

山丹丹开放式组织培养抑菌剂的筛选

王凯^{1,2}, 蔡晓妮³, 王延峰^{1,2*}

(1. 延安大学生命科学学院, 陕西延安 716000; 2. 陕西省红枣重点实验室, 陕西延安 716000; 3. 延安正大宏园林绿化有限公司, 陕西延安 716000)

摘要 为简化组培环节, 降低组培成本, 对开放式组织培养中山丹丹增殖和生根培养基添加次氯酸钠浓度进行筛选。结果显示: 添加次氯酸钠浓度为 0.013% 时, 山丹丹增殖系数最高; 次氯酸钠浓度为 0.016% 时, 山丹丹生根率最高。最终选择 0.014% 为山丹丹开放式组织培养的最适浓度。

关键词 开放式组织培养; 山丹丹; 抑菌剂

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)23-0140-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.23.034



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Selection of Bacteriostatic Agent in Open Tissue Culture of *Lilium pumilum*

WANG Kai^{1,2}, CAI Xiao-ni³, WANG Yan-feng^{1,2} (1. College of Life Science, Yan'an University, Yan'an, Shaanxi 716000; 2. Key Laboratory of Chinese Jujube, Yan'an, Shaanxi 716000; 3. Yan'an Zhengda Hong Landscaping Co., Ltd., Yan'an, Shaanxi 716000)

Abstract In this experiment, the concentration of antibacterial agent (sodium hypochlorite) was selected for the culture medium of proliferation and rooting in open tissue culture of *Lilium pumilum*. The results showed that when the concentration of sodium hypochlorite was 0.013%, the multiplication coefficient was the highest; when the concentration of sodium hypochlorite was 0.016%, the rooting rate was the highest. Finally, 0.014% was selected as the optimal concentration for open tissue culture of *L. pumilum*.

Key words Open tissue culture; *Lilium pumilum*; Bacteriostatic agent

开放式组织培养主要通过添加抑菌剂, 摆脱无菌操作环节, 在未消毒的自然试验条件下实现的组织培养方式^[1]。与传统组织培养不同之处在于, 开放式组织培养是在开放未消毒的环境中进行试验操作, 省去高压锅和超净工作台等设备, 简化组织培养步骤, 提高试验效率, 降低组培成本。开放式组织培养使用的培养基不通过高压灭菌操作, 激素和营养元素损失较少, 组培苗品质优良, 通过添加抑菌剂实现开放式组织培养的植物有东北红豆杉^[2]、香蕉^[3]、魔芋^[4]等。

山丹丹(*Lilium pumilum* DC.) 为百合科百合属多年生草本植物^[5], 其叶狭长, 色彩鲜红, 具有观赏价值, 是陕北地区极其珍贵的城市园林绿化植物^[6-7], 山丹丹同时具有一定的食用和药用价值^[8-9]。

筛选次氯酸钠抑菌剂的合适浓度, 进行山丹丹开放式组织培养研究, 以期降低组培成本, 简化组培环节, 增加经济效益。

1 材料与与方法

1.1 山丹丹开放式组培的初步建立

1.1.1 材料与培养条件。

1.1.1.1 材料。 选用山丹丹种球来源于陕西甘泉(109.34°E、36.27°N), 选取外形饱满、直径 2.5 cm 左右、鲜重 3.0~3.5 g 的健康山丹丹种球。抑菌剂为次氯酸钠^[10]。

1.1.1.2 培养条件。 培养室采用 LED 日光灯照明, 28 °C 恒温诱导不定芽萌发, 初期暗处理 7 d, 不定芽萌发后采用 1 500~2 000 lx 光照, 光照周期为 8:00—20:00(12 h/d)^[11],

湿度保持 60%~75%。

1.1.2 方法。

1.1.2.1 开放式组织培养培养基配制。 MS 培养基(蔗糖、琼脂、6-BA、NAA)高压灭菌后调 pH 至 5.8~6.0, 待琼脂未凝固前添加一定浓度抑菌剂, 分装封口。

