

## “洛阳红”牡丹组织培养快速繁殖技术研究

王燕霞,师校欣,杜国强,王晨,郝晓祎,王俊玲  
(河北农业大学园艺学院,河北保定 071001)

**摘要:**以“洛阳红”牡丹组培苗为试材,探讨了不同基本培养基、激素配比、培养条件、抗褐化物质对“洛阳红”牡丹继代苗增殖生长、生根及褐化的影响。结果表明:DKW基本培养基适宜“洛阳红”牡丹继代增殖;培养基中附加2.0~3.0mg/L BA与0.5mg/L IAA或0.05mg/L NAA配比有利于继代苗分化、生长,而附加玉米素ZT效果不佳;20~25℃对“洛阳红”继代苗增殖影响不大,30℃下试管苗很快老化、枯死,不宜采用;1/2MS附加0.2mg/L NAA或2.0mg/L IAA与2.0mg/L IBA配比可促进“洛阳红”牡丹试管苗不定根诱导;继代和生根培养基中附加0.5g/L PVP可有效减轻‘洛阳红’牡丹组培苗褐变,促进继代苗分化、生长,但对生根没有明显影响。

**关键词:**牡丹;组织培养;继代增殖;生根;褐变

**中图分类号:**S682.1 **文献标识码:**A

### Micropropagation of ‘Luo Yang Hong’ Peony in vitro

Wang Yanxia, Shi Xiaoxin, Du Guoqiang, Wang Chen, Hao Xiaoyi, Wang Junling  
(College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001)

**Abstract:** The ‘Luo Yang Hong’ peony cultured in vitro was studied for effect of basic media, combination of plant growth regulators, incubation condition, and anti-browning material on subculture status, rooting ability, and browning. The results showed that DKW medium was a suitable basic medium for ‘Luo Yang Hong’ Peony’s subculture. Supplying of 2.0~3.0mg/L BA and 0.5mg/L IAA or 0.05mg/L NAA could benefit the subculture, but supplying of ZT did not have positive result. The plantlets incubated at 20~25℃ had no significant difference in terms of the number of propagating buds, but the plantlets were aging and dead faster at 30℃. The 1/2MS basic medium supplied with 2.0mg/L NAA or 0.2mg/L IAA and 2.0mg/L IBA could help the inducing of adventitious roots. The supplying of 0.5g/L PVP in media of subculture and rooting could mitigate browning and promote differentiation of subculture plantlets, but had no significant effect on rooting.

**Key words:** peony, tissue culture, subculture, rooting, browning

牡丹(*Paeonia suffruticosa*)属芍药科芍药属宿根木本花卉,花朵雍容华贵,端庄富丽,居中国传统名花之首,素有“花中之王”、“国色天香”之美誉。中国人民还把牡丹作为幸福、美好、繁荣昌盛的象征,深受人们喜爱。牡丹不仅有极高的观赏价值,还有相当重要的药用价值<sup>[1,2]</sup>。牡丹传统的繁殖方式有种子繁殖、分株繁殖、压条繁殖和嫁接繁殖<sup>[3,4]</sup>等。但在实际生产中存在一些

问题,如种子具有休眠习性,有些品种在自然状态下萌发需要8个月的时间且生根萌发率极低<sup>[5]</sup>,一些名贵品种经长期人工栽培,结实能力降低,种子发育不良<sup>[6]</sup>。嫁接和分株等常规无性繁殖方式不仅成苗周期长,出苗量少,质量参差不齐,且只能在生长季节繁殖,繁殖速度有限,难以满足生产的需求。采用组织培养法繁殖牡丹,是提高牡丹繁殖率的有效途径。

**基金项目:**河北省自然科学基金资助项目“不同继代次数组培苗种质保存特性研究”(C2008000287)资助。

**第一作者简介:**王燕霞,女,1982年4月出生,硕士研究生,主要从事园艺生物技术研究。通信地址:071001河北省保定市河北农业大学园艺学院, Tel: 0312-7528322, E-mail: biotech@hebau.edu.cn。

