

芍药组织培养的研究进展

薛银芳, 赵大球, 周春华, 陶俊

(扬州大学 园艺与植物保护学院, 江苏 扬州 225009)

摘要:利用组织培养进行繁育是芍药商品化和产业化发展的必然趋势。现从外植体选择与处理、再生体系途径(愈伤组织途径、丛生芽途径、体细胞胚途径)、目前组培中存在的问题(主要是褐化和玻璃化)等方面,综述了芍药组织培养研究现状,并对今后的发展进行了展望,旨在为芍药的生产提供重要信息。

关键词:芍药;组织培养;外植体;再生途径

中图分类号:S 682.1⁺2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)04-0167-04

芍药是芍药科芍药属的多年生草本花卉,在中国的栽培历史长达数千年^[1],被人们誉为“花相”。芍药的传统繁殖方式为播种、分株、扦插、压条繁殖,但繁殖系数低^[2],速度慢,不能满足日益增长的市场需求。同时,芍药目前繁殖方法的滞后也限制了其种质资源保存及新品种选育工作的开展。采用组织培养方法,不仅能在短期内获得大量植株,而且通过组织培养建立的再生体系,也为转基因改良提供了重要的前提条件^[3]。

芍药的组织培养有几种途径:愈伤组织脱分化途径、丛生芽途径、体胚途径,根据这几个途径及在培养期间存在的问题,近年来人们对芍药组织培养进行了一些研究。现通过对当前芍药组培技术的综述,为芍药种苗快繁生产技术的现代化提供科学的理论依据,并为以后的芍药种质资源保存、新品种选育等相关研究提供有价

值的参考。

1 外植体的选择和处理

1.1 外植体的选择

所谓外植体,是指被用来进行组织培养的植物组织、器官甚至是细胞材料,组培中常见的外植体主要有茎尖、茎切段、叶片、胚等^[4]。外植体的选择对组培快繁的成功十分重要。由于外植体取材部位、时间以及生理状态不同,其对外界诱导反应的能力及分化再生的能力也不同^[5]。一般来说,较大的外植体有较强的再生能力,而较小的外植体的再生能力则较弱^[6]。芍药的组织培养常用的外植体有种子、胚、上胚轴、茎段、茎尖、根尖、芽、叶片、叶柄、花药等。黄凤兰等^[7]、潘瞳等^[8]在对芍药愈伤组织的诱导试验中均发现茎段为最佳外植体,其次是叶柄,叶片的效果最差。王吉凤等^[9]在对芍药4种外植体的愈伤组织诱导及分化研究中发现,胚轴诱导效果最好,其诱导率可达到100%,且可以分化出不定芽,而其它3种外植体的愈伤诱导率均低于100%,其顺序依次为:茎段>叶柄>叶片,这与前人的研究结果相一致。

另外,外植体的取材时间对于组培也有重要影响。在芍药的茎尖培养中,金飏等^[10]认为取材以1月份或4℃冷藏处理5~6周为最佳,取材过早休眠尚未解除,生长较慢,苗弱;过迟芽已生长,灭菌困难。母代芽应选择

第一作者简介:薛银芳(1986-),女,硕士,现主要从事园艺植物栽培与生理研究工作。

责任作者:陶俊(1966-),男,博士,教授,博士生导师,现主要从事园艺植物栽培生理与分子生物学等研究工作。

基金项目:江苏省科技支撑计划(农业)资助项目(BE2009318);江苏省科技基础设施建设计划(科技公共服务平台)资助项目(BM2010590)。

收稿日期:2011-12-14

From 1985 to 1990, the total cultivation area and yield of citrus had been increased rapidly. But from 1992 to 2000, the total cultivation area and yield of citrus had been significantly decreased. Since 2001, the total citrus cultivation area and yield in Guangdong increased rapidly year by year. And the total cultivation area and yield were reached $27.6 \times 10^4 \text{ hm}^2$ and $322.1 \times 10^4 \text{ tons}$, respectively in 2009. The citrus production in Guangdong were still most important in the whole country. Guangdong already formed the citrus favorable areas with distinctive local characteristics according to local climate conditions. The Yangjiang, Zhaoqing and Northern mountains were the citrus favorable areas in Guangdong. And the per unit area yield were significantly different in the different areas.

