



利用试管休眠芽进行芍药组培技术研究

李艳敏¹, 薛娴², 王慧娟¹, 高凯³, 高杰¹, 袁欣¹, 王利民¹, 符真珠^{1,*}, 张和臣^{1,*}

¹河南省农业科学院园艺研究所, 郑州450002

²河南科技大学农学院, 河南洛阳471003

³洛阳市农林科学院, 河南洛阳471023

*共同通信作者: 符真珠(pearlgh2005@163.com)、张和臣(zhc5128@126.com)

摘要: 本研究以芍药根茎芽为外植体进行组织培养技术研究, 诱导其形成试管休眠芽, 采用石蜡切片对休眠芽进行解剖结构观察, 重点研究了不同浓度6-BA及蔗糖对休眠芽生长的影响, 并对打破休眠的温度进行了筛选。结果表明, 芍药试管休眠芽具有顶端分生组织、叶原基和腋芽原基, 基部由表皮、薄壁细胞和胚性愈伤组织细胞团组成。6-BA和蔗糖显著影响试管休眠芽的形成和生长, 适宜的休眠芽诱导培养基为WPM+0.4 mg·L⁻¹ 6-BA+60 g·L⁻¹蔗糖+6.5 g·L⁻¹琼脂, 诱导率可以达到81.14%, 增殖系数1.61。在8~12°C温度范围内, 在不添加任何植物生长调节物质MS培养基中, 试管休眠芽可以先生根后萌芽; 其中, 12°C培养条件下, 试管休眠芽生根率为72.2%, 萌芽率为83.3%。生根苗移栽成活后生长90 d左右, 在根茎处形成新的休眠芽。

关键词: 芍药; 试管休眠芽; 温度; 生根; 萌芽

Study on tissue culture of *Paeonia lactiflora* by using test tube dormant buds

LI Yanmin¹, XUE Xian², WANG Huijuan¹, GAO Kai³, GAO Jie¹, YUAN Xin¹, WANG Limin¹,
FU Zhenzhu^{1,*}, ZHANG Hechen^{1,*}

¹Horticulture Institute of Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China

²College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China

³Luoyang Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Luoyang, Henan 471023, China

*Co-corresponding authors: Fu ZZ (pearlgh2005@163.com), Zhang HC (zhc5128@126.com)

Abstracts: In this study, the rhizome buds of *Paeonia lactiflora* were used as explants to conduct tissue culture technology research to induce them to form test tube dormant buds *in vitro*. Paraffin sections were used to observe the anatomical structure of dormant buds. The effects of different concentrations of 6-BA and sucrose on the growth of dormant buds were studied, and the dormancy-breaking temperature was screened. The results showed that the test tube dormant buds of *P. lactiflora* had apical meristem, leaf primordia and axillary bud primordia, and the base of dormant buds was callus that formed epidermis, parenchyma cells and embryogenic cell clusters. 6-BA and sucrose significantly affected the formation and growth of dormant buds *in vitro*, and the induction rate was 81.14%, proliferation coefficient was 1.61 when 6-BA (0.4 mg·L⁻¹) and sucrose (60 g·L⁻¹) were added to the WPM medium. In the temperature range of 8–12°C, the dormancy

收稿 2022-06-29 修定 2023-08-25

资助 河南省农业科学院基本科研业务费项目(2022ZC23和2023ZC029)和河南省科技攻关项目(222102110406)。

of test tube buds could be broken without adding any plants growth regulating substances in MS medium, and the dormant buds germinated after rooting. Under 12°C condition, the rooting rate of dormant buds in test tubes was 72.2%, and the germination rate was 83.3%. The newly rooted seedlings transplanted from the roots took about 90 days to grow, and new dormant buds formed at the rhizome.

Key words: *Paeonia lactiflora*; test tube dormant buds; temperature; rooting; germination

芍药(*Paeonia lactiflora*)是芍药科芍药属多年生宿根草本植物,我国传统名花,主要通过种子和分株方式繁殖。芍药种子具有上下胚轴双休眠特性,自然条件下,需要2年时间萌发,而分株繁殖多在秋季进行,受材料、时间限制,繁殖系数低,难以满足市场需求,制约着芍药产业化发展(Shen等2012)。采用组织培养方法繁殖芍药,具有效率高、速度快、周年生产等优点,是促进其良种繁育、产业发展的重要方式。关于芍药组培技术的研究报道很多,主要集中在离体芽培养(郑黎文等2011)、胚培养(Zhao等2017)、愈伤组织诱导(王吉凤等2010)等。芍药地下芽灭菌困难,污染率高(曲文静等2014);诱导丛生芽过程中,需要添加适量的GA₃(孙晓梅等2022)和水解酪蛋白(刘雪婷等2020)以达到丛生芽诱导和正常生长目的;芍药试管苗生根研究报道较少,多为研究生长素种类及浓度对生根的影响,认为低浓度生长素诱导生根效果不佳(孙晓梅等2022),且生根试管苗移栽后未成活(吴红娟等2011)。综上,芍药组培技术经过多年的研究,虽然取得了诸多进展,但还存在褐化、玻璃化和污染严重,以及分化困难、再生效率不高、生根率低以及移栽不成活等问题(张润龙等2021)。

