

应用侧芽平切刻伤方法建立牡丹植株再生体系

刘会超*, 贾文庆

(河南科技学院园林学院, 河南新乡 453003)

摘 要: 以牡丹品种‘乌龙捧胜’5~6年生苗中下部饱满的侧芽为外植体, 探讨了平切刻伤方法对侧芽诱导不定芽的影响, 并研究了侧芽消毒方法、不同植物生长调节剂对不定芽继代增殖与生根的影响。结果表明: 先用75%酒精消毒30 s, 再用0.1%升汞消毒7 min, 褐化率与污染率较低; 采用平切刻伤的侧芽不定芽诱导率显著提高, 诱导率为对照的2.6~4.8倍, 最高达96%; 不定芽增殖最佳的培养基为WPM+6-BA 3.0 mg·L⁻¹+IAA 0.2 mg·L⁻¹, 增殖率可达到787.05%; 生根最佳培养基为1/2改良MS+IBA 4.0 mg·L⁻¹+NAA 1.0 mg·L⁻¹, 生根率达81.33%, 移栽成活率为90%。

关键词: 牡丹; 平切刻伤; 不定芽; 增殖; 生根

中图分类号: S 685.11

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2010) 09-1471-06

Establishment of Plantlet Regeneration System of Tree Peony Through Lateral Buds Cutting and Carving

LIU Hui-chao* and JIA Wen-qing

(Landscape College, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003, China)

Abstract: Tree peony ‘Wulong Pengsheng’ s lateral buds were used as explants. It was the first time to study the effect of cutting lateral buds on the adventitious buds differentiation. The influence of plant growth regulation on the adventitious buds induction, the multiplication and rooting was also studied. The results were as followed (1) Disinfecting with 75% alcohol for 30 s, and then soaking with 0.1% corrosive sublimate for 7 min had good effect of disinfection (2) Compared with the control, the adventitious buds induction rate significantly increased through cutting, and the number of adventitious buds increased by 2.6–4.8 times, with the maximum reaching 96%; (3) The best medium for proliferation was WPM + 6-BA mg·L⁻¹ + IAA 0.2 mg·L⁻¹, with the proliferation of was 787.05%; (4) The rate of plantlets rooting was up to 81.33% on 1/2 WPM medium supplemented with NAA 1.0 mg·L⁻¹ and IBA 4.0 mg·L⁻¹. The plantlets were successfully transplanted to potting and the survival rate of transplanted plantlets was 90%.

Key words: tree peony; cutting; adventitious bud; proliferation; rooting

牡丹 (*Paeonia suffruticosa*) 传统的繁殖方式以嫁接为主, 存在周期长, 繁殖系数低等问题 (Barzilay et al., 2002)。利用组培快繁技术生产牡丹种苗, 具有速度快、苗木质量整齐的优点, 牡丹植株再生体系的研究也是利用转基因技术进行牡丹品种改良研究的基础 (谭文澄和戴策刚, 1997)。

收稿日期: 2010-03-16; 修回日期: 2010-08-03

基金项目: 河南省创新人才工程项目 (2005-126-49); 河南科技学院博士基金项目 (050106); 河南科技学院重点项目基金项目 (050121)

* E-mail: liuhc918@yahoo.com.cn

在成功培育牡丹组培苗的报道中,大多采用胚作为外植体 (Brukhin & Batygina, 1994; Beruto et al., 2004; 贾文庆和刘宇, 2006; 刘会超和贾文庆, 2008), 但由于大多数牡丹品种不产生种子或种子量很少 (王莲英, 1997), 同时胚的组培苗差异很大, 在生产中不能大量应用; 牡丹侧芽做外植体具有来源广, 取材方便、组织分化程度低等优点, 但是有不易彻底消毒、不定芽诱导率及增殖率低等问题 (Beruto et al., 2004)。作者所在实验室从 2005 年以来进行牡丹组织培养的研究, 2007 年发现侧芽平切刻伤可刺激侧芽产生不定芽。本试验中探讨了该方法对牡丹侧芽不定芽诱导的影响, 并对如何防止侧芽污染以及不同培养基对继代增殖及生根的影响进行了研究, 以期对牡丹组培快繁体系的建立提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试牡丹品种为‘乌龙捧胜’。选 5 ~ 6 年生苗中下部饱满的侧芽为试材, 于 2008 年 2 月 6 日在河南科技学院牡丹资源圃采取侧芽, 带回实验室后置于 4℃ 冰箱里保存待用。

