

灵芝浸出液在香蕉组织培养中的抑菌作用

唐历波

(遵义医学院珠海校区生物化学及细胞分子生物学教研室, 广东 珠海 519000)

摘要:设计不同浓度的灵芝浸出液培养基,以香蕉(*Musa sapientum* L.)作为培养材料,通过定量接种不同种类的细菌及真菌以观察灵芝浸出液的抑菌效果。结果表明,采用野生灵芝 10 g 于 1 000 ml 蒸馏水中煮 2 h 的浸出液配制的培养基,不仅能使香蕉正常生长,而且已感染细菌的材料经一段时间培养后,细菌污染消失,恢复正常。研究结果对于香蕉转基因操作以及完善组织培养技术具有重要的参考意义。

关键词:真菌;灵芝;香蕉;组织培养;抑菌作用

中图分类号:Q943.1

文献标识码:A

文章编号:1005-3395(2006)03-0229-04

Inhibitory Effects of *Ganoderma lucidum* Extraction in Tissue Culture of Common Banana

TANG LI-b0

(Biochemical and Cell Molecular Biological Staff Room, Zunyi Medical College Zhuhai Campus, Zhuhai 519000, China)

Abstract: The experiments of the effects of *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. extract (GLE) on bacterial inhibition in tissue culture of common banana was carried out by adding various concentrations of GLE into MS medium containing 2 mg L⁻¹ BA and 0.1 mg L⁻¹ NAA. Explants from absorptive buds of common banana (*Musa sapientum* L.) were used to observe the inhibition of bacteria (*Escherichia coli* I, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces griseus* and *Agrobacterium tumefaciens*), the shooting and the growth of plantlets. It was indicated that best bacterial inhibition concentrations of GLE in primary culture and subcultures were 5 or 10 g *Ganoderma* pieces boiled in 1 000 ml distilled water for two hours. However, GLE showed certain inhibitory effect on shooting, but there was no influence on rooting.

Key words: Fungus; *Ganoderma lucidum*; Common banana; Tissue culture; Bacterial inhibition

香蕉(*Musa sapientum* L.)可作为重要的转基因植物载体,在香蕉转基因操作中,一般利用农杆菌作为载体在离体培养条件下转移外源基因,而后添加抗生素以消除农杆菌的影响,常导致培养材料的生长受到抑制。

香蕉苗的工厂化生产已成为香蕉育苗的主要方式,其初代培养外植体主要采用吸芽消毒培养方式,但吸芽消毒较为困难^[1-3],而采用常规的升汞处理,又因内源性的细菌感染常导致消毒不彻底。此外,在继代培养过程中,如操作不慎,也易导致细菌

性感染而给种苗生产造成损失。近期有研究表明,可通过抑菌剂抑制组织培养中的污染^[4-6]。我们在试验中发现野生灵芝浸出液具有强烈的抑制细菌作用,为此,设计了单因子对比试验,对灵芝浸出液的抑菌效果作一个系统比较,为香蕉组织培养和工厂化生产提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 灵芝浸出液的制备

采用野生的灵芝(采于海口市金牛岭公园枯萎

的马占相思树上),经形态学及细胞学鉴定,属热带灵芝(*Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr) Karst.)。自然风干(含水量 11.2%),实验分 5 个处理:A:灵芝组织块 1 g,浸于 1 000 ml 蒸馏水,煮 2 h,滤去残渣,用于配制培养基;处理 B、C、D 分别称取灵芝组织块 5、10、15 g,其他过程同处理 A;处理 E:称取灵芝组织块 10 g,浸于 1 000 ml 蒸馏水,浸泡过夜,用浸出液配制培养基。采用 MS 培养基,附加 6-BA 2 mg L⁻¹,NAA 0.1 mg L⁻¹。经常规高温高压灭菌消毒处理。

1.2 菌种

由华南热带植物研究院植保研究所提供,有:大肠埃希菌(*Escherichia coli* I),酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*),根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*),接种菌液浓度均为 OD₂₈₀:0.5。

1.3 方法

采用 3 种材料:(1) 直接从大田采取香蕉(*Musa sapientum* L.)吸芽,用 75%酒精浸泡 10 min 进行表面消毒处理后,接种于不同处理的灵芝浸出液培养基中,并设置不加灵芝浸出液的 MS 培养基作为对照。(2) 采用 6 代香蕉增殖苗转接在处理 C 配制的培养基中,分别接种上述各种菌种,观察香蕉生长及抑菌情况。(3) 采用第 3 代未分化的外植体转接于处理 C,并设置正常培养基作为对照,以观察灵芝浸出液对香蕉生长及分化的影响。

