

浅层液体结合固体培养对红叶樱花组培壮苗生长的影响

李艳敏,王利民,师曼,高杰,符真珠,董晓宇,张晶,袁欣,王耀塘
(河南省农业科学院园艺研究所,郑州 450002)

摘要:为解决红叶樱花试管苗茎短缩、生长弱的问题,采用浅层液体结合固体培养方法,开展试管苗壮苗培养研究,主要研究浅层液体培养基中有机物质、用量及pH值对红叶樱花苗高、干鲜比及叶绿素的影响。采用浅层液体结合固体培养的方法可以促进红叶樱花试管苗生长,添加20 mL液体培养基1/2MS+BA 0.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L+肌醇300 mg/L,pH 6.0为宜,苗高为4.81 cm,干鲜比为0.088,叶绿素含量为2.064 mg/(g·FW)。研究完善了红叶樱花组培快繁技术体系,为其种苗工厂化生产提供了技术支持,为其他品种试管苗壮苗培养提供借鉴。

关键词:红叶樱花;液体培养基;有机物质;pH值;苗高

中图分类号:S685.99

文献标志码:A

论文编号:casb17120123

Shallow Liquid Combined with Solid Culture Affect the Seedling Growth of *Prunus serrulata* 'Royal Burgundy' in Vitro

Li Yanmin, Wang Limin, Shi Man, Gao Jie, Fu Zhenzhu, Dong Xiaoyu, Zhang Jing, Yuan Xin, Wang Yaotang
(Horticulture Institute of Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002)

Abstract: To solve the problem of stalk shortening and poor growth of *Prunus serrulata* 'Royal Burgundy' in vitro, the study of seedling culture in vitro was carried out by using shallow liquid combined with solid culture method. The effect of organic substance, amount and pH value of liquid medium on seedling height, fresh and dried ratio, and the amount of chlorophyll were studied. The results showed that the test tube seedlings grew better in the liquid culture medium, which was 1/2MS+ BA 0.5 mg/L+ IBA 0.5 mg/L+ inositol 300 mg/L, pH value of 6.0, the seedling height was 4.81 cm, the dry matter ratio was 0.088, the chlorophyll content was 2.064 mg/(g·FW). This study improves the tissue culture and propagation technology of *P. serrulata* 'Royal Burgundy', and provides technical support for in vitro seedling cultivation.

Key words: *Prunus serrulata* 'Royal Burgundy'; liquid culture medium; organic substance; pH value; the seedling height

0 引言

红叶樱花属蔷薇科李属,叶片在春夏秋三季呈现红色,花春季开放,玫瑰色重瓣,是一个既可观花又可赏叶的优良彩叶树种^[1]。近年来笔者对红叶樱花开展了组培快繁技术研究^[2-3],结果表明利用茎段进行红叶樱花组织培养,可以获得较好的增殖效果,但是存在试

管苗莲座化生长、茎短缩、生长势弱、不利于生根培养等问题。为完善红叶樱花组培快繁技术,获得大量生长整齐、健壮的优质试管苗,提高生根苗比例和移栽成活率,实现工厂化生产,开展了红叶樱花壮苗培养技术研究。

在植物组培过程中,获得生长健壮具有一定高度

基金项目:河南省科技攻关项目“红叶樱花工厂化生产中外植体萌芽及壮苗培养”(162102110103);河南省科技攻关项目“优质观赏树种楸树组培中愈伤组织发生的调控研究”(182102110079)。

第一作者简介:李艳敏,女,1978年出生,河南汤阴人,副研究员,硕士,主要从事园林植物组培快繁技术研究。通信地址:450002 河南省郑州市花园路116号 河南省农业科学院园艺研究所, Tel:0371-65742009, E-mail:minzili@126.com。

通讯作者:王利民,男,1971年出生,河南温县人,副研究员,博士,主要从事园林植物栽培繁育技术研究。通信地址:450002 河南省郑州市花园路116号 河南省农业科学院园艺研究所, Tel:0371-65742009, E-mail:wanglimin923@126.com。

