

牡丹‘乌龙捧盛’不定芽的诱导及增殖

徐小博, 贾文庆, 刘会超, 郑健

(河南科技学院 园艺园林学院, 河南 新乡 453003)

摘 要:以牡丹品种‘乌龙捧盛’侧芽为试材,研究了 MS 和 WPM 2 种基本培养基、不同植物生长调节剂配比、不同蔗糖浓度和继代次数对不定芽诱导和增殖的影响。结果表明:WPM 培养基对侧芽萌发和不定芽的诱导效果优于 MS;不定芽增殖的最佳生长调节剂的组合是 6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L,增殖率最高达 811.23%;蔗糖浓度为 35 mg/L 时玻璃化率最低,更有利于不定芽的增殖;随着继代次数增加,不定芽增殖率先升后降,继代次数为 4 次时不定芽增殖率达最高。

关键词:牡丹;不定芽;继代次数

中图分类号:S 685.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)11-0127-04

牡丹(*Paeonia suffruticosa*)为芍药科芍药属落叶亚灌木,是原产我国的名贵观赏花卉,素有“国色天香”、“花中之王”的美称^[1]。牡丹传统繁殖方式主要以分株和嫁接为主,存在繁殖速度慢、苗木质量参差不齐等问题,严重制约了牡丹的商品化、产业化、规模化生产,牡丹的快速繁殖已成为亟待解决的问题。前人对牡丹的组织培养进行了大量研究,‘乌龙捧盛’是传统牡丹名贵品种,在园林中具有广泛的应用,但以该品种的侧芽作为外植体进行组织培养研究的较少,此外,组织培养中还存在增殖率较低、生长状况不佳等问题^[2-3]。该研究比较分析了基本培养基、植物生长调节剂组合、蔗糖浓度和继代次数对不定芽诱导增殖的影响,以期对牡丹组培快繁体系的建立打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为牡丹品种‘乌龙捧盛’的侧芽,2010 年 10 月份采于洛阳国家牡丹园。选 5~6 a 生母株下部饱满的侧芽置于 4℃冰箱里保存待用。把侧芽鳞片剥去剩 1~2 层,用洗洁精清洗侧芽,滤去洗洁精水,冲洗至无泡沫。然后流水冲洗牡丹侧芽 20 min,用 1%的多菌灵浸泡 10 min,蒸馏水冲洗 3 次,用青霉素浸泡 10 min,蒸馏水冲洗 3 次,滤纸吸干后置于超净工作台

上,用 75%酒精浸泡 30 s,无菌水冲洗 3 次,然后用 0.1%升汞消毒 9 min,无菌水冲洗 6 次,接种到不同培养基上。

1.2 试验方法

1.2.1 侧芽萌发阶段基本培养基的筛选 将消毒处理过的侧芽剥去全部鳞片,在距侧芽基部 2/3 处平切^[4],分别接种于 WPM 和 MS 基本培养基中,培养基中均添加 6-BA 2.5 mg/L、NAA 0.5 mg/L、3.0%蔗糖、0.54%琼脂、PVP(0.5 g/L),pH 调至 5.8。每个处理接种 20 瓶,每瓶接种 2 个侧芽,每 7 d 观察生长状况和基部变化情况,35 d 后观察统计萌发率。

1.2.2 不定芽诱导阶段基本培养基的筛选 将萌发后生长状态良好的芽分别转接于 WPM 和 MS 基本培养基中,培养基中均添加 6-BA 2.5 mg/L、NAA 0.5 mg/L、3.0%蔗糖、0.54%琼脂、PVP(0.5 g/L),pH 调至 5.8。每个处理接种 20 瓶,每瓶接种 2 个侧芽。每 7 d 观察生长状况,35 d 后观察统计不定芽诱导率及不定芽高度(有效不定芽:高度 ≥ 0.5 cm)。不定芽诱导率(%)=产生不定芽的外植体数(个)/接种外植体总数(个) $\times 100$ 。

