

激素对复叶槭茎段和叶片愈伤组织诱导及再生的影响

张彦妮¹, 董亚茹¹, 卓丽环^{1,2*}, 张远东³

(1. 东北林业大学园林学院, 哈尔滨 150040; 2. 上海农林职业技术学院, 上海 201600;
3. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091)

摘要:以复叶槭的茎段、叶片为外植体,以MS为基本培养基,附加多种激素配比试验,结果表明:叶外植体在各种培养基上均形成愈伤组织,但没有出现芽的分化。茎段外植体在多种培养基上均产生愈伤组织,但仅在MS+0.0005 mg·L⁻¹ TDZ+0.01 mg·L⁻¹ NAA培养基上出现再生芽,芽的分化率为22.8%,在MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA上生根率为83.3%,移植后成活率为86.2%。

关键词:复叶槭;植物激素;愈伤组织;诱导

中图分类号:S687.1;S792.35 文献标识码:A

Effect of Plant Hormones on Callus Induction and Regeneration of Stem Segment and Leaf from *Acer negundo*

ZHANG Yan-ni¹, DONG Ya-ru¹, ZHUO Li-huan^{1,2}, ZHANG Yuan-dong³

(1. College of Landscape Architecture, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China; 2. Shanghai Vocational and Technical College of Agriculture and Forestry, Shanghai 201600, China; 3. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: The stem segments and leaves of *Acer negundo* as explants were put on MS basis culture media with various hormones matching. The results indicated that the callus was induced from leaves on all kinds of culture media, but without the adventitious buds obtained. The callus induced from stem segments was found on several types of culture media, while the regeneration buds were only found on MS+0.0005 mg·L⁻¹ TDZ+0.01 mg·L⁻¹ NAA and differentiation ratio of buds was 22.8%. The rooting rate was 83.3% on MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA. The survival rate of transplantation was 86.2%.

Key words: *Acer negundo*; plant hormone; callus; induction

复叶槭(*Acer negundo* L.)亦称糖槭,是稀有优良的园林绿化树种,可作庭院树、行道树及防护林树种。是中国东北、华北、内蒙园林绿化树种,在新疆及长江流域一带都有栽培。

复叶槭传统的繁殖方法为播种、扦插。对其组织培养的研究相对较少^[1-2]。愈伤组织诱导是组织

培养的起始阶段,能否获得活力旺盛和易于分化的愈伤组织是植物组织培养成功的关键,同时也是细胞液体悬浮培养的前体物^[3]。在愈伤组织诱导过程中,激素种类和浓度、适宜的外植体选择是关键因素,且控制着愈伤组织的再生过程^[4-5]。

本实验通过在培养基中加入不同激素,来诱导

复叶槭茎段、叶片产生愈伤组织,从而为复叶槭细胞悬浮培养、工厂化生产、良种快繁、外源基因的遗传转化等研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

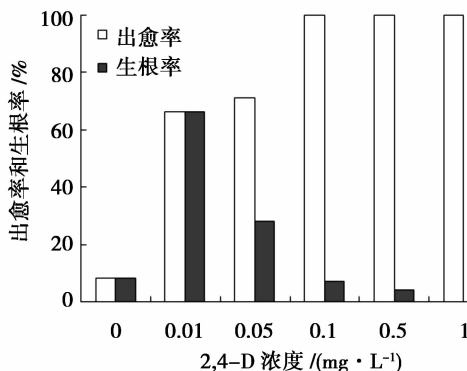
复叶槭实生苗和组培苗。

1.2 方法

1.2.1 愈伤组织和不定芽的诱导 将复叶槭实生苗的茎段在洗衣粉中浸泡约 10 min,然后用自来水冲洗 20 min;在超净工作台上用 75% 的酒精浸泡 10~30 s,在 1% 的 NaClO 溶液中浸泡 10~15 min,无菌水冲洗 3~5 次,用无菌滤纸吸干外植体表面的水分,再剪成长约 0.5~1 cm 的小段;叶片剪成约 0.5 cm × 0.5 cm,然后接种于诱导愈伤组织培养基上,定期观察外植体的形态变化和愈伤组织的诱导效果。出愈率 = (出愈外植体数/接种外植体数) × 100%;生根率 = (生根外植体数/接种外植体数) × 100%;不定芽分化率 = (分化外植体数/接种外植体数) × 100%。诱导培养基有:

- (1) MS + 0~1 mg · L⁻¹ 2,4-D;
- (2) MS + 0.01~2.5 mg · L⁻¹ 6-BA;
- (3) MS + 0.000 02~0.1 mg · L⁻¹ TDZ;
- (4) MS + 0.01 mg · L⁻¹ 2,4-D + 0.1~2 mg · L⁻¹ 6-BA;
- (5) MS + 0.01~0.1 mg · L⁻¹ NAA + 0.1~0.7 mg · L⁻¹ 6-BA;
- (6) MS + 0.01 mg · L⁻¹ NAA + 0.000 02~0.001 mg · L⁻¹ TDZ;

1.2.2 再生芽伸长培养 将在不同培养基上诱导产生的再生芽,经过 1~2 次继代后转接到芽伸长



培养基(MS + 0.1 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.05 mg · L⁻¹ NAA)上,25 天后观察记录芽的生长情况。

1.2.3 再生芽生根培养 当芽长至 1~2 cm 时,用解剖刀将其切下,转至生根培养基 MS + 0.1 mg · L⁻¹ NAA,在驯化移栽前每周观测记录 1 次组培苗的生长情况。

所有培养基均加 30 g · L⁻¹ 蔗糖,7.6 g · L⁻¹ 琼脂,pH 值为 5.8。培养室温度为 25 ± 2 °C,光/暗周期为 14 h/10 h,光照强度 2 500~3 500 lx。

1.2.4 组培苗的驯化和移栽 将生根良好的试管苗在移栽前先松开三角瓶的绑扎,在组织培养室放置 3~5 天,然后放于温室中,去掉封口膜 1 天后,取出试管苗洗净基部的培养基,移植到经过高压灭菌的蛭石营养钵中,前期要保持高湿环境,每隔 1 周浇 1 次经稀释 100 倍的 MS 基本培养基营养液,25 天统计成活率。

2 结果与分析

2.1 2,4-D 浓度对叶片、茎段诱导愈伤组织效果

从图 1 可见,低浓度 2,4-D(0.01 mg · L⁻¹) 叶外植体出愈率和生根率相当,高达 70% 左右;茎段外植体出愈率达 90% 以上,但出根率不足 20%。随着 2,4-D 浓度增加两者外植体出愈率高达 100%,生根率逐渐降低至 0,愈伤组织质地也发生变化:0.01 mg · L⁻¹ 出现绿色瘤状愈伤组织;0.05 mg · L⁻¹ 的为乳黄颗粒状愈伤组织;0.1 mg · L⁻¹ 的为水渍状或玻璃化愈伤组织。综上看出,愈伤组织的诱导 2,4-D 浓度为 0.01 mg · L⁻¹ 较为适宜。

