

二步灭菌法在植物组织培养中的应用

杨宇, 金强, 王新建

(新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300)

摘要: 在马铃薯茎尖组织培养过程中, 对外植体不同的灭菌方法进行研究。结果表明: 用流水冲洗 24 h, 可以降低外植体的污染率和褐化率, 同时对材料的生长无较大影响。升汞的灭菌效果虽然好于次氯酸钠, 但接种后的效果较差。化学药剂的处理时间为 5 min 时, 虽然污染率稍高, 但其接种后效果相对较好。

关键词: 化学试剂; 灭菌; 时间

中图分类号: Q 943.1 文献标识码: B 文章编号: 1001-0009(2010)07-0143-02

植物组织培养技术起源于 20 世纪, 至今有约 100 a 的历史。现植物组织培养技术已在科研和生产中广泛应用, 成为最常用的生物技术手段之一。虽然植物组织培养的操作过程并不复杂, 但在试验和生产过程中常常会因外植体灭菌不彻底导致组培无法取得预期效果, 给科研和生产造成损失, 因此外植体的灭菌技术, 直接影响整个组织培养过程的进行^[1]。该试验以马铃薯茎尖为外植体, 研究二步灭菌法在植物组织培养中的应用效果, 以期为进一步研究组培生产提供借鉴^[2]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为双丰 5 号马铃薯块茎。

1.2 试验方法

1.2.1 流水冲洗灭菌 供试马铃薯在室温下催芽萌发, 待茎尖长到 1~3 cm 时, 选取强壮的芽用刀片切下放入烧杯, 用纱布封好杯口, 分别用流水冲洗 1、2、24、36、48 h 后, 在超净工作台上, 将其置于灭菌培养皿内, 用无菌滤纸吸干水备用。用 75% 酒精浸泡 10 s, 转入 0.1% 的升汞浸泡 5 min 后取出, 用无菌水反复冲洗, 接种。

1.2.2 化学药剂处理灭菌 将外植体流水冲洗 2 h 后, 在超净工作台上用 75% 酒精浸泡 10 s, 转入 0.1% 的升汞或 5% 的次氯酸钠溶液中浸泡, 若干时间后取出 (见表 1), 用无菌水反复冲洗, 接种。

1.2.3 马铃薯茎尖的接种及培养 在无菌条件下, 切取马铃薯茎尖 3~5 mm, 接种于 MS+NAA 0.2 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 培养基中, 每瓶接 4 个, 培养温度

(25±2) °C 光照强度 1 500~2 000 lx, 光周期性 12 h/d。

表 1 化学试剂的种类及处理时间

化学试剂	5%的次氯酸钠			0.1%的升汞		
	3	5	7	3	5	7
处理时间/min						
处理代码	C ₁	C ₂	C ₃	S ₁	S ₂	S ₃

1.3 结果观察和统计方法

马铃薯茎尖接种 10 d 后统计其污染率、褐化率、出芽率, 20 d 后统计芽长势。

2 结果与分析

2.1 不同流水冲洗时间对马铃薯茎尖接种效果的影响

为了使植物材料消毒彻底, 采摘的植物材料必须迅速进行清洗。由图 1 可知, 流水不同冲洗时间对外植体的接种效果影响程度不同。随冲洗时间的增加, 外植体培养过程中的污染率、褐化率和出芽率都有不同程度的下降。流水冲洗 1、2 h 对外植体的接种效果影响不大, 冲洗 24 h 的马铃薯茎尖接种后的污染率则显著低于流水冲洗 1、2 h 的污染率, 继续延长冲洗时间, 污染率变化幅度不大。流水冲 36 h 的外植体接种后出芽率显著低于流水冲洗时间少于 24 h 的出芽率, 继续延长冲洗时间, 出芽率下降幅度不大。流水冲洗时间长于 24 h, 对减轻植物外植体接种后褐化现象的发生有显著效果。因此流水冲洗 24 h, 即可以降低外植体的污染率和褐化率, 又同时对材料的生长无较大影响。

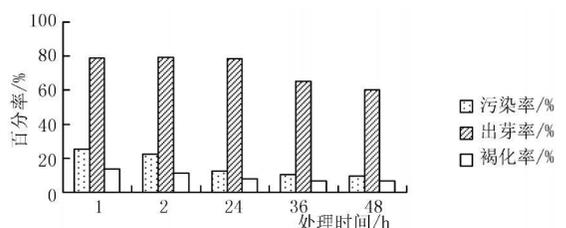


图 1 不同流水处理时间对马铃薯茎尖接种效果的影响

第一作者简介: 杨宇(1978-), 女, 硕士, 讲师, 现主要从事园艺植物细胞工程方面的研究工作。

基金项目: 马铃薯耐盐变异株系的离体筛选及鉴定资助项目(TDZKSS08003)。

收稿日期: 2009-12-09

2.2 不同化学药剂处理对马铃薯茎尖接种效果的影响

不同化学药剂和不同的灭菌时间,对植物外植体的接种效果影响程度不同。由表 2 可知,分别用升汞和次氯酸钠对马铃薯茎尖处理灭菌后,升汞处理的材料污染率和芽长势普遍较低,而死亡率显著高于次氯酸钠,但出芽率及褐化率则差异不大,而出芽率受时间影响的程度更大。总体看来,升汞的灭菌效果较好,但接种后的效果则远不如次氯酸钠。

