

芍药胚离体培养的初步研究

孙晓梅¹, 王慧聪¹, 周文强², 杨宏光¹, 王丹²

(1. 沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 沈阳市植物园, 辽宁 沈阳 110163)

摘要:以芍药去皮种子和胚为外植体,研究了不同培养基对胚萌发率和生长状况的影响。结果表明:在诱导种子萌发过程中,3种基本培养基中以MS的效果最好,且在MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L培养基上萌发率最高,达71.4%;离体胚培养中,单独添加2.0 mg/L 6-BA时,胚生长受到抑制;MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L能促进愈伤组织形成;适宜浓度的GA₃能够打破上胚轴休眠,MS+6-BA 1.0 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L为胚诱导真叶抽生的最佳培养基。

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(2013)10-0097-03

芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.)属芍药科(Paeoniaceae)芍药属多年生宿根草本花卉,原产中国以及亚洲北部,被列为中国六大名花之一。芍药花形妩媚,花色艳丽,不仅具有极高的观赏价值,更具有重要的药用价值。长期以来,芍药繁殖方式主要以分株为主,存在生长缓慢、育种周期长、繁殖系数低等问题。因此,探索芍药快繁问题被育种工作者所关注。关于芍药组织培养的研究,前人研究多集中在芍药嫩茎^[1]、茎尖^[2]、丛生芽^[3]、叶柄^[4]、叶片^[2,4]等方面,芍药胚培养仍显薄弱。该试验对芍药胚离体培养技术进行了研究探索,以期探讨芍药快繁的可行性途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为购买的芍药成熟种子,外植体分为成熟种胚和去皮种子2种。

1.2 试验方法

1.2.1 材料处理 试验前将种子置于蒸馏水中浸泡2 d,取出种子用流水冲洗干净。在超净工作台上将种子去皮后,用75%酒精消毒表面30 s,无菌水冲洗3~5次,再

用0.1%升汞溶液处理10 min,无菌水冲洗5~6次,无菌滤纸吸干种子表面水分后分别直接接种和切开胚乳取胚接种。

1.2.2 种子培养 将去皮后的种子进行培养。分别以MS、1/2MS、1/4MS为基本培养基,附加不同浓度的6-BA、NAA,共9种组合(表1)。培养初期进行15 d遮光处理后光照12 h/d。观察种子生长情况,统计萌发率。

1.2.3 种胚培养 将去皮后的种子胚乳切开,用镊子迅速将胚挑出进行培养。分别接种于附加不同浓度6-BA、NAA、GA₃的MS固体培养基中,共9种组合,1个对照(表1)。培养初期进行7 d遮光处理后光照12 h/d。观察胚生长情况,记录初萌期。

1.2.4 培养条件 培养基中均添加30 g/L蔗糖和7 g/L琼脂粉,pH为5.8~6.0。每种处理接种30瓶,每瓶接种1枚,培养室温为(24±1)℃,光照强度1 500~2 000 lx。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对芍药种子生长的影响

由表2可以看出,Z3培养基上胚的萌发率最高,达到71.4%,而Z7培养基中胚萌发率最低为0,其它培养基上的萌发情况介于中间水平。不同基本培养基的效果有所不同。以MS(Z1、Z2、Z3)为基本培养基的芍药胚萌发率明显高于浓度为1/2MS(Z4、Z5、Z6)和1/4MS

第一作者简介:孙晓梅(1970-),女,博士,教授,研究方向为园林植物遗传育种。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31240028)。

收稿日期:2012-01-14

Abstract: Along with our country paying more attention to the landscape construction, more and more garden landscape design and landscape material arises emerged as the times require, so the material application status directly affected the whole landscape spiritual culture. The present situation of the application of landscape material and problems often appears in the application process were mainly discussed in this paper, the characteristics of several common rigid pavement were elaborated, according with its applications.

Key words: landscape materials; application status; characteristics and selection

表 1 培养基配方

培养基	编号	培养基配方
种子培养基		
	Z1	MS+6-BA 1.0 mg/L
	Z2	MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L
	Z3	MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L
	Z4	1/2 MS+6-BA 1.0 mg/L
	Z5	1/2 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L
	Z6	1/2 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L
	Z7	1/4 MS+6-BA 1.0 mg/L
	Z8	1/4 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L
	Z9	1/4 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L
种胚培养基		
	P0	MS
	P1	MS+6-BA 0.5 mg/L
	P2	MS+6-BA 1.0 mg/L
	P3	MS+6-BA 2.0 mg/L
	P4	MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L
	P5	MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L
	P6	MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L
	P7	MS+6-BA 1.0 mg/L+GA ₃ 0.1 mg/L
	P8	MS+6-BA 1.0 mg/L+GA ₃ 0.5 mg/L
	P9	MS+6-BA 1.0 mg/L+GA ₃ 1.0 mg/L

