

纳米氧化锌消毒小蓟外植体应用研究

邓凯元,朱雨荷,陈 婷,潘玉欣

(华北理工大学 生命科学学院,河北 唐山 064009)

摘要:为使纳米氧化锌在组织培养中达到最佳消毒效果,以小蓟叶片外植体为材料,建立纳米氧化锌消毒的组织培养无菌体系。结果表明:纳米氧化锌浓度为 $1\sim 7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对小蓟外植体消毒效果逐渐提升,褐化率也逐渐升高,不同浓度纳米氧化锌对愈伤组织的诱导和生长没有明显的影响。纳米氧化锌最佳消毒处理浓度为 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,处理外植体 20 min。 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 纳米氧化锌+0.1% 升汞消毒,外植体大约 20% 有污染,愈伤组织生长良好。 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 纳米氧化锌+0.1% 升汞达到最佳的消毒效果,但愈伤组织诱导被抑制,生长缓慢。

关键词:纳米氧化锌;小蓟;组织培养;杀菌

中图分类号:Q94-331;Q7 文献标识码:A 文章编号:1002-2767(2016)08-0019-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.08.0019

纳米材料作为新世纪的主流研究对象,具有一定的杀菌能力。目前组织培养中面临的最大的问题是外植体消毒的问题,虽然现在已经使用了很多的消毒剂,但是由于某些消毒剂的毒性或者残留性,例如升汞和次氯酸这类消毒剂对人有着明显的腐蚀性和毒性,所以在必须格外小心。纳米氧化锌颗粒粒径在 $1\sim 100\text{ nm}$,具有良好的抑菌杀菌性^[1-4],纳米氧化锌对微生物作用方式主要是空穴效应,对人体却几乎没有毒害^[5],在一定的浓度范围内,可以促进植物的生长及发育^[6-7]。

纳米氧化锌在消毒研究方面的相关报道较少,缺少对其最佳消毒浓度、时间、与常规消毒剂的效果对比等研究和条件。本研究以小蓟叶片作为外植体,纳米氧化锌为消毒剂,探索不同时间和浓度处理情况下,纳米氧化锌作为表面消毒剂的消毒效果,以及对小蓟外植体愈伤组织诱导的影响。

1 材料与方

1.1 材料

供试材料小蓟采自华北理工大学校园内花圃。培养基为 MS 培养基($\text{MS}+6\text{ g}$ 琼脂粉+ 30 g 蔗糖+ $0.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D + $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA),空白 MS 培养基($\text{MS}+$

6 g 琼脂粉+ 30 g 蔗糖)。

1.2 方法

1.2.1 不定形纳米氧化锌制备 称取 1.2 g 的尿素溶解于 20 mL 去离子水中, 9.5 g 醋酸锌溶解于 60 mL 去离子水中, $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应釜中高温反应 10 h 。冷却至常温,去除上清液,去离子水清洗沉淀 3 次。置于烘箱中烘干,形成不定型纳米氧化锌粉末,并分别配制成 $1、2、3、4、5、6、7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的水溶液各 50 mL 用于消毒实验。

1.2.2 外植体取材及处理 选取长势良好的小蓟叶片,置于烧杯中,使用洗涤剂清洗叶片并浸泡 5 min ,然后使用去离子水冲洗 $3\sim 5$ 次待用。

1.2.3 不同浓度纳米氧化锌溶液消毒处理 将小蓟叶片使用 75% 的乙醇浸泡 30 s ,分别在不同浓度的纳米氧化锌溶液中浸泡 15 min ,以升汞和去离子水作对照(见表 1)。

表 1 不同浓度纳米氧化锌消毒处理
Table 1 Disinfection under different concentration of Nano-ZnO

处理 Treatments	浸泡时间/min Soaking time	
纳米氧化锌浓度/ $(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ Nano-ZnO concentration	1	15
	2	15
	3	15
	4	15
	5	15
	6	15
	7	15
升汞 Mercuric chloride		15
去离子水 Deionized water		15

收稿日期:2016-03-10

基金项目:华北理工大学在校大学生创新创业训练计划资助项目(X2014059)

第一作者简介:邓凯元(1993-),男,福建省龙岩市长汀县人,在读学士,从事植物学研究。E-mail:294450783@qq.com。
通讯作者:潘玉欣(1979-),女,副教授,博士,硕士生导师,从事植物学研究。E-mail:panyu-xin@163.com。

表 2 三种浓度纳米氧化锌不同时间消毒处理
Table 2 Disinfection under three concentration and different time of Nano-ZnO

