维普资讯 http://www.cqvip.com

正交试验优选南方红豆杉外植体的消毒方案

李 健 宋晓平 刘海隆 杨柳絮
(西北农林科技大学 动物科技学院 陕西 杨凌 712100)

南方红豆杉(*Taxus chinensis var. mairer*),又名美丽红豆杉,是红豆杉科红豆杉属红豆杉的一个变种。从其中提取出的紫杉醇是一种具有独特抗癌活性的二萜化合物,对卵巢癌,子宫癌,乳腺癌等多种癌症具有明显的治疗效果[1]。然而该树种天然群体数量稀少,种子休眠期较长,生长十分缓慢,加之人为破坏,有濒临灭绝的危险,已被列为国家一级保护植物。利用组织培养的方法生产红豆杉提取紫杉醇,不仅可以保护野生资源,还能有效提高紫杉醇产率,具有良好的工业化前景。在组织培养过程中,污染是经常遇到的较难控制的问题。本试验旨在通过单因素预试验,筛选和确定南方红豆杉愈伤组织诱导过程中影响消毒效果的主要因素,并通过正交试验优化消毒方案,为紫杉醇的规模化生产提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

人工种植的3年生南方红豆杉(购自陕西杨陵中科环境工程公司)上分别摘取1、2年生的茎、叶,以及当年生的茎、叶备用。基本培养基为MS,添加萘乙酸(NAA)、6-苄氨基嘌呤(BA)和2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D),调pH值5.8。

主要仪器有LRH-50-S I智能型人工气候箱(广东省医疗器械厂);SW-CJ-1F洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 外植体的处理 将采下的植物材料,在含0.02%洗洁精的自来水中摇动浸泡10 min,自来水冲洗10 min,转入无菌三角瓶,移入超净工作台。用植物材料体积10倍以上的酒精浸泡30 s,无菌水漂洗1次,用植物材料体积15倍以上的0.1%、0.2%或0.3%升汞摇动浸泡,无菌水冲洗5次,每次1~2 min,用无菌滤纸吸去水分。将植物材料去掉两端,切成1 cm小段,接种于培养基上,放入人工气候箱,24 ℃暗培养,相对湿度60%。每天观察1次,记录愈伤组织出现的时间、数量及培养基颜色的变化情况。

1.2.2 单因素预试验 对植物选材、酒精浓度、升汞浓度、升汞浸泡时间等影响因素进行筛选(见表1),并以愈伤组织诱导率、污染率、死亡率以及培养基颜色变化作为指标进行评定。其中,愈伤组织诱导率=愈伤组织数/外植体数;外植体表面或周围的培养基出现肉眼可见的菌落者即判定为污染;外植体大部分变成深褐色或黑色者判定为死亡;外植体周围出现红色者为++,整个培养基变红者为++++,无明显变化者记为−[4]。

1.2.3 正交试验 根据单因素预试验结果进行正交试验设计[5]。对正交试验中愈伤组织诱导率、污染率和死亡率的结果进行直观分析和方差分析,确定出南方红豆杉外植体的最佳消毒方案。

表1 南方红豆杉外植体消毒单因素影响预试验

筛选因素	取材部位	酒精/%	升汞/%	浸泡时间/min
取材部位	往年生茎、叶,当年生茎、叶	70	0.2	5
酒精浓度	当年生茎	50,70,80	0.2	5
升汞浓度	当年生茎	70	0.1、0.2、0.3	5
浸泡时间	当年生茎	70	0.2	3、5、8、10

表2 南方红豆杉外植体消毒单因素影响预试验结果

影响因素	因素水平	愈伤组织诱导率/%	污染率/%	死亡率/%	培养基变红程度
取材部位	往年生茎	33.3(4/12)	58.3(7/12)	0(0/12)	++
	往年生叶	0(0/13)	46.2(6/13)	15.4(2/13)	−
	当年生茎	53.3(8/15)	6.7(1/15)	0(0/15)	++
	当年生叶	21.4(3/14)	0(0/14)	28.6(4/14)	−
酒精浓度/%	50	46.7(7/15)	13.3(2/15)	0(0/15)	++++
	70	53.3(8/15)	6.7(1/15)	0(0/15)	++
	80	73.3(11/15)	0(0/15)	20(3/15)	+
升汞浓度/%	0.1	66.7(10/15)	13.3(2/15)	0(0/15)	−
	0.2	53.3(8/15)	6.7(1/15)	0(0/15)	++
	0.3	50.0(8/16)	0(0/16)	12.5(2/16)	+
浸泡时间/min	3	53.3(8/15)	0(0/15)	0(0/15)	−
	5	53.3(8/15)	6.7(1/15)	0(0/15)	++
	8	60.0(9/15)	0(0/15)	6.7(1/15)	++
	10	31.2(5/16)	0(0/16)	12.5(2/16)	++

2 结果与分析

2.1 单因素预试验

由表2可知,只有当年生的茎段愈伤组织诱导率较高而污染和死亡率极低,故选其作为正交试验的外植体材料。随着酒精浓度增大,

维普资讯 http://www.cqvip.com

愈伤组织诱导率呈上升趋势，酒精浓度为50%的处理虽然污染情况比较明显，但培养基变红的程度是所有处理中最显著，而培养基颜色变红一般意味着有紫杉醇类物质释放[6]。升汞浓度和浸泡时间对愈伤组织诱导率也有较大影响。综上所述，以酒精浓度50%、70%、80%，升汞浓度0.1%、0.2%、0.3%，浸泡时间3 min、5 min、8 min，作为待考察的水平，进行正交试验。

