内蒙古农业科技 2008(6):75~77
Inner Mongolia Agricultural Science And Technology

国内外牡丹组织培养技术研究现状

王二强[1], 王占营[1], 王晓晖[1], 王丛晓[2]
(1.洛阳市农业科学研究院,河南 洛阳 471022;2.洛阳市洛浦公园 管理处,河南 洛阳 471000)

摘 要:文章较全面地综述了国内外牡丹组织培养技术的研究现状,并指出目前牡丹组织培养过程中存在的技术难题,为今后牡丹组织培养工作的进一步开展提供借鉴,并认为组织培养技术必将成为牡丹快速繁育的有效手段。

关键词:牡丹;组织培养;技术
中图分类号:S685.11 **文献标识码**:B **文章编号**:1007-0907(2008)06-0075-03

牡丹是我国传统名花,深受世人喜爱,已经成为世界流行花木之一,市场前景广阔。牡丹的传统繁殖方式为播种、嫁接和分株,但由于具有很好观赏性状的品种,雄蕊、雌蕊高度瓣化,导致无结实能力或种子严重发育不良,因此这些品种生产上大多采用嫁接或分株繁殖。但分株、嫁接方式繁殖牡丹严格受时间限制,从而造成牡丹名优品种繁殖率低,限制了牡丹的繁育和育种进程及商品化生产。

组织培养技术是目前植物快繁的最有效方法之一,具有繁殖周期短、繁殖系数高,便于大规模生产,整体生产成本低的优势,因此,用组培方法进行牡丹的繁育,以解决常规繁殖方法存在的不足,是牡丹商品化和产业化发展的必然趋势。

1 牡丹组培的常规程序和培养基成分

1.1 牡丹组培常见培养基成分

牡丹组培的基本培养基为MS,其他附加成分主要有吲哚乙酸(IAA)、萘乙酸(NAA)、吲哚丁酸(IBA)、赤霉素(GA3)、水解蛋白(LH)、6-苄基嘌呤(BA)、6-糖氨基嘌呤(KT)、异戊烯基腺嘌呤(2ip),还有0.5%的活性炭,3%或2%的蔗糖作为碳源。

1.2 组培常规程序

外植体消毒工作是牡丹组培的基础,一般是将剪下的外植体先用清水冲洗干净,去掉表皮组织,然后放入70%~75%酒精中浸泡5~10s进行灭菌,并用无菌水冲洗2~3次,然后在5%的安替福民溶液中浸7~10min进行表面灭菌,然后再用无菌水冲洗3~5次,后用消毒镊子夹取材料接种在培养基上进行培养。经过30d,当苗长至1~2cm时再转移到壮苗培养基上进行培养,再过30d,当苗长到3~4cm时,进行生根诱导。

2 国内牡丹组培研究现状

2.1 研究概况

1984年李玉龙等人报道了牡丹快繁技术的研究,之后英国、法国、美国、荷兰、朝鲜及日本等国家也进行了研究。20多年来,中外学者对牡丹的组培进行了大量的工作,均取得了不同程度的进展。目前利用组培方法,已经能育成生根的组培苗,但由组培苗过渡到商品苗还存在许多问题,组培苗的生根、炼苗、出瓶,褐化现象的控制等都需要进一步研究。国内组培苗还没有形成商品苗批量生产。

2.2 国内研究进展

2.2.1 不同品种离体繁殖表现不同 国内学者在组培诱导过程中发现,自然条件下繁殖系数低,繁殖速度慢的品种,在组培过程中繁殖系数也低。如洛阳红、胭脂红比较容易分化、增殖和生根。而姚黄、夜光白则生根率低,增殖系数小。这与其在常规繁殖过程中的难易程度是一致的。

2.2.2 不同取材时期对芽培养的影响 洛阳农业高专孔祥生等以洛阳红和姚黄等品种为试材,用牡丹芽作外植体进行离体快繁技术研究,结果表明:不同时期取牡丹芽作外植体,在初次培养中表现差异很大,牡丹芽培养的适宜外植体以2月份取即将萌动的休眠芽进行培养效果最好,11月份和8月份取休眠芽培养次之,而3月份取萌生条效果最差。菏泽市农科所张桂花等人在牡丹芽萌发期和休眠期分别进行腋芽和顶芽组织培养,结果表明:牡丹丛生芽诱导要在芽萌动至休眠前进行。芽诱导最佳培养基为MS+6-BA0.5~1.0mg/L+NAA0.1~0.2mg/L,MS为最佳壮苗培养基,牡丹试管苗培养的适宜光照强度为2000 lx,光照时数为10 h/d,适宜温度(25±1)℃。