在长期的系统演化过程中,芍药形成了独特的休眠特性,即种子和芽均需经过一定的低温过程才能打破休眠进而萌发,表现为秋季先产生根系,经历一段寒冷的低温时期打破上胚轴和芽休眠后再出土萌发(王厉慧等2011;孙晓梅等2015),由此可知,芍药生长过程中,根和芽生长所需温度不同,二者具有不同步性。现有的芍药组培技术研究中,以地下芽或种胚为外植体,诱导其萌发成苗,然后进行生根诱导,整个培养过程在相同的温度下进行,不符合芍药的生长特性,苗生长势弱,生根率低,移栽难成活。本文在前人研究的基础上,以芍药根茎芽为外植体获得无菌试管苗,诱导形成试管

休眠芽,研究了影响试管休眠芽诱导与增殖的关键因子,筛选了休眠芽生根及萌芽的适宜温度,建立起利用芍药试管休眠芽进行组培快繁的技术体系,为芍药属植物组织培养技术提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

以芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.)品种‘粉玉奴’和‘大富贵’为试验材料,于2020年1月15日从洛阳市农林科学院芍药资源圃采集其根茎芽,放入冰盒带回实验室。

1.2 外植体灭菌及无菌体系建立

取芍药根茎芽,剥去最外层鳞片后,先用自来水冲洗,再用肥皂水浸泡和刷洗,最后用流水冲洗30 min。将洗净的鳞芽拿到超净工作台上进行灭菌,体积浓度为75%的酒精灭菌30 s,质量浓度为0.1%的HgCl₂灭菌3次,其中前两次HgCl₂灭菌之间用无菌水冲洗一次,最后一次HgCl₂灭菌后用无菌水或者用含有300 mg·L⁻¹的头孢无菌水冲洗3~4遍,具体灭菌时间和方法见表1。将灭菌后的根茎芽,用无菌的镊子将鳞片剥掉,再用无菌刀片将根茎芽切割分成顶芽、有鳞侧芽和无鳞侧芽3种类型,观察不同类型芽的萌发情况。芽萌发培养基为1/2MS+30 g·L⁻¹蔗糖+6 g·L⁻¹琼脂+1.0 mg·L⁻¹6-BA+1.0 mg·L⁻¹GA₃,培养40 d后,得到芍药无菌试管苗。

1.3 芍药试管休眠芽的诱导形成及结构观察

将获得的芍药无菌试管苗转接入WPM+0.4 mg·L⁻¹6-BA+30 g·L⁻¹蔗糖+6.5 g·L⁻¹琼脂培养基中培养,叶柄基部有红色休眠芽形成,继代培养后,可以形成多个休眠芽聚合生长的休眠芽丛。已有的芍药组培报道中,芍药丛生芽是由多个具有叶片和叶柄的不定芽组成(吴红娟等2011;刘雪婷等2020;孙晓梅等2022),本文中的休眠芽丛是由多个不具叶片和叶柄、由鳞片包裹的不定芽组成。

表1 芍药根茎芽灭菌时间及方法

Table 1 Sterilization time and method of rhizome bud of peony

编号	HgCl ₂ 灭菌时间	冲洗方法
A	第1次8 min, 第2次和第3次均为6 min	无菌水冲洗3、4遍
B	3次灭菌均为8 min	无菌水冲洗3、4遍
C	3次灭菌均为8 min	头孢无菌水冲洗3、4遍

选取芍药试管休眠芽丛, 用FAA固定液固定24 h以上。将组织从固定液取出修块, 放于脱水盒内, 做好标记。将脱水盒放进脱水机内依次梯度酒精进行脱水, 具体为: 75%酒精4 h, 85%酒精2 h, 90%酒精2 h, 95%酒精1 h, 无水乙醇I 30 min, 无水乙醇II 30 min, 醇苯5~10 min, 二甲苯15~10 min, 二甲苯石蜡包埋, 石蜡切片厚度为10 μm, 1%番红-0.5%固绿染色法染色, 封片后使用Nikon ECLIPSE E100显微镜观察, ISH数码显微摄像系统拍照。

