

# 崇左金花茶的外植体灭菌研究

杨舒婷, 林 茂, 王华新, 唐道冥, 龚建英, 孙利娜

(广西林业科学研究院, 广西 南宁 530002)

**摘 要:**以崇左金花茶的幼嫩叶片、幼嫩茎段、半木质化茎段、芽、花苞和种子为外植体,采用 75% 酒精、0.1%  $\text{HgCl}_2$ 、0.2%  $\text{HgCl}_2$  和  $\text{NaClO}$  4 种灭菌剂进行消毒灭菌处理,研究了崇左金花茶组织培养中外植体的最佳灭菌方案。结果表明:幼嫩叶片和种子的消毒相对容易,幼嫩叶片采用 75% 酒精 30 s+0.1%  $\text{HgCl}_2$  5 min+0.1%  $\text{HgCl}_2$  5 min 的灭菌方法好;种子采用 75% 酒精 40 s+0.1%  $\text{HgCl}_2$  20~30 min+0.2%  $\text{HgCl}_2$  20 min 的灭菌方法好。茎段的消毒相对较难,采用分段灭菌的方法效果较好,幼嫩茎段采用 75% 酒精 25 s+0.1%  $\text{HgCl}_2$  10 min+0.2%  $\text{HgCl}_2$  5 min 的灭菌方法好;半木质化茎段采用 75% 酒精 35 s+0.1%  $\text{HgCl}_2$  12 min+0.2%  $\text{HgCl}_2$  6 min 的灭菌方法好。芽和花苞的消毒最难,采用  $\text{NaClO}$  原液+ $\text{HgCl}_2$  分段灭菌,并逐次剥去外层苞片进行灭菌的方法也难以达到预期效果。

**关键词:**崇左金花茶;外植体;灭菌

**中图分类号:**S 571.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)03-0124-03

崇左金花茶(*Camellia chungtsoensis* S. Y. Liang et L. D. Huang)为山茶科山茶属常绿灌木,是最近新发现的金花茶珍稀品种,是继杜鹃红山茶之后,世界上发现的第 2 个四季开花的金花茶品种。它不但在金花茶族中颜色最鲜黄,而且全年不断开花。崇左金花茶仅在广西崇左的局部石灰岩低山地区有少量分布<sup>[1]</sup>。该种与柠檬黄金花茶近似,不同之处在于花大、深黄色,花瓣 13~16 瓣,四季开花<sup>[2]</sup>。其花朵分布均匀,枝条稠密,全光照条件下可正常生长,具有很高的观赏价值,在家庭盆栽、园林美化以及茶花育种方面具有广阔的应用前景。崇左金花茶的自然分布范围狭窄、数量有限,由于枝条细弱、扦插生根率低,无性繁殖困难,难以满足园林花卉市场需求。迄今为止,国内外虽有一些关于金花茶组植物组织培养的报道,但鲜见关于崇左金花茶的组培研究报道。现对崇左金花茶不同外植体灭菌处理的最佳灭菌方案进行研究,以期对崇左金花茶组织培养快速繁殖研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为崇左金花茶的幼嫩叶片、幼嫩(无木质

化)茎段、半木质化茎段、芽、花苞和种子等 6 种外植体。采集崇左金花茶生长良好、无病虫害的 6 种不同的外植体,带回实验室备用。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 无菌体系的建立** 将崇左金花茶的 6 种外植体先用洗洁精清洗表面 2 次,再用自来水流水冲洗 30 min。在无菌条件下,使用 75% 酒精、0.1%  $\text{HgCl}_2$ 、0.2%  $\text{HgCl}_2$  和  $\text{NaClO}$  4 种灭菌剂,设计不同的灭菌剂与灭菌时间组合,进行比较试验,分别筛选出适宜 6 种不同外植体生长的最佳灭菌方法。灭菌的外植体用无菌水冲洗 6 次。

**1.2.2 培养方法** 将幼嫩叶片切成 1  $\text{cm}^2$  的小块,茎段切成长度为 1~2 cm 的小段,种子分为去掉外种皮和不去外种皮 2 种,芽和花苞剥去外层苞片,置于启动培养基中。培养基中均加入 30 g/L 蔗糖,6 g/L 琼脂粉,pH 5.8。培养温度 25℃,光照时间 12 h/d,光照强度 2 000 lx。

## 2 结果与分析

### 2.1 幼嫩叶片灭菌的处理效果

幼嫩叶片经 75% 酒精和 0.1%  $\text{HgCl}_2$  灭菌处理后,会有不同程度的损伤,随着酒精和  $\text{HgCl}_2$  处理时间的延长,叶片污染的几率下降,但出现褐化死亡的几率增加。由表 1 可以看出,0.1%  $\text{HgCl}_2$  灭菌时间长短对幼嫩叶片的生存影响很大,随着  $\text{HgCl}_2$  时间的延长,能很好地抑制菌类的生长,但又会给叶片造成伤害,影响其正常生长,褐变死亡。最佳的处理方法为 A3 号,不仅能有效控制霉菌的生长,而且保证了叶片的正常生长。

