

北美海棠组培脱菌技术的优化

黄俊轩, 刘艳军, 杨静慧, 李建科, 李 雕

(天津农学院 园艺园林学院, 天津 300384)

摘 要:以北美海棠消毒处理的一年生枝腋芽为试材,采用组织培养技术与抗生素结合的方法,研究了不同抗生素种类与浓度以及不同的处理时间对试材脱菌效果的影响。结果表明:北美海棠外植体在含有羧苄青霉素($250\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) + 卡那霉素($50\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的MS培养基中获得的脱菌苗生长效果最好;经过在增殖培养基上的增殖筛选和3次继代培养,获得的再生苗生长势稳定率最高;经过对再生脱菌苗的细菌学检测,基本没有微生物出现;该试验结果可以为北美海棠的优质苗木繁殖提供技术支撑。

关键词:北美海棠;组织培养;抗生素;脱菌

中图分类号:S 687.603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)06-0113-04

北美海棠(North American *Begonia*)属蔷薇科苹果属落叶乔木,它是由美国和加拿大的育种者从自然杂交的海棠中选育出来的,已经在北美种植和推广了几十年,因此被称为北美海棠。北美海棠具有很高的观赏价值,不但其花和果实的色彩丰富,许多品种的叶色和枝条亦随着季节的不同呈现出不同的色彩,所以,北美海棠已成为北方气候条件下被广泛应用的一种重要的园林植物。随着我国对园林业的大力发展和扶植,市场需要越来越多的优质绿化苗木,北美海棠已经成为优良的绿化资源,并逐渐成为苗木市场的主推品种^[1]。

北美海棠品种较多,其中“凯尔斯”海棠为重瓣花的新品种,“红玉”海棠为垂枝的品种,“王族”海棠叶色紫红,是观花观叶的优秀品种。北美海棠的花期一般在4月下旬,花色极为丰富,主要有白色、粉色、紫色、红色等色系,且有不同色深及冷暖色调差异^[2]。同时,北美海棠抗性强、耐寒、耐瘠薄,管理容易,在园林绿化中适于列植于道路两旁,亦可孤植、丛植于草坪上或点缀于岩石旁、湖水边^[3]。

北美海棠作为重要的园林绿化植物新品种,关于它的繁殖方法报道较多。其中大多采用嫁接与扦插

方式进行繁殖^[4-6],虽然该繁殖方法简便易行,但受到季节限制及成活率等因素的影响,在生产上很难保证向市场提供充足的北美海棠苗木。组培研究主要是快繁研究。关于组培脱菌研究的报道很少^[7-11]。而获得无菌的北美海棠组培苗不但可以加快其快繁速度,还可以提高苗木的质量。因此,该研究拟通过生物技术手段,建立一套北美海棠脱菌快繁体系,以期为其生产提供充足的优质组培苗木,从而促进这一园林植物的推广与栽植。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试北美海棠栽培品种“红宝石”取自天津农学院校园及附近绿地。

1.2 试验方法

1.2.1 北美海棠组培苗的获得 剪取北美海棠一年生休眠枝条,用含有去污剂的自来水将其表面清洗干净。将枝条剪成长度为2~3 cm的小段,每段都带有一个腋芽。先用70%的酒精将枝条切断浸泡30 s,然后将其浸泡到40%的安替福民水溶液中10 min,将消毒过的枝条用无菌水反复冲洗5次,以便去除残留的消毒剂。将洗净的无菌枝条用无菌的滤纸吸干表面水分,接种到准备好的1/2MS固体培养基上进行培养。培养基中加入 $10\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GA_3 ,促进腋芽的尽快萌发,培养温度为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$,黑暗或弱光下培养。

1.2.2 北美海棠组培苗的脱菌处理 经过大约3周

第一作者简介:黄俊轩(1973-),男,广东河源人,硕士,副教授,现主要从事园林植物教学与科研等工作。E-mail:huangjunxuan@sina.com.

