

牡丹传统繁殖与离体再生的研究进展

韩继刚¹, 秦俊², 胡永红¹, 朱木兰³

(1. 中国科学院 上海辰山植物科学研究中心/上海辰山植物园, 上海 201602; 2. 上海植物园, 上海 200231; 3. 中国科学院 上海生命科学研究院 植物生理生态研究所, 上海 200032)

摘要:牡丹素有“花中之王”的美誉, 观赏价值极高, 其丹皮可入药, 种子可榨油, 因而具有重要的研究意义。通过对我国牡丹传统繁殖和离体再生的方法及其利弊进行综述, 着重介绍了以种胚、芽、叶柄、叶片和花粉等为起始外植体的牡丹离体快繁殖研究现状, 提出了目前该物种离体快繁中存在褐化和生根困难等问题, 展望了牡丹传统繁殖和离体再生的发展方向。

关键词:牡丹; 传统繁殖; 离体再生; 种胚; 褐化; 生根

中图分类号: S685.11

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2014)04-0077-04

牡丹(*Paeonia suffruticosa*), 别名富贵花、百两金、木芍药、鼠姑、鹿韭及洛阳花, 为芍药科芍药属木本植物^[1], 落叶灌木, 素有“国色天香”“花中之王”的美誉。牡丹不仅有较高的观赏价值, 还具备很好的药用价值。早在汉代, 药用植物典籍《神农本草经》就有牡丹被驯化入药的记载。随着牡丹在园林绿化、药材储备中市场价值的增加, 推动了牡丹的经济市场, 因此, 提高牡丹苗木的繁殖系数, 加大牡丹苗木的规模生产成为当今牡丹研究的主要方向。该文综述了有关牡丹的传统繁殖和离体再生的方法及存在的主要问题。

1 传统繁殖

牡丹的繁殖方法有两种: 一为有性繁殖, 二为无性繁殖, 其中有性繁殖又称为种子繁殖, 无性繁殖包括分株、嫁接、扦插及压条等。

1.1 种子繁殖

牡丹的种子繁殖主要是用于砧木的繁殖和选育天然杂种、药用栽培与定向栽培以及杂交新品种培育^[2-3]。

牡丹种子在成熟过程中最初为白色, 接近成熟时为咖啡色, 老熟时呈黑色。种子的收获一般

宜在 8 月下旬(视气候而定), 当角果呈蟹黄色时采收^[3]。采收过早或过晚都会影响发芽率^[4]。

牡丹种子在自然条件下具有休眠特性, 具体表现在胚根(下胚轴)和胚芽(上胚轴)的休眠, 尤以上胚轴休眠较为深沉。为了提高发芽率, 播种前可将种子用 50℃ 温水浸泡 24~48 h, 或用 95% 酒精浸泡 30 min^[5-6]。牡丹种子播种一般在 8 月下旬至 9 月上旬进行, 过早或过迟都影响种子的发芽率, 利用冬季自然低温打破上胚轴休眠能够有效提高种子的发芽率及发芽势^[6]。

研究发现, 采集成熟牡丹种子风干后 4℃ 湿砂藏 1 a 左右, 种子的活力不减, 且有一部分种子置于该条件下 2~4 个月会生根。

1.2 分株繁殖

分株是繁殖牡丹最简单的方法。分株一般于秋分与寒露之间进行, 早则易秋发, 晚则长势弱、不发根, 翌年易早死^[7]。

常用的分株方法为: 挖出品种纯正、三至五年生、生长健壮的母株, 将附土去掉, 分株后进行合理的修剪, 对伤口消毒处理, 然后移栽培土过冬。为了促使分株苗早生根并防止病菌侵入, 用多菌灵 600~1 000 倍液, 添加适量生根粉液或适量 0.1% 磷酸二氢钾及适量的蔗糖进行蘸根处理, 或采用 1% CuSO₄ 或甲基托布津 500~800 倍液, 均能显著提高植株的成活率及牡丹品质^[2,8]。

