

美国红枫的组织培养与快繁技术

吴雅琼^{1,2}, 刘 婧^{1,2}, 汪贵斌^{1,2}, 曹福亮^{1,2}

(1. 南京林业大学 南方现代林业协同创新中心, 江苏 南京 210037; 2. 南京林业大学 林学院, 江苏 南京 210037)

摘 要:以美国红枫腋芽茎段为外植体,采用组织培养方法,研究了不同激素配比对美国红枫无菌体系的建立、启动、增殖、壮苗培养、试管苗生根移栽的影响。结果表明:带腋芽茎段最佳消毒方式为以 70%酒精浸泡 30 s,1%升汞消毒 6 min,成活率和抽芽率最高,分别达到 75.22%和 95.13%;NAA 对启动培养的影响大于 6-BA,接种于培养基 MS+NAA 0.05 mg·L⁻¹+6-BA 0.5 mg·L⁻¹中的外植体诱导率最高,为 62.80%,培养基及激素的最佳配比为 NN69+2,4-D 0.1 mg·L⁻¹+TDZ 0.3 mg·L⁻¹,诱导率达到 80.21%;增殖培养阶段的最佳培养基为 NN69+NAA 0.1 mg·L⁻¹+TDZ 0.3 mg·L⁻¹,增殖系数为 4.2;MS+2,4-D 0.1 mg·L⁻¹+6-BA 0.5 mg·L⁻¹能有效促进小苗的生长;生根培养最适培养基 MS+NAA 0.1 mg·L⁻¹+2,4-D 0.5 mg·L⁻¹,生根率达 99.8%,生根条数达 7.9,根长达 6.5 cm;练苗后移栽到蛭石+珍珠岩(1:1)基质中,移栽成活率为 75.2%。

关键词:美国红枫;组织培养;生根

中图分类号:S 792.35 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)20-0097-06

美国红枫(*Acer rubrum*)属槭树科槭树属多年生落叶乔木,又称红花槭、北方红枫、北美红枫、沼泽枫等,原产于美国东北部^[1]。美国红枫对土壤营养要求不高,耐瘠薄、适应能力强,在酸性土、中性土和石灰质土中生长较好,但在微酸、湿润、透水性好的土壤中生长最为理想^[2],在我国华北、西北、长江流域广泛栽种^[3]。

目前,已经对美国红枫开展了群落更新^[4]、开花、结果、坐果特性^[5]以及不同栽培品种的鉴定^[6]等方面的深入研究。而美国红枫的组织培养与快繁技术的研究仍然欠缺,在组培方面,李莹等^[7]对美国红枫外植体灭菌、褐化预防及外植体启动进行研究,但未深入研究最佳消毒方案。宗树斌等^[8]研究表明,不同浓度 6-BA 与 IAA 配比对美国红枫愈伤组织的诱导有不同的影响,嫩茎段的诱导率高于叶片,没有深入比较基质配方。鉴于此,该研究以美国红枫腋芽茎段为外植体,探讨了最佳消毒方式并研究了美国红枫的最佳培养基配方,旨在建立较完善的美国红枫组织培养与快繁技术体系,以期对美国红枫组培种苗工厂化生产提供技术支持,并为园林绿化

提供大量优质彩色叶苗木,为美国红枫组织培养的进一步研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为美国红枫 1 年生和 2 年生实生苗截干后的萌条,采集新生枝条的带顶芽和腋芽的茎段作为试验材料。

根据试验设计,分别制备 MS、NN69 基本培养基,并添加不同浓度的 NAA、6-BA、2,4-D、TDZ 等植物生长调节物质(表 1)。

表 1 基本培养基及激素配比试验设计

Table 1 Design of experiment of basic culture medium and

序号 Number	培养基 Culture medium	hormone proportion mg·L ⁻¹			
		NAA	2,4-D	6-BA	TDZ
1	MS	0.1	—	—	0.3
2	MS	0.1	—	0.5	—
3	MS	—	0.1	—	0.3
4	MS	—	0.1	0.5	—
5	NN69	0.1	—	—	0.3
6	NN69	0.1	—	0.5	—
7	NN69	—	0.1	—	0.3
8	NN69	—	0.1	0.5	—

1.2 试验方法

1.2.1 材料的预处理 在晴天 13:00 左右采集美国红枫的嫩枝,将其剪成 1.5~2.0 cm 的带腋芽茎段,保证每个茎段都有 1~2 对腋芽。去掉叶片,先用自来水冲洗,

第一作者简介:吴雅琼(1992-),女,硕士研究生,研究方向为森林培育。E-mail:347470439@qq.com.

