

新优彩叶植物红叶樱花外植体采集及 离体培养技术研究

李艳敏¹, 孟月娥¹, 张 玉², 赵秀山¹, 王利民¹, 王慧娟¹

(1. 河南省农业科学院 园艺研究所, 河南 郑州 450002;

2. 南京林业大学 风景园林学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 对红叶樱花外植体采集时期和采集部位进行研究, 筛选了红叶樱花的启动、增殖和生根培养基, 并研究了赤霉素和黑布遮光对株高的影响。结果表明: 红叶樱花外植体的最佳采集时期在 4—5 月, 以当年萌发的半木质化枝条中、上部芽萌发最好; 启动培养基为改良 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L 时, 成芽率达到 93.3%; 在改良 MS 培养基中添加 0.8 mg/L 的 6-BA 时, 增殖系数达到 2.21; 在接种后 5 d 进行黑布遮光处理 10 d, 然后见光培养, 可以增加株高, 株高最高达 2.24 cm; 最佳的生根培养基为 1/2MS+IBA 0.05 mg/L+NAA 0.05 mg/L+蔗糖 20 g/L+琼脂 6 g/L, 生根率达 100%。

关键词: 红叶樱花; 外植体; 增殖; 黑暗处理; 生根

中图分类号: S68 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2012)09-0127-05

Study on Explants and Tissue Culture of *Prunus serrulata* Royal burgundy

LI Yan-min¹, MENG Yue-e¹, ZHANG Yu², ZHAO Xiu-shan¹,

WANG Li-min¹, WANG Hui-juan¹

(1. Institute of Horticulture, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;

2. College of Landscape Architecture, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: Using *Prunus serrulata* Royal burgundy as material, *in vitro* culture was studied including the collecting period, bud parts, explants initial culture, subculture and rooting culture, as well as the effect of GA₃ and darkness on the height of plantlet. The results showed that the germination of the upper axillary bud was optimal from the half-lignification stems in April-May, with the suitable medium MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+30 g/L sugar, on which the highest germination rate could reach 93.3%. The propagating ratio was 2.21 on the improved MS medium with 0.8 mg/L 6-BA. The growth rate of tissue culture seedling highly improved with 10-day darkness treatment after 5 days of inoculation, and the seedling height was 2.24 cm. The rooting rate was 100% on the medium of 1/2MS+IBA 0.05 mg/L+NAA 0.05 mg/L+sugar 20 g/L+agar 6 g/L.

Key words: *Prunus serrulata* Royal burgundy; explants; propagating; darkness treatment; rooting

红叶樱花属蔷薇科樱李属红叶落叶乔木, 玫瑰色, 后期老叶渐变铜褐色。红叶樱花集观花、观叶于一身, 是风景园林、城市绿化的名贵观赏彩叶树种, 也重瓣大花, 初春展叶为深红色, 5—7 月份叶为亮红

收稿日期: 2012-04-27

基金项目: 河南省科技厅科技成果转化项目 (102201110016)

作者简介: 李艳敏 (1978-), 女, 河南汤阴人, 助理研究员, 硕士, 主要从事园林植物组培快繁技术研究。E-mail: minzili@126.com

是最具发展前景的首推树种。该品种适于在我国大部分地区栽植,主要靠嫁接进行繁殖,繁殖速度慢。国内已有关于樱花不同品种的组培快繁报道^[1-8],但是鲜见关于外植体采集时期及部位对其萌发影响的系统研究报道,并且樱花品种不同,在组培技术方面有较大差异,因此,以红叶樱花为研究对象,进行了外植体采集时期和采集部位的研究,并对增殖及生根技术进行了初探,以期对红叶樱花的规模繁育提供技术支持。

1 材料和方法

取红叶樱花当年萌发的半木质化枝条,剪成带 1 个腋芽的茎段,先用自来水冲洗,再用洗洁精刷洗每个茎段,最后用流水冲洗 30 min。拿到超净工作台上进行灭菌,用 75% 的乙醇灭菌 30 s,1% 的 NaClO 灭菌 10 min,无菌水冲洗 1 遍,再用 0.5% 的 NaClO 灭菌 10~13 min,无菌水冲洗 3~4 遍,接种于培养基中。

