

# 亮叶忍冬外植体灭菌方法的研究

王 丹, 李洪娜, 骆建霞, 柴慈江

(天津农学院 园艺系 天津 300384)

**摘 要:** 以亮叶忍冬带芽茎段为试材, 对影响外植体组织培养的灭菌方法进行研究。结果表明: 先用 70%酒精进行表面浸润消毒处理 15 s, 然后用 2%次氯酸钠处理 15 min, 外植体污染率低, 存活率高, 发芽率高, 新梢生长量也相对较高; 在接种之前保留部分外植体叶片可以降低污染率, 促进发芽及新梢生长; 培养基中添加蔗糖可以促进发芽。

**关键词:** 亮叶忍冬; 外植体; 灭菌方法; 污染率; 发芽率

**中图分类号:** S 793.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)06-0150-03

亮叶忍冬 (*Lonicera nitida* 'Maigrun') 为忍冬科忍冬属灌木, 在北方落叶, 南方为常绿灌木。主要特点是株型紧凑, 叶色亮绿, 生长旺盛, 萌芽力强, 分枝茂密, 极耐修剪; 耐寒力强, 能耐 -20℃低温, 也耐高温; 对光照不敏感, 在全光照下生长良好, 也能耐荫; 对土壤要求不严, 在酸性土、中性土及轻盐碱土中均能适应<sup>[1]</sup>。亮叶忍冬为我国近些年由国外引入的新型地被植物, 这种植物具有优良的观赏价值, 引入天津后表现出对天津地区环境条件较强的适应性。因其可在一定范围内替代草坪, 可以节约大量绿化灌溉用水和管理用工, 这对于天津市水资源极为缺乏的现状也具有较大的实用价值<sup>[2]</sup>。

亮叶忍冬为匍匐生长的木本地被植物中的佼佼者, 深受园林工作者的欢迎, 推广的地区已越来越多。目前亮叶忍冬的市场需求很大, 而现阶段这种植物的繁殖方法主要是扦插繁殖。现研究不同药剂、不同处理时间、处理外植体方法等因素对亮叶忍冬外植体灭菌效果的影响, 以期获得亮叶忍冬无菌材料, 对建立亮叶忍冬快繁体系具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

选取长势好、无病虫害、健康的亮叶忍冬母株上新梢的带芽茎段(采于天津农学院西校区地被植物园)。试验药剂为安替福林(2%次氯酸钠)、升汞(0.1%氯化汞)、70%酒精。

### 1.2 试验方法

表面消毒用 70%乙醇浸泡使之没过, 并不断搅拌 15 s 左右将乙醇倾去(可将外植体表面的脂类物质溶解), 浸泡时间不易过长<sup>[3]</sup>。之后进行以下试验。

1.2.1 试验方案一 一组将表面消毒后的材料移入 2%次氯酸钠溶液, 分别浸泡 0.5、10、15、20 min; 另一组将材料移入 0.1%的升汞溶液, 分别浸泡 0.3、6、9、12 min。消毒后的材料立即用无菌水清洗 4 次, 在培养皿中切取外植体茎段接种于培养基上。每个灭菌处理接种 8 瓶, 每瓶接种 4 株。

1.2.2 试验方案二 将外植体用 2%次氯酸钠灭菌 10 min 后, 在添加蔗糖的培养基中接种 8 瓶, 每瓶 4 株, 在无蔗糖的培养基中接种 10 瓶, 每瓶 4 株。

1.2.3 试验方案三 将外植体用 2%次氯酸钠灭菌 10 min 后进行叶片处理, 一组保留外植体的 1/3 叶片, 另一组完全去掉叶片, 各组接种 8 瓶, 每瓶 4 株。

### 1.3 培养条件

培养温度为 (25±2)℃, 光照时间 12 h/d, 光照强度为 1 500~2 000 lx, 空气相对湿度 60% 以下。

### 1.4 指标测定

接种后每天观察外植体生长情况, 接种 13 d 后进行观察测定每个处理中被污染的外植体数, 以及每个处理中发芽的外植体数。发芽率(%)=发芽外植体数/接种外植体数×100%; 污染率(%)=污染外植体数/接种外植体数×100%; 新梢生长量为每个处理中的各株出芽长度之和。

## 2 结果与分析

### 2.1 次氯酸钠的处理灭菌效果

从表 1 可以看出, 用 2%次氯酸钠处理不同时间后, 灭菌效果有明显差异。不做灭菌处理的亮叶忍冬外植体全部被污染, 并且未观察到有芽发出; 而经次氯酸钠处理后, 其污染率大幅度下降, 经 5~20 min 处理后的污染率仅有 6%~19%。处理 20 min 后, 外植体的污染率为 19%, 但发芽率仅 3%, 且新梢生长量很小, 可能是由于灭菌药剂对于植物组织是有毒的, 处理时间过长, 影响发芽。综合污染率、发芽率及新梢生长量等测定指

