

贺州荸荠开放式组织培养体系建立

吴桂容, 曲芬霞, 余炳锋

(贺州学院 桂东特色资源开发与利用重点实验室, 广西 贺州 542800)

摘要:以“贺蹄一号”荸荠为外植体,研究了抵制剂种类和浓度、蔗糖浓度、有机成分和培养方式对贺州荸荠开放式组织培养的影响。结果表明:当次氯酸钠浓度为 1.0% 时,污染率最低,为 23.3%,平均诱导率高达 79.0%;蔗糖浓度为 2% 时,抑菌效果较好,污染率为 23.0%;有机成分去除甘氨酸时污染率最低,为 11.0%,诱导率达 80.7%;接种材料在培养室中培养,污染率低但诱导率高,分别为 14.0% 和 87.7%;但是改善玻璃温室的环境条件,从而降低污染率,是开放式组织培养的有效途径之一。

关键词:荸荠;开放式组织培养;污染率

中图分类号:S 632.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)06-0110-03

荸荠(*Eleocharis tuberosa*)为莎草科多年生水生草本植物,俗称马蹄、地栗,已有 3 000 余年栽培史。地下有匍匐茎,先端膨大为球茎,皮色紫黑,肉质洁白,味甜多

汁,清脆可口,其营养价值高,除含有丰富的水分、淀粉、蛋白质,还含有较高的钙、磷、铁、胡萝卜素、VB1、VB2、VC 等物质,其苗秧、根、果实均可入药。中医认为,荸荠性味甘寒,功效清热化痰、生津开胃、明目清音、消食醒酒^[1]。自古有“地下雪梨”之美誉,北方人视之为“江南人参”^[2],是大众喜爱的时令食品,是一种优良的药食兼用的保健型果蔬类食品。长期使用传统的种球繁育手段导致荸荠种性退化问题较为突出,近十几年来国内开展了关于荸荠组织培养技术的研究,采用茎尖分生组织培养技术获得荸荠脱毒组培苗^[3],是保持品种优良特性,

第一作者简介:吴桂容(1970-),女,在读博士,副教授,研究方向为植物繁育技术。E-mail: hzwgr510@163.com.

基金项目:广西技术与开发资助项目(桂科转 10191001-6);广西教育厅计划资助项目(201012MS209);贺州市科学研究与技术开发计划资助项目(贺科转 1012007N);贺州学院植物学重点建设学科资助项目(2011ZDJ SXK05)。

收稿日期:2012-12-11

[10] Li X Y, Huang F H, Gbur E F. Effect of basal medium, grow thregulators and phytagel concentration on initiation of embryogenic cultures from immature zygotic embryos of loblolly pine[J]. Plant Cell Reports, 1998, 17: 298-301.

[11] Ellis D D. Stabletrans form ation of Piceaglauca by particle accelerat ion [J]. Bio Technology, 1993, 11: 84-89.

[12] 翟晓巧, 翟翠娟, 刘新风. 木本植物体细胞胚胎发生及植株再生研究现状[J]. 河南林业科技, 2004, 24(2): 7-9.

[13] Becwar M R, Nagamani R, Wann S R. Initiation of embryogenic cultures and somati cembryo development in loblolly pine(*Pinus taeda*) [J]. Can J For Res, 1990, 20: 810-817.

Study on Induction of Embryogenic Tissue of *Platycladus orientalis*

CAO Ya-qiong, ZHANG Cun-xu

(College of Forestry, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: Taking the immature zygotic embryo and radicle of *Platycladus orientalis* as test materials, the effects of basic medium, different explants, plant hormones, zygotic embryo developmental stage in callus induction were studied. The results showed that immature zygotic embryo and radicle could induce on optimal medium. The optimal combination of medium for immature zygotic embryo was DCR+2.0 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L 6-BA+0.5 g/L glutamine, the inducing rate was 96.67%. The optimal combination of medium for radicle was DCR+1.0 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L 6-BA+0.5 g/L glutamine, the inducing rate was 93.33%. The best period of immature zygotic embryo sampling was around July 3.

