

文章编号:1001-4829(2007)06-1318-06

马铃薯脱毒快繁抗菌污染的研究

杨琼芬, 白建明, 李世峰, 李先平, 杨万林, 包丽仙, 李山云, 隋启君*

(云南省农业科学院马铃薯研究开发中心, 云南 昆明 650205)

摘要:分别加入10、20和50 mg/L的氨苄青霉素、硫酸链霉素、克林霉素及利用3种抗生素(20 mg/L)分别和病毒唑(10 mg/L)的配合使用,研究抗生素及抗生素浓度在马铃薯茎尖剥离及快繁过程中的综合影响。实验结果表明在茎尖剥离阶段,50 mg/L的链霉素对细菌的抗性最好;抗生素的不同浓度对霉菌抗性的效果不同,抗生素种类和浓度的互作对霉菌具有抗性效应,以使用10 mg/L的链霉素对霉菌的抗性最好,链霉素+病毒唑组合在茎尖剥离时期对霉菌和细菌的抗性最好;在快繁阶段,以使用20 mg/L克林霉素对霉菌和细菌的抗性最好,但抗生素及抗生素+病毒唑的配比措施对组培苗的生根数、黄化率、生根率均有负效应,所以在马铃薯组培快繁阶段的污染控制主要靠控制环境和操作规程来达到。

关键词:马铃薯;茎尖培养;试管苗快速繁殖;培养基;抗污染

中图分类号:S532 **文献标识码:**A

Preliminary study on repressing contamination in apical meristem culture and plantlet of potato

YANG Qiong-fen, BAI Jian-ming, LI Shi-feng, LI Xian-ping, YANG Wan-lin, BAO Li-xian, LI Shan-yun, SUI Qi-jun*

(Potato Research Center, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Yunnan Kunming 650205, China)

Abstract: The resistance to contamination from both bacteria and fungi had played an important role and become constrainable factors during in apical meristem culture and plantlet propagation of potato. The controversy between to prevent from the contamination by antibiotic and to make a negative impact in the procedure for potato had been argued. To balance the profit between using antibiotics and increasing productivity of potato, two trails, one of is three kind of antibiotics, Amoxycillin (AC), Streptomycin Sulfate (SS) and Clindamycin Hydrochloride (CH), with three different concentration, 50, 20, 10 mg/L, in respectively and other one is the combination both the three antibiotics plus Ribavirin (RB) with 20, 10 mg/L, in respectively were employed and mingled into medium during apical meristem culture and plantlet propagation of potato. The results shown that the SS with 50 mg/L resisted to bacteria significantly. For mildew of fungi resistance, the effect is variable significant among three kind of antibiotic and different concentration from different antibiotic. Meanwhile, the interactive effect of resistance to mildew between antibiotic and concentration is significant that the 10 mg/L of SS was best among different combinations. During plantlet propagation, both the three kind of antibiotics and three kind of concentration performed a significant effect of resistance to bacteria and shown that the productivity can be increased by adjustable antibiotics and its concentration. The result also suggested that the combination between antibiotics and RB is not only resist to contamination significant but also affect to other important traits, include number of roots, etiolated plantlet and shoot of roots, with negative effect significant. The approach and strategy both apical meristem culture and plantlet propagation of potato in practice has been discussion.

Key words: potato; apical meristem culture; plantlet propagation; medium; antibiotics

马铃薯的组织培养在新品种选育及大面积推广脱毒苗的过程中起着关键作用,但不同品种(基因型)之间的技术指标又不尽相同。马铃薯种薯繁育

是育种工作的下游工作,是新品种应用于生产的重要环节。在马铃薯种薯繁育过程中,除了保持品种纯度外,还要防止病毒和细菌的感染。而在大田育种和马铃薯种薯生产过程中马铃薯又很容易被细菌污染,植株一旦含有内源细菌后,会给后期的脱毒快繁工作带来很大障碍。马铃薯脱毒快繁过程中经常有细菌和霉菌污染,导致脱毒工作很难进行和组培