收稿日期:2017-12-28, **修回日期:**2018-03-15。

的试管苗,是进行生根培养的基础,通过调整基本培养基、向培养基中添加有机物质、调整激素配比和pH值等方法可达到试管苗壮苗效果^[4-7];在增殖阶段改变培养方式,利用液体易于被吸收的原理,采用液体震荡培养^[8-9]、液体浅层培养^[10-12]等方法可以促进试管苗增殖,提高试管苗苗高,利于生根培养。对红叶樱花而言,由于增殖茎段小,单独使用液体培养,容易浸没在液体培养基中,造成通气不良,不利于茎段的生长,因此本研究采用浅层液体结合固体培养方法,在固体培养基上加入浅层液体,以红叶樱花试管苗为材料进行壮苗培养,研究浅层液体中分别添加肌醇、水解乳蛋白、水解酪蛋白及蛋白胨等有机物质对红叶樱花壮苗培养的影响,以及浅层液体添加量、pH值对试管苗生长的影响,以期获得红叶樱花组培壮苗,完善红叶樱花组培快繁技术体系,同时为其他植物的组培壮苗研究提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为红叶樱花试管苗,试验于2016年10月—2017年5月在河南省花卉研究与发展中心组培实验室进行。

1.2 试验方法

在试验过程中,红叶樱花生长的固体培养基为改良MS+BA 0.5 mg/L+ NAA 0.05 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L,浅层液体培养基为1/2MS+ BA 0.5 mg/L+ IBA 0.5 mg/L,先将液体培养基倒入固体培养基上,然后将红叶樱花试管苗接入培养瓶中,放在培养间生长。

试验选取的有机物质种类为水解酪蛋白(casein acid hydrolysate, CH)、水解乳蛋白(lactoalbumin hydrolysate, LH)、肌醇和蛋白胨4种,将有机物质分别添加到浅层液体培养基中,添加量均为300、400、500 mg/L,采用双因素随机试验;浅层液体用量设置为10、15、20、25、30 mL/瓶,采用单因素随机试验;浅层液体pH值分别为5.6、5.8、6.0,采用单因素随机试验。以无添加的固体培养基上培养的试管苗作为对照。以上每个处理接种30瓶,每瓶10株,重复3次。

培养温度(25±2)℃,光照周期为8 h/d,光照强度2500 lx左右。培养30天后统计试验结果,从各处理中随机取12瓶试管苗,分别测定植株干鲜重和叶绿素含量,叶绿素含量采用丙酮提取法^[13]取整株叶片测定。

1.3 数据处理

所有数据采用DPS软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 有机物质种类及浓度对红叶樱花壮苗培养的影响

添加的有机物质种类及用量不同,对红叶樱花试管苗苗高、干鲜比及叶绿素含量有不同的影响(表1)。

从红叶樱花试管苗苗高看,添加有机物质的各处理的苗高均显著高于对照的苗高,其中Y7处理肌醇300 mg/L时苗高最高为4.39 cm,显著高于对照、蛋白胨、CH和LH各处理的苗高,肌醇3个处理的试管苗苗高在3.83~4.39 cm,处理之间差异不显著。

从干鲜比指标看,对照的干鲜比为0.083,添加4种有机物质,植株的干鲜比变化在0.071~0.109,各处理之间及各处理与对照之间差异不显著。添加CH时,

表1 有机物质种类及浓度对红叶樱花壮苗培养的影响

处理号	有机物质种类	用量/(mg/L)	苗高/cm	干鲜比	叶绿素/[mg/(g·FW)]
Y1	CH	300	3.06cd	0.109a	1.611ab
Y2		400	3.52bcd	0.091a	1.217b
Y3		500	3.39bcd	0.082a	1.459ab
Y4	LH	300	3.31cd	0.087a	1.234b
Y5		400	3.05d	0.083a	1.471ab
Y6		500	3.27cd	0.092a	1.263b
Y7	肌醇	300	4.39a	0.086a	1.927a
Y8		400	4.09ab	0.090a	1.676ab
Y9		500	3.83abc	0.081a	1.491ab
Y10	蛋白胨	300	3.27cd	0.076a	1.740ab
Y11		400	3.17cd	0.093a	1.556ab
Y12		500	3.03d	0.071a	1.396ab
CK	—	—	1.16e	0.083a	1.710ab

