

‘凤丹’牡丹组织培养研究

唐豆豆<sup>1</sup>,李厚华<sup>1\*</sup>,张延龙<sup>1</sup>,马凯恒<sup>2</sup>,包努恩·都特<sup>1</sup>,李 果<sup>1</sup>

(1.西北农林科技大学 风景园林艺术学院,陕西 杨陵 712100;2.西北农林科技大学 林学院,陕西 杨陵 712100)

**摘 要:**以‘凤丹’牡丹芽为材料,对其外植体消毒、褐化防治、组培苗扩繁和生根技术进行研究。结果表明:用75%酒精消毒30 s,0.1%升汞消毒8 min消毒效果最佳,外植体的污染率和成活率分别为32.31%和64.32%;其最适初代诱导和继代增殖培养基为MS+6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>和MS+6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>+PIC(毒莠定,Picloram) 1.0 mg·L<sup>-1</sup>,增殖系数为4.84;生根培养基为1/2MS+CaCl<sub>2</sub> 220 mg·L<sup>-1</sup>+IBA 3.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>,生根率为74.30%;低温结合3 mg·L<sup>-1</sup>硝酸银培养可使褐化率降至29.15%。

**关键词:**‘凤丹’牡丹;组织培养;扩繁;生根

中图分类号:S685.11      文献标志码:A      文章编号:1001-7461(2016)02-0160-07

Studies on Tissue Culture of *Paeonia ostii* ‘Feng Dan’

TANG Dou-dou<sup>1</sup>,LI Hou-hua<sup>1\*</sup>,ZHANG Yan-long<sup>1</sup>,MA Kai-heng<sup>2</sup>,BAO Nuendute<sup>1</sup>,LI Guo<sup>1</sup>

(1. College of Landscape Architecture and Arts, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Buds of *Paeonia ostii* ‘Feng Dan’ were used as explants to study its culture techniques, such as disinfection, anti-browning, proliferation and rooting. Best disinfection result could be achieved by 75% ethanol for 30 s and 0.1% HgCl<sub>2</sub> for 8 min. Under this treatment, the contamination rate reduced to 32.31% and the survival rate reached 64.32%. The most appropriate medium for explants inducing was the medium of MS+6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>, and the most suitable medium for propagation was MS+6-BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>+PIC (Picloram) 1.0 mg·L<sup>-1</sup>. The best rooting medium was 1/2MS+CaCl<sub>2</sub> (220 mg·L<sup>-1</sup>)+IBA 3.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>, on which the rooting rate reached 74.30%. Browning rate could be controlled to 29.15% under the cultivation combined chilling with 3 mg·L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>.

**Key words:** *Paeonia ostii* ‘Feng Dan’; tissue culture; proliferation; rooting

牡丹(*Paeonia suffruticosa*)属芍药科芍药属灌木,是原产中国的传统花卉<sup>[1]</sup>。‘凤丹’牡丹(*Paeonia ostii* ‘Feng Dan’)为牡丹野生种杨山牡丹的栽培品种。‘凤丹’牡丹不仅具有很好的观赏与药用作用,还有较高的油用价值。有研究表明,‘凤丹’牡丹籽油中含有丰富的不饱和脂肪酸,亚麻酸、亚油酸和油酸,具有抗肿瘤、抗炎、改善心血管和调节免疫等医疗保健等功能<sup>[2-3]</sup>。‘凤丹’牡丹传统的繁殖

方式有播种、嫁接和分株,但播种繁殖实生苗易发生性状分离,变异大,不易于保持亲本优良性状,嫁接和分株繁殖的繁殖率较低,影响了‘凤丹’苗木商品化生产和育种工作的进行<sup>[4]</sup>。组织培养是解决上述问题的主要途径<sup>[4]</sup>。种胚是目前‘凤丹’牡丹组培常用的试验材料,但是它存在二次休眠和生理后熟现象,前期处理耗时较长(30 d左右),组培过程繁琐<sup>[5-7]</sup>。朱向涛<sup>[8]</sup>等以‘凤丹’种胚为外植体,成功从

收稿日期:2015-04-22 修回日期:2015-05-18

基金项目:林业公益性行业科研重大专项(201404701);高等学校博士学科点专项科研基金(20120204120006)。

作者简介:唐豆豆,女,在读硕士,研究方向:园林植物分子生物学。E-mail:1747662070@qq.com

\*通信作者:李厚华,男,副教授,研究方向:植物分子生物学。E-mail:lihhouhua73@163.com

愈伤组织中诱导出体细胞胚;殷丽青<sup>[9]</sup>等对‘凤丹’种胚进行了愈伤诱导,但再生植株转化率较低,影响了‘凤丹’牡丹快繁研究。本试验尝试以‘凤丹’芽为试验材料,进行了消毒、诱导、增殖和生根的方法的探究,并对防褐化方法进行了优化。以期有效提高‘凤丹’牡丹组培苗的扩繁系数,获得生根苗,推动‘凤丹’牡丹快繁体系的建立,为油用牡丹规模化种苗繁育提供更好的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

