

DOI:10.11937/bfyy.201620026

亳州芍药组织培养的关键技术

梁小敏, 罗赣丰

(江西农业工程职业学院, 江西 樟树 331200)

摘 要:以亳州芍药鳞芽外植体为试材,对3个时间段(2月下旬至3月上旬、9月下旬至10月上旬、12月下旬至翌年1月上旬)的鳞芽进行了优化,并确定了亳州芍药组织培养的最佳取样时间;以2月下旬至3月上旬(第1阶段)鳞芽为试材,研究了5种鳞芽表面灭菌方法和IBA、NAA与BA组合的4因素2水平以及BA与KT组合的2因素2水平培养基组分筛选正交实验,以建立一套高效成熟的亳州芍药组织培养的快速繁殖技术体系。结果表明:2月下旬至3月上旬取样的亳州芍药鳞芽诱导成活率最高,采用0.13% HgCl_2 浸泡10 min对亳州芍药萌芽进行2次灭菌效果最好;亳州芍药鳞芽最佳的增殖出芽分化培养基为 $1/2\text{MS}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{BA}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{KT}+3.0\%\text{蔗糖}+0.7\%\text{琼脂}$ 。

关键词:芍药;鳞芽;取材时间;灭菌方法;组织培养

中图分类号:S 682.1⁺2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)20-0102-04

芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.)属毛茛科多年生宿根草本植物,是我国传统的名贵花卉之一,其根经过蒸煮、去皮、风干和切片等工序后制成的中药材被中医称之为白芍(*Radix Paeonia Alba*),其具有扩张血管、镇痉、镇痛、通经、利尿等功效和悠久的药用历史^[1-3]。我国中药材市场上的白芍主要来源三大产区,即安徽亳州的亳白芍、浙江东阳等地的杭白芍、四川中江等地的川白芍,

但以安徽亳州的亳白芍产量大、色白、粉性足、质量好而享誉全国,市场占有率最高。

芍药的传统繁殖方式有分株、扦插和播种,但这些方法的繁殖系数低、周期长,新品种难以快速扩大种植规模。组织培养是植物材料快速繁殖较成熟的方法,已在很多花卉苗木生产中应用^[4-6]。而芍药属植物的组织培养技术体系尚不成熟,存在外植体污染率高、褐化严重、外植体僵化与脱分化及分化难、增殖和根诱导难等问题^[7-9]。组织培养存在一定的专一性,植物同属不同种,甚至同一种内不同品种或生态型,组织培养技术也存在较大差异。目前芍药组织培养技术多集中在花卉用品种上^[10-13],药用品种的组织培养技术报道不多^[7]。

第一作者简介:梁小敏(1973-),女,江西高安人,硕士,教授,研究方向为植物组织培养在种苗生产中的应用。E-mail:liangxm@sina.com.

基金项目:江西省教育厅青年科学基金资助项目(GJJ09633)。

收稿日期:2016-07-05

Abstract: Taking *Acer rubrum* as material, using transformation technology, the whole process from the sterile system establishment, start up cultivation, breeding, seedling cultivation, root culture and hardening-seedling transplanting were discussed by different hormone proportion. The results showed that the best disinfection way of the stem with bud explants was disinfection by 70% alcohol immersion 30 seconds + 6 minutes disinfection by 1% mercuric chloride. The highest survival rate and sprout rate were 75.22% and 95.13%. Adopting orthogonal test, medium and hormone ratio test to start training. The former result showed that the influence of NAA was greater than 6-BA, $\text{MS}+\text{NAA } 0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+6\text{-BA } 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ had the highest start rate of 62.80%. The latter result showed $\text{NN69}+2,4\text{-D } 0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{TDZ } 0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ had the highest start rate of 80.21%. The best medium for multiplication culture was $\text{NN69}+\text{NAA } 0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{TDZ } 0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, the multiplication factor was 4.2. The $\text{MS}+2,4\text{-D } 0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+6\text{-BA } 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ could effectively promote the growth of test-tube seedlings. In root culture stage, the optimal culture medium was $\text{MS}+\text{NAA } 0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+2,4\text{-D } 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The rooting effect was best with root rate 99.8%, root number 7.9, root length 6.5 cm. Amounts of elements benefits test-tube plant rooting. After the culture-bottle seedlings were transplanted into the matrix composed of vermiculite and perlite (1:1, V:V), the transplanting survival rate was up to 75.2%.

