维普资讯 http://www.cqvip.com

马蹄组织培养中的外植体灭菌及培养基筛选研究

吴桂容，李忠芳，陈春岚，邓年方，曲芬霞

（贺州学院　生化系，广西　贺州　542800）

［摘　要］对马蹄茎尖进行消毒灭菌剂配合使用，采用不同时间灭菌及不同浓度激素的处理。试验结果表明，对于马蹄茎尖灭菌以75%酒精1 min，0.5%升汞10min处理效果好。适宜马蹄茎尖诱导及继代培养的培养基是MS + BA 2.0 mg/L + NAA0.2 mg/L，生根培养基是1/2 MS + NAA 0.5 mg/L。

［关键词］马蹄；灭菌；培养基筛选

［中图分类号］S645.3　［文献标识码］A　［文章编号］1673－8861(2007)02－0126－02

马蹄学名荸荠（*E leochari stuberosa*），莎草科荸荠属宿根性水生草本植物，马蹄因其果肉脆甜、多汁、爽口，是一种集果蔬兼用和保健于一体的优质食品，因而深受人们的喜爱。马蹄在我国种植历史悠久，广西贺州是主要的马蹄生产基地之一，种植面积达6万亩。但因连续多年的种植，采用传统的球茎繁殖，出现了个小、质劣、产量低、商品率低及品种抗逆性差，病害（主要是杆枯病）等严重问题，在一定程度上影响了马蹄的生产。马蹄组培苗是在实验室内用马蹄茎尖进行组织培养而获得的无菌、无病毒生根苗。马蹄组培苗的快繁的先决条件是外植体的消毒灭菌，其次才是初代培养、继代培养、生根培养。本实验主要是对马蹄的外植体的选择及消毒方法及培养基的配制进行初步研究，以其为规模化生产马蹄组培苗提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 试验于2004～2006年在贺州学院进行。供试品种为“贺州芳林马蹄”。

1.2 试验方法

（1）选择外植体及消毒方法。将种荠放入水中浸泡2－3天，待芽萌发，取顶芽、侧芽。用洗衣粉泡2分钟，冲洗干净。在超净工作台上，用70%的酒精浸泡1分钟，再分别用0.1%升汞、2%次氯酸钠、10%过氧化氢、2%溴水，分别消毒5，10，15，20分钟，进行接种培养，观察记录外殖体的分化、存活率情况。所有实验均接种30个。

（2）诱导培养基激素组成。培养基中添加6－BA的浓度设为0.5，1.0，1.5，2.0 mg/L，NAA浓度设为0.1，0.2 mg/L。加蔗糖30 g/L，pH值为5.8。培养室温度控制在25±2℃。光照强度为1200～1500Lux，光照时间12小时。

（3）生根培养基激素组成，培养基中添加NAA浓度设为0.1，0.2，0.5 mg/L，加蔗糖30 g/L，2g/L琼脂（半固体），光照强度及光照时间同上。

2 结果与分析

2.1 不同消毒方法及时间对外殖体的影响

马蹄组织培养过程中褐化及污染现象是外植体处理中最主要的问题（表1）。外植体在培养过程中切口产生的多酚类物质被氧化成褐色的醌类物质，这就是褐变现象。目前认为，植物组织褐变主要与多酚氧化酶（PPO）有关，当细胞膜的结构发生变化和破坏时，为酚创造了与PPO接触的条件，在氧存在的情况下使酚类物质氧化成醌，进行一系列的脱水、聚合反应，最后形成黑褐色物质，从而引起褐变。醌类物质毒害植物本身，影响培养材料的生长与分化，严重时导致培养材料死亡[1]。由于马蹄采用茎尖作为外植体，需要将茎尖剥离至0.5 mm大小，操作过程中容易划伤芽尖，导致芽体细胞结构遭到破坏，从而产生褐化现象。在组织培养过程中，如果环境、培养基或外植体灭菌不彻底、操作过程不规范等，微生物则会在培养基中滋生，并使培养物的生长受到影响甚至死亡[2-4]。由于马蹄为水生植物，种球外履盖

［收稿日期］2007－06－19

［作者简介］吴桂容（1970－），女，广东陆丰人，副教授，主要研究方向：植物组织培养及植物生态。

［基金项目］广西教育厅科研资助项目。

维普资讯 http://www.cqvip.com

着泥土,菌类滋生,有的病毒甚至长至组织内部,致使表面消毒剂很难杀死组织内部的病毒而产生污染。

表1 不同药剂、处理时间对马蹄茎尖褐化、污染率的影响 单位:%

材料	0.1% 升汞	10% H_2O_2	2% NaClO	2% 溴水
5 min	46.67	56	43.33	53.33
10 min	36.67	63.33	56.67	46.67
15 min	70	100	93.33	80
20 min	100	100	100	100