于 2014 年采集‘凤丹’牡丹健壮、无病的饱满芽(鳞芽和根蘖芽),采集地点为西北农林科技大学牡

丹种质资源圃。

### 1.2 外植体选择和消毒处理

清洗:取‘凤丹’牡丹鳞芽和根蘖芽,用毛笔蘸洗衣粉水刷洗外植体表面灰尘,流水冲洗 2~4 h<sup>[10]</sup>。

消毒:全部材料用 75%酒精消毒 30 s,分别用 0.1%升汞消毒 6、8 min 和 10 min,无菌水冲洗 3~5 次,其中 1/2 鳞芽要剥弃全部鳞片(表 1)。共 9 个组合,每组 20 个外植体,重复 3 次。

7 d 后统计污染率、成活率和褐化率,其中污染率=(污染的外植体数/接种外植体的总数)×100%,存活率=存活的外植体数/接种外植体的总数)×100%,褐化率=褐化的外植体数/成活外植体的总数)×100%。

表 1 9 种不同消毒处理

Table 1 Nine kinds of dis-infection treatment									
处理组	1	2	3	4	5	6	7	8	9
芽种类	根蘖芽	根蘖芽	根蘖芽	鳞芽	鳞芽	鳞芽	鳞芽	鳞芽	鳞芽
75%酒精消毒时间/ s	30	30	30	30	30	30	30	30	30
0.1%升汞消毒时间/ min	6	8	10	6	8	10	6	8	10
鳞片	无鳞片	无鳞片	无鳞片	不剥鳞片	不剥鳞片	不剥鳞片	剥弃鳞片	剥弃鳞片	剥弃鳞片

### 1.3 褐化防治

1.3.1 硝酸银及活性炭对‘凤丹’牡丹外植体褐化的影响 将处理组 8 消毒后的外植体接种到分别添加了 2、3、4 mg·L<sup>-1</sup> 硝酸银、1、2、3 g·L<sup>-1</sup> 活性炭的 MS 基本培养基(不添加任何激素)上,以不添加任何防褐剂的处理作对照。共 7 个组合,每个组合 30~50 个外植体,重复 3 次。分别在培养后的 1、2、3、4、7、10、15 d 后统计每个处理的褐化情况,包括褐化级别和褐化率,褐化级别根据褐色深浅划分,0、1、2、3、4 分别表示无、浅红、红、深红、黑<sup>[11]</sup>,其中褐

化率=(褐化的外植体数/成活外植体的总数)×100%。

#### 1.3.2 培养条件对‘凤丹’牡丹外植体褐化的影响

将按处理组 8 消毒后的外植体接种后接种到添加 3 mg·L<sup>-1</sup> 硝酸银的 MS 基本培养基上,分别放置在 6 种环境中培养(表 2)。共 6 个组合,每个组合 30~50 个外植体,重复 3 次。分别统计 3 d、7~10 d 后的褐化级别、褐化率和外植体生长状况,其中褐化级别划分和褐化率计算同上。

表 2 6 种不同培养环境

Table 2 Six kinds of culturing environment						
处理组	1	2	3	4	5	6
温度/℃	25±1	25±1	25±1	4±1	4±1	4±1
光照/lx	暗培养	1 500~2 000	2 500~3 000	暗培养	1 500~2 000	2 500~3 000

### 1.4 初代诱导培养

将消毒处理后的‘凤丹’鳞芽进行初代诱导培养的研究,探讨不同浓度 6-BA(浓度 0.5、1.0、1.5 mg·L<sup>-1</sup>)和 NAA(0.1、0.2 mg·L<sup>-1</sup>)组合对初代诱导培养的影响,共 6 个组合,每个组合接种 30 个鳞芽。观察并统计‘凤丹’鳞芽开始萌动时间和诱导率,其中诱导率=(诱导分化的外植体数/成活外植体的总数)×100%

### 1.5 继代增殖培养

‘凤丹’鳞芽诱导培养 30 d 后,切取组培苗上生长情况相似的粗壮腋芽到以下继代培养基上增殖培

养,继代培养基为:1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA+(0.0 mg·L<sup>-1</sup>、0.5 mg·L<sup>-1</sup>、1.0 mg·L<sup>-1</sup>、1.5 mg·L<sup>-1</sup>) PIC(过滤灭菌后添加到继代培养基中)。共 4 个组合。每个组合接种 20 个腋芽。30 d 后分别统计增殖系数和芽生长质量。增殖系数=新增殖的芽数/接种芽的总数。

### 1.6 生根培养

取株高 2 cm 左右的增殖芽在 MS 基本培养基壮苗培养 25~20 d 后,再置于不同的生根培养基 1/2 MS+CaCl<sub>2</sub>(220 mg·L<sup>-1</sup>)+(1.0 mg·L<sup>-1</sup>、2.0 mg·L<sup>-1</sup>、3.0 mg·L<sup>-1</sup>、4.0 mg·L<sup>-1</sup>) IBA+(0.0

