

复叶槭顶芽组织培养再生体系的建立

张彦妮*, 卓丽环

东北林业大学园林学院, 哈尔滨 150040

摘要: 初步建立了复叶槭顶芽组培再生体系。N-苯基-N'-1,2,3-噻二唑-5-脲(TDZ)可诱导复叶槭顶芽分化。复叶槭顶芽的最佳增殖培养基为MS+0.1 mg·L⁻¹ 6-BA+0.01 mg·L⁻¹ NAA,最佳分化培养基为MS +0.01 mg·L⁻¹ TDZ,最佳生根培养基为MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA。

关键词: 顶芽; 组织培养; 再生体系; 复叶槭

Stablishment of Plantlet Regeneration System for Apical Bud of *Acer negundo* L. *in Vitro*

ZHANG Yan-Ni*, ZHUO Li-Huan

College of Landscape Architecture, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: A regeneration system of plantlets was established with apical bud of *Acer negundo* L. *in vitro*. The results showed that thidiazuron (N-pheny-N'-1,2,3-thia-diazol-5-ylurea, TDZ) had distinct effect on inducion adventitious buds for apical bud of *Acer negundo*. The optimal culture medium for proliferation was MS added 0.1 mg·L⁻¹ 6-benzylaminopurine (6-BA) and 0.01 mg·L⁻¹ α -naphthaleneacetic acid (NAA). The optimal culture medium for differentiation and rootage was MS added 0.01 mg·L⁻¹ TDZ and 0.1 mg·L⁻¹ NAA separately.

Key words: apical bud; tissue culture; regeneration system; *Acer negundo* L.

复叶槭(*Acer negundo* L.)属槭树科槭树属,其树形挺拔秀美,入秋叶色金黄,具有高的观赏及实用价值,是稀有优良的园林绿化树种之一,我国东北地区将其作为主要园林绿化树种已有30多年。但最近几年由于病虫害的危害,其观赏价值大大降低。采用基因工程遗传转化手段获得抗病虫能力较强的复叶槭新品种可能是一种可选的方法,而遗传转化的成功则需有良好的高效离体再生系统的建立。复叶槭的组织培养的报道尚少。我们曾就影响复叶槭叶片和茎段诱导愈伤组织的因素进行过初步研究(张彦妮和卓丽环2006),并对茎段诱导得到的愈伤组织作了解剖学观察(张彦妮等2006)。本试验以复叶槭的顶芽为外植体,比较不同种类植物生长调节物质对顶芽的萌发、生长和分化的影响,筛选适合于顶芽再生的最佳培养基配方,建立复叶槭顶芽组织培养再生体系,为复叶槭的离体快繁和抗病虫基因遗传转化的研究建立基础资料。

材料与方法

复叶槭(*Acer negundo* L.)实生苗由我院花圃提

供。实验所用化学药品均为分析纯。

取苗龄在25~60 d复叶槭实生苗的顶芽,去掉下部叶片,然后将其横切成约1 cm(只要带顶芽部分),用常规方法消毒后接种到加有不同生长调节物质的MS培养基(具体见结果与讨论)上,于培养室内培养。随时观察记录。培养的无菌苗长到2~3 cm时,将其转入生根培养基MS+0~0.5 mg·L⁻¹ NAA上进行生根诱导实验,观察不定芽的生根情况,20 d后统计生根率、根的长度以及生根状况等。所有培养基均附加3%蔗糖,7.6 g·L⁻¹琼脂,pH为5.8。在121 °C条件下高压灭菌13 min。培养室温度为(25±2) °C,光/暗周期为14 h/10 h,光照强度为50~70 μ mol·m⁻²·s⁻¹。

