

文章编号:1001-7380(2017)03-0005-04

红叶石楠开放式组织培养抗污染试验初报

卢绪娟, 祝三强

(南京视觉艺术职业学院, 江苏 南京 211215)

摘要:为探索红叶石楠开放式组织培养抗污染技术,以其当年生茎段为外植体,对休眠芽诱导培养阶段杀菌剂的使用顺序,培养基中添加不同质量分数的次氯酸钠对外植体的影响,基本培养基中分别去除MS、蔗糖、琼脂后外植体的污染及生长状况进行了研究,并在获得最佳抗污染方案的基础上,以尿素为外源能量供给物,对外植体上芽的生长状况进行了研究。结果表明:红叶石楠休眠芽诱导培养阶段,先用0.1%次氯酸钠处理外植体7 min,再用75%酒精处理1 min,无需冲洗,是最佳外植体杀菌方案;在MS固体培养基中添加0.01%的次氯酸钠,采取无糖培养的方式,有利于污染的控制;尿素可显著促进已萌动外植体上芽的生长,最佳喷施用量为3.0 g/L。

关键词:红叶石楠;开放式组织培养;休眠芽诱导;杀菌;抗污染

中图分类号:Q945.51;S723.1⁺32 **文献标志码:**A **doi:**10.3969/j.issn.1001-7380.2017.03.002

红叶石楠(*Photinia fraseri*)是蔷薇科石楠属红叶常绿小乔木,因耐修剪,耐干旱,耐贫瘠,生态适应性强,叶片观赏期长,而享有“红叶绿篱之王”的美誉,是目前应用较为广泛的优良园林绿化植物^[1-2]。有关红叶石楠传统组织培养的研究已有较多报道,但未见其开放式组织培养的相关研究。与传统组织培养相比较,开放式组织培养脱离了严格的无菌操作环境,因而降低了对环境的要求,简化了操作环节,大大节约了生产成本,具有良好的发展前景^[2-6]。目前已有关于兰花、菊花、烟草、荸荠等植物的开放式组织培养研究报道^[7-9]。开放式组织培养,污染控制是影响其成败的关键。本研究以红叶石楠当年生茎段为外植体,对其开放式组织培养中休眠芽诱导培养阶段的抗污染技术进行了初步研究,建立了合理的休眠芽诱导培养抗污染方案。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

材料为南京视觉艺术职业学院校内大田苗。

1.2 试验方法

5—10月晴天中午采集生长健壮、无病虫害且具有8—10片叶当年生枝条,摘除叶片和叶柄,用洗涤剂清洗表面污垢后,经流水冲洗10—15 min,备用。以独立普通实验室作为接种室,接种室每7 d清洁与杀菌1次。试验前用75%酒精喷洒试验区

域,接种器具用75%酒精浸泡30 min以上,接种过程中器具始终浸泡在75%酒精中。

从预处理好的试验材料中,切取第4—6片叶所在的单腋芽茎段为外植体,外植体总长度约2 cm,腋芽2端的保留茎段长度相近。培养条件:温度(25±1)℃,空气湿度60%—80%,光照度2 000—3 000 lx。培养瓶具盖但不密闭。采用对比试验,以75%酒精与0.1%次氯酸钠(添加Triton X-100)为杀菌剂,按照不同的使用顺序对外植体进行杀菌处理。将杀菌后的外植体接种到MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+6.0 g/L 琼脂+30 g/L 蔗糖的培养基中。每处理接种50瓶,每瓶接种外植体1个,接种20 d后统计启动率、污染率、褐变度。每个试验重复3次。按照表1的杀菌处理试验设计方案,探索不同处理试验中的杀菌效果。

培养基中添加物试验设计如表2所示。各处理中所有培养基均添加1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA。每处理接种50瓶,每瓶接种外植体1个,20 d统计芽的平均生长量、污染率和褐变度。试验重复3次。采用对比试验,探索培养基中不同添加物处理试验中的污染控制效果。

