

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2022.11.007

三峡消落带落羽杉茎段外植体扩繁技术研究

陈雪梅^{1,2}, 陈春桦¹, 杨治华¹, 袁中勋¹, 陈张婷¹, 李昌晓¹

1. 西南大学 生命科学学院, 重庆 400715; 2. 重庆市北碚区王朴中学校, 重庆 400717

摘要: 为了提供大量优质落羽杉幼苗用于三峡库区消落带人工植被重建, 进一步推进落羽杉在我国尤其是消落带地区的推广应用, 以落羽杉茎段为外植体, 通过组织培养扩繁获得无菌苗。结果表明: 未木质化茎段中部为最佳外植体, 存活率最高, 为 41.67%; 对未木质化茎段中部采用联合消毒, 先用 75% 乙醇漂洗 30 s, 再用 0.1% 的 HgCl₂ 消毒 3 min, 培养基中附加浓度为 0.2% 的抗菌剂 PPM, 无菌外植体获得率为 75.00%, 污染率为 16.67%; 茎段腋芽诱导最合适的培养基为 MS+0.5 mg/L KT+0.4 mg/L NAA, 诱导率为 66.67%, 丛芽诱导最合适的培养基为 1/2 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.4 mg/L IBA, 诱导率为 83.33%。

关键词: 落羽杉; 三峡库区; 扩繁; 无菌苗

中图分类号: Q948.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2022)11-0070-10

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Study on Propagation of Stem Explants (*Taxodium distichum*) for Vegetation Restoration in Hydro-Fluctuating Zones of Three Gorges

CHEN Xuemei^{1,2}, CHEN Chunhua¹, YANG Zhihua¹,
YUAN Zhongxun¹, CHEN Zhangting¹, LI Changxiao¹

1. School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Chongqing Wangpu Middle School, Chongqing 400717, China

Abstract: The current situation of the Three Gorges Reservoir requires extensive planting the *Taxodium distichum* seedlings for vegetation restoration in fluctuating zone. For this purpose, stem segments of *T. distichum* as explants were used to obtain sterile seedlings through tissue culture propagation to provide healthy *T. distichum* seedlings for artificial vegetation restoration in the Three Gorges Reservoir area.

收稿日期: 2021-01-08

基金项目: 重庆市科技兴林项目(2021-9); 西南大学生命科学学院科学基金项目(20212005406201); 中央林业改革发展资金科技推广示范项目(渝林科推 2020-2)。

作者简介: 陈雪梅, 硕士, 主要从事植物生态学的研究。

通信作者: 李昌晓, 教授, 博士研究生导师。

This method can further promote the wide application of *T. distichum* in China, especially in large dam water-fluctuating regions. Our results showed that the middle part of the unignified stem was the best explant, with the highest survival rate of 41.67%. The middle part of the unignified stem was combined with disinfection by first rinsing with 75% ethanol for 30 seconds and then disinfected in a mass fraction of 0.1% HgCl_2 for 3 minutes with addition of 0.2% antibacterial agent PPM in the medium. The acquisition rate of sterile explants was 75.00%, and the contamination rate was 16.67%. The most suitable medium for the induction of stem axillary buds was MS+0.5 mg/L KT+0.4 mg/L NAA, where the induction rate was 66.67%. The most appropriate medium for clump bud induction was 1/2 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.4 mg/L IBA, where the induction rate was 83.33%.

Key words: *Taxodium distichum*; Three Gorges dam reservoir; proliferation; aseptic seedling

三峡工程完全建成后,在“冬蓄夏排”的水位调度方式下,形成了垂直落差达 30 m 的消落带.库区消落带原有的植物因受到长时间反季节水淹而大量消亡,进而导致消落带生物多样性降低,水土流失加剧,生态屏障功能减退.研究表明人工植被修复与重建是恢复消落带植被的有效方法.落羽杉 *Taxodium distichum* (L.) Rich. 耐水淹能力强,在三峡消落带的生长表现良好,是消落带植被修复重建的首选树种之一^[1-4],目前已被广泛用于消落带植被修复重建项目中.然而,当前用于消落带植被修复重建的落羽杉苗木基本上来自省外采购,病虫害发生率较高,苗木质量参差不齐,一级苗占比较低,运输、栽植及管护成本居高不下.落羽杉为杉科(Taxodiaceae)落羽杉属(*Taxodium* Rich.)落叶性大乔木,树干通直,基部常较粗大,原产地位于北美,现已广泛引种到世界各地^[5].落羽杉的种子繁殖实验表明,因种皮太厚且种子具有明显锐利的棱脊,发芽率低,利用种子大规模繁殖较为困难^[6].与此同时,落羽杉的扦插繁殖也存在插穗数量受限、时间耗费较长、成本较高、采条部位对插苗的性状表现影响较大等诸多问题^[7].因此,组织培养已经成为落羽杉种苗扩繁的重要途径.如果将长期处于三峡库区消落带水淹—落干—水淹—落干逆境条件且已完全适应的落羽杉人工林作为组培外植体,无疑将会明显加快所需落羽杉种苗的繁育速度并提高繁育成效.组织培养繁殖速度快、不受季节限制、能保存母本的全部优良性状^[8-12].在组织培养时,对于不同物种外植体的选取不尽相同^[13-14],通常用于组织培养的外植体主要有胚轴、叶片、叶柄、茎段等.目前落羽杉的组织培养多采用种子成熟胚或幼苗为外植体^[15-16],这对于三峡库区消落带而言,这些外植体来源受到明显的限制(种子及幼苗极少).相反,如果以三峡库区消落带现有长势良好的落羽杉茎段为外植体来源,则可以获得大量来自于消落带原位生境的组培材料,进而为三峡库区消落带提供大量落羽杉良种壮苗,为三峡库区消落带生态修复与重建所需种苗做出切实贡献.当前,有关以三峡库区消落带现有适生的落羽杉茎段为外植体来源进行组培的研究还未见报道.因此,本文以生长于三峡库区消落带原位的 10 年生落羽杉优株为试验材料,选取落羽杉茎段为外植体进行组织培养,探索三峡库区消落带落羽杉外植体的最佳组培实践技术,以期对三峡库区消落带原位生长的落羽杉优株快速扩繁提供技术支撑.

