

植物组织培养中真菌污染防治方法研究

程逸宇, 郑建秋, 迟 卉, 王幼芳

(华东师范大学 生命科学学院, 上海 200062)

摘要 通过对组培接种室空气中真菌的分离和鉴定, 发现曲霉(*Aspergillus*), 毛霉(*Mucor*), 青霉(*Penicillium*), 木霉(*Trichoderma*), 根霉(*Rhizopus*)等常见菌为组培的主要污染真菌。抑菌环实验表明次氯酸钠与制霉菌素抑菌效果较好。50mg/L 酮康唑 + 50mg/L 制霉菌素 + 0.1% 次氯酸钠组成的混合杀菌剂, 抑菌效果好, 对植物伤害小, 是良好的防真菌污染添加剂。

关键词 组织培养; 真菌污染; 杀菌剂

中图分类号 Q954 **文献标识码** A **文章编号** 1003-65-63(2005)04-0040-04

PREVENTION OF THE FUNGAL CONTAMINATION IN PLANT TISSUE CULTURE

CHENG Yi-yu, ZHEN Jian-qiu, CHI Hui, WANG You-fang

(Life Science College of East China Normal University, Shanghai 200062, China)

ABSTRACT By the separation and identification of the epiphyte in the air of the plant tissue culture lab, *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Rhizopus* were found to be the main infective fungi in plant tissue culture. The experiment of mycostatic loop had indicated that sodium hypochlorite and nystatin are good fungistats. The mixture of 50mg/L ketoconazole + 50mg/L nystatin + 0.1% sodium hypochlorite is the best additive to prevent the fungal contamination in plant tissue culture and has slight damage to plants.

KEY WORDS tissue culture; fungal contamination; fungistat

植物组织培养是上世纪初开始, 以植物生理学为基础发展起来的一项植物繁殖技术。经过近一个世纪的发展, 这项技术已在科学研究和生产上得到广泛应用, 但它的技术环节还存在不少问题^[1]。微生物污染是组织培养中普遍存在的问题。在培养基中添加杀菌剂已成为防治污染的一种重要方法得到广泛运用。但目前研究主要集中在防治细菌污染方面, 对真菌污染较少顾及。韩美丽等在绿巨人组培中实验了青霉素钠、先锋霉素和大庆霉素对继代培养中细菌污染的抑菌效果^[2]。本实验小组在组培过程中发现: 接种室环境中存在大量真菌孢子, 常规

方法很难避免真菌污染, 且真菌污染有着爆发突然, 感染面积大等特点, 一旦爆发会导致全部材料报废, 对一些珍贵的材料来说是很严重的威胁。故本实验对组培过程中易污染的真菌分离与鉴定, 并进行一些杀菌剂的抑菌实验, 以期能找到有效降低真菌污染的方法。

1 实验材料

1.1 培养基

MS 基础培养基, 马铃薯葡萄糖培养基。

收稿日期: 2005-09-23

作者简介: 程逸宇(1983), 男, 华东师范大学 2002 级在读本科生。

通讯作者: 王幼芳(1953-), 女, 教授。E-mail: (yfwang@bio.ecnu.edu.cn)

1.2 组培材料与杀菌剂

1.2.1 组培材料

烟草(华东师大生物站种植)。

1.2.2 杀菌剂

医用抗生素:制霉菌素、灰黄霉素、酮康唑。

实验室常用杀菌剂:次氯酸钠。

2 实验方法

2.1 污染真菌的收集与鉴定

2.1.1 收集

将5个MS培养基平板开盖后放置在超净工作台上,静置20min后,盖上培养皿,放入培养箱25℃下培养3~5d,形成明显的菌落以便分离鉴定。

2.1.2 分离与鉴定

使用马铃薯葡萄糖培养基对收集到的真菌进行划线分离,纯化培养,直至形成单菌落。通过形态学特征鉴定真菌。

2.2 抑菌试验

已从鉴定的真菌中每属选取1个代表种为材料,使用滤纸片法测定各种杀菌剂的抑菌效果。

2.2.1 从真菌培养物中提取孢子,稀释至 10^2 cfu/ml。将孢子悬浮液以每付平板0.5ml的量加入到50℃左右的MS培养基中,混匀后倾到平板。

2.2.2 用无菌镊子取半径0.5cm的圆形无菌滤纸片,分别浸泡在经过灭菌的不同浓度的制霉菌素、灰黄霉素、酮康唑(均分为200mg/L、50mg/L、10mg/L 3个浓度)及次氯酸钠溶液(分2%、0.5%、0.1% 3个浓度)中1min,等距置于混有真菌孢子的培养基表面。每组设6个重复样本。