收稿日期:2007-04-25

基金项目:云南省“十一五”科技攻关项目(2006NG08)

作者简介:杨琼芬(1971-),女,助理研究员,主要从事马铃薯核心种薯的生产和病毒检测,*为通讯作者。

苗大幅度减少,严重时全部被污染,直接影响着脱毒苗的产量和质量。因此,控制污染是马铃薯种薯生产中需要解决的关键问题。

污染分为2类:一类是细菌性污染,另一类是真菌性污染。细菌性污染一般来源于植物体本身或操作时器具污染,称为接触性传播,其途径可能是原始材料或接种工具等带菌媒介接触材料造成的,在马铃薯脱毒和无菌培养过程中,原始材料中带有细菌是很常见的且属于顽固性内源菌,要控制它就要从材料本身和操作过程入手。由于马铃薯在田间极易感菌,所以材料大多都带内源菌,这使马铃薯无菌苗的获得有一定难度。另一类是真菌性污染,除直接接触传播途径外,主要通过空气媒介传播,控制它显得容易些,只需严格注意空气的湿度和操作人员的卫生就可以了。因此,如何找到一条有效的方法来控制马铃薯脱毒和快繁过程中细菌生长,是马铃薯脱毒及快繁过程中的重点和难点。近年来,云南省农业科学院马铃薯研究中心选育出以高淀粉品种“云薯一号”为代表的一批马铃薯新品种。为了完善该类品种的脱毒快繁技术指标,我们对该品种和“抗青9-1”2个品种的茎尖剥离和快繁2个阶段进行了不同抗生素(硫酸链霉素、氨基青霉素、克林霉素)、抗生素的不同浓度(50、20、10 mg/L)及抗生素和病毒唑搭配(20 mg/L + 10 mg/L)的控制污染和相应效应的比较实验。

1 材料与方法

1.1 供试材料

以云南省农科院马铃薯研究开发中心保存的被细菌感染的“抗青9-1”试管苗和“云薯201”的普通块茎为试验材料。

1.2 培养基

茎尖诱导培养基:MS + BA 1 mg/L + NAA 0.05 mg/L + GA₃ 1 mg/L + 泛酸钙 1 mg/L + 3 % 白糖 + 琼脂 6 %;快繁培养基:MS + 3 % 白糖 + 6 % 琼脂。pH 均为 5.8。

1.3 材料消毒

在高温(33 ~ 37 ℃)下处理马铃薯“云薯201”的普通块茎4周后取出,将顶芽、侧芽切下若干段(2 cm)放入烧杯,用自来水冲洗2 h,再用75 %的酒精漂洗30 s,最后用0.1 %的升汞灭菌6 min,无菌水漂洗6次备用。

1.4 试验时期

在马铃薯的脱毒快繁过程中,分2个对抗生素敏感的阶段来进行处理。一个是茎尖剥离阶段的处理,另一个是快速繁殖阶段的处理。

1.5 茎尖培养

将清洗干净的芽置于40倍双目解剖镜下,用解剖针去掉幼叶,直至露出半圆形光滑生长点,用解剖刀从0.3 mm处切下,接种在装有茎尖培养基的试管内,每管接1个剥离后的茎尖,放入光照培养箱内培养(培养条件为2000 lx, 25 ℃,光照12 h)。

1.6 试验设计

1.6.1 试验1 采用3种不同的抗生素和不同浓度,在茎尖剥离和快繁阶段进行处理,3种抗生素分别是青霉素、链霉素、克林霉素,3种不同浓度分别是10、20、50 mg/L。其中青霉素、链霉素和克林霉素在茎尖培养基灭菌后,温度降至50 ℃左右时,经过灭菌针管加入。茎尖剥离各处理分别接种茎尖20个,而增殖阶段各处理分别接种20瓶,每瓶装培养基30 mL,内接带1个腋芽的茎段16个,采用随机区组设计,重复3次,以寻找最好的抗生素浓度。

