

许建民,王永平. 红叶石楠液体间歇浸没培养的初步探索[J]. 江苏农业科学,2014,42(4):63-65.

红叶石楠液体间歇浸没培养的初步探索

许建民,王永平

(江苏农林职业技术学院,江苏句容 212400)

摘要:采用间歇浸没培养装置对红叶石楠进行组培快繁研究,结果表明:在液体间歇浸没培养下,红叶石楠的株高、地上部鲜重和干重都比固体培养的高;液体间歇浸没培养下的红叶石楠积累的生物量接近传统固体培养的3倍;液体间歇浸没培养下红叶石楠的叶片水势比固体培养的低,但没有玻璃化现象发生;液体间歇浸没培养下,红叶石楠的继代和生根过程合二为一,因此可以缩短培养时间;在液体间歇浸没培养下,红叶石楠的气孔面积是固体培养下的3.2倍,气孔频度是固体培养的1.7倍。综合研究结果,间歇浸没培养方式相对于传统的固体培养在各项生理指标上均表现较好,可用于大规模培养红叶石楠。

关键词:红叶石楠;间歇浸没生物反应器;植物组织培养;组培苗;工厂化生产

中图分类号: Q813.1⁺² **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)04-0063-03

红叶石楠(*Photinia fraseri*)是光叶石楠(*P. glabra*)和石楠(*P. serrulata*)的杂交种,属于蔷薇科石楠属常绿阔叶小乔木或多枝丛生灌木,因其新梢和嫩叶鲜红而得名。红叶石楠生长速度快,且萌芽性强、耐修剪,可以根据园林需要栽培成不同的树形,因而在园林绿化上的用途广泛^[1-2]。目前红叶石楠的繁殖多采用扦插繁殖,但随着扦插代数增加,其叶色会变淡、变暗,且叶色不整齐,从而降低了其品质^[3-4]。利用植物组织培养技术可大规模生产优质种苗,大大提高商品的产量及质量,但传统的培养方式程序多、苗木成本高,且随着继代次数的增加,增殖系数降低,在工厂化生产方面的应用仍较少。间歇浸没培养是在液体培养的基础上发展的新型组培方式,主要依靠外在动力实现液体培养基的间歇式供给,间歇液体培养过程中的培养基物质交换速度快,植物组织产生的代谢物质不易在组织块周围积累,因此植物组织在液体培养基中的生长速度大于固体培养基,特别是在易发生褐变的花卉培养上效果明显。国外对液体间歇浸没培养的研究和应用较多,主要集中于玉簪^[5]、芭蕉^[6]、马铃薯^[7]等经济作物;国内有人对辰星草^[8]、甘蔗^[9]、马铃薯^[10]、三叶半夏^[11]等植物进行过初步研究,但关于红叶石楠的液体间歇浸没培养尚未见报道。本研究将利用液体间歇浸没培养技术开展对红叶石楠生长的研究,并对比传统的固体培养技术和液体间歇浸没培养技术在生长指标上的优劣,以期对红叶石楠的大规模工厂化生产提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为红叶石楠组培苗——红罗宾(*Photinia fraseri*)

收稿日期:2013-08-05

项目资助:江苏省科技支撑计划(编号:BE2011349);江苏省镇江市科技支撑计划(编号:NY2010023)。

作者简介:许建民(1981—),男,甘肃张掖人,博士研究生,讲师,研究方向为设施作物的生理生态。E-mail:cauee@163.com。

通信作者:王永平,男,江苏宜兴人,教授,研究方向园艺植物育种, Tel:(0511)87291229;E-mail:wyp1961@126.com。

“Red Robin”),由江苏农林职业技术学院组培室提供。

1.2 试验方法

选取在传统固体培养条件下生长一致的红叶石楠组培苗,分别接种至液体间歇浸没培养容器和传统固体培养容器内。在固体培养过程中,取300 mL的组培瓶作为培养容器,每个组培瓶中接种3株组培苗。液体培养基配方为:MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA。根据预试验结果设置培养的浸没频率为1 min/6 h;培养时间为45 d;培养室温度为(25 ± 2) °C,光照时间为12 h/d,光照强度为70 μmol/(m²·s)。每种培养方式设5个重复。

1.3 测定项目及方法

1.3.1 测定项目 在上述条件下培养45 d后测定组培苗的株高、茎粗、叶长、叶宽、叶面积、根长、根茎的干鲜重、根系活力、叶绿素含量、叶片水势、气孔特性参数(气孔长度、气孔宽度、气孔开度、气孔密度)等参数。

