

我国牡丹组织培养研究进展

李子峰^{1,2}, 胡永红^{2*}, 刘庆华¹, 王佳^{2,3}

(1. 莱阳农学院环境艺术学院, 山东青岛 266109; 2. 上海植物园, 上海 200231; 3. 北京林业大学园林学院, 北京 100083)

摘要 综述我国牡丹组织培养研究现状及进展, 着重介绍以种子、茎尖、芽、幼叶、叶柄、根等作为外植体进行培养的研究成果。牡丹组织培养的技术已经逐渐趋于完善, 但对于大规模生产还存在困难, 主要在组培品种少, 培养物褐化、玻璃化、生根难以及培养基的筛选、合适的外植体等问题需要进一步研究。

关键词 牡丹; 组织培养; 外植体; 培养基

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2006)13-2998-02

Research Advance in Chinese Peony Tissue Culture

LI Zi-feng et al (Laiyang Agricultural University Landscape Architecture and Art, Qingdao, Shandong 266109)

Abstract The tissue culture is the technical system of plant fast reproduction. In this article the present research progress in Chinese peony tissue culture was summarized, including seed culture, stem-tip culture, bud culture, young leaf culture, petiole culture, root culture and so on. The results indicated: the technique of peony tissue culture already gradually not only tended to the consummation, but also had the difficulty in the large scale production, fewer species cultured, the culturing material brown and vitrification, root growth and suitable medium, appropriate explants and so on. The technical objective, future direction and industrialization of Peony breeding were put forward.

Key words *Paeonia suffruticosa*; Tissue culture; Explants; Medium

牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.^[1]), 别名富贵花、百两金、木芍药、鼠姑、鹿韭, 为芍药科芍药属植物, 牡丹传统的繁殖方法有有性繁殖中的种子繁殖, 无性繁殖中的分株、压条、嫁接繁殖^[2]等。这些繁殖方法受着各种因素的影响, 由于多种牡丹结实率低甚至不结实, 且种子发育不良^[3], 用种子繁殖难以获得优良植株, 无性繁殖受生长季节的限制、繁殖系数小、形不成规模, 无法满足市场的需求, 而利用组培技术繁殖牡丹周期短, 繁殖系数高, 便于大规模生产, 因此, 各牡丹品种群的组培技术已经成为主要研究方向。笔者通过对 20 年来牡丹组培技术的综述^[4], 为牡丹种苗快速繁殖生产技术的现代化提供科学理论依据, 并为以后的研究提供有价值的参考。

1 种子培养

在已经报道的牡丹种子组织培养中, 主要以种胚作为外植体, 培养基以 MS 为基本培养基, 添加不同浓度的激素。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, 提高萌发率和提早萌发。黄守印^[5]对牡丹进行胚培养, 将牡丹胚分别接种在 2 种培养基上, 即 A: MS + BA 0.5 mg/L + IAA 1 mg/L + 蔗糖 3%; B: MS + BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L + LH 100 mg/L + 蔗糖 2%。在 A 上培养 10 d 后, 体积增大, 2 片子叶张开, 从叶缘开始变绿, 30 d 左右新叶长出; 在 B 上培养 60 d, 始终未见任何变化。将 A 上长出的小苗转移到 MS + BA 1 mg/L + NAA 0 ~ 0.01 mg/L + 蔗糖 2% ~ 3% 的培养基上, 可促使产生较多腋芽, 切割后可在同样培养基上继代, 便形成丛生芽。周仁超^[6]用紫斑牡丹(*Paeonia rockii* T. Hong et Li J. J.) 为材料研究胚培养和植株再生, 种胚在 1/2MS + BA 1 mg/L + IAA 1.0 mg/L 的培养基上可以较快生长并分化出不定芽, 不定芽在 1/2MS + BA 1 mg/L + IAA 0.2 mg/L 培养基上可快速繁殖, 平均增殖倍数达 6.5。曹小勇^[7]以濒危紫

斑牡丹的胚进行组培, 在没有添加任何激素的培养基上, 离体胚生长类似种子萌发时胚的生长模式, 子叶扩大伸长, 到达种子大小时停顿, 根伸长生长极其显著, 进一步得出: BA 促进子叶膨大生长, 当 BA 浓度增大时根生长受到抑制; NAA 促进愈伤组织形成, 抑制根生长, 0.1 mg/L BA 促进紫斑牡丹胚的胚轴、根生长, 有利于幼苗形成。张子学等^[8]分别采用凤丹(*Paeonia ostii*) 的种子、种胚以及由此产生的子叶、叶柄、叶片和愈伤组织等作为外植体进行芽的诱导, 结果采用胚培养可以打破上胚轴的休眠, 大大缩短初代培养周期, 进一步得出: 凤丹种胚初代培养的适宜培养基 MS + BA 0.25 mg/L + NAA 0.05 mg/L + BR 0.000 01 mg/L, 适宜的芽增殖培养基 MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + TDZ 0.001 mg/L, 适宜的生根培养基 1/2MS + IBA 0.8 ~ 1.2 mg/L。