1.6.2 试验2 采用3种不同的抗生素和病毒唑的组合(青霉素 + 病毒唑、链霉素 + 病毒唑、克林霉素 + 病毒唑),加上对照共计4种处理的试验,抗污染剂加入方法同试验1。在马铃薯茎尖剥离和快繁阶段进行处理(表1),采用随机区组设计,重复3次。

1.7 性状调查

在茎尖剥离阶段调查3个性状(细菌抗性、霉菌抗性、平均茎尖成活数);在快繁的阶段调查5个性状(细菌污染率、霉菌污染率、每株生根数、试管苗黄化率、长势)。

1.8 性状调查的方法

1.8.1 茎尖剥离时期的细菌抗性 接种1周后,调查各种处理接种的20个茎尖的细菌污染茎尖数,求3个重复的茎尖污染数,由(3个重复的茎尖污染数/60) × 100 % 得到茎尖污染率,用1减去茎尖污染率得到细菌抗性。

1.8.2 茎尖剥离时期的霉菌抗性 茎尖剥离时期霉菌抗性的测定及计算方法与细菌的一致。

1.8.3 茎尖剥离时期茎尖成活数 接种1月后,调查各处理接种的20个茎尖的茎尖成活数,求3个重复的平均茎尖成活数。

1.8.4 快繁时期的细菌抗性 接种1周后,调查增殖阶段各种处理分别接种的20瓶,每瓶接带1个腋芽的茎段16个,共计320个茎段的细菌数,求3个重复的平均污染数,由(3个重复的植株细菌污染数/960) × 100 % 得到植株污染率,用1减去植株污染率得到植株细菌抗性。

1.8.5 快繁时期的霉菌抗性 快繁时期的霉菌抗性测定及计算方法与细菌的一致。

表 1 3 种不同抗生素及不同浓度对两组试验 9 种性状的方差分析结果

Table 1 The analyzed result of nine characters for three different antibiotics and different concentrations in two traits

试验时期 Trial date	性状 Trait	变异来源(a) Variance origin	自由度 (DF)	平方和 (SS)	均方 (MS)	F 值 F value
茎尖剥离 Apical meristem peelling	细菌抗性 Bacteria fastness	k	2	64.7	32.3	8.72**
		n	2	27.6	13.8	3.72*
		k × n	4	43.1	10.8	2.91
	霉菌抗性 Mildew fastness	k	2	685.0	342.5	45.69**
		n	2	492.1	246.0	32.83**
		k × n	4	459.0	114.8	15.31**
	茎尖成活数 Number of apical meristem survive	k	2	1.4	0.7	0.63
		n	2	64.3	32.1	28.69**
		k × n	4	8.1	2.0	1.82
	茎尖分化率 Apical meristem polarized rate	k	2	50.0	25.0	0.89
		n	2	1516.7	758.3	26.96**
		k × n	4	200.0	50.0	1.78
快繁 Propagation	细菌抗性 Bacteria fastness	k	2	824.0	412.0	162.99**
		n	2	8.2	4.1	1.63
		k × n	4	337.8	84.4	33.41**
	霉菌抗性 Mildew fastness	k	2	276.1	138.0	82.36**
		n	2	300.1	150.0	89.52**
		k × n	4	130.4	32.6	19.45**
	单株生根数 Radication of plant	k	2	35.9	17.9	22.78**
		n	2	30.5	15.3	19.39**
		k × n	4	37.3	9.3	11.84**
	苗黄化率 Etiolation rate	k	2	5093.6	2546.8	605.85**
		n	2	7873.4	3936.7	936.48**
		k × n	4	1608.8	402.2	95.68**
	苗生根率 Radication rate	k	2	8041.6	4020.8	1153.37**
		n	2	4070.2	2035.1	583.78**
		k × n	4	1475.6	368.9	105.82**

注:k 表示抗生素效应,n 表示不同浓度效应,k × n 表示抗生素和抗生素浓度的互作效应。

1.8.6 快繁时期的单株生根数 接种 10 d 后,调查增殖阶段各处理分别接种的 20 瓶,每瓶接带 1 个腋芽的茎段 16 个,共计 320 个茎段的植株生根数,求 3 个重复的平均生根数,由 3 个重复的植株生根数/960 得到植株生根数。

