

“益培灵”的抑菌效果及对大花蕙兰类原球茎增殖与分化的影响

施隆文, 汪霞, 卢佳

(嘉兴职业技术学院, 浙江 嘉兴 314036)

摘 要:将被萎蔫短小杆菌污染的大花蕙兰的类原球茎置于 MS 培养基中, 以添加不同浓度、不同处理方法的“益培灵”杀菌剂进行正交实验, 并观察类原球茎的平均增殖倍数及芽与根的生长分化情况。结果表明:“益培灵”对培养后期的萎蔫短小杆菌基本无抑菌效果。由于污染程度有差异, 引起类原球茎平均增殖倍数、芽与根的生长数及分化率的差异。以培养基中添加 0.05 g/L “益培灵”和消毒液浸泡 6 min 组合的类原球茎增殖倍数高, 芽和根的生长数多, 分化率高。

关键词:“益培灵”; 抑菌效果; 大花蕙兰; 类原球茎; 增殖与分化

中图分类号:S 682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)04-0123-03

植物组织培养中的细菌和真菌污染是组培生产的最大障碍之一, 它直接影响生产成本和珍贵科研材料的保存。对于从外植体诱导成功的培养物, 因污染而报废、前功尽弃的情况很频繁。在做好其它防污染措施的同时, 在环境和培养基中加入杀菌剂亦可防止污染^[1]。在大花蕙兰(*Cymbidium hybridum*)经假鳞茎诱导成类原球茎的过程中, 常受真菌和细菌污染, 尤其是出现一种菌落为金黄色的细菌污染。为减少细菌和真菌污染, 提高大花蕙兰类原球茎的增殖与分化效果, 使用不同浓度和不同处理方法的“益培灵”杀菌剂对组培病原菌进行抑菌试验, 对其中的细菌进行鉴定, 并对大花蕙兰类原球茎增殖与分化的影响进行研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试杀菌剂 “益培灵”为植物组织培养专用防污染杀菌剂, 浅黄色粉末, 极易溶于水, 120℃加热 2 h 活性不下降, 购自上海稼丰园艺用品有限公司。

1.1.2 接种材料和培养基 接种材料由上海松柏龙园艺有限公司提供的大花蕙兰品种“花仙子”, 采其 1 a 生假鳞茎诱导出类原球茎(用培养基为 MS + 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.1 mg/L + 活性炭 1 g/L, pH 5.8)。类原球茎已被一种金黄色菌落的细菌轻度污染。

第一作者简介:施隆文(1951-), 男, 浙江宁波人, 本科, 副教授, 现主要从事植物组织培养和植物保护的教学和研究工作。E-mail: slw51@126.com。

基金项目:嘉兴市科技局资助项目(2008AY1002)。

收稿日期:2011-11-21

1.2 试验方法

1.2.1 正交实验设计 培养基基本配方: MS + 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.5 mg/L + 琼脂 10 g/L + 蔗糖 30 g/L + 活性炭 1 g/L, pH 5.8。采用 $L_9(3^4)$ 正交表, 3 个因素各 3 个水平: 在培养基中加不同浓度的“益培灵”(0、0.05、0.10 g/L); 在纯净水中加不同含量的益培灵, 灭菌, 制成消毒液(0、0.05、0.10 g/L), 在培养物接种前浸泡; 消毒液不同浸泡时间(3、6、9 min)。2 次重复。每一处理的每次重复接种 5 瓶, 每瓶接种大小基本一致, 平均 10 mg/个的类原球茎 6 个。

1.2.2 培养条件 在温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 光照强度为 1 500 lx, 光照时间 12 h/d 条件下进行。

1.2.3 观察记载 经过 6、83 d 培养, 分别观察记载污染情况。将类原球茎取出, 用分析天平进行称量、记录, 并观察记载每块类原球茎块的芽生长数和根生长数。

