

# 杀菌剂在莲瓣兰原生地萌发胚培养中的应用

李海峰<sup>1</sup>, 赵志莲<sup>2</sup>, 胡侃<sup>1</sup>, 李明<sup>1</sup>

(1. 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播种萌发突破种皮后的胚为外植体,研究了培养基中添加不同种类、不同浓度的杀菌剂对胚培养过程中真菌污染的控制作用。结果表明:培养基中添加福朗、苯菌灵和代森锰锌能有效控制莲瓣兰杂交种子原生地萌发突破种皮后的胚培养过程中的真菌污染,胚污染率可以控制在 10.0 % 以内,培养基中添加福朗时胚成活率显著高于添加苯菌灵和代森锰锌,胚成活率高达 92.4 %;培养基中福朗浓度在 0.5~1.0 mg/L 范围内时胚污染率能够控制在 9.0 % 以内,胚成活率超过 92.3 %,不仅能有效控制莲瓣兰杂交种子原生地萌发突破种皮后的胚培养过程中真菌污染,还能促进胚生长发育转绿成根状茎。

**关键词:**莲瓣兰;胚培养;杀菌剂;真菌污染

**中图分类号:**S 682.2<sup>+</sup>9;S 603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)03-0148-03

莲瓣兰(*Cymbidium tortisepalum*)是兰科(Orchidaceae)兰属(*Cymbidium*)植物中主要分布在滇西北“三江”并流区的温带性生地兰<sup>[1]</sup>,别名小雪兰、卑亚兰、萱草兰,具有很高的观赏价值和经济价值。但是,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 多年的挖掘,野生莲瓣兰种质资源遭到了毁灭性破坏<sup>[2]</sup>,野生种质资源濒临灭绝。

多年来,课题组对莲瓣兰杂交育种、杂交种子非共生萌发、杂交种子原生地播种共生萌发及植株形态发生过程进行研究发现<sup>[3]</sup>,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感染突破种皮只需 8~14 个月时间,可是从种胚突破种皮后经根状茎途径到完整植株再生过程极其缓慢,一般需要 4~6 a 的时间。为了缩短莲瓣兰种子萌发到完整植株形态发生过程,建立稳定的莲瓣兰杂交育种胚培养及植株再生体系,达到快速繁殖的目的。前期研究结果发

**第一作者简介:**李海峰(1971-),男,白族,云南大理人,硕士,副教授,现主要从事植物组织的研究工作。E-mail: lihfh888@sina.com。

**基金项目:**云南省大理州科技局 2007 年资助项目;大理学院药物研究所资助项目(2009yy02)。

**收稿日期:**2010-11-16

## Research on Construction of Regeneration System of Xinjiang Muskmelon and Transformation with *NPR1* and *HRP* Disease-resistance Bivalent Gene

FENG Yu-jie, WANG Ai-ying, SHEN Hai-tao, ZHU Jian-bo

(Agriculture Biotechnology of Major Lab of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000)

**Abstract:** In order to establish the regeneration and transformation system, the cotyledons of five-day muskmelon as explants, MS and half-strength MS medium as basic medium with different 6-BA, IAA and kanamycin. The results showed that the optimum medium for Adventitious buds was MS medium supplemented with 1.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IAA, the medium for adventitious buds to elongate was MS medium supplemented with 0.75 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IAA, the root induction medium was 1/2 MS medium with 0.3 mg/L IAA. The optimum transformation conditions were 48 hours pre-cultured for the explants,  $OD_{600}=0.3\sim0.4$  for *Agrobacterium tumefaciens* cell density, 15 minutes for inoculation duration, 48~55 hours for co-cultivation in darkness at 22°C. Obtained 8 out of 21 transgenic plantlets with 75 mg/L kanamycin selection concentration medium, were confirmed by PCR that *NPR1* and *HRP* disease-resistance bivalent gene had transferred into the genome of muskmelon plants by *Agrobacterium*-mediated, the transformation efficiency was about 38%.

**Key words:** muskmelon; regeneration system; disease-resistance bivalent gen; *agrobacterium*-mediated

现<sup>[4-6]</sup>,以莲瓣兰大雪素、剑阳蝶杂交种子原生地播种萌发突破种皮后的胚为试验材料,氯化汞作为灭菌剂能有效控制胚培养过程中真菌污染,但是对胚造成的损伤程度高、胚成活率低;次氯酸钠作为灭菌剂胚培养过程中真菌污染控制效果不如氯化汞,但是对胚造成的损伤较小、胚成活率高;培福朗预处理能有效控制胚培养过程中真菌污染。因此,该研究在此基础上,以莲瓣兰大雪素、剑阳蝶杂交种子原生地播种萌发突破种皮后的胚为外植体,探讨培养基添加不同种类、不同浓度的杀菌剂对莲瓣兰杂交种子原生地播种萌发突破种皮后的胚培养过程中真菌污染控制及胚培养成活情况的影响,结果筛选出了最佳杀菌剂及其浓度,有效控制了胚培养过程中的真菌污染及胚成活率,为莲瓣兰杂交育种、种子原生地播种萌发突破种皮后的胚培养及植株再生提供理论依据和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以莲瓣兰大雪素(*Cymbidium tortisepalum* 'da xue su')、莲瓣兰剑阳蝶(*Cymbidium tortisepalum* 'jian yang die')杂交种子在原生地播种共生萌发突破种皮后的胚为试材,试验于2008年3~12月在大理学院药学院药物研究所植物组织培养室进行。

