

芍药组织培养技术研究

张庆瑞¹, 孙建洲², 任凝辉¹, 董小宇¹, 刘志敏¹, 翟敏¹

(1. 河南农业大学林学院园艺学院, 河南 郑州 450002; 2. 中国洛阳国家牡丹基因库, 河南 洛阳 471008)

摘要: 以芍药休眠芽为外植体, 进行组织培养试验。结果表明, 外植体消毒的最佳方法是用 0.1% HgCl₂ 消毒 10 min, 适宜的启动培养基为 1/2MS + GA₃ 1 mg/L + 6-BA 1 mg/L, 最佳增殖培养基为 1/2MS + 6-BA 1 mg/L + KT 0.5 mg/L。采用两步生根法, 组培苗生根的适宜培养基为 1/2MS + IBA 1 mg/L。

关键词: 芍药; 组织培养; 培养基

中图分类号: S682.1⁺2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2006)04-0088-03

Tissue Culture of *Paeonia lactiflora* Pall

ZHANG Qing-rui¹, SUN Jian-zhou², REN Ning-hui¹, DONG Xiao-yu¹, LIU Zhi-min¹, ZHAI Min¹

(1. College of Forestry and Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. China National Peony Gene Bank, Luoyang 471008, China)

Abstract: The dormant buds of *Paeonia lactiflora* Pall were used as the material for tissue culture in order to improve the propagation rate. It was found in this experiment that the best sterilizing procedure was for the explants to be soaked in 0.1% aqueous mercuric chloride for 10 min, the optimal cultural medium for bud induction was 1/2MS + GA₃ 1 mg/L + 6-BA 1 mg/L, the suitable cultural medium for multiplication was 1/2MS + 6-BA 1 mg/L + KT 0.5 mg/L, and the preferable root-inducing medium was 1/2MS + IBA 1 mg/L.

Key words: *Paeonia lactiflora* Pall; Tissue culture; Medium

收稿日期: 2005-12-10

基金项目: 河南省重大科技攻关项目(0122012200)

作者简介: 张庆瑞(1980-), 女, 河南焦作人, 在读硕士研究生, 研究方向: 园林植物栽培生理。

干上等。生长基质要求疏松、通气、肥沃、潮湿等。盆栽时, 基质可按园田土 2 份、腐叶土或草炭土 5 份、珍珠岩及河砂 3 份的比例混合, 并加入适量腐熟的动物粪肥, 混合均匀即可。

2.2 肥水管理

栽植后浇透水。生长季节(4~9月)需要充足的水分, 经常保持盆土湿润, 但不能积水, 定期向叶面或周围环境中喷水, 使空气湿度保持 70%~80%。其他季节盆土干时再浇, 空气干燥时可向叶面喷水。生长旺季, 每 1 个月左右施 1 次稀薄液肥(腐熟饼肥水或复合化肥)。注意不使液肥沾污叶面, 否则易造成叶片枯黄, 影响观赏效果。

2.3 光、温控制

蕨类分布于热带或亚热带, 喜温暖、潮湿和半阴

环境, 忌阳光直射。全年需遮阳栽培, 要求蔽荫度 50% 左右, 光照强度在 2 000~4 000 lx 为宜。室内观赏应置于明亮的蔽荫处。生长适温为 20~22℃。夏季经常喷水雾降温, 并注意通风防闷热, 室内观赏防止空调冷风侵袭。越冬温度 5~10℃。

2.4 修剪整形

养护过程中发现有枯叶应及时剪除。叶片拥挤会导致生长衰弱、叶片发黄等现象, 影响观赏效果。因此, 叶丛过密时, 要适时分株, 或于每年秋季将老叶适当疏剪一部分, 以保证叶片顺畅、疏密适宜, 株形端庄、优雅。