1.4 不同浓度6-BA和蔗糖处理下芍药试管休眠芽生长

将芍药试管休眠芽丛切割成带1~3个休眠芽的芽块, 转入含有不同浓度6-BA (0、0.4、0.8和1.2 mg·L⁻¹)的WPM培养基中, 附加30 g·L⁻¹蔗糖、0.1 g·L⁻¹椰子粉和6.5 g·L⁻¹琼脂, 每个处理接种3瓶, 每瓶5个休眠芽块, 3次重复。将芍药试管休眠芽多次继代增殖培养一段时间后, 进行蔗糖浓度筛选试验, 蔗糖浓度分别为15、30、45、60、75和90 g·L⁻¹, 基本培养基为WPM, 附加0.4 mg·L⁻¹ 6-BA、0.1 g·L⁻¹椰子粉和6.5 g·L⁻¹琼脂, 每个处理接种5瓶, 每瓶6个休眠芽块, 3次重复。观察休眠芽的形成及生根情况, 统计休眠芽诱导率、增殖系数及生根率。休眠芽诱导率(%)=长出新休眠芽的休眠芽块/接入的休眠芽总数×100; 增殖系数=转出的休眠芽芽块数/接入的休眠芽芽块数; 生根率(%)=生根的休眠芽块/接入休眠芽总数×100。

1.5 不同温度处理下芍药试管休眠芽萌发生根

取未生根的芍药‘粉玉奴’试管休眠芽, 接入MS培养基中, 放于设置不同温度(4、8、12、15、18、20和25°C)的培养箱中培养, 每个处理3瓶, 每瓶接种5个休眠芽, 重复3次。每5 d观察一次生根和萌芽情况, 记录生根和长叶时间, 70 d时统计生根和萌芽情况, 并计算生根率和萌芽率。萌芽率(%)=

长叶的休眠芽数/休眠芽总数×100。

芍药根茎芽外植体萌发、休眠芽诱导及生长试验的培养条件为温度(23±2)°C, 光照强度25 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光照周期12 h·d⁻¹。

采用单因素完全随机试验设计, Excel软件整理数据, DPS 6.55软件进行方差分析及多重比较。

2 实验结果

2.1 不同灭菌方法对芍药根茎芽污染率的影响

芍药根茎芽生长在地下, 作为外植体灭菌困难。采用0.1% HgCl₂灭菌, 存在很高的污染率。从表2可以看出, 采用0.1% HgCl₂灭菌3次, 用无菌水冲洗(灭菌方式A和B), ‘粉玉奴’外植体污染率仍旧高达77.78%以上, ‘大富贵’外植体污染率高达97.5%以上; 采用0.1% HgCl₂灭菌3次, 再用含有300 mg·L⁻¹的头孢无菌水冲洗3、4遍(灭菌方式C), 可以有效降低污染率, ‘粉玉奴’外植体污染率降至21.43%, ‘大富贵’外植体污染率降至45.45%。因此, 芍药外植体灭菌时, 在常规的清洗、灭菌后, 结合抗生素无菌水, 可以有效降低污染率。

2.2 不同类型的芍药芽萌发情况对比

芍药根茎芽为复合芽, 由顶芽和侧芽组成, 侧芽着生于鳞片腋内, 按芽有无鳞片可分为裸芽(无鳞侧芽)、鳞芽(有鳞侧芽), 通常顶芽为花芽, 裸芽形成侧枝, 鳞芽形成子代根茎芽、侧枝。从表3中可以看出, ‘粉玉奴’和‘大富贵’2个品种的顶芽萌发率均最低, 分别为14.3%和22.2%, 而侧芽的萌发率较高, 其中‘粉玉奴’的无鳞侧芽萌发率最高, 为43.8%; ‘大富贵’有鳞侧芽萌发率最高, 为40%。

2.3 芍药试管休眠芽诱导及休眠芽组织结构显微观察

芍药无菌苗在WPM+0.4 mg·L⁻¹ 6-BA+30 g·L⁻¹蔗糖+6.5 g·L⁻¹琼脂培养基上继代培养后, ‘粉玉奴’

表2 不同灭菌方式对外植体污染率的影响

Table 2 Effects of different sterilization methods on the contamination rate of explants

