

红叶石楠组织培养工厂化扩繁技术研究

邱国金¹, 史云光¹, 汤庚国²

(1. 江苏农林职业技术学院, 江苏 句容 212400; 2. 南京 林业大学, 江苏 南京 200137)

摘要: 以红叶石楠的侧芽和顶芽为材料进行组织培养试验。结果表明: 外植体用 0.1% HgCl₂ 消毒 10~12 min, 诱导培养基以 MS+0.05 mg·L⁻¹ NAA+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA 为佳, 芽增殖培养基以 MS+1.0 mg·L⁻¹ BA+0.1 mg·L⁻¹ 6-BA 为佳, 壮苗培养基以 MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA 为佳, 生根培养基以 1/2MS+1.0 mg·L⁻¹ IBA 为佳, 将生根苗移入温室的穴盘中, 基质以蛭石: 珍珠岩: 泥炭土=5: 3: 2 较好, 控制好室内的温度、光照和湿度, 成活率可达 90% 以上。

关键词: 红叶石楠; 外植体; 组织培养

中图分类号: S687 **文献标识码:** A

Study on Mass Reproduction of *Photinia Fraseri* through Tissue Culture

QIU Guo-jin et al.

(Jiangsu Polytechnic College of Agriculture and Forestry, Jurong Jiangsu 212400, China)

Abstract: The paper reports a tissue culture of *Photinia Fraseri* with its side-bud or top-bud. The results showed that the better sterilization is putting in 0.1% HgCl₂ solution for 10-15 min; the better inducement medium is MS+0.05 mg·L⁻¹ NAA+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA; the better buds multiplication medium is MS+1.0 mg·L⁻¹ BA+0.1 mg·L⁻¹ 6-BA; the better medium for strong seedling is MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA; the better medium for striking roots is 1/2MS+1.0 mg·L⁻¹ IBA; the better base soil is composed of vermiculite: pearlite: peat=5: 3: 2 after struck roots seedlings being transplanted to hole plates in greenhouse. The survival rate can be over 90% under well-controlled temperature and humidity.

Key words: *Photinia Fraseri*; Explant; Tissue culture

红叶石楠红罗宾 (*Photinia fraseri* Red Robin) 属蔷薇科石楠属常绿小乔木, 它于 1998 年从荷兰引入江苏农林职业技术学院后, 具有生长快、萌芽力强、耐修剪, 易于移栽和成型, 叶色可随叶片新老程度而变化等特点, 素有“红衣卫士”之美称^[1], 红叶石楠喜强光照, 也有很强的耐荫能力, 有较强的抗毒、滞尘功能, 可在大气污染较重地区栽植, 它在园林绿化中起到了其他树种不可替代的作用。对于生长表现良好、园林利用价值高, 但繁殖材料少的红叶石楠, 常规的有性繁殖受到繁殖材料数量 (红叶石楠为杂种, 在国内至今未见结实报道) 的限制, 很难满足市场的巨大需求量。^[2~4] 我们于 1999 年成立了红叶石楠研究开发小组, 通过试验研究已掌握了红叶石楠组织培养快速繁殖的关键技术, 在工厂化快繁的基础上已形成了产业化链, 基本可以满足市场增长的需要, 并在园林绿化工程中得到广泛的应用和推广。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

材料采自江苏绿苑园林绿化有限公司 1998 年从荷兰引进的红叶石楠品种“红罗宾”扦插苗。

1.2 试验仪器

药物天秤、电子天秤、高压消毒锅、冰箱、超净工作台、空调机、培养架、玻璃瓶、蛭石、珍珠岩、泥炭土等。

1.3 试验方法

1.3.1 材料处理

于晴天上午采集生长健壮无病虫害的新枝为外植体, 除去多余的茎叶, 用自来水冲洗干净, 备用。

1.3.2 初代培养

将洗干净的外植体置于超净工作台上, 用 75% 的酒精浸泡 15~30 s, 再用 0.1% 升汞消毒 10~12 min, 无菌水冲洗 4~5 次, 然后切取带一个腋芽或顶芽的茎段, 迅速接入培养基 (1) MS, (2) MS+1.0 mg·L⁻¹ BA+0.1 mg·L⁻¹ IBA 中, 每瓶接种一个外植体。

