

不同灭菌方式对月季花的灭菌效果

何 燕,任盼盼,段 瑜

(西藏农牧学院植物科学学院,西藏 林芝 860000)

摘 要:本研究旨在探明月季花外植体在组织培养过程中不同灭菌方式及培养基对外植体的影响。结果表明:灭菌效果以乙醇(75%)15 S+次氯酸钠(有效氯 $\geq 10\%$)10 min和 HgCl_2 (0.1%)10 min+双氧水(H_2O_2 3.0%~3.2%)10 min最佳;MS培养基和1/2 MS培养基对外植体的生长影响不大;乙醇(75%)15 S和次氯酸钠(有效氯 $\geq 10\%$)10 min和 HgCl_2 (0.1%)10 min+双氧水(H_2O_2 3.0%~3.2%)10 min对月季茎段根的生长影响最小。

关键词:灭菌方式;灭菌效果;月季花

中图分类号:S685.12 **文献标识码:**A

Germedical Effect on Monthly Rose Explants by Different Sterilization Methods

HE Yan, REN Pan-pan, DUAN Yu

(Plant Science College, Tibet Agriculture & Animal Husbandry University, Tibet Linzhi 860000, China)

Abstract: This study aims to find out the impact on explants caused by different sterilization methods and medium during tissue culture Rosa chinensis. Experimental result showed that the best sterilization effect was caused by ethanol(75%)15 S+ sodium hypochlorite(available chlorine $\geq 10\%$)10 min and HgCl_2 (0.1%)10 min+ H_2O_2 (3.0%~3.2%)10 min; Next came MS medium and 1/2 MS medium; Ethanol(75%)15 S+ sodium hypochlorite(available chlorine $\geq 10\%$)10 min and HgCl_2 (0.1%)10 min+ H_2O_2 (3.0%~3.2%)10 min has the least influence on the growth of china rose's stem and root segment.

Key words: Sterilization methods; Germedical effect; Monthly rose

月季被称为花中皇后,又称月月红;常绿、半常绿低矮灌木,四季开花,一般为红色,或粉色、偶有白色和黄色。自然花期8月到次年4月,花成大型,由内向外,呈散型,有浓郁香气,可广泛用于园艺栽培和切花;也可作为药用植物。现代医学研究发现,月季花含有丰富的槲皮素等黄酮及其他成分,经提纯后具有抗菌、抗病毒、调节人体免疫等效用^[1-2]。生产中常用的育苗方法主要是扦插育苗,具有繁殖速度快,成活率高的特点^[3-4]。但是扦插需要大量的需要扦插地,并要进行插后防虫、灌水等管理。尤其在西藏这种空气干燥、白天日照时间长且紫外线

强烈的地方,需要架设苗床拱棚、盖遮阳网等。一些优良的月季品种,它们的扦插苗根系不发达,以及繁殖材料不足等缺点,严重阻碍月季优新品种的扩繁与推广^[5]。

而用组织培养的方式可以避免这些麻烦。外植体是指第1次接种用的植物材料,与植物组织培养的成败密切相关,为使外植体适于在离体培养条件下生长,有必要对外植体进行灭菌及无菌操作^[6]。组织培养中的污染原因很多,主要有外植体污染,外植体消毒不过关等等^[7-9]。植物材料的灭菌是植物组织培养工作中的重要环节,既要求必须将外植体表面的微生物彻底杀死,又要求尽可能少伤害外植体组织和表层细胞,不影响组培苗的正常生长。为了探明在月季花的茎段组织培养过程中,采用不同灭菌方法对外植体产生的消毒效果,以期对月季花及相似木本花卉的外植体灭菌、组织培养和扩繁提供技术参考。

收稿日期:2019-06-10

基金项目:“植物组培产业化”开发与示范推广

作者简介:何 燕(1970-),女,硕士研究生,副教授,主要从事作物遗传与育种的教学与科研工作,E-mail:hy031108@qq.com。

表 1 外植体灭菌试验处理

因素水平	a	b
1	a1	b1
2	a2	b2
3	a3	b3
4	a4	b4
5	a5	b5
6	a6	b6

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料以丰花月季当年新发、饱满健壮、茎秆粗壮的嫩枝为材料,均在西藏农牧学院校园中采集。

1.2 试验方法

1.2.1 灭菌的方法 设计 6 种灭菌方法,分别为①乙醇(75 %)15 S;②HgCl₂(0.1 %)10 min;③次氯酸钠(有效氯≥10 %)10 min;④双氧水(H₂O₂3.0 %~3.2 %)10 min;⑤乙醇(75 %)15 S+次氯酸钠(有效氯≥10 %)10 min;⑥HgCl₂(0.1 %)10 min+双氧水(H₂O₂3.0 %~3.2 %)10 min。每处理 3 瓶,每瓶至少 4 个茎段,每茎段长度 1~1.5 cm,保证每茎段上至少 1 个腋芽。

