

蜈蚣兰初代培养中内生真菌的抑制作用

沈洁,袁堂茹,赵兴兰,吉星星,邵世光,罗丽,张雷

(连云港师范高等专科学校 生命科学系,江苏 连云港 222000)

摘要:为了建立蜈蚣兰无菌繁殖体系,以0.2%的山梨酸钾和0.2%的苯甲酸钠为供试药剂,研究了两种不同种类的食品防腐剂在蜈蚣兰初代培养中对内生真菌的抑制作用。结果表明:两种食品防腐剂均对蜈蚣兰内生真菌的生长有抑制作用,且山梨酸钾的抑菌作用更为显著。同时,两种防腐剂的加入对外植体侧芽萌发均有一定程度的抑制,且苯甲酸钠的抑制作用较为突出。另外,0.8%的次氯酸钠溶液对蜈蚣兰内生真菌的生长也有一定的抑制作用。

关键词:蜈蚣兰;防腐剂;山梨酸钾;苯甲酸钠;次氯酸钠;内生真菌;抑制作用

中图分类号:S682.31

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2014)02-0016-02

蜈蚣兰(*Cleisostoma scolopendrifolium* Garay)是一种附生兰,属兰科隔距兰属,为国家重点保护野生植物名录中的Ⅱ级保护植物。因其分布区域较窄、生境独特、种群较小,相关研究开展得也较少^[1]。药用植物研究课题组利用组培手段对江苏云台山蜈蚣兰居群进行快繁,在初代培养中从未发生细菌污染,但接种3 d在蜈蚣兰茎段(外植体)上切口处出现白色真菌菌丝(见图1),且在培养50 d后仍不断有相同菌丝滋生。故判定为蜈蚣兰内生真菌,菌种经分离、纯化,已初步鉴定。因蜈蚣兰内生菌丝蔓延迅速,严重影响无菌繁殖体系的建立,现对内生真菌的抑制作用进行研究,并取得了一定效果。



图1 接种3 d外植体切口处菌丝
Fig.1 Mycelium at explant gash after inoculation for 3 days

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用的蜈蚣兰于2012年9月采自江苏省云台山,采集和鉴定均由连云港师范高等专科学校邵世光教授完成。以2~3 cm长的蜈蚣兰茎段为外植体,无菌消毒后接种。供试药剂为苯甲酸钠、山梨酸钾(国药集团化学试剂有限公司生产)及次氯酸钠。

1.2 方法

1.2.1 培养条件 试验所用培养基为MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+3%蔗糖,pH 5.8。培养温度(25±2)℃,每日光照12 h,光照强度2 500 lx。

1.2.2 防腐剂抑菌试验 试验设3个处理,分别添加0.2%苯甲酸钠、0.2%山梨酸钾,以不添加防腐剂的培养基为对照。每瓶培养基只接种1个蜈蚣兰外植体,每个处理24瓶,每个试验重复3次。每隔3 d观察,记录外植体生长情况,21 d后计算染菌率,50 d后统计外植体侧芽萌发数。

1.2.3 次氯酸钠消毒试验 在超净工作台上将染菌瓶瓶盖轻轻打开,用无菌滴管视菌落大小向外植体感染处及培养基中滴加0.8%次氯酸钠(以覆盖菌落为准),盖上瓶盖在原瓶中暗处理1 d,用无菌水冲洗组培苗(至少3次,每次2 min)转入新的培养基中继续培养,14 d后观察并记录再次污染率。

1.2.4 数据分析方法 染菌率(%)=污染的苗数/总苗数×100;侧芽萌发率(%)=未染菌萌发数/未染菌总数×100;再次污染率(%)=再次染菌数/处理总数×100(再次污染率以14 d计,重复污染处理以新染菌数、处理数分别记录在再次染菌数和处理总数中)。

收稿日期:2013-09-11

基金项目:2012年江苏省高等学校大学生实践创新训练计划资助项目(2012JSSPITP4290)

第一作者简介:沈洁(1969-),女,江苏省靖江市人,硕士,教授,从事植物细胞结构与分子生物学的教学与研究。E-mail:shenjie1969@126.com。