品种	灭菌方式编号	接入数/个	污染数/个	污染率/%
‘粉玉奴’	A	32	29	90.63
	B	18	14	77.78
	C	28	6	21.43
‘大富贵’	A	40	39	97.50
	B	20	20	100.00
	C	22	10	45.45

表3 不同类型芍药芽的萌发情况

Table 3 Germination of different types of *P. lactiflora* buds

品种	芽类型	接入数/个	萌发数/个	萌发率/%
‘粉玉奴’	顶芽	14	2	14.3
	无鳞侧芽	16	7	43.8
	有鳞侧芽	8	2	25.0
‘大富贵’	顶芽	9	2	22.2
	无鳞侧芽	10	3	30.0
	有鳞侧芽	10	4	40.0

11株无菌苗中有8株形成不完全休眠芽, ‘大富贵’ 9株无菌苗中有5株形成不完全休眠芽, 这种不完全休眠芽芽尖开裂, 不再萌发新叶(图1-A)。将2个品种的不完全休眠芽在相同的培养基上再次继代, 个别芽再次萌发, 多数芽保持休眠状态, 并且能够产生新的休眠芽, 形成有红色鳞片包裹的休眠芽丛(图1-B)。对‘粉玉奴’试管休眠芽丛制作石蜡切片, 观察其显微结构, 从图1-C和D中可以看出, 芍药试管休眠芽结构中有顶端分生组织、叶原基和腋芽原基; 芽基部是愈伤组织, 已经分化出表皮, 愈伤组织内具有多个胚性愈伤组织细胞团, 胚性细胞核大且核仁明显, 位于细胞中央, 细胞质浓厚, 生长旺盛, 轮廓清晰, 与周围的非胚性细胞有明显的界限; 周围未分化的细胞为薄壁组织细胞, 形状不规则, 单个细胞的体积大, 颜色淡, 整个细胞质很均一, 细胞核几乎看不到。基部的胚性愈伤组织细胞团具有分化不定芽和不定根的潜能。

2.4 不同6-BA浓度对芍药试管休眠芽生长的影响

不同6-BA浓度对芍药试管休眠芽的诱导和增殖均有显著影响。从表4可以看出, 对照不添加6-BA时, 休眠芽诱导率为40.0%, 增殖系数为1.40, 生

根率为46.7%。添加不同浓度的6-BA后, 休眠芽诱导率较对照均提高, 其中, 6-BA浓度为0.4 mg·L⁻¹时诱导率为57.8%, 显著高于对照。增殖系数随6-BA浓度增加呈现出先增加再降低的趋势, 以6-BA浓度为0.8 mg·L⁻¹最高, 为1.62, 显著高于对照; 其次是0.4 mg·L⁻¹, 达到1.58, 高于对照, 但是与对照差异不显著, 与0.8 mg·L⁻¹ 6-BA时差异也不显著; 6-BA浓度为1.2 mg·L⁻¹时, 增殖系数最低, 为1.38。添加6-BA后, 芍药试管休眠芽的生根率在17.8%~26.7%之间, 显著低于对照, 说明6-BA可以促进休眠芽的生长, 抑制根的发生。综合考虑, 芍药试管休眠芽继代生长时, 6-BA浓度以0.4 mg·L⁻¹为宜。

2.5 不同蔗糖浓度对芍药试管休眠芽生长的影响

蔗糖为试管休眠芽提供碳源和能量, 对试管休眠芽生长有显著影响。从表5可以看出, 蔗糖对休眠芽的诱导和增殖有促进作用, 当蔗糖浓度为15 g·L⁻¹时, 休眠芽诱导率仅32.2%, 增殖系数为1.26, 显著低于其他处理; 随着蔗糖浓度的增加, 休眠芽诱导率和增殖系数呈现先增加再降低的变化趋势, 当蔗糖浓度增加至60 g·L⁻¹时, 休眠芽诱导率最高, 为81.1%, 显著高于其他处理, 增殖系数为1.61, 与