选取诱导培养10 d的无污染、已萌动、生长状况相近的外植体喷施不同质量浓度(1.0, 3.0, 5.0, 10.0 g/L)的尿素,以不喷施尿素的外植体(CK)为对照。喷雾前对培养室进行清洁与杀菌处理。外植

收稿日期:2017-02-27;修回日期:2017-03-08

作者简介:卢绪娟(1981-),女,山东日照人,讲师,硕士。主要研究方向:园林植物栽培生理。

表 1 杀菌处理试验设计方案

处理	75%酒精杀菌时间/min	0.1%次氯酸钠杀菌时间/min	杀菌后冲洗与否
T1	0.5(先)	1.0(后)	冲洗
T2	0.5(先)	5.0(后)	冲洗
T3	0.5(先)	7.0(后)	冲洗
T4	1.0(先)	1.0(后)	冲洗
T5	1.0(先)	5.0(后)	冲洗
T6	1.0(先)	7.0(后)	冲洗
T7	2.0(先)	1.0(后)	冲洗
T8	2.0(先)	5.0(后)	冲洗
T9	2.0(先)	7.0(后)	冲洗
T10	1.0(先)	7.0(后)	否
T11	1.0(后)	7.0(先)	冲洗
T12	1.0(后)	7.0(先)	否

先、后代表每个处理中杀菌剂的使用顺序

表 2 培养基中添加物试验设计

处理	基本培养基	蔗糖/(g/L)	琼脂/(g/L)	次氯酸钠/%
M1	MS	30	6.0	0.005
M2	MS	30	6.0	0.01
M3	MS	30	6.0	0.03
M4	MS	30	6.0	0.05
M5	MS	30	6.0	0.1
M6	MS	30	6.0	0.2
M7	H ₂ O	30	6.0	0.01
M8	MS	0	6.0	0.01
M9	MS	30	0	0.01

体接种在上述试验筛选的适宜培养基中。喷施周期为每 7 d 1 次,连续 3 次。20 d 后,统计外植体上芽的平均生长量,研究不同质量浓度的尿素对外植体上芽的平均生长量的影响。

褐变度统计标准:0—接种茎段外观鲜亮,无任何褐化现象;1—接种茎段横切面表皮及韧皮部呈现褐色;2—接种茎段横切面全部呈现褐色;3—接种茎段下部 1/3 呈现褐色;4—接种茎段下部 1/2 呈现褐色;5—接种茎段全部呈现褐色。

污染率=(污染瓶数/接种总瓶数)×100%

启动率=(成活外植体数/未污染外植体总数)×100%

芽的平均生长量=未污染外植体上芽的长度和/未污染外植体总数

1.3 数据统计

采用 Excel 和 DPS 对试验数据处理与分析。

2 结果与分析

2.1 不同杀菌处理方式对外植体的影响

结果见表 3。由表 3 的试验统计结果可知,不

同处理对外植体启动率、污染率和褐变度的影响不同。T1 至 T9 的各处理中,启动率与污染率呈相同的变化趋势,75%酒精杀菌时间相同时,随着 0.1%次氯酸钠杀菌时间的延长,外植体的启动率与污染率均呈现逐渐下降的趋势,各处理之间差异显著,0.1%次氯酸钠杀菌时间相同时,随着 75%酒精杀菌时间的延长,外植体的启动率与污染率同样呈逐渐下降的趋势,各处理之间差异显著。T1 至 T9 的各处理中,褐变度的变化趋势与污染率和启动率的变化趋势相反,75%酒精杀菌时间相同时,随着 0.1%次氯酸钠杀菌时间的延长,外植体的褐变度呈逐渐上升的趋势,各处理之间差异显著,0.1%次氯酸钠杀菌时间相同时,随着 75%酒精杀菌时间的延长,外植体的褐变度同样呈逐渐上升的趋势,各处理之间差异显著。综合考虑各因素,T6 处理中 75%酒精与 0.1%次氯酸钠的用量为最佳用量。

