

冬枣组织培养的消毒方法

刘雪红, 刘俊华, 张孝霖

(滨州学院 生命科学系, 山东 滨州 256603)

摘要: 为了优化冬枣组织培养的消毒方法, 比较分析了乙醇、升汞、次氯酸钠和吐温等 4 种消毒剂对冬枣茎尖、叶片、茎段以及叶柄等组织培养的消毒效果。结果表明: 70%乙醇 30 s 0.1%升汞加 3~5 滴吐温 20 消毒 6 min 既能减少污染, 又能提高外植体的成活率, 综合效果最佳。

关键词: 冬枣; 组织培养; 消毒方法

中图分类号: S 665. 103. 6 文献标识码: B 文章编号: 1001-0009(2009)02-097-02

冬枣 (*Ziziphus jujuba* Mill cv. dongzao) 又名冻枣、雁来红、苹果枣、冰糖枣, 是我国独有的优良资源, 由于成熟期晚, 所以常称为冬枣。冬枣是目前公认的鲜食优质栽培品种。冬枣不仅有其它枣类的抗盐碱、耐瘠薄的特点, 而且营养丰富。北京营养源研究所 1994 年沾化冬枣分析表明: 冬枣内除含有其他枣果中的营养物质之外, 还含有人体所需的 19 种氨基酸和维生素 A、B、C、D 等多种维生素, 其中维生素 C 的含量高达 1 079. 1 μ g/L。冬枣还含有钾、钠、铁、铜等多种微量元素以及抗癌物质环磷酸腺苷、环磷酸鸟苷等^[1]。因此, 冬枣的需求量在不断增加, 但是由于冬枣资源缺乏, 而且用常规方法播种、嫁接、扦插等方式繁殖比较困难, 并且靠嫁接繁殖受到季节的限制, 且部分存在后期不亲和现象, 其砧木还会发生大量的萌蘖, 难以控制^[2]。所以就影响了优良枣品种的大面积发展, 但组织培养可以克服这些缺点。而组织培养的关键环节就是对材料进行消毒。

1 材料与方法

1.1 材料

供试品种为冬枣 (*Ziziphus jujuba* Mill cv. dongzao) 的水培茎和室外茎, 材料取自山东省沾化县冬枣研究所。

参照黄建等^[25]的文献, 以 MS 为基本培养基, 另添加 1.2 mg/L 6-BA 和 0.2 mg/L IBA, 消毒剂有 70%乙醇 0.1%升汞, 2.5%次氯酸钠溶液和吐温 20。

1.2 试验设计

1.2.1 乙醇和升汞处理 70%乙醇处理 30 s, 0.1%升汞处理分 6 min 和 8 min, 还有升汞两段消毒 2.5 min+3

次无菌水+3 min。2.5%次氯酸钠处理 5 min。10 个处理, 重复 5 次, 共 50 瓶(见表 1)。

表 1 乙醇、升汞和次氯酸钠处理设计

处理	70%乙醇/ s	0.1%升汞	2.5%次氯酸钠	外植体类型
A ₁	30	0 s	0 s	室外茎尖
B ₁	0	8 min	0 s	室外茎尖
C ₁	0	0 s	5 min	室外茎尖
D ₁	0	2.5 min+3 min	0 s	室外茎尖
E ₁	30	6 min	0 s	室外茎尖
F ₁	30	0 s	0 s	水培茎尖
G ₁	0	8 min	0 s	水培茎尖
H ₁	0	0 s	5 min	水培茎尖
I ₁	0	2.5 min+3 min	0 s	水培茎尖
J ₁	30	6 min	0 s	水培茎尖

1.2.2 加吐温 20 处理 加 3~5 滴吐温 20 分 4 个处理, 每个处理重复 6 次, 共 24 瓶, 处理情况详见表 2。

表 2 加吐温 20 处理

处理	70%乙醇/ s	0.1%升汞/ min	吐温 20	外植体类型
A ₂	30	6	加	室外茎尖
B ₂	30	6	加	水培茎尖
C ₂	30	6	不加	室外茎尖
D ₂	30	6	不加	水培茎尖

1.2.3 不同外植体的处理设计 冬枣水培茎尖幼嫩的茎段、茎尖、叶片和叶柄等材料用 70%乙醇 30 s, 0.1%升汞加 3~5 滴吐温 20 消毒 6 min, 各处理重复 5 次, 共 20 瓶。

