

曾云英, 万 强, 马存琛. 抑菌剂及接种条件在矮牵牛开放式快速繁殖中的效果[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(5): 79–80.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.021

抑菌剂及接种条件在矮牵牛开放式快速繁殖中的效果

曾云英, 万 强, 马存琛

(江苏开放大学, 江苏南京 210036)

摘要:以矮牵牛为外植体, 将不同种类和浓度的抑菌剂加入培养基中, 确定适合矮牵牛开放式快速繁殖的最佳抑菌剂种类和浓度。结果表明, Y1 和 Y2 均可作为矮牵牛开放式快速繁殖的抑菌剂, Y1 浓度为 2.5% 时抑菌效果最佳且外植体生长良好。接种器具用抑菌剂浸泡消毒 5 min 后在空气消毒后的制剂间接种可以达到超净工作台的效果。

关键词:矮牵牛; 开放式快速繁殖; 抑菌剂; 接种条件

中图分类号: S681.604+.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)05-0079-02

植物开放式快速繁殖是指在抑菌剂的作用下, 使植物快速繁殖脱离严格无菌的操作环境, 不需高压灭菌和超净工作台, 用普通容器代替组培瓶, 在自然、开放的有菌环境下进行植物的快速繁殖。该技术实现了把植物组培从无菌实验室移到自然环境中进行, 可降低植物快繁要求、简化快繁程序、降低快繁成本、提高快繁效率。当前关于植物开放式快速繁殖的研究重点是围绕污染控制问题展开, 抑菌剂的选择成为开放式快速繁殖是否成功的关键。利用抗生素、农药、家用消毒剂、植物提取物等作为抑菌剂方面的研究均有报道, 崔刚等首次采用植物提取液作为抑菌剂对葡萄茎段进行培养, 成功获得外植体, 由此开始快速繁殖的相关研究^[1]。陈瑞丹等以植物混合提取液作为抑菌剂对梅花茎段进行培养^[2]。丁国昌等以退菌特为抑菌剂获得黑木相思开放式快速繁殖的再生苗, 污染率仅为 9.3%^[3]; 解辉等以家用消毒剂次氯酸钠作为香蕉开放式快速繁殖的抑菌剂, 认为浓度在 0.01% 以上可有效抑制培养基的污染^[4]; 赵青华等将特制的 H198 抑菌剂 400 倍液添加到培养基中, 获得魔芋的再生苗^[5]; 王赵玉等比较生物农药大蒜素与化学农药代森锰锌的抑菌效果, 认为适当浓度的大蒜素和代森锰锌抑菌效果均比较理想且不会对植物生长产生副作用^[6]。王丹用山梨酸钾作为抑菌剂获得红豆杉的再生苗^[7]。本研究以 2 种复合抑菌剂(Y1, Y2)作为矮牵牛开放式快速繁殖的抑菌剂, 研究适合矮牵牛外植体生长的最佳抑菌剂种类和浓度, 以及合适的接种操作方法, 以期建立其开放式快速繁殖技术体系, 简化快速繁殖程序, 降低快速繁殖成本, 为植物的低成本工厂化生产提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料为矮牵牛茎尖和茎段。抑菌剂为复合型抑菌

剂, Y1 由植物提取, Y2 是化学合成制剂, 均由上海宇涵生物科技有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 抑菌剂筛选 以 MS+1.0 mg/L BA+0.5 mg/L NAA 为矮牵牛培养基, 将不同浓度的 Y1、Y2 抑菌剂分别添加到培养基中, 培养基不经过高温高压灭菌直接接种。Y1 抑菌剂浓度为 1.25、2.50、3.50 mL/L, Y2 抑菌剂的浓度为 0.25、0.50、1.00 mL/L。以传统制备方法即高温高压灭菌为对照。

1.2.2 接种条件的筛选 接种盘、镊子、刀片不同处理: 高压灭菌、乙醇浸泡消毒、抑菌剂浸泡消毒、不消毒。接种环境: 超净工作台接种、空气消毒后的制剂间接种。以快速繁殖的传统接种方法为对照。

