

美国红栎液体快繁体系的建立

石琨, 郑彩霞*

北京林业大学生物科学与技术学院, 北京100083

摘要: 以美国红栎无菌苗为材料, 建立基于植物微扩繁器的液体快繁体系。结果表明, 以 $0.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA、 $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA和 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖的MS为液体培养基, 芽增殖培养的浸没频率为 $12 \text{ 次}\cdot\text{d}^{-1}$, 浸没时间为 $5 \text{ min}\cdot\text{次}^{-1}$, 增殖倍数达6.0; 以 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA和 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖的1/2MS为液体培养基, 生根培养的浸没频率为 $6 \text{ 次}\cdot\text{d}^{-1}$, 浸没时间为 $5 \text{ min}\cdot\text{次}^{-1}$, 生根率可达90%以上。在液体培养体系中, 小植株生长迅速, 健壮, 繁殖周期比固体培养的缩短2周。

关键词: 美国红栎; 液体培养体系; 浸没频率; 蔗糖浓度

Liquid Culture System of Rapid Propagation of *Cotinus coggygia* ‘Royal Purple’

SHI Kun, ZHENG Cai-Xia*

College of Biological Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: The liquid culture system of rapid propagation of *Cotinus coggygia* ‘Royal purple’ was established based on plant micropropagation bioreactor, in which the tissue culture plantlets were taken as material. The results showed that with the immersion frequency of 12 times per day for 5 mins each time, multiplication rate of shoots reached 6.0 in MS liquid medium supplemented with $0.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA, $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA, and $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose. With the immersion frequency of 6 times per day for 5 mins each time, the rooting percentage of the adventitious shoots was above 90% in 1/2MS liquid medium supplemented with $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA and $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose. *In vitro* plantlets grew fast and strong, and the plant regeneration cycle was shortened by two weeks in the liquid culture system than that in solid culture.

Key words: *Cotinus coggygia* ‘Royal purple’; liquid culture system; immersion frequency; sucrose concentration

美国红栎是一种木本观赏植物, 其树形美观大方, 叶片主体呈紫红色并随季节而变化。夏季时, 在枝条顶端开花, 花序絮状鲜红, 如烟雾笼罩, 又有“烟树”之称(郭树嘉等2002)。与黄栌(*Cotinus coggygia* Scop.)相比, 其叶片较大, 挂树时间较长(姚砚武等2000)。因为它具有较强的抗旱性和观赏性, 所以市场对苗木需求量大。采用种子繁殖美国红栎苗, 不仅由于种子萌发困难而成苗率低, 且其观赏性状不能很好的保存下来; 采用扦插和嫁接的繁殖方法能够保持其优良性状, 但插穗生根困难, 嫁接的成活率也比较低(Pacholczak等2005; Metivier等2007)。采用植物组织培养技术可对该植物的优良株系进行扩繁, 获得大批的优质苗木。崔俊茹等(2004)和胡相伟等(2006)初步建立了美国红栎的固体扩繁技术体系。Călinescu等(2009)详细报道了提高美国红栎芽增殖倍数和生根率的固体培养方法。这些工作为该植物进行无性繁殖奠定了重要的技术基础, 但不能满足工厂化高效扩繁的技术需求。

用液体培养基对繁殖体进行间歇浸没式培养, 通过调节浸没时间和浸没频率等为繁殖体提供良好的增殖和生根环境, 促进繁殖体对营养物质和水分的吸收利用, 可提高繁殖系数, 获得优质小植株(Etienne和Berthouly 2002; Albarrán等2005)。早在20世纪80年代, 国际上就已将该技术应用于植物的无性繁殖, 已建立了苹果(Zhu等2005)、桉树(McAlister等2005)和咖啡(Etienne等2006)等液体培养的技术参数及相应设备, 初步实现了繁殖体的大规模生产。国内主要开展了香蕉(杨柳等2010)和甘蔗(杨柳等2011)等的研究, 对美国红栎等漆树科的木本植物尚未见报道。

