

牡丹组织培养技术的研究进展

李 萍, 成仿云

(北京林业大学 园林学院, 国家花卉工程技术研究中心, 北京 100083)

摘 要:从离体快繁、愈伤组织培养与植株再生、胚珠和胚培养与体细胞胚发生、花粉和花药培养及体细胞胚发生几方面综述了牡丹组织培养技术的研究现状,指出了目前牡丹组织培养中存在的一些问题,认为组织培养技术是加快牡丹育种和繁殖的重要基础,为加快牡丹的育种和繁殖提供了美好前景。

关键词:牡丹;组织培养

中图分类号:S 685.110.36 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)11-0102-05

牡丹(*Paeonia × suffruticosa*)属芍药科、芍药属落叶亚灌木,是我国特产的传统名花。牡丹因其雍容华贵、国色天香的美好姿容和繁荣昌盛、和平幸福的美好象征,深受世界人民的喜爱,已成为世界流行花木之一,市场前景广阔。牡丹传统的繁殖方式有播种、分株和嫁接繁殖。由于很多园艺化的品种高度退化,结实能力低或种子发育不良;加之种子具有休眠习性,自然状态下8个月才能萌发且生根萌发率极低,因此生产中通常采用分株和嫁接法进行繁殖^[1,2]。然而牡丹的分株和嫁接繁殖受时间限制较大,一般只能在秋季进行,且分株需隔年进行,因此决定了传统的牡丹繁殖方法存在繁殖率低的缺陷,限制了牡丹的繁殖和育种进程以及商品化发展。

植物组织培养技术包括直接器官发生和间接器官发生两方面内容,前者直接产生芽和胚状体,后者先形成愈伤组织,而后分化出芽或胚状体。此技术可以在一定的时间内从一个外植体繁殖出几百个甚至千万个具有相同遗传性状的小植株,为植物的繁殖生产提供了一条新的途径。因此,用组培的方法进行牡丹的繁殖,以解决常规繁殖方法存在的不足,是牡丹商品化及产业化发展的必然趋势,是加快牡丹育种和繁殖步伐的重要基础。现综述牡丹组织培养技术的研究现状,为通过组培的方法进行牡丹的繁殖提供一些参考和借鉴。

1 离体快繁技术

离体快繁是牡丹组织培养中研究最早和最多的一

项技术。自李玉龙等人^[3]1984年首次报道以来,有关这方面的研究日益增多。归纳起来,可以从外植体、启动和增殖培养、生根培养、生根苗移栽等方面进行阐述。

1.1 外植体

1.1.1 外植体选择 目前,牡丹离体快繁采用的外植体主要是顶芽^[4]、腋芽^[4,5]、萌蘖芽^[5]、花芽^[5,6]和萌生条^[7]等,其中萌蘖芽的培养效果最好,分化率高,花芽最差。不同取材时期对芽的离体快繁也有影响,2月份取材,外植体污染率低,成活率高,萌发时间早,生长迅速,植株健壮,培养效果最好^[7]。这是因为冬季自然低温,将土壤以及植株上附着的细菌、病菌等微生物冻死,减少了污染源;另外,低温过程导致植株及芽内的激素含量发生动态变化,促进萌发和生长的 IAA, GA₃ 增多,抑制萌发和生长的 ABA 减少^[8],从而改善了芽外植体的培养效果。

1.1.2 外植体表面灭菌技术 牡丹芽体上或芽体内的菌类物质是外植体消毒困难的主要原因^[9]。牡丹离体快繁中常用的消毒剂有酒精^[3-5,7,10], HgCl₂^[3-5,7], 次氯酸盐^[10-13], 酒精和 HgCl₂ 混合液^[14]等;消毒剂的浓度和处理时间因品种、外植体类型、取材时期等的不同有一定差异。目前比较成熟的表面灭菌技术主要包括以下几步^[3-5,7]:首先用自来水将外植体表面冲洗干净;再用适量洗涤灵溶液浸泡 20 min,用毛刷轻轻洗去鳞片包裹的尘土,用流水冲洗 10 min;接着在超净工作台上用上述消毒剂进行灭菌;之后用无菌水冲洗 3~5 次以清除残余消毒剂;再剥去芽外部包裹的鳞片接种。

