

牡丹顶芽组织培养的初步研究

尤 扬¹, 贾文庆¹, 王 慧²

(1. 河南科技学院 园林学院, 河南 新乡 453003; 2. 信阳市浉河区吴家店镇农村经济发展服务中心, 河南 信阳 464142)

摘 要:以牡丹顶芽为试材,研究了不同时间 0.1% HgCl₂ 处理对顶芽污染率、褐化率及存活率的影响,并探讨了以 MS 为基本培养基,添加不同植物生长调节剂对牡丹顶芽的萌动、丛生芽的诱导以及生根的影响。结果表明:用 0.1% HgCl₂ 处理牡丹顶芽时,以处理 8 min 左右为宜;顶芽萌动和丛生芽诱导最佳的培养基均为 MS+Ca²⁺+6-BA 2.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L。该试验中所用的生根培养基在 50 d 时,生根率达 18%,生根效果不好,对此还需进一步研究。

关键词:牡丹;顶芽;培养

中图分类号:S 685.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)04-0131-03

牡丹(*Paeonia suffruticosa*)为芍药科(Paeoniaceae)芍药属落叶亚灌木植物,其根丹皮更是名贵的中药材,药用价值甚高,有清热凉血、活血祛瘀和补血等功效^[1]。牡丹传统的繁殖方式有种子繁殖、分株繁殖、嫁接繁殖等。这些传统的方式繁殖速度较慢,限制了牡丹苗木的产业化和商品化生产。组培技术具有繁殖速度快、繁殖系数高、便于大规模生产等特点。目前,国内对牡丹组织培养有少量报道^[2-7],但至今仍未有较成熟的技术直接用于生产实践中。尤其关于牡丹顶芽组织培养更是鲜有报道^[8-9]。现以 MS 为基本培养基,添加不同的植物生长调节剂,研究其对牡丹顶芽生长和生根的影响,以期选择出适合牡丹顶芽培养的培养基,为牡丹快繁提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为牡丹顶芽,采自新乡市七里营镇龙泉观光园,挑选牡丹植株上健壮、无病的枝条,采取饱满的顶芽。采后带回实验室,放于冰箱中保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的消毒 首先剥去顶芽所有苞片,在自来水下冲洗 30 min,然后用 500 倍多菌灵和药用青霉素各浸泡 10 min,最后用无菌水清洗 3 次。然后直接置于超净工作台上,紫外灯照射 25 min 后,用 75% 酒精浸泡 30~60 s,无菌水冲洗 2~3 次,再用 0.1% HgCl₂ 分别处理 4、6、8、10、12 min,最后用无菌水清洗 5~6 次,然后即

可接种。10 d 后统计污染率、褐化率、存活率。

1.2.2 不同培养基对牡丹顶芽萌动的影响 将经过处理的顶芽(方法同前)接种于以 MS 培养基为基本培养基,添加 Ca²⁺(Ca²⁺ 浓度与 MS 培养基中 Ca²⁺ 的浓度相同,下同),附加不同浓度的 6-BA、NAA 和 IAA,共 8 种配方培养基(表 1),每处理接种 20 瓶,每瓶接种 2 个顶芽,2 次重复,顶芽经 7 d 暗培养后转入光下培养。在培养过程中,每 7 d 观察 1 次,并统计顶芽的萌动率。培养条件为:温度(18±2)℃,光照强度 1 500 lx。

1.2.3 不同培养基对丛生芽诱导的影响 将处理过的顶芽接种于 MS+Ca²⁺ 的不同 6-BA、NAA 和 IAA 组合的诱导培养基上(表 1)。每处理接种 20 瓶,每瓶接种 2 个顶芽,每 7 d 观察 1 次。先在黑暗条件下培养 7 d,再移到光下培养。40 d 后统计丛生芽的诱导情况,丛生芽的个数以大于 0.5 cm 的记为 1 个有效芽(高度是以目测的方法进行)。上述培养基均添加 3% 蔗糖、0.52% 琼脂,pH 调至 5.8~6.0,接种后置于培养间培养。培养条件为:温度(18±2)℃,光照强度 1 500 lx。

表 1 顶芽萌动和丛生芽诱导培养基

Table 1 The medium of germinating of terminal bud and induction on multiple shoot