注:同列不同小写字母表示差异达显著水平($P<0.05$),下同。

植株干鲜比较高,在0.082~0.109之间。

从叶绿素含量看,对照的叶绿素含量1.710 mg/(g·FW),有机物质各处理的叶绿素含量在1.217~1.927 mg/(g·FW),说明有机物质对叶绿素含量的影响既有正影响又有负影响;CH和LH各处理中,叶绿素含量低于对照叶绿素含量,肌醇和蛋白胨中的Y7和Y10处理干鲜比分别为1.927、1.740 mg/(g·FW),高于对照,但是与对照之间差异不显著。

2.2 浅层液体用量对红叶樱花壮苗培养的影响

浅层液体添加量对红叶樱花壮苗培养也有一定影响。从表2中可以看出,在不同的添加量下,T1~T5各处理之间的苗高均显著高于对照CK苗高,其中T2、T3和T5处理苗高均在4.26~4.44 cm,显著高于T1和T4处理,T1处理苗高为3.73 cm,显著高于T4处理;植株干鲜比在0.077~0.086之间变化,各处理之间以及各处理与对照之间差异不显著;叶绿素含量在T1处理中最高为1.828 mg/(g·FW),其次是对照1.709 mg/(g·FW),再次是T3处理1.637 mg/(g·FW),三者之间差异不显著。综上,浅层液体添加量以T3为宜,即添加20 mL可以促进红叶樱花壮苗生长。

表2 浅层液体用量对红叶樱花壮苗培养的影响

处理号	添加量/(mL/瓶)	苗高/cm	干鲜比	叶绿素/[mg/(g·FW)]
CK	0	1.1d	0.083a	1.709ab
T1	10	3.73b	0.084a	1.828a
T2	15	4.43a	0.083a	0.973b
T3	20	4.26a	0.084a	1.637ab
T4	25	3.22c	0.077a	1.631ab
T5	30	4.44a	0.086a	1.425ab

2.3 浅层液体pH值对红叶樱花壮苗培养的影响

pH值对红叶樱花的组培苗生长影响显著,试验设计从pH 5.6调高至pH 6.0时,苗高、干鲜比、叶绿素含量呈现增加趋势。P3处理苗高最高为4.81 cm,干鲜比为0.088,均显著高于P1和P2处理,叶绿素含量为2.064 mg/(g·FW),与其他2个处理差异不显著。因此,浅层液体适宜pH 6.0。

表3 液体培养基pH值对红叶樱花壮苗培养的影响

处理号	pH值	苗高/cm	干鲜比	叶绿素/[mg/(g·FW)]
P1	5.6	3.30b	0.073b	1.602a
P2	5.8	3.76b	0.077ab	1.601a
P3	6.0	4.81a	0.088a	2.064a

3 结论

本研究以浅层液体结合固体培养的方式进行红叶樱花组培壮苗培养,筛选出了浅层液体培养基的成分、用量及合适的pH值。

(1)添加不同浓度有机物质的各处理苗高均显著高于对照苗高,干鲜比差异不显著,叶绿素含量差异显著。CK苗高为1.16 cm,各处理苗高在3.03~4.39 cm,其中以Y7处理最高为4.39 cm;CK的干鲜比为0.083,叶绿素含量为1.710 mg/(g·FW),Y7处理的干鲜比为0.086,叶绿素含量为1.927 mg/(g·FW),说明Y7处理(添加肌醇300 mg/L)适宜红叶樱花壮苗培养。

(2)浅层液体添加量试验中,CK苗高1.1 cm,显著低于各处理苗高(3.22~4.44 cm);T2、T3和T5处理苗高分别为4.43、4.26、4.44 cm,差异不显著;CK的干鲜比为0.083,T3和T5处理植株干鲜比分别为0.084、0.086,差异不显著;T1处理叶绿素含量最高为1.828 mg/(g·FW),其次是对照1.709 mg/(g·FW),再次是T3处理1.637 mg/(g·FW),差异不显著,综合分析,浅层液体添加量以T3处理即20 mL为宜。