1.2.3 最佳生长调节剂组合的试验 将不定芽切割成单芽,选取生长健壮,均匀一致的单芽,接于各处理培养基中(表 2),基本培养基为 1.2.2 中筛选出的最佳基本培养基,均附加 3.0%蔗糖、0.54%琼脂、PVP 0.5 g/L, pH 调至 5.8。每个处理接种 20 瓶,每瓶接种 2 个单芽,每 7 d 观察生长状况,35 d 后观察统计不定芽高度、增殖率。增殖率(%)=不定芽的总数(个)/接种外植体总数(个) $\times 100$ 。

1.2.4 蔗糖浓度对组培苗生长的影响 将生长健壮,均匀一致的单芽,接于添加不同蔗糖浓度(30、35、40 g/L)的培养基上,基本培养基为 1.2.2 中筛选出的最佳基本

第一作者简介:徐小博(1986-),男,在读硕士,研究方向园林植物生物技术。

责任作者:刘会超(1964-),男,河南南阳人,博士,教授,硕士生导师,现主要从事园林植物种质资源与生物技术等研究工作。
E-mail:liuhc918@yahoo.com.cn.

基金项目:河南省创新人才工程资助项目(2005-126-49)。

收稿日期:2012-02-24

培养基,生长调节剂组合为 1.2.3 中筛选最佳的生长调节剂组合。每个处理接种 20 瓶,每瓶接种 2 个单芽,每 7 d 观察生长状况,35 d 后观察统计不定芽高度、增殖率、玻璃化芽数。

1.2.5 继代次数对组培苗增殖的影响 从第 2 次继代进行统计至第 6 代。每 7 d 观察生长状况,35 d 后观察统计不定芽高度及增殖率。各处理放置温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,光照时数 14 h/d(8:00~22:00),光照强度 2 500 lx(光源为 FL40S,植物组织培养用日光灯)培养室中进行培养。

表 1

基本培养基对侧芽萌发及不定芽诱导的影响

Table 1 Effects of different basic mediums on germination and induction of adventitious buds

基本培养基 Basic medium	侧芽萌发率 Germination rate/%	诱导率 Inducing rate/%	不定芽诱导 Induction of adventitious buds	基部变化情况 Basal status
			生长状况 Growth status	
MS	74 \pm 1.22Aa	66.7 \pm 3.45Bb	++	基部稍微膨大,有少量愈伤组织产生
WPM	89 \pm 2.34Bb	86.7 \pm 2.67Aa	+++	基部明显膨大,有少量量愈伤组织产生

2.2 不同生长调节剂配比对不定芽诱导的影响

将产生的丛生芽切割成单芽接种(图 1-a)到不定芽增殖培养基上,10 d 时可以观察到基部有不定芽产生,17 d 后单芽基部产生的不定芽生长明显加速。由表 2

表 2

不同生长调节剂组合对不定芽增殖的影响

Table 2 Effects of different medium on multiplication of adventitious buds

编号 No.	6-BA /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	接种数 Number of inoculated shoot	增殖率 Multiplication rate/%	生长状况 Growth status	新生芽平均株高 Height of sprout/cm
A1	1.0	0.1	38	321.78 \pm 7.10 FGgh	+	1.66 \pm 0.05 Hi
A2	1.0	0.3	36	270.22 \pm 4.47 Gi	++	1.96 \pm 0.06 FGh
A3	1.0	0.5	38	297.43 \pm 4.33 Ghi	+	2.16 \pm 0.13 Fg
B1	1.5	0.1	38	412.06 \pm 1.36 DEde	++	2.76 \pm 0.12 DEef
B2	1.5	0.3	36	487.67 \pm 2.17 Ce	++	1.86 \pm 0.04 GHh
B3	1.5	0.5	34	444.28 \pm 6.23 CDcd	++	2.66 \pm 0.15 Ef
C1	2.0	0.1	38	689.40 \pm 5.25 Bb	+++	3.13 \pm 0.03 BCbc
C2	2.0	0.3	38	811.23 \pm 3.33 Aa	+++	3.26 \pm 0.05 ABb
C3	2.0	0.5	38	705.64 \pm 10.67 Bb	++	2.86 \pm 0.07 DEde
D1	2.5	0.1	40	445.36 \pm 4.45 CDcd	+	2.96 \pm 0.10 CDcd
D2	2.5	0.3	34	365.39 \pm 5.36 EFfg	—	3.46 \pm 0.02 Aa
D3	2.5	0.5	36	382.19 \pm 2.27 Eef	—	2.72 \pm 0.11 DEef