Key words: citrus; cultivation area; yield; favorable areas

11~12月上、中旬和春季3月份较好,有利于萌动和分化;9~10月取地下芽培养,效果最差^[11]。

1.2 外植体的灭菌

外植体的灭菌是植物组培工作中的重要环节,它既要求将外植体表面的微生物彻底杀死,又要求尽可能少伤害外植体组织和表层细胞^[12]。前人的研究表明,0.1% HgCl_2 对芍药外植体消毒具有十分重要的作用^[8,13]。叶片最佳消毒时间为5 min,叶柄为8 min,休眠芽为10 min,茎段则需要15 min。但也有人提出叶片的最佳消毒方式是先用70%酒精消毒30 s,再用1:10的84消毒液浸泡12 min,且近轴面接触培养基能减轻外植体褐化的程度^[9]。

2 芍药再生体系的研究

植物体外再生有2种类型,即器官再生和胚状体再生。器官发生途径通常可以分为器官间接发生途径与器官直接发生途径2种类型,在芍药组织培养中,目前见报道的器官再生途径主要是通过愈伤组织脱分化的器官间接发生途径和通过茎芽、腋芽直接诱导丛生芽的器官直接发生途径。胚状体途径是指外植体按胚胎发生方式形成再生植株的过程,体细胞胚状体途径在芍药组织培养方面目前也有少量报道。

2.1 器官发生途径

2.1.1 愈伤组织诱导 在芍药愈伤组织培养中,影响较大的因素是培养基中激素和营养元素的种类及含量。另外,不同芍药品种、培养条件等也会对愈伤组织诱导产生一定的影响。首先,激素的种类与用量对愈伤组织诱导及增殖有显著影响。前人的研究表明,生长素与细胞分裂素均能促进愈伤组织的产生,配合使用效果好于单一处理^[14],而且同种激素对愈伤组织诱导效果也不尽相同^[15]。赵明等^[16]发现芍药愈伤的形成对6-BA用量水平敏感,但单独使用时诱导愈伤组织所需时间太长。赵蓉^[15]则认为6-BA、NAA、2,4-D三者结合时,诱导芍药愈伤组织的效果最佳,而且同属生长素的2,4-D对愈伤组织的诱导效果比NAA好,IBA效果则最差。由于选择的外植体不同,每种激素在诱导时的最佳含量尚需进一步研究。另外,培养基中营养元素种类和含量、不同芍药品种、培养条件等也会对愈伤诱导产生影响。赵蓉^[15]发现 Ca^{2+} 在芍药的组培中起着重要作用,适当浓度的 Ca^{2+} 能提供芍药愈伤组织诱导及增殖必需的营养,并能有效抑制褐化现象。当 Ca^{2+} 浓度为基本培养基中含钙量的2倍时,对芍药愈伤的诱导及增殖效果最好。王吉凤^[17]发现不同品种愈伤组织诱导由易到难依次为:‘粉玉奴’>‘莲台’>‘紫凤羽’>‘桃花飞雪’>‘春晓’。潘瞳等^[8]研究还发现,暗培养比光下培养能减轻褐化程度,有利于愈伤组织的诱导。

2.1.2 愈伤诱导不定芽 目前在芍药属植物愈伤组织培养途径中,大多数研究仅止于愈伤组织的诱导,而进行愈伤组织分化的研究尚少,这可能是由于随着愈伤继代培养时间的延长,愈伤最初的植株再生能力逐渐下降,甚至完全消失。胡映泉等^[18]以芍药嫩茎为外植体进行组织培养研究,在MS+6-BA 3.5 mg/L+蔗糖30 g/L+琼脂6 g/L培养基上诱导出愈伤组织,并进一步诱导形成了不定芽,不定芽诱导率达到了74%;但赵蓉^[15]发现6-BA在2~5 mg/L的浓度范围都不能促使芍药品种‘大富贵’的愈伤组织分化出不定芽,这与胡映泉的研究结果相矛盾,可能是因为不同品种需要不同的浓度要求,具体原因还有待进一步研究验证。

