

# 牡丹组织培养技术研究综述

刘 磊, 王志勇

(信阳农林学院园艺系, 河南 信阳 464000)

**摘要:** 从外植体类型、培养条件、培养基种类、生根培养方法、组培苗移栽驯化几方面综述了牡丹组织培养技术的研究现状, 分析了目前牡丹组织培养中存在的问题, 提出了今后的发展方向。

**关键词:** 牡丹; 组织培养; 培养基

**中图分类号:** S685.110 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2014)04-0049-04

[doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2014.04.018](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1463.2014.04.018)

## Research Summary of Tissue Culture Techniques of Tree Peony

LIU Lei, WANG Zhi-yong

(Xinyang college of agriculture and forestry, xinyang Shanxi 464000)

**Abstract:** The advances of tree peony tissue culture was summarized, including types of explant, culture condition and basic medium, rooting culture, transplantation and so on. Main problems in tree peony tissue culture were analyzed, and the development direction in the future was discussed.

**Key words:** Tree peony; Tissue culture; Medium

牡丹(*Paonia suffruticosa* Andr.)为毛茛科芍药属落叶小灌木, 原产中国, 它雍容华贵, 娇艳妩媚, 花形大而美, 被誉为“花中之王”。牡丹传统

的繁殖方法多采用播种、嫁接和分株方式, 不仅成苗周期长, 而且出苗量少, 质量参差不齐。组织培养在牡丹的快速繁殖方面具有无可比拟的优

收稿日期: 2014-11-01

作者简介: 刘 磊(1983—), 男, 河南安阳人, 助教, 硕士, 主要从事花卉栽培生理和生物技术研究工作。联系电话: (0)15290250842。E-mail: swuliulei@163.com

苏适宜种植区域大力推广应用。同时加大对集约化订单育苗、机械化作业的扶持力度, 解决移栽用苗问题; 并加快紫苏移栽机具研发, 提高机械化作业程度, 降低劳动生产强度, 提高生产效率。

4.2.4 加快推进产业化经营步伐 一是要从政策和资金上加大支持力度, 引导和扶持紫苏加工龙头企业。发展订单种植, 扩大生产基地。二是积极组建紫苏农民专业合作经济组织, 提高紫苏生产的组织化程度和生产效益。同时, 加大紫苏籽、紫苏油、紫苏叶深加工的研发力度, 开发附加值高的香料、化妆品、保健品等系列产品, 促进紫苏产业的精深发展。

### 参考文献:

- [1] 陈 欢, 陈 光, 李海燕. 油料作物油脂合成基因工程研究现状[J]. 吉林农业大学学报, 2012, 34(2): 198-203.
- [2] 高桂珍, 伍晓明, 陆光远, 等. 几种油料作物种子中类胡萝卜素含量的分析 [J]. 中国油料作物学报, 2008, 30(3): 312-315.
- [3] 杨冬赓. 我国油菜产业形势日趋严峻[J]. 中国农业信

息, 2010(8): 3.

- [4] 杨红旗, 徐艳华. 我国油菜生产现状与发展[J]. 种子世界, 2010(7): 1-2.
- [5] 刘爱民, 于 格, 于萧萌. 大豆主产区主要竞争农作物生产成本与收益分析[J]. 中国农业资源与区划, 2005, 26(2): 35-39.
- [6] 徐世平. 基于投入产出的甘肃农业发展分析[J]. 中国农业资源与区划, 2012, 33(5): 54-58.
- [7] 姜成英, 戚登臣, 苏 瑾, 等. 甘肃省油橄榄生产现状与发展对策[J]. 经济林研究, 2006, 24(2): 78-81.
- [8] 尹 东. 基于GIS的甘肃省陇南油橄榄气候适宜性区划 [C]// 中国地理学会. 地理学与生态文明建设——中国地理学会2008年学术年会论文摘要集. 出版地不详: 出版社不详, 2008: 275.
- [9] 王志禄, 金 朴, 李正和, 等. 陇南引种油橄榄适生区气候分析与区划[J]. 陕西气象, 1999(3): 16-20.
- [10] 胥国斌, 简毓峰, 周天林, 等. 紫苏——资源栽培及加工[M]. 杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2012: 5-6.
- [11] 杨 宏, 周明灿. 油橄榄北移试栽成功[J]. 甘肃农业科技, 1980(1): 34-35.

