

## 卷柏启动培养研究

杨茜琚,周广柱

(沈阳农业大学 林学院,辽宁 沈阳 110866)

**摘要:**以卷柏(*Selaginella tamariscina*)幼叶、茎尖及茎段为外植体,研究了不同消毒方式的消毒效果以及基本培养基类型和激素组合对初代培养的影响。结果表明:以卷柏的茎尖为外植体,用  $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  多菌灵处理 8 h 的消毒方式,取得了较好的消毒效果,无菌率可达 79.8%;茎尖最佳初代培养基为  $\text{MS}+\text{KT } 2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{NAA } 0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{IAA } 0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**关键词:**中华卷柏;启动培养;消毒方式

**中图分类号:**S682.35

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2011)05-0017-03

卷柏(*Selaginella tamariscina*)为蕨类植物门卷柏科卷柏属植物,主要分布在热带及亚热带地区。我国有卷柏科植物 50~70 种,多生长在山坡阴处岩石上、山顶岩石上、向阳山坡石缝中、山坡灌丛下<sup>[1-4]</sup>。卷柏属植物的繁殖有孢子繁殖、分株繁殖、扦插繁殖、分栽不定芽等,但这些方法的增殖效率都较低,而且容易受到自然环境的干涉,很难适应规模化商业繁殖。组织培养可以保持遗传性状的相对稳定,并且繁殖速度快。目前,关于卷柏的组织培养国内鲜有报道,现对卷柏启动培养的几个影响因素进行了研究,以期对其将来的商业化生产提供基础资料。

收稿日期:2011-02-16

第一作者简介:杨茜琚(1984-),女,辽宁省葫芦岛市人,在读硕士,从事园林植物生理生态与栽培研究。E-mail: yayayang. 1984@163.com。

通讯作者:周广柱(1964-),男,辽宁省沈阳市人,教授,从事园林植物生理生态与栽培教学和研究。E-mail: zhouguang-zhu@sina.com。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

供试材料为 2009 年 10 月由野外移植的卷柏,栽植于沈阳农业大学温室内。选择生长健壮、无病虫害的植株进行组培试验。

#### 1.2 方法

1.2.1 外植体的处理和消毒 选取卷柏的幼叶、茎尖及茎段为外植体。在流水下冲洗 5 h,然后进行消毒处理,试验采用  $L_9(3^4)$  正交设计,各因素水平:外植体类型分别为幼叶、茎尖、茎段;杀菌剂类型分别为代森锰锌、百菌清、多菌灵;杀菌剂浓度分别为 1、3、5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,杀菌剂浸泡时间分别为 4、8、12 h,处理后的材料取出后用无菌水冲洗 5 遍,75%酒精 20 s,0.1%  $\text{HgCl}_2$  消毒 8 min,无菌水冲洗 5 次。接种到  $\text{MS}+\text{KT } 2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{NAA } 0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的培养基中,每个处理接种 40 个外植体,重复 3 次。15 d 后调查各处理的污染率,30 d 调查各处理的成活率,筛选出外植体消毒的最佳

## Application of Activated Carbon in Potatoes Tissue Culture

XIA Jing-bo, XIA Ping, QIU Guang-wei, HAO Zhi-yong

(Keshan Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Keshan, Heilongjiang 161606)

**Abstract:** Taking plantlet *in vitro* of potato variety of Kexin 18 as experimental material, the effects of activated carbon on potato tissue culture and adding amount of activated carbon on plantlets growth situation were studied. The results showed that in the MS agar-solidified medium, activated carbon significantly promoted the growth of plantlets *in vitro*, the reproduction coefficient could increase 10 times, it could increase plantlet height, promote root, the plantlet strong and growth vigorous.