Keywords: *Acer rubrum*; tissue culture; rooting

该试验以亳州芍药外植体为试材,对外植体的取材时间、表面灭菌方法和培养基中的植物生长激素配方进行研究和筛选,从而建立亳州芍药高效成熟的快速繁殖体系,以期为其种苗的快速繁殖与推广奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试亳州芍药植株取自安徽省亳州市谯城区十九里镇马寨村。选取4~5年生单株根数大于40,最大根长42 cm以上的植株,移栽于江西农业工程职业学院中草药品种圃,翌年用于组织培养取样。经检测该批次亳州芍药芍药苷含量大于3%,属优良品系。

1.2 试验方法

1.2.1 芍药取材时间的优化 根据芍药组织培养的报道^[10-13],分别选取2月下旬至3月上旬(第1阶段)、9月下旬至10月上旬(第2阶段)、12月下旬至翌年1月上旬(第3阶段)3个阶段的鳞芽为试验材料,剥除鳞片,流水冲洗1 h,在净化工作台上用0.10% HgCl₂浸泡10 min进行灭菌^[11],用无菌水清洗残液,接种到1/2 MS+2.0 mg·L⁻¹ BA+0.05 mg·L⁻¹ NAA+3.0%蔗糖+0.7%琼脂的培养基上,7 d后观测记录诱导情况。每个阶段均取样3~4次,分别培养,取平均值,每次取样大于100个样本。

1.2.2 芍药鳞芽表面灭菌方法的优化 将2月下旬至3月上旬(第1阶段)的鳞芽先用70.0%酒精消毒30 s,无菌水洗5遍,后采用4种不同的鳞芽表面灭菌方法进行处理:A) 0.13% HgCl₂浸泡10 min(简称“0.13%升汞法”);B) 0.13% HgCl₂浸泡10 min,培养7 d后,剔除污染鳞芽,将未污染鳞芽取出,置于10 mg·mL⁻¹氨苄西林钠中消毒10 min,取出后不清洗,转接于新鲜培养基(简称“氨苄灭菌法”);C) 0.13% HgCl₂浸泡10 min,培养7 d后,剔除污染鳞芽,将未污染鳞芽取出,转接于新鲜培养基,在新鲜培养基表面加10 mL浓度为10 mg·mL⁻¹的氨苄西林钠(简称“氨苄培养法”);D) 0.13% HgCl₂浸泡10 min,培养7 d后,剔除污染鳞芽,将未污染鳞芽取出,置于0.13% HgCl₂浸泡10 min,灭菌水清洗5遍后转接于新鲜培养基(1/2MS+2.0 mg·L⁻¹ BA+0.05 mg·L⁻¹ NAA+3.0%蔗糖+0.7%琼脂)(简称“2次升汞法”)。以0.10% HgCl₂浸泡10 min为对照(CK)。14 d后对生长情况进行观察记录。

1.2.3 BA、IBA和NAA组合筛选愈伤诱导培养基 设置BA(0.5 mg·L⁻¹和1.5 mg·L⁻¹)、IBA(0.1 mg·L⁻¹和0.5 mg·L⁻¹)、NAA(0.1 mg·L⁻¹和0.5 mg·L⁻¹)和蔗糖(15 g·L⁻¹和30 g·L⁻¹)的4因素2水平的L₈(2⁷)正交实验(表3),8种组合培养基配方有效接种量在30~70,接种28 d后进行观察,记录每种组合中基部

有愈伤生成的鳞芽数目,计算其诱导率。诱导率(%)=有愈伤形成的鳞芽数目/接种鳞芽的总数×100,并进行差异显著性分析。

1.2.4 BA和KT组合筛选新芽分化培养基 将亳州芍药幼嫩鳞芽接种到分化培养基(1/2 MS+BA+KT+3.0%蔗糖+0.7%琼脂)上,进行BA(0.5 mg·L⁻¹和1.0 mg·L⁻¹)、KT(0.5 mg·L⁻¹和1.0 mg·L⁻¹)的2因素2水平的L₄(2³)正交实验(表4),无需继代,同一瓶培养基中连续培养28 d后进行诱导率和增殖系数的测定与分析。诱导率(%)=诱导出芽的外植体/接种的外植体总数×100,增殖系数=各外植体诱导出芽数总和/接种外植体总数。