1.2 启动和增殖培养

1.2.1 培养基 牡丹启动和增殖培养中用到的基本培养基有 LP^[10]、MS^[3,15,16]、改良 MS^[17-19,7] 和改良 WPM^[13,14],其中最常用的是 MS 及改良 MS 基本培养基。生长调节剂方面, Bouza 等^[12]研究发现在 Z, iP, iPA, K 和 BAP 5 种细胞分裂素中,只有 BAP 能够促进

第一作者简介:李萍,女,博士,主要研究方向:植物组织培养。E-mail:liping-star@163.com。

通讯作者:成仿云,博士,教授,博士生导师。E-mail:chengfy8@263.net。

基金项目:国家林业局“948”资助项目(2003-4-23)。

收稿日期:2007-08-09

不定芽的发生,其最适浓度为 $4 \mu\text{M}$ 。GA₃单独使用,对组培苗的高生长以及叶片和腋芽的生长和分化都没有促进作用,而与 BAP 配合使用,能同时提高增殖率和促进植株高生长,但是连续使用的次数不能超过 3 次,否则组培苗易发生顶芽和叶片坏死现象,当培养基中 Ca^{2+} 浓度低时,这种现象更为明显。将 Ca^{2+} 浓度提高到正常 MS 培养基中的 2 倍,或者将只含 BAP 的培养基与 GA₃ 和 BAP 组合的培养基交替使用,则可以减轻该现象的发生。孔祥生等^[7]将 IAA 和 NAA 与 BAP 配合使用,也提高了牡丹组培苗的增殖率,但同时刺激了愈伤组织的形成,影响了芽的生长,导致有效新梢下降。目前,在牡丹离体快繁的启动和增殖培养阶段,MS(Ca^{2+} 加倍) + BAP + GA₃ 被认为是较理想的组合,但由于牡丹品种间的差异较大,BAP 和 GA₃ 的使用浓度可能存在很大不同。蔗糖浓度对牡丹组培苗增殖和生长有一定影响。蔗糖浓度较高时($\geq 4\%$),组培苗分化能力强,生长迅速,但同时易导致玻璃化和褐化的发生,不利于有效增殖,因此,一般认为蔗糖浓度在 $2\% \sim 3\%$ 比较合适^[20]。继代培养周期同样对牡丹组培苗的生长和增殖造成影响。Harris 和 Mantel^[15]认为以 3 周为继代周期,能减弱顶芽的抑制作用,促进腋芽的萌发;由于在第 3~4 周内,牡丹组培苗的质量增加最多(15.5 mg),生长量最大,所以以 4 周为继代周期,能保证组培苗生长健壮;在第 4~5 周内,组培苗的质量增加量少(4.8 mg),但腋芽和不定芽却得到充分生长。因此,牡丹离体快繁以 4 或 5 周为继代周期较好。芍药方面,BAP,kinetin,2ip 和 TDZ 单独使用,可促进腋芽生长,但是增殖率较低;而将低浓度的 TDZ 与 BAP,kinetin 和 2ip 配合使用,能明显促进腋芽发生^[21]。在不含细胞分裂素的培养基中添加 ABA 或 Fluridone,都不会对芍药组培苗的增殖造成影响;ABA 和细胞分裂素同时加入培养基中,休眠芽和未休眠芽的叶片形成都受到抑制;而 Fluridone 和细胞分裂素同时使用,则促进了休眠芽和未休眠芽的茎叶发生。表明芍药组培过程中的休眠现象由 ABA 引起,Fluridone 对茎叶发生的作用依赖于培养基中的其它外源生长调节剂等^[22]。

1.2.2 培养条件 培养温度在很大程度上控制着牡丹玻璃化苗的发生及发生频率。当温度在 $10 \sim 26^\circ\text{C}$ 时,通常没有玻璃化苗出现; $26 \sim 30^\circ\text{C}$ 时,63% 的组培苗发生玻璃化;温度高于 30°C ,玻璃化苗的比率高达 84%。研究认为,牡丹组培苗的最适生长温度是 $24 \sim 26^\circ\text{C}$,此条件下组培苗生长健壮、叶片浓绿、生长较快^[23]。