1.3.3 增殖培养

待诱导出的不定芽长至 2 cm 左右, 切下接入增殖培养基中进行增殖培养。增殖培养基分别采用 MS、1/2MS、B₂ 和 SH, 附加同浓度 (1.0 mg·L⁻¹ BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA) 的激素配比, 采用随机区组排列, 每瓶接种一个外植体, 每次 30 瓶, 每组重复 3 次, 25 d 后统计增殖倍数和芽苗高度。

1.3.4 生根培养

收稿日期: 2006-09-22 修回日期: 2006-10-15

作者简介: 邱国金 (1959-), 男 (汉), 江苏丹阳人, 副教授, 硕士, 主要从事园林树木的分类、园林树木的栽培教学和科研方面的研究。

通讯作者: 汤庚国, 教授, 博士生导师。Tel: 025-85427650; E-mail: ggtang1950@yahoo.com.cn.

基金项目: 镇江市科技成果示范推广项目 (NY2004032)

将增殖培养得 2 cm 以上的丛生芽截取 1.2~1.5 cm 茎段接入生根培养基中进行生根培养诱导不定根。生根培养基基本培养基为 1/2MS, 激素种类为 IAA, IBA, NAA, 质量浓度分别为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。用随机区组排列, 每瓶接种一个, 每次 30 瓶, 每组重复三次, 培养 25 d 后统计生根率和生根量。

1.3.5 培养条件

所有的培养基都加入 3% 的蔗糖和 0.7% 的琼脂。pH 值为 5.8~6.0。光照强度 $1500 \sim 2000 \text{ lx}$, 培养温度为 $22 \sim 28 \text{ }^\circ\text{C}$, 光照时间为 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

1.3.6 移栽炼苗

当芽长到 3 cm 以上, 根长到 1.5 cm 以上, 并有 2~3 条侧根时即可移栽炼苗。

2 结果与分析

2.1 外植体诱导结果

将灭菌的材料接种到诱导培养基 (1) 和 (2) 上, 15 d

左右芽点开始萌动生长, 腋芽及顶芽有新的绿点出现, 40 d 左右 (2) 上有大块的愈伤组织形成, 50 d 左右 (2) 上的芽点长成具 3~4 片叶的不定芽, 节间短, 叶色绿。(1) 培养基上芽生长缓慢。

2.2 芽的增殖培养结果

将诱导出的无菌丛芽分割, 切段接种于培养基 MS (BA1.0, NAA0.1)、1/2MS (BA1.0, NAA0.1)、 B_5 (BA1.0, NAA0.1)、SH (BA1.0, NAA0.1) 中进行增殖培养, 经过 25 d 的培养, 统计芽增殖数。对统计结果进行方差分析并进行显著性检验^[5], 结果见表 1。

由表 1 可以看出, 用 $MS + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ BA} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA}$ 进行增殖培养出来的芽苗粗壮, 增殖倍率较高, 增殖倍数可达 5.9 倍, 平均苗高可达 1.58 cm, 极显著地高于其他 3 个处理。

表 1 不同培养基芽增殖培养结果

Tab 1 The culture results of buds propagation in different culture medium

处理 Treatment	培养基 Culture medium	激素种类 The kind of hormone	高度 (cm) Height	增殖倍数 (倍) 及显著性 Breeding multiplication and the significance
A ₁ B ₁	MS	1.0BA+0.1NAA	1.58	5.9aA
A ₂ B ₁	1/2MS	1.0BA+0.1NAA	1.32	5.2bB
A ₃ B ₁	B ₅	1.0BA+0.1NAA	1.18	4.9bB
A ₄ B ₁	SH	1.0BA+0.1NAA	1.16	4.8bB

注: 1. 表中数据为 3 次重复的平均值。2. 大、小写字母不同分别表示 0.01 和 0.05 的差异显著 (下表均同)。

Note: 1. The data in table is average value with repeat three times. 2. Capital and small alphabet indicate respectively the significant difference of 0.01 and 0.05 (nether table is same alike)