第一作者简介: 王丹(1979-), 女, 硕士, 讲师, 现从事植物学教学与科研工作。E-mail: wd724@163.com。

收稿日期: 2009-12-20

标,用2%次氯酸钠对亮叶忍冬外植体灭菌时以处理15 min 为宜。

表1 2%次氯酸钠不同消毒时间对外植体的影响

处理时间 / min	接种数 / 个	污染数 / 个	发芽数 / 个	污染率 / %	发芽率 / %	新梢生长量 / mm
0	32	32	0	100	0	0
5	32	5	8	16	25	63
10	32	3	3	9	9	14
15	32	3	9	6	28	57
20	32	6	1	19	3	2

2.2 升汞处理的灭菌效果

从表2可以看出,0.1%升汞处理后,无论哪个处理时间下,亮叶忍冬外植体的污染率均为0,取得了很好的灭菌效果,不做灭菌处理的亮叶忍冬外植体污染率为100%,说明升汞的灭菌能力强。从各处理时间的发芽率和新梢生长量的测定指标看,处理3 min后发芽率最高,新梢生长量也最高。而随处理时间延长,发芽率和新梢生长量明显下降,当处理12 min时发芽率为0,这可能是由于汞离子有剧毒,会使外植体受到汞离子的毒害而死亡,致使发芽数量变小,甚至为0。因此,在控制污染发生的过程中,用升汞做灭菌处理的时间不宜过长,控制在3 min左右为宜。

表2 0.1%升汞不同消毒时间对外植体的影响

处理时间 / min	接种数 / 个	污染数 / 个	发芽数 / 个	污染率 / %	发芽率 / %	新梢生长量 / mm
0	32	32	0	100	0	0
3	32	0	4	0	13	26
6	32	0	1	0	3	4
9	32	0	3	0	9	6
12	32	0	0	0	0	0

2.3 培养基中添加蔗糖对外植体的影响

从表3可以看出,进行亮叶忍冬外植体灭菌培养时,在培养基中不添加蔗糖虽然与添加蔗糖后的污染率差异不大,但用不添加蔗糖的培养基进行外植体培养,其发芽的数量和新梢生长量明显不如添加蔗糖的处理。因此,培养基中添加蔗糖可以促进亮叶忍冬外植体发芽以及新梢的生长。

表3 在添加蔗糖和没加蔗糖的培养基中培养情况

处理	接种数 / 个	污染数 / 个	发芽数 / 个	污染率 / %	发芽率 / %	新梢生长量 / mm
添加蔗糖	32	9	3	28	9	14
没有蔗糖	40	12	0	30	0	0

2.4 外植体保留叶片对灭菌效果的影响

从表4可以看出,在灭菌处理之后完全去掉叶片的外植体灭菌率比不完全去掉叶片的外植体污染率高些。从发芽率方面看,完全去掉叶片的外植体和不完全去掉叶片的相差较小,但不完全去掉叶片的外植体新梢生长量明显比完全去掉叶片的高。结果表明,亮叶忍冬外植

体灭菌处理后接种前保留少部分叶片有利于芽的生长。

表4 完全去掉亮叶忍冬外植体叶片和保留部分叶片的2组培养情况

处理	接种数 / 个	污染数 / 个	发芽数 / 个	污染率 / %	发芽率 / %	新梢生长量 / mm
完全去掉叶片	32	0	2	0	6	2
不完全去叶片	32	3	3	9	9	14

3 结论与讨论

3.1 关于亮叶忍冬外植体灭菌药剂和灭菌时间

消毒药剂和消毒时间对外植体的消毒效果有明显的影响,为达到理想的灭菌效果必须根据不同接种材料的具体情况确定最佳的消毒药剂和处理时间<sup>[4]</sup>。试验用0.1%升汞消毒得到的灭菌效果较好,污染率均为0,但发芽率较低,当处理时间是3 min的时候,发芽率仅有13%,新梢生长量相对也很小,其它几个处理时间后,发芽率和新梢生长量都很小,这可能是由于所用升汞的浓度稍高,也可能是由于处理时间过长,而导致植物组织细胞被破坏,影响了外植体的诱导分化,从而使发芽率和新梢生长量较低。试验表明,以亮叶忍冬茎段为外植体时,先用70%酒精表面浸润处理15 s,然后用2%次氯酸钠处理15 min后,所获得的无菌材料最多,存活率高达94%,发芽率最高,新梢生长量也最大;0.1%升汞比2%次氯酸钠的灭菌效果好,但是经0.1%升汞处理后的发芽率和新梢生长量很低,而经2%次氯酸钠处理15 min后发芽率和新梢生长量都比较高。因此亮叶忍冬茎段最佳灭菌药剂是2%次氯酸钠,其处理时间是15 min。

3.2 关于亮叶忍冬外植体的培养基中是否添加蔗糖

在试验中,添加蔗糖的培养基中外植体的污染率和没加蔗糖的外植体的污染率相差很小,从降低培养成本的角度看,在培养基中可以不添加蔗糖,然而不添加蔗糖亮叶忍冬外植体的发芽和新梢生长却受到了明显的抑制。因此,在进行亮叶忍冬组织培养时候,添加少量的蔗糖,不会使亮叶忍冬外植体污染率明显增大,且能促进芽和新梢的生长。

