

牡丹胚培养及丛生苗继代培养研究

刘会超, 贾文庆, 王 坤

(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, 研究不同植物生长调节剂对胚苗生长、诱导丛生芽的影响。结果表明:用 0.5% 的多菌灵消毒过的种子污染率降低; 胚生长最适培养基 MS+6-BA 1.5 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L+GA₃ 0.1 mg/L; 分化不定芽最佳培养基 MS+6-BA 2.5 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L。

关键词:牡丹; 胚; 丛生芽

中图分类号:S 685.110.36 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)06-0172-03

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。牡丹是原产我国的木本名贵观赏花卉,花大色艳、雍容华贵、芳香浓郁,

第一作者简介:刘会超(1964),男,河南南阳人,博士,教授,硕士生导师,现从事观赏植物生物技术研究工作。E-mail: liuhc918@yahoo.com.cn。

通讯作者:贾文庆(1979),男,河南淮阳人,硕士,讲师,现从事观赏植物生物技术研究工作。E-mail: jiawq99@126.com。

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);河南科技学院重点资助项目(050121)。

收稿日期:2009-12-20

而且品种繁多,素有“国色天香”、“花中之王”的美称,长期以来被人们当作富贵吉祥、繁荣兴旺的象征^[1]。牡丹常用播种、分株、压条、扦插和嫁接等传统方式繁殖,在实际生产中存在育苗周期长、幼苗不整齐等问题。利用组织培养途径进行牡丹的繁育已经取得了进展,在芽培养、茎尖培养、叶及叶柄培养、种子培养进行了较为深入的研究^[2],但有关牡丹胚培养诱导出丛生芽的研究甚少。该试验通过对胚培养及丛生苗继代培养研究,为实现牡丹快速繁殖提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

牡丹品种‘凤丹白’种子,2008年10月采于洛阳国家牡丹基因库。

[9] Igasaki, Mohrit, Ichikawa H, et al. Agrobacterium tumefaciens mediated transformation of Robinia pseudoacacia [J]. Plant Cell Reports, 2000, 19(5): 448-453.

[10] 夏阳,梁慧敏,陈受宜,等.四倍体刺槐转甜菜碱醛脱氢酶基因的研究[J].中国农业科学,2004,37(8):1208-1211.

[11] 董振红,王贵民,王彦超,等.甜叶菊茎尖组培苗生根及移栽的研究

[J].中国糖料,2008(2):29-30.

[12] 张子学,杨久峰,檀赞芳.植物生长调节剂对甜叶菊增殖和生根的影响[J].中国林副特产,2008(2):13-15.

[13] 王清连.植物组织培养[M].北京:中国农业出版社,2000:16.

[14] 孙静秋,夏铃风,周传余.大岩桐试管结球的初步研究[J].上海农业学报,2003,19(4):64-66.

Study on Rooting Culture of Stevia Tissue-cultured Plant

SHANG Hong-qin

(Department of Life Science, Heze University, Heze, Shandong 274015)

Abstract: With the tissue-cultured seedling of *Stevia rebaudianum* Bertoni as materials, it researched the effects of media, NAA concentrations and activated charcoal on Stevia rooting culture. The results showed that 1/2MS basic medium was better than 2MS, MS and 1/4MS media for rooting induction. The best rooting induction medium was 1/2 MS medium supplemented with 0.2 mg/L NAA, on which the induction percentage was 83.3%, roots were thicker and longer than those of other treatments. Rooting induction was accelerated, and root numbers were enhanced by the addition of 0.3% activated charcoal.

Key words: *Stevia*; media; NAA concentration; activated charcoal; rooting

1.2 试验方法

1.2.1 胚培养 参照黄守印的方法,略有修改。将经过最佳层积处理的种子放入自来水中,吸水膨胀后进行以下处理:用 0.5%多菌灵浸泡 8 min,用水冲洗 30 min,然后在超净工作台用 70%酒精消毒 50~60 s,用无菌水冲洗 3~5 遍,0.1%升汞溶液浸泡 7~8 min,无菌水冲洗 6 次,每次 1 min。将胚接种到胚生长培养基(见表 1)中培养。接种后 30 d 观察幼苗生长情况,调查不同激素配比对牡丹幼苗生长的影响。

表 1 胚培养培养基			
培养基	6 BA /mg ° L ⁻¹	2 4 D /mg ° L ⁻¹	GA ₃ /mg ° L ⁻¹
A ₁	2.0	0.05	0.1
A ₂	2.0	0.1	0.1
A ₃	2.0	0.2	0.1
A ₄	2.0	0.5	0.1
A ₅	1.5	0.05	0.1
A ₆	1.5	0.1	0.1
A ₇	1.5	0.2	0.1
A ₈	1.5	0.5	0.1

