

中图分类号: S532 文献标识码: B 文章编号: 1672-3635(2017)03-0129-05

遗传育种

抑菌剂抑菌效果及对马铃薯试管苗生长发育的影响

张小静, 李德明, 陈 富, 袁安明*, 马海涛, 孟红梅

(定西市农业科学研究院, 甘肃 定西 743000)

摘要: 为降低马铃薯组培污染, 试验采用多菌灵、盐酸万古霉素、制霉菌素、益培隆和冰片5种抑菌剂, 开展不同浓度处理对青霉菌、黑曲霉、细菌抑制效果比较及其对马铃薯试管苗生长发育的影响试验。结果表明, 冰片与益培隆浓度分别达20和50 mg/L时, 对青霉菌的抑制率达100.0%; 冰片、益培隆和制霉菌素浓度分别达50, 80和80 mg/L时, 对黑曲霉的抑制率达100.0%; 冰片、益培隆和盐酸万古霉素浓度分别达20, 50和80 mg/L时, 对细菌的抑制率达100.0%; 5种抑菌剂浓度为20 mg/L时, 对试管苗生长发育及成活率均无任何影响, 当浓度增大到80 mg/L时, 对试管苗生长发育均有抑制作用。

关键词: 抑菌剂; 抑菌效果; 马铃薯; 试管苗; 生长发育

Antibacterial Effect of Antibacterial Agents and Effects on Potato Plantlets *in vitro* Growth

ZHANG Xiaojing, LI Deming, CHEN Fu, YUAN Anming*, MA Haitao, MENG Hongmei

(Dingxi Academy of Agricultural Sciences, Dingxi, Gansu 743000, China)

Abstract: The antibacterial effect of different concentrations of five antibacterial agents (carbendazim, vancomycin hydrochloride, nystatin, Yipeilong, and borneol) on *Penicillium* spp, *Aspergillus niger* and bacteria, and potato plantlets *in vitro* growth were tested in order to reduce the contamination rate of potato plantlets. The results showed that the inhibition rate reached to 100.0% on *Penicillium* spp of borneol (20 mg/L) and Yipeilong (50 mg/L), the inhibition rate reached to 100.0% on *Aspergillus niger* of borneol (50 mg/L), Yipeilong (80 mg/L) and nystatin (80 mg/L), and the inhibition rate reached to 100.0% on bacteria of borneol (20 mg/L), Yipeilong (50 mg/L) and vancomycin hydrochloride (80 mg/L). No any impact on potato plantlets *in vitro* growth and survival rate was found when concentration was 20 mg/L of antibacterial agents, however, plantlets *in vitro* growth was inhibited when concentration reached to 80 mg/L.

Key Words: antibacterial agent; antibacterial effect; potato; plantlet *in vitro*; growth

自20世纪70年代以来, 中国马铃薯组织培养技术已从实验室研究阶段一跃成为一种大规模工厂化育苗的有效手段, 在当前倡导高效现代化农业发展模式和马铃薯主食化战略的形势下, 通过马铃薯组织培养技术生产高质量的脱毒基础种薯具有十分

广阔的市场前景。经过40多年的发展, 该技术已有相当精深的理论研究, 但组织培养中出现的真菌、细菌污染问题, 虽有诸多防控试验研究报道^[1-4], 但一直不能得以有效解决, 使试管苗的质量不能保证, 也给生产带来巨大损失, 已成为马铃薯开放式

收稿日期: 2016-03-15

基金项目: 甘肃省自然科学基金项目(145RJZJ129); 国家马铃薯产业技术体系定西综合试验站(CARS-10-ES27)。

作者简介: 张小静(1981-), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事马铃薯组织培养及栽培试验研究。

*通信作者(Corresponding author): 袁安明, 副研究员, 主要从事马铃薯脱毒种薯生产工作, E-mail: zhangxj_123@163.com。

