

多菌灵在黄精根茎无菌培养中的应用

徐忠传^{1,2} 何俊蓉³ 周静亚¹ 徐晖² 徐凯²

(¹常熟理工学院生物与食品工程系, 常熟 215500; ²浙江科技学院生物与化学工程系, 杭州 310023; ³四川省农科院生物技术核技术研究所, 成都 610066)

摘要: 本研究中比较了几种杀菌剂对黄精根茎的灭菌效果。结果表明, 采用乙醇、饱和漂白粉、 HgCl_2 等杀菌剂对黄精根茎杀菌时, 微生物的污染率很高; 先用 3% 多菌灵溶液对黄精根茎进行内吸杀菌处理 45h 以上, 然后再用 0.2% HgCl_2 进行灭菌 10min, 则黄精根茎的污染率可得到有效控制。多菌灵的处理效果与黄精根茎的大小、类型和年龄等因素有关。

关键词: 多菌灵 多花黄精 污染率 组织培养

Application of Carbendazim in Sterile Culture of *Polygonatum Cyrtonema* Hua RootsXu Zhongchuan^{1,2} He Junrong³ Zhou Jingya¹ Xu Hui² Xu Kai²

(¹Department of Biology Science and Food Engineering, Changshu college of Science and Technology, Changshu, Jiangsu 215500; ²Department of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023; ³Institute of Biological and Nuclear Technology, Sichuan Academy of Agricultural Science, Chengdu 610066)

Abstract: The effect of some kinds of bactericides have compared in this paper. The results showed that microbe pollution rate was very high, if *Polygonatum cyrtonema* Hua roots were dealt with ethanol, saturated bleaching power or HgCl_2 . *Polygonatum cyrtonema* Hua roots pollution rate were controlled by 3% Carbendazim at least 45h and 0.2% HgCl_2 10min. The effect of Carbendazim on *Polygonatum cyrtonema* Hua roots has relate to the size, type and age of *Polygonatum cyrtonema* Hua.

Key words: Carbendazim *Polygonatum cyrtonema* Hua Pollution rate Tissue culture

黄精是百合科黄精属多年生宿根性草本植物, 其根茎是传统中药, 以多花黄精为贵。随着黄精药用价值和保健价值越来越被人们认识, 黄精原料的需求量也越来越大, 价格不断上扬, 致使山区农民对野生黄精无计划采集加剧, 导致其资源枯竭加速, 影响可持续开发利用。因此, 对保证黄精原料来源、实行产业化种植的呼声越来越高。近年来虽然有些地方开始人工种植黄精, 但由于生产上多采用分根繁殖, 其繁殖系数低, 质量不稳定, 故黄精种苗问题成了人工大面积种植的瓶颈。所以, 通过植物组织培养建立快速繁殖体系, 是规模化生产优质黄精种苗

的有效途径。

黄精植物组织培养的第一步就是要建立无菌体系。但由于黄精根茎长期生长在土壤中而受微生物污染十分严重, 用常规灭菌方法则污染率极高。因此, 寻求一种能有效杀灭侵入到黄精根茎组织内部微生物的方法就非常有必要。鉴于多菌灵用于金线莲、马铃薯组织培养以及银白杨、地被菊等组培污染苗作外植体的组织培养中抑菌效果明显^[1-3], 那么多菌灵用于建立黄精根茎无菌体系的效果如何, 为此进行了研究。用多菌灵复合处理方法建立黄精根茎无菌体系至今未有报道。

基金项目: 本课题为浙江省自然科学基金资助项目(基金编号: 302312)

作者简介: 徐忠传(1956-), 男, 教授, 博士(留日), 研究方向: 植物生物技术相关教学

1 材料和方法

1.1 材料来源

多花黄精 (*Polygonatum Cyrtonema* Hua.) 的根茎采集于浙江省天台山山区;多菌灵 (50% 可湿性粉剂) 和漂白粉从市场上购买;氯化汞以及配制培养基所需的常用化学试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

