

牡丹试管苗生根与移栽技术研究进展

张倩, 王华芳*

(北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要: 牡丹组织培养从 1984 年报道至今, 试管苗生根率低和小植株移栽成活率低的问题还没有得到很好的解决, 还不能用于苗木生产和生物育种。根据植物组织培养程序综述了牡丹试管苗生根和移栽研究进展, 分析影响试管苗生根的主要因素, 阐述诱导生根的有效方法; 分析小植株移栽成活的影响因素, 总结提高移栽成活率的关键技术和方法, 为组织培养技术用于牡丹科学研究、细胞与分子育种和种苗生产提供参考。

关键词: 牡丹; 离体; 组织培养; 生根; 移栽驯化

中图分类号: S 685.11

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 09-1819-10

In vitro Shoot Rooting and Plantlet Transplanting of Tree Peonies

ZHANG Qian and WANG Hua-fang*

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

Abstract: *In vitro* culture techniques of tree peonies have yet been used in micropropagation, somaclonal and gene engineering breeding since first paper see in 1984. The challenges are still the low rate of shoot rooting and survive of plantlet transplanting and acclimatization. In this paper, review the two of five major stages *in vitro* culture of the tree peonies accordance with plant tissue culture practical. Focus on the impacts of shoot rooting *in vitro* and the survive factors in transplanting and acclimatization, reveal the effective ways and methods to increase rooting and transplanting efficiency. Discussed histological, physiological, biochemical and molecular aspects to resolve the problems in the tree peony tissue culture.

Key words: *Paeonia suffruticosa*; *in vitro*; tissue culture; shoot rooting; transplanting and acclimatization

牡丹 (*Paeonia suffruticosa* Andr.) 属于芍药科芍药属落叶灌木, 作为花卉栽培至今已有约 1600 年的历史 (李嘉珏 等, 2011), 园艺化品种已有 1000 多个。观赏牡丹的繁殖方法主要是无性繁殖, 多采用嫁接和分株法 (习惯上称之为常规繁殖方法), 其特点是操作简单易行, 成活率高; 主要问题是成苗周期长, 繁殖材料短缺, 繁殖效率低, 质量参差不齐, 难以满足市场需求 (陈有民, 1981; 刘淑敏 等, 1987; 郭绍霞 等, 2003)。植物组织培养具有微型繁殖周期短, 繁殖系数高等优点, 已是公认的植物快速繁殖的有效途径 (曹孜义和刘国民, 1996)。牡丹组织培养 1984 年开始有报道 (李玉龙 等, 1984), 之后国内外相继探索, Beruto 和 Curir (2007) 对完整的牡丹组织培养程序和步骤做了总结。有的实验室已获得移栽成活并开花的凤丹 (*Paeonia ostii* var. *lishizhenii* B. A. Shen)

收稿日期: 2012-05-17; 修回日期: 2012-07-23

基金项目: 国家林业局林业科学技术重点推广项目 ([2006]78 号)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: hfwang@bjfu.edu.cn)

组织培养植株（徐桂娟，2002），但牡丹组织培养用于规模化生产，仍然存在品种、技术、条件等诸多因素限制，还未见成功报道。试管苗转变为容器苗或田间栽培植株的成活率太低，已成为牡丹组织培养技术实用化的主要障碍。

本文中从植物组织培养的基本程序入手，分析影响试管苗生根的主要因素，阐述诱导生根的有效方法；分析小植株移栽成活的影响因素，揭示提高移栽成活率的关键技术和方法，为牡丹组织培养用于细胞与分子育种和种苗生产提供参考。

1 牡丹试管苗生根的方法及其影响因素

1.1 牡丹试管苗的生根方法

植物不定根发生包括根原基的发生和生长两个基本过程，前者需要生长素类物质诱导，后者需要适当的环境条件，如温度、水分、通气、养分等（王华芳 等，1987）。牡丹试管苗的生根，有试管内和试管外等方法，但几乎毫无例外地使用植物生长调节剂生长素类物质诱导。

1.1.1 试管内生根

牡丹试管苗生根形成小植株的过程在试管内进行。不定根发生需要生长素类物质诱导。吲哚丁酸（IBA）诱导生根最有效。其使用方法主要有以下 3 种：（1）IBA 持续诱导生根法：试管苗在含有 IBA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的琼脂培养基（生根诱导培养基）上持续培养，诱导不定根发生（Harris & Mantell, 1991）；（2）IBA - 活性炭（IBA - AC）诱导生根法：试管苗先在含 IBA 的培养基上培养一段时间以诱导根原基的发生，再转移到含 AC 的培养基上持续培养以促进根原基生长；（3）IBA 速蘸 - AC 诱导生根法：将牡丹试管苗基部浸入 IBA 溶液中一定时间，转接到含 AC 的培养基上持续培养。IBA - AC 法的生根率高，是最有效的生根方法（Bouza et al., 1994b; 张红晓和经剑颖，2003）。

‘菱花湛露’在 IBA $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 AC 0.1% 的培养基上，生根率达 47.9%（孟清秀 等，2011），与 Beruto 和 Curir（2007）所述的生根率相当。牡丹试管苗试管内生根困难，且小植株移栽成活率低，甚至全部死亡，研究不定根发生的影响因素，揭示和调控其生根的两个基本过程的关键环节，以期获得突破。