注:表中每列数据后不同大小写字母分别表示在 0.01 和 0.05 水平上存在差异。

Note: Different lowercase and capital following the figures denote significantly different at 0.05 and 0.01 level.



图 1 ‘乌龙捧胜’不定芽增殖

注:a,单芽;b:不定芽的形成(C₂处理);c:干枯现象;d:不定芽的形成(继代第 4 次);e:玻璃化的不定芽。

Fig. 1 Multiplication of adventitious buds of peony ‘Wulongpengsheng’

Note: A, single bud; b, the formation of adventitious buds(C₂); c, the phenomenon of withered leaf; d, the formation of adventitious buds(the fourth generation); e, vitrification adventitious buds.

为 2.5 mg/L 时,增殖率最高为 445.35%(D1),仅为 C2 的 54.9%。表明 6-BA 浓度增加虽有利于不定芽增殖,但高浓度对不定芽增殖有抑制作用。从不定芽的生长状况看,当 6-BA 为 2.0 mg/L,生长状况较其它浓度好。此外,C2 组合新产生不定芽平均高度也为最高,达 3.26 cm。综合来看,继代增殖阶段生长调节剂组合 C2 较好。

2.3 不同蔗糖浓度对不定芽增殖的影响

牡丹组培过程中容易产生玻璃化现象。由表 3 可

表 3

不同蔗糖浓度对不定芽增殖的影响

Table 3

Effects of different sucrose concentration on multiplication of adventitious buds

蔗糖浓度 Concentration of sucrose/g · L ⁻¹	接种芽数 Number of inoculated shoot	玻璃化芽数 Number of vitrification buds	生长状态 Growth status	新生芽平均株高 Height of sprout/cm	增殖率 Multiplication rate/%
30	40	11±0.57 Aa	黄绿色,3%有干叶现象	2.81±0.23 Bb	487.35±7.67 Cc
35	39	5±0.21 Bb	嫩绿色,10%有干叶现象	3.52±0.11 Aa	882.57±9.34 Aa
40	38	3±0.33 Bb	绿色,49%有干叶现象	2.10±0.09 Cc	655.10±4.21 Bb

2.4 继代次数对不定芽增殖的影响

由表 4 可看出,在继代 4 次时增殖率达到最大,为 883.58%(图 1-d),显著高于其它继代次数。继代次数超过 4 次后不定芽增殖率开始逐渐下降。在继代次数为 4 次以内时,组培苗生长势强,且植株健壮,试管苗基部膨大,有少量愈伤组织,基部无黑色。随着继代系数的增加,达到 5~6 次时,增殖率显著的下降,试管苗长势越来越弱,植株高度明显下降,出现黄叶、枯叶的现象,组培苗基部呈现黑色。

表 4 不同继代次数对不定芽增殖的影响

Table 4 Effects of different germination times on multiplication of adventitious buds

继代次数 Subculture times	增殖率 Multiplication rate/%	生长状况 Growth status	新生芽平均株高 Height of sprout/cm
2	378.20±5.57 Ee	+++	2.57±0.20 Bb
3	785.32±9.17 Bb	+++	4.31±0.26 Aa
4	883.58±4.36 Aa	+++	4.10±0.10 Aa
5	632.41±6.56 Cc	++	2.97±0.40 Bb
6	555.68±4.58 Dd	+	2.75±0.26 Bb

