

红锥茎段外植体消毒和初代培养*

廖焕琴¹ 叶芷华² 潘文¹ 张卫华¹

(1. 广东省林业科学研究院 / 广东省森林培育与保护利用重点实验室, 广东 广州 510520; 2. 广东生态工程职业学院, 广东 广州 510520)

摘要 红锥 (*Castanopsis hystrix*) 是华南地区重要的优质乡土阔叶树种, 研究以红锥优树茎段为材料, 研究不同消毒剂及处理时间、茎段木质化程度、留叶方式、光照强度和培养基对茎段初代培养试验的影响。结果表明, 以红锥半木质化优树茎段为外植体, 75% 酒精 5 s, 0.1% 升汞 5 min, 保留 1/2 叶, 接种于改良 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L KT+0.2 mg/L NAA 培养基, 置于 3 000 Lux 光照强度下培养诱导效果最佳。

关键词 红锥; 初代培养; 污染率; 萌芽率

中图分类号: S722.8 **文献标志码**: A **文章编号**: 2096-2055 (2018) 06-0085-05

Research on Explant Disinfection and Primary Culture of *Castanopsis hystrix* Stem

LIAO Huanqin¹ YE Zhihua² PAN Wen¹ ZHANG Weihua¹

(1. Guangdong Academy of Forestry/ Guangdong Provincial Key Laboratory of Silviculture, Protection and Utilization, Guangzhou, Guangdong 510520, China; 2. Guangdong Eco-Engineering Polytechnic, Guangzhou, Guangdong 510520, China)

Abstract *Castanopsis hystrix* is an important high quality native broad-leaved tree species in Southern China. This paper studied the influences of different disinfectants and treating time, maturity level, way of keeping leaves, light intensity and culture medium on primary culture of *C. hystrix* stem. The stems were employed as initial explants, origins of which were superior individuals. The results showed the best induction rate when the stems were treated with 75% alcohol for 5 s, 0.1% mercuric chloride for 5 min, kept 1/2 leaf, vaccinated in culture medium: MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L KT + 0.2 mg/L NAA under 3 000 Lux light intensity.

Key words *Castanopsis hystrix*; primary culture; contamination rate; germination rate

红锥 (*Castanopsis hystrix*) 属壳斗科 (Fagaceae) 栲属 (*Castanopsis*) 常绿乔木, 高约 25 m, 胸径约 1.5 m。其为华南地区重要的乡土阔叶珍贵用材和多用途树种^[1-2]。它具有生长快、萌芽力强、材质优、适应广、效益高、混生性能好等各种优良特性。是与松、杉等针叶树种混交造林地最理想伴生树种之一^[3-5]。红锥可用于车、船、梁、柱、建筑及家具或工艺品的优质木材, 是重

要用材树种。

目前, 红锥的主要繁殖方法为种子和扦插繁殖, 但因红锥母树林结实的大小年现象十分明显, 结实小年经常采不到种子, 资源有限的条件下不能满足造林需求^[4], 扦插繁殖能够保持母株优良特性, 但优树穗条有限, 且扦插苗造林后存在不同程度的偏冠现象^[6-7]。组织培养繁殖不仅可以保持母本的优良性状, 而且不受季节和时间的限制,

* 基金项目: 广东省林业科技创新项目 (2014KJCX002); 广东省省级科技计划项目 (2014B020202002)。

第一作者: 廖焕琴 (1988—), 女, 工程师, 主要从事林木遗传育种研究, E-mail: liaohuanqin@sinogaf.cn。

通信作者: 张卫华 (1978—), 女, 高级工程师 (教授级), 主要从事林木遗传育种研究, E-mail: zwh523@sinogaf.cn。

具有快速繁殖的特点，是目前优良种质无性繁育的重要手段^[8]。目前通过红锥组培实现优良无性系推广应用的报道甚少^[9-11]。本研究以红锥优树茎段为材料，研究不同消毒剂及处理时间、茎段木质化程度、留叶方式、光照强度和培养基对茎段初代培养试验的影响，以期建立红锥组培繁育体系，对红锥优良种质开发和利用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料采自广东省林业科学研究院红锥种质资源圃。选取生长健壮、洁净且无病虫害植株的 2 a 生优树截桩促萌半木质化枝条，用冰袋和干净的湿毛巾低温保存并立即带回实验室。剪去叶片后用小刷子蘸取洗洁精水轻刷，自来水冲洗 10 min，加入消毒粉液浸泡枝条 10 min，自来水冲洗 30 min 后将枝条剪成约 4 cm 的带芽小段备用。