2 结果与分析

2.1 不同外植体取材时间对成活率的影响

由表1可以看出,3个取材阶段的成活率处理间存在极显著差异,其中以第1个阶段(2月下旬至3月上旬)为最高,其次为第3个阶段(12月下旬至翌年1月上旬),最低是第2个阶段(9月下旬至10月上旬);且第1个阶段取材的鳞芽在培养中褐化不明显,其它2个阶段的材料均严重褐化,这表明3个取材时间段中,2月下旬至3月上旬取材时间段最好。该时间段包含4个取样时间点,每个时间点相隔7 d左右,其外植体诱导成活率在20%以上(20.0%~26.5%),极显著高于其它取样阶段(0%~6.7%)。第2阶段的亳州芍药地下鳞芽刚萌发出地面,芽体为红色,叶片卷曲,十分幼嫩。可见,亳州芍药组织培养应选择适龄的幼嫩鳞芽来提高诱导率及减轻褐化。

2.2 不同表面灭菌方法对亳州芍药鳞芽培养成活率的影响

表2表明,采用0.10%和0.13% HgCl₂浸泡亳州芍药鳞芽10 min的灭菌方法外植体培养7 d的成活率分别为22.8%和70.9%,后者的灭菌效果极显著高于前者。培养7 d后取出未污染的外植体,继续继代培养7 d后,未对外植体进行2次灭菌CK的样品全部污染,成活率为0%;处理A、B、C和D 14 d后成活率分别为43.4%、

表1 不同取样时间下的亳州芍药外植体培养的成活率

取材时间 Time of materials collection	7 d后成活率 Survival rate after 7 days/%	7 d后生长情况 Growth situation after 7 days
第1阶段 The first stage	22.8±1.87aA	褐化不明显
第2阶段 Second stage	3.1±1.27cC	严重褐化
第3阶段 Third stage	5.0±0.59bB	严重褐化

注:小写和大写字母分别表示在0.05和0.01水平上存在显著差异。下同。

Note: The lowercase letters and uppercase letters after the number mean the significant difference at 0.05 and 0.01 level. The same below.

表 2 不同表面灭菌方法下亳州芍药鳞芽的成活率

Table 2 Survival rate of Bozhou peony bulbil explants under different surface sterilization methods

表面灭菌方法 Method of surface sterilization	7 d 培养成活率 Survival rate after 7 days /%	14 d 培养成活率 Survival rate after 14 days /%
CK	22.8±3.24bB	0.0±0.00dD
A	70.9±4.04aA	43.4±1.95bB
B	—	46.4±1.85bB
C	—	38.3±1.65cC
D	—	84.4±3.51aA

46.4%、38.3%和 84.4%。因此,采用 2 次生汞法灭菌效果最好。

2.3 BA、IBA 和 NAA 对亳州芍药鳞芽培养诱导的影响

由表 3 可知,在不同 BA、IBA、NAA 和蔗糖用量的增殖出芽分化培养基(1/2 MS+BA+IBA+NAA+蔗糖+0.7%琼脂)中,亳州芍药鳞芽的诱导率在 38.27%~

表 3 BA、IBA、NAA 和蔗糖 4 因素 2 水平正交设计及各处理对亳州芍药鳞芽培养愈伤诱导率

Table 3 Orthogonal experiment design of BA, IBA, NAA and sucrose and the callus induction results

处理序号 No. of treatment	BA /(mg·L ⁻¹)	IBA /(mg·L ⁻¹)	NAA /(mg·L ⁻¹)	蔗糖 Sucrose /(g·L ⁻¹)	诱导率 Induction rate/%
1	0.5	0.1	0.1	15	38.27
2	0.5	0.1	0.5	30	42.45
3	0.5	0.5	0.1	30	43.79
4	0.5	0.5	0.5	15	46.09
5	1.5	0.1	0.1	30	49.56
6	1.5	0.1	0.5	15	54.87
7	1.5	0.5	0.1	15	59.43
8	1.5	0.5	0.5	30	63.75

表 4 BA、IBA、NAA 和蔗糖 4 因素 2 水平正交设计方差分析

Table 4 ANOVA of the orthogonal experiment design of BA, IBA, NAA and sucrose 4 factors at 2 levels

