

文章编号:1000-2340(2007)01-0025-04

不同植物生长调节物质对芍药离体培养的影响

张庆瑞,杨秋生,李永华

(河南农业大学林学院园艺学院,河南 郑州 450002)

摘要:以芍药茎尖、叶片为外植体,研究了植物生长调节物质对芍药离体培养的影响。结果表明,芍药茎尖诱导培养的适宜培养基为 $1/2MS + GA_3$ $1\text{ mg} \cdot L^{-1} + 6-BA$ $1\text{ mg} \cdot L^{-1}$,影响茎尖诱导的主要因素是 GA_3 ;适宜增殖培养基为 $1/2MS + 6-BA$ $1\text{ mg} \cdot L^{-1} + KT$ $0.5\text{ mg} \cdot L^{-1}$;诱导叶片愈伤组织的适宜培养基为改良 $MS + 2,4-D$ $0.5\text{ mg} \cdot L^{-1} + 6-BA$ $0.5\text{ mg} \cdot L^{-1}$ 。

关键词:芍药;组织培养;植物生长调节物质

中图分类号:S 682.12

文献标识码:A

Effects of Different Plant Growth Regulators on Tissue Culture of *Paeonia lactiflora* Pall.

ZHANG Qing-rui, YANG Qiu-sheng, LI Yong-hua

(College of Forestry and Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Taking buds and leaves of *Paeonia lactiflora* Pall. as explants, the effect of plant growth regulators on the tissue culture was studied. The results showed that the culture medium for the buds induction were $1/2MS + GA_3$ $1\text{ mg} \cdot L^{-1} + 6-BA$ $1\text{ mg} \cdot L^{-1}$, and GA_3 was the most important influencing factor for bud induction; the best medium for propagation was $1/2MS + 6-BA$ $1\text{ mg} \cdot L^{-1} + KT$ $0.5\text{ mg} \cdot L^{-1}$; and the preferable medium for the shoots callus induction for propagation was a modified MS supplemented with $2,4-D$ $0.5\text{ mg} \cdot L^{-1}$ and $6-BA$ $0.5\text{ mg} \cdot L^{-1}$.

Key words: *Paeonia lactiflora* Pall.; tissue culture; plant growth regulators

芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.)为芍药科芍药属多年生宿根草本植物。其花形妩媚,花色艳丽,素有“花中皇后”的美称,自古以来深受人们的喜爱。中国芍药栽培已有3 900多年的历史^[1]。芍药还是牡丹嫁接繁殖的理想砧木,在生产中观察到,以日本进口“金晃”牡丹的砧木——芍药作砧木嫁接的牡丹开花大,数量多,花期长,花色艳,且适宜在容器中较长时间栽培。但是此种芍药数量极少,尚不能满足生产上的需求。芍药繁殖主要以分株为主,但其繁殖周期长、系数低。对于快繁研究,以前主要集中在以种子为材料的组织培养方面^[2-5],茎尖研究

的相对较少^[6]。为此,本试验以日本进口“金晃”牡丹的砧木——芍药的茎尖、叶片为外植体进行组织培养研究,期望在短时间内扩大其种苗数量,为牡丹生产提供充足的砧木资源。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料取自日本进口“金晃”牡丹的砧木——芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.)。以该芍药为砧木嫁接的牡丹盆栽时间较长,花色艳丽,开花期长。茎尖选自根茎处休眠芽。叶片选自春季刚萌发

的无病虫害的嫩叶。

1.2 试验方法

1.2.1 茎尖培养 1)启动培养 2004-11月3次取地栽芍药休眠芽作为试验材料。茎尖采回后,先用自来水冲洗干净,去掉外层鳞片,切除基部受伤部分,用洗洁精浸泡20 min后,用流水冲洗30 min;然后用体积分数为75%酒精消毒30 s,再用质量分数为0.1%升汞消毒10 min,最后用无菌蒸馏水洗6~7次,用刀片剥去鳞片,切取顶端茎尖为外植体,接种到培养基上。每处理接种20瓶,每瓶接种1~2个外植体,在培养室培养25 d后统计结果。培养基中蔗糖用量为 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,琼脂用量为 $11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,pH 5.6~5.8。培养温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,光照强度2000 lx,光照时间 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ (下同)。