1.2 试验方法

1.2.1 消毒剂种类及处理时间 表面清洁后备用

的红锥茎段在超净工作台内经 75% 酒精和 0.1% 升汞灭菌，无菌水冲洗 3~5 次后接入培养基中，设置酒精 0，5，10，15，30 s 5 个水平，升汞 3，5，8 min 3 个水平，共 15 个处理（表 1），筛选最佳消毒方法。每个处理接种 30 瓶。

1.2.2 材料木质化程度 选取优树侧枝嫩枝、侧枝半木质化、侧枝木质化、主茎半木质化枝条作为外植体进行试验，研究供试材料不同木质化程度对外植体萌芽率的影响。每个处理接种 40 瓶。

1.2.3 留叶方式 对消毒完成后的外植体，在接种前采用剥芽表层、剥叶柄、留叶柄、留 1/4 叶和留 1/2 叶 5 种不同处理方式，研究去留叶片对外植体萌芽率的影响。每个处理接种 30 瓶。

1.2.4 光照强度 将接种好的茎段分别置于 1 000，2 000，3 000 Lux 光照下进行培养，研究不同光照强度对外植体萌芽率的影响。每个处理接种 30 瓶。

1.2.5 培养基 将处理后的茎段接种于不同培养基内（表 2），研究不同基本培养基及植物生长调节

表 1 不同消毒剂种类及处理时间
Tab.1 Different disinfectants and treating time

处理号 Serial number	处理 Treatment	处理号 Serial number	处理 Treatment
1	酒精 0 s，升汞 3 min	9	酒精 10 s，升汞 8 min
2	酒精 0 s，升汞 5 min	10	酒精 15 s，升汞 3 min
3	酒精 0 s，升汞 8 min	11	酒精 15 s，升汞 5 min
4	酒精 5 s，升汞 3 min	12	酒精 15 s，升汞 8 min
5	酒精 5 s，升汞 5 min	13	酒精 30 s，升汞 3 min
6	酒精 5 s，升汞 8 min	14	酒精 30 s，升汞 5 min
7	酒精 10 s，升汞 3 min	15	酒精 30 s，升汞 8 min
8	酒精 10 s，升汞 5 min		

表 2 不同培养基
Tab.2 Different culture medium

处理号 Serial number	培养基 Culture medium
1	1/2MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA
2	改良 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L KT+0.2 mg/L NAA
3	改良 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L GA3+0.2 mg/L NAA
4	改良 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA
5	MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L KT+0.5 mg/L IAA
6	MS+0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L GA3+0.5 mg/L IAA
7	MS+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA

剂对外植体萌芽率的影响。每个处理接种 30 瓶。

1.2.6 统计方法 连续定期观察红锥茎段污染和生长情况 30 d 后，统计污染和萌芽情况。

污染率 = (污染数 / 接种数) × 100%

存活率 = (存活数 / 接种数) × 100%

萌芽率 = (萌芽数 / 接种数) × 100%

2 结果与分析

2.1 酒精和升汞不同时间消毒对红锥茎段存活的影响

以红锥优树茎段为外植体，经 75% 酒精和 0.1% 升汞灭菌联合消毒，结果由图 1 所示，处理 1~9 茎段污染率控制在 20% 左右，且存活率大于 70%；处理 10~15 茎段污染率可控制在 20% 以下，但存活率骤降，茎段表现为褐化干枯。因此红锥茎段消毒 75% 酒精处理时间不能大于 15 s，

综合考虑以 75% 酒精处理 5 s，0.1% 升汞 3~8 min 处理效果较好，其中 75% 酒精 5 s 和 0.1% 升汞 5 min 联合处理存活率可达到 100%。

2.2 外植体木质化程度对红锥茎段萌芽的影响

采用 75% 酒精 5 s 和 0.1% 升汞 5 min 联合消毒的方法，对不同由木质化茎段处理结果由图 2 可知，半木质化侧枝和主茎作为外植体时萌芽率较高，最高萌芽率为 55%，以幼嫩侧枝和木质化侧枝茎段作为外植体时萌芽率低。幼嫩茎段和木质化茎段萌芽率低主要原因是保存率低，幼嫩茎段在消毒时容易被杀死，导致褐化干枯，木质化茎段普遍污染率高。因此可选择半木质化枝条作为供试材料。