基本培养基为改良的 MS 培养基,在培养各阶段添加不同的植物生长调节剂,设置不同的质量浓度,蔗糖 30 g/L,琼脂 6 g/L,pH 值调整为 5.8。培养条件为温度(25±2)℃,光照强度 2 000 lx,光照时间为 12 h/d。

1.1 外植体采集时期的选择

分别于 4 月 14 日、5 月 12 日、6 月 15 日 3 个时期采集外植体,于天气晴朗的午后采集,将红叶樱花当年萌发的枝条剪成 1 cm 左右的带芽茎段,用洗洁精刷洗,流水冲洗 0.5 h 后,拿到超净台上进一步灭菌,先用 75% 的乙醇灭菌 30 s,再用 1% 的 NaClO 灭菌 10 min,无菌水冲洗 1 次后用 0.5% 的 NaClO 灭菌 12 min,无菌水冲洗 3~4 次后接入培养基中。外植体接种 14 d 后观察其污染死亡情况和萌动情况。萌动的标准:萌发出 1~2 片完整的叶片。污染死亡率=污染死亡个数/接种总数×100%,萌动率=未污染植株中萌动个数/(接种总数-污染死亡个数)×100%。

1.2 外植体不同部位的选择

将 1 根枝条平均分成 3 份,其中距主干近的部分定为下段,距主干远的部分定为上段,对应枝条上的腋芽分别称为上、中、下芽,14 d 后观察各部分芽的污染死亡情况和萌动情况。

1.3 外植体启动培养基筛选

外植体启动培养基共 6 种,激素种类及质量浓度详见表 1,观察其对外植体萌动及成芽的影响,30 d 后统计萌发情况。成芽的标准:长出 3~5 片叶,有明显的茎。成芽率=成芽株数/萌动株数×100%。

表 1 红叶樱花外植体启动培养基的筛选

培养基编号	6-BA/(mg/L)	NAA/(mg/L)
A	0	0
B	0.5	0.1
C	1.0	0.1
D	2.0	0.1
E	1.0	0.5

1.4 6-BA 对红叶樱花增殖的影响

将芽切成 0.5~1.0 cm 的高度,然后接入增殖培养基,6-BA 的质量浓度分别为 0.3、0.5、0.8、1.0 mg/L,以不添加激素的空白培养基为对照,每个处理 5 瓶,每瓶 5~6 株,重复 2 次,30 d 后统计增殖系数及苗的生长状况。

1.5 GA₃ 对红叶樱花株高的影响

采用过滤灭菌的方式向培养基中添加 GA₃ 0、0.05、0.10、0.15、0.20 mg/L,观察其对红叶樱花组培苗苗高的影响。每个处理 30 株,30 d 后统计株高。

1.6 转接后不同时间进行黑暗处理对红叶樱花植株株高的影响

将组培苗切割转入新鲜培养基后,分别于转接后 5、7、9、11、13、15 d 开始进行暗处理培养。具体方法是关闭灯源,用黑布将培养瓶包裹起来,黑暗处理持续 10 d,然后撤掉黑布,打开灯源培养,以完全见光培养为对照,接种 26 d 统计苗高超过 2 cm 的植株数量,计算长高率。长高率=苗高超过 2 cm 的植株数/接种苗数×100%。

1.7 生根培养基的筛选

以 1/2MS 培养基为基本培养基,添加不同质量浓度的 IBA 和 NAA(均为 0.01、0.05、0.10、0.50 mg/L),蔗糖 20 g/L,观察组培苗的生根情况,每个处理 15~20 株,重复 2 次,30 d 后统计生根株数、单株生根数和最长根的根长,计算生根率、平均根数和平均根长。试验数据采用 DPS 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 外植体采集时期的选择

取材时期影响外植体的萌发及后期的诱导培养,大多数植物外植体的采集时期都是在生长开始的季节采样,生长末期或已进入休眠的外植体对诱导反应迟钝或无反应^[9]。从表 2 可以看出,红叶樱花外植体污染死亡率以 5 月最低,仅 14.8%,4 月次之,为 33.3%;外植体萌动率以 4 月采集的最高,可达 100%,5 月采集的外植体次之,萌动率也达 63.0%,6 月最差,仅 46.4%,这是因为在 4—5 月植株上的芽体开始萌动,并迅速进入生长的旺盛阶段,芽体内累积了较多的营养物质,利于其萌动生长。

