

# 牡丹组织培养研究进展

孟 军, 韩 杰, 祖 恩 普

(河南洛阳师范学院生命科学系, 471022)

**摘 要:** 从品种、外植体的选择、培养基配置、培养条件控制及生根移栽等几个方面对牡丹组织培养的研究进展进行了比较、分析和总结。认为目前的研究水平处于应用基础研究的初级阶段, 应通过加强协作、细化分工来拓展研究内容的广度和深度, 加强研究的系统性。

**关键词:** 牡丹; 组织培养; 进展

**中图分类号:** S 685.116 **文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-0009(2007)01-0153-02

牡丹(*Paeonia suffruticosa*)为芍药科芍药属牡丹组多年生灌木花卉。由于传统繁殖方法存在结实能力低下、种子变异性强、无性繁殖系数低等问题, 目前我国的牡丹生产还很难满足日益增长的社会需求。同时, 繁殖方法的滞后也限制了牡丹种质资源保存及新品种选育工作的开展。近年来, 植物组织培养技术获得了长足的发展, 越来越多的工作者尝试使用这一技术进行牡丹快速繁殖及种质保存与创新研究。现对近年来牡丹组织培养的研究进展作出综述, 为今后的工作提供参考。

## 1 品种

我国是牡丹第一资源大国<sup>[1]</sup>, 现有四大品种群近千个品种, 但真正用于组培研究的却非常少, 与我国丰富的牡丹资源极不相称。常见的有凤凰山牡丹<sup>[2~3]</sup>、紫斑牡丹<sup>[4~7]</sup>、青龙卧墨池、十八号牡丹、黑花魁、豆绿、金星雪浪、大胡红<sup>[8]</sup>、荷花紫<sup>[9]</sup>、洛阳红、姚黄<sup>[10]</sup>、枯枝牡丹、古班同春等, 这在一定程度上反映出目前的牡丹组培研究工作还处于初级阶段, 研究的广度有待加强。同时也可以看出, 以获取丹皮酚等药用成分为目的的“凤丹”组培研究较少, 而观赏牡丹组培研究相对较多。

## 2 外植体的选择

在凤丹组培中, 张子学等<sup>[2]</sup>采用种子、种胚以及由此产生的子叶、叶柄、叶片和愈伤组织等作为外植体进行芽的诱导, 发现采用胚培养可以打破上胚轴休眠, 大大缩短初代培养周期。时侠清等<sup>[3]</sup>则采用主根韧皮部进行愈伤组织诱导并提取丹皮酚也获得了较好的结果。在观赏牡丹组培中, 取材部位亦有所不同, 包括胚、上胚轴、腋芽、顶芽、土芽、叶片、叶柄、心皮、花药等, 其中土芽的愈伤组织诱导率最高<sup>[4]</sup>。Margherita Beruto 等<sup>[11]</sup>的研究进一步表明, 带有展开叶片的芽比仅具有幼叶原基的芽更容易启动组培过程。分析认为土芽的组织分化程度最低, 最容易脱分化产生愈伤组织, 是最理想的外

植体材料, 幼苗的顶芽和叶柄也是较好的材料。若以顶芽为外植体, 则在 12 月至次年 2 月间取材较为适宜, 7~9 月最差<sup>[11]</sup>。这可能与这一时期的芽经过低温休眠, 分化完全, 营养积累丰富, 苞片紧密, 污染率低等因素有关。也有的学者从防止褐化的角度进行研究, 幼茎在组培过程中褐化的可能性最小, 最适宜作为外植体, 但在其研究中并未涉及以芽作为外植体而可能出现的情况<sup>[12]</sup>。另外, 如果在取材前对母株进行暗处理或在培养过程中对材料进行暗处理也有利于褐化的抑制<sup>[13]</sup>。

## 3 培养基

目前, 牡丹组培主要采用的是 MS 培养基<sup>[10]</sup>, 但由于该培养基无机盐浓度过高, 可能会引起酚类外溢物质的大量产生而导致褐化, 所以 1/2 MS 培养基也被大量使用<sup>[6, 14]</sup>, 有的学者也曾将 MS 培养基中的大量元素减半后使用<sup>[10]</sup>。蔗糖作为碳源也经常添加到培养基中, 浓度多在 2%~3% 的范围内浮动, 但谢静莹等<sup>[12]</sup>将蔗糖浓度提高到 5%、8% 时, 也成功诱导出愈伤组织, 形成丛生芽。在木本植物组织培养中糖的浓度过高或过低都是不利的, 有可能导致褐化或玻璃化现象的发生<sup>[15]</sup>。水解酪蛋白(CH)、水解乳蛋白(LH)做为有机营养物质也曾被使用, 浓度一般为 500 mg/L<sup>[12]</sup>。

