

# 三种牡丹组织培养比较研究

范小峰, 郭小强, 马世荣

(陇东学院 生命科学系, 甘肃 庆阳 745000)

**摘要:**以3种牡丹的茎尖为外植体, 研究不同品种牡丹茎尖在不同激素配比条件下, 愈伤组织和丛生芽的诱导、芽的生长及生根情况。结果表明: 适合3种牡丹丛生芽产生的最佳培养基, 紫斑牡丹为 MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.2 mg/L+GA<sub>3</sub> 0.1 mg/L+Vc 100 mg/L, 青心白为 MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L+CH 100 mg/L, 朝霞为 MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.5 mg/L+CH 100 mg/L+Vc 100 mg/L; 适合3种牡丹生根的培养基为 1/2MS+IAA 1.0 mg/L+IBA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L, 其中, 朝霞生根效果最佳, 生根率可达 82.35%, 紫斑牡丹和青心白分别为 75%和 50%; 活性炭和 Vc 可有效防止褐化的发生。

**关键词:** 牡丹; 茎尖; 组织培养; 快速繁殖

**中图分类号:** S 685.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)04-0132-03

牡丹 (*Paeonia suffruticosa*) 为我国的名贵花卉, 它不但有极高的观赏价值, 而且其根皮为中药中的“丹皮”, 含有丹皮酚等多种生物活性物质, 具有清热凉血、活血化淤之功效, 主治中风、腹痛、月经不调、淤血、慢性阑尾炎以及头痛和关节痛等症<sup>[1]</sup>, 药用价值很高。牡丹通常用播种、分株或嫁接的方法繁殖, 繁殖系数低, 周期长, 速度慢<sup>[2]</sup>, 通过实生苗或分株苗获取药用成分, 存在资源严重不足等困难, 因此, 应用植物组织培养技术进行牡丹的快速繁殖和细胞培养以提取有效药用成分, 不但具有周期短、可控性强等优点, 更重要的是可筛选有效成分含量高的细胞系, 并通过培养条件的调整, 促进目的产物的合成, 是开发牡丹药用价值的有效途径。

关于牡丹的组织培养, 国内曾作过一些工作<sup>[3-9]</sup>, 但至今仍未有较成熟的技术直接用于生产实践中, 特别是子午岭林区的紫斑牡丹, 属国家珍稀濒危三级保护植物, 其组织培养未见系统报道。试验以子午岭野生紫斑牡丹、2种栽培牡丹青心白和朝霞的顶芽为材料, 进行了愈伤组织诱导和植株再生的比较研究, 旨在为牡丹的组织培养提供科学的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

3个牡丹品种为朝霞 (cv. ZhaoXia)、青心白 (cv.

QingXinBai) 及子午岭林区的紫斑牡丹 (*Paeonia rockii*)。

### 1.2 试验方法

于当年4月取牡丹的顶芽或带芽茎段, 洗衣粉水擦洗, 流水冲洗2~3 h, 70%(V/V)乙醇消毒5~8 s, 无菌水冲洗2次, 再用0.1% HgCl<sub>2</sub>消毒6~8 min, 无菌水冲洗5~7次后, 在超净工作台上用尖嘴镊子将顶芽或侧芽苞片层层剥离, 在其基部横切, 将生长点挤出接种到诱导培养基中, 暗培养7~8 d后移至培养架照光培养, 建立无性系。

经过30 d的初代培养, 比较不同牡丹的生长情况, 筛选出最佳培养基用以继代。为了获得更多无性系芽, 将萌发的单芽分割, 接种到继代培养基上, 并统计不同牡丹的生长增殖情况, 同时, 采取①在培养基中加入活性炭、Vc等抗氧化剂; ②缩短转接周期; ③接种后先放入4℃冰箱中, 10~15 d再取出置于培养架, 用3种方案以抑制芽的褐化。将高度大于3 cm、且生长健壮的丛生芽和不定芽切下转入生根培养基上诱导生根。

