

茜草茎段组织培养灭菌方法研究

于相丽, 李勇慧, 王 静
(洛阳师范学院, 河南 洛阳 471022)

摘要: 研究了不同灭菌剂(0.1% HgCl_2 、10% NaClO 、10% H_2O_2)、不同灭菌时间、二步灭菌法对茜草不同年龄的茎段污染率和愈伤组织诱导率的影响。结果表明:75%酒精处理30s+10% NaClO 灭菌20min效果最好,污染率20%,愈伤组织诱导率为35%;二步灭菌法不适合于茜草茎段的灭菌;幼嫩茜草茎段愈伤组织诱导率最高,达55%。

关键词: 茜草; 灭菌方法; 污染率; 愈伤组织诱导率

中图分类号: S567.23⁺9 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2011)07-0130-03

Sterilization Conditions for Tissue Culture of Stem in *Rubia cordifolia* L.

YU Xiang-li, LI Yong-hui, WANG Jing
(College of Life Science, Luoyang Normal University, Luoyang 471022, China)

Abstract: The different age stems from *Rubia cordifolia* L. were used as explants to study the effects of different bactericides (0.1% HgCl_2 , 10% NaClO , 10% H_2O_2), different sterilization times, and two-step asepsis on pollution of explants and induction of callus. The results showed that the method of 75% alcohol 30s+10% NaClO 20min was the best and the pollution rate was 20%, induction rate was 35%; the method of two-step asepsis was suitable for stems of *Rubia cordifolia* L.; the young stems induction rate of callus was the highest up to 55%.

Key words: *Rubia cordifolia* L.; Sterilization method; Pollution rate; Induction rate

茜草(*Rubia cordifolia* L.),为茜草科多年生攀援草本植物,以干燥根或根茎入药,有凉血止血、活血去瘀作用,用于吐血、崩漏、外伤出血,经闭瘀阻、关节痹痛、跌扑肿痛^[1]等的治疗。茜草自然生长十分缓慢,野生资源趋于枯竭,且大量挖取造成水土流失。为保护国内茜草野生资源,实现茜草生产现代化栽培,开展茜草的快繁及愈伤组织诱导的研究就显得更为迫切和重要^[2]。污染是组织培养过程中首先要解决的问题,在试验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,因此外植体的灭菌技术,直接影响整个组织培养过程^[3]。对茜草来说,其茎、叶均有倒刺,易隐藏微生物,灭菌工作更为重要。本研究以茜草不同年龄段的茎段为外

植体,采用不同灭菌剂(0.1% HgCl_2 、10% NaClO 、10% H_2O_2)、不同时间及二步灭菌法进行处理,观察接种茜草茎段后的污染率以及愈伤组织诱导率,以期茜草组织培养提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料茜草(*Rubia cordifolia* L.)取自洛阳师范学院中校区校园,选取生长良好的茜草茎,切成3cm左右的茎段,自来水冲洗2h后进行灭菌处理。

1.2 方法

1.2.1 不同灭菌剂处理 75%酒精浸泡外植体30s,共设9个处理:A1:0.1% HgCl_2 溶液灭菌

收稿日期: 2011-01-10

基金项目: 河南省科技厅科技攻关项目(102102310345)

作者简介: 于相丽(1975-),女,河南漯河人,讲师,硕士,主要从事植物生物技术研究。E-mail: shuyu97@sina.com.cn

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2min; A2: 0.1% HgCl₂ 溶液灭菌 5min; A3: 0.1% HgCl₂ 溶液灭菌 8min; B1: 10% NaClO 溶液灭菌 10min; B2: 10% NaClO 溶液灭菌 20min; B3: 10% NaClO 溶液灭菌 30min; C1: 10% H₂O₂ 溶液灭菌 10min; C2: 10% H₂O₂ 溶液灭菌 15min; C3: 10% H₂O₂ 溶液灭菌 20min。无菌水冲洗 5 次后,把茜草茎段切成 1cm 左右的小段(切去节),接种在 MS+2,4-D 2mg/L 诱导培养基中进行培养。温度 (25±1)℃,相对湿度 60%~70%,光照 3000lx,人工光照 15h/d。接种后第 2 天开始记录污染和褐化情况,20d 后统计污染率和愈伤组织诱导率,比较灭菌效果,筛选出最佳灭菌方案。污染率=污染外植体数/接种外植体数×100%;愈伤组织诱导率=发生愈伤组织数/接种外植体数×100%。

