

施帅男,陆 叶,杨金海,等. 红枫品种“四季红”休眠芽萌发诱导与培养[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):90-92.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.026

# 红枫品种“四季红”休眠芽萌发诱导与培养

施帅男,陆 叶,杨金海,王光萍,施季森

(南京林业大学林学院/林木遗传与生物技术省部共建教育部重点实验室,江苏南京 210037)

**摘要:**四季红红枫是一种重要的园林绿化树种,为获得足够多的外植体材料并建立“四季红”红枫的离体快速繁殖体系,分别在自然条件和离体条件下利用植物激素对休眠芽进行催芽处理。结果表明,在活体情况下喷施 0.1 mg/L 赤霉素能够促进休眠芽萌发。在离体培养条件下,通过在 MS 基本培养基中添加 0.5 mg/L TDZ、1.0 mg/L BA、1.0 mg/L NAA,休眠芽萌发率最高可达到 73.3%。

**关键词:**休眠芽;赤霉素(GA);噻苯隆;萌发培养;萌发率;红枫

**中图分类号:**S687.04<sup>+</sup>3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)11-0090-03

红枫品种“四季红”(Acer palmatum ‘Trompenburg’)是槭树科的落叶小乔木。其叶形优美,红色鲜艳持久,树姿美观,是一种非常美丽的观叶稀有树种<sup>[1]</sup>,具有很高的开发利用价值。“四季红”的主要繁殖方法有播种繁殖、扦插繁殖和嫁接繁殖<sup>[2]</sup>,但是红枫种子繁殖方式成活率较低,一般在 30%~40%<sup>[3-4]</sup>,而扦插繁殖与嫁接繁殖效率受母树年龄与环境因素影响较大。组织培养不仅可以克服种子繁殖中存在的诸多问题,而且可以克服扦插繁殖速度慢、难生根、繁殖率低的缺点,还能保持母体的遗传特性,是解决优良种苗快速繁殖的最佳方式。但是笔者观察到红枫“四季红”品种的休眠芽不仅萌动较慢,而且只有部分能够展叶,其他多数休眠芽一直停留在休眠状态,因此如果要建立该品种的离体快速繁殖体系,必须解决外植体材料来源困难的问题。为获得足够多的用于离体培养的外植体材料,本研究分别在活体条件和离体条件下外施植物激素,探讨植物激素对红枫休眠芽萌发的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

研究材料为南京桥林林业科技有限公司的红枫“四季红”品种的嫁接盆栽苗,地径为 3cm,苗高 1m,休眠芽均处于休眠状态。

### 1.2 试验方法

1.2.1 活体条件下赤霉素对茎段休眠芽萌发的影响 “四季红”红枫原种购自加拿大,目前在市场上出现得很少,国内只有少数公司进行培育,市场供不应求。本试验中用到的材料为嫁接再生植株,由于嫁接难度大因而材料稀少,因此,本试验选取 24 株嫁接盆栽苗,进行不同浓度(0、0.05、0.10 mg/L)的赤霉素处理,每组 8 株。每隔 3 d 喷施 1 次,共

处理 9 次,27 d 后统计休眠芽萌发个数。

### 1.2.2 离体条件下 TDZ 和 NAA 对休眠芽萌发的影响

1.2.2.1 外植体灭菌处理 从未经 GA 处理的植株上剪下带有休眠芽的茎段,每个茎段长约 4 cm,分别标号,用于后期组织培养。剪取材料时用镊子夹取,再放入收纳袋,避免手指上的油脂触碰到茎段,难以表面灭菌,造成后期组培污染。

在灭菌处理之前,先用自来水冲洗 20 min,并用毛刷刷轻轻刷去上面的杂质,然后设计不同灭菌方式。消毒处理采用 3 因子 2 水平的 L<sub>4</sub>(2<sup>3</sup>)正交试验设计,分别利用 70%乙醇(10、15 s)、吐温 80(加 2 滴、不加)和 0.1% HgCl<sub>2</sub>(10、15 min)进行处理。各处理后均用无菌水冲洗 5 遍,均处理 30 个外植体,25 d 后统计污染率和萌发率,筛选出最佳灭菌方式。