本文利用课题组研制的可自动换液的间歇浸润式植物微扩繁器(plant micropropagation bioreactor, PMB; 专利号ZL201220470675.9)对美国红栎无菌苗进行液体快繁技术的研究, 建立基于植

收稿 2015-01-08 修定 2015-03-25

* 通讯作者(E-mail: zhengcx@bjfu.edu.cn; Tel: 010-62337717)。

物微扩繁器的液体培养体系(liquid culture system, LCS), 为实现苗木的工厂化高效扩繁奠定技术基础。

材料与方法

1 植物材料

本研究所用的外植体材料为课题组以固体培养方法获得的美国红栎(*Cotinus coggygia* Scop. 'Royal purple')无菌苗的丛生芽, 长度 ≥ 15 mm。

2 培养方法

采用本课题组研制的PMB对外植体进行液体培养, 工作原理如图1所示。PMB将植物培养瓶和

液体瓶串联组成一个植物生长器单元, 若干生长器单元并联后便可组成所需规模的扩繁器, 其既能自动更换营养液又可防止交叉污染。实验中采用的生长器单元体积都为1 L, 注入的液体培养基均为130 mL。主要流程是: (1)设置PMB控制参数, 包括溶液注入的时间(流速固定, 由时间控制注入的溶液体积)、溶液浸没植物材料的时间、溶液浸没频率(次 $\cdot d^{-1}$)。 (2)接入外植体。 (3)启动自动控制装置, 使液泵和真空泵按设置参数运转。 (4)置换及更新培养基。根据培养物的生长需要和液体培养基的浑浊程度确定更换液体的种类和时间, 并设置更换程序。

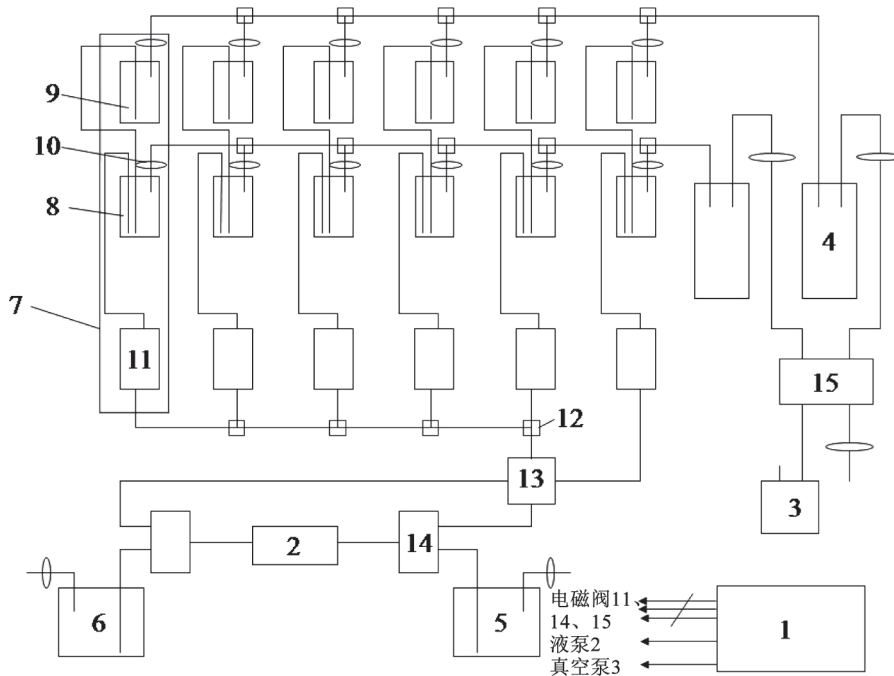


图1 PMB装置示意图

Fig.1 Schematic of the plant micropropagation bioreactor

1: 自动控制装置; 2: 液泵; 3: 真空泵; 4: 缓冲瓶; 5: 新液瓶; 6: 废液瓶; 7: 植物生长器单元; 8: 液体瓶; 9: 植物培养瓶; 10: 滤菌器; 11: 截止阀; 12: 三通管; 13: 四通管; 14: 三通电磁阀; 15: 四通电磁阀。

