

甜叶菊叶片灭菌方法的研究

刘学敏,尚宏芹

(菏泽学院 生命科学系,山东 菏泽 274015)

摘要:为筛选出适宜甜叶菊叶片灭菌的条件,以甜叶菊叶片为外植体,通过统计污染率、枯死率和愈伤组织诱导率来评价灭菌效果,研究不同灭菌剂、灭菌时间对灭菌效果的影响。结果表明:单一灭菌剂的灭菌效果不好,以 0.1% HgCl_2 灭菌 5 min 的愈伤组织诱导率较高,为 44.5%;75% 酒精与其它灭菌剂组合的灭菌效果好于单一灭菌剂,以 75% 酒精与 0.1% HgCl_2 组合最好,污染率和枯死率较低,愈伤组织诱导率较高,适宜甜叶菊叶片灭菌的组合为 75% 酒精 4 s+0.1% HgCl_2 4 min,愈伤组织诱导率达 86.7%。

关键词:甜叶菊;灭菌;愈伤组织诱导

中图分类号:S566.9

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2014)03-0019-03

甜叶菊(*Stevia rebaudiana* Bertoni.),又称甜菊,为菊科多年生草本植物,原产巴拉圭与巴西交界的山区,于 20 世纪 80 年代初引入中国并栽培成功。其叶中含有甜菊糖苷,又名甜菊糖甙和甜菊糖等,易溶于水,甜度约为蔗糖的 300 倍,热能仅为蔗糖的 1/300,甜味接近蔗糖,安全无毒,可取代糖精、甜蜜素和部分蔗糖,已经广泛应用于食品、饮料、餐桌佐料和酱菜加工^[1]。同时,具有防治糖尿病、肥胖症、小儿龋齿和高血压等疾患的药用价值,因而逐渐引起人们的关注和重视^[2-3]。甜叶菊为异花授粉植物,群体的基因组成为杂合型,自交不亲和并且遗传性状不稳定,其后代难以保持原有的优良性状。而且甜叶菊的种子小、极易丧失活力,种子带菌又会导致苗期及后期发生病害^[4-5]。

国内组织培养在甜叶菊上的应用研究较早,中国科学院武汉植物研究所徐慧珠等^[6]对甜叶菊叶片进行了愈伤组织的诱导并分化成芽和生根。云南大学李启任^[7]成功地对甜叶菊茎尖进行了培养。后来,更多学者对甜叶菊的组织培养进行了研究^[8-10]。但是关于甜叶菊外植体灭菌方面的研究鲜见报道。该试验以甜叶菊叶片为外植体,通过统计污染率、枯死率和愈伤组织诱导率来评价灭菌效果,研究不同灭菌剂、灭菌时间对甜叶菊叶片灭菌效果的影响,以期对甜叶菊再生体系的建

立及快速繁殖提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料 试验所用甜叶菊植株采自菏泽市黄楼,种植于菏泽学院生命科学系植物组织培养实验室,取甜叶菊幼嫩叶片作为外植体。

1.1.2 试剂 供试试剂有 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)、升汞(HgCl_2)和双氧水(H_2O_2)等均由上海科密欧试剂公司生产。

1.2 方法

试验于 2013 年 3~6 月在菏泽学院生命科学系植物组织培养实验室进行。

1.2.1 单一灭菌剂对甜叶菊叶片灭菌效果的影响 先将外植体用自来水冲洗 2 h,在超净工作台上,用不同的灭菌剂对外植体进行灭菌处理,无菌水冲洗 5 次后,把叶片切成 0.5 cm×0.5 cm 大小,接种在 $\text{MS} + 6\text{-BA } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基上,每瓶接种 3 块外植体,每处理接种 12 瓶,在培养 15 d 时统计污染率、枯死率和愈伤组织诱导率。

1.2.2 酒精与不同灭菌剂组合对甜叶菊叶片灭菌效果的影响 甜叶菊叶片用自来水冲洗 2 h 后,先用 75% 酒精浸泡 4 s,再分别用 0.1% HgCl_2 、10% H_2O_2 和 2% NaClO 分别浸泡 2、4、6 min,然后用无菌水冲洗 5 次,接种在 $\text{MS} + 6\text{-BA } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基上,每瓶 3 块外植体,每处理接种 10 瓶,培养 15 d 时统计污染率、枯死率和愈伤组织诱导率。

1.2.3 不同灭菌时间对甜叶菊叶片灭菌效果的影响 将甜叶菊叶片先用自来水冲洗 2 h,在超

收稿日期:2013-10-15

基金项目:山东省菏泽市科技发展计划资助项目(2010N013)