2.3 不同留叶方式对红锥茎段萌芽的影响

经 75% 酒精 5 s 和 0.1% 升汞 5 min 消毒茎段，通过不同留叶处理，结果由图 3 可见，污染率以

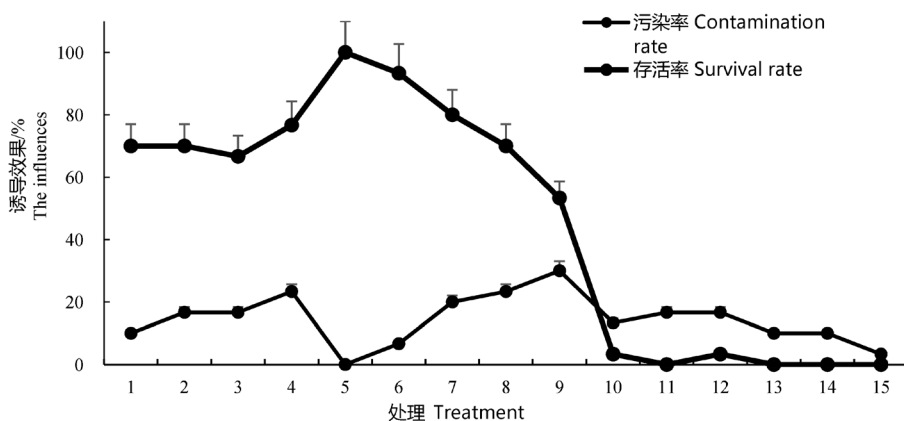


图 1 不同消毒剂种类及处理时间对红锥茎段诱导效果的影响

Figure1 The influences of different disinfectants and treating time on primary culture of *Castanopsis hystrix* stem

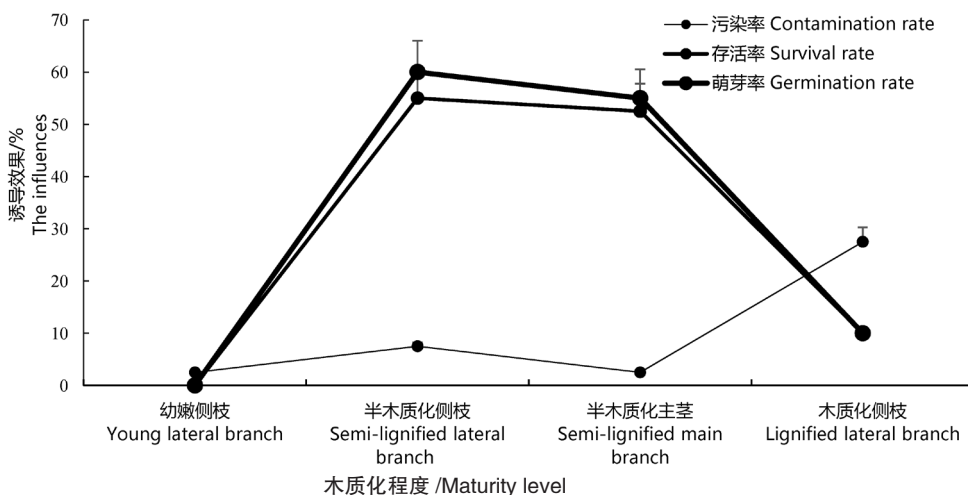


图 2 材料不同木质化程度对红锥茎段诱导效果的影响

Figure2 The influences of different maturity level on primary culture of *Castanopsis hystrix* stem

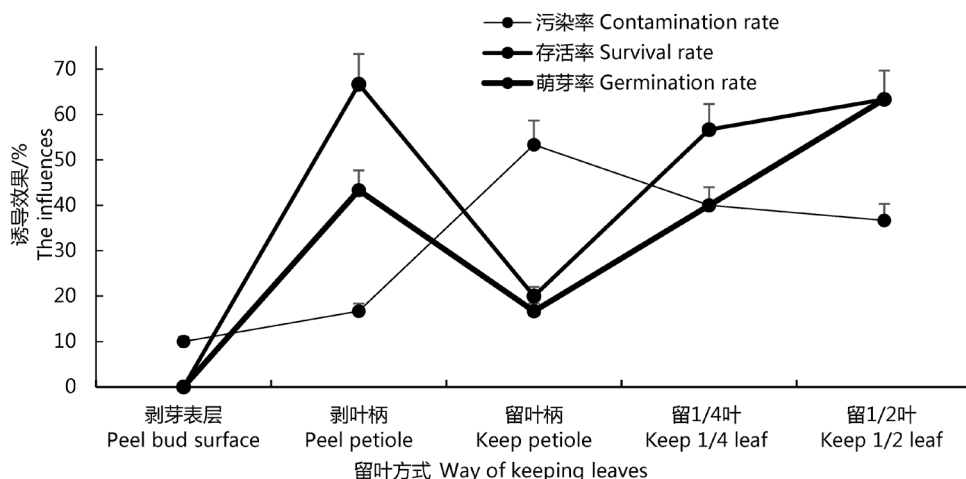


图 3 不同留叶方式对红锥茎段诱导效果的影响

Figure 3 The influences of different way of keeping leaves on primary culture of *Castanopsis hystrix* stem

