

降低彩色马蹄莲组培初代培养污染因素的筛选

周凤娇¹, 陈训^{2*} (1. 贵州大学林学院, 贵州贵阳 550025; 2. 贵州科学院, 贵州贵阳 550001)

摘要 [目的] 筛选降低彩色马蹄莲组培初代培养污染率的最佳方法。[方法] 以正在萌芽的红色、黄色马蹄莲 1 年生小球茎为培养材料, 选取水浴温度、表面消毒时间、表面消毒剂种类、防腐剂种类 4 个因素进行正交设计, 培养 10 d 后统计每个组合的污染率、褐变率。[结果] 选取的 4 种因素对污染率均有极显著影响 ($P < 0.01$), 其中水浴温度、表面灭菌时间、表面消毒剂种类对褐变率有显著影响 ($P < 0.05$)。从单个因素来看, 水浴温度 40 °C 时污染率较低, 0.1% HgCl₂ 处理的污染率较低, 无防腐剂处理的污染率较低; 水浴温度 45 °C 时褐变率较低, 表面灭菌时间短的处理减少褐变率的效果较好。[结论] 水浴温度 50 °C、0.1% HgCl₂ 处理 20 min、无防腐剂培养基的污染率最低。

关键词 彩色马蹄莲; 正交设计; 污染率

中图分类号 S682.2⁺64 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)29-12589-02

Screening on the Methods for Decreasing Contamination Rate of Tissue Culture for *Zantedeschia antedeschia* in Initial Culture

ZHOU Feng-jiao et al (College of Forestry, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025)

Abstract [Objective] The aim was to screen the optimum method for decreasing the contamination rate of tissue culture for *Zantedeschia antedeschia* in initial culture. [Method] With the budding annual bulb of red and yellow *Zantedeschia* as the cultured materials, 4 factors of bath temperature, surface disinfection time, kinds of surface disinfectant and preservative were selected for orthogonal design and the contamination rate and browning rate of every combination were calculated after the bulbets were cultured for 10 d. [Result] The 4 selected factors all had very significant influence on the contamination rate ($P < 0.01$) and among them, the bath temperature, surface disinfection time and kinds of surface disinfectant had significant influence on the contamination rate ($P < 0.05$). From the signal factor, the contamination rate was lower when the bath temperature was 40 °C, and when the bulbets were treated by 0.1% mercuric chloride, or treated without preservative. The browning rate was lower when the bath temperature was 45 °C and it could get better effect of decreasing the browning rate when the surface disinfection time of the treatment was short. [Conclusion] The contamination rate was lowest under the condition of the bath temperature of 40 °C, treating the bulbets by 0.1% mercuric chloride treating for 20 min and the medium without preservative.

Key words *Zantedeschia antedeschia*; Orthogonal design; Contamination rate

彩色马蹄莲 (*Zantedeschia antedeschia*) 属天南星科马蹄莲属, 原产南非, 起源于 5 个原种: *Z. albomaculata*, *Z. elliotiana*, *Z. jucunda*, *Z. pentlandii* 和 *Z. rehmannii*。其花、叶具有较高观赏价值, 常用作配叶材料^[1-2]。目前国内主要采取分球法和组培法扩繁彩色马蹄莲生产用种^[3-5]。在彩色马蹄莲组培过程中常规灭菌程序灭菌效果不好^[6], 污染率较高, 易造成组培苗的浪费。因此, 如何降低彩色马蹄莲组培初代培养污染率是首先需要解决的问题。在植物组织培养中, 防止组培污染的研究^[7-9]较多。笔者采用不同温度热水浴预处理, 不同种类和浓度的表面灭菌剂处理和和培养基中加入防腐剂 C₆H₅COONa 和 Na₃PO₄ 等方法, 并通过正交设计筛选降低彩色马蹄莲组培初代培养中污染率的最佳方法。

1 材料与方

1.1 试验材料 试验采用红色和黄色马蹄莲 1 年生小球茎, 取自贵阳市白云区东森公司花卉基地。试剂和仪器为代森锌可湿性粉剂、多菌灵可湿性粉剂; MS 大量元素、MS 微量元素、MS 有机物类、MS 肌醇、MS 铁盐、无菌水; 高压灭菌锅、超净操作台。

1.2 试验方法 试验采用 L₉(3⁴)4 因素 3 水平的正交设计, 共 9 个处理(表 1)。

取正在萌芽的红色和黄色马蹄莲 1 年生小球茎, 刷洗干净泥土, 刮掉最外层褐色表皮, 流水冲洗 1 h。用代森锌和多菌灵混合溶液浸泡 1 h 后洗去溶液, 分别用 40、45、50 °C 的热水浴处理小球 0.5 h, 然后把小球茎切成 0.5 cm × 0.5 cm ×

