

天女木兰组织培养中有效获得无菌外植体的研究

徐 石, 陆秀君, 李天来

(沈阳农业大学 林学院, 辽宁, 沈阳, 110161)

摘 要:为探讨天女木兰组织培养中无菌外植体的有效获得,将天女木兰外植体分为种子和其他3种(侧芽、带侧芽的茎段、顶芽)外植体进行研究。天女木兰种子分为3种不同类型消毒,进行材料污染率、萌发率及成苗率的统计。其他3种外植体(侧芽、带侧芽的茎段、顶芽)采用 $L_9(3^4)$ 正交设计,统计无菌率。结果表明:天女木兰种子消毒时间为4 min的Ⅲ型试材为最适外植体,成苗率可达70%。采用正交设计的3种外植体的最优水平组合为 $A_1B_2C_3$,即外植体为侧芽,消毒剂为0.1% $HgCl_2$,消毒时间为12 min。

关键词:天女木兰;外植体;正交设计

中图分类号:S685.790.353

文献标识码:A

文章编号:1001-7461(2008)03-0127-03

Studies on Tissue Culture of *Magnolia sieboldii* to Get Bacteria-free Explants

XU Shi, LU Xiu-jun, LI Tian-lai

(Forestry Department, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161, China)

Abstract: To get nontoxic explant from *Magnolia sieboldii* tissue culture effectly, the explant of *M. sieboldii* was divided into seed and other three explants like sprout, stem of sprout and terminal bud for researching deeply. The article takes 3 kinds of sterilizing to *M. sieboldii* to statistics the contamination rate, germination rate and seedling rate. Other explants (sprout, stem of sprout and terminal bud) used $L_9(3^4)$ orthogonal design to measure pathogen-free rate. The results showed that the best explant was Ⅲ seed of *M. sieboldii*, its sterilizing times was 4 min and seedling rate was high to 70%. The best compose in 3 types of explant using orthogonal design was $A_1B_2C_3$: explant was sprout, disinfectant was 0.1% $HgCl_2$, sterilizing times was 12 min.

Key words: *Magnolia sieboldii*; explant; orthogonal design

天女木兰(*Magnolia sieboldii*)为木兰科木兰属落叶小乔木,是木兰科树种中最抗寒的品种。其数量稀少,仅分布在辽宁长白和黄山一带,为国家三类保护植物^[1,2]。天女木兰育苗栽培技术十分复杂,繁殖难度很大,目前多用种子繁殖或者扦插繁殖^[3-6],而对于天女木兰的组织培养技术报道很少。组织培养是建立在无菌操作基础之上的专门技术,因此,在进行植物组织培养时,必须选择合适的外植体并进行有效的灭菌和接种,才能确保组织培养工作的顺利进行^[7-8]。本文以天女木兰为研究对象,探

索获得组织培养中有效无菌材料的途径和方法,为进一步研究和生产提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

材料为沈阳农业大学植物园内天女木兰当年生种子和当年新生枝条。

1.2 培养基

培养基为 B_5 +蔗糖 30 g·L⁻¹+琼脂 10 g·L⁻¹, pH 5.8。121℃下灭菌 20 min。

收稿日期:2007-10-23 修回日期:2008-03-18
基金项目:沈阳农业大学博士/后基金项目(777 230409)
作者简介:徐石(1983-),女,辽宁本溪人,硕士研究生,从事苗木培育研究。

1.3 外植体处理

1.3.1 种子处理 将天女木兰种子分为3种不同类型:Ⅰ带外种皮的天女木兰种子;Ⅱ带中种皮的天女木兰种子;Ⅲ带内种皮的天女木兰种子。每种天女木兰的种子均用自来水冲洗10 min后在无菌室里,分别放在已经灭菌的锥形瓶中,用70%酒精浸泡30 s,再用0.1%升汞消毒,每组进行6个消毒

A:外植体: Λ_1 侧芽
B:消毒剂: B_1 2%NaClO
C:消毒时间: C_1 4 min

1.4 接种培养

每瓶接种1个外植体,每种处理接种40瓶,按标记顺序放在培养室培养,培养温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,光照强度3000 lx,光照时间 $14 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。每5 d观察1次,并记录结果,直到结果不再有变化为止,试验重复2次。

