

红金银花组织培养外植体灭菌的研究

赵贤慧¹, 刘庆华¹, 张德锋²

(1. 莱阳农学院环境艺术学院, 山东 青岛 266109; 2. 莱阳农学院, 山东 青岛 266109)

摘要:在单因素预试验的基础上, 采用正交试验设计, 筛选出了植物组织培养中红金银花外植体最佳灭菌方法, 总结出外植体的类型、酒精浸泡时间、升汞质量分数、升汞浸泡时间等对红金银花外植体的污染程度及成活率均有显著影响。采用 $L8(4 \times 2^4)$ 正交试验表明, 对红金银花外植体先用 75% 的酒精消毒 30 s, 再配合 0.2% 的升汞溶液处理 5 min, 能达到理想的灭菌效果。

关键词:红金银花; 组织培养; 外植体; 灭菌

中图分类号:S567.79 **文献标识码:**A

Sterilization of the explant of *Lonicera japonica* var. *chinensis* in vitro culture

ZHAO Xian-hui¹, LIU Qing-hua¹, ZHANG De-feng²

(1. School of Landscape Architecture and Art, Laiyang Agriculture College, Qingdao 266109, China;

2. Laiyang Agriculture College, Qingdao 266109, China)

Abstract: The sterilization method of the explants of *Lonicera japonica* var. *chinensis* was screened out with orthogonal design and single factor experiment. The results were as follows: such factors as explant type, concentration of $HgCl_2$, sterilization time in ethanol and $HgCl_2$ had significant effects on the contaminative rate and the survival of the explants. The results of orthogonal experiment $L8(4 \times 2^4)$ showed that it was optimal for the explants of *Lonicera japonica* var. *chinensis* to be treated with 75% ethanol for 30 s and subsequently 0.2% $HgCl_2$ for 5 min.

Key words: *Lonicera japonica* var. *chinensis*; Tissue culture; Explant; Sterilization

红金银花 (*Lonicera japonica* var. *chinensis*) 为忍冬科忍冬属木本植物, 是金银花的变种。其叶、茎均为紫色; 花期长, 花蕾在开放前由紫红变大红, 初开时先为粉红, 后变成红、黄、白相间, 香味浓郁。红金银花的抗逆性强, 耐旱、耐涝、耐寒、耐瘠薄, 对气候、土壤适应性强, 且生长快。与忍冬属其他植物最大不同的是其冬天不落叶, 可用于园林绿化, 也可作盆栽栽培, 观赏价值更高。

要对红金银花进行组织培养以扩繁苗木, 首先要解决的是怎样获得无菌外植体材料。污染是组织培养过程中首先要解决的重要问题, 但又很难控制。组织培养中造成污染的原因主要有: (1) 外植体自身带菌, 尤其是内部带菌 (简称内生菌), 这些菌不容易清除^[1]; (2) 生产工艺过程中各环节操作不适

宜或不严格所致的带菌, 这类污染可通过严格操作得到控制。而外植体的种类、取材的季节与时间、预处理方法、灭菌药剂的种类、质量浓度与时间以及方法, 就成为获取组织培养成功前必须研究的问题。

1 材料与方法

外植体取材试验分别在春、夏、秋、冬 4 季进行, 并设计不同的方案进行对比。

1.1 外植体的预处理

由于红金银花春秋季有新萌发的顶芽, 所以在春秋季可以新萌发的顶芽和带对生腋芽的茎段作为外植体, 而夏季取材可以带对生腋芽的茎段为外植体。先用自来水冲洗数次, 吸干外植体表面的水分, 再将其剪成 1~2 cm 的带对生腋芽的茎段或 1~

收稿日期: 2006-11-18; 修回日期: 2006-12-30

作者简介: 赵贤慧 (1981-), 女, 汉族, 山东烟台人, 在读硕士研究生, 主要从事园林植物与观赏园艺专业方面的研究工作。

通讯作者: 刘庆华 (1962-), 男, 博士, 莱阳农学院环境艺术学院院长, 主要从事园林植物方面的研究。

2 cm长的顶芽末梢,放入清洗液或洗衣粉溶液中浸泡 15~20 min,最后用自来水冲洗 1 h,备用。

1.2 灭菌剂的选取

外植体用自来水冲洗后,先用酒精消毒,再配合次氯酸钠、次氯酸钙或 HgCl_2 等进行灭菌。本试验选用目前应用比较普遍的酒精与次氯酸钠组合和酒精与 HgCl_2 组合,进行预试验比较。