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )NAA 上培养,共 12 个组合,每个组合 20 个芽<sup>[12]</sup>。培养 15、20、35 d 后分别统计生根率和平均根数,生根率=生根的组培苗数/接种组培苗的总数)×100%,平均根数=根总数/生根的组培苗数。

## 2 结果与分析

### 2.1 3 种消毒方法及外植体材料选择对无菌体系建立的影响

通过 3 种消毒方法处理(表 3)可知,0.1% 升汞消毒根蘖芽和鳞芽 8 min 消毒效果最佳,虽然用 0.1% 升汞消毒 10 min 污染率降低,但‘凤丹’外植体成活率均较低。在用 0.1% 升汞消毒 8 min 后,剥弃鳞片的鳞芽污染率(32.31%)较根蘖芽(62.33%)和未剥鳞片的鳞芽(47.53%)低,同时其成活率(64.32%)较根蘖芽(35.18%)和未剥鳞片芽(37.91%)高,较适合做‘凤丹’牡丹外植体材料。这可能因为根蘖芽从土里长出,自身带有较多细菌和真菌,消毒困难。未剥鳞片的鳞芽与剥弃鳞片的鳞芽在污染率上虽相差不大,但成活率上差异极显著,这可能与包裹的数层鳞片影响芽原基生长有关。

### 2.2 不同防褐剂和培养条件对‘凤丹’外植体褐化的影响

2.2.1 6 种不同浓度防褐剂对‘凤丹’外植体褐化的影响 由表 4 可知,3 mg·L<sup>-1</sup> 的硝酸银和 3 g·L<sup>-1</sup> 活性炭控制外植体褐化效果最好,且外植体生长正常,培养 10 d 后,褐化率分别为 42.69%、37.79%,均远远低于对照组褐化率(80.34%)(图 1-D)。但 3 g·L<sup>-1</sup> 活性炭处理下的外植体生长较慢,这可能是因为活性炭吸收了培养基中营养物质,

影响了外植体正常生长。每个处理组的外植体褐化率和褐化级别有差异,但褐化主要集中在培养的7~10 d 中,之后褐化率和褐化级别均变化不大。这与李萍<sup>[11]</sup>等研究发现褐化集中发生在转接后 4 d 内有区别,这可能与试验材料有关。

表 3 不同消毒处理对植体污染率和成活率的影响

Table 3 Effects of different disinfection treatment on the contamination rate and the survival rate %

处理组	污染率	成活率	褐化率
1	80.56±1.50a	18.21±1.22f	84.45±1.34cd
2	62.33±2.02cd	35.18±2.90cd	83.80±2.09cd
3	55.45±1.12de	28.21±1.32e	90.89±1.56a
4	72.21±1.04bc	22.63±2.39f	80.45±2.44e
5	47.53±1.15e	37.91±1.61c	86.43±1.58bc
6	38.21±2.00f	33.47±1.47de	89.09±3.01a
7	68.23±2.67bc	29.45±2.54e	76.38±2.79f
8	32.31±1.36fg	64.32±2.10a	83.89±1.31cd
9	25.13±2.50g	45.12±3.56b	87.45±2.05b

注:每列数据后不同小写字母分别表示在  $p<0.05$  水平上差异显著。下同。

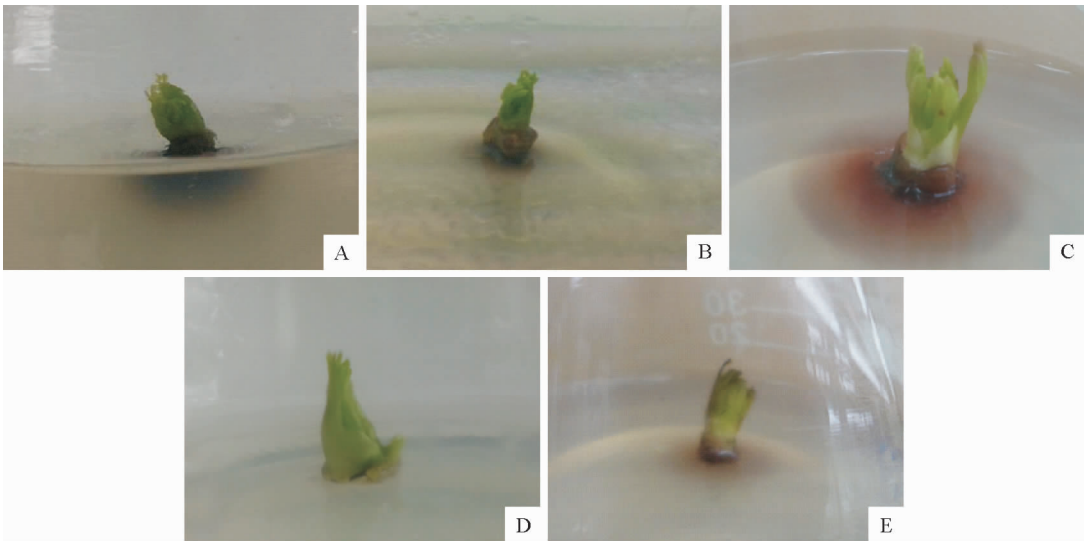
2.2.2 6 种不同培养条件对‘凤丹’外植体褐化的影响 将在 MS 基本培养基(添加 3 mg·L<sup>-1</sup> 硝酸银)上培养的外植体,分别置于 6 种不同环境培养中培养(表 5)。6 种培养环境下的‘凤丹’外植体褐化情况表明,温度为(4±1)℃,暗培养 10 d(处理 4)下的‘凤丹’外植体褐化率最低,为 25.24%;温度为(4±1)℃,光照度为 1 500~2 000 lx(处理 5)时‘凤丹’褐化率次之,为 29.15%。处理 4 下的外植体生长质量较差,出现小叶失绿和叶片卷曲的情况。当温度为(25±1)℃,光照 2 500~3 000 lx(处理 3)时‘凤丹’褐化率最高,为 53.30%。低温培养后的褐化率和褐化级别明显低于正常组培温度后褐化率和