1 材料与方法

1.1 外植体类型的筛选

试验材料选自三峡库区重庆市忠县石宝镇汝溪河消落带落羽杉人工林.在 165~175 m 海拔之间选择长势良好的 10 年生落羽杉随机剪取树冠中部的当年生未木质化枝条、半木质化枝条,长约 15 cm,及时喷水保湿,24 h 内带回实验室处理.剪去针状叶片,用洗衣粉清洗 3 遍,置于水龙头下冲洗 2 h.用 75% 的乙醇漂洗 30 s,无菌水冲洗 3 次,再用 0.1% HgCl_2 消毒 3 min,无菌水冲洗 3~5 次,切割成 2~3 cm 的茎段,接种到 MS 培养基上.本试验随机设置 3 个重复小区,每个小区接种外植体 70 个,每个处理共接种外

植体 210 个, 培养 15 d 后观察统计外植体的存活率和污染率.

1.2 外植体部位的筛选

根据 1.1 试验结果, 选取最佳外植体类型, 消毒方法同 1.1, 将其切割分为上、中、下 3 部分, 分别接种到 MS 培养基上. 随机设置 3 个重复小区, 每个小区接种外植体 16 个, 每个处理共接种外植体 48 个, 培养 15 d 后观察统计外植体的存活率和污染率.

1.3 表面消毒剂和消毒时间的筛选

根据 1.2 试验结果, 选取明确的最佳外植体部位, 在无菌条件下, 先用 75% 的乙醇消毒不同时间 (10 s, 20 s, 30 s, 40 s), 无菌水冲洗 3 次后接种到 MS 培养基中. 选择乙醇的最佳消毒时间进行第 1 次消毒后分别用 2% NaClO, 5% NaClO, 0.1% HgCl₂ 消毒不同时间 (1 min, 1.5 min, 2 min, 2.5 min, 3 min), 无菌水冲洗 3~5 次, 切割成 2~3 cm 长的茎段, 接种于 MS 培养基中. 随机设置 3 个重复小区, 每个小区接种外植体 8 个, 每个处理共接种 24 个外植体, 培养 15 d 后观察统计外植体的存活率和污染率.

1.4 抑菌剂的筛选

选取 1.2 试验结果中最佳外植体部位, 选取 1.3 中明确的最佳消毒方法, 培养基中分别加入 PPM (0.1%, 0.2%, 0.4%) 和益培灵 (0.05 g/L, 0.1 g/L, 0.2 g/L), 随机设置 3 个重复小区, 每个小区接种外植体 8 个, 每个处理共接种 24 个外植体, 培养 25 d 后观察统计外植体的存活率和污染率.

1.5 落羽杉茎段腋芽的诱导

选取 1.2 试验结果中最佳外植体部位, 选取 1.3 中明确的最佳消毒方法, 之后切成 2~3 cm 的茎段, 培养基中加入 0.2% PPM, 接种到以下含不同植物生长调节剂的培养基中: MS+激动素(KT)(0.5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L)+萘乙酸(NAA)(0.1 mg/L, 0.2 mg/L, 0.4 mg/L). 随机设置 3 个重复小区, 每个小区接种外植体 8 个, 每个处理共接种 24 个外植体, 培养 60 d 后统计腋芽的诱导率、繁殖系数和生长状况.

1.6 落羽杉丛芽诱导

诱导出的茎段腋芽约长至 2 cm 时, 接种到以下含不同植物生长调节剂的培养基中, DCR+6-苄氨基嘌呤(6-BA)(0.5 mg/L, 1 mg/L)+吲哚丁酸(IBA)(0.2 mg/L, 0.4 mg/L, 0.6 mg/L); 1/2 MS+6-BA (0.5 mg/L, 1 mg/L)+IBA(0.2 mg/L, 0.4 mg/L, 0.6 mg/L), 均去除细胞分裂素浓度低于生长素浓度的组合. 随机设置 3 个重复小区, 每个小区接种外植体 4 个, 每个处理共接种 12 个外植体, 培养 60 d 后统计丛芽的诱导率、繁殖系数和生长状况.