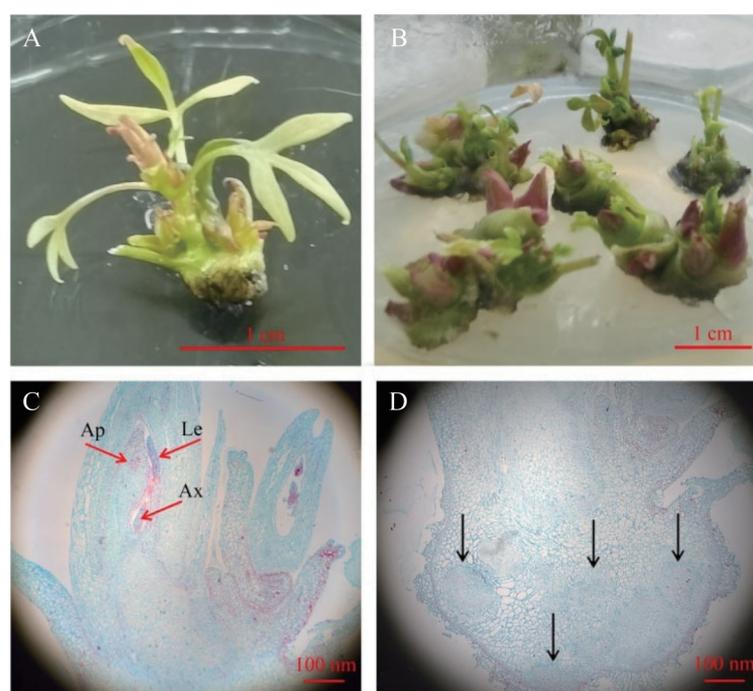


图1 ‘粉玉奴’试管休眠芽及组织解剖结构

Fig. 1 Dormant buds and tissue anatomy of *P. lactiflora* 'Fenyunu' *in vitro*

A: 试管苗形成休眠芽; B: 试管休眠芽增殖; C: 芽解剖结构, Ap: 顶端分生组织, Le: 叶原基, Ax: 腋芽原基; D: 基部解剖结构, 黑色箭头指向胚性细胞团。

表4 不同6-BA浓度对芍药试管休眠芽生长的影响

Table 4 Effects of different 6-BA concentrations on growth of dormant buds of *P. lactiflora* *in vitro*

培养基编号	6-BA浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	休眠芽诱导率/%	增殖系数	生根率/%
CK	0	40.0±2.3 ^b	1.40±0.04 ^{bc}	46.7±2.2 ^a
B1	0.4	57.8±2.6 ^a	1.58±0.09 ^{ab}	17.8±1.7 ^b
B2	0.8	46.7±2.2 ^{ab}	1.62±0.04 ^a	26.7±2.5 ^b
B3	1.2	51.1±1.3 ^{ab}	1.38±0.04 ^c	24.4±1.5 ^b

同列数字后的不同小写字母表示0.05水平有显著差异; 下同。

T2、T3、T5和T6处理差异不显著。在休眠芽生根方面, 少量的蔗糖对生根有促进作用, 当蔗糖浓度为 $45\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 生根率最高, 为16.7%, 但是与T1、T2和T4处理的生根率差异不显著, 蔗糖浓度超过 $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 会抑制生根, 生根率降至7.8%和4.4%, 显著低于其他处理的生根率。综上, 蔗糖浓度为 $30\sim 60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 有利于芍药试管休眠芽的生长, 以 $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时为最佳用量。

2.6 不同温度对芍药试管休眠芽生根萌芽的影响

自然界中芍药具有双休眠特性, 根生长和芽

萌发不同步, 即秋季长根, 春季萌芽, 其中芽的萌发必须经历低温才能打破休眠。因此, 本试验设计不同的温度梯度, 观察不同温度下芍药试管休眠芽萌发和生根表现。从表6中数据可以看出, 在 $4\sim 18^\circ\text{C}$ 范围内, 芍药试管休眠芽可以萌发, 随温度的升高, 萌芽率呈现先增加再降低的趋势, 在 $8\sim 12^\circ\text{C}$ 时, 萌芽率分别为66.7%和83.3%, 二者差异不显著, 均显著高于其他温度下的萌芽率; 超过 18°C 时萌芽率为0。在 $4\sim 25^\circ\text{C}$ 范围内, 生根率随温度的升高亦表现出先增加再降低的趋势, 在12和 15°C

表5 不同蔗糖浓度对芍药试管休眠芽生长的影响

Table 5 Effects of different sucrose concentrations on growth of dormant buds of *P. lactiflora* in vitro

培养基编号	蔗糖浓度/g·L ⁻¹	休眠芽诱导率/%	增殖系数	生根率/%
T1	15	32.2±0.7 ^c	1.26±0.03 ^b	14.4±0.9 ^a
T2	30	58.9±2.8 ^b	1.52±0.05 ^a	13.3±1.6 ^a
T3	45	66.7±2.0 ^b	1.47±0.16 ^a	16.7±1.5 ^a
T4	60	81.1±0.8 ^a	1.61±0.11 ^a	13.3±1.6 ^a
T5	75	60.0±2.3 ^b	1.61±0.07 ^a	7.8±1.2 ^b
T6	90	58.9±2.6 ^b	1.46±0.19 ^a	4.4±1.5 ^b

