

复叶槭叶片和茎段诱导愈伤组织的影响因素

张彦妮¹, 卓丽环²

(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, 201600)

摘要: 研究了影响复叶槭叶片和茎段愈伤组织诱导的因素。结果表明, 放置方式与茎段和叶片的出愈率关系不大, 但对茎段愈伤组织的大小、形态特性和部位与生根率有关。叶片的出愈率与碳源有关, 在白砂糖中最高, 蔗糖次之, 但在蔗糖中表现最佳。黑暗处理时间的长短也影响叶片的脱分化能力。叶片和茎段的脱分化能力与蔗糖浓度有关, 在 30g/L 时出愈率最大。外植体出愈率的高低和愈伤组织的形态与激素种类或浓度有关。高浓度的 2, 4-D 将导致水渍状或玻璃化的愈伤组织产生, 低浓度的 2, 4-D 形成瘤状愈伤组织。随着 6-BA 浓度的增加, 叶片的生根率降低, 茎段愈伤组织出现的时间提前, 愈伤组织生长的较快, 但当 6-BA 浓度到达 2.0mg/L 时, 愈伤组织出现时间推迟, 生长速度下降, 褐化速度加快。

关键词: 叶片; 茎段; 愈伤组织

中图分类号: S792.35.04 **文献标识码:** B

文章编号: 1001-0009(2006)04-0168-03

复叶槭(*Acer negundo* L.) 亦称糖槭、羽叶槭、白蜡槭, 属槭树科、槭树属。广泛分布于美国及加拿大。该树种喜光、耐旱、耐寒、耐烟尘, 根萌蘖性强, 生长较快, 对土壤要求不严; 树形挺拔秀美, 入秋叶色金黄, 具有很高的观赏价值及实用价值, 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。但目前的栽培苗木供不应求, 一般情况下, 主要采用常规的扦插和播种繁殖方法, 扦插繁殖系数低, 播种繁殖的后代易产生性状分离, 而组织培养作为重要的快速繁殖技术可以弥补二者的缺点。其中愈伤组织途径是进行组织培养快速繁殖的一条重要途径。现以复叶槭叶片和茎段为研究对象, 通过比较不同处理方法以及不同浓度的 2, 4-D、6-BA 等因素对复叶槭叶片和茎段愈伤组织诱导的效果, 从而为通过愈伤组织途径建立复叶槭组织培养再生体系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用材料来源于复叶槭的实生苗和复叶槭组培苗。

1.2 试验方法

1.2.1 复叶槭实生苗茎段的消毒 将来自 35d 左右的复叶槭实生苗茎段, 在加有 1~2 滴 Tween-20 和 1% 的 NaClO 溶液中进行表面消毒, 20d 后进行污染率、白化率统计, 从而筛选茎段的最佳消毒时间。

1.2.2 不同放置方式诱导茎段、叶片的愈伤组织 将茎段平放或竖放(分为正插和倒插两种)、叶片近轴面或远轴面分别放于 MS+0.01mg/L 2, 4-D+1.0mg/L BA 的培养基上, 20d 后观察记录, 比较放置方式对茎段和叶片愈伤组织诱导的影响。

1.2.3 不同碳源诱导叶片愈伤组织 以组培苗的叶片为外植体, 以 MS+0.7mg/L BA+0.01mg/L 2, 4-D 为培养基, 分别以葡萄糖、白砂糖、蔗糖为碳源(浓度均为 30g/L), 20d 后观察记录, 比较不同碳源对叶片愈伤组织的诱导效果。

1.2.4 不同黑暗处理时间诱导叶片愈伤组织 以组培苗的叶片为外植体, 将其接种到 MS+0.7mg/L BA+0.01mg/L 2, 4-D 培养基上, 然后放于培养室进行不同时间的黑暗处理(0、7d 和 15d), 20d 后进行观察记录, 比较黑

暗处理时间对叶片愈伤组织的诱导效果。

1.2.5 不同蔗糖浓度诱导叶片、茎段愈伤组织 以组培苗的叶片、茎段为外植体, 以 MS+0.7mg/L BA+0.01mg/L 2, 4-D 为培养基, 分别以 10g/L、20g/L、30g/L、40g/L 蔗糖为糖源, 比较蔗糖浓度对叶片、茎段愈伤组织的诱导效果, 20d 后进行统计。

