

牡丹幼嫩花瓣愈伤组织诱导及芽的分化

朱向涛^{1,2}, 王 雁^{2*}, 彭镇华², 律春燕^{2,3}

(1. 浙江农林大学 天目学院, 浙江 临安, 311300; 2. 中国林业科学研究院 林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091;
3. 胶州市少海发展管理处, 山东 青岛, 266300)

摘 要:以牡丹“凤丹”的花瓣为外植体,在优化植物生长调节剂的基础上,成功诱导出愈伤组织并实现植株再生,对愈伤组织诱导和分化的培养基类型、植物生长调节剂种类和浓度进行筛选,结果表明:不同的生长调节剂对愈伤组织诱导和分化的影响不同,愈伤组织诱导的最佳培养基为 MS+2,4-D 2.0 mg · L⁻¹+6-BA 1.5 mg · L⁻¹+NAA 0.3 mg · L⁻¹,愈伤组织分化的最佳培养基为:MS+ZT 0.5 mg · L⁻¹+6-BA 2.0 mg · L⁻¹,分化率达到 59.0%。

关键词:牡丹花瓣;愈伤组织;诱导;分化

中图分类号:S685.11 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2012)01-0085-03

Callus Induction and Bud Differentiation of *Paeonia suffruticosa* Petal

ZHU Xiang-tao^{1,2}, WANG Yan^{2*}, PENG Zhen-hua², LV Chun-yan^{2,3}

(1. Tianmu college, Zhejiang Agricultural and Forestry University, Linan Zhejiang 311300; 2. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091;
3. Jiaozhou Shaohai Development Management Department, Qingdao, Shandong 266300)

Abstract: The petals of *Paeonia suffruticosa* were used as explants in this experiment to examine the roles of plant hormones combinations for callus formation and shoot differentiation. The results showed that plant hormones exhibited different impacts on the callus induction and shoot differentiation. The best plant hormone combinations for callus induction were MS+2,4-D 2.0 mg · L⁻¹+6-BA 1.5 mg · L⁻¹+NAA 0.3 mg · L⁻¹ and MS+ZT 0.5 mg · L⁻¹+6-BA 2.0 mg · L⁻¹ was the best plant combination for callus differentiation, the rate of callus differentiation was 59.0%.

Key words: *Paeonia suffruticosa* petal; callus; induction; differentiation

牡丹(*Paeonia suffruticosa*)为芍药科芍药属名贵观赏和药用木本花卉,花大而美,有“花中之王”的美誉^[1],牡丹的组织培养已经有大量研究^[2-7],但尚未建立起一套完整的再生体系。愈伤组织诱导是植株再生的重要步骤,同时愈伤组织是遗传转化的良好的受体,利用愈伤组织诱导出完整植株是遗传转化体系建立的重要前提条件。关于牡丹各种外植体愈伤组织诱导,前人曾利用不同牡丹品种的土芽和顶芽、叶柄、叶片、心皮和雄蕊(陈怡平等,2001)、根的韧皮部等为外植体进行了愈伤组织诱导,土芽

和顶芽的诱导率最高达到 100%,叶柄和叶片诱导率为 80%左右,根的韧皮部诱导率为 70%,心皮和雄蕊诱导率为 0,但普遍分化比较困难,仅在叶柄见到分化现象,分化率达 30.7%^[2-7]。而用花瓣作为外植体进行愈伤组织诱导尚未见报道。利用花瓣进行愈伤组织诱导在菊花、七子花、百合、辛夷、鸢尾等植物中都已实现,且诱导率较高,有些已经分化出新植株^[8-12]。因此利用牡丹花瓣诱导愈伤组织,进一步诱导植株或许成为牡丹再生体系建立的一个新的途径,具有较高的研究价值。本研究利用牡丹的幼

收稿日期:2010-12-30 修回日期:2011-03-14
基金项目:科技部 863 项目(2007AA10Z182);国家林业局“948”项目(2006-4-C07)
作者简介:朱向涛,男,讲师,主要从事园林植物与观赏园艺研究。
* 通讯作者:王雁,女,研究员,博士生导师,主要从事园林植物与观赏园艺研究。

嫩花瓣为外植体,对诱导愈伤组织形成的培养基类型和植物生长调节剂进行筛选,并进一步诱导愈伤组织分化,探讨牡丹再生体系建立的有效方法,拟为牡丹的快速繁殖提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

牡丹品种为‘凤丹’(*Paeonia suffruticos* ‘feng-dan’),取苞片生长良好且尚未开裂时的幼嫩花瓣为外植体。

1.2 方法

1.2.1 外植体灭菌 将花蕾在自来水下冲洗 2~4 h,用 2%次氯酸钠消毒 20 min,在超净工作台上用无菌水冲洗 3~5 遍,再用 70%酒精消毒 15 s,无菌水冲洗 3~5 遍。