1.8.7 快繁时期的组培苗黄化率 接种 15 d 后,调查增殖阶段各种处理分别接种的 20 瓶,每瓶接带 1 个腋芽的茎段 16 个,共计 320 个茎段的植株黄化数,求 3 个重复的平均植株黄化数,由(3 个重复的植株黄化数/960) × 100 % 得到植株黄化率。

1.8.8 快繁时期的组培苗长势 接种 15 d 后,调查增殖阶段各种处理分别接种的 20 瓶,每瓶接带 1 个腋芽的茎段 16 个,共计 320 个茎段的植株长势情

况(通过植株粗壮程度、叶色等评价)。

2 结果与分析

2.1 3 种不同抗生素及不同浓度对抗对茎尖剥离阶段的影响

在茎尖剥离时期,3 种抗生素(青霉素、链霉素、克林霉素)及其 3 种不同浓度(10、20、50 mg/L)对细菌抗性和霉菌抗性都有影响,且不同抗生素及其不同浓度的组合对霉菌和细菌污染均有效(表 1)。说明可以通过采用不同抗生素及不同浓度来防止茎尖剥离时细菌和霉菌的污染。

试验结果同时也表明,3 种抗生素及其不同浓度的搭配(组合)对茎尖剥离时期的平均茎尖成活

表 2 不同抗生素和其抗生素浓度的配比对马铃薯组培苗快繁时期的影响效应
Table 2 Result of different antibiotic and three different concentrations combination effected to potato plantlet propagation

配比方案 Combination	抗生素 Antibiotic	浓度(mg/L) Concen- tration	细菌(%) Bacteria- fastness	效应顺序 Effect order	霉菌抗(%) Mildew fastness	效应顺序 Effect order	单株生根 (个) Radication of plant	效应顺序 Effect order	苗黄化率(%) Etiolationrate	效应顺序 Effect order	苗生根率(%) Radication rate	效应顺序 Effect order
1	青霉素 Amoxycillin	10	70.3	7	86.0	5	5.33	3	51.7	6	19.3	9
2	青霉素 Amoxycillin	20	73.7	6	87.7	2	3.00	6	44.3	4	32.7	5
3	青霉素 Amoxycillin	50	67.3	9	80.3	7	2.33	8	81.0	9	22.7	7
4	链霉素 Streptomycin	10	77.7	5	76.3	8	2.33	9	45.0	5	22.7	8
5	链霉素 Streptomycin	20	69.0	8	86.7	4	5.00	4	32.0	3	43.3	4
6	链霉素 Streptomycin	50	78.7	4	75.3	9	3.33	5	56.0	7	28.3	6
7	克林霉素 Clindamycin	10	79.0	3	82.7	6	7.00	2	8.0	2	45.3	3
8	克林霉素 Clindamycin	20	87.7	1	91.0	1	8.00	1	5.3	1	96.0	1
9	克林霉素 Clindamycin	50	84.7	2	87.7	3	3.00	7	63.0	8	51.7	2

数、分化率影响差异不显著。说明采用抗生素防止细菌和霉菌污染时,对关系茎尖剥离成功与否的平均茎尖成活数和分化率 2 个指标影响较小,可以采用这 3 种抗菌素及相应的浓度配比来达到防止茎尖剥离时细菌和霉菌的污染。

2.2 3 种不同抗生素及不同浓度抗生素对马铃薯组培苗快繁阶段的影响

不同抗生素及不同浓度抗生素对马铃薯组培苗快繁阶段各性状的影响表现出差异(表 2)。对所有性状来说,克林霉素的效应显著地好于青霉素和链霉素,而青霉素和链霉素之间除了对每株生根数的效应没有显著差异外,对其它性状也有显著影响,因此,在马铃薯组培苗快繁阶段,以使用克林霉素最好,链霉素次之;而 3 种不同的抗生素的浓度配比对马铃薯组培苗快繁阶段的影响效应也存在差异,在 3 种抗生素与 3 种不同浓度的 9 种配方中,第 8 种(20 mg/L 克林霉素)的效果最好,其余配方各有所长,实际应用时可根据具体情况选取。

