

# 血皮槭的愈伤组织培养研究

陈 丽, 李 冰, 王 梅, 牛小沛

(济源市农业科学研究所, 河南 济源 454650)

**摘 要:** 对血皮槭的营养器官嫩茎、叶和叶柄进行了愈伤组织的诱导研究。结果表明: 各外植体中诱导愈伤组织的难易程度为嫩茎>叶柄>叶; 2,4-D 比 NAA 更有利于愈伤组织的形成, 诱导血皮槭产生愈伤组织的最佳培养基配方: 改良 MS+6-BA 1.8 mg/L+2,4-D 0.8 mg/L+0.6 g/L 活性炭, 诱导率为 80%; 继代增殖培养基的配方: 改良 MS+6-BA 3.0 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L+0.6 g/L 活性炭, 增殖系数可达 3.0。

**关键词:** 血皮槭; 外植体; 组织培养; 愈伤组织

**中图分类号:** S 792.35 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)08-0170-03

血皮槭(*Acer griseum*)为槭树科槭树属, 原产中国, 国家二级保护树种。在北至新疆中部、内蒙古和辽宁南部, 南至苏州、安徽、湖北北部区域内生长良好, 适应粘土、碱性土等, 湿润、排水良好的土壤最宜其生长。树高和冠幅均可达 6~9 m, 树冠呈圆形, 树皮红棕色, 自然卷曲, 鳞片状斑驳脱落。生长速度慢, 每年生长 10~15 cm。特别适合小型造景的需要<sup>[1]</sup>, 可以种植在庭园中, 孤植或群栽于灌木丛中, 能显示出极高的园林观赏价值。血皮槭播种或扦插繁殖, 繁殖速度较慢。利用组织培养技术可加快其繁殖速度, 不仅为市场提供大量苗木, 又能保持性状的优良性和一致性, 增加该品种的观赏效果。目前仅有关于复叶槭的愈伤组织研究报道<sup>[3-4]</sup>, 未见血皮槭组培研究的相关报道, 因此进行该项研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试外植体材料取自河南省济源市原始森林。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 不同时间的选择** 为了减少血皮槭在培养过程中出现的褐化问题, 分别在 4 月底、6 月和 8 月进行不同外植体的采摘。

**1.2.2 外植体的处理** 选用 1 a 生的无病虫害的枝条带叶流水冲洗 5 min, 用洗洁净水冲洗数次, 在无菌操作下用 75% 酒精消毒 30 s—无菌水冲洗 1 次—0.1% 氯化汞灭菌 18 min(添加吐温并不停的摇动)—无菌水冲洗 8 次, 进行材料的表面灭菌。然后将幼叶用无菌滤纸吸干水分, 分别将嫩茎、叶柄剪成 0.5 cm 左右的小段作

为外植体, 以备接种。

**1.2.3 培养基的选择** 试验设计了以改良 MS 为基础, 添加不同激素水平的诱导愈伤组织培养基(见表 1), 蔗糖 25%, 琼脂 0.5%, pH 6.0, 每个配方中不同外植体各接种 8 瓶。接种后暗培养 2 d 后转入光培养, 培养温度为 (25±2)℃, 光照 2 500 lx, 光照时间 12 h/d, 每天观察, 发现污染及时取出。10 d 后计算每瓶中愈伤组织的生长情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同时间的选择对血皮槭褐化及分化的影响

为了减少血皮槭在培养过程中出现的褐化问题, 分别在 4 月底、6 月和 8 月进行不同外植体的采摘。结果表明, 在 6 月份采的外植体分化能力强, 褐化少; 为了减少污染率分别选择在 10:00、13:00、17:00 进行采摘, 结果表明在 13:00 采摘的污染率最低。