1.2.3 统计与分析 材料接种培养后, 在一定时间内对材料的污染率、芽分化率以及外植体生长状况作观察记载及必要的统计。本试验中, 污染率=污染的外植体数/接种的外植体数×100%; 分化率=已分化的外植体数/接种后成活外植体数×100%。

统计相关的数据, 采用 SPSS for windows 10.0 统计分析软件包对试验观察数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 抑菌剂种类及浓度对矮牵牛快速繁殖的影响

试验于 2015 年 3 月 11 日进行, 接种后定期观察外植体生长状况, 接种后 7、14、20 d 分别统计外植体污染情况, 接种后 30 d 观察统计外植体分化状况。与传统组织培养相比, 污染率一直是植物开放式快速繁殖的一大难题。从表 1 可以看出, 传统的灭菌方式培养 20 d 时污染率为 0。加了抑菌剂的培养基在一定程度上能控制污染, 但达不到高压灭菌的效果。Y1、Y2 在低浓度时污染率较高, 浓度高时基本能达到与传统灭菌方式一样的无菌效果。培养 7 d 时, 不加抑菌剂和不进行高压灭菌的 CK2 污染率最高, 为 80%, 其次是 Y1 浓度为 1.25 mL/L 时, 污染率为 13%。培养 14 d 时, Y1 浓度为 2.50 mL/L、Y2 浓度为 0.25 mL/L 时开始出现污染, 之后污染逐渐加重, 20 d 时污染率分别达到 33% 和 20%。由此可见, 14 d 是污染加重的一个拐点, 为了减少污染, 可在培养 14 d 左右更换培养基。

收稿日期: 2015-12-11

基金项目: 江苏省高校自然科学研究面上项目(编号: 13KJB180004)。

作者简介: 曾云英(1976—), 女, 重庆长寿人, 硕士, 副教授, 从事园林植物与观赏园艺、生态规划方面的研究。E-mail: yuniny@sina.com。

表 1 抑菌剂种类及浓度对矮牵牛快速繁殖污染率的影响

抑菌种类	抑菌剂浓度 (mL/L)	接种瓶 数(瓶)	7 d 污染 率(%)	14 d 污染 率(%)	20 d 污染 率(%)
Y1	1.25	15	13	33	60
	2.50	15	0	13	33
	3.50	15	0	0	7
Y2	0.25	15	0	7	20
	0.50	15	0	0	7
	1.00	15	0	0	0
CK1	不加抑菌剂,高压灭菌	15	0	0	0
CK2	不加抑菌剂,不 高压灭菌	15	80	100	100

表 2 抑菌剂种类及浓度对矮牵牛快速繁殖的影响

抑菌剂种类	抑菌剂浓度(mL/L)	接种瓶数(瓶)	分化率(%)	外植体生长状况
Y1	1.25	15	100aA	未污染的外植体生长良好,分化正常
	2.50	15	93aA	外植体生长良好,分化正常
	3.50	15	53bB	外植体生长纤细,部分分化
Y2	0.25	15	0cC	外植体老叶萎黄,不分化,伸长生长缓慢
	0.50	15	0cC	外植体不生长,叶片萎黄,逐渐死亡
	1.00	15	0cC	外植体不生长,叶片萎黄,逐渐死亡
CK1	不加抑菌剂,高压灭菌	10	100 aA	未发生污染,外植体生长良好,正常分化
CK2	不加抑菌剂,不高压灭菌	10	0cC	污染严重

注:各处理芽分化率进行 *LSD* 检验,同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著,不同大写字母表示在 0.01 水平差异显著。

加到矮牵牛开放式快速繁殖的培养基中,在不同的接种条件下进行接种,观察外植体污染情况和生长状况,以确定接种条件对抑菌效果的影响。试验结果表明,接种器具用 500 mg/L 的 Y2 浸泡消毒 5 min 可以达到彻底消毒的效果,制剂间空气

抑菌剂对外植体分化率及生长状况的影响见表 2。从表 2 可以看出,随着 Y1 浓度的升高,外植体的分化率减少,Y1 浓度为 1.25、2.50 mL/L 时分化率差异不显著。本试验所设的 Y2 等 3 个浓度均不利于外植体的分化,外植体只伸长生长,并且随 Y2 浓度升高,外植体黄化率增高,直至全部死亡。

