

日本红枫组织培养技术研究

李 莹, 罗晓芳

(北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要:对日本红枫茎段组织培养过程中的外植体灭菌、启动培养、增殖培养和生根培养等进行了研究。结果表明:日本红枫外植体经1.0%次氯酸钠灭菌4 min后,成活率达到最高,为78.9%;以MS为基本培养基筛选出适宜日本红枫的启动培养基为MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹;在MS培养基中附加0.005 mg·L⁻¹ TDZ时,可获得最佳的增殖效果,最佳的生根培养基为1/2MS+IBA 0.2 mg·L⁻¹+蔗糖30 g·L⁻¹+琼脂5g·L⁻¹,生根率可达97.8%。幼苗经炼苗后移栽,成活率在90%以上。

关键词:日本红枫;组织培养;快速繁殖

中图分类号:S687.9

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2010)10-0004-04

日本红枫(*Acer palmatum atropurpureum*)属槭树科槭树属落叶乔木,广泛分布在日本、韩国和我国许多地区,其树高4~8 m,冠幅4~5 m,叶5~7裂,树型优美,叶色鲜艳,是优良的园林绿彩叶树种,具有很高的社会价值和经济价值。

日本红枫目前主要采用扦插、嫁接等无性繁殖方法进行繁殖,其繁殖速度慢,育苗效率低,使推广受到了极大的限制。近几年来随着城市绿化的需要,人们越来越重视彩叶植物栽培繁殖技术,尤其是组织快繁技术的研究。目前包括紫叶李、红叶石楠和银杏等在内的多种彩叶植物组织培养研究已有报道^[1-3],槭属植物中的茶条槭、元宝枫和挪威槭的组织培养也已获得成功^[4-6],但有关日本红枫组织培养方面的研究,国内外鲜有报道。为了加快日本红枫快繁和推广,现对日本红枫组织培养过程中外植体灭菌、启动培养、增殖培养、生根及移栽等关键技术进行了研究,为进一步研究提供了依据。

1 材料与方法

1.1 材料

研究所用材料来自北京林业大学良种繁育研究中心温室,采集生长健壮无病害的日本红枫母株当年生嫩枝作为试材。

1.2 方法

1.2.1 外植体的灭菌

取当年生嫩枝去除叶片,

切割成1.5~2.0 cm长的带芽茎段。用饱和洗衣粉水刷洗后流水冲洗0.5~1.0 h,转入超净工作台,在70%乙醇中浸泡30 s,然后分别选用0.5%、1.0%、2.0%的次氯酸钠进行2、4、6和8 min的灭菌处理,最后用无菌水冲洗3~4遍,吸干水分,切去裸露的被消毒剂灼伤的部分,接种于培养基上,每个处理接种30个外植体,重复3次,培养10 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,并计算相关参数:

$$\text{污染率}/\% = \text{污染个数}/\text{接种个数} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{褐化死亡率}/\% = \text{褐化死亡个数}/\text{接种个数} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{存活率}/\% = (\text{接种个数} - \text{污染个数} - \text{褐化死亡个数})/\text{接种个数} \times 100 \quad (3)$$

1.2.2 外植体的启动培养

将经过灭菌处理的外植体分别接种到含有6-BA(0、1.0、2.0 mg·L⁻¹)、NAA(0、0.1、0.2 mg·L⁻¹)的1/4 MS、1/2 MS和MS基本培养基中培养,每个处理接种30个外植体,重复3次,接种30 d后,计算抽芽率,并观察腋芽生长情况,确定启动培养的最佳生长调节剂添加量。

$$\text{抽芽率}/\% = \text{抽出新芽并达到1.0 cm以上的外植体个数}/\text{接种个数} \times 100 \quad (4)$$

1.2.3 增殖培养基的筛选

启动培养后,待茎段腋芽萌发展叶,从基部切下转接到分化培养基中。以MS为基本培养基,分别选择6-BA(0.5、1.0、2.0 mg·L⁻¹)、Thidiazuron(TDZ)(0.002、0.005、0.010 mg·L⁻¹)2种细胞分裂素,配合生长素NAA(0.1、0.2、0.5 mg·L⁻¹)进行L₉(3⁴)正交试验。接种培养40 d后,观测腋芽分化及生长状况,并计算增殖系数、平均株高度,确定最佳调节

