

DOI:10.11937/bfyy.201608027

紫叶挪威槭再生体系建立

王子岚^{1,2}, 佟欣³, 杜克久^{1,2}

(1. 河北农业大学 林学院, 河北 保定 071000; 2. 河北省林木种子资源与森林保护重点实验室, 河北 保定 071000;
3. 承德市滦平县国有林场管理处 于营子林场, 河北 滦平 067000)

摘要:以紫叶挪威槭2年生枝条水培后展开1~2片小叶的萌发芽为试验材料,采用无菌条件下组织培养的方法,研究了紫叶挪威槭外植体材料不同的消毒方法和时间,不同的不定芽和不定根分化培养基对再生体系建立的影响,以期低污染、高效的建立紫叶挪威槭的再生体系。结果表明:萌发芽经2%洗涤灵溶液洗涤,无菌水冲洗,去除残留,70%乙醇处理30 s,无菌水冲洗5~6次,1%次氯酸钠消毒液处理20 min,无菌水冲洗5~6次,接种到不定芽分化培养基MS+0.05 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA+0.3 g/L CH(水解酪蛋白)+2.0 g/L PVP+30 g/L 蔗糖(pH 5.5)诱导并产生不定芽。不定芽继代至不定根分化培养基MS+0.4 mg/L IBA+0.05 mg/L NAA+0.3 g/L CH+2.0 g/L PVP+25 g/L 蔗糖(pH 5.5)诱导形成不定根,建立了紫叶挪威槭的植株再生体系。

关键词:紫叶挪威槭;萌发芽;组织培养;再生体系

中图分类号:S 792.35 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)08-0096-04

紫叶挪威槭(*Acer platanoides* L. 'Crimson King')
属槭树科槭树属落叶乔木,又名红国王、国王枫、红帝娜

第一作者简介:王子岚(1989-),女,硕士研究生,现主要从事环境毒理与生物修复等研究工作。E-mail:zilanwang@126.com

责任作者:杜克久(1965-),男,河北抚宁人,博士,教授,现主要从事植物基因工程生物安全评价及环境修复等研究工作。E-mail:dukejiu@126.com

基金项目:“十二五”农村领域国家科技计划资助项目(2012AA101403);环境化学与生态毒理学国家重点实验室开放基金资助项目(KF2009-03);河北省强势学科资助项目。

收稿日期:2015-12-23

威槭、大叶红枫、紫叶挪威槭,原产欧洲。其叶片随季节的变化而呈现不同的颜色,常作为观赏植物被栽植在公路或街道两旁^[1-8]。其生命力旺盛,适应性较强,是园林绿化的优良树种,市场需求量极大,并且价格昂贵。但其繁殖比较困难,扦插和移栽成活率低,播种繁殖后代需要的时间比较长,并且容易产生性状分离^[9]。因此建立和完善紫叶挪威槭的植株再生体系,实现紫叶挪威槭的快速繁殖,具有重要的理论意义和实际应用价值。

王静等^[9]利用紫叶挪威槭的休眠芽为外植体,在WPM培养基上培养,获得无菌体系。利用休眠芽为外

The Establishment of Regeneration System of Tissue Culture of *Artemisia annua* L.

LI Fei, MA Huanxin, LI Zhong'ai, WANG Zicheng

(College of Life Science, Henan University, Kaifeng, Henan 475004)

Abstract: In order to investigate the callus induction and the regeneration of the plant of *Artemisia annua* L., to obtain rapid reproduction technology, the leaves and petioles of *Artemisia annua* L. were taken as explants, and the MS culture was chosen as the basic culture medium to be used in different combinations with hormone. The results showed that using leaves of *Artemisia annua* L. as explants, the callus induced medium was MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D, the induction rate was 78.0%; the differentiation medium was MS+1.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA+3% sucrose+0.7% agar powder, the differentiation rate was 95.3%. The differentiated seedling rooted well in the culture medium 1/2MS+1.0 mg/L NAA, the rooting rate was 98.9%. Petioles of *Artemisia annua* L. could be a seedling by one step in medium MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D. The system could effectively shorten the training period, and was worthy of study.

