

# 在培养基中加入抗生素防止万年青 茎段培养污染的研究

周俊辉, 杨妙贤, 李春霞, 宋苑芬

(仲恺农业技术学院园艺系, 广东广州 510225)

**摘要:** 以玛丽安万年青茎段为试验材料, 将浓度为  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的青霉素、氯霉素、利福平、庆大霉素、先锋霉素 6 号、链霉素和卡拉霉素 7 种抗生素分别经过过滤灭菌后加入到 MS 基本培养基, 从中筛选出防止污染效果较好的两种抗生素, 分别按  $50$ 、 $100$ 、 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的浓度加入到 MS 培养基中培养, 以筛选出最适合浓度; 然后再筛选出利福平和氯霉素的最佳浓度组合。结果表明: 7 种抗生素中以利福平和氯霉素防止污染效果较好, 未污染率分别为  $68.42\%$  和  $58.33\%$ , 成活率分别为  $65.79\%$  和  $52.78\%$ , 利福平和氯霉素的浓度均为  $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时防止污染的效果最佳;  $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  利福平 +  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  氯霉素和  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  利福平 +  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  氯霉素组合, 未污染率分别达到  $78.46\%$ 、 $85.18\%$ , 极显著高于  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  利福平单独处理的效果。

**关键词:** 玛丽安万年青; 抗生素; 茎段培养; 防止污染

**中图分类号:** Q943.1   **文献标识码:** A   **文章编号:** 1000-3142(2005)03-0233-03

## Studies on contamination control by adding antibiotics into medium in stem culture of *Dieffenbachia amoena* cv. Camilla

ZHOU Jun-hui, YANG Miao-xian, LI Chun-xia, SONG Yuan-fen

( Horticultural Department, Zhongkai University of Agriculture and Technology, Guangzhou 510225, China )

**Abstract:** There was serious contamination in the stem culture of *Dieffenbachia amoena* cv. Camilla, belonging to Araceae. All of antibiotics tested was added into MS medium by using  $0.2 \mu\text{m}$  supor membrane acrodisc syringe filter produced by Gelman Laboratory, respectively. First, ampicillin, chloramphenicol, rifampin, gentamycin, streptomycin, kanamycin and cefradine, was tested with  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively. The inhibiting bacteria contamination effect of rifampin and chloramphenicol, of which the uncontaminated rate was  $68.42\%$  and  $58.32\%$  respectively, and the surviving rate was  $65.79\%$  and  $52.78\%$  respectively, was better than others. Second, chloramphenicol and rifampin was tested with  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  concentration, respectively, both two kinds of antibiotic with  $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  concentration had the best effect. Third, the two antibiotics combined with different concentrations were tested,  $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  rifampin combined with  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  chloramphenicol, and  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  rifampin combined with  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  chloramphenicol had the higher effect with  $78.46\%$  and  $85.18\%$  uncontaminated rate, respectively, both had very significant difference comparing with the control.

**Key words:** *Dieffenbachia amoena* cv. Camilla; antibiotic; stem culture; contamination control

在植物组织培养过程中, 存在两种类型的污染, 一种是通常讲的污染, 即因外植体消毒不彻底、无菌操作和

培养过程中如培养基、接种工具、接种室消毒不严格或操作不规范而导致的污染。另一类是内源菌污染。生

收稿日期: 2004-01-08   修订日期: 2004-05-18

基金项目: 国家星火计划资助项目(2001EA780018)

作者简介: 周俊辉(1963-), 男, 江西临川人, 博士, 副教授, 从事园艺植物的组织培养和栽培生理的教学和科研工作。

长在高温多雨的热带、亚热带植物和多年生木本植物容易表现内源细菌污染(周俊辉,1999,2003)。

对防止内源细菌污染的方法主要有:对母树喷布杀菌剂或抗生素(Reuveni等,1990),用抗生素对外植体进行预培养(朱广廉,1996;傅婉华等,1991),改进灭菌方法(傅婉华等,1991),还有多次消毒(灭菌)、使用混合的消毒液、酸化培养基和在培养基中加入其他抑菌剂等方法(周俊辉等,2003)。

在培养基中加入抗生素能较有效地抑制内生细菌污染,但效果不一(周俊辉等,2003)。天南星科黛粉叶属的玛丽安万年青在茎段培养中特别容易污染,我们以其作为试材,通过在培养基加入不同种类的抗生素、不同浓度及不同浓度的组合处理,进行筛选研究,以期找到防止外植体内源细菌污染的有效方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