收稿日期:2010-05-31

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-ling1019@163.com。

通讯作者:罗晓芳(1938-),女,江苏人,学士,教授,从事植物生物技术研究。

剂种类和添加量。

增殖系数=增殖后的芽总数/接种的芽数 (5)

平均株高度/cm=增殖芽总高度/接种时芽总高度 (6)

1.2.4 生根培养和移栽 选取生长健壮、高度达到2 cm以上的芽剪下,分别转入到含有 IBA(0.1、0.2、0.3 mg·L⁻¹) 和蔗糖(10、20、30 g·L⁻¹) 的 1/4 MS、1/2 MS和 MS 基本培养基中进行生根诱导。培养20 d 后,统计生根率、平均生根条数和平均根长等指标。

生根幼苗炼苗7 d 后,移入灭过菌的基质中培养30 d,计算成活率。

生根率/%=生根苗总数/接种时芽苗总数×100 (7)

平均根数/条=生出的根总数/生根苗株数 (8)

平均根长/cm=生出的根总长度/生出的根总数 (9)

成活率/%=成活的移栽苗数/移栽苗总数×100 (10)

上述培养基(除生根培养基)均附加蔗糖 30 g·L⁻¹、琼脂6 g·L⁻¹、pH 6.0,生根培养基附加琼脂5 g·L⁻¹,培养温度为(25±2)℃,光照强度为2 000~3 000 lx,光照时间为14 h·d⁻¹。

2 结果与分析

2.1 外植体表面灭菌方法的选择

由试验得知(见表1),次氯酸钠的不同浓度和处理时间对日本红枫当年生嫩枝茎段的灭菌效

果影响差别较大,其中以处理6 灭菌效果最好,污染率和褐化死亡率最低,分别为0 和21.1%,成活率相对最高,为78.9%。

表1 不同灭菌处理对外植体的污染率、存活率和褐化死亡率的影响

处理	浓度 /%	灭菌时间 /min	污染率 /%	褐化死亡率/%	成活率 /%
1	0.5	2	96.7	0	3.3
2	0.5	4	61.1	10.0	28.9
3	0.5	6	12.2	20.0	67.8
4	0.5	8	0	31.1	68.9
5	1.0	2	46.7	8.9	44.5
6	1.0	4	0	21.1	78.9
7	1.0	6	0	55.6	44.4
8	1.0	8	0	62.2	37.8
9	2.0	2	27.8	14.5	57.8
10	2.0	4	0	55.5	44.5
11	2.0	6	0	74.5	25.5
12	2.0	8	0	81.1	18.9

2.2 启动培养基的筛选

试验结果经极差分析得知(见表2),第二因素(6-BA 浓度)的极差最大,为56.29,其次为第一因素(MS 无机盐含量),最小是第三因素(NAA浓度),说明6-BA 的浓度对抽芽率的影响较大。从平均值上看,第一因素的第3 水平最好,第二因素的第2 水平最好,第三因素的第2 水平最好,也就是说,各种因素的最好搭配为基本培养基 MS、6-BA 1.0 mg·L⁻¹、NAA 0.1mg·L⁻¹,即最佳启动培养基为 MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹ + NAA 0.1 mg·L⁻¹。

表2 启动培养基的筛选

处理	基本培养基	6-BA /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	抽芽率/%			
				重复1	重复2	重复3	平均值
13	1(1/4MS)	1(0)	1(0)	30.00	30.00	23.33	27.78
14	1	2(1.0)	2(0.1)	83.33	76.66	73.33	77.77
15	1	3(2.0)	3(0.2)	20.00	23.33	13.33	18.89
16	2(1/2MS)	1	2	53.33	43.33	56.66	51.11
17	2	2	3	73.33	66.66	66.66	68.88
18	2	3	1	26.66	16.66	13.33	18.88
19	3(MS)	1	3	60.00	63.33	50.00	57.78
20	3	2	1	86.66	80.00	70.00	78.89
21	3	3	2	20.00	10.00	26.66	18.89
K1	124.44	136.67	125.55				Σ418.87
K2	138.87	225.54	147.77				
K3	155.56	56.66	145.55				
X1	41.48	45.56	41.85				
X2	46.29	75.18	49.26				
X3	51.85	18.89	48.52				
R	10.37	56.29	7.41				