2.2.3 于25℃培养5d后观察结果。如有抑菌作用,则滤纸片周围无菌生长,形成抑菌环。根据抑菌环大小,判断抑菌效果。

2.3 混合杀菌剂检验

由于杀菌剂有其抑菌谱,无一种杀菌剂对所有真菌都有效,且长期使用单一品种抗生素易使真菌产生抗药性。故从试验抗生素中选出3种抑菌谱广,抑菌效果好的杀菌剂,按正交试验设计原理 $L_9(3^4)$,配成9组浓度不同的混合杀菌剂,对同时混

有上述5种真菌的MS培养基进行抑菌环试验。每组设6个重复样本。

2.4 混合杀菌剂在组培中运用

从9组混合杀菌剂中选出3组抑菌效果好且浓度水平低的组合作为培养基添加剂使用到组培中。将烟草嫩叶用0.1%升汞表面消毒5min后,在普通实验环境下(无任何消毒措施),接种到分别加入上述3组杀菌剂的MS培养基及1组无杀菌剂MS培养基中。再严格按照组培消毒要求处理,在超净台上接种同一材料到1组无杀菌剂MS培养基中作为对照。每组设10个重复样本。光照培养箱中,24h光照,25℃培养。3周后观察愈伤组织生长情况及污染状况。

3 结果与分析

3.1 真菌的分离与鉴定

通过对空气中污染真菌的分离纯化,共获得9种真菌,其中曲霉属(*Aspergillus*)2种,毛霉属(*Mucor*)2种,青霉属(*Penicillium*)3种,木霉属(*Trichoderma*)1种,根霉属(*Rhizopus*)1种。这些均为常见真菌,它们的孢子在空气中分布广,含量大,易造成污染。且其在培养基上生长迅速,繁殖旺盛,较短时间内就会威胁到植物的生存。组培中需对这些真菌重点防治。

3.2 不同浓度杀菌剂抑菌效果比较

从表1中可知,高浓度次氯酸钠对这5种真菌均有很强的抑制作用,而低浓度(0.1%)则无作用。在3种抗生素中,制霉菌素抑菌效果最明显,在50mg/L水平上对5种真菌都有作用,且效果与200mg/L相似,但10mg/L水平抑菌作用较差。灰黄霉素的抑菌效果不理想,对根霉与毛霉无任何作用。所以选用次氯酸钠,制霉菌素和酮康唑进行混合抑菌试验。

3.3 混合杀菌剂抑菌试验结果

从表2中可知,第3、6、8、9组抑效果较好。其中第9组效果最好,培养皿内无菌生长,但考虑到高浓度的抗生素对组培材料有强杀伤作用,选取第3、6、8组进行组培试验。

表 1 杀菌剂抑菌环试验结果

Tab. 1 The experiment of mycostatic loop

杀菌剂	浓度	抑菌效果				
		木霉	曲霉	毛霉	青霉	根霉
次氯酸钠 sodium hypochlorite	2%	++	+++	+++	+++	+++
	0.5%	++	+++	+++	+++	+
	0.1%	-	-	-	+	-
酮康唑 ketoconazole	200mg/L	++	+	-	+	-
	50mg/L	+	-	-	+	-
	10mg/L	+	-	+	-	-
制霉菌素 nystatin	200mg/L	++	+	+++	+++	++
	50mg/L	++	+	++	++	++
	10mg/L	-	+	+	++	-
灰黄霉素 griseofulvin	200mg/L	++	+	-	+	-
	50mg/L	++	-	-	+	-
	10mg/L	+	-	-	-	-