2 茎尖培养

目前, 牡丹茎尖培养主要是针对芽的茎尖, 并且取得了进展。李玉龙等^[9]运用“青龙卧墨池”和“杂种 18 号”的腋芽茎尖进行培养, 在培养基 1/2MS + BA 0.5 ~ 1.0 mg/L + GA₃ 0.1 ~ 0.5 mg/L + KT 0.2 ~ 1.0 mg/L 得到愈伤组织, 在培养基 MS + BA 0.2 ~ 2.0 mg/L + GA₃ 0.2 ~ 0.5 mg/L 使芽伸长, 在培养基 1/2MS + IBA/IAA 0.1 ~ 2.0 mg/L + 2% 蔗糖 + 0.5% 活性炭诱导生根。谢静莹^[10]运用牡丹(枯枝牡丹)的腋芽茎尖, 在培养基 MS + BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + LH 500 mg/L + 蔗糖 5% 获得愈伤组织及分化出芽。张龙勃等^[11]运用“胡红”的休眠芽茎尖, 在培养基 MS + BA 1.5 mg/L + KT 0.5 mg/L 获得幼苗。孔祥生等^[12]运用“姚黄”、“洛阳红”的休眠芽茎尖, 在培养基 1/2MS(大量减半) + BA 1.0 mg/L + GA₃ 0.5 mg/L 获得愈伤组织、丛生芽。

3 芽培养

目前, 已报道的牡丹芽培养中, 多数以鳞芽为外植体进行研究, 包括腋芽^[13]、花芽^[15]、顶芽^[13]、休眠芽^[14]等, 在所有鳞芽中, 以休眠芽的分化表现最好, 分化率可达 94%, 花芽最差仅 16%。不同取材时期对芽培养也有影响, 12 月至翌年 2 月取材, 经过低温休眠, 芽充分分化, 营养物质累积丰富, 苞

基金项目 上海市绿化管理局科学技术项目“木本植物引种筛选体系的建立与部分成果的应用研究”(F050304)。

作者简介 李子峰(1978-), 男, 山东胶州人, 硕士研究生, 研究方向: 园林植物应用。* 通讯作者。

收稿日期 2006-03-29

片紧密,污染率低,成活率高,萌发时间早,因此,此时期取材最好^[12,13]。

张桂花等^[14]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:自芽萌动至开始休眠为适宜培养期,芽诱导最佳培养基为 MS + 6-BA 0.5 ~ 1 mg/L + NAA 0.1 ~ 0.2 mg/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 2 000 lx,光照时数为 10 h/d,适宜温度 (25 ± 1)℃。刘淑敏^[15]运用“古班同春”的花芽,在培养基 MS + VC + BA 获得幼苗。陈怡平等^[16]以紫斑牡丹休眠地下芽为材料,对同一时间打破休眠的地下芽在 3 种不同培养基上的发育状况、不同时期低温处理后在同一培养基上的发育以及不同时期休眠地下芽在同一培养条件下的发育进行了比较研究,得出 MS + BA 1 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L 最有利于打破休眠的地下芽发育,720 h 的低温处理对于地下芽的萌发率及发育速率最好,彻底打破休眠的不同时期地下芽在同一培养条件下发育速率基本一致。陈笑蕾^[17]采用“洛阳红”、“胡红”、“肉芙蓉”、“鲁荷红”、“乌龙捧盛”和“朱砂垒”牡丹品种的鳞芽诱导培养,结果表明:品种之间的增殖率、综合萌芽率和增殖系数,“乌龙捧盛”品种表现较好。以“乌龙捧盛”鳞芽为材料,对鳞芽增殖系数的影响依次为:NAA > 基本培养基类型 > 6-BA > IAA;培养基 MS + Ca²⁺ (WPM) + 6-BA 2.0 mg/L + IAA 0.3 mg/L 和 MS + Ca²⁺ + 6-BA 1.0 mg/L + IAA 0.1 mg/L 有利于试管苗的增殖,继代培养时间应低于 35 d。在生根培养过程中,IBA 和基本培养基类型是影响牡丹试管苗生根率的主要因素,培养基 1/2MS + IBA 1.0 mg/L + IAA 1.0 mg/L + 蔗糖 20 mg/L 有利于根的诱导;基本培养基类型和蔗糖浓度是影响牡丹试管苗平均根长的重要因素,培养基 WPM + IBA 1.0 mg/L + IAA 1.0 mg/L + 蔗糖 40 mg/L 有利于根的生长;IAA 浓度和蔗糖浓度是影响牡丹试管苗根数的重要因素,培养基 1/4MS + IBA 3.0 mg/L + IAA 3.0 mg/L + 蔗糖 30 mg/L 和培养基 1/2MS + Ca²⁺ (WPM) + IAA 3.0 mg/L。

