看,增殖培养的最佳培养基及激素组合为 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA。但是处理 1 新发的芽有一部分偏黄,达 5%,枯黄率最高的处理 9 有 16.2%,所以在进行继代培养时,对光照可以进行适当的补充。

3 结论与讨论

撒瓦纳柏组织培养中,对外植体最可靠的灭菌方法是:首先对外植体用 75% 乙醇消毒 30 s 后,再用无菌水漂洗 1 遍;然后用氯化汞溶液消毒 7~8 min 后,用无菌水漂洗 3 遍。通过此消毒方法,外植体的成活率可达 57%,且芽生长健壮。

表 4 启动培养诱导率调查

处理 编号	接种外 植体数 (个)	萌发率 (%)	诱导率 (%)	生长状况
1	20	20	25	生长慢、植株低矮、叶色枯黄
2	20	55	60	生长迅速、植株健壮、叶色嫩绿
3	20	25	30	生长慢、植株低矮、叶色枯黄
4	20	65	80	生长迅速、植株健壮、叶色嫩绿
5	20	10	30	生长慢、植株低矮、叶色枯黄
6	20	40	50	生长迅速、植株低矮、叶色嫩绿
7	20	5	15	生长慢、植株低矮、叶色枯黄
8	20	30	50	生长慢、植株低矮、叶色嫩绿
9	20	10	30	生长慢、植株低矮、叶色枯黄
10	20	20	30	生长慢、植株低矮、叶色枯黄
11	20	40	65	生长迅速、植株低矮、叶色嫩绿
12	20	20	30	生长慢、植株低矮、叶色枯黄
13	20	10	20	生长慢、植株低矮、叶色枯黄
14	20	10	25	生长慢、植株低矮、叶色枯黄
15	20	0	0	生长慢、植株低矮、叶色枯黄
16	20	0	0	生长慢、植株低矮、叶色枯黄
17	20	25	30	生长慢、植株低矮、叶色嫩绿
18	20	30	40	生长慢、植株低矮、叶色嫩绿

表 5 增殖培养诱导率调查

处理编号	接种数 (个)	新芽发生数 (个)	诱导率 (%)	枯黄率 (%)
1	44	35	79.5A	5.0
2	43	22	51.2AB	15.0
3	46	12	26.1B	5.4
4	45	17	37.8B	0.0
5	44	8	18.2B	12.3
6	43	16	37.2B	8.9
7	43	13	30.2B	7.8
8	40	10	25.0B	13.0
9	44	12	27.3B	16.2

撒瓦纳柏启动培养芽萌发率最大为 65%，芽诱导率为 80% 以上，植株长势整体偏矮，说明撒瓦纳柏组织培养过程中不易诱导丛生芽，培养繁殖较为困难。启动培养基在 3 种培养基中以 MS 最好，最佳的激素配比浓度 6-BA 为 1 mg/L，NAA 的最佳浓度为 0.05 mg/L。在增殖培养过程中，最佳培养基为 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA。此时撒瓦纳柏的芽诱导率达到 79.5%，且芽长势最好，植株最为健壮。

柏科植物组织培养较难成活，因此应选择分化潜力较大的胚或茎段进行植物组织培养。MS、1/2MS、WPM、SH 是柏科植物常用培养基，将多种激素混合可使柏科植物产生丛生芽。由于试验过程中所使用的基本培养基是针对于培养大多数外植体幼苗而配制的固定配方，因此在操作时常会考虑植物的生长特点而进行适当调整。植物组织培养过程中增殖培养作为最重要的工作环节，对植物腋芽和不定芽的诱导发挥重要作用^[4-6]。有研究者对叉子圆柏进行组培，发现适宜叉子圆柏茎段分化的诱导培养基为 1/2MS+5.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA^[7]；当然对不同的柏科植物诱导时培

养基和适宜的激素浓度都会有所不同^[8]，在培养基配制过程中还可添加一些附加成分促使外植体诱导分化^[9-13]。另外植物在漫射光的照射条件下能使愈伤组织的诱导更好生成^[14]。

撒瓦纳柏是柏科针叶树种，鳞叶密被，对外植体的消毒相对较难，所以在消毒过程中每个程序都必须防止外植体受到污染。本试验中消毒处理过程稍显简单，可适当对乙醇消毒的时间加以变化，或者增加其他有效消毒药物的使用，筛选出最适宜的消毒方法^[15]。当然消毒时间还与组培时期、外植体的幼嫩程度有密切的关系。

对培养基选择主要从 MS、1/2MS 和 WPM 中筛选，但对糖的添加、活性炭等对外植体的萌发诱导及生长的影响没有进行相关的试验^[16]，这是本试验过程不太完善的部分。培养室内的温度变化对植物体的生长影响也很大。而对激素的添加在启动培养中可进行混合添加，但要注意混合添加的效果和单独添加的效果是不一样的。

参考文献：

[1] 上 绿. 新优植物推荐[J]. 园林, 2007(8): 30-31.

[2] 何小弟, 祁亚萍. 彩叶树种的选择与应用[J]. 园林, 2010(11): 18-21.

[3] 何海燕, 路兆庚, 何小弟. “花样”繁多的彩叶树种[N]. 中国花卉报, 2014-10-29(A02).

[4] 金江群, 韩素英, 郭泉水. 柏科植物组织培养研究现状与展望[J]. 世界林业研究, 2012(25): 34.

[5] 刘中兵, 徐 西. 垂枝侧柏离体再生体系建立初探[J]. 湖北农业科学, 2012(8): 1689.

[6] 齐力旺, 杨云龙, 韩素英, 等. 侧柏的组织培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 1995(4): 284-285.

[7] 石美丽. 叉子圆柏组织培养和快速繁殖研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009: 42-64.

[8] 王建华, 齐力旺, 韩素英. 绒柏的组织培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(1): 76.

[9] 李春艳, 王林和, 慈忠玲. 臭柏愈伤组织的诱导[J]. 内蒙古农业大学学报, 2000, 21(2): 58-62.

[10] 徐龙光, 郭军战, 严 婷. 古侧柏组织培养研究[J]. 西北林学院学报, 2014, 30(5): 92-95.

[11] 黎海利, 谭飞理, 刘锴栋, 等. 聚花过路黄的组织培养和快速繁殖[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(6): 51-53.

[12] 韩晓勇, 宋婷婷, 王 立, 等. 靖江香沙芋组织培养快繁技术[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(1): 50-52.

[13] 张艳萍, 赵 玮, 董治宝, 等. 甘肃荒漠地区野生白刺的组织培养[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(9): 80-82.

[14] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882.

[15] 孟少童. 铅笔柏种源引进及栽培技术研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2006: 32-35.

[16] 刘明群, 张 凯, 赵建华, 等. 蓝莓茎段初代启动培养研究[J]. 现代农业科技, 2013, 7(21): 74-75.