### 1.2 试验方法

1.2.1 材料灭菌方法 按照参考文献[5]将试验材料分别用70%酒精灭菌30 s、0.1%高锰酸钾溶液处理5 min、1.0%次氯酸钠灭菌20 min,次氯酸钠溶液灭菌过程中用超声波处理3.0 min,无菌水洗涤5次,用无菌滤纸吸干水份备用。

1.2.2 培养基配制及试验设计 以改良RM<sup>[7]</sup>作为基本培养基,培养基中添加蔗糖30 mg/L、活性炭2.0 g/L、香蕉泥20 g/L、琼脂12 g/L,pH 5.8。杀菌剂试验在培养基配制时培养基中分别添加75%代森锰锌可湿性粉剂1.5 g/L、25%甲霜灵可湿性粉剂1.5 g/L、50%苯菌灵可湿性粉剂1.5 g/L和25%培福朗1.0 mg/L,筛选出最佳杀菌剂;以25%培福朗做杀菌剂浓度试验,在培养基配制时分别添加0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 g/L的25%培福朗。

1.2.3 培养方法 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用无菌滤纸吸干水份备用试验材料1个,每个处理接种50支试管,3次重复。接种好的外植体在光照强度1 500 lx、光照时间12 h/d、23℃条件下的人工气候箱中培养。

1.2.4 结果统计与分析 培养20 d后测定胚污染数,胚污染数指接种胚中由于胚带菌而被污染数,胚污染率

为污染胚数/接种胚数×100%;培养60 d后测定胚成活数,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/(接种胚数-污染胚数)×100%。所得数据用SPSS 13.0统计软件分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 杀菌剂对莲瓣兰胚培养过程中真菌污染控制及胚成活情况的影响

由表1可知,培养基添加75%代森锰锌可湿性粉剂、50%苯菌灵可湿性粉剂和25%培福朗能有效控制莲瓣兰杂交种子原生地萌发胚培养过程中真菌污染,胚污染率显著低于无添加的对照组(CK),胚污染率能控制在10%以内;培养基添加25%甲霜灵可湿性粉剂胚污染率低于无添加的对照组(CK)。培养基添加25%培福朗胚成活率显著高于75%代森锰锌可湿性粉剂和50%苯菌灵,胚成活率为92.4%;培养基添加75%代森锰锌可湿性粉剂、50%苯菌灵可湿性粉剂和25%甲霜灵可湿性粉剂对胚的损伤程度较大,胚成活率较低,胚成活率不到70.0%。

表1 杀菌剂对莲瓣兰胚培养过程中真菌污染控制及胚成活情况的影响

杀菌剂	接种胚数	污染胚数	胚污染率/%	胚成活数	胚成活率/%
甲霜灵	100	16.0	16.0b	45	53.57d
苯菌灵	100	9.0	9.0a	61	67.03b
代森锰锌	100	8.0	8.0a	60	65.22c
培福朗	100	8.0	8.0a	85	92.4a
对照	100	32.0	32.0c	32	47.06d

### 2.2 培福朗浓度对莲瓣兰胚培养过程中真菌污染控制及胚成活情况的影响

由表2可知,培养基添加的25%培福朗能有效控制胚培养过程中真菌污染,培福朗浓度越高对莲瓣兰杂交种子原生地萌发胚培养过程中真菌污染控制效果越好,培福朗浓度在0.5~4.0 mg/L时胚污染率显著低于无添加的对照组(CK),胚污染率能控制在9.0%以内。培养基添加培福朗浓度在0.5~1.0 mg/L时,胚成活率显著高于其它处理,胚成活率达93.5%;随着培福朗浓度升高对胚的损伤逐渐增大,胚成活率逐渐降低,胚成活率不到65.0%。

表2 培福朗浓度对莲瓣兰胚培养过程中真菌污染控制及胚成活情况的影响

培福朗 /mg·L <sup>-1</sup>	接种胚数	污染胚数	胚污染率 /%	胚成活数	胚成活率 /%
0.25	100	19.0	19.0b	54	66.7b
0.50	100	9.0	9.0a	84	92.3a
1.00	100	8.0	8.0a	80	93.5a
2.00	100	4.0	4.0a	61	63.5b
4.00	100	3.0	3.0a	43	44.3d
CK	100	32.0	32.0c	34	50.0c