2.3 增殖培养基的筛选

试验结果由方差分析得知(见表3,表4,表5),TDZ对诱导分化芽数量和促进高度生长方面的作用都达到了显著水平,而6-BA和NAA在这两方面的作用均不明显。通过多重比较和q检验的结果显示(见表6),TDZ在水平2和水平3时,增殖系数显著地好于水平1,而水平2与水平3之间差异不显著,但是从平均高度方面看,水平2的增殖苗平均高度远大于水平3的增殖苗平均高度,从生长状况上看,水平2条件下的增殖苗生长健壮,叶色深绿,水平3条件下的增殖苗茎短粗、水分含量大,叶片畸形,整株颜色暗红。综合以上各因素的分析结果得出,TDZ取水平2时,增殖系数和生长状况都最好,其对应的浓度为 $0.005\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,即最佳增殖培养基为MS+TDZ $0.005\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表3 增殖培养基的筛选

处理	6-BA / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	TDZ / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	NAA / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	增殖 系数	增殖苗平均 长度/cm
22	1(0.5)	1(0.002)	1(0.1)	1.68	3.28
23	1	2(0.005)	2(0.2)	2.59	3.37
24	1	3(0.010)	3(0.5)	3.06	1.92
25	2(1.0)	1	2	1.33	3.05
26	2	2	3	2.71	3.27
27	2	3	1	2.94	1.56
28	3(2.0)	1	3	1.67	2.85
29	3	2	1	2.49	3.09
30	3	3	2	2.80	1.81

表4 生长调节剂对增殖系数影响的方差分析

变异来源	df	SS	MS	F	F_{α}
6BA	2	0.03	0.015	1.5	$F_{0.05}=19.00$
TDZ	2	3.07	1.535	153.5**	$F_{0.01}=99.01$
NAA	2	0.08	0.04	4	
误差	2	0.02	0.01		
总计	8	3.2			

表5 生长调节剂对增殖苗长度影响的方差分析

变异来源	df	SS	MS	F	F_{α}
6BA	2	0.13	0.07	2	$F_{0.05}=19.00$
TDZ	2	3.9	1.95	55.71*	$F_{0.01}=99.01$
NAA	2	0.01	0.005	0.14	
误差	2	0.07	0.035		
总计	8	4.11			

表6 TDZ浓度对增殖效果影响的多重比较

TDZ/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	增殖系数	增殖苗高度
0.002	$1.56\pm0.057\text{b}$	$3.06\pm0.108\text{a}$
0.005	$2.60\pm0.057\text{a}$	$3.24\pm0.108\text{a}$
0.010	$2.93\pm0.057\text{a}$	$1.76\pm0.108\text{b}$

2.4 生根培养基的筛选

试验得知(见表7),不同处理方式对试管苗的生根率、平均生根条数和平均根长都有一定的影响。总体上看,在MS培养基中,生出的根黄色,短粗,没有须根。在1/2MS和1/4MS的培养基中生出的根白色,有须根,但1/4MS的培养基不利于生根,在这种培养基上生长的组培苗生根率低;IBA浓度为 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时比浓度为 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 诱导生根效果要好,生根率高,且在相同基本培养基的条件下,随着IBA浓度的上升,组培苗的基部开始有愈伤组织生长,根脆易断;低浓度的蔗糖不利于诱导生根和促进根的生长。由此可得出:以1/2MS为基本培养基,添加IBA $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,诱导生根效果最好,生根率为97.8%,而且根的生长状态最好,主根粗壮,侧根细密,数量较多,有利于移栽。即最佳生根培养基为:1/2MS+IBA $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表7 生根培养基的筛选