表 4 硝酸银和活性炭对‘凤丹’外植体褐化发生的作用

Table 4 Effects of silver nitrate and activated charcoal on the anti-browning of *P. ostii* ‘Feng Dan’

		褐化级别/褐化率							生长状况
		1 d	2 d	3 d	4 d	7 d	10 d	15 d	
对照组	0	1.60/ 19.38±0.34a	2.31/ 27.16±0.27a	2.72/ 33.74±1.04a	3.14/ 45.78±0.69a	3.60/ 76.34±0.11a	3.65/ 80.34±0.51a	3.65/ 80.68±0.34a	正常生长
		1.07/ 15.31±0.31b	1.31/ 24.79±0.43b	1.72/ 29.01±0.37bc	2.21/ 40.56±0.73b	3.00/ 50.35±0.68c	3.20/ 62.79±1.03c	3.20/ 63.34±1.12c	
		0.85/ 11.45±1.05d	1.03/ 16.08±0.98d	1.35/ 20.91±0.58de	1.50/ 33.78±1.02c	1.82/ 41.16±0.48d	1.85/ 42.69±0.39d	1.85/ 43.11±1.45d	
		0.93/ 9.84±0.37e	1.16/ 15.30±0.96de	1.42/ 21.56±1.04d	1.62/ 31.31±0.47d	2.05/ 40.46±0.28de	2.05/ 41.36±1.47de	2.05/ 41.78±1.31de	
硝酸银 /(mg·L <sup>-1</sup> )	2	0.72/ 14.79±1.03bc	0.82/ 20.18±0.82bc	1.05/ 32.67±1.05b	1.41/ 38.21±0.74b	2.07/ 68.45±1.10b	2.16/ 72.78±0.73b	2.16/ 73.31±1.02b	正常生长
		0.68/ 10.68±0.49de	0.75/ 16.46±1.10d	0.96/ 20.58±0.72de	1.31/ 26.02±0.38de	1.84/ 37.80±1.13de	1.84/ 44.98±0.64d	1.84/ 45.67±1.56d	
		0.54/ 8.03±0.55e	0.60/ 12.60±0.79e	0.74/ 21.52±1.21d	0.96/ 27.80±0.62de	1.58/ 32.49±1.07e	1.58/ 37.79±0.65e	1.58/ 38.55±2.07e	
活性炭 /(g·L <sup>-1</sup> )	1								正常生长
	2								生长较慢
	3								生长较慢

注:褐化等级 0、1、2、3、4 分别表示褐色深浅:无、浅红、红、深红、黑。



注:A、B:‘凤丹’鳞芽在未添加任何防褐剂培养基上培养 7~10 d 后;C、D、E:分别表示‘凤丹’鳞芽在添加硝酸银 2 mg · L<sup>-1</sup>(C)、3 mg · L<sup>-1</sup>(D)、4 mg · L<sup>-1</sup>(E)培养基上培养 7~10 d 后。

图 1 硝酸银对‘凤丹’褐化的防治

Fig. 1 Effects of silver nitrate on the anti-browning of *P. ostii* ‘Feng Dan’

表 5 不同培养环境对‘凤丹’外植体褐化发生作用

Table 5 Effects of different cultured environments on the anti-browning of *P. ostii* ‘Feng Dan’

处理	褐化级别和褐化率				生长状况
	3 d		7~10 d		
1	1.27	16.48±0.23cd	1.61	39.93±1.86bc	小叶失绿
2	1.30	20.91±1.04b	1.75	44.86±1.51b	小叶正常
3	1.89	30.82±1.31a	2.87	53.30±1.12a	小叶发黄、部分有枯叶
4	0.48	10.31±0.69e	1.26	25.24±2.45e	部分小叶卷曲失绿
5	0.48	14.57±0.63de	1.48	29.15±1.46e	小叶正常
6	0.51	16.68±1.03c	1.66	32.46±1.61cd	部分小叶发黄

