

沟叶结缕草组织培养表面灭菌方法的筛选

王栋^{1,2}, 买合木提·克衣木³, 王永雄^{1*}, 胡艳¹ (1. 西南大学动物科技学院, 重庆市牧草与草食家畜重点实验室, 重庆市高校草食动物工程研究中心, 重庆北碚 400716; 2. 塔里木大学动物科技学院, 新疆阿拉尔 843300; 3. 新疆巴州动物疾病控制与诊断中心, 新疆巴音郭楞蒙古自治州 841000)

摘要 [目的] 为建立沟叶结缕草再生体系奠定基础。[方法] 以沟叶结缕草带芽茎段为外植体, 通过正交试验研究 0.1% 升汞、5% 次氯酸钠、75% 酒精和预处理方法等因素对外植体成活率的影响, 筛选最佳表面灭菌方法。[结果] 各因素对外植体成活率的影响顺序为 0.1% 升汞 > 5% 次氯酸钠 > 75% 酒精 > 预处理方法, 而 0.1% 升汞和 5% 次氯酸钠对其影响分别达到极显著和显著水平。沟叶结缕草组织培养的最佳表面灭菌方法为: 先用 5 g 洗洁精加水冲洗 2 次, 再使用 5% 次氯酸钠 (滴入 3 滴 100% 吐温 80), 振荡灭菌 10 min; 最后用 0.1% 升汞 (滴入 3 滴 100% 吐温 80), 振荡灭菌 10 min。[结论] 可用杀菌剂、抗生素等对外植体进行预处理或将抗生素加入培养基中, 起到杀菌和抑菌的作用。

关键词 正交试验设计; 表面灭菌方法; 沟叶结缕草

中图分类号 S688.4 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)20-08560-02

Screening of Surface Sterilization Methods in the Tissue Culture of *Zoysia matrella*

WANG Dong et al (Chongqing Key Laboratory of Forage and Herbivore, College of Animal Science and Technology of Southwest University, Research Center of Herbivore Engineering in Universities of Chongqing, Beibei, Chongqing 400716)

Abstract [Objective] The research aimed to lay the foundation for establishing the regeneration system of *Zoysia matrella*. [Method] With stem with buds of *Zoysia matrella* as explants, the effects of such factors as 0.1% mercuric chloride, 5% sodium hypochlorite, 75% alcohol and pretreatment methods on the survival rate of explants were studied through the orthogonal test. And the optimum surface sterilization methods was screened out. [Result] The effects of each factor on the survival rate of explants orderly were 0.1% mercuric chloride > 5% sodium hypochlorite > 75% alcohol > pretreatment methods and the effects of 0.1% mercuric chloride and 5% sodium hypochlorite reached at extremely significant level and at a significant level. The optimum sterilization method in the tissue culture of *Zoysia matrella* was as follows: flushing with 5 g detergent and water for 2 times, and sterilizing with 5% sodium hypochlorite (dropping 3 drops of 100% Tween 80) for 10 min under vibratory conditions and finally sterilizing with 0.1% mercuric chloride (dropping 3 drops of 100% Tween 80) for 10 min under vibratory conditions. [Conclusion] It could play the role of sterilization and bacteriostasis to pretreat explants with bactericide, antibiotic and so on or adding antibiotic to the medium.

Key words Orthogonal test design; Surface sterilization methods; *Zoysia matrella*

沟叶结缕草 (*Zoysia matrella* (L.) merr) 是禾本科结缕草属多年生草本植物, 原产于台湾、广东、海南等地, 生于海岸沙地上, 亚洲和大洋洲的热带地区也有分布^[1]。是一种高质量的暖季型草坪草, 适于景点绿化、休憩广场和高级运动场的草坪建植, 已成为我国南方大部分地区的主要草坪栽培种^[2]。但因其存在成坪速度慢、叶量少、易感锈病、抗寒性较差、季节变换时易变黄等缺陷, 以及目前育成品种较少的缘故, 已满足不了市场的需求和生态建设的需要, 因而需要通过遗传育种的手段加以改良。传统育种方法因受育种周期长等种种限制, 极大地阻碍了品种选育和繁育。以植物基因工程和细胞工程技术为核心的现代生物技术不仅能够按照预定目标加速新品种的选育, 克服常规育种方法耗时长、工作量大等不足, 而且技术手段渐趋成熟。但若采用这种方法首先必需利用植物组织培养技术建立高频、稳定的植物再生体系。在植物组织培养中, 要求严格进行无菌操作防止污染。但由于重庆地区气候湿润, 土壤潮湿, 加上沟叶结缕草草坪草层厚密, 易使大量微生物繁殖与生长^[3-4], 导致使用沟叶结缕草外植体接种培养后, 污染严重, 易培养失败。正交试验设计是一种高效、快速、灵活的多因素试验方法, 能以较少的试验次数达到较满意的结果, 因而被广泛应用^[5-6]。笔者在预备试验的基础上, 采用正交试验设计, 筛选效果最优的表面灭菌方法, 旨在保证沟叶结缕草再生体系建立的试验能够顺利进行。