责任作者:汪贵斌(1970-),男,博士,教授,研究方向为森林培育。E-mail:gbwang@njfu.edu.cn.

基金项目:江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)。

收稿日期:2016-07-21

再用软毛刷蘸洗洁精刷洗 5 min,流水冲洗 6 h,移至超净工作台备用。

1.2.2 无菌体系的建立 材料预处理后,用 70%~75%乙醇消毒 30 s,同时不断用玻璃棒搅拌,使外植体的表面充分与酒精接触,进行消毒。再设置以下 3 种消毒剂进行消毒处理:75%乙醇分别消毒 4、6、8、10 min,0.1%升汞分别消毒 4、6、8、10 min,2.5%NaClO 分别消毒 5、10、15 min。最后用无菌水冲洗 3 次,切去伤口部分,接种到各种培养基上(表 1),每个处理接种 20 个外植体,重复 3 次,15 d 后统计外植体存活率、抽芽率和生长状况,期间密切观察外植体的褐化及污染状况,及时进行转接和剔除污染茎段。光照培养,光照时间 12 h·d⁻¹,光强为 1 500~2 000 lx,空气相对湿度 55%~65%,培养温度为(25±2)℃。下同。成活率(%)=成活的数量/总数量×100,抽芽率(%)=(抽芽的外植体/供检测的外植体)×100。

1.2.3 附加物对外植体褐变的抑制作用 将外植体接种在培养基中,并向其中分别添加聚乙烯吡咯烷酮(浓度分别为 0.5、1.0、2.0 g·L⁻¹)和维生素 C(浓度分别为 0.1、0.5、1.0 g·L⁻¹),以不添加附加物的处理为对照。在接种 2 周后,统计外植体的褐化率及褐斑直径大小。褐化率(%)=未污染褐化数/未污染总数×100。

1.2.4 启动培养 在无菌室超净工作台上,将灭菌的茎段接种到表 1 中的 8 种培养基中,每个处理接种 20 瓶,3 次重复。1 个月后统计外植体启动率及生长状况,随时剔除污染的材料,以免交叉污染。启动率(%)=未污染外植体启动数/未污染外植体总数×100。

1.2.5 继代增殖培养 取长势良好的芽苗,当其长到 1~2 cm 时,将新芽接种到继代培养基中(表 2),分别添加不同浓度的 NAA、2,4-D、6-BA、TDZ,每个处理接种 20 瓶,3 次重复,40 d 后统计各组增殖系数。

表 2 增殖培养的试验设计

Table 2 Design of experiment of multiplication culture

编号 Number	培养基 Culture medium	NAA	2,4-D	6-BA	TDZ
1	MS	0.1	—	0.5	—
2	MS	0.1	—	—	0.3
3	MS	—	0.10	0.5	—
4	MS	—	0.05	0.5	—
5	NN69	0.1	—	0.5	—
6	NN69	0.1	—	—	0.3
7	NN69	—	0.10	0.5	—
8	NN69	—	0.05	0.5	—

1.2.6 壮苗和生根培养 当增殖到一定数量时,转入到 4 种壮苗培养基中继续培养,壮苗培养基见表 3,然后再转入不同生根培养基中进行培养;较大的苗可直接转入生根培养基中培养(表 4)。

表 3 壮苗培养的试验设计

Table 3 Design of experiment of acclimatizing culture

编号 Number	基本培养基 Culture medium	2,4-D	6-BA
1	MS	0.1	0.5
2	MS	0.1	0.1
3	MS	0.0	0.1
4	MS	0.1	0.0