处理	基本 培养基	IBA / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	蔗糖 / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	生根率 /%	平均 生根数	平均根 长度/cm
31	1(1/4MS)	1(0.1)	1(10)	25.6	3.44	4.47
32	1	2(0.2)	2(20)	47.8	5.61	3.46
33	1	3(0.3)	3(30)	37.8	3.21	1.92
34	2(1/2MS)	1	2	50.0	5.68	4.07
35	2	2	3	97.8	3.79	3.48
36	2	3	1	74.4	3.26	2.02
37	3(MS)	1	3	51.1	2.73	3.40
38	3	2	1	83.3	4.40	4.87
39	3	3	2	62.2	2.56	2.27

2.5 移栽

将已生根的日本红枫试管苗在温室环境下进行炼苗,7 d 后用温水冲洗干净,移入由草炭土、珍珠岩和蛭石组成的混合基质中,覆塑料棚保温保湿,培养10 d 后,逐步打开塑料棚,继续培养30 d,成活率可达90%以上。

3 结论与讨论

以日本红枫当年生嫩枝为外植体,成功建立了组织培养体系。试验结果表明,当年生带芽茎段经70%酒精消毒30 s后,再用1.0%次氯酸钠溶液处理4 min,外植体的污染率和褐化死亡率较低,成活率最高,为78.9%;在MS培养基中添加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA,启动培养时外植体抽芽率最高。

TDZ作为一种有效的细胞分裂素,其在外植体增殖培养中的作用已在包括元宝枫等槭属植物组培中得到证明^[6],试验结果显示,日本红枫的最佳增殖培养基为MS+TDZ $0.005 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ +琼脂 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。试验过程中发现,在最初几代的增殖培养中,新分化的幼苗生长健壮、整齐,叶子较多,继代到一定次数后分化的幼苗数量没有太大变化,但生长不整齐,健壮苗明显减少,这与何水涛在苹果继代培养和高相福等在刺梨组培中发现随着继代次数增加植物的变异率增加的结果一致^[7-8]。出现这种现象的原因可能与外源激素TDZ在组培苗体内的积累有关,但是积累到什么程度会对分化产生影响,以及影响的途径和程度尚需进行深入研究。

组培苗的生根率和移栽成活率决定了整个组培技术能否真正应用到实际生产中。从试验结果看出,日本红枫的最佳生根培养基为 $1/2\text{MS} + \text{IBA } 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖 } 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{琼脂 } 5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

参考文献:

- [1] 孙在红,夏阳,梁慧敏,等.紫叶李组织培养及快繁体系的建立[J]. Grassland and Turf., 2005, 108(1): 58-61.
- [2] 王红梅,王然,董晓颖.红叶石楠的组织培养与快速繁殖[J]. 莱阳农学院学报, 2004, 21(3): 238-240.
- [3] Tommasi F, Scaramuzzi F. *in vitro* propagation of Ginkgo biloba by using various bud cultures[J]. Biologia Plantarum, 2004, 48(2): 297-300.
- [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, 41(6): 790.
- [5] Durkovic J. *in vitro* regeneration of Norway maple (*Acer platanoides* L.) [J]. Biologia Plantarum, 1996, 38(2): 303-307.
- [6] 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, 27(3): 104-107.
- [7] 何水涛,刘沛镇,崔怀玉,等.培养条件对长富2号苹果新梢增殖和生长的影响[J]. 果树科学, 1996, 13(4): 219-222.
- [8] 高相福,高天永.刺梨试管繁殖技术研究[J]. 园艺学报, 1994, 21(3): 235-238.

Tissue Culture of *Acer palmatum atropurpureum*

LI Ying, LUO Xiao-fang

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

Abstract: The stem segments of *Acer palmatum atropurpureum* was used as explants to study sterilization techniques, initial culture, proliferation and rooting *in vitro*. The results showed that the highest survival rate of the explants was 78.9% after the explants sterilized in 1.0% NaClO_3 for 4 min; The optimum initiation media was MS medium supplemented with $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA and $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA; The MS medium containing $0.005 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ was the most efficient in the proliferation of *Acer palmatum atropurpureum*; The ratio of rhizogenesis was 97.8% in the optimum rooting medium of $1/2$ MS medium supplemented with $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA, $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sugar and $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ agar, the survival ratio of transplanting was 90% after training seedling.

Key words: *Acer palmatum atropurpureum*; tissue culture; rapid propagation