

# 我国槭树科组织培养研究进展

张春艳, 吴 瑜

(中国科学院 成都生物研究所, 四川 成都 610041)

**摘 要:**该文从外植体选择和消毒、培养基种类、生长调节剂 3 方面介绍了槭树科植物组织培养研究进展;并综述了组培过程中存在的问题及解决方法,总结了其发展趋势,以期为今后槭树科植物组培研究提供参考。

**关键词:**槭树科;组织培养;研究进展

**中图分类号:**S 566.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)07-0181-04

槭树属槭树科(Aceraceae)乔木或灌木,其显著特点是叶对生和翅果,大多数是虫媒型,少数种类是风媒型,是槭树科槭属树种的泛称,其中一些种俗称“枫”或“枫树”。全世界的槭树植物有 199 种,我国是槭树种类最多的国家,现已发现 155 余种,主要分布在长江流域以及南方各省区<sup>[1-3]</sup>。

槭树科槭属大多数种类极具观赏价值,是温带最重要的观赏树木,也是国外重要的行道树种。槭树独树一帜,形态优美,叶色丰富多彩,古往今来一直是世界闻名的观赏植物,历代文人墨客对其青睐有加,描绘的诗文也屡见不鲜,西晋人潘岳在《秋兴赋》中有“庭树槭以洒落”之句<sup>[4]</sup>。近几十年来,各地公园、风景名胜区内,特别是植物园十分重视槭树的引种驯化工作。

槭树繁殖主要采用播种和嫁接 2 种传统方法<sup>[5]</sup>,繁殖系数低,繁殖的后代易产生性状分离。随着园林建设迅速发展,槭树作为重要的观赏植物,其苗木的需求量也越来越大。我国落后的槭树繁殖技术和与日俱增的市场需求之间的矛盾日益突出。因此,槭树属的快速繁殖技术逐渐受到重视。其中应用组织培养技术建立槭树再生体系是目前研究最多也是最受欢迎的方法。组织培养技术不仅能加快获得苗木的速度,还能极大促进其品种改良和分子育种的发展。其关键技术是选择合适的

再生途径,这对建立高效的再生体系十分重要。该文综述了我国槭树组织培养研究进展,以期为槭树开发利用和快速繁殖提供参考。

## 1 外植体选择

木本植物含有较多的多酚类物质,会阻碍细胞分裂。因此,木本植物的离体培养成功率与草本植物相比还很低。已有研究显示,种子、叶片、茎尖、侧芽、根、花粉等均具有细胞全能性,能够再生新植株的任何组织或器官,都可以作为外植体。但是外植体的来源及发育阶段、不同生理时期或不同部位酚类物质的含量都存在较大差异,因此,外植体的选择对器官发生具有重要意义。叶景丰等<sup>[6]</sup>对挪威槭的组织培养以种子为外植体获得无菌试管苗,同时,还以自由人槭的顶芽、幼嫩茎段为外植体,通过比较发现顶芽作为外植体更利于芽的萌发;顾地周等<sup>[7]</sup>利用色木槭早春的休眠枝水培发芽,取其嫩茎进行生根,生根率达到 99%;孟月娥等<sup>[8]</sup>从田间选取春季生长健壮、无病虫害、叶片色彩好的茶条槭植株,取其幼嫩枝条作为外植体,效果较好;李岩岩<sup>[9]</sup>取茶条槭月初的顶芽、侧芽、带侧芽的茎段作为外植体诱导培养,结果发现受污染率程度依次为顶芽<侧芽<茎段,诱导萌发率依次为茎段>顶芽>侧芽;唐丽等<sup>[10]</sup>以红翅槭嫩茎和嫩叶为外植体进行组织培养,发现嫩茎的分化率高,嫩叶分化速率快;陈丽等<sup>[11]</sup>利用血皮槭的嫩茎、叶和叶柄进行愈伤组织诱导,发现外植体中诱导愈伤组织容易程度为嫩茎>叶柄>叶;胡雪雁等<sup>[12]</sup>以健康生长的加拿大红枫的叶片、叶柄、顶芽、侧芽为外植体,诱导愈伤组织,比较发现最适外植体是顶芽。可见,槭树的种子、顶芽、侧芽、嫩茎、叶片、叶柄都可以通过组织培养获得健康植株,其中嫩茎是繁殖成功率较高的外植体,但是其也比较容易受到污染。顶芽和侧芽的污染率相对较