表 4 生根培养的试验设计

Table 4 Design of experiment of rooting culture

编号 Number	基本培养基 Culture medium	NAA	2,4-D
1	MS	0.1	0.5
2	3/4MS	0.1	0.5
3	1/2MS	0.1	0.5

1.2.7 生根试管苗的练苗和移栽 将根系发达、植株健壮的试管苗带瓶练苗,打开培养瓶的塑料薄膜,用纱布封口,期间给试管苗喷水,3~5 d 后取出试管苗,栽种于花钵中,基质为灭菌的蛭石+珍珠岩。1 周后放入室外,适应自然环境下光照和温湿度,加盖拱棚覆膜保持一定的温度和湿度。7 d 后逐渐见光,及时通风换气,定期喷肥和喷药,定期浇水,防止菌类污染,提高组培试管苗的成活率。移栽时,小心从培养瓶中取出美国红枫幼苗,用清水洗去培养基并且在 0.1% Na₂SO₄ 溶液中浸泡 3 min,再移栽于花钵内,喷透水。移栽后的苗木进行遮阴,期间注意水肥管理,2~4 周后可与一般苗木进行同样的管理。

1.3 数据分析

试验结果的基础数据用 Excel 统计汇总后,利用 SPSS 统计分析软件对试验数据进行多重对比和方差分析等。

2 结果与分析

2.1 不同消毒处理对外植体的影响

外植体茎段消毒处理后,接种到培养基中培养 5~7 d 后,部分培养基表面变得粗糙,有细菌污染的现象,菌落点状或带水状,颜色为橙色或灰黑色等。7~10 d 后出现霉菌污染,在培养基的表面或茎段切口处出现菌丝,并且呈逐渐扩大的趋势。部分茎段无污染,不启动,褐变死亡。

不同处理对外植体成活率、抽芽率以及生长状况的影响较大。由表 5 可知,3 种消毒剂中 0.1%升汞最适合美国红枫茎段的消毒处理,灭菌 6 min,其成活率最高,达 75.22%;成活的茎段其抽芽率也最高,为 95.13%,茎段的叶片生长良好,芽苗长,深绿色,茎秆粗壮。2.5%的 NaClO 的消毒效果次于升汞,最佳处理时间为 5 min,其成活率为 65.22%;抽芽率较高,为 80.56%,其茎秆粗壮,但芽苗较短。随着消毒时间的增加,其成活率降低,抽芽率也降低,消毒时间为 15 min 时,成活率仅 25.67%,

抽芽率为 20.57%。使用 75%乙醇消毒效果较差,消毒时间为 4、8、10 min 时无茎段成活,其它消毒时间下,成活的茎段生长状况也不佳,叶片呈黄绿色,茎秆瘦弱,长势不佳。

表 5 不同消毒处理对带芽茎段消毒的影响

Table 5 Effect of stem with bud with different sterilizations					
编号 Number	消毒剂种类 Antiseptic type	时间 Time /min	成活率 Rate of survival /%	抽芽率 Germination rate /%	生长状况 Growth condition
1	75%乙醇	4	0	0	—
2	75%乙醇	6	19.50	33.92	叶片黄绿,长势不佳
3	75%乙醇	8	0	0	—
4	75%乙醇	10	0	0	—
5	0.1%升汞	4	45.30	76.45	叶片深绿,长势佳
6	0.1%升汞	6	75.22	95.13	叶片深绿,茎秆粗壮
7	0.1%升汞	8	35.43	30.21	叶片深绿,茎秆粗壮
8	0.1%升汞	10	30.79	25.34	叶片浅绿,茎秆细
9	2.5%NaClO	5	65.22	80.56	芽苗短,茎秆粗壮
10	2.5%NaClO	10	40.45	48.21	叶片浅绿,长势弱
11	2.5%NaClO	15	25.67	20.57	叶片浅绿,茎秆长势弱

