

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635 (2010) 06-0330-04

马铃薯脱毒试管苗快繁中污染抑菌剂的筛选

宿飞飞, 吕典秋, 邱彩玲, 李 勇, 刘尚武, 王绍鹏, 刘伟婷

(黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘 要: 在马铃薯脱毒试管苗工厂化快繁过程中, 常因各种原因出现细菌污染, 严重影响试管苗的生长, 给生产带来损失。为了解决这一问题, 本试验分别加入卡那霉素、青霉素、链霉素及青霉素和链霉素配合使用的抗生素, 研究抑菌剂及抑菌剂浓度在马铃薯快繁过程中的抑制细菌的效果。结果表明: 在培养基中加入卡那霉素、青霉素 G 钠、青霉素和链霉素的混合物都能抑制细菌的污染, 但青霉素各处理不仅能抑制细菌污染, 而且对试管苗的生长有明显的促进作用, 其中青霉素 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的效果最好, 同时抑菌剂的抑菌作用具有时效性。

关键词: 马铃薯; 细菌污染; 抑菌剂; 抑菌作用

Screening of Antibacterial Agents in Rapid Propagation of Virus-free Potato Plantlets

XU Feifei, LU Dianqiu, QIU Cailing, LI Yong, LIU Shangwu, WANG Shaopeng, LIU Weiting

(Virus-free Seedling Institut, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China)

Abstract: Bacterial contamination affects the growth of plantlets seriously and brings losses in rapid propagation of virus-free potato plantlets. In order to solve this problem, antimicrobial agents of different kinds and concentrations were studied in this research to understand their effect of restraining the bacteria. The result showed that adding the kanamycin, penicillin G sodium, streptomycin and penicillin in the medium could inhibit the contamination of bacteria. The penicillin not only inhibited the contamination of bacteria, but also significantly promoted the growth of plantlets. When applied at $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, it produced the best effect. However, inhibition effects of the antimicrobial agents tested were effective only for a given period of time.

Key Words: potato; bacterial contamination; antibacterial agent; bacteriostasis

马铃薯脱毒试管苗的快速繁殖是马铃薯原种生产的基础环节, 在相对短的时间内保证和提高试管苗快繁的质量对马铃薯种薯生产具有重要意义。然而, 马铃薯脱毒试管苗快繁过程中经常由于各种原因出现不同程度的细菌污染, 污染后的试管苗生长缓慢, 也不生根。这种细菌污染可直接侵入到试管苗组织内部, 用一般的消毒方法很难处理, 在扩繁过程中很容易交叉感染, 造成大面积的扩散, 且扩散后继代苗仍全部表现为细菌污染。细菌污染苗长势弱, 移栽成活率低, 给生

产带来巨大损失。

对于马铃薯脱毒试管苗快繁中控制污染发生的研究工作, 已有了一些报道。但针对已经出现污染的试管苗进行防治的研究还较少^[1-2], 所发表的结果是氨苄西林钠或链霉素、链霉素和青霉素的混合效果较好。本试验针对马铃薯组织培养生产中遇到的细菌污染问题, 在试管苗快繁培养基中加入不同的抑菌剂来处理细菌苗, 进行不同抑菌剂处理的污染控制效果试验, 筛选出最佳的抑菌剂处理及浓度, 为控制马铃薯脱毒试管苗快繁中细菌污染的发生提供参考。

收稿日期: 2010-07-24

基金项目: 黑龙江省科技厅项目 (GA08B102、GB07B103); 马铃薯产业创新体系 (NYCYTX-13); 2006 年黑龙江省农科院科技创新工程项目。

作者简介: 宿飞飞 (1977-), 女, 在读博士研究生, 助理研究员, 主要从事马铃薯组织培养及工厂化生产脱毒试管苗的研究。

1 材料与方法

1.1 供试材料

马铃薯品种费乌瑞它 (Favorita) 的脱毒试管苗。将试管苗接种于 MS 固体培养基上进行快繁, 经 3~4 个周期的继代培养, 发生细菌污染后, 对污染材料进行不同抑菌剂的筛选试验。

抑菌剂: 青霉素 G 钠 (Penicillin G sodium), 硫酸链霉素 (Streptomycin sulfate), 卡那霉素 (Kanamycin)。