2.1 LCS增殖浸没频率的确定

芽增殖培养时, 采用预实验确定的液体增殖培养基($MS+0.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA $+0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA $+30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖)。浸没频率设置: 每24 h芽增殖培养液浸没次数为3、6、12和24次, 浸没时间选择预实验确定的最佳时间, 每次5 min。在培养过程中观察芽分化的状态, 记录萌芽时间(即从芽接入植物培养瓶至第1个增殖芽萌发的时间)和增殖周期(为

80%以上的增殖芽高度 ≥ 15 mm时所需的时间)。培养6周后, 统计增殖倍数、增殖芽的平均高度和玻璃化苗的比率。在上述液体培养基中添加 $5.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂作为固体培养基, 对外植体进行增殖培养, 作为液体增殖培养的对照。

2.2 LCS蔗糖浓度的确定

选择最佳的芽增殖浸没频率后, 设置增殖培养基中的蔗糖浓度分别为0、10、20和 $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 培

培养基其他成分同2.1节。培养6周后, 比较不同处理的增殖苗的高度、茎粗、叶片数和增殖倍数, 以确定适宜的蔗糖浓度。

2.3 LCS生根培养浸没频率的确定

生根培养时, 将增殖培养基置换成预实验确定的生根培养基(1/2MS+1.0 mg·L⁻¹ IBA+20 g·L⁻¹ 蔗糖)。浸没频率设置同2.1节, 浸没时间为每次5 min。在培养过程中观察不定根分化的状态, 记录出根时间(即从芽接入植物培养瓶至观察到根发出的时间)和生根周期(为80%以上的不定根长度≥20 mm时所需的时间)。培养3周后, 统计生根率、生根数和根的平均长度。在上述液体培养基中添加5.5 g·L⁻¹琼脂作为固体培养基, 对不定芽进行生根培养, 作为液体生根培养的对照。

3 培养条件和数据统计

培养温度为(25±1) °C, 光照强度为45 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光照时间为16 h·d⁻¹。LCS中每组4对生长器单元, 其中每培养瓶接种10个芽; 对照组每组10个培养瓶(瓶高10 cm、直径6 cm), 每瓶接种4个芽。实验重复3次。对有效增殖芽(茎直径≥1 mm、高度≥15 mm, 多数叶片展开的芽)进行统计。用Excel和SPSS 18对数据进行统计分析。

实验结果

1 LCS中浸没频率对美国红栎增殖的影响

不同浸没频率对美国红栎组育苗增殖的影响差异显著(表1)。浸没频率为12次·d⁻¹时, 组育苗增殖倍数最高, 与其他浸没频率相比差异显著($P < 0.05$), 其增殖芽生长健壮, 玻璃化苗的比例较低(26.8%), 萌芽时间相比其他组而言差异不显著, 但增殖芽的生长速度比其他处理的快, 2周内大部分外植体都能诱导出不定芽, 4周内超过80%增殖芽的高度≥15 mm, 可以进行后续生根培养, 培养6周后, 增殖芽的平均芽高最大, 为52.1 mm(表1, 图2-A)。随着浸没频率的降低, 增殖倍数依次减少, 玻璃化苗的比例依次降低, 萌芽时间和芽高并没有显著差异。浸没频率为24次·d⁻¹的组育苗在诱导增殖过程中出现较明显的玻璃化和褐化现象(图2-B), 降低了增殖效率和增殖苗质量, 不利于后续的生根培养。

2 LCS中蔗糖浓度对美国红栎增殖的影响

从表2可以看出, 随着蔗糖浓度的升高, 美国

表1 不同浸没频率对美国红栎增殖的影响

Table 1 Effects of different immersion frequencies on shoot multiplication of *C. coggygia*

