

红叶李离体茎段培养与微体快繁的研究

刘长春¹, 廖林正¹, 雷光祥², 刘奕清^{1*} (1. 重庆高校园林花卉工程研究中心, 重庆 400041; 2. 重庆铁路中心, 重庆永川 402168)

摘要 [目的]为红叶李的商品化生产、遗传转化和品种定向改良奠定基础。[方法]以红叶李茎段为外植体,在MS、1/2MS基本培养基中添加不同浓度的6-BA和NAA,研究不同激素浓度对红叶李增殖和生根的影响,建立红叶李的离体繁殖体系。[结果]适量浓度的6-BA和NAA组合比单独使用6-BA诱导率高,处理⑤(6-BA、NAA的浓度分别为1.0、0.2 mg/L)的诱导率达75.0%,且腋芽生长良好。处理⑥(6-BA、NAA的浓度分别为2.0、0.2 mg/L)的增殖系数为7.67,芽苗高度大于2 cm的芽数为4.76。适合红叶李生根的最佳IBA浓度为0.5 mg/L,生根率达98.3%。试管苗移栽成活率达85%以上。[结论]红叶李离体培养的最佳启动培养基为MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L,最佳增殖培养基为MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L,最佳生根培养基为1/2MS+IBA 0.5 mg/L。

关键词 红叶李;离体培养;快速繁殖

中图分类号 S722.3+7 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)21-08910-02

Study on In Vitro Stem Culture and Rapid Propagation of *Prunus cerasifera* Ehrh. cv. Atropurpurea

LIU Chang-chun et al (Garden and Flower Engineering Research Center of Chongqing Colleges, Chongqing 400041)

Abstract [Objective] The study aimed to lay the base for the commercial production, genetic transformation and variety-directed improvement of *Prunus cerasifera* Ehrh. cv. Atropurpurea. [Method] With the stems of *P. cerasifera* as the explants, 6-BA and NAA with different concn. were added into MS and 1/2 MS medium to study the effect of different hormone concn. on the proliferation and rooting of *P. cerasifera* and establish the in vitro propagation system of *P. cerasifera*. [Result] The induction rate in the combination of 6-BA, NAA and NAA with proper concn. was higher than that in the treatment with single 6-BA. T5 with 6-BA and NAA at 1.0 and 0.2 mg/L resp. could get the induction of 75.0% and make axilla buds grow well. T6 with 6-BA and NAA at 2.0 and 0.2 mg/L resp. could get the proliferation coefficient of 7.67 and had buds of 4.76 whose height was over 2 cm. The optimum IBA concn. suitable for rooting of *P. cerasifera* was 0.5 mg/L, with rooting of 98.3%. The survival rate for transplanting of tube seedlings was over 85%. [Conclusion] The best initial medium for in vitro culture of *P. cerasifera* was MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L, the best medium for proliferation was MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA+0.2 mg/L and the best medium for rooting was 1/2 MS+IBA 0.5 mg/L.

Key words *Prunus cerasifera* Ehrh. cv. Atropurpurea; In vitro Culture; Rapid propagation

红叶李(*Prunus cerasifera* ‘Atropurpurea’)又名紫叶李,是蔷薇科李属植物,其叶色常年紫红,是园林中优良的彩叶树种,具有极高的观赏价值和广泛的园林应用价值^[1-2]。近年来,彩叶树种行情走俏,红叶李作为园林绿化中一种重要的观叶树种,市场需求量剧增。红叶李常规繁殖速度较慢,已不能满足巨大的市场需求,组培快繁是保持其优良性状和加快繁殖应用的主要手段。目前,有关红叶李的组织培养研究国内外相关报道甚少^[1]。通过红叶李茎段诱导腋芽萌发,形成丛生芽获得再生植株,能较好地保持其遗传稳定性。为此,笔者研究了不同激素浓度对红叶李增殖和生根的影响,建立了红叶李的离体繁殖体系,旨在为其商品化生产、遗传转化和品种定向改良奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 以重庆文理学院生物园内生长健壮且无病虫害的红叶李植株作母本,选取当年生半木质化枝条作外植体。