**第一作者简介:**张春艳(1988-),女,博士研究生,现主要从事植物组织培养和小麦遗传育种等研究工作。E-mail:zhangchunyan1988@163.com.

**基金项目:**国家“十二五”科技支撑计划资助项目(2011BAD35B03);中国科学院知识创新工程重要资助项目(KSCX3-EW-N-02);中国科学院成都分院与都江堰市院地合作资助项目;中国科学院山地生态恢复与生物资源利用重点实验室资助项目。

**收稿日期:**2013-12-13

低,也是不错的外植体来源,但是其材料来源往往受到限制。所以,一般选择早春生长健壮的嫩茎作为外植体,成功率大,但是要严格注意外植体的消毒。

## 2 外植体的消毒预处理

暴露在空气中的植物,表面带有大量的微生物,选择各个部位作为外植体时,必须进行严格的消毒灭菌,否则将直接影响到试验成功与否,可见,外植体的消毒处理很关键。现在常用的消毒剂有氯化汞、次氯酸钠、过氧化氢、酒精、抗菌素和硝酸银等<sup>[13]</sup>。孟月娥等<sup>[8]</sup>采取茶条槭带萌发的茎段,用软毛刷蘸取洗液细刷洗叶腋及表皮,用自来水冲洗1~2 h。将清洗干净段放入70%乙醇溶液中浸泡30 s,用无菌水冲洗3~5次,然后用0.1% HgCl<sub>2</sub>消毒7 min,再用无菌水冲洗3~5次;顾地周等<sup>[7]</sup>取色木槭经过水培萌发的嫩茎在超净工作台上用70%酒精涮洗20 s,然后用2%链霉素溶液浸泡3 min,无菌水洗6次,用无菌滤纸吸干表面水分;刘宝光等<sup>[14]</sup>取7月中旬无病害生长良好的翅果,在4℃冰箱冷藏2 d,用软毛刷沾少许洗洁精刷洗,减去种翅,冲洗2~3 h,然后在超净工作台内,用70%乙醇浸泡外植体30 s,无菌水冲洗,在用1%次氯酸钠溶液消毒10 min,无菌水冲洗4~5次;取35 d的复叶槭实生苗茎段,加1~2滴Tween-20,用1%的NaClO溶液消毒15 min<sup>[15]</sup>。可见,由于其取材部位和外植体生理活性状态的不同,消毒剂的选择和处理时间会存在明显的差异。

## 3 培养基

经过消毒后的离体组织需要通过合适的培养基进行培养才能进一步发育成愈伤组织,从而实现实验室的第一步成功。培养基能为离体植物组织提供所需的营养物质,是影响植物组织培养成败的关键因素之一,不同植物或同种植物不同阶段和不同的目的对营养的需求都不同,首先培养基的选择必须根据选择的物种、外植体类型和培养目的而决定。常用的基本培养基为MS、1/2MS、WPM、B5,不同培养基中的无机离子、有机营养物质含量也存在差异,因此需要分阶段根据培养的目的和外植体类型选择适宜的培养基;李艳敏等<sup>[16-17]</sup>在金叶复叶槭和粉叶复叶槭的组培过程中,利用WPM培养基进行芽的增殖和生根;加拿大红枫愈伤组织诱导和不定芽的增殖采用1/2MS培养基<sup>[12]</sup>;而日本红枫启动和增殖培养基是MS,而生根培养基是1/2MS<sup>[18]</sup>;景观树种红翅槭愈伤组织诱导和不定芽的增殖采用的都是MS培养基<sup>[19-20]</sup>;血皮槭愈伤组织诱导用的是MS培养基<sup>[11]</sup>;郝爱丽<sup>[21]</sup>研究表明,综合考虑生根数、根长和生

根率等因素,MS培养基要优于1/2MS培养基;同时还比较了MS、1/2MS、WPM、B5 4种培养基,考虑到产生的愈伤组织鲜重和愈伤组织的诱导率等两方面,显示青榨槭愈伤组织诱导采用MS培养基比较好。

## 4 外源激素

除了基本培养基给予离体组织所需营养成分外,配合使用外源激素对植物细胞分裂、诱导器官形成也具有重要作用。生长素和细胞分裂素是2种关键的外源激素,不同的生长发育阶段所需的浓度配比也不尽相同。普遍认为,生长素与细胞分裂素比例高时,愈伤组织仅生成根,二者比值低时,生成苗。在愈伤组织形成植株的过程中,一般将不定芽形成和根的诱导分成2个过程,即将愈伤组织诱导形成不定芽,通过继代培养增加芽的繁殖系数,当不定芽长到合适大小后,将其切下转入生根培养基中诱导不定根的形成<sup>[22]</sup>。