表 3 杀菌处理试验统计结果

处理	启动率/%	污染率/%	褐变度
T1	92.10 a	61.70 a	1.20 h
T2	89.00 c	38.20 d	1.60 g
T3	87.02 d	11.10 g	2.00 d
T4	90.40 b	55.40 b	1.30 h
T5	86.30 e	29.10 e	1.80 f
T6	83.40 f	9.10 h	2.10 d
T7	87.10 d	47.70 c	1.90 e
T8	52.20 h	23.40 f	3.03 b
T9	39.00 i	6.30 j	3.60 a
T10	65.53 g	8.50 i	2.60 c
T11	82.21 f	9.50 h	2.12 d
T12	82.16 f	8.62 i	2.16 d

Duncan's 显著性检验,不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著

与 T6 处理相比较,T10 处理外植体启动率降低了 17.87%,褐变度上升了 0.50,2 个处理中,75%酒精与 0.1%次氯酸钠处理时间相同,但 T10 处理未做冲洗,可见,残留的杀菌剂对外植体本身造成了明显损伤。但 T6 处理因冲洗导致污染率上升了 0.60%。

T6 处理与 T11 处理中,75%酒精与 0.1%次氯酸钠的用量相同而使用顺序不同,外植体的启动率分别为 83.40%与 82.21%,差异不显著,2 者的褐变度与污染率均差异不显著,这说明在冲洗的条件下杀菌剂的使用顺序对杀菌效果无显著影响。

T10 处理与 T12 处理相比较,T12 处理的启动率上升了 16.63%,褐变度降低 0.44,污染率差异不显著,这说明在不冲洗的条件下杀菌剂的使用顺序对杀菌效果有显著的影响。

T11 处理与 T12 处理相比较,75%酒精与 0.1% 次氯酸钠的用量与加入顺序均相同,但 T12 未冲洗,2 处理的启动率与褐变度均无显著差异,但 T11 处理的污染率上升了 0.88%,同样说明冲洗造成了污染率的升高。

综上所述,T12 处理即先用 0.1% 次氯酸钠处理 7 min,再用 75%酒精处理 1 min,无需冲洗,简化了操作程序,且启动率、污染率和褐变度均达到理想效果,是最佳外植体杀菌方案。

2.2 培养基中不同添加物对外植体上芽的平均生长量、污染率和褐变度的影响

采用 T12 杀菌方式对外植体进行杀菌处理,结果如表 4 所示。

表 4 培养基中添加物试验统计结果

处理	芽的平均生长量/cm	污染率/%	褐变度
M1	1.03 a	14.31 a	1.92 f
M2	1.01 b	7.10 c	2.10 e
M3	0.65 f	4.01 d	2.71 d
M4	0.50 g	1.20 f	3.01 c
M5	0.20 h	0.21 g	3.42 b
M6	0.01 i	0 h	4.21 a
M7	0.83 d	7.03 c	2.01 e
M8	0.71 e	3.70 e	1.72 g
M9	0.99 bc	11.21 b	1.30 h

Duncan's 显著性检验,不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著

由表 4 中 M1 到 M6 的试验统计结果可知,随着次氯酸钠质量分数的升高,外植体上芽的平均生长量和污染率均呈逐渐下降的趋势,且各处理之间差异显著。M1 处理在培养基中添加 0.005% 的次氯酸钠,外植体上芽的平均生长量为 1.03 cm,污染率为 14.31%,当次氯酸钠质量分数升高至 0.2% 时,外植体上芽的平均生长量仅为 0.01 cm,而污染率下降为 0;随着次氯酸钠质量分数的升高,外植体的褐变度呈逐渐上升的变化趋势,M1 处理在培养基中添加 0.005% 的次氯酸钠,外植体的褐变度为 1.92,当次氯酸钠质量分数上升至 0.05% 时,外植体的褐变度上升为 3.01,为 M1 处理的 1.57 倍。试验中观察到,当外植体的褐变度等级大于 3 时,新芽在生长过程中会逐渐褐变死亡。随着次氯酸钠质量分数的持续上升外植体的褐变度急剧上升。M6 处理中外植体的褐变度是 M1 处理的 2.19 倍,该处理中外植体上芽的平均生长量仅为 0.01 cm,外植体已无法正常生长。综合考虑外植体上芽的平均生长量、污染率和褐变度可知,休眠芽诱导培养基

