

## 杂交松组织培养中外植体的灭菌方法\*

Explant Disinfection in Tissue Culture of *Pinus elliottii*  
× *P. caribaea*

马兰珍, 韦立秀, 薛 鹰, 黄宝灵, 吕成群

Ma Lanzhen, Wei Lixiu, Xue Ying, Huang Baoling, Lü Chengqun

(广西大学林学院, 广西南宁 530001)

(Forestry College, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530001, China)

摘要: 在实验室内对来自广西大学林学院苗圃、东门林场苗圃、广西林业局种苗基地的杂交松 (*Pinus elliottii* × *P. caribaea*) 外植体进行 75% 酒精 10s + 0.1% 升汞 4~6 min 灭菌试验。其中, 东门林场苗圃的外植体进一步采用 75% 酒精 10s + 0.1% HgCl<sub>2</sub> 6 min 结合添加入培养基中的 1.2% 大蒜液的灭菌方法进行试验。结果表明: 广西大学林学苗圃的杂交松外植体, 采用 75% 酒精 10s + 0.1% 升汞 5~6 min 的灭菌方法效果较好。东门林场苗圃以及广西林业局种苗基地的杂交松外植体用 75% 酒精 + 0.1% 升汞的灭菌方法效果不理想。东门林场苗圃的枝条用 75% 酒精 10s + 0.1% HgCl<sub>2</sub> 6 min 结合添加入培养基中的 1.2% 大蒜液的灭菌方法效果较好。

关键词: 杂交松 组织培养 外植体 消毒灭菌

中图分类号: S791.24; Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2005)01-0037-03

**Abstract:** The disinfection experiments of 75% ethanol 10 seconds + 0.1% HgCl<sub>2</sub> 4~6 minutes to *Pinus elliottii* × *P. caribaea* explants from the nurseries of Forestry College (FC), Dongmen Forest Farm (DFF) and Guangxi Forestry Bureau (GFB) were performed in lab. To the explants from DFF, a further disinfection experiment was conducted in the treatment of 75% ethanol 10 seconds + 0.1% HgCl<sub>2</sub> 6 minutes with 1.2% garlic solution in the culture medium. It shows that the treatment of 75% ethanol 10 seconds + 0.1% HgCl<sub>2</sub> 5~6 minutes has better result to the explants from FC. The treatment of 75% ethanol + 0.1% HgCl<sub>2</sub> is no good to the explants from DFF and GFB. To the explants from DFF, there is a better result in the treatment of 75% ethanol 10 seconds + 0.1% HgCl<sub>2</sub> 6 minutes with 1.2% garlic solution in the culture medium.

**Key words:** *Pinus elliottii* × *P. caribaea*, tissue culture, explants, disinfection

组织培养过程中的外植体接种成功与否, 主要取决于外植体的选取和消毒灭菌方法的掌握<sup>[1]</sup>。在杂交松 (*Pinus elliottii* × *P. caribaea*) 的组织培养研究中, 我们以成龄或幼龄植株上当年生的、带有针叶苞的幼嫩枝条作为外植体。这些外植体来自室外, 茎、叶都暴露在空气中, 除了受到空气中的杂菌污染外, 还容易受到泥土、肥料中的杂菌污染, 并且幼嫩的针叶苞既容易藏菌对消毒剂又比较敏感。本文对

不同来源的杂交松外植体采用不同的灭菌方法进行试验, 探讨杂交松组织培养中外植体的有效灭菌方法。

## 1 试验材料与方法

### 1.1 试验材料

本试验所用的外植体采自广西大学林学院苗圃 1 年生的杂交松扦插植株、广西东门林场中心苗圃 3 年生的杂交松扦插植株、广西林业局林木种苗基地 5 年生的杂交松实生植株上当年生的半木质化的带有未张开针叶苞的枝条。选择晴天中午或下午采集外植体。外植体使用前均进行以下预处理: 用自来水冲洗 1h 以上, 再用较温和的饱和肥皂水反复刷洗表

收稿日期: 2004-06-29

修回日期: 2004-08-09

作者简介: 马兰珍(1967-), 女, 广西马山人, 主要从事森林生态研究。

\* 广西科学研究与技术开发计划(桂科攻 0235017-6)资助项目。

面,以不损伤材料为度,然后用自来水冲洗干净备用。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 不同来源外植体的灭菌试验

将从林学院苗圃、东门林场苗圃、林业局种苗基地采回的枝条,预处理后移至超净工作台上,先用75%酒精浸泡10s左右,用无菌水清洗1~2遍后,再用0.1%升汞浸泡4min、5min、6min。无菌水清洗干净后剪成1.5~2cm的茎段,接种于DCR<sup>[2]</sup>附加一定浓度的BA(6-苄基腺嘌呤)及NAA(萘乙酸)的培养基上。培养基中琼脂7g/L,蔗糖30g/L,pH值5.8。所有的培养基均在121℃下灭菌20min,培养室温度为25~28℃,光强为2000lx,光照时间12h/d。接种时每瓶接一个茎段。15d后统计污染率。

