

5个芍药品种愈伤组织诱导及分化研究

王吉凤 李青 孟会

(北京林业大学园林学院, 国家花卉工程技术研究中心)

摘要:芍药组织培养是解决其快速繁殖的有效方法, 更为其新品种的繁育提供有效途径。本试验分别从5个芍药品种的不同部位取材, 研究了影响芍药愈伤组织诱导和再分化的主要因素。结果表明: 2, 4-D、NAA与TDZ诱导愈伤组织效果较好, KT、IAA和IBA不利于愈伤组织诱导和不定芽分化; 在愈伤组织再分化中, NAA效果优于2, 4-D, TDZ优于6-BA; 在所选外植体中只有胚轴产生的愈伤组织分化出不定芽, 平均分化率为7.95%。

关键词: 芍药; 植物生长调节剂; 愈伤组织; 诱导; 再分化

中图分类号: S682.1⁺2 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2010)03-0213-04

WANG Ji-feng; LI Qing; MENG Hui. **Induction and regeneration of callus tissues in five peony cultivars.** *Journal of Beijing Forestry University* (2010) 32 (3) 213-216 [Ch, 12 ref.] National Engineering Research Center for Floriculture, College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, 100083, P. R. China.

Tissue culture of peony provides an effective approach of improving rapid propagation, especially for new cultivars. Five cultivars were selected to study the induction and regeneration of peony callus. Results show that the addition of 2, 4-D, NAA and TDZ was effective in the induction of callus, while KT, IAA and IBA had negative effects in the induction of callus and differentiation of adventitious buds. In terms of regeneration of callus, NAA had a better effect than 2, 4-D and TDZ was better than 6-BA. Only callus from the hypocotyl succeeded in producing adventitious buds, with an average regeneration rate of 7.95%.

Key words *Paeonia lactiflora* Pall.; plant growth regulators; callus; induction; regeneration

芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.)原产中国, 属毛茛科(Ranunculaceae)芍药属多年生宿根草本植物, 是我国传统名花之一, 具有极高的观赏价值和药用价值。芍药传统的分株繁殖方式繁殖系数小, 播种繁殖不能保持品种的优良性状, 不能满足产业化生产的要求。组织培养技术是解决芍药快速繁殖有效方法, 近30年相继有关于芍药组织培养的文献报道, 但至今仍未有较成熟的技术用于生产实践中^[1-6]。

有关芍药愈伤组织诱导和植株再生的研究中, 郭风云^[7]、张庆瑞^[8]虽然诱导出了愈伤组织, 但是均未诱导出不定芽。本研究选择芍药5个品种为试验材料, 通过诱导愈伤组织和不定芽, 克服芍药组织培养快繁中以芽为外植体污染严重、难于建立无菌

培养体系等问题, 同时为芍药的遗传转化及新品种培育等方面的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

材料取材于北京市昌平区小辛庄芍药园。于2007年8月份分别取‘粉玉奴’、‘春晓’、‘紫凤羽’、‘莲台’、‘桃花飞雪’种子进行无菌培养后取胚轴作外植体, 进行芍药不同品种间愈伤组织诱导和褐化问题的研究。2008年4月上旬采集5年生植株的叶、叶柄、无芽茎段作外植体, 研究植物激素及不同外植体对芍药愈伤组织诱导和再分化及褐化的影响。

收稿日期: 2009-04-30

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD07B01)。

第一作者: 王吉凤。主要研究方向: 花卉组织培养。电话: 010-62963197 Email: saisai05361@163.com 地址: 100083 北京市清华东路35号北京林业大学园林学院。

责任作者: 李青, 副教授。主要研究方向: 花卉组织培养。电话: 010-62338294 Email: wliqing06@sina.com 地址: 同上。

本刊网址: <http://www.bjfujournal.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

1.2 培养条件

培养条件:温度(24±2)℃,光照时间14 h/d,光照强度2 000~3 000 lx。

1.3 方法

1.3.1 外植体处理

将采来的外植体材料用洗涤剂浸泡10 min,流水冲洗2~3 h后,在超净工作台内先用75%酒精表面灭菌30 s,无菌水冲洗3~4遍,再用0.1%的HgCl₂灭菌5 min,无菌水冲洗5~6遍。将叶片切为1 cm²左右,叶柄、茎段切分为1 cm左右的段,分别接种于准备好的诱导培养基中。