培养基为1/2MS附加不同浓度的6-BA,NAA和 GA_3 ,采用 $\text{L}_9(3^4)$ 正交设计(表1),培养基编号为1~9号。

表1 启动培养的 $\text{L}_9(3^4)$ 正交设计

Table 1 Orthogonal table of medium for induction

因子水平	因子种类 / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		Factor type
Level of factor	GA_3	6-BA	NAA
1	0	0.5	0
2	0.5	1	0.5
3	1	2	1

2)增殖培养 增殖培养基中分别加入NAA,KT,6-BA,基本培养基为1/2MS,采用 $\text{L}_9(3^4)$ 正交设计(表2),培养基编号为10~18号。将启动培养得到的生长相对一致的组培苗切割下来接种到培养基上。每处理接种10瓶,每瓶接1株,60 d后观察统计。

表2 增殖培养的 $\text{L}_9(3^4)$ 正交设计

Table 2 Orthogonal table of medium for multiplication

因子水平	因子种类 / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		Factor type
Level of factor	6-BA	NAA	KT
1	0.5	0	0
2	1	0.5	0.5
3	2	1	1

1.2.2 叶片愈伤组织培养 叶片采回后,切成适当大小,用洗洁精浸泡20 min后,在流水下冲30 min;然后用体积分数为75%酒精消毒30 s,再用质量分数为0.1%升汞消毒4 min。用无菌蒸馏水洗6~7次,每次约1 min。用无菌滤纸吸干表面水分,切成 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 的小块(带主脉),在主脉上

刻痕,接种到诱导培养基上。每处理接种20瓶,每瓶1个外植体。30 d后统计结果。

结合预备试验,愈伤组织诱导以MS,改良MS,1/2 MS为基本培养基,添加的植物生长调节物质有NAA,6-BA,2,4-D。具体配方见表3:

表3 叶片愈伤组织诱导培养基处理组合

Table 3 Different medium treatment of callus culture

处理编号	基本培养基	植物生长调节物质 / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		
		Plant growth regulator		
No. of treatment	Base medium	NAA	2,4-D	6-BA
19	1/2 MS	0.5	0.5	0.2
20	改良 MS	0	0.5	0.5
21	1/2 MS	1	2	0
22	MS	2	1	0.2

2 结果与分析

2.1 植物生长调节物质对芍药茎尖诱导率的影响

在3种外源植物生长调节物质中, GA_3 对芍药诱导率影响最大,且与6-BA,NAA差异显著(表4)。随着 GA_3 浓度的增加,茎尖的诱导率也相应提高,而6-BA,NAA的浓度和诱导率,并没有明显的线性关系。Ti值越大,说明该种植物生长调节物质的诱导效果越好。因此, GA_3 取T3($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),6-BA取T2($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),NAA取T3($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)配合时可组成诱导率最高的培养基,即:1/2MS + GA_3 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 6-BA $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。但从实际结果看,8号培养基的平均诱导率最高,为75.46%,且组培苗叶片较大,叶色浓绿,苗株较高。

2.2 植物生长调节物质对芍药组织培养苗增殖系数的影响

将启动培养基中高度在2.5 cm以上的组培苗切割下转入增殖培养基。接种17 d后基部开始膨大,23 d后基部有不定芽发生,60 d后统计其增殖率(表5)。从表5可知,植物生长调节物质最优水平组合为6-BA $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + KT $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,这与实际结果配方13相符。各因素水平对增殖倍数的影响力大小依次为:6-BA > KT > NAA。浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的6-BA增殖效果极显著高于浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,说明高浓度的6-BA对组织培养苗的增殖有一定的负作用。对于KT来说, $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的效果较好,但二者没有显著性差异,NAA的3个浓度水平对芍药增殖率的影响有显著性差异,随浓度增加,增殖率显著降低。

表 4 不同植物生长调节物质对芍药茎尖诱导率的影响

Table 4 Effect of different plant growth regulators on the buds induction of *Paeonia lactiflora* Pall

处理编号 No. of treatment	植物生长调节物质/(mg · L ⁻¹) Plant growth regulator			诱导率/% Induction rate			
	GA ₃	6-BA	NAA	I	II	III	$\bar{x} \pm s$
1	1(0)	1(0.5)	1(0)	60.00	46.36	44.44	50.27 ± 2.97
2	1	2(1)	2(0.5)	38.57	33.33	36.36	36.09 ± 1.68
3	1	3(2)	3(1)	43.33	55.56	37.50	45.46 ± 9.05
4	2(0.5)	1	2	73.33	48.57	63.64	61.85 ± 8.23
5	2	2	3	60.00	75.00	63.63	66.21 ± 5.96
6	2	3	1	59.23	36.29	48.00	47.84 ± 6.72
7	3(1)	1	3	60.00	75.00	66.67	67.22 ± 4.66
8	3	2	1	79.23	85.71	71.43	78.79 ± 7.14
9	3	3	2	53.85	50.00	45.45	49.77 ± 2.56
T1	40.61	55.33	55.63				
T2	54.19	57.03*	44.79				
T3	61.93*	44.36	56.30*				
极差 R Range	<21.32>*	12.67	10.40				