### 1.3 培养基及培养条件

以MS或1/2MS为基本培养基, 添加不同的植物生长调节剂, 蔗糖3.0%和琼脂0.35%, pH 5.8; 培养温度为(25±2)℃, 光照时间为12~14 h/d, 光照强度为1500~2000 lx。

## 2 结果与分析

### 2.1 无性系的建立

将生长点接种在启动培养基中培养, 其中紫斑牡丹发生较早, 第3天芽已开始萌动(图1a), 其余2种牡丹芽萌动较迟。20 d后统计结果如表1。

在无性系建立过程中, 不同浓度的6-BA、NAA、IBA配合使用, 3种牡丹芽的反应不同, 0.5 mg/L的6-BA与

第一作者简介: 范小峰(1966-), 女, 甘肃西峰人, 硕士, 副教授, 现主要从事植物生理学和植物组织培养研究工作。E-mail: qyszxf@126.com。

基金项目: 甘肃省科技攻关计划资助项目(2GS035-A41-001-06); 甘肃省教育厅研究生导师科研资助项目(0701-23)。

收稿日期: 2009-10-10

0.05 mg/L 的 NAA 配合,有助于牡丹愈伤组织的产生,但不利于芽的生长,萌芽率均低于 1 号对照,可能是细胞分裂素/生长素比例相对较低,而牡丹对 NAA 较敏感,致使外植体脱分化产生大量愈伤组织;6-BA 和 IBA 配合,既利于 3 种牡丹芽的萌发,也利于组织脱分化产生愈伤组织,且二者浓度均为 0.5 时,芽生长最好,3 种牡丹萌芽率均较高,但随着 IBA 浓度的提高,除紫斑牡丹外,其余 2 种萌芽率有下降的趋势;3 种牡丹中,紫斑牡丹芽易萌发,在不含任何激素的 1 号或 6-BA 和 IBA 表 1

不同生长调节剂对 3 种牡丹芽生长的影响

编号	植物生长调节剂/ mg · L <sup>-1</sup>				CH	Vc	品种	接种数/ 个	萌芽数/ 个	萌芽率/ %
	6-BA	NAA	IBA	GA <sub>3</sub>						
1	0	0	0	0	0	0	青心白	7	3	23.33
							紫斑牡丹	8	3	37.50
							朝霞	6	2	33.33
2	0.5	0.05	0	0	0	0	青心白	10	2	20.00
							紫斑牡丹	7	2	28.57
							朝霞	12	2	16.67
3	0.5	0	0.5	0	100	0	青心白	9	5	55.56
							紫斑牡丹	10	4	40.00
							朝霞	8	5	62.50
4	1.0	0	0.5	0	100	100	青心白	10	3	30.00
							紫斑牡丹	9	3	33.33
							朝霞	12	5	41.67
5	0.5	0	0.2	0.1	0	100	青心白	8	2	25.00
							紫斑牡丹	11	7	63.64
							朝霞	9	2	22.22

2.2 丛生芽的产生及生长

将 3 种牡丹的单芽(图 1b)分别接种到 MS+6-BA 0.5+IBA 0.5+CH 100 培养基中,7 d 后 3 种牡丹叶腋先后有侧芽不同程度萌发,其中,紫斑牡丹发生最早。

比较发现,紫斑牡丹生长最好,叶片较大,分化芽数多(图 1c),且繁殖系数最高,可达 3.30;青心白生长一般,叶片卷曲,分化芽数少(图 1d),繁殖系数为 2.80;朝霞生长最差,且叶片膨大,略有玻璃化,繁殖系数仅为 2.33。

2.3 愈伤组织的产生及分化

在无性系建立和继代培养过程中发现,部分接触到培养基的叶片表面或单芽基部膨大,高度愈伤化。培养一段时间后,愈伤组织和叶片表面脱分化产生绿色芽点,进一步形成不定芽(图 1e)。3 种牡丹中,尤以朝霞发生频率最高,说明朝霞较其它 2 种牡丹对激素敏感,易脱分化和再分化。