### 1.2.2 消毒液不同处理时间的对比试验

对东门林场苗圃以及广西林业局林木种苗基地的杂交松枝条进行预处理后移至超净工作台上,先用75%酒精浸泡10s左右,用无菌水清洗1~2遍后再用0.1%升汞浸泡。0.1%升汞浸泡重复2次,第1次浸泡后用无菌水冲洗干净材料,再进行第2次消毒。在此我们设计了3种0.1%升汞的浸泡时间。方法1:2次0.1%升汞各浸泡4min。方法2:2次0.1%升汞各浸泡5min。方法3:2次0.1%升汞各浸泡6min。无菌水清洗干净后剪为1.5~2cm的茎段,接种于DCR<sup>[2]</sup>附加一定浓度的BA及NAA的培养基上。培养基中琼脂7g/L,蔗糖30g/L,pH值5.8。所有的培养基均在121℃下灭菌20min。培养室温度为25~28℃,光强为2000lx,光照时间12h/d。接种时每瓶接1个茎段。15d后统计污染率。

### 1.2.3 大蒜液在杂交松枝条灭菌上的初步应用

按照邢小黑<sup>[3]</sup>介绍的方法制备大蒜粗提液。对从东门林场苗圃采回的杂交松枝条经预处理后,先用75%酒精+0.1%升汞进行表面消毒灭菌,其中75%酒精处理时间为10s,0.1%升汞处理时间为6min。然后将茎段接到添加了不同浓度大蒜液的培养基上。基本培养基为DCR<sup>[2]</sup>附加一定浓度的BA及NAA。培养基中琼脂7g/L,蔗糖30g/L,pH值5.8。所有的培养基均在121℃下灭菌20min。培养室温度为25~28℃,光强为2000lx,光照时间12h/d。接种时每瓶接一个茎段。40d后统计结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同来源外植体的灭菌效果

由表1结果可知,采用同一方法对不同来源的

杂交松枝条进行灭菌处理的结果不一样,说明不同来源的外植体带菌程度不一样。对于林学院苗圃枝条,采用75%酒精10s+0.1%升汞5~6min的灭菌方法就可以达到较好的效果。而东门林场苗圃及林业局种苗基地可能其周围环境中的菌较多,其枝条所带的菌较多,以上的灭菌方法效果不理想,应采取其它相应的灭菌方法。

表1 不同来源外植体的污染率

外植体来源	污染率(%)		
	0.1% HgCl <sub>2</sub> 4min	0.1% HgCl <sub>2</sub> 5min	0.1% HgCl <sub>2</sub> 6min
林学院苗圃	40.0	30.0	32.0
东门苗圃	92.0	94.0	86.0
林业局种苗基地	84.0	74.0	76.0

### 2.2 消毒液的不同处理时间对灭菌成功率的影响

由表2可知,利用消毒液对外植体进行消毒灭菌时,灭菌时间的长短很重要。灭菌时间短了则污染率高,达不到目的。灭菌时间长了又容易伤害到外植体。对于东门林场苗圃枝条,效果最好的试验是2次升汞,每次5min,其成功率也只有38.0%。而广西林业局种苗基地可能由于水肥管理较好,枝条生长达到本试验采集的杂交松枝条以针叶苞已经长饱满而又未张开的要求,但是,采集的外植体比较嫩,运用以上的灭菌方法虽然污染率较低,褐化率却太高,效果最好的试验是2次升汞,每次4min,其成功率只有18%。可见,对于这两地的杂交松枝条,75%酒精+2次0.1%升汞的灭菌方法效果都不理想。

表2 不同灭菌时间的效果比较\*

外植体来源	消毒方法	接种瓶数	污染瓶数	褐化瓶数	成功瓶数	成功率(%)
东门苗圃	方法1	50	34	2	14	28.0
	方法2	50	27	4	19	38.0
	方法3	50	23	9	18	36.0
林业局种苗基地	方法1	50	29	12	9	18.0
	方法2	50	21	23	6	12.0
	方法3	50	19	27	4	8.0

\* 褐化包括茎段、针叶苞全部褐化以及程度较轻的只是针叶苞褐化而茎段未褐化两种情况,褐化瓶数仅指无菌但褐化了的瓶数。成功率=无菌且成活的瓶数/接种瓶数。

### 2.3 大蒜液在杂交松枝条消毒上的初步应用

由表3可见,大蒜液对外植体上的细菌和真菌有抑制或杀灭作用。在培养基中添加1.2%的大蒜液时,外植体的污染率由不添加大蒜液时的84.8%下降到37.8%。而且添加了大蒜液后对茎段的分化率无明显的影响。因此,对东门林场苗圃的杂交松枝