基金项目:天津市科委资助项目(14ZXNZNC0040)。

收稿日期:2016-12-07

的培养,北美海棠腋芽开始陆续萌发,其中一些出现细菌或真菌污染,将污染的枝条及时剔除,将生长正常的腋芽在超净台中切下,分别接种到含有不同抗生素的 MS 培养基上进行脱菌培养。所有培养基附加 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的琼脂粉。每种抗生素的使用浓度为其抗菌的标准使用浓度,分别为硫酸链霉素 $40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;羧苄青霉素 $250\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;庆大霉素 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;卡那霉素 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。试验采用 100 mL 的广口三角瓶,加入 35 mL 的固体培养基。每个处理接种 5 瓶,每瓶接种 8~10 个腋芽。培养条件为温度 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$,光照强度 $2\ 000\text{ lx}$,光照时间为 24 h 。经过 30 d 的培养,对不同处理的北美海棠组培苗的生长情况进行统计分析,找到适宜的抗生素组合。其中生长势为腋芽生长的相对比较结果。

1.2.3 北美海棠组培苗的再生继代培养及脱菌效果的检测 将脱菌处理的北美海棠苗按照生长优势进行筛选,并将其转移到 $\text{MS}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ BA}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IAA}+30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖的分化培养基上进行增殖培养。在转移过程中记录每种组培苗对应的抗生素处理组合,经过 30 d 的培养,统计组培苗的增殖系数及再生芽的生长情况。此过程的培养条件与前面脱菌处理相同。增殖系数=增殖出的总芽数/接种的腋芽数。

1.2.4 继代培养 将增殖培养筛选出的最佳处理在 MS 上进行继代培养,经过连续 3 次继代后,选择

生长稳定的健壮组培苗作为脱菌组培快繁的原始材料。采用全营养型培养基对筛选出的组培苗做微生物检测,进一步验证其脱菌的可靠性。

2 结果与分析

2.1 北美海棠抗生素抑菌试验

由表 1 可知,不同抗生素组合对北美海棠腋芽生长的影响不同。首先采用硫酸链霉素、羧苄青霉素、庆大霉素或这 3 种抗生素两两混合使用时,除了羧苄青霉素+庆大霉素组合较低外,腋芽的存活率都将近 100% ,这可能与接种的腋芽生理状态有关。而且从腋芽生长高度、颜色及生长势来看基本正常,说明北美海棠对于这 3 种抗生素表现较强的适应性;然而当采用卡那霉素或卡那霉素与其它 3 种抗生素组合使用时,腋芽的存活率明显下降,而且腋芽生长高度、颜色及生长势都表现出较差的水平,说明卡那霉素对于北美海棠腋芽具有一定的伤害作用,严重影响了植株正常的生长。其次,从组合情况来看,在卡那霉素与其它抗生素组合使用时,会比单独使用卡那霉素对腋芽造成的伤害要大,说明在卡那霉素存在下,再附加其它抗生素会加剧抗生素对植物的损害。虽然抗生素对植物具有一定的伤害作用,但也会对寄生在植物组织内的微生物具有更强的伤害作用,因此,将存活下来的每个处理中生长相对较好的腋芽保留下来,进行进一步的筛选,以便获得真正的脱菌苗。

表 1 不同抗生素组合对北美海棠腋芽生长的影响

Table 1 Influence of different antibiotic combination on the axillary bud growth of North America Begonia

处理 Treatment	接种腋芽成活率 Survival rate of axillary bud/ %	腋芽生长平均高度 Average height of axillary bud/cm	腋芽颜色 Color of axillary bud	生长势 Growth potential
硫酸链霉素 Streptomycin	100	4.3	绿色	强
羧苄青霉素 Carbenicillin	100	4.1	绿色	强
庆大霉素 Gentamicin	100	5.2	绿色	强
卡那霉素 Kanamycin	67	3.1	黄色	弱
硫酸链霉素+羧苄青霉素 Streptomycin+Carbenicillin	98	3.9	绿色	中
硫酸链霉素+庆大霉素 Streptomycin+Gentamicin	99	4.3	绿色	中
硫酸链霉素+卡那霉素 Streptomycin+Kanamycin	43	2.6	黄色	弱
羧苄青霉素+庆大霉素 Carbenicillin+Gentamicin	81	3.3	黄绿色	中
羧苄青霉素+卡那霉素 Carbenicillin+Kanamycin	29	3.4	黄色	弱
庆大霉素+卡那霉素 Gentamicin+Kanamycin	40	2.9	黄色	弱

2.2 经过抗生素处理的腋芽增殖培养结果

将抗生素处理过的腋芽转接到增殖培养基上,经过 30 d 的培养,这些腋芽出现不同程度的增殖,并在生长表现上出现较大的差异。由表 2 可知,单独采用抗生素处理的腋芽在增殖培养中生长情况较差,不但增殖系数相对较低,同时增殖芽生长速度与生长势都较差,这说明在单一抗生素作用下,外植体

