

牡丹‘乌龙捧盛’组培苗生根及生根解剖学研究

贾文庆^{1,2}, 徐小博², 刘会超², 李纪元^{1*}

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; 2. 河南科技学院园艺园林学院, 河南 新乡 453003)

关键词: 牡丹; ‘乌龙捧盛’; 组培苗; 生根; 解剖学

中图分类号: S722.3

文献标识码: A

Study on Rooting Culture and Rooting Anatomy of Tree Peony ‘Wulong Pengsheng’ Regenerated Shoots

JIA Wen-qing^{1,2}, XU Xiao-bo¹, LIU Hui-chao², LI Ji-yuan¹

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China;

2. He'nan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, He'nan, China)

Abstract: The tissue-cultured seedlings of tree peony ‘Wulong Pengsheng’ were used to study the effects of different plant growth regulators, culture methods, and holdfast on rooting. The morphological structure change during rooting was also observed using the method of paraffin section. The result showed that the best combination of plant growth regulators for rooting was IBA 3.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.6 mg · L⁻¹. The treatment under the temperature of 4°C for ten days was benefit to rooting, and the rate could reach 75.67%. It was identified that the adventitious root primordia of shoot *in vitro* originated from the vascular cambium cells, especially, the cross areas of cambium and pith ray and they started to differentiate at the 5th day and lasted to the 12th day. If the shoots were cultured in the root inducing medium for 12 days, it would lead to not only descend of rooting rate, but also showing callus of stem base, and leaf senescent. However, if they were transferred into the medium without hormone in time, the root primordial protruded the epidermis and developed normally after 5 days’ culture.

Key words: *Paeonia suffruticosa*; *Paeonia suffruticosa* ‘WuLong PengSheng’; regenerated shoots; rooting; anatomy

牡丹 (*Paeonia suffruticosa* Andr.) 为芍药科 (*Paeoniaceae*) 牡丹组 (Sect. Moutan) 落叶亚灌木, 是原产我国的名贵木本观赏花卉, 素有“国色天香”、“花中之王”的美称, 是中国的候选国花^[1]。牡丹广泛的用途使其需求量日益增加, 但牡丹很多品种不结实或结实率极低, 目前主要以分株繁殖和嫁接繁殖为主, 存在繁殖速度慢、苗木质量参差不齐等问题, 严重制约着牡丹的规模化生产, 牡丹的良种扩繁已成为亟待解决的问题。

利用组培快繁的方法培育良种苗, 可以不受地

区、气候的影响, 扩繁速度比常规方法快数万倍, 不仅能够及时提供大量优质种苗, 加速牡丹优良品种的繁育, 而且可以利用转基因技术进行品种改良^[2]。前人对牡丹的组织培养进行了大量研究, 目前虽然在胚培养、不定芽增殖等方面取得了突破性进展^[2-3], 但如何提高牡丹组培苗的生根率和移植成活率, 成为能否进行工厂化育苗的瓶颈问题。针对牡丹在组培瓶中难以生根、吸收功能弱等特点, 本试验以牡丹‘乌龙捧盛’ (*P. suffruticosa* ‘Wulong Pengsheng’) 组培苗为材料, 研究不同植物生长调节

收稿日期: 2012-11-02

基金项目: 河南省重点科技攻关项目“牡丹组培工厂化育苗关键技术研究”(112102110021)

作者简介: 贾文庆(1979—), 男, 河南淮阳人, 博士研究生, 讲师, 主要研究方向为观赏植物生物技术。

* 通讯作者: 研究员, 博士生导师, 主要研究方向为观赏植物。E-mail: jiyuan@126.com

剂组合、培养方式对组培苗生根的影响,并通过生根过程的形态结构观察,分析根系在发生发育过程中的变化机制,为牡丹组培快繁体系建立提供技术支持和理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验用材料为高约5~8 cm的单株‘乌龙捧盛’不定芽(由牡丹侧芽诱导而来)。不定芽继代增殖培养基为WPM附加 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA,继代周期35 d,继代次数6~8代。