1.3.2 测定方法 株高、叶长、叶宽、根长采用直尺测量,茎粗用游标卡尺测定,叶面积用Photoshop图像处理法获得,根茎鲜重用电子天平称量,根系活力用TTC法测定,叶绿素含量采用舒展等的方法^[12],叶片水势用WP4C露点水势仪测定,组培瓶内的湿度用湿度传感器测定。

气孔观察采用指甲油印迹法,利用Olympus x51显微镜在40倍下观察并拍照,采用Image-Pro Plus软件进行气孔大小和气孔面积的测量,每个切片取5个视野统计气孔频度,每个视野测量5个气孔的长度、宽度、气孔面积。相关计算公式如下:

$$\text{单个气孔面积}(\mu\text{m}^2) = \text{长} \times \text{宽} \times \pi \times 1/4;$$

气孔频度(个/mm²) = 单位视野内的气孔数/单位视野的面积;

$$\text{气孔总面积}(\mu\text{m}^2) = \text{气孔密度} \times \text{单个气孔面积}。$$

2 结果与分析

2.1 不同培养方式对红叶石楠生长的影响

不同的培养方式对红叶石楠生长指标的影响不同。由表1可以看出:在液体间歇浸没培养下,红叶石楠的株高、地上

部鲜重和干重都比固体培养下的显著增加,但茎粗、叶片长、叶片宽与传统固体培养下相比没有显著差异。此外,液体间歇浸没下红叶石楠生物量(地上部鲜重)的积累约是传统固

体培养的2~3倍,说明液体间歇浸没培养方式能促进红叶石楠的生长和生物量的积累;液体间歇浸没培养下地上部含水率为75.43%,低于于固体培养下的77.98%。

表1 不同培养方式对红叶石楠生长的影响

培养方式	株高 (mm)	茎粗 (mm)	叶片长 (mm)	叶片宽 (mm)	叶面积 (mm ²)	地上部鲜重 (g)	地上部干重 (g)
固体培养	29.33 ± 4.51b	1.33 ± 0.15a	35.20 ± 2.65a	15.30 ± 2.17a	425.67 ± 93.63a	0.377 ± 0.047b	0.083 ± 0.006b
液体间歇浸没	83.67 ± 5.51a	1.07 ± 0.15ab	33.50 ± 3.95a	15.50 ± 1.91a	407.90 ± 69.58ab	0.875 ± 0.078a	0.215 ± 0.021a

注:同列数据后不同小写字母者表示差异显著($P < 0.05$)。下表同。

2.2 不同培养方式对红叶石楠叶绿素含量及水势的影响

由表2可以看出,培养方式不同对红叶石楠叶绿素含量的影响也不同。与传统固体培养相比,液体间歇浸没培养下红叶石楠叶片中叶绿素a的含量没有显著变化,叶绿素b的含量显著提高,叶绿素的总量也显著提高,因此认为液体间歇浸没培养有助于叶绿素的积累。

在液体间歇浸没培养条件下,培养容器内的空气湿度达到83%,而传统固体培养下培养容器内的空气湿度为65%,在这种情况下,液体间歇浸没培养中的红叶石楠处于水分胁迫中,叶片的水势相应降低,为-1.00 MPa(表2),可见液体间歇浸没培养环境对红叶石楠叶片水势的影响显著。

表2 不同培养方式对红叶石楠叶绿素及水势的影响

培养方式	叶绿素a含量 (mg/g)	叶绿素b含量 (mg/g)	叶绿素总量 (mg/g)	水势 (MPa)
固体培养	2.37 ± 0.61a	0.45 ± 0.11b	2.81 ± 0.72b	-0.74 ± 0.08b
液体间歇浸没	2.34 ± 0.01a	0.74 ± 0.13a	3.08 ± 0.12a	-1.00 ± 0.14a

2.3 不同培养方式对红叶石楠根生长的影响

在传统的固体培养下,红叶石楠的生长需要分别经历继代和生根2个分别不同的阶段,红叶石楠在继代培养基上很难生根,一般只生长愈伤组织,而在液体间歇浸没培养下,继代和生根过程合二为一。由表3可见,本试验中,液体间歇浸

没培养的红叶石楠根的干鲜重也远远大于固体培养的,且根的平均长度达到98.67 mm,完全满足移栽定植需要,因此用液体间歇浸没法培养红叶石楠,在大规模生产中可缩短培养时间,节约生产成本。