很难彻底摆脱微生物的影响。而采用组合式的抗生素处理可以收到较好的结果,尤其是在采用卡那霉素与其它 3 种抗生素组合处理后的腋芽,不但增殖系数高,而且生长健壮,表现出较强的生长势。这说明多种抗生素组合利于植物材料脱菌处理。在该试验中卡那霉素起到关键作用,但在卡那霉素抑菌处理时,腋芽的生长也受到了抑制,说明其对微生物与

植物都具有伤害作用。一般硫酸链霉素、羧苄青霉素、庆大霉素对于细菌有较好的杀灭作用,而对于真菌的效果较差,卡那霉素不但抑制细菌,也对真菌有

很好的抑制效果,因此在不造成植物材料伤害的前提下采用适当的浓度会起到较好的脱菌效果。

表 2 不同抗生素处理对北美海棠腋芽增殖生长的影响

Table 2 Influence of different antibiotic combination on the axillary bud proliferation of North America Begonia

处理 Treatment	增殖系数 Coefficient of proliferation	增殖芽平均高度 Average height of proliferation bud/cm	增殖芽生长势 Growth potential of proliferation bud
硫酸链霉素 Streptomycin	3.5	2.1	弱
羧苄青霉素 Carbenicillin	4.4	2.3	弱
庆大霉素 Gentamicin	3.9	1.9	弱
卡那霉素 Kanamycin	4.1	3.2	中
硫酸链霉素+羧苄青霉素 Streptomycin+Carbenicillin	4.5	2.0	弱
硫酸链霉素+庆大霉素 Streptomycin+Gentamicin	4.9	3.3	中
硫酸链霉素+卡那霉素 Streptomycin+Kanamycin	6.9	3.1	强
羧苄青霉素+庆大霉素 Carbenicillin+Gentamicin	5.1	1.7	中
羧苄青霉素+卡那霉素 Carbenicillin+Kanamycin	7.3	2.9	强
庆大霉素+卡那霉素 Gentamicin+Kanamycin	6.2	3.9	强

2.3 脱菌的北美海棠组培苗的继代筛选及微生物检测结果

经过增殖筛选出的健壮北美海棠组培苗接种到 MS 培养基上继续培养,经过 3 次继代培养,一直保持较强生长势的组培苗被进一步选择下来,经微生物学检测,这些组培苗都没有发现有微生物产生。这些选择下来的组培苗均来源于卡那霉素与 3 种抗生素组合处理的腋芽,因此,结合前面增殖培养结果,确定采用羧苄青霉素+卡那霉素进行脱菌为最佳方案。

3 讨论

在该试验中,采用抗生素作为植物材料的脱菌手段,其效果很好。这是一些常用消毒剂无法实现的,分析原因主要因为:第一,使用抗生素可以在不造成组培材料伤害的情况下实现微生物的杀灭作用。第二,使用抗生素可以准确控制其用量,不会因操作不当造成植物材料死亡。第三,采用抗生素可以较长时间对植物材料中的微生物进行抑制与杀灭。

在进行抗生素脱菌处理时应注意以下几个问题:一是要合理使用抗生素的用量。每种抗生素在杀菌作用时都有一个适宜的用量,在实际应用中还应对抗生素的实际作用浓度进行测试,因为抗生素的作用会因生产批次或保存时间等因素的影响而出现下降的现象;二是在进行抗生素培养基制作时应注意培养基在加入时抗生素的温度,因为较高的温度会造成抗生素的分解,因此要尽量在培养基没有凝固前的最后时刻加入才能保证抗生素的作用效果最好;三是要有所选择地采用不同抗生素组合进行

脱菌处理。要选择对真菌与细菌都起作用的组合,也要注意抗生素的抗菌谱,如有些只对革兰氏阳性菌起作用,而有一些只对细菌起作用,也有一些虽然抗菌谱很广,但单独使用作用不大,因此要合理搭配其它种类的抗生素。因此在实际操作中要根据脱菌效果确定合理抗生素用量及组合。

经过对北美海棠组培苗的脱菌处理,获得了生长健壮、繁殖效果良好的北美海棠试管苗,这些试管苗可以直接用于北美海棠的组培快繁。现将具体的操作步骤总结如下:以北美海棠栽培苗的一年生枝条为外植体,在经过表面消毒后,将其接种到含有 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA₃ 的 1/2MS 培养基上进行培养,得到表面没有污染的腋芽后,将其转移到含有羧苄青霉素($250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)+卡那霉素($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的 MS 培养基上,从中筛选出生长健壮的组培苗;将生长健壮的组培苗转移到增殖培养基 MS+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA+ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA+ $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖上,从中筛选出增殖效果最好的再生苗。再经过对再生苗 3 次继代培养,筛选出的组培苗就是脱菌的北美海棠组培苗。