**Key words:** activated carbon; potato; tissue culture; plantlet *in vitro*

方案。无菌率/ $\%$ =未污染的外植体数/接种外植体数 $\times 100$ ;成活率/ $\%$ =成活的外植体数/接种外植体数 $\times 100$ 。

1.2.2 不同基本培养基对初代培养的影响 将准备好的外植体接种到以 1/2MS、MS、N6、B5 为基本培养基,附加相同质量浓度的 KT 与 NAA,即  $KT 2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} + NAA 0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的培养基中。每个处理重复 3 次,每个重复接种 30 瓶。60 d 后进行数据统计。存活率/ $\%$ =存活芽数/接种芽数 $\times 100$ 。

1.2.3 不同激素组合对初代培养的影响 将准备好的外植体接种到以 MS 为基本培养基,分别加入不同质量浓度 KT、6-BA、NAA 和 IAA 的培养基中培养。每个处理重复 3 次,每个重复接种 30 瓶。30 d 后进行数据统计。诱导率/ $\%$ =萌发出叶片的外植体个数/接种外植体数 $\times 100$ 。

1.2.4 培养条件 培养基中含蔗糖  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、琼脂  $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 5.8。培养条件为:温度  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,每天光照 12 h,光照强度 1 500 lx。

1.2.5 数据统计 试验数据采用 DPS 软件进行处理,用邓肯氏新复极差法检验各处理间的差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同消毒方式对外植体消毒效果的影响

由表 1 中不同极差值(R)可以看出,外植体 $>$ 杀菌剂类型 $>$ 杀菌剂浓度 $>$ 处理时间,说明在卷柏的消毒过程中,外植体种类起着决定性的作用,其次是消毒剂类型,杀菌剂浓度及处理时间对消毒效果的影响较小。通过比较 K 值可知,卷柏的最易消毒的外植体为茎尖;在  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的多菌灵溶液中处理 8 h 的效果最佳。

表 1 不同消毒方式对外植体消毒效果的影响

处理	外植体	杀菌剂类型	杀菌剂浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	处理时间/h	无菌率/ $\%$
1	茎尖	代森锰锌	1	4	64.8
2	茎尖	百菌清	3	8	67.3
3	茎尖	多菌灵	5	12	79.8
4	幼叶	代森锰锌	3	12	51.7
5	幼叶	百菌清	5	4	49.8
6	幼叶	多菌灵	1	8	57.5
7	茎段	代森锰锌	5	8	27.7
8	茎段	百菌清	1	12	19.9
9	茎段	多菌灵	3	4	33.8
$K_1$	70.633	48.067	47.400	49.467	$t=452.3$
$K_2$	53.000	45.667	50.933	50.833	
$K_3$	27.133	57.033	52.433	50.467	
R	43.500	11.366	5.033	1.366	

对不同消毒方式下的外植体的成活率进行统计,从表 2 中可以看出,以茎尖为外植体时成活率较高,均超过了 50%;幼叶的无菌率虽较高,但成活率却都较低;以茎段为外植体时,污染率较高,但未污染的外植体大部分都可成活。

表 2 不同消毒方式对外植体成活率的影响

处理	1	2	3	4	5	6	7	8	9
成活率/ $\%$	58.3	51.6	62.1	12.2	13.5	14.1	22.1	10.3	25.6

### 2.2 不同基本培养基对初代培养的影响

将消毒后的茎尖分别接种在添加相同激素的 1/2MS、MS、N6、B5 培养基中培养,从表 3 中可以看出,不同培养基中茎尖的存活率有着较大的差异,以 MS 培养基中的外植体存活数量最多,与其它 3 种培养基相比差异显著;N6 与 B5 培养基中的外植体存活率均不理想,与其它 2 种培养基相比差异显著。

表 3 不同基本培养基对茎尖初代培养的影响

培养基	接种数	存活数	存活率/ $\%$
1/2MS	40	17	42.5b
MS	40	22	55.0a
N6	40	4	10.0c
B5	40	3	7.50c

注:同列数据后标不同小写字母者表示采用邓肯氏新复极差法检验在 0.05 水平上差异显著。

### 2.3 不同激素组合对初代培养的影响

以茎尖为外植体,接种到以 MS 为基本培养基,添加不同质量浓度的 KT、NAA、6-BA 和 IAA 的培养基中进行培养,由表 4 中不同激素水平的极差值(R)可以看出,KT 的 R 值最大,说明在茎尖初代培养阶段,激素 KT 起主要作用。4 个因素中,对茎尖诱导率的影响顺序为:KT $>$ NAA $>$ 6-BA $>$ IAA。通过比较 K 值可知,最适宜卷柏茎尖初代诱导的培养基为 MS + KT  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{IAA } 0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 4 不同激素组合对茎尖初代诱导的影响