Keywords: *Artemisia annua* L.; leaf; petiole; tissue cultivation; plant regeneration

植株进行原代培养时,需要剥去 2~3 层芽鳞,操作难度大,容易污染。利用水培以后展开 1~2 片小叶的萌发芽为外植体进行离体培养,在芽萌发过程中鳞片自动脱落,省去了人工剥离外层鳞片过程,消毒处理后可直接接种到不定芽诱导培养基上,操作简便,减少了污染,更容易获得无菌培养材料,可为紫叶挪威槭植株再生体系建立奠定基础,有关研究目前尚鲜见文献报道。现以紫叶挪威槭 2 年生枝条水培后展开 1~2 片小叶的萌发芽为试验材料,采用无菌条件下组织培养的方法,研究了紫叶挪威槭外植体材料不同的消毒方法和时间,不同的不定芽和不定根分化培养基对再生体系建立的影响,以期建立低污染、高效的紫叶挪威槭的再生体系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试紫叶挪威槭 (*Acer platanoides* L. 'Crimson King') 枝条采自河北省保定市安国市苗圃内。

1.2 试验方法

1.2.1 材料处理 初春晴天的中午,剪取带休眠芽的 2 年生枝条,带回到实验室内进行水培,24 h 更换 1 次水,自来水要提前准备好,保持与室温一致,才可接入到培养枝条的容器中。待休眠芽萌发出 1~2 片小叶时,将萌发芽和从苗圃采集的当年生嫩茎作为外植体进行组织培养。

1.2.2 试验设计 将水培后展开 1~2 片小叶的萌发芽和从苗圃采集的当年生嫩茎(剪成 1.5~2.5 cm),用 2% 的洗涤灵溶液冲洗 1 min,去除表面油污和尘土,无菌水冲洗干净,去除洗涤灵残留,用 70% 的乙醇进行表面消毒 30 s,无菌水冲洗 5~6 次,再用 1% 的次氯酸钠消毒液分别浸泡 0、10、15、20、25、30、35、40 min,然后用无菌水冲洗 5~6 次,将它们分别接种在不定芽诱导培养基上和继代增殖培养基上,待其发出 2~3 片小叶时,苗高长至 3 cm 左右时,将其接种在生根培养基上进行培养。将紫叶挪威槭水培后展开 1~2 片小叶的萌发芽和从苗圃采集的当年生嫩茎分别接种于不定芽诱导培养基上,每天观察试验结果。

1.2.3 培养条件及培养基 试验培养温度为 (25±2)℃,光照强度 1 800 lx,光照时间 16 h/d;不定芽诱导、不定根诱导培养基均为 MS 培养基添加 2.0 g/L PVP 和 0.3 g/L CH(水解酪蛋白),所用外源激素的浓度单位为 mg/L;不定芽诱导培养基附加蔗糖 30 g/L,琼脂 6.5 g/L,不定根诱导培养基均附加蔗糖 25 g/L,琼脂 6.5 g/L,使用的培养基种类见表 1~3。

1.3 项目测定

成活率(%)=长势正常的萌发芽/接种数量×100;污染率(%)=被污染(真菌和细菌)的萌发芽/接种数量×100;死亡率(%)=褐化和被次氯酸钠烧坏的萌发芽/接

表 1 不定芽诱导培养基

Table 1	Induction medium of adventitious budsc			mg/L
	萘乙酸 NAA	6-苄基腺嘌呤 6-BA	赤霉素 GA	
WPM	0.05	1.0	0.5	
	0.05	2.0	1.0	
	0.10	1.0	1.0	
	0.10	2.0	0.5	
	0.05	1.0	0.0	
MS	0.05	1.0	0.5	
	0.05	2.0	1.0	
	0.10	1.0	1.0	
	0.10	2.0	0.5	
	0.05	1.0	0.0	

表 2 增殖培养基

Table 2	Induction medium of proliferation			mg/L
	萘乙酸 NAA	6-苄基腺嘌呤 6-BA	赤霉素 GA	
MS	0.05	1.0	0.5	
	0.05	2.0	1.0	
	0.10	1.0	1.0	
	0.10	2.0	0.5	
	0.05	1.0	0	

