



研究报告

Research Report

秋石斛侧芽外植体消毒方法的研究

杨光穗[✉], 陆顺教[✉], 易双双[✉], 任羽[✉], 尹俊梅[✉], 冷青云[✉]

中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/农业部华南作物基因资源与种质创制重点开放实验室, 儋州, 571737

[✉] 通讯作者: suiguangyang@aliyun.com; [✉] 作者

植物药与药理学杂志, 2014 年, 第 3 卷, 第 6 篇

收稿日期: 2012 年 06 月 10 日

接受日期: 2012 年 06 月 17 日

发表日期: 2014 年 06 月 28 日

本文首次发表在《基因组学与应用生物学》(2014, Vol.3, No.3)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

杨光穗等, 2014, 秋石斛侧芽外植体消毒方法的研究, 基因组学与应用生物学, 33 (3): 674-681 (doi: [10.13417/j.gab.033.000674](https://doi.org/10.13417/j.gab.033.000674))

引用格式(英文):

Yang et al., 2014, Research on Explants Disinfection of Dendrobium hybrida Lateral Buds, Genomics and Applied Biology, 33 (3): 674-681 (doi: [10.13417/j.gab.033.000674](https://doi.org/10.13417/j.gab.033.000674))

摘要 以秋石斛栽培品种‘088’新生侧芽为外植体, 研究了 2%次氯酸钠(2% NaClO)和 0.1%升汞(0.1% HgCl₂)单独消毒和组合消毒对秋石斛侧芽茎尖、中部茎段和基部茎段的消毒效果, 探索适合秋石斛侧芽消毒的有效方法。实验结果表明: (1) 0.1% HgCl₂ 对秋石斛侧芽消毒污染率低、存活率高, 效果比 2% NaClO 好, 2% NaClO+0.1% HgCl₂ 组合消毒效果优于单独使用一种消毒剂消毒; (2) 秋石斛侧芽茎尖、中部茎段和基部茎段的最佳消毒方式分别为: 2% NaClO 浸泡 10 min+0.1% HgCl₂ 浸泡 6 min、2% NaClO 浸泡 10 min+0.1% HgCl₂ 浸泡 8 min 和 2% NaClO 浸泡 10 min+0.1% HgCl₂ 浸泡 10 min。

关键词 秋石斛, 侧芽, 组织培养, 消毒

Research on Explants Disinfection of Dendrobium hybrida Lateral Buds

Yang Guangsui[✉], Lu Shunjiao[✉], Yi Shuangshuang[✉], Ren Yu[✉], Yin Junmei[✉], Leng Qingyun[✉]

Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/ Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China, Danzhou, 571737

[✉] Corresponding author, suiguangyang@aliyun.com; [✉] Authors

Abstract Used new lateral buds of Dendrobium hybrida cultivar ‘088’ as explants, the disinfection effect of 2% NaClO and 0.1% HgCl₂ alone and in combination disinfection for stem tip, middle stem and basal stem of Dendrobium hybrida lateral buds was analyzed, and to explored the effective explants disinfection method for Dendrobium hybrida lateral buds. The research result showed that: (1) 0.1% HgCl₂ had better explants disinfection effect for Dendrobium hybrida lateral buds than 2% NaClO, and the in combination disinfection effect was better than alone disinfection. (2) The best disinfection method for stem tip, middle stem and basal stem of Dendrobium hybrida lateral buds was 2% NaClO immersed 10 min+0.1% HgCl₂ immersed 6 min, 2% NaClO immersed 10 min+0.1% HgCl₂ immersed 8min and 2% NaClO immersed 10 min+0.1% HgCl₂ immersed 10min, respectively.