2.2.3 根诱导方面的研究 牡丹组培苗生根培养中用到的基本培养基有MS、LP、改良MS、1/2MS和改良WPM,其中最常用的是1/2MS。最有效的生根诱导剂是IBA,也有使用NAA和IAA诱导生根的报道。IBA作为生根诱导剂"两步生根法"最有效,即先将未生根的组培苗在含一定浓度的IBA的培养基上进行一段根诱导,然后转入含有活性炭而不含生长素的根形成培养基中培养。IBA的浓度和诱导天数,培养基中的蔗糖浓度,AC含量等也对牡丹的生根有影响。另外,由于牡丹品种间的差异较大,适合不同品种生根的IBA浓度和诱导天数不尽相同。徐桂娟等人在研究中以15mg/L IBA处理20d,海云紫等品种生根率最高。可见,IBA的适宜浓度和诱导天数需要分别针对不同的品种进行摸索,这也是牡丹组培苗生根率低的一个原因。李艳敏等一些学者认为充足的蔗糖等碳水化合物能提高牡丹组培苗的生根率,并同时促进根和茎的生长;组培苗在生根阶段对蔗糖的需要量大于增殖阶段。根形成培养基中添加一定量的AC,能明显改善生根质量。李艳敏发现培养基中AC的含量从0增加到2.0mg/L,组培苗的生根条数从1.43条增加到4.54条,不过根的颜色也变为白色。

2.2.4 以叶及叶柄为外植体进行组培研究 我国牡丹组培学者用叶和叶柄进行组织培养取得了一些进展。李丽霞等以"荷花紫"、"大胡红"品种的幼叶作外植体,采用正交设计法,考察6-BA、2,4-D、KT、NAA 4种激素及酪蛋白对牡丹愈伤组织产生的影响,确定适宜的激素种类及水平,优化筛选出适宜于2个牡丹

收稿日期:2008-10-10

品种的愈伤组织诱导培养基,得出:激素 2,4-D 是幼叶愈伤诱导的关键因素,适宜于牡丹"荷花紫"及"大胡红"初培养的培养基配方均为 1/2MS+2,4-D4mg/L+KT0.2mg/L+NAA0.4mg/L+酪蛋白 200mg/L。何松林等以"洛阳红"叶柄为试验材料,探讨离体培养中褐化的防止,得出:WPM 为基本培养基时褐化现象最轻,1/2MS 次之,MS 褐化现象最为严重;3 种抗氧化剂和吸附剂对褐化的抑制作用较为明显,其中以 PVP 最好,VC 较次之,$Na_2S_2O_3$ 最差。西北师范大学陈怡平等先后分别用紫斑牡丹的土芽、叶柄、叶片、幼芽、心皮、雄蕊及经一段时间组织培养的试管苗等作外植体进行愈伤组织的诱导,得出:配方 MS+BA15 mg/L+NAA2 mg/L 最为理想;不同外植体中,试管苗的幼芽和土芽诱导率最高,叶柄和叶片次之,其诱导率分别为 100.0%、60.0%、30.8%,而生殖器官雄蕊和心皮未能诱导成功。

2.2.5 牡丹组培过程中产生玻璃化现象的研究 1992 年河南师范大学的储成才、李大卫首次报道了组培中产生玻璃化现象,并对其产生原因做了初步观察。实验中发现:NAA、6-BA 等单独或相互作用均不会诱导牡丹玻璃苗的产生;温度的高低与牡丹玻璃苗的产生有很大的相关性,在 26℃以下没有玻璃苗的产生,在 26~30℃却有 63%的牡丹苗发生玻璃化现象,随温度的升高,玻璃化产生的频率也升高。

