

莲瓣兰原生地萌发胚培养真菌污染控制的优选

李海峰¹, 赵志莲², 张海珠¹, 李明¹, 刘光明¹

(1. 云南省大理学院 药学院, 云南 大理 671000; 2. 云南省大理农业学校, 云南 大理 671003)

摘要:以莲瓣兰杂交种子原生地共生萌发突破种皮的胚为试验材料, 采用正交试验设计研究次氯酸钠浓度、灭菌时间、灭菌次数及超声波处理时间对莲瓣兰胚培养过程中真菌污染控制及胚培养情况的影响。结果表明: 莲瓣兰胚培养过程中以次氯酸钠浓度: 灭菌时间: 灭菌次数: 超声波处理时间(4% : 15 min : 1次 : 6 min)的配比胚被真菌污染的污染率最低为 16.0%, 但是胚成活率较低仅为 14.3%, 不宜作为莲瓣兰胚培养的灭菌条件; 经过正交试验设计优选出莲瓣兰胚培养过程中胚成活率作用大小为次氯酸钠浓度 > 超声波处理时间 > 灭菌时间 > 灭菌次数, 以次氯酸钠浓度: 灭菌时间: 灭菌次数: 超声波处理时间(1% : 20 min : 2次 : 3 min)的配比胚成活率高达 93.3%, 同时胚被真菌污染率仅为 19.00%, 可以作为莲瓣兰(*Cymbidium tortiseplum*)杂交种子原生地共生萌发突破种皮的胚培养灭菌条件, 在此条件下胚能够从培养基中吸收营养物质, 经过培养胚生长发育成根状茎。

关键词: 莲瓣兰; 胚培养; 正交设计; 真菌污染

中图分类号: S 682.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)04-0129-03

莲瓣兰(*Cymbidium tortiseplum*), 兰科(Orchidaceae)兰属(*Cymbidium*)植物, 别名小雪兰、卑亚兰、菅草兰, 主要分布在滇西北“三江”并流区的温带性地生兰^[1], 具有很高的观赏价值和经济价值。由于全球“兰花热”和经济利益的驱使, 从 20 世纪 80 年代至今, 经过 20 a 野生挖掘, 野生莲瓣兰种质资源遭到了毁灭性破坏^[2], 在莲瓣兰的原生地已很难找到开花的成年植株, 而没有一定数量的野生种质资源, 莲瓣兰是无法通过虫媒授粉在自然界中繁衍和生存, 野生种质资源濒临灭绝。

该项目组对莲瓣兰杂交育种、杂交种子非共生萌发、杂交种子在原生地播种共生萌发及植株形态发生过程进行多年研究发现, 莲瓣兰种间杂交亲和性较强, 杂交种子在非共生条件下很难萌发。但是莲瓣兰杂交种子在原生地播种容易萌发, 从播种到种子被共生萌发菌侵染突破种皮形成类原球茎只需 6~12 个月, 可是从类原球茎转绿成根状茎到完整植株极其缓慢, 一般需要 4~6 a 的时间。因为莲瓣兰种子在原生地只有被共生萌发真菌浸染, 通过共生真菌把胚和基质连接起来, 持续不断为胚提供营养物质促进胚的发育及突破种皮萌

发, 外植体同时受内生及外部真菌的影响, 按照传统的灭菌方法很难控制胚培养过程中的真菌污染。

为了缩短莲瓣兰原生地共生萌发过程中从类原球茎到植株形态发生过程, 达到快速繁殖的目的, 试验以莲瓣兰大雪素、剑阳蝶杂交种子原生地萌发突破种皮的胚为外植体, 采用正交试验设计法对影响莲瓣兰杂交种子原生地萌发突破种皮的胚培养真菌污染控制及影响胚培养成活的 4 种主要因素(次氯酸钠浓度、灭菌时间、灭菌次数及超声波处理时间)进行优选, 获得了最佳的灭菌组合, 有效控制了胚培养过程中的真菌污染, 提高了胚培养成活率, 建立了稳定的莲瓣兰杂交育种胚培养体系, 为莲瓣兰杂交育种胚培养选育新品种、野生种质资源保护和利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