Keywords Dendrobium hybrida, Lateral bud, Tissue culture, Disinfection

石斛兰是兰科石斛属(Dendrobium)多年生草本植物, 与卡特兰、文心兰、蝴蝶兰并称四大观赏兰花。依开花时间可以把石斛兰分为春石斛秋石斛, 春石斛于春季开花, 花生于假鳞茎节上, 每节开花 3~4 朵, 花期 3~4 周, 主要用作盆花观赏。秋石斛一般于秋季开花, 花多生于茎顶端, 花期长达一个多月, 不仅是兰科中重要的切花种类, 也是重要的观赏盆花, 在兰花的商业生产中具有重要的地位。但是目前栽培的商业品种多为杂交一代, 通过种子繁殖无法得到与亲代性状一致的植株。而通过分株繁殖不仅速度慢, 而且易导致病毒的积累和传播, 造成观赏品质的下降。因此, 组织培养是提高秋石斛种苗繁育效率的有效途径。而外植体消毒是组织培养繁殖方式最重要的环节之一, 秋石斛的外植体一般是取自基部萌发的侧芽或高位芽, 但是两种部位的芽由于特性不一样, 消毒起来均比较困难, 基部萌发的侧芽数量较多, 较容易采集, 且比较粗壮, 消毒不易致死, 但由于植株基部靠近栽培基质, 细菌较多, 内生菌的污染比较严重, 消毒比较困难; 而高位芽不易受内生菌感染, 但较瘦弱, 消毒容易致死。因此秋石斛消毒是限制其组织培养的重要因素, 直接影响了秋石斛组织培养的效率。针对这些问题, 本研究开展了 2%次氯酸钠+0.1%升汞(2% NaClO+0.1% HgCl₂)不同消毒时间组合对秋石斛基部萌发侧芽的消毒研究, 探索适合秋石斛侧芽的消毒方式, 为提高秋石斛的组织培养效率提供技术保证。

1 结果与分析



1.1 2% NaClO 对秋石斛侧芽的消毒效果

由表 1 看出, 2% NaClO 对秋石斛侧芽茎尖的消毒效果较差, 污染率虽随着消毒时间的增加而降低, 但在 30 min 时, 仍有 62.22% 的污染率, 存活率随着消毒时间的延长而逐渐升高, 在 30 min 时达到最高, 但仅有 23.33%。2% NaClO 对秋石斛侧芽中部茎段的消毒在 5 min 和 10 min 时全部污染, 在 15~30 min 时, 随着时间的延长, 污染率逐渐下降, 30 min 的污染率为 76.67%, 2% NaClO 对外植体伤害较小, 在消毒 5~20 min 时未有外植体死亡, 25 min 和 30 min 的死亡率分别是 4.44% 和 11.11%, 因此, 虽然消毒 20 min 污染率较高, 但由于无外植体死亡, 因此存活率最高, 为 16.67%。2% NaClO 对侧芽基部茎段消毒效果很差, 消毒 30 min 的污染率高达 78.89%, 而存活率最高仅为 16.67%。综合以上结果发现, 虽然外植体死亡率较低, 但是污染率高, 外植体存活率低, 因此 2% NaClO 不适合秋石斛侧芽外植体的消毒。

1.2 0.1% HgCl₂ 对秋石斛侧芽消毒的影响

由表 2 看出, 0.1% HgCl₂ 对秋石斛侧芽 3 个部位外植体进行消毒, 其污染率随着消毒时间的延长而逐渐下降, 而死亡率均随着消毒时间的延长而逐渐上升, 外植体的存活率则呈现先上升后下降的趋势。

侧芽茎尖在消毒 14 min 时, 污染率由 2 min 的 85.56% 降到了 0%, 但死亡率也由 0% 上升到了 64.44%, 在 16 min 时, 死亡率达到了 81.11%。在 2 min 时, 侧芽茎尖存活率为 14.44%, 之后随着消毒时间的增加而逐渐上升, 在 8 min 时达到最高的 61.11%, 之后随着时间的增加逐渐下降, 在 16 min 时仅有不足 20% (18.89%)。侧芽中部、基部茎段在污染率、死亡率和存活率上和侧芽茎尖随消毒时间的变化趋势是一致的, 不同的是, 侧芽中部和基部茎段在消毒 16 min 时仍有少量的污染(污染率分别是 5.56% 和 12.22%), 且死亡率均比相同消毒时间的侧芽茎尖要低。在存活率上, 侧芽中部茎段在 10 min 时达到最高的 57.78%, 而侧芽基部茎段则在 12 min 时达到最高(51.11%)。

