

美国红枫外植体选择及启动培养研究

李莹, 罗晓芳, 蒋湘宁

(北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要:对美国红枫组织培养中外植体灭菌、褐化预防及外植体启动进行了试验研究。结果表明:以美国红枫半木质化茎段为外植体,用1%次氯酸钠灭菌4 min,外植体的成活率最高为82.22%;在外植体培养初期每隔2 d转移至新鲜培养基中,2~3次后可以彻底去除褐化现象;最佳的启动培养基为MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹,外植体抽芽率可达92.2%。

关键词:美国红枫;外植体;消毒剂;褐化;组织培养

中图分类号:S688

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2010)08-0006-04

美国红枫(*Acer rubrum*),学名红花槭,槭树科槭树属,原产于北美洲。树形姿态优美,分枝平展,层层如云,叶形秀丽,色彩如花,是珍贵的彩叶树种。此外,美国红枫具有较强的耐旱、耐寒、耐湿性,对土壤的适应性较强,是一个较好的抗逆树种^[1-2]。

随着彩叶植物在园林绿化中的广泛应用,槭树属植物的繁殖技术特别是快繁技术逐渐受到重视,目前国内外对槭树科植物的组培快繁技术研究较少,仅有茶条槭、元宝槭和挪威枫等少数几种建立了较为完善的组织培养体系^[3-4]。作为槭树属植物中最流行的彩色绿化植物之一的美国红枫,其繁殖技术的研究还多停留在播种、扦插等传统育苗方式上,而有关组培快繁方面的研究报道较为少见。现通过美国红枫组织培养过程中外植体选择及灭菌、启动培养和褐化抑制等技术的探讨研究,为以后美国红枫组织培养技术的进一步研究提供了依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验材料取自生长健壮的美国红枫母株,由北京林业大学良种繁育研究中心提供。

1.2 方 法

1.2.1 外植体的消毒

收稿日期:2010-05-07

第一作者简介:李莹(1977-),女,吉林省吉林市人,博士,助教,从事植物生物化学与分子生物学研究。E-mail:liy-ing1019@163.com。

通讯作者:罗晓芳(1938-),女,江苏省人,教授,从事植物生物技术研究。

质化茎段、室内水培芽、当年实生苗作为外植体,选用70%乙醇、0.1%升汞、1%次氯酸钠3种消毒剂。将试验材料剪切成1.5~2.0 cm带腋芽茎段(尖),用毛刷蘸肥皂水刷洗3~5 min,流水冲洗30 min,转移至超净工作台。在无菌条件下,用70%的乙醇消毒30 s,再分别用不同的消毒剂处理,最后用无菌水冲洗3~5次,切去伤口部分,接种到启动培养基上。每个处理接种30个外植体,重复3次,15 d后统计外植体污染率、褐化死亡率、存活率及观察生长状况,并按公式计算相关参数:

$$\text{污染率}/\% = \text{污染个数}/\text{接种个数} \times 100$$

$$\text{褐化死亡率}/\% = \text{褐化死亡个数}/\text{接种个数} \times 100$$

$$\text{存活率}/\% = (\text{接种个数} - \text{污染个数} - \text{褐化死亡个数})/\text{接种个数} \times 100$$

1.2.2 褐化抑制 将经过消毒处理的外植体按5种处理方式进行分析外植体的褐化现象,每个处理接种30个外植体,重复3次,10 d后比较各处理方式对褐化的抑制效果,并按以下公式计算相关参数:

$$\text{褐化率}/\% = \text{褐化个数}/\text{接种个数} \times 100$$

处理方式:

I. 对照(CK);

II. 添加活性炭(AC)1 g·L⁻¹;

III. 添加硝酸银(AgNO₃)10 mg·L⁻¹;

IV. 添加聚乙烯吡咯烷酮(PVP)1 g·L⁻¹;

V. 接种初期每两天将外植体转移至新鲜培养基中,重复2~3次。

1.2.3 外植体的启动培养 将经过消毒处理的外植体接种含有不同浓度6-BA、NAA的MS培

培养基中培养,每个处理接种 30 个外植体,重复 3 次,30 d 后观测茎段抽芽数量,并按公式计算相关参数:

