

苯 甲 酸 钠 在 组 培 中 对 外 植 体 污 染 及 分 化 的 影 响

蔡建荣, 黄萍萍

(福建省龙岩市农业科学研究所, 福建 龙岩 364000)

摘要: 以 ‘林畚早薯’山药茎段、‘龙薯3号’甘薯茎尖和 ‘六月红’芋茎尖为外植体, 研究了培养基中添加高温处理和常温无菌过滤处理 25 mg/L 苯甲酸钠的杀菌抑菌效果。结果表明, 25 mg/L 苯甲酸钠能有效降低植物组织培养过程中的污染率, 并且对外植体分化率的影响不明显; 经高温处理和常温下过滤处理的苯甲酸钠在植物组织培养中的杀菌抑菌效果区别不显著。

关键词: 苯甲酸钠; 外植体; 污染率; 组织培养

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1673- 4823(2008)03- 0100- 03

植物组织培养是 20 世纪初以植物生理学为基础发展起来的一门新兴技术, 该技术已在科研和生产中得到广泛应用, 成为最常用的生物技术之一^[1,2], 但作为植物组织培养三大难题之一的污染现象也普遍存在, 在组培过程中经常发现外植体基部培养基存在半透明状乳白色细菌斑或淡黑色霉菌群。植物组织培养过程中造成污染的原因多种多样, 如外植体的种类, 取材的季节和时间, 外植体的预处理, 消毒剂的种类、浓度、消毒时间, 试验人员的操作、工作环境等, 都与污染的产生密切相关^[2,3]。目前, 在对外植体进行妥善消毒处理的前提下, 往培养基中添加一定浓度的各种抗菌类药剂(如抗生素、多菌灵等), 以抑制外植体因内生菌的存在而再次污染的问题已有大量的研究报道^[4]。但由于多菌灵、抗生素类药剂在高温高压下容易分解, 所以在作为培养基的添加剂使用上存在一定的局限性。本试验以常用的苯甲酸钠(sodium benzoate)为培养基添加剂, 取“龙薯3号”甘薯和“六月红”芋的茎尖及“林畚早薯”山药苗的带节间部茎段为外植体, 对一定浓度的苯甲酸钠在外植体分化培养过程中的作用进行试验探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为 ‘龙薯3号’甘薯, 取自本所; “六月红”芋, 来自福建永定; ‘林畚早薯’山药苗, 取自福建连城。 ‘龙薯3号’甘薯和 ‘六月红’芋采用茎尖, “林畚早薯”山药采用苗中上部幼嫩茎段作为外植体。

1.2 方法

试验设三个处理, 处理 A: 将 25 mg/L 苯甲酸钠溶液加入 MS 培养基后进行高温高压灭菌; 处理 B: 灭菌过滤后得到的无菌 25 mg/L 苯甲酸钠溶液加入经高温高压灭菌过的 MS 培养基中^[5,6]; 处理 C: 对照处理(未添加苯甲酸钠的 MS 培养基)。三种外植体均先用洗衣粉溶液冲洗表面杂物, 并用清水反复洗净, 在无菌条件下, 将外植体用浓度为 70%的酒精消毒 30 s, 随后用无菌水洗净, 再放入浓度为 0.1%的氯化汞溶液中消毒 12 min, 最后用无菌水漂洗 4 次。将消毒灭菌后的 ‘林畚早薯’山药苗节间茎段切成 0.6 cm 含节间的小段, “龙薯3号”甘薯与 “六月红”芋外植体在显微镜下进行剥离并切取 0.2 ~0.5 mm 茎尖部位, 最后将 3 种外植体分别接入上述三种培养基中^[7-9]。每处理各接种 90 瓶, 每种植物 30 瓶, 每瓶 1 个