2.2 不同处理对外植体褐化的影响

由表 6 可以看出,添加维生素 C 能降低外植体的褐化率,其平均褐斑直径也较小,但其对茎段生长有一定的影响。当添加维生素 C 达 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,茎段生长不良,叶片颜色浅绿,生长瘦弱。添加 PVP 不如添加维生素 C 效果好,但其对茎段生长的影响较小,在所有添加 PVP 的培养瓶中,茎段新发叶片深绿,芽苗生长健壮。与对照相比,添加 PVP、维生素 C 对减轻外植体褐化都有明显的效果。

表 7 启动培养的正交实验设计的直观结果

Table 7 Results of orthogonal experiment of starting culture				
序号 Number	NAA $/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	6-BA $/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	平均启动率 Average of starting rate/%	芽苗生长状况 Growth condition of shoot
1	0.05	0.5	62.80	叶片深绿,茎秆粗壮,抽芽早,愈伤少,质地较轻
2	0.05	1.0	48.60	叶片浅绿,抽芽晚,愈伤多,透明
3	0.05	2.0	32.20	叶片浅绿,茎秆细,叶片卷曲
4	0.10	0.5	54.22	叶片深绿,茎秆粗壮,底部带愈伤较多,愈伤深红色,质地较厚
5	0.10	1.0	44.60	叶片浅绿,茎秆粗,底部带愈伤多,愈伤浅绿,质地厚
6	0.10	2.0	25.82	叶片浅绿,茎秆粗壮,基部膨大,愈伤较多,稍有变形
7	0.50	0.5	48.60	叶片深绿,茎秆粗壮,基部带愈伤较少,芽生长良好
8	0.50	1.0	33.10	叶片深绿,茎秆基部带的愈伤组织最多,愈伤血红色,透明
9	0.50	2.0	23.20	叶片浅绿,茎秆粗壮,底部膨大,愈伤多,愈伤呈深红色

由表 8 可知,在 5 号组合,即培养基为 NN69+NAA $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + TDZ $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,诱导率最高,达 83.20%;其次是 7 号组合:NN69+ $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ,启动率为 80.21%;再次是 1 号:MS+NAA $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + TDZ $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,诱导率为 78.20%,二者无显著差异。2 号组合:MS+NAA $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 6-BA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,诱导率最低,仅 54.22%。该研究中,当生长调节物质及其配比一定的情况下,在 NN69 培养基中外植体的诱导率较高。可能是培养基中的有机

表 6 不同处理对控制外植体褐化的影响

Table 6 Effect of the control of implant browning with different deals				
序号 Number	添加物 Additive	添加量 Additive amount $/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	褐化率 Browning rate /%	平均褐斑直径 The average diameter of brown spot/cm
1	PVP	0.5	52.50	1.50
2	PVP	1.0	42.67	1.01
3	PVP	2.0	32.65	0.93
4	VC	0.1	35.20	1.22
5	VC	0.5	25.33	0.62
6	VC	1.0	23.56	0.30
7	CK	0.0	75.00	1.82

2.3 不同处理对茎段启动培养的影响

接种 1 周后,茎段开始萌发出小叶,茎基部开始膨大,部分长出愈伤组织,各处理芽萌发的时间不同,愈伤的颜色、质地、结构也都有不同(表 7)。当 NAA 浓度一定时,随 6-BA 浓度增加,外植体的平均启动率降低;当 6-BA 浓度一定时,随 NAA 浓度的升高,外植体的启动率也降低,说明低浓度的 NAA 和 6-BA 促进外植体的启动以及抽芽,高浓度的 NAA 和 6-BA 抑制其启动率和抽芽率。由此可见,对茎端的启动培养效果最好的是 1 号,即 MS+NAA $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 6-BA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,平均启动率最高,达 62.8%;其次是 4 号组合,平均启动率为 54.22%。当 6-BA 浓度为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 NAA 组合培养的外植体,平均启动率较其它 2 组的均值要高,说明低浓度的 6-BA 有利于美国红枫外植体启动培养,浓度增大反而抑制其启动。

