

驱蚊香草组织培养中污染的控制研究

朱万琴¹ 张 丽²

(1. 辽宁省微生物科学研究院, 辽宁 朝阳 122000; 2. 朝阳市双塔区林业局, 辽宁 朝阳 122000)

【摘 要】驱蚊香草是具有观赏价值、环保驱蚊的芳香植物, 本文就其组织培养过程中污染的控制问题进行了初步探讨。通过对驱蚊香草三种外植体的比较, 确定了以茎段为最佳外植体经杀毒后污染率较低, 并可加快组织培养快速繁殖的进程。通过对庆大霉素、氯苄西林钠和米鲜胺不同杀菌剂、不同使用浓度对驱蚊香草试管苗生长指标的考察, 确定了在不同培养基中添加 20~40mg/l 的氯苄西林钠和米鲜胺 1:1 的杀菌混合液既不影响驱蚊香草的生长又能达到控制污染的目的。

【关键词】驱蚊香草; 组织培养; 污染; 控制

中图分类号: S604⁺.7

文献标识码: C

驱蚊香草又名蚊净香草, 是非洲天竺葵科植物与中国含有香茅醛的植物经过细胞融合技术而获得的芳香植物, 多年生, 三年草本转木本。它通过天竺葵科自身独有的释放系统将香茅醛分子源源不断地释放空气中, 具有淡雅的柠檬香味, 并净化空气, 对人类有益无害。它株型美丽, 枝叶婆娑, 易于造型。驱蚊香草是市场上热销的集观赏、驱蚊之佳品。驱蚊香草通过无性繁殖方式繁育, 开花不育, 不能结实, 一般通过扦插和组织培养的方式进行繁育, 扦插方式需要大量的母本材料, 且受季节的影响较大, 速度慢; 组织培养的方式恰能突破此局限, 能在较短的时间内达到快速繁育的目的。但微生物污染是组织培养生产中的最大障碍之一, 微生物污染具有一定的普遍性, 每种植物、每个组织培养过程都可能有污染发生。本文就驱蚊香草组织培养中的污染控制问题作了初步探讨, 为规模化生产提供一定的理论指导。

1 材料与方法

1.1 供试材料

由本实验室养殖的盆栽成株驱蚊香草, 株高 30~40cm。

杀菌剂: 氯苄西林钠、米鲜胺市售粉剂; 庆大霉素市售水剂

1.2 试验方法

1.2.1 培养条件

培养基均以 MS 为基础培养基, 加入蔗糖 3.5%, 琼脂代用品 0.4%, 调 PH6.0~6.5,

①外植体启动培养基为 BA3.0mg/l (单位下

同) + IBA0.03;

②增殖培养基为 BA2 + NAA0.5;

③生根培养基为 NAA0.3。

培养室温度保持在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 相对湿度 60~80%, 光照强度 2500Lx, 光照时间 12h/d。

1.2.2 培养过程

将驱蚊香草外植体先接种于①外植体启动培养基上, 待诱导出芽后转接于②增殖培养基上, 当增殖芽达到要求时转到③生根培养基上, 最后进行瓶外练苗、移栽。

1.2.3 选用不同外植体进行表面杀菌试验

3 种外植体剪取方法:

幼芽: 自芽尖向下剪取 2~3cm。

茎段: 剪取 1~2 节未木质化的较嫩茎段 3.0~4.0cm, 去掉较大叶片, 可保留 1~2 片叶。

叶片: 采用中等成熟度的饱满叶片, 可保留叶柄 0.5~1.0cm。

外植体的杀菌处理: 将此三种外植体浸泡在加有数滴洗涤精和洗衣粉适量溶液中, 并轻轻摇动 5~10 分钟两次, 自来水冲洗 30~60 分钟, 于超净工作台上用 75% 酒精浸泡摇洗 2~3 秒, 再用 0.1% HgCl_2 浸泡 5~7 分钟, 无菌水摇洗 4~5 次, 用无菌滤纸吸干外植体表面的水分。再用无菌刀片将外植体原切口处重新切掉少许, 这样有利于减轻切口处的药害及褐变。并使外植体的大小保持在: 幼芽 1.5~2.0cm; 茎段 2.0~3.0cm 仍保留 1~2 个茎节; 叶片的叶柄保留 0.3~0.5cm, 并可延叶脉剪数个切口。而后接种于①外植体启动培养基上, 每瓶接种一个外植体, 以防交叉污染。25d 后统计试验结果, 为减轻外植体的污染率, 还可在剪取前 7~8d 隔天分 2~3 次向预剪部位喷

洒 700~800 倍的多菌灵溶液,以降低启动时的污染率,试验设计如表 2。

1.2.4 启动培养基中添加杀菌剂试验

将按照 1.2.3 处理的茎段接种在含不同种类、不同浓度杀菌剂的启动培养基上,试验设计见表 3,杀菌剂采用过滤灭菌方式,浓度分别设为 0、20、40、60mg/l,接种 25d 后统计茎段的污染率和分化率。