1.3 生根培养

1.3.1 培养基及培养方式 牡丹组培苗生根培养中用到的基本培养基有 MS^[3,15,16]、LP^[10]、改良 MS^[11,18,19]、1/2 MS^[7] 和改良 WPM^[13],其中最常用的是 1/2 MS。

最有效的生根诱导剂是 IBA^[3,10,11,13,15,16,18,19],也有使用 NAA 或 IAA^[3,7,10] 诱导生根的报道。IBA 作为生根诱导剂,其使用方法大致分为 3 种:一步生根法^[3,7,10,13,15,18];即将未生根的组培苗接种在含 IBA 的培养基中,进行长时间的培养。速蘸法^[3,18];将用于生根的组培苗的基部在一定浓度的 IBA 溶液中浸泡一段时间,然后接种在含有活性碳而不含生长素的培养基中培养生根。两步生根法^[11,13,16,18,19];即先将未生根的组培苗接种在含一定浓度 IBA 的培养基中进行一段时间根诱导,然后转入含有活性碳而不含生长素的根形成培养基中培养。结果表明,两步生根法最有效^[13,18]。Beruto 等人^[13]先用 2°C 低温对未生根苗进行一周的冷处理,然后再按两步生根法进行生根培养,发现生根率明显高于未经冷处理的材料。因此,可以把 Beruto 的方法称为改良两步生根法或三步生根法。IBA 的浓度和诱导天数、培养基中蔗糖浓度、AC 含量等也对牡丹的生根有影响。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。例如 Bouza 等^[18]用 $75 \mu\text{M}$ IBA(约 1.0 mg/L)暗处理 10 d, 'Mme de Vetry' 生根效果最好;徐桂娟^[24]以 15 mg/L IBA 处理 20 d, '海云紫' 等生根率最高。可见,IBA 的适宜浓度和适宜诱导天数,需要分别针对不同品种进行摸索,这也是牡丹组培苗生根率低的一个原因。Harris 和 Mantel^[15]以及李敏艳^[20]都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^[20]。根形成培养基中,添加一定量的 AC,能明显改善生根质量。李敏艳^[20]发现培养基中 AC 的含量从 0 增加到 2.0 mg/L,组培苗的生根条数从 1.43 增加到 4.54,不定根的颜色也由黑色变为白色。

1.3.2 其它影响因素 组培苗的来源和本身的状态都对牡丹生根有影响。增殖过程以 5 周为继代周期的组培苗,生根效果好^[15,19]。Harris 和 Mantel 以及 Bouza 等人分别从两方面对这一现象进行了解释。Harris 和 Mantel^[15]认为在培养的第 4~5 周内,组培苗生长量小,因此体内留存的高含量的糖类物质直接作用于生根,从而改善了生根效果。而 Bouza 等^[19]认为以 5 周为继代周期,组培苗体内的内源生长素大量积累,内源 BA 却大幅下降,因而促进了生根。Bouza 等^[18]还指出茎段伸长较多的组培苗比茎段未伸长的组培苗生根率低,她推测是伸长茎段中残留的 GA₃ 影响了生根,也可能是茎段伸长减少了基部的生根位点;而将伸长茎段基部的腋芽去掉后再进行根诱导,可以使生根率得到提高;但茎段未伸长的组培苗保留基部的腋芽,即保留生根的活跃区,则能促进生根。她还解释了腋芽比主芽生根困难的原因,认为腋芽中内源 IAA 和 BA 的含量通常为主芽中的 5 倍,而 IAA/BA 在所有芽体中大致相同,因此腋芽生根

困难应该是 BA 浓度较高所致。也就是说,就牡丹组培苗生根而言,BA 的绝对含量可能比 IAA/BA 的比值影响更大,BA 的绝对含量的降低,是生根前提^[19]。

