

# 五角枫组织脱分化与芽增殖的初步研究

聂鹤云,石琨,郑彩霞\*

(北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083)

**摘要:** 针对五角枫 (*Acer mono Maxim*) 无性繁殖困难的现状, 从探讨五角枫组织脱分化以及芽增殖入手, 开展了器官再生的初步研究。结果表明, 由消毒的五角枫种子在 MS 培养基上萌发获得无菌苗, 通过无菌苗的叶、子叶和根均可脱分化形成愈伤组织, 其中叶的愈伤诱导率最高, 其最适诱导培养基为: MS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L+ NAA 0.5 mg/L; 该愈伤的最适增殖培养基为: MS+6-BA 1.0 mg/L+ 2,4-D 0.5 mg/L+ NAA 0.5 mg/L+ TDZ 1.5 mg/L。叶诱导的愈伤经适当诱导可产生不定芽与根; 幼苗的茎尖可用于芽的增殖, 其较适的增殖培养基为 MS+ TDZ 0.04 mg/L, 生根培养基为 1/2MS+IBA 1.5 mg/L。通过诱导脱分化与再分化, 首次获得了五角枫的再生苗, 为五角枫的快繁组培技术体系的建立奠定了一定基础。

**关键词:** 五角枫; 组织脱分化; 器官再生; 芽增殖

**中图分类号:** S792.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2286(2012)03-0522-06

## Dedifferentiation and Shoot Proliferation of *Acer mono Maxim*.

NIE He-yun, SHI Kun, ZHENG Cai-xia\*

(Beijing Forestry University, College of Biological Science and Biotechnology, Beijing 100083, China)

**Abstract:** Aiming at the fact that the vegetative propagation of the *Acer mono Maxim*. is difficult, this study was conducted to deal with the dedifferentiation and shoot proliferation of *Acer Mono Maxim*. and the organogenesis of the plantlet. Seeds of *Acer mono Maxim*, were sterilized and cultivated in MS medium. Leaves, cotyledons and roots from seedlings were used for the dedifferentiation. The result showed that leaves had the highest induction rate of callus and the best medium for callus inducing was MS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L+ NAA 0.5 mg/L; the optimal proliferation medium for callus was MS+6-BA 1.0 mg/L+ 2,4-D 0.5 mg/L+ NAA 0.5 mg/L+ TDZ 1.5 mg/L. Appropriate medium for shoot proliferation was MS+ TDZ 0.04 mg/L, and that for the tissue culture rooting was 1/2MS+IBA 1.5 mg/L. The regenerated plants of *Acer mono Maxim* were obtained for the first time through the dedifferentiation and redifferentiation process and a foundation for the techniques of propagation of *Acer mono Maxim* was established.

**Key words:** *Acer mono Maxim*.; dedifferentiation; organogenesis; shoot proliferation

五角枫 (*Acer mono Maxim*.) 别名色木槭, 是我国槭树科树种中分布最广的落叶乔木之一, 广泛分布于东北、华北各省。五角枫树形优美, 叶、果秀丽, 嫩叶红色, 秋季叶为黄色或红色, 是重要的观赏与庭园绿化树种, 其木材坚韧细致, 可供家具及细木工用材; 由于五角枫含有杨梅素、神经酸、黄酮、绿原酸等活性物质, 种子可榨油, 已作为医药保健、化工染料、轻工酿造等原料树种。因此, 优质五角枫种苗的市场需求量越来越大。目前五角枫育苗主要以播种或扦插为主, 但播种苗易发生变异; 而扦插繁殖成活率低的技术难题也一直未能突破, 亟待建立有效的快繁组培体系。迄今, 国内有关五角枫组织培养的研究尚未见报道, 国外仅有关于红槭的愈伤诱导<sup>[1]</sup>, 糖槭的愈伤诱导<sup>[2]</sup>与大槭树的芽增殖<sup>[3]</sup>的研究报道。本研究以五角枫无菌苗的叶、子叶及根为试验材料, 诱导组织脱分化、愈伤增殖和

收稿日期: 2012-03-15 修回日期: 2012-05-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30671655) 和山西省杨树局合作项目