用流水冲去侧芽鳞片上的浮土, 在含 0.5% 洗洁精的水中浸泡 20 min, 用毛刷刷去尘土, 再用流水冲洗 10 min, 用滤纸吸干水分, 用镊子剥去外部 1 ~ 2 层鳞片, 仅保留内层 1 ~ 2 层鳞片, 用 1% 多菌灵溶液浸泡 10 min 后待用。

1.2 处理方法

1.2.1 消毒处理

将侧芽用蒸馏水冲洗 3 次, 滤纸吸干后置于超净工作台上, 用 75% 酒精浸泡 30 s, 无菌水冲洗 3 次, 然后用 0.1% 升汞消毒 5、7 和 9 min, 即 3 个处理, 均用无菌水冲洗 6 次。每个处理接种 40 瓶, 每瓶 2 个侧芽。经 15 d 培养后, 统计 3 种消毒处理的污染率及幼苗生长状况。

1.2.2 侧芽平切与刻伤

采用上述所得最佳消毒方式对侧芽进行消毒, 之后分别在距侧芽基部 1/3 处 (处理 1)、1/2 处 (处理 2)、2/3 处 (处理 3) 平切 (图版, A、B、C) 和不平切 (处理 4), 并均在基部枝杈处刻伤; 以既不平切也不刻伤的作为对照。

将以上侧芽接种到预备试验得到的诱导不定芽最佳培养基 (WPM + 6-BA 2.5 mg · L⁻¹ + IAA 0.2 mg · L⁻¹) 上, 每处理接种 25 瓶, 每瓶接种 2 个侧芽。30 d 后观察统计不定芽诱导数及诱导率 (有效不定芽: 高度 0.5 cm)。

1.2.3 不定芽增殖培养

将不定芽切割成单芽接种到以改良 WPM (Razdan, 2006) 作为基本培养基、并附加不同浓度 6-BA 和 IAA 的增殖培养基 (表 3) 上, 每个处理重复 6 次。35 d 后统计增殖率。

增殖率 (%) = 不定芽的总数 (个) / 接种外植体总数 (个) × 100。

以上处理放置于温度为 (25 ± 1)℃, 光照时数 14 h · d⁻¹ (8:00—22:00), 光强 2 500 lx (光源为 FL40S, 植物组织培养用日光灯) 培养室中进行培养。

1.2.4 生根培养

以 1/2 改良 MS 作为基本培养基, 继代培养 40 d, 切取生长健壮、均匀一致、长度在 1.5 cm 以上的嫩梢, 接入各处理培养基中 (表 4), 每处理 20 瓶, 每瓶接种 1 个, 培养瓶下半部用黑纸包裹。接种后暗培养 3 d, 然后置于光强 2 000 ~ 2 500 lx, 光照时间 15 h · d⁻¹, 培养温度: 白天 (20 ± 1)℃

，晚上（ 16 ± 1 ） $^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度 $65\% \pm 5\%$ 的条件下培养，40 d 后统计生根条数和生根率（有效根长度 $>0.2\text{ cm}$ ）。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时间对侧芽污染率的影响

3 种处理侧芽污染率有明显差异（表 1），5 min 消毒处理污染率达 37.5%，少量最顶端的叶片略显褐色，7 min 和 9 min 消毒处理污染率均为 2.5%，但 9 min 处理时侧芽有严重褐化（26%），因此侧芽的消毒时间以 7 min 为宜。

2.2 侧芽平切刻伤对不定芽诱导的影响

接种 4 d 后，侧芽开始生长，颜色由接种时的褐绿色逐渐变为黄绿色，12 d 后肉眼观察到有不定芽产生，并伴有少量愈伤组织形成（图版，D），25 d 后不定芽逐渐长大，30 d 后统计 5 种处理对侧芽不定芽诱导率影响显著，不平切、不刻伤的对照不定芽诱导率仅为 20%，平均诱导数仅有 3.26 个，平切 1/2 和 1/3 的处理诱导率及诱导数量差异不显著，平切 2/3 的处理不定芽诱导率及平均诱导数均达到最高，分别达 96% 和 15.35 个，诱导数最高达 19.36 个，诱导率为对照的 4.71 倍（表 2），由此可见对侧芽实施平切刻伤，能显著提高不定芽的诱导率。