天南星科(Araceae)黛粉叶属玛丽安万年青(*Dieffenbachia amoena* cv. *Camilla*),取自于仲恺农业技术学院花圃。

### 1.2 方法

用手术刀将万年青的叶片剥去,露出腋芽,用自来水冲洗干净后用肥皂水冲洗1次,再用自来水浸泡2~3 h后冲洗干净,沥干。

### 1.3 培养基的制备

以MS培养基为基本培养基,不加任何植物生长调节剂,蔗糖2%,琼脂6%,pH5.8。

### 1.4 消毒灭菌

1.4.1 外植体常规消毒 用75%的酒精浸泡1 min,无菌水冲洗1~2次,再用1 g/L的HgCl<sub>2</sub>浸泡15 min,无菌水冲洗3~5次。

1.4.2 抗生素减压过滤灭菌 由于抗生素在高温高压下易分解,应采取减压过滤灭菌。将配制浓度为50 mg·L<sup>-1</sup>的氨苄青霉素(ampicillin)、氯霉素(chloramphenicol)、利福平(rifampin)、庆大霉素(gentamycin)、链霉素(streptomycin)、先锋霉素6号(cefradine)和卡拉霉素(kanamycin)7种抗生素在超净工作台用已灭菌的注射器和一次性滤器进行过滤灭菌,然后加入尚未凝固的培养基中。一次性滤器采用Gelman Laboratory生产,孔径为0.2 μm,滤器不能加热。

1.4.3 抗生素浓度的筛选 选出第一阶段培养中表现最好的两种抗生素利福平和氯霉素,设定不同的浓

度0、50、100、150 mg·L<sup>-1</sup>,进行最佳浓度的筛选。

1.4.4 不同利福平和氯霉素浓度组合的筛选 以50 mg·L<sup>-1</sup>利福平作对照,设计25 mg·L<sup>-1</sup>利福平+25 mg·L<sup>-1</sup>氯霉素、25 mg·L<sup>-1</sup>利福平+50 mg·L<sup>-1</sup>氯霉素、50 mg·L<sup>-1</sup>利福平+25 mg·L<sup>-1</sup>氯霉素和50 mg·L<sup>-1</sup>利福平+50 mg·L<sup>-1</sup>氯霉素4种组合,进行最佳浓度组合筛选。

### 1.5 培养条件与统计

培养室温度25~28℃,光照度2 000~4 000 lx,每天光照12~14 h,20 d后观察统计。数据采用SPSS 10.0软件分析处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同抗生素种类对万年青茎段培养防止污染的影响

结果表明,氯霉素和利福平处理材料后的未污染率和成活率都比较高,与CK、庆大霉素、卡拉霉素、链霉素、青霉素、先锋霉素等处理比较均达到了极显著水平。其中,利福平的未污染率从对照的19.45%上升到68.42%,成活率从16.67%上升到65.79%,说明利福平和氯霉素均能较有效地抑制内源细菌的污染,而其他抗生素的效果较差,特别是庆大霉素的处理与对照相似(表1)。

### 2.2 不同浓度的氯霉素、利福平对万年青茎段培养防止污染的效果

从表2可以看出,随氯霉素(缩写为Chl.)和利福平(缩写为Rif.)浓度的增加,未污染率和成活率均有增加的趋势,当利福平的浓度为150 mg·L<sup>-1</sup>时的未污染率和成活率都达到76.92%,而氯霉素浓度为150 mg·L<sup>-1</sup>时对防止污染的效果达64.10%。

### 2.3 不同浓度的氯霉素、利福平组合对万年青茎段培养防止污染的效果

从表3看出,当氯霉素浓度达到50 mg·L<sup>-1</sup>时,不论利福平浓度是25 mg·L<sup>-1</sup>还是50 mg·L<sup>-1</sup>,防止污染的效果与成活情况均极显著地高于利福平单独处理;而当氯霉素浓度为25 mg·L<sup>-1</sup>时,不管利福平浓度是25 mg·L<sup>-1</sup>还是50 mg·L<sup>-1</sup>,防止污染的效果与成活情况都与对照没有显著性差异。因此,加入培养基的氯霉素浓度不能低于50 mg·L<sup>-1</sup>。

