

芍药胚离体培养的研究

高昌勇

(菏泽学院 生命科学系 山东 菏泽 274015)

摘要:以芍药成熟种子胚为外植体,研究不同浓度 6-BA、NAA 和 GA₃ 对比对芍药种胚萌发和生长的影响,并对芽的增殖和生根进行研究。结果表明:6-BA 和 GA₃ 有利于芍药胚的萌发和生长,在 MS+6-BA 1.0 mg/L+GA₃1.0 mg/L 的培养基上诱导效果最好;细胞分裂素对芽的增殖影响较大,在 MS+6-BA 1.0 mg/L+KT 1.5 mg/L 无菌芽苗的增值系数最大,达 3.41;1/2MS+NAA 0.5 mg/L 培养基有利于生根,生根率达 73.3%,且芽苗健壮。

关键词:芍药;胚;离体培养

中图分类号:S 682.1⁺2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001—0009(2010)16—0157—02

芍药(*Paeonia lactiflora* Pall, Chinese herbaceous peony)属芍药科(*Paeoniaceae*)芍药属多年生草本植物,花形妩媚,花朵硕大,花色富丽,自古以来就深受人们的喜爱,与牡丹并称为“花王”与“花相”。芍药常规杂交育种周期较长,选育一个品种往往要十几年。开展芍药的遗传转化,通过基因工程途径进行芍药品种的改良,成为芍药育种工作者近年探索的课题。组织培养体系的建立是进行遗传转化研究的前提。在很多植物的遗传转化研究中,胚轴都是非常好的转化受体,建立胚培养体系,将为芍药的遗传转化提供一个技术平台。对芍药胚离体培养已有报道,但技术还不够成熟,特别是无菌苗的增殖比较困难^[1-3]。该试验以芍药种胚为外植体,探讨胚萌发和芽苗增殖的最佳培养基,旨在芍药优良品

种的快速繁育及遗传转化提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

芍药成熟种子采自菏泽市天香公园,室内阴干后储藏于冰箱中备用。

1.2 试验方法

1.2.1 不同激素对比对芍药胚苗生长的影响 试验前将芍药种子在蒸馏水中浸泡 2 d 后去掉种皮。在超净工作台上,用 75% 酒精消毒 15 s,再用 0.1% 升汞消毒 12 min,无菌水中洗 5 次。切开胚乳,挑出胚接种在不同激素配比的诱导培养基上(表 1),每种处理接种 10 瓶,每瓶接 3 枚离体胚。定期观察胚的生长情况。

表 1 种胚诱导培养基

激素	编号										
/mg·L ⁻¹	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
6-BA	0	0.5	1.0	0.5	0.5	1.0	1.0	0.5	0.5	1.0	1.0
NAA	0	0	0	0.01	0.02	0.01	0.02	0	0	0	0
GA ₃	0	0	0	0	0	0	0	0.5	1.0	0.5	1.0

1.2.2 增殖培养 将诱导获得的无菌苗从基部切下,接种至添加有不同浓度 6-BA 和 KT 的培养基上,每瓶接种 2 块外植体,每处理接种 10 瓶。定期观察胚苗的生长情况和增殖情况,培养 4 周后统计增殖倍数。

1.2.3 生根培养 选取高约 2.5 cm 的芽苗,从基部切下,单个接入含有不同浓度 NAA 的 1/2MS 培养基中进行培养,每处理接种 15 瓶,每瓶接种 2 棵芽苗,培养 30 d 时统计生根率。生根率=接种苗数/生根苗数×100%。

1.3 培养条件

以上培养基中均添加 30 g/L 的蔗糖,6.5 g/L 琼脂,0.5 g/L 的活性炭。pH 5.6~5.8 培养温度为 21~25℃,光照强度 2 000 lx,光照时间为 12 h/d。

2 结果与分析

2.1 不同激素对比对芍药胚苗生长的影响

在培养过程中观察胚的生长情况发现,在没有添加任何激素的培养基 1 中,培养初期子叶展开,胚根伸长,生长明显,但后来子叶间没有出现新叶,整个植株后期生长缓慢。在添加不同浓度 6-BA 的 2、3 培养基中,胚生长速度较快,子叶生长扩大明显,有少量子叶中间出现新叶,下胚轴伸长,根生长明显,生长量都大于 1 号;培养基 3 中胚子叶的生长量大于 2 号,根的生长量与 2 号

作者简介:高昌勇(1976-),男,山西汾阳人,硕士,讲师,研究方向为植物生物技术。E-mail: sxnydx@126.com。

基金项目:菏泽学院科学研究基金资助项目(XY07SW01)。

收稿日期:2010-05-12

相当。在添加不同浓度 6-BA 和 NAA 的培养基 4、5、6、7 中, 胚初始生长情况同 2、3 号培养基上接种的胚。后期无菌苗基部出现愈伤组织, 随着 NAA 浓度的增加愈伤化程度加重; 6、7 号培养基上出现愈伤组织较 4、5 号少。在添加 6-BA 和 GA₃ 的培养基 8、9、10、11 中, 胚子叶生长明显, 有大量无菌苗子叶间出现新叶; 生长迅速, 健壮。在培养基 11(MS+6-BA 1.0 mg/L+GA₃ 1.0 mg/L)中无菌苗长势最快, 新叶萌发较 8、9、10 号培养基上的多。