1.2 试验方法

1.2.1 最佳培养基的筛选 以改良1/2MS为基本培养基(前期试验得出),采用2因素(IBA、NAA)完全随机试验,IBA、NAA浓度分别为1、2、3、4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和0.2、0.4、0.6、0.8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (表1),进行诱导生根培养,确定最佳的植物生长调节剂配方。

在得到最佳植物生长调节剂配方的基础上,设置4个活性炭处理,浓度分别为0、1、2、3 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,进行诱导生根培养,确定最佳的活性炭浓度。

上述培养基均添加0.54%琼脂、3.5%蔗糖、 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PVP,pH值调至5.8。每处理3个重复,每重复10株(下同)。接种40 d后统计生根情况。

1.2.2 生根培养条件的筛选 采用2种培养方式:一种是正常培养,培养温度(24 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,光照时间14 h,光照度2 000 lx;另一种是先低温(0、2、4、6 $^{\circ}\text{C}$)结

合暗培养10 d,然后再转入常规培养。40 d后统计生根情况。

1.2.3 两步诱导生根法对生根的影响 第1步:采用上述最佳生根配方及方法诱导生根培养,在接种后3、6、9、12、15、18、21 d转入下一步所用培养基;第2步:采用1/2MS基本培养基培养,不添加植物生长调节剂。

1.2.4 不定根发生的形态观察 采用石蜡切片法观察组培苗不定根发生过程中的组织结构变化。以上述所得最佳生根配方作为培养基,进行诱导生根培养,分别于接种后的0、5、10、15、20、25、30、35、40 d时切取基部0.5 cm左右长的茎段,以FAA固定液固定,然后用梯度酒精脱水,石蜡包埋,转动式切片机切片,切片厚度10 μm 。番红-固绿对染法染色,Olympus BX53显微镜观察并照相。

1.3 数据统计分析

采用Excel 2003对数据进行描述性分析,用DPS6.55统计分析软件对数据进行方差分析,得出“平均数 \pm 标准差”。生根率=生根株数/诱导株数 $\times 100\%$,平均根数=根总数/生根株数,平均根长=根长总数/平均根数。

