

文章编号:1673-0747(2008)03-0020-03

山农一号在北海道黄杨组织培养中的应用

杨亚亚¹, 麻东梅², 许 兴²

(1. 宁夏大学 生命科学学院, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021)

摘 要:针对北海道黄杨(*Euonymus japonicus* Thunb)组织培养过程中内生菌污染严重问题,使用山农一号进行杀菌和抑菌实验,结果表明:山农一号 I 型能够有效对外植体进行杀菌和抑菌,山农一号 II 型添加在培养基中能有效抑制北海道黄杨组织培养过程中的内生菌。其中北海道黄杨茎段经山农一号 I 型消毒后接种到含山农一号 II 型的培养基中,杀菌、抑菌效果最佳,并且山农一号 I 型和 II 型对不定芽分化和外植体的生长无抑制作用。

关键词:北海道黄杨;组织培养;山农一号

中图分类号:Q93-334

文献标志码:A

北海道黄杨(*Euonymus japonicus* Thunb)系卫矛属卫矛科植物,原产自日本北海道札幌市,别名正木,为大叶黄杨的栽培品种,是目前唯一能在-23.9℃的气温条件下生存的常绿阔叶乔木^[1]。该树树姿挺拔,四季长青,极具观赏和开发价值,是北方园林中的优良树种。北海道黄杨的繁殖多以扦插法(单芽扦插法和叶片扦插法)为主,繁殖系数低^[2]。在北海道黄杨组织培养中,因其自身携带的内生菌较多,常出现严重的污染问题。本实验在北海道黄杨组织培养过程中使用山农一号进行杀菌和抑菌,能有效降低内生菌的污染,为建立良好的北海道黄杨组织培养体系,进行转基因分子育种工作奠定基础,为其工厂化生产提供技术保证,对推广该树种和不断培育新品种具有重要意义。

1 实验

1.1 材料

北海道黄杨由宁夏永宁县安宁园林绿化有限公司提供。山农一号 I 型和 II 型抑菌剂购自济南普朗特生物科技有限公司。

1.2 培养基

以 $\rho(\text{MS}+6\text{-BA})=1.5\text{ mg/L}+\rho(\text{NAA})=0.5\text{ mg/L}$ 为腋芽诱导培养基,附加 $\rho(\text{蔗糖})=30\text{ g/L}$, $\rho(\text{琼脂粉})=7\text{ g/L}$, $\text{pH}=5.8$ 。

1.3 方法

(1)取带腋芽的北海道黄杨茎段或顶芽,剪去叶片,留叶柄基部,用质量分数为0.1%的洗衣粉水轻轻刷洗枝条后,在流水下冲0.5~1.0 h,修剪成2 cm左右的小段,供接种使用。

(2)将(1)中洗干净的茎段先用酒精浸泡30 s,再用 $w(\text{升汞})=0.1\%$ 分别进行3, 6, 9, 12, 15 min 消毒后直接接种到腋芽诱导培养基中,20 d 后观察污染和生长情况。

(3)在超净工作台上,将(1)中洗干净的茎段在含有 tween-20 的无菌水溶液中浸泡10~15 min,无菌水冲洗后,在 $\varphi(\text{山农一号 I 型})=4\%$ 中(添加1/4 MS 无机盐)浸泡8, 9, 10, 11 h, 设4个时间梯度实验。不用冲洗,直接接种到事先灭菌的培养基 I ($\rho(\text{MS}+6\text{-BA})=1.5\text{ mg/L}+\rho(\text{NAA})=0.5\text{ mg/L}+\varphi(\text{山农一号 II 型})=0.1\%$) 和培养基 II ($\rho(\text{MS}+6\text{-BA})=1.5\text{ mg/L}+\rho(\text{NAA})=0.5\text{ mg/L}$) 中进行对比实验,观察并记录实验结果。

(4)将(1)中洗干净的茎段先用 $\varphi(\text{酒精})=70\%$ 消毒30 s,无菌水冲洗2~3次,再用 $w(\text{升汞})=0.1\%$ 消毒,无菌水冲洗5~6次,每次3 min,分别接种到培养基 I 和 II 中,30 d 后观察污染情况。

(5)将实验过程中有污染的北海道黄杨茎段采取以下方式处理:对于真菌性污染,将污染材料用软

收稿日期:2007-11-05

基金项目:国家973项目“重要耐盐、耐低温基因的生物学整合效应分析研究”(2006CB100106)

作者简介:杨亚亚(1982-),男,甘肃静宁人,硕士研究生,主要从事植物基因工程研究。

通信作者:许兴,教授,博士生导师,主要从事作物逆境生理与生物技术育种研究,Email: xuxingscience@126.com.