1.2 方法

1.2.1 外植体处理。于2006年10月下旬将外植体取回实验室后用自来水冲洗30 min;用浓度0.5 mg/L GA₃浸泡30 min;在超净工作台上用浓度70%的酒精浸泡30 s;浓度0.1% HgCl₂消毒10 min,其间不停振荡使消毒更彻底;无菌水清洗4~6次,备用。

1.2.2 试验设计。

(1)初代培养。消毒后的外植体切成1.0~1.5 cm的单芽茎段,接种于含有不同浓度的6-BA和NAA的MS培养基中。每处理接种30杯,每杯接种2个茎段,30 d后统计初代

诱导情况。

(2)继代培养。将侧芽诱导获得的无菌苗切成带单芽的茎段,接种在附加不同浓度的6-BA和NAA的增殖培养基中。每处理重复3次,每次接种10杯,培养30 d后统计试管苗的生长情况。

(3)生根培养。选取生长一致的芽苗[($h \pm 0.2$) cm,带2片完全叶]接种于含有不同IBA浓度的1/2 MS培养基中。每处理重复3次,20 d后统计试管苗的生根情况。

(4)试管苗移栽。当试管苗的根长至1.0~1.5 cm时,在室内开瓶炼苗2 d,清洗干净培养基,并用浓度0.1%的百菌清药液消毒后将试管苗移栽到草炭:珍珠岩体积比为1:1的营养土中。

1.2.3 培养条件。培养温度为(25±2)℃;光照时间为14 h/d,光照强度为2 500 lx;培养基中含琼脂0.5%、蔗糖3%,pH值为6.0。

1.2.4 试验统计。试验所获数据用生物统计学原理^[3]进行试验统计分析,采用DPS(Data Process System)软件进行Duncan's新复极差法多重比较。

2 结果与分析

2.1 初代培养结果 不同浓度的激素配比对红叶李初代培养影响较大,培养30 d后结果表明(表1),各处理均能诱导腋芽的萌发,其中以处理⑤诱导效果最好,诱导率为75.0%,且腋芽生长良好(图1)。而处理③诱导率最差,为25.0%,且腋芽生长不正常,部分叶畸形、红色。笔者观察到处理⑤在培养10 d后,腋芽最先开始萌发,其余各处理15 d后也陆续开始萌发(图2)。可见,适宜浓度的6-BA和NAA组合比单独使用6-BA诱导率高。从诱导率和腋芽的生长情况来看,确定最佳启动培养基为MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L。

基金项目 重庆市教委重大平台建设项目(GCZX0713),重庆文理学院重点科研项目。

作者简介 刘长春(1986-),男,重庆云阳人,助教,从事园林植物离体培养的科研工作。*通讯作者,教授。

收稿日期 2008-05-09

表 1 6-BA 和 NAA 对红叶李外植体诱导的影响

Table 1 Effects of 6-BA and NAA on explants inducement of *Prunus cerasifera* 'Atropurpurea'

编号	6-BA	NAA	诱导率//%	腋芽生长情况
No.	mg/L	mg/L	Induction rate	Growth status of axillary bud
1	0.5	0	33.3	正常、叶色嫩绿 Normal, tender green leaf
2	1.0	0	27.5	正常、叶暗红色 Normal, dark red leaf
3	2.0	0	25.0	不正常、部分叶畸形、红色 Abnormal, some abnormal leaf, red
4	0.5	0.2	47.5	正常、叶嫩绿色 Normal, tender green leaf
5	1.0	0.2	75.0	正常、叶嫩绿色 Normal, tender green leaf
6	2.0	0.2	45.0	正常、叶嫩绿色 Normal, tender green leaf
7	0.5	0.4	40.0	正常、叶深绿色 Normal, dark green leaf
8	1.0	0.4	38.7	正常、叶深绿色 Normal, dark green leaf
9	2.0	0.4	37.5	正常、叶深绿色 Normal, dark green leaf

注:接种数均为 60 株。
Note:The inoculation number is 60.