表 3 不定根诱导培养基

Table 3	Induction medium of adventitious roots			mg/L
	萘乙酸 NAA	6-苄基腺嘌呤 6-BA	赤霉素 GA	
MS	0.4	0.05	0.1	
	0.4	0.10	0.2	
	0.8	0.05	0.2	
	0.8	0.10	0.1	
	0.4	0.05	0	

种数量×100。不定芽诱导分化率(%)=分化出丛生芽的苗数/接种苗数×100。分化率(%)=生成不定芽的萌发芽/接种的正常萌发芽×100。生根率(%)=生根的苗数/接种的苗数×100。

2 结果与分析

2.1 无菌体系的建立

在植物组织培养中,筛选适当的灭菌材料,确定最佳的处理时间是无菌体系建成的重要环节^[10]。由表 4 可知,用 1% 次氯酸钠体表灭菌 20 min 效果最好,其污

表 4 1% 次氯酸钠消毒液处理效果

Table 4 Effect of 1% sodium hypochlorite on surface sterilization							
处理时间 /min	处理 数	成活 数	污染 数	死亡 数	成活率 /%	污染率 /%	死亡率 /%
0	50	4	40	6	8	80	12
10	50	30	10	10	60	20	20
15	50	38	1	11	76	2	22
20	50	42	0	8	84	0	16
25	50	32	2	16	64	4	32
30	50	29	1	20	58	2	40
35	50	22	1	27	44	2	54
40	50	14	0	36	28	0	72

染率为0%。消毒时间太短不能对外植体材料进行彻底消毒,导致材料污染;消毒时间过长容易将外植体材料组织细胞杀死,致使材料褐化或枯死。

2.2 不定芽诱导

观察结果表明,用紫叶挪威槭水培后展开1~2片小叶的萌发芽做外植体进行不定芽诱导,成活率比较高,用从苗圃采集的当年生嫩茎作为外植体,生长一段时间后,大都干枯死亡,很少有不定芽产生。由表5可以看出,MS作为基本培养基比WPM作为基本培养基更有利于紫叶挪威槭的不定芽分化诱导,说明在紫叶挪威槭的组织培养过程中,无机盐的浓度和种类对不定芽分化诱导有着至关重要的影响。激素组合NAA+

6-BA+GA有利于紫叶挪威槭外植体材料不定芽的诱导,经观察,添加GA的培养基中,有部分玻璃化现象,并且NAA+6-BA的浓度起着至关重要的作用,其中0.05 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA为最适配比浓度。紫叶挪威槭在离体培养过程中不易分化,是由于外植体体内含有较高水平的酚类物质,导致植物材料容易褐化,使用生长调节物质会使内源物质发生改变^[11],因此培养基中需添加防治褐化的物质,活性炭或者PVP,活性炭在吸附酚类物质的同时会改变培养基的营养成分,而PVP不会使培养基成分发生改变,并且对褐化的抑制效果比较明显,目前作为褐化抑制剂被广泛使用^[12]。

表5 不同培养基对萌发芽诱导产生不定芽的影响

Table 5 Effect of different culture medium on producing adventitious bud

培养基种类	分化数/接种数	分化率/%	分化特征
WPM+0.05 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L GA+2.0 g/L PVP+0.3 g/L CH	21/46	46	苗健壮,有玻璃化
WPM+0.05 mg/L NAA+2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L GA+2.0 g/L PVP+0.3 g/L CH	18/46	39	苗较弱
WPM+0.10 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L GA+2.0 g/L PVP+0.3 g/L CH	23/46	50	苗较弱
WPM+0.10 mg/L NAA+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L GA+2.0 g/L PVP+0.3 g/L CH	25/46	54	苗较弱
WPM+0.05 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA+0.0 mg/L GA+2.0 g/L PVP+0.3 g/L CH	28/46	60	苗健壮,有玻璃化
MS+0.05 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L GA+2.0 g/L PVP+0.3 g/L CH	24/46	52	苗健壮,有玻璃化
MS+0.05 mg/L NAA+2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L GA+2.0 g/L PVP+0.3 g/L CH	20/46	43	苗较弱
MS+0.10 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L GA+2.0 g/L PVP+0.3 g/L CH	25/46	54	苗较弱
MS+0.10 mg/L NAA+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L GA+2.0 g/L PVP+0.3 g/L CH	27/46	58	苗健壮,有玻璃化
MS+0.05 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA+0.0 mg/L GA+2.0 g/L PVP+0.3 g/L CH	31/46	67	苗健壮