1.2 试验方法

(1) 无菌水的制备: 将蒸馏水装入三角瓶, 封口, 在 121℃、0.12 Mpa·cm² 的条件下灭菌 20 min, 待用。

(2) 抑菌剂水溶液的配制: 将抑菌剂小瓶封口用 75% 的酒精消毒后, 用一次性医用注射器注入无菌水配成 1 g·L⁻¹ 的抑菌剂母液, 用过滤灭菌器进行过滤灭菌, 待用。

(3) 将 MS 培养基经过高温灭菌, 待培养基的温度冷却至 40~50℃时, 在无菌的超净工作台上加入不同浓度的抑菌剂, 混匀, 分装到培养瓶中, 待用。

1.3 试验设计

以 MS 为基本培养基, 添加的不同抑菌剂处理及浓度见表 1。

1.3.1 不同种类和浓度抑菌剂对细菌的抑制效果及对试管苗生长的影响

将受到细菌性侵染的费乌瑞它试管苗在无菌条件下剪切带有 1~2 个腋芽的茎段, 转接到含有不同浓度抑菌剂的固体繁殖培养基的培养瓶中进行培养, 未加抑菌剂的培养基作为对照。每处理接种 20 瓶, 每瓶 15 个茎段, 每个处理 3 次重复, 转接后置于光照 2 000~3 000 lx, 光期 16 h·d⁻¹, 培养温度 (24±2)℃的条件下培养。3 周后观察各处理试管苗的污染率, 并从每个处理中取 5 瓶对试管苗生长状况等指标进行测量, 记录试验结果进行分析。

1.3.2 抑菌剂对细菌的抑制作用时间

为观察抑菌剂的作用时间对抑菌效果的影响, 分别以 20、40 d 为一个作用周期观察抑菌效果。方法是将 1.3.1 中无细菌侵染处理中随机抽取 5 瓶在 20 d 时转接至不加抑菌剂的 MS 培养基中, 另抽取 10 瓶继续培养到 40 d, 如果该处理在 40 d 还表现抑菌, 再将这些材料转入不加抑菌剂的培养基中, 培养条件同 1.3.1, 每处理接种 10 瓶, 观察不同处理试管苗受细菌污染情况。

表 1 培养基中添加的不同抑菌剂处理及浓度

Table 1 Treatments of different antibacterial agent and concentration

处理代号 Code	浓度 (mg·L ⁻¹) Concentration
A1	卡那霉素 10
A2	卡那霉素 20
A3	卡那霉素 40
A4	卡那霉素 60
A5	卡那霉素 100
B1	青霉素 G 钠 10
B2	青霉素 G 钠 20
B3	青霉素 G 钠 40
B4	青霉素 G 钠 60
B5	青霉素 G 钠 100
C1	硫酸链霉素 10
C2	硫酸链霉素 20
C3	硫酸链霉素 40
C4	硫酸链霉素 60
C5	硫酸链霉素 100
D1	青霉素 G 钠 10 + 链霉素 10
D2	青霉素 G 钠 20 + 链霉素 20
D3	青霉素 G 钠 40 + 链霉素 40
D4	青霉素 G 钠 60 + 链霉素 60
D5	青霉素 G 钠 100 + 链霉素 100
CK	MS 对照, 不添加抑菌剂

1.4 试验数据采集与处理

对不同种类抑菌剂各处理间和不同浓度抑菌剂各处理内的平均株高、平均叶片数等指标按单因素完全随机试验的统计方法进行方差分析和差异显著性测验 (SSR 法)^[3]。

2 结果与分析

2.1 不同种类、浓度抑菌剂对细菌污染的抑制效果

由表 2 可以看出, 培养基中加入卡那霉素、青霉素 G 钠、青霉素 G 钠 + 链霉素对细菌的抑菌率均达 100%。说明卡那霉素和青霉素 G 钠可有效的抑制细菌的侵染, 而链霉素抑制细菌污染的能力不明显, 而且与浓度无关。而在未加抑菌剂 (对照) 处理中, 瓶苗全部被细菌污染。