由表1可看出,马蹄灭菌效果以0.1%升汞消毒10分钟效果最好,而且以选取肥大顶芽的外植体效果最好。

2.2 激素浓度对增殖培养基的影响

马蹄的组织培养中,激素的浓度与丛芽的诱导及增殖关系密切。马蹄茎尖经灭菌处理后转入诱导培养基,本试验设计8种不同激素浓度组合,其对马蹄茎尖的诱导及继代培养的影响如表2所示。最适宜马蹄诱导及继代培养基是:MS + BA2.0 mg/L + NAA0.2 mg/L,7天左右茎尖膨大形成小芽点,18 d左右开始长芽,28 - 30天左右在小芽基部一般有2 - 4个丛生芽。将丛生芽转接到继代培养基上,15 - 20d左右其基部可形成3 - 7个小芽,将基部的幼芽切成2 - 3个一簇的继续培养,继代5次转入生根培养基进行生根培养。在继代培养中,比较了固体培养基与半固体培养基、液体培养基增殖率,发现半固体培养基的幼芽增殖系数平均为6,而固体培养基培养的幼芽增殖系数只有3 - 4,而幼芽在液体培养基容易发生倒伏,固定性较差,影响幼芽增殖系数。在半固体培养基中增殖率较高的原因可能与马蹄是水生植物有关。

表2 激素浓度对马蹄茎尖诱导的影响

激素浓度/(mg·L-1)	存活率%	开始分化时间/d	生长状况
BA0.5 + NAA0.05	0	-	不生长
BA0.5 + NAA0.2	0	-	不生长
BA1.0 + NAA0.05	13.33	35	生长缓慢
BA1.0 + NAA0.2	16.67	32	生长缓慢
BA1.5 + NAA0.05	16.67	30	生长缓慢
BA1.5 + NAA0.2	30	26	芽体转绿,长势较弱
BA2.0 + NAA0.05	26.67	24	芽体转绿,长势较弱
BA2.0 + NAA0.2	60	18	诱导芽体多,长势旺盛

注:材料为随取随接

2.3 激素浓度对生根培养基的影响

培养基中添加NAA浓度设为0.1,0.2,0.5 mg/L,对马蹄组培苗生根的影响如图3所示。当NAA浓度为0.2 mg/L时,35天才开始长出根系;而当NAA浓度为0.5 mg/L时,只需25天既长出白色或褐色的根系,大约32天左右根系数量可达到10 - 15,为最适宜的生根培养基。

表3 激素浓度对马蹄组培苗生根培养的影响

激素浓度/(mg·L-1)	生根时间/d	根数量	生长状况
1/2MS + NAA0.1	-	0	
1/2MS + NAA0.2	35	6 ~ 10	根较细,长势弱
1/2MS + NAA0.5	25	10 ~ 15	根较粗壮,长势强

3 结论

(1) 马蹄组织培养过程中容易发生褐化及污染现象,主要原因可能是由于剥离茎尖创伤以及茎尖本身携带病毒所致。0.1%升汞消毒10分钟的效果最好,用其他消毒剂消毒后的茎尖存活率低。

(2) 培养温度为25℃,光照强度为1200 ~ 1500Lux,光照时间12小时条件下,最适宜的诱导及继代培养基是MS + BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L(半固体),生根培养基是1/2MS + NAA 0.5 mg/L(半固体)。

[参考文献]

[1]Marks TR, Simpson SE. Reduced phenolic oxidation at culture initiation in vitro following the exposure of field - grown stock plants to darkness or low level of irradiance[J], J.Hort. Sci, 1990, 65: 103 - 111.

[2]Blackman, S.A, Brown, K.L, Manalo J.R, et al. Embryo culture as a means to rescue deteriorated maize seeds[J]. Crop Science. 1996, 36(6): 1693 - 1698.

[3]Merel Langens - Gerrits, Marion Albers, Geert - Jan De Klerk, Hot - water treatment before tissue culture reduces initial contamination in Lilium and Acer[J], Plant Cell Tissue Org Cult, 1998, 52: 75 - 77.

[4]穆承年,王庆云,常冬至,王宝林.影响植物组织培养的细胞内生微生物(初报)[J].华北农学报,1987,2(2):115 - 118.