1.3 嫁接繁殖

嫁接是牡丹主要的传统繁殖方法, 具有成本低、速度快、繁殖系数高、苗木整齐规范等优点, 且不同牡丹品种间嫁接成活率无显著性差异^[9]。嫁

收稿日期: 2013-10-17

基金项目: 上海市科委重点科技攻关资助项目(1039 1901200, 11391901101); 上海市绿化局重点攻关资助项目(G102406); “863”计划资助项目(2013AA102704)

第一作者简介: 韩继刚(1970-), 男, 河北省, 博士, 教授, 从事牡丹种质资源创新和利用等相关研究。E-mail: jghan@gmail.com。

通讯作者: 朱木兰(1968-), 女, 湖南省怀化市人, 副研究员, 从事林木花卉和主要农作物如大豆、大麦等的种质资源创制与遗传改良研究。E-mail: mlzhu@sinap.ac.cn。

接法的繁殖系数比分株法高得多,尤其适用于一些发枝力弱的品种。嫁接时间一般为8月下旬到10月上旬^[10],以白露前后存活率最高。

国内牡丹嫁接的砧木通常选用“粗种”牡丹或芍药的肉质根。接穗一般选用根颈部萌发的一年生枝条,而对于萌蘖枝很少的品种,可采用树冠上部的枝条作接穗。接穗应随采随接,久放则降低存活率^[4]。

为了提高嫁接存活率,王锋等^[2]人在晾晒前处理砧木时分别用甲基异硫磷和甲基托布津800倍液浸泡处理15 min。而袁全国等^[8]在进行嫁接时,以吲哚丁酸 $1\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +0.1%磷酸二氢钾和泥涂抹嫁接口,两者均取得了很好的效果。王晓辉等^[4]根据牡丹嫁接繁殖以其使用的接穗、砧木和嫁接部位的不同,分为根接、枝接和芽接等,结果表明,根接法简便灵活;枝接法损伤砧木的根系,嫁接存活率高,苗木生长势强,但是操作较费力,阴雨天不便作业;芽接法嫁接期长,且成活率低,容易退化,所以在生产上未能大量推广。

1.4 压条繁殖

对于稀有品种和萌蘖枝较少的品种,压条繁殖是无性繁殖中最简便可靠的方法^[11]。牡丹的压条繁殖方法一般是将牡丹枝条环状剥皮或刻伤压入土中,生根后与母株分离形成新植株,包括就地压条法和吊包压条法等^[12]。目前有关牡丹的压条繁殖研究很少。

2 离体再生

在牡丹的组织培养中,研究最多和最早的主要是以种胚、芽和叶柄等外植体为起始的离体再生技术,体细胞胚胎发生和花粉培养研究较为少见。

2.1 种胚的培养

国外最早的有关牡丹组织培养方面的报道是1965年Partanen^[13]和1969年Demoise等^[14]通过对无菌剥离的牡丹合子胚的培养,诱导出愈伤组织。Zillis等^[15]研究表明,自然条件下牡丹种子需休眠1~2 a才能萌发,采用种胚培养可以将休眠时间缩至12~14周。

种胚培养方法主要是将去荚种子用蒸馏水冲洗干净后置于超净工作台上,用75%的酒精浸泡30 s,再以无菌水冲洗2~3次,后用0.1%升汞溶液浸泡8 min,用无菌水冲洗3~4次后去除外种

皮,剥出种胚进行离体培养^[16]。

牡丹种胚离体培养的配方特异性不太明显。刘会超等^[17]研究表明凤丹成熟胚离体培养的最佳培养基为 $1/2\text{MS}+\text{GA}_3\ 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。范晓峰^[18]研究表明牡丹胚生长的最适培养基为 $\text{MS}+6\text{-BA}\ 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{IBA}\ 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{CH}\ 100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。尽管还有很多研究采用的培养基成分有所不同,但共性的结论是6-BA促进子叶生长,抑制根的生长^[19-20]。

贾文庆等^[20-22]研究表明低温层积处理对成熟胚丛生芽的影响显著。Brukhin等^[23]研究表明,只有球状胚阶段之后的胚状体培养才能正常增殖。一般成熟种胚更易萌发,且离体培养早期带胚乳的胚比不带胚乳的胚生长更快更健壮。