毛刷在流水下冲洗干净,在 φ (山农一号 I 型) = 50% 中(添加 1/4 MS 无机盐)中浸泡 10 min;对于细菌或混合性污染材料,在 ρ (柠檬酸) = 0.6 g/L 和 φ (山农一号 I 型) = 100% 1 : 1 配成的溶液中浸泡 10 min. 经以上处理的材料取出后,不用冲洗,直接接种到培养基 II 中,20 d 后观察污染情况.

(6)培养室温度为 24 ℃,每天光照 12 h,光照强度为 1 500~2 000 lx.

2 结果与分析

2.1 升汞消毒时间对内生菌污染和材料的影响

北海道黄杨茎段经酒精和升汞处理后接种到腋芽诱导培养基中,20 d 后所得结果如表 1 所示. 随着升汞消毒时间的延长,外殖体污染越小,同时外殖体褐化的情况也越严重,这主要是由升汞造成的损伤,褐化严重的直接导致外殖体死亡.

表 1 升汞消毒时间对内生菌污染和材料的影响
Tab. 1 Effect of mercuric chloride disinfection time to the endogenous fungus pollution and material

升汞消毒时间/min	接种数	污染数	污染率/%	存活数	存活率/%	外殖体褐化情况
3	50	50	100.0	50	100.0	无褐化
6	51	37	72.5	50	100.0	无明显褐化
9	48	31	64.6	46	95.8	轻微褐化
12	53	30	56.6	48	90.5	有明显褐化
15	47	23	48.9	42	89.4	褐化严重
18	49	12	24.5	27	55.1	褐化严重

2.2 山农一号 I 型对内生菌污染和外殖体的影响

将洗净的北海道黄杨茎段用山农一号 I 型处理后,接种到培养基 I 和 II 中,30 d 后所得结果如表 2 所示. 经过山农一号 I 型处理后的外殖体,相比经升汞处理的外殖体污染率有显著降低,存活率有所提高. 另外经山农一号 I 型处理的材料,表面褐色 2 周后逐渐褪去,外殖体没有明显损伤.

表 2 山农一号 I 型对内生菌污染和外殖体的影响
Tab. 2 Effect of Shannong No. 1 type I processing to the endogenous fungus pollution and material

培养基	处理时间/h	接种数	污染数	污染率/%	存活数	存活率/%
I	8	29	2	6.9	29	100.0
I	9	28	1	3.6	27	96.4
I	10	31	1	3.2	30	96.8
I	11	33	2	6.1	29	87.9
II	8	30	5	16.7	30	100.0
II	9	32	5	15.6	32	100.0
II	10	29	3	10.3	27	93.1
II	11	30	1	3.3	27	86.7

2.3 酒精和升汞对内生菌污染和外殖体的影响

将用酒精和升汞处理后的茎段一分为二,分别

接种到培养基 I 和 II 中,30 d 后所得结果如表 3 所示. 经酒精和升汞处理的材料同时接种到培养基 I 和 II 中,在含山农一号 II 型的培养基中能有效抑制污染,相比之下,不含山农一号 II 型的培养基中污染明显严重.

表 3 酒精和升汞处理对内生菌污染的影响
Tab. 3 Result of alcohol and mercuric chloride processing

培养基	处理时间/min	接种数	污染数	污染率/%
I	6	31	12	38.7
I	9	28	10	28.0
I	12	30	8	26.7
I	15	32	8	25.0
II	6	29	22	75.9
II	9	30	19	63.3
II	12	27	15	55.6
II	15	33	16	48.5

2.4 山农一号 I 型对污染材料的影响

把有污染的材料按方法(5)处理后,接种到腋芽诱导培养基中,20 d 后结果如表 4 所示. 污染材料经山农一号 I 型处理后污染率明显降低,因此山农一号 I 型对真菌和细菌都具有明显的除菌作用.

表 4 山农一号 I 型对污染材料的影响
Tab. 4 Effect of Shannong No. 1 type I on pollution material

污染菌种	处理数	处理后污染数	污染率/%
细菌	20	3	15.0
真菌	19	4	21.1
细菌、真菌	22	6	27.2

3 结论与讨论

组织培养中的污染由 2 方面原因造成,一是实验材料自身携带的菌引起污染,这种污染不能被一般的消毒方法所清除;二是组织培养过程中操作不当引起污染. 北海道黄杨是含内生菌较多的植物,茎组织中心有髓组织,其细胞间隙大,在用酒精和升汞进行外殖体消毒时,通常会对外殖体造成严重损伤,从而影响其再生能力和繁殖速度. 本实验在北海道黄杨组织培养中使用山农一号能有效杀死细菌和真菌,对污染具有较好的抑制作用,并且对外殖体没有造成很大损伤.