1.1.2 试管外生根

试管外生根，即试管苗作为微型插穗直接扦插于无菌基质上生根形成小植株的方法。试管苗不在琼脂等半透明半凝固的培养基上生根，不需要融溶琼脂取出小植株根系再移植到基质中，简化了育苗工艺（徐振华 等，2002），免去了移栽过程对根系的伤害，提高了成活率。近年来，试管外生根技术已用于不少植物的小植株产业化生产（沈海龙，2009）。牡丹试管外生根的初步研究表明，其成活率高于试管内生根（张倩，2012），但相关技术还需要进一步完善。试管外生根基质不具有半透明特性，观察不定根发生和统计生根率可凭经验根据茎尖生长状况加以判别。

1.1.3 可借鉴的其他方法

滤纸桥技术用于杨树、花椒、大岩桐、樱桃砧木等经济林果花卉的试管苗生根，生根率和移栽成活率都有所提高（孙仲序 等，2002）。试管苗基部蘸适当浓度的生长素，仔细插入滤纸桥中，置入装有适当营养液的容器内培养，获得最佳的气、液和营养比例。在操作过程中，可随时根据试管苗生长情况及时调整光强、温度和湿度，以获得最佳的生根和生长条件。牡丹试管苗的同类研究未见报道，鉴于该方法在理论上的可行性，值得借鉴和尝试。

水培是无土栽培的一种方式，以水为介质，插穗一部分栽培在盛有营养液的容器中，从溶液中

获得营养和水分, 从空气介质中获得氧气, 以达到最佳水、气、营养比例, 有利于不定根的形成和生长(王华芳 等, 1997)。水培用于花卉养殖比较广泛, 而用于牡丹试管苗生根还少见报道, 鉴于该方法用于研究不定根发生的营养、温度、湿度、pH 值等较为方便, 不失为一种考虑。

1.2 影响牡丹试管苗生根的主要因素

1.2.1 品种及外植体类型

牡丹品种和基因型差异对不定根分化有重要影响, 品种不同导致其试管苗生根难易明显不同。安佰义(2005)的研究表明, 60 个牡丹品种间的扩繁能力取决于基因型。‘洛阳红’试管苗生根率达 70% (王燕霞 等, 2008); ‘大胡红’高达 100% (李志军 等, 2006), 但‘乌龙捧盛’仅为 33.3% (贺丹, 2009), ‘明星’为 67% (霍锦茹, 2010), ‘菱花湛露’为 47.9% (孟清秀 等, 2011)。目前牡丹栽培品种有 1 000 多个, 从中筛选容易分化不定根的品种用于组织培养, 比较容易提高试管苗的生根率。

从同一植株的不同部位采集外植体培养的试管苗, 生根率也不同。李玉龙等(1984)分别用牡丹的腋芽、嫩叶和叶柄作外植体, 培养出了大量的丛生芽并诱导生根形成小植株, 已移栽成功。叶片是高度分化的组织, 可以诱导形成愈伤组织(Wang & van Standen, 2001), 用源于幼叶、叶柄、子叶的愈伤组织, 只有子叶愈伤组织分化出不定芽(安佰义, 2005)。凤丹种子成熟胚诱导的愈伤组织可产生不定胚(王华芳, 1999, 资料未发表; 朱向涛, 2010)和不定芽, 不定芽生根率可达 22% (朱向涛, 2010)和 80% (张子学 等, 2004)。

1.2.2 培养基类型

牡丹试管苗生根的基本培养基主要有: MS (Harris & Mantell, 1991)、1/2MS、改良 WPM (Bouza et al., 1994a; Wang & van Standen, 2001; Beruto et al., 2004)、改良 1/2WPM (王永伟, 2008; 孟清秀 等, 2011) 等。MS、WPM、White、B5 等 4 种基本培养基上的生根率高低依次为 WPM、MS、White、B5, WPM 或 1/2WPM 的生根率最高(Beruto et al., 2004; 王永伟, 2008; 刘会超和贾文庆, 2010a)。凤丹试管苗生根基本培养基为改良 WPM (徐桂娟, 2002), ‘乌龙捧盛’、‘菱花湛露’为 1/2WPM (王永伟, 2008; 孟清秀 等, 2011)。改良 WPM 主要是将 Ca^{2+} 浓度增加一倍(Wang & van Standen, 2001), Beruto 和 Curir (2007) 所述的 WPMP 配方, 大量元素为 WPM, 微量元素为 MS, 有机添加物为肌醇 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 盐酸 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 盐酸吡哆醇 (VB_6) $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 盐酸硫胺素 (VB_1) $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 柠檬酸 $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 抗坏血酸 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; Ca 化合物的添加在起始阶段为 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $441 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 扩繁和生根阶段为一水葡萄糖酸钙(calcium gluconate monohydrate) $1\,342.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该配方考虑到养分、抑制褐化等问题, 有较强的针对性, 但鉴于牡丹品种丰富和培养基成分复杂, 对不同品种和外植体, 有必要系统、综合地分析培养基成分对试管苗生根的影响, 从而获得最佳基本配方。

1.2.3 植物生长调节剂

牡丹试管苗无论试管内还是试管外生根, 适量使用生长素类物质可以诱导根原基发生, 并促进不定根生长。常用的生长素类物质主要有 IBA、NAA、IAA 等, 其中 IBA 使用最多。李玉龙等(1984)认为牡丹试管苗生根的生长素种类是专一的, IAA 或 NAA 均不能诱导生根, 因为这两种生长素类物质使试管苗基部愈伤化, 而 IBA 则能诱导生根, 形成良好根系, 且生根率较高。也有人分别用 IAA、IBA、NAA 诱导均未获得生根苗(张桂花 等, 2001)。植物生长调节剂主要用于诱导根原基的发生, 对已形成根原基(即先成根原基)的材料, 提供适当环境条件便可促成其根原基生长, 形成不定根。对凤丹试管苗进行组织解剖观察没有见到先成根原基; 采用两步生根法, 试管苗在附加 IBA 的培养