因此,以在 4—5 月采集红叶樱花外植体为宜。

表 2 不同采集时期对红叶樱花外植体萌动的影响

采集时期/ 月份	接种数/ 个	污染死亡 数/个	萌动数/ 个	污染死亡率/ %	萌动率/ %
4	24	8	16	33.3	100
5	54	8	29	14.8	63.0
6	100	44	26	44.0	46.4

2.2 外植体采集部位对红叶樱花外植体萌动的影响

红叶樱花同一枝条不同部位的腋芽进行相同的处理后,其污染死亡和萌动情况有差别,上芽和中芽接种 5 d 开始萌动,下芽在接种 7~15 d 陆续萌动。就萌动率而言,上芽和中芽的萌动率都较高,分别为 70.6%和 78.6%(表 3),而下芽萌动率仅有 33.3%。就污染死亡率而言,上芽的最低,为 0,其次为中芽和下芽,污染死亡率分别为 12.5%和 14.3%。因此,在采集外植体时,以剪取枝条中、上部分的腋芽较好。

表 3 采集部位对红叶樱花外植体萌动的影响

外植体 部位	接种数/ 个	污染死亡 数/个	萌动数/ 个	污染死亡率/ %	萌动率/ %	萌动 时间/d
上芽	17	0	12	0	70.6	5
中芽	16	2	11	12.5	78.6	5
下芽	21	3	6	14.3	33.3	7~15

2.3 不同启动培养基对红叶樱花外植体萌动及成芽的影响

研究中发现,在不含任何激素的培养基中,外植体接种 7 d 后芽膨大,接种 12 d 后芽露叶尖,开始萌发;在含有激素的培养基中,外植体膨大时间提前,在接种 5 d 后芽体膨大,而芽萌发的时间同样是在接种 12 d 后出现,其萌发产生的芽生长健壮,生长速度快。

从表 4 可以看出,在不添加激素的培养基 A 中,红叶樱花外植体的萌动率为 64.3%,成芽率为 66.7%,添加外源激素之后,外植体的萌动率和成芽率均有不同程度的提高。在培养基 B、C、D 中,NAA 质量浓度均为 0.1 mg/L,6-BA 质量浓度分别为 0.5、1.0、2.0 mg/L,在 B 培养基中,萌动率为 64.0%,而在 C、D 培养基中,萌动率均为 76.0%,说明 6-BA 质量浓度从 0.5 mg/L 增加到 2.0 mg/L,促进了红叶樱花外植体萌动,但是当 6-BA 质量浓度达到一定水平后,萌动率不再增加;在培养基 C 和 E 中,6-BA 质量浓度均为 1.0 mg/L,NAA 质量浓度分别为 0.1 mg/L 和 0.5 mg/L,二者的萌动率分别为 76.0%和 75.0%,相差小,而在成芽率上,E 培养基的最高,为 93.3%,比 C 高出 35.4 个百分点,说明 NAA 对成芽有促进作用。综上,红叶樱花外植体的启动培养基以改良 MS 附加 6-BA 1.0 mg/L、NAA 0.5 mg/L 为

宜。

表 4 不同启动培养基对红叶樱花外植体萌发的影响

处理 编号	接种数/ 个	污染死亡 数/个	萌动数/ 个	成芽数/ 个	萌动率/ %	成芽率/ %
A	30	2	18	12	64.3	66.7
B	30	5	16	13	64.0	81.3
C	30	5	19	11	76.0	57.9
D	30	5	19	15	76.0	78.9
E	30	10	15	14	75.0	93.3

2.4 6-BA 对红叶樱花外植体增殖的影响

从表 5 可以看出,6-BA 对红叶樱花增殖有显著影响。对照培养基中,增殖系数仅 0.94,苗生长慢,叶片大,并且出现生根现象,不利于增殖生长;当添加 6-BA 后,增殖系数有不同程度的提高,在 6-BA 0.8 mg/L 时最高,为 2.21,显著高于对照的增殖系数,并且苗较高,丛芽多。当 6-BA 增加到 1.0 mg/L 时,增殖系数为 2.11,与 0.8 mg/L 处理差异不显著,但是苗矮,多数苗的叶片小,卷曲,茎短缩成莲座状,因此,6-BA 的质量浓度以 0.8 mg/L 为宜。