生长素的种类很多,如2,4-D、NAA、IAA、IBA等,对重新启动有丝分裂,使植物细胞脱分化,对愈伤组织的诱导、增殖和植物生根具有重要作用。2,4-D是常用的生长素,能诱导愈伤组织的形成和实现细胞悬浮培养,其浓度过高时能抑制芽的形成。张彦妮等<sup>[23]</sup>在复叶槭茎段及叶片的组织培养中发现,低浓度的2,4-D利于瘤状愈伤组织形成,而当使用高浓度2,4-D时愈伤组织会玻璃化;进行血皮槭的组织培养时,2,4-D比NAA更利于愈伤组织的形成<sup>[11]</sup>。培养基中不加生长调节剂也能产生根,但生根数量少,根比较细,移栽对地上部分生长不利,影响成活率,适量的添加生长素利于生根。张彦妮等<sup>[23]</sup>发现添加NAA利于根变粗,但浓度过大时,苗长势会下降,最佳浓度为0.1 mg/L;李海艳等<sup>[24]</sup>在茶条槭愈伤组织的再生体系过程中发现用WPM+0.3 mg/L IBA生根效果好,添加NAA延缓了根的出现;李艳敏等<sup>[25]</sup>探讨NAA、IBA、KT对金叶复叶槭组培苗生长作用,结果发现,WPM+IBA 0.08 mg/L利于根生长及增殖生长。

常见的细胞分裂素有6-BA、TDZ、ZT、KT等,能促进细胞分裂,对愈伤组织诱导、不定芽的分化和增殖很重要。6-BA使植物体的代谢能力加强,可诱导组织内天然激素产生,相对于其它细胞分裂素而言对芽的增殖效果要好<sup>[26-27]</sup>。张彦妮等<sup>[15]</sup>发现复叶槭茎段愈伤组织诱导随6-BA浓度增加而提前,但当浓度到2.0 mg/L时,不仅愈伤组织的产生延缓了,而且褐化的速度也加快了。茶条槭组培中发现,随着6-BA浓度增加茶条槭幼茎增值率也提高<sup>[9]</sup>;在复叶槭顶芽增殖培养基中适当提高6-BA(0.1~0.3 mg/L)浓度使4.7%的顶芽在愈伤组

织基部上产生不定芽<sup>[23]</sup>。TDZ 是一种很强的细胞分裂素,对木本植物很有效<sup>[28]</sup>。徐榕等<sup>[29]</sup>发现 TDZ 对自由人槭‘冷俊’无菌苗有显著增殖效果;元宝枫组培中,TDZ 在外植体增殖生长方面有明显的作用<sup>[30]</sup>。

愈伤组织诱导以及芽的分化和增殖过程中,最好配合使用生长素和细胞分裂素,但要掌握二者的浓度。五角枫高效诱导愈伤较好的激素配比组合为 6-BA、2,4-D 和 NAA<sup>[31]</sup>;郝爱丽<sup>[21]</sup>用青榨槭叶片诱导愈伤组织时,发现培养基中添加 TDZ 0.5 mg/L 和 NAA 0.1 mg/L,诱导率达 98.7%。所以组培中要根据阶段和目的不同,选择合适的生长素和细胞分裂素。

## 5 其它因素的影响

### 5.1 碳源

在组培初期,植物组织不能进行光合作用,需要添加碳源。碳源提供能量的同时也能维持一定的渗透压,碳源的种类很多,但蔗糖是最常用的。李艳菊等<sup>[30]</sup>发现元宝枫组培时添加葡萄糖,出现玻璃化苗较多,蔗糖可以促使高生长和丛生芽萌发,效果好于葡萄糖。

### 5.2 活性炭

活性炭虽然不是组培过程中的必需成分,但在组织培养的过程中可能发挥着重要的作用。徐榕等<sup>[29]</sup>以自由人槭‘冷俊’为试材,发现活性炭对其生根有很大的影响。活性炭能吸附培养基中的有害物质,同时也能吸附培养基中的生长调节物质<sup>[32]</sup>,因此,在使用的过程中要把握活性炭的浓度,使其发挥更好的作用。

### 5.3 光照

光照可以影响生根和不定芽诱导。研究发现,对元宝枫的生根培养,与每天 12 h 光照相比,每天 16 h 光照有助于幼茎生根<sup>[30]</sup>;在青榨槭组织培养中,通过比较不同暗培养时间发现,叶片和茎段的不定芽诱导率先增加后降低趋势,20 d 时效果最佳,随着时间延长,诱导率下降,出现褐化,不利于芽的生长<sup>[21]</sup>。