**通讯作者:**杜国强,男,1966年2月出生,博士,教授,主要从事园艺植物生物技术和果树栽培生理研究。通信地址:071001河北省保定市河北农业大学园艺学院, Tel: 0312-7521817, E-mail: duguoqiang666@yahoo.com.cn。

**收稿日期:**2008-08-15, **修回日期:**2008-08-19。

国内、外学者对牡丹离体培养进行了研究<sup>[7,8]</sup>,但至今未能用于生产实践,原因是牡丹组培快繁难度较大,主要表现在(1)褐化严重,牡丹组培苗褐化严重,影响外植体与继代植株的正常生长与分化增殖及生根<sup>[9]</sup>; (2)生根率不高,甚至一些品种尚未获得生根苗<sup>[10]</sup>; (3)生根质量不高,不定根从茎基部的愈伤组织产生,使根与茎中间形成离层,影响下一步的移栽工作,牡丹生根苗移栽后的成活率极低,限制了组培技术在实际工作中的应用<sup>[11]</sup>。笔者对“洛阳红”牡丹的离体快繁技术进行研究,以期对牡丹种苗的工厂化生产提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

2005年10月25日自河南洛阳采集“洛阳红”牡丹土芽,自来水冲洗干净,在超净台上用0.1% HgCl<sub>2</sub>消毒5~15min,无菌水冲洗4~5次,接种在培养基(MS+BA1.0mg/L+NAA0.05mg/L+白糖30.0g/L+琼脂6.0g/L)上培养,待长成有一定数量的无菌繁殖系后进行试验,试验于2006—2008年在河北农大园艺学院生物技术实验室进行。

### 1.2 试验设计 及方法

1.2.1 基本培养基对“洛阳红”牡丹继代增殖的影响 采用6种基本培养基MS、1/2MS、WPM、C<sub>17</sub>、DKW、B<sub>5</sub>,附加BA1.5mg/L、NAA0.05mg/L、白糖30g/L、琼脂6g/L,pH调至6.0,接种“洛阳红”牡丹继代苗,完全随机试验设计,每处理10瓶,每瓶接种5~6株,要求苗大小相近(下同)。

1.2.2 生长调节剂配比对“洛阳红”牡丹继代增殖的影响 基本培养基DKW分别附加30g/L白糖、6g/L琼脂及不同浓度的BA、ZT、IAA、NAA组合,接种“洛阳红”牡丹继代苗,具体处理见表2。

1.2.3 培养条件对“洛阳红”牡丹继代增殖的影响 “洛阳红”牡丹继代苗接种后分别放置在20℃、25℃、30℃恒温培养箱及(25±3)℃培养室下培养,调查其分化、

生长情况。

1.2.4 生长调节剂配比对“洛阳红”牡丹生根的影响 选择1/2MS或1/2DKW附加白糖25g/L为基本培养基,分别配合不同种类和浓度的生长素,切取继代培养35d左右,生长健壮、株高在1.5cm以上的嫩梢,接入各处理培养基中,进行“洛阳红”牡丹试管苗不定根诱导(具体处理详见图1),完全随机试验设计,每处理10瓶,每瓶接种4~6株。

1.2.5 控制褐化对“洛阳红”牡丹继代繁殖和生根的影响 在DKW+BA2.0mg/L+IAA0.5mg/L+白糖30g/L的继代培养基及1/2MS+NAA0.2mg/L+IBA1.0mg/L+白糖25g/L的生根培养基中分别附加0.3、0.5、1.0g/L的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和2.0、4.0g/L的活性炭(AC),调查吸附剂PVP和AC对“洛阳红”牡丹试管苗控制褐变的效果及对继代增殖和生根的影响。

### 1.3 培养条件

除特殊处理外,培养室条件为温度(25±3)℃,14h/d光照,光照强度2000lux。

### 1.4 结果调查与统计

接种后40~50d左右调查各处理继代苗增殖情况或生根情况,即平均每株分化苗数和平均每株有效新梢数(有效新梢数为高于1.5cm、可用于生根的嫩梢数)、生根率和平均每株生根条数。数据采用DPS软件统计分析,百分率经反正弦转换,显著水平0.05。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同基本培养基对“洛阳红”牡丹继代繁殖的影响