1.0 cm 的小块, 每块上都带有芽或芽眼, 无菌水冲洗后, 在超净工作台上用 75% 酒精灭菌 20 s, 无菌水冲洗 1 次后, 按表 1 进行表面灭菌后, 无菌水冲洗 5 次, 用无菌滤纸吸干, 接种于无蔗糖无激素但有不同防腐剂的 MS 培养基中(琼脂 9 g/L, pH 值为 5.8), 在 25 °C, 2 000 lx 光照条件下培养, 9 个处理每个处理 10 瓶, 每瓶 1 个芽, 重复 1 次。10 d 后统计污染率、褐变率。

表 1 降低彩色马蹄莲组培初代培养污染率的正交组合

Table 1 Orthogonal combination of reducing contamination rate of *Zantedeschia antedeschia* in initial culture

水平 Level	水浴温度/°C Water bath temperature	表面消毒时间/min Surface disinfection time	表面消毒剂种类 Surface disinfectant type	防腐剂种类 Preservative type
1	40	10	10% NaClO	无防腐剂 No preservative
2	45	15	0.1% HgCl ₂	0.5% Na ₃ PO ₄
3	50	20	10% Ca(ClO) ₂	20 mg/L C ₆ H ₅ COONa

1.3 数据处理 用 SPSS13.0 软件对试验数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 各因素对污染率的影响 用 SPSS13.0 软件对污染率与水浴温度、表面灭菌时间、表面灭菌剂种类、防腐剂种类 4 种因素进行方差分析。结果表明, 4 种因素对污染率均有极显著的影响 ($P < 0.01$)。从表 2 可以看出, C₃ 处理污染率的均值最低, 为 0.033 3, 是降低污染率的最佳组合; 其次是 A₂ 处理, 污染率均值为 0.066 7; 污染率最高的是 B₃ 处理, 均值达到 0.833 3。

4 种因素的 3 个水平分别比较, 水浴温度 40、45、50 °C 均值分别为 0.133 3、0.483 3、0.383 3, 说明水浴温度在 40 °C 时

基金项目 贵州省科技攻关项目[黔科合 NY 字(2006)3027 号]。

作者简介 周凤娇(1974-), 女, 山东泰安人, 在读硕士, 从事种苗繁育方面的研究。*通讯作者。

收稿日期 2008-07-07

表 2 污染率与褐变率描述统计

Table 2 Descriptive statistics of contamination rate and browning rate

处理 Treatment	温度//℃ Temperature	时间 Time min	表面消毒剂 Surface disinfection	防腐剂 Preservative	污染率 Contamination rate		褐变率 Browning rate		N
					均值	标准差	均值	标准差	
					Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation	
A ₁	40	10	10% NaClO	无防腐剂 No preservative	0.100 0	0.050 00	0	0	3
A ₂	15	15	0.1% HgCl ₂	0.5% Na ₃ PO ₄	0.066 7	0.076 38	0.400 0	0.0500 0	3
A ₃	20	20	10% Ca(ClO) ₂	C ₆ H ₅ COONa	0.233 3	0.028 87	0	0	3
B ₁	45	10	0.1% HgCl ₂	C ₆ H ₅ COONa	0.183 3	0.076 38	0.366 7	0.028 87	3
B ₂	15	15	10% Ca(ClO) ₂	无防腐剂 No preservative	0.433 3	0.076 38	0	0	3
B ₃	20	20	10% NaClO	0.5% Na ₃ PO ₄	0.833 3	0.057 74	0	0	3
C ₁	50	10	10% Ca(ClO) ₂	0.5% Na ₃ PO ₄	0.483 3	0.076 38	0	0	3
C ₂	15	15	10% NaClO	C ₆ H ₅ COONa	0.633 3	0.125 83	0.116 7	0.028 87	3
C ₃	20	20	0.1% HgCl ₂	无防腐剂 No preservative	0.033 3	0.028 87	0.416 7	0.028 87	3

污染率较低,这与李群的试验结果(水浴温度在 48 ℃时降低污染率效果较好)不符^[12];表面灭菌时间 10、15、20 min 均值分别为 0.255 6、0.377 8、0.366 7,说明表面灭菌 10 min 的处理对降低污染率较好;表面灭菌剂种类 2% NaClO、0.1% HgCl₂、10% Ca(ClO)₂ 均值分别为 0.522 2、0.094 4、0.383 3,污染率较低的是 0.1% HgCl₂;对于防腐剂种类来说,无防腐剂、0.5% Na₃PO₄、C₆H₅COONa 均值分别为 0.188 9、0.461 1、0.350 0,无防腐剂的污染率较低,说明培养基中加入防腐剂对彩色马蹄莲组培效果不明显。