表 1 2% NaClO 对秋石斛侧芽的消毒效果

Table 1 The explants disinfection effect of 2% NaClO for *Dendrobium hybrida* lateral bud

外植体类型 Explants type	时间(min) Time (min)	污染率(%) Contamination rate (%)	死亡率(%) Mortality (%)	存活率(%) Survival rate (%)
茎尖 Stem tip	0	100	0	0
	5	100	0	0
	10	92.22	0	7.78
	15	85.56	0	14.44
	20	74.44	5.56	20
	25	68.89	10	21.11
	30	62.22	14.44	23.33
中部茎段 Middle stem	0	100	0	0
	5	100	0	0
	10	100	0	0
	15	95.56	0	4.44
	20	83.33	0	16.67
	25	81.11	4.44	14.44
	30	76.67	11.11	12.22
基部茎段 Basal stem	0	100	0	0
	5	100	0	0
	10	100	0	0
	15	100	0	0
	20	96.67	0	3.33
	25	90	2.22	7.78
	30	78.89	4.44	16.67

1.3 2% NaClO+0.1% HgCl₂ 组合对秋石斛侧芽的消毒效果



1.3.1 2% NaClO +0.1% HgCl₂ 组合对秋石斛侧芽茎尖的消毒效果

由表 3 看出, 2% NaClO+0.1% HgCl₂ 组合对秋石斛侧芽茎尖进行消毒, 污染率随着消毒时间的增加而逐渐下降, 死亡率则明显上升, 存活率在 2% NaClO 消毒 20 min 以前, 随着 0.1% HgCl₂ 消毒时间的增加呈现先升后降的趋势, 在 2% NaClO 消毒 25 min 和 30 min 时则随着 0.1% HgCl₂ 消毒时间的增加而逐渐下降。在 2% NaClO+0.1% HgCl₂ 组合消毒为(5+6) min 和(10+6) min 时, 污染率和死亡率分别为 18.89%、14.44% 和 12.22%、18.89%, 均较低, 存活率分别达到 66.67%和 68.89%, 因此这两个组合适合秋石斛侧芽茎尖消毒。

表 2 0.1% HgCl₂ 对秋石斛侧芽的消毒效果

Table 2 The explants disinfection effect of 0.1% HgCl₂ for *Dendrobium hybrida* lateral bud

外植体类型 Explants type	时间(min) Time (min)	污染率(%) Contamination rate (%)	死亡率(%) Mortality (%)	存活率(%) Survival rate (%)
茎尖 Stem tip	0	100	0	0
	2	85.56	0	14.44
	4	72.22	0	27.78
	6	42.22	11.11	46.67
	8	25.56	13.33	61.11
	10	15.56	26.67	57.78
	12	8.89	45.56	45.56
	14	0	64.44	35.56
	16	0	81.11	18.89
	中部茎段 Middle stem	0	100	0
2		90	0	10
4		83.33	0	16.67
6		62.22	3.33	34.44
8		45.56	12.22	41.11
10		38.89	14.44	57.78
12		23.33	25.56	51.11
14		11.11	62.22	26.67
基部茎段 Basal stem	16	5.56	70	24.44
	0	100	0	0
	2	100	0	0
	4	86.67	0	13.33
	6	67.78	0	32.22
	8	57.78	6.67	35.56
	10	47.78	7.78	44.44
	12	34.44	14.44	51.11
14	22.22	40	37.78	
16	12.22	57.78	30	