1.3.2 愈伤组织诱导培养基

本试验以1/2MS为基本培养基,附加6-BA、TDZ、2,4-D、NAA、IBA、KT等激素,0.6%琼脂,3%砂糖,pH为5.8~6.0;研究各种激素在芍药愈伤组织诱导中的作用效果,筛选芍药愈伤组织诱导的最佳培养基。

1.3.3 愈伤组织分化培养基

以1/2MS为基本培养基,附加的外源激素及浓度组合为:6-BA(1.0、2.0、3.0、4.0 mg/L)分别与NAA、IBA、IAA(0.1、0.2、0.4、0.5 mg/L)组合,以及TDZ(0.2、0.4、0.5、1.0 mg/L)与NAA(0.1、0.2、0.4、0.5 mg/L)组合,将诱导的愈伤组织转接于分化培养基中进行不定芽再生诱导。

1.3.4 数据处理及愈伤组织生长表现指标描述

试验中每瓶培养基中接种2~3个外植体,每个处理15瓶,重复3次。数据采用SPSS软件进行分析,进行差异显著性检验。

相关数据统计方法如下:

1)愈伤组织诱导率=(产生愈伤组织的外植体数/接种的外植体数)×100%。

2)愈伤组织分化率=(分化出不定芽的愈伤组织数/处理的愈伤组织数)×100%。

2 结果与分析

2.1 不同品种对愈伤组织诱导的影响

以不同芍药品种的胚轴为外植体,诱导培养基为1/2MS+TDZ 0.2 mg/L+NAA 0.1 mg/L。结果表明,不同品种的芍药愈伤组织诱导难易程度差别较大,不同品种愈伤组织诱导由易到难为:‘粉玉奴’>‘莲台’>‘紫凤羽’>‘桃花飞雪’>‘春晓’(表1)。

2.2 外植体类型对愈伤组织诱导及分化的影响

在相同的培养条件下,不同的外植体在愈伤组织诱导率、诱导愈伤组织所需的时间、植株再生率等问题上存在较大差别。叶片培养30 d后,未有明显变化,经过50~60 d培养,叶片周边开始长出绿色

表1 不同品种对愈伤组织诱导的影响

Tab.1 Induction of callus in different cultivars

品种	花型	接种数/个	愈伤组织数/块	诱导率/%	褐化率/%	褐化程度
‘粉玉奴’	单瓣型	35	35	100	0	-
‘莲台’	托桂型	35	35	100	10.5	*
‘紫凤羽’	托桂型	38	36	94.7	18.3	*
‘桃花飞雪’	皇冠型	33	11	33.3	50.0	**
‘春晓’	托桂-皇冠	32	6	18.8	21.1	*

注:-未发生褐化现象;*轻度褐化,外植体周围淡褐色,材料色泽正常;**中度褐化,较多褐色物质溢出,外植体周围1/2以上面积变褐,材料边缘变褐色;***严重褐化,培养基全部深褐色,外植体黑色,材料变褐色,生命力降低。表3同此。

愈伤组织颗粒;叶柄在培养30 d后即可见明显的愈伤组织颗粒,2个月后叶柄完全形成愈伤组织;茎段在培养30 d时可诱导出大量的愈伤组织。若以胚轴为外植体,污染率低,诱导率达到100%。将4种外植体来源的愈伤组织接种于分化培养基中,60 d后观察,只有胚轴产生的愈伤组织分化出不定芽。

2.3 植物生长调节剂对愈伤组织诱导的影响

2.3.1 生长素对愈伤组织诱导的影响

不同种类和浓度的生长素诱导芍药叶柄愈伤组织时,2,4-D的诱导效果最好,随着浓度的增加,诱导率上升,当浓度达到2.0 mg/L时,诱导率最高为46.7%,但愈伤组织呈白色;其次为NAA,诱导率为14.3%;IBA未诱导出愈伤组织,且褐化现象严重,外植体变黑死亡(表2)。