多数情况下,一种抗生素只能抑制菌的生长而不能将其完全杀死^[3]. 无论是细菌还是真菌,一种抗生素往往只能对其中的一种或几种菌有效,组织培养过程中,抗生素浓度低了效果差,而浓度高了又容易对植物产生伤害^[4],并且使用抗生素容易引起抗性,多种抗生素混用往往引起不相容性. 此外,抗生素一般不稳定,遇酸碱或加热易分解,失去活性. 而

山农一号是一种广谱生物杀菌剂,能够杀死各种细菌和真菌细胞,阻止孢子萌发,体积分数较高时,能够消除对内生菌的污染,其活性成分能够穿透菌类细胞壁,抑制部分重要代谢循环的酶类活性,抑制柠檬酸循环和电子传递等,同时能阻断一些单糖的氨基酸从培养基到菌类细胞的转运,是针对抑制多种菌类代谢物活性而设计的,因此在组织培养过程中,不会引起菌类的抗药性,可多代使用。

山农一号能有效针对真菌和细菌进行杀菌和抑菌,在组织培养中能大大降低外殖体内生菌的污染,有效提高无菌苗的繁殖速度,同时对芽的分化和根的生成没有显著影响,对获得无菌苗有很大帮助,在其他组织培养中值得推广,尤其对内生菌较多、濒危植物材料难以获得的植物组织培养中具有重要作用。本实验结果表明:北海道黄杨茎段经山农一号 I 型消毒并接种在含山农一号 II 型的培养基中,杀菌、

抑菌效果最为理想;但山农一号的价格相对昂贵,提高了大规模生产成本,用酒精和升汞消毒后接种到含山农一号 II 型的培养基中同样可获得相对理想的结果,既能够充分获得无菌苗,又可以降低成本。

山农一号具有 4 种类型:外殖体型、分化生根型、共生菌专用型和瓶内催化型,根据不同组织培养的目的,可选用不同的类型。本实验未对后 2 种剂型进行实验,还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 杨合亭,魏林,李怀义.北海道黄杨单芽快速繁殖技术[J].林业实用技术,2002(5):23-24.
- [2] 王合心.北海道黄杨引种表现[J].中国林业,2002(4):35.
- [3] 翟建中,顾梅俏.长春蔓组织培养中污染的防除[J].森林病虫害通讯,1999(4):30-32.
- [4] 周俊辉.植物组织中的内生菌污染问题[J].广西植物,2003,23(1):41-47.

Application of Shannong No. 1 in tissue culture of *Euonymus japonicus* Thunb

Yang Yaya¹, Ma Dongmei², Xu Xing²

(1. School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, China;

2. School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: In order to prevent and control the severe pollution in tissue culture of *Euonymus japonicus* Thunb, Shannong No. 1 was applied to conducted the sterilization effect. The results showed that Shannong No. 1 type I could sterilize and eliminate endophytic bacteria effectively, Shannong No. 1 type II added in the medium to effectively inhibit endophytic bacteria in the tissue culture of *Euonymus japonicus* Thunb. The stem segments of *Euonymus japonicus* Thunb. used Shannong No. 1 type I disinfection after inoculation into contain Shannong No. 1 type II in the culture medium, the effect of inhibitory and sterilization was optimum, and Shannong No. 1 type I and II there be no inhibitory to the bud differentiation and growth of explant.

Key words: *Euonymus japonicus* Thunb; tissue culture; Shannong No. 1

(责任编辑、校对 魏 乐)

(上接第 19 页)

Research of fertilization technique for maize in sandy soil

Gong Yuqin, Bai Jinhong, Ma Xiaohong, Wang Meiqin

(Yinchuan Centre Station for Popularization of Agricultural Techniques, Yinchuan 750004, China)

Abstract: The influences of the combination of nitrogen, phosphorus and potassium, optimal dosage and time and proportion of nitrogen on maize yield in sandy soil in Ningxia irrigation region were researched. The results showed that the maize yield with whole fertilizers had no differences compared with that deficient of phosphorus and potassium. Nitrogen was the key factor in controlling yield. The applying amount of nitrogen fertilizer was suitable for 315 kg/hm² for two times in sandy soil. 50% was applied as basic fertilizer and other 50% was applied as topdressing fertilizer during the later half of June.

Key words: maize; sandy soil; fertilization technique

(责任编辑、校对 安春华)