

# 毛尖紫萼藓外植体消毒方法及接种培养基的筛选

崔巍, 张梅娟, 沙伟

(齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**摘要:**以毛尖紫萼藓(*Grimmia pilifera* P. Beauv.)配子体为试材,以 Benek、MS、Knop 3 种培养基为基本培养基,通过预培养和预处理,借助旋流振荡器,对毛尖紫萼藓组织培养消毒方法及接种培养基类型进行了筛选。结果表明:预培养 15 d 左右的外植体,0.025% 升汞溶液旋流振荡 105 s 能有效地对外植体进行消毒, Benek 培养基适合毛尖紫萼藓返绿生长。

**关键词:**毛尖紫萼藓;组织培养;消毒方法;培养基

**中图分类号:**S 603.6 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)10-0138-03

毛尖紫萼藓(*Grimmia pilifera* P. Beauv.)属紫萼藓科(Grimmiaceae)紫萼藓属(*Grimmia*)植物,体粗壮,稀疏成片丛生,高 3~4 cm。茎倾立,挺硬,衡疏叉状分枝,中轴细胞不分化的小型旱生藓类。在我国南北各省区均有分布,呈现出东亚与北美的间断分布<sup>[1]</sup>。苔藓植物具有很强的耐旱性,很多种类的苔藓可以随着环境改变将植物体内的含水量降到最低,以休眠状态生存<sup>[2]</sup>。毛尖紫萼藓的抗性尤为突出,在自然风干状态下,半年前采集的材料仍具有很强的生命力,在复水后数十秒就能复水返绿,可见毛尖紫萼藓具有典型的抗性。植物组织培养研究自 Haberlandt(1902)的工作开始,至今已有 100 多年的历史<sup>[3]</sup>。要做到既彻底灭菌,又保持组织细胞的生命力,使外植体成活又不污染,是长期困扰植物组培工作的难题<sup>[4]</sup>。该试验对毛尖紫萼藓组织培养最关键的步骤消毒,进行探讨研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

毛尖紫萼藓采自黑龙江省五大连池市石龙地区。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 材料预培养** 将野外采集的毛尖紫萼藓,用自来水冲洗干净,充分复水,装入培养瓶,放在培养箱中培养 15 d 左右。培养温度(23±1)℃、光照强度 3 000 lx、光照周期 12 h/12 h。

**1.2.2 材料预处理** 在长有新生茎段的材料中,挑选生

长细长的茎段,在解剖镜下取茎尖部约 5 mm。流水冲洗 5 h 左右。冲洗后将材料泡在水中,防止材料风干。

**1.2.3 消毒方法** 浸泡消毒:试验在超净工作台中进行,培养皿中加入一定浓度的消毒液,用无菌镊子将外植体浸于消毒液中,计时。用无菌镊子将材料取出转入另一个装有无菌水的培养皿中清洗,每次清洗 30 s 以上,清洗 5~8 次。热击法浸泡消毒:将预处理过的材料,40℃ 水浴 5 min,再进行浸泡消毒;40℃ 水浴 10 min,再进行浸泡消毒。旋流振荡消毒:试验在超净工作台中进行,将配好的不同浓度的升汞溶液加入 1.5 mL 离心管中,放入预处理好的材料,立刻在旋流振荡器上剧烈振荡,计时。用无菌镊子将材料取出转入另一只无菌离心管中用无菌水的清洗,每次清洗剧烈振荡 30 s 以上,清洗 5~8 次。消毒液种类、消毒液浓度及消毒时间见表 1。

表 1 消毒液种类、浓度及消毒时间

Table 1 Disinfectant type, concentration and sterilization time

消毒液种类	消毒液浓度	消毒时间		
Disinfection liquid	Concentration of disinfection liquid/ %	Time of disinfection / s		
次氯酸钠 Sodium hypochlorite	0.5	45	60	75
	1.0	45	60	75
升汞 Mercuric chloride	0.025	90	105	120
	0.05	45	60	75
	0.1	15	30	45

**1.2.4 接种** 将消好毒的材料用无菌滤纸吸干残留水份,分别接种到 MS、Knop、Benek 3 种培养基上,每瓶接 5 个外植体。

**1.2.5 培养条件** 培养温度(23±1)℃、光照强度 3 000 lx、光照周期 12 h/12 h,每隔 15 d 转接 1 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 毛尖紫萼藓外植体消毒条件筛选

