

# 西兰花离体快繁外植体消毒技术初探

吴林森 冯福娟 张宇 余财友 丁岚 周建飞 俞旗英 包玲丽

(丽水职业技术学院, 浙江 丽水 323000)

**【摘要】**以西兰花花茎为试材, 进行外植体消毒试验。结果表明为: 70%酒精(15s) + 10%次氯酸钠(10min)的组合是最佳消毒处理。

**【关键词】**西兰花; 植物组织培养; 消毒

中图分类号: S635

文献标识码: A

西兰花又称绿花菜、青菜花 (*Brassica oleracea* L. var. *italica*)。它颜色鲜艳, 味道清新, 是一种营养成分齐全、营养价值高的中高档蔬菜, 更因1992年美国生物学家雷迪发现其有抗癌物质而倍受世人注目。近年来已成为我国东部沿海地区创汇农产品中最重要种类之一, 如浙江省临海市、宁波市等。它们是浙江省规模化的冬春西兰花生产中心和重要的国际西兰花生产基地。

西兰花主要靠种子繁殖, 种子价格高, 而且其来源主要是依靠进口, 因此这无形中增加了西兰花的繁育成本。而组织培养具有繁殖系数大、成本较低等优点, 西兰花植株的任一器官都可以作为材料进行组织培养繁殖, 这样就弥补了常规繁殖种子价格高的矛盾, 突破了材料不足的限制, 并且能在较短的时间内生产量多、质优的苗木, 满足农民的栽种要求。因此, 选择适宜的培养条件进行西兰花的组织培养研究, 促进优良品种选育, 这无疑有着广阔的应用前景和巨大的经济价值。

本试验是西兰花组织培养的初步研究。主要是选择花茎为外植体, 通过外植体消毒时的杀菌剂与消毒时间的搭配试验, 以期找出最有效的外植体消毒方法, 为以后的组织培养工作进行做好铺垫。

## 1 试验材料与方法

### 1.1 材料

所用西兰花购自丽水市城区府前菜市场; 杀菌剂选用70%酒精、0.1%升汞、10%的次氯酸钠和5%的新洁尔灭等四种。

### 1.2 材料处理与培养条件

#### 1.2.1 外植体的表面处理程序

从花浓绿、花蕾饱满的花球上取下花茎, 然后用自来水洗净, 再用洗洁精液仔细刷洗干净, 冲洗去多余的洗洁精液后在流动的清水中浸泡30min, 然后在无菌的超净工作台上用滤纸吸干外植体表面的水分, 用70%的酒精进行表面消毒, 然后用不同的杀菌剂进行深层的消毒, 最后用无菌水冲洗5次。在无菌条件下切取0.5cm<sup>2</sup>左右大小的茎块接种到无菌培养基上, 放在培养室内进行培养。

#### 1.2.2 培养基

培养基: MS + 6 - BA3.0mg·L<sup>-1</sup> + NAA0.5 mg·L<sup>-1</sup>。

培养基中添加琼脂6g·L<sup>-1</sup>, 蔗糖30g·L<sup>-1</sup>, PH=5.8。

#### 1.2.3 培养条件

温度22~24℃, 培养室环境湿度保持在70%左右, 光照时间12h·d<sup>-1</sup>, 光照强度1500~2000lx。

## 1.3 试验方法

### 1.3.1 不同水平消毒时间的杀菌剂的消毒效果试验

采用正交设计方法, 选用2种杀菌剂、3个水平, 即70%酒精[15s, 30s, 60s]、0.1%升汞[5min, 10min, 12min], 其安排见表1和表2。

根据表2的设计做了9个处理, 每个对应培养基的试验重复取样20次, 每瓶培养基上接种外植体茎块3个。3天后开始观察现象, 记录有无污染, 污染的个数; 死亡与成活的情况。直到结果不再变化为止。

表1 酒精与升汞的处理时间安排表

杀菌剂	水平		
	A	B	C
70%酒精 (s)	15	30	60
0.1%升汞 (min)	5	10	12

表2 正交表安排试验方案及其试验结果

处理	70%酒精	0.1%升汞	接种数	污染		黑褐		存活	
				总数	%	总数	%	总数	%
1	1 (15)	1 (5)	60	6	10	4	7	50	83
2	1 (15)	2 (10)	60	4	7	3	5	53	88
3	1 (15)	3 (12)	60	2	3	18	30	40	67
4	2 (30)	1 (5)	60	33	55	27	45	0	0
5	2 (30)	2 (10)	60	8	13	30	50	22	37
6	2 (30)	3 (12)	60	27	45	24	40	9	15
7	3 (60)	1 (5)	60	10	17	40	66	10	17
8	3 (60)	2 (10)	60	10	17	48	80	2	3
9	3 (60)	3 (12)	60	25	42	26	43	9	15

## 1.3.2 不同杀菌剂的消毒效果试验

选用0.1%升汞、10%次氯酸钠、5%新洁尔灭等3种杀菌剂,安排3个不同的消毒时间进行实验,即0.1%升汞[5min, 10min, 12min]、10%次氯酸钠[15min, 20min, 25min]、5%新洁尔灭[15min, 20min, 25min],其安排见表3。其中70%酒精的使用时间是固定的,取自于经

## 1.3.1 试验后确定的最佳消毒时间。

根据表3的设计做了9个处理,每个对应培养基的试验重复取样10次,每瓶培养基上接种外植体茎块5个。3天后开始观察现象,记录有无污染,污染的个数;死亡与成活的情况。直到结果不再变化为止。