1.3.3 生根苗的休眠解除 牡丹组培苗生根诱导过程中,IBA 的使用诱发 ABA 的积累,导致芽的有丝分裂活性降低,继而发生休眠现象^[16]。自然界中,牡丹芽和上胚轴休眠的解除,需要经过 4~8 周 4~5℃ 的低温处理^[11]。离体培养的牡丹种子的休眠解除,也需要类似的条件^[25]。因此,Bouza 等人将这一理论应用到牡丹生根组培苗的休眠解除中。她发现,低温处理使生根苗内源 IAA 积累,ABA 消失,因而茎尖的有丝分裂活性增强,有新叶生成;但低温处理结束后,IAA 的水平迅速降低,ABA 却快速积累,所以组培苗通常只产生 1~2 新叶,没有腋芽生成,高生长也不明显。Bouza 等将上述情况解释为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,组培苗丧失了凋谢激素代谢的能力,而这种代谢干扰在组培苗移栽后依然存在。可见,低温处理并不能有效解除牡丹生根苗的休眠现象^[11],休眠的解除可能需要在代谢水平甚至分子水平进行研究。

1.3.4 生根苗移栽 牡丹组培苗根长约 3~4 cm 时,从培养室取出,置于 4℃ 进行低温处理,之后于散射光下闭瓶练苗并逐渐去掉封口材料。练苗时间的长短对生根苗移栽成活有一定影响,适当延长练苗时间,可以提高移栽成活率^[20]。生根苗移栽应选择凉爽的季节,以春季和秋季为好,此时温度适宜,昼夜温差较大,有利于移栽苗的生长^[5]。孔祥生认为腐殖土上的移栽成活率(48%)比蛭石作基质时提高 33%^[7],李艳敏则认为以蛭石:珍珠岩(1:1 或 1:2)的混合基质为牡丹组培苗移栽的最佳基质^[20]。

2 愈伤组织培养与植株再生

1965 年 Partanen^[26],1969 年 Demoise 和 Partanen^[27]分别以牡丹种子的合子胚为材料,诱导出了愈伤组织,得到了二倍体和四倍体的混合细胞团,但没有器官发生或任何形态发生的报道。Gildow 和 Mitchell^[28]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 5 000 mg/L KNO₃,后者为 2 500 mg/L KNO₃ 和 1 650 mg/L NH₄NO₃)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^[14]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^[29]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,适合做外植体。

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。李玉龙等人^[3]诱导牡丹嫩叶和叶柄产生愈伤组织,并分化出不定芽,实现了少量的植株再生;他得出叶柄的愈伤诱导率及愈伤分化率都显著高于嫩叶。李艳敏^[20]诱导‘紫瑶台’叶片愈伤组织的不定芽分化率最高仅为 10.0%。Beruto 等^[13]把牡丹的花丝和花瓣外植体接种在含有生长调节剂组合 2iP+PIC 或 TDZ+2,4-D 的培养基中,诱导出大量愈伤组织;并发现 TDZ 能促进花瓣上的愈伤再生出芽,再生率为 0~50%,然而这些再生芽没能成功转化成完整的幼苗。可见,牡丹组织培养中,由愈伤组织再生植株的途径还需要深入研究。

3 胚珠培养、胚培养与体细胞胚发生

胚珠培养技术是指将植物的胚珠从子房中剥离出来,在无菌条件下进行离体培养,使它们在人工合成的培养基上生长发育成幼苗,或由此诱导愈伤组织、不定芽、珠心等以获得幼苗的技术^[30]。胚珠培养对提高种子萌发率、缩短萌发时间、及时进行杂种胚拯救和加速育种进程都有重要意义^[43]。何桂梅等^[31,32]首次对牡丹胚珠培养进行了报道。她认为发育早期的胚珠(花后 48 d 以内)极难培养成功,原因可能是培养基提供的营养物质不充分,也可能是胚珠未完成受精作用;而内部种胚完成器官分化的胚珠(花后 60 d 以后),及时去掉胚乳,可以培养成苗。