剥芽表层和剥叶柄较低,保留叶柄和不同程度的叶片污染率提高,而剥芽表层的保存率和萌芽率为 0%,可见剥芽表层对嫩芽造成了伤害,留 1/2 叶的保存率和萌芽率最高,达到 63.33%,剥叶柄的方式虽然保存率较高,但萌芽率与留 1/4 叶持平,因此供试材料应保留 1/2 叶为宜。

2.4 不同光照强度对红锥茎段诱导的影响

由图 4 可知,红锥茎段在 1 000~3 000 Lux 光照强度下均可萌芽,且表现出较高存活率,但红锥是强阳性植物,高光强度下诱导效果明显优于较低光强,在光强达到 3 000 Lux 时萌芽率可达到 60%。因此将红锥茎段置于光强为 3 000 Lux 的 LED 灯下进行诱导为宜。

2.5 不同培养基对红锥茎段诱导的影响

由图 5 可知,不同培养基试验以处理 2 和处理 7 萌芽率较高,分别达到 70.00% 和 53.33%,而处理 5 和处理 6 萌芽率仅为 6.67% 和 3.33%,对比处理 7 和处理 6,基本培养基都为 MS,而处理 6 多添加了 0.2 mg/L GA₃,可能 GA₃ 抑制了芽的萌发,对比处理 2 和处理 5,培养基中 6-BA 和 KT 相同,主要为基本培养基不同,因此基本培养基和植物生长调节剂都对红锥茎段诱导产生影响,可选择改良 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L KT+0.2 mg/L NAA 作为初代培养基。

3 讨论与结论

在植物组织培养过程中,对外植体进行消毒,获得无菌材料是首要步骤^[12],不同植物由于生长状况及表皮结构等不同,即使相同的植物由于生

长环境、外植体部位不同,消毒的难易程度不同。红锥外植体消毒时存在污染率高、诱导率低等问题^[13],本文通过消毒时间和消毒方法的改进,并通过外植体、培养基和培养条件的选择等实现了无菌体系的建立。

选择外植体并对其进行有效的消毒是组培首先要解决的问题。本试验选用 75% 酒精和 0.1% 升汞为消毒剂联合消毒,发现当酒精处理时间超过 15 s 时,嫩枝茎段容易褐化干枯,半木质化和木质化茎段褐化率大大增加,可能红锥枝条表皮结构容易被酒精渗透,导致细胞脱水,因此红锥茎段宜采用半木质化枝条,以 75% 酒精 5 s 和 0.1% 升汞 5 min 联合消毒,实现污染率低,存活率高的目的。

扦插繁殖时通常保留叶片可促进生根率,由于穗条上的叶不仅能够通过光合作用产生碳水化合物、含氮物质等促进插穗下切口处分化成根及生长发育,而且在芽萌发时能生成一定数量的生长激素,这些生长素可由叶向茎移动,进而促进插穗生根^[14],在组织培养时,茎段和叶片一般被分别作为外植体进行消毒,茎段留叶消毒、接种鲜有报道,这主要考虑外植体表面积过大,叶片和茎段耐消毒能力不同等因素导致污染严重,消毒难以成功。本试验借用了扦插经验,对茎段留叶柄、留 1/4 叶和留 1/2 叶消毒结果表明,保留 1/2 叶片,污染率有所增加,但保存率和萌芽率高,且新芽鲜绿和粗壮。