2.4 褐化及防治

在牡丹的组织培养中,遇到的最大难题是褐化,由于牡丹根及茎中均含有大量的酚类化合物,在培养过程中极易褐化,严重影响了组培苗的生长。

结果显示,3 种方法相比较,方法②在实际生产中不但增加了工作量,而且不经济,可操作性较小,方法③虽然可明显抑制褐化,但低温影响苗的正常生长,不利于无菌苗的快繁,只有方法①切实可行,在相同培养条件

浓度均较低的 4 号培养基中,萌芽率均高于朝霞和青心白,且生长良好,叶片较大,分化芽数较多;加入适量 GA<sub>3</sub>有利于芽的生长,尤其紫斑牡丹可产生大量丛生芽,而且芽生长快,经过 1 个继代周期,平均高度可达 5.2 cm。筛选出适合紫斑牡丹、青心白、朝霞丛生芽产生及生长的最佳培养基分别为 MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.2 mg/L+GA<sub>3</sub>0.1+Vc 100 mg/L, MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L+CH 100 mg/L, MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.5 mg/L+CH 100 mg/L+Vc 100 mg/L。

下,青心白褐化较轻,而朝霞和紫斑牡丹褐化严重,而且褐化的芽长势较弱,不易生根,未褐化的芽长势良好,生根容易。

2.5 生根培养

将符合标准的单芽接入生根培养基(以 1/2MS 为基本培养基)中,25 d 后 3 种牡丹不同程度生根,结果如表 2。在各种生根培养基中,朝霞生根效果最佳(图 1f),较其它 2 种容易,生根率最高可达 82.35%。紫斑牡丹和青

表 2 不同植物生长调节剂对 3 种牡丹生根的影响

编号	植物生长调节剂/ mg · L <sup>-1</sup>			品种	接种数 / 个	生根数 / 个	生根率 / %
	IAA	IBA	NAA				
1	0.0	1.0	0.2	朝霞	13	8	61.54
				青心白	12	1	8.33
				紫斑牡丹	15	1	6.66
2	1.0	2.0	0.2	朝霞	17	14	82.35
				青心白	10	5	50.00
				紫斑牡丹	8	6	75.00
3	2.0	3.0	0.2	朝霞	13	5	30.77
				青心白	10	2	20.00
				紫斑牡丹	12	3	25.00
4	2.0	2.0	0.5	朝霞	11	6	54.55
				青心白	12	1	8.33
				紫斑牡丹	16	4	25.00
5	2.0	3.0	0.5	朝霞	9	5	55.56
				青心白	11	2	18.18
				紫斑牡丹	13	1	7.69

心白分别为 75% 和 50%，这与试验中愈伤组织再分化产生不定芽结果相一致，说明 3 种牡丹中，朝霞对外源生长素最敏感，易再分化产生新器官，牡丹较难生根，在 1/2MS 培养基上，IAA、IBA、NAA 3 种生长素低浓度配合，可有效诱导不定根产生，浓度较高反而影响生根，筛选出牡丹最佳生根培养基为 1/2MS+IAA 1.0 mg/L+IBA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L；青心白在生根培养中，褐化较轻，其它 2 种牡丹褐化比较严重。

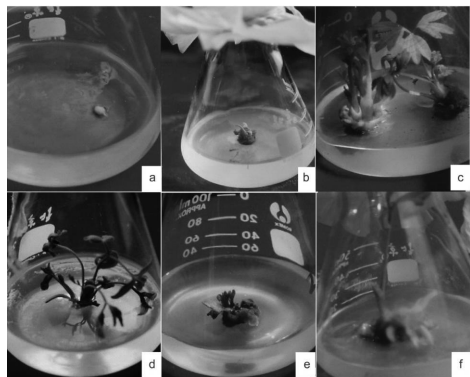


图 1 a. 无性系建立第 3 天的芽；b. 萌发的单芽；c. 紫斑牡丹产生的丛生芽；d. 青心白产生的丛生芽；e. 愈伤组织及不定芽的产生；f. 朝霞单芽生根。