2.3 3 种抗生素与病毒唑的配合使用对马铃薯茎尖剥离和快繁阶段的影响

不同抗生素和病毒唑的搭配使用是一种常用的便宜的抗菌试剂。试验结果表明抗生素和病毒唑(20 mg/L + 10 mg/L)组合对马铃薯茎尖剥离和快繁阶段均有影响(表 3),链霉素 + 病毒唑组合在茎尖剥离时期的效果最好,显著地优于青霉素和克林霉素的组合,和对照相比达到极显著水平;相反,对于茎尖剥离时的茎尖成活率和茎尖分化率而言,三种抗菌措施和对照没有显著差异,说明在马铃薯茎尖剥离时使用抗菌素可以防止细菌和霉菌的污染而

对茎尖的成活率和分化率影响较小。在组培苗的快繁阶段,3 种抗生素 + 病毒唑组合对细菌的抗性均较好,对霉菌抗性的效果有差异,但对对照的差异不明显;单纯对霉菌而言,不用抗生素 + 病毒唑组合也可防止其污染,但无法避免细菌带来的污染;同时也可以看出,3 种抗生素 + 病毒唑的配比措施对组培苗的生根数、黄化率、生根率均有负效应,比对照不同程度的减少,这种差异甚至达到了显著水平,对生根数、生根率的影响最明显,而对组培苗黄化率的影响和对照相比也达到显著差异。因此在实际应用时,快繁阶段的污染控制主要靠控制环境和操作规程来控制,尽量避免用添加抗菌素来控制污染。

3 讨 论

(1)不同抗生素及抗生素不同浓度防止茎尖剥离时细菌和霉菌污染的试验结果表明,链霉素对细菌的抗性显著好于青霉素和克林霉素;霉菌抗性效果依次是链霉素、克林霉素、青霉素;使用 10 mg/L 的链霉素效果最好。相反,3 种抗生素及抗生素不同浓度对茎尖剥离时期的平均茎尖成活数、分化率的影响较小。因此,可以采用这 3 种抗菌素及相应的浓度配比来达到防止茎尖剥离时细菌和霉菌的污染。

(2)不同抗生素和抗生素的不同浓度对马铃薯组培苗快繁阶段的影响差异极显著,可以通过改变抗生素及其浓度来调节马铃薯组培苗快繁阶段的生产效率;在马铃薯组培苗快繁阶段,以使用克林霉素最好、链霉素次之;3 种抗生素与 3 种不同浓度的配方中,使用克 20 mg/L 林霉素的配方效果最好。

表3 不同抗生素+病毒唑组合对马铃薯组培茎尖剥离和快繁的影响

Table 3 The effect of different antibiotic plus Ribavirin combination for potato apical meristem peeling and plantlet propagation

试验时期 Trial date	性状 Trait	效应测验 ^{a)} Effect test	对照 ^{b)} (CK)	青霉素+病毒唑 ^{c)} Amoxycillin + Ribavirin	链霉素+病毒唑 Streptomycin + Ribavirin	克林霉素+病毒唑 Clindamycin + Ribavirin
茎尖剥离 Apical meristem peeling	细菌抗性 Bacteria fastness	效应值(%) Effect value	68.7	96.0	97.0	86.7
		Duncan 测验 Duncan test	C	A	A	B
	霉菌抗性 Mildew fastness	效应值(%) Effect value	56.0	93.7	94.0	76.0
		Duncan 测验 Duncan test	C	A	A	B
	茎尖成活数 Number of apical meristem survive	效应值(个) Effect value	12	5.7	9.7	4
		Duncan 测验 uncan test	A	B C	B A	C
	茎尖分化率 Apical meristem polarized rate	效应值(%) Effect value	A	B	A	B
		Duncan 测验 Duncan test	60.0	25.0	48.3	20.0
快繁 Propagation	细菌抗性 Bacteria fastness	效应值(%) Effect value	0	81.3	75.3	81.3
		Duncan 测验 Duncan test	C	A	B	A
	霉菌抗性 Mildew fastness	效应值(%) Effect value	87.0	86.3	81.3	85.0
		Duncan 测验 Duncan test	A	A	B	A
	单株生根数 Radicaton of plant	效应值(%) Effect value	8.0	4.0	2.7	1.7
		Duncan 测验 Duncan test	A	B	C B	C
	苗黄化率 Etiolation rate	效应值(%) Effect value	0.0	33.0	53.0	81.7
		Duncan 测验 Duncan test	D	C	B	A
	苗生根率 Radicaton rate	效应值(%) Effect value	100.0	15.0	12.3	18.3
		Duncan 测验 Duncan test	A	C	D	B