### 2.2 不同外植体的选择对血皮槭愈伤组织诱导的影响

为了确定诱导血皮槭愈伤组织的最适外植体, 分别以叶柄、叶片和幼嫩的茎段为培养物, 采用改良的 MS+6-BA 2.0 mg/L+2,4-D 1.5 mg/L 为诱导培养基进行预备实验。结果表明: 各个部位的愈伤组织诱导以幼嫩茎段最高, 为 40%; 叶柄(带 0.1 cm 的叶)次之, 为 30%; 叶片最低, 为 15%。所以外植体诱导和愈伤组织的难易程度为幼嫩茎段>叶柄(带 0.1 cm 的叶)>叶片。

### 2.3 不同元素对比对愈伤组织诱导的影响

在确定了合适的外植体后, 需选择合适的激素配比, 找出形成愈伤组织的最适培养基。以幼嫩茎段为外植体, 以改良的 MS+6-BA 2.0 mg/L+2,4-D 1.5 mg/L 为对照, 分别以改良 MS 和 B5 为基础培养基, 设计了 6-BA、2,4-D 2 种激素间, 3 水平试验, 结果如表 1、表 2。

第一作者简介: 陈丽(1983-), 女, 本科, 助理研究员, 研究方向为生物组织培养。

收稿日期: 2009-12-18

表 1 以改良的 MS 为培养基不同激素  
配比对茎段愈伤组织的诱导情况

外植体	激素配比		调查茎段 / 块	愈伤组织 / 块	愈伤组织 诱导率/ %
	2 4-D	6-BA			
	/mg · L <sup>-1</sup>	/mg · L <sup>-1</sup>			
1	对照		40	28	70
2	1.5	0.5	40	18	45
3	1.5	0.8	40	20	50
4	1.5	1.0	40	17	43
5	1.8	0.5	40	23	58
6	1.8	0.8	40	32	8
7	1.8	1.0	40	18	45
8	2.0	0.5	40	22	55
9	2.0	0.8	40	29	73
10	2.0	1.0	40	30	75
平均数			40	23.7	59

试验中注意观察,如果在接种后 2 d,接种外植体培养基上出现黑红色,是褐化的原因,应及时转出来,防止褐化死亡。在所接的嫩茎中,生长 10 d 就可以看出,幼嫩茎段在和培养基接触的表面,侧芽不生长,叶柄脱落,茎变粗裂开变绿形成愈伤。正常的愈伤组织生长时是黄绿色较为紧密的结构,这种愈伤组织分生能力强,芽点较多;而深绿色的愈伤太硬不容易分化,最后也容易转变成浅黄色而死亡;浅黄色的愈伤组织不分化不成块,在培养过程中逐渐玻璃化死亡。

表 2 以 B5 培养基不同激素配比对茎段  
愈伤组织的诱导情况

外植体	激素配比		调查茎段 / 块	愈伤组织 / 块	愈伤组织 诱导率/ %
	6-BA	2 4-D			
	/mg · L <sup>-1</sup>	/mg · L <sup>-1</sup>			
1	对照		40	28	70
2	1.5	0.5	40	8	20
3	1.5	0.8	40	12	30
4	1.5	1.0	40	9	23
5	1.8	0.5	40	22	55
6	1.8	0.8	40	26	65
7	1.8	1.0	40	16	40
8	2.0	0.5	40	24	60
9	2.0	0.8	40	26	65
10	2.0	1.0	40	25	63
平均数			40	19.6	49

2.4 血皮槭愈伤组织的继代培养

表 3 表明:改良 MS+6-BA 3.0 mg/ L+2 4-D 2.0 mg/ L+0.6 g/ L 活性炭,增殖系数可达 3.0 为最高。在相同的浓度下,单独加 2 4-D 的比加 2 4-D 和 NAA 的增殖率高。

