

女王竹芋共生菌的抑制及离体培养体系的建立

张永平^{1,2}, 乔永旭¹, 陈超¹, 李小六¹, 陶猛¹

(1. 唐山师范学院生命科学系, 河北唐山 063000; 2. 浙江大学农业与生物技术学院, 浙江杭州 310029)

摘要: 以女王竹芋分蘖芽为材料, 通过在培养基中添加抗生素来抑制共生菌造成的污染, 建立了再生体系。结果表明, 抗生素能有效抑制分蘖芽中共生菌的繁殖, 不同种类抗生素及其浓度对共生菌的抑制效果存在较大差异, 庆大霉素较其他抗生素效果好, 庆大霉素最佳抑菌浓度为 60 mg/L。适合分蘖芽增殖的培养基为 MS + 4.0 mg/L 6-BA + 0.02 mg/L NAA, 增殖系数为 3.64; 适合生根的培养基为 1/2MS + 2 mg/L NAA, 平均每株根数为 8.7 条, 平均根长 5.07 cm。生根后的幼苗, 移栽成活率高达 90%。

关键词: 女王竹芋; 共生菌; 抑制; 组织培养

中图分类号: S682.1⁺61.01 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-1302(2007)04-0105-03

女王竹芋(*Calathea maui Queen*)是竹芋科肖竹芋属观叶植物, 性耐阴, 叶形叶色图案美妙, 适合盆栽或庭园阴蔽处美化, 为室内观赏植物的上品。近年来, 女王竹芋越来越受到市场青睐, 仅凭进口已远远无法满足市场需要。女王竹芋是靠分蘖繁殖, 速度较慢, 同时由于病毒病等原因, 在种植过程中退化和逐渐死亡的现象较为严重, 致使许多引进的名贵品种逐渐减少^[1], 因此采取组织培养繁殖女王竹芋成为较合理的方法。但组织培养过程中, 由于共生菌的存在, 大大增加了组织培养的难度, 再生体系很难建立^[2-5]。目前关于女王竹芋的组织培养和共生菌的抑制尚无人研究。基于此, 本试验选用女王竹芋分蘖芽为试验材料, 通过在培养基中添加抗生素抑制共生菌的生长, 以期建立起完整的再生体系, 为女王竹芋的大量繁殖提供技术参考。

1 材料与方 法

1.1 供试品种

所用品种女王竹芋(图 1), 由唐山师范学院花卉示范基地提供。

1.2 试验材料

取女王竹芋分蘖产生的分蘖芽(图 2), 除去芽体周围的杂质, 先用洗衣粉水浸泡 2 h, 然后用自来

水冲洗干净, 再依次用 75% 酒精和 0.1% 升汞消毒 30 s 和 8 min, 无菌水冲洗 5~6 遍, 然后在无菌操作台上去除芽体表皮, 然后将分蘖芽切到 0.5~1.0 cm 待用。

1.3 共生菌的抑制与芽的诱导

将已消毒的分蘖芽接种到含有不同浓度抗生素的培养基上, 每种培养基接 30 瓶, 每瓶 1 个芽, 重复 3 次。光照 12 h/d, 光照强度 2 000 lx, 培养温度(25 ± 1) °C。分析比较抗生素的种类和浓度对分蘖芽共生菌的抑制效果。培养基配方分别为: (1) CK: MS + 6-BA 4 mg/L + NAA 0.2 mg/L; (2) MS + 6-BA 4 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 庆大霉素 20 mg/L; (3) MS + 6-BA 4 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 青霉素钠 20 mg/L; (4) MS + 6-BA 4 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 硫酸链霉素 20 mg/L; (5) MS + 6-BA 4 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 卡那霉素 20 mg/L; (6) MS + 6-BA 4 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 庆大霉素 40 mg/L; (7) MS + 6-BA 4 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 庆大霉素 60 mg/L; (8) MS + 6-BA 4 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 庆大霉素 80 mg/L。各培养基均添加 30 g/L 蔗糖, 6 g/L 琼脂, pH 值 5.8。

1.4 芽的增殖

筛选出适合芽体诱导的抗生素的种类和浓度, 将分蘖芽接入含有一定浓度该抗生素的 MS 培养基中进行增殖。芽的增殖培养基为: (9) MS + 6-BA 2 mg/L; (10) MS + 6-BA 4 mg/L; (11) MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.2 mg/L; (12) MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.02 mg/L; (13) MS + 6-BA 4 mg/L + NAA 0.2 mg/L; (14) MS + 6-BA 4 mg/L + NAA 0.02

收稿日期: 2007-03-02

作者简介: 张永平(1978—), 女, 山西晋城人, 博士生, 从事设施园艺植物生理学研究。E-mail: zh-yongping@163.com。通讯作者: 乔永旭, 硕士, 讲师, 主要从事农业生物技术科研与教学工作。E-mail: qiaoyx123@163.com。

mg/L。各培养基均添加 30 g/L 蔗糖, 6 g/L 琼脂, 60 mg/L 庆大霉素, pH 值 5.8。各处理接种芽数及培养条件同上。20 d 后调查芽的增殖情况。