第一作者简介:刘学敏(1991-),女,山东省宁津县人,在读学士,从事植物生物技术研究。

通讯作者:尚宏芹(1977-),女,山东省章丘市人,硕士,副教授,从事植物生物技术研究。E-mail:hqshang@126.com。

净工作台上,分别按照表 1 对甜叶菊叶片进行灭菌处理,无菌水冲洗 5 次后切成 0.5 cm×0.5 cm 大小,接种在 MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹的培养基上。

表 1 不同作用时间对灭菌效果的影响

Table 1 The effect of different time on the sterilization result

水平 Levels	75%酒精 浸泡时间/s 75% alcohol soaking time	升汞浸泡 时间/min Mercuric chloride soaking time
1	2	2
2	4	4
3	6	6

污染率(%)=污染总数/接种总数×100;

表 2 不同单一灭菌剂对甜叶菊叶片灭菌效果的影响

Table 2 Effects of different single sterilization reagent on sterilization of the *Stevia rebaudiana* leaves

灭菌剂 Sterilants	灭菌时间/min Sterilization time	污染率/% Contamination rate	枯死率/% Exsiccation rate	愈伤组织诱导率/% Induction rate of callus
无菌水 Sterile water	10	100.0	0	0
75%酒精 75% Ethanol	0.2	55.6	44.4	0
0.1%升汞 0.1% HgCl ₂	5	44.4	11.1	44.5
10%双氧水 10% H ₂ O ₂	5	58.3	8.3	33.4
2%次氯酸钠 2% NaClO	5	63.9	5.6	30.5

由表 2 可以看出,单独用无菌水处理的外植体全部污染,说明无菌水不能冲洗掉所有菌类。75%酒精浸泡 0.2 min 后,外植体的污染率和枯死率都较高,存活率为 0,说明 75%酒精不能单独作为灭菌剂使用。经其它 3 种灭菌剂灭菌后,外植体的污染率均较高,以 0.1% HgCl₂ 灭菌的污染率较低、存活率较高,分别为 44.4%和 44.5%,

表 3 不同灭菌药剂组合对甜叶菊叶片灭菌效果的影响

Table 3 Effects of different sterilization reagent combination on sterilization of *Stevia rebaudiana* leaves

灭菌剂 Sterilants	灭菌时间/min Sterilization time	污染率/% Contamination rate	枯死率/% Exsiccation rate	愈伤组织诱导率/% Induction rate of callus
0.1%升汞 0.1% HgCl ₂	2	43.3	3.3	53.4
	4	10.1	6.6	83.3
	6	3.3	26.5	70.2
10%双氧水 10% H ₂ O ₂	2	73.3	3.3	23.4
	4	46.7	10	43.3
	6	23.3	20	56.7
2%次氯酸钠 2% NaClO	2	67.7	3.3	29.0
	4	36.6	10.1	53.3
	6	20.1	20.3	59.6

枯死率(%)=枯死外植体数/接种外植体数×100;

愈伤组织诱导率(%)=产生愈伤组织的外植体数/接种外植体数×100。

1.2.4 培养条件 培养基的蔗糖含量为 30 g·L⁻¹,琼脂含量为 7 g·L⁻¹,pH 为 5.8,培养温度为(25±2)℃,光照强度为 2 000 lx,光照时间 14 h·d⁻¹。

2 结果与分析

2.1 单一灭菌剂对甜叶菊叶片灭菌效果的影响

目前,有多种灭菌剂可用来进行植物组织的灭菌,如 HgCl₂、次氯酸钠和 H₂O₂ 等,不同的灭菌剂灭菌效果不同。甜叶菊叶片经过不同的灭菌剂灭菌后,接种在相同的培养基上,培养 3 d 时开始出现污染症状,15 d 时统计结果(见表 2)。

说明单一灭菌剂处理甜叶菊叶片的灭菌效果及存活效果不好。

2.2 酒精与不同灭菌剂组合对甜叶菊叶片灭菌效果的影响

为了明确最适宜的灭菌剂组合,固定先用 75%酒精灭菌 4 s,然后分别与不同的灭菌剂组合对甜叶菊叶片进行灭菌,结果见表 3。

由表 3 可以看出,75%酒精浸泡 4 s 与不同的灭菌剂组合对甜叶菊叶片灭菌的效果不同,随着灭菌时间的延长,污染率逐渐降低,但是枯死率增大,愈伤组织诱导率以 75%酒精 4 s+0.1%升汞灭菌 4 min 组合最好,达到 83.3%。