2.3 生根培养

将生长健壮、增殖苗长至 2 cm 以上的有效苗分割接入生根培养基中, 用不同培养基激素种类 (A₁: IAA, A₂: IBA, A₃: NAA) 和不同激素浓度 (B₁: $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, B₂: $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, B₃: $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, B₄: $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 进行处理, 其结果见表 2。

由表 2 可以看出, 培养基处理间, A 处理、B 处理、A × B 处理的结果之间差异均达到了极显著水平。说明红叶石

楠生根培养应考虑激素的种类和质量浓度, 才有利于提高其生根率。在考虑主效应的同时, 还应考虑它们之间的交互效应。如在选择不同培养基的同时, 应考虑采用何种浓度, 在选择不同浓度的同时, 还要考虑采用何种培养基, 这样才能获得较高的生根率。试验中 A₂B₂ (IBA, 1.0) 即在 1/2MS 培养基中加浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 激素时的生根率和生根量均极显著地高于其它处理, 在本试验设计中是最佳配方。^[6]

表 2 不同激素种类和不同浓度生根培养结果

Tab 2 The culture results of rooting in different hormone and density

处理 Treatment	激素种类 The kind of hormone	激素浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Hormone's density	生根率 (%) 及显著性 Rooting rate and the significance	生根量 (根/株) 及显著性 Rooting number and the significance
CK		0	0	0
A ₁ B ₁	IAA	0.5	15.2 hH	1.06 fE
A ₁ B ₂	IAA	1.0	33.4 fF	1.21 eF
A ₁ B ₃	IAA	1.5	59.3 bcBC	1.35 cdBCD
A ₁ B ₄	IAA	2.0	52.9cdCD	1.44cBC
A ₂ B ₁	IBA	0.5	65.9bB	1.67bA
A ₂ B ₂	IBA	1.0	82.0aA	1.84aA
A ₂ B ₃	IBA	1.5	29.8gG	1.48cB
A ₂ B ₄	IBA	2.0	24.4gG	1.43cBC
A ₃ B ₁	NAA	0.5	43.6eDE	1.10eFE
A ₃ B ₂	NAA	1.0	50.5dCDE	1.25deCDE
A ₃ B ₃	NAA	1.5	42.0eE	1.44cBC
A ₃ B ₄	NAA	2.0	27.3gG	1.37cdBCD

2.4 移栽炼苗

根据我们的试验, 红叶石楠组培苗移栽可省略瓶内炼苗过程, 如能在温室中拧松瓶盖放置 3~5 d, 炼苗则更好, 但温度要控制在 20~30 ℃ 之间。如能在早春和秋冬移栽到温床上效果最佳。在江浙一带过渡苗床可建在普通单体塑料大棚内, 基质以蛭石:珍珠岩:泥炭=5:3:2 为好。温度应控制在 20~25 ℃ 之间, 湿度在移栽前后 3~5 d 控制在 95% 以上, 一周后控制在 85%~95% 左右, 并喷施 800~1 000 倍甲基托布津或百菌清, 每隔一周左右喷施一次, 20 d 即可成活, 成活率达 90% 以上。

3 结论

(1) 分化较好的芽增殖培养基为 MS+1.0 mg·L⁻¹ BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA, 将试管苗侧枝分割成 2~3 芽为一段接种于该培养基上, 10 d 后茎段叶芽萌动, 30 d 长成大量侧枝, 并有大量双生枝和三生枝产生。接种茎段形成具有 5~

8 侧枝的丛生苗, 平均增殖 5.9 倍。试管苗节间明显伸长, 幼嫩叶片茎秆均呈淡红色, 叶片大, 茎秆较粗, 组织不充实, 茎基部愈伤组织大。以后每 30 d 继代 1 次, 经 3~4 次继代试管苗出现玻璃化现象。^[7]

(2) 经增殖培养的试管苗每继代 3~4 次后转移到壮苗培养基 MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA, 40 d 后形成大量侧枝, 平均每茎段 4~6 侧枝, 侧枝平均长 1.8 cm, 平均增殖 3.1 倍, 基本无双侧枝或三侧枝。侧枝生长健壮, 组织充实, 叶色深绿, 基部愈伤组织小, 黄绿色, 无玻璃化现象。