1.2.6 2, 4-D 和 6-BA 诱导叶片和茎段愈伤组织 诱导愈伤组织培养基为: MS+0~1mg/L 2, 4-D; MS+0.01~2.5mg/L 6-BA; 所有培养基均用 1%NaOH 调节 pH 为 5.6~6.0, 除了比较不同碳源和蔗糖浓度对外植体的分化影响外, 均选用 30g/L 的蔗糖为碳源, 琼脂浓度为 7.6g/L。然后在 121℃条件下高压灭菌 13min。

1.2.7 不同指标的计算方法 每隔一周观察一次, 20~30d 统计出愈率、污染率、生根率等。计算公式如下:

出愈率=[产生愈伤组织的外植体总数/(接种外植体总数-污染外植体总数)]×100%

污染率=[未污染的外植体总数/接种外植体总数]×100%

生根率=[生根外植体的总数/(接种外植体总数-污染外植体总数)]×100%

外植体接种后, 除进行黑暗实验的比较外, 均放入培养室内进行培养, 培养室温度为 25±2℃, 光/暗周期为 14h/10h, 光照强度 2500~3500Lx。

2 结果与分析

2.1 茎段消毒时间的确定

表 1 茎段不同消毒时间的比较

消毒时间 项目	放置 方式	5	10	15	20	25
接种数(个)	横放	29	78	54	23	46
	竖放	23	25	25	25	19
污染率(%)	横放	13.8	4	0	0	0
	竖放	13.0	1.3	0	0	0
白化率(%)	横放	0	0	0	0	0
	竖放	0	0	0	0	0

从表 1 看出, 茎段的放置方式影响其消毒效果。随着茎段消毒时间的延长, 污染率下降。茎段在消毒时间超过 10min 后, 白化率虽然均为 0, 但发现有的茎段出现一端白化现象, 随着消毒时间的延长, 一端白化率相对较高。总的来说, 茎段在消毒 15min 时消毒效果最佳。放置方式对茎段白

化率没有影响。茎段横放于培养基时比竖放于培养基时的污染率要高,可能是由于横放时,茎段与培养基接触面积大,易吸收养分,培养基中由于表面水分相对较多,利于菌生长,不利于外植体生长。

2.2 外植体放置方式诱导愈伤组织

2.2.1 茎段放置方式诱导愈伤组织的影响 从表 2 看出,茎段的放置方式与出愈率关系不大,但对愈伤组织的大小、形态特性和部位与生根率有关。茎段平放时,茎段两端均产生愈伤组织,愈伤组织大小差异不大,茎段竖放时,上下两端产生愈伤组织大小差异明显,甚至只在茎段的一端产生愈伤组织。茎段竖放正插时,上部全部膨大产生较大的愈伤组织,为浅绿色或绿色,基部也全部产生愈伤组织,为黄绿色或浅绿色,但相对上端较小,约为上端的 1/2 或 1/3,愈伤组织大小为 0.6~0.7cm。而倒插时有的愈伤组织表现为水渍状,30%茎段的上端只是略胀大,基部(靠近培养基一端)愈伤组织大约为上端的 2~3 倍。放置方式影响愈伤组织的各种特性可能与植物体内不同部位的激素含量和运动方式有关,同时也与茎段的极性有关。

表 2 茎段不同放置方式诱导愈伤组织情况

放置方式	茎段数(个)	产生愈伤数(个)	出愈率(%)	愈伤颜色质地	生根率(%)
平放	24	24	100%	绿色或浅绿色,有的绿色愈伤周围有白絮状物。	25
正插	61	61	100%	浅绿色或绿色或黄绿色	0
倒插	30	30	100%	绿色或绿色周围有白絮状或浅绿色似水渍状	0