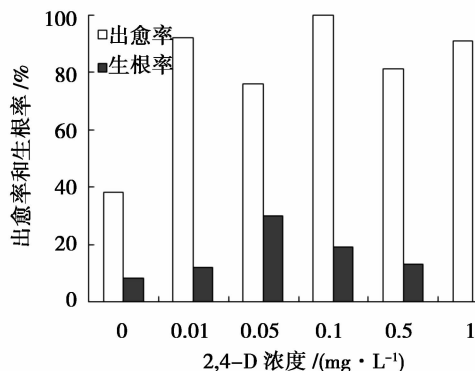


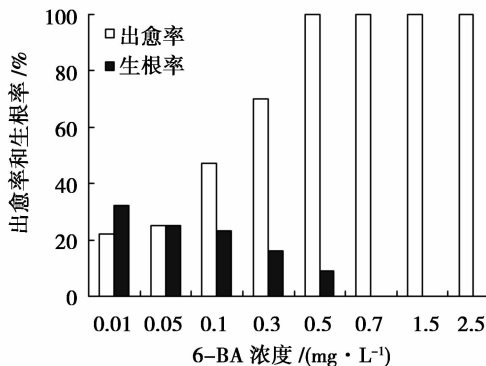
图 1 不同 2,4-D 浓度对叶片(左)和茎段(右)诱导愈伤组织

2.2 6-BA 浓度对叶片、茎段诱导愈伤组织的影响

6-BA 浓度影响叶片和茎段的脱分化能力(见图 2)。叶片出现愈伤组织的时间和位置受 6-BA 浓度

的影响。浓度越高,出现的时间越早。有的在叶缘伤口处产生,有的在叶脉受伤处形成致密的愈伤组织(图 3-A)。当浓度大于 0.5 mg · L⁻¹ 时,出愈率为

100%。在浓度为 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,愈伤组织形成的时间推迟,且较早出现褐化。随着 6-BA 浓度的增



加,叶片的生根率降低。可见,6-BA 浓度高,抑制根的形成。

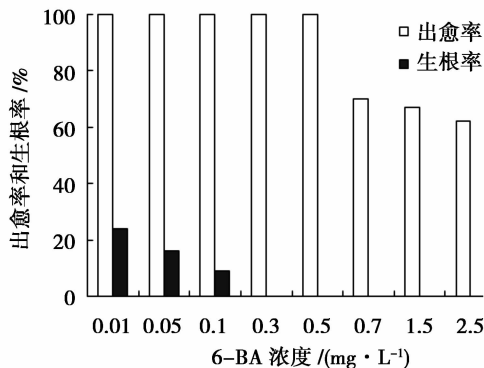


图2 不同6-BA 浓度诱导叶片(左)和茎段(右)愈伤组织

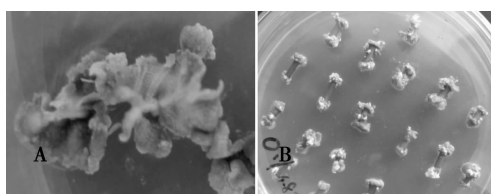


图3 叶片和茎段产生的愈伤组织

6-BA 浓度影响茎段愈伤组织的质地、颜色等特征。愈伤组织先在皮层表皮形成,而形成层以内的组织形成愈伤组织较晚或不形成。随着浓度的升高,茎段愈伤组织形成较早,生长速度较快。在浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,愈伤组织的形成缓慢,褐化加快。在 $0.1 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,茎段接种 1 周后,两端开始膨大,呈哑铃型,20 天后形成淡黄绿色颗粒

状愈伤组织,而贴近培养基的愈伤组织出现褐色的芽体(图 3-B),推测复叶槭内源激素中生长素含量较高与外源激素起作用导致芽体褐化。

2.3 TDZ 浓度对叶片、茎段愈伤组织诱导的影响

以复叶槭实生苗的茎段和无菌苗的叶片为外植体,将其接种到附加不同浓度 TDZ 的 MS 基本培养基上,30 天后观察比较不同外植体愈伤组织的诱导情况(表 1、表 2)。结果表明,低浓度的 TDZ 对叶片和茎段就能起到脱分化作用,TDZ 浓度增加对叶片和茎段的诱导效果不同。TDZ 浓度为 $0.0005 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,茎段芽的分化率为 15%。叶片芽的分化率为 0。

表1 TDZ 浓度对诱导茎段愈伤组织影响

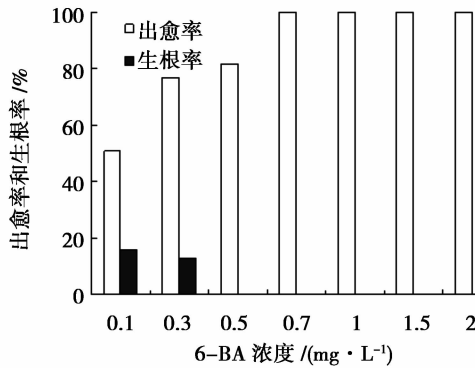
浓度/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	茎段数	分化率/%	愈伤颜色、质地
0.000 02	21	9.5	绿色或浅绿色有光泽,疏松。
0.000 04	36	2.8	浅绿色有光泽,疏松。
0.000 1	23	7.7	浅绿色,有的表面有水渍状,疏松。
0.000 5	20	15	白绿色,疏松,有的表面有白毛。
0.001	25	0	浅绿色或浅棕色,疏松。
0.005	26	0	白绿色带有少量浅棕色,疏松。
0.01	23	0	白绿色或绿色带有少量浅棕色,疏松或玻璃化。
0.05	25	0	绿色(深绿色),有的玻璃化或呈颗粒状。