培养基 Medium	6-BA	NAA	IAA
A1	1.5	0.1	
A2	1.8	0.1	
A3	2.0	0.1	
A4	2.5	0.1	
A5	2.5	0.5	
A6	2.0		0.5
A7	4.0		1.0
A8	4.0		0.5

1.2.4 不同培养基对生根的影响 初代培养结束后,将 1.5~2.0 cm 大小的幼苗转接到 1/2MS+IBA 5 mg/L+NAA 2 mg/L,1/2MS+TDZ 0.1 mg/L+NAA 4 mg/L+

第一作者简介:尤扬(1973-),男,河南罗山人,硕士,讲师,现主要从事园林植物的教学与研究工作。E-mail:youyang1028@126.com。

基金项目:河南科技学院重点科研基金资助项目(050122)。

收稿日期:2011-12-07

IBA 2 mg/L+LH 1 g/L, 1/2MS+TDZ 0.1 mg/L+NAA 2 mg/L+IBA 4 mg/L+LH 1 g/L 3 种培养基上。以上培养基均添加 2% 的蔗糖, 0.52% 琼脂, pH 调至 6.0~6.2, 转接后放置于培养间培养。培养条件为: 温度 $(18\pm 2)^{\circ}\text{C}$, 光照强度 1 500 lx。在培养过程中, 每 7 d 观察 1 次, 统计顶芽生根率。

1.3 数据统计分析

所得数据采用 DPS 软件进行方差分析与多重比较法(Duncan's 法), 其中百分率经反正弦转换后加以分析比较。部分数据采用 Excel 进行分析。

2 结果与分析

2.1 外植体的消毒处理

由表 2 可知, 随着消毒时间的延长, 污染率呈由高到低的趋势, 而褐化率却呈由低到高的趋势, 存活率是先升高后下降(污染、褐化见图 1-A~B)。消毒 4 min, 污染率最高达 80%, 褐化率最低为 20%, 而存活率达 15%; 随着消毒时间延长, 污染率急剧下降, 但褐化率逐渐增大, 消毒时间在 8 min 时存活率达到最高, 为 50%, 随后存活率又会下降。消毒时间为 12 min 时, 污染率降为 15%, 褐化率却最高, 达到 85%, 同时存活率也才 10%。从低污染率、低褐化率以及高存活率 3 项指标综合考虑, 0.1% 升汞消毒 8 min 为最理想的消毒处理时间。继续延长消毒时间至 10 min, 虽然污染率会有所下降, 但是顶芽的存活率也随之下降, 且褐化率也增高。所以用 0.1% HgCl_2 对顶芽消毒时, 应将时间控制在 8 min 左右为宜。

表 2 不同消毒时间对牡丹顶芽的影响

Table 2 Effect of different disinfection time to terminal bud of peony

消毒剂 Disinfectant	处理时间 Treatment time /min	污染率 Pollution rate /%	褐化率 Browning rate /%	存活率 Survival rate /%
HgCl_2	4	80	20	15
HgCl_2	6	60	30	25
HgCl_2	8	40	35	50
HgCl_2	10	30	50	40
HgCl_2	12	15	85	10

2.2 不同培养基对牡丹顶芽萌动率的影响

由表 3 可知, 不同培养基对所采顶芽的萌动影响显著(萌动见图 1-C), 处理 1、2、3 的萌动率较其它几个处理高, 达到 80% 以上; 处理 4、5、6 之间没有显著差异, 萌动率在 60%~75%; 处理 7 和 8 的萌动率最低。处理 1、2 和 7、8 之间有极显著差异, 6-BA 的浓度和 NAA 的浓度的比值对顶芽的萌动有显著影响。由表 3 还可知, 处理 1 和 8 的 6-BA 的浓度同为 2.5 mg/L, NAA 的浓度为 0.5 mg/L 时萌芽率比 NAA 的浓度为 0.1 mg/L 时萌芽率高 54%。处理 3、5 和 6 之间激素种类相同, 但激素的浓度呈倍数增加, 但它们三者之间差异不显著。因此, 在牡丹组织培养过程中, 6-BA 与 NAA 的浓度配比对外植体的诱导具有显著影响^[10]。