4 叶及叶柄培养

为保存牡丹种质资源,加速珍稀品种的扩大繁殖,以及增添培育新品种,研究组织培养方法是极其必要的^[18]。中外学者已利用牡丹的某些品种进行了研究,积累了较为丰富的资料,对于用叶及叶柄进行中国牡丹组织培养取得了一些进展。李丽霞等^[19]以牡丹“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,优化筛选出适宜于两个牡丹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 1/2 MS + 2,4-D 4 mg/L + KT 0.2 mg/L + NAA 0.4 mg/L + 酪蛋白 200 mg/L。何松林等^[20]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,Na₂S₂O₃ 最差;外植体采取前对母株进行遮光处理以及在培养过程中对材料进行暗处理有利于抑制褐化;培养基中生长调节物质(BA、NAA)的浓度变化对褐化没有明显的影响。

陈怡平等^[21]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 + BA 15 mg/L + NAA 2 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%、60%、30.8%,而生殖器官雄蕊和心皮未能诱导成功。

5 根培养

牡丹为芍药科木本植物,分观赏和药用两类。药用牡丹的有效部分是根皮,俗称丹皮。丹皮是中医临床上的常用药材,主要的药用成分是丹皮酚,它具有抗菌、降压、抗血栓和抗动脉硬化等作用,主治热病吐血、血瘀、经痛、跌打瘀血作痛、高血压和中风^[22]。时侠清等^[23]采用植物组培的方法,用牡丹品种凤丹根韧皮部为材料诱导愈伤组织,得出:在 MS 培养基中加入 1.0 mg/L 2,4-D 或 1.5 mg/L NAA,愈伤组织的诱导率大于 70%;培养基中加入 1.0 mg/L 2,4-D 和 5.0 ng/L TDZ 或 1.5 mg/L NAA 和 5.0 ng/L TDZ,并在 29℃、黑暗条件下继代培养,可以显著提高牡丹根皮愈伤组织的生长倍数和丹皮酚含量。

6 洛阳牡丹组培进展

作为植物繁殖的新手段,组织培养技术已日益普及,这种在无菌条件下进行的无性繁殖和常规方法相比,最显著的优点是可以用较短的时间和较少的空间,且不受季节、气候的影响,由个体开始,产生大量的植株。

为加速牡丹产业化发展,中国洛阳国家牡丹园于 2004 年 6 月开始投入运行牡丹植株组培工作。该项研究主要分为 4 个阶段进行。第一个阶段是培养物的建立,即选择适合的外植株。为了保证培养物的无菌性,对外植体的消毒方法、时间都需要一个摸底过程,找出一个最佳的方法。第二个阶段是茎芽的增殖方法。通过诱导不定芽,实现增殖和增强腋芽生枝能力的方法。第三个阶段是离体植株的生根。在有细胞分裂素存在的情况下,由不定芽和腋芽长成的枝条一般都没有根,为了得到完整植株,必须把其转入生根培养基中。第四阶段是生根苗的移栽。把植株由试管移栽入土,须十分小心地分步进行。牡丹试管苗的生根和移栽是一项非常艰巨的工作,也是影响牡丹微繁的关键。

对于牡丹组织培养技术,关系到培养基、激素以及外植体的选择,牡丹属于木本植物,由于其多年田间生长,通过组织培养建立繁殖体系相对困难,并且木本植物组织培养的培养基成分对同一树种可能因基因型不同而不同、因继代培养不同而不同,在培养过程中培养物褐化、玻璃化问题^[24]较难克服。目前,对于牡丹的组培仅限于几个药用品种,而对于观赏品种还比较少,且品种区间太小,面对生根难等问题,需要将牡丹与基因技术^[25]及木本植物组培方法结合起来,不仅要解决牡丹组培中各种问题,而且要将组培品种的范围扩展到各个观赏品种与药用品种,要从外植体、培养基、培养条件等防止褐变^[26,27]与玻璃化^[28]的发生。目前,正在对江南牡丹品种进行种胚培养,已经开始继代培养基的选择,下一步将对继代培养基中的苗子在一特制的大玻璃瓶中进行木质化培养,最后对其进行嫁接繁殖,从而间接地克服牡丹组