所有接种的材料均置于 28℃,光照每天 10–12 h, pH 5.8,光照强度 2 100 lx 下培养。增殖培养

基为 MS+6-BA 2 mg L⁻¹+NAA 0.1 mg L⁻¹+蔗糖 3%+卡拉胶 0.65%,根分化培养基为 MS + 6-BA 0.1 mg L⁻¹+ NAA 0.4 mg L⁻¹+蔗糖 1.5%+卡拉胶 0.65%+活性炭 0.1%。

2 结果和分析

2.1 空白对照试验结果

直接将各处理及未加灵芝浸出液配制的、不经过高压灭菌处理的固体培养基各 20 瓶置于自然环境中作空白对照试验,结果表明,未采用灵芝浸出液的培养基在放置过夜后,就出现白色的细菌斑点,处理 A 和处理 E 在第二天分别有 60%和 70%出现白色细菌斑点,其他处理均未发现细菌斑(B 处理仅有 5%出现细菌斑)。但在 2 d 后所有处理和对照均出现白色或绿色霉菌,发生真菌污染。这初步说明灵芝煮过的浸出液对细菌有一定的抑制作用。

2.2 香蕉吸芽初代培养试验结果

将从大田取回的香蕉吸芽用 75%的酒精浸泡 10 min,分别接种于不同的处理中,结果见表 1。

从表 1 可见,浸泡过夜的灵芝浸出液(处理 E)几乎不起作用;处理 B 与处理 C 效果较好;而处理 A 由于灵芝浸出液浓度较低,污染较大;处理 D 可能浓度太高,虽然污染率为 0,但材料经 20 d 培养已经发黑变坏。因此,灵芝浸出液有一个适宜浓度范围,即以灵芝风干组织块 5–10 g 的浸出液,材料虽有少量污染,但经过 40 d 左右的培养,能正常分化出不定芽,而对照组几乎百分之百污染,其中有 80%是真菌与细菌复合感染。原因可能是香蕉的维管组织非常发达,采用 75%的乙醇浸泡消毒处理,

表 1 香蕉吸芽初代培养污染率

Table 1 Infection rate in primary culture for common banana buds

	污染 Infection	处理 Treatment*					对照 Control
		A	B	C	D	E	
污染率 Infection rate (%)	细菌 By bacteria	60	5	0	0	70	100
	真菌 By fungi	10	5	0	0	80	80
成活率 Survival rate (%)		5	90	80	10	0	0

*A、B、C 和 D 处理分别是将 1、5、10 和 15 g 的灵芝在 1 000 ml 的蒸馏水中煮 2 h,处理 E 用 10 g 的灵芝在 1 000 ml 的蒸馏水中浸泡过夜。A, B, C and D represent treatments with 1, 5, 10 and 15 g of *Ganoderma* pieces boiled in 1 000 ml distilled water for 2 h, respectively, while E represents treatment with 10 g *Ganoderma* pieces soaking in 1 000 ml distilled water for one night without boiling. 每个处理接种 20 瓶。Twenty culture flasks were used for inoculation in each treatment.

很难清除维管组织中的内源性细菌感染。本试验结果表明灵芝浸出液对细菌有强烈的抑制作用,同时对培养材料也有一定的负面影响。

2.3 香蕉增殖苗抑菌效果

将已分化出芽点的组织块转接于处理 C 配制的继代培养基中, 每瓶接种 3 块 2 cm³ 左右的组织块, 2 d 后, 选出无真菌污染的材料 100 瓶, 另选择未污染的无灵芝浸出液的材料 100 瓶作为对照, 分别接种大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、灰色链霉菌、土壤根癌农杆菌、酿酒酵母。将这些细菌制成细菌悬液 10 ml, 测定 OD₂₈₀ = 0.5, 接种至培养基中, 分别于第 2 天、第 5 天、第 7 天、第 10 天刮取表面约 1 cm 厚的培养基, 加入 10 ml 无菌水制成悬液, 静置 5 min 滤去固体培养基, 在分光光度计中测定其 OD 值, 结果见表 2。

通过单因子成对比较试验, 将处理与对照进行比较, 除酵母菌以外, 其他各种细菌在灵芝浸出液中均受到显著的抑制作用, 紫外分光光度计测定结果显示, OD 值差异均达到显著或极显著水平, 同时随着培养时间的延长, 抑菌效应愈显著。