胚培养技术是指将植物的种胚接种在无菌的条件下培养,使之生长发育成幼苗的技术。芍药属植物的胚培养开始于 1969 年^[27]。在以后 30 多年中采用不同基因型的成熟胚及不同培养基与生长调节剂配比,通过三条途径获得再生植株:合子胚直接再生成苗、诱导丛生芽再生成苗和诱导体细胞胚再生成苗^[32]。其中合子胚直接再生成苗的途径,缩短了牡丹种子的休眠期,将种子萌发时间由 8 个月的缩至 12~14 周^[25],大大加快了育种进程。黄守印^[33]和周仁超^[34]研究了不同基因型的牡丹成熟胚的胚培养,通过丛生芽和不定芽的产生,获得了较高的增殖率。周仁超^[34]将丛生芽切分成单芽,诱导生根,生根率达 90% 以上,大大提高了成苗率。何桂梅等^[31]对几种日本牡丹的幼胚(花后 65 d)进行培养,发现启动培养基、基因型与胚的发育时期是影响幼胚离体生长的重要因素;但幼胚培养成苗率低,只有 10% 左右。而紫斑牡丹和杨山牡丹近成熟胚(花后 90 d)的离体培养,分别获得了 71.6% 和 63.6% 的成苗率^[32]。说明幼胚不是牡丹胚培养的理想材料;发育后期的材料适合用作胚培养。

体细胞胚发生是细胞全能性表达最完全的一种方式^[35],与诱导器官分化相比,体细胞胚遗传性相对稳定,不容易发生突变,在适宜的条件下很容易长成独立植株,成苗率较高,可加快繁殖优良种质并保持其遗传性^[36]。与合子胚相比,体胚繁殖速度快、数量多、结构完

整,因而其发生体系是进行植物品种改良、转基因受体和突变体筛选等的良好无性繁殖实验体系^[35]。近年来,分子生物技术的迅猛发展和广泛应用,使体细胞胚发生的研究进入一个崭新的阶段。牡丹方面,何桂梅^[32]以两种日本牡丹的幼胚以及杨山牡丹和紫斑牡丹的近成熟胚为外植体,首次成功诱导出牡丹的体细胞胚,在 1/2 MS+BAP 0.5 mg/L+CH 500 mg/L+蔗糖 10%的培养基中,4 种牡丹的体胚诱导效果均较好,分别达 27.3%,23.1%,20.0%和 10.0%,将诱导出的体胚分割下来单独培养,紫斑牡丹的体胚 5.8%能再生成苗。该项研究填补了牡丹体胚发生方面的空白,为牡丹的分子育种奠定了一些基础。

4 花药和花粉培养及体细胞胚的发生

芍药属植物具有多核或多细胞花粉(胚)的现象,表明其具有较明显的体胚发生潜能,为进行体胚发生研究创造了条件^[37]。目前,在芍药中已诱导出花粉胚、胚性愈伤及体细胞胚,并获得了再生植株,但诱导率很低,畸形体胚多,再生时间长,再生植株不健全,未能出瓶驯化^[38]。牡丹方面,Zenkter^[39]等研究了 *P. suffruticosa* 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 3 周后,观察到多细胞和多核的花粉粒;6 周后,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 Sunderland^[40]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。

5 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。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。牡丹组织培养技术发展至今,仍存在诸多问题,没有形成健全的体系,限制了它们在实践中的应用。

首先是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。该问题主要包括两方面,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。只有解决它们,才能建立完整、健全的牡丹离体快繁体系。

其次牡丹组培苗移栽成活率低。这一方面与不定根质量不高有关,另一方面与组培苗生根后发生休眠有关。只有提高不定根的质量并采取适当的方法打破芽

的休眠,提高组培苗适应环境的能力,才能切实提高移栽成活率。

第三褐化严重。牡丹组织培养中极易发生褐化现象,严重时导致植物材料死亡^[9],因此对褐化的防治不容忽视。在培养基中添加活性炭^[14,41]、维生素 C^[41,42]、PVP^[41]、Na₂S₂O₃^[41]等成分均能有效减轻牡丹组培中的褐化现象;其中活性炭的效果最好,但使用活性炭时,应调整活性炭与生长调节物质等培养基成分的用量,使其皆能发挥有效作用^[43]。另外,接种或转接初期进行 5~7 d 暗培养,然后转入正常培养环境中,可以减轻组培苗的褐化程度,而不影响组培苗生长和增殖^[20]。