结果与讨论

1 6-BA和6-BA+NAA对复叶槭顶芽再生的影响

外植体在加有不同浓度6-BA(表1)的培养基

收稿 2007-01-24 修定 2007-06-21

资助 黑龙江省青年基金项目(QC06C004)。

* E-mail: zhangyanni808@126.com; Tel: 0451-82191564

上萌发的时间略有差异,低浓度 6-BA ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的培养基上的萌发相对较早,3 d后顶芽开始萌发,在高浓度 6-BA 的培养基上,多数在 5 d 后开始萌发。30 d后,部分外植体明显长高,逐渐形成独立的苗木。生长良好的苗木再进行切段培养(每段至少带有 1 个节或顶芽),如此反复,可初步达到快繁和增殖的目的。

表 1~4 显示:

(1)不同浓度 6-BA 对顶芽的增殖倍数(外植体长高后可分割数)有一定的影响,随着 6-BA 浓度的增加,顶芽的生长速度下降,增殖倍数降低;出愈率逐渐降低,愈伤组织的大小逐渐减小,由绿色致密到基部略有膨大呈褐色;外植体的长势和生根率也受到 6-BA 浓度的影响,低浓度时,外植体长势好,出芽率高,生根数相对较多,但没有不定芽。6-BA 浓度为 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,1 个顶芽基部直接产生 2 个不定芽和细长的根;6-BA 浓度为 0.1 和 $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时茎相对较粗,大于 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 后,茎的粗度没有增加,叶片变小,呈深绿色。增殖倍数的降低主要由于高浓度 6-BA 所致,6-BA 对顶芽的生长不但没有促进,抑制反而越来越强(表 1)。

表 1 不同浓度 6-BA 对复叶槭顶芽再生的影响

Table 1 Effects of different concentrations of 6-BA on the regeneration from apical bud of *Acer negundo*

6-BA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	接种数/个	出愈率/%	芽增殖倍数
0.1	26	100	2.6
0.3	18	100	2.6
0.7	18	77.8	1.5
1.0	25	0	1.3
2.0	18	0	1.2

(2) 6-BA 浓度为 $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,随着 NAA 浓度的增加,顶芽的整体长势有下降趋势,植株的高度和增殖倍数逐渐下降。与培养基中只含有 6-BA 时相比,顶芽的生长情况和分化率有所改善,但增殖倍数几乎相同(表 2)。说明 NAA 促进顶芽生长。这可能由于 NAA 作为一种生长素类似物有极性运输的特点,即从形态学上端往下端输送营养物质。在叶片展开后,就能进行正常的光合作用,植株本身合成的生长素可促进顶芽生长。因此,在离体培养中,NAA 的浓度不能太高,即比值太小的 6-BA 和 NAA 对顶芽生长和增殖倍数会产生负面影响,但本文中的出愈率未受影响。

表 2 不同浓度 NAA 与 $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 组合对顶芽再生的影响

Table 2 Effects of combination of different concentrations of NAA and $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA on the regeneration from apical bud of *Acer negundo*

NAA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	接种数/个	出愈率/%	芽增殖倍数	分化率/%	生长状况/20 d 后统计
0.01	20	100	2.4	0	叶片深绿色,长势较好。
0.03	15	100	2.2	0	愈伤组织颜色为黄绿色。
0.05	21	100	2.0	4.7	1 个顶芽产生 2 个不定芽。
0.10	9	100	1.5	0	2 个长势较好,其余长势较差。
0.30	11	100	1.2	0	长势较差。

表 3 不同浓度 6-BA 与 $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 组合对顶芽再生的影响

Table 3 Effects of combination of different concentrations of 6-BA and $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA on the regeneration from apical bud of *Acer negundo*

6-BA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	接种数/个	芽增殖倍数	生根率/%	生长情况
0.1	42	3.6	19	长势较好。
0.3	20	2.8	7.1	长势较好。出愈率 100%。
0.7	19	0.7	0	长势较差。基部产生褐色愈伤组织。
0.8	4	0.3	0	长势较差,叶黄绿色,基部愈伤组织为黄绿色。

(3)在NAA浓度为 $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,随着6-BA浓度的增加,外植体的长势、增殖倍数和生根率明显呈下降趋势,叶色由绿变为黄绿。6-BA浓度大于 $0.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,生根率为0(表3)。这可能是NAA和6-BA配比不当造成的。