2.2 正交试验

2.2.1 因素与水平 根据单因素预试验初步得出的结果，选用当年生南方红豆杉茎段作为外植体，对酒精浓度、升汞浓度以及升汞浸泡时间3个因素做3水平的正交试验(见表3)。

表3 南方红豆杉茎段外植体消毒影响因素正交试验 $L_9(3)^3$

水平	酒精/%	升汞/%	浸泡时间/min
1	50	0.1	5
2	70	0.2	8
3	80	0.3	10

2.2.2 最佳消毒方案 正交试验的结果见表4，从对基段外植体正交试验死亡率数据分析中可见，获得最高愈伤组织诱导率的消毒方案为：70%酒精消毒，0.2%升汞浸泡5 min；获得最小污染率的消毒方案为，70%酒精消毒，0.2%或0.3%升汞浸泡5 min；获得最小死亡率的消毒方案为，70%酒精消毒，0.1%升汞浸泡5 min。综合考虑各方面因素，南方红豆杉愈伤组织诱导过程中，外植体消毒的最佳方案为：取当年生嫩茎为外植体，用70%酒精浸泡30 s，0.2%升汞浸泡5 min。

3 讨论

(1) 取材部位 陈永勤等[7]比较了多种红豆杉的愈伤组织诱导情况，发现南方红豆杉的茎段容易形成愈伤组织，但叶片形成愈伤组织的比率要比茎段低得多。本试验的结果表明，叶片诱导出的愈伤组织的大小，远小于相同生长时间的茎段上的愈伤组织，而过小的组织块不利于传代以及进一步的细胞悬浮培养，因而南方红豆杉的叶片不适于用作外植体。杨礼香等[8]发现以芽作为外植体，污染率低且生长较快。但南方红豆杉的芽一般只在春季多发，单纯以芽作为外植体会给组培工作带来限制。往年生的茎段虽然可以有少部分诱导出愈伤组织，但其污染率高，说明随着生长年限的增长内生真菌在红豆杉体内寄生部位逐渐向深扩散，消毒效果和愈伤组织诱导能力较差。综合上述情况，以新生嫩茎作为外植体是较好的选择。

(2) 消毒剂选择 升汞是剧毒的重金属杀菌剂，其原理是Hg^{2+}与蛋白质的巯基结合，使菌体的蛋白质变性。有关研究表明[9]，植物消毒剂中，升汞的灭菌效果最好，但对植物组织的毒害作用也最大，表2中0.3%升汞处理表现出的低诱导率(50%)和高死亡率12.5%明显地反映了这一情况，因此使用时应当慎重，处理时间不能过长。同时，野生红豆杉多数生长在潮湿背阴的环境中，这一物种特性决定了外植体中大量带菌。据相关文献[10~12]报道，红豆杉内生真菌约有300多种，大部分存在于茎中，而常规消毒剂(例如漂白粉等)只能杀死表面和浅层真菌，对深层真菌作用不明显，所以升汞仍然是目前最好的选择。

(3) 升汞浓度和浸泡时间 在升汞浓度和浸泡时间方面，不同报道中的差异较大。苏应娟等[13]认为应当用0.2%升汞浸泡12 min；而盛长忠等[14]则认为用0.1%升汞浸泡5 min即可。这反映出同为南方红豆杉，但不同个体之间的生理差异以及生长时的带菌情况对消毒效果的影响很大。本试验的结果进一步显示，即使采自同一植株，不同部位及不同生长时期对消毒效果也有较大影响。在以新生嫩茎作为外植体的前提下，本试验通过正交设计筛选出的消毒方案为用70%酒精浸泡30 s，0.2%升汞浸泡5 min。

表4 南方红豆杉茎段外植体正交试验结果

序号	酒精浓度/%	升汞浓度/%	浸泡时间/min	诱导率/%	污染率/%	死亡率/%
1	50	0.1	3	27.78(5/18)	16.67(3/18)	0(0/18)
2	50	0.2	5	93.75(15/16)	0(0/16)	0(0/16)
3	50	0.3	8	66.67(10/15)	0(0/15)	20.00(3/15)
4	70	0.1	8	93.75(15/16)	0(0/16)	0(0/16)
5	70	0.2	3	68.75(11/16)	6.25(1/16)	6.25(1/16)
6	70	0.3	5	52.94(9/17)	0(0/17)	5.89(1/17)
7	80	0.1	5	50.00(9/18)	11.11(2/18)	0(0/18)
8	80	0.2	8	73.33(11/15)	0(0/15)	13.33(2/15)
9	80	0.3	3	62.50(10/16)	6.25(1/16)	6.25(1/16)

参考文献

1 叶 勤．现代生物技术原理及其应用[M]．北京：中国轻工业出版社，2003

2 朱广廉．植物组培中的外植体灭菌[J]．植物生理学通讯，1996，32(6)：444～449

3 李 群，杜文平，王米力，等．植物组织培养中控制污染技术研究[J]．四川林业科技，1999，20(4)：22～26

4 朱蔚华，陆 俭，李新兰，等．红豆杉植物愈伤组织诱导培养的观察[J]．中药材，1991，14(9)：5～7

5 袁志发，周静芋．试验设计与分析[M]．北京：高等教育出版社，2000

(6～14略—本刊)★

(栏目责任编辑 张作芳)