**第一作者简介:**杨舒婷(1978-),女,四川三台人,本科,工程师,现主要从事花卉学研究工作。E-mail:dilys8041@yahoo.com.cn.

**基金项目:**广西林科院基本科研业务费专项资助项目(林科 201114 号)。

**收稿日期:**2012-10-22

表 1 幼嫩叶片的灭菌方法及效果

Table 1 Sterilization methods and effect for young leaves

处理编号 Treatment number	处理方法 Treatment method			接种叶片数 Inoculated explants	污染率 Rate of contamination/%		外植体表现 Performance of explants
	75%酒精	0.1% HgCl <sub>2</sub>	0.1% HgCl <sub>2</sub>		7 d	15 d	
A1	30 s	8 min	—	60	30	58	半数以上长白色霉菌
A2	30 s	10 min	—	54	21	28	污染的长白色霉菌,未污染有半数褐变
A3	30 s	5 min	5 min	66	10	15	污染很少,未污染的褐变也很少
A4	30 s	12 min	—	60	10	13	污染很少,未污染的褐变半数以上
A5	30 s	9 min	3 min	72	8	11	污染很少,未污染的褐变半数以上

2.2 茎段灭菌的处理效果 菌时间不好掌握,采用分段灭菌的方法效果比较好,最佳的  
茎段的灭菌相对幼嫩叶片来说难度大很多,污染率 处理方法为 B5 号。  
很高。由表 2 可以看出,茎段的灭菌比较困难,HgCl<sub>2</sub> 灭

表 2 茎段的灭菌方法及效果

Table 2 Sterilization methods and effect for stem segments

处理编号 Treatment number	处理方法 Treatment method				污染率 Rate of contamination/%	外植体表现 Performance of explants
	75%酒精	0.1% HgCl <sub>2</sub>	0.1% HgCl <sub>2</sub>	0.2% HgCl <sub>2</sub>		
B1	无木质化 25 s	无木质化 10 min	—	—	100	接种后 20 d 全部污染,长霉菌或细菌
	半木质化 35 s	半木质化 12 min	—	—		
B2	无木质化 25 s	无木质化 12 min	—	—	100	接种后 28 d 全部污染,长霉菌或细菌
	半木质化 35 s	半木质化 15 min	—	—		
B3	无木质化 25 s	无木质化 15 min	—	—	78	接种后 20 d 有未污染的茎段存活,但未污染褐变死亡的也达 60%
	半木质化 35 s	半木质化 18 min	—	—		
B4	无木质化 25 s	无木质化 2 min	无木质化 8 min	—	80	接种后 20 d 有未污染的茎段存活,但未污染褐变死亡的也达 50%
	半木质化 35 s	半木质化 3 min	半木质化 10 min	—		
B5	无木质化 25 s	无木质化 10 min	—	无木质化 5 min	36	接种后 20 d 有未污染的茎段存活,但未污染褐变死亡的也达 30%
	半木质化 35 s	半木质化 12 min	—	半木质化 6 min		

2.3 芽和花苞灭菌的处理效果 行了灭 1 次菌就剥去最外层苞片的处理,但是污染的情况  
芽和花苞由于其结构的特殊性,灭菌难度最大。由 还是很严重,有的甚至灭到外植体发黑,还依然长出  
表 3 可以看出,芽和花苞的灭菌最困难,每个处理都进 霉菌。对于芽和花苞的灭菌有待今后继续研究。

表 3 芽和花苞的灭菌方法及效果

Table 3 Sterilization methods and effect for buds

处理编号 Treatment number	处理方法 Treatment method				芽污染率 Rate of bud contamination/%	花苞污染率 Rate of flower bud contamination/%	外植体表现 Performance of explants
	75%酒精	0.1% HgCl <sub>2</sub>	0.1% HgCl <sub>2</sub>	NaClO			
C1	40 s	20 min	—	—	100	100	灭菌后 3 d,外表全部变黑,25 d 后,80%长白色霉菌,20%细菌污染
C2	40 s	15 min	5 min	—	100	100	部分能保持原有色泽,25 d 后,78%长白色霉菌,22%细菌污染
C3	40 s	10 min	—	15 min	90	71	芽污染全部长白色霉菌,花苞全部是细菌性污染
C4	40 s	15 min	—	20 min	80	67	芽污染全部长白色霉菌,花苞 80%属于细菌性污染
C5	40 s	10 min	6 min	20 min	57	75	芽污染全长白色霉菌,花苞 80%属于细菌污染

2.4 种子灭菌的处理效果 有外种皮的缘故,可加长灭菌时间抑制菌类的生长,单  
由于种子外被种皮,且外种皮光滑,灭菌比较容易 一用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 不能达到很好的灭菌效果,采用分段  
掌握。由表 4 可以看出,种子的灭菌相对容易,由于带 法效果理想。