注:表中“+++”代表培养皿中无真菌生长,“++”代表抑菌环直径3cm以上,“+”表示抑菌环直径1~3cm,“-”表示无抑菌效果。

表 2 混合杀菌剂正交试验($L_9(3^4)$)Tab. 2 The orthogonal test of mixed fungistats ($L_9(3^4)$)

组号	酮康唑	制霉菌素类	次氯酸钠	抑菌效果	污染种类
1	10mg/L	10mg/L	0.1%	-	青霉
2	10mg/L	50mg/L	0.5%	+	曲霉、青霉
3	10mg/L	200mg/L	2%	++	曲霉
4	50mg/L	10mg/L	0.5%	+	青霉、毛霉
5	50mg/L	50mg/L	2%	+	曲霉、木霉
6	50mg/L	200mg/L	0.1%	++	曲霉、根霉
7	200mg/L	10mg/L	2%	-	曲霉、青霉
8	200mg/L	50mg/L	0.1%	++	曲霉
9	200mg/L	200mg/L	0.5%	+++	无

注:表中“+++”代表培养皿中无真菌生长,“++”代表抑菌环直径3cm以上,“+”表示抑菌环直径1~3cm,“-”表示无抑菌效果。

表 3 组培试验

Tab. 3 The plant tissue culture experiment

消毒情况	培养基	每组瓶数	真菌污染瓶数	污染率	愈伤组织生长状况
未消毒	组 3	10	2	20%	较差
	组 6	10	2	20%	较好
	组 8	10	0	0	差
严格消毒	空白	10	8	80%	好
	空白	10	1	10%	好

注:本表数据去除细菌污染的情况。

3.4 组培试验

由表3可知,在未消毒情况下使用杀菌剂的组别真菌污染率明显低于无杀菌剂组,且与严格灭菌情况下污染率相近。杀菌剂组的愈伤组织生长状况差于无杀菌剂组,第8组抗生素浓度最高,组培材料全被杀死。第3组中次氯酸钠浓度较高,植物生长状况差。杀菌剂浓度最低的第6组,杀菌效果好,植物生长状况也仅稍差于无杀菌剂组,是组培中防治空气污染真菌良好的培养基添加剂。

4 讨论

本实验共从接种室中获取9种真菌,其中曲霉属(*Aspergillus*)2种,毛霉属(*Mucor*)2种,青霉属(*Penicillium*)3种,木霉属(*Trichoderma*)1种,根霉属(*Rhizopus*)1种。利用杀菌剂防治植物组织培养污染,可大大降低污染率,降低生产成本^[3],通过对这5属真菌的抑菌环实验发现4种杀菌剂中次氯酸钠与制霉菌素抑菌效果最好。用50mg/l 酮康唑 + 50mg/l 制霉菌素 + 0.1% 次氯酸钠组成的混合杀菌剂,抑菌效果好,对植物伤害小,是良好的防真菌污染添加剂。

本实验筛选出的杀菌剂组合已能得到与常规消毒类似的效果。如将该杀菌剂和常规消毒手段一同

使用,则可达到预防真菌污染这一目的。在用某些珍贵的植物材料进行组培时,可使用此杀菌剂预防真菌污染,从而得到更多更健康的愈伤组织,此外,抗生素一般不稳定,只能用过滤灭菌法灭菌。把抗生素应用于组培上,必然会增加工作量,增加成本,从而降低经济效益。所以有必要寻找稳定、能耐高温高压的抑菌剂^[4]。可以考虑使用一些防腐剂或农用杀菌剂来代替目前使用的抗生素,其应用有待进一步研究。

参考文献

- [1] 周俊辉. 植物快速繁殖技术中存在的问题与对策[J]. 仲恺农业技术学院学报, 1999, 12(4): 64 ~ 70
- [2] 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 ~ 19
- [3] Teng W L, Tiffany s, Teng M C. Explant preparation affects culture initiation and regeneration of *Panax ginseng* and *quinquefolius* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2001, (68): 233 - 239
- [4] 周俊辉, 李宏彬, 杨耀强, 等. 植物组织培养中污染的鉴定与防止初步研究[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(2): 53 ~ 55