组织培养的最大制约因素。试验对马铃薯试管苗生产中常见的青霉菌、黑曲霉和细菌3类污染物进行分离纯化后, 采用5种抑菌剂进行了体外抑菌效果及对试管苗生长发育影响的研究, 以期筛选出既能对试验菌种起抑菌作用, 且不影响试管苗生长发育的抑菌剂, 为控制马铃薯试管苗生产中污染的发生, 提高快繁效率, 降低生产成本奠定基础, 也为马铃薯开放式组织培养提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

植物材料: 马铃薯脱毒试管苗‘陇薯6号’。

抑菌剂: 多菌灵(50%可湿性粉剂), 冰片, 益培隆(A 10 mL/瓶, B 435 mg/瓶)、盐酸万古霉素和制霉菌素3种抑菌剂为北京康倍思科技有限公司生产。

供试菌种: 试验所用青霉菌、黑曲霉和细菌3类污染物均从污染组培苗培养基中分离纯化获得。

培养基: 细菌培养基采用发根农杆菌培养基(YEB); 霉菌培养基采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA); 试管苗生长培养基采用MS培养基。

1.2 试验方法

1.2.1 抑菌剂母液制备

益培隆: 将B瓶白色粉末溶解于A瓶缓冲液中, 加10 mL蒸馏水进行稀释备用。

冰片、制霉菌素各称取0.5 g, 乙醇溶解后蒸馏水定容至50 mL。

多菌灵、盐酸万古霉素各称取0.5 g, 蒸馏水溶解后定容至50 mL。

1.2.2 菌种的分离纯化与培养

收集3种组培污染菌, 用无菌接种环挑取1环污染菌于已凝固的YEB(细菌培养)或PDA(真菌培养)平板上, 进行多次划线分离, 获得纯菌落。比较各菌株的群体形态特征和个体形态特征, 进行鉴定。挑取单菌落, 霉菌接种到斜面PDA培养基上, 于28℃恒温培养7 d后接种到平面培养基上培养, 长满平皿后备用; 细菌接种到YEB液体培养基中, 于37℃摇床扩大培养到对数生长期后接种到YEB固体培养基上继续培养。

1.2.3 抑菌试验方法

将5种抑菌剂母液取不同计量分别加入到经高

温高压灭菌的50℃左右YEB及PDA培养基中, 混合均匀后倒入培养皿内冷却(对照不加任何抑菌剂)。用灭菌后的直径为7 mm打孔器取菌饼, 菌面朝下接种于含药培养基, 一个培养皿接1个菌饼, 3次重复。霉菌与细菌分别置于28和37℃恒温箱培养, 5 d后测量供试病菌在不同浓度带药培养基上的菌落直径, 与对照(不加抑菌剂)比较计算药剂处理对菌落扩展的生长抑制率。

生长抑制率(%) = $\frac{[(\text{对照菌落直径} - \text{菌饼直径}) - (\text{处理菌落直径} - \text{菌饼直径})]}{(\text{对照菌落直径} - \text{菌饼直径})} \times 100\%$ 。

1.2.4 试管苗生长发育测定

将5种抑菌剂母液取不同计量分别加入到经高温高压灭菌的50℃左右MS培养基中, 混合均匀后分装到培养瓶中。每瓶接种10株试管苗, 每处理9瓶, 置于自然光照培养室培养15 d后统计成活率, 并测定植株株高、茎粗、根数和根长等指标。

茎粗用游标卡尺测定, 株高、根长用直尺测定。

1.2.5 数据处理

数据处理与分析分别采用Excel 2003与DPS 7.05软件^[5], 多重比较采用新复极差法(SSR)。

2 结果与分析

2.1 抑菌剂不同处理对青霉菌的抑制效果

各处理对青霉菌的抑制效果见表1, 5种抑菌剂对青霉菌均有一定的抑制作用, 其中盐酸万古霉素的3个浓度处理抑制效果最差, 抑菌率低于30.0%; 多菌灵与制霉菌素对青霉菌的抑制效果随使用浓度的增加而增大, 浓度为80 mg/L时的抑菌率分别达82.9%和89.6%; 冰片的3个浓度处理与益培隆的使用浓度为50 mg/L以上时, 均对青霉菌有很好的抑制效果, 抑制率达100.0%, 其菌落直径与其他处理间的差异达极显著水平。由此可见, 冰片(20~80 mg/L)和高浓度益培隆(50~80 mg/L)均对青霉菌有很好的抑制作用。