方差来源 Source of SS	III 型平方和 SS of type III	自由度 df	均方 Average of SS	F 值 F value	收尾概率 P Significance
校正模型 Calibration model	548.921	6	91.487	88.512	0.081
截距 Intercept	19 821.471	1	19 821.471	19 177.067	0.005
BA	406.255	1	406.255	393.047	0.032
IBA	97.353	1	97.353	94.188	0.065
NAA	32.486	1	32.486	31.430	0.112
蔗糖 Sucrose	0.100	1	0.100	0.097	0.808
BA×IBA	11.492	1	11.492	11.118	0.185
BA×NAA	1.235	1	1.235	1.195	0.472
误差 Error	1.034	1	1.034		
总计 Total	20 371.425	8			
校正的总计 Total of revise	549.954	7			

63.75%,存在明显变化。表 4 方差分析表明,BA 对亳州芍药鳞芽的诱导率有显著影响(收尾概率 $P=0.032<0.05$),而 IBA、NAA、蔗糖、BA×IBA 互作效应、BA×NAA 互作效应对亳州芍药鳞芽的诱导率效果均不显著($P>0.05$)。表明在 1/2 MS+BA+IBA+NAA+蔗糖+0.7%琼脂的诱导培养基中,BA 是影响亳州芍药诱导率的主要因素。

2.4 BA 和 KT 对亳州芍药鳞芽培养诱导作用的影响

由表 5 可知,BA 和 KT 浓度同时位于低水平(0.5 mg·L⁻¹)或者高水平(1.0 mg·L⁻¹)时外植体出芽诱导率都较低,分别只有 69.2%和 65.7%;在 BA 浓度处于高水平,KT 浓度处于低水平时,亳州芍药鳞芽诱导率最高,达 82.3%,显著高于其它激素组合;此条件下,增殖系数也最高,为 2.9,是 BA 和 KT 都位于低水平时的 2 倍多。在外植体愈伤分化出芽诱导培养基中,BA 浓度 0.5~1.0 mg·L⁻¹与 KT 浓度 0.5~1.0 mg·L⁻¹时,其组合均能起到较好的诱导作用,愈伤出芽诱导率介于 65.7%~82.3%;但以 1.0 mg·L⁻¹BA+0.5 mg·L⁻¹KT 对鳞芽愈伤诱导出芽的效果最好,KT 过高或 BA 过低都将导致鳞芽的诱导率下降。

表 5 BA 和 KT 对亳州芍药鳞芽培养诱导作用的影响

Table 5 Effect of BA and KT on tissue culture of Bozhou peony bulbs

处理序号 No. of treatment	BA /(mg·L ⁻¹)	KT /(mg·L ⁻¹)	诱导率 Induction rate/%	增殖系数 Propagation rate
1	0.5	0.5	69.2cAB	1.4cC
2	0.5	1.0	75.6bAB	2.0bB
3	1.0	0.5	82.3aA	2.9aA
4	1.0	1.0	65.7cB	1.5cC

3 讨论与结论

芍药组织培养的外植体在全年各个时间段都有取材的报道^[9]。郭风云^[14]认为母代芽应选择 11 月初至 12 月上中旬和春季 3 月份,有利于萌动和分化;9—10 月取地下芽培养,效果最差。金飏等^[15]认为茎尖培养取材时间以 1 月或 4℃冷藏处理 35~42 d 为佳;取材过早,休眠芽尚未解除;过迟,芽已生长,灭菌困难。张庆瑞等^[10]以日本进口“金晃”牡丹的砧木(芍药)的芽为外植体的取材时间以 11 月至翌年 3 月为好。以往的取材季节均以芍药芽萌动不久为取材最佳时间,但具体时间不完全一样,这可能与地域有一定的关系。该研究发现,亳州芍药组织培养的取样时间应该在每年的 2 月下旬至 3 月上旬,此时亳州芍药地下鳞芽萌发刚露出地面,芽体为红色,叶片卷曲,十分幼嫩,选用此时的鳞芽作为外植体将大大提高诱导率和减轻褐化。

组织培养的外植体消毒是诱导成活的关键技术之一,芍药也不例外。王吉凤等^[16]采用黄化苗外植体在

4 ℃的 HgCl_2 溶液中剧烈搅拌,效果仍不理想,后通过在培养基中添加抗菌素来提高灭菌效果。张庆瑞等^[10]认为亳州芍药休眠芽的最佳消毒是 0.10% HgCl_2 消毒 10 min;但该研究采用该方法,所有鳞芽在培养 2 周后都相继污染,无一例外。污染物基本都在鳞芽与培养基接触的部位,属细菌性污染,这可能与亳州芍药鳞芽本身带菌比较严重或表面灭菌不彻底有关;在该研究的试验中对鳞芽表面消毒条件进行优化,采用 0.13% HgCl_2 消毒 1 次(10 min)后培养 7 d,再用 0.13% HgCl_2 消毒 1 次(10 min)的 2 次灭菌法,效果极其显著,成活率达 84%,基本解决了消毒难的问题。通常来说,培养基中添加抗生素不利于外植体的分化和生长的,该研究也证明了这一点,在培养基中添加氨苄西林钠后的鳞芽诱导成活率大大降低了。