注:褐化等级 0、1、2、3、4 分别表示褐色深浅:无、浅红、红、深红、黑。  
褐化级别,推测可能是低温抑制了外植体内酚类化合物的合成途径,同时影响相关氧化酶的活性,从而减轻褐化。强光照培养环境下的外植体褐化情况较严重,这可能是光照强度的增加提高了多酚氧化酶的活性的结果<sup>[13]</sup>。

2.3 6 种不同激素组合对‘凤丹’外植体鳞芽初代诱导培养的影响

6 种不同质量浓度 6-BA 和 NAA 配对外植体芽诱导率有显著差异。由表 6 可知,4 号培养基(MS+6-BA 1.0 mg · L<sup>-1</sup>+NAA 0.2 mg · L<sup>-1</sup>)下鳞芽初代诱导率最高,为 82.32%。在此培养基下,‘凤丹’鳞芽 7 d 左右就开始萌动(图 2-A);15 d 后叶片逐渐展开,基部出现 1~2 个不定芽(图 2-B);20 d 后部分芽节间部位长出 3~4 个腋芽(图 2-C);30 d 左右叶片完全展开(图 2-D)。  
‘凤丹’鳞芽在 3、5、6 号培养基上生长速度也较快,但出现了茎叶泛红和叶片发黄的现象。

2.4 4 种不同浓度 PIC 对‘凤丹’牡丹继代增殖的影响

试验结果表明(表 7),不同质量浓度 PIC 与‘凤

丹’牡丹增殖存在极显著差异。  
‘凤丹’牡丹在 3 号培养基上的继代增殖效果最好,增值系数为 4.84。在该培养基上,70%芽无愈伤形成过程,15 d 后直接从基部形成丛生芽(图 3-A,图 3-B)。15%芽在培养 7 d 后,先在其基部形成颗粒状愈伤组织,20 d 从愈伤组织表面分化出不定芽;在 2 号、4 号培养基上,芽基部多形成大量颗粒状、结构松散的愈伤组织,培养 20 d 后,只有少部分愈伤组织会分化出 1~2 个细弱不定芽(图 3-C)。综合增殖系数和芽质量的考虑,MS+6-BA 1.0 mg · L<sup>-1</sup>+NAA 0.2 mg · L<sup>-1</sup>+PIC 1.0 mg · L<sup>-1</sup>较适合‘凤丹’牡丹的增殖培养。

2.5 12 种不同质量浓度 IBA 和 NAA 对‘凤丹’牡丹组培苗生根影响

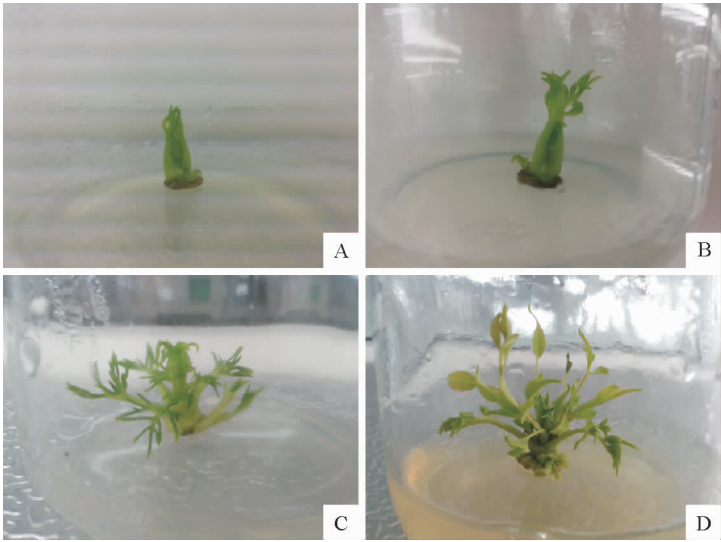
由表 8 可知,在生根试验中,不同质量浓度的 IBA 和 NAA 组合对‘凤丹’苗生根率的影响存在显著差异。当 NAA 浓度一定时,随着 IBA 浓度提高,生根率和平均生根数会先增大,当 IBA 浓度为 3 mg · L<sup>-1</sup>时,其值最大;当 IBA 浓度超过 3 mg · L<sup>-1</sup>时,生根率和平均根数均降低。IBA 结合 NAA 的

生根效果比单独使用 IBA 生根效果要好,其中在 1/2MS+CaCl<sub>2</sub>(220 mg·L<sup>-1</sup>)+IBA 3.0 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 培养条件下的‘凤丹’组培苗生根率(74.30%)和平均生根数(4.37 条)都较高。另外,‘凤丹’苗在该培养基中培养 15 d 后,其基部切口处出现白色凸起,并逐渐变大,20 d 后凸起明显,形成 3~4 个不定根,且发根部位逐渐上移,35 d 后不定根变长变粗(图 4)。

