

牡丹‘凤丹’胚不定芽诱导和生根研究

贾文庆, 刘会超

(河南科技学院 园林学院园林系 河南 新乡 453003)

摘要:以‘凤丹白’种胚为材料,研究了不同植物生长调节剂对胚诱导丛生芽及生根的影响。结果表明:胚分化不定芽最佳培养基MS+6-BA 2.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L;最佳生根培养基为1/2MS+IBA 1.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L,生根率达60.17%。

关键词:牡丹;胚;丛生芽;生根

中图分类号:S 685.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)03-0069-03

牡丹(*Paeonia suffruticosa*)又名百两金、富贵花、洛阳花等,为芍药科芍药属落叶亚灌木。是原产我国的木本名贵观赏花卉,根皮作为丹皮,药用价值甚高。牡丹种子繁殖存在很多问题,如种子具有上胚轴休眠习性^[1,2],名贵品种结实能力很低,且无性繁殖困难等。组织培养是一项重要的生物技术^[4,8],对牡丹无性繁殖有着巨大潜力。目前,国内对牡丹组织培养有少量报道^[9,19],但对胚诱导丛生芽再生研究未见报道,该试验对牡丹离体胚不定芽诱导增殖的培养基筛选进行了探讨研究,以期对牡丹快速繁殖体系提供理论基础。

1 材料方法

1.1 供试材料

供试牡丹品种“凤丹”种子,2006年10月购于洛阳国家牡丹基因库。

1.2 方法

1.2.1 外植体的灭菌消毒 牡丹种子带回实验室后4℃低温层积40 d,洗净后用0.1%~0.3%高锰酸钾消毒15 min,无菌水冲洗干净后,在超净工作台用70%酒精消毒30 s,无菌水冲洗3遍,0.1%升汞溶液浸泡9 min,无菌水冲洗6次,每次1 min。最后用解剖刀剥出胚接种在培养基上。

1.2.2 基本培养基的筛选试验 以MS、1/2MS、1/4MS、B5为基本培养基,附加细胞分裂素6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.01 mg/L,以单因素对比试验进行筛选,每种培养基培养10瓶,重复3次以便确定合适胚生

长的最适基本培养基,50 d后调查胚的诱导率,诱导率=诱导出芽的胚数/接种胚数。

1.2.3 不同生长调节剂组合对丛生芽诱导的影响试验

试验设计采用双因素(6-BA 1.0、2.0、3.0、4.0 mg/L; NAA 0.05、0.1、0.2、0.4 mg/L)考虑交互作用的完全试验设计,生长调节物种类、浓度及配比是在现有资料及预备试验的基础上选定的,该试验基本培养基为1.2.2试验已确定的培养基,每处理重复3次,每重复培养20瓶,继代培养基培养基同于诱导培养基,适当降低生长素浓度。

1.2.4 不同生长调节剂组合对生根的影响试验 当丛生芽长至1.5~2 cm长时,切成单株接种于生根培养基(见表3)中诱导生根。接种后30 d观察无根苗的生根情况,调查不同激素比对牡丹丛生芽生根的影响。上述培养基均附加3%蔗糖、0.56%琼脂,pH值调至5.8。接种后置于培养架上,培养室内培养培养温度(20±1)℃左右,光照强度2500 lx,光照时间15 h/d。

2 结果与分析

在接种培养5 d后,离体胚开始萌发生长,子叶和胚轴逐渐变绿,显微观察部分子叶上有红色细胞出现,15 d后子叶展开变绿,开始膨大,胚根及下胚轴上少量愈伤组织形成(图版,1);32 d后,从增粗的子叶顶端及子叶基部,分化出许多不定芽及长出叶,不定芽有簇状(图版,5)、具有不定芽点的叶片(图版,4)与伸长不定芽3种。胚培养56 d后,转入继代培养基,培养25 d待芽或芽丛长到一定大小时,可切割转入生根培养基。