(本文责编: 陈 珩)

势<sup>[1-2]</sup>，通过组织培养技术解决牡丹常规繁殖中存在的不足，是牡丹商品化、产业化发展的必然趋势，也是加快牡丹育种和繁殖步伐的重要途径。

## 1 研究进展

### 1.1 外植体类型

1.1.1 胚 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，既可以用来克服胚败育和发育不良，也可以缩短种子休眠期，促进萌发，提高萌发率。在自然界中，牡丹种子的休眠期长达数年，采用胚培养时可缩短至28~42 d。

培养基对离体胚的生长有着重要影响。周仁超等以‘紫斑牡丹’为材料进行胚培养，结果种胚在1/2MS+BA 1.0 mg/L+IAA 1.0 mg/L的培养基上可较快生长并分化出不定芽；不定芽在1/2MS+BA 1.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L的培养基上可快速繁殖，平均增殖倍数达6.5<sup>[3]</sup>。杨红超在牡丹种胚培养时发现，在培养基中添加胚乳的水提液对胚根和子叶生长有一定的抑制作用<sup>[4]</sup>。安佰义以胚为材料考察了不同培养基对丛生芽诱导的影响，结果WPM培养基丛生芽诱导率最高，为36.66%，较MS培养基的丛生芽诱导率提高6.66个百分点；B5培养基丛生芽诱导率最低，为20.00%；MS培养基诱导出芽的总数最多，芽高、叶色正常，但平均丛生芽数较少；WPM培养基诱导出芽的总数少，芽矮，但平均丛生芽数较多；B5培养基诱导出芽的芽不仅总数、平均丛生芽数少，而且生长异常。另外，胚的不同发育时期对其培养结果有显著的影响<sup>[5]</sup>。Brukhin V B和Batygina T B研究发现，只有选择球状胚阶段后的胚状体培养，才能增加繁殖能力，取自成熟种子的胚，在无激素MS和1/2MS培养基上培养均能形成正常小植株；而早期鱼雷形胚和心形胚在培养后只有25%能形成小植株；在愈伤组织诱导培养基中培养21 d后，心形胚、鱼雷形胚、成熟种胚的愈伤诱导率分别为60%、80%、100%<sup>[6]</sup>。

1.1.2 花药和花粉 牡丹花药、花粉的培养条件为花药处于有丝分裂的第一阶段，基本培养基中不加任何生长调节物质，培养温度为25~30℃，从花药中诱导出胚状体需120~160 d，而且胚状体的生长速度很慢<sup>[7]</sup>。Shoyama Y等成功地进行了*P. suffruticosa*和*P. lutea Superba*两个品种的花药离体培养，所用培养基是LS+3%蔗糖+500 mg/LCH+1mg/Lkin+1 mg/L IAA，培养21d后可看到多细胞和多核花粉粒；培养42 d后，2%~3%的花粉粒形成了多细胞胚状体<sup>[8]</sup>。Roberts和Sunderland用不加碳和琼脂的MS培养基进行液体培养，接种花药密度为1~2个/mL获得成功<sup>[9]</sup>。

1.1.3 鳞芽 鳞芽培养被认为是牡丹组织培养中最有应用价值的途径之一，关于鳞芽组织培养的报道很多，但是鳞芽的整个再生体系尚未建立，关键原因在于鳞芽生根十分困难。张桂花等利用牡丹腋芽和顶芽进行组织培养，获得了没有生根的试管苗植株<sup>[10]</sup>。徐桂娟以‘凤丹’、‘海云紫’等品种为材料，以改良MS培养基作为基本培养基也成功地得到了再生植株<sup>[11]</sup>。2003年，李艳敏用‘青龙卧墨池’、‘银粉金鳞’、‘紫瑶台’3个牡丹品种的鳞芽进行组织培养，获得再生植株并移栽成功<sup>[12]</sup>。鳞芽的取材部位不同，诱导的难易程度也不同，在所有鳞芽中，以土芽的分化表现最好，分化率可达94%；腋芽次之，为71%；花芽最差，仅为16%<sup>[13]</sup>。陈笑蕾在诱导‘洛阳红’、‘胡红’、‘肉芙蓉’、‘鲁荷红’、‘乌龙捧盛’、‘朱砂垒’6个牡丹品种增殖时，发现不同品种间的增殖率存在显著差异，从大到小依次为‘乌龙捧盛’、‘鲁荷红’、‘胡红’、‘洛阳红’、‘朱砂垒’、‘肉芙蓉’<sup>[14]</sup>。