(4)在NAA浓度为 $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,芽增殖倍数在6-BA浓度为 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以上时逐渐下降,生根率随着6-BA浓度的增加而降低。即使在同一培养基上,在不同的培养阶段,部分外植体先期生长正常,到后来生长势愈来愈弱,甚至整个外植体叶片黄化脱落而死亡(表4)。其机制有待研究。

总之,6-BA和NAA的配对外植体分化至关重要。在 $\text{MS}+0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} 6\text{-BA}+0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{NAA}$ 培养基中,1.5%的顶芽在基部愈伤组织上产生1~2个不定芽。在 $\text{MS}+0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} 6\text{-BA}+0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{NAA}$ 培养基中,4.7%的顶芽在基部愈伤组织上产生1~2个不定芽,而在其他的培养基上则未见不定芽分化(表4)。 $\text{MS}+0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} 6\text{-BA}+0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{NAA}$ 为复叶槭顶芽的最佳增殖培养基(表3)。

2 TDZ和TDZ+NAA对复叶槭顶芽再生的影响

从表5和表6可见:

(1)接种一周后,在不同浓度TDZ的培养基中顶芽基部有不同程度的愈伤组织产生。20 d

表4 不同浓度6-BA与 $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA组合对顶芽再生的影响

Table 4 Effects of combination of different concentrations of 6-BA and $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA on the regeneration from apical bud of *Acer negundo*

6-BA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	接种数/个	芽增殖倍数	生根率/%	分化率/%	生长情况
0.05	22	3.2	68.0	0	长势很好,基部愈伤组织为黄绿色。
0.10	65	3.5	30.8	1.5	长势很好。
0.20	24	0.8	29.2	0	有的叶子为紫红至褐绿色,带紫色,45.8%长势较好。
0.30	21	2.0	0	4.7	长势较好。
0.50	8	0.4	0	0	有的顶叶为紫红色或边缘为紫色,愈伤组织为绿带红紫色。

表5 不同浓度TDZ对顶芽生长的影响

Table 5 Effects of different concentrations of TDZ on growth of apical bud of *Acer negundo*

TDZ/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	接种数/个	分化率/%	生长情况
0	12	0	生长良好,节间较短,基部愈伤组织少几乎没有,生细长根。
0.0001	10	0	长势很好,顶芽长高明显,基部膨大产生浅黄绿色疏松愈伤组织。
0.0005	6	16.7	长势好,但顶芽为枯黄色,叶基部为绿色,基部愈伤组织为乳黄色带有紫色点状。
0.0050	10	30.0	长势一般,叶片黄绿色,基部产生浅黄绿色愈伤组织。
0.0100	10	45.0	顶叶叶色为枯黄色,茎基部膨大明显,出现多个黄色突起和紫色小点,长势较差。
0.0500	10	17.2	长势不好,顶芽不长高,叶片为浅黄白绿色。基部愈伤组织褐化明显。

表6 不同浓度TDZ与 $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA组合对顶芽再生的影响

Table 6 Effects of combination of different concentrations of TDZ and $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA on the regeneration from apical bud of *Acer negundo*

TDZ/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	接种数/个	分化率/%	生长情况
0.001	18	13.7	基部愈伤组织上出现紫色点,后来形成具紫红色叶片的不定芽。
0.005	19	20.3	基部为黄绿色疏松愈伤组织。
0.010	15	36.7	基部黄绿色愈伤组织上产生紫色小点,几天后变成紫色的叶片。愈伤组织生长速度较快。
0.050	15	13.3	基部浅白绿色愈伤组织上有光泽,有的产生紫色小点,几天后变成紫色的叶片。愈伤组织生长较快,褐化严重。