1.2.2.2 培养基的设计 本试验根据报道的美国红枫组培方法<sup>[5-6]</sup>,以 MS+1.0 mg/L BA 为基础,分别测定 TDZ 和 NAA 对休眠芽萌发的影响。生长调节剂的浓度和种类采用 2 因素 3 水平 L<sub>9</sub>(3<sup>2</sup>)正交试验设计(表 1),其中 TDZ 的浓度分别为 0、0.5、1.0 mg/L,NAA 的浓度分别为 0.50、0.75、1.00 mg/L。

表 1 休眠芽萌发培养 L<sub>9</sub>(3<sup>2</sup>)正交试验因子水平

水平	TDZ 浓度 (mg/L)	NAA 浓度 (mg/L)
1	0	0.50
2	0.5	0.75
3	1.0	1.00

培养基中蔗糖 30 g/L、琼脂 6.4 g/L,pH 值为 5.7,分装至三角瓶中后于 121 ℃高压灭菌 20 min。每瓶接种 1 个外植体,每个处理接 10 瓶,3 次重复。接种后每天观察休眠芽的萌动趋势,25 d 后统计接种数(除去污染数)、萌芽率并观察芽的长势,寻找最合适的培养基。培养期间及时随机取出污染的瓶子,以避免交叉污染,因此统计的接种数为去除污染数后的总数。

1.2.2.3 培养环境 培养材料于(25±2)℃光培养 16 h,暗培养 8 h,在相对湿度 50%~70%的环境下进行培养,每 25 d 继代培养 1 次。

1.2.2.4 数据分析方法 培养 25 d 后统计各个处理的污染率、萌芽率等指标。指标计算方法如下:污染率=(污染的休

收稿日期:2014-11-12

基金项目:江苏省高校自然科学基金(编号:13KJA220001);江苏高校优势学科建设工程项目(编号:PAPD)。

作者简介:施帅男(1989—),女,江苏南通人,硕士研究生,研究方向为林木遗传育种。E-mail:shishuainan99@163.com。

通信作者:施季森,教授。E-mail:jshi@njfuedu.cn。

眠芽数目/接种的休眠芽数目) × 100%; 萌芽率 = (未污染休眠芽萌动数目/未污染的休眠芽数目) × 100%。

用 Excel 软件计算在活体条件下试验组和对照组数据的显著性,用 SPSS 软件分析离体条件下最佳组合培养基。

2 结果与分析

2.1 赤霉素处理对茎段休眠芽萌发的影响

根据不同处理条件下休眠芽萌发情况(图 1),休眠芽的萌发率随着所施 GA 浓度升高而升高。当赤霉素浓度为 0.10 mg/L 时,萌发率最高,平均每天萌发 2 个休眠芽,27 d 后,平均每株萌发数达到 20 个(图 2 - C);赤霉素浓度为 0.05 mg/L 时,平均每天萌发 1 个休眠芽,27 d 后,平均每株萌发数达到 12 个(图 2 - B);而对照组平均每 6 d 左右萌发 1 个休眠芽,27 d 后只有顶部枝条发芽,平均每株萌发 8 个(图 2 - A)。经 GA 处理后,休眠芽萌发时间提前,在处理 3 d 后,

休眠芽开始萌发,而对照组则在处理 6 d 后开始萌发。将处理 27 d 后各组休眠芽萌发个数用 Excel 进行显著性分析可以得出,  $P$  值为  $0.043 < 0.05$ ,说明赤霉素对休眠芽萌发促进效果显著,浓度为 0.10 mg/L 时萌发效果最好。