1.2.4 统计 经过 6 d 培养, 对每处理的 5 瓶培养瓶, 每瓶 6 个类原球茎块(共 30 块)进行污染率统计。经过 83 d 培养, 随机对每处理的 4 瓶培养瓶, 每瓶 6 个类原球茎(共 24 块)进行统计, 统计细菌、真菌污染率、类原球茎平均重量(mg/块)、平均类原球茎增殖倍数、平均芽或根分化率(每块类原球茎上只要有芽或根即为分化)、平均芽生长数和平均根生长数。类原球茎增殖倍数 = 接种 83 d 后的类原球茎重量(mg/个)/接种时的类原球茎重量(mg/个), 接种时的类原球茎平均重量为 10 mg/个。按正交实验要求, 用 Excel 表进行正交设计计算和方差分析。

1.2.5 细菌鉴定 对造成后期普遍污染的金黄色菌落的未知细菌委托浙江大学农业生命环境学部分析测试

中心用 MIDI Sherlock 微生物鉴定系统,对气相色谱(HP-6890)的操作及摄取数据结果进行分析鉴定。气相色谱的升温程序为:坡道式,170~270℃,升高 5℃/min。每个分析结束后,弹道式升温至 300℃,保持 2 min,清洁柱子。检测器为氢火焰离子检测器(FID),色谱柱为 Agilent 19091B-102(25.0 m×200 μm×0.33 μm),氢气为载气,氮气为“遮蔽”气。

2 结果与分析

2.1 细菌鉴定结果

经鉴定,造成后期普遍污染的金黄色菌落的细菌为短小杆菌属萎蔫短小杆菌的甜菜致病变种或奥氏致病变种(*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *betae/oortii*),该种细菌有不同致病变种,造成多种植物的细菌性叶斑病等^[2-4]。

2.2 “益培灵”杀菌剂抑菌效果分析

接种后 6 d,各处理的平均污染率见表 1。污染菌均为真菌。经方差分析,各因素的差异均不显著。此时,各处理的污染率均很低(0%~6.3%),且为真菌污染,未见接种前所见的萎蔫短小杆菌污染。

表 1 不同浓度、不同处理方法的“益培灵”的抑菌效果(接种 6 d 后)

试验号	培养基中浓度 /g·L ⁻¹	消毒液浓度 /g·L ⁻¹	消毒液浸泡时间 /min	平均污染率 /%
1	0	0	3	0
2	0	0.05	6	6.3
3	0	0.10	9	0
4	0.05	0	6	4.2
5	0.05	0.05	9	2.1
6	0.05	0.10	3	2.1
7	0.10	0	9	0
8	0.10	0.05	3	0
9	0.10	0.10	6	0

接种后 83 d,各处理的平均污染率见表 2。经方差分析,不同消毒液浸泡时间对抑菌效果(污染率)差异极显著($F=8.023^{**}$),由表 2 可知,消毒液浸泡 6 min 的相对污染率较低。其它各因素对抑菌效果差异不显著。由萎蔫短小杆菌引起的污染率极高,在 72.9%~100%,而真菌的污染相对较小,在 0%~12.5%。据此分析,“益培灵”杀菌剂对真菌有一定的抑菌效果,而对后期(接种 83 d 后)的萎蔫短小杆菌基本没有抑菌效果。

2.3 使用“益培灵”后对大花蕙兰原球茎增长倍数的影响

接种后 83 d,不同浓度、不同处理方法的“益培灵”对大花蕙兰类原球茎增长倍数的影响见表 3。经方差分析,“益培灵”在培养基中的浓度对大花蕙兰类原球茎增长倍数的影响极显著($F=24.393^{**}$),其在消毒液中的浓度对增长倍数的影响极显著($F=39.038^{**}$),其消毒液浸泡时间对增长倍数的影响极显著($F=9.909^{**}$)。

以在消毒液中不加“益培灵”,适当的浸泡时间(6 min),而在培养基中添加适量的“益培灵”(0.05 g/L)的组合下大花蕙兰类原球茎增长倍数较高,为 15.3 倍。在培养基中、在消毒液中不添加“益培灵”的组合下类原球茎增长倍数也很高,为 16.8 倍。

表 2 不同浓度、不同处理方法的“益培灵”的抑菌效果(接种 83 d 后)