观察发现，侧芽基部刻伤的部位产生不定芽最多，占不定芽产生总数量的 45.75%（图版，E、H、J），其次是侧芽基部无刻伤部位，占 30.25%（图版，G）。分枝的枝杈处产生不定芽最少，占 17.25%（图版，F）。其余的不定芽在平切枝杈的内面产生，占 6.75%（图版，I）。

2.3 不同培养基对不定芽增殖的影响

将产生的丛生芽切割成单芽接种到不定芽增殖培养基上，15 d 后单芽基部产生的不定芽生长明显加速。总体来看产生不定芽有两种形式，一种在基部切割处产生愈伤组织并在其上长新芽，另一种是直接切割处长新芽。从表 3 看出，当 $6\text{-BA } 1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IAA } 0.1 \sim 0.8\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，新芽的高度高于其他处理，例如处理 A2： $6\text{-BA } 1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IAA } 0.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，超过 2 cm 的新芽占 30.21%，有的高达 5 cm。 6-BA 为 $3\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ， IAA 为 $0.1 \sim 0.8\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，不定芽的增殖率最高，在 650% ~ 787.5% 之间。观察还发现：接种 15 d，D3 处理的不定芽点形成数较 C2 处理增加 32%，但后期芽点逐渐死亡，当培养 35 d 时，D3 处理的不定芽增殖率是 287.10%，仅为 C2 处理的 36.46%。这表明 6-BA 浓度增加有利于不定芽的形成，但对不定芽生长有抑制作用，不利于有效不定芽的形成。综合来看，对于继代增殖用 C2 培养基比较好，即 $\text{WPM} + 6\text{-BA } 3.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IAA } 0.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ （图版，K）。

表 1 不同消毒时间对侧芽污染的影响

Table 1 Effects of different disinfection time on the bud contamination

处理时间/min Processing time	污染瓶数 Bottle numbers of pollution	污染率/% Pollution rate
5	15	37.5
7	1	2.5
9	1	2.5

表 2 不同处理方式对侧芽不定芽诱导的影响

Table 2 Effects of different treatments on adventitious bud induction of lateral buds

平切 Cutting	接种数 Induction number	每外植体不定芽 产生数 Number of buds per explant	诱导率/% Induction rate
2/3	50	$15.35 \pm 0.21\text{ aA}$	96
1/2	50	$11.25 \pm 1.01\text{ bB}$	90
1/3	50	$10.00 \pm 0.69\text{ bB}$	85
不平切	50	$4.53 \pm 0.54\text{ cC}$	53
No cutting 对照	50	$3.26 \pm 0.38\text{ dD}$	20
Control			