2.3 继代增殖培养

将上述不定芽转移到增殖培养基中,诱导丛生芽的产生。由表6可知,当培养基为MS+0.05 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA+0.3 g/L CH+2.0 g/L PVP+30 g/L 蔗糖(pH 5.5)时,分化率较高,分化出的丛生芽生长状况良好。添加GA可以提高分化率,却能使分化出来的小苗出现玻璃化现象,因此选用增殖培养基为MS+0.05 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA+0.3 g/L CH+2.0 g/L PVP+

30 g/L蔗糖(pH 5.5),显然和初始诱导培养基成分相同,因此初始诱导和继代增殖可以同时进行,缩短了无菌体系建立的时间。由于紫叶挪威槭在组织培养过程中极其容易褐化,吴婉婉等^[13]研究表明,在植物组织培养过程中,及时转瓶,更换新的培养基可以有效地降低褐化率。因此,在培养过程中,要定期更换成分相同的新培养基,时间为10 d。

表6 不同培养基对不定芽产生丛生芽的影响

Table 6 Effect of different culture medium on producing multiple shoot clumps

培养基配方	分化率/%	平均苗高/cm	丛生芽生长状况
MS+0.05 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L GA+2.0 g/L PVP+0.3 g/L CH	54	2.8	苗健壮,有玻璃化
MS+0.05 mg/L NAA+2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L GA+2.0 g/L PVP+0.3 g/L CH	58	2.6	苗健壮,有玻璃化
MS+0.10 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L GA+2.0 g/L PVP+0.3 g/L CH	52	3.1	苗较弱
MS+0.10 mg/L NAA+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L GA+2.0 g/L PVP+0.3 g/L CH	58	3.0	苗健壮,有玻璃化
MS+0.05 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA+0.0 mg/L GA+2.0 g/L PVP+0.3 g/L CH	55	2.9	苗健壮

2.4 不定根诱导

待分化产生的紫叶挪威槭长到3 cm左右时将植株转入到生根培养基中,进行生根诱导。由表7可知,在培养基MS+0.05 mg/L NAA+0.4 mg/L IBA+0.3 g/L CH+2.0 g/L PVP+25 g/L 蔗糖(pH 5.5)中培养,生根

率较高为51%,6 d后可见有不定根生成,生根所用时间较短,并且根的生长状况良好。添加6-BA可以加快组培苗的生长,却使根生长受到抑制。因此生根培养基选用MS+0.05 mg/L NAA+0.4 mg/L IBA+0.3 g/L CH+2.0 g/L PVP+25 g/L 蔗糖(pH 5.5)。

表 7

不同培养基对生根的影响

Table 7

Effect of different culture medium on producing roots

培养基种类	生根率/%	生根时间/d	不定根生长情况
MS+0.4 mg/L IBA+0.05 mg/L NAA+0.1 mg/L 6-BA+2.0 g/L PVP+0.3 g/L CH	43	6.0	根较弱
MS+0.4 mg/L IBA+0.10 mg/L NAA+0.2 mg/L 6-BA+2.0 g/L PVP+0.3 g/L CH	33	7.0	根正常
MS+0.8 mg/L IBA+0.05 mg/L NAA+0.2 mg/L 6-BA+2.0 g/L PVP+0.3 g/L CH	37	7.5	根较弱
MS+0.8 mg/L IBA+0.10 mg/L NAA+0.1 mg/L 6-BA+2.0 g/L PVP+0.3 g/L CH	46	6.0	根正常
MS+0.4 mg/L IBA+0.05 mg/L NAA+0.0 mg/L 6-BA+2.0 g/L PVP+0.3 g/L CH	51	6.0	根正常