### 5.4 pH 值

培养基中 pH 值对细胞分裂分化、植物激素进入细胞、植物代谢等都存在一定的影响<sup>[33]</sup>。郝爱丽<sup>[21]</sup>研究发现,随 pH 值增大,不定芽诱导率先升高后降低,培养基适宜的 pH 为 5.8~6.2。

## 6 存在问题

### 6.1 褐化

褐化是植物组织培养过程中常见的现象,是由于酚类化合物和多酚氧化酶接触发生的反应<sup>[34]</sup>。木本植物含有较高的酚类化合物,采取有效措施控制褐化可以提高木本组织培养的成功率。产生褐化的因素很多,如植

物种类、外植体的选择、外源生长调节剂、培养基及培养条件等<sup>[35]</sup>。

槭树组培过程中经常发生褐化。可以采取不同方法来解决这个问题。周音等<sup>[36]</sup>研究了抗坏血酸、亚硫酸钠、柠檬酸 3 种抗氧化剂对茶条槭组培褐化的影响,发现一定浓度下三者配合使用效果要好;招雪晴等<sup>[37]</sup>采取不同取材时间、添加抗褐变剂、暗处理等措施来提高自由人槭‘秋焰’的抗褐化作用,结果发现取材时要取早春的材料,可能多酚氧化酶活性较低,可降低褐化;2.0 g/L PVP 比 AC、Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 效果要好;褐化率随黑暗处理时间的延长呈高-低-高的趋势。可见,添加好的抗氧化剂,控制取材时间,进行黑暗处理都有可能降低槭树组织培养的褐化率,但是不管采取什么措施,要达到控制褐化的同时也要利于外植体进一步增殖分化。

### 6.2 污染

污染是木本植物组培过程中的另一大难题。污染主要来自植物体自身和操作不严格<sup>[38]</sup>两方面。因此在取材时尽量选择带菌少的部位,注意取材的时期,材料的消毒处理方面要采取严格的方法;组培用的玻璃器皿、镊子、手术刀等要进行严格的高温高压灭菌尽可能减少污染的几率。

## 7 展望

槭树是重要的绿化植物,栽培苗木供不应求。国外已经成功育出了各种色彩斑斓的槭树,但在我国槭树观赏资源的开发利用却很有限。驯化引进物种也存在各种困难。组织培养在槭树的资源保存、新品种选育等方面有着很好的应用前景,因此进一步研究该技术对槭树的育种有很大的推动作用。

近年来,虽然许多学者已在主要的观赏槭树(如茶条槭、复叶槭、五角枫)的组织培养方面取得了一些进展,但却没有形成完整的组培体系,要实现工厂化育苗还存在较大困难。

因此,为了更好的推动槭树组培技术的研究,更快的实现工厂化生产,可以从几个方面开展工作。第一,优化快繁体系,提高可重复性;第二,要加强对其它槭树的组织培养技术,扩大快繁种类;第三,利用细胞培养生产有用的次生代谢产物,积极探索组培规模化生产次生代谢产物的方法;第四,可以利用转基因等遗传方法进行其它方面的改造。槭树的叶片易受到虫害的影响,张彦妮等<sup>[23]</sup>已经利用农杆菌介导法和针刺法将神经毒、蛋白基因 *Toxin* 和 *Bt* 基因导入复叶槭进行了初步试验。因此,有关转基因研究尚处于起步阶段,需要进行更加深入的研究。