表 6 不同质量浓度 6-BA 和 NAA 对芽诱导的影响

Table 6 Effect of different concentrations 6-BA and NAA on the induction of buds

处理	6-BA /(mg·L <sup>-1</sup> )	NAA /(mg·L <sup>-1</sup> )	芽起始 萌动时间/d	诱导率/%	外植体 生长状况
1	0.5	0.1	15±0.44a	46.28±2.31ef	生长较慢,茎叶鲜绿,叶片正常
2	0.5	0.2	14±0.62a	53.81± 1.78e	生长较慢,茎叶鲜绿,叶片卷曲
3	1.0	0.1	10±0.56b	77.73±2.57bc	生长较快,茎叶泛红,叶片正常
4	1.0	0.2	7± 0.28c	82.32±3.89a	生长较快,茎叶鲜绿,叶片正常
5	1.5	0.1	7±1.20c	78.45±2.08b	生长较快,茎叶泛红,叶片正常
6	1.5	0.2	8±0.84bc	63.56±2.57d	生长较快,茎叶鲜绿,叶片变黄



注:‘凤丹’芽在最佳初代诱导培养基上培养情况,分别为培养 7 d(A)、15 d(B)、20 d(C)、30 d(D)后。

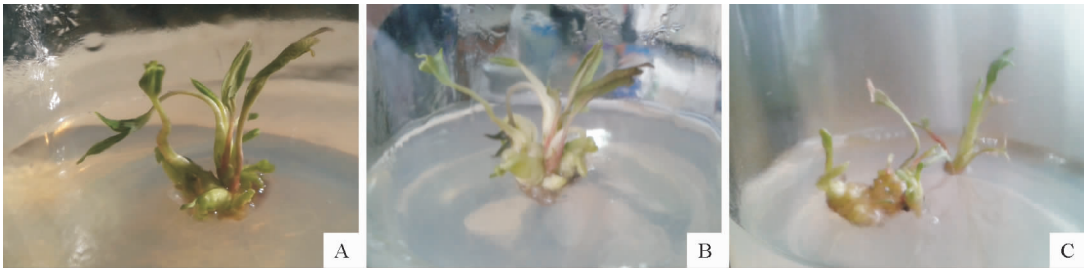
图 2 ‘凤丹’牡丹鳞芽初代诱导过程

Fig. 2 Inducing process of buds of *P. ostii* ‘Feng Dan’

表 7 不同质量浓度 PIC 对‘凤丹’牡丹的增殖作用

Table 7 Effect of different concentrations of PIC on multiplication of *P. ostii* ‘Feng Dan’

序号	6-BA /(mg·L <sup>-1</sup> )	NAA /(mg·L <sup>-1</sup> )	PIC /(mg·L <sup>-1</sup> )	接种芽数 /个	增殖系数	增殖芽 生长状况
1	1.0	0.2	0	20	1.45±0.14cd	黄绿色,弱
2	1.0	0.2	0.5	20	2.89±0.30c	绿色,较弱
3	1.0	0.2	1.0	20	4.84±0.68a	绿色,粗壮
4	1.0	0.2	1.5	20	3.76±0.12b	黄绿色,较弱



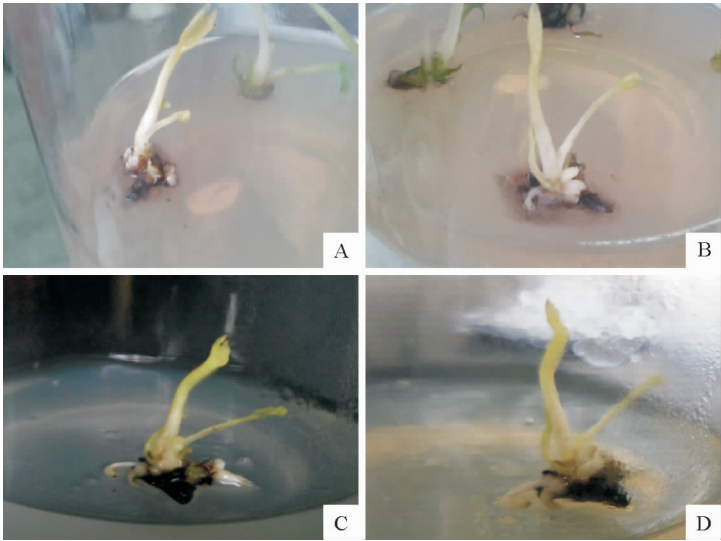
注:A 和 B:‘凤丹’牡丹继代培养 15 d(A)和 25 d(B)后的丛生芽;C:‘凤丹’牡丹继代培养 20 d 后时从愈伤组织分化的不定芽。

图 3 ‘凤丹’牡丹继代增殖过程

Fig. 3 Propagation process of *P. ostii* ‘Feng Dan’