### 3 讨论

在自然条件下兰科植物种子只有与适宜的真菌共生才能萌发<sup>[8]</sup>,共生真菌是影响兰科植物分布与生存的主要因素。课题组经过多年对莲瓣兰杂交种子在原生地播种萌发及植株形态发生过程研究发现,莲瓣兰杂交种子无菌播种在非共生条件下很难萌发,但是在原生地播种种子容易萌发。因此,莲瓣兰杂交种子原生地播种突破种皮萌发的胚不仅受外界真菌的影响,还受侵入种胚内生真菌的影响,按照植物组织培养中传统的灭菌方法处理突破种皮的胚,很难控制胚培养过程中的真菌污染。培养基中添加杀菌剂是对一些容易污染而又难灭菌材料进行组织培养时常用的方法,李晓莺等<sup>[9]</sup>的研究发现培养基中添加 75%代森锰锌可湿性粉剂对枸杞组织培养过程中出现的真菌污染具有显著的防治效果,李元海等<sup>[10]</sup>的研究也发现,培养基中添加 75%代森锰锌可湿性粉剂对莲瓣兰组织培养过程中出现的真菌污染具有显著的防治效果。该研究结果也表明,培养基添加 75%代森锰锌可湿性粉剂、50%苯菌灵可湿性粉剂和 25%培福朗能有效控制莲瓣兰杂交种子原生地萌发胚培养过程中真菌污染,但是培养基添加 75%代森锰锌可湿性粉剂、50%苯菌灵可湿性粉剂对胚的损伤程度较大,胚成活率较低;培养基添加 25%培福朗对胚的损伤程度较小,胚成活率较高。该研究还对培养基添加培福

朗的浓度进一步筛选发现,培养基中培福朗添加量在 0.5~1.0 mg/L 时胚污染率可以控制在 9.0%以内、胚成活率在 92.3%以上,能够满足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控制的要求,为莲瓣兰杂交育种、种子原生地播种共生萌发胚培养及植株再生提供参考。

### 参考文献

- [1] David Du Puy, Phillip Gribb. The Genus *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] 李海峰, 赵志莲, 张海珠, 等. 珍稀濒危莲瓣兰杂交育种及种子原生地萌发的研究[J]. 西北植物学报, 2010, 30(3): 541-545.
- [4] 李海峰, 赵志莲, 张海珠, 等. 莲瓣兰原生地萌发胚培养真菌污染的控制[J]. 湖北农业科学, 2010, 45(2): 363-365.
- [5] 李海峰, 赵志莲, 张海珠, 等. 莲瓣兰原生地萌发胚培养真菌污染控制的优选[J]. 北方园艺, 2010(4): 129-131.
- [6] 何正春, 李春艳, 李海峰, 等. 杀菌剂对莲瓣兰种子原生地萌发胚培养中真菌污染控制的研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(4): 1721-1722.
- [7] 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.
- [8] 柯海丽, 宋希强, 谭志琼, 等. 兰科植物种子原地共生萌发技术及其应用前景[J]. 林业科学, 2007, 43(5): 126-128.
- [9] 李晓莺, 罗青, 张曦燕, 等. 杀菌剂对枸杞组织培养中真菌污染的控制作用[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(36): 15804-15841.
- [10] 李元海, 陈丽华, 徐恒莲, 等. 杀菌剂对莲瓣兰组织培养中真菌污染的控制作用[J]. 云南农业科技, 2006(3): 52.

## Research on Fungicide in the Culture of *Cymbidium tortisepalum*'s Germination Embryo *in situ*

LI Hai-feng<sup>1</sup>, ZHAO Zhi-lia<sup>2</sup>, HU Kan<sup>1</sup>, LI Ming<sup>1</sup>

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

**Abstract:** Using the seeding germination embryo of *Cymbidium tortisepalum*'s hybrid seeds *in situ* as explants, to observe the effects of different kinds, different concentration of fungicide on the control of fungus pollution during the process of culturing the germination embryo of *Cymbidium tortisepalum*'s hybrid seeds. The results showed that uazation, benomyl, mancozeb in medium could control fungus pollution in germination embryo of *Cymbidium tortisepalum*'s hybrid seeds *in situ*, by using uazatine, the fungus pollution percent of embryo was controlled within 10.0%, significantly greater than benomyl and mancozeb group. The survival ratio of embryo was 92.4%, the concentration ranges of uazatine were 0.5~1.0 mg/L. The fungus pollution percent of germination embryo of *Cymbidium tortisepalum*'s hybrid seeds *in situ* was controlled within 9.0%, the survival ratio of embryo remarkably higher than 92.3%, not only effectively controlled fungus pollution in the course of culturing germination embryo hybrid seeds of *Cymbidium tortisepalum in situ*, but also promoted embryo growth and transformed into rhizome.

**Key words:** *Cymbidium tortisepalum*; embryo culture; fungicide; fungus contamination