1.7 培养条件

培养基含蔗糖 30 g/L, 琼脂 6.5 g/L, pH 值为 5.8. 培养温度为 (25±1)°C, 光照强度为 30 μmol/(m²·s), 光照时间 12 h/d.

1.8 数据处理

用 Microsoft Excel 2010 和 SPSS 22.0 软件对测定的原始数据进行处理, 采用独立样本 *t* 检验和单因素方差 (One-way ANOVA) 进行统计分析. 单因素方差分析采用 Duncan 多重比较 (Duncan's multiple range test) 进行显著性检验, 显著性水平设为 $\alpha=0.05$. 所有图像均用 Origin 9.0 (Origin lab Corporation) 软件制图.

2 结果

2.1 落羽杉外植体类型的筛选

从表 1 可以看出, 未木质化茎段的存活率和污染率与半木质化茎段差异有统计学意义. 半木质化茎段的污染率达到了 71.24%, 而未木质化茎段的污染率却只有 21.91%, 提高了 2.25 倍. 试验观察记录也发现, 半木质化茎段绝大部分长菌, 未木质化茎段长菌较少. 与此同时, 半木质化茎段的存活率只有

19.05%, 与未木质化茎段的存活率达到 60% 相比, 降低了 2.15 倍. 因此, 以存活率和污染率综合评判, 未木质化茎段为最佳的外植体类型.

表 1 不同外植体类型的污染率和成活率

指标	未木质化茎段	半木质化茎段	<i>F</i>	<i>p</i>
接种数/个	210	210	—	—
存活率/%	60.00±0.05**	19.05±0.05	0.043	0.001
污染率/%	21.91±0.02**	71.24±0.04	3.226	0.000
生长状态	长菌较少	绝大部分长菌	—	—

注: 基本培养基为 MS, ** 表示 $p < 0.01$, 差异有统计学意义.

2.2 外植体部位的筛选

将外植体切割成上、中、下 3 部分之后, 分别接种于培养基中, 培养 15 d 后观察统计外植体的存活率和污染率. 对存活率和污染率方差分析结果进行比较发现(表 2), 3 个部位茎段的存活率相互之间差异无统计学意义; 尽管中部茎段的存活率最高且达到 41.67%, 但与上部和下部茎段的存活率相差不大. 相反, 下部茎段的污染率和上部、中部茎段相比差异均具有统计学意义, 下部茎段污染率为 50.00%, 达到最高, 显著高出中部 0.33 倍, 高出上部 0.85 倍. 因此, 基于存活率和污染率进行综合判定, 茎段中部为外植体最佳选取部位.

表 2 外植体不同部位处理的存活率和污染率

外植体部位	接种数/个	存活率/%	污染率/%	生长状态
上部	48	35.42±0.07a	27.08±0.04b	长菌较少, 多数褐化
中部	48	41.67±0.13a	37.50±0.06b	长菌较多, 部分褐化
下部	48	35.42±0.04a	50.00±0.06a	长菌较多, 少量褐化

注: 基本培养基为 MS, 小写字母不同表示外植体不同部位处理之间差异有统计学意义($p < 0.05$).

2.3 表面消毒剂和消毒时间的筛选

经消毒处理的外植体在培养基中培养 15 d 后, 其存活率和污染率情况分别见表 3 和表 4. 结果表明, 不同种类及浓度的消毒剂对外植体的污染率和存活率影响差异有统计学意义. 由表 3 可知, 用 75% 乙醇溶液漂洗 30 s 时存活率最高(29.17%), 漂洗 10 s, 20 s 时外植体全部长菌污染死亡. 用 75% 乙醇溶液漂洗 40 s 时污染率最低(37.50%), 但其存活率较 30 s 时有所下降. 由表 4 可知, 当用 2% NaClO 消毒 1 min, 1.5 min, 在第 5d, 6 d 时外植体就会全部长菌. 消毒时间延长至 3 min 时, 污染率依旧达到 83.33%. 增加 NaClO 的浓度到 5% 后, 在相同的消毒时间内, 随着 NaClO 浓度的升高消毒效果明显增强, 消毒时间为 3 min 时效果最好, 污染率降到 41.67%, 存活率也提高到 45.83%. 用 0.1% HgCl₂ 漂洗 1 min 时外植体全部长菌, 随着 HgCl₂ 消毒时间的延长, 污染率逐渐降低, 漂洗 3 min 时是所有消毒处理中效果最好的, 污染率降至 33.33%. 综上所述, 在本试验中, 先用 75% 乙醇漂洗 30 s, 再用 0.1% HgCl₂ 消毒 3 min 是落羽杉茎段消毒的最佳处理方法.