采用次氯酸钠对毛尖紫萼藓进行消毒,外植体迅速

**第一作者简介:**崔巍(1985-),男,硕士,研究方向为苔藓植物组织培养。E-mail: cuiwei313@163.com。

**责任作者:**沙伟(1963-),女,博士,教授,博士生导师,现从事植物学和植物遗传学教学与科研工作。E-mail: shw1129@263.net。

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31070180)。

**收稿日期:**2012-02-24

失绿,接种后全部染菌,次氯酸钠不适合于毛尖紫萼藓的消毒试验。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,对外植体伤害非常大,可见酒精消毒法对苔藓植物并不适用<sup>[4]</sup>。用升汞对毛尖紫萼藓进行浸泡消毒,染菌率极高,浸泡消毒并不适用于毛尖紫萼藓的消毒试验。经 40℃ 水浴热击处理过的外植体,在一定浓度的升汞溶液浸泡消毒后,能有效的降低染菌率,但接种后全部死亡。一定浓度的升汞溶液,以外植体旋流振荡,能有效的降低外植体染率。由表 2 可知,浓度为 0.025% 的升汞消毒 105 s,无污染率为 76%,成活率为 72%(成活率=能生长出原丝体且不染菌的个数/接种个数×100%),是最好的处理毛尖紫萼藓消毒的方法。0.5% 的升汞消毒 60 s 次之,无污染率为 70%,成活率为 66%。毛尖紫萼藓的叶片没有特殊的抗旱、抗寒及抗紫外线的结构,生命力较脆弱<sup>[5]</sup>。使用 0.1% 的升汞对毛尖紫萼藓进行消毒试验使得外植体全部死亡。0.025% 浓度的升汞浓度较低,短时间的振荡消毒并不能起到很好的消毒效果。

表 2 升汞消毒的浓度和处理时间

Table 2 Mercuric chloride disinfectant concentration and treatment time

浓度 Concentration /%	时间 Time /s	接种数 Inoculated number/个	未污染数 Uncontaminated number/个	无污染率 Uncontaminated rate/%	成活率 Survival rate/%
0.025	90	50	30	60	44
0.025	105	50	38	76	72
0.025	120	50	44	88	52
0.05	45	50	30	60	40
0.05	60	50	35	70	66
0.05	75	50	42	84	32
0.1	30	50	41	82	0
0.1	45	50	50	100	0
0.1	60	50	50	100	0

## 2.2 外植体消毒培养基的筛选

该试验共选用了 3 种培养基,其中 MS 培养基使外植体发黑,返绿情况极差;Benek 和 Knop 2 种培养基材料返绿情况较好,但接在 Knop 培养基上的外植体 5 d 后开始发黑,渐渐死亡。只有 Benek 培养基上的外植体返绿情况较好(图 1)。Benek 较适合于毛尖紫萼藓的消毒试验。



图 1 毛尖紫萼藓原丝体

Fig. 1 Protoneme of *Grimmia piliifera*

## 3 讨论与结论

毛尖紫萼藓的消毒试验中,预培养的时间要适度,培养时间过长,材料出现褐化现象,预培养时间过短,毛尖紫萼藓不能长出较好的芽体,预培养 15 d 左右的材料能够在茎尖处长出新的芽体,新生的芽体含菌量相对较少,细胞分裂较旺盛,适用于消毒试验。预处理的材料大小要适中,材料过大染菌率较高,材料过小,外植体极易被消毒液杀死。

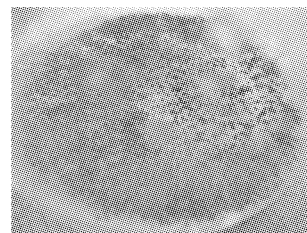


图 2 毛尖紫萼藓内生菌

Fig. 2 Endophytic bacteria of *Grimmia piliifera*

该试验中,染菌的外植体材料多染同一种菌(图 2),染其它杂菌的机率极小。有的外植体已死亡,未染菌,培养瓶内藻类繁茂(图 3)。由此推断,毛尖紫萼藓可能是与内生菌、藻类共生的一种藓类植物。宋艳祥等<sup>[5]</sup>将桉树外植体进行 40℃ 热击处理,有效地降低了内生细菌的污染率。李贵等<sup>[8]</sup>在研究蛇足杉外植体表面消毒时,采用 47℃ 热水浴热击处理,再进行消毒液处理,能降低内生菌污染率。苔藓植物多为阴生植物,毛尖紫萼藓对温度较敏感,相对过高的温度很容易对毛尖紫萼藓外植体造成一定伤害,因此,热击法并不适用于毛尖紫萼藓的消毒试验。



图 3 毛尖紫萼藓共生藻

Fig. 3 Symbiotic algae of *Grimmia piliifera*

肖显华等<sup>[4]</sup>采用浸泡消毒、玻璃棒搅拌、磁力搅拌器进行苹果枝条外植体消毒方法的筛选,结果表明,用磁力搅拌器能有效的降低外植体的污染率。采用浸泡消毒方法处理的毛尖紫萼藓外植体染菌率较高,并不适用于毛尖紫萼藓的消毒。采用旋流振荡,能使外植体与消毒液充分接触,降低染菌率,适用于毛尖紫萼藓的消毒试验。

