

马铃薯脱毒试管苗污染控制效果研究

康萍芝¹, 张丽荣¹, 詹虹², 沈瑞清¹, 郭成瑾¹

(1. 宁夏农林科学院 植物保护研究所, 宁夏植物病虫害防治重点实验室, 宁夏 银川 750002; 2. 宁夏马铃薯脱毒种薯繁育中心, 宁夏 平吉堡 750024)

摘要:通过在 MS 培养基中加入抗生素和杀菌剂进行逐步筛选, 解决马铃薯脱毒试管苗快繁过程中的污染问题。结果表明:防止马铃薯脱毒试管苗污染的最佳抑菌剂组合 MS+50 mg/L 硫酸庆大霉素+50 mg/L 氨苄青霉素+50 mg/L 硫酸链霉素+0.4 g/L 多菌灵, 该组合有效降低了马铃薯脱毒苗细菌和真菌污染, 提高了快繁效率。

关键词:马铃薯脱毒苗; 污染; 抑菌剂; 控制效果

中图分类号:S 532 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)20-0134-03

马铃薯产业已成为宁夏农业战略性主导产业之一, 是南部山区农民脱贫致富的重要支柱产业。目前, 宁夏地区以脱毒种薯繁育和质量控制为重点, 脱毒原原种年生产能力达 5 000 万粒。然而, 在马铃薯脱毒试管苗工厂化快繁过程中, 常因苗源感染、培养基带菌、接种环境不洁以及操作环节不慎等原因造成脱毒试管苗污染严重, 给马铃薯原原种生产成本和质量带来了很大障碍。对于防止马铃薯脱毒试管苗污染的研究报道, 分析其污染原因的较多^[1-2], 也有一些资料显示, 加入适量的抗生素可有效控制马铃薯脱毒苗细菌性污染^[3-4], 但对于其真菌性污染的防治鲜有报道。事实上, 对于马铃薯脱毒试管苗的污染问题, 由于组培过程中每一环节都可能出现污染, 而导致情况常常比较复杂, 不仅仅单独为细菌性或真菌性污染, 很可能表现为二者的混合污染, 如一些内生菌(细菌、真菌)污染等, 但对于该项研究, 目前尚无报道。为了解决这一问题, 试验利用一些抗生素和杀菌剂作为抑菌剂进行了大量反复筛选试验, 选择出了最佳降低马铃薯脱毒试管苗细菌和真菌污染的配方组合, 旨在为今后更好地解决马铃薯脱毒试管苗污染问题, 提高快繁效率, 确保马铃薯原原种生产质量和降低成本奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

马铃薯脱毒试管苗:“克新 18 号”。抗生素:先锋

霉素 V (Cefazolin Sodium 头孢唑林钠, 石药集团中诺药业有限公司)、氨苄青霉素 (Ampicillin Sodium 氨苄西林钠, 哈药集团三精总厂)、硫酸庆大霉素 (Gentamycin Sulfate, 8 万单位, 石药集团欧意药业有限公司)、硫酸链霉素 (Streptomycin Sulfate, 100 万单位, 牡丹江宇德制药有限公司)。杀菌剂:50% 多菌灵可湿性粉剂 (Carbendazim, 江阴市福达农化有限公司)、五氯硝基苯可湿性粉剂 (精粉) (Quintozene, 运城绿康实业有限公司)。培养基:MS 基础培养基。