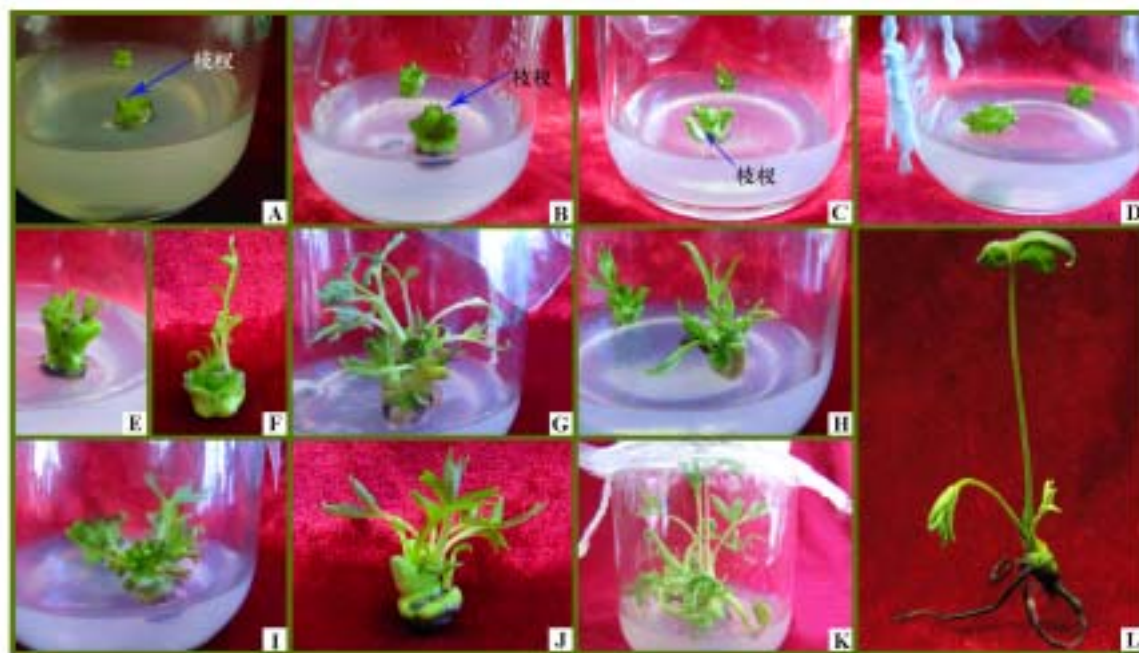
注：不同大小写字母表示在 0.01 和 0.05 水平上差异显著。

Note: The data with different capital and small letters indicate significant difference at 0.01 and 0.05 level.

表 3 不同培养基对不定芽增殖的影响

Table 3 Effects of different medium on multiplication of adventitious buds

编号 No.	6-BA/ (mg · L ⁻¹)	IAA/ (mg · L ⁻¹)	接种数 Number of inoculated shoot	新芽数 Number of sprout	增殖率/% Multiplication rate	生长状况 Growth status	2 cm 新芽率/% Percentage of sprout (2 cm)
A1	1	0.1	34	95	279.41	+	32.12 ± 1.20
A2	1	0.2	52	102	196.15	++	30.21 ± 0.50
A3	1	0.4	36	98	272.22	+	35.50 ± 0.28
A4	1	0.8	32	89	278.13	++	30.58 ± 0.85
B1	2	0.1	38	126	331.58	++	20.20 ± 0.55
B2	2	0.2	40	119	297.50	++	18.31 ± 0.65
B3	2	0.4	38	136	357.89	++	19.54 ± 0.45
B4	2	0.8	35	140	400.00	++	20.31 ± 0.52
C1	3	0.1	32	210	656.25	+++	10.52 ± 0.58
C2	3	0.2	32	218	787.50	+++	9.55 ± 0.34
C3	3	0.4	35	235	671.43	++	9.20 ± 0.15
C4	3	0.8	34	221	650.00	++	8.54 ± 0.48
D1	4	0.1	36	102	283.33	+	4.50 ± 0.72
D2	4	0.3	40	95	237.50	-	3.95 ± 0.54
D3	4	0.5	31	89	287.10	-	4.25 ± 0.80
D4	4	0.5	35	100	285.71	+	5.00 ± 0.56



图版说明：A. 保留 1/3 平切侧芽；B. 保留 1/2 平切侧芽；C. 保留 2/3 平切侧芽；D. 侧芽培养 12 d 后不定芽点产生，并在基部伴有少量愈伤组织；E. 侧芽培养 15 d 不定芽从基部刻伤部位发生；F. 保留 1/3 平切侧芽不定芽发生部位；G. 不定芽从刻伤处产生；H ~ J. 保留 1/3 平切侧芽产生的不定芽；K. 不定芽继代增殖；L. 生根。

Explanation of plates : A : Preserving 1/3 and cutting ; B : Preserving 1/2 and cutting ; C : Preserving 2/3 and cutting ; D : Adventitious bud was appeared after 12 days culture accompanied by small callus ; E : Adventitious bud was appeared after 12 days culture from basal cutting position ; F : The happening part of adventitious bud of preserving 1/3 bud ; G : Adventitious bud was appeared from cutting position ; H ~ J : Adventitious buds from preserving 1/3 bud ; K : Multiplication of adventitious buds ; L : Rooting.