1.3 试验过程、指标和统计分析方法

试验用的水培茎尖于 4 月份田间采集 1 a 生休眠枣头, 清洗干净后在光照培养箱内进行水培, 3 周后, 水培芽抽生约 10 cm 时, 剪下新生枣头用洗洁精浸泡 5~8 min, 流水冲洗 2 h, 将清洗好的材料放置到超净工作台上, 供试验材料用。室外茎尖于天气晴朗的中午采集生长旺盛的冬枣新生枣头与水培的新生枣头做同样的处理。在无菌的环境条件下消毒, 用无菌水反复冲洗 3~4 次后进行切段, 最后接种。接种后均置于培养室培养。接种时各类型外植体剪成不同规格, 叶片为 0.5 cm×0.5 cm, 茎段为 1.0 cm, 叶柄 0.8 cm, 茎尖为 1.0 cm。每

第一作者简介: 刘雪红(1976-), 女, 硕士, 讲师, 主要从事植物细胞工程教学与研究工作。E-mail: liuxue-hong@tom.com.
基金项目: 滨州学院自然科学基金资助项目(BZXYQ NLG2005 015)。
收稿日期: 2008-08-18

瓶处理放 6 个小段,培养温度为 $(28\pm2)^{\circ}\text{C}$,光照强度 $2\,000\,\text{lx}$,光照 $12\,\text{h/d}$,基本培养基为 $\text{MS}+1.2\,\text{mg/L}\,6\text{-BA}+0.2\,\text{mg/L}\,\text{IBA}+$ 蔗糖+琼脂。

从接种完起,每天观察其生长和污染情况,30 d 后统计其污染率,并计算其成活率,进行分析得出最佳方案。

2 结果与分析

2.1 乙醇、升汞和次氯酸钠对消毒效果的影响

从表 3 可知,对室外茎尖和水培茎尖来说 B_1 和 G_1 的消毒效果最好,污染率分别为 $(27.8\pm5.5)\%$ 和 $(11.1\pm3.5)\%$;而从水培茎尖和室外茎尖来看,各种处理方案中都是水培茎尖优于室外茎尖。因此在选择外植体时水培茎尖是最佳的。

表 3 乙醇、升汞和次氯酸钠对消毒效果的影响

处理	70%乙醇/s	0.1%升汞	2.5%次氯酸钠	污染率/%	成活率/%
A_1	30	0 s	0 s	$94.4\pm3.5^{\text{a}}$	$41.7\pm3.7^{\text{a}}$
B_1	0	8 min	0 s	$27.8\pm5.5^{\text{e}}$	$72.2\pm3.5^{\text{b}}$
C_1	0	0 s	5 min	$69.5\pm2.8^{\text{b}}$	$19.5\pm2.8^{\text{c}}$
D_1	0	2.5 min+3 min	0 s	$44.4\pm5.6^{\text{d}}$	$69.4\pm6.7^{\text{b}}$
E_1	30	6 min	0 s	$30.6\pm5.1^{\text{cd}}$	$86.1\pm5.1^{\text{b}}$
F_1	30	0 s	0 s	$36.1\pm2.8^{\text{cd}}$	$77.8\pm3.5^{\text{b}}$
G_1	0	8 min	0 s	$11.1\pm3.5^{\text{e}}$	$75.0\pm5.7^{\text{b}}$
H_1	0	0 s	5 min	$25.0\pm3.7^{\text{ce}}$	$30.6\pm5.1^{\text{c}}$
I_1	0	2.5 min+3 min	0 s	$19.5\pm2.8^{\text{c}}$	$80.6\pm5.1^{\text{b}}$
J_1	30	6 min	0 s	$13.9\pm5.1^{\text{e}}$	$91.7\pm3.7^{\text{b}}$

注:小写字母不同表示差异显著($P<0.01$)。

虽然用 0.1%升汞单独消毒 8 min 污染最少,效果最佳,但成活率却比 70%乙醇处理 30 s,再用 0.1%升汞处理 6 min 的低 15%~20%。因此,综合考虑消毒效果和成活率两方面,应是水培茎尖用 70%乙醇处理 30 s,再用 0.1%升汞处理 6 min 效果最佳。