2.1 基本培养基对不定芽分化诱导的作用

从图1可看出:不同种类的培养基都可不同程度的诱导胚分化出不定芽,MS培养基虽然无机元素充分但含量太高,诱导率为12.5%,不利于牡丹胚不定芽的诱导,而容易形成愈伤组织。而无机盐含量较低的1/2MS,培养基诱导率达36.4%,有利于牡丹胚的不定芽分化诱导,但无机盐含量偏低的1/4MS培养基诱导率为

第一作者简介:贾文庆(1979-),男,硕士,讲师,主要研究方向为观赏植物生物技术。

通讯作者:刘会超(1964-),男,河南南阳人,博士,教授,硕士生导师,主要从事观赏植物生物技术方向研究工作。

基金项目:河南省创新人才工程资助项目(2005-126-49);河南科技学院博士基金资助项目(050106)。

收稿日期:2008-11-10

15.2%,不利于胚的不定芽诱导。B5 培养基与上述培养基相比,诱导率最低,仅为 8.6%,综上可知 1/2MS 为最适培养基。

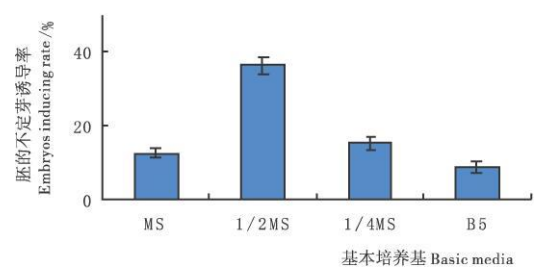


图 1 不同培养基对胚不定芽诱导的影响

Fig. 1 Influence of different basic media on embryos inducing

2.2 生长调节物质对不定芽增殖的影响

从表 1 可以看出,6-BA 和 NAA 的不同浓度配比对不定芽的分化增殖影响较大,在含 6-BA 和 NAA 的培养基上,材料出现了不同程度的分化和生长,试验发现,二者比值过高过低都不利于芽的增殖,过高易于子叶的伸长、增粗和产生芽点,但后期芽点逐渐变褐死亡,不易形成丛生芽;6-BA 与 NAA 比值过低则容易产生愈伤组织,愈伤组织在培养中逐渐变褐死亡,这与张俊琦^[20]的研究一致。

由表 2 可以看出,不同浓度的 6-BA、NAA 对牡丹胚芽的增殖均存在显著差异,6-BA 与 NAA 的组合存在交互作用并对其芽增殖有极显著差异,进一步做多重比较(LSD_{A×B}=0.459, *t*_{0.01}(32)=2.75)得出 2.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA 为最佳的浓度组合,不定芽主要从两片叶子向茎面(图版,2、4)、2 片子叶背茎面(图版,3)、基部(图版,5)直接诱导产生。

表 1 6-BA 与 NAA 不同组合对牡丹胚芽增殖的影响

Table 2 Effect of diffeent combinations of 6 BA and NAA on buds proliferation

	NAA		6-BA/mg · L ⁻¹			
	/mg · L ⁻¹	0.5	1.5	2.5	3.5	
不定芽均值(X̄ ± SD)/个	0.05	1.1±0.10	1.46±0.09	2.34±0.16	1.58±0.12	
	0.1	2.1±0.10	2.56±0.26	2.43±0.20	1.55±0.05	
	0.2	3.09±0.12	4.97±0.15	5.83±0.25	4.3±0.18	
	0.4	3.09±0.19	3.37±0.15	3.76±0.18	4.15±0.05	

表 2 6-BA 与 NAA 不同组合对芽增殖影响试验结果方差分析

Table 2 The variance analysis of different combination of growth regulations on bud proliferation