### 1.2 培养条件和培养基

1.2.1 培养条件 在牡丹组织培养过程中，温度、光照、湿度和pH等环境因子是组织培养中重要的影响因素。研究认为，牡丹组织培养的最佳温度为(25±1)℃，光照强度为1 500~2 000 Lx，光照时数为10~12 h/d，pH为5.8~6.0<sup>[5,15]</sup>。此外，在培养过程中应注意对昼夜温差的控制，昼夜无温差将导致干物质积累量、叶绿素含量减少、酶功能失调、蛋白质含量降低，从而导致玻璃化苗产生。通过变温处理，加大昼夜温差会使玻璃化现象消失<sup>[16]</sup>。在湿度控制方面，一般认为采用通透性较好的棉塞等封口材料有利于培养材料光合干物质积累，降低湿度，减少玻璃化苗的发生<sup>[17]</sup>。张桂花通过对牡丹品种‘金星雪浪’的研究发现，牡丹试管苗在20~22℃条件下叶片微绿，生长缓慢，个别出现玻璃化苗；在24~26℃条件下，叶片浓绿，苗健壮且生长速度较快；大于26℃，叶片黄化，苗弱，生长速度较慢甚至停止生长。光照时数低于8 h/d，试管苗表现正常，生长缓慢；光照时数为10 h/d时，试管苗长势壮、生长快、芽分化多；光照时数高于12 h/d时，试管苗生长势弱，个别出现玻璃化苗。光照强度为2 000 Lx时，试管苗生长表现最佳<sup>[10]</sup>。

1.2.2 培养基 在牡丹组织培养中，供试品种及其外植体类型不同，选用基本培养基则不同。在已报道的牡丹组织培养研究中，大多数学者将MS或1/2MS作为基本培养基<sup>[18-21]</sup>，但也有一些用WPM作基本培养基<sup>[5]</sup>。安佰义用经过40 d低温层积处理后的种胚作为外植体，分别接种于WPM、

MS、B5培养基,培养50 d后,不同培养基上丛生芽诱导率存在一定差异。WPM培养基中丛生芽诱导率最高,为36.66%,比MS培养基高6.66个百分点;B5培养基最低,为20.00%,比MS培养基低10.00个百分点<sup>[5]</sup>。何桂梅以自然授粉约90 d的‘紫斑牡丹’和‘杨山牡丹’近成熟胚作为外植体,接种于MS、1/2MS、1/2MS+Vc100 mg/L培养基中,发现3种培养基上种胚的生长表现相似,均呈增大的趋势,形成莲座状苗。MS培养基中少数种胚真叶浅绿色,1/2MS培养基添加Vc 100 mg/L后反而降低了种胚的抽真叶率及生根、成苗率,综合考虑种胚的各种生长指标,认为1/2MS培养基可作为牡丹近成熟胚的基本培养基<sup>[22]</sup>。

### 1.3 生根培养

组培苗的生根过程是一个复杂的生理生化过程,一般影响组培苗生根的因素有植物材料、培养基类型<sup>[23]</sup>、植物生长调节剂、糖和其它因子<sup>[24]</sup>。在牡丹无根苗生根培养阶段常使用的生长调节剂为IBA,根据IBA的使用方式不同,其生根方法分为一步生根法(在含有低浓度IBA培养基上连续培养)、速蘸法(将微插条基部在一定浓度IBA溶液中浸泡一定时间,然后将其转接到含有活性炭而不含植物生长调节剂的培养基中<sup>[1]</sup>)、两步生根法(先在根诱导培养基上进行短期诱导培养,然后转移至不含植物生长调节剂的培养基中让根系发育),先采用根诱导再进行根形成的两步连续生根法培养是最有效的生根方法<sup>[25]</sup>。试管苗瓶外生根技术是近几年研究成功的一项先进生根技术,该技术的关键是将试管苗生根和驯化结合起来,从而省去用来提供营养物质和支撑作用的培养基,简化组培程序,降低生产成本,提高繁殖系数,进而解决了组培工厂化育苗生根难的问题<sup>[26-27]</sup>。

### 1.4 组培苗的移栽驯化

牡丹移栽成活率低是限制组培快繁技术应用于生产及育种研究的关键因子之一。虽然幼苗生根质量高及生长健壮为移栽驯化成活奠定了良好的物质基础,但适宜的炼苗移栽方法、上盆时间、栽培基质、环境及移栽后的温湿调控与管理手段也是影响幼苗成活的重要技术环节。李玉龙在牡丹试管苗诱导出根1条,长到3~4 cm时进行炼苗,将瓶塞打开放在阳光充足处通风透光炼苗3~4 d后移栽,效果较好<sup>[28]</sup>。孔祥生认为以腐殖土做基质移栽幼苗比蛭石作基质移栽幼苗成活率高,且移栽苗生长健壮<sup>[29]</sup>。李志军等在保持20℃左右的温度条件下,通过蛭石+草炭土(1:1)和泥炭+珍珠岩(1:1)两种基质对生根苗移栽影响的研究表明,