1.2 试验方法

该试验在平吉堡原原种薯繁育基地进行。

1.2.1 试验 1 根据相关资料^[4-6]和初筛试验结果, 选择先锋霉素 V、氨苄青霉素、硫酸庆大霉素、硫酸链霉素 4 种不同的抗生素, 分别与杀菌剂多菌灵、五氯硝基苯进行一定浓度的配比组合, 分别为:①50 mg/L 先锋霉素 V (X)+100 mg/L 氨苄青霉素 (A1)+100 mg/L 硫酸链霉素 (L1)+0.75 g/L 多菌灵 (D1); ②50 mg/L 硫酸庆大霉素 (Q)+100 mg/L 氨苄青霉素 (A1)+100 mg/L 硫酸链霉素 (L1)+0.75 g/L 多菌灵 (D1); ③50 mg/L 先锋霉素 V (X)+100 mg/L 氨苄青霉素 (A1)+100 mg/L 硫酸链霉素 (L1)+0.75 g/L 五氯硝基苯 (W1); ④50 mg/L 硫酸庆大霉素 (Q)+100 mg/L 氨苄青霉素 (A1)+100 mg/L 硫酸链霉素 (L1)+0.75 g/L 五氯硝基苯 (W1), 并将其加入到 MS 培养基中设成不同处理混合培养基, 灭菌后接入马铃薯脱毒污染苗 (细菌和真菌混合污染) 和无菌苗 (健康苗), 并设 MS 培养基无菌苗和污染苗作为对照, 共计 10 个处理, 均使用 100 mL 广口玻璃瓶内装 30 mL MS 混合培养基, 每瓶接入 20 个茎段苗 (一个污染材料), 每处理 10 瓶, 接种后置于培养室内进行培养。生长 20 d 时调查其污染率, 并观察脱毒苗的生长情况。

1.2.2 试验 2 在试验 1 的基础上进行。选择控制效果最好的抗生素和杀菌剂最佳组合②和④, 将其中抗

第一作者简介:康萍芝(1972-), 女, 本科, 副研究员, 现主要从事马铃薯种薯病害及其全程质量控制方面的研究工作。E-mail: kangpingzhi@163.com。

责任作者:沈瑞清(1964-), 男, 博士, 研究员, 现主要从事马铃薯病虫害方面研究工作。

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划资助项目 (2009BAD5B04)。

收稿日期:2011-08-11

生素组合 50 mg/L 硫酸庆大霉素(Q)+100 mg/L 氨基青霉素(A1)+100 mg/L 硫酸链霉素(L1)设置成 3 种不同浓度,分别为:①50 mg/L 硫酸庆大霉素(Q)+100 mg/L 氨基青霉素(A1)+100 mg/L 硫酸链霉素(L1);②50 mg/L 硫酸庆大霉素(Q)+100 mg/L 氨基青霉素(A1)+50 mg/L 硫酸链霉素(L2);③50 mg/L 硫酸庆大霉素(Q)+50 mg/L 氨基青霉素(A2)+50 mg/L 硫酸链霉素(L2),将其分别与 MS 培养基混合制成含药培养基,灭菌后分别接入马铃薯脱毒无菌苗和细菌苗,并设 MS 培养基无菌苗和细菌苗作为对照,共计 8 个处理,每处理 20 瓶,接苗茎段数量、培养基用量等均与试验 1 相同,生长 20 d 时调查其污染率,并观察脱毒苗的生长情况。

1.2.3 试验 3 将试验 2 筛选出的抗生素最佳组合 50 mg/L 硫酸庆大霉素(Q)+50 mg/L 氨基青霉素(A2)+50 mg/L 硫酸链霉素(L2)分别与 0.6、0.4、0.2 g/L 的多菌灵(D2、D3、D4)、五氯硝基苯(W2、W3、W4)杀菌剂均匀混合,再加入 MS 培养基中进行灭菌,灭菌后分别接入马铃薯脱毒无菌苗和污染苗,并设

表 1 加入不同抑菌剂 20 d 时马铃薯脱毒苗污染情况

抑菌剂种类	脱毒苗	接种/瓶	污染/瓶	污染率/%	真菌污染/瓶	细菌污染/瓶	脱毒苗生长情况
X+A1+L1+D1	健苗	10	0	0	0	0	—
	污染苗	10	2	20	0	2	—
Q+A1+L1+D1	健苗	10	0	0	0	0	—
	污染苗	10	0	0	0	0	—
X+A1+L1+W1	健苗	10	1	10	0	1	—
	污染苗	10	4	40	0	4	—
Q+A1+L1+W1	健苗	10	2	20	2	0	—
	污染苗	10	1	10	0	1	—
CK	健苗	10	2	20	1	1	+
	污染苗	10	9	90	4	5	—