2 结果与分析

2.1 不同植物生长调节剂配比对组培苗生根的影响

表1表明:在完全随机试验中,不同浓度IBA、

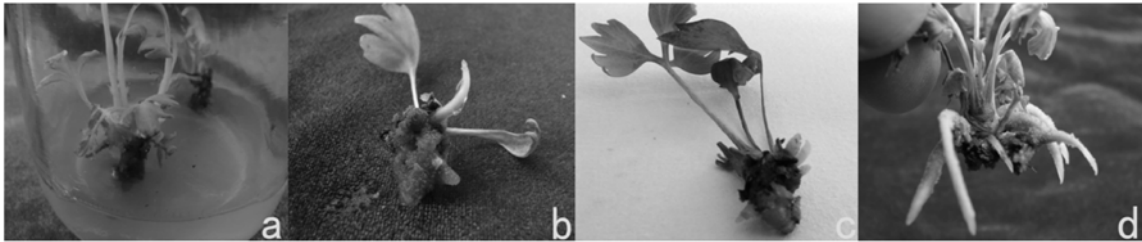
表1 不同植物生长调节剂配比对组培苗生根的影响

IBA 浓度/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	NAA 浓度/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	生根率/%	平均根数/条	平均根长/cm
1	0.2	5.67 ± 0.31 Ef	1.30 ± 0.06 Fh	1.67 ± 0.10 Ff
2		14.65 ± 0.25 DEe	1.67 ± 0.05 EFgh	2.85 ± 0.11 EFef
3		27.85 ± 0.63 CDd	3.33 ± 0.11 EFfg	2.67 ± 0.07 EFef
4		18.40 ± 0.55 DEe	4.31 ± 0.02 DEef	3.50 ± 0.15 EFef
1	0.4	10.67 ± 0.33 DEef	1.85 ± 0.03 EFgh	3.55 ± 0.07 EFdef
2		36.44 ± 0.58 CDcd	4.30 ± 0.15 DEef	4.86 ± 0.25 DEdef
3		42.69 ± 0.64 BCc	8.65 ± 0.24 BCbc	4.33 ± 0.13 DEdef
4		32.00 ± 0.52 CDd	6.33 ± 0.21 CDcd	6.75 ± 0.31 CDcde
1	0.6	23.07 ± 0.67 DEde	3.35 ± 0.03 EFfg	4.48 ± 0.20 DEcdf
2		45.35 ± 1.02 Bc	8.96 ± 0.15 Bb	3.60 ± 0.12 EFde
3		63.33 ± 0.50 Aa	10.21 ± 0.07 Aa	6.88 ± 0.22 CDde
4		51.35 ± 0.36 Bb	6.87 ± 0.24 Cc	5.65 ± 0.15 CDde
1	0.8	5.77 ± 0.20 DEf	1.68 ± 0.08 EFgh	7.67 ± 0.02 CDbed
2		12.33 ± 0.21 DEe	2.11 ± 0.25 EFfg	10.15 ± 0.08 ABab
3		37.67 ± 0.88 CDc	5.33 ± 0.33 Dde	11.25 ± 0.12 ABab
4		21.35 ± 0.64 de	3.90 ± 0.09 DEef	8.90 ± 0.16 BCbc

注:表中每列数据后不同大、小写字母分别表示在0.01和0.05水平上存在差异,下同。

NAA对牡丹‘乌龙捧盛’组培苗生根率影响存在显著差异。当NAA浓度一定时,平均根长随着IBA浓度增加基本呈增长的趋势,生根率、平均根数随着IBA浓度增加一般先升高后降低(图1-a、1-c、1-b),IBA浓度为 $3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最高;当NAA浓度为 $0.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,IBA浓度为 $3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,生根率、平均根数分别达63.33%和10.21条,与其它组合差异极显著,且平均根长适中。当IBA浓度一定

时,生根率和平均根数均随着NAA浓度的增加基本呈现先增加后降低的趋势,当IBA浓度为 $3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,NAA浓度为 $0.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,平均根数最多,达10.21条。NAA浓度为 0.2 、 $0.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,平均根长基本呈增加的趋势。综合考虑,IBA $3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 是适宜牡丹组培苗生根的植物生长调节剂配方(图1-d)。



a:无生根试管苗;b:根少且长;c:根多且短;d:生根正常

图1 试管苗生根情况

2.2 添加活性炭对组培苗生根的影响

添加活性炭与未添加活性炭对牡丹‘乌龙捧盛’组培苗生根的影响差异极显著(表2)。当活性炭浓度大于和等于 $2.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,组培苗没有不定根产生。试验中还观察到,随着活性炭浓度增加,组培苗有黄叶、枯枝现象发生。

2.3 低温培养处理对组培苗生根的影响

$4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温暗培养处理下,牡丹‘乌龙捧盛’组培苗的生根率和平均根长显著高于对照,平均根数与对照的差异不显著(表3)。 $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温暗培养处理与对照的3项指标差异不显著, 0 、 $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温暗培养处理生根状况较对照稍差。综合来看, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温暗培养处理是最佳的牡丹生根培养方法。

2.4 不同培养处理时间对组培苗生根的影响

试验观察发现,牡丹‘乌龙捧盛’组培苗采用2步诱导生根法,显著地提高了生根率,平均生根率达79.56%,并且有助于减少组培苗基部愈伤的产生,是牡丹生根的适宜处理方法;但第1步诱导生根培养阶段的处理时间,也直接影响根系的发生发育。本研究结果显示:在最佳生根诱导培养基上培养10d(辅以 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温暗培养处理),生根率为73.5%~82.5%。处理时间太短和过长都对生根不利。处理时间短生根率低,但超过15d不仅生根率略有下降(18d处理生根率为71.5%),更重要的是在组培苗基部出现愈伤和叶片黄化脱落现象,对以后组培苗生长会造成不利的影

表2 不同活性炭浓度对牡丹‘乌龙捧盛’组培苗生根的影响

活性炭浓度/ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	生根率/ %	平均根数/ 条	平均根长/ cm
0	68.33 ± 0.50 Aa	10.21 ± 0.08 Aa	6.88 ± 0.32 Aa
1	35.31 Bb	3.10 Bb	1.57 Bb
2	0	0	0
3	0	0	0