基上暗培养 20 d, 转移到附加 AC 的改良 WPM 上持续培养, 生根率高于 75% (徐桂娟, 2002)。该方法在根原基诱导阶段, 黑暗和低温 (2 °C) 组合处理更有效 (Beruto & Curir, 2007)。这种方式符合植物不定根发生的两个基本过程, 有针对性地使用植物生长调节剂诱导根原基将达到事半功倍的效果。

牡丹丛生芽内的生长素和细胞分裂素水平调控着根和芽的分化, 形态学下端的 IAA 水平升高或 BA 水平下降都有利于不定根发生 (曾端香 等, 2000)。外源细胞分裂素 BA 等用于试管苗的起始和增殖培养阶段, 在生根阶段则应使用生长素类物质 IBA 1 ~ 10 mg · L⁻¹ (Beruto & Curir, 2007), 而 ‘明星’ 试管苗使用 IBA 20 mg · L⁻¹ 更有效 (张倩, 2012)。

1.2.4 试管苗质量

试管苗经过壮苗和炼苗 (过渡) 阶段后, 变得健壮、整齐, 生根形成的小植株数量和质量也相应提高。在壮苗培养基中降低细胞分裂素浓度 (尹伟伦和王华芳, 2009) 或不加入, 试管苗在附加 AC 但不含植物生长调节剂的培养基上培养, 褐化也可得到缓解。

1.2.5 碳源

蔗糖是牡丹试管苗生根所需的碳源, 其浓度影响试管苗生根率、生根数及根长。生根过程中生长素对维管束组织分化的作用主要依赖于蔗糖的存在。20 g · L⁻¹ 蔗糖对凤丹 (徐桂娟, 2002) 和 ‘乌龙捧盛’ (陈笑蕾, 2005), 10 ~ 20 g · L⁻¹ 蔗糖对 ‘金阁’ (王军娥, 2008) 的生根率最高。碳源对大多数牡丹不定根发生有影响, 其浓度随品种不同有差异, 因此在实践中需要针对具体品种进行碳源种类和浓度的优化。

1.2.6 活性炭

在培养基中添加活性炭 (AC) 主要有两方面的作用, 即形成黑暗环境和吸附作用。活性炭吸附增殖阶段进入植株体内的植物生长调节剂残留、植株分泌物及其他物质, 降低盐基离子浓度, 减少褐变, 促进不定根的发生和伸长, 同时也会导致植株生长减弱 (Pan & van Staden, 1998; Thomas, 2008)。Pan 和 van Staden (1999) 还分析了活性炭浸出液成分对不定根发生的影响, 认为 AC 的作用相当复杂。牡丹根部合成的根皮苷等多酚类物质释放到培养基中, 见光后容易被氧化成醌类物质, 导致培养基褐化; 在培养基中加入适量 AC 吸附褐变物质, 有益于不定根的发生和生长, 改善生根质量。加入 AC 0 ~ 2.0 mg · L⁻¹, 不定根数量从 1.43 条增加到 4.54 条, 根颜色由黑褐色变为白色 (李艳敏, 2004)。AC 的用量以有效吸附但不显著影响生长为宜, 品种不同其用量有差异, ‘Old Pink’ 用 0.3% AC (Beruto et al., 2004), 而 ‘明星’ 则用 0.5 g · L⁻¹ AC 为宜 (张倩, 2012)。

1.2.7 多胺

有研究表明, 多胺对牡丹试管苗生根有影响, 分别以腐胺、精胺和亚精胺进行试验, 腐胺 1 mg · L⁻¹ 诱导 ‘正午’ 30 d, 生根率最高, 达 80.56%, 平均根数达 4.35 条 (张颖星, 2008; 邱金梅, 2010)。

1.2.8 环境温度

试管苗生长的环境条件是指试管内或培养瓶内的光照强度、温度、水分、气体交换、营养成分等。试管内的湿度一般能达到饱和, 通常不用考虑。适宜的温度是获得优质试管苗, 提高生根率的重要条件。试管内温度的测定和控制比较困难, 但根据试管内温度与培养室温度正相关关系, 可通过调节室温的方法间接控制试管内温度。牡丹试管苗在室温 10 ~ 25 °C 无玻璃化, 26 °C 以上随温度升高玻璃化严重 (储成才和李大卫, 1992)。不定芽生长的适宜温度为 18 ~ 25 °C (霍锦茹, 2010), 而不定根发生则在 10 ~ 15 °C 为宜, 甚至有的品种需要用更低的温度 (2 ~ 4 °C) 处理一段时间 (徐桂娟, 2002; Beruto & Curir, 2007), 如 ‘太平红’ (*P. suffruticosa* ‘Taipinghong’) 8 °C

暗期处理 3 d, 生根率达 90% (徐盼盼, 2011)。一般的培养室温度在 $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ 范围内, 这对牡丹不定芽生长合适而对不定根发生则偏高。温度控制是耗能的过程, 生产中为降低成本而采用不定芽和不定根分阶段、分季节等方式进行。