添加物叶酸以及生物素 VH 能够促进组织培养中相关酶的合成,使外植体快速地进行愈伤发生以及腋芽生长。另一方面,7 号培养基中生长外植体的诱导率大于 1 号,说明 2,4-D 比 NAA 更适合作为启动培养的生长素添加物,因为 2,4-D 的活性大于 NAA,并且在植物体内比较稳定。

2.4 不同培养基对不定芽增殖的影响

从表 9 可以看出,不同培养基对不定芽增殖的影响较大,NN69+NAA $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + TDZ $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,即

表 8 培养基及激素比对启动培养的影响

Table 8 Effect of basic culture medium and hormone proportion on starting up culture

序号 Number	基本培养基 Culture medium	NAA /(mg · L ⁻¹)	2,4-D /(mg · L ⁻¹)	6-BA /(mg · L ⁻¹)	TDZ /(mg · L ⁻¹)	诱导率 Induction rate/%
1	MS	0.1	—	—	0.3	78.20±0.80a
2	MS	0.1	—	0.5	—	54.22±4.22e
3	MS	—	0.1	—	0.3	58.62±4.62cd
4	MS	—	0.1	0.5	—	71.20±3.20b
5	NN69	0.1	—	—	0.3	83.20±1.20a
6	NN69	0.1	—	0.5	—	60.29±2.71c
7	NN69	—	0.1	—	0.3	80.21±1.79a
8	NN69	—	0.1	0.5	—	72.10±4.10b

6号处理组合的增殖系数最高,达到4.20,与其它各处理差异显著。其次是MS+NAA 0.1 mg · L⁻¹ + TDZ 0.3 mg · L⁻¹,增殖系数为2.90;增殖系数最小的是1号组合,即MS+NAA 0.1 mg · L⁻¹ + 6-BA 0.5 mg · L⁻¹

下,不定芽的增殖系数仅为1.40。该研究中影响增殖的因素较为复杂,是基本培养基和激素共同作用,在相同激素配比的情况下,接种于NN69基本培养基中的不定芽增殖系数高。

表 9 不同的增殖培养基对不定芽增殖的影响

Table 9 Effect of different multiplication culture medium on adventitious bud multiplication culture

编号 Number	基本培养基 Culture medium	NAA /(mg · L ⁻¹)	2,4-D /(mg · L ⁻¹)	6-BA /(mg · L ⁻¹)	TDZ /(mg · L ⁻¹)	增殖系数 Multiplication rate
1	MS	0.1	—	0.5	—	1.40±0.28f
2	MS	0.1	—	—	0.3	2.90±0.42b
3	MS	—	0.1	0.5	—	2.10±0.29cd
4	MS	—	0.05	0.5	—	2.65±0.21bc
5	NN69	0.1	—	0.5	—	1.65±0.35e
6	NN69	0.1	—	—	0.3	4.20±0.30a
7	NN69	—	0.1	0.5	—	2.85±0.07bc
8	NN69	—	0.05	0.5	—	2.80±0.30bc

2.5 不同处理对壮苗培养的影响

由表10可知,壮苗的最佳培养基为1号组合,即MS+2,4-D 0.1 mg · L⁻¹ + 6-BA 0.5 mg · L⁻¹。在此培养基中美国红枫的长势最好,试管苗颜色深绿,茎秆粗壮,叶子生长的速度也较快,平均株高5.8 cm。而添加单一激素的2种培养基中的株高分别为4.3、4.2 cm,苗木的生长状况较差,其叶子的颜色稍泛黄色。与1号培养组合相比,其它处理苗高都较低,可能是1号处理中适合浓度的生长素和细胞分裂素共同调节植物的营养生长。

表 10 壮苗培养的试验设计

Table 10 Design of experiment of acclimatizing culture

编号 Number	基本培养基 Culture medium	2,4-D /(mg · L ⁻¹)	6-BA /(mg · L ⁻¹)	平均株高 Average height/cm
1	MS	0.1	0.5	5.8
2	MS	0.1	0.1	4.5
3	MS	—	0.1	4.3
4	MS	0.1	—	4.2