表 3 乙醇消毒时间对外植体消毒效果的影响

消毒剂	消毒时间/s	接种数/个	存活率/%	污染率/%	生长状态
75%乙醇	10	24	0	1.00a	全部长菌
75%乙醇	20	24	0	1.00a	全部长菌
75%乙醇	30	24	29.17±0.17a	54.17±0.07b	长菌较多, 小部分褐化
75%乙醇	40	24	20.83±0.07a	37.50±0.13c	长菌较多, 部分褐化

注: 基本培养基为 MS, 小写字母不同表示外植体不同消毒时间之间差异有统计学意义($p < 0.05$).

表 4 消毒试剂次氯酸钠(NaClO)与氯化汞(HgCl₂)在不同消毒时间条件下对外植体消毒效果的影响

消毒剂	消毒时间/min	接种数/个	存活率/%	污染率/%	生长状态
2% NaClO	1	24	0f	1.00a	全部长菌
	1.5	24	0f	1.00a	全部长菌
	2	24	0f	95.83±0.07a	全部长菌
	2.5	24	8.33±0.04ef	87.50±0.13ab	全部长菌, 少量褐化
	3	24	8.33±0.04ef	83.33±0.07abc	长菌较多, 部分褐化
5% NaClO	1	24	0f	91.67±0.14ab	全部长菌
	1.5	24	8.33±0.07ef	83.33±0.14abc	长菌较多, 少量褐化
	2	24	16.67±0.07de	75.00±0.13bc	长菌较多, 少量褐化
	2.5	24	29.17±0.07c	54.17±0.07de	长菌较多, 部分褐化
	3	24	45.83±0.07b	41.67±0.07ef	长菌较少, 部分褐化
0.1% HgCl ₂	1	24	0f	1.00a	全部长菌
	1.5	24	0f	91.67±0.04ab	长菌较多
	2	24	8.33±0.07ef	75.00±0.13bc	长菌较多, 少量褐化
	2.5	24	20.83±0.07cd	66.67±0.14cd	长菌较多, 少量褐化
	3	24	58.33±0.07a	33.33±0.04f	长菌较少, 部分褐化

注: 基本培养基为 MS, 小写字母不同表示外植体不同消毒时间之间差异有统计学意义($p < 0.05$).

2.4 抑菌剂对外植体存活率和污染率的影响

将消毒过后的外植体接种至加入了抑菌剂的培养基中, 结果表明, 加入抑菌剂组和对照组(CK)相比存活率、污染率差异均有统计学意义(表 5). 与对照组相比, 加入抑菌剂后的处理组污染率显著降低, 其中 0.2% PPM 组污染率最低, 只有 16.67%. 尽管加入 0.2 g/L 益培灵处理组污染率最高, 达到 33.33%, 但仍然显著低于对照组. 相应地, 各处理组存活率与对照组相比显著提高, 存活率提高最大的是培养基中加入 0.2% PPM 处理组, 其存活率达到 75.00%, 高出对照组 1.25 倍; 即使是存活率提高最低的 0.05 g/L 益培灵处理组, 存活率也达到了 50.00%, 高出对照组 0.5 倍.

表 5 不同抑菌剂对外植体存活率和污染率的影响

抑菌剂种类	浓度	接种数/个	存活率/%	污染率/%	抑菌效果	生长状态
PPM/%	0.1	24	70.83±0.07ab	20.83±0.07b	++	生长较好, 长菌较少, 少褐化
PPM/%	0.2	24	75.00±0.13a	16.67±0.07b	++	生长较好, 长菌较少, 少褐化
PPM/%	0.4	24	70.83±0.14ab	25.00±0.13b	+	生长缓慢, 长菌较多, 部分褐化
益培灵/(g·L ⁻¹)	0.05	24	50.00±0.13bc	29.17±0.07b	-	生长缓慢, 长菌较多, 部分褐化
益培灵/(g·L ⁻¹)	0.1	24	62.5±0.13ab	25.00±0.13b	+	生长缓慢, 长菌较多, 部分褐化
益培灵/(g·L ⁻¹)	0.2	24	58.33±0.19ab	33.33±0.07b	-	生长缓慢, 长菌较多, 部分褐化
CK	0	24	33.33±0.07c	58.33±0.07a	-	生长正常, 长菌较多, 部分褐化

注: 基本培养基为 MS; 小写字母不同表示外植体不同抑菌剂之间差异有统计学意义($p < 0.05$); ++ 表示抑菌效果较好, + 表示抑菌效果一般, - 表示抑菌效果差.