表6 不同温度对芍药试管休眠芽生根萌芽的影响

Table 6 Effects of different temperatures on rooting and germination of dormant buds of *P. lactiflora* in vitro

温度/°C	萌芽率/%	长叶时间/d	生根率/%	生根时间/d
4	38.9±9.0 ^b	45	13.9±9.2 ^c	40
8	66.7±5.4 ^a	35	25.0±6.8 ^{bc}	30
12	83.3±3.8 ^a	35	72.2±1.8 ^a	15
15	25.0±3.2 ^b	45	77.8±2.0 ^a	15
18	8.3±7.1 ^c	60	41.6±2.8 ^b	10
20	0 ^c	—	27.8±7.1 ^{bc}	10
25	0 ^c	—	25.0±3.2 ^{bc}	5

时,生根率分别为72.2%和77.8%,显著高于其他处理的生根率;不同温度下,试管休眠芽长出叶片和生根所需要的时间也不相同,总之,长叶需要培养35 d以上,而生根需要5~40 d。具体而言,在8~12°C时,休眠芽培养35 d长出叶片,生根时间分别为30 d和15 d,4°C条件下,休眠芽长叶需要培养45 d,生根需要40 d,在18~25°C条件下,5~10 d即可

生根,但是休眠芽不长叶片,说明芍药试管休眠芽生长时先生根再萌芽,生根最适温度比萌芽最适温度高;在4~18°C范围内,可以同时满足芍药试管休眠芽萌芽和生根生长的需要,尤以12°C时试管休眠芽生根和萌芽表现最好(图2-A)。

2.7 芍药试管苗移栽

将生根萌芽的芍药试管苗进行移栽,基质由



图2 ‘粉玉奴’试管休眠芽打破休眠及移栽

Fig. 2 Breaking dormancy and transplanting of dormant buds in vitro of *P. lactiflora* 'Fenyunu'

A: 试管休眠芽打破休眠生根萌芽; B: 试管苗移栽45 d; C: 移栽苗形成新的休眠芽(箭头所示)。

草炭、珍珠岩和蛭石混合而成,栽后盖透明塑料盖保湿2周,然后逐渐通风。45 d可见叶片长大,叶色浓绿(图2-B),90 d左右可以形成新的休眠芽(图2-C)。

3 讨论

芍药是多年生宿根植物,在长期演化过程中形成了冬季休眠的特性,其种子和芽需经过一定的低温过程才能破除休眠而萌发。这种休眠表现为暖温下生根,低温后长芽,根和芽生长所需温度不同,二者具有不同步性,这种特性影响了芍药组培技术研究进程。本研究以芍药根茎芽为外植体,在离体培养条件下诱导其形成休眠芽,筛选出适宜试管休眠芽生长的6-BA浓度和蔗糖浓度,通过调控温度,打破休眠芽休眠,使其生根萌芽,并移栽成活。移栽苗生长一段时间后,能够形成新的根茎芽。本研究建立了利用试管休眠芽进行芍药组培的技术体系,解决了其组培苗生根率低、生长势弱、移栽不成活等难题,为芍药属植物组培技术研究提供了新思路;为芍药良种产业化生产提供了技术支持;同时明确了芍药试管休眠芽生根萌芽的适宜温度,为进一步研究芍药生根与萌芽的机理机制提供了技术参数和试验材料。

植物不定芽的发生与植物体内激素含量和营养物质储备密切相关。6-BA是一种细胞分裂素类物质,能促进细胞分裂,促进芽的发生。现有的芍药的离体培养报道中,芍药试管苗在增殖培养基中,苗基部分化出新生长点,形成具有叶柄和叶片的丛生芽(孙晓梅等2022),6-BA是形成丛生芽的必要条件(刘雪婷等2020)。本研究结果表明,培养基中添加6-BA可以提高芍药试管休眠芽的诱导率和增殖系数,促进休眠芽的生长。说明6-BA既可促进丛生芽增殖,也可促进休眠芽发生。

糖是不可缺少的碳源,不仅为细胞提供合成新化合物的碳骨架,为细胞呼吸和代谢提供底物与能源,还可以维持一定的渗透压。因此,适宜浓度的糖有利于细胞对培养基中各种营养成分和激素的吸收,可以促进芽细胞的分裂生长和休眠芽的萌动,达到增殖的目的(修景润等2011)。非洲菊组培苗增殖培养中,适宜的蔗糖浓度能够促进增