表 11 不同的培养基对生根的影响

Table 11 Effect of different rooting medium on rooting

序号 Number	培养基 Culture medium	NAA /(mg · L ⁻¹)	2,4-D /(mg · L ⁻¹)	生根率 Rooting rate/%	根数 Rooting numbers/条	根长 Rooting length/cm
1	MS	0.1	0.5	99.80±0.07a	7.90±0.14a	6.50±0.16a
2	3/4MS	0.1	0.5	82.30±0.64b	4.30±1.32b	5.20±0.32b
3	1/2MS	0.1	0.5	51.90±0.98c	3.60±0.49c	4.50±0.35c

2.6 不同培养基对生根的影响

待茎段长至3~5 cm,接种到生根培养基中,1号处理茎段的基部,在5~7 d产生点状突起的组织,这些点状突起继续生长。根呈白色,粗壮肉质。2号处理同样也会产生点状突起,但基部带少量愈伤,根系较弱。3号处理的根系呈黄白色,根系细弱,基部带的愈伤也较多。

不同的培养基对美国红枫生根的效果不同(表11),生根效果最佳的是处理1,即为MS+NAA 0.1 mg · L⁻¹ + 2,4-D 0.5 mg · L⁻¹的生根率最高达99.80%,生根条数7.90,平均根长最长为6.50 cm。其次是处理2,处理3的生根效果最差,平均生根率为最低,仅51.90%。3种处理差异达显著水平(P<0.05)。生长素NAA和2,4-D组合对生根的诱导效果较佳,3个处理的生根率都在51.90%以上。平均根数均在3.60根以上,平均根长也达到4.50 cm以上,基本培养基对茎芽生根的影响较大。

3 讨论

植物组织培养成败的关键是要保证无菌培养。为避免污染,所用的器械和用于培养的外植体,均需经过严格消毒灭菌。消毒处理要尽量将植物材料所携带的微生物杀死,同时不能伤害植物材料而影响其生长。因此,选择良好的消毒剂以及控制好消毒时间对植物组织培养很重要。该试验中美国红枫的外植体中含有较为丰富的次生代谢物质,如花青苷、多酚氧化酶等。需要采用抗氧化剂或吸附剂以防止褐化,所以采用维生素 C 和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。

在完整植物体的细胞中,酚类化合物和多酚氧化酶是分隔存在的,外植体被切割后受到创伤刺激,受伤细胞内的酚类化合物和多酚氧化物便流出,酚类化合物被多酚氧化物氧化成褐色的醌类物质和水,醌类物质又会与络氨酸酶发生作用使外植体蛋白质聚合,导致外植体生长停顿,直至死亡。褐变现象严重,往往使组培工作难以进行。王静^[9]对美国山核桃(*Carya illinoensis*)叶片组织培养中在培养基中添加 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PVP 可以很好的降低外植体的褐化率,BAUERLE 等^[10]认为美国红枫脱落酸合成是叶子蒸腾压力不足的响应机制,WATMOUGH 等^[11]则用成熟美国红枫的愈伤组织研究美国红枫受金属污染和抵抗金属污染的抗性的关系。该研究表明,添加 PVP、维生素 C 对减轻美国红枫外植体褐化都有明显的效果。于传^[12]选择各种不同外植体,筛选不同激素和浓度进行研究,找出美国红枫组培直接和间接器官发生最佳途径,得出腋芽成活率最高,给该试验提供选材基础。曹受金等^[13]以美国红枫嫩茎为外植体,得出不同浓度的激素组合对红枫组织培养影响较大,与该试验结果相似。郭晓东^[14]以桃(*Prunus persica*)为材料,认为 3 月是最适宜的取材时间,其污染率与 8 月和 11 月间的差异达到显著水平,因此对于外植体的采集时间该试验有待研究。PREECE 等^[15]得出基本培养基是影响组培的重要因子,其组成中的盐分代替激素而促进体胚的发生,近年来,WPM 培养基也应用于木本植物的组培中^[16],WPM 培养基对美国红枫的组培效果影响试验有待深入研究。

