

# 两种抗生素对葡萄组培中污染菌的抑制作用

田永亮<sup>1</sup>, 张文<sup>1</sup>, 张国珍<sup>2</sup>, 马会勤<sup>1</sup>

(1. 中国农业大学农学与生物技术学院果树系, 北京 100094; 2. 中国农业大学农学与生物技术学院植保系, 北京 100094)

**摘要:**在引进的2个葡萄品种维德(Vidal Blanc)和南方无核(Reliance)的组培中, 为了降低污染率, 提高生产效率, 在初代培养基中分别加入不同浓度的青霉素(20 mg/L 和 40 mg/L(毫克/升))和四环素(20 mg/L 和 40 mg/L(毫克/升))来抑制污染真菌和细菌的生长。试验结果表明, 四环素的抑菌作用比青霉素的抑菌作用好, 两种抗生素在试验浓度下都没有对植物体产生毒害作用, 没有表现黄化等异常现象, 在实际生产中可以应用。

**关键词:**葡萄; 组织培养; 青霉素; 四环素; 抑菌作用

**中图分类号:**S663.103.6 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2005)05-0084-02

植物组织培养中真菌和细菌的污染是一个很普遍的现象, 因此无菌操作和培养环境的洁净对减少组培物污染率来说都很重要[朱广廉 1996 李群等 1999 由翠荣 2004]。为了消除真菌和细菌污染对外植体成活率的影响, 常在接种前用酒精、次氯酸钠等进行体外消毒, 但是各种消毒剂对外植体都会产生一定的影响, 消毒时间过长或消毒剂浓度过高会使植物死亡, 而消毒时间过短或者消毒剂使用浓度过低, 又不能有效地杀死污染菌(王利民等 2002)。所以对外植体, 尤其是对比较珍贵的外植体的消毒, 是组织培养是否成功的重要影响因素。在建立葡萄快繁体系时, 体系中经常会有污染菌的出现。为了提高葡萄组织培养的成活率, 减少真菌和细菌的污染, 我们在初代培养基中分别加入四环素和青霉素, 检验两种抗生素对真菌和细菌的抑制作用, 并探讨抗生素是否会对植物生长产生影响。

我们特别选用两个珍贵的葡萄品种维德(Vidal Blanc)和南方无核(Reliance)做为组培试验材料。vidal Blanc 是加拿大酿造冰葡萄酒的最重要的品种之一, 抗病、抗寒, 丰产性好; Reliance 是一个无核早熟鲜食葡萄品种。这两个品种都是国内少见的葡萄品种, 具有较高的市场推广价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以田间生长的两个葡萄品种的新梢茎段为外植体, 2004年7~8月间从中国农业大学科学园果树苗圃采样。

### 1.2 方法

新梢采集后, 当日在实验室剪成1 cm~2 cm(厘米)的单芽茎段。先用多菌灵(1:800)的溶液消毒10 min(分钟), 自来水洗净, 再用75%的酒精溶液消毒1 min(分钟), 无菌水清洗2~3次, 最后用2%~3%次氯酸钠消毒20 min(分钟), 无菌水清洗5~6次, 分别接种到培养基上。每个组织培养瓶接种3~4个茎段, 每个处理的接种数量根据材料的多少重复接种30~50个茎段。每7 d(天)统计一次培养瓶中真菌和细菌污染情况, 每14 d(天)统计一次葡萄芽的萌发率, 以确定两种抗生素及其不同浓度对污染真菌和细菌的抑制作用和对葡萄植物体生长的影响。

### 1.3 培养基

培养基以MS培养基为基础, 使用B5培养基的有机质浓

度, 激素浓度为BA 0.25 mg/L(毫克/升)培养基中四环素和青霉素浓度分别为20 mg/L、40 mg/L(毫克/升), 以不加抗生素的处理为对照。

## 2 结果与分析

在实验过程中我们分别将两种抗生素对真菌和细菌的抑制效果进行了统计。

表1 抗生素对 Reliance 组培中细菌的抑制作用

抗生素 及浓度	细菌污染率%				接种数 (个)
	接种后 7d	接种后 14d	接种后 21d	接种后 28d	
青霉素 20 mg/L	2.2	22.7	22.7	22.7	44
青霉素 40 mg/L	5.6	11.1	13.9	36.1	36
四环素 20 mg/L	4.5	16.7	16.7	22.7	44
四环素 40 mg/L	0	2.8	22.2	22.2	36
CK	14.6	27.1	31.3	31.3	48

表2 抗生素对 Vidal Blanc 组培中细菌的抑制作用

抗生素 及浓度	细菌污染率%				接种数 (个)
	接种后 7d	接种后 14d	接种后 21d	接种后 28d	
青霉素 20mg/L	0	0	12.5	20	40
青霉素 40mg/L	2	4	7	10	30
四环素 20 mg/L	0	2	4	10	50
四环素 40 mg/L	0	0	0	0	41
CK	10	10	25	25	40