表3 不同低温处理对组培苗生根的影响

温度/ $^{\circ}\text{C}$	生根率/%	平均根数/条	平均根长/cm
0	59.56 ± 1.67 BCc	6.21 ± 0.09 Bb	5.63 ± 0.35 Ab
2	69.75 ± 0.88 ABb	10.23 ± 0.16 Aa	7.05 ± 0.07 Aab
4	75.67 ± 0.67 Aa	11.85 ± 0.18 Aa	11.05 ± 0.67 Aa
6	54.25 ± 0.50 Cc	7.22 ± 0.45 ABab	8.64 ± 1.33 Aab
CK	62.33 ± 1.50 Bbc	9.21 ± 0.08 Aab	6.88 ± 0.33 Ab

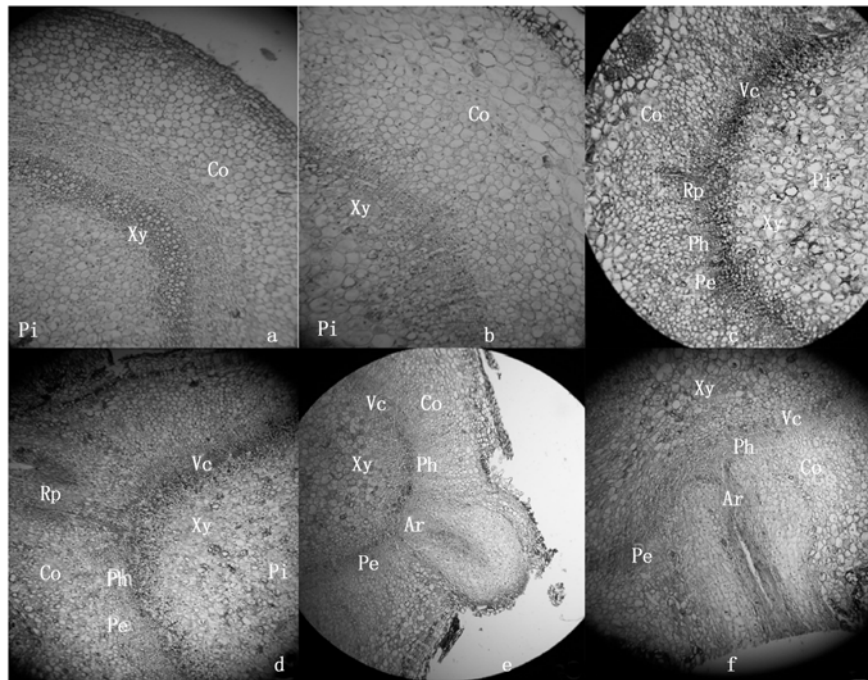
2.5 组培苗生根过程的外部形态特征

2.5.1 不定根发生时间、发根部位 试验观察表明:牡丹‘乌龙捧盛’组培苗接种后15d,在基部有白色突起,18d时不定根长度约为0.5cm。不定根最早发生部位在切口附近,随着时间的延长,发根部位逐渐往上移。生根培养30d左右时,组培苗在未与培养基接触的叶腋处有不定根发生。

2.5.2 组培苗生根过程的解剖学观察 通过对牡丹‘乌龙捧盛’无根苗生根过程的组织解剖学观察发现,试管苗木质部、韧皮部和皮层中未发现有潜

在的根原基存在,不定根原基属于诱生根原基类型。在诱导生根的过程中,培养前5 d镜检时未发现分裂的迹象,第10天镜检可以看出形成层细胞开始分裂,细胞层数增加,由原来的5~8层细胞增至10~15层细胞(图2-c),该部分细胞细胞质浓,细胞核位于中央,核仁较大,染色较深。第10天开始,在维管束处开始出现根原基,细胞首先进行平周分裂,增加细胞的层数,其次进行各个方向