## 3 讨论

内源细菌污染在植物组织培养中较难解决,无

论用何种表面消毒方法都无法彻底消除外植体的内生细菌,在培养基加入抗生素是防止内源细菌污染的有效措施之一。

我们的实验结果表明,在 7 种抗生素中以利福

平和氯霉素防止污染效果较好,未污染率分别为 68.42% 和 58.33%,成活率分别为 65.79% 和 52.78%;利福平和氯霉素的浓度均为  $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时污染防止的效果最佳。

表 1 不同抗生素种类对万年青茎段培养防止污染的影响(浓度为  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )

Table 1 Contamination control effect of different antibiotic in medium on stem culture of *Dieffenbachia amoena* cv. Camilla

| 处理<br>Treatment     | 接种数<br>Inoculated numbers | 未污染情况 Uncontaminated |                             |    |     | 成活情况 Surviving      |                             |    |     |
|---------------------|---------------------------|----------------------|-----------------------------|----|-----|---------------------|-----------------------------|----|-----|
|                     |                           | 茎段数<br>Stem numbers  | 比例<br>Rate(%) <sup>1)</sup> |    |     | 茎段数<br>Stem numbers | 比例<br>Rate(%) <sup>1)</sup> |    |     |
| 对照 CK               | 36                        | 7                    | 19.45                       | ab | AB  | 6                   | 16.67                       | ab | AB  |
| 庆大霉素 Gentamycin     | 37                        | 4                    | 10.81                       | a  | A   | 4                   | 10.81                       | a  | A   |
| 卡拉霉素 Kanamycin      | 36                        | 9                    | 25.00                       | ab | AB  | 9                   | 25.00                       | ab | AB  |
| 链霉素 Streptomycin    | 36                        | 10                   | 27.78                       | ab | ABC | 10                  | 27.78                       | ab | ABC |
| 氨苄青霉素 Ampicillin    | 37                        | 14                   | 37.84                       | bc | BCD | 14                  | 37.84                       | bc | BCD |
| 先锋霉素 6 号 Cefradine  | 37                        | 18                   | 48.65                       | cd | CDE | 17                  | 45.94                       | cd | CDE |
| 氯霉素 Chloramphenicol | 36                        | 21                   | 58.33                       | de | DE  | 19                  | 52.78                       | de | DE  |
| 利福平 Rifampin        | 38                        | 26                   | 68.42                       | e  | E   | 25                  | 65.79                       | e  | E   |

注: <sup>1)</sup> 方差分析中小写字母表示 0.05(显著)水平;大写字母表示 0.01(极显著)水平,下同 In systematic analysis, little letters indicate prominent difference among different treatments, while the capital letters mean very significant difference. The same is as below.

表 2 不同浓度的氯霉素、利福平对万年青茎段培养防止污染的效果

Table 2 Contamination control effect of chl. and rifampin with different concentration in medium on stem culture of *Dieffenbachia amoena* cv. Camilla

| 处理<br>Treatment | 浓度<br>Concentration<br>( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | 接种数<br>Inoculated numbers | 未污染情况 Uncontaminated |                             |    |    | 成活情况 Surviving     |                             |    |    |
|-----------------|--|---------------------------|----------------------|-----------------------------|----|----|--------------------|-----------------------------|----|----|
|                 |  |                           | 茎段数<br>Stem numbers  | 比例<br>Rate(%) <sup>1)</sup> |    |    | 茎段数<br>Stem number | 比例<br>Rate(%) <sup>1)</sup> |    |    |
| 对照 CK           | 0  | 38                        | 10                   | 26.32                       | a  | A  | 8                  | 21.05                       | a  | A  |
| 氯霉素 Chl.        | 50   | 39                        | 19                   | 48.72                       | b  | AB | 18                 | 46.15                       | b  | AB |
|                 | 100  | 39                        | 20                   | 51.28                       | b  | B  | 19                 | 48.72                       | b  | B  |
|                 | 150  | 39                        | 25                   | 64.10                       | bc | B  | 25                 | 64.10                       | bc | B  |
| 利福平 Rif.        | 50   | 37                        | 22                   | 59.46                       | b  | B  | 21                 | 56.76                       | b  | B  |
|                 | 100  | 38                        | 20                   | 52.63                       | b  | B  | 20                 | 52.63                       | b  | B  |
|                 | 150  | 39                        | 30                   | 76.92                       | c  | C  | 30                 | 76.92                       | c  | C  |