(下转第 3001 页)

状态;将芽谷均匀撒播在床面上,用木板轻压入土;把预先准备好未施用化肥的过筛床土均匀撒盖在床面上,盖种厚度以不见谷为度,一般为 0.5~1.0 cm,盖种后喷湿盖种土。及时在苗床上直接盖薄膜或起拱覆膜促齐苗,当膜内温度达到 35℃ 时要及时揭膜,通风降温。或在膜上加盖麦草等遮阴降温。湿润育秧做成合式秧田,畦宽 1.5 m,沟深 20 cm,分畦定量播种,播后轻塌谷,再加盖草木灰或麦壳等覆盖物。

2.1.5 水分管理。齐苗前保持床土相对含水量在 70%~80%;齐苗后,根据天气适时揭去苗床上的覆盖物,并喷 1 次透水;齐苗至移栽前以控水控苗为主,中午出现卷叶需补水,可于傍晚 1 次补足。如在秧苗期降雨,则需盖膜并及时排干沟中积水,以防苗床进水。湿润育秧 3 叶期前畦面不上水,3 叶期后畦面保持浅水。

2.1.6 追肥。早育秧的苗床以缺肥补肥为主,叶色褪淡时 1 m²用 5~10 g 尿素对水 500~1 000 g 喷浇,喷后淋水洗苗。湿润育秧于 3 叶期及移栽前 3~5 d 各追施尿素 1 次,每次施 45~60 kg/hm²。

2.1.7 秧苗期病虫害防治。秧苗 2~3 叶期防治稻蓟马;移栽前 5~7 d 秧田,用杀虫单或 Bt 乳剂进行防治,带药下田。

2.2 精细整地,施足基肥 适时耕翻前茬,耕前施足基肥,施腐熟有机肥 15 t/hm² 或饼肥 750 kg/hm²,过磷酸钙 600 kg/hm²,氯化钾 150 kg/hm²,尿素 240 kg/hm²。施后耕翻耙碎整平,开好十字沟或井字沟与四周边沟相通,达到田平(同田高低相差不过 3 cm)、面净、泥糊、肥融的要求。在最后 1 次踏平田面作业时,用 60% 丁草胺 1 875 ml/hm² 加少量水跟在耙后滴撒,防除稻田杂草,隔 3 d 左右栽插秧苗。

2.3 合理密植,提高移栽质量 根据茬口情况移栽期安排在 6 月上、中旬。大田株行距 16.7 cm × 20.0 cm,栽 30 万穴/hm²,每穴栽 2 粒种子苗,基本苗 120 万~115 万/hm²。

最好拉线栽插,确保栽插穴数不减少,栽插时要浅栽、栽正、栽稳、栽匀,不漂秧浮苗。

2.4 适时适量追肥,促蘖增穗增粒 栽后 7 d 左右,追 75 kg/hm² 尿素促分蘖。抽穗前 25 d 左右,追 37.5 kg/hm² 尿素和 75 kg/hm² 氯化钾。抽穗前 18 d 左右,视苗情酌施保花肥,如叶色不褪淡的田不施,明显发黄的田块施 45 kg/hm² 尿素和 30 kg/hm² 氯化钾。

2.5 合理管水,促控有度 本着“薄水移栽,浅水促蘖,够苗搁田,干湿交替,活熟到老”的原则,栽后 5~7 d 返青后,排水晾田 2~3 d,促根生长;追施分蘖肥后灌浅水促分蘖。栽后 20 d 左右当苗数达到预期穗数时及时晒田,将最高苗控制在 375 万/hm²,减少无效分蘖的发生;分别于抽穗前、后半个月灌浅水养穗;后期间歇灌溉,干干湿湿,活熟到老,收获前 7 d 断水。

