

大羽藓组培初代培养适宜消毒方法的筛选

郎玉卓, 阚世超, 刘伟才, 周金川, 熊原新* (贵州大学生命科学学院, 贵州贵阳550025)

摘要 [目的] 为苔藓植物组织培养提供一些有价值的参考和依据。[方法] 采用正交设计方法, 对大羽藓配子体和孢子体组培初代培养消毒方法进行筛选。[结果] 结果显示, 配子体初代培养的最佳消毒方法为: 0.5% 次氯酸钠溶液+0.05% 升汞消毒60 s; 孢子体组培初代培养的最佳消毒方法为: 用2.0% 次氯酸钠消毒6 min。[结论] 该试验筛选的方法比较适用于大羽藓配子体组培初代培养。

关键词 大羽藓; 组织培养; 消毒方法; 筛选

中图分类号 S567.23+9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)34-14892-02

Screening of Appropriate Disinfection Method of Early Cultured *Thuidium cymbifolium* Tissue Culture

LANG Yu-zhuo et al (College of Life Science, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025)

Abstract [Objective] The research aimed to provide valuable references for the tissue culture of bryophytes. [Method] Orthogonal design method was used to choose the appropriate disinfection method of early cultured *Thuidium cymbifolium* tissue culture. [Result] The results show that, the best way to disinfect the gametophyte in the early culture was: 0.5% sodium hypochlorite solution + 0.05% mercuric chloride, disinfecting for 60 s, and the best way to disinfect the sporophyte in the early culture was: use 2.0% sodium hypochlorite solution to disinfect for 6 min. [Conclusion] The methods screened in this study was suitable for the tissue culture of early cultured *T. cymbifolium*.

Key words *Thuidium cymbifolium*; Tissue culture; Disinfection method; Screening

大羽藓(*Thuidium cymbifolium* (Doz. et Molk.) Doz et Molk.) 属羽藓科(Thuidiaceae) 羽藓属(*Thuidium*), 为湿润石生植物, 主要生于热带和亚热带地区, 在我国分布于安徽、福建、广东、贵州、广西、海南、湖北、湖南、河北、河南、江苏、江西、香港、黑龙江、辽宁、陕西、山东、四川、台湾、新疆、西藏、云南及浙江^[1]。药用全草, 味淡、性凉, 有清热、拔毒、生肌等功能, 用于治水火烫伤^[2], 具有很高的药用价值。但由于苔藓植物形体微小, 构造特殊, 生长缓慢, 对环境条件要求特殊, 目前对于苔藓植物组织培养方面的研究很少, 用配子体直接作为外殖体的培养在国内外都不常见^[3]。为了更好地开发利用苔藓植物, 笔者对大羽藓的配子体和孢子体组培初代培养的消毒方法进行了筛选, 以期能为苔藓植物组织培养提供一些有价值的参考和依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 大羽藓配子体及孢子体均采自于贵州大学花溪南校区。

1.2 试剂、仪器 Knop 培养基: Ca(NO₃)₂·4H₂O(浓度1 000 ng/L)、KNO₃(浓度250 ng/L)、KH₂PO₄(浓度250 ng/L)、ZnSO₄·7H₂O(浓度3 ng/L)、FeSO₄·7H₂O(浓度12.5 ng/L) 及微量 NaNO₃。蔗糖、琼脂、蒸馏水、pH 试纸、次氯酸钠溶液、升汞、无水乙醇、NaOH、HCl。高压蒸汽灭菌锅、电子天平、超净工作台、光照培养箱等。

1.3 试验方法

1.3.1 培养基的制备。配子体培养基(K1) 制备: Knop 培养基+3% 蔗糖+8% 琼脂, pH 值调至7.0。

孢子体培养基(K2) 制备: Knop 培养基+1% 蔗糖+6% 琼脂, pH 值调至7.0。

1.3.2 消毒方法。配子体的处理: 取新鲜的大羽藓绿色配子体, 洗掉表面的泥土等, 在自来水下流水冲洗4 h 左右, 然后

转入无菌条件下用无菌水冲洗3 次。将清洗干净的配子体剪成1.5 cm 左右的茎叶体小段, 浸入消毒剂中灭菌。消毒方法的筛选试验采用L₄(2³)₂ 水平3 因素4 个处理的正交设计(见表1)。

表1 大羽藓配子体消毒方法筛选正交试验设计

Table 1 The orthogonal test design for the screening of the disinfection methods for *Thuidium cymbifolium* gametophyte