表 3 不同浓度的氯霉素、利福平组合对万年青茎段培养防止污染的影响

Table 3 Contamination control effect of rifampin combined with chloramphenicol by different concentration in medium on stem culture of *Dieffenbachia amoena* cv. Camilla

| 处理<br>Treatment | 接种数<br>Inoculated numbers | 未污染情况 Uncontaminated |                             |   |   | 成活情况 Surviving     |                             |   |   |
|-----------------|---------------------------|----------------------|-----------------------------|---|---|--------------------|-----------------------------|---|---|
|                 |                           | 茎段数<br>Stem numbers  | 比例<br>Rate(%) <sup>1)</sup> |   |   | 茎段数<br>Stem number | 比例<br>Rate(%) <sup>1)</sup> |   |   |
| Rif. 50(CK)     | 33                        | 23                   | 69.70                       | a | A | 22                 | 66.67                       | a | A |
| Rif. 25+Chl. 25 | 33                        | 22                   | 66.67                       | a | A | 22                 | 66.67                       | a | A |
| Rif. 25+Chl. 50 | 32                        | 25                   | 78.12                       | b | B | 24                 | 75.00                       | b | B |
| Rif. 50+Chl. 25 | 33                        | 22                   | 66.67                       | a | A | 21                 | 63.64                       | a | A |
| Rif. 50+Chl. 50 | 32                        | 27                   | 84.38                       | c | C | 26                 | 81.25                       | c | C |

使用哪种抗生素为好、使用浓度多少为适宜?可能因植物的种类不同、植物所含内生菌种类的不同以及抗生素使用的种类和浓度不同,导致抗生素使用的效果变化很大(周俊辉等,2003)。如  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  头孢噻肟(cefotaxime)(Barrett 等,1994)、 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  阿霉素(amycacin)(Bistrichanov 等,1997)、 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  利福平(Leven 等,1996)、 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  卡拉霉素(Blackman 等,1996)、先锋霉素(韩美丽等,

1999)、链霉素(翟建中,1999)、庆大霉素(傅婉华等,1991)、林可霉素(傅婉华等,1991),分别有效地抑制各培养中的细菌污染。

我们发现, $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  利福平 +  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  氯霉素和  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  利福平 +  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  氯霉素组合,防止污染的效果比利福平单独处理有很大的提高,与翟建中(1999)、Reed 等(1998)的结果相似。(下转第 268 页 Continue on page 268)

蒜多糖相似、中国石蒜和换锦花多糖相似度更大。

#### 4.4 多糖的组成

也就是多糖一级结构对其生物活性有一定的影响,而多糖的高级结构更有赖于一级结构的排步(黄芳,1998)。与基因的遗传密码类似,可能存在多糖密码,即所谓的糖码,生物多糖可能按照一定的规则排列组合并相互识别。石蒜属中不同植物的多糖结构组成不同,会导致不同的生物活性和药用价值(廖代伟等,1997)。另外,多糖结构组成的差异可为探讨石蒜属种间亲缘关系提供实验证据。