主要操作流程:黄精根茎预处理→灭菌处理→无菌水清洗→接种入瓶→培养→计算污染率

1.2.1 预处理 刷掉根茎缝隙处污泥土、用洗洁精溶液泡 10 min、用自来水慢冲 1 h,控水备用。

1.2.2 杀菌剂灭菌处理:每个处理为 6~8 瓶,重复 3 次,每瓶放 3~5 块黄精根茎,数据取平均值。乙醇处理:用 75% 乙醇浸泡黄精根茎不同时间;漂白粉处理:用漂白粉饱和上清液浸泡黄精根茎不同时间;氯化汞处理:用 0.1% 氯化汞 (含 0.05% 吐温 20) 浸泡黄精根茎不同时间;多菌灵处理 + 0.2% 氯化汞处理:3% 多菌灵溶液^[3] 倒入放有脱脂棉的瓷盘内,将根茎竖放在脱脂棉上进行吸药处理 12、24、36、48、72、96 h 后,放入超净工作台内用紫外线灭菌 60 min,再用 0.2% 氯化汞 (含 0.05% 吐温 20) 处理 10 min;对照 (CK) 为不加多菌灵处理。

1.2.3 接种入瓶 根茎灭菌后弃消毒液,用适量无

菌水清洗 5 次,沥干,切除暴露在消毒液中的根茎组织,接种于 $MS^{[4]} + 6 \sim BA 4 \text{ mg} \cdot L^{-1} + NAA 0.2 \text{ mg} \cdot L^{-1} + 0.8\%$ 琼脂 + 3% 蔗糖的培养基 ($pH = 5.8$) 上培养。培养条件为:温度 18~20℃ (夜)、22~24℃ (昼);光照 $12 \text{ h} \cdot L^{-1}$,光照度 1 500 lx。

2 结果与分析

2.1 不同消毒剂和处理时间对黄精根茎灭菌效果的影响

漂白粉、乙醇、氯化汞等几种常用消毒剂对月季 (*Rosa chinensis*)、香石竹 (*Dianthus caryophyllus*) 等消毒效果好、污染率较低^[5]。但在本实验中对黄精根茎消毒效果则不理想 (见表 1)。

表 1 结果表明,氯化汞灭菌效果好于乙醇或漂白粉,且与时间和浓度成正相关趋势;但即使延长其处理时间,或这几种消毒剂单一处理或复合处理,也都没有达到所要求。随着消毒剂浓度加大和处理时间延长,根茎污染率降低,但成活率的总趋势与此相反。尤其是氯化汞处理时间延长,导致了根茎成活率降低;同时,增大氯化汞浓度,虽然可以使根茎污染率有所下降,但根茎成活率也显著降低。故用氯化汞和乙醇等常规消毒剂难以使根茎污染率得到有效控制。

表 1 不同消毒剂对黄精根茎的灭菌效果

处理编号	75% 乙醇处理时间 (s)	漂白粉处理时间 (min)	0.1% 氯化汞处理时间 (min)	0.2% 氯化汞处理时间 (min)	接种 5d 污染率 (%)	30d 后根茎成活率 (%)
A01	0	0	0		100	0
A02	15	0	0		100	0
A03	30	0	0		100	0
A04	0	10	0		100	0
A05	0	15	0		100	0
A06	0	20	0		100	0
A07	0	0	3		100	0
A08	30	15	0		100	0
A09	30	15	5		97.2	100
A10	30	15	8		84.3	100
A11	30	15	10		76.7	88.9
A12	30	15	12		73.3	88.9
A13	30	15	15		70.0	83.3
A14	30	20	10		76.7	88.9
A15	30	20	15		70.0	80.6
A16	30	10		10	67.1	77.8
A17	30	10		15	62.3	72.2
A18	30	15		10	66.7	75.0
A19	30	15		15	61.1	68.2