1.3.2 2% NaClO+0.1% HgCl₂ 组合对秋石斛侧芽中部茎段的消毒效果

从表4看出, 2% NaClO+0.1% HgCl₂组合对秋石斛侧芽中部茎段进行消毒, 污染率随着消毒时间的延长逐渐下降, 2% NaClO消毒15 min、20 min、25 min和30 min时, 污染率分别在0.1% HgCl₂消毒10 min、8 min、6 和6 min时降到0%。外植体死亡率则逐渐上升, 2% NaClO 消毒30 min+0.1% HgCl₂消毒12 min时, 死亡率达到 100%。2% NaClO消毒5 min、10 min和15 min时, 外植体存活率随着0.1% HgCl₂消毒时间的延长先上升, 在8



min达到最大值, 分别为60.00%、64.44%和61.11%, 之后逐渐下降。2% NaClO消毒20 min时, 外植体存活率亦随0.1% HgCl₂消毒时间的延长先上升, 但在4 min时就达到最大值55.56%, 之后逐渐下降。2% NaClO 消毒25 min和30 min时, 存活率随0.1% HgCl₂消毒时间的延长逐渐下降, 0.1% HgCl₂消毒12 min时, 存活率分别为3.33%和0%。因此, 2% NaClO 10 min+0.1% HgCl₂ 8 min适合于秋石斛侧芽中部茎段的消毒。

表 3 2% NaClO+0.1% HgCl₂ 组合对秋石斛侧芽茎尖的消毒效果

Table 3 The explants disinfection effect of 2% NaClO+0.1% HgCl₂ combination for stem tip of *Dendrobium hybrida* lateral bud

2%次氯酸钠(min) 2%NaClO (min)	0.1%升汞(min) HgCl ₂ (min)	污染率(%) Contamination rate (%)	死亡率(%) Mortality (%)	存活率(%) Survival rate (%)
5	2	76.67	5.56	17.78
	4	61.11	6.67	32.22
	6	18.89	14.44	66.67
	8	14.44	24.44	61.11
	10	7.78	42.22	50
	12	2.22	63.33	34.44
10	2	67.78	7.78	24.44
	4	54.44	12.22	33.33
	6	12.22	18.89	68.89
	8	7.78	34.44	57.78
	10	3.33	52.22	44.44
	12	1.11	67.78	31.11
15	2	60	10	30
	4	35.56	17.78	46.67
	6	8.89	31.11	60
	8	0	45.56	54.44
	10	0	70	30
	12	0	78.89	21.11
20	2	40	15.56	44.44
	4	12.22	30	57.78
	6	6.67	45.56	47.78
	8	0	70	30
	10	0	84.44	15.56
	12	0	90	10
25	2	12.22	36.67	51.11
	4	5.56	50	44.44
	6	0	71.11	28.89
	8	0	88.89	11.11
	10	0	94.44	5.56
	12	0	100	0
30	2	10	50	40
	4	2.22	58.89	38.89
	6	0	80	20
	8	0	97.78	2.22
	10	0	100	0
	12	0	100	0



表 4 2% NaClO+0.1% HgCl₂ 组合对秋石斛侧芽中部茎段的消毒效果

Table4 The explants disinfection effect of 2% NaClO+0.1% HgCl₂ combination for middle stem of Dendrobium hybrida lateral bud

2%次氯酸钠(min) 2%NaClO (min)	0.1%升汞(min) HgCl ₂ (min)	污染率(%) Contamination rate (%)	死亡率(%) Mortality (%)	存活率(%) Survival rate (%)
5	2	85.56	2.22	12.22
	4	70	4.44	25.56
	6	48.89	13.33	37.78
	8	23.33	16.67	60
	10	16.67	28.89	54.44
	12	8.89	47.78	43.33
10	2	74.44	6.67	18.89
	4	58.89	6.67	34.44
	6	32.22	14.44	53.33
	8	14.44	21.11	64.44
	10	5.56	42.22	52.22
	12	2.22	54.44	43.33
15	2	65.56	7.78	26.67
	4	48.89	15.56	35.56
	6	18.89	20	61.11
	8	2.22	41.11	56.67
	10	0	57.78	42.22
	12	0	68.89	31.11
20	2	47.78	11.11	41.11
	4	25.56	18.89	55.56
	6	15.56	30	54.44
	8	0	56.67	43.33
	10	0	74.44	25.56
	12	0	81.11	18.89
25	2	21.11	26.67	52.22
	4	12.22	40	47.78
	6	0	56.67	43.33
	8	0	80	20
	10	0	87.78	12.22
	12	0	96.67	3.33
30	2	14.44	37.78	47.78
	4	5.56	50	44.44
	6	0	70	30
	8	0	92.22	7.78
	10	0	96.67	3.33
	12	0	100	0