表 5 6-BA 对红叶樱花外植体增殖的影响

6-BA 质量 浓度/(mg/L)	增殖 系数	苗生长情况
0	0.94a	苗生长慢,叶片大,展开,苗生根
0.3	1.71ab	苗较高,节间短,叶片中等大,丛芽少,生根
0.5	1.49ab	苗较高,节间短,叶片中等大,丛芽少
0.8	2.21b	苗矮,节间短,叶片中等大,丛芽多
1.0	2.11b	苗矮,茎短缩,叶片多、小、卷曲,丛芽多

注:同列不同大小写字母表示差异显著($P<0.05$),或极显著($P<0.01$),表 6 同。

2.5 GA₃ 对红叶樱花株高的影响

红叶樱花在增殖过程中,株高较低,节间短,使得能够用于生根的组培苗较少,因此,开展了培养基中添加赤霉素促使植株增高的试验。从图 1 可以看出,添加 GA₃ 后能够有效增加植株株高,GA₃ 质量浓度为 0.20 mg/L 时,株高最高为 2.24 cm,GA₃ 为 0.10 mg/L 时,株高为 2.00 cm,不添加 GA₃ 株高仅 1.00 cm。在所有处理中,苗均长出新叶,对照中苗颜色深绿,叶片正常,茎粗壮,添加 GA₃ 后,苗茎伸长明显,苗颜色黄绿,叶片变长,生长较弱。

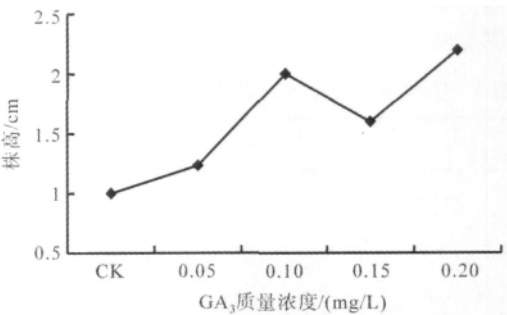


图 1 GA₃ 质量浓度对红叶樱花株高的影响

2.6 接种后不同时间进行黑暗处理对红叶樱花株高的影响

能够促使红叶樱花植株长高的另一种途径是进行黑暗处理,黑暗处理一段时间后,红叶樱花苗节间伸长,颜色黄白色,茎剪短呈“钩”状弯曲,但是去除黑暗处理见光培养后,形态可以恢复正常。从图 2 可以看出,对照的株高仅 1.04 cm,长高率为 1.1%,经过黑暗处理后,植株的平均高度均较对照有明显提高,并且长高率也有大幅度提高;在平均株高方面,以接种后 5 d 再黑暗处理的苗平均高度最高,可以达到 2.25 cm,在长高率方面,接后 5~13 d 进行黑暗处理,与对照相比,长高率均有大幅增加,接后 5 d 进行暗处长高率最高,为 99.1%。随着接种后黑暗处理天数的增加,长高率逐渐降低,到接种后 15 d 再进行黑暗处理时,长高率只有 33.6%,与对照差异不显著。因此,接种后 5 d 进行黑暗处理最佳。

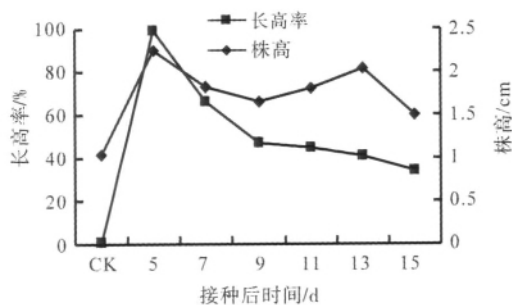


图 2 接种后不同时间进行黑暗处理对红叶樱花株高的影响

2.7 生根培养基的筛选

红叶樱花组培苗生根比较容易。从表 6 可以看出,不添加激素的对照中,生根率为 97.6%,添加一定质量浓度的生长素后,生根率有小幅增加,当生长素 IBA 和 NAA 质量浓度均为 0.05 mg/L 时,生根率达到 100%,当 IBA 和 NAA 的质量浓度超过 0.1 mg/L 时,生根率微降,为 99.1%,各处理之间差异不显著。在平均根数方面,随着生长素质量浓度的增加,其变化规律呈 W 型,在 IBA 和 NAA 质量浓度均为 0、0.05、0.50 mg/L 时平均根数分别为 9.2 条、8.8 条和 10.0 条,差异不显著。在平均根长方面,随着生长素质量浓度的增加,平均根长呈现出先增加后降低的趋势,