1.2.2 培养基的设计 采用 2 种不同的培养基配方,一种是 MS 培养基,代号 a;一种是 1/2MS 培养基,代号 b。试验处理见表 1。

2 结果与分析

月季花茎段剪切后立即进行扦插,每隔 7 d 进行 1 次观察、记载,共记载 5 周。观察茎段的污染情况、上部叶片生长情况、下部根的生长情况。

2.1 不同处理方式的污染率

从第 7 天开始记载污染情况,并将污染的培养瓶拿出实验室。至第 3 周后,已经无新的污染出现。计算污染率(图 1、表 2)。

由图 1 可知,6 种灭菌方式效果由好到差的排列为:5、6>2、4>1>3。说明用乙醇(75 %)15 S+次氯酸钠(有效氯≥10 %)10 min 和 HgCl₂(0.1 %)10 min+双氧水(H₂O₂3.0 %~3.2 %)10 min 这 2 种复合杀菌效果最佳,污染率为 2.6 %,而次氯

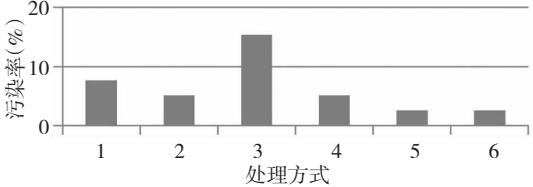


图 1 不同灭菌方式的灭菌效果

表 2 不同灭菌方式的污染率

处理方式	污染瓶数 (瓶)	该处理瓶数 (瓶)	污染率 (%)	占总污染比率 (%)
a1	1	3	33.3	2.6
a2	1	3	33.3	2.6
a3	3	3	100.0	7.7
a4	1	3	33.3	2.6
a5	1	3	33.3	2.6
a6	1	4	25.0	2.6
b1	2	3	66.7	5.1
b2	1	3	33.3	2.6
b3	3	3	100.0	7.7
b4	1	3	33.3	2.6
b5	0	3	0.0	0.0
b6	0	5	0.0	0.0
合计	15	39	38.5	38.5

酸钠(有效氯≥10 %)10 min 的效果最差,占全参试污染率的 15.4 %。

由表 2 可知,各灭菌方式下都有污染的情况出现,但污染率有差异。通过方差分析可见,不同的处理间灭菌效果不同(表 3~4)。

由表 3~4 可知,各处理间存在差异,a3、b3 与 b5 之间存在着极显著差异。b5 的灭菌效果最好,污染率为 0.0 %,说明在 1/2MS 培养基中乙醇(75 %)15 S+次氯酸钠(有效氯≥10 %)10 min 复合杀

表 3 污染率方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
区组间	0	3	0	0	1
处理间	20.4482	11	1.8589	2.605	0.0165
误差	23.5515	33	0.7137		
总变异	43.9997	47			

表 4 污染率多重比较

处理	均值	5 % 显著水平	1 % 极显著水平
a3	1.260225	a	A
b3	1.260225	a	A
b1	0.4817	ab	AB
a6	0.05075	abc	AB
b6	-0.261675	bc	AB
b4	-0.28755	bc	AB
b2	-0.28755	bc	AB
a1	-0.28755	bc	AB
a2	-0.28755	bc	AB
a5	-0.28755	bc	AB
a4	-0.28755	bc	AB
b5	-1.066075	c	B

表 5 不同培养基的灭菌效果

处理方式	污染瓶数	污染率(%)
a	8	20.5
b	7	17.9
平均	7.5	19.2
合计	15	38.5

菌效果最佳。其次为 a4、a5、a2、a1、b2、b4、b6、a6 及 b1,污染率均较低,说明无论是 MS 培养基还是 1/2MS 培养基培养,1、2、4、5、6 即乙醇(75%)15 S、HgCl₂(0.1%)10 min、双氧水(H₂O₂3.0%~3.2%)10 min、乙醇(75%)15 S+次氯酸钠(有效氯≥10%)10 min、HgCl₂(0.1%)10 min+双氧水(H₂O₂3.0%~3.2%)10 min 的灭菌效果比较好。a3 和 b3 的污染率均达到了 100%,说明处理 3 即次氯酸钠(有效氯≥10%)10 min 的处理效果最差。