表3 不同杀菌剂与时间的试验安排及其结果

编号	杀菌剂种类	消毒时间 (min)	接种数	污染		黑褐		存活	
				总数	%	总数	%	总数	%
1	0.1%升汞	5	50	5	10	4	8	41	82
		10	50	5	10	3	6	42	84
		15	50	8	16	12	24	30	60
2	10%次氯酸钠	10	50	1	2	1	2	48	96
		15	50	3	6	11	22	36	72
		20	50	5	10	16	32	29	58
3	5%新洁尔灭	12	50	9	18	24	48	17	34
		20	50	17	34	27	54	6	12
		25	50	9	18	30	60	11	22

## 2 试验结果与分析

### 2.1 不同水平消毒时间的杀菌剂的消毒效果

#### 2.1.1 70%酒精的不同消毒时间的消毒效果分析

酒精有强的杀菌能力和穿透力,同时亦具有很好的湿润作用,可排除掉材料表层组织的空气,利于其他灭菌剂的渗入。

从表2中可以看出,在0.1%升汞处理时间固定为10min时,酒精处理时间为15s、30s、60s,外植体的污染率分别是7%、13%、17%,黑褐率分别是5%、50%、80%,存活率分别是88%、37%、3%。这说明在使用酒精进行消毒处理中,随着时间的延长,在其强有力的穿透作用下,外植体受到了一定程度的伤害,黑褐率明显上升,污染率也略有上升,但其对应的存活率是明显下降的。这表明酒精消毒处理中的使用时间不宜过长,应该加以控制,要严格掌握,以减少外植体污染与黑褐,保证成活率。

#### 2.1.2 0.1%升汞的不同消毒时间的消毒效果分析

从表2中可以看出,当固定酒精的消毒时间为15s时,升汞的处理时间为5min、10min、12min,污染率为10%、7%、3%,黑褐率分别是7%、5%、30%,存活率分别是83%、88%、67%。由此可见,随着消毒时间的加长,污染率呈现下降的态势,而且在这种组合下,污染率就已经处于较低的水平,这表明当升汞的处理时间达到10min左右时,绝大多数的病菌已被杀死,取得了比较好的灭菌效果。但由于汞离子有剧毒,其使用时间过长后,会使外植体受到毒害而死亡,致使黑褐率有了一个上升的趋势。因此在控制污染发生的过程中,升汞的处理时间不宜过长。

综上所述,处理2效果最理想,即外植体表面消毒比较适宜的方法是70%酒精处理15s + 0.1%升汞处理10min。

### 2.2 不同杀菌剂的消毒效果分析

在本次试验中为了寻找最合适的杀菌剂,选用的升汞、次氯酸钠、新洁尔灭等都是植物组织培养工作中常用的杀菌剂。

表3中的试验结果表明,随着消毒时间的增加,外植体的黑褐率不断上升。其中5%新洁尔灭处理后的黑褐率达到最高,在所做的三个处理中,达到或超过50%;而利用10%次氯酸钠

10min进行处理其黑褐率仅为2%。另从污染率的大小来看,也是5%新洁尔灭处理后的污染率较高,而用0.1%升汞或10%次氯酸钠的处理,其污染率相对较低。

就灭菌效果而言,0.1%升汞和10%次氯酸钠的处理效果最好,5%新洁尔灭最差。但升汞和次氯酸钠相比较,升汞对植物组织的毒害较大,这对植物组织培养是不利的;从存活率上比较,最高的是10%次氯酸钠处理10min时为96%,其次是0.1%升汞处理10min时为84%,最低者在5%新洁尔灭处理20min时为12%。

综上所述,使用10%次氯酸钠处理10min的杀菌效果优于0.1%升汞处理10min。

## 3 结论与讨论

3.1 外植体表面处理是植物组织培养的基础工作,是前提条件。杀菌是否彻底对紧接的接种与培养工作取得成功有着明显的影响。因此,应当做好杀菌剂与消毒时间的合理选择与搭配,使用最合适的杀菌剂取得最好的杀菌效果。

3.2 试验表明,以西兰花茎为外植体时,先用70%的酒精表面浸润处理15s,然后用10%次氯酸钠处理10min左右时间,所获得的无菌材料最多,存活率最高,达到96%。

3.3 本试验最终结果是采用10%次氯酸钠为杀菌剂,这样做可以大大减少通常采用升汞作为杀菌剂所带来的排放难题,同时也一定程度上缓解了对组培材料的损伤。经济上,降低了组培成本。

3.4 为减少环境污染,本试验按照正交设计的方法安排试验,不但减轻了工作量,也减少了组培的成本,更重要的是在多水平试验时,能够观察并选取适宜的试验组合,此设计方法有待于在今后西兰花的组培试验中进一步推广。

### 参考文献

- [1]李骏明.植物组织培养教程[M].北京:中国农业大学出版社,1996.
- [2]王清连.植物组织培养[M].北京:中国农业出版社,2001.
- [3]李艳红,宋秀珍,庄木.青花菜组织培养再生体系的研究.[J].首都师范大学学报(自然科学版),2001,22(3):48-53.
- [4]王国良,李国雷,吴明华.西兰花花梗褐心病病菌鉴定[J].浙江万里学院学报,2004,17(5):102-104.
- [5]王得元,何晓明,王鸣.蔬菜生物技术概论[M].北京:中国农业出版社,2001.

作者简介:吴林森(1969-),男,浙江庆元人,副教授,主要从事植物组织培养技术的研究。