3 结论

利用紫叶挪威槭 2 年生枝条水培后展开 1~2 片小叶的萌发芽为外植体建立了稳定的紫叶挪威槭植株再生体系,其技术流程为:紫叶挪威槭水培后展开 1~2 片小叶的萌发芽经过 2% 的洗涤灵溶液冲洗 1 min,去除表面油污和尘土,无菌水冲洗干净,去除洗涤灵残留,用 70% 的乙醇进行表面消毒 30 s,无菌水冲洗 5~6 次,再用 1% 的次氯酸钠消毒液浸泡 20 min,无菌水冲洗,去除残留,接种到诱导培养基 MS+0.05 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA+0.3 g/L CH+2.0 g/L PVP+30 g/L 蔗糖(pH 5.5)培养,不定芽诱导培养基亦可进行增殖诱导,每 10 d 将不定芽继代一次,至新培养基中,防止褐化,待苗高长至 3 cm 左右时,将诱导出来的不定芽转入到生根培养基 MS+0.4 mg/L IBA+0.05 mg/L NAA+0.3 g/L CH+2.0 g/L PVP+25 g/L 蔗糖(pH 5.5)培养,诱导不定根形成,完成植株再生。

参考文献

- [1] 钱又宇,薛隽.世界著名观赏树木挪威槭与亚欧槭(桐叶槭)[J].园林,2008,44(5):60-61.
- [2] 康月兰,郝小华.石家庄园林彩叶树种资源及其应用研究[J].安徽

农业科学,2010,38(9):4883-4885,4953.

- [3] 孟庆法,何瑞珍,刘志术,等.挪威国王枫引种栽培研究[J].安徽农业科学,2010,38(22):12060-12061,12064.
- [4] 吴劼,陈中庆.建设城市彩色生态景观的探讨[J].现代园艺,2012(8):101,103.
- [5] 王德芳.北京地区彩叶植物引种栽培研究[J].中国农学通报,2012,28(19):297-302.
- [6] 窦玥.两种槭树的组织培养和防止组培污染的初步研究[D].大连:辽宁师范大学,2010.
- [7] 王静.三种植物的组织培养及生根过程中酶活性的变化[D].大连:辽宁师范大学,2008.
- [8] 杜运长.紫叶挪威槭的嫁接繁殖技术[J].科技创新与应用,2014(18):282.
- [9] 王静,王关林,华婧,等.紫叶挪威槭的休眠芽培养与植株再生[J].植物生理学通讯,2007,43(5):896.
- [10] 颜昌敬.植物组织培养手册[M].上海:上海科学技术出版社,1989:35-36.
- [11] 谷瑞升,蒋湘宁,郭仲琛.植物离体培养中器官发生调控机制的研究进展[J].植物学通报,1999,16(3):238-244.
- [12] 李新风.牡丹胚离体植株再生及褐化问题的研究[D].西安:西北农林科技大学,2008.
- [13] 吴婉婉,孙威江.茶树组织培养研究进展[J].亚热带农业研究,2013,9(2):133-139.

Establishment of Plantlet Regeneration System of *Acer platanoides* L. 'Crimson King'

WANG Zilan^{1,2}, TONG Xin³, DU Kejiu^{1,2}

(1. College of Forestry, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000; 2. Hebei Provincial Key Laboratories for Germplasm Resources of Forest Trees and Forest Protection, Baoding, Hebei 071000; 3. Yuyingzi Forest Farm, The State-owned Forest Farm Management Office of Luanping in Chengde City, Luanping, Hebei 067000)

Abstract: Using the germination of the buds with 1—2 pieces leaflet as test material, the influence of different disinfection methods, different time and different mediums with the method of tissue culture in aseptic conditions were studied, in order to establish plant regeneration system of *Acer platanoides* L. 'Crimson King' in low pollution and high efficiency. The results showed that the germination of the buds were treated with 2% detergent and flushed with sterile water. Then they were treated with 70% alcohol for 30 seconds and flushed with sterile water for 5—6 times. After germination of the buds were treated with 1% sodium hypochlorite for 20 minutes and flushed with sterile water for 5—6 times, they should be inoculated into MS+0.05 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA+0.3 g/L CH+2.0 g/L PVP+30 g/L sucrose(pH 5.5) medium. The plant regeneration system of *Acer platanoides* L. 'Crimson King' could be quickly established, when the plantlets were subcultured into MS+0.4 mg/L IBA+0.05 mg/L NAA+0.3 g/L CH+2.0 g/L PVP+25 g/L sucrose (pH 5.5).

Keywords: *Acer platanoides* L. 'Crimson King'; bud germination; tissue culture; plantlet regeneration system