2.6 加强大田病虫害防治 皖稻 77 主要病虫害有纹枯病、稻曲病、二化螟、三化螟、稻纵卷叶螟等。防治纹枯病可在拔节期用 20% 井冈霉素可湿性粉剂 750 g/hm² 对水 900 kg/hm² 均匀喷洒下部茎叶,隔 7~10 d 再喷 1 次。防治稻曲病宜在抽穗前 7 d 和破口期,用 20% 三唑酮乳油 1 500 ml/hm²,对水 750 kg/hm² 各喷 1 次。防治稻飞虱和稻蓟马,用 10% 蚜虱净可湿性粉剂 300 g/hm² 对水 750 kg/hm² 喷雾。防治二化螟、三化螟和稻纵卷叶螟等害虫,应在幼虫孵化初期用 20% 三唑磷 375 ml/hm² 或 95% 杀螟 2 000 可湿性粉剂 750 g/hm² 或 90% 杀虫单可湿性粉剂 750 g/hm²,对水 900 kg/hm² 均匀喷雾。

参考文献

- [1] 李泽福,夏加发,唐光勇,等. 优质中籼稻皖稻 77 的选育及其应用研究[J]. 安徽农业科学, 2001, 29(5): 589-590, 594.
- [2] 夏加发,李泽福,唐光勇,等. 中籼 898 产量构成及高产栽培措施研究[J]. 安徽农业科学, 2000, 28(6): 707-708, 716.

(上接第 2999 页)

织培养生根难的问题,为牡丹产业化发展及新品种选育等奠定基础。

参考文献

- [1] 李嘉珏. 中国牡丹与芍药[M]. 北京: 中国林业出版社, 1999.
- [2] 高志民,王雁,王莲英,等. 牡丹、芍药繁殖技术育种研究[J]. 北京林业大学学报, 2001, 23(4): 75-79.
- [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] 曾瑞香,尹伟伦,赵孝庆,等. 牡丹繁殖技术[J]. 北京林业大学学报, 2000(3): 90-95.
- [5] 黄守印. 牡丹胚培养与植株再生[J]. 植物生理学通讯, 1987(2): 54-55.
- [6] 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.
- [7] 曹小勇. 濒危植物紫斑牡丹胚离体培养[J]. 氨基酸和生物资源, 2003, 25(2): 35-36.
- [8] 张子学,丁为群. 凤丹组织培养研究[J]. 现代中药研究与实践, 2004, 18(1): 18-20.
- [9] 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.
- [10] 谢静萱. 枯枝牡丹的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1987(2): 53.
- [11] 张龙勃. 牡丹组织培养研究初报[J]. 河南城市园林, 1989(10): 21-23.
- [12] 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.
- [13] 李艳敏,罗晓芳. 牡丹离体培养与快速繁殖研究进展[J]. 西南林学院学报, 2004, 24(1): 70-73.
- [14] 张桂花,王洪海,王连祥. 牡丹组织培养技术研究[J]. 山东农业科技,

2001(5): 16-18.

- [15] 刘淑敏. 牡丹“古班同春”组培通报[J]. 中国花卉盆景, 1987(7): 24.
- [16] 陈怡平,廉永康,王勋陵. 紫斑牡丹休眠地下芽在组织培养条件下的发育研究[J]. 西北植物学报, 2003, 23(2): 314-317.
- [17] 陈笑蕾. 牡丹组织培养的初步研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2005.
- [18] 谭文澄,戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1991: 8.
- [19] 李丽霞,曲复宁,由翠荣,等. 应用正交设计方法筛选牡丹愈伤诱导培养基的研究[J]. 烟台大学学报: 自然科学与工程版, 2005, 18(1): 41-49.
- [20] 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.
- [21] 陈怡平,丁兰,赵敏桂. 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, 2001, 37(3): 66-69.
- [22] 王高潮,刘仲健. 中国牡丹培育与鉴赏及文化渊源[M]. 北京: 中国林业出版社, 2001: 119.
- [23] 时侠清,张子学. 凤凰山牡丹药用器官的愈伤组织培养[J]. 核农学报, 2005, 19(3): 186-190.
- [24] 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, 1992, 20(1): 70-72.
- [25] 韩磊,汪旭东,吴先军. 植物组织培养技术及其应用研究进展[J]. 种子, 2005, 24(1): 38-43.
- [26] 叶梅,王伯初,段传人. 植物组织培养外植体褐变的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2004, 15(4): 426-428.
- [27] 陈菲,李黎,官伟. 植物组织培养的防褐化探讨[J]. 北方园艺, 2005(2): 69.
- [28] 李娅莉,张健,潘远智. 观赏植物组织培养过程中玻璃化现象与解决措施进展[J]. 四川农业大学学报, 2004, 22(3): 278-282.