莲瓣兰大雪素(*Cymbidium tortiseplum* 'daxuesu'), 莲瓣兰剑阳蝶(*Cymbidium tortiseplum* 'jianyangdie')杂交种子在原生地共生萌发突破种皮的胚为试验材料。试验于 2008 年 3~12 月在大理学院药学院药物研究所药用植物细胞培养次生代谢产物中心进行。

1.2 试验设计

选取次氯酸钠浓度、灭菌时间、灭菌次数、超声波处理 4 个因子, 每个因子取 3 个水平, 考察莲瓣兰胚培养过程中真菌污染控制及胚培养情况, 采用 $L_9(3)^{4[3]}$ 正交表, 因子水平设计见表 1。

第一作者简介: 李海峰(1971-), 男, 云南大理人, 硕士, 副教授, 现从事莲瓣兰杂交育种组织培养快速繁殖, 药用植物细胞培养及次生代谢产物的研究工作。E-mail: lihzh888@sina.com。

基金项目: 云南省大理州科技局及大理学院药物研究所资助项目(2009yy02)。

收稿日期: 2009-10-26

表 1 $L_9(3)^4$ 因子水平设计

因子水平	因子种类			
	A	B	C	D
	NaClO 浓度 / %	灭菌时间 / min	灭菌次数 / 次	超声波处理 / min
1	1	10	1	0
2	2	15	2	3
3	4	20	3	6

1.3 培养基的配制及培养方法

以改良 RM¹⁴ 作为基本培养基 培养基中分别添蔗糖 30 mg/L、活性炭 2.0 g/L、香蕉泥 20 g/L、琼脂 12 g/L, pH 为 5.8。将莲瓣兰大雪素、剑阳蝶杂交种子在原生地共生萌发突破种皮的胚用 70%酒精灭菌 30 s, 再按照试验设计方法用次氯酸钠浓度、灭菌时间、灭菌次数 (1 次无处理 2 次用 70%酒精灭菌 30 s 后再用 0.1% 高锰酸钾溶液处理 5 min, 3 次用 70%酒精灭菌 30 s 后再用 0.1% 升降汞溶液处理 5 min)、超声波处理进行灭菌, 灭菌结束用无菌水洗涤 5 次, 用无菌滤纸吸干水份待用。

培养容器为 16 mm×100 mm、12 mL 玻璃试管 每支试管加入 3 mL 固体培养基, 120℃ 高压灭菌 15 min, 培养基放置成斜面冷却。在无菌操作条件下每支试管接种经过灭菌处理、无菌水洗涤后的莲瓣兰杂交种子原生地共生萌发突破种皮的胚 1 个, 每个处理接种 100 支试管, 接种好的外植体在光照强度 1 500 lx、光照时间 12 h/d、25℃ 条件下的人工气候箱中培养。

1.4 指标测定

培养 20 d 后测定胚污染数, 胚污染率=胚污染数/胚接种数×100%; 胚成活数指培养 60 d 后没有被污染

的胚转绿成根状茎数, 胚成活率=胚成活数/(胚接种数-胚污染数)×100%。

2 结果与分析

2.1 不同处理对莲瓣兰胚培养过程中真菌污染控制及胚培养成活情况影响

研究结果发现, 接种在培养基中莲瓣兰杂交种子原生地共生萌发突破种皮的胚 胚污染经营 2 个阶段, 培养 6~10 d 污染主要是胚表皮的外生真菌污染, 培养 15~20 d 后产生的污染主要是胚内生真菌污染。没有被污染或灭菌杀死的胚经过 30~40 d 的培养, 胚能转绿成根状茎。

结果表明, 各因子对莲瓣兰胚培养过程中真菌污染控制及胚培养成活情况影响很大, 莲瓣兰胚培养过程中以次氯酸钠浓度 : 灭菌时间 : 灭菌次数 : 超声波处理 (4% : 15 min : 1 : 6 min) 配比处理时, 胚污染率最低为 16.0%, 但胚成活率仅为 14.3%, 不宜作为灭菌条件; 以氯酸钠浓度 : 灭菌时间 : 灭菌次数 : 超声波处理 (2% : 20 min : 1 次 : 3 min) 配比处理时, 胚污染率为 29.0%, 胚成活率高达 91.5%, 是比较理想的灭菌条件。为了进一步考察因子之间的差异, 对试验结果进行极差分析, 结果见表 3。