1.5 根的诱导

生根培养基设 4 种处理: (15) 1/2MS; (16) MS; (17) 1/2MS + NAA 2 mg/L; (18) MS + NAA 2 mg/L。各培养基均添加 30 g/L 蔗糖, 6 g/L 琼脂, 60 mg/L 庆大霉素, pH 值 5.8。选取 2~4 cm 的增殖后的芽体, 转移到 4 种培养基上诱导生根, 每种培养基接 5 瓶, 重复 3 次, 接种 30 d 后统计根系生长情况。根长出 3 cm 后, 洗去根部杂质, 移栽到经高温消毒的蛭石培养基上, 保持湿度并遮阳, 10 d 后进行正常的水肥管理, 30 d 后观察成活情况。

2 结果

2.1 抗生素对共生菌的抑制

2.1.1 抗生素种类对共生菌的影响 如表 1 所示, 抗生素能显著降低分蘖芽体周围培养基污染的比例和程度。接种 5 d 后, 芽体周围出现污染现象, 随着培养时间的延长, 污染物均由白色转为不同程度的

黄色。对照培养基除了 1 瓶以外, 其余全部污染, 接种 15 d 后, 污染物转为深黄色, 严重抑制了分蘖芽体的生长。添加抗生素后, 污染率大大降低, 其中庆大霉素的抑菌效果最好, 污染率较青霉素钠、硫酸链霉素和卡那霉素分别降低了 6.67、3.33 和 6.67 个百分点, 较对照明显降低。不同抗生素对污染的影响程度也存在差别, 从接种后 5~15 d 这段时间内, 添加庆大霉素的菌斑和颜色变化不大, 其次为添加卡那霉素的菌斑, 变化最大的是添加青霉素钠和硫酸链霉素的菌斑, 接种 15 d 后, 污染严重的菌斑明显抑制了分蘖芽的生长。因此, 庆大霉素是抑制分蘖芽中共生菌繁殖的理想抗生素。

表 1 不同种类抗生素对共生菌的抑制效果

培养基编号	抗生素种类	污染率 (%)	污染程度		
			5 d	10 d	15 d
(1)	无	96.67	++	+++	++++
(2)	庆大霉素	80.00	+	+	+
(3)	青霉素钠	86.67	+	++	+++
(4)	硫酸链霉素	83.33	+	++	+++
(5)	卡那霉素	86.67	+	++	++

注: +轻度污染; ++中度污染; +++重度污染; ++++严重污染。



图1 女王竹芋 (*Calathea maui Queen*)

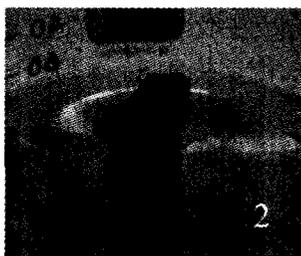


图2 女王竹芋分蘖芽



图3 女王竹芋芽的诱导

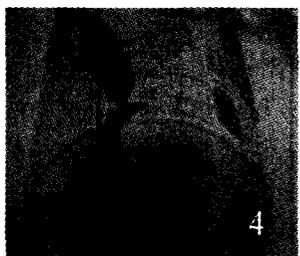


图4 女王竹芋芽的增殖



图5 女王竹芋丛生芽的诱导

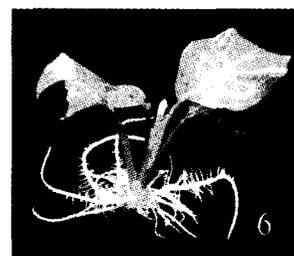


图6 女王竹芋试管苗生根

2.1.2 抗生素浓度对共生菌的影响 如表 2 所示, 随着庆大霉素浓度的增加, 共生菌污染状况得到有效抑制。接种 5 d 后对照的污染率最高, 达 73.33%; 添加 80 mg/L 庆大霉素的污染率最低, 仅为 16.67%, 其次为添加 60 mg/L 庆大霉素的培养基。随着培养时间的延长, 培养基的污染程度逐步加深, 20 d 后趋于稳定, 其中以添加 60 mg/L 庆大霉

素的污染率最低, 其次为添加 80 mg/L 庆大霉素的, 二者的抑菌效果明显好于其他浓度处理。考虑到较高浓度的抗生素往往对外植体有一定的损伤作用, 并且在一定程度上抑制丛生芽的生长, 因此 60 mg/L 庆大霉素为本试验合适的浓度。