1.2.5 增殖、生根培养基中添加杀菌剂对驱蚊香草试管苗的影响

分别将未污染的试管苗和已污染的试管苗接

种于含不同浓度的氨苄西林钠和米鲜胺(1:1)混合液的增殖、生根培养基上,杀菌剂采用过滤灭菌,试验设计如表 1,每个处理 30 瓶。接种 25d 后统计试管苗的生长情况,包括分化芽数、株高、根长、生根数等生长指标,观察杀菌剂降低污染率的同时对试管苗生长的影响。

已污染试管苗的获得:认真检查增殖过程中的试管苗,通常取用自转接后培养不超过三天的试管苗作为污染试验苗株(若培养时间过长污染菌长满不利于试验并易造成环境污染),在超净工作台转至试验用培养基上即可。

表 1 杀菌剂对驱蚊香草试管苗生长的影响

编 号		(氨苄西林钠 mg/l)	米鲜胺 (mg/l)
未污染试管苗	①	0	0
	②	20	20
	③	40	40
	④	60	60
已污染试管苗	⑤	0	0
	⑥	20	20
	⑦	40	40
	⑧	60	60

2 试验结果

2.1 外植体表面杀菌试验结果

表 2 不同外植体表面杀菌试验

外植体	取样数 (个)	未染菌数 (个)	污染率 (%)	成活数 (个)	死亡率 (%)	分化率 (%)	新芽始出现 天数 (d)
幼芽	30	21	30	15	50	43.3	18
茎段	40	30	25	29	27.5	70	15
叶片	50	34	32	20	60	36	23

注:分化率=出芽的个体数/取样数

采用文中的杀菌方式以茎段为外植体污染率最低,结果最好(如表 2)。据观察,三种外植体接种于启动培养基上后,杀菌对外植体的损伤影响 8d 后即可看出,叶片由绿变黑,死亡率达 60%;幼芽呈现死亡状态稍慢,但整芽的绿色越来越少,直至完全变黑死亡,死亡率也高达

50%;茎段所带叶片亦有发黑现象,但茎段的耐受性较强,损害较轻而保持其绿色,死亡率仅为 27.5%。7d 后统计污染状况,通常在外植体基部及上部可见微生物污染,培养基表面可见完整菌落,基部多为细菌,上部多为真菌。叶片污染率较高为 32%,这可能因叶片不平整部分菌易滋生

于此;幼芽稍次之,污染率为30%这可能由于芽基部多有包被,杀菌剂难以到达所致;茎段污染率最低,仅为25%。25d后统计分化情况发现叶片通常约需23d愈伤组织分化出新芽,分化率为36%;幼芽在18d后愈伤组织由绿转白,新芽分化,分化率为43.3%;茎段最快,15d后即能在节间长出新芽,分化率达到70%。在组织启动培养过程中死亡率、污染率、分化率是衡量这一步骤的主要指标。综合来看采用文中的杀菌方式以茎段为外植体可降低污染率,效果最好。

2.2 在启动培养过程杀菌剂的作用结果

启动培养基中加了杀菌剂后对分化率、污染率的影响是不同的(如表3)。试验中发现庆大霉

素对驱蚊香草启动培养过程中霉菌污染无抑制作用、对细菌的作用也不明显,降低污染率的作用不大。氨苄西林钠对细菌的抑制作用明显,米鲜胺则对霉菌的抑制作用明显。当氨苄西林钠与米鲜胺1:1混合的杀菌剂浓度在0~20mg/l时,污染率由25%降低到16%;当杀菌剂浓度达到40mg/l时,污染率降为14%;但当杀菌剂浓度超过40mg/l时,驱蚊香草的分化率显著下降,由不加杀菌剂的70%降低到60mg/l时的50.0%。因此驱蚊香草启动培养时以添加氨苄西林钠与米鲜胺1:1混合的杀菌浓度20~40mg/l最佳,既降低了污染率,又保证了一定的分化率。

表3 杀菌剂浓度对茎段分化率和污染率的影响

处 理	杀菌剂浓度 (mg/l)	污染菌	接种数 (个)	分化率 (%)	污染率 (%)
对照	0	* * * + + + +	100	70	25
A 庆大霉素	20	* * * + + +	50	68	25
	40	* * * + + +	100	66	24
	60	* * * + +	100	65	23
	20	* * * + +	50	68	18
B 氨苄西林钠	40	* * * +	100	67	17
	60	* * * +	100	64	17
	20	* + + +	50	66	24
C 米鲜胺	40	+ + +	100	65	22
	60	+ +	100	65	22
	20	* + + +	50	64	23
A + C = 1: 1	40	+ +	100	62	22
	60	+ +	100	52	21
	20	+	50	66	16
B + C = 1: 1	40	—	100	63	14
	60	—	100	50	10