2.1.3 丛生芽途径 直接通过芽增生的方式进行扩繁是目前芍药属植物组织培养的常用途径,因为分化困难,芍药属植物组织培养很少通过愈伤组织途径^[19]。从材料萌发诱导丛生芽方面考虑,选取顶芽和带芽茎段,容易萌动诱导丛生芽,是较有利的取材部位。但是以芍药茎芽为外植体进行组织培养时,虽然萌动快,易诱导丛生芽,但是难以控制污染^[17]。芽启动培养方面,从培养基中添加激素种类和浓度来看,张庆瑞^[20]研究认为 GA_3 是影响芽启动培养最主要的因素,其次是6-BA, NAA效果不明显,但 GA_3 配合6-BA或者NAA使用时芽诱导率最高。潘瞳等^[8]筛选出‘种生粉’地下芽诱导丛生芽的适宜启动培养基与增殖培养基均为1/2MS+ GA_3 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L。Takashi等^[21]以顶芽为外植体,发现在半固体MS培养基中添加0.5 mg/L 6-BA和1.0 mg/L GA_3 ,可明显促进丛生芽的发生。上述研究均表明6-BA和 GA_3 配合使用对芍药丛生芽的诱导效果最好。在试管苗增殖方面,王吉凤^[17]发现IAA对芍药试管苗增殖效果最好,IBA次之。Gabryszewska^[22]研究表明,6-BA、KT、2ip和TDZ单独使用时,腋芽生长但较难增殖;低浓度TDZ配合6-BA、KT和2ip使用时,腋芽增殖率则较高。张庆瑞^[20]研究发现芍药丛生芽特别是簇生短芽伸长时使用 GA_3 效果最好,且能提高增殖倍数,但较高浓度 GA_3 长期刺激会导致芽畸形发育,研究还发现6-BA增殖影响大于KT,6-BA浓度为1 mg/L时效果最好。另外,通过研究葡萄糖和蔗糖、果糖和麦芽糖4种碳源对芍药试管苗增殖和苗高的影响,发现4种碳源间存在显著差异,以葡萄糖效果最好,适宜浓度为35 g/L。

2.1.4 生根培养 无论是愈伤途径还是丛生芽途径,生根对于芍药组培快繁来说都是至关重要的。目前,关于芍药组培苗生根发面的研究均显示其生根率低、生根质量不高^[19],主要是通过调节生长素(IBA、IAA)的浓度来促进其生根,部分文献还强调了活性炭的重要性。郭风云^[11]发现IBA生根效果最好,张庆瑞^[20]发现在IBA浓

度大于 1 mg/L 时,芍药组培苗生根率和平均根长随 IBA 的浓度增加呈下降趋势。IAA 诱导生根效果最差, NAA 诱导的根由愈伤组织分化而形成,根与茎缺乏输导组织的联系,移栽后难以成活。Takashi 等^[21]运用纸桥培养法,在液体培养基中添加 1.0 mg/L IBA 后,根诱导率达到了 57%~100%。黄凤兰等^[7]研究发现 0.4 mg/L IAA 处理幼苗的生根率最高,达 65.0%。兰海英^[23]以芍药胚为外植体进行组织培养,发现在培养基中添加一定程度的活性炭能促进胚根的生长,这可能是由于活性炭的吸光作用给胚根的形成和生长创造了有利的黑暗环境,同时活性炭的吸附作用吸附了一些有害分泌物,也在一定程度上对胚根的形成起到了促进作用。

2.2 体细胞胚状体途径

体细胞胚状体再生具有两极性(同时具有芽端和根端)和完整植株的特性。相比于器官发生途径,体细胞胚状体再生具有发生速度快、数量多、结构完整、再生率高等优点^[24]。Brukhin 等^[25]以芍药种子为材料,对不同发育时期的种子进行胚培养,发现体细胞胚的形成过程与种子发育相似。Kim 等^[26-27]以芍药子叶为外植体进行研究,胚状体在 MS+2,4-D 0.2 mg/L+6-BA 0.2 mg/L 培养基上形成。Kim 等^[28]将种胚和花药接种在含有 ABA 或者 PAA 的 MS 培养基上,均诱导出了体细胞胚,特别是花药,直接接种于 MS 培养基上,就可获得体细胞胚。黄凤兰^[7]研究则认为胚状体分化的最佳培养基为 1/2MS,不需添加任何激素。

3 组织培养存在的问题

目前,芍药的组织培养研究相对于同属的牡丹较滞后,并且存在很多需要解决的问题,一是经过愈伤组织途径诱导芽分化困难;二是目前研究大多选用芽为外植体进行丛生芽诱导,此过程污染常常难以控制,而且此途径只能用于扩繁,无法为遗传转化等研究提供基础;三是在组织培养过程中褐化、玻璃化现象较严重;四是组培苗生长势弱,叶片生长不旺盛,容易发黄皱缩,影响下一步的移栽工作等。这些问题都严重制约了芍药组织培养的研究进展,导致其难以在生产上推广应用。试验在芍药组培过程中发现组培苗发生较为严重的褐化、玻璃化现象,必须采取一定的防治方法来解决这些问题。

3.1 褐化及其防治

芍药在组培过程中外植体存在非常严重的褐化问题^[29-30],这与外植体的种类、选取时期、生理状况及组织培养方式等因素密切相关^[11,31]。赵蓉^[15]以芍药的茎段、叶柄及叶片进行愈伤组织诱导时,发现茎段褐化率较低,其次是叶柄,叶片褐化最严重。安伯义等^[32]研究发现幼茎的总酚含量远低于幼叶和成龄叶。郭风云^[11]认为体积较小、幼嫩的外植体、器官分化度较低的外植体