1.2.2 二步灭菌法灭菌处理 75%酒精灭菌 30s 后,共设 3 个处理,即 D: 0.1% HgCl₂ 溶液灭菌 2min; E: 10% NaClO 溶液灭菌 20min; F: 10% H₂O₂ 溶液灭菌 15min。然后各处理于无菌水静置 48h,再次用 75%酒精灭菌 30s 后,用 0.1% 的升汞灭菌 5min。接种及统计方法同上。

1.2.3 不同年龄段茜草茎段处理 选取生长健壮的不同年龄段茜草茎段用 75%酒精灭菌 30s 后,再用 10% NaClO 溶液处理 20min。接种及统计方法同上。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌剂处理对茜草茎段愈伤组织的影响

由表 1 可以看出,经过不同灭菌剂的处理,效果最好的为 10%NaClO,污染率都在 25%以下,愈伤组织诱导率也较高;0.1%升汞灭菌效果次之,愈伤组织诱导率低;最差的为 10% H₂O₂,污染率高,而且愈伤组织诱导率为 0。所有处理中,污染率最低的是 A3 组,污染率为 10%,但愈伤组织诱导率仅有 5%,本次试验的最终目的是得到愈伤组织,进一步培养得到组培苗,HgCl₂ 虽然有很强的杀菌效果但由于其毒性过大,在灭菌过程过度损伤茜草茎段,导致其愈伤组织诱导率较低;10% NaClO 毒性相对较小,灭菌过程中不产生有害副反应物,虽然处理时间相对较长,有较好的杀菌效果,对茜草茎段损伤小,所以愈伤组织诱导率相对较高;而 10% H₂O₂ 处理后,可能由于在杀菌过程中,产生较多氧离子,对茜草损伤过大,以至于不能产生愈伤组织。综合考虑污染率和愈伤组织诱导率,最好的处理组是 B2 组,即 75%酒精灭菌 30s 后用 10% NaClO 灭菌 20min 的处理。

表 1 不同灭菌剂处理对茜草茎段愈伤组织的影响

处理	外植体数/个	污染率/%	愈伤组织诱导率/%
A1	20	40	20
A2	20	25	15
A3	20	10	5
B1	20	15	15
B2	20	20	35
B3	20	25	20
C1	20	65	0
C2	20	70	0
C3	20	60	0

2.2 二步灭菌法对茜草茎段灭菌效果的影响

由表 2 可以看出,不同灭菌剂经二步灭菌法处理的茜草茎段,污染率都很低,但愈伤组织诱导率都为 0。这可能和茜草本身有关,茜草是草本植物,茎木质化程度低,表皮较易受伤害,尤其是在无菌水浸泡 2d 后,受到更大的伤害,导致其愈伤组织诱导率都为 0。综合考虑污染率和愈伤组织诱导率,二步灭菌法杀菌效果虽好,但不适合用于茜草茎段消毒。

表 2 二步灭菌法对茜草茎段灭菌效果的影响

处理	外植体数/个	污染率/%	愈伤组织诱导率/%
D	20	0	0
E	20	15	0
F	20	10	0

2.3 不同生理状态茜草茎段对愈伤组织诱导的影响

由表 3 可以看出,10%的 NaClO 灭菌 20min,幼嫩和成熟的茎段,污染率均为 10%,而衰老的茎段,污染率相对较高,这可能和材料本身携带的微生物多少有关,材料生长时间越长,携带微生物越多,故衰老茎段污染率相对较高。细胞的生理状态和其脱分化的能力密切相关,细胞越幼嫩,脱分化能力越强,反之,脱分化能力越弱,这个规律在本试验中也得到体现。对 3 种材料来讲,愈伤组织诱导率有很大差别,最高的是幼嫩茎段,愈伤组织诱导率为 55%,成熟茎段次之,为 40%,最弱的为衰老茎段,只有 20%。以后在茜草取材时,尽可能选取幼嫩的材料,以获得较多的愈伤组织。