### 3 结论与讨论

通过 3 种牡丹茎尖培养比较发现，牡丹的增殖均可通过产生丛生芽、愈伤组织再分化或叶片直接产生不定芽的方式进行。在丛生芽生长过程中，在 MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L+CH 100 mg/L 培养基上，紫斑牡丹芽生长良好，增殖系数最高，而朝霞芽生长较差，且易发生玻璃化，说明不同品种牡丹对 6-BA 的敏感程度不同。试验还发现，牡丹的愈伤组织较易诱导，6-BA 与

NAA 或 IBA 配合使用均可诱导愈伤组织发生，该结果与陈怡平等<sup>[5]</sup>以紫斑牡丹的营养器官为外植体诱导愈伤组织的结果略有不同。

继代培养中，牡丹芽基部切口处易发生褐化，这与组织中含有酚类物质密切相关，由于机械损伤打破了底物与酶的空间分隔而使底物与酶接触，从而使酚氧化成红褐色的醌类物质，比较发现在整个组培过程中，青心白褐化最轻，而紫斑牡丹和朝霞褐化严重，这可能与各自组织内酚类物质含量有关，有待进一步试验证明。为了探索切实有效防止芽褐化的途径，试验比较发现，虽然通过缩短增殖周期可有效防止褐化，但在实际生产中，不但加大了工作量，而且不经济，提高了生产成本，只有在培养基加入活性炭或 Vc 等抗氧化剂的方法切实可行。

生根率低是长期以来制约牡丹生产的因素之一，比较发现，以 1/2MS 为基本培养基，较低浓度的 IAA、IBA 和 NAA 配合使用，可有效诱导牡丹根的产生，其中朝霞脱分化和再分化能力较强，生根率最高，紫斑牡丹次之，青心白最低，筛选出适合 3 种牡丹生根的培养基为 1/2MS+IAA 1.0+IBA 2.0+NAA 0.2。但 3 种牡丹生根均不太理想，需进一步探讨。

### 参考文献

- [1] 刘立品. 子午岭木本植物志[M]. 兰州: 兰州大学出版社, 1998.
- [2] 李嘉珏. 中国牡丹与芍药[M]. 北京: 中国林业出版社, 1999.
- [3] 谭文澄, 戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991.
- [4] 黄守印. 牡丹胚培养与植株再生[J]. 植物生理学通讯, 1987, 25(2): 54.
- [5] 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, 2001, 37(3): 66-69.
- [6] 何桂梅, 成仿云, 李萍. 两种牡丹胚珠与幼胚离体培养的初步研究[J]. 园艺学报, 2006, 33(1): 185.

## Comparative Studies on The Tissue Culture of Three Species of Peony

FAN Xiao-feng GUO Xiao-qiang MA Shi-rong

(Department of Life Science Longdong University, Qingyang Gansu 745000)

**Abstract:** The stem apex of three peony were used to research induction of callus and cluster buds, buds growth and rooting in the compounding proportions of different hormones. The results indicated that the optimal medium for cluster buds inducing of three peony, *Paeonia rockii* was MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.2 mg/L+GA<sub>3</sub> 0.1 mg/L+Vc 100 mg/L, cv. QingXinBai was MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L+CH 100 mg/L, cv. Zhao Xia was MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.5 mg/L+CH 100 mg/L+Vc 100 mg/L; the optimal medium for rooting was 1/2MS+IAA 1.0 mg/L+IBA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L, the rooting rate was 82.35% of cv. ZhaoXia and the best, *Paeonia rockii* and cv. QingXinBai were 75% and 50%; activated carbon and Vc could prevent the occurrence of browning effectively.

**Key words:** *Paeonia suffruticosa*; stem apex; tissue culture; rapid propagation