作者简介: 聂鹤云(1988—), 女, 硕士生, 主要从事植物生物技术研究, E-mail: nieheyun@sina.cn; \*通讯作者: 郑彩霞, 博士, 博士生导师, E-mail: zhengcx@bjfu.edu.cn。

芽增殖, 并通过组织再分化首次获得了五角枫的再生苗, 为五角枫的快繁组培技术体系的建立奠定了试验基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

供试材料五角枫 (*Acer mono Maxim.*) 的种子采于清华大学校园的五角枫成熟植株。

### 1.2 无菌体系建立

10月中旬当五角枫翅果由绿变黄褐色时采集备用。选取饱满的翅果(图1-2), 剥去外种皮, 25℃水浴2h后用洗衣粉涮洗3次, 自来水冲洗30min; 超净台内体积分数为75%的酒精浸泡30s后NaClO(0.8%,0.4%,0.2%)消毒25min, 无菌水冲洗3遍, 接入MS培养基中培养。

### 1.3 组织脱分化及愈伤组织增殖

1.3.1 组织脱分化诱导 MS基本培养基添加6-BA、NAA、2,4-D3种外源生长调节物, 采用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验设计(表1)。将无菌苗幼嫩叶片垂直于主脉分割成1cm<sup>2</sup>长条形; 壮根剪为长2cm左右的根段, 子叶切割为0.5cm<sup>2</sup>小块, 按正交表的设计接种于培养基上, 每个水平接5瓶, 每瓶8个外植体, 黑暗处理3周后观察统计组织脱分化率及愈伤生长情况。

$$\text{组织脱分化率} = (\text{生成愈伤组织的外植体块数} / \text{接种外植体块数}) \times 100\% \quad (1)$$

表1 组织脱分化的正交设计表

Tab.1 The orthogonal design for callus induction

水平 Level	因素 Factor			
	A/(mg · L <sup>-1</sup> ) NAA	B/(mg · L <sup>-1</sup> ) 6-BA	C/(mg · L <sup>-1</sup> ) 2, 4-D	D 外植体 Explant
1	0.1	0.5	0.5	根
2	0.2	1.0	1.0	幼叶
3	0.5	1.5	1.5	子叶

1.3.2 愈伤组织的增殖 采用6-BA、NAA、2,4-D、TDZ4种外源生长调节物, 以L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验(表2)设计试验, 每个水平5瓶, 每瓶接4块愈伤组织, 每块愈伤组织的质量为1.0g。从培养3周后的组织脱分化培养基中选取健康, 生长力旺盛的愈伤组织转接入愈伤增殖的培养基中, 进行暗培养。观察记录其增殖情况; 3周后称量其质量。

$$\text{愈伤组织增殖率} = (\text{增殖后的愈伤组织质量} / 1.0 \text{ g}) \quad (2)$$

表2 愈伤组织增殖正交设计

Tab.2 The orthogonal design for callus proliferation

水平 Level	因素 Factor			
	A/(mg · L <sup>-1</sup> ) 6-BA	B/(mg · L <sup>-1</sup> ) TDZ	C/(mg · L <sup>-1</sup> ) NAA	D/(mg · L <sup>-1</sup> ) 2,4-D
1	1.0	0.5	0.2	0.1
2	1.2	1.0	0.5	0.2
3	1.5	1.5	1.0	0.5

### 1.4 器官发生

采用不同水平的6-BA、NAA和IBA与各种改良MS培养基以研究五角枫愈伤的再分化。依据Kerns等<sup>[4]</sup>对*Acer freemannii*芽增殖的试验结果<sup>[4]</sup>, 采用TDZ处理促进芽增殖, 试验设计TDZ的10个水平分别为: 0.005,0.01,0.003,0.03,0.04,0.05,0.1,0.3,0.5,0.7 mg/L。培育2周后记录增殖情况。发现7号培养基较为适宜, 芽增殖状况良好。将芽接于6瓶7号培养基中, 每瓶6个芽, 培育20d后观察统计增殖数量。