### 2.1 两种抗生素对葡萄组培中污染细菌的抑制作用

根据对两个葡萄品种在分别添加青霉素和四环素培养基上细菌和真菌污染率的统计结果, 两种抗生素对组培过程中污染细菌和真菌都表现了一定的抑菌效果。在接种初期(7 d(天)), 两种抗生素对细菌均具有明显的抑制作用, 污染率低。但随着时间的延长, 两种抗生素对污染细菌的抑制作用降低, 低浓度(20 mg/L(毫克/升))处理在接种14 d(天)后细菌污染率明显增加, 高浓度(40 mg/L(毫克/升))处理的污染率增加相对较少(表1和表2)。说明抗生素的抑菌作用具有一定的持效期, 超过一定时间即失去抑菌效果。总体来讲, 培养基中添加四环素40 mg/L(毫克/升)对细菌的抑制作用较好, 尤其对Vidal Blanc中污染细菌的抑制效果更好。

### 2.2 两种抗生素对组培葡萄中污染真菌的抑制作用

从表3和表4中, 我们可以看到在接种初期两种抗生素对真菌的抑制都比较好, 但是随时间的推移, 两种抗生素对污染菌的抑制作用都有降低, 一方面是由于抗生素的消耗, 另一方面可能是由于真菌对抗生素产生了耐药性(李筱芳等 2004), 致使在实验后期污染率升高。

在本实验中, 2 个葡萄品种外植体的污染率有较大的差异, Vidal Blanc 的外植体污染率低于 Reliance 的外植体污染率, 可能与外植体取材时间有关。在获取外植体时, 新梢已经较老, 特别是 Reliance 的新梢停长更早, 相比较而言较老的新梢所携带的污染菌的数量较大, 在同样处理条件下较难清洗干净, 可能是造成这种实验结果的原因。

表 3 抗生素对 Reliance 组培中真菌的抑制作用

抗生素 及浓度	真菌污染率/%				接种数 (个)
	接种后 7 d	接种后 14 d	接种后 21 d	接种后 28 d	
青霉素 20 mg/L	15.9	29.5	29.5	29.5	44
青霉素 40 mg/L	22.2	25	25	25	36
四环素 20 mg/L	15.9	19.4	21.6	21.6	44
四环素 40 mg/L	11.1	36.4	36.4	36.4	36
CK	25	25	35.4	35.4	48

表 4 抗生素对 Vidal Bibnc 组培中真菌的抑制作用

抗生素 及浓度	真菌污染率/%				接种数 (个)
	接种后 7 d	接种后 14 d	接种后 21 d	接种后 28 d	
青霉素 20mg/L	2.5	5	5	5	40
青霉素 40 mg/L	3.3	3.3	3.3	6.7	30
四环素 20 mg/L	0	2	2	2.2	50
四环素 40 mg/L	2.4	27.3	7.4	7.4	41
CK	0	15	20	20	40

2.3 两种抗生素对葡萄生长的影响

抗生素的应用会对植物生长产生影响(张智俊等, 2002, 徐秉良等, 2004), 实验对两个葡萄品种的萌芽率进行了统计, 以了解所用抗生素浓度是否对外植体的生长产生影响, 以及是否由于抗生素的存在造成外植体生长的异常。

表 5 抗生素对 Reliance 组培中茎段萌芽率的影响

抗生素 及浓度	单芽茎段萌芽率/%				接种数 (个)
	接种后 7 d	接种后 14 d	接种后 21 d	接种后 28 d	
青霉素 20mg/L	0	2.8	4.5	4.5	44
青霉素 40mg/L	0	2.8	11.1	11.1	36
四环素 20mg/L	0	0	6.6	6.8	44
四环素 40mg/L	0	0	2.8	2.8	36
CK	0	0	2.1	6.25	48

表 6 抗生素对 Vidal Blanc 组培中茎段萌芽率的影响

抗生素 及浓度	单芽茎段萌芽率/%				接种数 (个)
	接种后 7 d	接种后 14 d	接种后 21 d	接种后 28 d	
青霉素 20mg/L	0	7.5	22.5	25	40
青霉素 40mg/L	0	10	20	20	30
四环素 20 mg/L	0	0	14	16	50
四环素 40mg/L	0	14.6	26.8	26.8	41
CK	0	0	12.5	12.5	40

根据实验结果, 两种抗生素对葡萄的生长没有产生明显的毒害, 未观察到黄化、死亡等不良现象。在添加了抗生素的培养基中葡萄的萌芽速率反而高于不加抗生素的对照。但两个葡萄品种对两种抗生素的反应有所区别。Reliance 在添加 40 mg/L(毫克/升)青霉素的培养基上萌芽率最高, Vidal Blanc 在添加 40 mg/L(毫克/升)四环素的培养基上萌芽率较高。