2.2.6 牡丹组培过程中防止褐化的研究 褐化问题是牡丹组培过程中的重要瓶颈之一。北京林业大学李萍等人研究了活性炭、硝酸银、PVPP 和 VC 4 种防褐剂对牡丹品种'乌龙捧盛'组培中褐化控制的作用及对组培苗生长和增殖的影响。结果表明:褐化集中发生在转接后 4d 内。活性炭能有效控制褐化,但长时间处理会抑制组培苗的生长和增殖;继代培养初期在含活性炭 2.0g/L 的培养基中进行 4d 短期处理,不仅能有效控制褐化,还在一定程度上促进了组培苗的生长和增殖。硝酸银 1.0~8.0mg/L 能明显减轻褐化,其中 2.0mg/L 的效果最好并能显著促进增殖;8.0mg/L 时组培苗生长量最大。PVPP 能部分控制褐化,1.0g/L 效果较好;低浓度的 PVPP 促进组培苗生长,高浓度时促进增殖。VC 控制褐化的效果不佳,且易导致组培苗玻璃化。综合分析认为:牡丹品种'乌龙捧盛'继代转接时,先在添加活性炭 2.0 g/L 的培养基中培养 4d,然后转入不含活性炭的培养基中,能有效控制褐化和避免活性炭对生长和增殖的负面影响;在培养基中加入硝酸银 2.0 mg/L,能在有效控制褐化的同时,促进组培苗生长与增殖,推荐在牡丹组培中应用。

3 国外组培技术研究进展

3.1 愈伤组织培养

在国外最早的有关牡丹组培方面的报道 Partanen (1965)及 Demoise 和 Partanen(1969)关于愈伤组织的培养,他们通过从牡丹种子剥离的合子胚诱导出愈伤组织。Gildow 和 Mitchell 用牡丹白化茎为外植体进行组织培养,比较了 2SH 和 SH-M 两种培养基(氮含量基本相同,前者为 5000mg/L KNO_3,后者为 2500 mg/L KNO_3 和 1650 mg/L NH_4NO_3)的效果,发现含有还原态氮和氧化态氮的 SH-M 培养基更利于愈伤组织的快速生长。

3.2 有关胚培养的研究

为了改变牡丹种子休眠的习性,国外学者进行了胚培养的研究。据 Gildow 和 Mitchell 用牡丹白化茎为外植体进行组织培养,比较了 2SH 和 SH-M 两种培养基的效果,发现含有还原态氮和氧化态氮的 SH-M 培养基更利于愈伤组织的快速生长。Wang and van Staden 报道,2,4-D 能促进'凤丹白'种胚的子叶两端形成愈伤组织。陈怡平等以紫斑牡丹土芽、叶柄、叶片、心皮和雄蕊为材料进行愈伤组织培养,发现愈伤组织诱导中,NAA 的作用大于 BA 的作用;NAA 浓度稍高于 BA 浓度比较理想;土芽和顶芽的诱导率最高,适合作外植体。牡丹组培中,诱导产生愈伤组织比较容易,而由愈伤组织分化不定芽却比较困难,不定芽分化率一般比较低。Zillis 和 Meyer(1976) 报道,胚的离体培养可以将萌发时间缩至 84~98d。Brukhin 和 Batygina(1994)用处于不同生长时期的 P.anomala 种胚 (授粉后 23~45d) 为外植体进行胚培养,发现只有选球状胚阶段之后的胚状体培养才能增殖,取自成熟种子的胚在无激素的 MS 和 1/2MS 培养基上均能形成正常的小植株。Julie,Buchheim 等(1994)研究了 GA3,ABA,BA 对上胚轴的影响,结果表明:GA3 促进上胚轴的生长,ABA 和各种浓度的 GA3 配合使用均抑制上胚轴的生长;GA3 和 BA 交互作用利于芽的生长;高浓度的 GA3 和 BA 能生成大量正常的叶片。此外,GA3 能打破上胚轴的休眠,在不含细胞分裂素的培养基上发生的根细长,且有侧根。

3.3 在花药和花粉方面的研究

Zenkteler 等(1975)研究了 P. suffruticos 和 P. lutea 花药的离体培养,在培养基 MS+3%蔗糖+500mg/L 水解酪蛋白+1mg/L KT+1mg/L IAA 中培养 21d 后,观察到多细胞和多核的花粉粒;42d 后,2%~3%的花粉粒形成了多细胞的胚状体,但它们始终包被着花药外壁,没有完成器官分化。Roberts 和 Sunder-land 在不添加碳和琼脂的 MS 液体培养基中,成功获得了 P. delavayi 的花粉胚。但是,由花粉胚分化出器官,从而完成植株再生的过程在牡丹方面尚未见报道。