2.2 继代培养结果 适宜的增殖体系不但要有较高的增殖率,而且还对获得的芽苗长度有一定的要求,以利于生根培

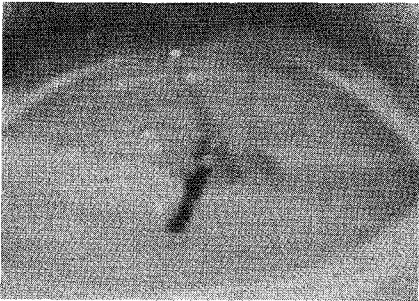


图 1 红叶李初代培养情况
Fig.1 Initial culture of *Prunus cerasifera*

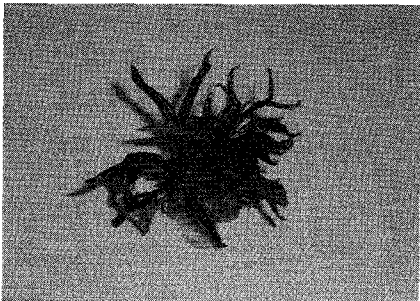


图 2 红叶李丛生芽
Fig.2 Multiple shoot of *Prunus cerasifera*



图 3 红叶李继代培养情况
Fig.3 Subculture of *Prunus cerasifera*

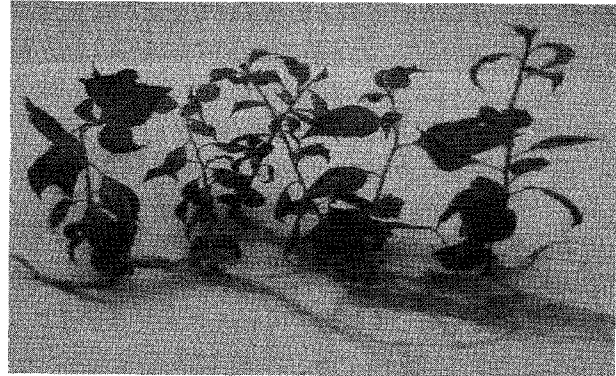


图 4 红叶李生根苗
Fig.4 Rooted seedlings of *Prunus cerasifera*

2.3 生根培养结果 将试管芽苗接种在添加不同 IBA 浓度的 1/2MS 基本培养基上,培养 20 d 后,随着 IBA 浓度用量的升高,试管苗的平均株高、根数、生根率 3 项生长指标都呈先上升后下降的变化趋势(表 3)。表明适量的 IBA 用量能促进试管苗的生根,激素浓度较高时则抑制试管苗的生长。综合

养,木本植物生根阶段所需要的芽苗高度一般大于 2 cm^[4]。表 2 表明,增殖系数以处理⑥最高,为 7.67,且与其他处理间差异极显著。符合生根培养的芽苗数量仍以处理⑥为最佳,平均芽数为 4.76,且与其他处理差异极显著。从增殖系数和芽苗高度 $h \geq 2$ cm 芽数综合考虑,最佳增殖配方为 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L(图 3)。

表 2 6-BA 和 NAA 对红叶李继代培养的影响

Table 2 Effects of 6-BA and NAA on subculture of *Prunus cerasifera* 'Atropurpurea'

编号	6-BA	NAA	增殖系数	$h \geq 2$ cm 芽数
No.	mg/L	mg/L	Multiplication coefficient	$h \geq 2$ cm bud number
1	0.5	0.1	3.36eD	1.73eEF
2	1.0	0.1	4.30deCD	2.03deEF
3	2.0	0.1	6.60abAB	2.40dDE
4	0.5	0.2	3.13eD	1.76dEF
5	1.0	0.2	5.07cdBC	3.30bcBC
6	2.0	0.2	7.67aA	4.76aA
7	0.5	0.3	3.33eD	1.30fF
8	1.0	0.3	4.16deCD	3.80bB
9	2.0	0.3	6.00bcB	3.00cCD

注:同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平有差异,不同大写字母表示在 0.01 水平有差异。下同。
Note: Different lowercases in a row mean differences at 0.05 level, different capital letters mean differences at 0.01 level. The same as follows.