1.3.3 2% NaClO+0.1% HgCl₂ 组合对秋石斛侧芽基部茎段的消毒效果

从表5看出, 2% NaClO+0.1% HgCl₂组合对秋石斛侧芽基部茎段进行消毒, 污染率随着消毒时间的延长逐渐下降, 在2% NaClO消毒15 min、20 min、25 min和30 min时, 污染率分别在0.1% HgCl₂消毒12 min、8 min、6和6 min时降到0%。外植体死亡率在各个2% NaClO消毒时间下均随着0.1% HgCl₂消毒时间的延长而逐渐上升。而存活率与侧芽中部茎段的变化趋势相似, 在2% NaClO 10 min+0.1% HgCl₂ 10 min时获得最高的存活率, 达到67.78%。



表 5 2% NaClO+0.1% HgCl₂ 组合对秋石斛侧芽基部茎段的消毒效果

Table 5 The explants disinfection effect of 2% NaClO+0.1% HgCl₂ combination for basal stem of *Dendrobium hybrida* lateral bud

2% 次氯酸钠(min) 2% NaClO (min)	0.1% 升汞(min) HgCl ₂ (min)	污染率(%) Contamination rate (%)	死亡率(%) Mortality (%)	存活率(%) Survival rate (%)
5	2	92.22	0	7.78
	4	84.44	3.33	21.11
	6	57.78	8.89	33.33
	8	35.56	12.22	52.22
	10	18.89	20	61.11
	12	12.22	41.11	46.67
10	2	81.11	4.44	14.44
	4	67.78	5.56	26.67
	6	45.56	10	44.44
	8	30	12.22	57.78
	10	17.78	14.44	67.78
	12	8.89	30	61.11
15	2	72.22	6.67	21.11
	4	58.89	14.44	26.67
	6	30	16.67	53.33
	8	15.56	25.56	58.89
	10	1.11	47.78	51.11
	12	0	63.33	36.67
20	2	56.67	10	33.33
	4	34.44	13.33	52.22
	6	18.89	25.56	55.56
	8	0	41.11	47.78
	10	0	56.67	43.33
	12	0	71.11	28.89
25	2	26.67	20	53.33
	4	18.89	28.89	52.22
	6	0	51.11	48.89
	8	0	70	30
	10	0	83.33	16.67
	12	0	92.22	7.78
30	2	26.67	26.67	46.67
	4	13.33	41.11	45.56
	6	0	63.33	36.67
	8	0	86.67	13.33
	10	0	92.22	7.78
	12	0	97.78	2.22

2 讨论

植物组织培养过程中, 无菌体系的建立是组织培养的关键, 而采自大田的实验材料极易粘附细菌和真菌等, 建立无菌体系时不易消毒, 因此, 必须根据材料幼嫩程度、材料类型等来决定消毒方式和消毒时间(Leifert et al., 1994)。秋石斛生长属热带地区植物, 常年高温多雨, 空气湿度大, 在茎叶表面滋生大量的微生物, 并附着大量的霉菌孢子和细菌芽孢, 甚至一些菌丝体侵入表皮内的薄壁组织形成大量的内生菌, 给外植体消毒造成很大的困难(陈少珍等, 2006)。本研究首次将秋石斛新生侧芽按照幼嫩程度分为茎尖、中部茎段和基部茎段 3 个部分来展开消毒试验, 结果表明秋石斛新生侧芽茎尖、中部茎段和基部茎段虽然来自同一个侧芽, 但是由于幼嫩程度不一样, 能承受的消毒剂伤害和携带的内生菌程度不一样, 因此同一种消毒剂的最佳消毒时间也明显不