浸没频率/ 次·d ⁻¹	萌芽时间/d	增殖倍数	芽高/mm	玻璃化苗 比例/%
3	9.2±0.5 ^a	2.7±0.3 ^c	37.0±2.3 ^b	<5
6	8.6±0.4 ^a	4.4±0.3 ^b	45.7±3.5 ^{ab}	19.5±2.6 ^b
12	8.4±0.3 ^a	5.8±0.3 ^a	52.1±2.4 ^a	26.8±4.2 ^b
24	8.2±0.3 ^a	4.1±0.4 ^b	40.2±2.8 ^b	46.9±3.8 ^a

不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 下表同此。

表2 不同蔗糖浓度对美国红栎增殖的影响

Table 2 Effects of different sucrose concentrations on shoot multiplication of *C. coggygia*

蔗糖浓度/g·L ⁻¹	增殖倍数	芽高/mm	茎粗/mm	叶片数
0	3.1±0.2 ^c	24.4±1.5 ^e	0.9±0.1 ^c	4.3±0.2 ^d
10	4.3±0.3 ^b	35.9±3.2 ^b	1.3±0.1 ^b	6.2±0.3 ^c
20	6.0±0.3 ^a	48.5±2.6 ^a	1.5±0.1 ^{ab}	8.5±0.3 ^b
30	5.8±0.3 ^a	52.1±2.4 ^a	1.9±0.1 ^a	9.7±0.6 ^a

红栎组育苗的增殖倍数、芽高、茎粗和叶片数都增加, 其中添加20和30 g·L⁻¹蔗糖的增殖倍数和芽高显著高于其他处理, 两者之间差异不显著。低蔗糖(0和10 g·L⁻¹)浓度与较高糖(20和30 g·L⁻¹)浓度的茎粗、叶片数等指标的差异也达到显著水平($P < 0.05$)。在培养第5周, 低蔗糖浓度处理的不定芽茎段基部和叶片开始出现褐化和玻璃化现象。综合来看, 蔗糖浓度为0和10 g·L⁻¹时, 诱导产生的不定芽较弱小; 蔗糖浓度为20和30 g·L⁻¹的不定芽生长健壮, 30 g·L⁻¹的叶片数高于20 g·L⁻¹的, 而其他各个指标均差异不显著。

3 LCS中浸没频率对美国红栎生根的影响

浸没频率高于6次·d⁻¹对美国红栎生根率的影响差异不显著。培养2周后, 绝大部分不定芽都能诱导出根; 3周后根长几乎都超过20 mm, 生根周期完成。其中以频率为6次·d⁻¹培养的苗出根时间最短, 根数最多(表3, 图2-C); 浸没频率为12和24次·d⁻¹培养的根, 一部分有变脆和易断的现象, 后者出现该现象较多。从表3可以看出, 过低的浸没频率(3次·d⁻¹)会延迟根的发生, 并降低生根率; 浸没频率过高会降低根数和缩短根长。综合来看, 浸没频率为6次·d⁻¹的生根效果最好。