表 8 不同质量浓度 IBA 和 NAA 对‘凤丹’苗生根的影响

Table 8 Effect of different concentrations of IBA and NAA on rooting of <i>P. ostii</i> ‘Feng Dan’					
	IBA /(mg · L <sup>-1</sup> )	NAA /(mg · L <sup>-1</sup> )	生根率/%	平均根数/条	生根质量
1	1.0	0	13.34±0.57g	0.56±0.03ef	白色,细弱
2	1.0	0.5	18.78±0.71f	1.72±0.12de	白色,细弱
3	1.0	1.0	15.35±1.03fg	1.42±0.05e	白色,细弱
4	2.0	0	22.56±0.14ef	1.37±0.13e	白色,细弱
5	2.0	0.5	35.62±0.70cd	2.81±0.26bc	白色,细弱
6	2.0	1.0	26.18±0.56e	1.67±0.14de	白色,细弱
7	3.0	0	50.31±0.22b	2.40±0.26c	白色,粗
8	3.0	0.5	74.30±0.61a	4.37±0.20a	白色,粗
9	3.0	1.0	59.28±0.35ab	2.83±0.14bc	白色,粗,基部形成少量愈伤
10	4.0	0	31.72±0.24cd	1.73±0.09d	白色,粗,基部形成少量愈伤
11	4.0	0.5	42.35±1.17bc	3.15±0.23b	白色,细弱,基部形成大量愈伤
12	4.0	1.0	37.14±0.58c	1.79±0.15d	白色,细弱,基部形成大量愈伤



注:‘凤丹’苗在最适生根培养基上培养 15 d(A),20 d(B),35 d(C 和 D)。

图 4 ‘凤丹’牡丹苗生根过程

Fig. 4 Rooting process of *P. ostii* ‘Feng Dan’

3 结论与讨论

植株生长调节激素是影响植株扩繁再生的主要因素,毒莠定(Picloram),化学名称为 4-氨基-3,5,6-三氯吡啶-2-酸,是一种除草剂,其作用机理类似 2,4-D<sup>[14]</sup>。本试验对‘凤丹’牡丹的增殖结果表明,在不同质量浓度的 PIC 处理下,‘凤丹’牡丹的增殖系数存在极显著差异。其中,1.0 mg · L<sup>-1</sup> PIC 处理下,‘凤丹’牡丹的增殖系数最高,为 4.84。殷丽青<sup>[9]</sup>等利用 PIC 对‘凤丹’种胚进行诱导,获得了大量的体细胞胚,但是后期的植株转化率不高,增殖系数较低。种胚培养技术可以克服胚败育和发育不良问题<sup>[15]</sup>,有利于新品种的培育,但种胚中存在性状分离现象,不利于保存母本材料的优良性状,而以芽为外植体材料,遗传变异少,能够继承母本优良特性。因此以‘凤丹’牡丹芽为外植体建立组织培养体

系,可以为其产业化和商品化生产提供良好的试验材料。

组培苗生根难、生根率低是一直以来制约牡丹组培技术发展的重要原因之一<sup>[16]</sup>。本试验用不同质量浓度 IBA 对‘凤丹’牡丹苗的生根进行了诱导。结果表明,当 IBA 浓度为 3 mg · L<sup>-1</sup> 时,生根率最高,为 74.30%,且植株生长良好。张改娜<sup>[17]</sup>等以‘凤丹’种胚为材料诱导生根时,生根率为 60.00%,但培养后期会出现芽干枯现象。分析认为,‘凤丹’芽诱导的不定根是直接从苗基部形成,与木质部相连,具有正常根的输送功能,所以植株生长较好。另外,本研究在生根过程中还发现,部分‘凤丹’组培苗会出现茎伸长生长极快,基部分化出 1~2 个芽,但生根率极低的情况。针对这样情况,采用从植株顶部切去 2~4 cm 茎段,并将基部芽去掉的方法能明显提高生根率。



褐化是植物材料受伤后,植株释放的酚类物质被氧化成褐色的醌类物质的结果<sup>[13]</sup>。褐化是牡丹组培快繁中普遍存在现象,它会对外植体的生长和分化产生严重影响<sup>[18]</sup>。本试验对温度、光照和防褐化试剂 3 种因素做了综合研究,试验发现,在含有 3 mg · L<sup>-1</sup> 的硝酸银,且温度为 (4 ± 1)℃、光照度为 1 500~2 000 lx 的培养条件下,‘凤丹’芽褐化率最低,为 29.15%,且外植体正常生长。

本试验以‘凤丹’芽为外植体材料,通过 PIC、IBA 等植株生长调节激素使用,使其增值系数达到 4.84,生根率提高为 74.30%。并通过低温结合硝酸银的处理,有效解决了外植体褐化问题。优化了‘凤丹’牡丹快繁体系,为油用牡丹的生产理论和实践提供更多的参考。

参考文献:

[1] 成仿云. 中国紫斑牡丹[M]. 北京:中国林业出版社,2005.

[2] 韩雪源,张延龙,牛立新,等. 不同产地‘凤丹’牡丹籽油主要脂肪酸成分分析[J]. 食品科学,2014,35(22):181-182.

HAN X Y,ZHANG Y L,NIU L X,*et al.* Fatty acid composition of ‘Fengdan’ peony seed oils from different growing regions[J]. Food Science,2014,35(22):181-182. (in Chinese)

[3] 陈慧玲,杨彦伶,张新叶,等. 油用牡丹研究进展[J]. 湖北林业科技,2013,42(5):42-44.