以上培养基均添加6g/L琼脂, 3g/L蔗糖; pH5.9~6.0; 外植体均在温度(25±2)℃, 光照强度2200lx, 光/暗周期为16h/8h的条件下培养。

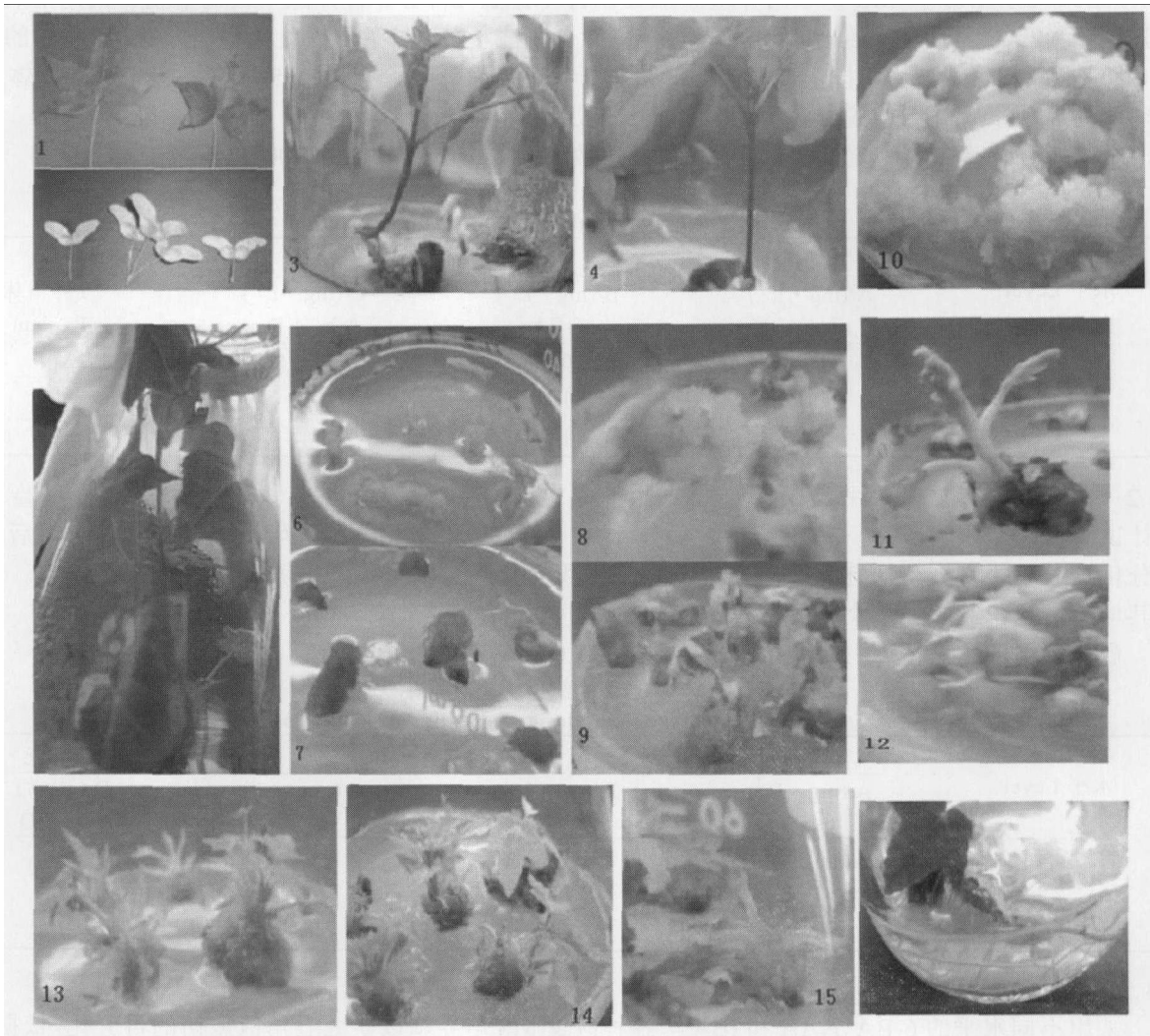
## 2 结果分析

### 2.1 五角枫无菌苗

接种后的 10 d 内, 统计发现质量分数 0.2%NaClO 消毒的种子染菌率高且多为真菌; 质量分数 0.4%NaClO 消毒的种子褐化程度轻且染菌率低, 发芽率高达 41.7%; 质量分数 0.8% NaClO 消毒的种子染菌率低但褐化严重, 发芽率近乎零。10 d 之后未染菌的发芽种子继续培育, 获得健康发育的无菌苗 (图 1-3,图 1-4,图 1-5)。