一样。刘海龙等(2010)在研究油茶茎段的灭菌方法时, 无木质化、木质化带腋芽茎段以及不带腋芽新萌条幼嫩顶梢和顶梢下部无木质化茎段的 0.1% HgCl₂ 最佳消毒时间也是不一样的。周婧等(2011)在研究红腺忍冬外植体灭菌时发现木质化程度不同的带腋芽茎段在 0.1% HgCl₂ 灭菌 14 min 时平均污染率、平均死亡率和芽平均诱导率均有明显差异。

不同的消毒剂对外植体的灭菌效果和伤害程度是不同的, HgCl₂ 虽然对外植体的伤害较大, 但是灭菌效果明显优于 NaClO, 如胡琦敏等(2013)在研究马槟榔组培快繁技术时发现, 0.1% 升汞对马槟榔外植体灭菌效果比 10% 次氯酸钠更理想; 汪腾越等(2012)在进行土沉香组织培养外植体消毒方法的研究时发现, 0.1% HgCl₂ 比 10% NaClO 消毒效果好; 李瑞梅等(2009)研究热带作物木薯幼嫩茎段的消毒方法时表明 0.1% HgCl₂ 的消毒效果优于 10% NaClO。本研究表明, 2% NaClO 消毒的污染率高, 而 0.1% HgCl₂ 虽然对外植体的伤害较大, 但是在合适的消毒时间范围内可以获得较高的外植体成活率, 与前面的研究结果相一致。

针对消毒困难的外植体, 单独使用一种消毒剂消毒, 污染率比较高, 达不到理想的消毒效果。而多种消毒剂的配合使用已经在多种植物外植体的消毒实验中获得成功, 如姚娜和赖志强(2010)在研究象草腋芽的外植体消毒中发现象草腋芽外植体最佳消毒措施为: 自来水冲洗 60 min+0.1% HgCl₂ 消毒 25 min+2% NaClO 消毒 20 min, 该措施的污染率最低且成功率最高; 蔡坤秀等(2010)在进行叶底红叶片外植体消毒方法的筛选的时候发现最佳灭菌措施为: 自来水冲洗 60 min+0.1% 升汞浸泡 25 min+次氯酸钠 20 min; 韩佳宇等(2012)对石栗树腋芽外植体消毒的研究表明最佳消毒组合为: 自来水冲洗 120 min+0.1% HgCl₂ 消毒 16 min +10% NaClO 消毒 24 min, 这种消毒组合的污染率降到最低的 16.67%, 而愈伤组织诱导成功率却高达 80.00%; 陶兴魁等(2013)在研究蓝莓外植体消毒方法时发现, 外植体经 70% 酒精 30 s+2% NaClO 10 min+0.1% HgCl₂ 10 min 的污染率最低, 成活率最高。以上组合方法的使用虽然取得了很好的研究结果, 但是由于设计的消毒时间梯度比较少, 时间间隔比较大, 不能准确的体现最佳的效果组合, 本研究参考以上研究, 将消毒时间梯度增加, 缩短消毒时间间隔, 展开 2% NaClO+0.1% HgCl₂ 对秋石斛侧芽茎尖、中部茎段和基部茎段的消毒效果。研究结果表明: (1) 2% NaClO 浸泡 10 min+0.1% HgCl₂ 浸泡 6 min 对侧芽茎尖的消毒效果最好, 污染率仅为 12.22%, 而存活率达到 68.89%; (2) 2% NaClO 浸泡 10 min+0.1% HgCl₂ 浸泡 8 min 对侧芽中部茎段的消毒效果最好, 污染率仅为 14.44%, 而存活率达到 64.44%; (3) 2% NaClO 浸泡 10 min +0.1% HgCl₂ 溶液浸泡 10 min 对侧芽基部茎段的消毒效果最好, 污染率仅为 17.78%, 而存活率达到 67.78%。研究结果表明 2% NaClO+0.1% HgCl₂ 组合对秋石斛侧芽外植体的消毒效果比单独使用一种消毒剂消毒的好, 但是幼嫩程度不同的外植体对 2% NaClO+0.1% HgCl₂ 消毒时间的承受范围不同。