以及接种时切割面较小的外植体较不易褐化,同时春季外植体褐化率较冬季外植体高。

采用最佳培养基、添加防褐剂、黑暗培养、低温、较短的继代周期都能不同程度的减轻愈伤褐化程度。在同属植物牡丹的研究上,何松林等^[33]发现以 MS 为基本培养基时褐化现象最为严重,其次为 1/2MS,以 WPM 褐化最轻;采用抗氧化剂与吸附剂对褐化进行抑制,发现以 PVP 效果好于维生素 C 和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$;在采取外植体前对母株进行遮光处理以及对材料进行暗培养也有利于抑制褐化;培养基中添加植物生长调节物质(6-BA、NAA)的浓度变化对褐化没有明显影响。张俊琦等^[34]研究发现,添加生长素会加剧启动培养外植体的褐化程度,悬浮培养不能够减缓褐化,PVP 和植物凝胶(Phytigel)能有效缓解褐化,但 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、维生素 C 和铜试剂(DDTC)却加剧了组织培养物的褐化程度,这与何松林的研究结果相反。黄凤兰^[7]在基本培养基中分别加入柠檬酸和维生素 C,外植体的褐化率明显低于对照,并且维生素 C 处理效果优于柠檬酸。

3.2 玻璃化及其防治

在进行植物组织培养时,经常会发生试管苗叶、嫩梢呈透明或半透明的水浸状,整株矮小肿胀,失绿,叶片皱缩且脆弱易碎,这种现象称为“玻璃化”。发生玻璃化现象后,植株很难继续继代培养和扩繁,玻璃苗移栽后难以成活,严重影响组织培养的效率^[35]。

有研究认为,芍药组培苗玻璃化的产生与光照强度密切相关,组培中光照强度应在 $1.60 \times 10^3 \text{ lx}$ 以上^[11];通过降低培养基水势,减少培养基中外源激素的含量(尤其是 6-BA、GA₃ 的含量),也可以有效减轻试管苗的玻璃化^[36];采用适宜的温度(25~28℃)、增加组培容器的透气性(如采用单层封口膜或加牛皮纸的封口膜)等措施均可降低组培苗玻璃化的发生^[37]。

4 展望

近年来,植物组织培养技术作为一种基本的实验技术和基础的研究手段,被广泛应用于植物学、遗传学、育种学、栽培学等各个领域,而且植物组织培养受自然环境的影响较小,并节省土地、劳力和时间^[38],具有广泛的产业化应用前景。芍药的组培技术目前尚处于基础研究阶段,大部分研究内容集中在选择外植体和培养基配方等方面,但还是有少部分研究获得了生根植株,表明利用组培技术离体扩繁芍药植株的方法是可行的,具有良好的产业化发展前景。

参考文献

- [1] 郭先锋. 中国芍药分类学研究进展[J]. 北京林业大学学报, 2002, 24(3): 99-102.
- [2] 秦魁杰. 芍药[M]. 北京: 中国林业出版社, 2004.
- [3] 高莉萍. 月季品种‘萨蔓莎’植株再生体系的建立和根癌杆菌介导

的遗传转化研究[D]. 武汉:华中农业大学,2004.