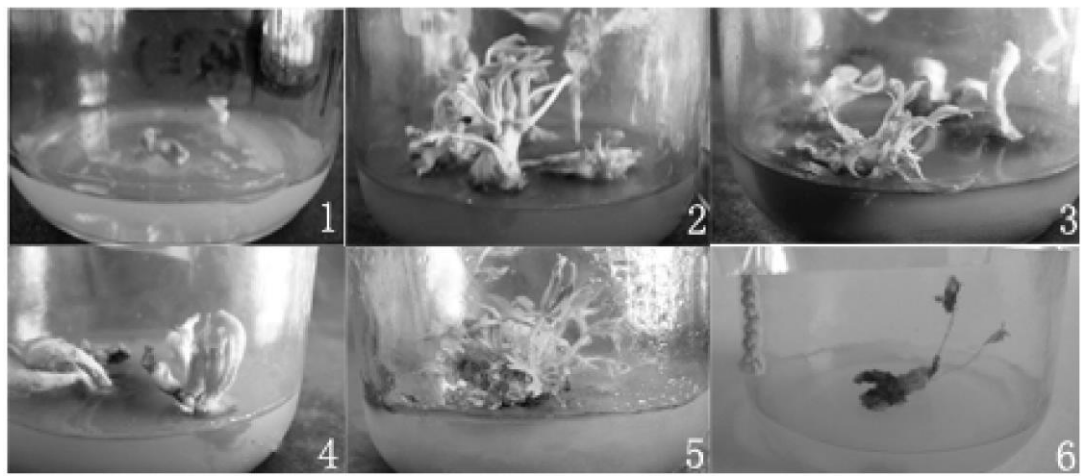
变异来源	离均差平方和	自由度	均方差	F 值	显著性
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square		
NAA	78.378	3	26.126	931.336	**
6-BA	5.781	3	1.927	68.696	**
NAA×BA	5.054	9	0.562	20.019	**
误差	0.898	32	0.028		
总变异	536.936	48			

2.3 不同生长调节剂组合对丛生芽生根的影响

表 3 IBA、NAA 对试管苗生根的影响

Table 3		Effect of IBA and NAA on rooting			
激素 Hormone		接入数 Number	根部愈伤	生根率	平均生根数
/mg · L ⁻¹		of shoots	Callos	Percentage of	No. of root
IBA	NAA	/个		rooting(±SD)/ %	(±SD)/ 条
2.0	0	20	较少	26.40 ±2.76a	0.65±0.11a
0.5	1.5	20	多	35.75 ±2.56b	1.23±0.05b
0.5	1.0	20	多	42.58 ±1.05c	1.0±0.14ab
0.5	0.5	20	较少	44.58 ±2.47c	1.56 ±0.16bc
1.5	0.5	20	少	60.17 ±1.53d	1.96 ±0.12cd

注:小写字母为 0.05 差异显著水平。Note: Small letter indicate 0.05 significant level.



图版:1 凤丹萌发胚 2、3、4、5 胚苗分化的丛生芽; 6 不定芽在 1/2MS 培养基诱导生根

Plates: 1 Germinating Embryo of 'Fengdan'; 2、3、4、5. Shoot forming from seedling 6 Rooting induced from shoot in 1/2MS medium.

由试验结果发现,牡丹试管苗接种后 15 d 左右有根生成,30 d 时大部分根长至 1 cm 长,有些苗长出 2 条丛生根,有些仅长出 1 条,由表 3 可见,1/2MS 基本培养基中附加不同浓度的 IBA 或 NAA 均可有效诱导牡丹试管苗生根,其中以 IBA 1.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L 诱导生根率最高,达 60.17%,平均生根数最多,达 1.96 条。从试验结果可以看出,单一的 IBA 不利于根的发生,适量较高浓度的 IBA 诱导生根效果佳;高浓度的 NAA 有利于愈伤组织的产生,但对根的再生有一定抑制作用。

3 结论与讨论

不同种类的培养基都可不同程度的诱导胚分化出不定芽,试验发现 MS、1/2MS、1/4MS 培养基中,无机盐含量中等的 1/2MS 培养基诱导率最高,表明适当降低无机盐含量有利于牡丹胚的不定芽分化诱导。B5 培养基与 MS、1/2MS、1/4MS 相比,诱导率最低,仅为 8.6%,这可能是 B5 铵含量较低缘故。