两者对移栽成活率的影响差异不显著,但对幼苗后期生长速率有一定的影响,移栽30 d后,幼苗平均高分别为18.4、11.5 cm,因此认为蛭石+草炭土(1:1)基质更适宜幼苗生长<sup>[30]</sup>。

## 2 存在的问题

### 2.1 污染

组培苗培养过程中造成污染的因素很多,如工作环境、培养基及器皿消毒不彻底、外植体带菌、工作人员操作不规范等。造成污染的病原主要分为细菌和真菌两大类,细菌污染的特点是菌斑呈黏液状,且在接种1~3 d后即可被发现;真菌污染的特点是污染部分长有不同颜色的霉菌,在接种3~15 d后才出现症状<sup>[31]</sup>。常用的消毒剂有升汞、次氯酸钠、双氧水等<sup>[32]</sup>。

### 2.2 褐化

牡丹为木本植物,次生代谢旺盛,植物体内含有较多的酚类化合物,组织培养过程中外植体极易褐化,这些褐色物质在培养基中不断扩散,抑制其它酶的活性,毒害培养材料,严重影响组培苗的成活率、扩繁率。在牡丹组培中对褐化的控制不容忽视,最常用的方法是在培养基中添加防褐剂。好的防褐剂既能有效控制褐化现象的发生,又能促进繁殖材料的生长和增殖<sup>[33]</sup>。

### 2.3 玻璃化

所谓玻璃化,是指在离体培养中,组织茎芽逐渐变为半透明状畸形植株,这种植株难以移栽成活,严重制约着繁殖效率。在牡丹离体培养中,由于生长调节物质、光照、温度的不适宜,经常可以观察到玻璃化现象。

### 2.4 组培苗生根难度大

主要表现在生根率不高,一些品种难以获得生根苗;生根质量差,部分不定根由愈伤组织产生,使根与茎中间形成离层,缺乏疏导组织联系,且不定根易脱落,影响移栽成活<sup>[34]</sup>。因此,诱导带有高质量根系的试管苗是亟待解决的问题。

### 2.5 移栽成活率低

一是组培苗在移栽过程中容易断根,二是组培苗移栽阶段感病严重而加大死亡率。因此要不断提高不定根质量和组培苗适应环境的能力,提高移栽成活率,才能为实现牡丹商品化、产业化发展奠定基础。

## 3 今后的研究方向

随着组织培养技术的迅猛发展,离体快繁技术在继续发挥传统优势。针对牡丹组培生产中存在的问题,应不断加强牡丹品种组织培养的技术体系研究,研制出针对不同品种的高效、实用、标准组培快繁体系。同时利用现代生物技术进一

步拓宽研究领域,如利用转基因技术在分子水平上改良牡丹的特定性状,以提高其抗逆性<sup>[35]</sup>,扩大园林绿化的应用范围;改变花色<sup>[36]</sup>,延长盛花期<sup>[37-38]</sup>,筛选优良切花品种;矮化植株和缩短根长,实现牡丹由田间栽培到室内培养的转变。在牡丹药用品种研究方面,通过RNAi技术,调控其代谢途径,提高牡丹根皮中有效成分的含量。还应采用发根农杆菌诱导牡丹发状根,提高其生根率。