2.4 生长调节剂对不定根诱导的影响

从表 4 可以看出，不同的生长素组合对新梢生根有显著影响，生根最佳的培养基组合为 1/2 改良 MS + IBA 4.0 mg · L⁻¹ + NAA 1.0 mg · L⁻¹，生根率达 81.33%，平均生根数达 4.5 条（图版，L）。

将诱导生根 50 d 左右的生根苗转入温室，强光照（18 000 ~ 35 000 lx）闭瓶锻炼 2 周，开瓶锻炼 4 ~ 6 d 后，取出试管苗移栽。移栽基质选用泥炭土与蛭石按 1:1 比例混合，栽后喷 0.1% 多菌灵防病并搭小拱棚保湿，一周后逐渐放风，直至去掉小拱棚。60 d 后调查，移栽成活率达 90%。

表 4 生长调节剂对不定根诱导的影响

Table 4 Effects of plant growth regulators on the adventitious root induction

IBA/ (mg · L ⁻¹)	NAA/ (mg · L ⁻¹)	生根数 Number of roots	生根率/% Rooting rate
2.0	1.0	3.25±0.50 C	65.87±0.25 C
3.0	1.0	2.75±0.25 D	70.24±0.25 B
4.0	1.0	4.50±0.50 A	81.33±0.50 A
5.0	1.0	3.25±0.75 C	68.21±0.75 C
2.0	2.0	2.25±0.25 E	56.32±0.25 D
2.0	3.0	3.50±0.50 B	58.61±0.50 D

注：不同大小写字母表示在 0.01 和 0.05 水平上差异显著。

Note: The data with different capital and small letters indicate significant difference at 0.01 and 0.05 level.

3 讨论

本试验中采用的侧芽平切刻伤方法，与之前不对侧芽进行平切刻伤的试验（贾文庆和刘会超，2009）相比，不定芽诱导率大幅提高。本试验中，平切刻伤处理诱导率为对照的 2.6 ~ 4.8 倍，其中处理 1 最高达 96%，而且不平切仅刻伤的芽其诱导率明显低于平切加上刻伤处理。分析原因可能是，芽是一个缩短的枝条，平切去掉一定高度分枝，使留下的部分营养更集中，为留下部分不定芽的分化提供了更充足的物质基础，侧芽基部枝杈处刻伤也可能刺激了分生组织的细胞，使细胞具有脱分化的可能，从而诱导了不定芽的分化。试验中发现产生不定芽最多的为侧芽基部刻伤的部位，占不定芽产生总数量的 45.75%，平切刻伤提高不定芽分化机理，还要从形态解剖、生理生化等方面进行进一步研究。

6-BA 有助于细胞分裂，继而影响器官的分化（Albers & Kunneman, 1992; Bouza et al., 1994），因此适当浓度的 6-BA 对于芽的增殖是必须的，单独使用 6-BA，增殖率很低，只有与适当的 IAA 配合使用，才有利于牡丹侧芽不定芽增殖（Linsmaier & Skoog, 1965; Gildow & Mitchell, 1977），本试验中，在 C2 培养基中，IAA:6-BA 接近于 0.2:3.0，增殖系数达最高，达到 787.50%，这个比例可能是牡丹不定芽增殖培养基中生长素和细胞分裂素的佳比例。前人在对牡丹的研究中也有类似的报道（Bouza et al., 1994; Wang & van Staden, 2001）。

牡丹生根一直是侧芽组织培养中的难题（Bouza et al., 1994; Wang & van Staden, 2001）。本试验中采用 1/2 改良 MS 培养基作为基本培养基，IBA 4.0 mg · L⁻¹ + NAA 1.0 mg · L⁻¹ 的植物生长调节剂组合来诱导不定根，生根率达 81.33%，生根数达 4.5 个，效果较好。

References

- Albers M R J, Kunneman B P A M. 1992. Micropropagation of *Paeonia*. Acta Hort, 314: 85–92.
- Barzilay A, Zemah H, Kamenetsky R. 2002. Annual life cycle and floral development of 'Sarah Bernhardt' peony in Israel. HortSci, 37: 300–303.
- Beruto M, Lanteri L, Portogallo C. 2004. Micropropagation of tree peony (*Paeonia suffruticosa*). Plant Cell Tiss Org Cult, 79: 249–245.
- Bouza L, Jacques M, Miginiac E. 1994. Requirements for *in vitro* rooting of *Paeonia suffruticosa* Andr. cv 'Mme de Vetry'. Sci Horticult, 58 (3): 223–233.