2 炼苗移栽及其影响因素

2.1 小植株炼苗移栽

炼苗移栽一般是指生根试管苗(小植株)进入从炼苗(过渡)到田间环境驯化的阶段。小植株通过炼苗, 完成从异养到自养的转变, 适应自然环境而独立生存。

炼苗移栽也是牡丹组织培养成败的关键环节。有报道, 将小植株根系从半凝固的琼脂中取出并移植到营养钵的蛭石(李玉龙 等, 1984)、泥炭和珍珠岩的混合基质(Harris & Mantel, 1991; Bouza et al., 1994b; Beruto & Curir, 2007)中, 移栽过程伤害了根系, 环境条件也发生剧变, 尽管精心养护, 移栽的小植株成活率也不高, 甚至全部死亡。

Beruto 和 Curir (2007) 采用两步法移栽: 第一步, 在培养瓶中装入研磨的(milled)草炭和珍珠岩混合基质(体积比, 1:1), 经 121°C , 1.01 mPa 灭菌 40 min, 每 200 mL 基质中加入 30~40 mL 灭菌的去离子水润湿, 小心植入生根小植株, 拧上盖并裹上塑料膜, 在组织培养室中培养 4 周, 在此期间注意避免试管内的水汽积累, 加强气体交换。第二步, 在花盆(直径 10 cm)中装入复合基质, 复合基质含研磨草炭 80%, 浮石(pumice) 15%, 膨润土(bentonite) 2%, 缓释肥 3%, 将小植株植入花盆复合基质中, 浇透水, 覆盖塑料膜, 在不加温的温室内养护 2 周, 在此期间浇水避免旱涝。这种移栽方式, 成活率达到 $80\% \pm 10\%$ (Beruto, 2004)。该移栽程序比较繁琐, 但符合小植株适应环境的生理生化和组织结构变化的渐进过程, 容易调控关键影响因素从而提高成活率。

2.2 根系发育对移栽成活的影响

小植株不定根与茎维管束之间的连续性直接影响地上和地下器官的水分和养分运输, 是影响小植株成活的内部原因。不定芽和不定根均可从愈伤组织发生, 于是人们考虑到根和茎维管束之间可能存在愈伤组织隔离。组织解剖表明, 凤丹根原基起源于茎的形成层附近, 根和茎的维管束系统连续且尚未发现愈伤组织隔离现象(徐桂娟, 2002; 徐盼盼, 2011)。但是, 牡丹根系为肉质根, 脆且易断, 在琼脂培养基中形成的根系, 在置于 40°C 左右温水中融溶琼脂使之分离和清洗等过程中容易折断, 根毛容易脱落; 移栽到基质的过程中根系也容易折断、脱落、窝根, 根毛全部脱落, 影响成活率。

为降低上述移栽风险, 本实验室提出无菌容器育苗法, 即生根、移栽一步法, 在特制的微型容器内填装栽培基质, 置入培养瓶内, 加入液体培养基, 灭菌, 接种, 培养使之形成微型容器苗, 炼苗后不经过移栽过程直接进入驯化阶段。不定根得到有效保护, ‘明星’小植株成活率至少比试管内生根的高 15% (张倩, 2012)。

小植株长势也影响移栽成活率。小植株健壮, 根系发达, 移栽成活率亦高, 新生根长 1.5~2.0 cm, 根尖嫩白, 在瓶内未转圈之前移栽比较合适(刘青林 等, 2003)。

2.3 生根休眠对移栽成活的影响

Bouza 等(1992)发现牡丹试管苗在生根诱导过程中, IBA 的使用诱发顶芽 ABA 的积累, 顶芽的有丝分裂活性降低而发生休眠现象。这种现象使小植株弱小且生长缓慢, 显著影响移栽成活率。

在炼苗之前有必要解除休眠。小植株置于 4℃下, 凤丹 45~60 d (徐桂娟, 2002), ‘正午’ 30 d (邱金梅, 2010), 顶芽休眠被打破, 细胞分裂旺盛, 植株继续生长。但也有人认为, 生根休眠与自然界的芽休眠不同, 不能通过低温解除 (李艳敏和罗晓芳, 2004)。‘Mme de Vatry’ 试管苗低温处理有限激活了顶端细胞分裂, 茎中的 ABA 减少, 根中的生长素和细胞分裂素增加, 到植株生长 1~2 片叶便停止, 而茎伸长不明显, 体内生长素和细胞分裂素迅速下降而 ABA 重新积累, 长时间离体培养使激素代谢失调, 并延续至移栽后的植株 (Bouza et al., 1994c), ‘锦袍红’ 经 4℃低温和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 赤霉素处理, 均能有效打破休眠 (张颖星, 2008)。尽管生根休眠的机制还不十分清楚, 低温解除休眠则是一种简单易行的方法。

2.4 炼苗季节和时间对移栽成活的影响

在春季和秋季炼苗天气凉爽, 昼夜温差较大有利于移栽苗生长 (张龙勃, 1989); 凤丹秋季移栽成活率达 71.43% (徐桂娟, 2002); ‘金阁’ 炼苗时间分别为 4、8、12、16 d, 移栽成活率分别为 10%、20%、30%、20% (王军娥, 2008), 尽管成活率还比较低, 但已提供了炼苗时间影响成活率的直接证据。炼苗过程通常是在荫棚或温室内逐步增加光照和适当通风透气, 逐渐打开试管或瓶盖使之与外界温度、湿度平衡, 创造一个过渡环境, 使试管内环境条件逐渐与室外一致, 是提高小植株成活率的重要条件。