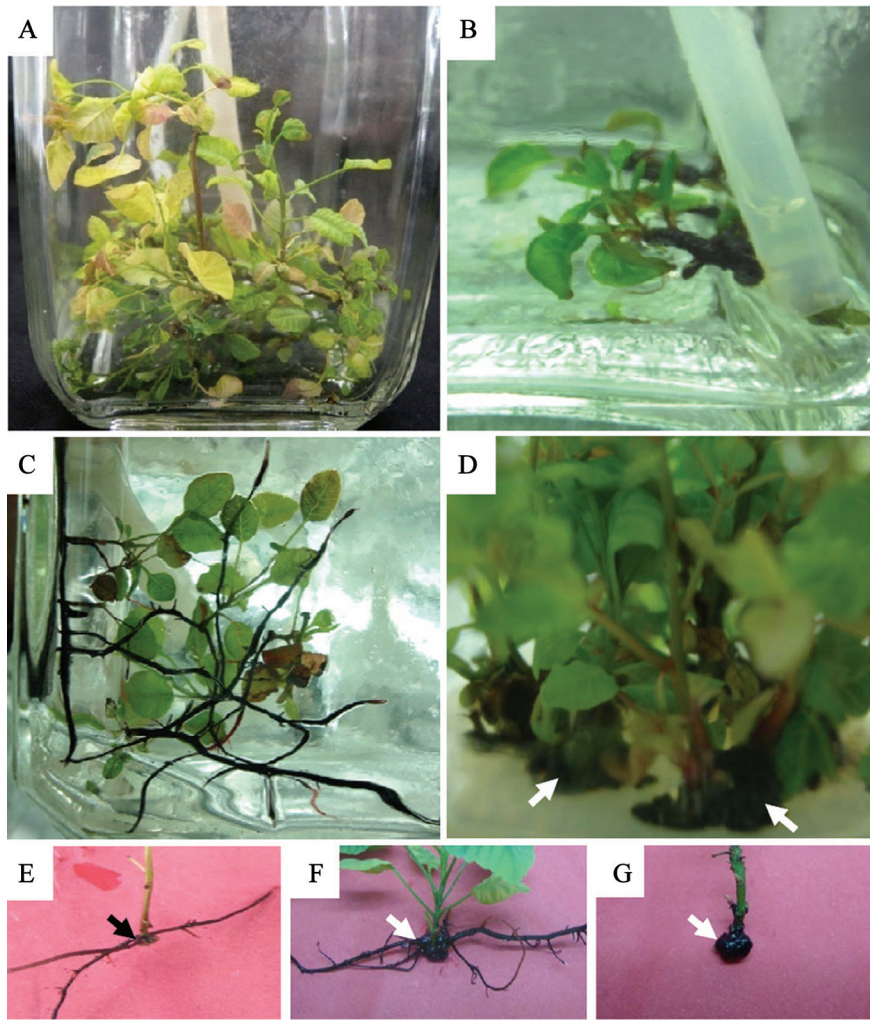


图2 LCS和固体培养中美国红栌的生长

Fig.2 The growth of *C. coggygia* 'Royal Purple' in LCS and solid culture

A: LCS培养的增殖苗(第6周); B: 玻璃化和褐化苗; C: LCS培养的生根苗(第3周); D: 固体培养苗(第6周)基部褐化的愈伤组织(箭头所示); E: LCS培养苗的基部直接发生的根(箭头所示); F: 从固体培养苗的浅褐色愈伤组织分化出的根(箭头所示); G: 不发根的固体培养苗, 愈伤组织褐化严重(箭头所示)。

表3 不同浸没频率对美国红栌生根的影响

Table 3 Effects of different immersion frequencies on rooting of *C. coggygia*

浸没频率/ 次·d ⁻¹	出根时间/d	生根率/%	生根数/条	根长/mm
3	10.1±0.5 ^a	56.7±5.8 ^b	2.2±0.4 ^{ab}	48.0±1.4 ^e
6	7.8±0.6 ^b	90.8±2.2 ^e	3.1±0.3 ^e	46.8±1.9 ^e
12	9.0±0.5 ^{ab}	92.5±1.4 ^e	2.4±0.2 ^{ab}	43.2±1.1 ^{ab}
24	8.8±0.8 ^{ab}	88.3±4.4 ^e	2.0±0.3 ^b	40.3±1.3 ^b

表4 LCS和固体中增殖培养的比较

Table 4 Comparison of shoot multiplication in LCS and solid culture

培养方式	增殖倍数	芽高/mm	萌芽时间/d	增殖周期/d
LCS培养	5.8±0.3	52.1±2.4	8.4±0.3	27.7±0.6
固体培养	6.7±0.6	23.0±1.0	10.2±0.5	36.9±0.7