2.2 芽的培养

芽的直接离体生根能够再生成小植株,不经过愈伤组织阶段,有利于保持培养母株的优良特性。芽一般分为顶芽、腋芽和不定芽(又称土芽或鳞芽)。鳞芽作为起始培养物,在牡丹组织培养中广泛使用。

芽培过程消毒很关键,进行消毒及消毒预处理时,一般采用流水冲洗3~5 h,多菌灵溶液、洗洁精溶液、青霉素溶液等预处理,再用75%乙醇和0.1%的升汞分别浸泡^[24-25]。

3种芽的培养基各有不同,尤扬等^[26]研究表明顶芽萌动和诱导丛生芽最佳的培养基为 $\text{MS}+\text{Ca}^{2+}+6\text{-BA}\ 2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{NAA}\ 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;贾文庆等^[27]研究表明, $\text{MS}+\text{Ca}^{2+}+6\text{-BA}\ 1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{NAA}\ 0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为牡丹“银粉金鳞”不定芽诱导最佳培养基。最佳增殖培养基为 $\text{WPM}+6\text{-BA}\ 1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{NAA}\ 0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[25]。

2.3 叶片及叶柄的培养

近年来,牡丹的叶片及叶柄的组培快繁技术也取得了相当大的进展。王芳等采用秋牡丹的叶片为材料,经过不定芽的诱导,接种叶片长出愈伤组织后,在愈伤组织周围会长出大量丛芽,再经过增殖培养,将不定芽分离成小丛后接到MS培养基,经过一段时间增殖和反复切割转接,在较短时间里可得到大量丛生芽。丛生芽长至2~3 cm后进行切割,并获得生根苗^[28]。何松林等以叶柄为起始外植体,对牡丹进行离体繁殖,但未获得再生植株^[29]。

2.4 花粉培养

单倍体育种对于植物育种具有重要意义,自1986年在黑杨(*Populus nigra* L.)上成功诱导出国内第一例木本花粉植株以来^[30],牡丹的花粉培养也得以深入研究。

盖伟玲^[31]等采用固体培养法研究了4个牡丹品种的花粉萌发情况,结果表明,固体培养基培养6 h左右牡丹花粉有较高萌发率,是调查花粉萌发率的适宜时期。牡丹花粉萌发的适宜条件为 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸、 $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖、pH 6.5~7.0。刘会超等^[32]考察了不同温度预处理及不同浓度激素组合对牡丹花药培养的影响,结果表明,未作任何处理的花药,其愈伤组织平均诱导率明显高于经过低温和高温预处理的花药,愈伤组织最佳诱导培养基为:MS+2,4-D $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +6-BA $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,愈伤组织的平均诱导率最高可达36.87%。Roberts等^[33]用不加碳和琼脂的MS培养基进行液体培养,花粉能够萌发,但均未获得再生植株。

2.5 体细胞胚胎发生

体细胞胚胎发生方式再生植株是植物再生的一个重要方式,但对木本植物尤其生长缓慢的灌木牡丹而言,成功的体细胞胚胎发生报道不多见。朱向涛^[34]对凤丹体细胞发生的研究结果表明,花后110 d是体细胞胚直接诱导合适的发育时期,在以MS为基本培养基并附加2,4-D与6-BA各 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基配方中,体细胞胚胎诱导率最高,达到38.33%。

周秀梅等^[35-36]对紫斑牡丹进行研究后发现,基本培养基种类、BAP、NAA和蔗糖浓度4因素对体胚诱导率的影响均极其显著,且NAA对其影响最大(不添加NAA对体胚的诱导最有利),基本培养基和BAP次之,蔗糖的影响最小。最佳组合为:改良MS+BAP $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +蔗糖 $100.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,可以使诱导率稳定在63.3%。此外,对外植体进行蔗糖溶液预处理能促进体胚发生,预处理时间对体胚发生效果与诱导培养基间存在交互作用,光照的有无及诱导培养时间长短对体胚的发生也有一定的影响^[35]。