芍药(*Paeonia lactiflora* Pall)为芍药科芍药属多年生宿根草本植物。其花形妩媚,花色富丽,自古以来深受人们的喜爱,与牡丹并称为“花王”与“花相”,素有“花中皇后”的美称。中国芍药栽培已有3 900多年的历史^[1]。芍药花可作切花,根皮可入药,种子为制造肥皂和漆料的原料。同时,芍药还是牡丹嫁接繁殖的理想砧木,具有根短粗,木质部松软,生长快,抗性强,易嫁接,易成活,生长快等优点。但适宜做牡丹砧木的芍药品种较少。在生产中我们观察到,以日本进口金晃牡丹的砧木——芍药作砧木嫁接的牡丹开花大,数量多,花期长,花色艳,且有在栽培容器中生长时间长的特点。芍药常采用传统的繁殖方法进行繁殖,但其繁殖系数低,速度慢,已不能满足市场的需求;而采用组织培养技术对其进行繁殖,可扩大其繁殖系数,加快其繁殖速度。因此,本试验以日本进口金晃牡丹的砧木(芍药)的芽为材料进行组织培养技术的研究,旨在探讨芍药芽诱导、增殖和生根的最适培养基,为其快速繁育提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料取自日本进口金晃牡丹的砧木(芍药)。将砧木基部休眠芽取下,带回实验室,进行组织培养。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的消毒和培养条件 用自来水将材料冲洗干净,去掉外层鳞片,切除基部受伤部分,用适量洗洁精浸泡20 min,再用流水冲洗30 min;然后在超净工作台上先用75%酒精消毒30 s,再用0.1% HgCl₂消毒。HgCl₂消毒时间设4个处理,分别为8 min、10 min、12 min、14 min,然后用无菌蒸馏水洗涤6~7次,用刀片拨去鳞片,切取顶端为外植体,接种到培养基上。每处理接种20瓶,每瓶接种1个外植体。培养基中蔗糖用量为25 g/L,琼脂用量为11 g/L, pH值5.6~5.8,培养温度(25±2)℃,光照强度2 000 lx,光照时间12 h/d。

1.2.2 芽诱导培养基 将芍药芽接种在附加不同浓度的细胞分裂素6-BA(6-苄基嘌呤)、生长素NAA(萘乙酸)和GA₃(赤霉素)的1/2MS培养基上。采用L₉(3⁴)正交设计组成9种处理组合。每处理接种10瓶,每瓶接种1个外植体,在培养室培养25 d后统计结果(培养条件同上)。

1.2.3 芽增殖培养基 增殖培养的激素种类有生长素类的NAA、KT(激动素)及细胞分裂素6-BA,

基本培养基为1/2MS,采用L₉(3⁴)正交设计。将诱导培养得到的生长相对均匀一致的幼苗切割下来接种到培养基上。每处理接种10瓶,每瓶接1棵苗,40 d后进行观察并统计增殖率。

1.2.4 根诱导培养基 选取高2 cm左右的组培苗,从基部切下,接种在以1/2MS为基本培养基,附加不同浓度IBA(吲哚丁酸)的培养基上暗培养10 d,然后转到不加任何激素的1/2MS+0.3% AC(活性炭)培养基上进行正常培养。每处理接种10瓶,每瓶接1棵苗,观察其发根时间及生根率(培养条件同上)。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时间对芍药休眠芽萌动率及污染率的影响

各处理培养10 d后调查消毒效果,结果表明(表1),消毒效果与消毒时间的长短有很大关系,污染率随消毒时间的延长而降低,而死亡率和褐化率均随消毒时间的延长而增加。各处理比较,14 min的处理褐化率最高达50%,对外植体造成伤害的程度较大,严重影响其萌动率;10 min处理萌动率最高为96.4%,死亡率最低仅为3.60%。

表1 不同消毒时间对外植体的影响 (%)

消毒时间 (min)	污染率	死亡率	褐化率	萌动率
8	55.56	3.7	27.27	96.3
10	39.28	3.6	37.50	96.4
12	34.48	10.3	43.75	89.7
14	28.00	16.0	50.00	84.0

2.2 不同生长调节剂对芍药休眠芽启动培养的影响

不同生长调节剂对芍药休眠芽诱导率的影响见表2。由表2可知:在GA₃、6-BA、NAA三因素中,GA₃是影响芽启动培养的最主要因素;其次是6-BA;NAA的影响相对较小。从平均值来看,GA₃浓度为1 mg/L与6-BA 1 mg/L或NAA 1 mg/L配合时芽诱导率最高,所以理论上最佳的芍药芽诱导培养基是:1/2MS+GA₃ 1 mg/L+6-BA 1 mg/L+NAA 1 mg/L,这一组合在正交设计时未组成。从实际启动率看,8号培养基的平均诱导率最高,为75.46%。同时,试验中还观察到8号培养基上培养的试管苗叶片较大,叶色浓绿。所以选8号培养基(1/2MS+GA₃ 1 mg/L+6-BA 1 mg/L)为试验中芍药芽诱导培养基。

