

降低软枣猕猴桃初代培养污染率的研究

孙书伟, 姚平, 宋洁, 周文杰 (辽东学院农学院, 辽宁丹东 118003)

摘要 [目的] 筛选降低软枣猕猴桃外植体初代培养污染率和提升外植体诱导率的处理方法。[方法] 采用半木质化的软枣猕猴桃新梢作为外植体, 根据外植体灭菌时间和氨苄青霉素培养基浓度差异组合, 分析降低软枣猕猴桃外植体初代培养污染率和提升外植体诱导率的因素, 筛选出最适宜的处理方法。[结果] 增加外植体 75% 乙醇灭菌时间至 10 s 可降低软枣猕猴桃初代培养污染率, 培养基中氨苄青霉素浓度为 100~150 mg/L 时, 软枣猕猴桃初代培养污染率随培养基中氨苄青霉素浓度的增加而降低。增加外植体灭菌时间和培养基中氨苄青霉素浓度均能增加软枣猕猴桃外植体诱导率。[结论] 污染率低且诱导率高的处理方法为 1/2MS + 100 mg/L 氨苄青霉素、1/2MS + 150 mg/L 氨苄青霉素、外植体 75% 乙醇灭菌 10 s + 0.1% 升汞灭菌 8 min 和外植体 75% 乙醇灭菌 10 s + 0.1% 升汞灭菌 10 min。

关键词 软枣猕猴桃; 污染率; 灭菌时间; 氨苄青霉素

中图分类号 S603.6 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)15-0087-02

Study on the Reduction of Contamination Rate of *Actinidia arguta* Planch. Primary Culture

SUN Shu-wei, YAO Ping, SONG Jie et al (College of Agriculture, Eastern Liaoning University, Dandong, Liaoning 118003)

Abstract [Objective] To screen the most suitable treatment for reducing *Actinidia arguta* primary culture contamination rate and increasing explant induction rate. [Method] Semi-woody shoots were used as explants to screen the most suitable treatment for reducing *A. arguta* primary culture contamination rate and increasing explant induction rate by combining sterilization time and ampicillin medium concentration. [Result] Increasing the sterilization time to 10 s could reduce the contamination rate of *A. arguta* primary culture, and the contamination rate of primary culture decreased with the increasing of ampicillin concentration during 100~150 mg/L. Increasing explant sterilization time and ampicillin concentration in culture medium could increase the induction rate of *A. arguta*. [Conclusion] 1/2MS + 100 mg/L ampicillin, 1/2MS + 150 mg/L ampicillin, explants were sterilized with 75% alcohol with 10 s + 0.1% mercuric chloride for 8 min and explants 75% alcohol sterilization 10 s + 0.1% mercury chloride sterilization 10 min are the suitable methods with low contamination rate and high induction rate.

Key words *Actinidia arguta* Planch.; Contamination rate; Sterilization time; Ampicillin

软枣猕猴桃属于猕猴桃科(Actinidiaceae)猕猴桃属(*Actinidia*)野生藤本果树。软枣猕猴桃拥有丰富的营养和药用价值^[1], 其果实维生素含量极高, 故有“V_c-之王”之称。软枣猕猴桃是雌雄异株藤本植物, 常用繁殖方式有扦插、嫁接等, 但繁殖速度慢, 扦插繁殖成活率低, 容易使植株带菌, 长期进行常规繁殖会造成品种退化^[2-3]。为获得优良品种, 对软枣猕猴桃良种进行离体快繁, 但获得无菌的初代苗比较困难, 灭菌时间不同, 其成活率不同。

20世纪70年代至今, 国内外很多学者对软枣猕猴桃组织培养进行了研究, 虽然培养过程中获得无菌初代培养苗方面有过一些报道, 但结果不尽一致。潘菊等^[4]先用洗衣粉水浸泡树莓枝段 10 min 后, 用自来水冲洗干净; 在超净工作台上用 70% 乙醇浸泡 30 s, 0.1% 升汞溶液消毒 8 min, 无菌水冲洗 5 次获得无菌初代苗。尤淑丽等^[5]在无菌条件下, 将红树莓茎段放入 70% 乙醇浸泡 30 s, 0.1% 升汞溶液消毒 4 min, 无菌水冲洗 4~6 次获得无菌初代苗。刘长春等^[6]将自来水冲洗过的软枣猕猴桃外植体, 用 0.2% 的洗衣粉溶液洗涤 10~12 min, 0.1% 升汞消毒灭菌 8~10 min, 无菌水冲洗接种于诱导培养基中, 结果发现此方法处理灭菌效果明显, 污染率降低, 很快得到初代培养物。田永亮等^[7]将四环素和青霉素以 20 mg/L 或 40 mg/L 的浓度加入葡萄培养基中, 对抑制污染有一定作用, 对葡萄萌芽和生长无不良影响。Bistrichanov 等^[8]在大绣球离体培养时发现, 10 mg/L 阿霉素可有效