试验号	培养基中浓度 /g·L ⁻¹	消毒液浓度 /g·L ⁻¹	消毒液浸泡 时间/min	平均污染率/%		
				细菌污染	真菌污染	合计
1	0	0	3	81.3	10.4	91.7
2	0	0.05	6	72.9	12.5	85.4
3	0	0.10	9	100	0	100
4	0.05	0	6	93.8	0	93.8
5	0.05	0.05	9	100	0	100
6	0.05	0.10	3	95.8	0	95.8
7	0.1	0	9	93.8	0	93.8
8	0.1	0.05	3	100	0	100
9	0.1	0.10	6	75.0	0	75.0

表 3 不同浓度、不同处理方法的“益培灵”对大花蕙兰类原球茎增长倍数的影响(接种 83 d 后)

试验号	培养基中浓度 /g·L ⁻¹	消毒液浓度 /g·L ⁻¹	消毒液浸泡 时间/min	平均增长倍数
1	0	0	3	16.8
2	0	0.05	6	10.8
3	0	0.10	9	3.4
4	0.05	0	6	15.3
5	0.05	0.05	9	8.2
6	0.05	0.10	3	10.5
7	0.10	0	9	8.4
8	0.10	0.05	3	3.8
9	0.10	0.10	6	3.8

出现以上情况的原因是“益培灵”对培养后期(接种 83 d 后)的萎蔫短小杆菌基本没有抑菌作用。在同样受细菌污染的情况下,有的组合的类原球茎受污染影响较轻,因而增长倍数较高;反之,则较低。

2.4 使用“益培灵”后对大花蕙兰类原球茎芽和根分化的影响

使用“益培灵”后对大花蕙兰类原球茎芽和根分化的影响见表 4。经方差分析,“益培灵”在培养基中的添加浓度对芽生长数和芽分化率的影响极显著($F=13.028^{**}$, $F=30.850^{**}$),以培养基浓度为 0.05 g/L“益培灵”的处理芽生长数最多和芽分化率最高(平均芽生长数为 0.71~1.17 个/块,芽分化率为 50.0%~77.1%)。而消毒液浸泡时间对芽分化率的影响极显著($F=8.251^{**}$),以 6 min 的处理芽分化率最高(平均芽分化率为 20.8%~77.1%)。

经方差分析,“益培灵”培养基中的添加浓度对根生长数和根分化率的影响极显著($F=12.547^{**}$, $F=8.787^{**}$),以培养基中添加浓度为 0.05 g/L“益培灵”的根生长数最多(为 0.27~0.88 根/块),根分化率最高(22.9%~50.0%)。“益培灵”消毒液浸泡时间对根生长数影响极显著($F=8.027^{**}$),以浸泡时间为 6 min 的根

表4 不同浓度、不同处理方法的“益培灵”对大花蕙兰类原球茎芽和根的分化的影响(接种 83 d 后)

试验号	培养基 中浓度 /g · L ⁻¹	消毒液 浓度 /g · L ⁻¹	消毒液 浸泡 时间/min	芽生长数 /个 · 块 ⁻¹	芽分化率 /%	根生长数 /根 · 块 ⁻¹	根分化率 /%
1	0	0	3	0.92	66.7	0.52	50.0
2	0	0.05	6	0.84	54.2	0.31	31.3
3	0	0.10	9	0.25	10.4	0.04	4.2
4	0.05	0	6	1.17	77.1	0.88	50.0
5	0.05	0.05	9	0.77	50.0	0.25	22.9
6	0.05	0.10	3	0.71	52.1	0.27	25.0
7	0.10	0	9	0.60	45.8	0.23	22.9
8	0.10	0.05	3	0.25	20.8	0.15	12.5
9	0.10	0.10	6	0.25	20.8	0.08	8.3

注:芽生长数、芽分化率、根生长数和根分化率均为 2 次重复的平均值。

生长数为多(0.08~0.88 根/块)。

综上所述,以培养基浓度为 0.05 g/L“益培灵”的处理的芽生长数多、芽分化率高、根生长数多及根分化率高;而消毒液浸泡 6 min 的芽分化率高和根生长数多。说明在同样受细菌污染的情况下,使用适当浓度的“益培灵”和浸泡适当时间的消毒液仍有减轻污染危害、提高类原球茎增殖与分化的效果。