对表 3 进行直观分析, 从 K 值大小可知, 因子 A (次氯酸钠浓度) 和因子 D (超声波处理时间) 对莲瓣兰胚成活率影响较大; 灭菌时间和灭菌次数影响较小。为了进一步反应各因子之间的差异, 以便寻求最佳水平, 采用方差分析进行精确分析, 结果见表 4。

表 2 试验设计对莲瓣兰胚培养过程中真菌污染控制及胚培养成活情况结果

试验编号	因子水平				接种胚数 / 个	胚污染数 / 个	胚污染率 / %	胚成活数 / 个	胚成活率 / %
	A	B	C	D					
1	1	10	1	0	100	72	72	9	32.1
2	1	15	2	3	100	34	34	58	87.9
3	1	20	3	6	100	23	23	59	76.6
4	2	10	2	6	100	19	19	41	50.6
5	2	15	3	0	100	67	67	10	30.3
6	2	20	1	3	100	29	29	65	91.5
7	4	10	3	3	100	18	18	15	18.3
8	4	15	1	6	100	16	16	12	14.3
9	4	20	2	0	100	39	39	8	13.1

注: A、B、C、D 分别代表不同的次氯酸钠浓度、灭菌时间、灭菌次数和超声波处理时间, 下同。

表 3 莲瓣兰胚培养胚成活率 $L_9(3)^4$ 极差分析

试验编号	因子水平			
	A	B	C	D
K1	65.53	33.67	45.97	25.17
K2	57.47	44.17	50.53	65.90
K3	15.23	60.40	41.73	47.17
R	50.30	26.73	8.80	40.73

对表 2 进行方差分析的结果见表 4, 因子 A (次氯酸钠浓度) 和因子 D (超声波处理时间) 作用极其显著, 因子 B (灭菌时间)、C (灭菌次数) 作用不显著。4 种因子对

表 4 莲瓣兰胚培养胚成活率的方差分析

因子	SS	DF	MS	F	
A	0.4379	2	0.2190	37.68	**
B	0.1088	2	0.0544	9.37	
C	0.0116	2	0.0058	1.0	
D	0.2494	2	0.1247	21.46	**
e	0.0116	9	0.0058		
Σe	0.8193	17			

注: $F_{0.05}(2, 8) = 4.26$ ** $F_{0.01}(2, 8) = 8.02$

莲瓣兰胚培养过程中胚成活率作用大小是: 因子 A > 因子 D > 因子 B > 因子 C。

2.2 次氯酸钠浓度、灭菌时间、灭菌次数、超声波处理时间最佳水平的选择

由表 2 可知, 莲瓣兰胚培养过程中胚成活率的最佳配比是: $A_1B_3C_2D_2$, 即次氯酸钠浓度 : 灭菌时间 : 灭菌次数 : 超声波处理 (1% : 20 min : 2 次 : 3 min)。试验用这种配比的灭菌方法进行验证, 胚被真菌污染率仅为 19.00%, 莲瓣兰胚成活率达 93.3%, 情况明显优于 $A_2B_3C_1D_2$, 证明试验所得结果的正确性, 可以作为莲瓣兰杂交种子原生地共生萌发突破种皮的胚培养灭菌条件, 在此条件下胚能够从培养基中吸收营养物质, 经过培养胚生长发育成根状茎。

3 讨论

按照植物组织培养中传统的灭菌方法进行灭菌处理外植体, 很难控制胚培养过程中的真菌污染, 无法建立莲瓣兰胚培养的快速繁殖系。传统的灭菌处理主要考虑杀菌剂浓度和灭菌时间, 试验对多次灭菌和超声波处理进行优选, 超声波处理时间越长, 胚污染率越低, 超声波作为一种次生波能够穿透细胞, 杀菌剂进入细胞内, 对内生真菌有很好的杀菌作用, 但是超声波对细胞的损害作用也很大, 对胚成活率的影响极其显著。肖显华等^[5]的研究发现超声波处理苹果、月季和紫杉的枝条能降低组织培养的污染率, 多次灭菌法^[6]是植物组织培养中对难灭菌材料的主要灭菌方法, 周鹏等^[7]的研究发现用 0.1% 高锰酸钾溶液、4% 次氯酸钠加 0.1% 升汞溶液、500 mg/L 先锋霉素的无菌水处理, 番木瓜组织培养的污染率能降低 50%, 但是在其多次灭菌法对莲瓣兰胚培养污染及胚成活影响不显著, 主要原因可能是多次灭