灵芝浸出液对革兰氏阴性细菌的抑制效果要强于革兰氏阳性细菌, 但对真菌的抑制效果不显著。尤其值得关注的是灵芝浸出液对土壤根癌农杆菌有强烈的抑制作用, 因此在香蕉的转基因操作过程中, 可消除农杆菌在继代培养过程中的影响。

2.4 灵芝浸出液对香蕉生长分化的影响

设计一个对比实验, 分别采用处理 C 和未加灵芝浸出液的培养基, 从初代培养开始跟踪观察, 一直考察八代并统计最后出苗数。原始接种瓶数均为 30 瓶, 每瓶接种 3 块组织块, 25 d 后分别统计出芽数。灵芝浸出液培养基最终出苗为 245 000 株, 而未用灵芝浸出液配制的培养基最终出苗 152 000 株, 原因主要为污染率问题, 前者平均每代污染率为 0.2%, 且主要为真菌类污染, 后者为 1.5%。

从第三代开始, 考察每个组织块新的出芽数, 在转入生根培养基后, 考察每株生根数, 其结果见表 3。

从表 3 可见, 灵芝浸出液培养基每代的芽点数要少于对照, 并达到 10% 的显著水平, 说明灵芝浸出液对芽的生长有一定的抑制作用, 但灵芝浸出液对生根数无任何影响, 同时由于降低了污染率, 最终出苗数高于对照, 在大规模种苗生产实践中具有一定的参考意义。

3 讨论

组织培养中降低污染率是工厂化生产种苗的关键, 采用诸如升汞, 次氯酸钠等消毒液处理, 在处理浓度及处理时间上较难掌握, 而对于一些内源性污染材料, 就更显得无能为力。香蕉是一类维管束组织非常发达的外植体材料, 接种后 20 d 都可出现细菌污染, 因此采用灵芝浸出液结合表面消毒处

表 2 灵芝浸出液对培养基中微生物的抑制作用

Table 2 Effect (OD value) of culture medium supplemented with *Ganoderma* extract (GLE) on inhibition of microorganisms

培养天数 Days of culture	灵芝浸出液 GLE				对照 Control				t 值 t value
	2	5	7	10	2	5	7	10	
大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i> I	0.35±0.02	0.26±0.04	0.02±0.01	0.01±0.01	0.56±0.03	0.78±0.03	0.82±0.04	0.85±0.04	4.06* t _{0.01,3} =4.54 t _{0.05,3} =2.35
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	0.42±0.03	0.25±0.05	0.21±0.07	0.18±0.04	0.52±0.02	0.64±0.02	0.73±0.05	0.78±0.07	3.67* t _{0.01,3} =4.54 t _{0.05,3} =2.35
灰色链霉菌 <i>Streptomyces griseus</i>	0.45±0.01	0.38±0.02	0.32±0.02	0.26±0.04	0.56±0.02	0.62±0.02	0.68±0.03	0.76±0.04	3.75* t _{0.01,3} =4.54 t _{0.05,3} =2.35
根癌农杆菌 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	0.18±0.02	0.08±0.01	0.02±0.01	0.01±0.01	0.52±0.02	0.73±0.05	0.8±0.02	0.8±0.02	6.095*** t _{0.01,3} =4.54 t _{0.05,3} =2.35
酿酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.54±0.01	0.63±0.01	0.72±0.02	0.86±0.02	0.56±0.01	0.65±0.01	0.71±0.01	0.83±0.01	1.59 t _{0.01,3} =4.54 t _{0.05,3} =2.35

表 3 灵芝浸出液培养基对香蕉生长分化的影响

Table 3 Effect of culture medium supplemented with *G. lucidum* extract (GLE) on shooting and rooting in banana

	处理C灵芝浸出液 GLE*	未加灵芝浸出液 Control	t值 t value
第三代出芽数 No. of shoots in F ₃	2.1+1.2	2.8+ 0.6	
第四代出芽数 No. of shoots in F ₄	4.6+ 0.8	6.3+ 0.2	
第五代出芽数 No. of shoots in F ₅	7.4+ 0.2	8.5+ 0.8	
第六代出芽数 No. of shoots in F ₆	12.6+ 0.5	14.5+ 0.4	
第七代出芽数 No. of shoots in F ₇	20.3+ 1.5	25.8+ 1.6	1.59*
			t _{0.05,4} =2.132
			t _{0.1,4} =1.533
第八代生根数 Root No. in F ₈	2.6+ 0.5	2.5+ 0.2	0.17
			t _{0.1,9} =1.383
			t _{0.2,9} =0.883

*The extract was obtained by 10 g of *G. lucidum* pieces in 1 000 ml distilled water boiled for two hours.