3 结论与讨论

将被萎蔫短小杆菌污染的大花蕙兰的类原球茎置于 MS 培养基中,以添加不同浓度、不同处理方法的“益培灵”杀菌剂进行正交实验,并观察类原球茎的平均增殖倍数及芽与根的生长分化情况。结果表明,“益培灵”对培养后期的萎蔫短小杆菌基本无抑菌效果。由于污染程度有差异,引起类原球茎平均增殖倍数、芽与根的生长数及分化率的差异。以培养基中添加 0.05 g/L“益培灵”和消毒液浸泡 6 min 的组合其类原球茎增殖倍数

高,芽和根的生长数多,分化率高。该试验在接种前,大花蕙兰类原球茎已被萎蔫短小杆菌所污染,且污染的面很广。该种细菌在培养前期不出现菌落,在培养后期均出现菌落。可以认为,萎蔫短小杆菌为外植体(假鳞茎)内部带菌。据相关文献记载^[5-6],大花蕙兰发生的主要病害中并没有萎蔫短小杆菌所引起的病害,所以,目前还不能判断萎蔫短小杆菌是致病菌。

“益培灵”杀菌剂对培养后期的萎蔫短小杆菌的抑菌效果很差,而培养前期基本上不出现菌落。据观察,在接种后 30 d 左右基本不出现萎蔫短小杆菌菌落,且类原球茎增殖分化情况良好,所以,可在接种培养 30 d 后即转接培养。转接培养基中仍加入适量杀菌剂和消毒液中加入适量杀菌剂,可有效抑制萎蔫短小杆菌在培养基中的出现。

参考文献

- [1] 王志成,刘明稀,易自力. 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.
- [2] 陈永芳,郭坚华,方中达. 落葵上发现短小杆菌(*Curtobacterium*)一个新的致病变种[J]. 植物病理学报,2000,30(2):171-175.
- [3] 尹燕妮,陈永芳,李师默,等. 植物病原棒形细菌的 RAPD 分析[J]. 微生物学报,2005,45(6):837-841.
- [4] 张晓梅,林友伟,吴新华,等. 菜豆萎蔫病菌的 PCR 检测技术[J]. 南京农业大学学报,2004,27(3):42-45.
- [5] 张根梅. 大花蕙兰主要病虫害发生规律及防治方法[J]. 河南林业科技,2009,29(1):69-70.
- [6] 吴连星. 大花蕙兰生产中常见病虫害及其防治措施[J]. 亚热带植物科学,2001,30(3):50-53.

(致谢:该试验中所涉及的萎蔫短小杆菌鉴定工作由浙江大学农业生命环境学部分析测试中心徐幼萍老师完成,特此致谢!)

The Bacteriostatic Effect of ‘Yipeiling’ and Its Influence on Multiplication and Differentiation of Protocorm Like-body of *Cymbidium hybridum*

SHI Long-wen, WANG Xia, LU Jia

(Jiaxing Vocational and Technical College, Jiaxing, Zhejiang 314036)

Abstract: The protocorm like-body (PLB) of *Cymbidium hybridum* contaminated by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *betae/oortii* was put in MS medium, and factorial experiment with different level (concentration or treatment) of ‘Yipeiling’ was carried out, then results of average multiplicative times, the growth and differentiation of sprout and root of PLB were observed. The results showed that ‘Yipeiling’ had not inhibiting effect to *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *betae/oortii* during later period. It caused the difference among different checks of average multiplicative times, the growth quantity and differentiation rate of sprout and root of PLB due to the different contaminated degree. The combination of MS medium added 0.05 g/L of ‘Yipeiling’ and PLB dipped in thimerosal in 6 minutes was better, and its average multiplicative time of PLB was higher, the growth quantity of sprout and root of PLB was more and the differentiation rate of them was higher.

Key words: ‘Yipeiling’; bacteriostatic effect; *Cymbidium hybridum*; protocorm like-body (PLB); multiplication and differentiation