中次氯酸钠最佳质量分数为 0.01%。

在 M2 与 M7 处理中,外植体上芽的平均生长量差异显著,M7 处理中外植体上芽的平均生长量降低了 0.18 cm,而 2 个处理间外植体的污染率和褐变度均无显著差异,这说明培养基中的 MS 对休眠芽诱导培养阶段外植体的污染率影响较小。

与 M2 处理相比较,M8 处理中外植体上芽的平均生长量、污染率、褐变度均降低,且各处理之间差异显著。M8 处理中,外植体上芽的平均生长量为 0.71 cm,比 M2 处理中降低了 0.30 cm,外植体污染率比 M2 降低了 3.40%,外植体的褐变度仅为 1.72,比 M2 处理降低 0.38。这说明培养基中不添加蔗糖有利于控制污染。

M9 与 M2 处理的外植体上芽的平均生长量无显著差异,但污染率上升了 4.11%,这说明液体培养基不利于控制污染。

综上所述,在休眠芽诱导培养的初期阶段,在 MS 固体培养基中添加 0.01% 的次氯酸钠,采取无糖培养的方式有利于污染的控制。

2.3 不同质量浓度的尿素对外植体上芽的平均生长量的影响

在 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+0.01% 次氯酸钠的固体无糖培养基中,对诱导培养 10 d 的无污染、生长状况相近的已萌动外植体喷施不同质量浓度的尿素,结果如图 1 所示。

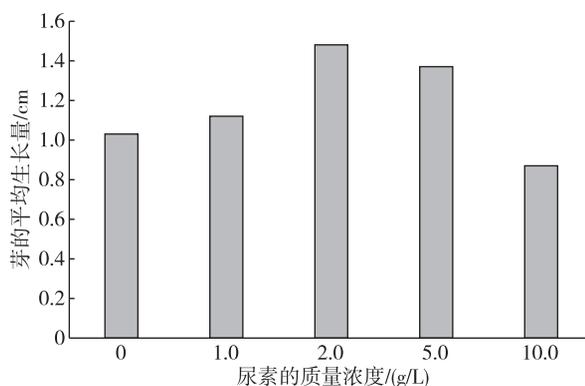


图 1 不同质量浓度的尿素对外植体上芽的平均生长量的影响

由图 1 可知,不同质量浓度的尿素对外植体上芽的平均生长量影响不同。与 CK 相比较,随着尿素质量浓度的增加,外植体上芽的平均生长量呈先上升后下降的趋势。当尿素的喷施质量浓度达到 3.0 g/L 时,外植体上芽的平均生长量达到峰值,比

CK高0.45 cm;当尿素质量浓度达到5.0 g/L时,外植体上芽的平均生长量比CK高0.34 cm,但比喷施3.0 g/L尿素时低了0.11 cm;当尿素的质量浓度达到10.0 g/L,芽的平均生长量低于CK。上述试验结果说明,适宜浓度的尿素有利于外植体的生长。在试验中观察到,当尿素质量浓度高于3.0 g/L后,芽的新生叶片边缘逐渐出现枯萎现象;当尿素质量浓度达到10.0 g/L,部分新生叶片出现死亡。因此,本试验表明,在红叶石楠芽诱导培养阶段喷施3.0 g/L尿素最佳。

3 结论与讨论

试验表明,开放式组织培养外植体杀菌处理过程中,75%的酒精与0.1%的次氯酸钠的使用顺序会对外植体的杀菌效果产生不同的影响。先使用75%的酒精,后使用0.1%的次氯酸钠,对外植体进行杀菌处理,若不用纯净水对外植体进行冲洗,则接种后外植体的褐变度较高,启动率较低,但冲洗过程却提高了外植体的污染率;而先使用0.1%的次氯酸钠,再使用75%的酒精对外植体进行杀菌处理,且不用纯净水进行冲洗,外植体的启动率、褐变度与污染率均达到了较为理想的效果。这可能与次氯酸钠通过水解产生次氯酸,次氯酸再进一步分解形成具极强氧化性的新生态氧,从而达到杀菌效果的过程有关。然而这一系列化学反应的产物,持续性地对外植体造成了损伤。使用75%的酒精在杀菌过程中对残留在外植体表面的次氯酸钠起到了冲洗作用,且酒精极易挥发,故先使用次氯酸钠,再使用酒精的处理方法对外植体的损伤较小,杀菌效果理想。因此,本试验最终确定,先使用0.1%的次氯酸钠处理7 min,再使用75%的酒精处理1 min,不用纯净水冲洗,是休眠芽诱导培养阶段最佳外植体杀菌方案。