注:+,植株生长正常;—,轻度抑制,有根;—,中度抑制,无根。下同。

2.2 不同抗生素组合抑菌剂对马铃薯脱毒苗细菌污染的控制效果

将试验 1 筛选所获得的防止脱毒苗污染效果最佳的抗生素组合 50 mg/L 硫酸庆大霉素(Q)+100 mg/L 氨基青霉素(A1)+100 mg/L 硫酸链霉素(L1)进行最佳浓度筛选试验,由表 2 可知,3 个处理组合均能很好

表 2 加入不同抗生素抑菌剂 20 d 时马铃薯脱毒苗污染情况

抑菌剂种类	脱毒苗	接种/瓶	污染/瓶	污染率/%	真菌污染/瓶	细菌污染/瓶	脱毒苗生长情况
Q+A1+L1	健苗	20	0	0	0	0	—
	细菌苗	20	2	10	2	0	—
Q+A1+L2	健苗	20	2	10	2	0	—
	细菌苗	20	2	10	2	0	—
Q+A2+L2	健苗	20	1	5	1	0	+
	细菌苗	20	2	10	2	0	+
CK	健苗	20	2	10	2	0	+
	细菌苗	20	8	80	2	6	—

2.3 不同抑菌剂组合及杀菌剂浓度对马铃薯脱毒苗污染控制效果的影响

MS 培养基无菌苗和污染苗作为对照,共计 14 个处理,每处理 20 瓶,接苗茎段数量、培养基用量等均与试验 1 相同,生长 20 d 时调查其污染率,并观察脱毒苗的生长情况。

2 结果与分析

2.1 不同抗生素和杀菌剂组合的抑菌剂对马铃薯脱毒苗污染控制效果

将初筛选所获得的防脱毒苗污染效果较好的抗生素和杀菌剂进行不同浓度组合并测定其污染控制效果。由表 1 可知,在含有上述 4 种组合处理的 MS 培养基中分别接入污染苗茎段后,均表现出了一定的抑菌效果,其污染率控制在 0%~40%,均比对照污染率(90%)低,尤其是处理组合 Q+A1+L1+D1 控制污染效果最好,污染率为 0,其次为处理组合 Q+A1+L1+W1;从对细菌和真菌的控制效果来看,抗生素组合 Q+A1+L1 和杀菌剂 D1、W1 均表现出了很好的抑菌效果,但植株生长均受到抑制,说明加入抑菌剂过量,抑制了脱毒苗生长,需要进一步进行浓度筛选。

的防治马铃薯脱毒苗细菌污染,但前 2 个处理组合与对照相比较,对脱毒苗的生长存在一定的抑制作用,而组合 Q+A2+L2 对脱毒苗的生长无影响,为最适宜的防止细菌污染浓度。在试验调查中也发现抗生素对一些真菌污染无控制效果。