培养基中的植物生长物质成分更是组织培养成功与否的关键。在花卉用芍药的组织培养中,常用 $1/2 \text{ MS} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ GA}_3 + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA}$ 的配方^[10,14]。一般认为 GA_3 有利于打破芽的休眠,促进芽的快速脱分化和生长,但在大面积生产中,使用 GA_3 的灭菌成本较高和使用不便。该研究表明,亳州芍药鳞芽的培养采用 $1/2 \text{ MS} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ BA} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KT} + 3.0\% \text{ 蔗糖} + 0.7\% \text{ 琼脂}$ 的培养基效果最好,不需要 GA_3 。

参考文献

- [1] 高学敏. 中药学[M]. 北京:中国中医药出版社,2007:463.
[2] 王景霞,张建军,李伟,等. 白芍提取物治疗抑郁症的实验研究[J]. 中

国实验方剂学杂志,2010,16(7):183-184.

- [3] 刘玲,赵建龙. 芍药苷对脂多糖诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国临床药理学杂志,2016,32(5):433-436.
[4] 陈佳,陈凌艳,何天友,等. 无患子组织培养与快速繁殖技术研究[J]. 福建农业学报,2014,29(3):239-242.
[5] 成晟,罗福来,钟定业,等. 切花非洲菊组织培养及快速繁殖研究[J]. 分子植物育种,2016,14(3):693-698.
[6] 王子岚,佟欣,杜克久. 紫叶挪威槭再生体系建立[J]. 北方园艺,2016(8):96-99.
[7] 李文峰,马宗新,马同富. 亳芍组织培养研究[J]. 安徽农业科学,2015,43(25):24-25,91.
[8] 孙晓梅,王慧聪,周文强,等. 芍药胚离体培养的初步研究[J]. 北方园艺,2013(10):97-99.
[9] 薛银芳,赵大球,周春华,等. 芍药组织培养的研究进展[J]. 北方园艺,2012(4):167-170.
[10] 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.
[11] 郎玉涛,罗晓芳. 牡丹愈伤组织的诱导及愈伤褐化抑制的研究[J]. 河南林业科技,2007,27(1):4-6,29.
[12] 王瑶,岳桦. 芍药组培中抗外植体褐化相关问题的研究[J]. 湖北农业科学,2009,48(4):783-785.
[13] 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.
[14] 郭风云. 芍药组织培养技术的研究[D]. 北京:北京林业大学,2001.
[15] 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):69-70.
[16] 王吉凤,李青,包欣. 芍药组织培养中污染现象的克服[J]. 植物研究,2012,32(1):84-90.

Key Technology for Tissue Culture of Bozhou White Peony Root Seedlings

LIANG Xiaomin, LUO Ganfeng

(Jiangxi Agricultural Engineering College, Zhangshu, Jiangxi 331200)

Abstract: The bulbils of Bozhou white peony root seedlings were used as explants for the trial of Bozhou peony tissue culture. Based on 3 stages of sampling, the best time for explants collection was optimized. Based on the bulbils collected in the last ten-day of February and the first ten-day of March, 5 surface sterilizing conditions and 3 plant hormones IBA, NAA and BA at different levels of combinations with the experimental design of 4 factors and 2 levels orthogonal test were investigated. The BA and KT combinations with the experimental design of 2 factors and 2 levels orthogonal test were also optimized to establish the fast propagation technology for Bozhou white peony root seedlings. The results showed that the explants collected in the last ten-day of February and the first ten-day of March had the highest rate of induction. The best surface sterilizing condition was submersing the bulbils for 0.13% HgCl_2 for 10 minutes and then repeated again. The optimized initiation culture medium for bulbils was $1/2 \text{ MS} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ BA} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KT} + 3.0\% \text{ sucrose} + 0.7\% \text{ agar}$.

Keywords: *Paeonia lactiflora* Pall.; bulbils; explants collection time; surface sterilization method; plant tissue culture