2.2 各因素对褐变率的影响 方差分析结果表明,防腐剂的有无和种类对褐变率无显著性影响($P > 0.05$),而水浴温度、表面灭菌时间、表面灭菌剂种类对褐变率有显著性影响($P < 0.05$)。

从表 2 可以看出,在 9 种处理组合中 C₃ 处理培养基褐变率均值最高,为 0.416 7,大于其他组合褐变率,其次是 A₂ 处理,均值为 0.400 0。

水浴温度、表面灭菌时间、表面灭菌剂种类 3 种因素的 3 个水平分别比较,水浴温度 40、45、50 ℃对褐变率影响的均值分别为 0.133 3、0.122 2、0.177 8,说明水浴温度 45 ℃处理对减少褐变率效果较好;表面灭菌时间 10、15、20 min 均值分别为 0.122 2、0.172 2、0.138 9,说明表面灭菌时间短对减少褐变率效果较好;表面灭菌剂种类的 3 个水平 2% NaClO、0.1% HgCl₂、10% Ca(ClO)₂ 均值分别为 0.038 9、0.394 4、0, HgCl₂ 对褐变率影响较大,而 10% Ca(ClO)₂ 对减少褐变率效果较好。

3 结论

(1)降低污染率是彩色马蹄莲组培的关键,但是褐变率高会影响萌芽率和植株的生长,所以要兼顾降低褐变率。从 2 组数据综合分析结果可以看出, C₃ 处理污染率最低,但褐变率是最高的,其次 A₂ 处理,污染率低而褐变率也较高。杜

雪玲等研究结果表明,灭菌时间较长,常常使接种材料的外层氧化变褐,影响培养效果,虽然 HgCl₂ 有很强的杀菌能力,但浸泡时间稍长会造成接种材料中毒^[15]。

从 4 个因素来看,水浴温度 40 ℃时污染率最低,而 45 ℃褐变率最低,综合考虑,应该在 45 ℃较好;从表面灭菌剂的种类分析来看,0.1% HgCl₂ 灭菌效果最好,但时间不能太长,否则褐变率也较高,影响组培苗的生长;至于培养基中防腐剂的添加,在彩色马蹄莲组培中其对污染率和褐变率均无显著性影响。

参考文献

- [1] 董毓林. 彩色马蹄莲的栽培与管理[J]. 山西农业, 2004(1): 49-50.
- [2] 周学青, 夏宜平. 鲜切花栽培和保鲜技术[M]. 上海: 上海科学出版社, 1994.
- [3] 黄作喜, 段辉国, 李树发. 彩色马蹄莲商品种球自育的关键技术[J]. 中国种业, 2006(7): 46-47.
- [4] 张露萍, 陆林, 王丽花, 等. 赤霉素对彩色马蹄莲开花的影响[J]. 中国种业, 2005(1): 34.
- [5] 范加勤, 张雯雯, 张娜, 等. 几个彩色马蹄莲品种的离体培养和快速繁殖[J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(2): 28-31.
- [6] 朱广廉. 植物组培中的外植体灭菌[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(6): 444-449.
- [7] 柴向华, 李军, 张秀珊, 等. 植物组织培养中污染的控制[J]. 热带农业科学, 2003, 12(6): 40-43.
- [8] 吴林森. 植物组织培养污染问题的研究及其控制措施[J]. 江苏林业科技, 2005, 2(1): 28-31.
- [9] 缪耀梅, 李开彪, 叶添谋. 组织培养过程中污染和褐化的防治[J]. 韶关学院学报: 自然科学版, 2003, 6(6): 101-103.
- [10] 周俊辉. 植物快速繁殖中存在的问题与对策[J]. 仲恺农业技术学院学报, 1999, 12(4): 64-70.
- [11] 周俊辉, 周厚高, 刘花全. 植物组织培养中的内生细菌污染问题[J]. 广西植物, 2003, 23(1): 41-47.
- [12] 李群. 热水浴处理对马蹄莲初代培养中污染的控制[J]. 四川师范大学学报, 2001, 9(5): 520-521.
- [13] 周俊辉, 周厚高, 刘花全, 等. 植物组织培养中的内生细菌污染问题[J]. 广西植物, 2003, 1(1): 41-45.
- [14] 冯晓英. 勿忘我组织培养快速繁殖研究[J]. 贵州农业科学, 2002, 30(1): 9-13.
- [15] 杜雪玲, 张振霞, 余如刚, 等. 植物组织培养中的污染成因及其预防[J]. 草业科学, 2005(1): 24-27.