3.3 关于亮叶忍冬外植体接种时保留叶片

组培快繁过程中外植体对培养效果的影响很大,当外植体叶片过大时会导致污染率增大,降低组培质量。试验中保留小部分叶片的亮叶忍冬外植体比完全去掉叶片的外植体污染率大些,但是保留小部分叶片的外植体发芽率及新梢生长量都较完全去掉叶片的高很多,这可能是由于叶片可以进行光合作用,而光合作用有利于植物的生长发育,因此,在灭菌后接种前保留少量叶片对外植体的分化及生长都有促进作用。结果表明,亮叶忍冬外植体灭菌以后,在接种之前可以保留少部分叶片。

# 金毛狗离体培养及再生植株体系的建立

李 雪<sup>1,2</sup>, 叶清梅<sup>1</sup>, 詹启成<sup>1</sup>, 康宝莲<sup>1</sup>, 简丽观<sup>1</sup>, 黄敏玲<sup>2</sup>

(1. 泉州市泉美生物科技发展有限公司, 福建 泉州 362012 2. 福建省特色花卉工程技术研究中心, 福建 福州 350013)

**摘 要:** 利用金毛狗孢子进行离体培养及再生植株的研究。结果表明: 孢子采用 2% 次氯酸钠消毒 10~12 min 获得无菌材料最佳。孢子萌发受培养基盐离子影响很小, 其平均萌发率为 91.25%。形成原叶体需 60~90 d。原叶体诱导孢子体最佳培养基为 1/10 MS, 生成孢子体需 80~110 d。原叶体形成孢子体有 3 种方式。孢子体增殖培养基 1/4MS+KT 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L+卡拉胶 4.5 g/L, pH 5.8; 生根培养基为 MS+0.1% AC+蔗糖 30 g/L+卡拉胶 4.5 g/L, pH 5.8; 组培苗移栽成活率达 98.67%。

**关键词:** 金毛狗; 孢子; 离体培养; 再生植株

**中图分类号:** S 682.35 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)06-0152-04

金毛狗 (*Cibotium barometz* (L.) J. Sm.), 蚌壳蕨科 (Dicksoniaceae) 金毛狗属大型树状陆生蕨类。根状茎粗壮肥大, 露出地面部分密被金黄色长茸毛, 似伏地的金毛狗<sup>[1-3]</sup>。叶簇生茎顶端, 3 回羽状分裂, 叶柄长达 1 m 以上。金毛狗根状茎富含淀粉, 可食用和酿酒, 具有补肝

肾、除风湿、利尿通淋, 茎上茸毛能止血, 入药时称金毛狗脊<sup>[4]</sup>。金毛狗也是大型的室内观赏及庭院植物, 根状茎可制成工艺品。目前其自然生存环境破坏严重, 加之过度采挖, 野生资源日渐枯竭, 已列入我国首批植物保护名单<sup>[5]</sup>。通过金毛狗组织培养的研究, 对保护野生资源、扩大该物种分布的数量, 对该物种的开发利用等具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

成熟孢子 (图 1) 于 2002 年 12 月采自泉州市五台山林场。

**第一作者简介:** 李雪 (1968-), 男, 重庆大足人, 硕士, 现从事园艺植物选育和快繁及产业化研究工作。E-mail: Snowthlee@yaho.com.cn.

**基金项目:** 福建省科技厅科研资助项目 (2008N2003)。

**收稿日期:** 2009-12-25

## 参考文献

- [1] 顾顺仙, 林爱寿. 花境新优植物应用及养护 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005.
- [2] 张金锋. 地被植物在园林绿化中的应用初探 [J]. 北方园艺, 2007, 24 (4): 158-159.

- [3] 李群, 陈丽萍, 石铁松. 马蹄莲组织培养过程中真菌和细菌污染的消除方法研究 [J]. 四川师范大学学报 (自然科学版), 2001, 24(6): 607-609.
- [4] 朱广廉. 植物组织培养中的外植体灭菌 [J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(6): 444-449.

## Study on the Sterilization Materials of *Lonicera nitida* 'Maigrun'

WANG Dan, LI Hong-na, LUO Jiang-xia, CHAI Ci-jiang

(Department of Horticulture, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384)

**Abstract:** The effects of investigated by using *Lonicera nitida* 'Maigrun' as testing material. The results indicated that the most sterilized materials could be obtained, and the explants with lower contaminated rate, higher survival rate, relatively higher germination rate and longer shoot growth were observed when the explant treated with 70% alcohol as surface sterilization for 15 min, then with 2% NaClO for 15 min. Contaminated rate could be declined, while germination and shoot growth were enhanced by keeping explant with parts of leaves before inoculation. Increasing cane sugar in the medium could promote the germination effectively.

**Key words:** *Lonicera nitida* 'Maigrun'; explant; sterile method; contaminated rate; germination