2.5 落羽杉茎段腋芽的诱导

将消毒过后的外植体接种到腋芽诱导培养基中, 结果表明, 不同植物生长调节剂种类和浓度组合显著影响茎段腋芽的诱导(表 6). 由表 6 可知, 与不加激素(图 1a)相比, 单一激素也能诱导腋芽萌发, 并随着

NAA 浓度的升高萌发率也升高, MS+0.4 mg/L NAA 处理组的萌发率达到 25.00%。混合激素对腋芽萌发的效果更好, 当 KT 浓度为 0.5 mg/L 时, 随着 NAA 浓度的升高, 腋芽萌发率和繁殖系数均升高, 萌发率最高达到 66.67%(图 1b), 繁殖系数达 1.50 倍。当 KT 浓度为 2 mg/L 时, 随着 NAA 浓度的升高, 腋芽萌发率和繁殖系数均下降, 萌发率最高为 33.50%, 繁殖系数最高为 1.00 倍。当 NAA 浓度为 0.1 mg/L 时, 随着 KT 浓度的升高, 萌发率和繁殖系数呈现先升高后下降的趋势, 当 NAA 浓度为 0.2 mg/L 和 0.4 mg/L 时, 萌发率和繁殖系数均随着 KT 浓度的升高呈现下降的趋势。在本次试验中, 从繁殖系数和萌发率来看, 最适合落羽杉腋芽诱导的培养基为 A6, 即 MS+0.5 mg/L KT+0.4 mg/L NAA, 且腋芽生长较快, 其次为 A5。

表 6 不同植物生长调节剂对落羽杉茎段腋芽的诱导

培养基号	生长调节剂/ (mg · L ⁻¹)	接种数/个	腋芽萌发率/%	单芽总数/个	繁殖系数/ 倍	生长状态
A1	MS+0.1 NAA	24	8.33±0.04fg	5	0.21±0.1ij	偏黄绿色, 长势缓慢, 芽膨大
A2	MS+0.2 NAA	24	16.67±0.04efg	12	0.50±0.13ghi	长势缓慢, 有芽异常膨大
A3	MS+0.4 NAA	24	25.00±0.0defg	17	0.71±0.04efg	颜色正常, 无膨大芽, 生长较快
A4	MS+0.5 KT+0.1 NAA	24	29.17±0.04def	20	0.83±0.04def	颜色正常, 有芽异常膨大, 生长较快
A5	MS+0.5 KT+0.2 NAA	24	58.33±0.07ab	34	1.42±0.19ab	颜色正常, 长势正常
A6	MS+0.5 KT+0.4 NAA	24	66.67±0.11a	36	1.50±0.13a	颜色正常, 长势较快
A7	MS+1 KT+0.1 NAA	24	50.00±0.07abc	30	1.25±0.07abc	颜色正常, 有膨大芽, 长势正常
A8	MS+1 KT+0.2 NAA	24	50.00±0.07abc	31	1.29±0.15abc	颜色正常, 长势较快
A9	MS+1 KT+0.4 NAA	24	41.67±0.11bcd	27	1.13±0.07bcd	颜色正常, 长势较快
A10	MS+2 KT+0.1 NAA	24	33.50±0.08cde	24	1.00±0.14cde	颜色正常, 生长较快
A11	MS+2 KT+0.2 NAA	24	20.83±0.04efg	14	0.58±0.08fgh	颜色正常, 长势正常
A12	MS+2 KT+0.4 NAA	24	16.67±0.04efg	9	0.38±0.07hij	颜色正常, 长势较慢
A13	CK	24	4.17±0.04g	2	0.08±0.08j	颜色正常, 长势较慢

注: 基本培养基为 MS, 小写字母不同表示外植体不同植物生长调节剂之间差异有统计学意义 ($p < 0.05$)。



(a) 对照组



(b) 处理组

图 1 落羽杉茎段腋芽诱导

2.6 落羽杉丛芽诱导

以落羽杉腋芽(无菌苗)为外植体接种到设定的诱导培养基中进行培养, 结果表明, 不同基本培养基和

不同植物生长调节剂种类、浓度组合显著影响落羽杉丛芽的诱导(表 7, 图 2)。比较 B1-B6 可知, 除 B5 外, 加入激素的处理组丛芽诱导率和繁殖系数均比不加激素的高; 当 6-BA 浓度一定时, 丛芽的诱导率和繁殖系数随着 IBA 浓度的升高而降低; 当 IBA 浓度一定时, 6-BA 浓度越高诱导率和繁殖系数越低, 诱导率最高达 75.00%, 繁殖系数最高为 2.25 倍。比较 B7-B12 可知, 当 6-BA 浓度为 0.5 mg/L 时, 随着 IBA 浓度的升高, 诱导率和繁殖系数也升高。当 6-BA 浓度为 1 mg/L 时, 随着 IBA 浓度的升高, 诱导率和繁殖系数先升高后降低。当 IBA 浓度一定时, 诱导率和繁殖系数均随着 6-BA 浓度的升高而降低。诱导率最高为 83.33%, 繁殖系数最高为 2.58 倍。综合繁殖系数、丛芽诱导率、单芽总数等指标, 腋芽丛芽在 B8 培养基中诱导率和繁殖系数最高, 显著高出其他处理组, 而且 B8 的丛芽长势和生长状态相较更好, 因此腋芽丛芽诱导最佳的培养基为 B8, 即 1/2 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.4 mg/L IBA, 其次为 B1 和 B3。