总体上, Reliance 的萌芽率明显比 Vidal Blanc 的低, 造成这个现象的主要因素可能是由于在 8 月底的时候 Reliance 的枝条已经不再大量产生新梢, 而 Vidal Blanc 的新梢仍保持较显著的生长, 在实验取材上产生了差异, 结果造成两种葡萄品种在萌芽率上出现了较大的不同。

3 讨论

葡萄尤其是鲜食葡萄的品种更新速度很快, 新的品种层出不穷, 其中很多品种都是国外培育的, 初次引进的数量很少, 如何通过组培和快繁, 尽快繁殖一定数量的群体, 对这些

品种的本地适应性进行观察, 是成功引种的关键。

在组培过程中为了提高外植体的成活率、降低污染率, 需要对外植体材料进行仔细的选择。然而, 对一些珍贵而稀少的植物资源, 对材料的选择余地较小。高浓度的消毒剂对外植体消毒虽然可以杀死污染菌, 减少组培中的污染, 但植物材料也会受到很大的损伤, 甚至被杀死, 而相对较为柔和的外植体消毒, 常常由于发生细菌和真菌的污染, 使组培实验失败。通过在培养基中添加合适的抗生素, 可以抑制污染菌的生长, 提高组培材料的成活率, 这种实践已经较多地应用于珍贵、稀少植物材料的组培。

抗生素在较高的浓度下会对植物的生长产生不利的影响, 过高浓度的抗生素同样会杀死植物, 这也是植物转基因过程中进行抗性选择的基础。不同的植物对不同的抗生素具有不同的耐受浓度, 研究两种常见抗生素对葡萄组培中污染菌的抑制, 以及是否会对葡萄外植体的萌芽与生长产生影响, 有助于提高葡萄珍稀品种的组培效率。

实验结果表明, 将四环素和青霉素以 20 mg/L 或 40 mg/L(毫克/升)的浓度加入葡萄培养基中, 对抑制污染菌的生长有一定的作用, 同时对葡萄的萌芽和生长没有不利影响。选择较低的抗生素浓度进行实验是因为高浓度抗生素会对植物产生伤害(郑启发等 1998, 由翠荣等 2004)。

有研究表明青霉素可以促进外植体芽的生长(郑秀珍等 1999, 朱建华等 1995), 在本实验中也观察到同样的现象。有研究报道四环素的抑菌作用时间较短(D. L. DAVIES 等 1994), 实验中可以观察到两种抗生素在实验后期对污染菌的抑制作用都出现显著降低。为了解决这个问题, 在实际生产中可以在接种 7 d~15 d(天)后将没有污染的外植体接入新的添加抗生素的培养基上。根据本实验结果可以初步认为, 四环素的抑菌效果比青霉素更好。由于这两个葡萄品种刚刚从国外引进, 取材数量受到限制, 样本的总数还显得较小, 最优化的培养基抗生素使用浓度和抗生素在植物组织培养过程中的代谢与变化还有待于进一步的研究。

参考文献:

[ 1 ] 朱广廉. 植物组织培养中的外植体灭菌[ J ]. 植物生理学通讯, 1996, 32(6), 444~449.

[ 2 ] 李群, 杜文平, 王米力等. 植物组织培养中控制污染技术研究[ J ]. 四川林业科技, 1999, 20(4), 22~26.

[ 3 ] 由翠荣, 曲复宁, 龚雪琴, 等. 迷你玫瑰组织培养中细菌污染的防止[ J ]. 植物生理学通讯, 2004, 40(1), 45~47.

[ 4 ] 王利民, 周毅, 陈龙友, 等. 植物组织培养中消毒剂的运用. 贵州师范大学学报(自然科学版), 2002, 20(1)15~17.

[ 5 ] 郑启发, 陈大成, 胡桂兵, 等. 抗生素对沙田柚外植体分化及生长的影响[ J ]. 广东农业科学, 1998, 1, 22~24.

[ 6 ] 李筱芳, 吕昭萍. 真菌耐药机制研究现状, 国外医学皮肤性病学分册, 2004, 30. (1): 54~56.

[ 7 ] 张智俊, 罗淑萍, 廖康. 抗生素对甜瓜植株再生的影响[ J ]. 中国西瓜甜瓜, 2002(1)6~7.

[ 8 ] 徐秉良, 师桂英, 薛应钰, 等. 2 种抗生素对甜瓜子叶外植体不定芽分化的影响[ J ]. 中国西瓜甜瓜, 2004(2)5~7.

[ 9 ] 朱建华, 富新华. 青霉素对几种作物种子发芽率和幼苗生长的影响(简报)[ J ]. 植物生理学通讯, 1995, 31(5), 344~346.

[ 10 ] 郑秀珍. 抗菌素对猕猴桃组织培养的影响[ J ]. 湖北农业科学, 1999, 3, 35~36.

[ 11 ] D. L. DAVIES and M. FCLARK. Maintenance of mycoplasma-like organisms occurring in Pynus species by micropropagation and their elimination by tetracycline therapy.