表2 不同生长素对愈伤组织诱导的影响

Tab.2 Effects of different auxin on callus induction

生长素种类	愈伤组织情况	浓度/(mg·L ⁻¹)			
		0.2	0.5	1.0	2.0
2,4-D	诱导率/%	6.7	10.0	16.7	46.7
	愈伤组织生长情况	+,黄绿色	+,绿色	+,白色	++,白色
NAA	诱导率/%	0	0	6.7	14.3
	愈伤组织生长情况	中度褐化,最终黑色死亡	中度褐化,最终黑色死亡	+,黄绿色	+,黄绿色
IBA	诱导率/%	0	0	0	0
	愈伤组织生长情况	外植体严重褐化,最终黑色死亡			

注: + 30 d内形成的愈伤组织表面直径小于0.5 cm,生长速度慢; ++ 30 d内形成的愈伤组织表面直径大于0.5 cm小于1 cm,生长速度较快; +++ 30 d内形成的愈伤组织表面直径大于1 cm,生长速度快。表3同此。

2.3.2 不同植物生长调节剂组合对愈伤组织诱导及生长的影响

2,4-D对芍药愈伤组织诱导作用大于6-BA,在2,4-D和6-BA组合中较适宜的浓度为6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 0.2 mg/L。2,4-D与TDZ组合对叶柄愈伤组织具有较高的诱导率,在继代培养中宜选择低浓度水平,表现为2,4-D 0.2 mg/L+TDZ 0.1 mg/L效果最好,诱导率较高,愈伤组织玻璃化

轻,无死亡现象(表 3)。

表 3 不同植物生长调节剂组合对愈伤组织诱导的影响
Tab. 3 Effects of different plant growth regulator combinations on callus induction

激素组合和浓度 / (mg·L ⁻¹)	愈伤组织诱导情况	诱导率 / %	愈伤组织生长情况	褐化率 / %	褐化程度
6-BA 0.5 + 2 4-D 0.2	叶柄下部膨大,开始出现愈伤组织	19.0 d	+,黄绿色	30.8	*
6-BA 1.0 + 2 4-D 0.2	叶柄下部开始诱导出现愈伤组织	35.7 c	++,绿色	0	-
6-BA 1.0 + 2 4-D 0.1	没有诱导出愈伤组织	0 d	+,黄绿色	0	-
TDZ 0.1 + 2 4-D 0.2	诱导出愈伤组织,颗粒状,轻玻璃化	45.8 b	++,绿色	0	-
TDZ 0.2 + 2 4-D 0.2	诱导出愈伤组织,颗粒状,玻璃化,易碎,死亡 23.1%	72.8 a	+,绿色	0	-
6-BA 1.0 + NAA 1.0	诱导出愈伤组织,长势较好	67.2 a	+++,绿色	13.3	*
6-BA 1.0 + NAA 2.0	诱导出愈伤组织,表面水渍状,易碎	85.0 a	+++,黄绿色-黄色	18.3	**
6-BA 2.0 + NAA 0.1	诱导出愈伤组织	22.9 d	+,黄绿色	23.8	*

注:同列中不同字母表示在 $P=0.05$ 水平上差异显著。

高浓度 6-BA (2.0 mg/L) 和 NAA (2.0 mg/L) 对愈伤组织生长有一定抑制作用。6-BA 1.0 mg/L 和 NAA 1.0 mg/L 组合时,愈伤组织诱导率较高,褐化死亡现象较轻;但与 2 4-D 0.2 mg/L 及 TDZ 0.1 mg/L 组合对比,其愈伤组织褐化现象严重(表 3)。KT 也不适合芍药愈伤组织的诱导和生长(图 1a)。

2.4 植物生长调节剂对愈伤组织分化不定芽的影响

将诱导产生的愈伤组织接种在分化培养基 1/2MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L、1/2MS + TDZ 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 中,诱导 30 d 后,分化率分别为 6.8% 和 9.1%,可见细胞分裂素 TDZ 比 6-BA 更适用于芍药愈伤组织芽的分化。进一步观察发现,有 2 种类型的不定芽发生:一是愈伤组织经过较长时间才分化出紫红色或绿色不定芽,这种类型的不定芽呈团块状叶状体,生长较慢,没有明显茎的分化,长期培养中,不定芽生长势减弱,最终死亡(图 1b);二是愈伤组织基部膨大产生颗粒状突起后很快分化出紫红色芽点,15 d 后芽点展开,露出大约 2 mm 大小的绿色不定芽,转入新的培养基后长大,但是长势较弱(图 1c)。