表 7 不同植物生长调节剂对丛芽诱导的影响

培养基号	生长调节剂/ (mg · L ⁻¹)	接种 数/个	丛芽诱导率/ %	单芽 总数/个	繁殖系数/ 倍	生长状态
B1	DCR+0.5 6-BA+0.2 IBA	12	75.00±0.14ab	27	2.25±0.25ab	颜色正常, 长势较慢
B2	DCR+0.5 6-BA+0.4 IBA	12	66.67±0.14abc	25	2.08±0.22ab	颜色正常, 长势正常
B3	DCR+1 6-BA+0.2 IBA	12	75.00±0.25ab	20	1.67±0.17bcd	叶黄绿色, 长势较快
B4	DCR+1 6-BA+0.4 IBA	12	33.33±0.14cd	12	1.00±0.14efg	叶黄绿色, 长势较慢
B5	DCR+1 6-BA+0.6 IBA	12	25.00±0d	7	0.58±0.22fg	叶黄绿色, 长势正常
B6	DCR	12	25.00±0d	9	0.75±0fg	颜色正常, 长势较慢
B7	1/2 MS+0.5 6-BA+0.2 IBA	12	41.67±0.14bcd	17	1.42±0.08cde	颜色正常, 长势较快
B8	1/2 MS+0.5 6-BA+0.4 IBA	12	83.33±0.14a	31	2.58±0.22a	颜色正常, 长势较快
B9	1/2 MS+1 6-BA+0.2 IBA	12	33.33±0.14cd	14	1.17±0.22def	叶黄绿色, 长势正常
B10	1/2 MS+1 6-BA+0.4 IBA	12	66.67±0.14abc	23	1.92±0.08bc	颜色正常, 长势较快
B11	1/2 MS+1 6-BA+0.6 IBA	12	33.33±0.14cd	6	0.50±0.14g	颜色正常, 长势正常
B12	CK	12	25.00±0.25d	6	0.50±0.29g	颜色正常, 长势较慢

注: 基本培养基为 MS, 小写字母不同表示不同植物生长调节剂之间差异有统计学意义($p < 0.05$)。



(a) 对照组



(b) 处理组

图 2 丛芽诱导

3 讨论

3.1 落羽杉茎段外植体的初代培养

试验研究发现,与大多数植物一样,在落羽杉组织培养过程中,外植体污染是普遍遇到的难题,若外植体材料污染的问题无法得到有效解决,则将十分影响后续阶段培养步骤的进行^[17-18]。所以科学合理的消毒灭菌步骤显得尤为重要。获取外植体的环境条件、取材部位、取材时间以及接种时操作是否规范都会对外植体的带菌情况造成影响,尤其是长期生长在室外环境条件下的植物自身易携带大量的细菌微生物,表面消毒时化学消毒剂很难将其彻底杀死^[19-20]。目前许多外植体消毒都是用单一的消毒剂进行消毒,不能达到良好的效果。组织培养常用的消毒剂有乙醇、次氯酸盐、 HgCl_2 、过氧化氢等。75%的乙醇具有一定的杀菌力,而且具有湿润作用,可排除掉植物材料上的空气,利于与其他消毒剂配合使用^[21]。次氯酸通过侵入细胞内与蛋白质发生氧化作用或破坏其磷酸脱氢酶,使糖代谢失调而致细胞死亡; HgCl_2 中的 Hg^{2+} 可与带负电的细菌蛋白质结合,使蛋白变性,酶蛋白失活,进而使细胞致死^[22]。本试验采用了乙醇与 HgCl_2 和 NaClO 联合消毒的方式,大大提高了消毒的效果。试验结果显示,2%的 NaClO 灭菌效果差,增大浓度到5%之后随着消毒时间的延长,污染率出现明显的降低,但在相同的消毒时间内效果不如0.1% HgCl_2 ,这与茶条槭(*Acer ginnala*)外植体消毒效果相似^[23]。这极有可能是因为 NaClO 灭菌作用较温和且容易去除,配置后稳定性较差,容易分解。在试验过程中还发现,虽然采取联合消毒的方式对外植体进行消毒的效果更好,但总体的污染率还是很高,部分外植体在接种1个月后有腋芽萌动时还会出现污染,给后续试验带来很大程度的干扰。因此,在初代培养阶段的培养基中有必要加入一定浓度的植物抗菌剂来抑制外植体携带的各种微生物污染。植物抑菌剂可以有效抵制酶催化作用,影响菌体细胞壁的合成,最终导致微生物生长受阻^[24]。加入抑菌剂后,外植体污染率大大降低,这与辣木(*Moringa oleifera* Lam.)结果相似^[25]。本次试验中虽然提高了 NaClO 的浓度,但是没有延长消毒时间,在接下来的试验中我们将考虑延长 NaClO 消毒的时间,观察其灭菌效果。