固体培养的相比较低, 但差异不明显, 而芽高明显大于固体培养的, 且LCS培养所需萌芽时间和增殖周期都短于固体培养的。

4 LCS培养与固体培养的差异

从表4可以看出, LCS培养中的芽增殖倍数与

表5中显示, LCS培养的生根率和根长都大于

表5 LCS和固体中生根培养的比较

Table 5 Comparison of shoot rooting in LCS and solid culture

培养方式	生根率/%	生根数/条	根长/mm	出根时间/d	生根周期/d
LCS培养	90.8±2.2	3.1±0.3	46.8±1.9	7.8±0.6	16.6±0.4
固体培养	74.2±2.2	3.5±0.7	35.1±0.8	12.2±0.9	21.3±0.7

固体培养的, 出根时间和生根周期都短于固体培养的, 而生根数上略低。观察结果表明, PMB装置中产生的增殖苗基部不积累褐色物质, 不定根能从基部切口处直接发生(图2-E); 而固体培养中的增殖苗和生根苗基部往往积累大量的褐色愈伤组织(图2-D和F), 且不生根的苗基部愈伤组织褐化严重(图2-G)。

讨 论

用固体培养基扩繁植物体不仅费时费工, 而且难以实现自动化控制。用液体培养基有利于实现自动化控制, 但培养物长期浸没在液体培养基中易出现玻璃化现象, 玻璃化引起植物形态和生理上的改变, 往往可导致组织坏死(Berthouly和Etienne 2005), 因此应用受到一定程度的限制(Preil 2005; 许亚良和张家明2013)。而利用间歇浸没式液体培养则能为培养物提供一个良好的生长和繁殖环境。通过调节浸没时间和浸没频率可控制培养物对营养物质、水分的吸收及气体交换, 进而调节培养体系的生长状态和繁殖系数(Albarrán等2005)。本研究表明, 当液体浸没时间为5 min时, 浸没频率在一定范围内(如6~12次·d⁻¹)有利于美国红栎的增殖和生根, 其中增殖最适浸没频率为12次·d⁻¹, 生根的最适浸没频率为6次·d⁻¹。当浸没频率达到24次·d⁻¹时, 接近一半(46.9%)的增殖苗出现玻璃化, 这不仅降低了芽的再生能力, 也影响了正常苗的生产率。Zhu等(2005)在苹果砧木M26液体培养的研究中也证明, 浸没频率高(9次·d⁻¹)的不定芽的繁殖系数大于浸没频率低(8次·d⁻¹)的。

LCS培养是一种半开放式的培养方式。在培养过程中, 培养瓶内气体随培养液的间歇浸没而不断更新, 可为培养物及时提供所需的CO₂和O₂。在该液体培养中由于CO₂的供应比固体培养方式的多, 对培养基中碳源的供应可相对减少。本研究表明, 液体培养基中蔗糖浓度为20 g·L⁻¹左右就

能使美国红栎组培苗正常分化生长, 可降低生产成本。

美国红栎为漆树科植物, 漆树科植物往往富含酚类物质(Riaz等2012)。在前期固体培养的研究中观察到美国红栎外植体的切口处易产生褐色物质, 这可能是因为这些酚类物质被氧化的结果。在固体培养中, 这些褐色物质在外植体切口处积累或导致愈伤组织褐化, 不仅抑制芽的生长, 而且阻碍幼苗根的发生与分化。而在LCS培养中, 由于液体培养基的流动, 使外植体切口处的褐色物质减少, 降低了对生长的抑制作用。同时随着液体培养基的流动, 营养物质和植物激素等分布均匀, 繁殖体能及时得到充足的营养和生长刺激, 能够较快地产生不定芽和不定根, 促进了小植株的生长发育。与固体培养方式相比, 在相同条件下, 虽然LCS培养的繁殖系数与之相似, 但从生芽出芽和发根较快, 不定芽和不定根生长较快, 小植株再生周期缩短了约2周, 提高了繁殖效率。