2.2 抑菌剂不同处理对黑曲霉的抑制效果

由表2分析, 5种抑菌剂对黑曲霉均有一定的抑制作用, 其抑菌效果随使用浓度的增大而愈加显著。盐酸万古霉素的3个浓度处理抑制效果最

差, 其次为多菌灵, 高浓度的制霉菌素(80 mg/L)、益培隆(80 mg/L)和冰片(50~80 mg/L)对黑曲霉有很好的抑制作用, 抑制率达100.0%, 其菌落直径与其

他处理间的差异达极显著水平。由此可见, 高浓度的制霉菌素(80 mg/L)、益培隆(80 mg/L)和冰片(50~80 mg/L)对黑曲霉有很好的抑制作用。

表1 不同种类、浓度抑菌剂处理对青霉菌的抑制效果

Table 1 Effect of different types and concentrations of antibacterial agents on *Penicillium* spp

抑菌剂 Antibacterial agent	浓度(mg/L) Concentration	菌落直径(cm) Colony diameter	差异显著性 Difference significant		抑制率(%) Antibacterial rate
			0.05	0.01	
多菌灵 Carbendazim	20	1.62	f	F	56.4
	50	1.23	g	G	74.9
	80	1.06	i	H	82.9
盐酸万古霉素 Vancomycin hydrochloride	20	2.72	b	B	4.3
	50	2.61	c	C	9.5
	80	2.24	d	D	27.0
制霉菌素 Nystatin	20	1.83	e	E	46.4
	50	1.21	gh	G	75.8
	80	0.92	j	I	89.6
益培隆 Yipeilong	20	1.16	h	G	78.2
	50	0.70	k	J	100.0
	80	0.70	k	J	100.0
冰片 Borneol	20	0.70	k	J	100.0
	50	0.70	k	J	100.0
	80	0.70	k	J	100.0
CK	0	2.81	a	A	—

注: 表中数据采用新复极差测验。下同。

Note: Means in each column are separated by Duncan's multiple range test. The same below.

表2 不同种类、浓度抑菌剂处理对黑曲霉的抑制效果

Table 2 Effect of different types and concentrations of antibacterial agents on *Aspergillus niger*

抑菌剂 Antibacterial agent	浓度(mg/L) Concentration	菌落直径(cm) Colony diameter	差异显著性 Difference significant		抑制率(%) Antibacterial rate
			0.05	0.01	
多菌灵 Carbendazim	20	2.22	e	E	48.1
	50	1.61	f	F	68.9
	80	1.33	g	G	78.5
盐酸万古霉素 Vancomycin hydrochloride	20	3.42	b	B	7.2
	50	3.04	c	C	20.1
	80	2.63	d	D	34.1
制霉菌素 Nystatin	20	1.62	f	F	68.6
	50	0.92	i	I	92.5
	80	0.70	j	J	100.0
益培隆 Yipeilong	20	1.11	h	H	86.0
	50	0.93	i	I	92.2
	80	0.70	j	J	100.0
冰片 Borneol	20	0.91	i	I	92.8
	50	0.70	j	J	100.0
	80	0.70	j	J	100.0
CK	0	3.63	a	A	—

2.3 抑菌剂不同处理对细菌的抑制效果

不同种类、浓度抑菌剂处理对细菌的抑制效果见表3, 5种抑菌剂均对细菌有一定的抑制作用, 其中制霉菌素的抑制效果最差, 试验最大抑制率为25.6%; 多菌灵浓度范围对细菌的抑制率达40.4%~83.3%; 冰片的3个浓度处理与高浓度的盐酸万古霉素(80 mg/L)、益培隆(50~80 mg/L)对细菌的抑制率达100.0%, 其菌落直径与其他处理间的差异达极显著水平。由此可见, 冰片(20~80 mg/L)与高浓度的盐酸万古霉素(80 mg/L)、益培隆(50~80 mg/L)对细菌有很好的抑制作用。