1.2.2 花瓣愈伤组织的诱导 切开消毒后的花蕾,将花瓣取出,切成 2 cm×2 cm 的小片,接种在添加不同浓度 2,4-D(浓度 1.0、2.0、3.0 mg·L⁻¹)、6-BA(浓度 1.0、1.5、2.0 mg·L⁻¹)、NAA(浓度 0.1、0.2、0.3 mg·L⁻¹)的 MS 培养基上,pH 5.8。采用三因素三水平正交表 L₉(3³)安排试验(表 1),每处理接种 10 瓶,每瓶接种 3 块小片,所有试验均重复 3 次,将培养瓶置于 25℃,相对湿度 70%的黑暗条件下进行培养,30 d 后观察愈伤组织诱导情况。

1.2.3 花瓣愈伤组织分化 将经过诱导形成的状态良好的愈伤组织,转接到添加不同浓度 ZT、6-BA 的 MS 培养基上,pH 值 5.8。置于 25℃,相对湿度 70%,光周期为 12 h,光照强度为 35~40 μmol·m⁻²·s⁻¹ 条件下进行分化诱导培养,30 d 后观察愈伤组织分化的数量,以芽露出愈伤组织作为标志。

1.2.4 数据分析 愈伤组织诱导率=(产生愈伤组

织的外植体数/接种的总外植体数)×100%。
愈伤组织分化率=(分化的愈伤组织数/接种的总愈伤组织数)×100%。

2 结果与分析

2.1 牡丹花瓣愈伤组织诱导及分化过程

经过消毒后的幼嫩花瓣接种到愈伤组织诱导培养基 15 d 后,平展在培养基表面的花瓣开始中间凸起,伤口处开始紧贴培养基表面,此时花瓣颜色仍为白色;20 d 左右时,花瓣的颜色变成褐色,在花瓣的四周切口处开始出现白色、淡黄色和黄色的愈伤组织。将愈伤组织转接到分化培养基上培养 30 d 左右,愈伤组织开始变为浅绿色,体积开始膨大,并在表面形成圆球状的小颗粒或松软的团状结构。之后每隔 15 d 转接到新的培养基上,转接两次后圆球状的小颗粒表面开始有小芽发出,或为丛生状或为单芽,继续培养愈伤组织形成的小植株,小植株不断长大,并萌发出叶片和小芽。

2.2 不同植物生长调节剂和浓度对牡丹花瓣愈伤组织诱导的影响

植物生长调节剂种类和浓度不同,对牡丹花瓣愈伤组织的诱导率有所差异,但愈伤组织诱导率均在 80.0%以上,5 号培养基组合的诱导率最高,达 98.9%。2,4-D 浓度的极差最大(38.89),6-BA 次之(11.11),NAA 最小(6.67),说明 2,4-D 浓度对愈伤组织的诱导率影响最大,而 NAA 浓度对愈伤组织的诱导率影响最小。从 K 的最大值来看,2,4-D、6-BA 的第 2 水平和 NAA 的第 3 水平最高,因此,最佳的培养基组合应为 MS+2,4-D2.0 mg·L⁻¹+6-BA 1.5 mg·L⁻¹+NAA 0.3 mg·L⁻¹,这一组合恰好是 5 号培养基(表 1)。

表 1 不同激素水平对花瓣愈伤组织诱导的影响
Table 1 Effects of different levels of hormones on callus induction

处理编号	2,4-D/(mg·L ⁻¹)	6-BA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)	愈伤诱导率/%	愈伤组织特征
1	1.0	1.0	0.1	80.00 E	白色,致密、颗粒状
2	1.0	1.5	0.2	84.44 D	白色、致密、颗粒状
3	1.0	2.0	0.3	85.56 D	白色、松软、团状
4	2.0	1.0	0.2	94.44 B	淡黄色、疏松、颗粒状
5	2.0	1.5	0.3	98.89 A	淡黄色、疏松、颗粒状
6	2.0	2.0	0.1	95.56 B	淡黄色、疏松、颗粒状
7	3.0	1.0	0.3	90.00 C	黄色、致密、颗粒状
8	3.0	1.5	0.1	92.22 C	黄色、致密、颗粒状
9	3.0	2.0	0.2	93.33 C	黄色、松软、团状
K1	250.00	264.44	267.78		
K2	288.89	275.56	272.22		
K3	275.56	274.44	274.44		
R	38.89	11.11	6.67		

2.3 不同培养基对花瓣愈伤组织诱导芽的影响

在本实验中,6-BA 浓度的变化对花瓣的分化率影响不大,均在 10%左右(表 2);而 ZT 对花瓣愈伤组织分化作用比较明显,其分化率在 30%~40%之间。随着 ZT 浓度的增加,愈伤组织分化率呈现先升高后降低的过程,ZT 浓度为 0.5 mg·L⁻¹时,牡丹花瓣的分化率最高达到 43.7%。当两种生长调节剂同时存在时,牡丹花瓣愈伤组织芽分化率有所提高,ZT 0.5 mg·L⁻¹+6-BA2.0 mg·L⁻¹组合的分化率达到 59.0%。因此,牡丹花瓣是诱导诱导愈伤组织分化的较好的材料。

表 2 ZT 和 6-BA 组合对牡丹花瓣芽分化的影响
Table 2 Effect of ZT and 6-BA combinations for shoot differentiation on flower petal of *Paeonia suffruticosa*