表 2 不同培养基对种子生长情况的影响

培养基	生长情况	萌发率/%
Z1	胚萌动缓慢,种子褐化程度轻	42.3
Z2	胚生长缓慢,子叶展开,胚根伸长,种子褐化程度轻	51.9
Z3	胚萌动较快,子叶伸展,有新芽萌动,胚根伸长,种子颜色逐渐变暗,褐化程度轻	71.4
Z4	胚萌动缓慢,种子褐化程度逐渐加重	13.3
Z5	胚萌动缓慢,子叶伸展缓慢,种子褐化程度轻	33.3
Z6	胚萌动较快,子叶展开后生长缓慢,种子褐化程度轻	37.5
Z7	胚未萌动,种子褐化严重,全部死亡	0
Z8	胚停止生长或种子褐化严重,导致死亡	5.3
Z9	胚根伸出胚乳后生长缓慢,种子极易褐变,污染严重	10.0

(Z7、Z8、Z9)上的萌发指数。从不同激素配比来看,附加细胞分裂素 6-BA 和生长素 NAA 的培养基中胚的萌发情况要好于单独添加 6-BA 的培养基。在提高 6-BA 和 NAA 的浓度后,胚的萌发率高于低浓度的组合。Z1、Z2、Z4、Z5 中,培养 20 d 后可见胚萌动,种子褐化程度较轻;Z3、Z6 培养 15 d 后,可见胚根伸出胚乳,子叶突破胚乳呈乳白色,其中 Z3 生长势优于 Z6,子叶健硕,23 d 时两子叶间有新芽萌动(图 1a);Z7、Z8 中少数或未见胚根伸出,随后种子出现不同程度的褐变,导致胚停止生长,最终大部分死亡。

2.2 不同浓度激素对比对种胚生长的影响

表 3 表明,在未添加任何激素的 P0 培养基中,胚的萌发时间较其它培养基迟缓,为 10 d。培养初期子叶萌动呈乳白色,随后逐渐扩大显绿,下胚轴伸长明显,生长速度缓慢。在单独添加不同浓度 6-BA 的 P1、P2、P3 培养基中,胚的初萌期相差较大,分别为 8、6、21 d,生长情况也有明显差异。P1 中,胚的初萌期早于或近似于 P0 的萌动时间,子叶膨大淡绿色,少数胚根生长;P2 初萌期和生长势均优于 P1,子叶伸展明显呈绿色,部分胚的上胚轴有萌动迹象,出现新芽,个别胚下胚轴较粗, P1 和 P2 下胚轴长势相当;P3 培养基在接种 15 d 后,胚仍无生长迹象。当 6-BA 浓度一定时,添加不同浓度 NAA 的 P4、P5、P6 培养基中,初萌期为 3~4 d,明显早于上述 4 种培养基的萌动时间,随着胚的生长,长势发生变化。P4 中,子叶展开后生长较快,两子叶间有新芽萌动但生长缓慢,胚根伸长,生长 2~4 条侧根;P5 中,部分子叶狭长反卷,有新芽萌动,主根长势强,围绕胚轴形成少量疏松愈伤;P6 中,子叶萌动后生长缓慢,下胚轴逐渐形成膨大紧密的愈伤组织,未见胚根伸长(图 1b)。当 6-BA 浓度一定时,离体胚在添加不同浓度 GA₃ 的(P7、P8、P9)培

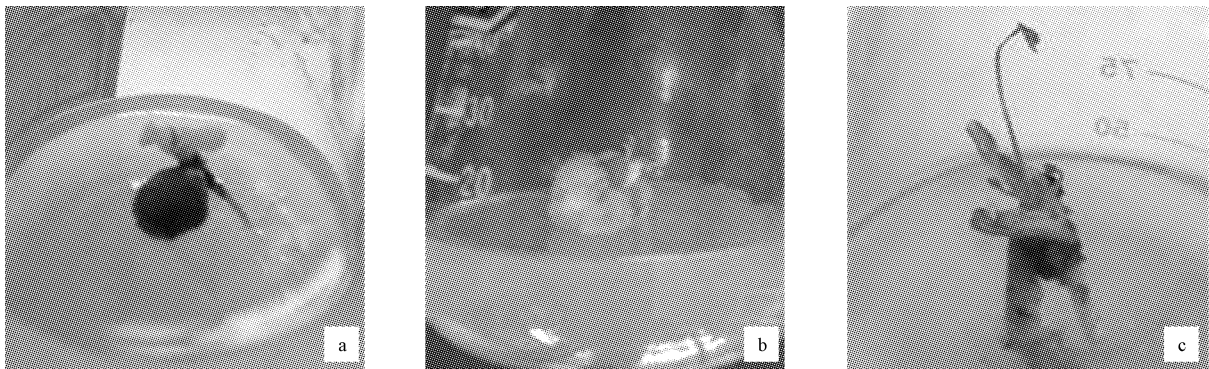


图 1 芍药的组织培养

注:a;芍药种子培养 23 d,子叶呈白色增大、胚根伸出;b;胚轴上发生愈伤组织;c;种胚抽生绿色真叶。

Fig. 1 Tissue culture of *Paeonia lactiflora*

Note:a;Seed culture of *Paeonia lactiflora* for 23 days,the white cotyledon enlarged and radicle threw out;b;Callus on hypocotyl;c;Throw out green leaves from embryo.