由 2 4-D 组合诱导产生的愈伤组织在不同浓度组合的分化培养基中长时间培养后,均未产生不定芽,原因可能是 2 4-D 的持续作用影响了分化,

说明 2 4-D 对芍药愈伤组织再分化有抑制作用。在 6-BA 分别与 NAA、IAA、IBA 组合的分化培养基中,所有愈伤组织增殖速度减慢、褐化、变黑死亡,没有不定芽发生。

由上述结果看出,芍药愈伤组织再分化对激素种类和浓度要求比较严格,仅由 NAA 诱导产生的愈伤组织可以分化出不定芽,2 4-D 诱导产生的愈伤组织在不同组合的分化培养基中均没有不定芽产生,说明 2 4-D 虽然对愈伤组织诱导有促进作用,但是对愈伤组织的芽分化却有抑制作用。

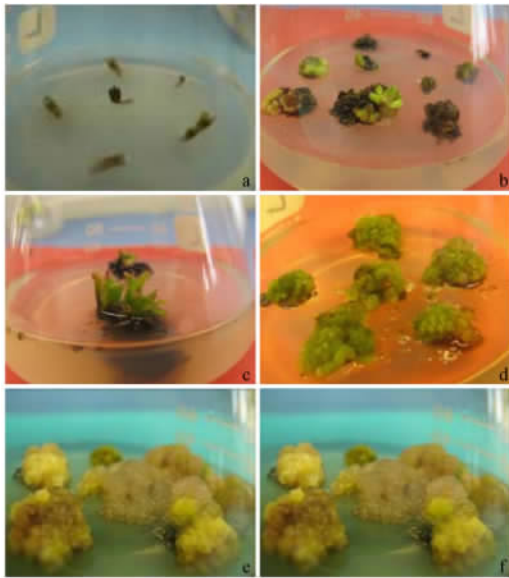
2.5 愈伤组织的类型对不定芽分化的影响

在芍药愈伤组织的诱导及培养过程中,出现了多种类型的愈伤组织,大致可以分为 3 种类型(见表 4)。

表 4 愈伤组织的类型
Tab. 4 Table of callus types

愈伤组织类型	愈伤形态特征	生长速度	进一步分化情况
I 型	淡黄色、结构紧实	生长缓慢	在合适的分化培养基中才能进行分化
II 型	绿色,有光泽,结构疏松	生长旺盛,增殖快	形态发生能力较强,容易分化成苗
III 型	白色、疏松,表面或软泥状或干枯,愈伤组织块大	过渡膨胀,生长逐渐缓慢,无生命力	形态发生能力很弱,后期培养变黑色,容易褐化死亡

在不同水平的激素组合中,2 4-D 的浓度变化对愈伤组织结构的影响比 NAA 明显,TDZ 的影响大于 6-BA。在较低的激素浓度下,如 2 4-D 0.1 mg/L、NAA 0.1 ~ 0.5 mg/L、TDZ < 0.1 mg/L 时,外植体形成 I 型愈伤组织(图 1d);当 2 4-D > 1.0 mg/L、NAA > 2.0 mg/L、TDZ 浓度 0.5 ~ 1.0 mg/L 时,形成 III 型愈伤组织(图 1f);只有生长素浓度适合(2 4-D 0.2 ~ 0.5 mg/L、NAA 0.5 ~ 1.0 mg/L、TDZ 0.1 ~ 0.5 mg/L)才形成 II 型愈伤组织(图 1e)。随着激素浓度的增加,质地较差的 III 型愈伤组织所占比例提高;类型 I 和类型 II 之间在一定程度上可以互相转变;若降低激素浓度,III 型愈伤组织却不能转化成质地较好的愈伤组织。原因可能是,在愈伤组织诱导和增殖培养过程中,细胞脱离了植物整体调节,细胞分化机制失常,随着外源激素浓度的增加,细胞核和细胞质迅速增加,但细胞分裂速度与核复制速度不能同步进行,导致巨型、多倍化的细胞愈伤组织向 III 型细胞发展^[9]。因此,愈伤组织在继代增殖过程中,必须适当降低激素浓度才有利于生长、分化。