1.1.2.2 外植体的消毒与接种。 纯水清洗山丹丹种球, 剥取鳞片先用 75% 乙醇消毒 30 s, 无菌水清洗 5~6 次, 再用 0.1% 升汞消毒 15 min, 无菌水清洗 5~6 次, 最后用 75% 乙醇消毒 30 s, 无菌水清洗 5~6 次^[12]。

清洗消毒后切割山丹丹鳞片成 1 cm × 1 cm 大小, 将鳞片内侧凹面向上接种培养, 每天观察组织块污染与分化, 统计结果。

1.1.2.3 抑菌剂的药效检验。 分别添加浓度为 0.001%、0.005%、0.01%、0.05% 和 0.1% 的次氯酸钠进行药效检验。在培养瓶中分别接入 4 个菌斑(酵母菌和霉菌各 2 个), 每个浓度梯度接 5 瓶, 培养室内光照培养。观察抑菌效果, 每 3 d 观察 1 次, 统计存活率。

$$\text{存活率} = \frac{\text{存活菌斑数}}{\text{接种菌斑数}} \times 100\%$$

1.2 山丹丹开放式组培的优化

1.2.1 材料与培养条件。 以开放式组织培养 2 代成功诱导且长势相对一致的分化芽为材料。培养条件同“1.1.1”。培养过程中, 及时清理污染的培养瓶。

1.2.2 方法。

1.2.2.1 培养基制备与接种。 培养基制备同“1.1.2”。

1.2.2.2 山丹丹增殖培养最佳次氯酸钠浓度筛选。 将未高温灭菌操作的 MS 增殖培养基(培养基配方: 40 g/L 蔗糖、8 g/L 琼脂、1 mg/mL 6-BA、0.1 mg/mL NAA) 分为 7 组, 分别加入浓度为 0.007%、0.009%、0.011%、0.013%、0.015%、

基金项目 国家自然科学基金项目(31751005); 陕西省重点研发计划项目(2018SF-331); 延安市科技局项目(2018CGZH-16)。

作者简介 王凯(1991—), 男, 陕西安塞人, 硕士, 从事生物化学与分子生物学研究。* 通信作者, 教授, 博士, 从事植物资源研究与利用、植物功能基因组研究。

收稿日期 2020-03-30; **修回日期** 2020-05-09

0.017%和0.019%的次氯酸钠,在自然开放的环境下,接入“1.1.2”中所得山丹丹鳞片诱导长势相近的丛生芽,每瓶接入3株丛生芽,每组浓度梯度接10瓶,对照组为传统组培经高温灭菌处理,组培室光照培养,连续观察30d后统计污染率和增殖系数,及时剔除污染组培苗。

$$\text{污染率} = \frac{\text{污染瓶数}}{\text{接种瓶数}} \times 100\%$$

$$\text{增殖系数} = \frac{\text{增殖芽数}}{\text{接种芽数}} \times 100\%$$

1.2.2.3 山丹丹生根培养最佳次氯酸钠浓度筛选。将未高温灭菌操作的生根培养基(培养基配方:35 mg/L蔗糖、8 mg/L琼脂和1.0 mg/mL NAA, pH 6.0)分为7组,分别加入浓度为0.006%、0.008%、0.010%、0.012%、0.014%、0.016%和0.018%的次氯酸钠。待山丹丹幼芽长至约4 cm时,取长势好、无根的单株幼芽,以开放的形式接入生根培养基,每瓶接入3株幼芽,每组接20瓶,培养室中光照培养,连续观察30d后统计污染率和生根率,及时剔除污染组培苗。

$$\text{污染率} = \frac{\text{污染瓶数}}{\text{接种瓶数}} \times 100\%$$

$$\text{生根率} = \frac{\text{生根芽数}}{\text{接种芽数}} \times 100\%$$

1.3 数据处理 利用SPSS 16.0软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 人工接菌试验抑菌剂有效浓度确定 由表1可知,次氯酸钠对细菌和真菌的抑菌效果明显,次氯酸钠浓度为0.05%时,细菌和真菌的存活率为0。