由表 3 可知,不同处理组合的抑菌剂对马铃薯脱毒苗污染均具有一定的控制作用,其中处理组合 Q+

A2+L2+D2、Q+A2+L2+D3、Q+A2+L2+W2 对脱毒苗污染控制效果最好,明显降低了真菌和细菌污

染,但只有处理 Q+A2+L2+D3 对脱毒苗的生长无影响,因此,该处理为该试验的最优浓度组合。

表 3 不同抑菌剂组合及其中杀菌剂浓度防止马铃薯脱毒苗污染测定结果

抑菌剂种类	脱毒苗	接种/瓶	污染/瓶	污染率/%	真菌污染/瓶	细菌污染/瓶	脱毒苗生长情况
Q+A2+L2+D2	健苗	20	0	0	0	0	—
	污染苗	20	2	10	0	2	—
Q+A2+L2+D3	健苗	20	0	0	0	0	+
	污染苗	20	1	5	0	1	+
Q+A2+L2+D4	健苗	20	1	5	1	0	+
	污染苗	20	3	15	2	1	+
Q+A2+L2+W2	健苗	20	0	0	0	0	—
	污染苗	20	2	10	1	1	—
Q+A2+L2+W3	健苗	20	0	0	0	0	—
	污染苗	20	3	15	2	1	—
Q+A2+L2+W4	健苗	20	2	10	1	1	—
	污染苗	20	4	20	2	2	—
CK	健苗	20	3	20	2	2	+
	污染苗	20	14	70	8	6	—

3 结论与讨论

该研究利用抗生素和杀菌剂作为抑菌剂进行了大量反复筛选试验,寻找到了控制马铃薯脱毒苗真菌和细菌污染效果显著的抑菌剂组合 MS+50 mg/L 硫酸庆大霉素+50 mg/L 氨苄青霉素+50 mg/L 硫酸链霉素+0.4 g/L 多菌灵。

试验中所选择出的杀菌剂可有效代替一些抗真菌污染的医用抗生素,如制霉菌素、酮康唑等^[7],可降低成本和工作量,增加经济效益。该试验结果可能对于植物组织材料中的一些内生菌污染有一定的控制效果,因为组织材料内部的内生菌不能被一般的表面消毒方法所清除,常随材料带入培养过程,从而引起组织中的细菌、真菌污染。至于在继代培养中污染是否还会显现,需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] 邱广伟,夏平,孙秀梅,等. 马铃薯脱毒试管苗工厂化污染问题[J]. 农业科技通讯,2009(10):87-88.
- [2] 杨萍,张涛. 马铃薯脱毒试管苗接种污染原因及防除技术[J]. 内蒙古农业科技,2005(7):21,24.
- [3] 方志明. 加入抗生素培养基对马铃薯脱毒试管苗的影响[J]. 中国马铃薯,2001,15(2):92.
- [4] 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.
- [5] 何正春,赵志莲,李峰,等. 杀菌剂对莲瓣兰种子原生地萌发胚培养中真菌污染控制的研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(4):1721-1722.
- [6] 李晓莺,罗青,张曦燕,等. 杀菌剂对枸杞组织培养中真菌污染的控制作用[J]. 安徽农业科学,2008,36(36):15804,15841.
- [7] 程逸宇,郑建秋,迟卉,等. 植物组织培养中真菌污染防治方法研究[J]. 贵州科学,2006,24(3):40-43.

Study on the Contamination Control Effect of Virus-free Potato Plantlets

KANG Ping-zhi¹, ZHANG Li-rong¹, ZHAN Hong², SHEN Rui-qing¹, GUO Cheng-jin¹

(1. Institute of Plant Protection, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Ningxia Key Laboratory for Control of Plant Disease and Insect Pest, Yinchuan, Ningxia 750002; 2. Ningxia Propagation Center of Virus-free Seed Potatoes, Pingjipu, Ningxia 750024)

Abstract: In order to solve contamination problem of virus-free potato plantlets in rapid propagation, this experiment by joining antibiotics and fungicide in MS medium gradually screened and choosed. The results showed that best antibacterial agent preventing the virus-free potato plantlets contamination, namely, MS + 50 mg/L Gentamycin Sulfate + 50 mg/L Ampicillin Sodium + 50 mg/L Streptomycin Sulfate + 0.6 g/L carbendazim. Through this way, bacteria and fungi contamination of virus-free potato plantlets were reduced effectively and efficiency of rapid propagation could also be improved.

Key words: virus-free potato plantlets; contamination; antibacterial agent; control effect