处理	激素质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$				诱导率/%
	KT	NAA	6-BA	IAA	
1	1	0.1	0	0	34.2
2	1	0.2	0.1	0.1	40.4
3	1	0.3	0.3	0.2	23.5
4	2	0.1	0.1	0.2	58.3
5	2	0.2	0.3	0	70.1
6	2	0.3	0	0.1	62.4
7	3	0.1	0.3	0.1	42.6
8	3	0.2	0	0.2	53.1
9	3	0.3	0.1	0	33.4
$K_1$	32.700	45.033	49.900	45.900	$t=418.0$
$K_2$	63.600	54.533	44.033	48.467	
$K_3$	43.033	39.767	45.400	44.967	
R	30.900	14.766	5.867	3.500	

3 结论与讨论

外植体的选择是组织培养中一个十分重要的问题,外植体取材部位不同可直接影响组织培养的效果<sup>[5]</sup>。研究结果表明,不同来源的外植体对污染率的影响较大,以茎尖为外植体时污染率最低,同时也有较高的成活率。茎段为外植体时,污染率较高,这是由于茎段长期暴露在空气中,其带菌较多,易产生污染现象。用杀菌剂提前处理外植体,在处理过程中因药液直接接触材料,药液对材料表层的外生菌有良好的杀菌效果,该试验中,以  $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  多菌灵处理 8 h 杀菌剂效果较好。

对于植物的离体培养来说,离体培养用的培养基是向植物细胞提供营养的场所,除此之外还起着调节渗透压、酸碱度和供给水分的作用。对于不同的植物,培养基的组成存在差异,基本培养基更是影响外植体诱导成功的主要因素。该试验在茎尖初代培养阶段采用的基本培养基有 1/2MS、MS、N6 及 B5。结果表明,MS 培养基的诱导效果最好,可以获得较高的存活率。

在离体培养中,植物生长调节剂往往起决定

作用,如何通过调节植物生长调节剂的种类、浓度及植物生长调节剂间的组合提高试管苗的繁殖速度,是离体培养快速繁殖的关键问题<sup>[6]</sup>。在该研究中,卷柏茎尖初代培养阶段起关键作用的是 KT,最适宜的浓度是  $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;最适宜的激素组合为  $\text{KT } 2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{IAA } 0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

参考文献:

[1] 吴兆洪,秦仁昌. 中国蕨类植物科属志[M]. 北京:科学出版社,1991.

[2] 《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志:第 1 卷[M]. 北京:科学出版社,1959.

[3] 孙稚颖,张宪春,崔绍梅,等. 中国 29 种和泰国 1 种卷柏科植物的叶形态学研究及其分类学意义[J]. 植物分类学报, 2006,44(2):148-160.

[4] 赵昕,吴子龙,叶嘉. 中国特有蕨类植物中华卷柏的研究进展[J]. 安徽农业科学,2010,38(4):1800-1801,1803.

[5] 李莹,罗晓芳,蒋湘宁. 美国红枫外植体选择及启动培养研究[J]. 黑龙江农业科学 2010(8):6-9.

[6] 韩东生,吴绰云. 植物激素和蔗糖对山葡萄体茎段腋芽及根发育的影响[J]. 北方园艺,1993(5):15-17.

Study on Primary Culture of *Selaginella tamariscina*

YANG Xi-jun, ZHOU Guang-zhu

(Forestry College of Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866)

**Abstract:** Young leaf, shoot tip and stem were used as explants to study the effect of disinfection methods and combinations of basic medium and different hormone on the primary culture of *Selaginella tamariscina*. The results showed that using shoot tip of *Selaginella tamariscina* as explants, the highest survival rate of the explants was 79.8% after the explants sterilized in  $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  carbendazim for 8 hours; The MS medium containing  $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  KT  $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA and  $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IAA was most efficient in the primary culture of shoot tip.

**Key words:** *Selaginella tamariscina*; primary culture; disinfection method