[收稿日期]2008- 04- 12

[作者简介]蔡建荣(1973-), 男, 福建长汀人, 助理研究员, 主要从事农作物组织培养等相关生物技术工作。

外植体。培养基 pH 值 5.6, 琼脂 7 g/kg, 培养温度 26℃, 光照强度 2000 Lx, 光照时间 16 h/d。

2 结果与分析

2.1 苯甲酸钠对外植体污染率的影响

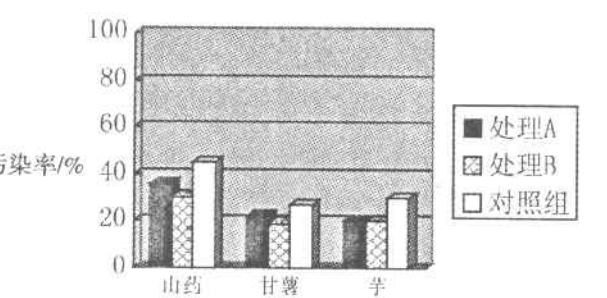


图 1 外植体污染情况

图 1 所示的是培养 20 d 后的污染结果(污染率计算方法: 污染率%=(污染外植体数/外植体总数) × 100%)。由图 1 可看出, 添加了 25 mg/L 苯甲酸钠的处理 A 和 B, 在试验中均表现出较强的抑菌作用, 污染率均比对照低。“龙薯 3 号”茎尖在处理 A 中污染率为 22%, 在处理 B 中污染率更低, 仅为 19%, 比对照处理低了 8 个百分点; “六月红”芋茎尖在处理 A 与 B 中的污染率均为 20%, 比对照处理低了 10 个百分点; 虽然“林番早薯”山药茎段处理 A 与 B 的污染率较高, 分别为 36% 和 30%, 但均低于对照。可见, 添加 25 mg/L 苯甲酸钠能够明显地抑制外植体的污染。处理 B 中的苯甲酸钠溶液是未经高温高压灭菌的, 从本次试验结果得知, 处理 B 的抑菌效果略强于处理 A, 但两处理间的差异并不显著。苯甲酸钠经过高温高压处理后其抑菌效果降低, 可能与高温高压状态下苯甲酸钠部分分解, 从而在一定程度上破坏其杀菌抑菌功能有关。本试验中, “林番早薯”山药外植体对照处理的污染率最高, 达到了 45%, 比同等条件下灭菌的“龙薯 3 号”甘薯与“六月红”芋的对照处理高出了 15 个百分点以上, 这可能与“林番早薯”山药苗茎段接种前的消毒灭菌时间偏短有关。

2.2 苯甲酸钠对外植体分化率的影响

组织培养过程中外植体愈伤组织的分化易受外源激素或添加物的影响。但本试验结果表明, 添加 25 mg/L 苯甲酸钠对外植体愈伤组织分化率的影响并不显著。由于三种植物外植体愈伤组织的分化时

间不同, “林番早薯”山药茎段大约 28 d, “龙薯 3 号”甘薯茎尖大约 35 d, “六月红”芋茎尖大约 40 d^[7-9], 因此图 2 所示的是培养 45 d 后的三种外植体分化率的表现情况。由图 2 可知, “林番早薯”山药茎段的 A、B 两种处理的分化率值分别为 80% 和 79%, 仅比对照处理低 2 个百分点和 3 个百分点; “龙薯 3 号”甘薯处理 A、B 与对照处理的分化率分别为 60%、58% 和 60%, 三者之间的差别同样不明显。“六月红”芋茎尖的分化极易受环境和外源物质的影响, 在不同的脱毒试验中茎尖分化率均差别较大。但此次试验中, 添加不同处理的 25 mg/L 苯甲酸钠的茎尖分化率均为 31%, 仅仅比对照低 3 个百分点, 差异并不明显。