2.2 不同培养基对灭菌效果的影响

对不同培养基配方在不同的灭菌方式下污染率略有差异但是差异较小(表 5)。

由表 5 可知,2 种培养基的平均污染率为 19.2%,1/2MS 培养基的污染率比 MS 培养基的略低(相差 2.6%)。

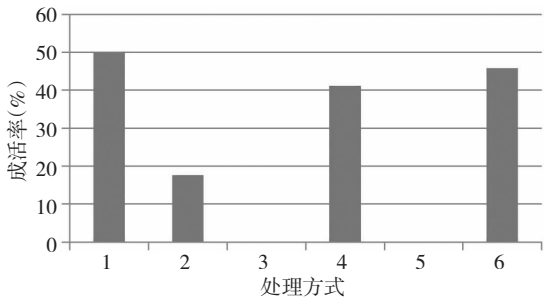


图 2 不同灭菌方式的成活率

2.3 不同处理方式下茎段的生长情况

除了考察外植体的污染率外,组培苗的生长状况也是衡量灭菌效果的重要指标。

由图 2 可知,6 种不同的灭菌方式中,1 的成活率最高(50.0%),其次为 6,成活率 45.8%,第 3 的是 4,成活率 41.2%。成活率从高到低的排列为:1>6>4>2>5 和 3。3、5 处理灭菌效果差,但是对外植体的损害也大,后期茎段均没有成活,具体成活率数据(表 6)。

由表 6 可知,成活率最高的处理方式是 a1,茎段成活率达到 66.7%;其次为 b6,成活率为 57.1%;排列第 3 的是 b4,成活率为 55.6%。可以看到,a 的总苗数为 53 棵,b 的总苗数为 51 棵,a 的成

表 6 不同灭菌方式对成活率的影响

处理 方式	第 1 周		第 2 周		第 3 周		第 4 周		成活率 (%)
	总苗数 (棵)	成活较 好苗数 (棵)	总苗数 (棵)	成活较 好苗数 (棵)	总苗数 (棵)	成活较 好苗数 (棵)	总苗数 (棵)	成活较 好苗数 (棵)	
a1	12		12	7	12	8	12	8	66.7
b1	14		14	9	10	6	10	5	35.7
a2	11	4	7	4	7	4	7	3	27.3
b2	6		6	0	6	0	6	0	0.0
a3	4		污染	0	0	0	0	0	0.0
b3	污染								0.0
a4	8	6	4	2	4	2	4	2	25.0
b4	9	8	5	5	5	5	5	5	55.6
a5	8		6	0	6	0	6	0	0.0
b5	8		8	0	8	0	8	0	0.0
a6	10	7	6	4	7	3	7	3	30.0
b6	14	11	14	11	14	11	13	8	57.1

表 7 成活率方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
区组间	0.0417	1	0.0417	1	0.3388
处理间	375.4583	11	34.1326	819.182	0
误差	0.4583	11	0.0417		
总变异	375.9583	23			

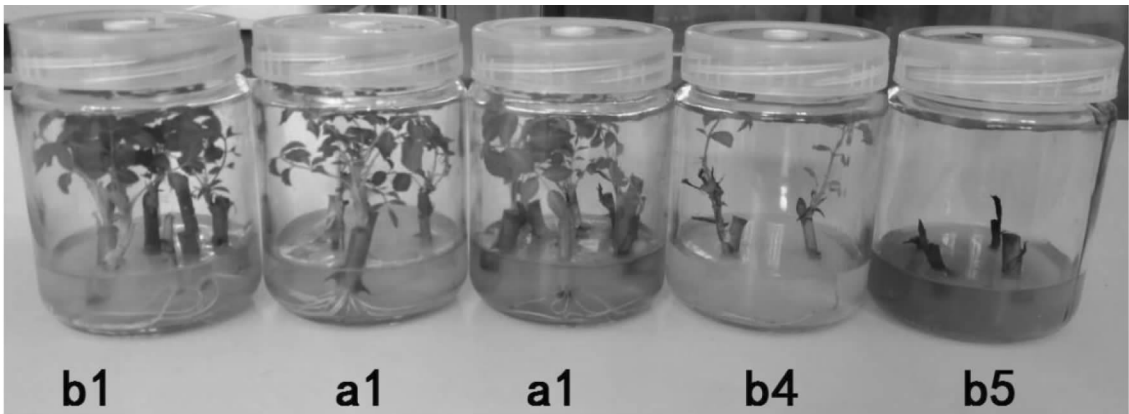


图 3 不同灭菌方式下个别月季生长情况(第 4 周)

