

# 不同处理方法对外植体消毒效果比较研究

刘丽娟, 李红梅, 刘雪莲

(通化师范学院 生物系 吉林 通化 134002)

**摘 要** 植物组织培养过程中,常出现不同程度的污染问题,造成很大的损失。现采用 6 种不同方法研究控制组培中外植体污染的措施。结果表明:外植体采用 0.1% 氯化汞溶液浸 5~10 min,再以青霉素和链霉素(200 万单位 $\cdot$ L<sup>-1</sup>)混合液浸泡 30 min,污染率较低为 13.3%,可用于生产实践。

**关键词:** 植物组织培养; 外植体; 污染

**中图分类号:** Q 946-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)10-0086-02

植物组织培养在快速繁殖、植株脱病毒、单倍体育种、种质资源保存、细胞突变体筛选等方面得到广泛运用<sup>[1]</sup>。污染是造成组织培养失败的主要原因之一,很多学者在初代培养阶段,很难得到无菌苗,或者虽然在初代培养得到了无菌苗,但在继代培养时往往出现大量污染甚至全部污染<sup>[2]</sup>。如何降低成本是提高经济效益的首要问题,因此,组织培养中降低污染率是工厂化生产中不可忽视的技术环节。在植物组织培养过程中,存在两种类型的污染:一类是通常所说的污染,即外植体消毒不彻底,无菌操作和培养过程中而导致的污染;另一类是内源菌污染,内源菌包括真菌和细菌,是造成内源污染的主要原因<sup>[3]</sup>。外植体污染是组织培养中众多污染途径中最难解决的一个。试验主要从外植体消毒方面,讨论减少污染的措施和方法,共采用了 6 种不同方法对外植体进行消毒,从中筛选出最佳消毒方法,以用于生产实践,提高产量。

**第一作者简介:** 刘丽娟(1972-),女,吉林通化人,硕士,副教授,研究方向为药用植物营养与栽培。

**收稿日期:** 2009-06-20

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

层积好的刺五加种子。

### 1.2 试验方法

将种子先用流水冲洗,剥去种皮,然后用自来水冲洗,并加少量洗衣粉洗涤,搅动 5 min,再用自来水冲洗,按表 1 对种子进行消毒处理<sup>[4]</sup>,每种药剂消毒后的种子均用无菌水冲洗 4 次,再用无菌纸沥干备用。按无菌操作要求接种于培养基上,培养基采用 1/2MS,不加激素。每种消毒方法接种 10 瓶,光照时间为每天 12 h,于 20~26℃,光照强度 1 500 lx 的培养室进行培养,定期观察试验结果。

表 1 6 种不同消毒方法

处理	消毒方法
A	70%乙醇溶液浸泡 3 次 每次 30 s
B	70%乙醇溶液浸 30 s 然后用 0.1%氯化汞溶液浸泡 5~10 min
C	70%乙醇溶液浸 30 s 然后用青霉素(200 万单位 $\cdot$ L <sup>-1</sup> )溶液浸泡 30 min
D	70%乙醇溶液浸 30 s 然后用链霉素(200 万单位 $\cdot$ L <sup>-1</sup> )溶液浸泡 30 min
E	70%乙醇溶液浸 30 s 然后用青霉素和链霉素(200 万单位 $\cdot$ L <sup>-1</sup> )混合液浸泡 30 min
F	0.1%氯化汞溶液浸 5~10 min 然后用青霉素和链霉素(200 万单位 $\cdot$ L <sup>-1</sup> )混合液浸泡 30 min

## Selection of Relative Index of the Salt-tolerance of Tomato at Seedling Stage

LI Ye<sup>1</sup>, JIANG Jing-bin<sup>2</sup>, LIU Hong-lan<sup>2</sup>, XU Xiang-yang<sup>2</sup>, ZHANG He<sup>2</sup>, LI Jing-fu<sup>2</sup>

(1. Harbin Academy of Agricultural Sciences Harbin, Heilongjiang 150070, China; 2. Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

**Abstract:** The relative index of the salt-tolerance of tomato at seedling stage was studied. Salt injury index, relative rate of electrolytic, free praline content, POD activity, CAT activity, chlorophyll content, soluble sugar content, MDA content, by using two different salt-tolerant tomato cultivars. The results indicated that salt injury index, relative rate of electrolytic, free praline content, POD activity, CAT activity, can be used as indexes to salt-tolerance of tomato cultivars.

**Key words:** Tomato; Salt tolerance; Physiological index; Selection

## 2 结果与分析

### 2.1 试验结果

培养 3 d 后进行观察, 处理 A 最先出现污染, 污染率达 13.3%, 而处理 B 和 F 均没有发生污染现象。其余处理有污染发生, 污染率处理 E 为 6.7%, 处理 C 和 D 与 A 相当; 培养 6 d 后, 污染率处理 A 最高达 73.3%, 处理 F 最低为 0, 其余处理污染率在 6.7%~33.3% 之间; 培养 9 d 后, 处理 F 仍未发生污染, 处理 A 的污染率为 80% 是所有处理中最高的, 其余处理小于 66.7%; 当培养 12 d 时, 处理 F 开始出现污染, 污染率为 6.7%, 处理 A 污染率仍是最高 86.7%; 培养 15 d 试验结束时, 处理 A 接种的种子全部污染, 处理 F 污染率为 13.3%, 处理 B 略高于 F 为 33.3%, 处理 C 和 D 结果相当均为 86.7%, 处理 E 在处理 B 和 C 之间。从图 1 可以看出, 所采用的 6 个处理中, 处理 F 污染出现的最迟, 且污染率最低仅为 13.3%, 可在实际生产中采用此法进行外植体灭菌; 而处理 A 污染发生的最早, 且污染率最高, 最终全部污染, 以种子为外植体进行组培生产时, 建议不采用此法进行外植体灭菌; 处理 B 的消毒效果仅次于 F, 可依据实际酌情使用; 其余消毒方法的消毒效果不很理想, 不建议使用。