注:表中*表示 Ti 的最大值;<>表示极差的最大值;*表示 0.05 显著水平; $\bar{x} \pm s$ (n=3);下同。

Note: * means the max of Ti; <> means the max of range; * means significance at 0.05 probability level; $\bar{x} \pm s$ (n=3); The same as below.

表 5 不同植物生长调节物质对芍药组培苗增殖系数的影响

Table 5 Effect of different plant growth regulators on the multiplication coefficient of in vitro shoots of *Paeonia lactiflora* Pall

处理编号 No. of treatment	植物生长调节物质/(mg · L ⁻¹) Plant growth regulator			增殖系数/% Multiplication coefficient			
	6-BA	NAA	KT	I	II	III	$\bar{x} \pm s$
10	1(0.5)	1(0)	1(0)	2.25	1.92	1.91	2.03 ± 0.19
11	1	2(0.5)	2(0.5)	2.71	2.17	1.25	2.04 ± 0.74
12	1	3(1)	3(1)	1.33	1.37	1.43	1.38 ± 0.05
13	2(1)	1	2	3.14	2.63	1.60	2.46 ± 0.78
14	2	2	3	1.88	1.86	1.60	1.78 ± 0.16
15	2	3	1	2.43	2.05	1.29	1.92 ± 0.58
16	3(2)	1	3	1.33	1.22	1.00	1.18 ± 0.17
17	3	2	1	1.85	1.74	1.33	1.64 ± 0.27
18	3	3	2	1.38	1.63	1.00	1.33 ± 0.32
T1	1.82 aA	1.89* aA	1.86 aAB				
T2	2.05* aA	1.82 abA	1.94* aA				
T3	1.39 bB	1.54bA	1.45 bB				
极差 R Range	<0.67>	0.34	0.50				

注:小写字母表示 0.05 差异显著水平,大写字母表示 0.01 差异显著水平。

Note: Significant difference at ($P < 0.05$) with different lowercase letter in the line; Significant difference at ($P < 0.01$) with different capital letter.

2.3 植物生长调节物质对叶片愈伤组织诱导率的影响

外植体接种 30 d 后,不同培养基上叶片愈伤诱导率、质地及生长情况存在明显差异(表 6)。21 号培养基的愈伤组织诱导率最低,仅 19.35%,且愈伤组织发生量少,呈黄白色,生长缓慢。19、20、22

号培养基上叶片愈伤组织的发生率均较高,分别为 66.67%,74.2%,78.13%。而 20 号培养基的愈伤组织生长情况又优于 19、22 号培养基。仅添加生长素类物质时,愈伤组织的诱导率较低,结合使用细胞分裂素时诱导率极显著提高。因此,叶片愈伤组织的诱导培养基选用 20 号培养基为宜。

表6 不同植物生长调节物质对叶片愈伤组织诱导率的影响
Table 6 Effect of different plant growth regulators on callus culture induction rate

处理编号 No. of treatment	诱导率/% Induction rate				愈伤组织质地, 颜色 Feature of callus	愈伤组织生长情况 Growth of callus
	I	II	III	$\bar{x} \pm s$		
19	63.70	66.67	73.40	(67.92 $\pm$ 4.97) bA	米黄色, 絮状	开始生长较快后期松软, 褐化
20	69.50	74.29	81.20	(75.00 $\pm$ 5.88) abA	翠绿色, 较紧实	开始生长慢后期快, 量多
21	20.40	19.35	18.70	(19.48 $\pm$ 0.86) cB	黄白色	生长较慢, 量少
22	80.10	78.13	77.40	(78.54 $\pm$ 1.40) aA	淡绿色, 紧实	前期较慢后期较快, 量较少

3 结论与讨论

1) GA_3 具有打破芽休眠的生理作用, 是影响芍药茎尖启动培养的主要因素, 在一定的浓度范围内随着 GA_3 浓度的提高, 启动率也相应增加。BOUZA L 等认为 BA 是维持和繁殖外植体的必需元素, 并且是唯一对牡丹叶和腋芽有效的细胞分裂素^[7]。因此, GA_3 与 6-BA 混合使用时芍药芽萌动快, 且利于芽的高生长。

