

## 抗菌肽在棉花、烟草组织培养中的应用初探

贾云超<sup>1,2</sup>, 白玮<sup>1</sup>, 张锐<sup>1</sup>, 罗淑萍<sup>2</sup>, 郭三堆<sup>1</sup>

(1. 中国农业科学院生物技术研究所, 国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京 100081;  
2. 新疆农业大学农学院, 乌鲁木齐 830052)

**摘要:**经 0.1% 氯化汞处理 5 min 后, 用无菌水冲洗 3~5 次, 再用 0.12 mg/mL 抗菌肽溶液浸泡棉花去壳种子能有效地防止棉花组织培养中常见的真菌污染, 且对棉花根系的发育没有影响, 同时在愈伤诱导阶段使用抗菌肽对棉花愈伤没有影响。在烟草组织培养中使用抗菌肽对愈伤及芽和芽生根没有影响, 单独使用抗菌肽对细菌的杀菌效果没有头孢菌素好, 但是抗菌肽与头孢菌素配合使用能有效地防止细菌污染。经初步研究抗菌肽可以应用于棉花、烟草组织培养, 并对组织培养中的污染有良好的防治效果。

**关键词:**组织培养; 污染; 抗菌肽

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-0864(2008)03-0097-05

## Preliminary Exploration of the Application of Antibacterial Peptide in Cotton and Tobacco Tissue Culture

JIA Yun-chao<sup>1,2</sup>, BAI Wei<sup>1</sup>, ZHANG Rui<sup>1</sup>, LUO Shu-ping<sup>2</sup>, GUO San-dui<sup>1</sup>

(1. Biotechnology Research Institute, National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; 2. College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

**Abstract:** The treatment of peeled cotton seeds by 0.1% mercuric chloride for 5 min, washed with sterile water 3~5 times, and then immersed in 0.12 mg/mL antibacterial peptide liquid, was effective in preventing most common fungal contamination of the cotton tissue culture, and did not effect the development of cotton roots. The using of antibacterial peptide in callus induction stage showed no impact on cotton callus. The using of antibacterial peptide in the tobacco tissue culture showed no impact on callus, shoots and shoots regeneration. Individual treatment by antibacterial peptide for the bacteria, the bactericidal effect was less than that by cephalosprin, but the joint treatment of antibacterial peptide and cephalosprin could prevent bacterial contamination effectively. In this preliminary study antibacterial peptide could be applied in cotton and tobacco tissue culture present good performances in fungal and bacterium contamination control.

**Key words:** tissue culture; contamination; antibacterial peptide

植物组织培养经过近一个世纪的发展, 在科学研究和生产上均得到广泛应用, 但在技术上还存在不少问题<sup>[1]</sup>。污染是植物组织培养过程中最常见的现象, 也是组织培养过程中一大难题<sup>[2]</sup>。在组织培养过程中, 污染主要源于细菌和真菌。植物组培污染的来源, 可归结为两方面: 一是操作污染和环境污染; 二是外植体自身带菌污染<sup>[3]</sup>。目前研究主要集中在防治细菌污染方面, 对真菌污染研究较少, 而且真菌污染有着感染面积大、难以控制等特点, 一旦暴发会导致全部材料

报废, 对一些珍贵的材料来说是很严重的威胁<sup>[4]</sup>。因而, 在培养基中添加杀菌剂已成为防治污染的一种重要方法。

抗菌肽作为一种高度热稳定性抗菌物质, 具有广谱抗菌性。在植物组织培养中添加抗菌肽来控制污染的研究尚未见报道。本试验首先通过抗菌肽与常规消毒方法相结合对组培原材料进行消毒, 从源头控制污染, 然后将抗菌肽与抗生素相结合对组织培养的中间材料进行消毒, 从而防止过程污染, 同时观察抗菌肽对组培材料生长和发

收稿日期: 2008-02-25; 修回日期: 2008-05-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771371)资助。

作者简介: 贾云超, 硕士研究生, 主要从事植物基因工程研究。Tel: 010-62133690; E-mail: jyuch928@126.com。通讯作者: 郭三堆, 研究员, 博士生导师, 研究方向为植物基因工程。Tel: 010-62136406; E-mail: gsdui@126.com

育是否有影响,以期找到有效降低组织培养中真菌、细菌污染的新方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 植物材料

棉花珂字 312 由山西运城棉花所提供;棉花 Y18 和烟草 NC89 由中国农业科学院生物技术研究所提供。

### 1.2 试剂

0.6 mg/mL 抗菌肽原液,经 121℃ 30 min 高温灭菌处理,由本实验室制备;0.1% 氯化汞,15% 双氧水,Gelrite 均购于 Sigma 公司;琼脂购于鼎国生物技术有限公司;其他试剂购于上海生工生物工程技术有限公司。