Key words: *Platycladus orientalis*; embryogenic callus; immature zygotic embryo; radicle; initiation factors

防治秆枯病有效的措施,在生产上也取得了良好效果。但是在植物组织培养中,为提供苗木最为理想的无菌或接近无菌生长环境,必须采取适宜的方式降低污染,如对外植体进行适宜处理、培养基高温高压灭菌、接种室严格消毒、接种绝对规范化等防范措施,投入了大量的人力、物力和心血,即使如此,也会由于某个环节控制不当,致使整个育苗过程失败。这是因为培养基所含营养物全面,培养温度适宜,不仅适合培养物的生长,更适合杂菌的生长。植物开放式组织培养是在杀菌剂作用下,使植物组织培养脱离严格的无菌的操作环境,不需要高温高压灭菌和超净工作台,利用塑料杯代替培养瓶,克服植物组织培养过程中的污染问题,使培养过程简单化,从而达到简化操作过程,降低育苗成本的目的。植物开放式组织培养已在香蕉、魔芋等植物上取得了成功^[4-6],但却鲜见荸荠的相关报道。该试验对荸荠开放式组织培养进行研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为果实大小一致、生长健壮、茎芽饱满、由贺州学院自主培育的“贺蹄一号”荸荠^[5]。用刀片切取茎芽,放在自来水中浸泡,取其中一部分作为对照组,先用 75% 的酒精浸泡 30 s,再用 0.1% 的升汞消毒 5 min,接着用无菌水冲洗 5 次后,再用接种针剥除外层,取内部茎尖,接种在相应的培养基上(开放式培养接种在普通实验室台面上,而对照组接种在无菌室的超净工作台上)。

1.2 试验方法

以 MS 为基本培养基,琼脂粉为 3.5 g/L(国药集团化学试剂有限公司),添加 6-BA 3.0 mg/L + IBA 0.2 mg/L。处理组加入相应的抑制剂,溶解后分装入广口瓶中,并用塑料薄膜封口。对照组调节 pH 为 5.8;进行高温高压灭菌。

1.2.1 抑制剂种类 在培养基中,分别加入次氯酸钠(浓度为 0.1%、0.5% 和 1.0%);次氯酸钙(浓度为 1.0%、3.0% 和 5.0%);青霉素(浓度为 0.5、1.0 和 1.5 mg/L)。

1.2.2 蔗糖浓度 在 MS 培养中,分别添加 1%、2%、3% 和 4% 的蔗糖,比较污染率和诱导率。

1.2.3 有机成分 保留肌醇,在培养基中分别去除烟酸(IVB)、盐酸吡哆醇(VB6)、盐酸硫胺素(VB1)和甘氨酸(GLY),比较污染率和诱导率。

1.2.4 培养方式 分别在玻璃日光温室、塑料大棚和培养室进行比较试验。培养室温度控制在(23±2)℃,光照强度 2 000 lx 左右,光照时间为 12 h/d,玻璃日光温室和塑料大棚采用透光率 75% 遮荫网覆盖,每处理 20 瓶,3 次重复,培养周期为 30 d,分别调查污染率和诱导率。

1.3 项目测定

污染率 = (污染外植体数/接种总外植体数) × 100%;诱导率 = (诱导愈伤组织外植体数/存活总外植体数) × 100%。

2 结果与分析

2.1 抑制种类和浓度对荸荠污染率及诱导率的影响

在开放式组织培养中,抑制剂合理选用是决定成功与否的最关键步骤。由表 1 可以看出,3 种抑制剂随着浓度的增加,抑菌能力也逐渐增强,次氯酸钠浓度为 1.0% 时,平均污染率为 23.3%,平均诱导率为 79.0%,效果最为理想,而次氯酸钙和青霉素诱导率并没有随着污染率的降低而增加,而是当抑制剂浓度超过一定量时,诱导率反而呈下降趋势。次氯酸钙在浓度 5.0% 时,污染率最低,为 41.3%,但诱导率却在浓度为 3.0% 时最高,为 64.3%,青霉素在浓度为 1.0 mg/L 时,诱导率达 74.3%。