处理时间/min Treatment time	纳米氧化锌浓度/ (g·L ⁻¹) Nano-ZnO concentration
10	3
	5
	7
15	3
	5
	7
20	3
	5
	7
25	3
	5
	7
30	3
	5
	7

取出叶片去离子水冲洗干净,将叶片中间部位剪成 0.5 cm² 大小,放入 MS 培养基中进行培养,3 d 后观察外植体的感染率。将未感染的外植体转接到空白 MS 培养基上培养,14 d 后观察剩下的没有感染的外植体的发育状况^[7]。

1.2.4 不同消毒时间处理小蓟外植体试验 将清洗处理过的小蓟外植体,不经过酒精杀菌,分别

浸泡在不同浓度纳米氧化锌溶液中 10、15、20、25、30 min(见表 2)。然后使用无菌去离子水冲洗 3 次,洗去残留的纳米氧化锌。将小蓟剪成块状接入 MS 培养基中。3 d 后观察外植体的感染率。将未感染的外植体转接到空白 MS 培养基上培养,14 d 后观察剩下的没有感染的外植体。记录愈伤组织出愈时间和愈伤组织生长的情况。

1.2.5 纳米氧化锌-升汞共同处理外植体试验 将洗净的外植体直接用 1、2、3、4、5、6、7 g·L⁻¹ 纳米氧化锌浸泡 15 min,再使用升汞浸泡 10 min。以酒精处理 30 s,升汞浸泡 10 min 为对照。去离子水冲洗 3 次后接种于 MS 培养基上。3 d 后观察统计外植体感染的数量。将未感染的外植体转接到空白 MS 培养基上培养 14 d。记录愈伤组织出愈时间和愈伤组织生长情况。

2 结果与分析

2.1 不同浓度纳米氧化锌消毒效果

不同浓度的纳米氧化锌在 15 min 的消毒时间下,小蓟外植体感染率会随着纳米氧化锌浓度的增加而有降低趋势。浓度达到 5 g·L⁻¹ 及以上时感染率最低。与王发园^[8]的研究结果相差无几。随着纳米氧化锌的浓度的增长,外植体的褐化现象逐渐严重。与去离子水对照组相比较,用纳米氧化锌消毒处理感染率明显降低。与升汞对照相比,褐化率较高,与王振红等^[7]研究当纳米氧化锌浓度大于 0.4 g·L⁻¹ 会对植物造成毒性相符合。愈伤组织诱导出现时间及生长状态没有明显差别,长势良好。

表 3 不同浓度纳米氧化锌处理结果
Table 3 The result of disinfection under different concentration of Nano-ZnO

处理 Treatments	浸泡时间/min Soaking time	感染数量 Infection number	褐化数量 Browning number	褐化率/% Browning rate	愈伤组织出愈时间/d Callus emergence time
纳米氧化锌浓度/ (g·L ⁻¹) Nano-ZnO concentration	1	15	9	*	8
	2	15	9	*	8
	3	15	7	*	7
	4	15	6	2	13.33
	5	15	2	7	46.67
	6	15	3	8	53.33
	7	15	3	8	53.33
升汞 Mercuric chloride	15	0	0	0	8
去离子水 Deinonized water	15	15	*	*	8

“ * ”表示感染数量太多无法统计褐化率。
“ * ” mean infection number was too many browning rate can't be calculated.

2.2 不同处理时间的消毒效果

纳米氧化锌浓度为 3、5、7 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,消毒效果均随着处理时间的延长而增强,感染率下降,褐化数量上升(见图 1,图 2)。相同时间下,褐化率随纳米氧化锌浓度增高不断上升,外植体最高褐化数

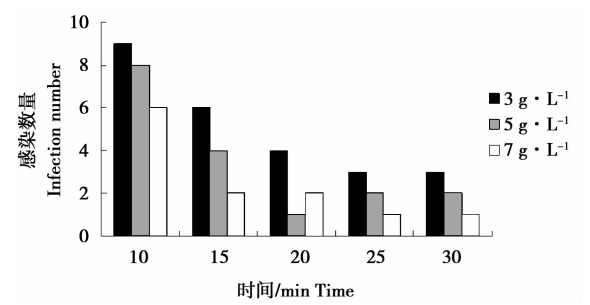


图 1 三种浓度纳米氧化锌不同处理时间感染数量
Fig. 1 The infection number of disinfection under three concentration and different time of Nano-ZnO