表 3 血皮槭愈伤组织的继代培情况

继代培养基	用于继代的愈 伤质量/ g	继代以后成活 的愈伤质量/ g	组织增殖 系数/ 倍
改良的 MS+6 BA 2.6 mg/ L+2 4 D 1.8 mg/ L	1.2	2.6	2.2
改良的 MS+6 BA 2.6 mg/ L+2 4 D 1.5 mg/ L+NAA 0.3 g/ L	1.0	2.0	2
改良的 MS+6 BA 2.8 mg/ L+2 4 D 1.5. mg/ L+NAA 0.3 g/ L	1.0	2.5	2.5
改良的 MS+6 BA 3.0 mg/ L+2 4 D 2.0 mg/ L	1.2	3.6	3.0
改良的 MS+6 BA 3.0 mg/ L+2 4 D 1.5 mg/ L+NAA 0.3 g/ L	1.2	2.8	2.3

3 结论与讨论

3.1 结论

从试验结果中可以得出:(1)血皮槭外植体诱导愈伤组织的难易程度为幼嫩茎段> 叶柄(带 0.1 cm 的叶)> 叶片。(2)2,4-D 比 NAA 更有利于血皮槭愈伤组织的形成,诱导愈伤组织的最佳培养基配方:改良 MS+6-BA 1.8 mg/ L+2,4-D 0.8 mg/ L+0.6 g/ L 活性炭,愈伤组织诱导率为 80%;(3)最佳继代增殖培养基的配方:改良 MS+6-BA 3.0 mg/ L+2,4-D 2.0 mg/ L+0.6 g/ L 活性炭,增殖系数可达 3.0;(4)在外植体的采摘方面血皮槭在刚生长 10 d 左右,带有 1 个顶芽和 1 个茎段的生成愈伤的速度最快,褐化最少。

3.2 讨论

血皮槭种子繁殖成活率底,繁殖速度慢,利用组织培养技术可以在短时间内得到大量的整齐的、优质的小苗,且不受外界条件的限制。虽然该试验在血皮槭的愈伤组织诱导上取得了一定的突破,但是如何令愈伤组织在短时间内有较大的增殖系数和诱导不定芽的问题还有待进一步研究。

在植物组织培养过程中,外植体的褐化也是导致培养失败的主要原因。从试验来看不同月份采摘的外植体褐化程度不同,主要是材料本身的生理状态不同。张妙霞等测定分析吧柿的休眠芽和嫩枝茎尖在离体培养过程中的多酚氧化酶活性,显示嫩芽茎尖的多酚氧化酶活性显著高于休眠芽,说明嫩枝茎尖为外植体进行培养时易褐化死亡的主要原因是多酚氧化酶活性太高<sup>[56]</sup>。

6 月份采摘试材的嫩茎容易诱导出愈伤组织,这可能与该部位的细胞相对生命力比较强,存在着居间分生组织,细胞年青化有关系<sup>7</sup>。6 月份时,血皮槭茎段已半木质化,多酚氧化酶已经降低,同时形成的腋芽较为饱满,接种后芽易萌化<sup>8</sup>。根据细胞的全能性学说,所有的活细胞都可以脱分化,但是在实践中,幼嫩生命力强的分生组织,包括居间分生组织比较容易诱导出愈伤,而较老的组织则较难诱导愈伤。

参考文献

[ 1 ] 曹小勇. 槭树科槭属植物形态学研究[ J ]. 汉中师范学院学报, 2000 18(2): 69-72.

[ 2 ] 沙文勇. 槭类丰姿—欧洲流行园林树种介绍[ J ]. 中国花卉园艺, 2002 (18): 18-19.

[ 3 ] 张彦妮, 高志慧, 卓丽环. 复叶槭茎段诱导的愈伤组织解剖学观察[ J ]. 东北林业大学学报, 2006 34(5): 38-39.

[ 4 ] 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.

[ 5 ] 张妙霞. 柿树组织培养防止外植体褐化的研究[ J ]. 河南农业大学学报, 1999, 33(1): 87-91.

[ 6 ] 刘兰英. 薄壳香核桃组培中的褐化及防止措施研究[ J ]. 园艺学报, 2002, 29(2): 171-172.

[ 7 ] 谭文澄. 观赏植物组织培养技术[ M ]. 北京: 中国林业出版社, 2001.