(3)在不同pH值处理中,P3处理苗高、干鲜比、叶绿素含量最高,说明浅层液体培养基pH 6.0时最为适宜。

4 讨论

红叶樱花在组培过程中存在茎短缩、生长弱问题,造成能用于组培苗生根有效新梢数量少,严重阻碍了其组培快繁的规模化生产,这种现象在同科属的其他植物组培中也有报道^[14-17]。王永清^[14]在樱花离体培养时通过连续多次转管,经过4个月的培养茎才能伸长;在甜樱桃砧木和桃砧木离体快繁中,李洪雯等^[16-17]取不定梢短茎接种到增殖培养基中,培养3周后直接添加液体培养基再培养10天,不定梢高度明显增加,粗度也有一定增加。这种培养方式需要将瓶苗从培养间转移至超净工作台,添加液体培养基后再放回进行短时间培养,在流程上增加了一道工序,因此本研究对此培养方式进行了改进,将液体培养基在转接组培苗之前就添加到固体培养基上,通过在液体培养基中补充添加适当用量的有机物质,同样提高了组培苗苗高,增加了有效新梢数量,但却简化了工作流程,降低了组培苗被污染的风险,更适合红叶樱花组培规模化生产应用。

有机物质是一类对植物生长发育有重要影响的营养物质,参与植物体的新陈代谢,人们在长期的组培实践中发现,培养基中添加某些适当的有机添加物,能够促进植物生长发育,常用的有机添加物包括椰汁、香蕉汁、马铃薯汁等天然有机物质及蛋白胨、水解乳蛋白、

水解酪蛋白等人工提取物^[18]。植物品种不同,其生长发育过程中对有机物质的需求不同,在白及的壮苗培养中,香蕉泥对其组培苗生长影响最显著^[19];在霍山石斛试管苗生长中,以土豆泥对生长的促进效果最佳^[20];蛋白胨可以促进叶底红试管苗的生长^[21]。肌醇是一种水溶性B族维生素中的一种,参与植物生长发育的多个生理生化过程,在植物组培中作为营养附加物,有利于植株生长发育。在欧洲花楸增殖培养中,添加15 g/L肌醇可以使欧洲花楸组培苗生长稳定,增殖系数始终保持在9以上^[22];在钟花樱丛生芽诱导培养中,添加25 mg/L肌醇后,增殖分化最好,增殖系数最高,芽生长较壮^[15]。在本研究中,浅层液体中添加不同用量的水解酪蛋白、水解乳蛋白、肌醇和蛋白胨4种有机物质后,对红叶樱花组培苗高生长促进作用显著,以肌醇300 mg/L对红叶樱花苗高、干鲜比和叶绿素含量促进效果最好。

植物组织培养时,培养基pH值通过影响培养物的营养元素吸收、呼吸代谢、多胺代谢和DNA合成、植物激素进出细胞等作用直接或间接地影响愈伤组织形成及形态建成^[23],一般将培养基的pH值调整在一定范围内,以满足植物对生长的需要,不同种或不同品种植物对pH值的要求不同^[24],四倍体刺槐和二乔刺槐2个品种对pH值的要求差异很大,四倍体刺槐喜偏酸性,pH 5.6~6.0时增殖系数高,二乔刺槐喜偏碱性,pH 6.4为宜。pH值与钙离子浓度影响柚木苗高和矿质元素吸收^[25],在pH 6.0时适宜苗高生长,同条件下低至中等钙离子浓度有利于幼苗对氮、磷、镁、锰、锌、硼、铜等营养元素的吸收,较高的钙离子浓度有利于提高钾离子吸收的选择性及提高氮吸收量,幼苗对铁离子的吸收随着钙离子浓度的增加而下降。pH值对幼苗的苗高和生理代谢也有影响^[26],在pH 6.0时甘蔗幼苗株高最高,叶绿素、可溶性糖、可溶性蛋白含量最高,而相对电导率、丙二醛和脯氨酸含量最低,甘蔗蔗株的各种生理代谢高度协调。在本试验中,红叶樱花的苗高、干鲜比和叶绿素含量随pH值的升高而增加,在pH 6.0时均达到最高,为红叶樱花试管苗生长的适宜pH值。