另外, LCS所采用的PMB装置可灵活调节浸没频率、浸没时间和培养规模, 可自动更换培养液, 减少了手工操作, 降低了成本, 提高了效率(张转转等2014)。本文所建立的基于PMB装置的美国红栎液体快繁体系, 为该类苗木的工厂化生产奠定了重要技术基础。

参考文献

- 崔俊茹, 陈彩霞, 李成, 李志丹(2004). 美国红栎的组织培养和快速繁殖. 植物生理学通讯, 40 (5): 588
- 郭树嘉, 秦绪兵, 王金秀, 袁晓华(2002). 美国红栎播种育苗及病虫害防治技术. 山东林业科技, (5): 21~23
- 胡相伟, 张守琪, 李毅(2006). 美国红栎的组织培养与快速繁殖技术研究. 甘肃农业大学学报, 41 (2): 59~61
- 许亚良, 张家明(2003). 一种高效大规模组培方法——间歇浸没培养法. 植物生理学报, 49 (4): 392~399
- 杨柳, 秦钢, 粟靖, 杨丽涛, 罗瑞鸿, 李小泉, 林贵美, 邹瑜, 李杨瑞(2010). 利用间歇浸没式生物反应器进行香蕉(*Musa AAA Cavendish* var. Williams B6)组培快繁研究. 果树学报, 27 (6): 1010~1013
- 杨柳, 秦钢, 杨丽涛, 吴建明, 罗瑞鸿, 魏源文, 李杨瑞(2011). 利用间

- 歇浸没式生物反应器进行甘蔗组培快繁的研究. 华南农业大学学报, 32 (1): 37~41
- 姚砚武, 周连第, 李淑英, 常力(2000). 美国红栎光合作用季节性变化的研究. 北京农业科学, 18 (5): 32~34
- 张转转, 石琨, 于镇榕, 郑彩霞(2014). 基于植物微扩繁器的草莓快繁技术的研究. 中国农学通报, 30 (16): 216~220
- Albarrán J, Bertrand B, Lartaud M, Etienne H (2005). Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor after regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 81: 27~36
- Berthouly M, Etienne H (2005). Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. In: Hvoslef-Eide AK, Preil W (eds). *Liquid Culture Systems for In Vitro Plant Propagation*. Netherlands: Springer, 165~195
- Călinescu M, Rovină A, Isac V, Plopa C (2009). "In vitro" propagation of 'Simfonia verii' and 'Royal Purple' *Cotinus coggygria* Scop cvs. *Scientific Papers of the Research Institute for Fruit Growing Pitesti-Maracineni*, 25: 196~201
- Etienne H, Berthouly M (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 69: 215~231
- Etienne H, Dechamp E, Barry-Etienne D, Bertrand B (2006). Bioreactors in coffee micropropagation. *Braz J Plant Physiol*, 18 (1): 45~54
- Metivier PSR, Yeung EC, Patel KR, Thorpe TA (2007). *In vitro* rooting of microshoots of *Cotinus coggygria* Mill, a woody ornamental plant. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 43: 119~123
- McAlister B, Finnie J, Watt MP, Blakeway F (2005). Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA[®]) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forests (SA). *Plant Cell Tiss Org Cult*, 81: 347~358
- Pacholczak A, Szydło W, Łukaszewska A (2005). The effect of etiolation and shading of stock plants on rhizogenesis in stem cuttings of *Cotinus coggygria*. *Acta Physiol Plant*, 27: 417~428
- Preil W (2005). General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. In: Hvoslef-Eide AK, Preil W (eds). *Liquid Culture Systems for In Vitro Plant Propagation*. Netherlands: Springer, 1~18
- Riaz T, Abbasi MA, Aziz-ur-Rehman, Rubab K, Shahzadi T, Ajaib M, Khan KM (2012). *Cotinus coggyria*: a rich source of antioxidants. *Pak J Pharm Sci*, 25: 679~686
- Zhu LH, Li XY, Welander M (2005). Optimisation of growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 81: 313~318