1.3 试验方法

1.3.1 单因素预试验设计 酒精体积分数均为 75%,处理时间为 1 min;次氯酸钠质量浓度选用 1%和 2% 2 个水平; HgCl_2 质量分数选用 0.1%和 0.2% 2 个水平;处理时间均为 5 min。实验方案:(A) 75%酒精处理 1 min+1%次氯酸钠处理 5 min;(B) 75%酒精处理 1 min+2%次氯酸钠处理 5 min;(C) 75%酒精处理 1 min+0.1% HgCl_2 处理 5 min;(D) 75%酒精处理 1 min+0.2% HgCl_2 处理 5 min 4 个组合。

培养条件:(1)基本培养基 MS+6-BA 1.0 mg/L(单位下同)+NAA 0.1 mg/L,蔗糖含量为 30 g/L,琼脂含量为 7 g/L,pH 5.8~6。(2)光照度为 1 500~2 000 lx 培养,温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。

1.3.2 试验设计 春、夏、秋、冬季的灭菌试验采用 $\text{L8} \times (4 \times 2^4)$ 4 因素混合水平的试验方案。其中酒精的体积分数均为 75%,时间设 30 s 和 1 min 2 个水平, HgCl_2 的质量分数设 0.1%和 0.2% 2 个水平,时间设 3,5,7 和 9 min 4 个水平,其他条件同上(见表 1)。

表 1 灭菌试验方案

序号	酒精处理/min	HgCl_2 质量分数/%	HgCl_2 处理/min
1	0.5	0.1	3
2	1	0.2	3
3	0.5	0.1	5
4	1	0.2	5
5	0.5	0.1	7
6	1	0.2	7
7	0.5	0.1	9
8	1	0.2	9

2 结果与分析

2.1 单因素预试验

7 d 后的观察显示,次氯酸钠的灭菌效果明显不如 HgCl_2 的灭菌效果,外植体有很高的污染率,且基本枯死。酒精和 HgCl_2 配合使用的灭菌效果较好,污染率和枯死率都比较低;C 组和 D 组外植体最终成活率分别为 60%和 65%。因此,确定最佳灭菌

组合为酒精和 HgCl_2 。

2.2 外植体筛选试验

2.2.1 试验结果记录 4 个季节的对比试验发现,春季以顶芽为外植体的试验结果与秋季以顶芽为外植体的试验结果相似;春季和秋季以带芽茎段为外植体的试验结果与夏季和冬季相似,笔者分析认为,虽然春季芽的萌发力比其他季节强,但由于红金银花枝条本身带有内生菌,因此试验效果与其他 3 季一样,均不理想。

由于顶芽暴露在空气中的时间相对较短,被微生物浸染的机会较少,自身带菌也就少些,并且萌发力强,因此接种后容易恢复生命力,成活率较高。4 个季节的试验显示,带有对生腋芽茎段的灭菌试验效果均较差,产生褐化、污染和不萌发的情况比较多,成活率很低。外植体周围出现云雾状微生物污染,原因可能是外植体组织内部带有细菌,此类污染很难清除,仅靠表面灭菌是达不到灭菌效果的。

2.2.2 试验结果分析 根据试验结果,由于带腋芽茎段污染率很高且成活率很低(见图 2),本文着重分析顶芽(见图 1)的试验结果,统计出不同因素、不同水平下,各个处理的污染、褐化和萌发情况(见表 2)。