殖苗的苗高、干鲜质量、叶面积和叶绿素含量,过高反而起抑制作用(孙翊等2017);在山薯组织培养中,蔗糖浓度大小对山薯组培苗形态发生有决定性的影响,蔗糖浓度的提高能促进腋芽点芽球的形成,当蔗糖浓度提高到233.9 mmol·L⁻¹时,形成的芽球大多数进一步分化发育成球茎,说明蔗糖既作为碳源底物为植物生长提供能量,也参与培养基溶液渗透压调节,进而影响山薯组培苗形态发生途径(严华兵等2011)。本研究中,蔗糖显著影响芍药休眠芽的形成、增殖及生根,30~60 g·L⁻¹时有利于试管休眠芽分化新的休眠芽,诱导率和增殖系数均较高,高于60 g·L⁻¹时,休眠芽的生长受到抑制,诱导率和增殖系数开始下降,生根率下降尤为显著。推测芍药试管休眠芽的生长受蔗糖浓度影响,其基部胚性愈伤组织细胞团的发育方向受蔗糖提供代谢底物和参与调节培养基溶液渗透压共同作用调控。

芍药种子打破休眠的过程中,下胚轴休眠打破更重要,只有先打破下胚轴休眠再打破上胚轴休眠,种子才能萌发,在15℃条件下处理45 d是打破下胚轴休眠的关键时间点,4℃低温层积28 d是打破上胚轴休眠的关键时间点(费日雯等2017)。本研究结果表明,芍药试管休眠芽打破休眠的过程中,生根需要5~40 d,而萌芽需要35 d以上,遵循先生根再萌芽的生长顺序,与自然界中芍药的生长顺序相同。芍药试管休眠芽在4~25℃范围内均可以生根,但是生根率和生根所需时间不同,生根所需时间随温度升高而缩短,生根率随温度升高呈现先升高再降低的趋势,其中15℃时,生根率最高,与种子打破休眠时下胚轴萌发所需要的温度一致,12℃时试管休眠芽的生根与15℃时生根差异不显著,因此认为,12~15℃是适合芍药试管休眠芽生根的温度范围。休眠芽的萌发与温度密切相关,在4~18℃范围内,芽萌发时间随温度的升高呈现先缩短再延长的变化规律,萌芽率随温度的升高呈现先增加后降低的趋势,其中在12℃时,萌芽率最高,其次是8℃,二者差异不显著,说明试管休眠芽萌发需要的温度为8~12℃。芍药试管休眠芽的萌发最适温度低于生根最适温度,与种子上胚轴打破休眠所需温度低于下胚轴打破休眠所

需温度的结论一致。因此,芍药试管休眠芽打破休眠后的生长规律与种子打破休眠后的生长规律有相似之处,即先生根再萌芽,但是休眠芽的生根和萌芽可以在一个温度(12°C)下完成,种子能否在此条件下同时打破下胚轴休眠和上胚轴休眠,需要进行试验。

由于前期外植体污染率高,得到的无菌试管苗数量少,在试管休眠芽形成方面未进行系统的试验,在今后的研究中,还需要增加外植体数量,同时提高灭菌效率和外植体萌芽发率,以获得足够的无菌试管苗,筛选试管休眠芽诱导的适宜培养条件。

参考文献(References)