### 1.3 培养基

MS1(MS 大量元素)培养基、MS2(MS 微量元素)培养基、MS3(MS 铁盐)培养基和 B5 培养基。MSB<sup>[5]</sup> 为上述培养基的维生素成分。

烟草愈伤诱导培养基:MSB + 6 - BA (2 mg/L) + IAA(5 mg/L) + 琼脂(5 g/L) + 蔗糖(30 g/L),pH 6.0。

烟草生根培养基:MSB + IAA(1 mg/L) + 琼脂(5 g/L) + 蔗糖(25 g/L),pH 6.0。

棉花无菌苗培养基:MS1 + 琼脂(4 g/L),pH 6.0。

棉花愈伤诱导培养基:MSB + IBA(0.8 mg/L) + Kt(0.4 mg/L) + 葡萄糖(25 g/L) + Gelrite(2.2 g/L),pH 6.0。

### 1.4 不同方法处理棉花种子制备无菌苗

① 用清水浸泡去壳棉花种子 30 min,作为对照;② 0.1% 氯化汞浸泡去壳棉花种子 5 min,无菌水冲洗 3~5 次<sup>[6~8]</sup>;③ 15% 双氧水浸泡 120 min,无菌水冲洗 3~5 次,然后再用无菌水浸泡 2 d 至种子露白后去壳<sup>[9]</sup>;④ 0.1% 氯化汞浸泡带壳棉花种子 30 min,无菌水冲洗 3~5 次,再用无菌水浸泡 2 d 至种子露白后去壳;⑤ 0.1% 氯化汞浸泡去壳种子 5 min,无菌水冲洗 3~5 次,再用抗菌肽浸泡 30 min;⑥ 抗菌肽浸泡棉花去壳种子 30 min。经过上述处理后分别接种于棉花无菌苗培养基上,6 d 后观察结果并记录。

### 1.5 抗菌肽最佳抑菌浓度的确定

0.1% 氯化汞浸泡棉花去壳种子 5 min,无菌水冲洗 3~5 次,然后用抗菌肽(抗菌肽设 3 个浓

度梯度,分别为:0.3 mg/mL、0.12 mg/mL 和 0.06 mg/mL)浸泡棉花去壳种子,分别种于棉花无菌苗培养基上,6 d 后观察棉花根系生长及抗菌肽的抑菌情况。

### 1.6 抗菌肽对棉花愈伤组织的影响

将污染棉花苗和没有污染的棉花苗分成两组,污染组切段后分别用无菌水、抗菌肽原液、抗菌肽结合头孢菌素(500 mg/L)浸泡棉花下胚轴切段;无污染组直接切段不再处理。然后分别将上述两组切段转接棉花愈伤诱导培养基上,20 d 转接 1 次共转接 3 次,观察结果并记录。

### 1.7 不同抑菌剂对烟草污染的防治效果及对愈伤组织的影响

用已经被细菌污染的烟草叶盘为材料,用无菌水、抗菌肽原液、头孢菌素(500 mg/L)、抗菌肽原液结合头孢菌素(500 mg/L)分别浸泡已污染的叶盘,再用烟草愈伤诱导培养基转接 3 次后观察对细菌的抑制效果和对愈伤组织的影响。

### 1.8 抗菌肽对烟草再生芽生根的影响

抗菌肽浸泡烟草再生芽,然后转接于含有抗菌肽的烟草生根培养基上,观察生根情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同方法处理棉花种子制备无菌苗

应用 6 种方法处理棉花种子,制备无菌苗,不同方法处理下,出苗率与污染率均有所不同(表 1)。

只用无菌水和抗菌肽浸泡的种子 100% 的染菌,且由于染菌影响了苗的正常生长,造成材料的严重浪费,说明种子都带菌,需要有适当的消毒方法才能获得无菌苗;虽然 15% 双氧水消毒对种子没有毒害且有利于种子的萌发和后期的生长,但是由于其易分解和挥发,使消毒不会很彻底,另外操作过程复杂易污染,所以染菌率较高,也会造成材料浪费;0.1% 氯化汞浸泡的带壳种子有 6.9% 出现染菌;先用 0.1% 氯化汞消毒 5 min 后再用抗菌肽原液浸泡去壳棉花种子则没有出现染菌现象,但是用氯化汞消毒的无菌苗叶子表面都有褐斑,说明氯化汞对棉花有一定的伤害作用,所以消毒时间不能过长。由以上试验结果可知,在组织培养中氯化汞与抗菌肽结合使用消毒效果最好,这可能是因为抗菌肽是生物大分子不易穿过细胞壁,而氯化汞的浸透能力要强于抗菌肽。

表 1 不同方法制备无菌苗

Table 1 Different preparation for aseptic seedling.