分裂,形成一球形细胞团,该细胞团继续分裂分化形成根原基轮廓(图2-d)。此后由于不定根的顶端分生组织细胞不断分裂、生长、发育,在根冠分泌物和机械压力的作用下,使根端穿过茎皮层伸向体外,同时位于不定根根尖后端的细胞从外向内逐渐分化形成根的维管系统,最终与茎的维管系统相连(图2-e、2-f)。



a:当年生茎横切(大田栽培);b:生根处理前无根苗茎横切;c:形成层细胞迅速分裂;
d:生根诱导产生根原基;e:不定根突破表皮;f:根茎疏导组织连接
Ar:不定根;Co:皮层;Ph:韧皮部;Pi:髓;Rp:根原基;Vc:微管形成层;Xy:木质部;Pe:中柱鞘

图2 组培苗根、茎解剖结构

3 结论与讨论

牡丹不定根的形成是一个复杂的生理过程。不定根原基的发生与发育是组培成功与否的关键,其形成依赖于多种因子,包括培养环境^[4]、低温黑暗^[4-8]、红光^[9]、植物激素^[5-11]等,其中低温、植物激素,尤其是低温与生长素起关键作用。本研究表明,随着 IBA 浓度增高,牡丹‘乌龙捧胜’组培苗生根率呈现先上升后降低的趋势,生根最佳培养基为:1/2MS + IBA 3.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.6 mg · L⁻¹,生根率为 63.33%。采用 4 ℃ 低温暗培养和 2 步诱导生根法处理后,牡丹‘乌龙捧胜’组培苗生根率为 73.5%~82.5%,高于贺丹采用 1 000 mg · L⁻¹ IBA

蘸根处理 1 s 同品种试管苗的生根率(35%)^[6],与本实验室之前所用 1/2WPM 培养基所得到的最高 81.33% 的生根率略有差异^[7],但平均根数大幅增加,且生根苗生长状况较之前有所改善。分析认为,培养基添加生长素可能比蘸根处理更有利牡丹‘乌龙捧胜’的生根,生根率及生根数差异是基本培养基、培养条件不同造成的。前期 4 ℃ 低温暗培养处理能促进组培苗生根,原因可能是低温暗环境抑制了一些酶的活性,减少了酚类氧化,植物生长调节物质分解,有利于前期组培苗吸收营养物质^[6-10],从而提高了组培苗的生根率。添加活性炭会抑制不定根的形成,与殷丽青等^[10]在牡丹‘太平红’(*P. suffruticosa* ‘Taipinghong’)组培苗生根中的研究一致,

可能是活性炭不利于营养物质吸收和运输,吸收了生长素造成的。

一般不定根原始体根据其来源分为潜伏根原始体和诱生根原始体 2 种^[12-17]。潜伏根原始体在发育早期产生,在适宜环境条件下会继续发育形成不定根;诱生根原始体需要后期生根刺激才形成。本研究发现,牡丹‘乌龙捧胜’组培苗内不存在根原始体,而经过生根培养后产生的根原始体,根原基形成时间为诱导后 5~10 d,区别于贺丹^[6]关于牡丹‘太平红’根原基发生期为诱导生根 3 d 左右的研究结果,显示‘乌龙捧胜’更难生根,这可能是品种差异造成的。本试验观察发现,不定根原基起源于维管束形成层细胞,特别是髓射线正对的形成层部分,这与张晓平等^[13]在杂种鹅掌楸(*Liriodendron chinense* × *L. tulipifera*)、马俊红等^[14]在苹果(*Malus pumila* Mill.)、贺丹等^[15]在牡丹‘太平红’、王清民等^[16]在核桃(*Juglans regia* L.)与朱耀军^[17]在牡丹硬枝扦插研究中发现的不定根起源于形成层一致,牡丹属于难生根的诱生根原基植物。刘会超等^[18]在牡丹‘凤丹白’(*P. suffruticosa* ‘Fengdanbai’)、贺丹等^[15]在牡丹‘太平红’研究中发现,牡丹试管苗的不定根也可由愈伤组织分化形成,本试验也发现部分生根苗的根由愈伤组织长出,培养后期生根苗有黄叶、干叶等现象出现,分析可能是其输导组织未与茎的维管束相连,营养输送能力差造成的。