表 6 不同质量浓度生长素对红叶樱花生根的影响

IBA/ (mg/L)	NAA/ (mg/L)	生根率/ %	平均根数/ 条	平均根长/ cm
0	0	97.6a	9.2AB	1.16ab
0.01	0.01	98.3a	5.7BC	1.00ab
0.05	0.05	100.0a	8.8AB	1.70a
0.10	0.10	99.1a	5.3C	0.77b
0.50	0.50	99.1a	10.0A	0.93ab

在 IBA 和 NAA 均为 0.05 mg/L 时平均根长最长,为 1.70 cm;综上,红叶樱花生根培养时需要的 IBA 和 NAA 质量浓度以 0.05 mg/L 为宜。

3 结论与讨论

植物组织培养的成功与否与外植体的选择有很大关系,外植体部位、取材时期、生理状态及发育年龄等会对外植体的诱导产生影响^[9],进而会影响后续的培养过程。在已经报道的樱花组培快繁技术研究中,关于外植体的采集仅仅是春梢^[1,4-6]或者夏梢^[2,7],没有进行采集时间的对比研究,更缺乏对枝条不同部位芽萌发情况的报道。本研究结果表明,红叶樱花外植体最佳的采集时期在 4—5 月,在同一枝条上尤以中上部芽萌发最好。

红叶樱花外植体启动培养时,添加外源激素,可以使外植体芽体膨大时间提前、萌发芽生长健壮,但是对萌动时间没有明显的促进作用,一定质量浓度的 6-BA 和 NAA 可以提高外植体的成芽率,在改良 MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L 培养基上,红叶樱花外植体的成芽率达到 93.3%,并且整个培养过程中,没有出现褐化和玻璃化现象。在樱花^[2]、福建山樱花^[5]的报道中,外植体褐化和玻璃化现象比较普遍,严重时会出现外植体死亡的现象,这主要跟樱花品种不同有关,另外培养基成分、外植体采集时期及部位也会影响褐化及玻璃化程度。

红叶樱花的增殖培养过程中,6-BA 质量浓度不能超过 0.8 mg/L,否则会出现茎短缩成莲座状,叶片小,卷曲的现象,这与姚连芳等^[1]的研究结果不同,东京樱花增殖时,6-BA 的质量浓度为 0.5~3.0 mg/L,芽苗生长健壮;王永清等^[2]在研究樱花外植体建立时也出现了茎不伸长的莲座状现象,认为是生长势力减退的问题,通过连续转管及添加赤霉素,有效解决了该问题。与普通樱花相比,红叶樱花移栽时表现出叶片生长但节间生长缓慢现象,王慧娟采用喷施 100 mg/L GA₃ 的方法可有效促进红叶樱花节间生长^[10]。本研究采用培养基中添加赤霉素和在培养初期遮光黑暗处理的方式,来促进红叶樱花苗长高,结果表明,转接后 5 d 开始进行黑暗处理 10 d,然后再见光培养,可以有效促进红叶樱花苗节间伸长,增加株高,使小苗生长健壮;培养基中添加 GA₃ 后,能够有效促进茎的伸长,但是处理后苗颜色黄绿,茎生长细弱,影响下一步的生根培养,因此,如何使赤霉素处理后的苗更健壮还需要进一步研究。

(下转第 142 页)

Real-time PCR 方法相比,常规 RT-PCR 方法的应用则更为广泛。本研究对近几年国产的主要猪乙脑弱毒疫苗产品的 TCID₅₀进行了测定,同时使用 RT-PCR 方法获得了基本一致的检测结果。与 TCID₅₀效价测定和 Real-time PCR 相比,虽然 RT-PCR 不能达到绝对定量的目的,但其可在数小时内实现多品牌疫苗产品的批量快速分析,在确保疫苗生产、保存及运输不出问题的前提下,该方法大大缩短了疫苗评估所需的时间周期,并降低了试验成本。