将“洛阳红”牡丹继代苗接种在附加相同激素的6种基本培养基中培养,继代增殖的效果不同(表1),其中以DKW、WPM、1/2MS基本培养基上生长的继代苗分化苗数较高,但能用于生根的有效苗数则以DKW培养基最高,且生长势较健壮,综合考虑DKW基本培养基较适宜“洛阳红”牡丹继代增殖。

表1 不同基本培养基对“洛阳红”牡丹组培苗继代生长的影响

基本培养基	激素浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )		分化苗数/(个·株 <sup>-1</sup> )	有效苗数/(个·株 <sup>-1</sup> )
	BA	NAA		
DKW	1.5	0.05	3.26 a	1.87 a
WPM	1.5	0.05	3.18 a	1.12 b
1/2MS	1.5	0.05	2.80 ab	0.64 c
C <sub>17</sub>	1.5	0.05	2.08 b	0.78 bc
MS	1.5	0.05	1.88 bc	0.98 b
B <sub>5</sub>	1.5	0.05	1.72 c	0.54 c

注:表中同列数值后标记不同字母表示差异达0.05显著水平,相同字母表示差异不显著。以下各表相同。

2.2 生长调节剂配比对“洛阳红”牡丹继代增殖的影响 以DKW为基本培养基,在16种不同激素配比水

平下对“洛阳红”牡丹组培苗继代增殖培养。结果如表2所示。细胞分裂素ZT不适合“洛阳红”牡丹继代增

表2 不同激素浓度对比对“洛阳红”牡丹继代增殖的影响

激素配比/(mg·L <sup>-1</sup> )				分化苗数/(个·株 <sup>-1</sup> )	有效苗数/(个·株 <sup>-1</sup> )
BA	ZT	IAA	NAA		
1.0	-	0.5	-	2.69 b	1.38 bc
2.0	-	0.5	-	2.90 ab	2.38 a
3.0	-	0.5	-	3.67 a	1.88 ab
4.0	-	0.5	-	2.24 bc	1.10 c
5.0	-	0.5	-	0.93 d	0.70 d
2.0	-	-	0.05	2.93 ab	2.02 ab
3.0	-	-	0.05	3.82 a	1.59 b
4.0	-	-	0.05	1.00 d	0.69 d
-	1.0	0.5	-	1.00 d	0.53 de
-	2.0	0.5	-	0.84 d	0.42 e
-	3.0	0.5	-	1.11 d	0.88 cd
-	4.0	0.5	-	1.00 d	0.30 e
1.0	1.0	0.5	-	2.27 bc	1.09 c
2.0	1.0	0.5	-	2.53 b	1.33 bc
1.0	2.0	0.5	-	1.96 c	1.06 c
2.0	2.0	0.5	-	1.85 c	1.03 c

殖,无论 ZT 单用还是与 BA 组合,对“洛阳红”继代增殖的效果都不好,生长势不整齐,试管苗老化;BA 浓度高于 4.0mg/L 分化苗数少,且过早停长,不利于“洛阳红”牡丹的繁殖,附加 2.0~3.0mg/L BA 时,“洛阳红”牡丹分化苗数和有效苗数都较高,增殖效果好;生长素种类对“洛阳红”牡丹继代增殖的影响不大,IAA0.5mg/L 或 NAA0.05mg/L 处理没有明显差别。

### 2.3 培养温度对“洛阳红”牡丹继代繁殖的影响

将“洛阳红”牡丹继代苗接种后分别置于 20℃、25℃、30℃ 恒温箱及 (25±3)℃ 培养室条件下培养,结果表明 20~25℃ 温度下,恒温或小幅变温处理分化苗数、有效苗数差异均不显著(表 3),但 30℃ 条件下试管苗生长后期易褐化、枯死,不宜采用。

表3 培养温度对“洛阳红”牡丹继代增殖的影响

温度/℃	分化苗数/(个·株 <sup>-1</sup> )	有效苗数/(个·株 <sup>-1</sup> )
20	2.92 a	1.85 a
25	3.54 a	1.93 a
30	1.36 b	0.25 b
25±3	3.68 a	2.01 a