2.2 多菌灵处理时间对黄精根茎灭菌效果的影响

多菌灵灭菌效果与处理时间有关(见图1)。单用0.2%氯化汞处理10 min不能有效杀灭根茎组织中的菌类,而多菌灵各处理的污染率都比对照低,尤其是多菌灵处理72 h,接种5 d的污染率降到了零,这说明多菌灵具有内吸灭菌作用。但接种10 d的污染率又重新升高,说明根茎组织中已被菌类侵染,残存菌类经过几天繁殖,其菌丝体已穿过根茎组织在培养基中大量增殖。随多菌灵处理时间延长,接种10 d的根茎污染率下降,说明多菌灵渗透到组织内部深处杀菌是个缓慢过程。

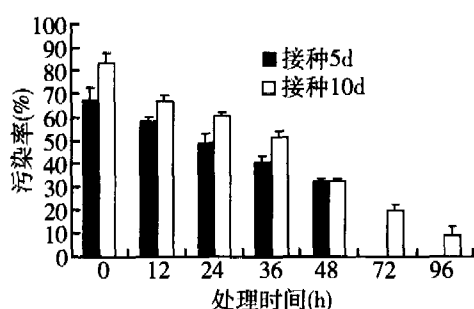


图1 多菌灵处理时间与污染率的关系

2.3 黄精根茎特性对多菌灵灭菌效果的影响

多菌灵处理效果与黄精根茎个体大小有关(表2)。根茎个体大则污染率相对偏高(表2中B3),而根茎个体小则污染率相对降低(表2中B1),但个体之间也有差异。这可能与根茎内部组织中含菌量有关系。多菌灵处理72 h后,接种5 d的污染率各组都为0;但是接种10 d的污染率各组分别上升为13.8%、19.7%和24.4%,这说明多菌灵灭菌的作用不仅有时间过程,而且有时间效应。另一方面,根茎大,则多菌灵渗入根茎组织内部深处可能缓慢,或其组织内部微生物数量相对较大,这些都可能影响多菌灵的杀菌效果。

根茎年龄也影响着多菌灵的处理效果(表2)。C1污染率为17.8%,C3污染率为26.7%。这表明当年新根茎受菌侵染的程度可能比1年生和2年生

表2 黄精根茎大小、年龄和部位对污染率的影响(多菌灵处理72h并培养10d的结果: $\bar{X} \pm S$)

根茎特性	污染率(%)
大小(根粗×根长)(cm)	B1(0.3~0.5×2.0~2.5) 13.8±0.8
	B2(0.6~0.8×2.0~2.5) 19.7±2.2
	B3(0.9~1.1×2.5~3.5) 24.4±2.4
年龄	C1(当年新根茎) 17.8±1.4
	C2(1年生根茎) 20.0±2.6
	C3(2年生根茎) 26.7±1.7
部位	D1(先端带芽无节) 20.5±0.6
	D2(中部带芽无节) 15.4±2.1
	D3(中部无芽无节) 12.8±1.1
	D4(中部带芽有节) 25.6±0.7
	D5(中部无芽有节) 23.1±2.3

根茎的要低些。

不同根茎部位的污染率差异明显(表2)。D4和D5污染率较高,说明有节间的部位微生物污染比较严重;而带芽部位由于芽鳞片包被,微生物污染也严重(表2中D1)。曾做过剥芽鳞片消毒试验,但成活率低。另外,多菌灵灭菌效果与根茎形状和平整程度等也有关。

3 小结

多菌灵与0.2%氯化汞复合使用,能有效控制黄精根茎组织中真菌生长,但其灭菌效果与处理时间、根茎部位、年龄和大小等有关系。选择不带节间、大小为0.6~0.8 cm×2~2.5 cm的当年生新根茎,用3%多菌灵处理72h再用0.2%氯化汞处理10 min,就能建立起黄精根茎无菌体系。

参考文献

- 何云芳,余有祥,冯建民. 浙江林业科技,1997,17(4):18~22.
- 许婉芳,龚福生,萧华山. 福建果树,1999,110(4):6~7.
- 李颖,李春燕. 林业科技,2002,27(1)06~08.
- 谭文澄,戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京:中国林业出版社,1991.
- 王利民,周毅,陈龙友,等. 贵州师范大学学报(自然科学版). 2002,20(1)15~17.