采用次氯酸钠溶液消毒,由于消毒后,氯气很容易挥发,不会因为消毒剂残留在材料中而对材料造成伤害,这种消毒剂已被广泛用于苔藓植物的组织培养<sup>[9]</sup>。

韩继臣等<sup>[10]</sup>使用 1% 的次氯酸钠消毒 3 min 也可得到较好的成活率,但由于消毒时间长,对蛇苔叶状体影响严重。多数外植体边缘细胞已失去活力,由此可见次氯酸钠不适用于某些苔藓类植物的组织培养消毒试验。该研究借助于小离心管、旋流振荡器剧烈振荡,使外植体与升汞溶液充分接触,能够有效地对外植体进行消毒,并保证了外植体的成活率。但升汞溶液不易祛除,在无菌水冲洗过程中,要进行剧烈振动,清洗至少 5 次,以尽可能减小升汞溶液对外植体的伤害。

MS 培养基是常规的组织培养常用的培养基,由于苔藓植物组织培养的特殊性,Knop、Benek 等无机培养基也是苔藓植物组织培养重要的培养基。朱瑞良等<sup>[11]</sup>使用 Knop、Benek 及 MS 3 种培养基,对 5 种具有代表性的苔藓植物进行组织培养方面的基础研究。相对简单的 Knop 和 Beneck 培养基能促进短月藓(*Brachymenium nepalense*)孢子萌发,并能够在 50 d 左右生长出茎叶体,而复杂的 MS 和 1/2MS 培养基使萌发的孢子发生褐变<sup>[12]</sup>。金灰藓(*Pylaisiella polyantha*)在 Knop 培养基上的孢子萌发率最高<sup>[13]</sup>。MS 与 Knop 培养基不适合毛尖紫萼藓外植体返绿生长,Benek 培养基为毛尖紫萼藓外植体生长较理想的培养基,不同种类苔藓植物的组织培养对于培养基种类的需求有所不同。对于某一种苔藓植物的组织培养,应多选用几种培养基进行筛选,确

保外植体能够成活,以达到组织培养消毒实验的目的。

### 参考文献

- [1] 黎兴江. 中国苔藓志[M]. 北京:科学出版社,2000:16-17.
- [2] Lee J A, Stewart G R. Desiccation injury in mosses. I. Intraspecific differences in the effect of moisture stress on photosynthesis [J]. New Phytologist, 1971, 70(6):1061-1068.
- [3] 杨丽琴,李瑞. 植物组织培养的三大难题[J]. 北方园艺,2008(4):104-107.
- [4] 肖显华. 植物材料表面消毒方法的改进[J]. 生物技术,1999,9(1):43-45.
- [5] 付素静. 五种观赏藓类植物的配子体发生与组织培养[D]. 南京:南京林业大学,2006.
- [6] 张晗,沙伟. 紫萼藓科植物 DNA 提取及遗传多样性的分析[J]. 山东农业科学,2006(1):7-9.
- [7] 宋艳祥,王玉凤,冉隆贤. 热处理和抗生素对桉树固有内生细菌去除的研究[J]. 河北农业大学学报,2011,33(4):64-68.
- [8] 李贵,李菁,黎有有,等. 蛇足石杉外植体表面消毒及内生菌消除方法[J]. 吉首大学学报(自然科学版),2009,30(4):100-103.
- [9] Sokal I, Kuta E, Przywara L. Callus induction and gametophyte regeneration in moss cultures [J]. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 1997, 39:35-42.
- [10] 韩继臣,沙伟. 蛇苔组织培养初探[J]. 北方园艺,2009(7):117-119.
- [11] 于传梅. 五种苔藓植物的组织培养[D]. 上海:华东师范大学,2007.
- [12] 刘俊华,陈坤,段代祥. 植物组织培养技术及其在苔藓植物中的应用[J]. 安徽农业科学,2010(1):56-57.
- [13] 王振杰,黄士良,李志,等. 不同 pH 值和培养基对金灰藓(*Pylaisiella polyantha*)孢子萌发的影响[J]. 河北师范大学学报,2008,32(6):813-816.

## Screen of Sterilized Methods and Inoculation Culture Medium Filter for Explants of *Grimmia piliifera*

CUI Wei, ZHANG Mei-juan, SHA Wei

(College of Life Sciences and Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006)

**Abstract:** Chosen *Grimmia piliifera* gametophytic as test material, Benek, MS, Knop as basic culture medium, the tissue culture of disinfection method and inoculation medium types were screened, through pre-culture, pretreatment, had the aid of swirl oscillator. The results indicated that explants pre-culture for about fifteen days, swirl oscillating by 0.025% mercuric chloride solution for 105 seconds could disinfect effectively for explants. Benek culture medium was suitable for *Grimmia piliifera* to return to green growth.

**Key words:** *Grimmia piliifera*; tissue culture; sterilization method; culture medium