### 2.4 生长素对比对“洛阳红”牡丹试管苗不定根诱导的影响

在附加不同生长素配比的 1/2DKW 培养基中接种牡丹生根苗,结果表明,各处理生根率低于 10% 甚至不生根,说明 1/2DKW 基本培养基不适宜做牡丹组培苗生根培养。

以 1/2MS 基本培养基附加不同浓度的 IAA 与 IBA

或 NAA 与 IBA,预备试验时发现,3 种生长素单独使用或配合使用浓度较低时 (0.5~1.0mg/L IAA, 0.3~1.0mg/L IBA,参考多数植物生根培养所用浓度) 生根率很低,加大生长素浓度后,“洛阳红”牡丹试管苗获得了较高的生根率(图 1),其中 IBA 促进生根效果明显,随浓度升高,生根率明显增加;IAA 和 NAA 也有随浓度升高,生根率提高的趋势,不过 NAA 浓度达到 0.3mg/L 时开始抑制不定根发生,IAA3.0mg/L 和 IBA2.0mg/L 配合时也有此现象发生。生长素对发根条数的影响趋势与生根率相同。综合以上结果“洛阳红”牡丹不定根诱导以 IAA2.0 或 NAA0.2 与 IBA2.0 配合使用效果较好。

### 2.5 控制褐化对“洛阳红”牡丹继代繁殖和生根的影响

“洛阳红”牡丹试管苗褐化严重,在 DKW+BA 2.0mg/L+IAA 0.5mg/L+ 白糖 30g/L 的继代培养基及 1/2MS+NAA 0.2mg/L+IBA 1.0mg/L+ 白糖 25g/L 的生根培养基中分别附加吸附剂 PVP 和 AC,结果表明(表 4),PVP 有减轻“洛阳红”牡丹试管苗褐化的效果,且附加 0.5g/L 的 PVP 可有效促进其继代苗分化,但供试各浓度对生根未明显促进作用;附加 2.0 和 4.0g/L 的 AC 对“洛阳红”牡丹试管苗的增殖和生根均有抑制作用。培养基中附加 PVP、AC 的原理是可吸附材料分泌的有害物质,有效防止褐变对材料的伤害,其中 PVP 是酚类物质的专一吸附剂<sup>[9]</sup>,而 AC 可能也同时吸附了促进分化的营养物质和生长激素<sup>[12]</sup>,所以抑制了材料生长。