参考文献

- [1] 鲁平,姚中华,徐冬云.几种适宜华中地区绿化用的彩叶新品种[J].西南园艺,2005,33(5):36-38.
- [2] 李艳敏,孟月娥,张玉,等.新优彩叶植物红叶樱花外植体采集及离体培养技术研究[J].河南农业科学,2012,41(9):127-130,142.
- [3] 王慧娟,孟月娥,王利民,等.红叶樱花组培苗移栽技术研究[J].现代农业科技,2011(21):218-219.
- [4] 蔡坤秀,陈振东,高洋帅,等.不同有机添加物对叶底红生根壮苗的影响[J].福建热作科技,2016,41(1):25-27.
- [5] 宋智琴,杨平飞,罗鸣,等.不同添加物对白及组培壮苗培养的影响[J].贵州农业科学,2016,44(3):138-140.
- [6] 毛芸芬,刘作易,金家兴,等.环草石斛试管苗壮苗培养的研究[J].种子,2005,24(6):21-22,44.
- [7] 张舵,杨艳敏,魏永祥,等.激素配比和pH值对蓝莓试管苗增殖生长的影响[J].北方果树,2015(3):13-14.
- [8] Tewary P K, Oka S. Simplified clonal multiplication of mulberry using liquid shake culture[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1999,3(4):223-226.
- [9] Tan Nhut, Duong, Teixeira da Silva, Jaime A. The importance of explant source on regeneration and micropropagation of Gladiolus by liquid shake culture[J]. Scientia Horticulturae, 2004,102(4):407-414.
- [10] 罗天宽,张小玲,陈珍,等.浅层液体培养在生姜脱毒苗快繁体系中的应用[J].中国农学通报,2006,22(4):75-77.
- [11] 林加根,林一心,张树河.白玉果蔗组培脱毒苗快繁技术研究[J].现代农业科技,2009(14):80,82.
- [12] 郑加协,李华东,甘勇辉.蜜宝菠萝组织培养及低成本快繁技术研究[J].果树学报,2005,22(1):27-30.
- [13] 邹琦.植物生理学实验指导[M].北京:中国农业出版社,2003:72.
- [14] 王永清,汤浩茹,邓群仙,等.樱花离体培养芽外植体的建立[J].四川农业大学学报,1997,15(3):341-344,387.
- [15] 闫道良,王贤荣,钦佩,等.钟花樱组织培养再生体系的建立[J].林业科技开发,2006,20(3):21-24.
- [16] 李洪雯,刘建军,邓家林,等.桃砧木GF667离体快繁技术体系研究[J].西北植物学报,2008,28(11):2226-2230.
- [17] 李洪雯,刘建军,陈克玲,等.CAB系列甜桃砧木离体快繁技术研究[J].西南农业学报,2007,20(3):481-485.
- [18] 李亮,张冬敏,雷华辉等.植物组织培养中有机添加物应用研究[J].宁夏农林科技,2012,53(2):28-30,34.
- [19] 宋智琴,杨平飞,罗鸣,等.不同添加物对白及组培壮苗培养的研究[J].贵州农业科学,2016,44(3):138-140.
- [20] 谢寅峰,徐丽,张志敏,等.几种有机添加物对霍山石斛试管苗生理特性的影响[J].西北林学院学报,2011,26(1):77-81.
- [21] 蔡坤秀,陈振东,高洋帅,等.不同有机添加物对叶底红生根壮苗的影响[J].福建热作科技,2016,41(1):25-27.
- [22] 黄立华,王占龙,于欣.欧洲花楸的组织培养和快速繁殖试验研究[J].中国新技术新产品,2009(9):212-213.
- [23] 曹新祥,韩小云.植物组织中的pH值[J].杭州师范学院学报:自然科学版,2003,2(1):60-63.
- [24] 黄茶英,刘青林.激素、通气和pH值对四倍体刺槐和二乔刺槐离体生长的影响[J].中南林学院学报,2003,23(5):38-41.
- [25] 周再知,徐大平,梁坤南,等.钙离子及pH值对柚木组培苗生长和矿质营养吸收的影响[J].中南林业科技大学学报,2009,29(3):1-5.
- [26] 刘光玲,陈荣发,田富桥,等.不同pH值对甘蔗幼苗生长和生理特性的影响[J].南方农业学报,2011,42(4):380-383.