培养基中附加适量生长素和细胞分裂素可促进外植体诱导分化出不定芽。该试验使用的生长素 NAA 和细胞分裂素 BA 均为易于获得,价格低廉,且使用方便的普通激素,分化效果尚可,但分化率有待进一步提高。试验表明,胚分化与两种激素都有关系,二者的配比影响分化率。这与前人在其它物种上的结果相似。

在众多的木本植物快繁中,培养基中生长素种类和质量浓度对试管无根苗影响很大,单一的激素不利于试管苗生根^[7]。试验也发现,添加单一 IBA 的培养基牡丹试管苗的生根率较低,产生的根数也少;IBA 与 NAA 组合诱导生根时,不仅生根率显著高于单一 IBA 处理,而且根系生长均匀,生根率、平均根数也达到最高值,组培苗整齐健壮(图版,6)。

参考文献

- [1] 周仁强,姚崇怀,潘俊,等.紫斑牡丹种子休眠和萌发特性初步研究[J].湖北农业科学,2002(1):59-60.

- [2] 郑相穆,周阮宝,谷丽萍,等.凤丹牡丹种子的休眠和萌发特性[J].植物生理学通讯,1995,31(4):260-262.
- [3] 杨增海.园艺植物组织培养[M].北京:农业出版社,1987.
- [4] 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.
- [5] 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,2001,30(3):62.
- [6] 黄守印.牡丹胚培养与植株再生[J].植物生理学通讯,1987(2):54-55.
- [7] 陈文华.木本植物组织培养技术及应用[M].北京:高等教育出版社,1991.
- [8] 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.
- [9] Gildow F E, Mitchell J P. Initiation growth and nuclear characteristics of tissue cultures of *paonia suffruticosa* [J]. *Physiolplant*, 1977 (39): 295-298.
- [10] 黄守印.牡丹胚培养与植株再生[J].植物生理学通讯,1987(2):54.
- [11] 孔祥生,张妙霞.牡丹离体快繁技术研究[J].西北园艺,1998(3/4):887-893.
- [12] 谢静萱.枯枝牡丹的组织培养[J].植物生理学通讯,1987(2):53.
- [13] 刘淑敏.牡丹“古班同春”组培初报[J].中国花卉盆景,1987(7):24.
- [14] Brukhin V B, Batygina T B. Embryo culture and somatic embryo genesis in culture of *Paenonia anomala* [J]. *Phytomorphology*, 1994, 44 (3/4): 151-157.
- [15] Sunderland N, Dunwell J M, Robert M. Anther culture in the genus *Paenonia* [J]. *John Innes Annu Rep*, 1975, 66: 57-60.
- [16] Robeerts M, Sunderland N. Pollen culture in *paenonia* [J]. *John Innes Annu Rep*, 1977(68): 60-61.
- [17] Albers M R J. Micropagation of *Paenonia* [J]. *Acta Horticulture*, 1992 (314): 85-92.
- [18] Bouza L, Jacques M, Miginiac. In vitro propagation of *Paenonia suffruticosa* Andr. cv. ‘Mme de Vatro’: developmental effects of exogenous hormones during the multiplication phase [J]. *Scientia Horticulturae* 1994(3): 241-251.
- [19] Zillis M R, Meyer M M. Rapid in vitro germination of mature dormant embryos [J]. *Plant Prol Soc* 1976, 26: 272-275.
- [20] 张俊琦,罗晓芳.牡丹组织培养中褐化的发生原因与防止方法的研究[J].沈阳农业大学学报,2006,37(5): 720-724.

‘Fengdan’ Embryo Culture and Plantlet Regeneration of Peony

JIA Wen-qing, LIU Hui-chao

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

Abstract: The mature embryo of ‘Fengdan’ was used as explant to study the effect of different hormone on shoot induction and rooting. Results showed that the optimum medium for production of multiple shoot from seed leaf was MS+6-BA 2.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L. The optimum medium for rooting was 1/2MS+IBA 1.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L, the rooting rate reached 60.17%.

Key words: Peony; Embryo; Multiple bud; Rooting