2.2 山丹丹开放式增殖培养次氯酸钠浓度的优化 由表2可知,污染率与次氯酸钠浓度呈负相关,而增殖系数随着次氯酸钠浓度的增加,出现先升高后降低的趋势;增殖系数最高为3.28,此时次氯酸钠浓度为0.013%,污染率为12.79%;次氯酸钠浓度在0.009%和0.019%时增殖系数差异不显著,当次氯酸钠浓度高于0.013%后,增殖系数降低,这是次氯酸钠浓度越高对山丹丹不定芽毒害作用越大所致。

2.3 山丹丹开放式生根培养次氯酸钠浓度的优化 由表3

可知,污染率与次氯酸钠浓度呈负相关,而生根率随着次氯酸钠浓度的增加,出现先升高后降低的趋势,生根数与次氯酸钠浓度呈负相关;生根率最高为85.7%,此时次氯酸钠浓度为0.016%,污染率为11.7%,生根数为4.48;当次氯酸钠浓度为0.014%时,与传统组织培养的生根数没有显著性差异。选择0.014%为山丹丹增殖和生根培养的最佳抑菌浓度。

表1 抑菌剂培养基人工接菌试验结果

Table 1 Experimental results of artificial inoculation with antimicrobial culture medium

浓度 Concentration//%	接种数 Number of inoculations//个	存活数 Survival number//个	存活率 Survival rate//%
0.001	20	6	30
0.005	20	4	20
0.01	20	2	10
0.03	20	1	5
0.05	20	0	0
0.1	20	0	0

表2 不同浓度次氯酸钠对山丹丹增殖培养的影响

Table 2 Effects of different concentrations of sodium hypochlorite on proliferation culture of *Lilium pumilum*

浓度 Concentration//%	接种芽数 Number of inoculated buds 个	污染情况 Contamination		增殖情况 Proliferation	
		污染芽数 Number of contaminated buds 个	污染率 Contamination rate//%	增殖芽数 Number of proliferating buds//个	增殖系数 Proliferation coefficient
0.007	90	17	18.33 aA	177	1.97 fF
0.009	90	15	16.54 bB	212	2.36 eE
0.011	90	13	14.07 cC	266	2.95 cC
0.013	90	12	12.79 dD	295	3.28 bB
0.015	90	11	11.65 eE	253	2.81 cCD
0.017	90	9	10.31 fF	234	2.60 dD
0.019	90	8	9.50 gG	213	2.37 eE
CK	90	5	5.21 hH	326	3.65 aA

注:同列数据后小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$),同列数据后大写字母不同表示差异极显著($P < 0.01$)

Note: Different small letters within the same column mean significant differences ($P < 0.05$), different capital letters within the same column show extremely significant differences ($P < 0.01$)

2.4 开放式增殖与生根最佳培养基的验证 由表4、图1可以看出,开放式组培的污染率(11.45%)高于传统组培(6.01%);

表3 不同浓度次氯酸钠对山丹丹生根培养的影响

Table 3 Effects of different concentrations of sodium hypochlorite on rooting culture of *Lilium pumilum*

浓度 Concentration//%	接种芽数 Number of inoculated buds//株	污染情况 Contamination		生根情况 Rooting			
		污染芽数 Number of contaminated buds//株	污染率 Contamination rate//%	生根芽数 Number of rooting buds//株	生根率 Rooting rate//%	根长 Root length//cm	生根数 Rooting number//个
0.006	90	22	24.2 aA	68	75.0 fE	3.41 aA	6.10 aA
0.008	90	19	21.2 bB	70	78.0 dD	3.39 aA	6.01 abA
0.010	90	16	17.6 cC	75	83.1 dC	3.40 aA	6.02 abA
0.012	90	14	16.0 dD	76	83.9 cdC	3.41 aA	5.88 bcAB
0.014	90	12	13.2 eE	76	84.7 bcBC	3.29 abA	5.73 cB
0.016	90	11	11.7 fF	77	85.7 bB	3.11 bB	4.48 eD
0.018	90	9	10.0 gG	75	83.4 dC	2.77 cA	3.58 fE
对照 Control	90	6	7.0 hH	82	91.6 aA	3.45 aA	5.19 dC