1.5 结果统计方法

种子为外植体时,统计外植体污染率、萌发率、成苗率。结果统计按肖显华等^[9]的方法,并做改动。 $\text{污染率}\% = (\text{污染外植体数}/\text{接种外植体总数}) \times 100\%$; $\text{萌发率}\% = (\text{未污染且萌动个数}/\text{接种外植体总数}) \times 100\%$; $\text{成苗率}\% = (\text{成苗个数}/\text{接种外植体总数}) \times 100\%$ 。其他3种外植体采用 $L_9(3^4)$ 正交设计的方法统计无菌率。 $\text{无菌率}\% = (\text{没有污染的外植体数}/\text{接种外植体总数}) \times 100\%$ 。

时间处理,即0、2、4、6、8、10 min,消毒后立即用无菌水冲洗4~5次,在超净台上将天女木兰幼胚从种子中剥离出来,并及时接种。

1.3.2 枝条处理 剪取天女木兰当年新生枝条,流水冲洗2 h后,分别取侧芽、带侧芽的茎段和顶芽(0.5~0.8 cm),采用 $L_9(3^4)$ 正交设计,各因素水平设计如下所示:

Λ_2 带侧芽的茎段 Λ_3 顶芽
 B_2 0.1% HgCl_2 B_3 2% $\text{Ca}(\text{ClO})_2$
 C_2 8 min C_3 12 min

2 结果与分析

2.1 天女木兰种子为外植体的培养

由表1看出,用0.1%升汞消毒Ⅰ(带外种皮的天女木兰种子)剥胚培养时,其中,消毒8 min时的污染率最低为10%,萌发率、成苗率最高,分别为90%和45%。不经过升汞消毒处理的Ⅰ全部污染。用0.1%升汞消毒Ⅱ(带中种皮的天女木兰种子)剥胚培养时,消毒10 min时污染率最少,萌发率和成苗率分别达到65%和30%。从污染率、萌发率、成苗率3个方面综合分析,消毒6 min时的污染率、萌发率和成苗率分别为20%、65%、30%,在一定程度上优于10 min的消毒处理。不经过升汞消毒处理的Ⅱ全部污染。Ⅰ、Ⅱ在各个时间段均有不同数量的污染现象。随着消毒时间的延长,污染率逐渐降低。

表1 天女木兰种子不同类型剥胚培养的萌发及成苗情况

Table 1 Result of embryo cultures after different types of *M. sieboldii* seeds being sterilized directly

消毒时间 /min	污染率/%			萌发率/%			成苗率/%		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
0	100	100	90	—	—	10	—	—	5
2	30	25	0	50	50	80	20	10	40
4	25	20	0	55	55	100	25	20	70
6	20	20	0	80	65	90	30	30	50
8	10	15	0	90	75	75	45	20	40
10	10	10	0	70	65	60	25	10	30

用0.1%升汞消毒Ⅲ(带内种皮的天女木兰种子)剥胚培养时,污染率均可降至0,处理时间在4 min时,萌发率和成苗率达到最高水平,分别为100%和70%。不经过升汞消毒处理的Ⅲ污染率很高,达到90%,萌发率和成出率分别为10%和5%。

随着消毒时间的增加,各种类型的外植体污染率均下降,而萌发率和成苗率均呈先升后降的趋势。主要原因是消毒时间过长,消毒剂渗入幼胚,造成对幼胚的毒害而不易萌发和成苗。

由表2得出,天女木兰幼胚离体培养中最好的消毒方式是将带内种皮的天女木兰种子用0.1%升汞消毒4 min,或消毒6 min效果也较好。其他均不太理想,Ⅱ型的试材在最优排列中未曾出现。Ⅰ型、Ⅱ型的试材均有一定的污染,而且萌发率和成出率都不高。主要是因为天女木兰种皮坚硬,消毒不易彻底,加上必须在培养皿内剥去种皮才可以剥离出幼胚,增加了剥胚难度并使操作时间加长,从而使污染率增高。

表 2 不同外植体在不同消毒时间下的最优排列

Table 2 The best permutation in different disinfection time with different explants

外植体类型	消毒时间 /min	污染率 /%	萌发率 /%	成苗率 /%
Ⅲ	4	0	100	70
Ⅲ	6	0	90	50
Ⅲ	8	0	75	40
Ⅲ	2	0	80	40
I	8	10	90	45

2.2 其他 3 种外植体正交设计结果与分析

由表 3 可以看出,3 个因素的各个水平最佳组合为 $\Lambda_1 B_2 C_3$ 或 $\Lambda_2 B_2 C_3$, 也就是说, Λ 因素(外植体)以 A_1 或 A_2 为最佳,即侧芽或带侧芽的茎段;B 因素(消毒剂)以 B_2 为最佳,即 0.1% $HgCl_2$;C 因素(消毒时间)以 C_3 为最佳,即 12 min。