2.2 抑菌剂对试管苗生长状况的影响

2.2.1 不同抑菌剂处理对试管苗生长的影响

由表 3 可看出, 卡那霉素、青霉素 G 钠、链霉

表2 不同种类、处理浓度抑菌剂对细菌的抑制效果

Table 2 Effect of different types and concentration of antibacterial agents

抑菌剂种类及浓度 Type and concentration of antibacterial agents	接种瓶数 (No) Inoculated bottle number	污染瓶数 (No) Contaminated bottle number	抑菌率 (%) Rate
卡那霉素 Kanamycin	A1	60	0
	A2	60	0
	A3	60	0
	A4	60	0
	A5	60	0
青霉素 G 钠 Penicillin G sodium	B1	60	0
	B2	60	0
	B3	60	0
	B4	60	0
	B5	60	0
硫酸链霉素 Streptomycin sulfate	C1	60	12
	C2	60	48
	C3	60	12
	C4	60	60
	C5	60	6
青霉素 G 钠 + 链霉素 Penicillin G sodium + Streptomycin sulfate	D1	60	0
	D2	60	0
	D3	60	0
	D4	60	0
	D5	60	0
CK	0	60	60

素、青霉素 G 钠 + 链霉素及对照各处理间存在显著差异。对照 (CK) 受培养基中细菌的影响植株表现不生根, 从而导致叶片不舒展, 生长势很弱。其中青霉素 G 钠处理的各性状显著高于对照。青霉素 G 钠

完全能抑制住细菌的生长, 而且试管苗根系发育的很好, 且对试管苗的生长有明显的促进作用。卡那霉素处理虽然能抑制细菌的生长, 但长势表现为试管苗根部根毛极少且很短或者不生根, 叶片黄化, 几乎停止生长, 所以该处理应否定。链霉素对细菌的抑制作用不大, 植株的根系不发达, 长势很弱, 株高显著低于对照。青霉素和链霉素混合的效果不如单独用青霉素, 试管苗的长势也显著低于对照。

2.2.2 不同抑菌剂浓度对试管苗生长的影响

从表 4 中可以看出, 低浓度的青霉素 G 钠 (B1、B2) 对试管苗株高的影响不显著, 但青霉素 G 钠在浓度 B3~B5 时, 试管苗的株高显著高于对照, 说明青霉素 G 钠在这个浓度范围内对试管苗株高有明显的促进作用。叶片数在 B1、B3、B4 浓度时显著高于对照; 且在 B4 处理浓度 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的株高、叶片数、根长、根数各项指标都表现最高的, 显著高于其他浓度处理和对照。

2.3 抑菌剂对细菌抑制有一定的时效性

加入抑菌剂对细菌抑制效果的影响, 结果表明, 培养 20 d 后, 青霉素 G 钠、卡那霉素及青霉素 G 钠和链霉素混合抑菌培养基都无细菌污染, 且将各处理中材料转入不加抑菌剂的培养基后 3~5 d 均可见细菌长出; 培养 40 d 后, 原来表现抑菌的处理中仅青霉素 G 钠 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和青霉素 G 钠和链霉素 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的处理各有 30 %、40%、30% 的未长细菌出来, 其他各处理均长出细菌 (表 5)。再将这部分未长细菌的材料转入不加抑菌剂的培养基后细菌仍会继续长出。这说明抑菌剂只能抑制细菌生长, 而在不加抑菌剂的继代繁殖中细菌就会滋生, 抑菌剂的抑制作用有一定的时间效应。

表3 各处理对试管苗生长的影响

Table 3 Effect of different treatments on the test-tube plantlet growth

处 理 Treatment	平均株高 (cm) Plant height	叶片数 (No) Leaf number	平均根数 (No) Root number	平均根长 (cm) Root length
卡那霉素 Kanamycin	1.33 e	1.35 d	0.00 c	0.00 c
青霉素 G 钠 Penicillin G sodium	5.89 a	7.99 a	11.48 a	3.62 a
硫酸链霉素 Streptomycin sulfate	3.23 d	6.57 bc	1.11 b	1.00 b
青霉素 G 钠 + 链霉素 Penicillin G sodium + Streptomycin sulfate	4.43 c	6.25 c	1.11 b	0.78 b
空白 CK	5.33 b	7.19 b	0.00 c	0.00 c

注: 表中数据均为抑菌剂的不同浓度处理的平均值。

Note: The data was the average over different concentrations of antibacterial agents.