注:同列数据后小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$),同列数据后大写字母不同表示差异极显著($P < 0.01$)

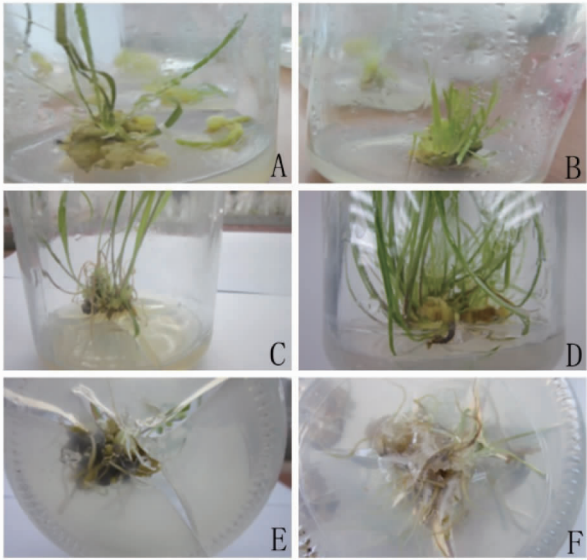
Note: Different small letters within the same column mean significant differences ($P < 0.05$), different capital letters within the same column show extremely significant differences ($P < 0.01$)

表4 开放式组织培养最佳组合验证

Table 4 Best practices in open organizational culture

处理 Treatment	接种芽数 Number of inoculated buds//株	污染情况 Contamination		增殖情况 Proliferation		生根情况 Rooting			
		污染数 Number of contami- nation//株	污染率 Contam- ination rate//%	增殖数 Number of prolife- ration//株	增殖系数 Proliferation coefficient	生根数 Rooting number//株	生根率 Rooting rate//%	根长 Root length//cm	生根数 Rooting number//个
开放式 Open	90	10	11.45 a	295	3.28 a	80	88.89 b	4.1 a	6.1 a
传统 Tradition	90	5	6.01 b	268	2.98 b	82	91.47 a	3.7 b	5.4 a

开放式组培的增殖系数(3.28)高于传统组培(2.98);开放式组培的生根率(88.89%)低于传统组培(91.47%),但开放式组培的根长和生根数目优于传统组培。



注:A. 传统增殖培养;B. 开放增殖培养;C和E. 传统生根培养;D和F. 开放生根培养

Note:A. Traditional proliferation culture; B. Open propagation culture; C and E. Traditional rooting culture; D and F. Open rooting culture

图1 开放培养与传统培养山丹丹生长情况对比

Fig. 1 Open culture and traditional culture of *Lilium pumilum*

3 结论与讨论

该试验对开放式组培过程中山丹丹增殖培养基和生根培养基次氯酸钠最佳抑菌浓度进行筛选,结果可得培养芽的污染率和次氯酸钠浓度呈正相关,而增殖系数和生根率随着次氯酸钠浓度的增加出现先升高后降低的趋势。培养芽的增殖系数最高时,次氯酸钠添加浓度为0.013%,此时污染率略高于传统组织培养;当次氯酸钠浓度为0.016%时,尽管此时的污染率降低,培养芽生长的根数较多,但增殖系数降低,是由于次氯酸钠浓度越高,对山丹丹不定芽毒害作用越大