本实验的研究结果为秋石斛无菌体系的建立提供了技术支持, 为后续的秋石斛组培再生与种苗生产奠定了基础。

3 材料与方法

3.1 实验材料

实验材料为秋石斛 ‘088’ 新生侧芽, 取自中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所热带花卉种质资源圃。选取生长粗壮, 生长状态良好, 具有 6~7 节的基部新生侧芽为实验材料。

3.2 实验方法

3.2.1 实验材料的预处理

选取生长粗壮, 生长状态良好, 具有 6~7 节的新生侧芽, 用经酒精消毒的刀片切下, 装入干净采样袋中带回实验室。将新芽的叶鞘小心剥掉, 切成茎尖、中部 3~4 节茎段和基部 2~3 节茎段三部分, 分别置于 150 mL 三角瓶中, 用洗衣粉清洗干净之后流水冲洗 30 min, 倒掉水后于超净工作台进行消毒实验操作。

3.2.2 外植体消毒方法

将预处理好的实验材料于超净台内用 75% 的酒精浸泡 30 s, 无菌水冲洗 2 次备用。

将材料分别按如下方案进行消毒处理, 其中 2% NaClO 和 0.1% HgCl₂ 单独消毒按单因素试验设计, 组合试验按双因素试验设计, 具体如下:

(1) 2% NaClO 消毒, 时间设为 0 min、5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min。

(2) 0.1% HgCl₂ 消毒, 时间设为 0 min、2 min、4 min、6 min、8 min、10 min、12 min、14 min、16 min。



(3) 2% NaClO+0.1% HgCl₂消毒, 2% NaClO时间设为5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min, 0.1% HgCl₂时间设为2 min、4 min、6 min、8 min、10 min、12 min, 将2% NaClO消毒时间和0.1% HgCl₂消毒时间进行正交设计, 共计38个处理, 每个处理的消毒顺序为先2% NaClO后0.1% HgCl₂。

消毒之后用无菌水清洗6~7次, 接种于培养基上, 20 d之后统计污染、死亡和成活数量。实验中, 每个处理接种10瓶, 每瓶3个外植体, 每个处理3次重复。

3.3 培养基的其它因素和培养条件

本实验中采用的培养基为 MS 培养基, 附加 3.5 g/L 的琼脂为固化剂和 30 g/L 的蔗糖, PH 值调至 5~6 之间。培养室温度控制在 25℃左右, 光照强度为 3 000 lux, 每天光照时间为 16 h。

3.4 数据统计

污染率=污染外植体数/接种外植体总数×100%。

死亡率=死亡外植体数/接种外植体总数×100%。

存活率=存活外植体数/接种外植体总数×100%。

作者贡献

本研究主要由陆顺教完成。易双双在后期的数据统计和分析上给予了很大帮助; 任羽和冷青云对实验材料进行了充分准备和操作技术上进行了细心指导; 尹俊梅和杨光穗从实验设计、论文构思到文章修改、审阅等环节给予了悉心指导。

致谢

本研究由中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(1630032013004)资助。同时感谢中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所热带花卉研究室全体同仁的大力支持。