表 1 抑制剂种类和浓度对荸荠污染率及诱导率影响

种类	浓度	污染率/%			平均	诱导率/%			平均
		I	II	III		I	II	III	
次氯酸钠/%	0.1	83	85	86	84.7	12	14	15	13.7
	0.5	72	76	73	73.7	65	64	67	65.3
	1.0	23	25	22	23.3	80	78	79	79.0
次氯酸钙/%	1.0	76	73	74	74.3	11	9	8	9.3
	3.0	54	52	51	52.3	66	64	63	64.3
	5.0	43	40	41	41.3	43	42	41	42.0
青霉素 /mg·L ⁻¹	0.5	45	47	48	46.7	24	26	28	26.0
	1.0	25	25	23	24.3	76	72	75	74.3
	1.5	12	13	16	13.7	34	32	33	33.0
对照	0	10	11	14	11.7	93	93	94	93.3

2.2 蔗糖浓度对荸荠污染率及诱导率的影响

由表 2 可以看出,在荸荠开放式组织培养中,降低蔗糖浓度,可以有效的抑制微生物活性,当浓度从 1% 增加到 4% 时,污染也从 14.7% 增加到 85.7%。但是诱导率却以 2% 浓度时最高,为 55.7%,对照诱导率为 93.3%。

表 2 蔗糖浓度对荸荠污染率及诱导率影响

蔗糖/%	污染率/%			平均	诱导率/%			平均
	I	II	III		I	II	III	
1	15	16	13	14.7	34	33	35	34.0
2	20	24	25	23.0	56	55	56	55.7
3	87	86	84	85.7	18	19	20	19.0
4	80	83	85	82.7	45	47	44	45.3
对照	10	11	14	11.7	93	93	94	93.3

2.3 有机成分对荸荠污染率及诱导率的影响

在 MS 培养中,保留肌醇,分别去除其它 4 种有机成分,从表 3 可以看出,当培养基中缺乏甘氨酸(GLY)时,污染率最低,仅为 11.0%(甚至低于对照),诱导率高达 80.7%,其次是烟酸(IVB)时,污染率为 16.3%,诱导率为 77.0%,效果最差的为盐酸硫胺素(VB1),污染率 16.0%,诱导率仅为 64.3%。

表 3 有机成分对荸荠污染率及诱导率影响

有机成分	污染率/%			平均	诱导率/%			平均
	I	II	III		I	II	III	
IVB	15	16	18	16.3	78	76	77	77.0
VB6	18	19	17	18.0	70	78	74	74.0
VB1	15	17	16	16.0	60	66	67	64.3
GLY	12	11	10	11.0	81	79	82	80.7
对照	10	11	14	11.7	93	93	94	93.3

2.4 培养方式对荸荠污染率及诱导率的影响

把开放式组培接种后的培养物,分别使用不同的培养方式进行培养。由表4可以看出,在培养室培养,污染率低而诱导率高,分别为14.0%和87.7%,效果和对照相差不大;其次是在玻璃温室,平均污染率为45.7%,诱导率为62.0%,塑料温室效果最差,污染率为55.0%,诱导率仅为47.3%。

表4 培养方式对荸荠污染率及诱导率影响

培养方式	污染率/%				诱导率/%			
	I	II	III	平均	I	II	III	平均
玻璃温室	45	46	46	45.7	61	62	63	62.0
塑料温室	56	55	54	55.0	45	48	49	47.3
培养室	14	15	13	14.0	86	89	88	87.7
对照	10	11	14	11.7	93	93	94	93.3

3 讨论与结论

在植物开放式培养中,抑制剂合理使用可有效地抑制微生物活性,从而降低污染率。在该试验中,次氯酸钠和次氯酸钙均是利用氯离子来抑制微生物的活性,以1%次氯酸效果最为理想,此时污染率低而诱导率高,次氯酸钙效果最差,可能是过高的钙离子抑制了荸荠细胞增殖,对微生物抑制作用却不明显,具体机理有待进行深入细致的研究。青霉素可以有效的抑制或杀死细菌,从而降低污染率,使荸荠细胞生长在适宜的环境中,利于生长,诱导率提高,但是微生物易于产生耐药和抗性,一经去除,污染加剧。