### 2.2 试验分析

由图 1 可知, 处理 F 即先用 0.1% 氯化汞溶液浸泡后, 再用青霉素、链霉素混合液处理外植体, 污染率最低且灭菌效果最好。原因是氯化汞为重金属盐, 其汞离子可与带负电荷的蛋白质结合, 使菌体蛋白变性, 酶失活, 可有效地杀死附着在外植体表面的细菌及芽孢, 是一种极有效的杀菌剂; 同时青霉素和链霉素为抗生素, 是生物代谢的产物, 一般是通过阻断微生物的正常代谢途径使微生物死亡, 也对外植体起到很好的杀菌作用, 因此二者结合使用灭菌效果较好。在其余处理中, 均先采用 70% 乙醇溶液进行消毒, 乙醇是脂溶剂和脱水剂, 可使膜损伤, 同时能使蛋白质变性, 具有杀菌能力, 但对细菌芽孢无效, 常用于物体表面、皮肤及器械消毒, 故消毒效果较氯化汞差。而处理 B 中结合使用 0.1% 氯化汞溶液和 70% 乙醇溶液进行灭菌, 消毒效果次之, 采用仅一种或不用抗生素灭菌效果均不明显。

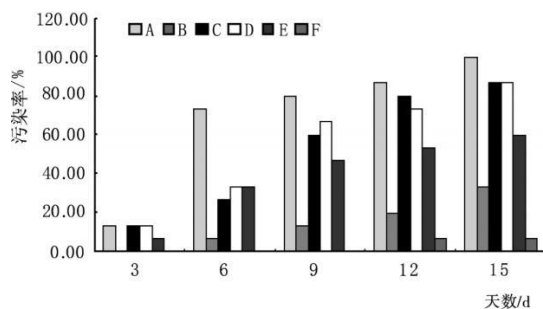


图 1 不同消毒方法组培苗污染率状况

## 3 结论

结合上述分析, 在组织培养中, 可采用 0.1% 氯化汞溶液浸泡后, 再用浓度为 200 万单位  $\cdot L^{-1}$  的青霉素和链霉素混合液处理进行外植体的消毒, 此法灭菌效果较好, 污染率较低仅为 13.3%, 可达到试验要求。但氯化汞是剧毒药品, 使用过程中必须极其小心谨慎, 不要接触皮肤, 更不能误入体内。根据不同的试验材料也可采用 0.1% 氯化汞溶液和 70% 乙醇溶液进行灭菌, 也能达到一般的要求。

在植物组织培养中, 一般的污染较易控制, 可达到接种的无菌环境条件和无菌操作要求, 而内源菌则较难控制, 要求全部杀死植物表面和组织内的微生物, 一般的消毒方法是不能完成的。可通过先对外植体植物进行预栽管理, 外植体的预处理, 并在此基础上, 改进消毒方法(如真空减压法、酸化培养基、灼烧法等), 也可去除培养基中的有机成分, 这些措施都能降低由内源菌引起的污染<sup>[9]</sup>。当然, 在植物组织培养中, 控制污染的方法是灵活多变的。在市场竞争中, 只要能减少污染, 实现工厂化快繁, 降低成本, 提高经济效益即可。

### 参考文献

- [1] 梁称福. 植物组织培养研究进展与应用概况[J]. 经济林研究, 2005, 23(4): 99-105.
- [2] 柴向华, 李军, 张秀珊, 等. 植物组织培养中污染的控制[J]. 热带农业科学, 2003(6): 40-43.
- [3] 周俊辉, 周厚全, 刘花全. 植物组织培养中内生菌污染问题[J]. 广西植物, 2003, 23(1): 41-47.
- [4] 陈雅君, 吴秀菊, 关政华, 等. 药用植物北五味子的组织培养[J]. 植物研究, 1997, 19(3): 318-322.
- [5] 邓小梅. 植物组织培养过程中污染现象的研究进展[J]. 北方园艺, 2006(6): 68-72.

## Comparasion of Different Treatment on Explants Disinfection

LIU Li-juan, LI Hong-mei, LIU Xue-lian

(Department of Biology, Tonghua Nornal University, Tonghua, Jilin 134002, China)

**Abstract:** There were different extent problems about contamination, and could cause huge loss in plant tissue culture. This article mainly studied the control method of explants Contamination in tissue culture by six different methods. It showed that through comparison that under immersed 5~10 min with mercuric chloride (0.1%) first, then immersed 30 min with penicillin and streptomycin 2 million units, the contamination rate was 13.3%, so this method can be used in practical production.

**Key words:** Plant tissue culture; Explants; Contamination