在培养基中添加不同质量分数的次氯酸钠,对外植体上芽的平均生长量、污染率和褐变度的影响各不相同,较高质量分数的次氯酸钠可显著降低外植体的污染率,但也对外植体本身造成了不同程度的损伤,致使褐变度升高,芽的平均生长量降低。本试验最终确定以0.01%的次氯酸钠为最佳。

本研究对培养基中分别去除MS、蔗糖、琼脂后外植体上芽的平均生长量、褐变度以及污染率进行了统计,认为去除MS的培养基中,外植体的污染率

和褐变度有所降低,但差异不显著,而外植体上芽的平均生长量却显著降低,这说明休眠芽诱导培养阶段,MS是影响外植体生长的重要因子^[10]。与固体培养基相比较,无琼脂的液体培养基中,外植体的污染率急剧上升,外植体腐烂速度较快。本试验中的液体培养基采用的是静置培养方式,有关流动式液体培养基中污染率的状况有待进一步研究。植物组织培养中,蔗糖是碳源和能量供给物,同时也是微生物滋生的主要原因,去除蔗糖,培养基中外植体的污染率大大降低,结果与张伟的研究结果相一致^[11]。

在试验中观察到,在未添加蔗糖的培养基中,随着培养时间的延长,外植体的生长速度减慢,叶片颜色逐渐变黄。本试验以尿素作为外植体生长的外源能量供给物进行了相关研究,结果表明,在已萌动的休眠芽上喷施3.0 g/L尿素,可显著促进萌动芽的生长。但是,尿素在开放式组织培养中增殖培养与生根培养阶段的作用,还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 潘晓东. 红叶石楠的栽培技术及其园林应用前景[J]. 绿色中国, 2004, 20(4): 61.
- [2] 吴冬, 王红梅. 景观树种红叶石楠的组织培养[J]. 海南师范大学学报(自然科学版), 2011, 24(3): 314-316.
- [3] 龚霄雯, 曾丽, 赵子刚, 等. 红叶石楠‘红罗宾’组织培养快繁技术的优化[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2011, 29(6): 35-41.
- [4] 肖平, 杨建荣, 陈燕. 植物组织无糖暴露培养工厂化生产技术[J]. 农业实用工程技术, 2003, 12(1): 34-36.
- [5] 曾云英. 开放式组织培养的研究进展及发展前景[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(4): 11-13.
- [6] 张慎, 郭陶然, 邓志瑞, 等. 植物开放式组织培养的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(26): 14281-14283, 14288.
- [7] YANAGAWA T, NAGAI M, OGINO T, et al. Application of disinfectants to orchid seeds, plantlets and media as a means to prevent *in vitro* contamination[J]. Lindleyana, 1995, 10(1): 33-36.
- [8] 吴桂容, 曲芬霞, 余炳锋. 贺州荸荠开放式组织培养体系建立[J]. 北方园艺, 2013(6): 110-112.
- [9] 王晓煌, 黄胜琴, 李玲. 4种抑菌剂在烟草开放式组织培养中的应用[J]. 广东农业科学, 2015, 42(5): 58-62.
- [10] KUBOTA C. Concepts and background of photoautotrophic micropropagation[J]. Progress in Biotechnology, 2001, 18(1): 325-334.
- [11] 张伟. 盆栽红掌离体快繁简化培养基的研究[J]. 信阳农业高等专科学校学报, 2012, 22(2): 102-106.