表 3 正交设计 $L_9(3^4)$ 试验结果

Table 3 The results of orthogonal design $L_9(3^4)$

试验号	外植体	消毒剂	消毒时间/min	无菌率/%
(1)	1	1	1	30
(2)	1	2	2	60
(3)	1	3	3	0
(4)	2	1	2	0
(5)	2	2	3	80
(6)	2	3	1	10
(7)	3	1	3	10
(8)	3	2	1	40
(9)	3	3	2	10
T_1	90	40	80	$T_{总}=240$
T_2	90	180	70	
T_3	60	20	90	
X_1	30	13.3	26.7	
X_2	30	60.0	23.3	
X_3	20	6.7	30.0	
R	10	53.3	6.7	

R 值越大,因素对试验结果的影响越显著。因为 $R_B > R_A > R_C$, 则试验中的各个因素中 B 因素为试验主导因素,即消毒剂对天女木兰组织培养的增殖有显著的影响,各因素影响效果的主次关系是:消毒剂>外植体>消毒时间。

对正交表进行方差分析(表 4),3 个因素中,对天女木兰组织培养的增殖情况影响从大到小依次为:消毒剂>外植体>消毒时间。实验所安排的 3 个因素对无菌率的影响无显著性差异。

通过试验,在天女木兰组织培养的无菌体系的建立中,最佳的外植体为侧芽或者带侧芽的茎段,消毒剂为 0.1% $HgCl_2$,消毒时间为 12 min。但由于带侧芽的茎段在培养过程中褐化严重,所以宜选择侧芽为外植体。

表 4 $L_9(3^4)$ 试验结果的方差分析

Table 4 Variance analysis of orthogonal test $L_9(3^4)$

变异来源	自由度	离差平方和	均方	均方比	F
A	2	200	100	0.2	$F_{(0.05)}-19.0$
B	2	5 066.7	2 533.4	4.8	$F_{(0.01)}-99.0$
C	2	66.7	33.4	0.06	
误差	2	1066.6	533.3		
总变异	8				

3 讨论

在植物组织培养中,外植体接种是组培的前提条件。外植体的接种成功与否,主要取决于外植体的选取和消毒时间。天女木兰种子用 0.1% 升汞消毒处理实验发现,所选取的外植体不同,适宜的消毒时间也不同,当消毒时间超过一定程度时就会出现材料致死而变黑现象,导致萌发率和成苗率逐渐降低。

天女木兰的外植体容易发生褐化^[10],在本试验中发现,当用植物组织培养中常用的次氯酸钠、次氯酸钙等以产生氯气灭菌的表面消毒剂时,天女木兰的带侧芽的茎段外植体极易褐化,顶芽褐化较轻,侧芽褐化最轻。因此,在天女木兰组培中,应当首选侧芽为外植体建立无性系。采用带侧芽的茎段为外植体(如生产脱毒苗)时,则宜用 0.1% $HgCl_2$ 作为消毒剂。

在本试验中,有效获得了天女木兰幼胚和侧芽的大量无菌外植体,已经用于诱导其脱分化和再分化,为天女木兰这一濒危植物无性系建立及基因转化奠定了基础。

参考文献:

[1] 叶桂艳. 中国木兰科树种[M]. 北京:中国农业出版社,1996.
[2] 于俊林. 天女木兰[J]. 生物学通报,2004(10):16.
[3] 田洪,于翠飞,赵占英,等. 天女木兰的栽培技术[J]. 吉林蔬菜,1997(6):25.
[4] 马占龙,李艳君. 天女花种子繁殖及其在园林中的应用栽培[J]. 河北林果研究,1999,14(3):238-241.
[5] 王志杰,张海新. 天女花育苗技术[J]. 河北林业科技,1995(3):43-44.
[6] 王欢,杜凤国,杨德冒. 天女木兰硬枝扦插繁殖初步研究[J]. 北华大学学报,2005,6(4):352-354.
[7] 于福科,张广军. 玫瑰组织培养污染控制技术措施[J]. 陕西农业科学,2002(11):47-48.
[8] 周锦霞,周黎军,魏琴. 油樟组织培养污染率控制试验[J]. 宜宾学院学报,2006(2):33-34.
[9] 肖显华,王顺珍,藏林荣,等. 植物材料表面消毒方法的改进[J]. 生物技术,1999,91:43-45.
[10] 黎明,马焕成. 木兰科植物无性繁殖研究概况[J]. 西南林学院学报,2003,23(2):92-95.