2.4 抑菌剂不同处理对马铃薯试管苗生长发育的影响

抑菌剂各处理对马铃薯试管苗生长发育的影响见表4, 茎粗、株高、根数和根长4个指标值均随抑菌剂浓度的增加而减小, 成活率下降。当益培隆

与冰片浓度达50 mg/L时, 对植株生根有较大的抑制作用, 根数与根长极显著低于对照, 植株成活率分别降至97.3%和96.2%; 当浓度达80 mg/L时, 植株成苗发育受到极大影响, 其茎粗(0.66和0.55 mm)与株高(5.19和4.96 cm)极显著低于对照(0.77和5.82 cm), 成活率降至85.2%和78.3%。多菌灵、盐酸万古霉素和制霉菌素3种抑菌剂对马铃薯试管苗生长发育影响较小, 当浓度达80 mg/L时, 茎粗、株高与对照间差异除多菌灵茎粗外, 均未达极显著水平, 而根数与根长除多菌灵根数外, 均极显著低于对照, 且成活率分别降至98.6%、99.1%和99.2%。由此分析可见, 5种抑菌剂在使用浓度为20 mg/L时, 对试管苗生长发育及成活率无任何影响, 当浓度增大到80 mg/L时, 均对试管苗生长发育有抑制作用。

表3 不同种类、浓度抑菌剂处理对细菌的抑制效果

Table 3 Effect of different types and concentrations of antibacterial agents on bacteria

抑菌剂 Antibacterial agent	浓度(mg/L) Concentration	菌落直径(cm) Colony diameter	差异显著性 Difference significant		抑制率(%) Antibacterial rate
			0.05	0.01	
多菌灵 Carbendazim	20	1.63	e	E	40.4
	50	1.22	f	F	66.7
	80	0.96	h	H	83.3
盐酸万古霉素 Vancomycin hydrochloride	20	1.12	g	G	73.1
	50	0.78	i	I	94.9
	80	0.70	j	J	100.0
制霉菌素 Nystatin	20	2.16	b	B	6.4
	50	1.94	c	C	20.5
	80	1.86	d	D	25.6
益培隆 Yipeilong	20	1.15	g	G	71.2
	50	0.70	j	J	100.0
	80	0.70	j	J	100.0
冰片 Borneol	20	0.70	j	J	100.0
	50	0.70	j	J	100.0
	80	0.70	j	J	100.0
CK	0	2.26	a	A	—