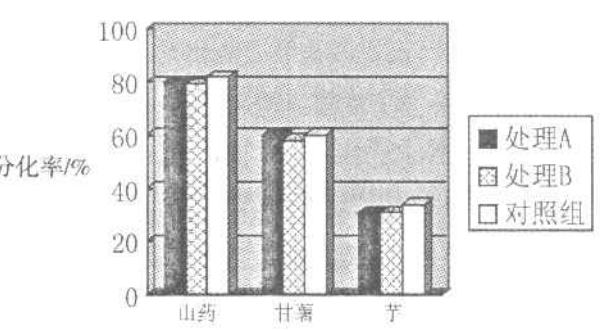


图 2 苯甲酸钠对不同外植体分化率的影响

山药茎段外植体褐变现象一般比较严重, 但在本次试验中, 处理 A 和处理 B 的褐变现象均显著轻于对照组, 其原因有待进一步的试验分析。

3 讨论

苯甲酸钠又称为安息香酸钠, 是一种常用的防腐剂, 在酸性环境下具有较强的杀菌和抑菌作用^[10]。研究表明, 在保证外植体生长适宜的 pH 值条件下, 在培养基中添加浓度为 25 mg/L 苯甲酸钠溶液可有效降低组织培养中外植体的污染率, 而且该浓度下的苯甲酸钠对外植体的生长分化的影响不显著; 高温灭菌的苯甲酸钠溶液在杀菌抑菌效果上仅比采用无菌过滤器方式过滤出的苯甲酸钠溶液略低些, 但差别不显著, 说明高温高压对苯甲酸钠的杀菌抑菌作用影响并不明显。考虑到组织培养中工厂化育苗的必要性及可行性, 完全可以将配好的苯甲酸钠溶液直接加入培养基中同时进行消毒灭菌。在此次研究观察中笔者还发现, 添加 25 mg/L 苯甲酸钠

能够明显改善山药茎段外植体的褐变现象。苯甲酸钠并非抗氧化类药剂，其改善外植体褐变的这种现象是否为此次试验中的偶然现象还是存在其他的褐变抑制机理，还需要作深入的试验论证。根据本试验三种外植体污染率的比较，苯甲酸钠的杀菌抑菌效果并不局限于某种植物的组培过程，但苯甲酸钠是否对在所有植物的组织培养过程中都能产生良好的杀菌抑菌作用，还有待进一步的研究探讨。

参考文献:

[1]孙敬三, 桂耀林. 植物细胞工程技术[M]. 北京: 科学出版社, 1995: 200- 225.
[2]杜雪玲, 张振霞, 余如刚, 等. 植物组织培养中的污染成因及其预防[J]. 草业科学, 2005(1): 24- 27.
[3]朱广廉. 植物组织培养中灭菌和无菌操作的几个问题[J]. 植物生理学通讯, 1995, 31(5): 375-384.

[4]田永亮, 张文, 张国珍, 等. 两种抗生素对葡萄组培中污染菌的抑制作用[J]. 北方园艺, 2005(5): 84-85.
[5]吴素萱. 植物组织和细胞培养[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1978: 20- 22.
[6]朱广廉. 植物组织培养中外植体灭菌[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(6): 440- 449.
[7]黄萍萍, 林金虎, 张志勇, 等. “六月红”早熟芋快速繁殖技术研究[J]. 江西农业学报, 2007, 19(8): 72- 73.
[8]徐龙珠. 甘薯组织培养初报[J]. 河南农业科学, 1986(10): 7- 8.
[9]蔡建荣, 曾军, 张志勇, 等. 山药茎段组织培养及增殖的研究[J]. 福建农业科技, 2002(2): 14- 15.
[10]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.

责任编辑: 潘伟彬

Effects of sodium benzoate in tissue culture on explants pollution and differentiation

CAI Jian- rong, HUANG Ping- ping

(Institute of Agricultural Sciences, Longyan, Fujian, 364000, China)

Abstract: In this research, stem of chinese yam, vine- tips of Longshu 3 and "June Red" eddo as explants, the asepsis effects of sodium benzoate by different treatments with 25 mg/L in medium were tested. The results showed that sodium benzoate with 25 mg/L could reduce pollution rate effectively, and had little influence to its differentiation rate; there was no significant difference in the asepsis effects of sodium benzoate in tissue culture with high temperature treatment and filtration treatment under normal temperature.

Key words: sodium benzoate; explant; pollution rate; tissue culture



热烈祝贺我院被确定为福建省示范性高等职业院校

经由学校自评、形式审核、实地考察评估、专家评审委员会审议、公示等严格程序，我院被福建省教育厅、发改委、财政厅确定为“福建省示范性高等职业院校”。

我院将坚持以服务为宗旨，以就业为导向，走产学研结合的发展道路，切实加强院校综合实力、重点专业、社会服务能力的建设，提升培养高素质技能型人才的能力，带动全省高等职业院校办出特色，提高水平。同时被确定为“福建省示范性高等职业院校”的，还有福建信息职业技术学院、黎明职业大学等7所高职院校。