## 参考文献

- [1] 中国树木志编辑委员会. 中国树木志[M]. 北京: 中国林业出版社, 1983:112-113.
- [2] 徐延志. 我国槭属植物资源评价[J]. 资源开发与保护, 1988(4): 51-54.
- [3] 徐延志. 槭树科的地理分布[J]. 云南植物研究, 1996, 18(1): 43-50.
- [4] 祁振声, 陆贵巧, 谷建才, 等. “枫”的误传与“槭”的误订[J]. 北京林业大学学报(社会科学版), 2006, 5(2): 37-42.
- [5] 窦玥. 两种槭树的组织培养和防治组培污染的初步研究[D]. 沈阳: 辽宁师范大学, 2010.
- [6] 叶景丰, 陈翌, 马冬菁, 等. 二种槭树有效获得无菌试管苗的研究[J]. 北方园艺, 2009(12): 117-119.
- [7] 顾地周, 丛小力, 姜云天, 等. 色木槭的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(2): 314.
- [8] 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.
- [9] 李岩岩. 茶条槭组织培养与快速繁殖技术研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2007.
- [10] 唐丽, 钟秋平, 刘显梅, 等. 红翅槭的组织培养及快繁技术[J]. 北方园艺, 2010(9): 136-138.
- [11] 陈丽, 李冰, 王梅, 等. 血皮槭的愈伤组织培养研究[J]. 北方园艺, 2010(8): 170-172.
- [12] 胡雪雁, 胡业华, 管倩, 等. 加拿大红枫愈伤组织诱导研究[J]. 林业实用技术, 2012(1): 3-5.
- [13] 曹改义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科技技术出版社, 1990.
- [14] 刘宝光, 施莹. 白牛槭的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(6): 613-614.
- [15] 张彦妮, 卓丽环. 复叶槭叶片和茎段诱导愈伤组织的影响因素[J]. 北方园艺, 2006(4): 168-170.
- [16] 李艳敏, 孟月娥, 赵秀山, 等. 金叶复叶槭组织培养技术研究[J]. 河南农业科学, 2008(7): 98-99.
- [17] 李艳敏, 孟月娥, 赵秀山, 等. 粉叶复叶槭的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2007(5): 895.
- [18] 李莹, 罗晓芳. 日本红枫组织培养技术研究[J]. 黑龙江农业科学, 2010(10): 4-7.
- [19] 唐丽, 钟秋平. 景观树种红翅槭愈伤组织增殖培养[J]. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(11): 69-73.
- [20] 唐丽, 钟秋平. 景观树种红翅槭组织培养中的不定芽诱导[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(3): 606-609.
- [21] 郝爱丽. 青榨槭愈伤组织诱导分化及生根生理生化基础研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2010.
- [22] 巩振辉, 申书兴. 植物组织培养[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 67-68.
- [23] 张彦妮, 卓丽环. 复叶槭组织培养再生体系建立及其遗传转化初步研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2005.
- [24] 李海艳, 宋继园, 董杰, 等. 茶条槭愈伤组织的再生体系建立及其没食子酸含量的测定[J]. 植物学通报, 2008, 25(2): 212-219.
- [25] 李艳敏, 孟月娥, 赵秀山, 等. 金叶复叶槭组织培养技术研究[J]. 河北农业科学, 2008(7): 98-99.
- [26] De Bruyn M H, Ferreira D I. *In vitro* corm production of *Gladiolus dalenii* and *gtristis*[J]. *Physiol Plant*, 1978, 43: 13-18.
- [27] Tang H R, Ren I L, Reustle G, et al. Plant regeneration from leaves of sweet and sour cherry cultivars [J]. *Scientia Horticulturae*, 2002, 93: 235-244.
- [28] Huetteman C A, Preece J E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant cell tissue culture[J]. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 1993, 33: 105-121.
- [29] 徐榕, 苑兆和, 招雪晴, 等. 生长调节剂对自由人槭‘冷俊’组培过程中增殖及生根的效应[J]. 山东林业科技, 2009(5): 17-20.
- [30] 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.
- [31] 聂鹤云. 五角枫组织脱分化与器官再生的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2012.
- [32] 刘根林, 梁珍海, 朱军. 活性炭在植物组织培养中的作用概述[J]. 江苏林业科技, 2001, 28(5): 46-48.
- [33] 曹新祥, 韩小云. 植物组织培养中的 pH 值[J]. 杭州师范学院学报(自然科学版), 2003, 2(1): 60-63.
- [34] 陈凯. 植物组织培养中褐变的产生机理及抑制措施[J]. 安徽农业科学, 2004, 32(5): 1034-1036.
- [35] 马燕, 韩瑞超, 臧德奎, 等. 木本观赏植物组织培养研究进展[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(4): 1956-1958.
- [36] 周音, 张智奇, 张建军, 等. 3 种抗氧化剂对茶条槭组织培养污染及褐化的影响[J]. 上海农业学报, 2007, 23(1): 5-7.
- [37] 招雪晴, 苑兆和, 徐榕, 等. 自由人槭‘秋焰’组培的褐变控制研究[J]. 中国农学通报, 2010, 26(4): 200-204.
- [38] 李艳菊, 马履一, 久岛繁. 元宝枫繁殖技术与应用研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2004.

## Research Progress on Tissue Culture of Aceraceae Plants in China

ZHANG Chun-yan, WU Yu

(Chengdu Institute of Biology, Chinese Academic of Sciences, Chengdu, Sichuan 610041)

**Abstract:** The research progress on tissue culture of Aceraceae plants from explant selection and disinfection, medium types, growth regulator were introduced in this paper, the problem in the progress of tissue culture and their solutions were reviewed, at the same time, the prospects which provided references for further study on tissue culture of Aceraceae plants were summarized.

**Key words:** Aceraceae; tissue culture; research progress