表2 TDZ 浓度对诱导叶片愈伤组织影响

浓度/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	叶片数	出愈率/%	愈伤颜色、质地	备注
0.000 02	10	10	白绿色有白色绒毛	1 个叶片叶柄切口处产生愈伤,其余卷曲。
0.000 04	15	33.3	浅绿色致密	5 个叶片产生少量愈伤。
0.000 08	14	35.7	浅绿色致密	在叶脉和部分叶缘处产生少量愈伤。
0.000 1	10	100	浅绿色致密	叶柄切口处产生愈伤,叶缘产生少量愈伤。
0.000 5	14	100	绿色或黄绿色致密或疏松	在叶片受伤部位产生带状的浅绿色愈伤。
0.01	23	100	绿色玻璃化	玻璃化严重。
0.05	10	100	嫩绿色,绿带褐化	3 个褐化较轻,上部 1 个褐化严重。
0.1	23	100	绿色或黄绿色玻璃化,有褐化,致密	愈伤大小为 $0.3 \sim 0.5 \text{ cm}$,底部褐化,5 个褐化。

2.4 6-BA 和 2,4-D 浓度组合效果

从图4可见,叶片和茎段外植体在6-BA和2,4-D组合培养基上脱分化后生根率两者明显差异,0.1 mg



$\cdot L^{-1}$ 6-BA 和 $0.01 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 2,4-D 茎外植体生根率高达 75% 左右,而叶外植体出根率不到 20%,随着 6-BA 浓度增加,出根率趋于 0,可见 6-BA 抑制根的形成。

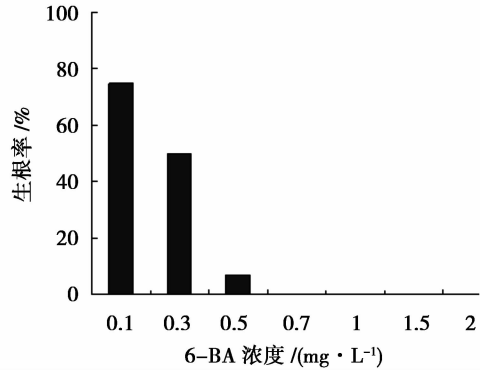


图4 0.01 $\text{mg} \cdot L^{-1}$ 2,4-D 浓度和不同 6-BA 浓度组合诱导叶片(左)和茎段(右)愈伤组织效果

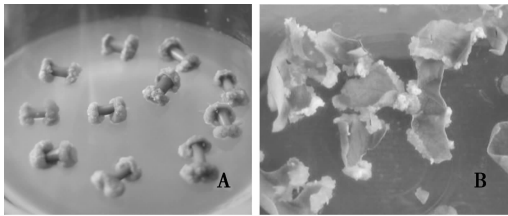


图5 叶片和茎段产生的愈伤组织

随着 6-BA 浓度的增加,愈伤组织的颜色质地也发生变化,由浅绿色颗粒状变为黄白色颗粒状。茎段外植体培养 20 天后,均两端形成愈伤组织呈哑铃形(图 5-A),6-BA 浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 时,茎段、叶片

外植体的愈伤组织增殖最快(图 5-B)。

2.5 6-BA 和 NAA 组合诱导茎段愈伤组织

茎段在所有培养基中的出愈率为 100%,但生根率不同(表 3~5)。当 NAA 浓度为 $0.05 \text{ mg} \cdot L^{-1}$,6-BA 浓度为 $0.1 \sim 0.7 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 时,生根率下降,愈伤组织的外观形态不同。随着培养时间的延长,低浓度 6-BA 易使愈伤组织表面形成白色絮状物,随着 6-BA 浓度的增加,白色絮状物逐渐减少。当 6-BA 浓度为 $0.3 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 和 $0.5 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 时,随着 NAA 浓度的增加,茎段的生根率明显增加。愈伤组织的大小与 NAA 浓度成正比。