#### 参考文献:

- 张懋杰. 1987. 复合多糖生化研究技术(第一版)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 62-65.
- 季春峰. 2002. 石蒜属资源开发与利用[J]. 中国野生植物资源, 21(6): 14-15.
- 霍光华, 李来生, 高荫榆. 2002. 波谱在多糖结构分析上的应用[J]. 生命的化学, 22(2): 194-196.
- Huang F(黄芳), Meng YW(蒙义文). 1998. Studies on polysaccharides with biological activity(活性多糖的研究进展)[J]. *Natural Product Research and Development*(天然产物研究与开发), 11(5): 90-98.
- Li DR(李道荣), Li k(李魁), Duan XM(段雪梅). 2002. Technology study on extraction of polysaccharide from pollen(蒲公英花粉多糖提取工艺研究)[J]. *J Zhengzhou Institute of Technology*(郑州工程学院学报), 23(4): 55-57.
- Liao DW(廖代伟), He SX(何苏雄), Lin YZ(林银钟), et al. 1997. Study on micro-catalysis in life science(生命科学中的微催化作用研究)[J]. *J Xiamen Univ*(厦门大学学报), 36(3): 478-481.
- Nie LW(聂刘旺), Zhang DC(张定成), Zhang HJ(张海军), et al. 2000. A study on three isozymes in plant of *Lycoris Herb*(安徽产石蒜属植物三种同工酶的分析)[J]. *J Biology*(生物学杂志), 17(3): 19-22.
- Sheng JR(盛家荣), Zeng LH(曾令辉), Zai C(翟春), et al. 1999. The extraction, isolation and structure analysis of polysaccharide(多糖的提取、分离及结构分析)[J]. *J Guangxi Teachers College*(广西师院学报), 16(4): 49-54.
- Tan ZJ(谭周进), Xie DP(谢达平), Wang Z(王征), et al. 2002. Studies on isolation, purification and properties of polysaccharide from *armillaria mellea*(蜜环菌多糖分离纯化及性质的研究)[J]. *Food Science*(食品科学), 23(9): 49-53.
- Wei YX(魏玉西), Hang H(杭瑚). 1998. Purification and analysis of polysaccharide from *P. urceolata*(多管藻多糖的提纯及分析)[J]. *J Qingdao Univ*(青岛大学学报), 11(3): 85-88.
- (上接第 235 页 Continue from page 235)
- 表明在培养基中使用两种或两种以上抗生素,可以防止细菌的抗药性,有时效果比单独使用更好。
- 参考文献:
- Barrett C, Cassells AC. 1994. An evaluation of antibiotics for the elimination of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* (Brown) from *Pelargonium X domesticum* cv. Grand Slam explants *in vitro*[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 36(2): 169-175.
- Bistrichanov S, Haralampieva V, Kaloyanova N. 1997. Testing of different types of antibiotics against bacterial contamination in *Hydrangea hortensis in vitro*[J]. *Bulgarian J Agricul Sci*, 3(6): 749-753.
- Blackman SA, Brown KL, Manalo JR, et al. 1996. Embryo culture as a means to rescue deteriorated maize seeds[J]. *Crop Sci*, 36(6): 1 693-1 698.
- Han ML(韩美丽), Lu RS(陆荣生), Huang HY(黄华艳), et al. 1999. Studies of vitrification and bacteria contamination control methods in the subculture of *Spathi phyllum kochii* (绿巨人组培苗继代过程中玻璃苗及细菌污染的消除方法研究)[J]. *Guangxi Fore Sci*(广西林业科学), 28(1): 16-19.
- Fu WH(傅婉华), Li WA(李文安). 1991. Utilization of antibiotics in clone propagation of *Alocasia sanderiann* (利用抗生素进行的海芋快速繁殖)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), 27(5): 373-375.
- Levin R, Stav R, Alper Y, et al. 1996. *In vitro* multiplication in liquid culture of *Syngonium* contaminated with *Bacillus* spp. and *Rathayibacter tritici*[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 45(3): 277-280.
- Reed BM, Mentzer J, Tanprasert P, et al. 1998. Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut; identification and antibiotic treatment[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 52: 67-70.
- Reuveni O, Shlesinger DR, Lavi U. 1990. *In vitro* propagation of dioecious *Carica papaya* L. [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 20(1): 41-46.
- Zhai JZ(翟建中), Gu MQ(顾梅俏). 1999. Elimination off contamination in tissue culture of *Vinca major* cv. Variegata (长春蔓组培生产中污染的防除)[J]. *Forest Pest and Disease*(森林病虫通讯), (4): 30-32.
- Zhou JH(周俊辉). 1999. Problems and their countermeasures during *in vitro* propagation of plants(植物快速繁殖技术中存在的问题与对策)[J]. *J Zhongkai Agrotechnical Coll*(仲恺农业技术学院学报), 12(4): 64-70.
- Zhou JH(周俊辉), Zhou HG(周厚高), Liu HQ(刘花全). 2003. Endophytic bacterial contamination in plant tissue culture(植物组织培养中的内生细菌污染问题)[J]. *Guihaia*(广西植物), 23(1): 41-47.
- Zhou JH(周俊辉), Liu HQ(刘花全), Luo HJ(罗慧君), et al. 2002. Study on contamination control in stem culture of *Dieffenbachia amoena* cv. Camilla(玛丽安万年青茎段培养污染防止研究)[J]. *J Zhongkai Agrotechnical Coll*(仲恺农业技术学院学报), 15(4): 43-48.