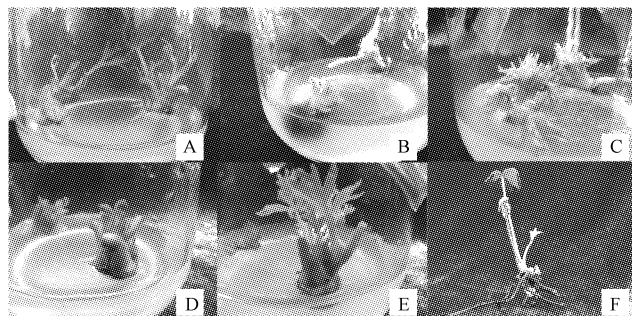


图 1 不同处理对牡丹顶芽的影响

注: A: 在后期生长中出现的细菌污染; B: 牡丹顶芽的褐化; C: 牡丹顶芽的萌动; D: 牡丹顶芽刚长出丛生芽(30 d); E: 牡丹顶芽生长到 40 d 时产生的丛生芽; F: 生根情况。

Fig. 1 Influence of different treatments to bud of peony

Note: A: Bacterial contamination in the late stage growth; B: Peony bud brown; C: Action of peony bud; D: Peony bud that growth for 30 days; E: Peony bud that growth for 40 days; F: Rootage conditions.

表 3 不同培养基对牡丹顶芽萌动的影响(30 d)

Table 3 Effect of different medium of germinating of terminal bud of peony

处理号 NO. of treatment	培养基 Medium	萌动率 Germination rate /%
1	MS+Ca ²⁺ +6-BA 2.5mg/L+NAA 0.5mg/L	(91.5±5.20)aA
2	MS+Ca ²⁺ +6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L	(88.0±2.50)abAB
3	MS+Ca ²⁺ +6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L	(82.0±7.52)abcABC
4	MS+Ca ²⁺ +6-BA 1.8 mg/L+NAA 0.1 mg/L	(75.0±6.61)bcdABC
5	MS+Ca ²⁺ +6-BA 4.0 mg/L+IAA 1.0 mg/L	(67.5±2.16)cdBCD
6	MS+Ca ²⁺ +6-BA 4.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L	(60.5±3.74)dCDE
7	MS+Ca ²⁺ +6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L	(40.0±4.14)eDE
8	MS+Ca ²⁺ +6-BA 2.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L	(37.5±2.09)eE

注: 小写字母表示 0.05 显著水平, 大写字母表示 0.01 极显著水平。

Note: Small letter means 0.05 level significant, capital letter means 0.01 level significant.

2.3 不同培养基对丛生芽诱导的影响

顶芽接种到诱导培养基中 10~15 d 后, 芽体膨大, 顶芽开始萌动, 逐渐长出丛生芽(图 1-D~E)。培养 40 d 后, 统计丛生芽的个数和高度。由表 4 可知, A5 培养基产生丛生芽的外植体数最多, 达 9 个。同时诱导出来的丛生芽也最多, 达 33 个, 诱导率最高为 22.5%, 丛生芽的平均高度最高, 为 2.06 cm, 比 A8 培养基诱导出来的丛生芽高出 57.8%。A3 与 A4 培养基产生丛生芽的外植体数一样, 诱导率均为 10%, 但产生丛生芽的个数和高度却有差异。另外 A1 与 A6、A7 与 A8 的诱导率也相同, 但从生芽的高度也不一样, 且有一定的差异。

2.4 不同培养基对生根的影响

将经过初代培养后的幼苗转接到 1/2MS 的生根培养基上后, 期间每隔 7 d 观察 1 次其生根情况, 直至 30 d 才见长出根来(生根见图 1-F), 至 50 d 统计其生根率, 达 18%, 生根效果差。

表4 不同培养基对丛生芽诱导的影响

Table 4 Effect of different medium of induction on multiple shoot

培养基 Medium	产生丛生芽的外植体数 Number of multiple shoot of explants /个	产生丛生芽数 Number of multiple shoot /个	诱导率 Induction rate /%	丛生芽平均高度 Average height of multiple shoot /cm
A1	7	28	17.5	1.73
A2	6	24	15	0.94
A3	4	13	10	1.02
A4	4	10	10	0.91
A5	9	33	22.5	2.06
A6	7	27	17.5	1.17
A7	5	23	12.5	1.56
A8	5	20	12.5	0.87