在组织培养中, 植物生长调节物质虽然用量少, 但却发挥着重要的调节作用。一般认为, 生长素能够促使细胞进入持续分裂增殖状态, 而细胞分裂素促使细胞进入分化状态。常用的生长素为萘乙酸(NAA)、吲哚乙酸(IAA)、吲哚丁酸(IBA), 被采用的频率依次递减。NAA 的浓度范围为 0.1~1.0 mg/L; IAA 浓度范围为 0.1~2.0 mg/L; IBA 浓度范围为 0.1~2.0 mg/L。除此之外, 有研究表明在初代培养中对愈伤组织增殖最有效的是 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)<sup>[9]</sup>。但 2,4-D 同时也是一种器官发生抑制剂, 不能用于启动根和芽的分化。在细胞分裂素中, 激动素(KT)和 6-苄基腺嘌呤(6-BA)常被全用, 其中 6-BA 使用最为频繁, 浓度范围多为 0.2~2.0 mg/L。KT 的使用相对较少, 浓度变化在 0.2~1.0 mg/L 之间。

生长素与细胞分裂素是决定器官分化的关键物质。林顺权等曾指出, 器官分化受生长素和分裂素的绝对浓度支配, 而非二者的比值。也有研究表明, 这一比值的确会对分化发育过程产生影响, 而且会随培养材料的不同及组培的不同阶段或目的而发生显著变化<sup>[4~5]</sup>。

在牡丹组织培养过程中严重的褐化现象在很大程度上抑制了培养材料的再生, 降低了增殖系数<sup>[9, 11]</sup>。为此, 一些抗氧化剂与吸附剂也被加入培养基中。何松林等<sup>[13]</sup>以叶柄离体培养材料为试材研究了硫代硫酸钠、维生素 C 和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)对褐化的抑制作用。结果表明这三种抗氧化剂与吸附剂对褐化的抑制作用依次递增, 其中以 1 000~1 500 mg/L PVP 效果最好。同时还发现在外植体采取前对母株进行遮光处理以及在培养过程中对材料进行暗处理也有利于抑制褐化, 而培养基中生长调节物质的浓度变化对褐化没有明显影响。活性炭能够清除培养材料在代谢过程中产生的毒副物质、调节激素供应, 因此有利于减少褐化的发生。

**第一作者简介:** 孟军, 男, 1977 年生, 博士, 现主要从事牡丹的组织培养研究工作。

**收稿日期:** 2006-08-15

也有学者认为由于活性炭的存在而使培养基变黑, 产生了类似土壤的效果, 从而有利于植物材料的生长<sup>[16]</sup>。但活性炭的存在也可能会降低培养基中植物生长调节物质的有效浓度, 从而影响试验结果, 增加试验成本。所以活性炭的添加量不宜过高, 一般为 0.3% ~ 0.5%。

#### 4 培养条件

研究表明, 牡丹组培所需温度以  $25 \pm 1$  °C 最为适宜, 超过 26 °C 就会刺激玻璃化苗的产生。相反, 较低的温度会降低光合能力, 抑制试管苗的生长<sup>[18, 17]</sup>。同时, 在组培过程中, 亦应注意昼夜温差的控制。昼夜无温差会导致物质积累减少, 叶绿素含量减少, 酶功能失调, 蛋白质含量降低, 从而导致玻璃化苗的产生。通过变温处理, 加大昼夜温差会使玻璃化现象消失<sup>[18]</sup>。

就光照条件而言, 当光照时间为 8 h/d 时, 试管苗正常, 但生长缓慢; 光照时间为 10 h/d 时, 试管苗生长健壮, 芽分化多; 光照时间为 12 h/d 时, 试管苗长势弱, 个别出现玻璃化苗<sup>[8]</sup>。光照时间或强度的增加可能会促进叶绿体的形成, 加强光合能力, 有利于细胞壁、细胞器的形态建成, 从而减少玻璃化苗的发生。但过强的光照会提高多酚氧化酶活性, 加速培养组织褐变。总体看来, 牡丹组培较适宜的光照条件是 2 000 Lx、10 h/d<sup>[8, 19]</sup>。但在凤丹组织培养中, 时侠清等<sup>[3]</sup>发现在 29 °C、黑暗条件下培养可显著提高根皮愈伤组织的生长倍数和丹皮酚含量。

在湿度控制方面, 一般认为采用通透性比较好的棉塞等封口材料有利于培养材料的光合干物质积累, 降低湿度, 减少玻璃化苗的发生。

#### 5 生根培养与移栽

IBA 有较好的促进植物生根的作用, 目前牡丹试管苗生根培养使用的生长素也多为 IBA, 也有将 IBA 与 IAA 同时使用的<sup>[19]</sup>。周仁超等<sup>[9]</sup>以紫斑牡丹胚为材料, 在 1/2 MS + IAA 0.2 mg/L 的培养基上获得了 90% 以上的生根率。曹小勇等<sup>[7]</sup>使用相类似的材料进行研究时却发现, 在添加 BA 0.1 mg/L 的 MS 培养基中, 紫斑牡丹胚的上下胚轴及胚根均可正常生长, 有些还可形成完整的幼苗。另外, 张桂花等<sup>[8]</sup>以黑花魁等品种的顶芽或腋芽为材料的研究表明, 单一生长激素无法促进生根。孰是孰非, 尚需试验验证。但可以设想, 培养材料的差异是最主要的影响因子之一, 培养材料自身的激素水平亦应被考虑到培养基的设计当中。