第四间接器官发生途径相对薄弱。愈伤组织生成是组织培养中的一个重要阶段,在合适的培养条件下,愈伤组织可以向器官分化方向发展,再生出不定芽或生成胚状体。但在牡丹组培中,愈伤组织再生成芽的比率非常低且还没有分化出胚状体的相关报道。因此,间接器官发生途径是牡丹的组织培养中需要深入研究的方向。

第五体胚诱导率低且畸形体胚多。目前,芍药属体细胞胚发生的研究还比较少,且绝大多数以芍药为研究对象,牡丹方面的研究才刚刚起步。芍药属体胚诱导率很低,畸形体胚多,导致植株再生困难。因此,提高体胚诱导率,同时减少畸形胚的比率,是今后体细胞胚生成研究要重点解决的难题。

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。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] Buchheim J A, Meyer M M. Micropropagating of Peony (*Paonia*

- spp.)[J]. Biotechnology in Agriculture and Forestry, High-tech and Micro-propagation Iv, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1992,20:269-285.
- [10] Albers M R J, Kunneman B P A M. Micropropagation of *Paeonia*[J]. Acta Horticulturae, 1992, 314: 85-92.
- [11] Bouza L, Jacques M, Sotta B, et al. The reactivation of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) vitroplants by chilling is correlated with modifications of abscisic acid, auxin and cytokinin levels[J]. Plant Science, 1994, 93:153-160.
- [12] Bouza L, Jacques M, Miginiac E. In vitro propagation of *Paeonia suffruticosa* Andr. cv. Mme de Vetry; developmental effects of exogenous hormones during the multiplication phase[J]. Scientia Horticulturae, 1994, 57: 241-251.
- [13] Beruto M, Lanteri L, Portogallo C. Micropropagation of tree peony (*paeonia suffruticosa*) [J]. Plant Cell Tiss. Org. Cult, 2004, 79: 249-255.
- [14] Wang H F, van Standen J. Establishment of in vitro cultures of tree peonies[J]. South African J. Bot, 2001, 67: 358-361.
- [15] Harris R A, Mantell S H. Effect of stage II subculture duration on the multiplication rate and rooting capacity of micropropagated shoots of tree peony[J]. J. Hort. Sci, 1991, 66(1): 95-102.
- [16] Bouza L, Sotta B, Bonnet M, et al. Hormone content and meristematic activity of *Paeonia suffruticosa* Andr. cv. 'Mme de Vetry' vitroplants during in vitro rooting[J]. Acta Horticulturae, 1992, 302: 213-216.
- [17] Bouza L, Jacques M, Sotta B, et al. The differential effect of N⁶-benzyl-adenine and N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)-adenine on in vitro propagation of *Paeonia suffruticosa* Andr. is correlated with different hormone contents[J]. Plant Cell Report, 1993, 12: 593-596.
- [18] Bouza L, Jacques M, Miginiac E. Requirements for in vitro rooting of *Paeonia suffruticosa* Andr. cv. Mme de Vetry[J]. Scientia Horticulturae, 1994, 58: 223-233.
- [19] Bouza L, Jacques M, Sotta B, et al. Relationship between auxin and cytokinin contents and in vitro rooting of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) [J]. Plant Growth Regulation, 1994, 15: 69-73.
- [20] 李艳敏. 三个牡丹品种组织培养技术的研究[D]. 北京林业大学, 2004.
- [21] Gabryszewska E. The influence of cytokinins, thidiazuron, paclobutrazol and red light on shoot proliferation of herbaceous peony cv. Jadwiga in vitro[J]. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 1998, 6 (3-4): 157-169.