#### 参考文献:

- [1] 李航,王永伟,何松林.牡丹试管苗生根研究进展和展望[J].安徽农业科学,2007,35(12):3499-3513.
- [2] 赵鑫,詹立平,邹学忠.牡丹组织培养研究进展[J].核农学报,2007,21(2):156-159.
- [3] 周仁超,姚崇怀.紫斑牡丹胚培养与植株再生(简报)[J].亚热带植物科学,2001,30(3):62-65.
- [4] 杨红超,裴冬丽.牡丹种子胚培养研究[J].广西农业科学,2006,3(2):108-110.
- [5] 安佰义.牡丹组培离体再生系统的建立[D].哈尔滨:东北林业大学,2005.
- [6] BRUKHIN V B, BATYGINA T B. Embryo culture and somatic embryogenesis in culture of *Paeonia anomala*[J]. Phytomorphology, 1994, 44(3/4): 151-157.
- [7] SUNDERLAND N, DUNWELL J M, ROBERTM. Anther culture in the genus *Paeonia* [J]. John Innes Annu Rep, 1975, (66): 57-60.
- [8] YUKIHIRO SHOYAMA, YOICHI YAMADA, HISUO NISHIOKA, et al. Depigmentation and inhibition of cell growth of B-16 melanoma cells by compounds isolated from *Paeonia suffruticosa* Callus[J]. Plant Cell Reports, 1990, 8(12): 711-713.
- [9] ROBERTS M, SUNDERL N. Pollen Culture in *Paeonia* [J]. John Innes Annu Rep, 1977(68): 60-61.
- [10] 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.
- [11] 徐桂娟.牡丹组培快繁技术的研究[D].北京:北京林业大学,2002.
- [12] 李艳敏.几个牡丹品种组织培养技术的研究[D].北京:北京林业大学,2004.
- [13] 张龙勃.牡丹组织培养研究初报[J].河南城市林业,1989(10):21-23.
- [14] 陈笑蕾.牡丹组织培养的初步研究[D].郑州:河南农业大学,2005.
- [15] 张子学,丁为群,时惟静,等.凤丹组织培养研究[J].现代中药研究与实践,2004,18(1):18-21.
- [16] 李娅丽,张健,潘远智.观赏植物组织培养过程中玻璃化现象与解决措施进展[J].四川农业大学学报,2004(3):278-282.
- [17] 孟军,韩杰,祖恩普.牡丹组织培养研究进展[J].北方园艺,2007,12(1):153-154.
- [18] 陈正华.木本植物组织培养及其应用[M].北京:高等教育出版社,1986.
- [19] 颜敬昌.植物组织培养手册[M].上海:上海科学技术出版社,1990.
- [20] 曾瑞香.牡丹繁殖技术[J].北京林业大学学报,2000,22(3):90-95.
- [21] 贾文庆,王广印,刘宇.牡丹种胚离体培养的研究[J].安徽农业科学,2006,34(24):6441-6444.
- [22] 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:北京林业大学,2006.
- [23] 张倩,王华芳.牡丹试管苗生根与移栽技术研究进展[J].园艺学报,2012,39(9):1819-1828.
- [24] 杨至德,王雁,刘雪梅,等.发根农杆菌诱导牡丹生根的初步研究[J].林业科学研究,2007,20(2):292-294.
- [25] LYDIABOUZA, MONIQUEJACQUES, EMILE MIGINI-AC et al. In vitro propagation of *Paeonia suffruticosa* Andr. cv Mme de Vetry: developmental effects of exogenous hormones during the proliferation phase [J]. Scientia horticulture in vitro, 1994, 57(3): 241-251.
- [26] 徐振华,王学勇,李敬川.试管苗瓶外生根的研究进展[J].中国农学通报,2002,18(4):84-89.
- [27] 孙仲序,王玉军,刘静.植物组培快繁滤纸桥生根新技术[J].山东农业大学学报(自然科学版),2002,33(3):257-263.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] 李志军,王国栋.牡丹组织培养快繁新技术[J].莱阳农学院学报(自然科学版),2006,23(2):122-125.
- [31] 王蒂.植物组织培养[M].北京:中国农业出版社,2004:29-30.
- [32] 胡凯,张立军,白雪梅,等.植物组织培养污染原因分析及外植体的消毒[J].安徽农业科学,2007,35(3):680-681.
- [33] 李萍,成仿云,张颖星.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):71-76.
- [34] 李萍,成仿云.牡丹组织培养技术的研究进展[J].北方园艺,2007,12(11):102-106.
- [35] HAIYANG JIANG, CUICUI Wang, LING PING, et al. Pattern of LRR nucleotide variation in plant resistance genes[J]. Plant Science, 2007, 173(2): 253-261.
- [36] CHRISTIAN SEITZ, MATTHIAS VITTEN, PETER STEINBACH, et al. Redirection of anthocyanin synthesis in *Osteospermum hybrida* by a two-enzyme manipulation strategy[J]. Phytochemistry, 2007, 68(6): 824-833.
- [37] VIVIAN F IRISH, AMY LITT. Flower development and evolution: gene duplication, diversification and redeployment [J]. Current Opinion in Genetics & Development, 2005, 15(4): 454-460.
- [38] 祁文烈,章文江.紫斑牡丹组培快繁技术研究[J].甘肃农业科技,2011(10):26-27.

(本文责编:王颢)