### 2.2 组织脱分化

外植体接种第 7 天开始脱分化出现愈伤组织; 2 周之后大部分外植体已长愈伤; 生长迅速的愈伤组织直径可达 1.5 cm (图 1-8)。多数愈伤呈乳白色, 部分浸润状 (图 1-6,图 1-8,图 1-9); 随着愈伤组织体积的增长, 其质地并未发生明显改观; 另一些愈伤呈翠绿色 (图 1-7), 少部分表面有颗粒状突起, 将其转接至空白培养基和继代培养基 MS+ TDZ 0.01 mg/L 后, 并不分化生长。继续培育 20 d 后, 观察统计 9 个水平的组织脱分化诱导率和愈伤组织的生长状况, 结果统计于表 3。



1.五角枫叶; 2.五角枫种子; 3.无菌苗; 4.无菌苗; 5.无菌苗; 6.脱分化 1 号; 7.脱分化 2 号; 8.脱分化 4 号; 9.脱分化 7 号; 10.愈伤组织再分化芽; 11.愈伤组织再分化根; 12.愈伤增殖 3 号; 13, 14, 15 均为芽增殖情况; 16.生根。  
1.The leaves of *Acer Mono Maxim*, 2.The seeds of *Acer Mono Maxim*, 3.The seedling of *Acer Mono Maxim*, 4.The seedling of *Acer Mono Maxim*(2011-11-01), 5.The seedling of *Acer Mono Maxim*.(2011-11-15), 6.Dedifferentiation No.1, 7.differentiation No.2, 8.Dedifferentiation No.4, 9.Dedifferentiation No.7, 10.callus proliferation No.3, 11.Redifferentiation of the callus-adventitious bud, 12.Redifferentiation of the callus-adventitious roots, 13, 14, 15, shoot proliferation, 16.tissue culture rooting.

图 1 五角枫组织脱分化、再分化与芽增殖的情况

Fig 1. Pictures of dedifferentiation, callus proliferation, redifferentiation and shoot proliferation of *Acer Mono Maxim*.

表3 不同生长调节物和外植体对组织脱分化的影响

Tab.3 The effects of different phytohormone and explants combination on callus formation

试验号 No.	NAA	6-BA	2,4-D	外植体 Explant	脱分化诱导 率/% Frequency	愈伤组织的颜色 The color of the callus	愈伤组织的生长情况 The growing condition of the callus
1	1	1	1	1	62.50	愈伤发暗	出愈量少, 生长缓慢
2	1	2	2	2	97.50	愈伤水润, 但颜色 暗淡	出愈量少, 边缘钙化
3	1	3	3	3	44.70	愈伤多呈淡灰绿色	愈伤从子叶表面均匀生长
4	2	1	2	3	75.00	愈伤呈极浅绿色, 水润	出愈量较多, 生长快
5	2	2	3	1	74.36	愈伤呈灰色, 生长 后期出现褐化	出愈量少, 易褐化
6	2	3	1	2	62.50	愈伤颜色暗淡	出愈量少
7	3	1	3	2	97.50	愈伤呈乳白色	出愈量大, 愈伤生长良好, 速度 快
8	3	2	1	3	60.00	愈伤浅绿色	愈伤附着于子叶表面, 呈膨大卷 曲状, 生长良好
9	3	3	2	1	65.00	愈伤乳白色, 后期 少许褐化	出愈量极少

表4 五角枫组织脱分化正交试验极差分析

Tab.4 Range analysis of the dedifferentiation of *Acer mono Maxim.*

	A	B	C	D
均值 $X_1$ Mean value $X_1$	0.682	0.783	0.617	0.673
均值 $X_2$ Mean value $X_2$	0.706	0.773	0.792	0.858
均值 $X_3$ Mean value $X_3$	0.742	0.574	0.722	0.599
极差 $R$ Range $R$	0.060	0.209	0.175	0.259

A=NAA, B=6-BA, C=2,4-D, D=explants.