3.4 组培苗生根能力和生根部位的研究

L.Bouza(1994)研究伸长芽的生根能力和生根部位发现,只要不去掉芽基部的腋芽,则未伸长芽的生根能力高于伸长芽,腋芽的生根能力低于主芽。为了保证试管苗出瓶后能有效地进行芽的生长,L.Bouza 等还对牡丹试管苗的再活化进行了研究,结果表明:移栽前将生根苗于 4℃冷藏 60d,有利于芽的生长。但芽的生长和形成的叶片数有限,腋芽没有进一步的生长,说明通过冷处理使试管苗再活化是有局限性的。同时,由于在人工控制的条件下长期培养或由于培养基中外源激素的加入,组培苗丧失了调节生长素和细胞分裂素代谢的能力,这种代谢干扰在组培苗出瓶后继续存在。

4 存在主要问题与展望

牡丹的育种和繁殖一直是生产和科研的主要内容,也是牡丹走向商品化和产业化的重要前提。但牡丹组织培养技术发展至今,仍存在诸多问题。主要如下:

4.1 褐化现象严重

在牡丹茎尖培养中,80%以上都会产生褐色物质,严重时导致植物材料死亡。众多问题中,褐化就是其中最主要的瓶颈之一,因此对褐化的防止不容忽视。

4.2 玻璃化现象

玻璃化是植物组织培养过程中的一种生理失调和生理病变,在牡丹组培过程中也普遍发生。整体植物与受冻害植株极其相似,从外部叶片坏死并逐渐发展到整株坏死,给牡丹组培带来极大的浪费。

4.3 生根率低和生根质量不高

生根问题是牡丹离体快繁中存在的主要问题, 也是制约牡丹离体快繁体系建立的最大瓶颈。一是生根率不高,甚至一些品种尚未获得生根苗;二是生根质量不高,部分不定根由愈伤组织产生,根与茎中间形成离层,缺乏疏导组织的联系,且不定根易脱落,影响了下一步的移栽工作。

4.4 牡丹组培苗移栽成活率低

这需要从内源激素和生理的角度进行分析解决, 尤其是移栽成活率低,是牡丹组织培养最大的限制因子,是急需进一步研究和解决的难题。

尽管牡丹的组织培养技术仍存在许多需要研究和解决的问题,并且这些问题的解决可能需要很长一段时间才能实现,但该技术应用于生产实践、服务于生产实践已成为必然趋势。组织培养及生物技术的发展,将为牡丹育种和繁殖生产提供更广阔、更高效、更便捷的途径,为加速牡丹育种和繁殖提供重要的技术基础。离体快繁技术和愈伤再生途径将为结实困难的牡丹品种提供了一条新的繁殖途径。胚珠和胚培养技术用于辅助育种,可以缩短育种年限,挽救杂种胚,提高育种效率。体细胞胚发生技术将为牡丹繁殖及通过生物技术进行牡丹育种创造条件。因此,牡丹组织培养的成功实现,道路虽然是曲折的,但前途却是光明的。

参考文献:

[1] 李嘉珏,赵潜龙.中国牡丹与芍药[M].北京:中国林业出版社,1998.

[2] 成仿云,李嘉珏,陈德忠,等.中国紫斑牡丹[M].北京:中国林业出版社,2005.

[3] 李玉龙,吴德玉,潘淑龙,等.牡丹试管苗繁殖技术的研究[J].科学通报,1984,(8) :500-502.

[4] 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.

[5] 张龙勃.牡丹组织培养研究初报[J].河南城市林业,1989,(10):21-23.

[6] 刘淑敏.牡丹"古班同春"组培初报[J].中国花卉盆景,1987,(7):24.

[7] 孔祥生,张妙霞.牡丹离体快繁技术研究[J].北方园艺,1998,(4) :87-89.

[8] 潘瑞炽.植物生理学[M].北京:高等教育出版社,2004.

[9] 何松林,陈笑蕾,陈　莉,等.牡丹叶柄离体培养中褐化防止的初步研究[J].河南科学,2005,23(1):47-50.