- [4] 马慧,张立军,阮燕桦,等. 植物组织培养技术的现状及发展趋势[J]. 安徽农业科学,2007,35(6):1602-1604.
- [5] 董少鸣. 愈伤组织培养实验中几种外植体的选择[J]. 承德民族师范高等专科学校学报,2007,27(5):62.
- [6] 张越阳,魏军亚,李开绵. 芒果组织培养研究进展[J]. 热带作物学报,2010,31(2):325-331.
- [7] 黄凤兰,孟凡娟,牛红云,等. 芍药遗传转化再生体系的建立[J]. 东北农业大学学报,2009,40(6):50-57.
- [8] 潘曜,吴红娟,于晓南. 芍药丛生芽及愈伤组织诱导方法初探[C]. 中国观赏园艺研究进展,2009:245-249.
- [9] 王吉凤,李青,孟会. 5个芍药品种愈伤组织诱导及分化研究[J]. 北京林业大学学报,2010,32(3):213-216.
- [10] 金飏,何小弟,吴建华,等. 芍药离体培养初步研究[J]. 江苏农业科学,2005(4):69-71.
- [11] 郭风云. 芍药组织培养技术的研究[D]. 北京:北京林业大学,2001.
- [12] 朱广廉. 植物组织培养中的外植体灭菌[J]. 植物生理学通讯,1996,32(6):444-449.
- [13] 张庆瑞,孙建洲,任凝辉,等. 芍药组织培养技术研究[J]. 河南农业科学,2006(4):88-90.
- [14] 张庆瑞,杨秋生,李永华. 不同植物生长调节物质对芍药离体培养的影响[J]. 河南农业大学学报,2007,41(1):25-28.
- [15] 赵蓉. 芍药愈伤组织诱导及增殖研究[D]. 北京:北京林业大学,2009.
- [16] 赵明,张松荣,何小弟,等. 芍药愈伤组织诱导及遗传转化技术的初步研究[J]. 林业实用技术,2009(1):10-12.
- [17] 王吉凤. 芍药组织培养研究[D]. 北京:北京林业大学,2009.
- [18] 胡映泉,冯海华,时宝凌. 芍药不定芽的诱导技术[J]. 山西林业科技,2003,增(S1):23-24,33.
- [19] 吴红娟,于晓南. 国内外芍药组织培养研究进展[J]. 安徽农业科学,2010,38(2):617-619.
- [20] 张庆瑞. 芍药组织培养技术的初步研究[D]. 郑州:河南农业大学,2006.
- [21] Takashi A H, Michiko A, Takehito K. *In vitro* propagation of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) by a longitudinal shoot-split method [J]. Plant Cell Reports,1989(8):243-246.
- [22] Gabryszewska E. The influence of cytokinins, thidiazuron, paelbutrazol

- and red light on shoot proliferation of herbaceous peony cv. Jadwiga *in vitro* [J]. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research,1998,6(3/4):157-169.
- [23] 兰海英. 芍药的胚培养及芍药苷含量的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古大学,2003.
- [24] 王傲雪,李景富. 植物体细胞胚状体的诱导研究及应用[J]. 黑龙江农业科学,1999(2):39-41.
- [25] Brukhin V B, Batygina T B. Embryo culture and somatic embryogenesis in culture of anoma [J]. Phytomorphology,1994,44(3/4):151-157.
- [26] Kim Y S, Lee B K. Effect of plant growth regulators and culture temperature on embryo culture of *Paeonia albi flora* [J]. Journal of the Korean Society for Horticultural Science,1995,36(2):255-262.
- [27] Kim Y S, Lee B K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotyledon culture of *Paeonia albi flora* [J]. Journal of the Korean Society for Horticultural Science,1996,37(6):827-830.
- [28] Kim H M, Shin J H, Sohn J K. Cryopreservation of somatic embryos of the herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) by air drying [J]. Cryobiology,2006,53:69-74.
- [29] Kunneman B P A M, Albers M R J. Tissue culture of peony is not yet producing plants [J]. Bloembollencultuur,1989,100(23):16-17.
- [30] Seyring M. Loss rate is still too high [J]. TASPO Gartenbaumazin,2000,10(2):30-31.
- [31] 王瑶,岳桦. 芍药属植物组织培养中褐化问题的研究进展[J]. 黑龙江农业科学,2009(2):159-160.
- [32] 安佰义,赵飞. 牡丹不同类型总酚含量与PPO活性研究[J]. 北华大学学报(自然科学版),2005,6(2):169-172.
- [33] 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,2005,23(1):47-50.
- [34] 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.
- [35] 刘庆昌,吴国良. 植物细胞组织培养[M]. 北京:中国农业大学出版社,2003:44-45.
- [36] 贾海慧. 影响樱桃试管苗玻璃化的因素与克服措施[J]. 山东林业科技,2010(4):72-73.
- [37] 任东植,李峰,曲云琴. 影响枣组培苗玻璃化的几个因素及其防治[J]. 植物生理学通讯,2000(1):21-23.
- [38] 朱根发. 花卉组织培养-培养基及其配制[J]. 花卉,2002(5):6.

Research Advances of Herbaceous Peony Tissue Culture

XUE Yin-fang, ZHAO Da-qiu, ZHOU Chun-hua, TAO Jun

(College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009)

Abstract: Traditional propagation methods of herbaceous peony have many problems, while propagation seedlings using tissue culture methods is the inevitable trend during development of commercialization and industrialization of herbaceous peony. The research situations of the tissue culture of herbaceous peony were reviewed from three aspects, selection and treatment of explants, regeneration pathways (callus, bud, and somatic embryo), the problems existed in tissue culture (browning and glassing) and so on. The future development of tissue culture in herbaceous peony was prospected in the final. And hoped these illustrations could provide some important information for herbaceous peony production.

Key words: herbaceous peony; tissue culture; explant; regeneration pathway