注: * 表示霉菌, * 越多, 霉菌越多 + 表示细菌, + 越多, 细菌越多 — 无菌

2.3 杀菌剂对未污染驱蚊香草瓶苗生长的影响

见表4, ①、②、③中的试管苗长势好于④, ①好于②、③, 但三个试验处理差异不显著。说

明适量加入20~40mg/l的杀菌剂对未污染驱蚊香草试管苗的生长无明显阻碍, 但浓度过高, 如60mg/l就会抑制其分化与生长。

表4 杀菌剂对驱蚊香草瓶苗生长的影响

编 号		分化芽数 (个)	株高 (cm)	平均根长 (cm)	平均根数 (条)
未污染试管苗	①	8	6.5	3.5	5.1
	②	7.5	6.4	3.3	4.4
	③	7.7	6.3	3.2	4.6
	④	4.5	4.8	2.8	4
已污染试管苗	⑤	0.4	2.2	0.9	2.1
	⑥	7	6	3	3.8
	⑦	7.2	6.2	3.1	4.2
	⑧	4.2	3.4	2.4	3.9

2.4 杀菌剂浓度对已污染瓶苗生长的影响

由表4看出⑤、⑥、⑦、⑧的驱蚊香草试管苗长势差异显著,⑤中基本不能正常生长,对已污染的试管苗不加杀菌剂污染菌就会难以遏制,从而导致试管苗发黄、生长停滞甚至干枯死亡。⑥、⑦的芽数、株高、根长、根数等生长指标均高于⑧,⑥、⑦与②、③差异不明显,这可能因为加入适量杀菌剂20~40mg/l,抑制了污染菌的繁殖改善了被污染试管苗的生长环境,使之能够被再利用,加快繁殖进程,减少浪费。

2.5 试管苗的练苗及移栽

待试管苗生好根后置于20±2℃温室中,加入少量无菌水以保持湿度并延缓杂菌滋生,揭开瓶盖使之逐步适应外界的通风及光照等自然条件,5~7d后,将苗轻轻取出,用清水洗净根部附着的培养基,因培养基营养成分较多,以降低染菌几率,而后移植于适当的基质中。

3 讨 论

3.1 本试验是在室内取得的试验材料,培养环境相对稳定,试验材料所带的主要污染菌可能是相对固定的,本试验只选用了有限的几种杀菌剂,试验结果可能并不理想,通过对主要污染菌的分析鉴定,筛选无副作用、更为有效的杀菌剂有待进一步作深入研究。

3.2 试验过程中,发现驱蚊香草污染状况在组培的各个阶段都会发生,但在启动、增殖培养过程中较为严重,其他种类植物的组织培养过程中情况类似,此阶段污染率的控制应引起组培工作者高度重视。

3.3 在组织培养过程中污染的原因有很多,本文

只着重从外植体启动和增殖等方面作了初步探讨,保持良好的培养环境、工作环境、操作者的严格规范的操作等也是降低控制污染率的重要因素。

3.4 本文采取一系列的控制污染措施,经多次传代增殖,跟踪观察10代无驱蚊香草变异情况出现,性状稳定,从而为驱蚊香草的种质资源保存及规模化生产提供了理论依据与技术支持。

参考文献

- [1] 吴林森.植物组织培养污染问题的研究及其控制措施[J].江苏林业科技,2003,32(1):28-31
- [2] 周俊辉,周厚高,刘华全.植物组织培养中内生菌污染问题[J].广西植物,2003,23(1):41-47
- [3] 韩美丽,陆荣生,黄化艳等.绿巨人组织培养过程中玻璃化菌及细菌污染的消除方法研究[J].广西林业科学,1999,28(1):16-18
- [4] 翟建中,顾梅俏.常青蔓组培生产中污染的防治[J].森林病虫害通讯,1999,(4):30-32
- [5] 于福科,张广军.玫瑰组织培养污染控制措施[J].陕西农业科学,2002,(11):48-48
- [6] 杜雪玲,张振霞,余如刚等.植物组织培养中污染成因及预防[J].草业科学,2005,(22):24-27
- [7] 吴洪生.组织培养中染菌及预防[J].药物生物技术,2001,8(2):239-240
- [8] 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
- [9] 朱广廉.植物组织培养中外植体灭菌[J].植物生理学通讯,1996,32(6):444-449
- [10] 朱广廉.植物组织培养中灭菌和无菌操作的几个问题[J].植物生理学通讯,1995,31(5):375-384
- [11] 王志成,刘明希,易自立.杀菌剂防治植物组织培养污染的初步研究[J].长沙电力学院学报(自然科学版),2004,19(1):82-84
- [12] 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),2001,24(6):607-609