3 小结与讨论

在植物组织培养中褐化现象普遍存在,诱发褐化现象发生的原因多数学者都认为其机理主要是由多酚氧化酶(PPO)作用于其底物酚类物质而引起的^[11]。在该试验中,消毒时间对组培苗的褐化有显著的影响,随着消毒时间延长,褐化率增高,可能是由于随着消毒时间延长,组培苗产生酚类或醌类物质增多,褐化程度增加。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。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。

消毒是为了杀灭病菌,保证植物组织培养的成功^[12]。牡丹顶芽同样存在此种情况,出现消毒难,致使出现污染率较高,难以培养成功。该试验中用 0.1% 的 HgCl₂ 不同消毒时间对外植体进行处理,结果表明,牡丹顶芽的消毒时间以 8 min 左右为宜。

以牡丹顶芽为外植体直接诱导其萌动,低浓度的生长素 NAA 与适当范围的细胞分裂素 6-BA 配合使用达到理想效果。诱导顶芽萌动的最适培养基和诱导顶芽分化丛生芽的最佳培养基均为 MS+Ca²⁺+6-BA

2.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L。

牡丹胚、茎尖器官发生途径已经成功^[13],通过顶芽建立的间接或直接植株再生途径远未成熟,尤其牡丹生根较难的问题仍需突破。该试验中,生根率仅为 18%,生根效果较差,探索生根的新途径及新方法是今后努力的方向。

参考文献

- [1] 刘淑敏,王莲英,吴涤新.等.牡丹[M].北京:中国建筑工业出版社,1987.
- [2] 杨红超,裴冬利.牡丹种子胚培养研究[J].广西农业科学,2006,37(2):108-110.
- [3] 孔祥生,张妙霞.牡丹离体快繁技术研究[J].北方园艺,1998,3(4):87-89.
- [4] 周仁超,姚崇怀.紫斑牡丹胚培养与植株再生[J].亚热带植物科学,2001,30(3):60.
- [5] 张桂花,王洪梅,王连祥.牡丹组织培养技术研究[J].山东农业科学,2001(5):16-18.
- [6] 何桂梅,成仿云,李萍.两种牡丹胚珠与幼胚离体培养的初步研究[J].园艺学报,2006,33(1):185.
- [7] 范小峰,郭小强,马世荣.三种牡丹组织培养比较研究[J].北方园艺 2010(4):132-134.
- [8] 何松林,陈莉,陈笑蕾.牡丹鳞芽诱导与增殖过程中影响因子研究[J].河南农业大学学报,2009,10(5):511-516.
- [9] 张启翔.中国观赏园艺研究进展 2009[M].北京:中国林业出版社,2009:258-260.
- [10] 李志军,刘志国,李红梅.牡丹组培快繁技术研究[J].山东林业科技,2006(3):39-40.
- [11] 谭文澄,戴策刚.观赏植物组织培养技术[M].北京:中国林业出版社,1997:278.
- [12] 王利民,周毅,陈龙友,等.植物组织培养中消毒剂的运用.贵州师范大学学报(自然科学版),2002,2(1):15-17.
- [13] 贾文庆,刘会超.‘凤丹’胚不定芽诱导和生根研究[J].北方园艺,2009(3):69-71.

Preliminary Study on the Tissue Culture of Terminal Bud of Peony

YOU Yang¹, JIA Wen-qing¹, WANG Hui²

(1. College of Horticulture and Landscape Architecture, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003; 2. Center of Rural Economic Development Service of Wujiadian Countryside Shihe Area, Xinyang, Henan 464142)

Abstract: Using the terminal bud of peony as explants, the effect of 0.1% HgCl₂ with different treatment time to pollution rate, browning rate and survival rate of terminal bud, and with MS as the basic medium, then supplemented with different plant growth regulator to germinating of terminal bud, induction on multiple shoot and rooting of peony were studied. The results showed that with 0.1% HgCl₂ treating the terminal bud of peony, the optimal treating about eight minutes. The medium of optimal of germinating of terminal bud and induction on multiple shoot was MS+Ca²⁺+6-BA 2.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L. In this test, on the 50th days, the rooting medium induced the rooted ratio was 18%, the effect was not well, should be further studied.

Key words: peony; terminal bud; culture