美国红枫在移栽前根系需要长到一定长度,试管苗的根系在无菌条件下生成,吸收功能较播种苗差,气孔导度大,易失水,光合作用弱。所以,在练苗的过程中将

封口膜改用纱布进行封口,以给苗木适应水分变化的过程,经过此过程苗木由绿色变成泛微黄色,之后颜色又变为绿色,说明植物已经适应水分变化的过程。因此,对移栽的基质、水分、温湿度、光照等严加控制管理,以提高移栽成活率,达到工厂化育苗的要求。

参考文献

- [1] 叶景丰,尤文忠,郭锦山,等.美国红枫容器苗培育技术试验研究[J].辽宁林业科技,2011(3):29-30.
- [2] 雷伟成,沈波.红枫的繁殖与栽培研究进展[J].林业科学,2009(13):194-196.
- [3] 董转年,方乐金,张睿,等.红枫的不同繁殖方法比较[J].湖南农业科学,2011(5):114-115.
- [4] JASON P, HARTMAN, DAVID S, et al. Differential success of oak and red maple regeneration in oak and pine stands on intermediate-quality sites in northern Lower Michigan[J]. Forest Ecology and Management, 2005(15): 8-10.
- [5] IKUYO S. Sexual reproductive biology of the endangered Japanese red maple(*Acer pycnanthum*)[J]. Ecological Research, 2007, 23(4): 719-727.
- [6] TOBOLSKI J J, KEMERY R D. Identification of red maple cultivars by isozyme analysis[J]. HortScience(USA), 1992, 27(2): 169-171.
- [7] 李莹,罗晓芳,蒋湘宁.美国红枫外植体选择及启动培养研究[J].黑龙江农业科学,2010(8):6-9.
- [8] 宗树斌,周春玲,牛立军,等.美国红枫的组织培养研究[J].山东林业科技,2006(1):1-3.
- [9] 王静.美国山核桃组织培养技术的研究[D].长沙:中南林业科技大学,2012.
- [10] BAUERLE W L, WHITLOW T H, SETTER T L, et al. Absciscic acid synthesis in *Acer rubrum* L. leaves—a vapor-pressure-deficit-mediated response[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2004, 129(2): 182-187.
- [11] WATMOUGH S A, HUTCHINSON T C. Metal resistance in red maple (*Acer rubrum*) callus cultures from mine and smelter sites in Canada[J]. Canadian Journal of Forest Research, 1997, 27(5): 693-700.
- [12] 于传.美国红枫的组织培养技术体系研究[D].重庆:西南大学,2013.
- [13] 曹受金,刘辉华,田英翠.美国红枫组织培养与快繁技术的研究[J].湖北农业科学,2010,49(11):2643-2645.
- [14] 郭晓东.预防和控制植株组织培养污染的研究[D].晋中:山西农业大学,2005.
- [15] PREECE J E, ZHAO J L, KUNG F H. Callus production and somatic embryogenesis from white ash[J]. HortScience, 1989, 24(2): 377-380.
- [16] LLOYD G, WCCOWN B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel(*Kalmia latifolia*) by use of shoot-tip culture[J]. Proc Int Plant Propagat Soc, 1980(30): 421-427.

Tissue Culture and Rapid Propagation of *Acer rubrum*

WU Yaqiong^{1,2}, LIU Jing^{1,2}, WANG Guibin^{1,2}, CAO Fuliang^{1,2}

(1. Co-innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037; 2. College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037)

DOI:10.11937/bfyy.201620026

亳州芍药组织培养的关键技术

梁小敏, 罗赣丰

(江西农业工程职业学院, 江西 樟树 331200)