表 2 不同化学药剂处理对马铃薯茎尖接种效果的影响

处理	污染率/ %	死亡率/ %	褐化率/ %	出芽率/ %	20 d 芽长/ cm
C ₁	21.34	13.78	11.56	71.78	2.24
C ₂	17.45	9.25	11.78	85.35	3.25
C ₃	13.23	8.45	11.84	88.36	2.15
S ₁	16.86	18.15	11.23	81.28	1.25
S ₂	11.57	11.13	11.56	79.26	1.67
S ₃	8.25	15.25	12.10	73.12	1.92

从不同化学药剂处理时间来看,在试验范围内处理时间越长,外植体接种后的污染率和死亡率越低,而褐化率则越高。用次氯酸钠处理后的材料出芽率与处理时间成正比,处理时间越长,出芽率越高,用升汞处理后的材料出芽率与处理时间则与之相反。从芽的长势来看,次氯酸钠处理 5 min 的芽长势最好,显著高于其它处理,而用升汞处理的材料长势,在试验范围内则随处理时间的增加而增强。总体看来,化学药剂的处理时间为 5 min 时,虽然污染率稍高,但其接种后效果相对较好。

经研究表明,随着化学试剂灭菌时间的缩短,污染率和死亡率均提高,虽然对减轻褐化有一定的帮助,但出芽率和芽长势也相应降低;最佳的化学试剂和处理时间的组合为:用次氯酸钠灭菌 5 min,污染率低,平均出芽数较高。

3 讨论

在组织培养中,有效无菌材料的获得是植物组织培养成功的重要前提和根本保证^[3]。为了使外植体消毒

彻底,采回的植物材料必须迅速进行清洗。传统的组培方法对采集到的植物材料清洗并不重视,一般根据材料的性质用自来水冲洗 5~15 min 即可,通过该试验系统的研究发现,适当加长流水清洗时间,可以有效的降低外植体的污染率。这可能是因为是在流水冲洗的过程中,不仅可以将灰土和较大的杂菌冲洗掉,还可能由于长时间的流水冲洗,使得一些小孢子得以快速生长,形成较大的杂菌,继而被流水冲洗掉,从而达到降低污染率的效果。所以,当外植体上的大部分小孢子都被冲洗掉后,继续延长流水冲洗时间,不但对降低污染率影响不大,还会影响材料的接种效果。经研究表明,流水冲洗 24 h,可有效降低外植体的污染率和褐化率,同时对材料的生长无较大影响。

组织培养过程中,尽管绝大多数人都认为灭菌的关键技术是外植体需要用化学药剂处理,但很少有人考虑灭菌效果的同时,还考虑到接种效果^[4]。该试验系统研究了次氯酸钠和升汞的处理时间对外植体的灭菌效果及对材料接种后的生长发育的影响。研究表明,升汞的灭菌效果虽然好于次氯酸钠,但接种后的效果较差。而化学药剂的处理时间为 5 min 时,虽然污染率稍高,但其接种后的效果相对较好。因此,在进行外植体灭菌时,根据试验目的来确定灭菌化学试剂种类和浓度及灭菌时间,不仅能够保证外植体的灭菌效果,还能对组培材料后期的发育起到一定的促进作用。

参考文献

- [1] 张桂海. 组织培养过程中的关键问题探讨[J]. 中国果菜, 2006(6): 28
- [2] 张月娇. 组织培养中有效无菌材料获得的试验研究[J]. 湖北林业科技, 2004(3): 20-22
- [3] 朱小虎, 王晓炜, 米立刚. 植物组织培养中存在的问题及改进方法[J]. 新疆农业科学, 2006 43(S1): 95-98
- [4] 马兰珍, 韦立秀, 薛鹰. 杂交松组织培养中外植体的灭菌方法[J]. 广西科学院学报, 2005, 21(1): 37-39.

Application of Two-Step Asepsis in Plant Tissue Culture

YANG Yu, JIN Qiang, WANG Xin-jian

(Key Laboratory of Tarim Basin Protection and Utilization of the Biological Resources of Xinjiang Production and Construction Corps Alar, Xinjiang 843300)

Abstract: Effective asepsis material obtained among tissue culture was a basic guarantee for successful tissue culture in plant. As a result, flushing for 24 hours could reduce the polluted rate and brown rate of plant, meantime it was of a sort to growth of plant. The sterilization effect of HgCl₂ was better than NaClO but the result of inoculability was worse. Although the polluted rate was high, the effect of inoculability was better when the time of chemical medicine treatment was 5 min.

Key words: two-step; bactericidal; application