2.5 移栽基质对小植株成活率的影响

牡丹小植株移栽的基质主要是复合基质, 以草炭、蛭石、珍珠岩等复配而成, 疏松透气、保水保肥和保温, 适合小植株肉质根生长。凤丹小植株用蛭石和珍珠岩 (1:2) 为基质, 移栽成活率最高, 而用松针土为基质, 因上层容易干, 下层容易涝导致烂根, 移栽成活率较低 (徐桂娟, 2002)。Beruto 和 Curir (2007) 所述的 17 个牡丹品种, 在泥炭和珍珠岩 (1:1) 基质上的成活率最高。泥炭珍珠岩组成的混合基质, 疏松透气, 在组织培养瓶内湿度饱和的情况下是合适的, 但在我国北方天气比较干燥的条件下, 适当增加基质的保水性更有利于提高移栽成活率。

环境条件对移栽成活率影响的系统分析比较少见。孔祥生和张妙霞 (1998) 报道, 在 15~20℃条件下, ‘洛阳红’ 和 ‘姚黄’ 等品种的小植株分别移栽至蛭石和腐殖土里, 以 1/4MS 无机盐营养液浇灌, 成活率分别为 36% 和 48%。植株移栽后的养护管理, 包括水分平衡, 空气温度和湿度控制, 防止菌类滋生等措施的报道多数为定性描述, 而真正提供试验证据的报道不多见。个别品种, 如 ‘乌龙捧胜’ 已报道其生根率达 81.33%, 移栽成活率 90% (刘会超和贾文庆, 2010b)。

2.6 牡丹试管苗成活率计算方法的探讨

牡丹试管苗的生根和移栽方法不尽相同, 试管内生根法包括生根和移栽两个过程, 实际生根率在生根基础上还有移栽成活率损耗; 试管外生根的小植株, 生根率即为实际成活率。为了比较不同方法生根的效果, 应该有统一的计算方法。从试管苗的投入与产出方面考虑, 如果规定, 用于生根的试管苗株数, 以株高 1.5~2 cm 记为 1 株; 移栽成活的株数, 以试种到田间或营养钵里 60 d 且正常生长的植株记为 1 株; 则试管苗实际成活率 (%) = 田间或营养钵试种成活的株数/用于生根的试管苗株数 $\times 100$ 。

该计算方法不考虑各种生根移栽过程的差异, 只统计投入和产出的数量比, 适用于各种生根移栽方法的成苗率计算和评价。试管内生根法的试管苗实际成活率 (%) = 生根率 \times 移栽成活率 $\times 100$ 。‘乌龙捧胜’ 生根率 81.33%, 移栽成活率 90% (刘会超和贾文庆, 2010b), 则试管苗实际成活率 = $81.33\% \times 90\% = 73.20\%$, 是迄今为止, 实际成活率最高的报道。

统计数据的可靠性依赖于足够的样品数量,用于计算成活率的试管苗数量,应符合统计学要求,符合正态分布的大样本数量,每个处理不少于 50 株;符合泊松分布的小样本数量,每个处理不少于 30 株。

3 结语

牡丹试管苗生根率和移栽成活率低是其组织培养实用化的瓶颈。该问题的解决将促进牡丹再生植株体系的建立、优良品种繁育、细胞与基因工程育种技术的进步。从植物组织培养的 5 个主要阶段分析,每个阶段都包括培养材料、培养基、培养条件、操作技能等问题。培养材料多数情况下主要取决于组织培养的目的,目的既定或牡丹品种确定的情况下,操作技能是共性的问题。

牡丹组织培养的基本培养基, WPM 的改良配方 (Wang & van Standen, 2001) 适用于凤丹等品种。Beruto 所述的在扩繁和生根阶段以葡萄糖酸钙代替氯化钙的实际效果国内未见报道,今后值得尝试。植物生长调节剂 IBA 用于促进牡丹不定根发生已趋于一致, IBA 浓度最高为 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。附加褐化抑制剂对牡丹组织培养有利,维生素 C $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、柠檬酸 $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Beruto et al., 2004)、维生素 B₂ $15 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (霍锦茹, 2010)、PVP $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、AC $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (张倩, 2012) 等。

不定根发生的生物化学与分子生物学基础已有报道:牡丹试管苗根原基发生在形成层部位,且伴随着一系列内源激素和酶活性的变化 (贺丹 等, 2011), 不定根形成过程中可溶性蛋白质,游离氨基酸,碳水化合物等发生一系列变化,并与 ATP 合成酶的亚基有关,还可能不存在不定根发生相关的调控蛋白 (王海云, 2010); 发根农杆菌侵染诱导牡丹毛状根发生,可提高生根率 (杨至德等, 2007) 等。这些新的探索正孕育着牡丹组织培养理论和技术的突破,完整的牡丹微型繁殖和植株再生技术将成为良种培育和种苗繁育的产业化技术和先锋技术。