所致,如再提高抑菌剂浓度,生根数和根长都会受到抑制。为降低不定芽的污染,兼顾生根和增殖,选择0.014%为山丹丹开放式组织培养的最适抑菌浓度。

传统组织培养具有污染率低的优点,但其需要严格的无菌操作和无菌培养环境,消毒过程中易造成培养基营养成分和激素损失,影响后期培养芽的增殖和生长状态,同时无菌操作环节所需仪器设备等投入增加了生产成本,降低了经济效益。开放式组织培养是组织培养的一种改进形式,这种培养需借助抑菌剂抑制培养环境中的微生物生长,在开放未消毒的环境中进行试验操作,省去无菌操作,简化组培环节,降低了生产成本,激素和营养元素损失较少,组培苗品质优良。开放式组织培养的关键在于抑菌剂的使用,抑菌剂种类和浓度的选择关乎开放式组织培养的成败。该试验选择次氯酸钠作为抑菌剂,筛选合适的使用浓度,为山丹丹的开放式组培奠定了基础,同时也为开放式组织培养中抑菌剂的使用提供了理论依据和选择参考。

参考文献

- [1] 周亚辉. 植物组培新方法——开放式组织培养研究概况[J]. 中国园艺文摘, 2018, 34(6): 57-59.
- [2] 王丹, 刘霞. 山梨酸钾在红豆杉开放式组织培养中的应用[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(2): 634-635.
- [3] 解辉. 香蕉开放式组织培养体系研究[D]. 海口: 海南大学, 2011.
- [4] 赵青华, 陈永波, 滕建勋, 等. 开放式组织培养下魔芋快繁技术研究[J]. 现代农业科技, 2011(13): 114-115.
- [5] WANG S J, LIU L L, YUAN L N, et al. Applied research on agricultural streptomycin in open culture of taxus cuspidate[C]//World Automation Congress(WAC). Puerto Vallarta, Mexico: IEEE, 2012: 1-4.
- [6] 齐向英, 陈宗礼, 薛皓, 等. 陕北野生山丹丹组培快繁技术研究[J]. 北方园艺, 2011(22): 115-117.
- [7] 王延峰, 杨宗保, 贺晓龙, 等. 低温和植物生长调节剂对山丹丹休眠与花期的影响[J]. 延安大学学报(自然科学版), 2014, 33(4): 89-91.
- [8] 王珍华, 莫国超, 唐道城, 等. 八种百合的主要营养成分比较分析[J]. 青海大学学报(自然科学版), 2012, 30(1): 11-13, 34.
- [9] 王琦. 兰州百合化学成分的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007: 10-11.
- [10] 黄敏, 梁春辉, 李秀平, 等. 两种抑菌剂在铁皮石斛开放式组织培养的应用[J]. 北方园艺, 2018(12): 136-140.
- [11] 曲波, 张谨华, 王鑫, 等. 温度和光照对藜麦幼苗生长发育的影响[J]. 农业工程, 2018, 8(7): 128-131.
- [12] 李菀, 李俊毅, 田哲妮, 等. 野生山丹鳞片快速无性繁殖体系的建立[J]. 陕西农业科学, 2018, 64(8): 35-36, 42.

(上接第128页)

- [20] 李晓丹, 张烨, 邹淑梅, 等. 高致病性 A(H5N6) 亚型禽流感病毒全基因组序列测定方法的建立[J]. 病毒学报, 2017, 33(1): 19-23.
- [21] 王熹婧. 鸡源禽流感病毒 H6N6 亚型对小鼠致病性以及在小鼠呼吸道组织复制的研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2019.
- [22] 丁晴微, 邓国华, 施建忠, 等. 两株鸭源 H6N2 亚型禽流感病毒的序列

- 分析及对鸡的致病性研究[J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33(4): 270-275.
- [23] 熊文婕, 谢芝勋, 曹国敏, 等. 2016~2017年防城港市活禽市场低致病性禽流感病毒监测分析[J]. 中国家禽, 2018, 40(9): 70-72.
- [24] 徐晓龙, 包红梅, 陈化兰, 等. 影响禽流感病毒致病性和传播的关键氨基酸位点的研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(2): 165-168.