2.2 增殖培养

将生长良好的无菌苗从基部切下, 接种在添加不同浓度 6-BA 和 KT 的增殖培养基上, 培养 10 d 时, 有的芽苗基部产生少量愈伤组织; 培养 15 d 时, 愈伤组织上产生淡绿色芽点, 逐渐长成芽苗, 培养 4 周后统计芽的增殖情况, 结果见表 2。由表 2 可知, 6-BA 和 KT 对芍药芽的增殖都有影响, 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时的平均增殖系数高于浓度为 0.5 mg/L 时; 当 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时, 增殖系数随 KT 浓度升高而先增加后降低。KT 浓度为 1.5 mg/L 时, 增殖系数最大达 3.41, 且芽苗健壮。

表 2 不同浓度 6-BA 和 KT 配比对芽增殖的影响

激素	编号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
6-BA/ mg · L ⁻¹	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0	1.0	1.0	1.0
KT/ mg · L ⁻¹	0.5	1.0	1.5	2.0	0.5	1.0	1.5	2.0
增殖系数	1.53	2.34	1.86	1.34	1.96	2.67	3.41	2.31

2.3 生根培养

培养 15 d 后部分外植体切口周围出现黄白色的根状凸起, 其后不定根陆续出现, 30 d 后统计生根率。由表 3 可知, 没有添加 NAA 的培养基, 外植体也能生根, 但生根率仅为 13.3%。在添加 NAA 的培养基上, 生根率显著增大, 说明 NAA 对芍药组培苗生根非常重要。随着 NAA 浓度的增加, 外植体的生根率先增加后降低, 以 NAA 浓度为 0.5 mg/L 时生根率最高, 达 73.3%, 且根粗壮、侧根多。

表 3 不同 NAA 浓度对生根率的影响

基本培养基	NAA/ mg · L ⁻¹	接种苗数/ 棵	生根苗数/ 棵	生根率/ %
1/ 2MS	0	30	5	13.3
1/ 2MS	0.2	30	11	36.7
1/ 2MS	0.5	30	22	73.3
1/ 2MS	1.0	30	17	56.7

Study on Embryo Culture of Chinese Herbaceous Peony in vitro

GAO Chang-yong

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

Abstract: The seeds of Chinese herbaceous peony was used to study the effect of 6-BA, NAA and GA₃ on the germination and growth of embryo, the proliferation and rooting of buds was studied. The results showed that 6-BA and GA₃ had positive effect on promoting germination and growth of embryo, the most suitable inducing culture medium was MS+6-BA 1.0 mg/L+GA₃1.0 mg/L; cyto-kinin was important to the proliferation of buds, the multiplication coefficient was highest on the medium of MS+6-BA 1.0 mg/L+KT 1.5 mg/L, which was 3.41; the most suitable culture medium to rooting was 1/ 2MS+NAA 0.5 mg/L, the rooting rate was 73.3%.

Key words: Chinese herbaceous peony; embryo; in vitro culture

3 讨论

胚培养技术可以用来克服胚败育和发育不良, 同时也可以缩短种子休眠期, 提早萌发和提高萌发率, 结合实生苗繁殖和田间性状选育, 可以在较短的时间内获得优良株系的繁殖群体。芍药种子具上胚轴休眠现象^[3-4]。打破芍药种子休眠特性大多是利用赤霉素(GA₃)和低温预处理相结合的方法^[5-9]。该试验只利用 GA₃ 就打破芍药胚休眠, 使种胚萌发, 说明 GA₃ 可以代替低温打破芍药胚上胚轴休眠, 这与张荣荣^[7]等的研究结果一致。芍药胚在没有附加任何激素的 MS 培养基可以萌动, 子叶张开, 胚根生长, 这显示出胚在离体培养条件下其生长模式类似于种子萌发时胚的生长模式^[8]。但是没有新叶出现, 原因可能是胚中含有少量的抑制物质, 抑制顶芽生长。试验发现, 芍药种胚离体培养容易萌发, 这可能是因为抑制芍药种子萌发的物质主要存在于胚乳中, 胚中含量较低^[7]。6-BA 与 GA₃ 合理搭配可以很好促进芍药胚的萌发和腋芽增殖, 胚培养诱导成苗最佳培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+GA₃ 1.0 mg/L, 最佳增殖培养基为 6-BA 1.0 mg/L+KT 1.5 mg/L。但是在生根培养时发现, 平均根数较少, 多数芽苗仅有 1~2 条根, 这不利于驯化移栽, 关于生根培养, 还有待于更进一步研究。

参考文献

- [1] Kim Y S, Lee B K. Effect of plant growth regulators and culture temperature on embryo culture of *P. albi flora* [J]. Journal of Korean Society for Horticultural Sciences 1995, 36(2): 255-262.
- [2] 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.
- [3] 李嘉珏. 中国牡丹与芍药 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1999: 1-2.
- [4] 王莹, 胡宝忠. 芍药 (*Paeonia lactiflora*) 生物学特性研究进展 [J]. 东北农业大学学报, 2004, 35(6): 759-763.
- [5] 宋春花, 康晓飞, 郭先锋, 等. 不同处理对芍药种子发芽的影响 [J]. 林业实用技术, 2010(2): 49-50.
- [6] 刘玉梅. 观赏芍药生态习性及其栽培技术研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(12): 4965-4967, 4969.
- [7] 张荣荣, 王康才. 芍药种子内源抑制物质活性的研究 [J]. 中草药, 2008, 39(12): 1880-1883.
- [8] Brukhin V B, Batygina T B. Embryo culture and somatic embryogenesis in culture of *P. anomala* [J]. Phytomorphology, 1994, 44(3/ 4): 151-157.