1.2.2 不同生长调节剂组合对丛生芽诱导的影响 胚培养 30 d 后,将幼苗转接于丛生芽诱导培养基(见表 2)中培养。30 d 后观察丛生芽的诱导情况,调查不同激素配比及不同苗龄对牡丹丛生芽诱导分化的影响。

表 2 不同生长调节剂组合对丛生芽诱导的影响

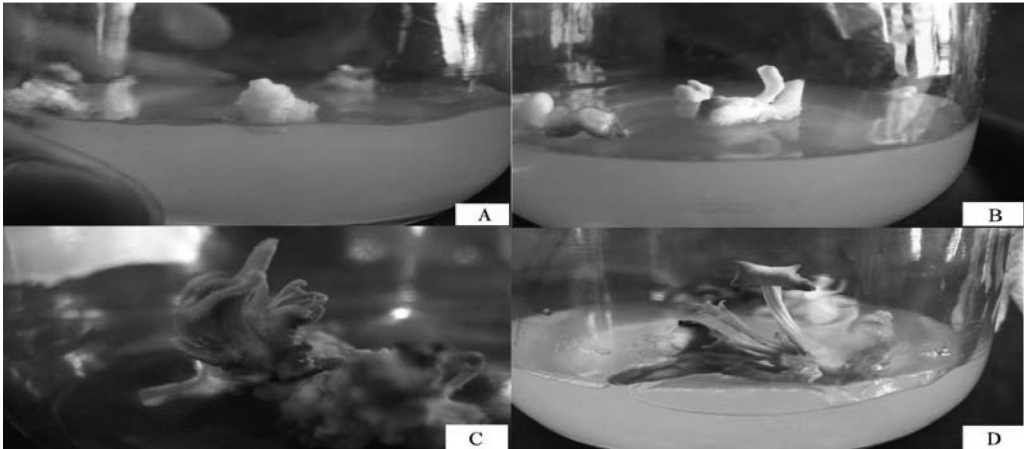
培养基	6 BA /mg ° L ⁻¹	2, 4 D /mg ° L ⁻¹
C ₁	2.0	0.05
C ₂	2.0	0.1
C ₃	2.0	0.2
C ₄	2.0	0.5
C ₅	2.5	0.05
C ₆	2.5	0.1
C ₇	2.5	0.2
C ₈	2.5	0.5

1.2.3 培养条件 培养基均附加 3%蔗糖、0.54%琼脂,pH 调至 5.6。接种后置于培养架上,培养室内培养温度 25℃左右,光照强度 1 000~1 500 lx,光照时间 14 h/d。

2 结果与分析

2.1 不同激素组合对胚培养的影响

从表 3 可看出,在 6-BA 浓度为 2.0 mg/L 的条件下,2,4-D 浓度在 0.05~0.5 mg/L 之间变化时,成苗率出现升高的趋势,2,4-D 浓度为 0.5 mg/L 达 65%,而苗高出现先升高后下降的趋势;2,4-D 浓度为 0.2 mg/L 时,平均苗高可达 1.04 cm;在 6-BA 浓度为 1.5 mg/L,2,4-D 浓度在 0.05~0.5 mg/L 之间变化时,成苗率与平均苗高均较高,成苗率出现先升高后下降的变化趋势,其中 2,4-D 浓度为 0.1 mg/L 时,成苗率最高达 90%;在 2,4-D 浓度为 0.05mg/L 时,平均苗高最高可达 1.39 cm。



图版说明: A、B 凤丹白胚苗; C、D 胚苗分化的丛生芽。

表 3 不同激素组合对胚培养的影响							
培养基	接种个数	6-BA /mg ° L ⁻¹	2,4-D /mg ° L ⁻¹	成苗数	成苗率 / %	平均苗高 / cm	长势状况
A ₆	20	2.0	0.05	10	50	0.87	幼苗生长良好
A ₇	20	2.0	0.1	12	60	0.94	苗长势良好
A ₈	20	2.0	0.2	12	60	1.04	幼苗健壮
A ₉	20	2.0	0.5	13	65	0.93	幼苗健壮
A ₁₀	20	1.5	0.05	17	85	1.39	苗壮、叶绿
A ₁₁	20	1.5	0.1	18	90	1.26	苗壮、叶深绿
A ₁₂	20	1.5	0.2	15	75	1.19	幼苗生长健壮
A ₁₃	20	1.5	0.5	15	75	1.13	苗壮、叶出现畸形