3.2 落羽杉茎段腋芽的诱导

通过腋芽增殖和间接器官发生的方法建立腋芽增殖体系,能否成功诱导出腋芽是其中关键的一步^[26]。在落羽杉茎段腋芽诱导阶段一般采用细胞分裂素与生长素相结合的办法。落羽杉属常用的激素有6-BA, NAA, KT, ZT等^[16, 27]。在墨西哥落羽杉组织培养过程中发现其对6-BA的浓度变化较为敏感,浓度达到1~2 mg/L就会出现诱导率降低,甚至出现玻璃化、白化芽的现象^[28]。激动素(Kinetin)是一种非天然的细胞分裂素,它可以促进细胞分化、分裂、生长,诱导组织长芽,解除顶端优势。它的活性比腺嘌呤更高,一般用来促进生芽^[29]。NAA是生长素的一种,通过在植物体内促进一系列的合成反应,进而促进蛋白质含量的上升,蛋白质的积累有益于促进营养器官纵向生长^[30]。KT与NAA的组合在落羽杉腋芽萌发过程中诱导率最高达66.67%,几乎未出现玻璃化,每个茎段产生腋芽数2~5个,且在适宜的浓度下腋芽生长速度较快,30 d左右腋芽能长至1~1.5 cm,颜色嫩绿,长势良好。试验中还发现在低浓度的NAA中,容易出现膨大的芽,这与百合(*Lilium* L.)试管鳞茎结果相似^[31],膨大的芽簇生在一起长势较慢。

3.3 丛芽诱导与褐化

针叶树种离体快繁在增殖诱导阶段时,通常使用6-BA与IBA或6-BA与NAA的组合来诱导不定芽^[32]。不同生长调节剂的混合使用效果远优于单一激素^[33-34]。在这个阶段采用0.5 mg/L 6-BA和0.4 mg/L IBA组合丛芽诱导率最高,这与墨西哥落羽杉幼苗为起始外植体的组培结果相似^[28]。在试验过程中我们发现,落羽杉茎段组培芽在添加激素的条件下进行增殖培养30 d后会有丛芽产生,多数单芽萌发多个丛芽,但不添加激素时几乎没有丛芽产生。落羽杉茎段组培芽培养30 d后,部分芽苗叶缘慢慢发黄,最终整个外植体枯黄死亡。究其原因可能是木本植物本身含有较多的酚类物质,将腋芽切割下来用于丛芽诱导时,外植体细

胞受到破坏,细胞内的过氧化物酶、多酚氧化酶等酶释放或合成,在合适的 pH 值、温度、光照等条件下,与细胞液泡里的酚类物质发生酶促氧化反应,形成有毒的棕褐色醌类物质,从而使组织发生褐变^[35-36]。随着培养时间的延长,醌类物质逐渐积累,最终导致整个外植体死亡。在本试验中,通过在培养基中添加不同浓度的吸附剂 AC^[37-38],褐化程度有一定的缓解,但是随着培养时间的延长,最终芽苗还是会枯黄死亡,对于这个现象的解决办法还有待进一步的研究。

4 结论

本研究运用组织培养技术获得了一定数量的无菌外植体,再通过腋芽诱导和丛芽诱导扩繁获得了无菌苗。结果表明,在落羽杉组培初代培养阶段外植体的存活率和污染率受外植体类型、外植体部位、消毒剂的种类、消毒剂作用时间等多个因素的影响,选择最佳的外植体以及消毒方式对之后的培养过程至关重要。在本试验中采用乙醇与 HgCl₂ 和 NaClO 联合消毒并加入植物抑菌剂的方法,显著提高了消毒的效果。在腋芽诱导和丛芽诱导阶段,不同植物生长调节剂以及浓度均显著影响其诱导率。

参考文献:

- [1] 樊大勇,熊高明,张爱英,等. 三峡库区水位调度对消落带生态修复中物种筛选实践的影响 [J]. 植物生态学报, 2015, 39(4): 416-432.
- [2] 刘维璋,王杰,王勇,等. 三峡水库消落区不同海拔高度的植物群落多样性差异 [J]. 生态学报, 2012, 32(17): 5454-5466.
- [3] 鲍玉海,贺秀斌. 三峡水库消落带土壤侵蚀问题初步探讨 [J]. 水土保持研究, 2011, 18(6): 190-195.
- [4] 李昌晓,钟章成. 模拟三峡库区消落带土壤水分变化条件下落羽杉与池杉幼苗的光合特性比较 [J]. 林业科学, 2005, 41(6): 28-34.
- [5] 汪企明,江泽平,吕祥生,等. 落羽杉属种源研究: 树种生物学特性 [J]. 江苏林业科技, 1995, 22(2): 14-18.
- [6] MURPHY J B, STANLEY R G. Increased Germination Rates of Baldcypress and Pondcypress Seed Following Treatments Affecting the Seed Coat [J]. Physiologia Plantarum, 1975, 35(2): 135-139.
- [7] 吴落军. 落羽杉的扦插繁殖技术与生根机理研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 2007.
- [8] 陆锦明. 垂枝型墨西哥落羽杉组织培养技术及其在绿化中的应用 [J]. 上海农业科技, 2019(2): 98-99.
- [9] CHAND S, PANDEY A, VERMA O. In Vitro Regeneration of *Moringa oleifera* Lam.: a Medicinal Tree of Family Moringaceae [J]. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding, 2019, 79(3): 606-613.
- [10] GOPALAKRISHNAN K, KRISHNAN S, NARAYANAN K. Tissue Culture Studies and Estimation of Camptothecin from *Ophiorrhiza prostrata* D. Don [J]. Indian Journal of Plant Physiology, 2018, 23(3): 582-592.
- [11] ZHANG L L, LÜ S, YANG B M, et al. An Efficient Callus-Based in Vitro Regeneration Protocol for *Warburgia ugandensis* Sprague, an Important Medicinal Plant in Africa [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant, 2019, 55(1): 3-8.
- [12] KHATER N, BENBOUZA H. Preservation of *Juniperus thurifera* L.: a Rare Endangered Species in Algeria through in Vitro Regeneration [J]. Journal of Forestry Research, 2019, 30(1): 77-86.
- [13] SUL I W, KORBAN S S. Direct Shoot Organogenesis from Needles of Three Genotypes of *Sequoia sempervirens* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2005, 80(3): 353-358.
- [14] VARIS S, KLIMASZEWSKA K, ARONEN T. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Primordial Shoot Explants of *Picea abies* (L.) H. Karst. Somatic Trees [J]. Frontiers in Plant Science, 2018(9): 1551.
- [15] 曹福亮,杨小虎,汪贵斌,等. 落羽杉离体快速繁殖方法: CN101347099A [P]. 2009-01-21.
- [16] 许秀玉. 墨西哥落羽杉组织培养的研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 2004.
- [17] 程遥. 组织培养过程中污染和褐化的防治 [J]. 农业与技术, 2017, 37(16): 12.

- [18] 陈罡. 林木组培快繁技术中常见问题及对策 [J]. 防护林科技, 2017(4): 100-102.
- [19] 刘佳隄. 白芨组织培养及快速繁育体系建立 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [20] 朱广廉. 植物组织培养中的外植体灭菌 [J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(6): 444-446.
- [21] 夏海武, 宋云鹏. 植物组织培养与现代农业 [J]. 昌潍师专学报, 2000, 19(5): 40-41.
- [22] 孟长军. 组培实验室常见消毒方法优劣比较 [J]. 中国园艺文摘, 2012, 28(8): 177-178, 168.
- [23] 马亚男. 茶条槭组织培养初代培养技术研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2019.
- [24] 马立. 植物抑菌剂抑菌机理的研究方法进展 [J]. 农业与技术, 2017, 37(2): 26.
- [25] 刘德承. 辣木组培三种培养基及抑菌剂的初步研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2019.
- [26] MARTIN K P. Rapid in Vitro Multiplication and Ex Vitro Rooting of *Rotula aquatica* Lour., a Rare Rhoeophytic Woody Medicinal Plant [J]. Plant Cell Reports, 2003, 21(5): 415-420.
- [27] 姚德彪, 汤桂钧, 顾建平. 一种垂枝型墨西哥落羽杉组织培养方法: CN105145368A [P]. 2015-12-16.
- [28] 许秀玉, 施季森, 席梦利, 等. 墨西哥落羽杉离体培养及再生体系的建立 [J]. 林业科学, 2007, 43(10): 40-44.
- [29] 胡蓉. 植物激素在组织培养中的作用 [J]. 川北教育学院院刊, 1989(1): 44-47.
- [30] 黄诚梅, 江文, 吴建明, 等. 萘乙酸与多效唑对茉莉成花及新梢内源激素含量的影响 [J]. 西北植物学报, 2009, 29(4): 742-748.
- [31] 任亚萍. 百合试管鳞茎形成及膨大的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [32] LIU C Q, XIA X L, YIN W L, et al. Shoot Regeneration and Somatic Embryogenesis from Needles of Redwood (*Sequoia sempervirens* (D. Don.) Endl.) [J]. Plant Cell Reports, 2006, 25(7): 621-628.
- [33] NOWAKOWSKA K, PACHOLCZAK A, TEPPER W. The Effect of Selected Growth Regulators and Culture Media on Regeneration of *Daphne mezereum* L. 'Alba' [J]. Rendiconti Lincei Scienze Fisiche e Naturali, 2019, 30(1): 197-205.
- [34] 刘春雷, 刘燕琴, 陈艾萌, 等. 珍稀药材白芨“两段式”组培快繁技术研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2020, 42(1): 30-36.
- [35] 董艳山. 红豆杉细胞培养过程中褐化机理及其控制 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2015.
- [36] 高洁, 张萍, 薛璟祺, 等. 酚类物质及其对木本植物组织培养褐变影响的研究进展 [J]. 园艺学报, 2019, 46(9): 1645-1654.
- [37] 刘用生, 李友勇. 植物组织培养中活性炭的使用 [J]. 植物生理学通讯, 1994, 30(3): 214-217.
- [38] 肖小君, 罗潼, 王芳. 木本植物组织培养过程中褐变现象及控制措施的研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2017, 45(16): 20-24.

责任编辑 周仁惠