2.2 吐温 20 对消毒效果的影响

表 4 吐温 20 对消毒效果的影响

处理	吐温 20	外植体类型	污染率/%	成活率/%
A_2	加	室外茎尖	$27.8\pm5.5^{\text{a}}$	$88.9\pm3.5^{\text{ab}}$
B_2	加	水培茎尖	$8.4\pm3.7^{\text{b}}$	$94.4\pm3.5^{\text{b}}$
C_2	不加	室外茎尖	$30.6\pm5.1^{\text{a}}$	$80.5\pm2.8^{\text{a}}$
D_2	不加	水培茎尖	$11.1\pm3.5^{\text{b}}$	$91.7\pm5.7^{\text{ab}}$

注:小写字母不同代表差异显著($P<0.05$)。

从表 4 可见,加吐温 20 比不加吐温 20 的污染率明显下降,加吐温 20 的水培茎尖污染率仅为 $(8.4\pm$

$3.7)\%$,不加的为 $(11.1\pm3.5)\%$,成活率也上升了 5%~10%,以后的生长分化状况也比较好。

2.3 不同外植体取材对组织培养的影响

从表 5 可见,茎段和茎尖的污染率要比叶片和叶柄的稍高些,但是它们之间不存在显著差异。而茎段和茎尖的成活率要比叶片和叶柄的高出约 10%~15%,这可能与茎尖的分生组织分生能力比较旺盛有关,所以有利于外植体的成活。

表 5 不同外植体对消毒效果的影响

外植体类型	污染率/%	成活率/%
茎段	$19.5\pm2.8^{\text{a}}$	$91.7\pm3.7^{\text{ab}}$
茎尖	$16.7\pm4.3^{\text{a}}$	$97.2\pm2.8^{\text{a}}$
叶片	$13.9\pm5.1^{\text{a}}$	$83.5\pm6.0^{\text{b}}$
叶柄	$11.1\pm5.6^{\text{a}}$	$80.6\pm5.1^{\text{b}}$

注:小写字母不同代表差异显著($P<0.05$)。

3 讨论与结论

试验研究了不同消毒方法对冬枣消毒效果的影响结果表明:70%乙醇 30 s,0.1%升汞加 3~5 滴吐温 20 消毒 6 min 既能减少污染,又能提高外植体的成活率。这与任敬民等^[3]的试验结果是一致的。70%乙醇比其它浓度的乙醇具有更强的杀菌力和穿透力,而且有湿润作用,可排除材料上的空气,利于其它消毒剂的渗入^[4],所以与升汞配合使用消毒效果更好。升汞有剧毒,消毒效果好,只是消毒后难以去除残余的汞,所以消毒后要多次冲洗,以减少对组织细胞造成的伤害。吐温 20 的作用原理是能使消毒药剂更好地与材料表面接触,促进消毒药剂与材料的结合,加快消毒进程,使消毒效果更好^[3]。

参考文献

[1] 李守勇 续九如,张华丽.冬枣研究进展[J].中国果树,2004(1):47-51.
[2] 黄建,马锦旺,攀军锋,等.枣树离体叶片不定芽再生体系建立的研究[J].西北植物学报,2006,26(5):942-948.
[3] 任敬民 陈跃进,郭丽明.台湾青枣组织培养的消毒方法[J].湖北农业科学,2004(1):65-68.
[4] 徐化凌 陈纪香,于德花,等.沾化冬枣组培快繁技术研究[J].山东林业科技,2003(5):29-30.
[5] 王玉珍.冬枣茎尖离体培养成苗[J].植物生理学通讯,1996,32(1):26-32.
[6] 曹孜义 刘国民.实用植物组织培养技术教程[M].兰州:甘肃科学技术出版社,1996:39.

Sterilized Methods on Tissue Culture of Winter *Ziziphus Jujuba*

LIU Xue-hong, LIU Jun-hua, ZHANG Xiao-lin

(Department of Life Science, Binzhou University, Binzhou, Shandong 256603, China)

Abstract: Effects of sterilization on explants and growth on callus were studied in the stem tip, lamina, stem segment and leafstalk tissue culture of winter *Ziziphus jujuba* by means of 70% alcohol, mercuric chloride, sodium hypochlorite and tween-20 in order to establish the sterilization method of the tissue culture. The result indicated that 70% alcohol sterilized the explants for 30 seconds, 0.1% mercuric chloride with 3~5 drops of tween-20 sterilized the explants for six minutes, which not only decreased the explants pollution rate, but also promoted the survival rate of the explants.

Key words: *Ziziphus jujuba*; Tissue culture; Sterilized methods