菌只对外生真菌污染作用效果显著, 在培养初期真菌污染率较低, 但是对内生真菌的灭菌效果较差, 培养 16 d 胚污染率显著增加, 污染主要由内生真菌引起。

对次氯酸钠浓度、灭菌时间、灭菌次数及超声波处理时间进行优选研究, 初步筛选出灭菌方法, 以次氯酸钠浓度 : 灭菌时间 : 灭菌次数 : 超声波处理时间 (1% : 20 min : 2 次 : 3 min) 的配比对莲瓣兰杂交种子原生地共生萌发突破种皮的胚进行灭菌, 胚被真菌污染率可以控制在 20.0%, 胚成活率超过 90.0%, 可以作为莲瓣兰杂交种子原生地共生萌发突破种皮的胚培养灭菌条件。而对其它杀菌剂、培养基添加抑菌剂等影响因素有待于进一步研究, 更加有效地控制莲瓣兰杂交种子原生地共生萌发突破种皮的胚培养过程中的真菌污染, 提高胚培养成活率。

参考文献

- [1] Puy D D Gribb P. The *Gumus Cymbidium* [M]. London: Timber Press 1998: 213-217.
- [2] 薛润光 和寿星, 李兆光, 等. 莲瓣兰保育现状与开发利用[J]. 林业调查规划, 2007, 32(3): 94-97.
- [3] 大泽胜次, 久保田旺. 生物工学基础 [M]. 东京: 农山渔村文化协会 1997: 70-72.
- [4] 明道绪 王钦德 耿社已, 等. 生物统计附试验设计 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 303-317.
- [5] 肖显华 王顺珍, 林荣双. 植物材料表面消毒方法的改进 [J]. 生物技术, 1999, 9(1): 43-45.
- [6] 王清莲. 植物组织培养 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 22-23.
- [7] 周鹏, 郑学勤, 陈向明. 成龄番木瓜的快速繁殖技术 [J]. 热带作物学报, 1995, 16(2): 66-69.

Selection of the Control of Fungi Pollution of Embryo Cultivation of *Cymbidium tortiliseplum*

LI Hai-feng¹, ZHAO Zhi-lian², ZHANG Hai-zhu¹, LI Ming¹, LIU Guang-ming¹

(1. College of Pharmacy, Dali University, Dali, Yunan 671000; 2. Dali Agriculture School, Dali, Yunnan 671003)

Abstract: The experiment material is embryo of *Cymbidium tortiliseplum* in hybrid seeds in suit when symbiotic germination breaks through the coat of seed. Orthogonal experimental design was used to observe the effect of sodium hypochlorite concentration, sterilization time, sterilization times and ultrasonic treatment time on the control of fungi pollution and embryo culture. The results showed that the ratio of embryos contaminated by fungi was 16.0%, with the lowest embryo survival rate of 14.3%. The ratio of sodium hypochlorite concentration : sterilization time : sterilization times : ultrasonic treatment time (4% : 15 min : 1 times : 6 min). Obviously, it could not suit the sterilization condition of the embryo culture. Furthermore, we noticed that the contribution on the embryo survival rate ordered by decreasing was sodium hypochlorite concentration, sterilization times, ultrasonic treatment time, and sterilization time. The embryo survival rate was 93.3%, and the contamination rate was just 19.0%. The concentration of sodium hypochlorite : sterilization time : sterilization times : ultrasonic treatment time (= 1% : 20 min : 2 times : 3 min). It demonstrated that this matching can be used to cultivate the *Cymbidium tortiliseplum* embryo, and under this condition, embryo can absorb nutrients from the culture medium, and develop into rhizome.

Key words: *Cymbidium tortiliseplum*; embryo culture; orthogonal test; fungi pollution