表3 0.05 $\text{mg} \cdot L^{-1}$ NAA 和不同 6-BA 浓度组合诱导茎段愈伤组织

6-BA 浓度 / ($\text{mg} \cdot L^{-1}$)	茎段数	生根率 / %	愈伤颜色、质地
0.1	10	42.3	两端产生绿色致密愈伤组织。
0.3	29	28.0	绿色或浅绿色致密,有的部分褐化,周围产生白绒毛。
0.5	16	19.5	绿色致密或疏松,愈伤,周围有乳白色絮状物。
0.7	14	8.7	绿色致密,愈伤周围有少量乳白色絮状物。

表4 0.3 $\text{mg} \cdot L^{-1}$ 6-BA 和不同 NAA 浓度组合诱导茎段愈伤组织

NAA 浓度 / ($\text{mg} \cdot L^{-1}$)	茎段数	生根率 / %	愈伤颜色、质地
0.01	7	16.2	绿色,愈伤周围全部产生白绒毛
0.03	8	22.6	绿色,愈伤周围全部产生白绒毛
0.05	29	28.0	绿色或浅绿色致密,有的部分褐化,有的周围产生白绒毛

表5 0.5 $\text{mg} \cdot L^{-1}$ 6-BA 和不同 NAA 浓度组合诱导茎段愈伤组织

NAA 浓度 / ($\text{mg} \cdot L^{-1}$)	茎段数	生根率 / %	愈伤颜色、质地
0.01	12	11.4	深绿色致密,有白毛根出现
0.03	17	18.1	深绿色,愈伤周围有浅棕色愈伤
0.05	17	21.7	深绿色,愈伤周围有浅棕色愈伤

NAA 浓度为 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时愈伤组织较大 ($0.5 \sim 0.9 \text{ cm}$), 长势好, 在 $6\text{-BA } 0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下愈伤组织最小。粗约 0.2 cm 的茎段产生愈伤组织相对早而大 (平均 0.5 cm), 粗小于 0.2 cm 茎段产生愈伤组织慢而小 (约 $0.2 \sim 0.4 \text{ cm}$)。在 NAA 浓度不变的情况下, 随 6-BA 浓度增加, 生根率降低。

2.6 TDZ 和 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 组合诱导茎段愈伤组织和分化

在 5 种培养基中, 茎段的出愈率均为 100%, 但愈伤组织出现的时间、颜色和质地、分化率不同 (表 6)。TDZ 浓度为 $0.000\ 02 \sim 0.000\ 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 愈伤组织为浅灰绿色、疏松、生长速度相对较慢; 浓度在 $0.000\ 1 \sim 0.001 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 愈伤组织为浅灰绿色或浅棕色、疏松、生长速度相对较快, 芽的分化率相对较高 (图 6)。

与表 1 相比, 茎段芽分化率有所提高, TDZ 浓度为 $0.000\ 5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 组合, 茎段愈伤组织芽的再生频率较高 (22.8%) (见表 6), 表明 TDZ 与 NAA 适当浓度组合有利于芽的分化。也证实了 TDZ 能诱导许多植物的愈伤组织再生^[6]。

表 6 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 和不同浓度 TDZ 组合诱导茎段愈伤组织和分化

TDZ 浓度/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	茎段数	分化率/%
0.000 02	35	11.1
0.000 04	33	8.4
0.000 1	33	14.0
0.000 5	34	22.8
0.001	33	14.5