- Fei RW, Sun XM, Yang PP, et al (2017). Anatomical obserbation of *Paeonia lactiflora* seeds during stratification process. *J Shenyang Agric Univ*, 48 (3): 354–359 (in Chinese with English abstract) [费日雯, 孙晓梅, 杨盼盼等(2017). 芍药种子变温层积过程中的解剖结构观察. *沈阳农业大学学报*, 48 (3): 354–359]
- Liu XT, Sun XM, Li Y, et al (2020). Study on initiation culture of *Paeonia lactiflora* embryo and induction of multiple shoots. *J Shenyang Agric Univ*, 51 (3): 312–320 (in Chinese with English abstract) [刘雪婷, 孙晓梅, 李妍等(2020). 芍药种胚启动培养及丛生芽诱导研究. *沈阳农业大学学报*, 51 (3): 312–320]
- Qu WJ, Li Q, Liu Y (2014). Contamination control of underground buds in peony tissue culture. *Bull Bot Res*, 34 (4): 524–528 (in Chinese with English abstract) [曲文静, 李青, 刘燕(2014). 芍药组织培养中地下芽污染的克服. *植物研究*, 34 (4): 524–528]
- Shen MM, Wang Q, Yu XN, et al (2012). Micropropagation of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall). *Sci Hortic*, 148: 30–38
- Sun XM, Yang PP, Lu XJ, et al (2015). Establishment of cDNA-AFLP system of *Paeonia lactiflora* seed. *Acta Hortic Sin*, 42 (3): 576–584 (in Chinese with English abstract) [孙晓梅, 杨盼盼, 陆秀君等(2015). 芍药种子cDNA-AFLP体系的建立. *园艺学报*, 42 (3): 576–584]
- Sun XM, Zhang XJ, Pei XH, et al (2022). Optimization of propagation and rooting technique of *Paeonia lactiflora* buds. *J Shenyang Agric Univ*, 53 (1): 16–23 (in Chinese with English abstract) [孙晓梅, 张晓菊, 裴新辉等(2022). 芍药组培丛生芽增殖及生根技术的优化. *沈阳农业大学学报*, 53 (1): 16–23]
- Sun Y, Fei RG, Yin LQ, et al (2017). Effects of basal medium and sucrose on propagation and growth characteristics in *Gerbera jamesonii*. *Nonwood For Res*, 35 (2): 183–187 (in Chinese with English abstract) [孙翊, 费如桂, 殷丽青等(2017). 培养基和蔗糖对非洲菊增殖及其生长特性的影响. *经济林研究*, 35 (2): 183–187]
- Wang JF, Li Q, Meng H (2010). Induction and regeneration of callus tissue in five peony cultivars. *J Beijing For Univ*, 32 (3): 213–216 (in Chinese with English abstract) [王吉凤, 李青, 孟会(2010). 5个芍药品种愈伤组织诱导及分化研究. *北京林业大学学报*, 32 (3): 213–216]
- Wang LH, Zheng LW, Yu XN (2011). Research advances in technology of forcing herbaceous peony and dormancy breaking. *Northern Hortic*, (6): 201–204 (in Chinese with English abstract) [王厉慧, 郑黎文, 于晓南(2011). 观赏芍药促成栽培技术与休眠解除的研究进展. *北方园艺*, (6): 201–204]
- Wu HJ, Shen MM, Yu XN (2011). Multiple shoot induction and rooting of *Paeonia lactiflora* ‘Dafugui’. *J Northeast For Univ*, 39 (9): 20–22 (in Chinese with English abstract) [吴红娟, 沈苗苗, 于晓南(2011). 观赏芍药‘大富贵’丛生芽诱导及生根技术. *东北林业大学学报*, 39 (9): 20–22]
- Xiu JR, Lian ML, Piao CR, et al (2011). Effect of medium componert on callus growth of mountain ginseng in vitro. *J Agric Sci Yanbian Univ*, 33 (2): 99–102 (in Chinese with English abstract) [修景润, 廉美兰, 朴成日等(2011). 培养基成分对山参愈伤组织增殖生长的影响. *延边大学农学学报*, 33 (2): 99–102]
- Yan HB, Yang LT, Li JL, et al (2011). The effecst of different-sucrose concentrations on the growth of *Dioscorea fordii* Prain et Burk. *in vitro* plantlets. *Chin J Trop Crops*, 32 (7): 1325–1329 (in Chinese with English abstract) [严华兵, 杨丽涛, 李俊玲等(2011). 不同蔗糖浓度对山薯组培苗形态发生途径的影响. *热带作物学报*, 32 (7): 1325–1329]
- Zhang RL, Wang XB, Shao LM, et al (2021). Tissue culture and genetic transformation system construction of *Paeonia lactiflora* and *Paeonia suffruticosa*. *Plant Physiol J*, 57 (2): 235–247 (in Chinese with English abstract) [张润龙, 王小斌, 邵灵梅等(2021). 芍药和牡丹的组织培养及遗传转化体系构建. *植物生理学报*, 57 (2): 235–247]
- Zhao DQ, Xue YF, Shi M, et al (2017). Rescue and in vitro culture of herbaceous peony immature embryos by organogenesis. *Sci Hortic*, 21 (7): 123–129
- Zheng LW, Wu HJ, Yu XN, et al (2011). Studies on the microprapagation and rejuvenation of the hyperhydric plantlets of *Paeonia lactiflora* ‘Zhong Sheng Fen’. *Fore Res*, 24 (3): 379–384 (in Chinese with English abstract) [郑黎文, 吴红娟, 于晓南等(2011). 芍药‘种生粉’离体芽培养及玻璃化苗复壮研究. *林业科学研究*, 24 (3): 379–384]