控制细菌污染, 对培养物生长不发生抑制作用。随着软枣猕猴桃产业的迅速发展, 对优良苗木的需求量也日渐增加。而软枣猕猴桃组织培养存在初代培养污染率极高的问题, 大大降低了组培苗繁殖速率, 因此降低软枣猕猴桃初代培养污染率具有重要意义。笔者从外植体灭菌时间和抗生素培养基 2 个方面设计试验, 旨在筛选出降低软枣猕猴桃初代培养污染率的有效处理方法, 为工厂化育苗提供可行性理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料 以辽东学院小浆果研究所软枣猕猴桃资源圃提供的半木质化的软枣猕猴桃新梢作为外植体进行试验。

1.2 试验设计 从外植体灭菌时间和培养基中添加抗生素浓度 2 个方面设计试验, 试验一: 取半木质化新梢作为外植体, 1/2MS 为基础培养基, 以 75% 乙醇灭菌 8 s + 0.1% 升汞灭菌 8 min 为对照, 记为 CK, 设置以下 3 种不同灭菌时间的处理: ①75% 乙醇灭菌 8 s + 0.1% 升汞灭菌 10 min, 记为 T₁; ②75% 乙醇灭菌 10 s + 0.1% 升汞灭菌 8 min, 记为 T₂; ③75% 乙醇灭菌 10 s + 0.1% 升汞灭菌 10 min, 记为 T₃。试验二: 取半木质化新梢作为外植体, 75% 乙醇灭菌 8 s + 0.1% 升汞灭菌 8 min, 以 1/2MS 为基础培养基不添加氨苄青霉素为对照, 记为 CK, 添加 50 mg/L 氨苄青霉素为 T₄, 添加 100 mg/L 氨苄青霉素为 T₅, 添加 150 mg/L 氨苄青霉素为 T₆。

1.3 试验方法 按常规方法配制 1/2MS 固体培养基, 按试验设计每个处理 40 个培养瓶, 每瓶 20 mL 培养基, 121 °C 灭菌 20 min, 放入超净工作台中, 其中 120 瓶冷却至 60 °C 左右, 加入氨苄青霉素稀释液, 使抗生素终浓度分别为 50、100、150 mg/L。按试验设计对外植体表面进行处理消毒、接种, 25 °C, 2 000 lx 光照条件下培养, 15 d 后目测并统计外植体污

基金项目 辽东学院农业攻关项目(2016YY013)。**作者简介** 孙书伟(1970—), 女, 满族, 辽宁鞍山人, 高级实验师, 从事生物技术与生物工程研究。**收稿日期** 2018-01-19

染和诱导情况。

1.4 接种培养和数据统计 利用 DPS7.55 数据处理软件进行数据统计, Duncan's 多重比较 ($P = 0.05$) 进行显著性分析, Excel 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 不同处理对软枣猕猴桃初代培养污染率的影响 软枣猕猴桃外植体接种 15 d 后, 检测不同灭菌时间对软枣猕猴桃初代培养污染率的影响。由表 1 可知, CK 污染率最高, 约为 54.33%。T₁ 处理与 CK 污染率无显著差异。T₂ 和 T₃ 处理显著降低了软枣猕猴桃初代培养污染率, 与 CK 相比分别降低了 23.30% 和 17.17%。即 75% 乙醇灭菌 10 s 较 8 s 的处理初代培养污染率显著降低, 而 0.1% 升汞灭菌 8 min 与 10 min 无显著差异。

表 1 不同灭菌时间对软枣猕猴桃初代培养污染率和外植体诱导率的影响

Table 1 The effect of different sterilization time on the contamination rate of *Actinidia arguta* primary culture and induction rate of explant %

处理 Treatment	污染率 Contamination rate	诱导率 Induction rate
CK	54.33 ± 5.69 a	30.00 ± 2.00 c
T ₁	47.33 ± 3.21 ab	36.33 ± 1.53 b
T ₂	41.67 ± 4.93 b	43.33 ± 1.15 a
T ₃	45.00 ± 2.00 b	46.33 ± 2.52 a

注: 不同小写字母表示不同处理在 0.05 水平上差异显著

Note: Values labeled with different lowercase letters are significantly different at 0.05 level in different treatments