表 8 成活率多重比较

处理	均值	5 % 显著水平	1 % 极显著水平
b6	13.5	a	A
a1	12	b	B
b1	10	c	C
b5	8	d	D
a6	7	e	E
a2	7	e	E
a5	6	f	F
b2	6	f	F
b4	5	g	G
a4	4	h	H
b3	0	i	I
a3	0	i	I

活率平均为 30.2 % ,b 的成活率平均为 35.3 % 。相对的 b 培养基的成活率要高于 a 培养基的,高出 5.1 % 。a5、b5、b2 无茎段成活。表 7 ~ 8 的分析同样说明不同灭菌方式下月季外植体成活率有极显著差异。

2.4 不同处理方式下根的生长情况

为防止出现“假活”现象,进一步观察灭菌药剂对外植体的影响,于第 2 周开始调查根的生长情况(表 9)。

由表 9 可知,1、2、6 的灭菌方式对外植体的生长影响较小,月季花茎段发育正常;4 的处理方式下,根生长情况一般。不同灭菌方式下月季生长情况(图 3)。

3 结 语

本文对月季花外植体采用了 6 种不同的灭菌方式进行处理,综合所有调查结果,认为应该用 75 % 乙醇消毒 15 S 的处理方式最好,其次为 HgCl₂ (0.1 %) 10 min + 双氧水(H₂O₂3.0 % ~ 3.2 %) 10

表 9 不同灭菌方式对根的影响

处理方式	第 2 周	第 3 周	第 4 周		根色
	生根茎段数(棵)	最长根长(cm)	发根总条数(条)	最长根长(cm)	
a1	8	3.5	50	7.7	白色
b1	5	5.0	59	5.5	白色
a2	3	3.0	6	4.0	白色
b2	0	0.0	0	0.0	
a3	0	0.0	0	0.0	
b3	0	0.0	0	0.0	
a4	2	4.0	10	4.0	有黑点
b4	5	5.0	18	8.0	白色
a5	0	0.0	0	0.0	
b5	0	0.0	0	0.0	
a6	1	3.5	3	5.0	白色
b6	6	5.0	9	4.0	白色

min 的处理方式。但 HgCl₂ 做为一种剧毒药品,购买存在一定的困难且对环境条件也有一定的影响,因此建议在木本外植体的消毒上可以采用乙醇(75 %)处理。在培养基的选择上,MS 与 1/2MS 的差异不显著,因此从后期的生长及节约成本的角度上看,可以用 1/2MS 培养基做初始培养基。

本次试验虽然采用了不同的灭菌剂,但是除了乙醇(75 %),其他的灭菌剂设定时间一样,没有探讨其他最佳的消毒时间。乙醇对木本外植体消毒效果尚可,但是对其他草本或茎秆较弱、较细的是否合适,其他灭菌剂的灭菌时间应继续进行探索,找到多种植物外植体灭菌效果最好的灭菌剂(或灭菌剂组合)及最佳灭菌时间。

开放组培的培养基不经高压灭菌,激素和营养元素损失较少,同时培养容器透光性能也较好。所以,组培苗不仅分化正常,有较高的分化率,且组培苗生长比传统组培苗健壮^[10]。今后也可以在这些

方面进行适合西藏环境的摸索。

参考文献:

[1]徐文昭. 月季花花瓣的黄酮类成分的研究[J]. 南京中医药大学学报(自然科学版),2000,16(4):225-226.

[2]张曦,吴锡信. 月季花的药理及临床应用探讨[J]. 吉林中医药,2004,24(4):47.

[3]王志远. 月季扦插育苗技术[J]. 现代农业科技,2015,16:174.

[4]张海涛. 月季扦插育苗技术[J]. 现代园艺,2016,12:81.

[5]蔡卫佳,陈芬,阮倩倩. 不同因素对月季嫁接后扦插生根的影响[J]. 南方园艺,2018,29(5):43-46.

[6]程林. 外植体的灭菌及无菌操作[J]. 中等职业教育,2012(2):17

-21.

[7]任目瑾,周建峰. 植物组织培养的常见污染及其防控技术[J]. 陕西林业科技,2016(6):103-105.

[8]吴建阳,何冰,曾慧兰,等. 植物组织培养教学改革初探[J]. 现代园艺,2018(8):198-199.

[9]焦立为,黄克梅,闫小飞,等. 植物组织培养前用臭氧对外植体进行消毒灭菌的效果初探[J]. 植物生理学通讯,2002,38(5):466.

[10]崔刚,单文修,秦旭,等. 植物开放式组织培养研究初探[J]. 山东农业大学学报,2004,35(4):529-533.