- Brukhin V B, Batygina T B. 1994. Embryo culture and somatic embryogeneses in culture of *Paeonia anomala*. *Phytomorphology*, 44 (34): 151 – 157.
- Gildow F E, Mitchell J P. 1977. Initiation, growth, and nuclear characteristics of tissue cultures of *Paeonia suffruticosa*. *Physiol Plant*, 58: 790 – 795.
- Jia Wen-qing, Liu Yu. 2006. Tissue culture of peony embryo. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 34 (24): 6441 – 6444. (in Chinese)
- 贾文庆, 刘 宇. 2006. 牡丹种胚离体培养的研究. *安徽农业科学*, 34 (24): 6441 – 6444.
- Jia Wen-qing, Liu Hui-chao. 2009. Preliminary study on culture *in vitro* of scaly bud of peony. *Journal of Henan Institute of Science and Technology*, (1): 12 – 14. (in Chinese)
- 贾文庆, 刘会超. 2009. 牡丹鳞芽离体培养的初步研究. *河南科技学院学报*, (1): 12 – 14.
- Linsmaier E M, Skoog F. 1965. Callus and cell suspension cultures of bush bean, *Phaseolus vulgaris*. *Can J Bot*, 18: 100 – 127.
- Liu Hui-chao, Jia Wen-qing. 2008. Adventitious bud inducing and rooting of dwarf peony cotyledon. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, (6): 436 – 437. (in Chinese)
- 刘会超, 贾文庆. 2008. 矮牡丹子叶不定芽诱导和生根研究. *江苏农业学报*, (6): 436 – 437.
- Razdan M K. 2006. An introduction to plant tissue culture. Beijing: Chemical Industry Press: 87 – 89. (in Chinese)
- 拉兹丹 M K. 2006. 植物组织培养导论. 北京: 化学工业出版社: 87 – 89.
- Tan Wen-deng, Dai Ce-gang. 1997. Ornamental plant tissue culture technology. Beijing: China Forestry Publishing House: 278. (in Chinese)
- 谭文澄, 戴策刚. 1997. 观赏植物组织培养技术. 中国林业出版社: 278.
- Wang H, van Staden. 2001. Establishment of *in vitro* cultures of tree peonies. *South African J Bot*, 67: 358 – 361.
- Wang Lian-ying. 1997. Chinese peony varieties pictorial. Beijing: China Forestry Publishing House: 24 – 27. (in Chinese)
- 王莲英. 1997. 中国牡丹品种图志. 北京: 中国林业出版社: 24 – 27.

欢迎订阅 2011 年《草业科学》

《草业科学》由中国草学会和兰州大学草地农业科技学院共同主办,为“中文核心期刊”、“中国科技核心期刊”和“中国农业核心期刊”,是《中国核心期刊(遴选)数据库》、中国科学期刊文献数据库、英国 CABI、《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》、中国科技期刊数据库、中文电子期刊服务(CEPS)数据库的固定源期刊,相继获得“全国畜牧兽医优秀期刊一等奖”、“全国优秀农业期刊二等奖”和“甘肃省优秀科技期刊奖”等,2009 年版科技部中国科技信息所《中国科技期刊引证报告》统计总被引频次和影响因子分别上升为 2 061 和 1.085,分别在全国畜牧、兽医科学类期刊中排名第 1 位和第 2 位。

《草业科学》以试验性论文、综述和专论等形式及时报道国内外草业科学及其相关领域,如畜牧学、作物学、园艺学等领域的创新性理论研究、学科前沿动态、技术开发、成果示范推广等。读者对象为从事草业科研、教学、生产和管理的专家、学者、院校师生以及相关领域的科技人员等,发行范围覆盖农业科研机构、农业推广单位、高等农业院校、综合性大学实验室及国家、省、部级实验室等。

《草业科学》为月刊,大 16 开本,国内外公开发行,邮发代号 54-51,每期定价 12 元,全年 144 元。全国各地邮局均可订阅,也可直接与编辑部联系订阅。

标准刊号:ISSN 1001-0629;CN62-1069/S;邮发代号:54-51;地址:兰州市 61 号信箱《草业科学》编辑部;邮编:730020;电话:0931-4865889;传真:0931-4865889

E-mail:cykx@lzu.edu.cn;主页:http://cykx.lzu.edu.cn