从生根培养流程来看, 一般认为, 当生长素完成诱导作用后会对新根的生成有抑制作用。因此, 先在根诱导培养基上培养再转移到不含激素但含活性碳的根形成培养基上培养的两步连续生根法对促进牡丹组培苗生根最为有效<sup>[15]</sup>。相对而言, 一步生根法难以消除培养后期生长素的抑制作用, 而速蘸法的缺点在于难以充分发挥生长素的诱导作用。

在生根试管苗移栽前首先要练苗, 即将瓶塞打开放在阳光充足处通风锻炼 3 ~ 5 d 再移栽。基质可选择蛭石、腐殖土或沙。孔祥生等<sup>[10]</sup>发现在腐殖土上移栽苗的成活率达 48%, 比蛭石作基质提高 33%。而周仁超等<sup>[9]</sup>在练苗 5 d 后将试管苗移栽入沙床, 实现了 80% 以上的成活率。

#### 6 讨论与展望

综上所述, 众多学者就牡丹组织培养这一课题进行了大量的研究。但由于受到品种异质性、试验时间和地点的差异以及取样误差等不可避免的因素的影响, 研究结果在拥有共性的同时也存在显著的差异。如何提高研究的系统性、进一步加强研究内容的广度和深度是当前面临的重要问题之一, 加强协作、细化分工可能会是行之有效的解决办法。随着研究的不断深入和内容的不断扩展, 目前看似矛盾的研究结果很可能会在一个更大的背景下得到统一。

组织培养是植物快速繁殖的有效方法, 更是种质资源保存和创新的重要工具。虽然目前的研究水平还处于应用基础研究的初级阶段, 研究内容也主要集中在外植体选择、生长调节物质配伍和培养基配方等领域, 但有部分研究已经获得了生根植株。虽然受到试管苗生根质量低、驯化移栽成活率低等关键问题的困扰, 牡丹组培暂时难以大量应用于生产实践<sup>[19]</sup>, 但牡丹组培快繁的理论可行性已经被证实, 产业化应用前景广阔。

#### 参考文献:

- [1] 郭绍鑫, 张玉刚, 任茹. 中国牡丹研究进展[J]. 莱阳农学院学报, 2003, (2): 116—121.
- [2] 张子学, 丁为群, 时惟静, 等. 凤丹组织培养研究[J]. 现代中药研究与实践, 2004, (1): 18—21.
- [3] 时侠清, 张子学. 凤凰山牡丹药用器官的愈伤组织培养[J]. 核农学报, 2005, (3): 186—190.
- [4] 陈怡平, 丁兰, 赵敏桂. 用紫斑牡丹不同外植体诱导愈伤组织的研究[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 2001, (3): 66—69.
- [5] 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, (3): 314—317.
- [6] 周仁超, 姚崇怀. 紫斑牡丹胚培养与植株再生(简报)[J]. 亚热带植物科学, 2001, (3): 62; 68.
- [7] 曹小勇. 濒危植物紫斑牡丹胚离体培养[J]. 氨基酸和生物资源, 2003, (2): 35—36.
- [8] 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.
- [9] 李丽霞, 曲复宁, 由翠琴, 等. 应用正交设计法筛选牡丹(*Paeonia suffruticosa*)愈伤诱导培养基的研究[J]. 烟台大学学报(自然科学版), 2005, (1): 41—44; 49.
- [10] 孔祥生, 张妙霞. 牡丹离体快繁技术研究[J]. 北方园艺, 1998, (4): 87—89.
- [11] Margherita Beruto, Luca Lanteri, Cristina Portogallo. Micropropagation of tree peony (*Paeonia suffruticosa*) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2004, (2): 249—255.
- [12] 安佰义, 赵飞. 牡丹不同类型总酚含量与 PPO 活性研究[J]. 北京大学学报(自然科学版), 2005, (2): 169—172.
- [13] 何松林, 陈笑蕾, 陈莉, 等. 牡丹叶柄离体培养中褐化防止的初步研究[J]. 河南科学, 2005, (1): 47—50.
- [14] Brukhin V B, Batygina T B. Embryo culture and somatic embryogenesis in culture of *Paeonia anomala* [J]. Phytomorphology, 1994, (34): 151—157.
- [15] 张红晓, 经剑颖. 木本植物组织培养技术研究进展[J]. 河南科技大学学报(农学版), 2003, (3): 66—69.
- [16] 崔德才, 徐培文, 李红双, 等. 植物组织培养与工厂化育苗[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003. 5(第一版): 32.
- [17] 储成才, 李大卫. 牡丹组织培养中玻璃化显现的出现及初步观察[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 1992, (1): 70—73.
- [18] 李娅丽, 张健, 潘远智. 观赏植物组织培养过程中玻璃化现象与解决措施进展[J]. 四川农业大学学报, 2004, (3): 278—282.
- [19] 李艳敏, 罗晓芳. 牡丹离体培养与快速繁殖研究进展[J]. 西南林学院学报, 2004, (1): 70—73.