3 问题及展望

传统繁殖方法的优点是遗传稳定性好,优良

品种变异小,但成苗成花周期长(一般需8 a左右),繁殖系数低,离体快繁技术有望解决这些难题。

然而,牡丹离体再生又存在着一定的技术难点。褐化是牡丹离体再生中最难以克服的问题之一,褐变机理主要是多酚氧化酶(PPO)作用于其底物酚类物质而引起的,花色差异与牡丹叶片总酚含量和PPO活性有一定关系,因此,各牡丹品种组织培养成功的难易程度有所不同^[37-39]。在不同生长时期和培养条件下,褐化程度有所不同。在多酚氧化酶活性较弱的冬春季取牡丹幼嫩的材料作外植体可以有效地减少褐化,添加生长素会加剧启动培养中外植体的褐化程度,同时,光照是加剧愈伤褐化的重要原因^[40-41]。抗氧化剂的添加可在一定程度上抑制醌类物质产生,活性碳的使用对减轻褐化也有一定的效果^[41]。

生根是牡丹离体快繁的难点,也是制约牡丹离体快繁体系建立的最大瓶颈。基本培养基类型对生根率的影响较大,牡丹在MS、LP、改良MS、1/2MS和改良WPM等基本培养基中均能生根,其中1/2MS最常见。刘会超等^[42]通过对培养基组分的比较,发现WPM适合牡丹生根可能与培养基中高浓度的 SO_4^{2-} 有关。Bouza等^[43]研究表明茎段伸长较多的组培苗比茎段未伸长的组培苗生根率低,腋芽生根比顶芽困难。两步生根法即大剂量IBA诱导不定根起始,然后转移至低IBA浓度或只含活性炭的培养基上继续培养生根,为牡丹生根培养的较佳方法。

牡丹组培苗移栽成活率低是牡丹快繁中最大的限制因子,也是急需进一步研究和解决的难题。牡丹组培苗生根诱导可能出现休眠现象,从而大大影响了组培苗的移栽成活,因此炼苗之前,需解除休眠,通过4℃低温处理,之后于散射光下闭瓶炼苗等方法可以解除这种轻度休眠;适当延长炼苗时间,改善移栽基质,如培土中加入草木灰等,可以提高移栽成活率^[44-45]。

目前牡丹仍以嫁接和播种繁殖为主,远不能满足市场需求。作为特产于中国的国花,探索其更佳成熟的培养途径已经成为一种迫切的需要。

尽管现在的研究倾向于繁殖系数高、后代性状稳定、便于大量育苗的离体快繁,但由于技术不够成熟,大多数停留于试验阶段,生根、防褐化及

移栽存活等问题仍然是牡丹组培中的热点问题及主攻方向。随着科学技术的不断进步,在巨大的市场利益驱动下,困扰牡丹快繁的这些问题必将得到解决,从而大大提高牡丹的利用价值,不仅发挥其在园林中的社会效益和生态效益,也会大大提高其经济效益。

参考文献:

- [1] 李子峰,胡永红,刘庆华,等.我国牡丹组织培养研究进展[J].安徽农业科学,2006(13):2998-2999,3001.
- [2] 王锋,申军伟,刘改芝,等.牡丹繁殖技术[J].现代农业科学,2011(6):219.
- [3] 张明春,晁红燕,郭向英.牡丹繁殖技术[J].林业科技,2002,27(6):56-57.
- [4] 王晓辉,张雁丽,秦萍,等.牡丹嫁接繁殖[J].中国花卉园艺,2009(16):40-41.
- [5] 马新玲,汪小龙,张义华.牡丹种子繁殖方法[J].农业科技与信息,2011(10):27-28.
- [6] 滕华容.牡丹繁殖方法[J].安徽林业,2007(5):34.
- [7] 徐成文.牡丹分株繁殖法[J].花木盆景,2005(4):25.
- [8] 袁全国,郑亚军,李艳玲.牡丹繁育及催化技术研究[J].现代农业科技,2011(15):224-225.
- [9] 胡中成,蒋文娟,马新乔,等.牡丹嫁接繁殖技术[J].浙江林业科技,2005,25(5):33-36.
- [10] 柴发喜,王继林.甘肃紫斑牡丹的快速繁殖技术[J].林业实用技术,2010(7):56.
- [11] 苗锦素,孙凤山.园林植物压条繁殖技术[J].湖南林业,2007(1):25.
- [12] 沈改霞,张新义.浅谈牡丹的繁殖栽培技术[J].北方园艺,2012(8):63-66.
- [13] Partanen C R. Cytological behaviour of plant tissues in vitro as a reflection of potentialities *in vivo* [Z]. Berkeley: Cuthan Publ CO. 1965.
- [14] Demoise C F, Partanen C R. Effect of subculturing and physical condition of medium on the nuclear behavior of a plant tissue culture[J]. American Journal of Botany, 1969, 56(2):147-152.
- [15] Zillis M R, Meyer M M. Rapid *in vitro* germination of immature, dormant embryos[J]. Plant Prol Soc., 1976, 26: 272-275.
- [16] 刘会超,贾文庆,王坤.牡丹胚培养及丛生苗继代培养研究[J].北方园艺,2010(6):172-174.
- [17] 刘会超,刘磊,贾文庆,等.牡丹成熟胚立体培养的初步研究[J].北方园艺,2009(1):99-101.
- [18] 范小峰.3种牡丹的胚培养及植株再生研究[J].林业实用技术,2009(5):49-51.
- [19] 高昌勇.牡丹胚离体培养的研究[J].安徽农业科学,2009, 37(19):8844,8865.
- [20] 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.
- [21] 杨红超,裴冬丽.牡丹种子胚培养[J].广西农业科学,2006,37(2):108-109.
- [22] 安阿莉,苏小玲,毛娟,等.紫斑牡丹幼胚离体培养试验[J].甘肃农业大学学报,2009,6:63-68.
- [23] Brukhin, Batygina. Embryo culture and somatic embryogenesis in culture of *Paeonia anomala* [J]. Phytomorphology, 1994, 44(34):151-157.
- [24] 许芳,黄春国,张定宇,等.稷山矮牡丹腋芽的组织培养[J].植物生理学通讯,2008,44(5):953.
- [25] 刘会超,贾文庆,魏紫牡丹叶芽组织培养的快速繁殖技术[J].核农学报,2010,24(3):513-517.
- [26] 尤扬,贾文庆,王慧.牡丹顶芽组织培养的初步研究[J].北方园艺,2012(4):131-133.
- [27] 贾文庆,刘会超.牡丹鳞芽离体培养的初步研究[J].河南科技学院学报,2009,31(1):12-14.
- [28] 王芳,郝梦姝,冯朋飞,等.秋牡丹的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,2008(44):943-944.
- [29] 何松林,陈笑蕾,陈莉,等.牡丹叶柄离体培养中褐化防止的初步研究[J].河南科学,2005,23(1):47-50.
- [30] 武冲,唐树梅,张勇,等.植物花粉培养研究进展[J].中国农学通报,2008(11):146-149.
- [31] 盖伟玲,盖树鹏.牡丹花粉立体萌发的研究[J].北方园艺,2010(22):132-133.
- [32] 刘会超,刘磊,贾文庆,等.牡丹花药培养的初步研究[J].江苏农业科学,2009(2):69-71.
- [33] Robert S M, Sunderland N. Pollen Culture in *Paeonia* [J]. John Innes Annu Rep, 1977, 68:60-61.
- [34] 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.
- [35] 周秀梅.牡丹体细胞胚胎发生研究[D].北京:北京林业大学,2008.
- [36] 周秀梅,成仿云,钟原,等.紫斑牡丹‘书生捧墨’的体胚诱导与发生[J].北京林业大学学报,2009,3(2):151-153.
- [37] 周仁超,姚崇怀.紫斑牡丹胚培养与植株再生[J].亚热带植物科学,2001,30(3):601.
- [38] 周俊辉,周家容,曾浩森,等.园艺植物组织培养中的褐化现象及抗褐化研究进展[J].园艺学报,2000(Z1):481-486.
- [39] 高国训.植物组织培养中的褐变问题[J].植物生理学通讯,1999,35(6):501-506.
- [40] 张俊琦,罗晓芳.牡丹组织培养中褐化的发生原因与防治方法的研究[J].沈阳农业大学学报,2006,37(5):720-724.
- [41] 陈菲,李黎,宫伟.植物组织培养的防褐化探讨[J].北方园艺,2005(2):69.
- [42] 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,2010,38(2):32-34.