表2 不同生长调节剂组合对芍药休眠芽诱导率的影响

培养基编号	生长调节剂种类及浓度(mg/L)			诱导率(%)
	GA ₃	6-BA	NAA	
1	1(0)	1(0.5)	1(0)	46.93
2	1	2(1)	2(0.5)	32.75
3	1	3(2)	3(1)	42.13
4	2(0.5)	1	2	55.18
5	2	2	3	62.88
6	2	3	1	44.51
7	3(1)	1	3	63.89
8	3	2	1	75.46
9	3	3	2	46.43
t1	121.82	166.00	166.90	
t2	162.56	171.09	134.37	
t3	185.78	133.07	168.90	
R	63.96	38.02	34.53	

2.3 不同生长调节剂对芍药增殖的影响

表3为不同生长调节剂对芍药增殖的影响,从中可以看出,6-BA和KT 2种细胞分裂素对芍药组培苗增殖的影响都远大于生长素NAA,其中6-BA的极差(1.03)大于KT的极差(0.84),说明6-BA对增殖的影响大于KT。在6-BA的3个水平中,以1 mg/L效果最好。因此,诱导芍药增殖的植物生长调节剂6-BA和KT的最佳搭配是6-BA 1 mg/L+KT 0.5 mg/L,即13号培养基。

表3 不同生长调节剂组合对芍药组培苗增殖系数的影响

培养基编号	生长调节剂种类及浓度(mg/L)			增殖系数
	6-BA	NAA	KT	
10	1(0.5)	1(0)	1(0)	1.875
11	1	2(0.5)	2(0.5)	2.25
12	1	3(1)	3(1)	1.33
13	2(1.0)	1	2	3.14
14	2	2	3	2.71
15	2	3	1	2.43
16	3(2)	1	3	1.33
17	3	2	1	1.38
18	3	3	2	2.5
t1	1.82	2.12	1.89	
t2	2.76	2.11	2.63	
t3	1.74	2.09	1.79	
R	1.03	0.03	0.84	

2.4 不同培养基组合对芍药组培苗生根的影响

不同培养基组合对芍药组培苗生根的影响见表4。从中可以看出,随着IBA浓度的增加,芍药组培苗的平均生根数和平均根长都呈下降趋势。同时,在试验中发现,经暗培养10 d后,在1/2MS+IBA 1 mg/L培养基上,芍药根发生时间最早,为12 d。因此,芍药组培苗生根的适宜培养基为1/2MS+IBA 1 mg/L。由于1 mg/L的IBA浓度是所试验的临界值,其生根率仅为50%,有待进一步研究。

表4 不同培养基组合对芍药组培苗生根的影响

培养基	生根率(%)	平均根数(个)	平均根长(cm)
1/2MS+IBA 1mg/L	50	4	2.625
1/2MS+IBA 2mg/L	60	3.33	1.45
1/2MS+IBA 5mg/L	25	2	0.75

3 小结与讨论

芍药休眠芽的最佳消毒时间是用0.1% HgCl₂消毒10 min。GA₃是影响芽启动培养的最主要因素,诱导培养基为1/2MS+GA₃ 1 mg/L+6-BA 1 mg/L,同时建议将1/2MS+GA₃ 1 mg/L+6-BA 1 mg/L+NAA 1 mg/L与上述培养基进行比较试验。最佳增殖培养基为1/2MS+6-BA 1 mg/L+KT 0.5 mg/L,6-BA对增殖的影响大于KT。生根的适宜培养基为1/2MS+IBA 1 mg/L。

参考文献:

- [1] 王莹,胡宝忠.芍药(*Paeonia* L.)生物学特性研究进展[J].东北农业大学学报,2004,35(6):759-763.
- [2] 郭风云.芍药组织培养技术的研究[D].北京:北京林业大学,2001.6.
- [3] 高志民,王雁,王莲英,等.牡丹、芍药繁殖与育种研究现状[J].北京林业大学学报,2001,23(4):75-79.
- [4] 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.
- [5] Takashi Hosoki, Michiko Ando, Takehito Kubara. In vitro propagation of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) by longitudinal shoot-split method[J]. Plant Cell Reports, 1989(8):243-246.
- [6] 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.