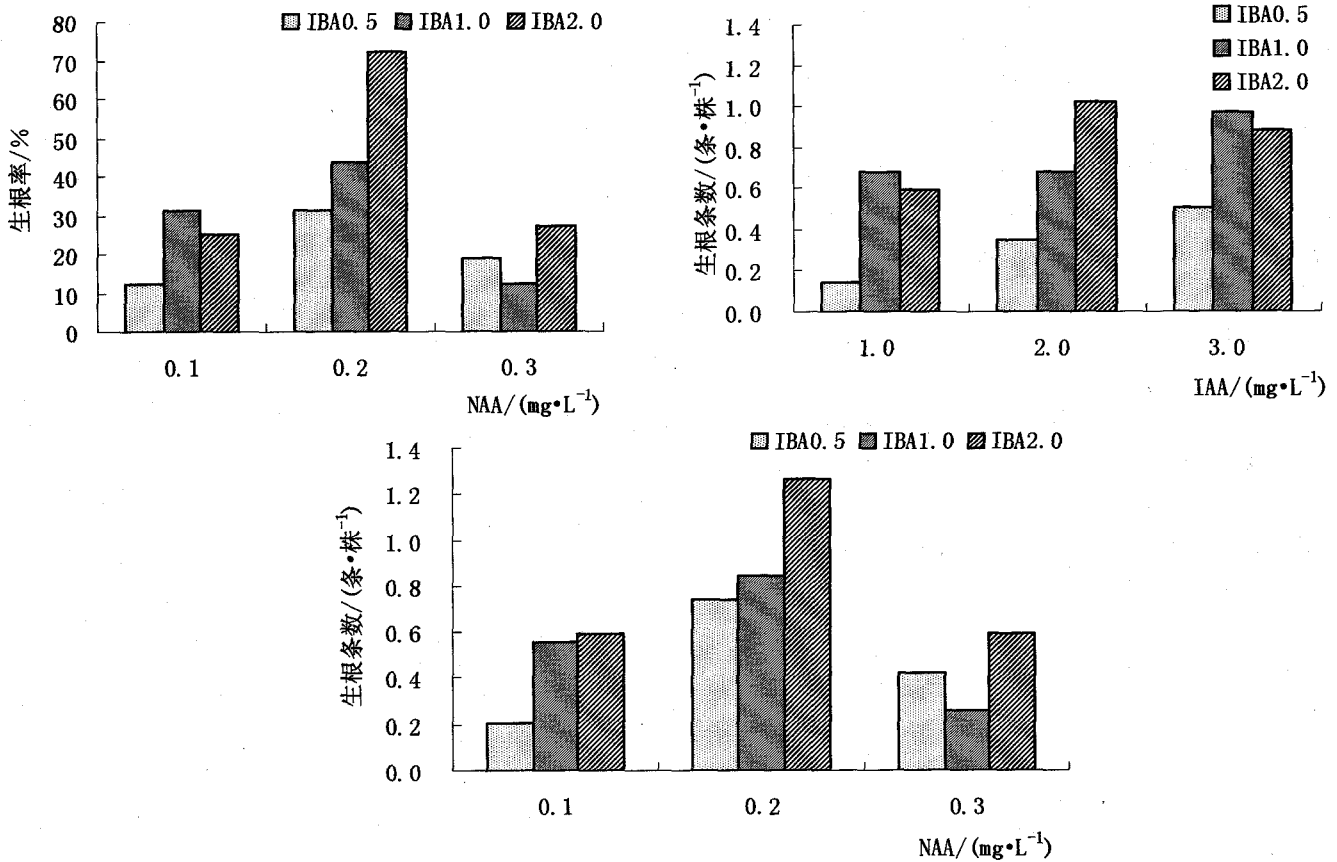


图1 生长素配比对“洛阳红”牡丹试管苗生根的影响

表4 PVP与AC对“洛阳红”牡丹继代增殖和生根的影响

PVP/(g·L <sup>-1</sup> )	AC/(g·L <sup>-1</sup> )	增殖		生根	
		分化苗数/(个·株 <sup>-1</sup> )	有效苗数/(个·株 <sup>-1</sup> )	生根率/%	生根条数/(条·株 <sup>-1</sup> )
0.0	0.0	2.56 b	1.82 bc	38.6 a	0.58 a
0.3	-	2.87 b	2.35 a	32.6 a	0.49 a
0.5	-	3.62 a	2.68 a	30.0 a	0.45 a
1.0	-	2.92 b	1.32 c	15.0 b	0.25 b
-	2.0	0.95 c	0.66 d	0.0 c	0.0 c
-	4.0	1.02 c	0.74 d	0.0 c	0.0 c

### 2.6 “洛阳红”牡丹试管苗温室驯化移栽

将“洛阳红”牡丹诱导生根40d的生根苗,转入温室强光照(18000~35000lux)闭瓶锻炼2周,开瓶锻炼3d后,取出试管苗移栽,移栽基质分别选用1/2沙壤土+1/2蛭石及草炭土+珍珠岩两种,并用0.1%多菌灵药液消毒,栽后喷0.1%多菌灵预防病害发生,搭小拱棚保持湿度,一周后逐渐放风,直至去掉小拱棚。50d后调查移栽成活率,其中蛭石+河床土基质成活率为25.7%,草炭土+珍珠岩基质的移栽成活率为10%。