抽芽率/% = 抽出新芽并达到 2.0 cm 以上的外植体个数/接种个数 × 100

2 结果与分析

2.1 外植体的选择

2.1.1 外植体种类对其成活率的影响 将 4 种外植体均用 1% 次氯酸钠消毒 5 min,从表 1 中数据可以看出,以当年实生苗为外植体进行培养时,其污染率和褐化率最低,分别为 7.78% 和 5.55%,成活率最高为 86.67%,其次是室内水培芽和半木质化茎段,效果最差的是木质化茎段。

表 1 不同种类外植体对成活率的影响

外植体种类	污染率/%	褐化率/%	成活率/%
木质化茎段	32.22	38.89	28.89
半木质化茎段	20.00	18.89	61.11
室内水培芽	17.78	16.67	65.56
当年实生苗	7.78	5.55	86.67

2.1.2 外植体种类对腋芽生长的影响 取未污染的外植体各 25 个继续培养,30 d 后统计抽芽个数计算抽芽率,并观察抽芽时间以及芽苗的生长情况。由表 2 可以看出,不同外植体其腋芽抽芽时间和抽芽率有较大差别,半木质化茎段和木质化茎段所需的抽芽时间较短,为 5~7 d,抽芽率分别为 84.00% 和 80.00%;室内水培芽抽芽需要的时间为 10~15 d,抽芽率为 72.00%,而当年实生苗抽芽需要 15 d 以上,抽芽率为 28.00%。从腋芽的生长情况来看,木质化茎段、半木质化茎段以及室内水培芽的新生腋芽都生长健壮;而当年实

生苗腋芽生长细弱。

表 2 外植体种类对腋芽生长情况的影响

外植体种类	抽芽时间/d	抽芽率/%	腋芽生长情况
木质化茎段	5~7	84.00	健壮
半木质化茎段	5~7	80.00	健壮
室内水培芽	10~15	72.00	健壮
当年实生苗	15 d 以上	28.00	茎秆细弱

综合各因素考虑,选择半木质化茎段作为美国红枫组织培养的外植体最为合适。

2.2 外植体表面灭菌

选择不同的消毒剂(70%乙醇、0.1%升汞、1%次氯酸钠)和不同处理时间(2、4、8、15 min)对半木质化茎段进行表面消毒,从表 3 中结果可以看出,随着消毒时间的增加,外植体的污染率总体趋势都在逐渐下降,而褐化率却随着消毒时间的增加而上升,从单因素角度来看,75%乙醇的消毒效果较差,0.1%升汞虽然消毒效果较好但是褐化严重,导致最终成活率较低,1%次氯酸钠的作用介于二者之间,在消毒 4 min 时成活率最高为 82.22%

消毒处理不仅影响外植体的表面消毒效果,而且对随后外植体的腋芽生长也有较大影响。从表 3 中可以看出,3 种消毒剂的作用都是随着消毒时间的增加而抽芽率下降,经过长时间 75%乙醇消毒后新芽长势细弱,叶片颜色黄绿;经过短时间的 0.1%升汞消毒后新芽能够正常生长,但长时间的消毒处理会导致腋芽不易抽芽,且抽出的新芽生长畸形;而用 1%次氯酸钠消毒处理后抽出的新芽叶片颜色深绿,长势健壮。

表 3 不同消毒处理对外植体成活率和腋芽生长情况的影响

处理	消毒剂种类	消毒时间/min	成活率/%	抽芽率/%	腋芽生长情况
1	1(75%乙醇)	1(2)	0	——	——
2	1	2(4)	0	——	——
3	1	3(8)	20.00	61.27	叶片颜色黄绿,茎秆细弱
4	1	4(15)	14.44	38.33	叶片颜色黄绿,茎秆细弱
5	2(0.1%升汞)	1	38.89	88.76	叶片颜色深绿,茎秆粗壮
6	2	2	55.56	78.08	叶片颜色深绿,茎秆粗壮
7	2	3	33.33	43.30	部分芽苗生长畸形
8	2	4	12.22	31.67	生长畸形
9	3(1%次氯酸钠)	1	48.89	100.00	叶片颜色深绿,长势健壮
10	3	2	82.22	100.00	叶片颜色深绿,长势健壮
11	3	3	43.33	51.68	叶片颜色深绿,长势健壮
12	3	4	27.78	35.36	叶片颜色深绿,长势健壮