本研究同时利用 TCID₅₀测定及 RT-PCR 方法对近年市售的多个品牌的不同批次猪乙脑商品疫苗进行了检测,发现仅有 1 个品牌的疫苗 JEV 病毒含量较高并且批间差较小,而其他品牌疫苗中病毒含量很低,这与生产企业实际应用后的免疫保护效果及临床病例发生情况基本相符。近年来,乙脑病例在规模化养猪场仍时有发生,其中以后备种猪睾丸肿大导致的经济损失较为严重^[8],这表明目前市售的猪乙脑疫苗质量良莠不齐,在免疫接种前对所选商品疫苗进行质量评估对于猪群乙脑的防控具有重要的现实意义。本研究为规模化猪场乙脑疫苗的选择提供了重要参考依据。

参考文献:

[1] Van den Hurk A F, Ritchie S A, Mackenzie J S. Ecolo-

gy and geographical expansion of Japanese encephalitis virus[J]. Annu Rev Entomol, 2009, 54: 17-35.

- [2] 自凳云,陈伯泉,俞永新. 虫媒病毒与虫媒病毒病[M]. 昆明:云南科技出版社,1995.
- [3] Konno J, Endo K, Agatsuma H, *et al.* Cyclic outbreaks of Japanese encephalitis among pigs and humans[J]. Am J Epidemiol, 1966, 84: 292-300.
- [4] 李一生,朱长清. 日本乙型脑炎病毒的研究进展[J]. 饲料博览, 2011(3): 50-53.
- [5] Xin Y Y, Ming Z G, Peng G Y, *et al.* Safety of a live-attenuated Japanese encephalitis virus vaccine(SA14-14-2) for children[J]. Am J Trop Med Hyg, 1988, 39: 214-217.
- [6] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[M]. 北京:中国农业出版社, 2005.
- [7] 滕蔓,罗俊,樊剑鸣,等. BHK-21 细胞稳定测定猪乙型脑炎病毒半数细胞感染量效价(TCID₅₀)的条件优化及应用[J]. 中国动物传染病学报, 2010, 18(6): 15-21.
- [8] 王兴涛,罗俊,滕蔓,等. 猪流行性乙型脑炎病毒种猪精液分离株的鉴定及进化分析[J]. 河南农业科学, 2011, 40(5): 152-157.

(上接第 130 页) 红叶樱花不属于生根困难的植物,在不添加植物生长调节剂的培养基中,生根表现也比较好,IBA 和 NAA 质量浓度均为 0.05 mg/L 的培养基中,生根率可以达到 100%,生根质量也高。樱花品种不同,生根表现也不相同,福建山樱花诱导生根比较困难,在 1/2MS+NAA 1.5 mg/L+IBA 0.2 mg/L+3%蔗糖的培养基上生根率为 92.1%^[5]。黄守印等^[4]在诱导樱花生根时,认为单用 IBA 的生根效果最好,IBA 和 NAA 配合的生根效果较差。黄宇翔等^[8]认为,山樱花生根培养时 IBA 和 NAA 配合效果较好。

参考文献:

- [1] 姚连芳,张建伟,冷天波,等. 樱花组培快繁生产技术[J]. 林业实用技术, 2004(3): 27-28.
- [2] 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.

- [3] 及华. 樱花的离体快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 1998, 8(4): 269.
- [4] 黄守印,池井存,苏淑欣,等. 雾灵山地区野生樱花的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2003, 6(3): 228.
- [5] 吕月良,陈璋,施季森,等. 福建山樱花不定芽诱导和植株再生规模化繁殖试验[J]. 南京林业大学学报:自然科学版, 2006, 30(3): 105-108.
- [6] 王光萍,黄敏仁. 福建山樱花的组织培养及植株再生[J]. 南京林业大学学报:自然科学版, 2002, 26(2): 73-75.
- [7] 邹娜,徐楠,曹光球,等. 福建山樱花试管苗生根条件的优化[J]. 江西农业学报, 2008, 20(4): 26-29.
- [8] 黄宇翔,刘金燕,卓小丽,等. 福建山樱花组培快繁研究[J]. 中国农学通报, 2006, 22(8): 162-164.
- [9] 曹孜义,刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社, 2002: 40-50.
- [10] 王慧娟,孟月娥,赵秀山,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.