比较 Y1 和 Y2 的污染率及外植体生长状况可以看出 Y2 作为抑菌剂可以很好的抑菌污染,但对外植体的伤害很大,很小的浓度就能使外植体整株黄化甚至死亡。Y1 抑菌力不及 Y2,但对外植体伤害小,外植体能正常生长与分化。适合矮牵牛开放式快速繁殖的抑菌剂种类为 Y1、浓度为 2.5 mL/L。

2.2 接种条件对矮牵牛外植体生长及分化的影响

以抑菌效果最好的浓度为 2.50 mL/L 的 Y1 为抑菌剂添

消毒后接种和超净工作台接种污染状况没有差异,接种器具经抑菌剂浸泡消毒后在空气消毒后的制剂间进行接种与传统的在超净工作台里进行的接种效果一样。制剂间空气消毒可作为矮牵牛的开放式快速繁殖的接种环境(表 3)。

表 3 接种条件对矮牵牛外植体污染的影响

处理	接种条件	接种瓶 数(瓶)	污染率(%)		
			接种 7 d	接种 10 d	接种 15 d
1	接种器具抑菌剂浸泡消毒 5 min 后超净工作台接种	20	0	0	0
2	接种器具不消毒,制剂间空气消毒后进行接种	20	30	45	50
3	接种器具抑菌剂浸泡消毒 5 min,制剂间空气消毒后进行接种	20	0	0	0
4	接种器具不消毒制剂间不消毒接种	20	85	100	100
5	接种器具高压灭菌后在超净工作台接种(CK)	20	0	0	0

3 结论与讨论

试验结果表明,Y1、Y2 在植物组织培养中的抑菌效果良好,Y2 的抑菌效果更佳,但 Y2 在抑菌的同时,对外植体的伤害较大,外植体出现生长缓慢,叶片黄化,最后全株黄化死亡。Y1 由植物提取液组成,抑菌效果相对 Y1 较弱,但对外植体不产生伤害,外植体正常生长和分化。综合抑菌能力和外植体的生长状况,Y1 浓度为 2.5% 是最佳的抑菌剂。接种器具用 Y2 浸泡消毒 5 min 后在空气消毒后的制剂间进行接种,可以替代在超净工作台接种。化学抑菌剂在抑菌的同时影响外植体生长、甚至导致外植体整株死亡,植物提取的抑菌剂对外植体的伤害相对小^[8-9],发现更多更有效的植物性抑菌剂是今后工作的重点。

参考文献:

[1]崔刚,单文修,秦旭,等.植物开放式组织培养研究初探[J].

山东农业大学学报:自然科学版,2004,35(4):529-533.
[2]陈瑞丹,孙文薇.梅花品种‘淡丰后’茎段开放式启动培养的初步研究[J].北京林业大学学报,2007,29(增刊1):30-34.
[3]丁国昌,高淑慧,林思祖,等.黑木相思开放式光自养微繁殖的研究[J].福建林学院学报,2010,30(1):11-14.
[4]解辉,莫廷辉,曾丽星.次氯酸钠在香蕉开放式组织培养中的应用研究[J].热带作物学报,2011,32(5):886-890.
[5]赵青化,陈永波,杨朝柱,等.魔芋开放式组织培养技术初探[J].氨基酸和生物资源,2009,31(4):79-82.
[6]王赵玉,张健雄,户新宇,等.抑菌剂在开放式植物组织培养中的应用研究[J].北方园艺,2012(18):125-127.
[7]王丹,刘霞.山梨酸钾在红豆杉开放式组织培养中的应用[J].安徽农业科学,2010,38(2):634-635.
[8]张爱华,任志成,王壮,等.不同生物源农药对西洋参主要病害的室内抑菌活性及田间防效[J].江苏农业科学,2015,43(11):197-200.
[9]杜永华,敖光辉,魏琴,等.油樟叶总黄酮和总多糖的抑菌活性[J].江苏农业科学,2015,43(11):408-410.