因此,从提高外植体的成活率同时又尽量降低消毒剂对外植体伤害的角度考虑,采用 1%次氯酸钠溶液消毒 4 min 为最佳消毒方式。

2.3 褐化

在对美国红枫茎段培养时发现,外植体普遍存在褐化现象。为此,选用 5 种不同的处理方式对美国红枫外植体褐化现象的抑制作用进行比较研究,结果表明(见表 4),处理 V 的褐化率为 0,褐斑直径为 0,能有效的抑制外植体褐化。

表 4 不同处理方式对控制外植体褐化的影响

处理	褐化率/%	平均褐斑直径/cm
I	44.44	1.73
II	15.56	—
III	21.11	0.82
IV	17.78	0.65
V	0	0

2.4 启动培养基的筛选

将经过消毒处理的外植体接种到培养基上培养,发现植物激素 6-BA 和 NAA 浓度对外植体抽芽率的影响有着显著的区别,随着 6-BA 和 NAA 浓度的增加,腋芽的抽芽率都表现出先升高后降低的趋势,在 6-BA 含量低的培养基上生长的腋芽抽枝较慢,生长也较慢,节间不展开,随着浓度的增加愈伤组织生长旺盛,外植体渐渐枯死,在 6-BA 含量相同的条件下 NAA 在很低含量的

表 5 外植体启动培养基选择的

正交试验设计 $L_{16}(4^2)$

处理	6-BA/mg·L ⁻¹	NAA/mg·L ⁻¹	抽芽率/%
13	1(0)	1(0)	19.18±4.61
14	1	2(0.1)	22.13±4.12
15	1	3(0.2)	24.79±3.78
16	1	4(0.3)	15.78±4.60
17	2(1.0)	1	36.58±3.07
18	2	2	76.73±11.60
19	2	3	72.71±1.98
20	2	4	27.33±1.32
21	3(2.0)	1	30.30±3.39
22	3	2	52.11±3.00
23	3	3	52.78±3.48
24	3	4	23.12±2.99
25	4(3.0)	1	6.98±6.04
26	4	2	21.31±2.85
27	4	3	23.21±1.58
28	4	4	16.14±1.98

注:数据经过角度反正弦转换 $\arcsin \sqrt{x_{ij}}$ 以及转换后的标准误。

表 6 植物激素对外植体抽芽率影响的方差分析

变异来源	df	SS	MS	F _A	F _a (3,30)
区组	2	123.70	61.85		
处理	15	18777.14	1251.81		F _{0.05} =2.92
6-BA 浓度	3	10457.96	3485.97	210.12**	F _{0.01} =4.51
NAA 浓度	3	5484.94	1828.31	110.21**	
6-BA×NAA	9	2828.90	314.32	18.95**	
误差	30	497.56	16.59		
总变异	47	19408.40			

表 7 6-BA 浓度对外植体抽芽率影响的多重比较

6-BA/mg·L ⁻¹	抽芽率/%
1.0	53.33aA
2.0	39.57bB
0	20.47cC
3.0	16.91cC

表 8 NAA 浓度对外植体抽芽率影响的多重比较

NAA/mg·L ⁻¹	抽芽率/%
0.2	43.37aA
0.1	43.07aA
0	23.26bB
0.3	20.59bB

时候就能促进腋芽的抽芽和生长,而过高的浓度反而会导致愈伤组织的大量生长。数据经过反正弦转换后进行 2 因素 4 水平的方差分析(见表 6,表 7,表 8),结果表明,6-BA 和 NAA 各水平间的差异以及二者交互效应均极显著,在分别对 6-BA 和 NAA 进行 SSR 检验和 Duncan 新复极差比较后发现,当 6-BA 浓度在 1.0 mg·L⁻¹,而 NAA 浓度在 0.1~0.2 mg·L⁻¹ 时外植的抽芽效果最好,而 NAA 浓度在 0.1~0.2 mg·L⁻¹ 对外植体的抽芽作用无明显差异,因此,启动培养基为:MS+6-BA1.0 mg·L⁻¹+NAA0.1 mg·L⁻¹。

3 结论与讨论

外植体的选择是组织培养中一个非常重要的问题。外植体的生理年龄、发育阶段和外植体取材部位不同都可导致外植体生理生化状态差异,从而影响组织培养的效果。研究表明,不同来源的外植体对污染率的影响较大,以当年实生苗为外植体时其污染率和褐化率低、成活率较高,半木质化茎段和室内水培芽次之,而木质化茎段由于长期暴露在空气中,其表面带菌较多,容易产生污染现象,而且木质化茎段含有的次生代谢物