依据表3和表4统计分析结果, 比较均值 $X$ : A、B、C、D 4个因素的最佳水平组合为 $A_3B_1C_2D_2$ , 即: 6-BA质量密度0.5 mg/L, 2,4-D质量密度1.0 mg/L, NAA质量密度0.5 mg/L为最佳, 外植体类型以幼叶为最佳。该组合并未在9个正交试验中出现。另外试验观察发现与该最佳水平组合相近的7号试验组: $A_3B_1C_3D_2$ , 3周后诱导的愈伤生长状况最好, 愈伤呈浅绿色, 诱导率高, 长势快。

由表5中的极差值 $R$ 可知, 极差分析中不同因子的极差值不同, 极差值越大表示该因素对试验结果的影响越显著。由于 $R_D > R_B > R_C > R_A$ , 即各因素影响从大到小依次为D(外植体)、B(6-BA浓度)、C(2,4-D浓度)、A(NAA浓度), 说明试验中的D因素(外植体)为主要影响因子, 而在3种外源生长调节物中, 6-BA相对2,4-D和NAA更有决定性作用, 其用量差异可显著影响组织脱分化率。

对试验结果进行方差分析, 可知: A、B、C、D因素的 $F$ 值分别为0.083、1.372、0.777、1.769; 说明对五角枫组织脱分化影响的主次关系为: D(外植体)、B(6-BA浓度)、C(2,4-D浓度)、A(NAA浓度), 与极差分析的结论一致。

### 2.3 外源生长调节物对愈伤组织增殖的影响

外源生长调节物对愈伤组织增殖的影响试验结果统计于表5, 极差分析结果见表6。

由表6分析结果可知, 4种外源生长调节物对愈伤增殖的影响大小依次为: 6-BA、2,4-D、NAA、TDZ。6-BA用量的差异会显著影响愈伤诱导率。比较均值发现, 五角枫愈伤增殖的最佳水平组合为 $A_1B_3C_2D_3$ , 即: 6-BA质量密度1.0 mg/L, 2,4-D质量密度0.5 mg/L, NAA质量密度0.5 mg/L、TDZ质量密度1.5 mg/L。与该最佳水平组合最相近的3号试验组: $A_1B_3C_3D_3$ (图1-10), 3周后诱导的愈伤组织生长迅速, 增殖量较大。

### 2.4 愈伤组织再分化和芽增殖

唐丽等<sup>[5]</sup>研究表明, 与1/2MS和2/3MS相比较, 全量MS培养基有利于红翅槭的组织脱分化。试验发现1/2MS和4/5MS较适宜五角枫愈伤组织再分化生根, 全量MS和3/4MS适宜愈伤再分化生芽。在4/5MS+TDZ 1.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L的培养基中愈伤组织可生根, 部分可分化出芽(图1-11); 接

表5 不同生长调节物对愈伤组织增殖的影响  
Tab.5 Effects of different phytohormone on callus proliferation

试验号 No.	6-BA	TDZ	NAA	2,4-D	愈伤增殖率/倍 Frequency	愈伤组织的生长情况 The growing condition of the callus
1	1	1	1	1	7.31	增殖量较多, 增殖速度一般
2	1	2	2	2	6.57	增殖量较多, 增殖速度一般
3	1	3	3	3	9.15	愈伤生长迅速
4	2	1	2	3	4.70	增殖比较快但量不多
5	2	2	3	1	2.16	增殖缓慢
6	2	3	1	2	3.90	增殖缓慢
7	3	1	3	2	4.08	出愈量大, 愈伤生长速度快
8	3	2	1	3	3.26	增殖缓慢
9	3	3	2	1	5.56	愈伤生长快

表6 五角枫愈伤组织增殖正交试验极差分析  
Tab.6 Range analysis of the callus proliferation of *Acer mono* Maxim.