[10] 李　萍,成仿云,何桂梅.牡丹组织培养的初步研究[C].见:中国园艺学会第六届青年学术讨论会论文集 [A]. 西安: 陕西科技出版社,2004.684-688.

[11] 储成才,李大卫.牡丹组织培养中玻璃化现象的出现及初步观察[J].河南师范大学学报(自然科学版),1992,20 (1) :70-73.

[12] 陈怡平,丁　兰,赵敏桂,等.用紫斑牡丹不同外植体诱导愈伤组织的研究[J].西北师范大学学报(自然科学版),2001,37 (3) :66-69.

[13] 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.

[14] 徐桂娟.牡丹组培快繁技术的研究[D].北京:北京林业大学,2001.

(责任编辑　侯旭光)

(上接 60 页)

[7] 谷安琳,云锦凤,Larry Holzworth.冰草属植物在内蒙古干旱草原的建植试验[J].中国草地,1994,(3):37-41.

[8] 郭本兆.中国植物志[M].北京:科技出版社,1987.

[9] 解新明,云锦凤,等.蒙古冰草遗传多样性的 RAPD 分析(英文)[J].西北植物学报,2002,(1):56-62.

[10] 解新明,云锦凤.蒙古冰草遗传多样性的等位酶分析[J].草业科学,2001,(6):6-11.

[11] 李景欣,云锦凤,阿拉坦苏布道.冰草的遗传多样性研究[J].中国草地,2004,26(6):12-15.

[12] 戚秋慧.内蒙古典型草原禾本科牧草生态适应综合评价[J].草地学报,1998,(2):133-138.

[13] 王荣华.渗透胁迫对蒙古冰草幼苗保护酶系统的影响[J].植物学通报,2003,20(3):330-335.

[14] 于　卓,SAIGASuguru.小麦族 10 种禾草叶片可消化性及矿物质含量的差异[J].草地学报,2002,(1):1-6.

[15] 云锦凤,李瑞芬.冰草的远缘杂交及杂种分析[J].草地学报,1997,5 (4):1-17.

[16] 云锦凤,米福贵.冰草种子的萌发、生长发育及其开花生物学[J].中国草地,1989(4):16-21.

[17] 云锦凤,米福贵.冰草属牧草的种类与分布[J].中国草地,1989,(3):14-17.

[18] 云锦凤,米福贵.干旱地区一种优良禾草—蒙古冰草[J].内蒙古草业,1990,(2):70-71.

[19] 云锦凤.冰草属分类学研究的历史回顾[J].中国草地,1989,(2):3-7.

[20] 张　众,师文贵,逯晓萍.蒙古冰草研究概况[J].草业科学,2004,(7):459-465.

[21] 云锦凤,斯琴高娃.蒙古冰草 B 染色体的研究[J].内蒙古农牧学院学报,1996,17(1):14-17.

[22] Stebbins G L. Chromosomal evolution in higher plantsms[M].London: Edward Arnold Ltd.1971,87-89.

[23] 李懋学,陈瑞阳.关于植物核型分析的标准化问题[J].武汉植物研究, 1985, 3 (4): 287-300.

[24] 段晓刚,王　丽,卜秀玲.蒙古冰草和布顿大麦染色体组型分析[J].中国草地,1990,(3):45-48.

[25] 云锦凤,斯琴高娃.蒙古冰草 B 染色体的研究[J].内蒙古农牧学院学报,1996,17(1):14-17.

[26] Sakamoto S.Pattern of phylogenetic differentiation in the tribe Triticeaes[J].Seiken Ziho,1973,(24):11-31.

[27] Sarkar P. Cytotaxonomic studies on Eremopyrum[J].Can J Bot, 1985, (36):539-546.

[28] Oinuma T. Karyomorphology of cereals.IX.Karyotype alteration in Aeglops and Triticum and relationship between karyotype and genomes[J].Jpn J Genet,1953,(28):949-955.

[29] Levitzky G A. The karyotype in systematics [J].Bull Appl Bot Genet Plant Breed,1931,(27):220-240.

[30] 陈瑞阳,宋文芹,李秀兰,等.中国主要经济植物基因组染色体图谱[M].北京:科学出版社,2003.

(责任编辑　侯旭光)