较多,褐化也较严重。此外,不同外植体对随后腋芽生长也有较大的影响。试验结果表明,半木质化茎段和木质化茎段接种后都容易抽芽,芽苗生长也较为健壮;室内水培芽可能由于体内积累的营养物质含量有限而抽芽时间相对缓慢;当年实生苗抽芽速度较慢,且芽苗生长细弱。综合试验结果是选择半木质化茎段作为美国红枫组织培养的外植体。

木本植物组织培养中的困难之一是建立无菌培养体系^[5],因此为了保证组织培养成功,在外植体接种前必须进行消毒。试验结果表明,选用半木质化茎段作为外植体,经过 70%乙醇和 0.1%升汞的长时间处理对外植体腋芽的生长产生了较大的影响,这可能是因为长时间的处理使消毒剂侵入到了材料组织细胞内,影响了材料的正常生长;而 1%次氯酸钠消毒后腋芽生长正常,原因可能是由于次氯酸钠分解性强,对材料的伤害小。所以研究中外植体在无菌条件下先用 70%的乙醇浸润 30 s,然后用 1%次氯酸钠溶液消毒 4 min,能取得最好的消毒效果。

在许多植物组织培养过程中,减轻和控制外植体褐化问题是一项非常重要的研究内容。组织培养过程中产生褐化的因素多为多酚氧化酶(PPO)和总酚含量等物质的存在,在培养基中添加适量的抗氧化剂和吸附剂等可以有效的抑制或减轻褐化现象^[6-7]。在美国红枫培养过程中也

普遍存在外植体的褐化现象,对培养基分别添加 Vc、AC、PVP 以及通过不断转换新鲜培养基的处理方法都能不同程度的抑制褐化,通过比较发现在外植体培养初期每 2 d 将外植体转移至新鲜培养基中,2~3 次后即可较彻底地去除褐化现象,且对后续的培养没有影响。

以美国红枫半木质化茎段为外植体,在 MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹培养基上进行启动培养,抽芽率高,芽苗生长正常。这表明,适当的生长调节剂种类和浓度既可以保证较高的抽芽率,又可以保证芽苗的生长质量。关于进一步的美国红枫增殖培养和生根培养正在进行研究。

参考文献:

- [1] 赵春仙,姜贵平. 优良观叶植物红枫及其繁殖栽培技术[J]. 山东林业科技,2002(4):33.
- [2] 刘桂兰. 观赏植物在园林应用中的突出重点与展示多样性问题[J]. 承德民族职业技术学院学报,2001(3):57-58.
- [3] 李艳菊,陶加洪,王兰珍,等. 元宝枫组织培养研究[J]. 北京林业大学学报,2005(3):104-107.
- [4] 孟月娥,周子发,李艳敏,等. 茶条槭的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2005(6):790.
- [5] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京:高等教育出版社,1986.
- [6] 姚洪军,罗晓芳,田砚亭. 植物组织培养外植体褐变的研究进展[J]. 北京林业大学学报,1999,21(3):78-84.
- [7] 吴晓霞,陈刚,张彪,等. 植物组织培养中褐变的研究进展[J]. 河北林果研究,2002,17(3):284-288.

Selection of Explant and Initial Culture of America Red Maple in Tissue Culture

LI Ying, LUO Xiao-fang, JIANG Xiang-ning

(Biological Sciences and Biotechnology College of Beijing Forestry University, Beijing 100083)

Abstract: The America Red Maple (*Acer rubrum*) was taken as material cultured *in vitro* to study sterilization techniques, browning prevention and explants initial culture. The results showed that using half-lignification stems as explants, the highest survival rate of the explants was 82.22% after the explant were sterilized in 1% NaClO for 4 min. Transfer explants into fresh medium every 2 d at primary stage, browning can be eliminated then after 2~3 times. The MS medium containing 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA and 0.1 mg·L⁻¹ NAA was most efficient in the initial culture of *Acer palmatum atropurpureum*, sprouting rate of explants was 92.2%.

Key words: *Acer rubrum*; explants; disinfectors; browning; tissue culture