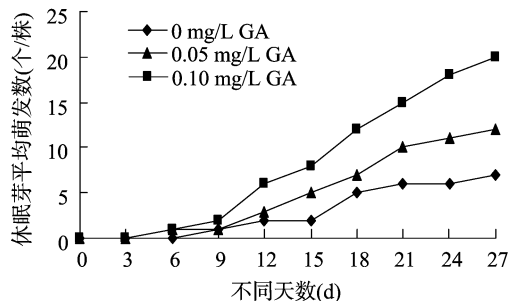
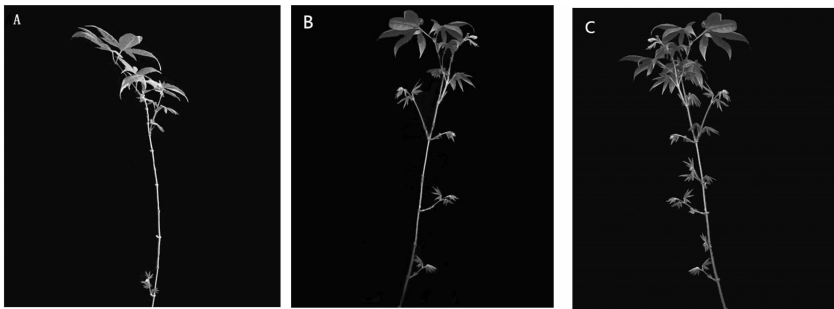


图1 赤霉素处理的休眠芽萌发情况



A—清水对照; B—喷施 0.05 mg/L GA; C—喷施 0.10 mg/L GA

图2 赤霉素处理 27 d 休眠芽萌发情况

2.2 离体条件下休眠芽萌发培养

2.2.1 不同消毒方式的影响 选择适当的消毒剂组合并确定合适的消毒时间是建立外植体无菌体系的重要基础。本试验对“四季红”红枫带芽茎段用 70% 乙醇表面消毒 20 ~ 30 s, 无菌水冲洗 5 次,然后用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 灭菌 5 ~ 7 min(加或不加吐温 80)进行表面灭菌,用无菌水冲洗 5 次后,接种到休眠芽萌发培养基上,消毒剂组合效果见表 2。

表 2 不同消毒剂组合的灭菌效果

试验号	70% 乙醇	吐温 80	0.1% HgCl <sub>2</sub>	污染率 (%)	萌发率 (%)
1	20 s	加	5 min	36.09	60.74
2	20 s	不加	7 min	40.00	70.56
3	30 s	加	5 min	4.60	87.55
4	30 s	不加	7 min	43.33	63.06
$k_{11}$	38.05	20.35	39.71		
$k_{12}$	23.97	41.67	22.30		
$R_{污染率}$	14.08	21.32	17.41		
优水平	A <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>		
$k_{21}$	65.65	74.15	74.15		
$k_{22}$	73.31	66.81	66.81		
$R_{萌发率}$	7.66	7.34	7.34		
优水平	A <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>			

方差分析结果表明,根据污染率试验结果,吐温 80 对外植体灭菌效果影响最大,其次是 0.1% HgCl<sub>2</sub> 灭菌时间,最后是乙醇灭菌时间。综合污染率及萌发率试验结果,A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>1</sub> 为最优组合,即乙醇处理 30 s,含吐温 80 的 0.1% HgCl<sub>2</sub> 灭菌

5 min,该处理条件下污染率为 4.60%,与其他处理差异极显著( $P < 0.01$ )。吐温 80 可增加灭菌液的溶解度,使消毒液能充分与植物材料接触,不会造成材料的损伤,数据结果表明,吐温并未对萌发率造成干扰。