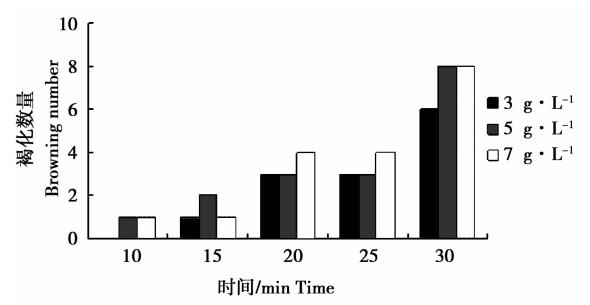


图 2 三种浓度纳米氧化锌不同处理时间褐化数量
Fig. 2 The browning number of disinfection under three concentration and different time of Nano-ZnO

量达 8 块,褐化率为 53.33%。纳米氧化锌在 5 和 7 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,处理时间 15~20 min 条件下消毒效果较好。不同处理时间下,愈伤组织诱导出现的时间没有明显差别,愈伤组织长势良好。

2.3 纳米氧化锌-升汞混合使用消毒效果

在常规操作下,升汞处理之前需使用酒精,酒精对外植体的损伤较大,可能使某些细菌快速缩水,形成“休眠”状态,造成后续升汞不起作用。

本试验中采用纳米氧化锌与升汞同时消毒处理,消毒的效果较纳米氧化锌的单一处理作用明显提升。随着纳米氧化锌浓度的提高,杀菌效果提升。纳米氧化锌浓度在 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,大约有 20% 的污染率,愈伤组织长势良好。纳米氧化锌浓度为 3~7 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,经升汞再处理,可以起到完全杀菌的效果(见图 3,图 4)。

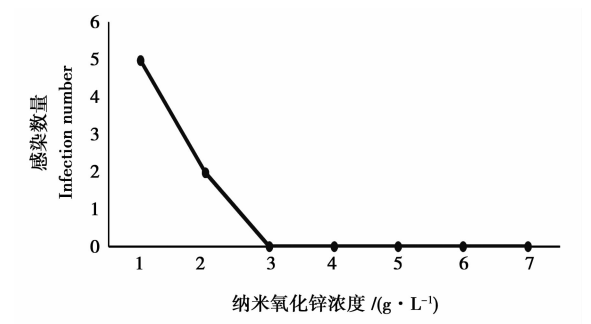


图 3 不同浓度纳米氧化锌-升汞处理结果
Fig. 3 The result of disinfection under different concentration of Nano-ZnO and mercuric chlorid

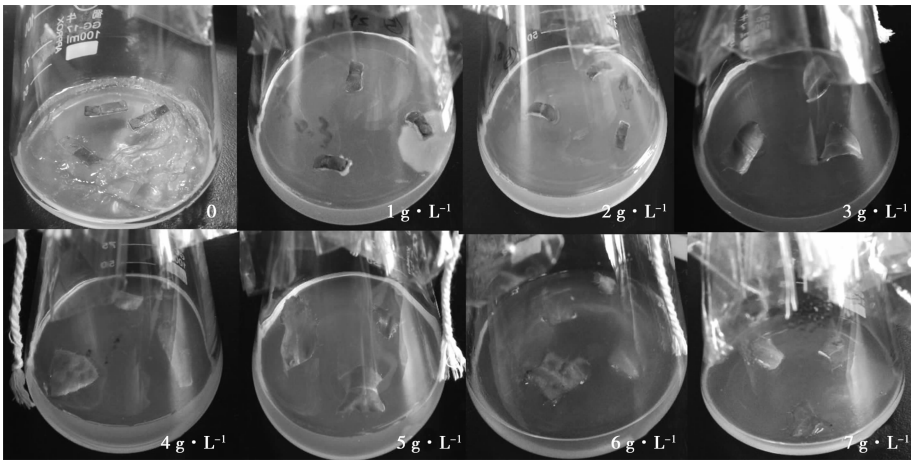


图 4 不同浓度纳米氧化锌-升汞处理外植体
Fig. 4 The explants growth under different concentration of Nano-ZnO and mercuric chlorid

纳米氧化锌浓度的提高,容易引发愈伤组织的“中毒”现象(见图 5)。酒精消毒处理的外植体,愈伤组织沿叶脉向四周边缘被诱导(见图

5A)。高浓度($\geq 3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)时纳米氧化锌和升汞共同消毒处理的外植体,发生表皮脱离现象,在外植体的各个部位均有愈伤组织诱导发生,但愈伤组