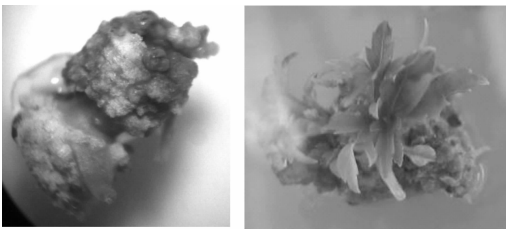


图 6 茎段愈伤组织芽的分化

2.7 再生芽的伸长培养

当再生芽苗长到约 $0.4 \sim 1 \text{ cm}$ 时, 将其从基部切下培养到伸长培养基 ($\text{MS} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}$) 上, 25 天后, 在伸长培养基上, 85.6% 的芽均能长高 (图 7-A), 但有 10% 的芽基部产生愈伤组织, 生长不良, 后逐渐黄化。表明伸长培养基有待于进一步优选。

2.8 再生芽的生根培养

将生长良好的无根苗培养到生根培养基 ($\text{MS} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}$) 上, 结果有 83.3% 的组培苗能产生白色健壮的完整植株, 生长良好。(图 7-B)

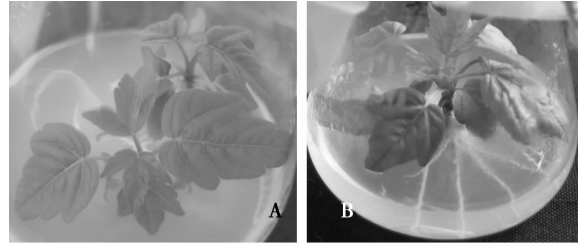


图 7 再生芽的伸长培养及生根诱导

2.9 组培苗的驯化和移栽

将生长良好的组培苗经过驯化后移栽到经高压灭菌的蛭石中, 前期注意保温保湿, 结果成活率为 86.2% , 成活率偏低与基质单一蛭石易过于潮湿和透气性差有关。

3 结论与讨论

本实验结果得出复叶槭叶片和茎段出愈率的高低与激素种类和浓度有关, 高浓度的 $2,4\text{-D}$ ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上) 叶外植体易形成水渍状或玻璃化的愈伤组织, 低浓度的 $2,4\text{-D}$ ($0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 形成瘤状愈伤组织利于根的形成。茎段外植体在 $\text{MS} + 0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 2,4\text{-D}$ 培养基上形成质地较好致密的愈伤组织绿色颗粒状。

在加有 6-BA 和 NAA 的培养基上, 茎段的出愈率均为 100% , 没有芽的分化。

有研究认为, NAA 和 TDZ 配合能促进愈伤组织的增殖但不利于芽的分化^[7]。本实验结果相反, 在 $\text{MS} + 0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}$ 和 $0.000\ 02 \sim 0.001 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{TDZ}$ 培养基上复叶槭茎段外植体愈伤组织都不同程度出现芽的分化, 其中芽的分化率较高的为 22.8% (见表 6), 可以认为将 NAA 与 TDZ 适当浓度配比, 更有利于芽的分化。再生芽生长正常, 生根率高达 83.3% , 移栽成活率达 86.2% 。

参考文献:

- [1] 张彦妮, 高志慧, 卓丽环. 复叶槭茎段诱导的愈伤组织解剖学观察 [J]. 东北林业大学学报, 2006, 34(5): 38-39
- [2] 张彦妮, 卓丽环. 复叶槭顶芽组织培养再生体系的建立 [J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(4): 639-642
- [3] 程江华, 任 琪, 李宝华, 等. 石榴疏松愈伤组织诱导条件的优化 [J]. 经济林研究, 2009, 27(3): 75-78
- [4] Webb D T, Torres L D. Interactions of growth regulators, explant age and culture environment controlling organogenesis from *Lettrce cotyledons in vitro* [J]. Can J Bot, 1984, 62: 586-590
- [5] Sinha R K, Mallick R. Plantlets from somatic callus tissue of the woody legume, *Sesbania bispinosa* [J]. Plant Cell Rep, 1991, 10: 247-250
- [6] Arya I D. Rapid *in vitro* multiplication of silver birch (*Betula pendula* Roth) through axillary bud culture [J]. Ann For, 1995, 3: 65-71
- [7] Murthy B N S, Murch S J, Saxena P K. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis [J]. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 1998, 34: 267-275