a. KT 诱导愈伤组织的情况; b. A 型不定芽; c. B 型不定芽;
d. I 型愈伤组织; e. II 型愈伤组织; f. III 型愈伤组织

图1 愈伤组织诱导及分化情况

Fig. 1 Induction and regeneration of callus tissues

从愈伤组织结构对再生植株分化的影响看,由 NAA 诱导产生质量好的愈伤组织多呈黄绿色,表面不均匀,颗粒状,细胞排列紧密程度适中,形态发生能力较强,诱导再生植株的可能性大;细胞排列过紧实或过于疏松的愈伤组织都很难再诱导分化产生植株。可见芍药愈伤组织的类型、激素水平及形态发生能力之间具有一定的相关性,均影响到愈伤组织再分化,其中的原因有待进一步研究。

3 结论与讨论

在相同条件下,芍药愈伤组织诱导不同品种间由易到难依次为“粉玉奴”>“莲台”>“紫凤羽”>“桃花飞雪”>“春晓”,不同外植体类型间由易到难依次为胚轴>茎段>叶柄>叶片;分化过程中,只有来源于胚轴的愈伤组织产生再生植株。

TDZ 的细胞分裂素活性高于嘌呤型细胞分裂素,能显著促进愈伤组织诱导、生长和分化^[10],但浓度较高会出现玻璃化现象,所以选用 TDZ 时应控制其浓度大小。生长素类物质中 2,4-D 和 NAA 对芍药愈伤组织诱导有促进作用:2,4-D 诱导愈伤组织表面常长出白色气生根,且极易老化,导致进一步分化较困难^[11];NAA 诱导出的愈伤组织质量较好,有

不定芽分化。而 KT、IBA、IAA 不利于芍药愈伤组织的诱导、增殖和分化。

芍药植株再生问题难以解决,本研究植株再生率平均为 7.3%,并且芽长势较弱。分析形态发生能力减弱或丧失的原因,大多由 3 个因素造成^[12]:一是诱导愈伤组织的外植体中含有分生组织,当重复继代时,逐渐减少至丧失,当它们不存在时,其他的愈伤组织难以再诱导形成器官中心,这些愈伤组织不能形成维管束,而始终保持无组织结构的细胞分裂;第二,内源生长调节物质的减少使形态发生潜力丧失;第三,染色体畸变产生畸变细胞,抑制发育过程。芍药愈伤组织途径获得试管苗的问题有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] HOSOKI T, ANDO M, KUBARA T, et al. *In vitro* propagation of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora*) by a longitudinal shoot split method [J]. *Plant Cell Reports*, 1989, 8(4): 243-246.
- [2] BRUKHIN V B, BATYGINA T B. Embryo culture and somatic embryo genesis in culture of *Paeonia anomala* [J]. *Phytonorphology*, 1994, 44(3/4): 151-157.
- [3] KIM Y S, LEE B K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotyledon culture of *Paeonia albiflora* [J]. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*, 1996, 37(6): 827-830.
- [4] 胡映泉,冯海华. 芍药不定芽诱导技术 [J]. 山西林业科技, 2003(增刊): 23-24.
- [5] 金颢,何小弟. 芍药离体培养初步研究 [J]. 江苏农业科学, 2005(4): 69-71.
- [6] 张庆瑞,孙建洲. 芍药组织培养技术研究 [J]. 河南农业科学, 2006(4): 88-90.
- [7] 郭风云. 芍药组织培养技术的研究 [D]. 北京:北京林业大学, 2001.
- [8] 张庆瑞. 芍药组织培养技术的初步研究 [D]. 郑州:河南农业大学, 2005.
- [9] 张磊,王震星,刘贵仁. 小枣发育枝愈伤组织类型及细胞学观察 [J]. 华北农学报, 1998, 13(2): 117-121.
- [10] 詹亚光,杨传平. 白桦愈伤组织的高效诱导和不定芽分化 [J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(2): 111-114.
- [11] 张磊,王震星,刘玉芹,等. 外源激素对杂种酸模叶组培效果的影响 [J]. 华北农学报, 2000, 15(2): 81-84.
- [12] 李浚明. 植物组织培养教程 [M]. 北京:中国农业大学出版社, 2003.

(责任编辑 董晓燕)