2.2.3 离体培养条件下 TDZ 和 NAA 对休眠芽萌发的影响

由表 3 可以看出,不同生长调节剂及配比对休眠芽的萌发效果存在一定的差异。当浓度为 0.5 mg/L TDZ 与不同浓度 NAA 配比时,萌发率最好。如表 3 所示,1.00 mg/L NAA 和 0.5 mg/L TDZ 组合为正交试验最佳组合,休眠芽的萌发率最高,萌发率为 73.3%,而且萌发状态较好,在接种培养 10 d 后芽苞膨大(图 3 - B),随后开始慢慢展叶,20 d 后展出新叶(图 3 - C),30 d 后基于稳定,35 d 后完全展叶,叶柄长约 1 cm(图 3 - D)。其次,0.75 mg/L NAA + 0.5 mg/L TDZ,萌发率为 66.7%;最后为 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L TDZ,萌发率为 66.7%。当 TDZ 浓度提高到 1.0 mg/L 时,萌发率明显下降,0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L TDZ 萌发率为 20%,0.75 mg/L NAA + 0.5 mg/L TDZ 萌发率为 40%,1.00 mg/L NAA + 0.5 mg/L TDZ 萌发率为 60%。由此看出,在相同浓度 TDZ 条件下休眠芽萌发率随 NAA 浓度升高而升高。同时,试验结果表明当 TDZ 浓度高于 0.5 mg/L 时,茎段底部玻璃化现象的频率增加,玻璃化程度加重将抑制植物的生长,萌发率开始下降。这与谢寅峰等的青钱柳休眠芽萌发诱导研究结果<sup>[7]</sup>一致。

3 结论与讨论

赤霉素是一种高效广普性植物激素,赤霉素处理会促进

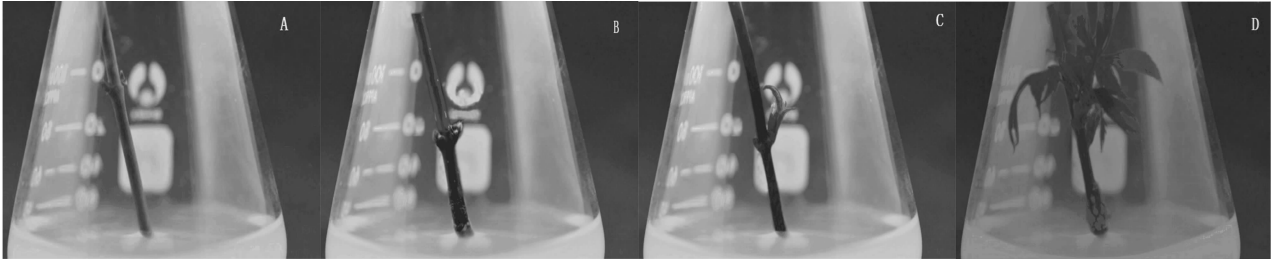
表 3 TDZ 和 NAA 对休眠芽萌发的影响

序号	TDZ (mg/L)	NAA (mg/L)	萌发率 (%)
1	0	0.50	0
2	0	0.75	0
3	0	1.00	0
4	0.5	0.50	60.0
5	0.5	0.75	66.7
6	0.5	1.00	73.3
7	1.0	0.50	20.0
8	1.0	0.75	40.0
9	1.0	1.00	60.0
$k_1$	0	26.7	
$k_2$	66.7	35.6	
$k_3$	40.0	44.4	
$R$	66.7	17.7	
优水平	$A_2$	$B_3$	

植物可溶性糖和蛋白质的合成,促进植物细胞及茎段伸长、叶片扩大,加速生长和发育,使作物提早成熟<sup>[8]</sup>。薛志成用 5~

10 mg/L 赤霉素溶液处理 15 min,有利于马铃薯休眠芽的萌发<sup>[9]</sup>。本研究首次对“四季红”红枫休眠芽喷施赤霉素,探讨外源激素对休眠芽萌发的影响,在 3 组试验中,对照组萌发率明显低于试验组,说明赤霉素有利于“四季红”红枫休眠芽的萌发,而且萌发速率随着浓度的升高而升高。结果显示,当赤霉素浓度为 0.10 mg/L 时,休眠芽萌发效率最佳。