软枣猕猴桃外植体接种 15 d 后, 检测不同浓度氨苄青霉素对软枣猕猴桃初代培养污染率的影响。由表 2 可知, T₄ 处理与 CK 污染率无显著差异, 而 T₅ 和 T₆ 处理显著降低了软枣猕猴桃初代培养的污染率。即添加 50 mg/L 氨苄青霉素对软枣猕猴桃初代培养污染率无显著影响, 添加 100 mg/L 和 150 mg/L 氨苄青霉素显著降低了软枣猕猴桃初代培养污染率, 且污染率随着氨苄青霉素浓度升高而降低。添加 150 mg/L 氨苄青霉素效果最佳, 与 CK 相比初代污染率降低了 34.97%。

2.2 不同处理对软枣猕猴桃外植体诱导率的影响 软枣猕猴桃外植体接种 15 d 后, 检测不同灭菌时间对软枣猕猴桃外植体诱导成功率影响。由表 1 可知, CK 成功率最低, 约为 30.00%。T₁、T₂ 和 T₃ 处理显著增加了软枣猕猴桃外植体诱导成功率, 与 CK 相比分别增加 21.10%、44.43% 和 54.43%。即外植体进行 75% 乙醇灭菌 10 s 的处理效果最好, 而 0.1% 升汞灭菌 8 min 与 10 min 无显著差异。

表 2 不同浓度氨苄青霉素对软枣猕猴桃初代培养污染率和外植体诱导率的影响

Table 2 The effect of different ampicillin concentrations on the contamination rate of *Actinidia arguta* primary culture and induction rate of explant %

处理 Treatment	污染率 Contamination rate	诱导率 Induction rate
CK	54.33 ± 5.69 a	30.00 ± 2.00 b
T ₄	49.67 ± 2.08 ab	49.67 ± 4.73 a
T ₅	44.33 ± 2.08 b	53.67 ± 4.04 a
T ₆	35.33 ± 2.31 c	53.33 ± 3.51 a

注: 不同小写字母表示不同处理在 0.05 水平上差异显著

Note: Values labeled with different lowercase letters are significantly different at 0.05 level in different treatments

软枣猕猴桃外植体接种 15 d 后, 检测不同浓度氨苄青霉素对软枣猕猴桃外植体诱导成功率的影响。由表 2 可知, T₄、T₅ 和 T₆ 处理显著增加了软枣猕猴桃外植体诱导成功率, 与 CK 相比分别增加了 65.57%、78.90% 和 77.77%。即添加不同浓度氨苄青霉素显著增加了软枣猕猴桃外植体诱导成功率, 氨苄青霉素浓度在 50 ~ 150 mg/L 时, 软枣猕猴桃外植体诱导成功率无显著差异。

3 结论

综上所述, 增加外植体 75% 乙醇灭菌时间至 10 s 可降低软枣猕猴桃初代培养污染率, 培养基中氨苄青霉素浓度为 100 ~ 150 mg/L 时, 软枣猕猴桃初代培养污染率随培养基中氨苄青霉素浓度的增加而降低。6 个处理均能增加软枣猕猴桃外植体诱导成功率。其中污染率低且诱导率高的处理方法为 1/2MS + 100 mg/L 氨苄青霉素、1/2MS + 150 mg/L 氨苄青霉素、外植体 75% 乙醇灭菌 10 s + 0.1% 升汞灭菌 8 min 和外植体 75% 乙醇灭菌 10 s + 0.1% 升汞灭菌 10 min。

参考文献

- [1] 陈东虹. 猕猴桃的药理活性研究进展[J]. 广东药学院学报, 2002, 18(3): 231-233.
- [2] 文国琴, 何震. 红阳猕猴桃茎段愈伤组织诱导成苗技术[J]. 福建林业科技, 2004, 31(4): 78-79.
- [3] BAKER F W G. 速生树种的快速繁殖[M]. 沈惠娟, 译. 北京: 中国农业出版社, 1994.
- [4] 潘菊, 杨双. 双季树莓的组织培养及快速繁殖[J]. 北方园艺, 2012(21): 105-106.
- [5] 尤淑丽, 王海新, 苏君伟, 等. 红树莓工厂化繁育技术体系研究[J]. 北方园艺, 2010(17): 161-164.
- [6] 刘长春, 陈泽雄, 龚雪芹, 等. 金富猕猴桃离体培养与植株再生的优化研究[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2007, 32(5): 124-128.
- [7] 田永亮, 张文, 张国珍, 等. 两种抗生素对葡萄组培中污染菌的抑制作用[J]. 北方园艺, 2005(5): 84-85.
- [8] BISTRICHANOV S, HARALAMPIEVA V, KALOYANOVA N. Testing of different types of antibiotics against bacterial contamination in *Hydrangea hortensis in vitro* [J]. Bulgarian journal of agricultural science, 1997, 3(6): 749-753.

科技论文写作规范——结果

利用图、表及文字进行合乎逻辑的分析。务求精练通顺。不需在文字上重复图或表中所具有的数据, 只需强调或阐述其重要发现及趋势。