来看,适合于红叶李生根的最佳 IBA 浓度为 0.5 mg/L(图 4)。

表 3 IBA 浓度对试管苗生根壮苗的影响

Table 3 Effects of IBA concentration on rooting and seedling strong of plantlet

编号	IBA	平均株高//cm	根数//条/株	生根率//%
No.	mg/L	Average plant height	Root number	Rooting rate
1	0.10	3.0bB	4.0bcAB	85.0bB
2	0.25	3.5aAB	5.3abAB	86.7bB
3	0.50	3.7aA	6.5aA	98.3aA
4	1.00	3.0bB	3.0cB	89.5bB

2.4 试管苗的移栽结果 红叶李是木本植物,如炼苗不充分,将对试管苗移栽的成活率影响较大^[5]。试验结果表明,试管苗炼苗后,在注意通风保湿,遮阴及预防病虫害的条件下移栽成活率达 85% 以上。

3 结论与讨论

(1)最优化的增殖体系不但要求有较高的增殖率,而且
(下转第 8965 页)

产生的淀粉酶活性增强。说明热休克蛋白发挥了分子伴侣作用。

2.2.4 对菌乙醇产量的影响。由图 3 可知,热休克蛋白使基因工程菌 BLAPH 乙醇产量大大增加,达到了 2.763 g/L。

2.2.5 对菌细胞干重的影响。由图 4 可知,热休克蛋白使基因工程菌 BLAPH 细胞干重比 BLAP 细胞干重减少 22.48%。说明热休克蛋白使基因工程菌 BLAPH 将更多碳源转化成乙醇。

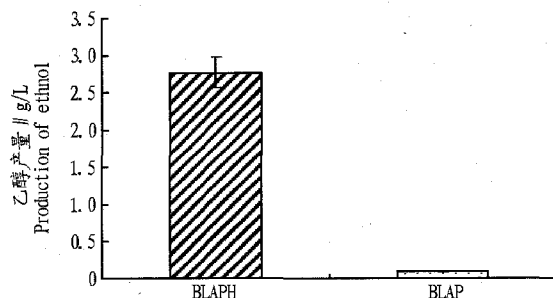


图 3 基因工程菌的乙醇产量

Fig. 3 Ethanol production of genetic engineering strain

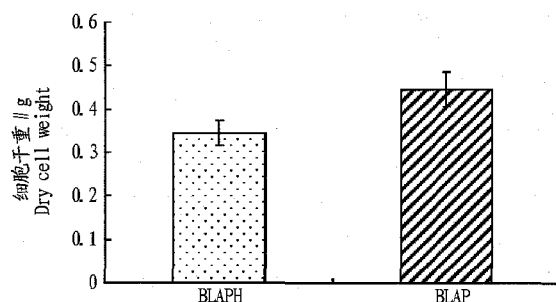


图 4 基因工程菌的细胞干重

Fig. 4 Dry cell weight of genetic engineering strain

3 结论与讨论

(1) 研究表明,生产乙醇的基因工程枯草芽孢杆菌处于逆境时(如高温、高渗透压、高底物浓度、高盐浓度、pH 值降低等),其生长会受到抑制及发酵产品的生产率会降低,通过表达 *sHsp*,该基因工程菌获得对逆境产生的抗性。

(2) Barbosa 等研究证明,来自运动发酵单胞菌的 *pdc* 和 *adhB* 能够成功地在枯草芽孢杆菌中表达,并产生有活性的

酶^[3]。笔者成功地构建了产生燃料乙醇的基因工程枯草芽孢杆菌,并研究了热休克蛋白对生产燃料乙醇基因工程菌的影响。创新之处在于将热休克蛋白基因导入产生燃料乙醇的基因工程枯草芽孢杆菌中。研究结果表明,在高温和高乙醇浓度逆境条件下,热休克蛋白能够使产燃料乙醇的基因工程菌温度耐受性提高,乙醇产量提高,生物量(细胞干重)减少。

(3) 初步研究了热休克蛋白对生产燃料乙醇基因工程菌抗逆性的影响,为进一步研究热休克蛋白对生产燃料乙醇基因工程菌的耐酸性、耐碱性、耐高盐浓度和耐木质纤维素水解液的能力等研究工作提供参考,也为改进和构建能高效利用木质纤维素水解液产乙醇的基因工程菌奠定基础。