培养基与 P4~P6 培养基上表现相近,初萌期相近为 3~4 d,在生长势方面有明显不同。P7 中,子叶狭长,有新芽萌动,下胚轴生长缓慢;P8 的生长势优于 P7 号,子叶硕大呈淡绿色,子叶间长出 2~4 片真叶,发生抽枝现象,下胚轴较粗迅速伸长,主根长势强(图 1c);在 P9 培养基中,个别子叶间形成多个新芽,胚根少数。

表 3 不同培养基对胚生长情况的影响

Table 3 Effect of different mediums on growth of embryo

培养基	生长情况	初萌期/d
P0	子叶膨大,下胚轴伸长明显	10
P1	子叶伸展,少数胚根生长	8
P2	子叶伸展显绿色,有新芽萌动,下胚轴较粗	6
P3	子叶萌动缓慢	21
P4	子叶生长较快,新芽生长缓慢,胚根伸长,有侧根发生	3
P5	子叶狭长反卷,新芽萌动,主根长势强,胚轴出现少量愈伤	4
P6	子叶生长缓慢,下胚轴形成大量愈伤组织	4
P7	子叶狭长,有新芽萌动,下胚轴生长缓慢	4
P8	子叶硕大,生长 2~4 片真叶,发生抽枝现象,下胚轴较粗	3
P9	子叶间出现多个新芽,胚根少数	4

3 结论与讨论

该试验结果表明,MS 适宜作为芍药种子培养的基本培养基。说明种子培养对大量元素的要求较高,高浓度的无机盐可以提供给胚萌动时所需要的充足的营养元素。高浓度激素组合 Z3(MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L)有助于胚突破胚乳生长。随着种子培养时间的增长,胚乳和培养基接触后褐化率随之增加,严重影响胚苗成活率。该试验发现,培养初期进行遮光处理^[5]、待胚萌动后将其与胚乳分离培养均能够减少褐化现象的发生,但褐化机理还有待进一步研究。

P0 号对照培养基中,种胚生长缓慢且长势弱,说明在离体培养中,胚的生长模式与种子萌发时胚的生长模式类似,这与郑相穆等^[6]的观点一致。单独使用 6-BA 2.0 mg/L 时,导致种胚基本停止生长。表明 6-BA 虽能促进胚发育,但浓度过高使胚的萌发明显受到抑制,单独使用 6-BA 短期内不易形成愈伤组织^[7]。确定 6-BA 1.0 mg/L 时,低浓度 NAA 可以促进种胚萌发,随着 NAA 浓度的增加,愈伤组织化越严重。GA₃是影响上胚轴初代培养的关键因素。试验结果表明,P8(MS+6-BA 1.0 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L)是诱导芍药胚萌发生长效果最理想的培养基。可见,6-BA 配合适宜浓度的 GA₃,可以有效打破芍药种胚上胚轴休眠,刺激茎伸长,这与于恒秀等^[8]的研究结果基本一致。该试验中,外植体褐化现象严重,生根数较少,仍有待于进一步深化研究。

参考文献

- [1] 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(增刊):23-33.
- [2] 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.
- [3] 王吉凤.芍药组织培养研究[D].北京:北京林业大学,2009.
- [4] 于晓南,吴红娟,潘瞳.4 个品种芍药愈伤组织的诱导及分化[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2001,37(2):166-171.
- [5] 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):783-786.
- [6] 郑相穆,周阮宝,谷丽萍,等.凤丹种子的休眠和萌发特性[J].植物生理学通讯,1995,31(4):260-262.
- [7] 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.
- [8] 于恒秀,周美艳,王森,等.利用二次正交旋转组合设计优化芍药胚苗快繁的培养基[J].扬州大学学报(农业与生命科学版),2008,29(4):84-89.

Preliminary Study on Embryo Culture *in vitro* of *Paeonia lactiflora* Pall.

SUN Xiao-mei¹, WANG Hui-cong¹, ZHOU Wen-qiang², YANG Hong-guang¹, WANG Dan²

(1. College of Forestry, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866; 2. Shenyang Botanical Garden, Shenyang, Liaoning 110163)

Abstract: *Paeonia lactiflora* Pall. peeled seeds and embryos were used as explants to study the effects of different mediums on the germination and growth of *Paeonia lactiflora* Pall.. The results showed that MS medium was the best for inducing the germination of seeds among 3 medias and seeds had the highest germination rate (71.4%) on MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L. *In vitro* embryo culture, adding 6-BA solely at 2.0 mg/L inhibited the growth of embryo; MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L promoted the formation of callus; GA₃ at suitable concentration could break the dormancy of epicotyl and the optional medium for inducing leaves to throw out from embryo was MS+6-BA 1.0 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L.

Key words: *Paeonia lactiflora* Pall.; embryo; *in vitro* culture