

山桃外植体的安全消毒方法研究

张雪冰, 王 鸿, 张 帆, 陈建军, 李宽莹
(甘肃农业科学院林果花卉研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 以甘肃山桃为材料, 采用 75% 的乙醇、0.1% 的氯化汞(HgCl_2)、消毒片(有效氯 500 mg/片)、新型植物组织培养防污染杀菌剂植培灵和益培隆, 对材料茎段消毒效果行进比较, 以筛选出合理有效的消毒方法来替代氯化汞消毒。结果表明: 采用 0.1% 的氯化汞(HgCl_2)与 75% 乙醇组合使用的消毒效果要明显好于消毒片, 植培灵和益培隆的污染率均为 0%, 其中益培隆的死亡率高于植培灵。综合考虑污染率、死亡率、对植物生长的影响以及废液对环境的影响等因素, 植培灵为替代传统氯化汞(HgCl_2)消毒的最佳选择。

关键词: 山桃; 外植体; 消毒方法; 组织培养

中图分类号: S662.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2019)06-0029-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2019.06.008

核果类果树是我国果树栽培的重要种类。随着科学技术的发展和人民生活水品的

收稿日期: 2019-04-01

基金项目: 国家自然科学基金(31760558); 国家桃产业技术体系(CARS-30-1-6); 农业农村部西北地区果树科学观测实验站(S-10-18)。

作者简介: 张雪冰(1990—), 女, 甘肃成县人, 研究实习员, 主要从事种苗的组培快繁体系研究工作。联系电话: (0)13893680163。Email: 460332042@qq.com。

通信作者: 王 鸿(1973—), 男, 甘肃灵台人, 研究员, 硕士生导师, 主要从事果树生理栽培与育种。Email: wanghong@gsagr.ac.cn。

源激素有关, 需做进一步研究^[5]。

各个条件下天山雪莲组织培养物总黄酮测定结果均符合《中华人民共和国药典(2015版)》规定的含量, 不同培养基的天山雪莲培养物总黄酮的含量均有差异, 可为天山雪莲总黄酮的生产提供参考依据。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 53-54.
- [2] 王 强, 刘运权, 王 涛, 等. 不同产地雪莲中绿原酸和芦丁含量测定及其煎煮提取工艺优化[J]. 中国药房, 2016, 27(25): 3539-3541.
- [3] 陈日道, 刘 晓, 邹建华, 等. 雪莲悬浮培养细胞中紫丁香苷、绿原酸和 1, 5-二咖啡酰奎尼酸的生物合成调控[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(12): 2275-2280.
- [4] 胡雪梅, 秦 丽, 贺 宾, 等. 新疆雪莲组织培养体系的优化[J]. 新疆农业科学, 2007(3): 333-335; 385
- [5] 覃建兵, 庞红霞, 祝长青. 植物激素对新疆雪莲愈伤组织诱导和分化的影响[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2009, 43(4): 633-636.
- [6] 刘 莹. 雪莲组织培养及次生代谢调控研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2009.
- [7] 林 侃, 王晓军, 赵民安, 等. 新疆雪莲体胚诱导与分化研究[J]. 西北植物学报, 2006(7): 1351-1354.
- [8] 吕亚丽, 王艳芳, 张福生, 等. 不同理化因素对雪莲组培苗生长及总黄酮量的影响[J]. 中草药, 2012, 43(1): 173-177.
- [9] 韦善君, 武运芳, 罗云燕, 等. 濒危药用植物新疆雪莲资源的研究进展[J]. 中央民族大学学报(自然科学版), 2014, 23(2): 10-15.

(本文责编: 郑立龙)

提高, 现有的果品品种已经满足不了人们的需求, 当务之急选育出优良品种十分重要, 而组培快繁技术为果树的遗传育种开辟了新道路^[1]。桃是蔷薇科桃属核果类果树, 现利用组培快繁技术, 能够有效的缩短苗木繁育周期, 提高种苗的繁育系数, 同时也促进了桃的产业化发展^[2]。果树是一种高度杂合体, 实生苗间差异很大, 常常影响试验结果。茎尖无性繁殖可以获得大量苗木, 能为这类试验提供整齐一致的理想试验材料^[3-4]。然而, 外植物污染是植物组织培养的三大难题之一, 污染的主要原因之一就是外植体带菌^[5]。首先是外植体的选取, 其中包括选取部位和选取时间; 其次是外植体消毒方法的选择, 一般外植体的表面和内部都会携带一些菌, 而这些菌直接影响到组培苗的生长^[6]。为了减少外植体的污染率, 应该尽可能选取带菌少并且不携带内生菌的材料作为外植体, 选择消毒效果显著且对环境污染小的灭菌剂, 有助于建立起绿色环保又有效的灭菌培养体系^[7]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