光照强度也是影响植物生长的重要因素^[8],本试验中较强光强更加利于红锥茎段萌芽,但光

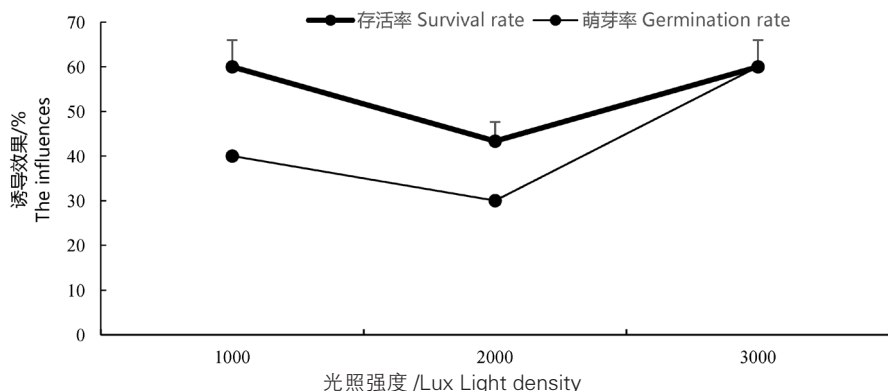


图 4 不同光照强度对红锥茎段诱导效果的影响

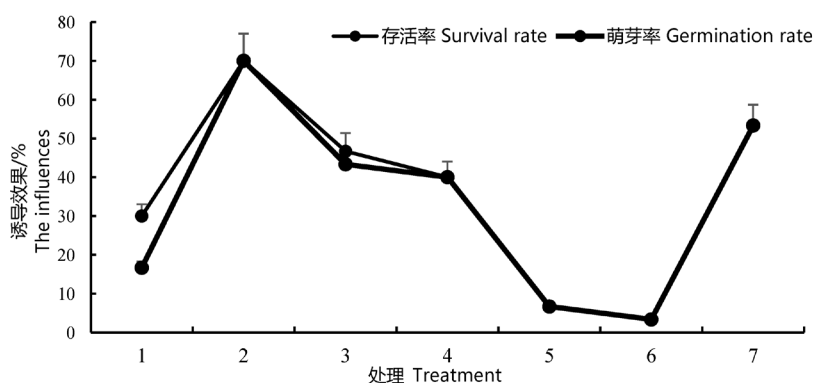
Figure4 The influences of different light density on primary culture of *Castanopsis hystrix* stem

图 5 不同培养基对红锥茎段诱导效果的影响

Figure5 The influences of different culture medium on primary culture of *Castanopsis hystrix* stem

质的影响还需进一步研究。本试验中不同培养基和植物生长调节剂对红锥茎段初代培养有较大影响。6-BA 具有很高的细胞分裂活性，在植物组培中普遍运用^[15]，在本试验中只采用了 0.5 和 1.0 mg/L 这两个水平，在后续试验中可细化 6-BA 浓度设置进一步进行探讨。本试验建立了红锥优树茎段无菌体系，突破了红锥优树组培的第一步，为下一步增殖和生根培养奠定基础，对其它树种的消毒和初代培养具有一定参考价值。

参考文献

- [1] 张方秋, 梁东成, 杨胜强, 等. 红锥天然分布表型变异研究[J]. 浙江林业科技, 2006(1): 1-9.
- [2] 唐熙麟. 红锥苗期生长节律及育苗技术研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2010.
- [3] 朱积余, 蒋焱, 丘小军. 广西红锥地理种源试验初报[J]. 广西林业科学, 1997, 26(2): 66-68.
- [4] 朱积余, 蒋焱, 潘文. 广西红锥优树选择标准研究[J]. 广西林业科学, 2002, 9(3): 109-113.
- [5] 申文辉, 朱积余, 刘秀, 等. 红锥种源区域试验与优良种源选择[J]. 中南林业科技大学学报, 2014(3): 11-17.
- [6] 邓燕忠, 连辉明. 红锥扦插繁殖试验[J]. 广东林业科技, 2005 (3) : 45-47.
- [7] 蒋焱, 唐卫辰, 姚广彬, 等. 红锥扦插育苗试验[J]. 西部林业科学, 2006, 35(1): 40-43.
- [8] 刘庆昌, 吴国良. 植物细胞组织培养[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002.
- [9] 李蕊萍. 红锥组培快繁技术研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [10] 覃子海, 覃鹏飞, 吴幼媚, 等. 红锥不同外植体消毒技术初探[J]. 生物技术世界, 2013(8) : 15-16.
- [11] 李玲莉. 柔枝松和红锥的组织培养研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2010.
- [12] 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.
- [13] 焦金凤. 红锥组织培养中褐化抑制方法研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [14] 曾晶珏. 钩栗扦插繁殖技术及其生根机理研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2016.
- [15] 王洪习, 蔡冬元. 植物组织培养技术[M]. 北京: 机械工业出版社, 2014.