表 3 不同生理状态茜草茎段愈伤组织诱导率

茎段生理状态	外植体数/个	污染率/%	愈伤组织诱导率/%
幼嫩	20	10	55
成熟	20	10	40
衰老	20	20	20

3 结论与讨论

污染是组织培养过程中首先遇到的问题,且很难控制。如果不能将污染降低到一定 (下转第 134 页)

3 结论与讨论

利用一体化营养基育苗被证明不仅省工省时,育出的苗健壮、抗逆能力强而且幼苗发育快、缓苗快,移植成活率高;同时它对于促进花芽分化、开花坐果数增多、延缓衰老、产品品质改善和提前上市以及增产增收也具有明显效果^[1-5]。

在西瓜上采用中农赛世公司研制的一体化育苗营养基育苗虽然在提高产量、增强抗病性等方面还达不到对照 2 的效果,但是相对于传统的育苗方式对于促进根系生长、培育壮苗有着显著作用,并且可以使花期提前 4~5 d,坐果率提高 6~7 个百分点,产量提高 20% 以上,这对于增加果实单果质量、提高产量、促进坐果,促进西瓜增收增效具有明显效果。同时,采用一体化育苗营养基育苗可以使幼苗立枯病的发病率降低,在后期生长过程中可使枯萎病的发生降低 11.72 个百分点。

由于果实成熟时瓜蔓太长导致不易测定株高,所以试验中采用的株高数据为前期测定的数值,但是或许成熟期的株高更能说明问题,这一点值得进一步试验研究。

参考文献:

[1] 孟宪民,赵恒田,王忠强,等.发展一体化育苗营养基推动种苗产业技术进步[J].农业系统科学与综合研究,2003,19(1):27-32

[2] 孟宪民,王忠强,邹德乙,等.CIS 育苗营养基对西红柿品质影响的试验研究[J].腐植酸,2004(3):29-32

[3] 邹德乙,王春枝,邹丹,等.一体化营养基育苗对微区西红柿、黄瓜产量及品质影响的研究[J].腐植酸,2005(1):31-35.

[4] 康宗利,杨玉红,邹德乙,等.CIS 育苗对番茄生长及产量和品质的影响[J].河南农业科学,2006(3):86-88.

[5] 宋艳富,张凤丽,孙秀丽.一体化育苗营养基技术[J].农民致富之友,2007(6):13

(上接第 131 页) 范围内,意味着组织培养不能继续进行,因此,保证无菌培养是植物组织培养成败的关键^[4]。对于茜草,因其生长在地面,生活环境复杂且表面有倒刺,很容易携带大量微生物且难以清除,因此,茜草外植体的生理状态、灭菌剂的种类选择、灭菌时间、灭菌方法等都是组织培养中需要解决的问题。本试验结果表明,75%酒精灭菌 30s+10%NaClO 灭菌 20min 效果最好,茜草茎段污染率最低,且愈伤组织发生率最高。二步灭菌法作为一种有效的灭菌方法,在很多植物上得到应用,对于茜草来说,虽然污染率低,但不能有效的诱导愈伤组织,故不宜采用二步灭菌法。

组织培养中,外植体的生理状态也是不可忽略的影响因素^[9]。本试验将茜草茎段分为 3 个不同的生理状态。发现幼嫩的材料愈伤组织诱导率较高,这说明分生组织在早期发生的内在变化通过细胞分裂传递下去,造成生理状态处于晚期的细胞脱分化比早期细胞更难,因而更难诱导出愈伤组织;也可能

在幼嫩的材料中,内源激素的含量相对较高,而培养基所加的外源激素能很快诱导其产生愈伤组织,而其他材料由于内源激素含量下降,培养基的外源激素不能很快引起其脱分化。

参考文献:

[1] 国家药典委员会.中国药典: I 部[S].北京:化学工业出版社,2005.

[2] 薛建平,张爱民,程建平.茜草愈伤组织诱导与快速繁殖的研究[J].中国中药杂志,2002,27(2):101-103.

[3] 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.

[4] 李键,李建勋,吴承祯,等.雷公藤组织培养外植体消毒和选择[J].中南林业科技大学学报:自然科学版,2010,30(8):18-21.

[5] 何勇刚,林刚,刘曼西,等.小麦不同生理状态的幼穗和幼胚盾片与诱导分化能力关系的研究[J].武汉植物学研究,2001,9(5):363-368.