参考文献

- Cai K.X., Chen Z.D., Lin X.X., Su J.Q., and Yu Z.C., 2010, Screening of appropriate disinfection method for early cultured *Phyllagathis fordii* leaf explant tissue culture, *Redai Nongye Kexue (Chinese Journal of Tropical Agriculture)*, 30(1): 1-2 (蔡坤秀, 陈振东, 林秀香, 苏金强, 余智城, 2010, 叶底红叶片外植体消毒方法的筛选, *热带农业科学*, 30(1): 1-2)
- Chen S.Z., Bu Z.Y., Bi Z.Q., Zhou J.Y., and Jiang H.P., 2006, Common problems in tissue culture of orchid and their solutions, *Guangxi Nongye Kexue (Guangxi Agricultural Sciences)*, 37(1): 72-74 (陈少珍, 卜朝阳, 闭志强, 周嘉运, 蒋慧萍, 2006, 兰花组织培养中常见问题及解决方法, *广西农业科学*, 37(1): 72-74)
- Han J.Y., Ou K.W., Xuan W. Y., Song X.M., and Feng D., 2012, Screening of sterilization methods for explants of *Aleurites moluccana* axillary bud, *Nanfang Nongye Xuebao (Journal of Shouthen Agriculture)*, 43(8): 1169-1172 (韩佳宇, 欧克纬, 繆维言, 宋炫昱, 冯斗, 2012, 石栗树腋芽外植体消毒方法的筛选, *南方农业学报*, 43(8): 1169-1172)
- Hu Q.M., Huang Y.F., and Lai M.X., 2013, Tissue culture and rapid propagation technique of *Capparis masaikai*, *Nanfang Nongye Xuebao (Journal of Shouthen Agriculture)*, 44(9): 1431-1434 (胡琦敏, 黄云峰, 赖茂祥, 2013, 马槟榔组培快繁技术研究, *南方农业学报*, 44(9): 1431-1434)
- Leifert C., Morris C.E., and Waites W.M., 1994, Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-grown plants: Reasons for contamination problems in vitro, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(2): 139-183
- Li R.M., Hu X.W., and Guo J.C., 2009, Simple and efficient methods of cassava explant disinfection, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 28(4): 775-778 (李瑞梅, 胡新文, 郭建春, 2009, 木薯外植体快速、高效消毒的简易方法, *基因组学与应用生物学*, 28(4): 775-778)
- Liu H.L., Chen X.M., Cai L., Wu Y.M., Qin Z.H., and Yang K.T., 2010, Sterilization conditions for tissue culture of different explants derived from *Camellia oleifera*, *Guangxi Linye Kexue (Guangxi Forestry Science)*, 39(2): 61-64 (刘海龙, 陈晓明, 蔡玲, 吴幼媚, 覃子海, 杨开太, 2010, 油茶不同外植体灭菌条件研究, *广西林业科学*, 39(2): 61-64)
- Tao X.K., Gao G.Z., Zhao L., Wang H.C., Zhang X.T., Yu S.J., and Li X.J., 2013, Comparative study of several methods for Blueberry explant disinfection, *Huaibei Shifan Daxue Xuebao (Ziran Kexue Ban) (Journal of Huaibei Normal University (Natural Science))*, 34(2): 39-41 (陶兴魁, 高贵珍, 赵亮, 王海潮, 张兴桃, 于士将, 李秀娟, 2013, 几种方法对蓝莓外植体消毒的比较研究, *淮北师范大学学报(自然科学版)*, 34(2): 39-41)
- Wang T.Y., Zhou Z.Z., Qiu Z.F., Liang K.N., Zeng B.S., Ma H.M., and Huang G.H., 2012, Disinfection methods of explants of *Aquilaria sinensis* in tissue culture, *Zhongnan Linye Keji Daxue Xuebao (Journal of Central South University of Forestry & Technology)*, 32(3): 44-48 (汪腾越, 周再知, 裘珍飞, 梁坤南, 曾炳山, 马华明, 黄桂华, 2012, 土沉香组织培养外植体消毒方法的研究, *中南林业科技大学学报*, 32(3): 44-48)
- Yao N., and Lai Z.Q., 2010, Screening of explant disinfection method for *Pennisetum purpureum* axillary bud, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 29(5): 943-946 (姚娜, 赖志强, 2010, 象草腋芽外植体消毒方法的筛选, *基因组学与应用生物学*, 29(5): 943-946)
- Zhou J., Yang M.C., Cen X.F., and Wei P.X., 2011, Influence of explants and its sterilization time on induction of *Lonicera hypoglauca* buds, *Nanfang Nongye Xuebao (Journal of Southern Agriculture)*, 42(2): 124-127 (周婧, 杨美纯, 岑秀芬, 韦鹏霄, 2011, 红腺忍冬外植体灭菌与芽诱导研究, *南方农业学报*, 42(2): 124-127)