(3) 当红叶石楠无根苗长到 2 cm 左右转移到生根培养基 1/2MS+1.0 mg·L⁻¹ IBA 培养。提高光照度到 2 500 lx, 延长光照时间到每天 16 h。一般经一周左右可见红色根生成, 15 d 后开始有根原基形成, 30~40 d 后根长 1~3 cm 时即可进行炼苗及驯化, 准备移栽。20~25 d 调查生根情况, 生根率达 66.3%, 每苗平均生根 1~2 条。^[8]

参 考 文 献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 林业科技出版社, 1998, 50 (1): 76-176.
- [2] 郑勇平. 红叶石楠 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2004: 1-4.
- [3] 陆铃娣. 中国蔷薇科一些属的种类修订 [J]. 植物分类学报, 2000, 38 (3): 276-281.
- [4] 吴中能, 于苏, 边艳霞. 合肥主要绿化树种滞尘效益研究初报 [J]. 安徽农业科学, 2001, 29 (6): 780-873.
- [5] 廖桂宗. 试验设计与抽样技术 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1990: 60-65.
- [6] 沈惠娟. 木本植物组织培养技术 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1992: 25-27.
- [7] Khan. A. A. Primary, preventive and permissive roles of hormones in plant systems [C]. Botanical Review, 1975, 41: 391-420.
- [8] Chen L P, Zhang M F. Efficient Plant Regeneration From Cotyledon-derived Protoplasts of Cytoplasmic Male-sterile Tuber Mustard (*Brassica juncea* coss. var *tumida* Tsen et lee) [J]. Acta Phytophysiologica Sinica, 2001 (5): 437-440.

(上接第 331 页)

3 讨论

(1) 本研究表明在合适的营养基质上, 盾壳霉可以产生几丁质酶。通过比较不同碳源(含双碳源)、氮源、pH 值因子、温度因子和时间因子对盾壳霉产生几丁质酶的影响, 得到了最佳产生几丁质酶的培养液。该培养液为改良的 SMCS 培养液, 其配方为: KH₂PO₄ 680 mg, K₂HPO₄ 870 mg, KCl 200 mg, NH₄NO₃ 1 g, MgSO₄·7H₂O 200 mg, CaCl₂ 200 mg, FeSO₄ 2 mg, ZnSO₄ 2 mg, MnSO₄ 2 mg, 葡萄糖 5 g, 几丁质

5 g, 加水 1 000 mL, 调 pH 值到 6.5。将该最佳培养液在 20 ℃ 恒温摇床上培养 15 d 可获得大量的几丁质酶。

(2) 不同的碳源和氮源等影响盾壳霉几丁质酶的产量, 说明这些物质对盾壳霉几丁质酶基因的表达具有调节作用。葡萄糖能有效诱导盾壳霉产生几丁质酶, 而几丁质的诱导率则较低, 但是在既有葡萄糖又有几丁质的培养液中, 几丁质酶活性高于只有葡萄糖的培养液。这说明对盾壳霉产生几丁质酶而言, 盾壳霉中产生的几丁质酶不仅具有诱导酶的特征, 还具有部分组成酶的特征。

参 考 文 献

- [1] 顾向阳. 一种测定土壤几丁质酶活性的方法 [J]. 土壤通报, 1994, 25 (6): 284-285.
- [2] Tu J C. Mycoparasitism by *Coniothyrium minitans* on *Sclerotinia sclerotiorum* and its effect on sclerotia germination [J]. Phytopathologische Zeitschrift, 1984, 109 (3): 261-268.
- [3] Jones D, Watson D. Parasitism and lysis by soil fungi of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary, a phytopathogenic fungus [J]. Nature, 1969, 224: 287-288.
- [4] Rodriguex-Kabana R. et al. The determination of soil chitinase activity; Conditions for assay and ecological studies [J]. Plant and Soil, 1983, 75: 95-103.
- [5] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. Anal. Chem. 1959, 3: 426-428.
- [6] Summer J B. A more specific reagent for the determination of sugar in urine [J]. Biol. Chem., 1925, 65: 393-395.