2.2 女王竹芋再生体系的建立

2.2.1 芽的增殖 如表 3 所示, 在 (9)~(14) 6 种

表2 抗生素不同浓度对共生菌的抑制效果

培养基 编号	庆大霉素浓度 (mg/L)	污染率(%)			
		5 d	10 d	15 d	20 d
(1)	0	73.33	93.33	96.67	96.67
(2)	20	36.67	56.67	80.00	80.00
(6)	40	33.33	53.33	76.67	80.00
(7)	60	20.00	46.67	70.00	70.00
(8)	80	16.67	50.00	73.33	73.30

培养基中,分蘖芽都有不同程度的增殖(图3~图5)。在只加6-BA的培养基中芽体生长较弱,叶色偏黄,卷叶程度高。添加NAA之后,芽体长势明显好转,叶色偏绿,卷叶程度较轻。另外6-BA和NAA浓度的比值影响芽体的繁殖系数。当6-BA/NAA的比值较低时,芽体的繁殖系数较低(分别为2.15和2.47),比值增加后,芽体的繁殖系数分别增加了54%和47%。其中以(14)培养基中的芽体繁殖系数最高,达3.64。所以(14)培养基无论是对于芽体增殖,还是对于芽体生长,都是非常理想的。

2.2.2 试管苗的生根 丛生芽分株后转入生根培

表3 培养基附加的激素种类及比例对女王竹芋分蘖芽增殖的影响

培养基 编号	激素种类及浓度 (mg/L)	繁殖系数	生长状况
(9)	6-BA 2, NAA 0	2.51	叶嫩绿色,卷叶
(10)	6-BA 4, NAA 0	2.84	叶黄绿色,卷叶
(11)	6-BA 2, NAA 0.2	2.15	叶黄绿色,微卷
(12)	6-BA 2, NAA 0.02	3.32	叶黄绿色,微卷
(13)	6-BA 4, NAA 0.2	2.47	叶绿色,伸展
(14)	6-BA 4, NAA 0.02	3.64	叶绿色,伸展

培养基中,15 d后部分试管苗生根(图6),新生根为乳白色。其中(17)培养基最好,生根最早,30 d时生根数为8.7条,生根率达到95.4%,平均根长5.07 cm,并且根系白嫩,生长健壮,无论是生根率还是长势均明显优于其他3种培养基;其次为(18)培养基(表4)。另外,在没有添加NAA的情况下,1/2MS培养基中的生根率高于MS培养基,说明较少的营养元素更有助于刺激根系发生。添加NAA之后,试管苗的生根率明显上升,适当浓度NAA促进根系发生。

表4 培养基激素对女王竹芋试管苗生根的影响

培养基 编号	培养基种类与激素	生根率 (%)	生根数 (条)	根长 (cm)	生长状况
(15)	1/2MS	87.5	7.6	4.32	根白嫩,细弱
(16)	MS	83.6	7.1	4.58	根白嫩,细弱
(17)	1/2MS + NAA 2 mg/L	95.4	8.7	5.07	根白嫩,健壮
(18)	MS + NAA 2 mg/L	91.8	8.3	4.85	根白嫩,健壮

2.2.3 试管苗的移栽 试管苗生根后,洗净根系,栽植到消过毒的蛭石培养基上,用塑料薄膜保湿,上面盖遮阳网,喷水3次/d,保持湿度。10 d后打开盖膜,喷施2%的氮肥,每10 d施肥1次,直至植株成活。成活率达到90%,并且生长健壮。

3 讨论

由于竹芋分蘖芽中存在共生菌,在培养基上往往大量繁殖造成污染,严重影响了组织培养中芽体的生长和分化^[6],所以竹芋类植物的再生体系至今都很难建立^[7]。本研究则通过在培养基中添加抗生素等办法,有效地抑制了共生菌的繁殖,在此基础上,建立了比较理想的女王竹芋的再生体系,并且筛选出了抑制共生菌的最佳的抗生素种类及其浓度,为女王竹芋的组培快繁提供了技术支持。

参考文献:

- [1]王四敏. 竹芋和三色竹芋的试管繁殖研究[J]. 四川师范大学学报,1996,19(2):116-119.
- [2]陈莉,窦秉德,阮元元,等. 甜玉米成熟胚的组织培养及其植株再生研究[J]. 江苏农业科学,2006(6):75-78.
- [3]Xiao Y P, Hu Y Q, Wang Z Z. Effect of kanamycin on induction and growth of *Stachys sieboldii* callus[J]. Acta Bot Bor - Occid Sin,2003,23(2):318-322.
- [4]蒋中海. 蕨类植物组织培养研究进展[J]. 江苏农业科学,2005(5):100-103.
- [5]侯占铭,满都拉. 美丽竹芋的组织培养[J]. 植物生理学通讯,2000,36(5):438.
- [6]邓君萍,颜双春,侯佩,等. 不同抗生素种类及浓度对麻疯树培养的影响[J]. 应用与环境生物学报,2005,11(2):156-159.
- [7]侯占铭,满都拉. 紫背竹芋的组织培养[J]. 植物生理学通讯,2001,37(2):135.