参考文献

- [1] 刘朝华,储博彦.北美海棠优良品种简介及栽培技术[J].河北林业科技,2014(1):102-103.
- [2] 姜永峰,唐世勇,邢英丽,等.北美海棠品种及在北方园林景观中的应用[J].农业科技通讯,2014(10):277-278.
- [3] 史立华.北美海棠产业化栽培技术[J].现代农业科技,2014(21):158-159.
- [4] 常黎民.北美海棠嫁接繁育技术试验研究[J].青海农林科技,2013(4):8-9,50.
- [5] 赵志新.北美海棠微扦插繁殖试验[J].天津农业科学,2012(1):123-125.

- [6] 李进章.北美海棠嫁接繁殖方法研究[J].中国园艺文摘,2012(8):119-121.
- [7] 李庆芝,刘振伟,史秀娟.组织培养技术在生姜上的应用[J].北方园艺,2011(3):201-203.
- [8] 王敬东,石磊,陈晓军,等.转基因马铃薯内源农杆菌脱除[J].安徽农业科学,2011(36):209-211.
- [9] 张正国,张丽莉,卢翠华,等.农杆菌介导 BADH 耐盐基因转化马铃薯的研究[J].作物杂志,2012(3):28-31.
- [10] 王敬东,石磊,陈晓军,等.转基因马铃薯内源农杆菌脱除[J].农业科学与技术(英文版),2011(11):1576-1579.
- [11] 黄玉玲.铁皮石斛和紫皮石斛在组培过程中细菌污染的防治研究[J].云南农业科技,2012(4):14-16.

Optimization of Technology for North American *Begonia* Taking off Bacteria by Tissue Culture

HUANG Junxuan, LIU Yanjun, YANG Jinghui, LI Jianke, LI Diao

(College of Horticulture and Landscape Architecture, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384)

Abstract: The North American *Begonia* annual branches axillary buds with disinfection treatment were used as test materials. By the method of tissue culture technology combined with antibiotic, different kinds of antibiotics and concentration was studied in order to find the effect of taking off the bacteria. The results showed that on the surface of MS medium containing carboxy benzyl penicillin ($250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) + kanamycin ($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), the effect of taking off the bacteria was the best; after screened on the multiplication culture medium and three times successive transfer culture, the stability factor of growth potential for regeneration seedling was the highest. After the bacteriological tests of the vaccine for the regeneration seedlings, microbes could not be found on the culture medium. The test results would be the technical support for North American *Begonia* quality nursery stock breeding.

Keywords: North American *Begonia*; tissue culture; antibiotics; taking off the bacteria

今春油菜生产应严防六件事

知识窗

1. **严防根系提前衰老** 防止油菜春后根系提前衰老,必须全面清理油菜"三沟",即主沟、围沟、厢沟,彻底排除油菜田积水,为防止大雨积水倒灌油菜田,还应疏通排灌沟渠。
2. **严防叶片早衰** 春后油菜生长快,对养分需求量大,油菜在开花前叶色明显落黄视为缺肥、早衰。始花期每 667 m^2 施用碳酸氢铵 $15 \sim 20 \text{ kg}$ (要在叶片露水干后施用),并喷施 2% 浓度的磷酸二氢钾溶液,荚果期喷施 $2\% \sim 3\%$ 浓度的过磷酸钙溶液。
3. **严防早苔早花** 出现早苔早花应及时摘除,争取次生苔高产,摘苔摘花时间应选晴天上午,摘后每 667 m^2 施用 $5 \sim 7 \text{ kg}$ 尿素。
4. **严防倒伏** 油菜发生倒伏严重影响产量和品质,春后围绕保根保叶抓管理,在做好培土和排渍的同时,对油菜生长旺盛的丘块,在油菜苔期每 667 m^2 用 15% 的多效唑 50 g 兑水 50 kg 喷施。
5. **严防病虫害** 油菜春后病虫害防治措施,一是清除植株下部病叶、老叶,二是在菌核病、霜霉病、病毒病始发期,每 667 m^2 用 25% 咪鲜胺或 50% 多菌灵 150 g 兑水 50 kg 喷施。
6. **严防花而不实** 甘蓝型油菜对硼极为敏感,油菜花而不实是因缺硼而导致的一种生理性病害,当油菜进入苔蕾期和初花期时,分别喷施一次硼肥溶液,一般每 667 m^2 用硼砂 100 g (溶于水后)兑水 50 kg 各喷施一次。

(摘自:中国兴农网)