表 4 不同灭菌时间对甜叶菊叶片灭菌效果的影响

Table 4 Effects of different sterilization time on sterilization of *Stevia rebaudiana* leaves

处理 Treatments	75%酒精浸泡时间/s 75% Ethanol soaking time	升汞浸泡时间/min Mercuric chloride soaking time	污染率/% Contamination rate	枯死率/% Exsiccation rate	愈伤组织诱导率/% Induction rate of callus
1	2	2	86.7	0	13.3
2	2	4	66.7	0	33.3
3	2	6	60	6.7	33.3
4	4	2	43.3	3.3	53.4
5	4	4	6.7	6.6	86.7
6	4	6	3.3	26.7	70
7	6	2	36.7	33.3	30
8	6	4	13.3	40	56.7
9	6	6	0	100	0

由表 4 可以看出,75%酒精浸泡不同时间对甜叶菊叶片的污染和愈伤组织诱导的影响明显。在相同 0.1% HgCl₂ 处理条件下,随着酒精灭菌时间的增加,叶片污染率逐渐减小,愈伤组织诱导率先增加后减少,主要由于随着灭菌处理时间的延长会出现外植体枯死的现象。75%酒精处理相同时间条件下,叶片的污染率随着升汞灭菌时间的增加分别表现出不断降低的趋势,但是愈伤组织诱导率表现为先升高后降低,因为处理时间越长,枯死现象越严重。因此,综合污染率、枯死率和愈伤组织诱导情况,认为甜叶菊叶片较好的灭菌条件为 75%酒精 4 s+0.1%升汞 4 min。

3 结论与讨论

在组织培养中,外植体的灭菌是组织培养的前提条件,灭菌剂的种类和灭菌时间对外植体灭菌成功与否具有明显的影响,因此,应当选择适宜的灭菌剂和处理时间,以尽量减少植物组织的污染和死亡。该试验研究结果表明,甜叶菊叶片作外植体时,在无菌条件下先用 75%酒精浸润 4 s,然后用 0.1%升汞灭菌 4 min 效果最好,外植体的污染率和枯死率都较低,愈伤组织诱导率高。该研究结果可知,在对甜叶菊叶片进行酒精浸泡时,当 75%酒精处理 6 s 时,枯死率达 30%。陈华涛等比较分析了 75%乙醇、次氯酸钠、氯气及乙醇+次氯酸钠等不同消毒方法对小豆种子的灭菌效果,结果表明,75%乙醇 1 min+5%次氯酸

2.3 不同灭菌时间对甜叶菊叶片灭菌效果的影响

对筛选出的具有较好灭菌效果的组合(75%酒精和 0.1% HgCl₂)进行不同灭菌时间处理,结果见表 4。

钠 30 min 的消毒方法能有效降低污染率^[11]。于相丽等研究了不同灭菌剂(0.1% HgCl₂、10% NaClO、10% H₂O₂)、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 30 s+10% NaClO 灭菌 20 min 效果最好,污染率 20%^[12]。沈晓霞等采用 70%酒精浸泡 1 h+不同灭菌剂对千层塔茎尖进行灭菌,研究表明 1/5 倍的饱和次氯酸钠溶液灭菌 15 min 效果最好,采用 0.1%的升汞溶液灭菌 3 min 效果最好^[13]。而董振红等^[9]用 75%酒精处理 10 s 效果较好,这可能因为所用外植体不同。灭菌剂 HgCl₂ 的灭菌效果最好,但对植物组织的毒害作用最大,而且 HgCl₂ 严重污染环境,有些国家的试验室严禁使用 HgCl₂,因此,在考虑降低污染率的措施时,不宜采用延长升汞处理时间的办法。

参考文献:

[1] 黄耀亚. 甜叶菊茎叶生药性状及组织的研究[J]. 吉林农业大学学报,1986(2):21-26.
[2] 黄永楷,郑永权,吴应累. 甜菊总甙的降压作用及其机制的初步分析[J]. 中山医科大学学报,1987(2):32-35.
[3] 胡献丽,董文宾,郑丹,等. 甜菊及甜菊糖研究进展[J]. 食品研究与开发,2005,26(1):36-38.
[4] 娄玉霞,宋磊,李新国,等. 甜叶菊叶片离体培养及试管无性系的建立[J]. 上海师范大学学报:自然科学版,2000,29(4):77-78.
[5] 沈秀丽,徐仲. 甜叶菊组织培养条件的研究. I. 外植体、激素浓度、琼脂浓度对愈伤组织形成及芽诱导的影响[J]. 中国糖料,1996(3):24-26.