织生长缓慢,无明显颗粒感(见图 5B)。当纳米氧化锌浓度过高时,会抑制外植体愈伤组织的诱导,这种现象仅出现在纳米氧化锌-升汞处理的试验组中,有可能纳米氧化锌-升汞组合增强了纳米氧化锌的空穴效应,产生更多氢氧根,强氧化性破坏了外植体的表面细胞,使细胞发生一定的改变,抑制愈伤组织的诱导^[9]。因此适当降低纳米氧化锌浓度,在一定程度上可以诱导愈伤组织的发生。

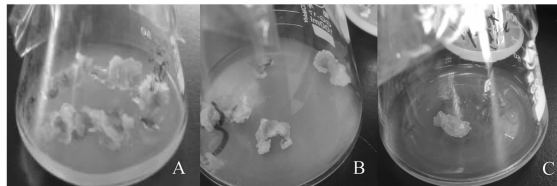


图 5 高浓度纳米氧化锌-升汞处理的 14 d 愈伤组织

Fig. 5 Callus under high concentration Nano-ZnO and mercuric chloride at 14 days

A. 酒精-升汞消毒处理; B. $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 纳米氧化锌-升汞消毒处理; C. $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 纳米氧化锌-升汞消毒处理

A. Alcohol and mercuric chloride disinfection; B. $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Nano-ZnO and mercuric chloride disinfection; C. $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Nano-ZnO and mercuric chloride disinfection

3 结论

本研究发现在浓度大于 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,可以起到良好的消毒效果,当纳米氧化锌浓度达 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,消毒 15 min 时消毒效果较好。但褐化率随纳米氧化锌浓度增高,随消毒时间的延长而上升,感染率随纳米氧化锌浓度增高逐渐下降,高浓度的纳米氧化锌作为消毒剂,外植体出现了明显的褐化

现象。愈伤组织出愈时间在不同浓度纳米氧化锌,不同消毒时间处理下,没有明显差异。

$2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 纳米氧化锌 + 0.1% 升汞消毒有少量污染,小蓟愈伤组织生长良好。当纳米氧化锌浓度在 $3 \sim 7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内与升汞组合,用于小蓟外植体消毒,有效的防止了由于酒精消毒时间过长而引起外植体的死亡,但愈伤组织诱导被抑制,生长缓慢。

参考文献:

- [1] 曲敏丽,姜万超. 纳米氧化锌抗菌机理探讨[J]. 印染助剂, 2004, 21(6): 45-46.
- [2] 周希萌, 桂柱贤, 艾鑫, 等. 纳米氧化锌抗菌与抗病毒效果的初步研究[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2006 (2): 16-17.
- [3] 胡占江, 赵忠, 王雪梅. 纳米氧化锌抗菌性能及机制[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(3): 527-530.
- [4] 王春阳, 金珑. 纳米 ZnO 抗菌性能的研究[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2006, 37(1): 39-42.
- [5] 白伟, 张程程, 姜文君, 等. 纳米材料的环境行为及其毒理学研究进展[J]. 生态毒理学报, 2009, 4(2): 174-182.
- [6] Raliya R, Nair R, Chavalmane S, et al. Mechanistic evaluation of translocation and physiological impact of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles on the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plant[J]. Metallomics, 2015 (12): 1584-1594.
- [7] 王振红, 罗专溪, 颜昌宙, 等. 纳米氧化锌对绿豆芽生长的影响[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(4): 619-624.
- [8] 王发园. 人工纳米颗粒的植物毒性以及其在植物中的吸收和积累[J]. 河南科技大学农学院, 2012, 7(2): 140-147.
- [9] 喻兵权, 张宏福, 陆伟, 等. 纳米氧化锌与普通氧化锌抑菌性能差异研究[J]. 饲料工业, 2007, 28(24): 34-37.

Application of Nano-ZnO in Explant Sterilization of *Cirsium setosum*

DENG Kai-yuan, ZHU Yu-he, CHEN Ting, PAN Yu-xin

(College of Life Science, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 064009)

Abstract: In order to achieve the best disinfection effect of nanometer zinc oxide (Nano-ZnO) in tissue culture, the explants of thistle leaves as materials, the disinfecting system of Nano-ZnO was established. Thistle explants disinfection effect and browning rate gradually rised, under $1 \sim 7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Nano-ZnO. The best disinfection concentration of nano-ZnO was $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ and the best infection time was 20 min. Under $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Nano-ZnO + 0.1% mercuric chloride condition, thistle explants had about 20% pollution and callus grew well. $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ of nano zinc oxide + 0.1% mercuric chloride condition could achieve the best disinfection, but the callus induction was inhibited and grow slowly.

Keywords: nanometer zinc oxide; *Cirsium setosum*; tissue culture; sterilization