编号	ZT /(mg·L ⁻¹)	6-BA /(mg·L ⁻¹)	外植体数	分化数	分化率 /%
1	0	1.0	102	10	9.8E
2	0	2.0	104	8	7.7F
3	0	3.0	101	11	10.9E
4	0.1	0	100	33	33.0D
5	0.5	0	103	45	43.7C
6	1.0	0	102	39	38.2D
7	0.1	2.0	102	44	43.1C
8	0.5	2.0	105	62	59.0A
9	1.0	2.0	105	58	55.2B

* 大写字母代表显著性 $p<0.01$ 。

3 结论与讨论

不同的植物生长调节剂种类及其浓度对牡丹品种‘凤丹’花瓣愈伤组织的诱导效应有差异,但总体上愈伤组织的诱导率都在 80.0%以上,最佳的培养基组合为 MS+2,4-D 2.0 mg·L⁻¹+6-BA 1.5 mg·L⁻¹+NAA 0.3 mg·L⁻¹,诱导率达到 98.9%。而在其他外植体诱导愈伤组织的研究中,土芽和幼芽愈伤组织诱导率达到 100%^[2],叶片、叶柄的愈伤组织诱导率为 80.0%左右^[2-3,5,7],心皮和雄蕊的诱导率为 0^[4]。利用 2,4-D、6-BA 和 NAA,以菊花花瓣为外植体,诱导出结构为疏松、颗粒状的愈伤组织,且诱导率较高均在 80%以上,有的甚至达到 100%,愈伤组织的颜色也有所不同,主要是黄色、白色两种颜色^[13]。利用 6-BA 和 NAA 诱导出金边瑞香花瓣愈伤组织,愈伤组织诱导率达到 85.1%^[14]。本实验结果与前人的研究有相似之处,愈伤组织诱导率均在 80%以上,由此可见利用这几种常见的植物生长调节剂均能诱导出花瓣愈伤组织,且愈伤组织诱导率较高。因此,牡丹幼嫩的花瓣也是诱导愈伤组织的重要材料。

目前针对花瓣愈伤组织诱导分化的研究较少,

仅见利用不同的植物生长调节剂对鸢尾花瓣愈伤组织诱导分化研究,其结果显示,对花瓣愈伤组织分化影响最大的为 6-BA 和 ZT 两种植物生长调节剂^[12]。牡丹的愈伤组织分化困难,大多数愈伤组织基本不分化,前人对叶柄愈伤组织诱导分化率最高达到 30%^[5],而本试验中花瓣愈伤组织的分化率达到 59.0%。在牡丹花瓣愈伤组织分化过程中,单独用 ZT 或 6-BA 都能诱导出愈伤组织,但分化率有所差异,ZT 的分化率要高于 6-BA,但两者同时使用时,愈伤组织分化率更高。说明 ZT 在具有 6-BA 存在的条件下能够加速分裂,能使分生组织加速分化。这与菠萝愈伤组织分化影响研究结果保持一致^[15]。

本试验中仅选用 ZT 和 6-BA 两种植物生长调节物质对牡丹品种‘凤丹’花瓣愈伤组织的分化进行研究,其他生长调节物质是否能提高愈伤组织的分化效率及其他牡丹品种的引导与分化尚待进一步研究。

牡丹花瓣愈伤组织诱导与分化过程中,要注意控制好培养条件,本试验在诱导过程中进行暗培养,而在愈伤组织增殖和分化过程中采用光暗交替培养的方式,这与对红掌^[16]愈伤组织诱导的结果有所不同,可能与植物的种类有关,具体原因有待进一步研究。

参考文献:

[1] 陈有民. 园林树木学[M]. 北京:中国林业出版社,1988.
[2] 高昌勇. 不同牡丹外植体诱导愈伤组织的研究[J]. 安徽农业科学,2007,35(34):11036,11111.
GAO C Y. Research of induction callus with different Peony explants[J]. Journal of Anhui Agriculture. Sci. 2007,35(34): 11036, 11111.
[3] 郎玉涛,罗晓芳. 牡丹愈伤组织的诱导及愈伤褐化抑制的研究[J]. 河南林业科技,2007,27(1):4-6,29.
LANG Y T, LUO X F. The research on callus inducing and browning prevention of peony[J]. Journal of Henan Forestry Science and Technology, 2007,27(1):4-6,29.
[4] 陈怡平,丁兰,赵敏桂. 用紫斑牡丹不同外植体诱导愈伤组织研究[J]. 西北师范大学学报:自然科学版,2001,37(3):66-69.
CHEN Y P, DING L,ZHAO M G. The study of inducing callus with different organs of *Paeonia rockii* T. Hong et J. J. Li [J]. Journal of Northwest Normal University: Natural Science Edition,2001,37(3):66-69.
[5] 王军娥,巩振辉,李新凤. 牡丹愈伤组织诱导与分化技术的优化研究[J]. 西北农业学报,2008,17(5):282-286.
WANG J E,GONG Z H, LI X F. Optimization on techniques of callus induction and differentiation of *Paeonia suffruticosa* [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2008,17 (5):282-286.