方法 Methods	种子数 Seeds	出苗数 Seedlings	污染数 Contaminations	出苗率(%) Seedlings rates(%)	污染率(%) Contamination rates(%)	生长状况 Growth
①	30	29	30	96.7%	100.0	严重污染 Serious contaminated
②	59	53	1	89.8%	1.7	子叶表面有褐斑 Speckles on cotyledon
③	35	33	26	94.3%	74.3	没有污染,生长健壮 No contamination, vigorous growth
④	29	24	2	82.8%	6.9	子叶表面有褐斑 Speckles on cotyledon
⑤	27	25	0	92.6%	0.0	子叶表面有少量褐斑 A few speckles on cotyledon
⑥	31	31	31	100.0%	100.0	根部或子叶有污染 Root or cotyledons contaminated

## 2.2 最佳抑菌浓度的确定及不同浓度抗菌肽对棉花根系的影响

经 0.1% 氯化汞消毒后,使用不同浓度的抗菌肽的抑菌效果见表 2。不经抗菌肽浸泡的有 13% 的污染率,将抗菌肽稀释到 0.12 mg/mL 后没有出现污染,当稀释到 0.06 mg/mL 时有 10% 的污染,说明抗菌肽稀释到 0.12 mg/mL 后依然有很强的杀菌效果,可以确定为本实验的最佳抑菌浓度。

稀释的各种浓度抗菌肽浸泡后棉花根系生长仍正常(见图 1),说明抗菌肽不影响棉花的生长。

## 2.3 抗菌肽对棉花愈伤组织的影响

抗菌肽对棉花愈伤组织的影响结果见表 3。仅用无菌水处理的污染组 100% 染菌,切段也由于染菌严重而死亡;仅用抗菌肽处理虽然污染率下降至 72.2%,且真菌污染也得到了有效抑制,但对细菌的抑制效果稍差,切段生长正常;抗菌肽结合头孢菌素使用收到良好的效果,染菌率大幅度下降,仅为 13.3%,切段生长正常;经抗菌肽处理过的种子长出的无菌苗切段不再使用抗菌肽处理,结果也没有出现污染(见图 2)。上述结果说明棉花组织培养中的污染主要来自于种子自身所带的菌,如果从源头上控制好就能较好地避免污染,同时也说明抗菌肽有较强的抑制真菌的作用,而对细菌的抑制作用相对较弱,抗菌肽与头孢菌素配合使用能够有效地防治棉花组织培养中的污染问题。

## 2.4 不同抑菌剂对烟草污染的防治效果比较及对愈伤组织的影响

在烟草组织培养中污染最多的是细菌,选择

表 2 不同浓度抗菌肽的抑菌效果

Table 2 The result of different concentrations of antibacterial peptide.

抗菌肽浓度 (mg/mL) Concentrations of antibacterial peptide (mg/mL)	种子数 Seeds	污染数 Contaminations	污染率% Contamination rates%
0	23	3	13.0
0.30	21	0	0.0
0.12	25	0	0.0
0.06	20	2	10.0

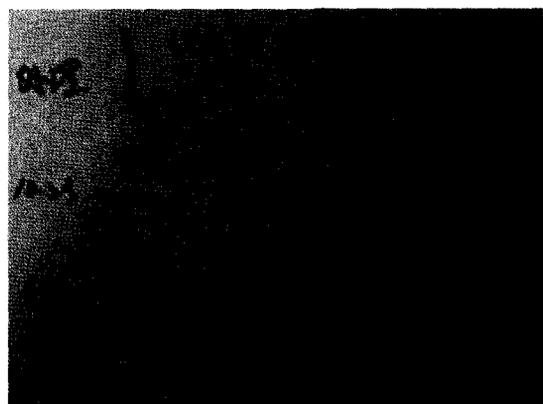


图 1 抗菌肽对根系影响情况

Fig. 1 Antibacterial peptide effect on roots.

注:上行为 0.3 mg/mL 抗菌肽处理组;下行为对照组

Note: Top row is 0.3 mg/mL antibacterial peptide treatment group; Bottom row is control group.