1 材料与方法

1.1 材料 植物材料为取自西南大学校园草坪的沟叶结缕草 (*Zoysia matrella* (L.) merr.), 外植体为其带芽茎段。

1.2 方法

1.2.1 试验设计。 采用 4 因素 3 水平 $L_9(3^4)$ 正交试验。

1.2.2 表面灭菌方法与步骤。 对从田间采回的材料, 视其清洁程度, 先用大量流水冲洗 30 min 左右; ①A 处理, 剥取 1~2 cm 带芽茎段, 去离子水冲洗 3 次, 再加入去离子水并磁力搅拌 10 min, 用盛有浓度 75% 酒精的喷壶喷洒装有外植体的烧杯内外壁, 放入超净工作台; ②B 灭菌, 用灭菌水冲洗 1 次; ③C 灭菌, 再用灭菌水冲洗 1 次; ④D 灭菌, 再用灭菌水冲洗 3 次, 最后用灭菌滤纸吸干水分后接种。

1.2.3 培养条件。 培养基为 MS 培养基 (不添加任何激素), 接种后在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光照强度 1 500~2 000 lx, 16 h 光照/8 h 黑暗条件下培养。每个处理重复 3 次。

1.2.4 数据统计分析。 在培养过程中, 如发现污染, 及时将未污染的外植体转移到新鲜培养基上, 直至不再发生污染为止。培养 30 d 后统计成活率。

$$\text{成活率}(\%) = \frac{\text{成活的外植体数}}{\text{接种的外植体数}} \times 100$$

应用 SPSS15.0 进行数据的统计、分析与计算; 对作为百分数 ($p < 0.3$ 和 $p > 0.7$) 的数据统计时进行反正弦 ($y = \arcsin x^{1/2}$) 转换^[5]。

2 结果与分析

2.1 直观分析结果 表 1 表明, 极差 $R_D > R_B > R_C > R_A$, 所以影响成活率的因素主次顺序为: $D > B > C > A$, 即浓度 0.1% 升汞 > 浓度 5% 次氯酸钠 > 浓度 75% 酒精 > 预处理方

基金项目 国家重点基础研究发展计划 (2007CB108901) 资助。

作者简介 王栋 (1982-), 男, 山西阳泉人, 硕士研究生, 研究方向: 牧草与草坪草遗传育种。* 通讯作者。

收稿日期 2008-03-31

表 1 正交试验方案与结果
Table 1 Scheme and results of orthogonal test

处理号 No. of treatment	因素 Factor				成活率 Survival rate // %		
	A 预处理方法 Pretreatment methods	B 浓度 5% 次氯酸钠 (滴入 3 滴 100% 吐温 80) 5% sodium hypochlorite	C 浓度 75% 酒精 75% alcohol	D 浓度 0.1% 升汞 (滴入 3 滴 100% 吐温 80) 0.1% mercuric chloride	重复 1 The 1st repeat	重复 2 The 2nd repeat	重复 3 The 3rd repeat
1	1(去离子水冲洗)	1(不使用)	1(不使用)	1(不使用)	0	0	0
2	1	2(振荡灭菌 10 min)	2(振荡灭菌 1 min)	2(振荡灭菌 10 min)	9.10	10.52	9.10
3	1	3(振荡灭菌 20 min)	3(振荡灭菌 2 min)	3(振荡灭菌 20 min)	0	0	15.89
4	2(5 g 洗衣粉加水冲洗)	1	2	3	0	0	10.52
5	2	2	3	1	0	0	10.52
6	2	3	1	2	21.42	0	10.52
7	3(5 g 洗洁精加水冲洗)	1	3	2	10.52	9.59	9.73
8	3	2	1	3	23.09	18.43	18.93
9	3	3	2	1	0	0	0
R	5.1	6.6	5.9	8.9			

法;各因素的最优水平为:A₃B₂C₁D₂。

2.2 方差分析与多重比较结果 方差分析结果表明,影响成活率的因素主次顺序为:D>B>C>A;且浓度 0.1% 升汞和浓度 5% 次氯酸钠分别达到极显著水平($P<0.01$)和显著水平($P<0.05$)。多重比较结果(表 2)表明,A 因素不同水平间成活率的差异不显著;在因素 B 中,B₂ 的成活率显著高于其余两水平,B₃ 与 B₁ 间的成活率差异不显著;在因素 C 中,C₁ 的成活率显著高于 C₂,其余水平之间的成活率差异不显著;在 D 因素中,D₂ 和 D₃ 的成活率极显著高于 D₁,但 D₂ 与 D₃ 之间成活率的差异不显著。