试验还发现大田栽培的牡丹茎切片木质部、韧皮部分化完善,表皮有明显角质层,细胞小且排列紧密,而牡丹‘乌龙捧胜’试管苗根发生部位茎的韧皮部和木质部分化不完善,在木质部中导管极少,表皮细胞大且排列相对疏松,不利于营养物质的运输,在生根阶段会导致生根困难,根发育不良,这可能与组培苗长期处于高湿、营养充足的环境,水分、营养充足导致自身运输功能会减弱有关。已有研究认为,植物激素使组培苗基部变成吸收养分的中心,起着促进物质交换、调配组培苗养分的作用,是促进诱生根原基植物生根的重要技术手段^[13-19]。合理的激素配比不仅有利于组培苗根原始体的诱导,而且能够促进不定根的发育和生长,因此,进一步优化生根培养基、培养程序及培养环境以提高牡丹组培苗生

根率,将是今后研究的重点方向。

参考文献:

- [1] 刘淑敏,王莲英. 牡丹[M]. 北京: 中国建筑工业出版社,1987
- [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] 刘会超,贾文庆. 应用侧芽平切刻伤方法建立牡丹植株再生体系[J]. 园艺学报,2010,37(9): 1471-1476
- [4] 王永伟. 牡丹试管苗生根培养初步研究[D]. 郑州: 河南农业大学,2008
- [5] Beruto M, Lanteri L, Portogallo C. Micropropagation of tree peony (*Paeonia suffruticosa*) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2004, 79(2): 249-255
- [6] 贺 丹. 牡丹试管苗生根调控研究[D]. 郑州: 河南农业大学,2009
- [7] 刘会超,贾文庆. 基本培养基及植物生长调节剂对牡丹组培苗生根的影响[J]. 河南科技学院学报: 自然科学版, 2010, 38(2): 32-34
- [8] 范小峰,郭小强,马世荣. 三种牡丹组织培养比较研究[J]. 北方园艺,2010(4): 132-134
- [9] 徐盼盼,符真珠,曹秀婷. LED 红光处理对牡丹试管苗生根及其酶活性的影响[J]. 河南农业大学学报,2011,45(1): 38-41
- [10] 殷丽青,王新基,胡永红. 牡丹组织培养若干影响因子研究[J]. 上海农业学报, 2012,28(1): 17-21
- [11] Gildow F E, Mitchell J P. Initiation, growth and nuclear characteristics of tissue cultures of *Paeonia suffruticosa* [J]. Physiologia Plantarum, 1977, 39(4): 295-298
- [12] 刘 勇,肖德兴,黄长干,等. 板栗嫩枝扦插生根解剖学特征研究[J]. 园艺学报,1997,24(1): 8-12
- [13] 张晓平,方炎明. 杂种鹅掌楸插穗不定根发生与发育的解剖学观察[J]. 植物资源与环境学报,2003,12(1): 10-15
- [14] 马俊红,陈四维,马宝馄,等. 苹果试管苗不定根起源及其发育状况的研究[J]. 河北农业大学学报,1992,15(4): 46-49
- [15] 贺 丹,王 政,何松林. 牡丹试管苗生根过程解剖结构观察及相关激素与酶变化的研究[J]. 园艺学报, 2011,38(4): 770-776
- [16] 王清民,彭伟秀,张俊佩,等. 核桃试管嫩茎生根的形态结构及激素调控研究[J]. 园艺学报,2006,33(2): 255-259
- [17] 朱耀军. 牡丹茎扦插繁殖技术及生根机理初步研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院,2007
- [18] 刘会超,贾文庆,刘 磊. 牡丹‘凤丹白’成熟胚不定芽诱导和生根研究[C]// 河南省细胞生物学学会. 河南省细胞生物学学会第二届会员代表大会暨学术研讨会论文摘要集. 北京: 《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社,2009
- [19] 刘会超,贾文庆. 魏紫牡丹腋芽组织培养的快速繁殖技术[J]. 核农学报,2010,24(3): 513-517