表 4

种子的灭菌方法及效果

Table 4

Sterilization methods and effect for seeds

处理编号 Treatment number	处理方法 Treatment method			接种种子数 Inoculated explants/粒	污染种子数 Number of contamination/粒	污染率 Rate of contamination/%	外植体表现 Performance of explants
	75%酒精	0.1% HgCl <sub>2</sub>	0.2% HgCl <sub>2</sub>				
D1	20 s	20 min	—	32	16	50	灭菌后 3 d 陆续见污染,真菌与细菌各占一半
D2	30 s	30 min	—	22	10	45	灭菌后 3 d 即出现污染,80%为细菌污染
D3	40 s	20 min	20 min	30	1	3.3	种子污染极少,生长正常
D4	40 s	30 min	20 min	27	1	3.7	种子污染极少,生长正常

### 3 结论与讨论

应用于崇左金花茶外植体消毒的消毒剂有:75%的酒精、0.1% HgCl<sub>2</sub>、0.2% HgCl<sub>2</sub>、NaClO 溶液。研究表明,酒精配合升汞对崇左金花茶外植体的消毒处理仍然非常有效。

该试验结果表明,在供试的 6 种外植体中,幼嫩叶片和种子的灭菌效果最好掌握,幼嫩叶片较好的灭菌方法为用洗洁精清洗外植体表面+流水冲洗 30 min+75%酒精 40 s+0.1% HgCl<sub>2</sub> 5 min+0.1% HgCl<sub>2</sub> 5 min;种子较好的灭菌方法为洗洁精清洗外植体表面+流水冲洗 40 min+75%酒精 40 s+0.1% HgCl<sub>2</sub> 20~30 min+0.2% HgCl<sub>2</sub> 20 min;其次是半木质化茎段和幼嫩茎段的灭菌,幼嫩茎段较好的灭菌方法为洗洁精清洗外植体表面+流水冲洗 30 min+75%酒精 25 s+0.1%

HgCl<sub>2</sub> 10 min+0.2% HgCl<sub>2</sub> 5 min;半木质化茎段较好的灭菌方法为洗洁精清洗外植体表面+流水冲洗 30 min+75%酒精 35 s+0.1% HgCl<sub>2</sub> 12 min+0.2% HgCl<sub>2</sub> 6 min。该结果为下一步崇左金花茶组织培养体系的建立奠定了基础。

崇左金花茶供试的外植体中,芽和花苞的灭菌非常困难,由于其结构的特殊性,消毒时间太短,灭菌的效果非常差,但消毒时间过长,甚至灭菌到外植体发黑,都还有白色霉菌长出,可见芽和花苞的灭菌难度很大,有待今后继续研究。

#### 参考文献

- [1] 高继银,刘信凯,黄连东,等. 四季开花的茶花又一重大发现—金花茶家族中的佼佼者‘崇左金花茶’[J]. 中国花卉盆景,2010(1):2-4.
- [2] 梁盛业,黄连东. 金花茶新种—崇左金花茶[J]. 广西林业,2010(6):33.

## Study on Explants Sterilization of *Camellia chungtsoensis* S. Y. Liang et L. D. Huang

YANG Shu-ting, LIN Mao, WANG Hua-xin, TANG Qiu-ming, GONG Jian-ying, SUN Li-na  
(Guangxi Zhuang Autonomous Region Forestry Research Institute, Nanning, Guangxi 530002)

**Abstract:** Taking the young leaves, the tender stem segments, the half lignified stem segments, the leaf buds, the buds and the seeds of *Camellia chungtsoensis* S. Y. Liang et L. D. Huang as explants, with 75% alcohol, 0.1% HgCl<sub>2</sub>, 0.2% HgCl<sub>2</sub> and NaClO 4 kinds of sterilization agent for sterilization, explants in tissue culture of *Camellia chungtsoensis* S. Y. Liang et L. D. Huang optimal sterilization program were studied. The results showed that it was easy to the young leaves and the seeds to disinfect. The better disinfection condition for the young leaves was 75% alcohol sterilized for 30 s, 0.1% HgCl<sub>2</sub> of mercury disinfected for 5 minutes and 0.1% HgCl<sub>2</sub> of mercury disinfected for 5 minutes again. The better disinfection condition for the seeds was 75% alcohol sterilized for 40 s, 0.1% HgCl<sub>2</sub> of mercury disinfected for 20 to 30 minutes and then 0.2% HgCl<sub>2</sub> of mercury disinfected for 20 minutes. It wasn't easy to the stems to disinfect, the better way was time period of disinfection. The better disinfection condition for the young stems was 75% alcohol sterilized for 25 s, 0.1% HgCl<sub>2</sub> of mercury disinfected for 10 minutes and then 0.2% HgCl<sub>2</sub> of mercury disinfected for 5 minutes. The better disinfection condition for the half lignified stems was 75% alcohol sterilized for 35 s, 0.1% HgCl<sub>2</sub> of mercury disinfected for 12 minutes and then 0.2% HgCl<sub>2</sub> of mercury disinfected for 6 minutes. And difficult to the buds. It was difficult to achieve the desired effect of time period of disinfection with NaClO+HgCl<sub>2</sub> and successive strip the outer bracts sterilization method.

**Key words:** *Camellia chungtsoensis* S. Y. Liang et L. D. Huang; explants; sterilization