不同抑菌剂进行了作用效果的比较,结果见图 3。抗菌肽抑制细菌的效果明显没有头孢菌素效果明显,经过几次转接后,抗菌肽处理组仍然有细菌污染,但比对照效果好;头孢菌素处理效果虽然比抗

表 3 抗菌肽对棉花愈伤组织的影响  
Table 3 The effect of antibacterial peptide on cotton callus.

处理 Treatments	接种段数 segments	污染数 Contaminations	污染率(%) Contamination rates(%)	愈伤组织生长情况 Development of callus
对照(无菌水) Control (sterile water)	19	19	100.0	真菌、细菌污染严重,切段死亡(图 2a) Serious fungal,bacterial contaminated, segments die(Fig. 2a)
抗菌肽 Antibacterial peptide	18	13	72.2	有细菌污染,没污染切段正常(图 2b) Some segments have been contaminated by bacterium normal growth of segmentswithout contamination(Fig. 2b)
抗菌肽 + 头孢 Antibacterial protein + cephalosporin	30	4	13.3	轻微污染,切段生长正常(图 2c) Slight contaminated, normal growth of segments(Fig. 2c)
无菌切段 Aseptic segments	28	0	0.0	有愈伤长出(图 2d) Callus developed(Fig. 2d)

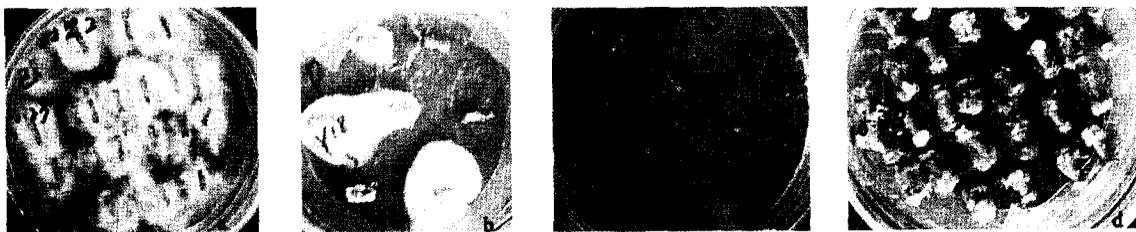


图 2 抗菌肽对棉花愈伤组织的影响

Fig. 2 The effect of antibacterial peptide on cotton callus.

a: 对照(无菌水); b: 抗菌肽; c: 抗菌肽 + 头孢菌素; d: 愈伤组织

a: Control(sterile water); b: Antibacterial peptide; c: Antibacterial protein and cephalosporin; d: Callus of aseptic segments

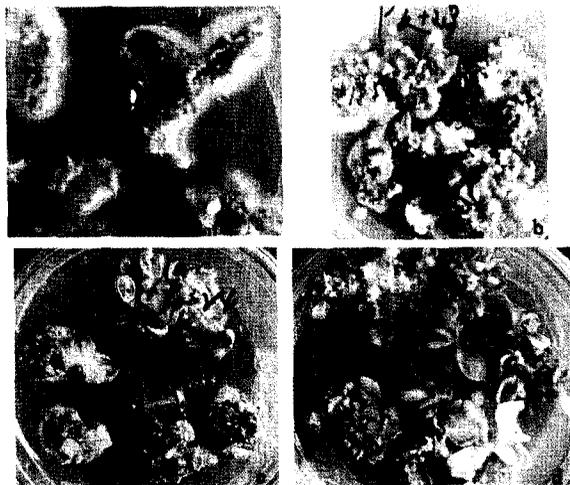


图 3 抗菌肽对烟草愈伤组织的影响

Fig. 3 The impact of antibacterial peptide on tobacco callus.

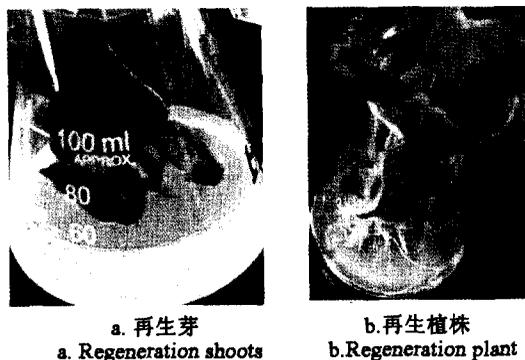
a: 对照(无菌水); b: 抗菌肽; c: 抗菌肽 + 头孢菌素; d: 愈伤组织  
a: Control(sterile water); b: Antibacterial peptide; c: Antibacterial protein and cephalosporin; d: Callus of aseptic segments