CHEN H L,YANG Y L,ZHANG X Y,*et al.* Research progress on *Paeonia suffruticosa* Andr. for oil[J]. Hubei Forestry Science and Technology,2013,42(5):42-44. (in Chinese)

[4] 曾端香,尹伟伦,赵孝庆,等. 牡丹繁殖技术[J]. 北京林业大学学报,2000,22(3):90-95.

ZENG D X,YIN W L,ZHAO X Q,*et al.* Propagation of Chinese tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) [J]. Journal of Beijing Forestry University,2000,22(3):90-95. (in Chinese)

[5] 景新明,郑光华,洪德元. 栽培牡丹的种子萌发和贮藏特性(简报)[J]. 植物生理学通讯,1995,31(4):268-270.

JING X M,ZHENG G H,HONG D Y. Characteristic of germination and storage of seed in cultural *Paeonia suffruticosa* [J]. Plant Physiology Communications,1995,31(4):268-270. (in Chinese)

[6] 成仿云,杜秀娟. 低温与赤霉素处理对‘凤丹’牡丹种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 园艺学报,2008,35(4):553-558.

CHENG F Y,DU X J. Effects of chilling and gibberellic acid on the seed germination and seedling growth in *Paeonia ostii* ‘Feng Dan’[J]. Acta Horticulturae Sinica,2008,35(4):553-558. (in Chinese)

[7] 杨红超,裴冬丽. 牡丹种子胚培养研究[J]. 广西农业科学,2006,37(2):108-110.

YANG H C,PEI D L. Study on embryo culture of peony (*Paeonia* L.) seed [J]. Guangxi Agricultural Sciences,2006,37

(2):108-110. (in Chinese)

[8] 朱向涛,王雁,彭镇华,等. 牡丹‘凤丹’体细胞胚发生技术[J]. 东北林业大学学报,2012,40(5):54-58.

ZHU X T,WANG Y,PENG Z H,*et al.* Somatic embryogenesis of *Paeonia suffruticosa* ‘Fengdan’[J]. Journal of Northeast Forestry University,2012,40(5):54-58. (in Chinese)

[9] 殷丽青,周音,胡永红,等. 毒莠定对牡丹愈伤诱导及体胚发生的影响[J]. 核农学报,2013,27(8):1106-1110.

YIN L Q,ZHOU Y,HU Y H,*et al.* Effect of picloram on *Paeonia* callus induction and somatic embryogenesis[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences,2013,27(8):1106-1110. (in Chinese)

[10] 郭军战,舒庆艳,王丽玲,等. 四倍体刺槐组织培养中的外植体选择和消毒研究[J]. 西北林学院学报,2002,17(1):15-18.

GUO J Z,SHU Q Y,WANG L L,*et al.* The selection and sterilization of explant of tetraploids of locust tree in tissue culture[J]. Journal of Northwest Forestry University,2002,17(1):15-18. (in Chinese)

[11] 李萍,成仿云,张颗星. 防褐剂对牡丹组培褐化发生、组培苗生长和增殖的作用[J]. 北京林业大学学报,2008,30(2):72-75.

LI P,CHENG F Y,ZHANG Y X. Effects of browning antagonists on antibrowning, growth and multiplication of issue culture of tree peony[J]. Journal of Beijing Forestry University,2008,30(2):72-75. (in Chinese)

[12] 刘粉莲,杨淑慎,宋西德,等. 火艳石楠组织培养快繁技术研究[J]. 西北林学院学报,2008,23(3):123-126.

LIU F L,YANG S S,SONG X D,*et al.* Studies on technique for rapid propagation of *Photinia fraseri* cv. *camelvy* [J]. Journal of Northwest Forestry University,2008,23(3):123-126. (in Chinese)

[13] 牛佳佳,吴静,贺丹,等. 牡丹离体培养中褐化问题的研究进展[J]. 中国农学通报,2009,25(11):34-37.

NIU J J,WU J,HE D,*et al.* The browning and prevention measures in plant tissue culture of paeony[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2009,25(11):34-37. (in Chinese)

[14] 史爱琴,于晓英,符红艳,等. 毒莠定在植物组织培养中的应用[J]. 湖南农业科学,2013(15):16-19.

SHI A Q,YU X Y,FU H Y,*et al.* Application of picloram in plant tissue culture[J]. Hunan Agricultural Sciences,2013(15):16-19. (in Chinese)

[15] 叶培忠. 植物繁殖上海[M]. 上海:科学技术出版社,1958.

[16] 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.

[17] 张改娜,张利娟,崔碧霄,等. ‘凤丹白’牡丹不定芽的诱导和生根研究[J]. 生物学通报,2012,47(4):46-48.

[18] 符真珠,陈静,徐盼盼,等. 牡丹组培褐变与总酚含量及相关酶活性的关系[J]. 西北林学院学报,2011,26(6):66-69.

FU Z Z,CHEN J,XU P P,*et al.* Relationship between tissue browning and contents of phenolics and related enzymes activity in *Paeonia suffruticosa*. [J]. Journal of Northwest Forestry University,2011,26(6):66-69. (in Chinese)