# 不同激素配比对牡丹愈伤组织诱导及生化指标的影响

贾小平, 孔祥生, 李海刚, 孙晓旭, 王磊

(河南科技大学 农学院, 河南 洛阳 471003)

**摘 要:** 以牡丹组培苗叶片、叶柄为外植体, 设计 5 个不同激素水平的诱导培养基, 在愈伤组织形成过程中对所需激素水平、生化指标变化规律进行研究。结果表明: 叶片、叶柄愈伤组织诱导的最适培养基均为 MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L。在 6-BA 浓度一定下, 叶柄愈伤组织诱导率随 NAA 浓度的升高而增高, 褐化率随 NAA 浓度升高而下降; 叶片愈伤组织诱导率及褐化率与 NAA 浓度无明显关联。外植体在不同培养基上愈伤组织诱导过程中可溶性糖、可溶性蛋白、SOD、POD 4 个生化指标随时间变化规律各不相同。

**关键词:** 牡丹; 愈伤组织; 激素水平; 生化指标

中图分类号: S 685.11 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)08-0172-04

牡丹是世界著名的观赏花卉之一。因其栽培品种繁多, 适宜温室周年栽培, 所以在我国花卉市场占有重要地位。近年来我国牡丹的栽培面积越来越大, 随之而来的是如何提高牡丹的人工培养成活率。传统的繁殖方法生产周期长, 生产成本低, 同时易导致牡丹感染病毒, 种性下降。为了实现牡丹种植的规模化、工厂化, 降低生产成本, 组织培养是一项有效的途径<sup>[1-3]</sup>。

目前关于牡丹的组织培养研究的报道较多, 如腋芽离体快繁、愈伤组织诱导、植株再生、胚培养等, 并取得一定进展, 但还没有关于牡丹组培过程中内在生理、生化变化规律方面的报道。植物组织培养的过程可以看作是一系列基因在时间和空间上顺序表达的过程, 蛋白、酶类等都是基因表达的产物。因此了解植物组织培养过程中生理生化变化规律可以深入认识植物愈伤组

织形成及植株再生的内在生化基础, 为从分子水平揭示愈伤组织的形成、植株再生机理提供前提条件。该研究以‘凤丹白’的组培苗叶片、叶柄为外植体, 比较了二者愈伤组织诱导所需的激素组合及该过程中可溶性糖、可溶性蛋白、SOD 活性、POD 活性 4 个生化指标的变化规律, 为从分子水平揭示牡丹愈伤组织形成机理奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

牡丹栽培品种‘凤丹白’的组培苗叶片、叶柄为外植体材料。

### 1.2 试验方法

1.2.1 愈伤组织诱导培养基配制方法 配制 5 个激素浓度组合的诱导培养基: ① MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.05 mg/L; ② MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L; ③ MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L; ④ MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.3 mg/L; ⑤ MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L。上述诱导培养基中蔗糖浓度为 30 g/L, 琼脂

第一作者简介: 贾小平(1973-), 男, 博士, 副教授, 现从事植物组织培养教学工作。

收稿日期: 2009-10-28

## Research on the Tissue Culture of *Acer griseum*

CHEN Li, LI Bing, WANG Mei, NIU Xiao-pai

(Jiyuan Academy of Agriculture Science, Jiyuan, Henan 454650)

**Abstract:** In this experiment, various explants—tender shoots, leaves and stalk derived from the *Acer griseum* had been used to induce the callus. The results showed that for inducing the callus, the optimized tissue were the egments of tender shoots, secondly were the leaves stalks, finally the leaves; the optimum forum for inducing callus was improve MS+6BA 1.8 mg/L+2,4-D 0.8mg/L+0.6 g/L charcoal, for subculture 80%; for subculture, improving MS+6BA 3.0 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L+0.6 g/Lcharcoal could increase the propagational coefficient by 3.0.

**Key words:** *Acer griseum* (Franch.) Pax; explants; tissue culture; callus