编号	次氯酸钠 %	升汞 %	消毒时间 s
No.	Sodium hypochlorite	Mercuric chloride	Disinfection time
1	0.5	0.025	30
2	0.5	0.050	60
3	1.0	0.025	60
4	1.0	0.050	30

按表1 进行表面灭菌后, 接种到 K1 培养基上。4 个处理每个处理10 个培养皿。重复3 次。每次试验后7 d 统计污染情况。

孢子体的处理: 挑取好的、成熟的带蒴柄的大羽藓孢蒴, 用70% 酒精消毒2 min, 然后用无菌水漂洗^[4], 再用浓度2.0% 的次氯酸钠溶液进行消毒, 次氯酸钠溶液处理设5 个时间梯度, 分别为2、4、6、8、10 min。消毒后用无菌水漂洗3~6 次, 将灭菌后的孢蒴放入盛有少量无菌水的小培养皿中, 切开孢蒴, 挤出孢子, 制成孢子悬浮液, 用吸管吸取少量孢子悬浮液, 均匀洒在盛有 K2 培养基的培养皿中。5 个处理, 每个处理6 个培养皿。重复3 次, 每次试验后10 d 统计污染情况。

1.4 数据处理 用 DPS v7.05 软件对试验数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 大羽藓配子体适宜消毒方法的筛选 采用L₄(2³)₂ 水平3 因素4 个处理的正交设计筛选大羽藓的消毒方法, 结果如表2 所示。

用 DPS v7.05 软件对污染率与消毒剂次氯酸钠溶液浓度、升汞浓度和消毒时间3 个因素进行方差分析, 结果显示, 处理1 与3、处理2 与4 间在0.01 水平无差异, 处理1、3 与处理2、4 之间在0.01 水平有差异。由此可见, 用浓度0.5% 次氯酸钠溶液和浓度0.05% 升汞消毒60 s 与浓度1.0% 次氯酸

基金项目 2007 年贵州大学创新基金资助(校研农2007008)。

作者简介 郎玉卓(1982-), 女, 河北邯郸人, 硕士研究生, 研究方向: 环境植物多样性。* 通讯作者, E-mail: xiongyx@vip.sina.com。

收稿日期 2008-10-10

钠溶液和浓度0.05%升汞消毒30 s 的消毒方法效果比较好。

2.2 大羽藓孢子体适宜消毒方法的筛选 用浓度2.0%次氯酸钠溶液对大羽藓孢子体进行消毒培养,通过DPS v7.05软件污染率与消毒时间进行统计分析,结果见表3。由表3可见,消毒2 min 与4 min 在0.05水平无差异,消毒6、8、10 min 间达0.01显著水平。消毒时间为6 min 效果最好,污染率为0;消毒8 min 次之。

表2 大羽藓配子体适宜消毒方法的筛选结果

Table 2 The screening results of the suitable disinfection methods for *T. cymbifolium gametophyte*

编号 Nb.	接种茎叶体段数 个 Segment number of inoculated stem	污染率 Pollution rate
1	50	0.793 3 ±0.011 5 A
2	50	0.146 7 ±0.150 1 B
3	50	0.620 0 ±0.230 7 A
4	50	0.133 3 ±0.041 6 B

注:不同大写字母表示在0.01水平有差异。下同。

Note: Different capital letters mean difference at 0.01 level. The same as below.

表3 大羽藓孢子体适宜消毒方法的筛选结果

Table 3 The screening result of the suitable disinfection methods for *T. cymbifolium sporophyte*

消毒时间 min	总接种培养皿个数	污染率
Disinfection time	Total dish number withinoculation	Pollution rate
2	18	1.000 0 ±0.000 0 A
4	18	0.9433 ±0.098 1 A
6	18	0.000 0 ±0.000 0 D
8	18	0.330 0 ±0.000 0 C
10	18	0.723 3 ±0.092 4 B

(上接第14888页)

表5 不同处理对可溶性蛋白质含量影响差异显著性分析

Table 5 The difference significance analysis on the effects of different treatments on the content of soluble protein