条先按照 2.1 的方法进行表面消毒后,茎段接种在加入 1.2%大蒜液的培养基中,可达到较好的灭菌效果又不影响成活茎段的分化率。

表 3 不同浓度大蒜液的灭菌效果

大蒜液 (%)	接种 (瓶)	污染 (瓶)	褐化 (瓶)	成功 (瓶)	萌芽 (瓶)	污染率 (%)	成功率 (%)	分化率 (%)
0.0	92	78	1	13	1	84.8	14.1	7.7
0.4	60	31	2	27	3	51.7	45.0	11.1
0.8	89	41	3	45	6	46.1	50.6	13.3
1.2	90	34	5	51	6	37.8	56.7	11.8

大蒜液浓度为体积百分比浓度。褐化瓶数指无菌但褐化了的瓶数。

成功率=无菌且成活的瓶数/接种瓶数

### 3 讨论

本试验结果表明,不同来源的同种外植体带菌程度不一样,所适用的灭菌方法也不一样。对林学院苗圃的枝条,用 75%酒精 10s+0.1% 升汞 5~6 min 的灭菌方法就可以达到较好的效果。对东门林场苗圃以及林业局种苗基地的枝条,75%酒精+1次 0.1%升汞的灭菌方法污染率太高,而 75%酒精+2次 0.1%升汞的灭菌方法随着外植体污染率的下降,褐化率在升高,结果成功率也偏低。这 2 种灭菌方法都不适用。对东门林场苗圃的枝条,先用 75%酒精 10s+0.1%升汞 6 min 消毒后,茎段接入添加了 1.2%大蒜液的培养基中,则可达到较好的灭菌效果。

目前,75%酒精配合 0.1%升汞是比较常规的灭菌方法。75%酒精具有浸润和灭菌的双重作用,能渗入外植体内杀死病菌,但是,其对植物组织具一定的破坏性,所以,消毒时间不宜过长,但这又不易达到消毒效果,因此,常与其它消毒剂配合使用。0.1%升汞是应用最广泛的一种消毒剂,消毒效果最好。但其有剧毒,且消毒后难以去除残余的汞,对外植体有杀伤作用,所以消毒后必须用无菌水反复冲洗,以除

去残余的汞,减少对外植体的毒害<sup>[4]</sup>。

大蒜 (*Allium sativum* L.) 为百合科植物,含有丰富的营养成分。现代研究发现<sup>[5]</sup>,大蒜有天然的抗菌物质,大蒜素是其抗菌的主要有效成分,也是目前发现的各种植物抗菌素中效率最大的一种。文献<sup>[6]</sup>报道,大蒜素对多种细菌及某些真菌均有明显的抑制作用。邢小黑<sup>[3]</sup>在对百合的组织培养研究中,将百合球茎接种于添加有大蒜素的培养基上发现,大蒜素对培养物的影响随其浓度不同而异。2%大蒜素对百合球茎生长和分化无影响,但是,大蒜素浓度达 5%,即会抑制百合生长和分化,并发现少部分百合球茎褪绿变成白色。因此,使用大蒜液灭菌时应根据不同材料和培养目的,选择适宜的大蒜素浓度,使之既能防止培养物的污染,又不影响培养物的生长和分化。

参考文献:

- [1] 魏晓兰. 浅析三倍体毛白杨组织培养中外植体的灭菌[J]. 甘肃林业科技, 2003, 28(2): 54-55.
- [2] 黄健秋, 卫志明. 松属树种的组织培养和原生质体培养[J]. 植物学通报, 1994, 11(1): 34-42.
- [3] 邢小黑. 大蒜素在植物组织培养中的初步应用[J]. 核农学通报, 1994, 15(5): 239.
- [4] 王利民, 周毅, 陈龙友, 等. 植物组织培养中消毒剂的运用[J]. 贵州师范大学学报(自然科学版), 2002, 20(1): 15-17.
- [5] Lau B H S, Yamaxaki, Gridley D S. Garlic compounds modulate macrophage and T-lymphocyte functions[J]. Mol Biother, 1991, 3: 103.
- [6] 陈能熠, 伍睿, 等. 大蒜研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(2): 67-74.

(责任编辑: 邓大玉)

### 鼠尾草有戒酒功效

意大利研究人员进行的动物实验显示,草本植物鼠尾草的提取液有帮助戒酒的功效。

意大利国家神经学研究院研究人员发现,取自鼠尾草根的中草药丹参中的成分可以使“酗酒”的老鼠成功“戒酒”。实验中,一些老鼠的基因结构使它们极易对酒精上瘾。使用丹参成分后,实验鼠产生酒瘾的时间被明显推迟。该研究院的研究人员准备在下一阶段进行人体临床测试,研究鼠尾草的戒酒功效。

鼠尾草是一种两年生草本植物,高 30~100cm,叶片呈褐绿色,花为蓝紫色,并有香气,可用于制作调味品和草药。自古以来,鼠尾草油就因含抗氧化、消炎和类似激素的物质,而被制成具有多种药效的香精油。

(据《科学时报》)