表3 不同培养方式对红叶石楠根生长的影响

培养方式	根长 (mm)	根(愈伤组织)鲜重 (g)	根(愈伤组织)干重 (g)	含水率 (%)	根系活力 [$\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$]
固体培养		0.377	0.083	77.77	
液体间歇浸没	98.67 ± 5.69	0.875	0.215	75.44	231.85 ± 28.48

2.4 不同培养方式对红叶石楠气孔特征的影响

不同培养方式对红叶石楠下表皮气孔的影响显著,表4、图1的试验数据显示:在液体间歇浸没培养下,红叶石楠的气孔开度较大,气孔面积也较大,是固体培养下的3.2倍;此外

液体间歇浸没培养下的气孔频度也是最大的,为固体培养的1.7倍,推测在固体培养条件下,大部分气孔处于关闭状态。总体看来,就气孔特征而言,2种培养方式之间对比明显。

表4 不同培养方式对红叶石楠下表皮气孔特征的影响

培养方式	气孔长 (μm)	气孔宽 (μm)	单个气孔面积 (μm^2)	气孔频度 (个/ mm^2)
固体培养	11.80 ± 0.51a	1.82 ± 0.37b	16.89 ± 3.89b	293.12 ± 52.28b
液体间歇浸没	9.68 ± 1.01b	7.01 ± 1.04a	53.54 ± 11.49a	493.80 ± 46.76a

3 讨论

间歇浸没培养能降低生产成本,缩短培养时间,主要是由于间歇浸没培养使得植物根部与营养液充分接触,而且氧气的交换也较充足^[13]。Yan等研究表明,在液体间歇浸没培养下罗汉果的增殖率、株高、根的干鲜重和生物量等各项指标均优于固体培养和液体培养,间歇浸没培养还可以抑制愈伤组织的生长^[14]。Jova等研究表明,采用液体间歇浸没培养可以使得甘薯试管薯的质量大于3g,远远高于固体培养的对照组^[15]。本试验结果显示,红叶石楠在液体间歇浸没培养下的

株高、地上部干鲜重、叶绿素总量等指标均优于传统的固体培养;此外在固体培养条件下,红叶石楠的继代和生根是2个相对独立的过程,而在液体培养下的红叶石楠除了茎的生长优于固体培养外,还可直接在继代培养过程中生根,这与Yan等的研究结果^[14]基本一致。总体看来,间歇浸没培养可以在同样的条件下得到更多更优质的组培苗,而且可以缩短组培生产时间,从而相应减少组培苗的培育成本。

水势是表示植物水分状况或水分亏缺程度的一个直接指标,在植物各部位的水势中,叶片水势是反映植物体内水分亏缺最灵敏的生理指标,反映了植物各种生理活动受环境水分

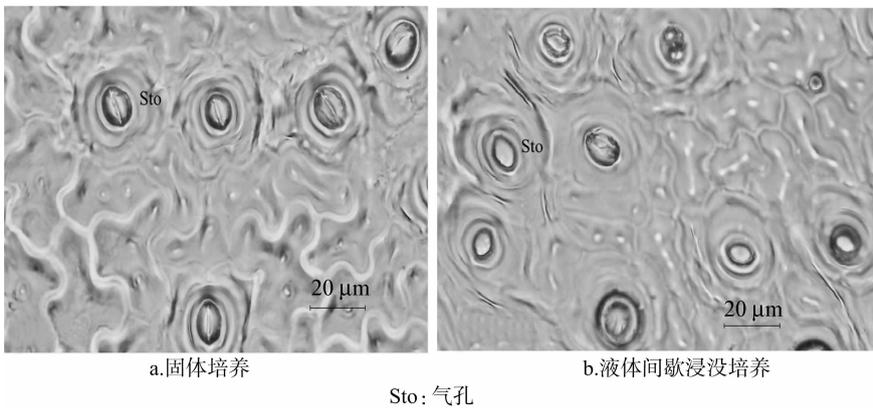


图1 不同培养方式对红叶石楠叶片下表皮气孔特征的影响

条件的制约程度。本研究中2种培养条件下红叶石楠叶片水势不同,固体培养的叶片水势高于液体间歇浸没培养的。Hahn等研究发现,固体培养下菊花的叶片水势要高于液体间歇浸没培养的^[16]。本试验中液体间歇浸没培养下的红叶石楠叶片水势比传统固体培养的低,为 -1.00 MPa,与Hahn等的结果^[16]一致;虽然液体间歇培养下的水势较低,但液体间歇浸没培养下的地上部含水率为 75.43% ,低于固体培养的 77.98% ,表明液体间歇浸没培养没有使植株产生玻璃化现象。徐志刚的研究表明:相对湿度为 $50\% \sim 65\%$ 较适合荔蒲芋组培苗生根阶段培养的需要,其次是 $75\% \sim 80\%$ 的相对湿度^[17];本研究中液体间歇培养瓶内、固体培养瓶内的湿度分别为 $83\%、65\%$,恰好在这2个范围之内,说明液体间歇浸没培养条件下瓶内的湿度是适合植物生长的湿度。