2 结果与分析

2.1 防腐剂抑菌效果

由表 1 可知,随着培养时间的延长,各处理染菌数均呈上升趋势。其中不含防腐剂的对照处理,接种第 12 天外植体的染菌率达到 50.0%,第 21 天

的染菌率高达 68.1%。相比之下,接种于添加山梨酸钾或苯甲酸钠培养基中的外植体染菌率明显降低,第 21 天的染菌率分别为 37.5%、55.6%。表明防腐剂对蜈蚣兰内生真菌的生长具有一定的抑制作用,且山梨酸钾的抑制效果更为显著。

表 1 不同防腐剂抑菌效果

Table 1 Inhibitory effect of different preservatives

防腐剂 Preservatives	处理总数 Number of treatments	染菌数 Number of infections	外植体染菌率/% Infection rate of explant						
			3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d	21 d
山梨酸钾 Potassium sorbate	72	27	2.7	6.8	17.6	24.7	29.9	33.8	37.5
苯甲酸钠 Sodium benzoate	72	40	3.9	10.4	22.1	28.4	44.6	51.4	55.6
对照 CK	72	49	5.6	18.1	36.1	50.0	58.3	62.5	68.1

由表 2 可知,以外植体接种 50 d 计,不含防腐剂的对照处理中,侧芽萌发率为 39.1%,而在含有山梨酸钾或苯甲酸钠防腐剂的培养基中的外

植体的侧芽萌发率只有 34.3%和 13.0%。显然两种防腐剂均对侧芽萌发具有抑制作用。

表 2 不同防腐剂对侧芽萌发的影响

Table 2 Effects of different preservatives on germination of axillary buds

防腐剂 Preservatives	未染菌数 Normal number	侧芽萌发数 Germination number of axillary buds	侧芽萌发率/% Germination rate of axillary bud
苯甲酸钠 Sodium benzoate	23	3	13.0
对照 CK	23	9	39.1

2.2 0.8%次氯酸钠消毒效果

用 0.8%次氯酸钠处理蜈蚣兰组培试验中被内生真菌污染的外植体,处理总数为 224 瓶,其中再次污染数为 61 瓶(以 14 d 计),再次染菌率为 27.23%。

从次氯酸钠的消毒试验看出,用 0.8%次氯酸钠对蜈蚣兰组培苗进行再次消毒处理可有效抑制内生菌的生长,但也不能完全杀死内生菌。而且再次消毒对外植体生长影响较大,处理后培养 7~14 d 后外植体开始表现出叶片泛黄、苗弱的现象,40%~60%的再处理苗在培养一段时间后枯黄死亡。但这一措施在外植体数量稀缺的情况下还是十分奏效的。

3 结论与讨论

关于植物组织培养过程中内生菌的控制已有很多报道^[2-5],其中在培养基中添加适宜防腐剂是有效抑制外植体内生菌生长的方法之一^[6]。试验结果表明,山梨酸钾对蜈蚣兰内生真菌生长的抑制效果更为明显,且这两种食品防腐剂能耐高压,使用方便,有利于及早建立无菌繁殖体系。防腐剂对内生菌有抑制作用,但不能杀死内生菌,在蜈蚣兰的组织培养过程中仍不断有内生菌生长,并且随着培养时间的延长,抑制作用明显降低。试验结果也表明,防腐剂对侧芽萌发的抑制影响较为严重,且苯甲酸钠抑制作用更为突出。通过调整防腐剂的浓度是否会增强抑菌效果、减小对苗生长的影响,还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 张雷,马波,邵世光.蜈蚣兰药用价值及生态学特性研究[J].安徽农业科学,2011,39(26):15960-15961.
- [2] 周俊辉,周厚高,刘花全.植物组织培养中的内生细菌污染问题[J].广西植物,2003,23(1):41-47.
- [3] 王亦菲,陆瑞菊,周润梅,等.彩色海芋组织培养过程中内生菌的抑制[J].上海农业学报,2001,17(2):82-83.
- [4] 李贵,李箐,黎有有,等.蛇足石杉外植体表面消毒及内生菌消除方法[J].吉首大学学报:自然科学版,2009,30(4):100-103.
- [5] 秦宇,熊兴耀,张家银.组织培养中不同抗生素对南方红豆杉内生菌抑制研究[J].湖南农业科学,2012(9):13-15.
- [6] 周蒋陈,邵元健,吴雯雯,等.防腐剂对水生鸢尾组培苗内生菌抑制作用的研究[J].江苏农业科学,2009(5):49-50.