注:a) Duncan 测验中的显著性水平是 95%。b) 对照(CK)用灭菌水。c) 3 种抗生素的浓度是 20 mg/L, 病毒唑的浓度是 10 mg/L。

(3) 链霉素+病毒唑的组合在茎尖剥离时期的效果最好;而对于茎尖剥离时期的茎尖成活率和茎尖分化率而言,3 种抗菌措施和对照没有显著差异,也进一步说明在马铃薯茎尖剥离时使用抗菌素可以防止细菌和霉菌的污染而对茎尖的成活率和分化率的影响较小。

(4) 3 种抗生素+病毒唑的配比措施在组培苗快繁阶段对细菌抗性有效,但对苗的生根数、黄化率、生根率均有负效应,因此在实际应用时,快繁阶段的污染控制主要靠控制环境和操作规程来控制,尽量避免用添加抗菌素来控制污染。

(5) 由试管苗的长势、黄化率和生根率 3 个调查指标的试验结果来看:加入抗生素会对组培苗有一定伤害,这也印证前人的研究^[2]。不能用抗生素

代替无菌消毒技术,它只能在一些植物材料难以消毒或一些宝贵材料受到污染必须抢救时方可考虑使用。

(6) 在高温高湿季节,微生物繁殖速度非常迅速,组培苗比在其它季节更容易被感染,如何控制微生物大面积真菌污染是组培快繁能否成功的关键^[2-4]。在试验过程中我们得到了一些意外的收获。那就是在实际工作中,除了工作人员应注意个人卫生并严格按操作规程进行工作外,真菌污染的控制环境很重要,身处高温高湿的培养环境中,任何消毒方法都作用不大。另外,在细菌的控制中,选择带菌少的健康原始材料是非常重要的^[5],因为一般消毒外植体的方法无法将浸入到植物组织中的菌类彻底杀死,经几代继代后就会表现出污染来。其次,

接种工具要消毒彻底,避免交叉感染,再次,可在培养基中加入一定量的抗污染剂(如抗生素、防腐剂等),它们对抑制细菌和真菌有一定的效果。

参考文献:

- [1] 朱德蔚. 植物组织培养与脱毒快繁技术[M]. 北京:中国科学技术出版社,2001.
- [2] Catlin DW. The effect of antibiotics on the inhibition of callus induction and plant regeneration from cotyledons of sugar beet[J]. Plant cell Rep., 1990(9):285-288.
- [3] 赵佐敏,艾 勇. 植物组织培养过程中的污染原因及控制措施[J]. 贵州农业科学,2004(1):44-45.
- [4] 杜雪玲,张振霞,余如刚,等. 植物组织培养中的污染成因及其预防[J]. 草业科学,2005(1):28-30.
- [5] 吕校石,杨建民,刘云强,等. 椴树组织培养中污染控制技术初步研究[J]. 河北林果研究,2004(1):34-38.
- [6] 李 群,陈丽萍,石铁松. 马蹄莲组培过程中真菌和细菌污染的消除方法研究[J]. 四川师范大学学报(自然科学版),2001(6):166-168.
- [7] 王亦菲,陆瑞菊,周润梅,等. 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(2):233-236.

(责任编辑 谢晓慧)