	A	B	C	D
均值 $\bar{X}$ 1 Mean value $\bar{X}$ 1	7.678	5.362	4.820	5.006
均值 $\bar{X}$ 2 Mean value $\bar{X}$ 2	3.585	3.996	5.610	4.851
均值 $\bar{X}$ 3 Mean value $\bar{X}$ 3	4.297	6.202	5.130	5.704
极差R Range R	4.093	0.209	0.790	0.853

A=6-BA, B=TDZ, C=NAA, D=2,4-D.

入 1/2 MS+ IBA 0.1 mg/L + NAA 1.0 mg/L 可诱导愈伤的底部生根, 根粗且白 (图 1-12); 关于外源植物调节物对愈伤的再分化影响还需深入探究。增殖过程中芽从底部生出红色愈伤, 再从愈伤中分化出芽体 (图 1-13)。TDZ 浓度为 0.04 mg/L 时五角枫芽增殖显著, 且增殖量多, 速度快 (图 1-14, 图 1-15), 其余培养基芽增殖效果不佳。试验统计表明, 芽在 MS+TDZ 0.04 mg/L 中增殖数最高可达 8 (图 1-15); 平均增殖数达 5.88。

## 2.5 生根

槭树科植物最常用的促生根生长素调节物质主要有 IBA 和 NAA。试验利用 TDZ, IBA 等植物外源调节物质诱导芽生根, 发现使用培养基 1/2MS+IBA 1.5mg/L (见图 1-16), 可使五角枫的生根率达 25%, 相对是较适宜的培养基。

## 3 讨论与结论

理论上任何有生命力的植物组织或器官都具发展成完整生物个体的潜能, 并可作为外植体进行组织脱分化与器官发生的培养, 但研究表明同一种植物不同的组织器官的脱分化与再生能力有很大差异。试验以五角枫幼叶、子叶和幼根进行组织脱分化, 发现五角枫的幼叶是组织脱分化的最理想材料。合适的生长调节剂种类和浓度是诱导组织脱分化和器官发生的关键因素<sup>[6]</sup>, 而适当调整生长素与分裂素会更有利于组织脱分化与芽增殖<sup>[7-8]</sup>, 本试验中, 6-BA 与 2,4-D 在诱导五角枫组织脱分化和愈伤增殖的过程中起决定性的作用。在五角枫的愈伤再分化及器官发生中, 生长调节物 NAA, 6-BA, IBA, ZT 以及活性炭, PVP, AgNO<sub>3</sub> 等附加物的组合均无显著促进效果; 只有单独使用 TDZ 时可观察到愈伤组织脱分化生成芽与根, 这与 Eva Wilhelm<sup>[2]</sup>的研究结果相符合。槭树科植物最常用的促生根生长素调节物质主要有 IBA、NAA; 在本试验中使用可诱导五角枫芽底部的愈伤生根; 但相较之下, TDZ 是具有更高的生物活性<sup>[9]</sup>, 不仅在诱导五角枫生根方面强于 IBA 与 NAA, 并且对芽增殖有良好的促进作用, 这与李艳菊等<sup>[10]</sup>的研究结果相符。但 TDZ 用量不当也有使植株玻璃化的趋势<sup>[11]</sup>, 杨雪等<sup>[12]</sup>的研究表明细胞分裂素的浓度偏高会提高红叶石楠组培苗玻璃化的比例; 如何通过恰当选择 TDZ 的浓度以降低玻璃化有待进一步的研究。

五角枫再分化过程中, 高水平的生长素和细胞分裂素可抑制其愈伤组织的再分化, 推测五角枫植株本身的内源激素水平比较高, 只需少量的细胞分裂素和生长素便可诱导五角枫的植株再生。针对五角枫这一特性, 后续研究可通过检测内源激素水平以期完善初步建立的五角枫脱分化与再分化体系。