表 3 不同叶片放置方式产生愈伤组织情况

放置方式	叶片数(个)	产生愈伤数(个)	出愈率(%)	愈伤颜色质地
近轴面	20	20	100	黄绿色致密
远轴面	16	16	100	黄绿色致密

2.2.2 叶片放置方式诱导愈伤组织的影响 结果表明(表 3),叶片的放置方式对复叶槭叶片的出愈率和愈伤组织的颜色质地影响不大。叶片在接种 4d 后,大部分叶片开始出现膨大现象,向近轴面方向卷曲,愈伤组织出现的最早部位是叶脉处,7d 左右出现肉眼可见的愈伤组织。随后在叶片边缘产生带状的绿色愈伤。出现这种结果和叶脉处聚集过多的维管束有关。

2.3 不同碳源对叶片诱导愈伤组织的影响

表 4 不同碳源对叶片愈伤组织的诱导

糖源	接种数(个)	产生愈伤数(个)	出愈率(%)	备注
葡萄糖	24	13	54.2	在叶脉处产生愈伤组织,叶片变为浅绿色,硬而脆。
白沙糖	13	12	92.3	在叶脉处产生黄绿色致密愈伤。
蔗糖	24	20	83.3	在叶脉处产生浅绿色愈伤,少而小

结果表明(表 4),在不同碳源中,叶片出愈率不同,在白沙糖中最高,蔗糖次之。但从愈伤的外观和生长情况来看,叶片产生的愈伤在蔗糖中表现最佳。蔗糖一直被作为常用碳源而被利用,由此实验也得以证实。以后的实验均使用蔗糖作为碳源。

2.4 黑暗处理时间对叶片诱导愈伤组织的影响

结果表明(表 5),叶片经黑暗处理比不经黑暗处理的出愈时间早、出愈率高,经过 7d 和 15d 黑暗处理的叶片,5d 后在叶脉处和少数的叶缘出现了肉眼可见的愈伤组织,而未经黑暗处理的叶片,一周后才在叶脉处出现肉眼可见的愈伤组织,经过黑暗处理产生的愈伤组织颜色略浅,黑暗处理 15d 产生的愈伤组织质量与黑暗处理 7d 的效果在外观上差异不明显,只是颜色相对略浅而已。许多实验表明,暗处理影响叶片愈伤组织的再生不定芽数,由于在复叶槭中三种处理均没有得到再生不定芽,因此无法比较处理时间对不定芽的再生效果。但从愈伤组织的生长情况比较,处理 7d 效果好一些。因为黑暗处理时间过长,愈伤组织的颜色较浅,离体叶片因长时间不进行光合作用可能会因饥饿而死亡,从而会影响叶片愈伤组织的增殖和再生。

表 5 黑暗处理时间对叶片诱导愈伤组织的影响

黑暗处理接种数(d)	产生愈伤数(个)	出愈率(%)	备注
0	24	20	83.3 多数只在叶脉处产生,少而小
7	26	26	100 在叶脉和叶缘均产生形成带状,愈伤为黄绿色,多而大,尤其在叶脉处可达 0.5cm。
15	21	21	100 愈伤为浅绿色,其余同上

2.5 不同蔗糖浓度对叶片、茎段诱导愈伤组织的影响

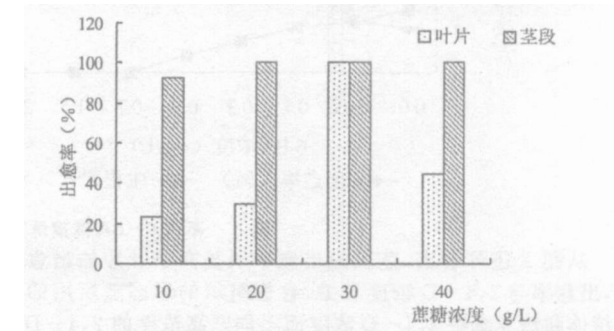


图 1 不同蔗糖浓度对叶片和茎段诱导愈伤组织

从图 1 看出,随着蔗糖浓度的增加,叶片的出愈率增加,在 30g/L 时最大,浓度再增加出愈率则下降。接种一周后,在加有 10g/L 和 20g/L 蔗糖的培养基中,分别有 61.5% 和 40.0% 的叶片边缘开始变白。20d 后,除了在含有 30g/L 的蔗糖的培养基中在叶脉和叶缘均产生了黄绿色愈伤组织外,其余均仅在叶脉处产生黄绿色少量的愈伤。在相同的蔗糖浓度中,茎段的出愈率均显著高于叶片的出愈率。除了在含有 30g/L 蔗糖的培养基中,茎段产生的愈伤为嫩绿色、较多、长势很好外,其余均表现为严重或不严重的水渍状,在 10g/L、20g/L、40g/L 蔗糖中具体分别表现为浅黄绿色水渍状较少、浅白绿色水渍疏松愈伤较多、黄绿色致密少量呈水渍状愈伤较少。这主要是因为蔗糖浓度不适宜导致培养基中的渗透势不当造成的。可见无论是哪种外植体,选用 30g/L 的蔗糖浓度较为适宜。