外源植物激素对外植体的形态建成及其调控起着十分重要的作用,其种类的选择和浓度的搭配影响着植株的再生方式。TDZ 是科学家们发现的具有植物细胞分裂素活性的一类生长调节物质,可以促进植物芽的再生和繁殖,打破芽的休眠,并且可以通过配合其他植物激素和生理活性物质的作用来调节植物的生长发育过程<sup>[10-13]</sup>。Hutchison 等利用热带果树的带腋芽茎段为外植体,在培养基中添加 TDZ,已成功诱导腋芽萌发<sup>[14-16]</sup>。本试验参考美国红枫 MS + 1.0 mg/L BA 的培养条件,在培养基中添加不同浓度的 TDZ 和 NAA,结果显示,当添加 0.5 mg/L TDZ + 1.0 mg/L NAA 时,能快速有效的促进休眠芽萌发。



A—培养0 d; B—培养10 d; C—培养20 d; D—培养35 d

图3 离体培养条件休眠芽萌发过程

本试验分别在自然条件和离体条件下,初步探讨了四季红红枫休眠芽萌发的影响因子,通过调整外源激素的浓度,达到休眠芽快速萌发的效果,为稳定而高效的组织培养与快繁技术体系的建立奠定了基础。

参考文献:

[1] 荣旭升,孙迎坤,赵爽,等. 彩叶树种新品种——美国红枫[J]. 现代园林,2006(4):42-43.  
[2] 何丰州. 红枫繁殖技术[J]. 现代农业科技,2010,39(24):213,215.  
[3] 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.  
[4] 雷伟成,沈波. 红枫的繁殖与栽培研究进展[J]. 现代农业科技,2009(13):194-196.  
[5] 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,2006,162(1):1-3.  
[6] 于传. 美国红枫(*Acer rubrum*)的组织培养技术体系研究[D]. 重庆:西南大学,2013.  
[7] 谢寅峰,张志敏,尚旭岚,等. 青钱柳茎段腋芽萌发和丛生芽增殖[J]. 林业科学,2011,47(1):50-55.  
[8] 石海燕,郭靖,周颖,等. 赤霉素和脱落酸在植物生长发育中相互关系的研究进展[J]. 华中师范大学研究生学报,2007,14

(1):138-142.  
[9] 薛志成. 赤霉素在蔬菜上的应用[J]. 农业科技与信息,1998(6):17.  
[10] 周连霞,马锋旺,陈登文,等. TDZ 对仙客来不同外植体再生的影响[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2006,34(4):39-42.  
[11] 陈荣,李庆玲,朱昌叁. TDZ 在白掌组织培养中的应用[J]. 江苏农业科学,2012,40(5):34-35.  
[12] 徐晓峰,黄学林. TDZ:一种有效的植物生长调节剂[J]. 植物学通报,2003,20(2):227-237.  
[13] 张晓娟,方小平,罗丽霞,等. TDZ 和 BA 对诱导大豆胚轴植株再生的影响[J]. 中国油料作物学报,2000,2(1):25-27.  
[14] Hutchison M J, Murch S J, Saxena P K, et al. Morphoregulatory role of TDZ:evidence of the involvement of geranium (*Pelargonium × hortorum* Bailey) [J]. Plant Physiol,1996,149:573-579.  
[15] Huettelman C A, Preece J E. TDZ:a potent cytokinin for woody plant tissue culture[J]. Plant Cell Tissue Organ Cult,1993,33:105-119.  
[16] Mundhara R, Rashid A. Stimulation of shoot\_bud regeneration on hypocotyl of linum seedlings on a transient withdrawal of callus: effect of calcium, cytokinin and thidiazuron [J]. Plant Science, 2002,162:211-214.