3 结论与讨论

在植物组织培养中,芽的增殖和生长受到培养基中的细胞分裂素和生长素含量的控制,6-BA 有助于细胞分裂,继而影响器官的分化,加入少量的生长素(NAA 或 IAA)后,可以提高增殖倍数^[3,5]。该试验中 6-BA 浓度对增殖系数的影响明显,当 6-BA/NAA 比值较高时对增殖的促进作用优于 6-BA/NAA 比值较低时,但过高的比值导致植株长势变弱,不定芽高度降低。原因有可能是分裂素类能够促进酚类化合物的合成或者是刺激多酚氧化酶活性提高^[6],从而抑制不定芽的生长。继代增殖阶段最佳激素组合应是 6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L。

蔗糖是组织培养中最常用的碳源,在植物组织培养

看出,随着蔗糖浓度的增加,玻璃化程度会显著降低,当蔗糖浓度为 40 g/L 时,玻璃化率仅为 7.5%;蔗糖浓度为 40 g/L 时,新生芽平均株为 2.10 cm,但有 49%的芽出现干叶现象(图 1-c);当蔗糖浓度为 35 g/L,增殖率和新生芽平均株高均为最大,此浓度时不定芽生长状况也最佳。综合来看,蔗糖浓度为 35 g/L 是不定芽增殖阶段最佳蔗糖浓度。

中,糖的用量不仅影响着培养物的生长速度和生长量,还影响其代谢水平、次生代谢物的合成以及细胞的形态和发生,是影响植物组织培养的关键因素之一。该试验结果表明,蔗糖浓度的提高能降低玻璃化率,但过高时干叶现象较为严重,这可能与蔗糖可以调节培养基中的渗透势有关;随着蔗糖浓度增加增殖系数明显增加,蔗糖浓度过高时,繁殖系数明显降低,不定芽的株高会明显降低,这与郑永强等^[7]的研究结果一致。蔗糖浓度 35 g/L 是不定芽增殖阶段最佳蔗糖浓度。

继代次数对牡丹增殖系数的研究表明,继代次数对牡丹不定芽的增殖率有明显的影响,当继代次数大于 4 次,增殖率开始下降。其原因可能是因为随着继代次数的增加,组培苗内部的营养成分已被消耗,此外,基部变黑褐化阻碍了组培苗对培养基中营养成分的吸收^[8],导致增殖率也随着下降。

参考文献

- [1] 王连英. 中国牡丹品种图志[M]. 北京:中国林业出版社,1997:24-27.
- [2] 赵鑫,詹立平,邹学忠. 牡丹组织培养研究进展[J]. 核农学报,2007,21(2):156-159.
- [3] Beruto M, Lanteri L, Portogallo C. Micropropagation of tree peony (*Paeonia suffruticosa*)[J]. Plant Cell Tiss Org Cult,2004,79:249-245.
- [4] 刘会超,贾文庆. 应用侧芽平切刻伤方法建立牡丹植株再生体系[J]. 园艺学报,2010,37(9):1471-1476.
- [5] Gildow F E, Mitchell J P. Initiation, growth and nuclear characteristics of tissue cultures of *Paeonia suffruticosa*[J]. Physiol Plant,1977(58):790-795.
- [6] Creasey L L. The increase in phenylalanine ammonialyase activity in strawberry leaf disks and its correlation with flavonoid synthesis[J]. Phytochem,1968(7):441-447.
- [7] 郑永强,刘艳梅. 蔗糖浓度对生姜试管苗生长及内源激素变化的影响[J]. 中国蔬菜,2004(2):15-17.
- [8] 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.