菌肽的效果好,但依然有细菌污染存在,而抗菌肽加头孢菌素组合处理组明显控制了细菌污染,同时又对烟草愈伤组织没有影响,经过转接后可长

出再生芽。对烟草的试验证实抗菌肽对细菌的抑制效果没有头孢菌素好,抗菌肽与头孢菌素配合使用能够有效地控制烟草组织培养中细菌的污染。

2.5 抗菌肽对烟草再生芽生根的影响

再生芽经抗菌肽浸泡后,再转接到含有抗菌肽的培养基上能够生根,并生长成小植株(如图 4),说明抗菌肽对烟草再生芽生根没有影响。



a. 再生芽  
a. Regeneration shoots  
b. 再生植株  
b. Regeneration plant

图 4 抗菌肽对烟草再生芽生根的影响

Fig. 4 The effect of antibacterial peptide on tobacco rooting.

### 3 讨论

无菌是植物组织培养成功的前提。常用的外植体表面灭菌剂有次氯酸钙、次氯酸钠、过氧化氢(双氧水)、溴水、硝酸银、氯化汞(升汞),以及抗生素、酒精和异丙醇等。这些灭菌剂用于组织培养消毒灭菌时,容易造成环境污染,且易影响外植体的活力,导致外植体褐变死亡,还有冲洗次数过多、操作复杂等缺点。利用抗生素类杀菌剂防治植物组织培养污染,可大大降低污染率<sup>[10]</sup>,但目前只局限于寻找抗生素的有效组合。由于抗生素各有其抑菌谱,需要加以选择试用;抗生素对组培苗的生长、分化和生根也造成一定的影响,对植物组织的生长有抑制作用,因此抗生素消除植物组培污染的方法只是一个短暂的解决方案,如果长期使用抗生素消除污染,易产生抗性菌,造成更严重的环境污染;同时抗生素一般不稳定,只能用过滤灭菌法灭菌,把抗生素应用于组培上,必然会增加工作量,增加成本,从而降低经济效益。因此有必要寻找安全有效,广谱抗菌、耐高温高压的抑菌剂<sup>[11]</sup>。

试验表明抗菌肽具有高度的热稳定性和广谱抗性,抗菌肽在防治棉花组织培养中的真菌污染方面具有良好的效果,尤其是与氯化汞结合使用能大幅度地降低棉花组培中的真菌污染率,节约大量的人力、物力、财力,同时抗菌肽对棉花及棉花愈伤组织的正常生长没有副作用;在烟草的组培中,抗菌肽虽然对细菌的消毒效果没有对真菌的效果好,但是与低浓度抗生素联合使用也能有

效地降低污染率,同时抗菌肽对烟草的愈伤组织同样没有副作用,烟草的再生芽在含有抗菌肽的培养基上可以再生。因此在组织培养中使用抗菌肽能有效地控制真菌、细菌带来的污染,减少抗生素的使用,降低环境污染。目前对抗菌肽的抑菌作用机理还不清楚,有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] 周俊辉. 植物快速繁殖技术中存在的问题与对策[J]. 仲恺农业技术学院学报, 1999, 12 (4): 64 - 70.
- [2] 罗士韦. 植物组织培养在农业上的应用[J]. 植物生理学通讯, 1997, 1 : 1 - 6.
- [3] 邓小梅, 奚如春, 符树根, 等. 植物组织培养过程中污染现象的研究进展[J]. 江西林业科技, 2004, 6: 33 - 36.
- [4] 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.
- [5] 迟吉娜. 陆地棉体细胞胚胎发生和植株再生体系优化[D]. 河北农业大学, 硕士学位论文, 2004, 11 - 12.
- [6] 李燕娥, 吴 霞, 张惠君, 等. 棉花无茵苗最佳生长条件的探讨[J]. 棉花学报, 1979, 9(4): 222 - 223.
- [7] 陈妹幼, 张献龙, 聂以春, 等. 陆地棉体细胞再生植株技术的改进研究[J]. 棉花学报, 2002, 14 (6): 344 - 347.
- [8] 刘传亮, 武芝霞, 张朝军, 等. 农杆菌介导棉花大规模高效转化体系的研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24 (5): 768 - 775.
- [9] 于 娅, 刘传亮, 李付广, 等. 陆地棉中棉所 24 胚性愈伤组织的诱导及植株再生[J]. 西北植物学报, 2004, 24 (2): 120 - 124.
- [10] Teng W L, Tiffany S, Teng M C. Explant preparation affects culture initiation and regeneration of Panax ginseng and quinquefolius[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2001, 68: 233 - 239.
- [11] 周俊辉, 李宏彬, 杨耀强, 等. 植物组织培养中污染的鉴定与防止初步研究[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(2): 53 - 55.