References

- An Bai-yi. 2005. Studies on the establishment of *in vitro* regeneration system of *Paeonia suffruticosa* Andr. [M. D. Dissertation]. Harbin: Northeast Forestry University. (in Chinese)
- 安佰义. 2005. 牡丹组培离体再生系统的建立 [硕士论文]. 哈尔滨: 东北林业大学.
- Beroto M, Curir P. 2007. *In vitro* culture of tree peony through axillary budding//Mohan Jain S, Häggman H. Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Dordrecht: Springer: 477 - 497.
- Beruto M, Lanteri L, Portogallo C. 2004. Micropropagation of tree peony (*Paeonia suffruticosa*). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 79 (2): 249 - 255.
- Bouza L, Jacques M, Miginiac E. 1994a. *In vitro* propagation of *Paeonia suffruticosa* Andr. cv 'Mme de Vatry': Developmental effects of exogenous hormones during the multiplication phase. Scientia Horticulturae, 57 (3): 241 - 251.
- Bouza L, Jacques M, Miginiac E. 1994b. Requirements for *in vitro* rooting of *Paeonia suffruticosa* Andr. cv 'Mme de Vatry'. Scientia Horticulturae, 58 (3): 223 - 233.
- Bouza L, Jacques M, Sotta B, Miginiac E. 1994c. The reactivation of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) vitroplants by chilling is correlated with modifications of abscisic acid, auxin and cytokinin levels. Plant Science, 97 (2): 153 - 160.
- Bouza L, Sotta B, Bonnet M, Jacques M, Arnaud Y. 1992. Hormone content and meristematic activity of *Paeonia suffruticosa* Andr. cv 'Madame de Vatry' vitroplants during *in vitro* rooting. Acta Horticulturae, 302: 213 - 216.
- Cao Zi-yi, Liu Guo-min. 1996. Practical techniques on plant tissue culture. Lanzhou: Gansu Science and Technology Press. (in Chinese)
- 曹孜义, 刘国民. 1996. 实用植物组织培养技术. 兰州: 甘肃科学技术出版社.
- Chen Xiao-lei. 2005. Preliminary study on tissue culture of *Paeonia suffruticosa* [M. D. Dissertation]. Henan Agricultural University. (in Chinese)

- 陈笑蕾. 2005. 牡丹组织培养的初步研究[硕士论文]. 河南: 河南农业大学.
- Chen You-min. 1981. Landscape dendrology. Beijing: China Forestry Publishing House. (in Chinese)
- 陈有民. 1981. 园林树木学. 北京: 中国林业出版社.
- Chu Cheng-cai, Li Da-wei. 1992. The preliminary observations on vitrification in tissue culture of peony. Journal of Henan Normal University: Natural science edition, 20 (1): 70 - 73. (in Chinese)
- 储成才, 李大卫. 1992. 牡丹组织培养中玻璃化现象的出现及初步观察. 河南师范大学学报: 自然科学版, 20 (1): 70 - 73.
- Guo Shao-xia, Zhang Yu-gang, Ren Ru. 2003. Research progress of Chinese tree peonies. Journal of Laiyang Agricultural College, 20 (2): 116 - 121. (in Chinese)
- 郭绍霞, 张玉刚, 任 茹. 2003. 中国牡丹研究进展. 莱阳农学院学报, 20 (2): 116 - 121.
- Harris R A, Mantell S H. 1991. Effect of stage II subculture duration on the multiplication rate and rooting capacity of micropropagated shoots of tree peony. Hort Sci, 66 (1): 95 - 102.
- He Dan. 2009. The control on rooting culture of *Paeonia suffruticosa* in vitro [M. D. Dissertation]. Henan: Henan Agricultural University. (in Chinese)
- 贺 丹. 2009. 牡丹试管苗生根调控研究[硕士论文]. 河南: 河南农业大学.
- He Dan, Wang Zheng, He Song-lin. 2011. Adventitious root generating process and hormone and enzyme changes in vitro *Paeonia suffruticosa*. Acta Horticulturae Sinica, 38 (4): 770 - 776. (in Chinese)
- 贺 丹, 王 政, 何松林. 2011. 牡丹试管苗生根过程解剖结构观察及相关激素与酶变化的研究. 园艺学报, 38 (4): 770 - 776.
- Huo Jin-ru. 2010. Plant tissue culture of *Paeonia suffruticosa* Andr. 'Mingxing' [M. D. Dissertation]. Beijing: Beijing Forestry University. (in Chinese)
- 霍锦茹. 2010. 牡丹 (*Paeonia suffruticosa* Andr. 'Mingxing') 组织培养的研究[硕士论文]. 北京: 北京林业大学.
- Kong Xiang-sheng, Zhang Miao-xia. 1998. Study on in vitro rapid propagation of tree peony. Northern Horticulture, (3): 87 - 89. (in Chinese)
- 孔祥生, 张妙霞. 1998. 牡丹离体快繁技术研究. 北方园艺, (3): 87 - 89.
- Li Jia-jue, Zhang Xi-fang, Zhao xiao-qing. 2011. Tree peony of China. Encyclopedia of China Publishing House. (in Chinese)
- 李嘉珏, 张西方, 赵孝庆. 2011. 中国牡丹. 北京: 中国大百科全书出版社.
- Li Yan-min. 2004. Study on tissue culture techniques of three varieties of tree peonies [M. D. Dissertation]. Beijing: Beijing Forestry University. (in Chinese)
- 李艳敏. 2004. 三个牡丹品种组织培养技术的研究[硕士论文]. 北京: 北京林业大学.
- Li Yan-min, Luo Xiao-fang. 2004. Research development of in vitro breeding and fast propagation of *Paeonia* spp. Journal of Southwest Forestry College, 24 (1): 70 - 73. (in Chinese)
- 李艳敏, 罗晓芳. 2004. 牡丹离体培养与快速繁殖研究进展. 西南林学院学报, 24 (1): 70 - 73.
- Li Yu-long, Wu De-yu, Pan Shu-long, Xu Shao-li, Wei Zhi-ming. 1984. In vitro propagation of *Paeonia suffruticosa*. Chinese Science Bulletin, (8): 500 - 502. (in Chinese)
- 李玉龙, 吴德玉, 潘淑龙, 徐少丽, 卫志明. 1984. 牡丹试管苗繁殖技术的研究. 科学通报, (8): 500 - 502.
- Li Zhi-jun, Wang Guo-dong, Xin Shu-liang. 2006. The new technology of propagation in the organization cultivation of *Paeonia suffruticosa*. Journal of Laiyang Agricultural College: Natural Science, 23 (2): 122 - 125. (in Chinese)
- 李志军, 王国栋, 辛淑亮. 2006. 牡丹组织培养快繁新技术. 莱阳农学院学报: 自然科学版, 23 (2): 122 - 125.
- Liu Hui-chao, Jia Wen-qing. 2010a. Effects of different kinds of basic medium and plant growth regulators on peony rooting. Journal of Henan Institute of Science and Technology, 38 (2): 32 - 34. (in Chinese)
- 刘会超, 贾文庆. 2010a. 基本培养基和植物生长调节剂对牡丹组培生根的影响. 河南科技学院学报, 38 (2): 32 - 34.
- Liu Hui-chao, Jia Wen-qing. 2010b. Establishment of plantlet regeneration system of tree peony through lateral buds cutting and carving. Acta Horticulturae Sinica, 37 (9): 1471 - 1476. (in Chinese)
- 刘会超, 贾文庆. 2010b. 应用侧芽平切刻伤方法建立牡丹植株再生体系. 园艺学报, 37 (9): 1471 - 1476.
- Liu Qing-lin, Ma Yi, Zheng Yu-mei. 2003. Tissue culture of ornamental plants. Beijing: China Agriculture Press: 84 - 85. (in Chinese)