(4) 利用的载体 pLac 带有 lac 启动子,经研究改造后不需要诱导就可以表达。利用的表达宿主菌为枯草芽孢杆菌。选择枯草芽孢杆菌作为乙醇生产宿主菌的优点在于其具有更广泛的底物利用范围(能够利用各种碳水化合物);具有一定的乙醇耐受性;在食品工业上已经被广泛应用,被认为是安全的;枯草芽孢杆菌发酵生产乙醇后的副产品(如蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶以及维生素等有益代谢产物)可以作为动物的饲料等。

参考文献

- [1] NANCY N NICHOLS, BRUCE S DIEN, RODNEY J BOTHAST. Engineering lactic acid bacteria with pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase genes for ethanol production from *Zymomonas mobilis* [J]. *Microbiol Biotechnol*, 2003, 30: 315 - 321.
- [2] SUUTARI M, LAAKSO S. Unsaturated and branched chain-fatty acids in temperature adaptation of *Bacillus subtilis* and *Bacillus megaterium* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1126: 119 - 124.
- [3] BARBOSA F S, INGRAM L O. Expression of the *Zymomonas mobilis* alcohol dehydrogenase II (*adhB*) and pyruvate decarboxylase (*pdc*) genes in *Bacillus* [J]. *Curr Microbiol*, 1994, 28: 279 - 282.
- [4] INGRAM L O, CONWAY T. Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1987, 53: 2420 - 2425.
- [5] PONGPAN LAKSANALAMAI, DENNIS L MAEDER, FRANK T ROBB. Regulation and mechanism of action of the small heat shock protein from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183 (17): 5198 - 5202.
- [6] 菊池庆实, 仓桥修, 横关健三, 等. 制备 L-赖氨酸和逆境抗性微生物的方法: 中国: 99117702[P]. 2005-12-07.
- [7] J·萨姆布鲁克, D·W·拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂, 等, 译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [8] 谢友斌. 气相色谱内标法分析啤酒中乙醇的含量[J]. 淮南师范学院学报, 2005, 7(5): 19 - 20.

(上接第 8911 页)

还要有正常的形态、颜色以及便于转接所需要的小植株茎高^[6]。综合来看,红叶李不定芽的增殖以 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 为宜。最佳生根培养基为 1/2 MS + IBA 0.5 mg/L,生根率为 98.3%。

(2) 红叶李作为一种重要的木本观叶植物,利用组织培养繁殖优质种苗有一定的理论意义与实际应用价值。马林等采用红叶李春发新梢的茎尖、腋芽、茎段和叶片作外植体进行了组织培养研究,结果显示,以茎尖为外植体诱导效果最好,以茎段为外植体则只能诱导出愈伤组织,而叶片的诱导效果不明显^[2]。该试验结果表明:以单芽茎段为外植体在试验所有处理中均能诱导产生丛生芽,诱导茎段腋芽的萌发

取决于多种因素,包括外植体取材的部位、季节、消毒时间、培养基的选择和植物激素的种类及浓度等^[7-8]。

参考文献

- [1] 袁涛. 彩叶植物漫谈[J]. 园林与花卉, 2001(5): 12 - 13.
- [2] 马林, 李卫锋, 张玲. 红叶李组织培养快繁技术[J]. 西南科技大学学报, 2005, 20(1): 60 - 62.
- [3] 明道绪. 生物统计附试验设计[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [4] 刘奕清, 王大平. 尾细松的组织培养和快速繁殖[J]. 西南农业大学学报, 2005, 27(2): 237 - 239.
- [5] 刘奕清, 王大平, 熊运海. 尾巨桉的离体培养和快速繁殖[J]. 园艺学报, 2005, 32(4): 672 - 673.
- [6] 刘奕清. 黄斑橡胶榕离体再生体系的建立[J]. 热带亚热带植物学报, 2006, 14(6): 522 - 525.
- [7] 熊丽, 吴丽芳. 观赏花卉的组织培养与大规模生产[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [8] 李俊明. 植物组织培养教程[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002.