草莓组培快繁技术研究

王振磊¹, 闫芬芬², 王 静³, 林敏娟^{3,4}

(1. 塔里木大学 教务处, 新疆 阿拉尔 843300; 2. 新疆生产建设兵团农一师十团, 新疆 阿拉尔 843300;
3. 塔里木大学 植物科学学院, 新疆 阿拉尔 843300; 4. 塔里木大学 塔里木盆地生物资源保护利用兵团重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300)

摘 要:以美国引进的草莓品种“赛娃”的顶芽为试材,研究了不同激素及组合对草莓组培苗快速繁殖和生根的影响。结果表明:适合继代增殖的培养基是 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.01 mg/L;适合生根的培养基 1/2MS+IBA 0.1 mg/L;该试验为草莓大规模繁殖和工厂化育苗提供了理论依据。

关键词:草莓;组培快繁;生根

中图分类号:S 668.403.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)11-0130-03

草莓(*Fragaria ananassa* Duch)属蔷薇科草莓属多年生草本植物,目前世界上栽培面积和产量在浆果类水果生产中仅次于葡萄,是一种经济价值很高的果品,除可以鲜食外,还可加工成罐头、果酱、果酒和饮料等制品,且具有非常高的医疗和保健作用^[1]。在目前的育苗繁殖中,传统的匍匐茎无性繁殖方法因其病毒感染严重、品种退化、繁殖系数低、速度慢,产量低,已不能满足目前规模化生产的实际需求。因此采用组织培养不但可以实现快繁,满足规模化生产的需求,还对一些繁殖系数较低、杂合的材料有性繁殖易分离、或从杂合的遗传群体中筛选能保持其优良遗传性的植株,具有更重要的意义^[2-3]。目前草莓进行组培苗的脱毒生产,既可防止病害传播,又符合国际上植物检疫标准要求,扩大产

品的流通,同时还保证了幼苗繁殖对气候条件的要求,缓和了淡旺季产品供需矛盾。世界上一些先进国家园艺植物组织培养技术的迅速发展从20世纪60年代就已经开始,并随着生长、分化规律性探索逐步深化,得到了进一步的发展,获得了可观的经济效益^[4]。

有关草莓组织培养研究,已有很多成功的报道^[5-6]。“赛娃”品种是罗新书教授由美国引进,它的引进与开发,较好地解决了国内草莓生产中春季上市过分集中,夏秋无草莓可食的问题,市场潜力巨大,已在山东省邻城县武安镇草莓园艺场试栽2 a,不仅填补了露地生产的空白,而且产生了明显的经济效应^[5-7]。该试验通过对其茎尖的诱导、继代增殖培养基和生根培养基进行筛选研究,以其筛选出最适宜的草莓快繁和生根培养基,为今后新疆的草莓大规模繁殖和工厂化育苗工作提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

该试验在农一师十团苗木基地组培室进行,试材为草莓“赛娃”品种,由十团苗木基地提供。

第一作者简介:王振磊(1977-),男,河北邯郸人,硕士,讲师,现主要从事果树生理研究工作。E-mail:wzljwc@163.com。

责任作者:林敏娟(1979-),女,河北邢台人,硕士,副教授,现主要从事果树生理研究工作。

收稿日期:2012-02-20

Multiplication and Induction of Adventitious Buds of Tree Peony ‘Wulongpengsheng’

XU Xiao-bo, JIA Wen-qing, LIU Hui-chao, ZHENG Jian

(School of Horticulture Landscape Architecture, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003)

Abstract: Tree peony ‘Wulongpengsheng’'s lateral buds were used as explants, the effect of basic medium, plant growth regulation, the concentration of sucrose, germination times on the adventitious buds differentiation were studied. The results showed that WPM was better than MS. The best medium for proliferation was WPM+6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.3 mg/L, with the proliferation of was 811.13%. The best concentration of sucrose was 35 mg/L. With the germination times increasing, the proliferation rose first and fell later. The proliferation rate reached highest at the fourth.

Key words: tree peony; adventitious bud; subculture times