- 刘青林, 马 玮, 郑玉梅. 2003. 花卉组织培养. 北京: 中国农业出版社: 84 - 85.
- Liu Shu-min, Wang Lian-ying, Wu Di-xin, Qin Kui-jie. 1987. Tree peonies. Beijing: China Architecture and Building Press. (in Chinese)
- 刘淑敏, 王莲英, 吴涤新, 秦魁杰. 1987. 牡丹. 北京: 中国建筑工业出版社.
- Meng Qing-xiu, Luo Xiao-fang, Zhang Jun-qi, Kang Xiang-yang. 2011. 'Linghua Zhanlu' peony bud scales of tissue culture. Chinese Agricultural Science Bulletin, 27 (10): 102 - 107. (in Chinese)
- 孟清秀, 罗晓芳, 张俊琦, 康向阳. 2011. '菱花湛露' 牡丹鳞芽组织培养技术研究. 中国农学通报, 27 (10): 102 - 107.
- Pan M J, van Staden J. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture—A review. Plant Growth Regulation, 26 (3): 155 - 163.
- Pan M J, van Staden J. 1999. Effect of activated charcoal, autoclaving and culture media on sucrose hydrolysis. Plant Growth Regulation, 29 (3): 135 - 141.
- Qiu Jin-mei. 2010. Study on the *in vitro* micropropagation of tree peony [M. D. Dissertation]. Beijing: Beijing Forestry University. (in Chinese)
- 邱金梅. 2010. 牡丹离体快繁技术的研究 [硕士论文]. 北京: 北京林业大学.
- Shen Hai-long. 2009. Shoot rooting techniques outside tubes for micropropagation of trees. Beijing: China Forestry Publishing House. (in Chinese)
- 沈海龙. 2009. 树木组织培养微枝试管外生根育苗技术. 北京: 中国林业出版社.
- Sun Zhong-xu, Wang Yu-jun, Liu Jing, Yang Hong-hua, Zhao Chun-zhi. 2002. A new filter bridge rooting method for plant micropropagation. Journal of Shandong Agricultural University: Natural Science, 33 (3): 257 - 263. (in Chinese)
- 孙仲序, 王玉军, 刘 静, 杨红花, 赵春芝. 2002. 植物组培快繁滤纸桥生根新技术. 山东农业大学学报: 自然科学版, 33 (3): 257 - 263.
- Thomas T D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnology Advances, 26 (6): 618 - 631.
- Wang H F, van Standen J. 2001. Establishment of *in vitro* cultures of tree peonies. South African J Bot, 67: 358 - 361.
- Wang Hai-yun. 2010. Study on protein expression variation of *Paeonia suffruticosa in vitro* in the period of rooting inducement [M. D. Dissertation]. Henan: Henan Agricultural University. (in Chinese)
- 王海云. 2010. 牡丹试管苗诱导生根中蛋白质表达变化的研究 [硕士论文]. 河南: 河南农业大学.
- Wang Hua-fang, Meng Qing-ying, Tian Yan-ting. 1987. A review of cut rooting promoted with artificial plant growth regulators. Journal of Beijing Forestry University, 9 (4): 425 - 432. (in Chinese)
- 王华芳, 孟庆英, 田砚亭. 1987. 人工合成植物生长调节剂促进插条生根的研究现状. 北京林业大学学报, 9 (4): 425 - 432.
- Wang Hua-fang, Wang Yu-hua, Wang Si-qing, Lu Ming-xing, Zhu Yi-hong, Peng Chun-sheng. 1997. Ornamental hydroponics. Beijing: Jindun Press. (in Chinese)
- 王华芳, 王玉华, 王四清, 卢明星, 朱艺红, 彭春生. 1997. 花卉无土栽培. 北京: 金盾出版社.
- Wang Jun-e. 2008. The research on tissue culture of peony (*Paeonia Suffruticosa*) [M. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 王军娥. 2008. 牡丹组织培养技术的研究 [硕士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Wang Yang-xia, Shi Xiao-xin, Du Guo-qiang, Wang Chen, Hao Xiao-wei, Wang Jun-ling. 2008. Micropropagation of 'Luoyanghong' peony *in vitro*. Chinese Agricultural Science Bulletin, 24 (10): 400 - 404. (in Chinese)
- 王燕霞, 师校欣, 杜国强, 王 晨, 郝晓炜, 王俊玲. 2008. '洛阳红' 牡丹组织培养快速繁殖技术研究. 中国农学通报, 24 (10): 400 - 404.
- Wang Yong-wei. 2008. The Preliminary research on rooting culture of *Paeonia suffruticosa in vitro* [M. D. Dissertation]. Henan: Henan Agricultural University. (in Chinese)
- 王永伟. 2008. 牡丹试管苗生根培养初步研究 [硕士论文]. 河南: 河南农业大学.
- Xu Gui-juan. 2002. Studies on micropropagation of Chinese tree peonies (*Paeonia suffruticosa* Andr.) [M. D. Dissertation]. Beijing: Beijing Forestry University. (in Chinese)
- 徐桂娟. 2002. 牡丹组培快繁技术的研究 [硕士论文]. 北京: 北京林业大学.
- Xu Pan-pan. 2011. The effect of environmental factor on rooting culture of *Paeonia suffruticosa in vitro* [M. D. Dissertation]. Henan: Henan