脱乙酰度 Deacetylation degree %	可溶性蛋白质含量 Content of soluble protein ng/g	显著水平0.05 0.05 significant level	极显著水平0.01 0.01 extremely significant level	昆虫多糖浓度 Concentration of insect polysaccharide ng/kg	可溶性蛋白质含量 Content of soluble protein ng/g	显著水平0.05 0.05 significant level	极显著水平0.01 0.01 extremely significant level
75	35.953 40	ab	AB	2	45.627 38	bc	ABC
80	36.154 93	ab	AB	10	47.744 27	ab	AB
85	36.259 63	ab	AB	50	48.061 33	ab	AB
90	39.065 86	a	A	250	49.273 67	a	A
95	39.448 22	a	A	1 250	44.526 18	cd	BC
CK	32.067 61	b	B	CK	41.700 31	d	C

参考文献

- 王维荣, 裴真明, 欧阳光察. 几种因子对黄瓜幼苗几丁质酶的诱导作用(简报)[J]. 植物生理学通讯, 1994, 30(4): 263-266.
- 严俊. 甲壳素的化学和应用[J]. 化学通报, 1984(11): 26-31.
- RHODES J, ROLLERS S. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and food[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(5): 80-86.
- 张文清, 柴平海, 金鑫荣, 等. 壳聚糖及其衍生物在化妆品中的应用[J]. 高分子通报, 1999(2): 73-75.
- BACONA, MAHIN J, SZER P J, et al. Carbohydrate biopolymer enhance antibody responses to M-cosal delivered vaccine antigens[J]. Infection and Immunity, 2000, 68(10): 5764-5770.
- 胡问玉, 邹良栋. 壳聚糖涂膜对苹果保鲜效应[J]. 植物生理通讯, 1998, 34(1): 17-19.
- 于汉寿, 吴汉章, 张益明, 等. 水溶性壳聚糖对水稻恶苗病和油菜菌核病的作用[J]. 江苏农业科学, 1998(5): 38-40.
- 徐本美, 白克智, 傅凯. 脱乙酰甲壳素对种子萌发的影响[J]. 种子, 1996(3): 50-52.
- 陆家安, 张承妹, 侯根宝, 等. 脱乙酰壳聚糖活性生物制剂对水稻生长的影响[J]. 上海农业学报, 2002, 18(4): 31-34.
- YAO Q, SUN T, ZHOU D X, et al. Antioxidant activity of carboxymethyl chitosan with different substituted degrees[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(1): 5-7, 59.

3 结论与讨论

苔藓植物组织培养是否能够成功, 苔藓植物组织材料的消毒是基础而关键的一步。曹同等设置了12个次氯酸钙的浓度对孢子体和配子体进行消毒, 发现当浓度为12.0%时孢子的存活率最好, 而配子体则在次氯酸钙浓度为9.0%时最好^[5]。李晓毓等通过对不同表面消毒剂及其用量和消毒时间的比较, 最后综合考虑选择浓度0.05%氯化汞溶液消毒60 s 对尖叶匍灯藓外殖体进行消毒培养^[6]。

由于苔藓植物非常矮小, 大多植物体是由单层细胞组成, 不同种类、不同材料的消毒方法也不同, 所以消毒剂的选择和消毒时间的控制都很难把握。70%的酒精穿透能力很强, 用其处理后苔藓植物配子体迅速失绿, 再用升汞消毒则对其伤害非常大, 所以常规的植物组织培养消毒方法对苔藓植物并不适用^[3]。次氯酸钠对植物体的伤害相对较小, 笔者采用正交试验设计筛选出0.5%次氯酸钠溶液+0.05%升汞消毒60 s 的方法比较适用于大羽藓配子体组培初代培养。大羽藓孢蒴由多层细胞组成, 消毒剂的浓度应该相对加大, 消毒时间加长, 这样才能达到理想的消毒效果, 经过多次试验筛选, 用2.0%次氯酸钠消毒6 min, 其污染率为0, 孢子的萌发率达90%以上。

参考文献

- 吴鹏程. 中国苔藓志 第六卷[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 248-250.
- 衣艳君. 中国药用苔藓植物资源[J]. 中草药, 2000, 31(8): 624-628.
- 付素静. 五种观赏藓类植物的配子体发生与组织培养[M]. 南京: 南京林业大学, 2006.
- 于传梅. 五种苔藓植物的组织培养[M]. 上海: 华东师范大学, 2007.
- 曹同, 陈静文, 娄玉霞. 苔藓植物组织培养繁殖技术及其应用前景[J]. 上海师范大学学报: 自然科学版, 2005, 34(4): 52-56.
- 李晓毓, 吴翠珍, 熊源新, 等. 尖叶匍灯藓的组织培养及显微观察[J]. 山地农业生物学报, 2006, 25(3): 217-222.