碳源是一切生物能量和中间重要代谢产物的重要来源,过低不能满足生长繁殖需要,太高渗透压过高,生物无法生长,在荸荠组织开放式组织培养中,发现当蔗糖浓度为2%时污染率最低,诱导率却高,为55.7%。此时浓度不能满足微生物合成需要,因而降低了污染率,为荸荠的分裂增殖创造了较好的条件,后来在补充试验中,把蔗糖浓度增加到2.3%时,此时污染率为24.1%,但是诱导率却提高到83.9%。

有机成分在生物的生长发育过程中,虽然不能直接

提供能量,但是作为辅助因子,参加了生物体的新陈代谢活动,是所有生命不可或缺的重要营养成分。在该试验中,去掉有机成分后,抑菌效果非常显著,诱导率平均达到64.3%以上,当培养基中缺乏甘氨酸时,效果最佳,污染率11.0%,诱导率高达80.7%。效果相对较差的盐酸硫胺素(VB1),污染率也仅为16.0%,诱导率却为64.3%。可能是甘氨酸在生物活动中作用没有其它3种成分重要的缘故,但是其具体生理生化代谢过程,还需要进行下一步的试验研究。

迄今为止,关于植物开放式组织培养中,鲜见关于培养方式的报道。在荸荠的开放式组织培养过程中,尝试了培养方式对其污染率及诱导率的影响,因为只有在粗放经营模式下,才能更有效的降低育苗成本。但是无论在琉璃温室还是塑料温室,污染率均达到45.7%以上,

但琉璃温室的诱导率也可达到62.0%。在培养室,污染率为14.0%,诱导率为87.7%,与其适宜的环境条件密切相关。尽管在普通温室中培养,没有取得理想的效果,但从节约育苗成本来看,这必将是一条有效的途径,通过改善温室环境和其它辅助条件,也许会取得预期的效果。

参考文献

- [1] 潘丽. 荸荠杆枯病原学、侵染来源及品种抗性评价研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012: 1-2.
- [2] 林辉峰, 周辉明, 周建金, 等. 荸荠的组织培养和快速繁殖探讨[J]. 浙江农业科学, 2011(6): 38-40.
- [3] 吴桂容, 李忠芳, 邓年芳, 等. 马蹄组织培养中的外植体灭菌及培养基筛选研究[J]. 贺州学院学报, 2007(2): 126-127.
- [4] 解辉, 莫廷辉, 曾丽星. 次氯酸钠在香蕉开放式培养中应用研究[J]. 热带作物学报, 2011, 32(5): 886-890.
- [5] 赵青年, 陈永波, 滕建勋, 等. 开放式组织培养下魔芋快繁技术[J]. 现代农业科技, 2011(13): 114-115.
- [6] 崔刚, 单文修, 秦旭, 等. 葡萄开放式组织培养外植体体系建立[J]. 农业生物技术科学, 2011, 20(6): 36-38.

Establishment of *Eleocharis tuberosa* System of Open Tissue Culture in Hezhou

WU Gui-rong, QU Fen-xia, YU Bing-feng

(Province Key Construction Laboratory of Characteristic Resources Research and Development of Guangxi, Hezhou, Guangxi 542800)

Abstract: The 'Hetu No. 1' of *Eleocharis tuberosa* in Hezhou was used as explants, the effects of resist agent type and concentration, the concentration of sucrose, organic ingredients and effects of culture ways in Hezhou open tissue culture were studied. The results showed that hypochlorite sodium concentration for 1.0%, pollution rate was minimum, for 23.3%, average induced rate up to 79.0%; sucrose concentration for 2.0%, the effect was better, pollution rate for 23.0%; organic components removal ammonia acid was pollution minimum, for 11.0%, induced rate up 80.7%; in vaccination material in training in the culturing room, pollution rate were low and induced rate high, respectively for 14.0% and 87.7%, but if glass greenhouse of environment conditions was improved, thus reduced pollution rate, was one of the effective ways to open tissue culture.

Key words: *Eleocharis tuberosa*; open tissue culture; pollution rate