表 4 不同浓度抑菌剂对试管苗生长的影响

Table 4 Effect on test-tube plantlet growth of antibacterial agents of different concentrations

抑菌剂 Antibacterial agent	浓度 (mg·L ⁻¹) Concentration	株高 (cm) Plant height	叶片数 (No) Leaf number	根长 (cm) Root length	根数 (No) Root number
青霉素 G 钠 Penicillin G sodium	B1	4.82 c	8.11 a	12.36 b	3.6 a
	B2	5.49 bc	7.56 ab	7.00 c	3.9 a
	B3	6.08 ab	8.30 a	11.27 b	3.8 a
	B4	6.69 a	8.24 a	14.61 a	3.4 a
	B5	6.39 a	7.66 ab	12.16 b	3.3 a
空白(CK)	0	5.33 c	7.19 b	0.00 b	0.0 b

注：仅对表 2 中试管苗长势显著高于对照的抑菌剂不同浓度处理进行进一步观测。

Note: The treatment with different antibacterial agent concentration was observed, for which the growth vigor of test-tube plantlet was significantly different from the control in Table 2.

表 5 加入抑菌剂 40 d 后的培养基细菌污染情况

Table 5 Contamination of culture medium added with antibacterial agents

抑菌剂种类 Antibacterial agent types	浓度 (mg·L ⁻¹) Concentration	污染率 (%) Contamination rate
青霉素 G 钠 Penicillin G sodium	B1	100
	B2	100
	B3	100
	B4	30
	B5	40
青霉素 G 钠 + 链霉素 Penicillin G sodium + Streptomycin sulfate	D1	100
	D2	100
	D3	100
	D4	100
	D5	30

和链霉素混合的效果不如单独用青霉素, 可能是链霉素对试管苗的生长有一定的抑制作用, 使试管苗的长势较单独使用青霉素弱, 所以均不宜选用。

本试验结果还表明, 抑菌剂的抑菌作用有一定的时效性, 这个时间在 20 d 左右, 40 d 后抑菌剂的作用几乎全部消失。这与韩美丽等^[6]的试验结果一致。这是因为抑菌剂只能抑制细菌生长而不能完全杀死它, 而且这种抑制作用有一定的时效性, 即抑菌剂在常温下只有 15~20 d 的有效期, 超过这段时间, 抑菌剂的抑菌作用会自动失效。因此可以认为大规模工厂化生产中, 可以采取在培养基中加入一定浓度抑菌剂的做法来控制大面积的细菌污染发生, 要彻底抑制或根除马铃薯的细菌还有待进一步研究。

[参 考 文 献]

3 讨 论

在马铃薯培养基中添加青霉素 G 钠可有效抑制细菌对培养基的侵染, 这与前人的报道相一致^[4-6]。不同浓度青霉素 G 钠对试管苗生长起一定的促进作用, 随着青霉素 G 浓度的增加, 对试管苗生长的促进作用增强, 到浓度 60 mg·L⁻¹ 时株高等各项指标都是最高的。

培养基中加入卡那霉素表现为抑制细菌的同时也完全抑制了试管苗的生长; 硫酸链霉素对细菌的抑制作用不明显, 而且植株的根系不发达, 长势很弱, 在株高、叶片数等性状显著低于对照; 青霉素 G 钠

- [1] 齐恩芳. 抗菌素控制马铃薯脱毒试管苗细菌污染的研究[J]. 甘肃科技, 2002(7): 85.
- [2] 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.
- [3] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [4] 王亦菲, 陆瑞菊, 周润梅. 彩色海芋组织培养过程中内生菌的抑制[J]. 上海农业学报, 2001, 17(2): 82-83.
- [5] 黄惜, 符书贤. 抗生素在防治香蕉组培细菌污染上的应用研究[J]. 海南岛农业科技, 1995, (2): 18-20.
- [6] 韩美丽, 陆荣生, 黄华艳, 等. 绿巨人组培苗继代过程中玻璃化苗及细菌污染的消除方法研究[J]. 广西林业科学, 1999, 28(1): 16-20.