- [22] Gabryszewska E. Effects of ABA, Fluridone and Light quality on growth and dormancy of tissue - culture *Paeonia* and *Hosta* shoots//Developmental Biology of Regeneration. 1st meeting[C]. Geisenheim, Germany, 2000: 12-15.
- [23] 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.
- [24] 徐桂娟. 牡丹组培快繁技术的研究[D]. 北京林业大学, 2001.
- [25] Zilis M R, Meyer M M. Rapid in vitro germination of immature, dormant embryos[J]. Plant Propagator, 1976, 26: 272-275.
- [26] Partanen C R. Cytological behaviour of plant tissues in vitro as a reflection of potentialities in vivo[J]. Proc Int Conf Plant Tissue Culture, Berkeley, Cuthan Publ. CO. 1965: 1-9.
- [27] Denoise C F, Partanen, C R. Effects of subculturing and physical condition of medium on the nuclear behavior of plant tissue culture[J]. Am. J. Bot, 1969, 56(2): 147-152.
- [28] Gildow F E, Mitchell J P. Initiation, growth and nuclear characteristics of tissue cultures of *Paeonia suffruticosa*[J]. Physiol. Plant, 1977, 39: 295-298.
- [29] 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.
- [30] 朱至清. 植物细胞工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 74-81.
- [31] 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.
- [32] 何桂梅. 牡丹远缘杂交育种及其胚培养与体细胞胚发生的研究[D]. 北京林业大学, 2006.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] 崔凯荣, 戴若兰. 植物体细胞胚发生的分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [36] Santana N, Conzalez M E, Valcarcel M, et al. Somatic embryogenesis, a valuable alternative for propagating selected robusta coffee (*Coffea canephora*) clones. In Vitro Cell. Dev. Biol. 2004, 40(1): 95-101.
- [37] 成仿云. 紫斑牡丹有性生殖过程研究[D]. 北京林业大学, 1996.
- [38] Brukhin V B, Batygina T B. Embryo culture and somatic embryogenesis in culture of *Paeonia anomala*[J]. Phytomorphology, 1994, 44(3-4): 151-157.
- [39] Zenkteler M, Misiura E, Ponitka A. Induction of androgenetic embryos in the in vitro culture anther of several species[J]. Experientia, 1975, 31: 289-291.
- [40] Roberts M, Sunderland N. Pollen culture of *Paeonia*[J]. John Innes Inst Ann. Rep, 1977, 68: 60-61.
- [41] 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.
- [42] 李萍, 成仿云, 何桂梅. 牡丹组织培养的初步研究//中国园艺学会第六届青年学术讨论会论文集[C]. 陕西科技出版社, 2004: 684-688.
- [43] 刘用生, 李友勇. 植物组织培养中活性炭的使用[J]. 植物生理学通讯, 1994, 30(4): 214-217.
- [44] Aghavan V. One hundred years of zygotic embryo culture investigation [J]. In Vitro Cell. Dev. Biol. -plant, 2003, 39: 437-442.

葡萄种植经

- 1 不把生土填回沟。沟内全部填熟土, 所填熟土到行间取。熟土掺拱肥回填。
- 2 适时早栽扣拱棚。扣上条状小拱棚, 定植苗木可提前大约 10 d。这么做缓苗快, 秋后枝条成熟好。
- 3 素土护根缓苗快。定植葡萄所用素土是没掺肥料的表土。
- 4 苗小根浅勤浇水。新栽的苗木根被剪得很短, 因此, 需要经常浇水, 保持表层土的湿润。
- 5 追肥做到少而勤。每 7~10 d 追肥 1 次, 每次每株 3~5 g 三元复合肥分散埋在表土下。
- 6 要让葡萄立着长。竖直向上生长, 可使枝蔓粗壮, 中上部也不会变细。
- 7 花芽分化靠摘心。采用夏剪方法, 强化了花芽分化。对每株葡萄仅留 1 个新梢。当心梢长出 5~7 片叶时, 留 4~6 片叶摘心, 此后, 对顶端的副梢留 5~6 片叶摘心, 反复进行。对其余副梢留 1 片叶摘心, 反复进行。
- 8 来年曲枝再催芽。萌芽前先不要上架, 让枝条在地面上水平状态萌芽。