2.6 2,4-D 对叶片、茎段诱导愈伤组织的影响

2,4-D 常被用来诱导愈伤组织形成及其增殖。从图 3 看出,2,4-D 对叶片愈伤诱导具有较强的作用,并且促进不定根的形成,也就是它可能对植物体内的生长素具有激活的作用。愈伤组织的形态随所用的外植体和培养基中 2,4-D 浓度而不同,这与 Matsuda 的结果一致。另外,2,4-D 浓度与叶片出愈率和生根率呈线形关系,随着 2,4-D 浓度的增

加,产生愈伤组织的水渍化程度愈高,生根率逐渐降低。随着培养时间的延长,松软水渍化的愈伤组织逐渐褐化死亡。在不加 2,4-D 的培养基中,叶片也能在叶缘处形成带状愈

伤,并能在叶脉处直接产生根。由此说明复叶槭植物体内含有较高浓度的内源生长素。

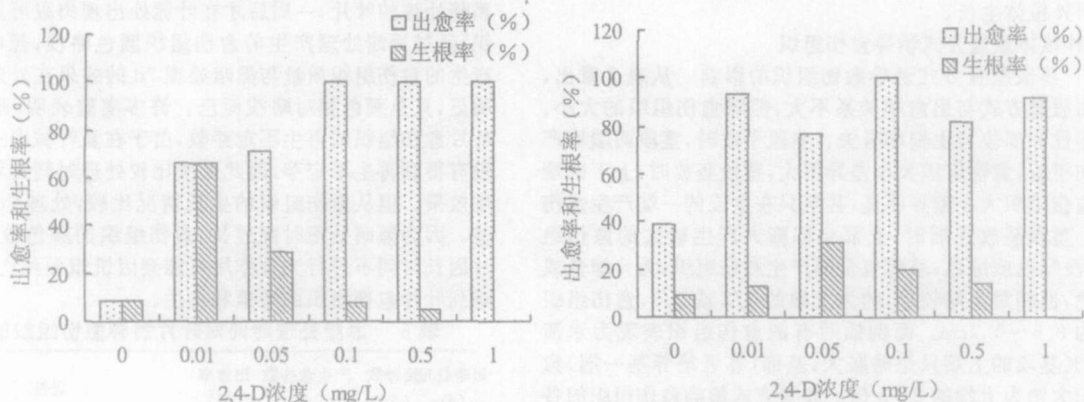


图2 不同 2,4-D 浓度对叶片(左)和茎段(右)诱导愈伤组织

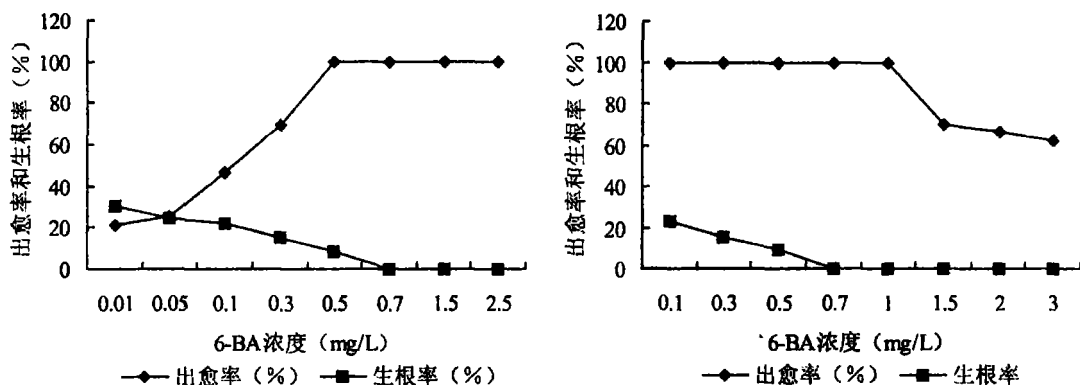


图3 不同 6-BA 浓度诱导叶片(左)和茎段(右)愈伤组织

从图2还可看出,茎段的出愈率明显高于叶片的出愈率,出愈率与 2,4-D 浓度有关,愈伤组织的形态随所用的外植体和培养基中 2,4-D 浓度而不同。高浓度的 2,4-D 将导致水渍状或玻璃化的愈伤组织产生,低浓度的 2,4-D 容易诱导外植体形成瘤状愈伤组织。在 2,4-D 为 0.1mg/L 时,愈伤组织体积达到最大,但质量不好,为水渍状,在 2,4-D 浓度为 0.01mg/L 时,茎段基部产生大量愈伤组织,为绿色系,生根率也不是很高,在 2,4-D 浓度为 0.05mg/L 时,乳黄或白色颗粒状的愈伤组织表面有白絮状物覆盖,茎段于不加任何激素的培养基上,当茎段直径在 0.2~0.3cm 以上时,茎段两端产生愈伤组织。而茎段直径小于 0.2cm 的 6 个茎段未产生愈伤组织。说明茎段的粗细即年龄与愈伤组织的诱导能力也有关系。因此,从整体来看,诱导茎段愈伤选择 2,4-D 浓度为 0.01mg/L 时较为适宜。有研究认为,胚性愈伤组织的诱导通常需要相对高的植物激素浓度,尤其是 2,4-D^[3,4]。