注:成苗率=(成苗数/接种外植体数)×100%。

2.2 不同生长调节剂组合对幼苗产生丛生芽的影响

将牡丹幼苗接种于同时添加了 6-BA 和 2,4-D 的诱导培养基上 2 d 后, 丛生芽开始从子叶基部萌发, 接种 30 d 后, 最长的芽达 2.6 cm 高。从表 4 可看到, 当 6-BA 浓度 2.0 mg/L 的条件下, 2,4-D 在 0.05~0.5 mg/L 之间丛生芽的诱导率较低, 当 6-BA 浓度在 2.5 mg/L 的条件下, 2,4-D 在 0.05~0.5 mg/L 之间变化时, 丛生芽诱导率呈现出先升高后降低的变化趋势, 其中 2,4-D 浓度为 0.1 mg/L 时的丛生芽诱导率高达 83.3%, 而当 2,4-D 浓度继续升高时其诱导率反而下降。

可见, 6-BA 与 2,4-D 对丛生芽的诱导作用明显。在 2,4-D 浓度为 0.05~0.1 mg/L, 6-BA 浓度在 2.5 mg/L 时对丛生芽的分化较为有利, 其中又以 MS+6-BA 2.5 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L 培养基的诱导率最高 (83.3%)。

表 4 不同激素浓度组合对幼苗产生丛生芽的影响

培养基	6-BA / mg · L ⁻¹	2,4-D / mg · L ⁻¹	接种个数	外植体产生芽数	诱导率/%
C ₁	2.0	0.05	15	1	6
C ₂	2.0	0.1	10	1.67	33.3
C ₃	2.0	0.2	12	1.33	25
C ₄	2.0	0.5	13	1.5	15.4
C ₅	2.5	0.05	15	1.13	53.3
C ₆	2.5	0.1	18	1.13	83.3
C ₇	2.5	0.2	16	1.29	43.8
C ₈	2.5	0.5	16	1	31.2

注: 诱导率(%)=(产生芽外植体数/接种外植体数)×100%。

3 结论与讨论

试验中, 牡丹胚培养及丛生芽诱导均需要适宜的 2,4-D 与 6-BA, 低浓度的生长素 2,4-D 与适当范围的细胞分裂素 6-BA 配合使用达到理想效果。胚培养最适培养基 MS+6-BA 1.5 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L+GA₃ 0.1 mg/L。

L, 幼苗分化不定芽最佳培养基 MS+6-BA 2.5 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L。

在牡丹组织培养中, 外植体褐变是导致培养失败的主要原因。外植体表面的褐化会严重影响营养物质的吸收, 不利于培养物的生长^[3-5]。温度、光照、转瓶周期、外植体大小及操作过程中外植体嵌入培养基深度对褐变均有影响^[6,7]。而加快继代转瓶的速度, 及时更换新鲜培养基, 可以减轻酚类物质对培养材料的毒害作用。牡丹在转接时容易褐化死亡, 试验在培养基中加入 0.5 g/L 的活性炭或适量抗坏血酸及暗处理能避免或减轻褐化, 丛生苗生长良好。

作为固化剂的琼脂在培养基中起支撑作用, 一般琼脂浓度为 5.2 g/L。近几年, 很多学者研究发现琼脂还有其它方面的作用。比如, 高浓度的琼脂可降低试管苗的褐化。但是, 过高浓度的琼脂使得各种养分与激素在琼脂中扩散较慢不利培养物吸收, 且浓度高抑制组织代谢活性, 会对离体培养物造成毒害^[8]。该试验中的琼脂最佳浓度为 5.4 g/L。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 贾文庆, 刘会超, 姚连芳. 牡丹组织培养研究进展[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(12): 2725-2727, 2729.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 谢静莹. 桔枝牡丹的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1987(2): 53.
- [6] 贾文庆, 刘会超. 牡丹鳞芽离体培养的初步研究[J]. 河南科技学院学报, 2009(1): 42-45.
- [7] 刘会超, 贾文庆, 姚连芳. 矮牡丹子叶不定芽的诱导和生根[J]. 江苏农业学报, 2009, 25(2): 436-437.
- [8] 周俊辉, 周家容, 曾浩森, 等. 园艺植物组织培养中的褐化现象及抗褐化研究进展[J]. 园艺学报, 2000, 27(增刊): 481-48.

The Culture of Peony Embryo and Subculture of Multiple Bud

LIU Hui-chao, JIA Wen-qing, WANG Kun

(Landscape department of Landscape college, Henan institute of science and technology, Xinxiang, Henan 453003)

Abstract: The mature embryo of Feng Danbai was used as explant to study the effect of different hormone on the growing of embryo seedlings and the induction of multiple buds. The results showed that the seeds sterilized by Carbendazim of 0.5% lowered pollution rate and the optimum medium for embryo culture was MS+6-BA 1.5 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L+GA₃ 0.1 mg/L. Besides, the optimum medium for production of multiple shoot was MS+6-BA 2.5 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L.

Key words: peony; embryo; multiple bud