6月初选取山桃 [*Amygdalus davidiana* (Carrière) de Vos ex Henry] 1年生嫩枝作为试验材料, 采自甘肃省农业科学院林果花卉研究所兰州实验基地, 以中上部分带芽茎段为外植体。

1.2 试验方法

预处理: 将田间采回的试验材料用自来水冲洗 30 min, 剪成 2~3 cm 带芽茎段。在超净工作台上将剪好的茎段用无菌水漂洗 1 遍。

试验分 4 个处理。处理①: 75% 乙醇 + 0.1% 的氯化汞 (HgCl_2) 作消毒试剂, 在 75% 的乙醇中浸泡 30 s 后, 再用 0.1% HgCl_2 浸泡相应的处理时间, 用无菌水把残留物冲洗干净后接入培养基中, 观察培养结果。0.1%

HgCl_2 浸泡相应的处理时间分别是 30 s、1 min、2 min、3 min、4 min、5 min、6 min、7 min。处理②: 75% 的乙醇 + 消毒片 (有效氯 500 mg/片) 作消毒试剂, 在 75% 的乙醇中浸泡 30 s 后, 再用消毒片 (有效氯 500 mg/片) 浸泡相应的处理时间, 最后用无菌水把残留物冲洗干净后接入培养基中, 观察培养结果。消毒片 (有效氯 500 mg/片) 浸泡相应的处理时间分别是 30 s、1 min、2 min、3 min、4 min、5 min、6 min、7 min。处理③: 新型植物组织培养防污染杀菌剂植培灵作消毒试剂, 配置添加了不同浓度杀菌剂植培灵的培养基, 然后将超净工作台上处理好的茎段接入添加好不同浓度植培灵的培养基中并观察培养结果。植培灵的处理浓度分别是, 0.5 mL/L、1 mL/L、2 mL/L、3 mL/L、4 mL/L、5 mL/L、6 mL/L、7 mL/L。处理④: 新型植物组织培养防污染杀菌剂益培隆作消毒试剂, 配置添加了不同浓度杀菌剂益培隆的培养基, 然后将超净工作台上处理好的茎段接入添加好不同浓度益培隆的培养基中并观察培养结果。处理浓度分别是 A 0.1 mL/L + B 5 mg/L、A 0.2 mL/L + B 10 mg/L、A 0.3 mL/L + B 15 mg/L、A 0.4 mL/L + B 20 mg/L、A 0.5 mL/L + B 25 mg/L、A 0.6 mL/L + B 30 mg/L、A 0.7 mL/L + B 35 mg/L、A 0.8 mL/L + B 40 mg/L、A 0.9 mL/L + B 45 mg/L、A 1.0 mL/L + B 50 mg/L (根据使用说明, 益培隆分 A 瓶、B 瓶, 消毒时需配合使用)。

2 结果与分析

从表 1 可知, 在处理①中, 0.1% HgCl_2 消毒 7 min 时污染率最低, 同时死亡率也最高, 达到 13.33%。从污染率和死亡率综合考虑, 0.1% 氯化汞 (HgCl_2) 消毒 5 min 时消毒效果最好, 污染率 3.33%, 死亡率 6.67%。在达到显著消毒效果的同时对植物本身的伤害又相对最小。从表 2 中可以看出, 处理②中消毒片 (有效氯 500 mg/片) 和处理① 0.1%

HgCl₂ 的消毒效果相比较, 消毒片(有效氯 500 mg/片)的消毒效果明显较弱。消毒时间在 7 min 时效果最好, 污染率和死亡率分别是 13.33% 和 3.33%。

从表 3、表 4 来看, 新型杀菌剂植培灵和益培隆的消毒效果比传统消毒药剂的消毒效果显著。植培灵在培养基中的浓度为 4 mL/L 时, 消毒效果最好且死亡率为 0, 污

表 1 75%乙醇和 0.1%氯化汞(HgCl₂)组合消毒效果

处理	75%乙醇	0.1%氯化汞 (HgCl ₂)	外植体总数 /个	污染数 /个	死亡数 /个	污染率 /%	死亡率 /%
1	30 s	30 s	30	9	0	30.00	0.00
2	30 s	1 min	30	7	0	23.33	0.00
3	30 s	2 min	30	5	0	16.67	0.00
4	30 s	3 min	30	4	1	13.33	3.33
5	30 s	4 min	30	2	2	6.67	6.67
6	30 s	5 min	30	1	2	3.33	6.67
7	30 s	6 min	30	1	3	3.33	10.00
8	30 s	7 min	30	0	4	0.00	13.33