2) 组培苗的增殖培养是进行快速繁殖的关键环节。试验发现, 具有细胞分裂活性的 6-BA 和 KT 都可以有效地诱导生长点的分化^[8], 且 6-BA 的影响力大于 KT。试验中观察到, 芍药组培苗的增殖方式有两种。一种是腋芽方式, 仅有少部分组培苗通过该方式增殖, 系数低, 究其原因, 可能与芍药在自然状态下不分枝或极少分枝的特性有关。另一种是通过基部膨大分化不定芽, 该方式增殖系数也较低, 而目前芍药也未见愈伤组织分化的报道。

3) 在基本培养基中, 附加生长素和细胞分裂素的比单一附加生长素的愈伤组织的诱导率高, 生长质量好, 这与欧李上的实验结果一致^[9]。芍药属植物组织培养途径多直接通过芽增生的方式进行扩繁^[10-12], 很少通过愈伤组织途径, 目前仅有牡丹愈伤组织的诱导和分化的报道^[13], 对于芍药的研究未见报道。何丽一等、于津等揭示出芍药甙 (paeoniflorin) 是芍药属植物中的特征性成分^[14-16], 因此其愈伤组织的诱导和分化是否与芍药甙的存在有关联还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 王莹, 胡宝忠. 芍药 (*Paeonia* L.) 生物学特性研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2004, 35(6): 759-763.
- [2] BRUKHIN V B, BATYGINA T B. Embryo culture and somatic embryogenesis in culture of *P. anomala* [J]. Phytomorphology, 1994, 44(3/4): 15-157.
- [3] KIM Y S, LEE B K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotyledon culture of *P. albiflora* [J]. Journal of the Korean Society for Horticultural Science, 1996, 37(6): 827-830.
- [4] KIM Y S, LEE B K. Effect of plant growth regulators and culture temperature on embryo culture of *P. albiflora* [J]. Journal of the Korean Society for Horticultural Science, 1995, 36(2): 255-262.
- [5] 金彪, 何小弟, 吴建华, 等. 芍药离体培养初步研究[J]. 江苏农业科学, 2005(4): 69-71.
- [6] HOSOKI T, ANDO M, KUBARA T, et al. In vitro propagation of herbaceous peony (*P. lactiflora* Pall.) by.
- [7] LYDIA BOUZA, MONIQUE JACQUES, EMILE MIGIN-IAC. In vitro propagation of *Paeonia suffruticosa* Andr. cv. 'Mme de Vatry': developmental effects of exogenous hormones during the multiplication phase [J]. Scientia Horticulturae, 1994, 57(3): 241-251.
- [8] 任凝辉, 王美平, 史宣杰, 等. 马铃薯茎尖组织培养及快速繁殖技术研究[J]. 河南农业大学学报, 2002, 36(3): 280-283.
- [9] 钱国珍, 苏福才, 牛文林, 欧李茎、叶愈伤组织的诱导及茎苗的再生[J]. 内蒙古农牧学院学报, 1994, 15(4): 8-14.
- [10] 张桂花, 王洪梅, 王连祥. 牡丹组织培养技术研究[J]. 山东农业科学, 2001(5): 16-18.
- [11] 陈怡平, 廉永善, 王勋陵. 紫斑牡丹休眠地下芽在组织培养条件下的发育研究[J]. 西北植物学报, 2003, 23(2): 314-317.
- [12] 孔祥生, 张妙霞. 牡丹离体快繁技术研究[J]. 北方园艺, 1998, 3(4): 87-89.
- [13] 李玉龙, 吴德玉, 潘淑龙, 等. 牡丹试管苗繁殖技术的研究[J]. 科学通报, 1984, (8): 500-502.
- [14] 何丽一, 冯瑞芝, 肖培根. 芍药甙在芍药属植物中的存在[J]. 药学学报, 1980, 15(7): 429.
- [15] 于津, 郎惠英, 肖培根. 芍药甙类和丹皮酚成分在芍药科植物中的存在[J]. 药理学, 1985, 20(3): 229-234.
- [16] 于津, 肖培根. 芍药科化学和系统学的初步研究[J]. 植物分类学报, 1987, 25(3): 172-179.

(责任编辑: 闫志平)