气孔作为植物与外界环境进行气体交换(主要是二氧化碳和水蒸气)的重要通道,在调节植物光合作用、蒸腾作用以及水分利用中扮演着至关重要的角色。植物通过蒸腾散失的水分中有 90% 以上是通过气孔散失的,植物通过改变气孔数目和开闭程度而调节叶片的蒸腾速率和水势。当叶片水势降至某一阈值时会引起气孔关闭,而气孔关闭反过来又会减少水分散失并有助于叶片水势恢复。本试验中液体间歇浸没培养和传统固体培养相比容器内湿度不同,液体间歇浸没培养的环境湿度大于传统固体培养,受此影响,液体间歇浸没培养下气孔开度较大,气孔面积也较大,气孔频度也最大。左应梅等对木薯的盆栽试验研究表明,空气相对湿度与气孔导度之间呈极显著正相关,当土壤相对含水量较低时,土壤相对含水量是影响气孔导度的主导因子^[18]。考虑到植物进行光合作用和干物质积累所需要的二氧化碳也是通过气孔而获得,而在组培生产过程中,培养容器内气体成分复杂,因此影响液体间歇浸没培养下气孔开闭的主要因素是容器内湿度还是其他因素还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] 吴丽君. 红叶石楠推广应用现状及前景分析[J]. 福建林业科技, 2009, 36(2): 145-148, 161.
- [2] 王真真, 王卫娜, 徐国超, 等. 红叶石楠研究现状及发展前景[J]. 黑龙江农业科学, 2011, 6(6): 150-153.
- [3] 陆小清, 李云龙, 毛志滨, 等. 红叶石楠扦插试验[J]. 江苏林业科技, 2005, 32(3): 22-23, 43.
- [4] 赵晓伟, 黄美娟, 黄海泉. 彩叶树种红叶石楠的开发与应用[J]. 北方园艺, 2008(6): 161-163.
- [5] Adelberg J. Efficiency in thin-film liquid system for *Hosta* micropropagation[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2005, 81(3): 359-368.
- [6] Aragón C E, Escalona M, Rodríguez R, et al. Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 2010, 46(1): 89-94.
- [7] Kämäräinen - Karpinen T, Virtanen E, Rokka V M, et al. Novel bioreactor technology for mass propagation of potato microtubers[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2010, 101(2): 245-249.
- [8] 廉美兰, 朴炫春, 王颖, 等. 间歇浸没式生物反应器在辰星草组培苗扩繁中的应用[J]. 园艺学报, 2004, 31(4): 532-532.
- [9] 刘丽敏, 谭裕模, 李松, 等. 利用间歇浸没式生物反应器进行甘蔗脱毒苗快繁研究[J]. 西南农业学报, 2009, 22(4): 1038-1041.
- [10] 许建民, 王永平, 王宇. 马铃薯组培苗液体间歇浸没培养初探[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(1): 53-55.
- [11] 贾明良, 张本厚, 高伟平, 等. 三叶半夏 [*Pinellia ternata* (Thunb.) Breit] 的间歇浸没培养[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(11): 49-54.
- [12] 舒展, 张晓素, 陈娟, 等. 叶绿素含量测定的简化[J]. 植物生理学通讯, 2010(4): 399-402.
- [13] 许建民, 王永平. 间歇浸没培养条件下硝酸银对草莓组培苗生长的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(10): 50-51.
- [14] Yan H, Liang C, Yang L, et al. In vitro and ex vitro rooting of *Siratia grosvenorii*, a traditional medicinal plant[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2010, 32(1): 115-120.
- [15] Jova M C, Kosky R G, Pérez M B, et al. Production of yam microtubers using a temporary immersion system[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2005, 83(1): 103-107.
- [16] Hahn E J, Paek K Y. Multiplication of *Chrysanthemum* shoots in bioreactors as affected by culture method and inoculation density of single node stems[M]//Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation, 2005: 143-153.
- [17] 徐志刚. 组培微环境与规模化育苗设施环境调控的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2002: 124.
- [18] 左应梅, 陈秋波, 邓权权, 等. 土壤水分、光照和空气湿度对木薯气孔导度的影响[J]. 生态学杂志, 2011, 30(4): 689-693.