表 2 75%乙醇和消毒片(有效氯500 mg/片)组合消毒效果

处理	75%乙醇	消毒片 (有效氯500 mg/片)	外植体总数 /个	污染数 /个	死亡数 /个	污染率 /%	死亡率 /%
1	30 s	30 s	30	12	0	40.00	0.00
2	30 s	1 min	30	11	0	36.67	0.00
3	30 s	2 min	30	9	0	30.00	0.00
4	30 s	3 min	30	8	0	26.67	0.00
5	30 s	4 min	30	8	0	26.67	0.00
6	30 s	5 min	30	6	0	20.00	3.33
7	30 s	6 min	30	5	1	16.67	6.67
8	30 s	7 min	30	4	1	13.33	3.33

表 3 植培灵消毒效果

处理	植培灵浓度 /(mL/L)	外植体总数 /个	污染数 /个	死亡数 /个	污染率 /%	死亡率 /%
1	0.5	30	8	0	26.67	0.00
2	1	30	6	0	20.00	0.00
3	2	30	5	0	16.67	0.00
4	3	30	3	0	10.00	0.00
5	4	30	1	0	3.33	0.00
6	5	30	0	2	0.00	6.67
7	6	30	0	2	0.00	6.67
8	7	30	0	3	0.00	10.00

表 4 益培隆消毒效果

处理	益培隆浓度 (A mL/L+B mg/L)	外植体总数 /个	污染数 /个	死亡数 /个	污染率 /%	死亡率 /%
1	0.1+5	30	11	0	36.67	0.00
2	0.2+10	30	9	0	30.00	0.00
3	0.3+15	30	8	0	26.67	0.00
4	0.4+20	30	5	0	16.67	0.00
5	0.5+25	30	3	0	10.00	0.00
6	0.6+30	30	2	2	6.67	6.67
7	0.7+35	30	2	2	6.67	6.67
8	0.8+40	30	1	4	3.33	13.33
9	0.9+45	30	0	6	0.00	20.00
10	1.0+50	30	0	9	0.00	30.00

染率 3.33%。益培隆的消毒效果不如植培灵，且相对植培灵死亡率较高，当益培隆在培养基中的浓度为 A 0.5 mL/L +B 25 mg/L 时消毒效果最好，其中污染率和死亡率分别是 10.00% 和 3.33%。

3 结论与讨论

试验结果表明，当传统消毒剂 75% 的乙醇分别与 0.1% 氯化汞、消毒片(有效氯 500 mg/片)组合使用时，75% 的乙醇消毒 30 s 和 0.1% 氯化汞(HgCl₂)消毒 5 min 组合消毒效果明显最好，污染率和死亡率均低至 3.33%。新型杀菌剂植培灵的消毒效果与 0.1% 氯化汞(HgCl₂)的消毒效果不相上下，植培灵在培养基中浓度为 4 mL/L 时消毒效果最好，污染率 3.33%，死亡率 0%。

在传统消毒剂中，0.1% 氯化汞(HgCl₂)的消毒效果最好，但残留物最不易清除，且使用后的废液会对环境造成污染，很难处理。我们筛选出的新型灭菌剂植培灵，由植物源提取，无毒无害，热稳定性好，可高温灭菌，不产生抗药性，不影响植物生长，并且消毒效果明显比氯化汞(HgCl₂)要好，也不会造成环境污染造，可作为替代传统氯化

汞(HgCl₂)消毒方法的最佳选择。

参考文献：

- [1] 杨宁, 杨红, 杨颖丽, 等. 核果类果树组织培养及遗传转化的研究进展[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2005(1): 94-100.
- [2] 尤超, 孙锦. 温室油桃组织培养快繁技术研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2015(4): 161-163.
- [3] 吴延军, 徐昌杰, 张上隆. 桃组织培养和遗传转化研究现状及展望[J]. 果树学报, 2002(2): 123-127.
- [4] 周玉碧. 桃高效微繁体系的建立与遗传稳定性研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2005.
- [5] 高晓华. 如何解决《植物组织培养》教学实验中的污染问题[J]. 福建质量管理, 2016(2): 256.
- [6] 胡凯, 张立军, 白雪梅, 等. 植物组织培养污染原因分析及外植体的消毒[J]. 安徽农业科学, 2007(3): 680-681.
- [7] 方庆, 熊明国, 决超. 桃组织培养外植体灭菌方法的筛选[J]. 中国园艺文摘, 2015, 31(7): 36-37.

(本文责编: 陈珩)