2.3 最佳表面灭菌方法的筛选结果 通过直观分析、方差分析与多重比较,可以得出最适消毒灭菌方法为:A₃B₂C₁D₂,即先用 5 g 洗洁精加水冲洗 2 次;再使用浓度 5% 次氯酸钠(滴入 3 滴浓度 100% 吐温 80),振荡灭菌 10 min;最后用浓度 0.1% 升汞(滴入 3 滴浓度 100% 吐温 80),振荡灭菌 10 min。

表 2 多重比较结果
Table 2 Results of multiple comparison

水平 Level	A 预处理方法 Pretreatment methods	B 浓度 5% 次 氯酸钠 5% sodium hypochlorite	C 浓度 75% 酒精 75% alcohol	D 浓度 0.1% 升汞 0.1% mercuric chloride
1	4.957 aA	4.485 bA	10.266 aA	1.169 bB
2	5.886 aA	11.077 aA	4.359 bA	10.055 aA
3	10.034 aA	5.315 bA	6.251 abA	9.653 aA

注:多重比较采用新复极差法(Duncan)。同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平有差异,不同大写字母表示在 0.01 水平有差异。

Note:SSR(Duncan) was used for multiple comparison. Different lowercases and capital leeters in a row mean differences at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

3 结论与讨论

(1)试验结果表明,对从田间采回的材料若用洗洁精、洗衣粉等洗液进行清洗的效果要比仅用水洗的效果好,洗洁精的去污除菌作用要优于洗衣粉;灭菌剂处理时间能影响消毒灭菌的效果,表现为灭菌剂处理时间短则消毒效果差,灭菌剂处理时间长则可能对材料的组织和细胞造成损伤,甚至被杀死,这一结果已在大量试验中得到了证实^[7]。但该试验结果表明,不使用浓度 75% 酒精的效果反而比使用浓度 75% 酒精的效果好,其原因有待进一步的研究。

(2)在培养过程中观察到外植体发生污染的时间有早晚之分,并且污染程度也不同。先出现细菌性污染,而后才渐渐出现真菌性污染;细菌性污染远多于真菌性污染,最多为真菌性污染的 38.0 倍,最少为 1.4 倍;培养 8~9 d 后,外植体长成小苗,并伴有白色的短根出现,继续培养后小苗进一步生长并发生增殖分蘖,小根也长成多条且长度增加,并由白色变为浅黄色毛状。健壮的外植体和长成的小苗在培养过程中容易出现细菌污染,笔者认为植物材料在体内含有寄生的细菌,随着材料的培养,细菌进一步生长并表现出来。不同处理间的污染出现时间、结束时间、持续时间不同,但同一处理的不同重复间的污染出现时间、结束时间、持续时间则较为一致。

(3)在培养过程中,处理 8(A₃B₂C₁D₃)的成活率最高,污染率最低,污染出现的时间最晚,污染结束的时间较早,但污染率仍在 46.7%~57.8%。这是由于某些微生物位于维管系统或胞间,因而仅靠传统的表面灭菌消毒方法效果不明显^[8-9]。在今后的试验中,可以使用杀菌剂、抗生素等对外植体进行预处理或将抗生素加入培养基中^[3-4,10-12],起到杀菌和抑菌的作用。

参考文献

[1] 中国植物志编委会.中国植物志:第 10 卷,第 1 册[M].北京:科学出版社,1990:125-131.
 [2] 苟文龙,张新全,白史且,等.沟叶结缕草研究进展[J].草业科学,2002,19(3):62-65.
 [3] 李群,陈丽萍,石铁松.马蹄莲组培过程中真菌和细菌污染的消除方法研究[J].四川师范大学学报,2001,24(6):607-609.
 [4] 黄天带,李维国,黄华孙.降低巴西橡胶树茎段培养污染率的方法研究[J].热带农业科学,2005,25(6):1-3.
 [5] 盖钧镒.试验统计方法[M].北京:中国农业出版社,2000:124-127,285-295.
 [6] 张文彤.SPSS11 统计分析教程[M].北京:中国希望电子出版社,2002:21-24.
 [7] 周维燕.植物细胞工程原理与技术[M].北京:中国农业大学出版社,2001:16.
 [8] 郭新春,肖文惠,陆相田,等.工厂化组织培养中的污染防止措施[J].植物保护,2007(11):31.
 [9] ARNOLD A E,MAYNARD Z,GILBERT G S,et al. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse[J]. Ecology Letters,2000,3(4):267-274.
 [10] 郑永强,刘艳梅,徐坤.生姜组织培养污染率控制研究[J].生物技术,2003,13(6):38-39.
 [11] 王萍,钱钊,李珠,等.不同消毒剂对海带成熟孢子体组织块培养的除菌效果[J].水利渔业,2007,27(2):105-106.
 [12] 王黎波,李晓燕.抗生素在植物组织培养中控制污染的应用[J].辽宁农业科学,2007(3):69-70.