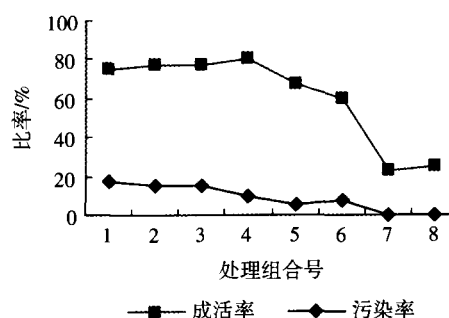


图 1 春季顶芽型外植体成活率和污染率

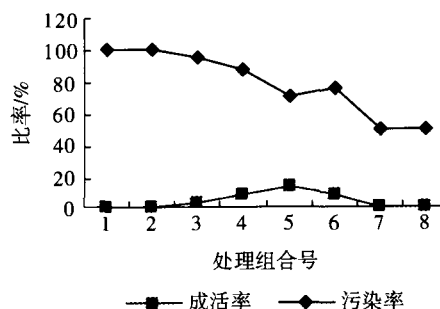


图 2 春季带腋芽茎段型外植体成活率和污染率

从表2可以看出, HgCl_2 不同时间的处理对外植体污染和萌发的影响都远远大于酒精不同时间的处理和 HgCl_2 不同质量分数的处理, 为最大影响因素。 HgCl_2 质量分数对污染的影响(污染率差值为2.5%)相对于酒精灭菌时间对污染的影响(污染率差值为1.25%)要大, 因此控制红金银花组织培养中外植体污染的问题, 应先确定 HgCl_2 的作用时间和所选择的质量分数。

当酒精的作用时间为1 min时, 产生的褐化情况要比作用时间为30 s产生的要多, 褐化率差值为3.75%, 而不同质量分数 HgCl_2 产生褐化的褐化率差值为1.25%, 说明酒精对褐化的影响大于 HgCl_2 的影响, 酒精处理时间越长, 产生褐化的机率越高。

酒精的作用时间对成活率的影响(成活率差值为0.625%)与 HgCl_2 质量分数对成活率的影响(成活率差值为0.625%)相同, 表明外植体的成活率与 HgCl_2 的作用时间有关, 酒精的不同作用时间和 HgCl_2 不同质量分数对外植体成活率的影响相似。萌芽数随着组合中 HgCl_2 处理时间增加而降低, 表明过长时间的 HgCl_2 接触会损伤外植体。另外, 发现试验中萌发出芽的叶片发皱并有枯死的现象, 随着组合序号的增加, 叶片发皱且枯死的情况越来越明显, 原因是因为 HgCl_2 质量分数的增加和作用时间的延长, 损伤了叶片细胞与组织, 使其产生毒害, 影响其正常生长。

表2 对顶芽的灭菌处理

不同因素	不同水平	总芽数 /个	污染数 /个	污染率 /%	褐化数 /个	褐化率 /%	萌发数 /个	成活率 /%
处理时间(酒精)	30 s	160	15	9.375	7	4.375	96	60
	1 min	160	13	8.125	13	8.125	97	60.625
	差	0	2	1.25	-6	-3.75	-1	0.625
质量分数(HgCl_2)	0.1%	160	16	10	11	6.875	95	59.375
	0.2%	160	12	7.5	9	5.625	96	60
	差	0	4	2.5	2	1.25	-1	0.625
处理时间(HgCl_2)	3 min	80	13	16.25	3	3.75	61	76.25
	5 min	80	10	12.5	3	3.75	63	78.75
	7 min	80	5	6.25	6	7.5	50	62.5
	9 min	80	0	0	8	10	19	23.75
	最小值	80	0	0	3	3.75	19	23.75
	最大值	80	13	16.25	8	10	63	78.75
	差	0	13	16.25	5	6.25	44	55

3 结论与讨论

红金银花的植株体表带有疏柔毛和疏腺毛, 枝条中空, 灭菌较困难, 因此对红金银花外植体的处理难以掌握。时间太短, 污染难以控制; 时间太长, 对组织产生毒害导致芽的萌发困难。以春季和秋季新萌发顶芽为外植体, 较易灭菌, 且外植体萌发力强, 采用75%酒精处理30 s与0.2% HgCl_2 处理5 min的灭菌组合处理外植体, 可达到将近80%的成活率。外植体为带对生腋芽的茎段灭菌情况与夏季和冬季带对生腋芽茎段一样, 都较难灭菌, 褐化现象也较严重, 各组合的试验效果均很差, 即使采用75%

酒精处理30 s与0.2% HgCl_2 处理7 min的灭菌组合, 成活率也只达到12.5%。因此, 本试验认为, 虽然红金银花为冬季不落叶植物, 但适宜进行组织培养试验外植体取材的季节只有春季和秋季, 适宜采用的外植体为新萌发的顶芽, 试验灭菌处理方法为75%酒精处理30 s与0.2% HgCl_2 处理5 min的组合。

参考文献:

- [1] 李群, 杜文平, 王米力, 等. 植物组织培养中控制污染技术研究[J]. 四川林业科技, 1999, 20(4): 22-26.