- Agricultural University. (in Chinese)
- 徐盼盼. 2011. 环境因子对牡丹试管苗生根的影响[硕士论文]. 河南: 河南农业大学.
- Xu Zhen-hua, Wang Xue-yong, Li Jing-chuan, Li Jian-ming. 2002. Progress of study on out test-tube rooting of test tube seeding. Chinese Agricultural Science Bulletin, 18 (4): 85 - 88. (in Chinese)
- 徐振华, 王学勇, 李敬川, 历建明. 2002. 试管苗瓶外生根的研究进展. 中国农学通报, 18 (4): 85 - 88.
- Yang Zhi-de, Wang Yan, Liu Xue-mei, Miu Kun, Tang Qiao-xiang. 2007. Preliminary study on hairy root occurrence of peony induced by *Agrobacterium rhizogenes*. Forestry Research, 20 (2): 292 - 294. (in Chinese)
- 杨至德, 王 雁, 刘雪梅, 缪 崑, 汤巧香. 2007. 发根农杆菌诱导牡丹生根的初步研究. 林业科学研究, 20 (2): 292 - 294.
- Yin Wei-lun, Wang Huan-fang. 2009. Biotechnology in forestry. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 尹伟伦, 王华芳. 2009. 林业生物技术. 北京: 科学出版社.
- Zeng Duan-xiang, Yin Wei-lun, Zhao Xiao-qing, Wang Hua-fang. 2000. Propagation of Chinese tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) . Journal of Beijing Forestry University, 22 (3): 90 - 95. (in Chinese)
- 曾端香, 尹伟伦, 赵孝庆, 王华芳. 2000. 牡丹繁殖技术. 北京林业大学学报, 22 (3): 90 - 95.
- Zhang Gui-hua, Wang Hong-mei, Wang Lian-xiang. 2001. Study on tissue culture technique for tree peony. Shandong Agricultural Sciences, (5): 17 - 18. (in Chinese)
- 张桂花, 王洪梅, 王连祥. 2001. 牡丹组织培养技术研究. 山东农业科学, (5): 17 - 18.
- Zhang Hong-xiao, Jing Jian-ying. 2003. Advancement of culture technology in woody plant tissue. Journal of Henan University of Science and Technology: Agricultural Science, (3): 66 - 69. (in Chinese)
- 张红晓, 经剑颖. 2003. 木本植物组织培养技术研究进展. 河南科技大学学报: 农学版, (3): 66 - 69.
- Zhang Long-bo. 1989. Preliminary study on the tissue culture of tree peony. Urban Forestry in Henan Province, (10): 21 - 23. (in Chinese)
- 张龙勃. 1989. 牡丹组织培养研究初报. 河南城市林业, (10): 21 - 23.
- Zhang Qian. 2012. Establishment of in vitro shoot rooting of dwarf tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr. 'Mingxing') [M. D. Dissertation]. Beijing: Beijing Forestry University. (in Chinese)
- 张 倩. 2012. 牡丹矮化品种‘明星’ (*Paeonia suffruticosa* Andr. 'Mingxing') 试管苗生根培养初步研究[硕士论文]. 北京: 北京林业大学.
- Zhang Ying-xing. 2008. Study on the micropropagation of tree peony and the effect of polyamines on *in vitro* rooting[M. D. Dissertation]. Beijing: Beijing Forestry University. (in Chinese)
- 张颖星. 2008. 牡丹离体快繁及多胺对组培苗生根影响的研究[硕士论文]. 北京: 北京林业大学.
- Zhang Zi-xue, Ding Wei-qun, Shi Wei-jing, Liu Xiao-long, Hou Zhao-hui. 2004. Study on tissue culture for fengdan peony. Research and Practice of Chinese Medicines, 18 (1): 18 - 21. (in Chinese)
- 张子学, 丁为群, 时惟静, 刘晓龙, 侯朝晖. 2004. 凤丹组织培养研究. 现代中药研究与实践, 18 (1): 18 - 21.
- Zhu Xiang-tao. 2010. Somatic embryos and callus induction and the bud differentiation of *Paeonia ostii* Andr. 'Fengdan' [Ph. D. Dissertation]. Beijing: Chinese Academy of Forestry. (in Chinese)
- 朱向涛. 2010. 凤丹体胚发生及愈伤组织诱导芽分化研究[博士论文]. 北京: 中国林业科学研究院.