## 参考文献:

- [1] Sandra M King, Allen L Morehart. Effect of BA, NAA, and 2,4-D on red maple callus growth[J].*Plant Cell Tissue Organ Culture*,1987,10:57-63.
- [2] Eva Wilhelm. Micropropagation of juvenile sycamore maple via adventitious shoot formation by use of thidiazuron[J].*Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1999,57:57-60.
- [3] Katayoun Mansouri, John E Preece. The influence of plant growth regulators on explant performance, bud break, and shoot growth from large stem segments of *Acer saccharinum* L[J].*Plant Cell Tissue Organ Culture*,2009,99:313-318.
- [4] Kerns H R, Meyer M M Jr. Tissue culture propagation of *Acer freemannii* using thidiazuron to stimulate shoot tip proliferation[J].*Hort Science*,1986,21(5):1209-1210.
- [5] 唐丽,钟秋平,刘显梅,等.景观树种红翅槭愈伤组织诱导培养[J].*中南林业科技大学学报*,2010,30(4):97-100.
- [6] 谢从华,柳俊.植物细胞工程[M].北京:高等教育出版社,2004:24.
- [7] Huettman C A, Preece J E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant cell tissue culture[J].*Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1993,33: 105-121.
- [8] 王小玲,高柱,樊军锋.奥地利黑松不定芽增殖与伸长研究[J].*江西农业大学学报*,2010,32(2):324-329.
- [9] John Calvin Thomas, Frank Reinald Katterman. Cytokinin activity induced by thidiazuron[J].*Plant Physiology*,1986,81:681-683.
- [10] 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.
- [11] 范鸿雁,何凡. TDZ 在番木瓜组织培养中的应用研究[J].*中国南方果树*,2008,37(2):32-33.
- [12] 杨雪,吴国盛,范加勤. 红叶石楠组培苗玻璃化影响因子及其克服技术研究[J].*江西农业大学学报*,2009,31(5):906-910.

---

(上接第 521 页)

## 参考文献:

- [1] 李发根,杨华,尹光天,等.棕榈藤基因组 DNA 提取及 RAPD 反应条件探索[J].*林业科学研究*,2004,17(6):824-828.
- [2] 杨春霞,叶金山,温强,等.枳壳基因组 DNA 提取方法的比较研究[J].*中国农学通报*,2009,25(19):32-36.
- [3] 邹喻苹,汪小全,雷一丁,等.几种濒危植物及其近缘类群总 DNA 的提取与鉴定[J].*植物学报*,1994,36(7):528-533.
- [4] 李登科,黄丛林,田建保,等.高质量枣树基因组 DNA 提取方法的研究[J].*分子植物育种*,2005(4):579-583.
- [5] 翠红,李杰,朱延明,等.不同 DNA 提取方法对 4 种重要作物 DNA 提取效率的比较[J].*东北农业大学学报*,2005,36(3):329-332.
- [6] 时向阳,魏江春,姜玉梅,等.提取地衣真菌总 DNA 的简便方法[J].*北京林业大学学报*,1997,19(4):45-50.
- [7] 曾志光,杨先锋,肖复明,等.陈山红心杉材性变异及其基因资源利用的研究[J].*江西林业科技*,2001(3):1-7.
- [8] 叶冰莹.杉木 DNA 提取方法的研究[J].*福建师范大学学报:自然科学版*,1999,15(3):68-72.
- [9] 黄少甫,赵志芬,陆军,等.杉木 DNA 的快速提取[J].*林业科学研究*,1995,8(6):692-693.
- [10] 刘萍,代红军,张立杰,等.提取方法与植物种类的效应比较[J].*宁夏农林科技*,1998(1):15-18.
- [11] 刘学春,潘春欣,宋云枝,等.一种单子叶植物总 DNA 提取方法的改进及应用[J].*山东农业大学学报*,1995,26(4):491-495.
- [12] 巩振辉, Cecchini E, Milner J J. 以 PCR 鉴定转基因植株的微量 DNA 提取方法[J].*西北农业大学学报*,1997,25(1):45-48.
- [13] 孙鑫,崔洪志,胡宝忠,等. SDS-CTAB 结合法提取棉花总 DNA[J].*生物技术通报*,2004,5:45-47.