后,在含有不同浓度 TDZ 的培养基中,外植体的生长情况不同(表 5)。TDZ 浓度与外植体分化率和芽增殖倍数成非线性关系。随着 TDZ 浓度的增加,整个外植体的生长由好到差,基部愈伤组织褐化速度加快,且明显。顶芽增殖倍数和形成不定芽的数量先增后降,TDZ 浓度为 $0.0005 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,顶芽的增殖倍数最多(3.1)。TDZ 浓度为 $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,顶芽增殖倍数最低(0.5)。TDZ 浓度为 $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,顶芽增殖倍数较低(1.2),形成不定芽的数量最多(3.1 个芽/顶芽),但出芽不明显。如果在含有 TDZ 的培养基中产生不定芽后,仍然放在只加有单一生长调节物质 TDZ 的 MS 培养基上培养,不定芽伸长较慢。在高浓度 TDZ ($>0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)下,发现 80% 以上的顶芽基部出现严重的褐化或呈水渍状,叶片呈现出非正常形态。这与前人报道的结果(杨业正 1989; Huetteman 和 Preece 1993; Lu 1993; Bretagne 等 1994; Debergh 等 1992)相似。

(2)在 NAA 浓度为 $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、TDZ 浓度为 $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,顶芽的分化率达到最大(表 6),形

成不定芽所需的时间最短。而在其他浓度 TDZ 下的不定芽形成均在 20 d 以后。但在 TDZ 浓度相同的情况下,NAA 的加入并没有提高复叶槭顶芽的分化率,反而有所下降(表 5、6),可能是由于顶芽本身的内源生长素含量较高,外源生长素的加入反而会抑制其不定芽分化。

综上所述,TDZ 对复叶槭的顶芽分化是有效的。最佳分化培养基为 $\text{MS}+0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ。

3 试管苗生根的诱导

从表 7 可见,培养基中不加任何生长调节物质时,也能生根,根的生长情况也较好,基部无愈伤组织产生,但根很细,这对移栽后地上部分生长不利。随着 NAA 浓度的增加,根明显变粗,生根数也明显增加。较低 NAA 浓度时的根才能从基部直接产生,NAA 达到 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,多数是组培苗的基部先形成愈伤组织,然后从愈伤组织上分化出不定根,NAA 浓度越高,形成的愈伤组织块越大。随着 NAA 浓度的增大,组培苗长势也下降。由此可见,最佳生根培养基为 $\text{MS}+0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA。

表 7 不同浓度 NAA 对试管苗生根的影响

Table 7 Effects of different concentrations of NAA on the root formation of the plantlet

NAA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	接种数/个	生根率/%	每苗发根数/条	根长/cm	生长情况
0	15	82.0	3.7	1.0 ± 0.5	长势较好,根细,几乎呈辐射型分布。
0.1	18	89.0	5.6	1.7 ± 0.5	长势较好,基部愈伤组织少或没有,根粗壮。
0.2	27	75.6	6.1	1.5 ± 0.5	长势较好,根粗壮,几乎呈辐射型分布。
0.5	22	52.2	5.2	1.4 ± 0.5	长势较差,根粗壮。

参考文献

- 杨业正(1989). 棉花脱叶剂 TDZ 简介. 植物生理学通讯, (6): 63~64
- 张彦妮, 卓丽环(2006). 复叶槭叶片和茎段诱导愈伤组织的影响因素. 北方园艺, (4): 168~170
- 张彦妮, 高志慧, 卓丽环(2006). 复叶槭茎段诱导的愈伤组织解剖学观察. 东北林业大学学报, 34 (5): 38~39
- Bretagne B, Chupeau MC, Chupeau Y, Fouilloux G (1994). Improved flax regeneration from hypocotyls using thidiazuron as a cytokinin source. *Plant Cell Rep*, 14: 120~124
- Debergh P, Aitken-Christie J, Cohen D, Grout B, von Arnold S, Zimmerman R, Ziv M (1992). Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 30: 135~140
- Huetteman CA, Preece JE (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 33: 105~119
- Lu CY (1993). The use of thidiazuron in tissue culture. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 29: 92~96