但在本实验中却相反,当 2,4-D 浓度为 0.01mg/L 时,茎段和叶片产生的愈伤组织从形态上相对较好,当 2,4-D 浓度达到 0.1mg/L 时,无论是哪种外植体均产生水渍状的愈伤组织,一般认为这种愈伤组织难以进行再分化。进一步证明不同的植物种类所需的植物激素的浓度不同。

2.7 6-BA 对叶片和茎段诱导愈伤组织的影响

从图3看出,不同浓度的 6-BA 对叶片和茎段的脱分化能力有一定的影响。在所用的 6-BA 浓度梯度中,BA 浓

度与叶片的出愈率和生根率呈线形关系,在加有不同浓度 6-BA 的培养基中,叶片出现愈伤组织的时间和位置稍有差异,浓度越高,出现的时间越早,有的在叶缘伤口处产生,有的主要在叶脉受伤处形成致密的愈伤组织。当浓度大于 0.5mg/L 时,出愈率达到 100%,但在浓度为 1.5mg/L 时,产生愈伤组织的时间推迟,并且愈伤组织开始较早地出现褐化。随着 6-BA 浓度的增加,叶片的生根率降低,可见,高浓度的 6-BA 抑制不定根的形成。6-BA 浓度影响茎段愈伤组织的质地和颜色等。在诱导过程中发现,愈伤组织先在皮层表皮形成,而形成层以内的组织较晚形成愈伤组织或不形成愈伤组织。随着 6-BA 浓度的升高,茎段愈伤组织出现的时间较早,愈伤组织生长的较快,但当 6-BA 浓度到达 2.0mg/L 时,愈伤组织的出现时间反而推迟,愈伤组织生长的速度下降,愈伤组织褐化的时间加快。在 BA 为 0.1~1.0mg/L 范围内,茎段在接种 1 周后,两端首先开始膨大,并形成亚铃型,20d 后形成较好的愈伤组织。于 0.7mg/L 6-BA 培养基上,茎段产生淡黄绿色颗粒状愈伤组织,靠近培养基的愈伤组织有 50% 变褐,45% 茎段上靠近愈伤组织周围有褐色东西产生,均有 0.8cm 长。于 0.1mg/L 6-BA 培养基上,80% 的茎段产生类似褐色芽的物质,但随着 6-BA 浓度的增加,类似褐色芽的物质逐渐减少,分析可能是外源激素的加入,激活了外植体的内源激素,在复叶槭的不同外植体中,内源激素中可能是生长素含量最高,生长素活性的增加导致了褐色芽的产生。