### 3 讨论

秋季采“洛阳红”牡丹土芽起始培养,污染率低,接种芽很快正常分化,所以土芽适宜做为外植体。“洛阳红”牡丹试管苗增殖、生根的效果主要受培养基基本成

分和激素配比影响,继代培养基选用DKW比较合适,但生根培养用1/2DKW效果很差,宜用1/2MS培养基。从试验结果看“洛阳红”牡丹试管苗生根率可达72%,但比起其它植物种类生根率还是偏低,笔者借鉴对较难生根的苹果品种进行适当黑暗培养来提高生根率的方法<sup>[3]</sup>,对“洛阳红”牡丹生根培养苗进行15~20d黑暗培养,但未能提高生根率,不过试验初步发现培养基的糖浓度和pH影响“洛阳红”牡丹生根,具体最适处理还需进一步试验验证。

很多报道都认为牡丹试管苗生根质量较差,根从苗基的愈伤组织产生,使根与茎中间形成离层,影响下一步的移栽工作<sup>[4]</sup>,笔者发现“洛阳红”牡丹试管苗生根后还存在一些其它问题,比如其它树种转入生根培

培养基中后由于生长素浓度提高,试管苗明显增高,茎增粗,叶片增大;而“洛阳红”牡丹生根后的植株比继代苗生长势还弱,个体不增大,颜色暗淡,无光泽,还有茎尖枯死现象;尤其生根后期诱导的不定根由最初的白色逐渐变为绿色、褐色,很易老化,变硬、变脆,这些因素对移栽成活会有影响。因此笔者建议,为提高移栽成活率,应在试管苗发根后尽早锻炼、移栽。

#### 4 结论

“洛阳红”牡丹外植体起始培养比较容易;其增殖、生根效率主要受培养基基本成分和激素配比影响,DKW培养基附加BA 2.0~3.0mg/L与IAA 0.5mg/L或NAA 0.05mg/L配比继代增殖效果较好,增殖倍数可达3~4倍以上;1/2MS基本培养基附加高水平的生长素NAA 2.0mg/L或IAA 0.2mg/L与IBA 2.0mg/L配合使用促进“洛阳红”牡丹试管苗不定根诱导,生根率可达70%左右;继代和生根培养基中附加0.5g/L的PVP可有效减轻“洛阳红”牡丹组培苗褐变程度,促进继代苗分化。

#### 参考文献

- [1] 刘淑敏,王蓬英.牡丹.北京:中国建筑工业出版社,1987:1-3.
- [2] 王建国.中国牡丹.北京:中国林业出版社,2001:5-8.
- [3] 曾端香,尹维伦,赵孝庆,等.牡丹繁殖技术.北京林业大学学报,2000,22(3):90-95.
- [4] 高志民,王雁,王蓬英,等.牡丹:芍药繁殖与育种研究现状.北京林业大学学报,2001,23(4):75-79.
- [5] 周仁超,姚崇怀.紫斑牡丹胚培养与植株再生.亚热带植物科学,2001,30(3):60.
- [6] 李玉龙,吴德玉,潘淑龙,等.牡丹试管苗繁殖技术的研究.科学通报,1984,(8):500-502.
- [7] LYDIA BOUZA, MOMIQUE JACQUES, EMILE MIGINIAC. Requirements for in vitro rooting of *Paeonia suffruticosa* Andr. cv. 'Mme de Vetry'. *Scientia Horticulturae*, 1994, 58(3):223-233.
- [8] 李志军,刘志国,李红梅.牡丹组培快繁技术研究.山东农业科学,2006,3:39-40.
- [9] 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.沈阳农业大学学报,2006,37(5):720-72.
- [10] 张桂花,王红梅,王连祥.牡丹组织培养技术研究.山东农业科学,2001,5:16-18.
- [11] 李艳敏,罗晓芳.牡丹离体培养与快速繁殖研究进展.西南林学院学报,2004,24(1):70-73.
- [12] 周俊辉,周加容,曾浩森,等.组织培养中的褐化现象及抗褐化研究进展.园艺学报,2000,27(增刊):481-486.
- [13] 师校欣,杜国强,高仪,等.黑暗培养对苹果组培快繁及叶片再生的影响.河北农业大学学报,2004,27(4):18-21.

致谢:感谢河南科技大学林学院李秀珍副教授提供“洛阳红”牡丹土芽。