每种处理随机抽取 10 瓶进行统计。Ten culture flasks were randomly selected calculation in each treatment.

理,将大大提高组织培养的成功率。

试验表明灵芝浸出液的功能主要是杀灭细菌,且对培养材料并没有大的影响,继代培养材料能正常分化出不定芽,同时,由于降低了污染率,最后出苗数略高于对照。因此灵芝浸出液可用于香蕉工厂化生产中污染率的控制。金贻郎等^[7]的研究表明,灵芝含有麦角甾醇、有机酸、氨基葡萄糖、多糖类、树脂、甘露醇等有效成分,对肺炎链球菌、甲型链球菌、白色葡萄球菌等均有显著的抑制作用,具有广谱的抗细菌作用,本实验表明灵芝浸出液对革兰氏阴性及阳性细菌均有显著的抑制作用,因此,可作为香蕉组织培养中理想的细菌抑制剂。

在香蕉转基因工程操作中,常利用根癌农杆菌介导外源基因的转移,在后续的继代培养中,常用抗生素抑制农杆菌的影响,转基因材料的生长受到一定的影响^[8-10]。本实验结果表明灵芝浸出液对根癌农杆菌有显著的抑制作用,因此,可作为抗生素的替代材料应用到香蕉的转基因工程中。

灵芝浸出液虽然有强烈的杀灭细菌作用,但对真菌类抑制效果不显著,因此还有待寻找真菌抑制剂,这样就能使组织培养在一个开放的系统中进行,并能够防止封闭式组织培养中常见诸如玻璃化的现象,使组织培养成为一项更普通的技术而得到广泛的应用。

参考文献

[1] Zhu G L (朱广廉). Sterilization of the explant in plant tissue

culture [J]. Plant Physiol Commun(植物生理学通讯), 1996, 32 (6):444-449.(in Chinese).

- [2] Cai X H(柴向华), Li J(李军), Zhang X S(张秀珊). Prevention of the contamination during plant tissue culture [J]. Chin J Trop Agri(热带农业科学), 2003, (6):8-10.(in Chinese)
- [3] Han M L(韩美丽), Lu R S(陆荣生), Huang H Y(黄华艳), et al. Vitrification of shoots bacterial contamination and their countermeasures during the subculture of *Spathiphyllum kochii* [J]. Guangxi For Sci(广西林业科学), 1999, 28(1):16-20.(in Chinese)
- [4] Xu S H(徐淑红), Xu X L(徐香玲). Bacteriostatic agent selection in plant genetic transformation [J]. Bull Bot Res(植物研究), 2004, 36 (4):26-28.(in Chinese)
- [5] Wang Z C(王志成), Liu M X(刘明稀), Yi Z L(易自力). Preliminary study on controlling contamination of plant tissue culture by bacteriocide [J]. J Changsha Univ Elect Power (Nat Sci)(长沙电力学院学报 自然科学版), 2004, (1):31-34.(in Chinese)
- [6] Zhou J H(周俊辉), Li H B(李宏斌), Yang Y Q(杨耀强). Preliminary study on the contamination identifying and prevention in plant tissue culture [J]. J Microbiol(微生物学杂志), 2002, 26(2): 22-26.(in Chinese)
- [7] Jin Y L(金贻郎). The Dictionary of the Natural Nutriment Resource in China [M]. Beijing: Changzheng Press, 1993. 78-79. (in Chinese)
- [8] Jia S R(贾士荣). The effect on transgenic callus for antibiotics [J]. Chin Bull Bot(植物学通报), 1992, (2):3-15.(in Chinese)
- [9] Zhang Y M(张艳敏), Guo B H(郭北海), Ding Z S(丁占生). Transgenic wheat regeneration through *Agrobacterium* mediated transformation systems [J]. Acta Agri Boreali Sin(华北农学报), 2003, (3):35-38.(in Chinese)
- [10] An L J(安利佳), Jiang C Y(姜长阳). The Introduction of Plant Tissue Culture [M]. Shenyang: Liaoning Teacher University Press, 1997. 68-72.(in Chinese)