3 讨论

冰片是中医药中一味常用佐药, 现代医学研究表明冰片有抗炎, 镇痛, 抗细菌、真菌, 抗病毒, 提高其他药物的生物利用度等作用^[6], 与黄芩苷配

伍使用对表皮葡萄球菌生长有协同抑制作用, 能显著增强两药的抑制能力^[7]。目前, 冰片的抗菌作用主要应用于医学领域, 在植物组培抑菌研究中未见报道。

益培隆是一种长效、广谱、高活性杀菌剂, 对

表 4 各处理对马铃薯试管苗生长发育的影响						
Table 4 Effect of different treatments on plantlet <i>in vitro</i> growth						
抑菌剂 Antibacterial agent	浓度 (mg/L) Concentration	茎粗 (mm) Stem diameter	株高 (cm) Plant height	根数 (No.) Root number	根长 (cm) Root length	成活率 (%) Survival rate
多菌灵 Carbendazim	20	0.76 aA	5.82 abAB	4.31 aAB	2.42 abAB	100.0
	50	0.76 aA	5.81 abcAB	4.23 abABCD	2.35 bcdABC	100.0
	80	0.71 bB	5.76 cB	4.12 bcdBCDE	2.21 efgDE	98.6
盐酸万古霉素 Vancomycin hydrochloride	20	0.76 aA	5.83 aA	4.35 aA	2.33 cdABCD	100.0
	50	0.76 aA	5.79 abcAB	4.22 abABCD	2.31 cdBCD	100.0
	80	0.74 aAB	5.76 cB	4.06 cdeCDE	2.26 defCDE	99.1
制霉菌素 Nystatin	20	0.76 aA	5.78 abcAB	4.15 bcABCDE	2.44 aA	100.0
	50	0.76 aA	5.78 abcAB	4.11 bcdBCDE	2.36 abcABC	100.0
	80	0.74 aAB	5.75 cB	3.98 deE	2.28 cdeCDE	99.2
益培隆 Yipeilong	20	0.77 aA	5.81 abcAB	4.32 aAB	2.22 efgDE	100.0
	50	0.74 aAB	5.80 abcAB	4.03 cdeDE	2.18 fgE	97.3
	80	0.66 cC	5.19 dC	3.94 eE	2.01 hF	85.2
冰片 Borneol	20	0.74 aAB	5.82 abAB	4.26 abABC	2.22 efgDE	100.0
	50	0.71 bB	5.76 cB	4.01 cdeDE	2.16 gE	96.2
	80	0.55 dD	4.96 eD	3.28 fF	1.24 iG	78.3
CK	0	0.77 aA	5.82 abAB	4.30 aAB	2.43 abAB	100.0

细菌、真菌和藻类等具有很强的抑制和杀灭作用,研究表明,益培隆在巴西橡胶树树根组织培养外植体消毒试验中对污染率控制有显著效果^[8],在MS培养基中添加20~25 mg/L 益培隆对甘薯试管苗污染的防治和污染资源的抢救有很好的效果^[9]。

本试验所采用5种抑菌剂均对青霉菌、黑曲霉和细菌有一定的抑制作用,其中冰片对3种污染菌的抑制效果最好,其次为益培隆与多菌灵,盐酸万古霉素对细菌的抑制作用较好,对青霉菌和黑曲霉的抑制效果较差,而制霉菌素对青霉菌和黑曲霉的抑制效果较好,对细菌的抑制作用较差。当浓度为20 mg/L时,5种抑菌剂对马铃薯试管苗的生长发育及成活率无影响,而随浓度的增加,其抑菌效果亦增大,但试管苗的生长发育受到抑制。由试验分析可见,较低浓度的冰片既能抑制3类污染物,又对马铃薯试管苗生长发育产生影响较小,因此可应用于马铃薯试管苗组织培养中。

针对马铃薯组培污染常见3类污染物,试验只进行了抑菌剂单用抑制效果研究,而对抑菌剂的复配抑制作用,有待进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] 康萍芝,张丽荣,沈瑞清,等.不同防腐剂对马铃薯脱毒试管苗污染的控制效果[J].中国蔬菜,2012(2):93-96.

[2] 宿飞飞,马纪,胡林双,等.植物源杀菌剂对马铃薯组织培养中青霉菌的抑菌效果[J].黑龙江农业科学,2012(3):81-83.

[3] 王春.医用抗生素在马铃薯组织培养中的抑菌效应研究[J].甘肃农业科技,2004(10):15-16.

[4] 程逸宇,郑建秋,迟卉,等.植物组织培养中真菌污染防治方法研究[J].贵州科学,2006,24(3):40-43.

[5] 唐启义.实用统计分析及其DPS数据处理系统[M].北京:科学出版社,2002.

[6] 魏楚蓉,伍赶球.冰片的药理作用及其机制研究进展[J].国际病理科学与临床杂志,2010,30(4):447-451.

[7] 于悦,王亚静,皮佳鑫,等.黄芩苷-冰片联合应用对表皮葡萄球菌的抑制作用[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(10):191-194.

[8] 姜泽海,周权男,李哲.巴西橡胶树树根组织培养外植体消毒研究[J].安徽农业科学,2011,39(17):10127-10129.

[9] 周志林,唐君,张允刚,等.甘薯试管保存资源污染抢救方法研究[J].江苏农业科学,2008(1):237-239.