摘 要:以亳州芍药鳞芽外植体为试材,对3个时间段(2月下旬至3月上旬、9月下旬至10月上旬、12月下旬至翌年1月上旬)的鳞芽进行了优化,并确定了亳州芍药组织培养的最佳取样时间;以2月下旬至3月上旬(第1阶段)鳞芽为试材,研究了5种鳞芽表面灭菌方法和IBA、NAA与BA组合的4因素2水平以及BA与KT组合的2因素2水平培养基组分筛选正交实验,以建立一套高效成熟的亳州芍药组织培养的快速繁殖技术体系。结果表明:2月下旬至3月上旬取样的亳州芍药鳞芽诱导成活率最高,采用0.13% HgCl_2 浸泡10 min对亳州芍药萌芽进行2次灭菌效果最好;亳州芍药鳞芽最佳的增殖出芽分化培养基为 $1/2\text{MS}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{BA}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{KT}+3.0\%\text{蔗糖}+0.7\%\text{琼脂}$ 。

关键词:芍药;鳞芽;取材时间;灭菌方法;组织培养

中图分类号:S 682.1⁺2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)20-0102-04

芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.)属毛茛科多年生宿根草本植物,是我国传统的名贵花卉之一,其根经过蒸煮、去皮、风干和切片等工序后制成的中药材被中医称之为白芍(*Radix Paeonia Alba*),其具有扩张血管、镇痉、镇痛、通经、利尿等功效和悠久的药用历史^[1-3]。我国中药材市场上的白芍主要来源三大产区,即安徽亳州的亳白芍、浙江东阳等地的杭白芍、四川中江等地的川白芍,

但以安徽亳州的亳白芍产量大、色白、粉性足、质量好而享誉全国,市场占有率最高。

芍药的传统繁殖方式有分株、扦插和播种,但这些方法的繁殖系数低、周期长,新品种难以快速扩大种植规模。组织培养是植物材料快速繁殖较成熟的方法,已在很多花卉苗木生产中应用^[4-6]。而芍药属植物的组织培养技术体系尚不成熟,存在外植体污染率高、褐化严重、外植体僵化与脱分化及分化难、增殖和根诱导难等问题^[7-9]。组织培养存在一定的专一性,植物同属不同种,甚至同一种内不同品种或生态型,组织培养技术也存在较大差异。目前芍药组织培养技术多集中在花卉用品种上^[10-13],药用品种的组织培养技术报道不多^[7]。

第一作者简介:梁小敏(1973-),女,江西高安人,硕士,教授,研究方向为植物组织培养在种苗生产中的应用。E-mail:liangxm@sina.com.

基金项目:江西省教育厅青年科学基金资助项目(GJJ09633)。

收稿日期:2016-07-05

Abstract: Taking *Acer rubrum* as material, using transformation technology, the whole process from the sterile system establishment, start up cultivation, breeding, seedling cultivation, root culture and hardening-seedling transplanting were discussed by different hormone proportion. The results showed that the best disinfection way of the stem with bud explants was disinfection by 70% alcohol immersion 30 seconds + 6 minutes disinfection by 1% mercuric chloride. The highest survival rate and sprout rate were 75.22% and 95.13%. Adopting orthogonal test, medium and hormone ratio test to start training. The former result showed that the influence of NAA was greater than 6-BA, $\text{MS}+\text{NAA } 0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+6\text{-BA } 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ had the highest start rate of 62.80%. The latter result showed $\text{NN69}+2,4\text{-D } 0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{TDZ } 0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ had the highest start rate of 80.21%. The best medium for multiplication culture was $\text{NN69}+\text{NAA } 0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{TDZ } 0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, the multiplication factor was 4.2. The $\text{MS}+2,4\text{-D } 0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+6\text{-BA } 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ could effectively promote the growth of test-tube seedlings. In root culture stage, the optimal culture medium was $\text{MS}+\text{NAA } 0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+2,4\text{-D } 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The rooting effect was best with root rate 99.8%, root number 7.9, root length 6.5 cm. Amounts of elements benefits test-tube plant rooting. After the culture-bottle seedlings were transplanted into the matrix composed of vermiculite and perlite (1:1, V:V), the transplanting survival rate was up to 75.2%.

Keywords: *Acer rubrum*; tissue culture; rooting