

GA₃、6-BA 和根长对牡丹凤丹白成熟胚解除上胚轴休眠的影响

贺 丹,吕博雅,王雪玲,高小峰,王 政,刘艺平,何松林*
(河南农业大学 林学院,河南 郑州 450002)

摘要: 为了缩短牡丹无性繁殖周期,以凤丹白(*Paeonia ostii* ‘Fengdanbai’)种子为材料,研究植物生长调节剂 GA₃、6-BA 及根长对牡丹凤丹白成熟胚解除上胚轴休眠的影响,探讨能够快速解除上胚轴休眠的适宜植物生长调节剂配比和根长。植物生长调节剂试验结果表明,在未添加植物生长调节剂的对照中,上胚轴未萌动;添加不同浓度的植物生长调节剂后,上胚轴均能在 2~5 d 内萌动,其中最快打破上胚轴休眠的处理是 6-BA 0.1 mg/L + GA₃ 1.0 mg/L,而较快打破休眠且诱导出的胚苗生长状况最佳的处理为 6-BA 0.5 mg/L + GA₃ 1.0 mg/L。根长度试验结果表明:不同根长度对解除上胚轴休眠有一定的影响,根长 0~1、4~5 cm 时打破上胚轴休眠所需时间最短,但以根长为 3~4 cm 能较快打破上胚轴休眠且成苗率和真叶抽生率最高,成苗的各项形态指标较优,同时对胚苗可溶性糖、淀粉及可溶性蛋白含量的测定结果均验证了适宜的根长度为 3~4 cm。综上,当凤丹白离体成熟胚胚苗根长长至 3~4 cm 时,使用 1.0 mg/L GA₃ 和 0.5 mg/L 6-BA 同时处理,既可快速打破上胚轴休眠缩短成苗时间,又可收获品质较好的种苗。

关键词: 牡丹;根长;胚;休眠;植物生长调节剂
中图分类号: S685.11 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2015)10-0122-05

Effects of Exogenous Hormone GA₃, 6-BA and Root Length on Breaking of Epicotyls Dormancy of *Paeonia ostii* ‘Fengdanbai’ Mature Embryo

HE Dan, LÜ Boya, WANG Xueling, GAO Xiaofeng, WANG Zheng, LIU Yiping, HE Songlin*
(College of Forestry, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The effects of exogenous hormone and root length on breaking of epicotyls dormancy of *Paeonia ostii* ‘Fengdanbai’ mature embryo were studied, so as to explore the suitable hormone ratio and root length for shorting the breeding cycle. The results showed that in the CK, the epicotyls didn’t sprout. After adding the different concentration of hormone, the epicotyls sprouted in 2—5 d, the fastest ratio of hormones which could break the dormancy was 6-BA of 0.1 mg/L + GA₃ of 1.0 mg/L. While the best treatment which could break the dormancy quickly and increase seedlings rate was 6-BA of 0.5 mg/L + GA₃ of 1.0 mg/L. Different root length had a certain influence on epicotyls dormancy, When the root length were 0—1 cm, 4—5 cm, the time of breaking epicotyls dormancy was the shortest. However when the root length was 3—4 cm, the plant percent and true leaf extraction rate reached the highest level, meanwhile the breaking dormancy and the morphological indexes of plants seemed well. The test of soluble sugar, starch and protein content of seeding also verified that the proper root length was 3—4 cm. Overall, when the root length of *Paeonia ostii* ‘Fengdanbai’ mature embryo was 3—4 cm, treating with 1.0 mg/L GA₃ +

收稿日期:2015-05-20
基金项目:国家自然科学基金项目(31272189);国家科技成果转化项目(2012D0001018);郑州市创新团队项目(10CXTD147);河南农业大学科技创新基金项目(30600965);河南农业大学博士启动基金项目(30600408)
作者简介:贺 丹(1983-),女,河南新乡人,讲师,博士,主要从事园林植物遗传育种。E-mail:dandan990111@163.com
* 通讯作者:何松林(1965-),男,河南郑州人,教授,博士,主要从事园林植物研究。E-mail:hsl213@163.com

0.5 mg/L 6-BA could quickly break the epicotyls dormancy,short the breeding cycle,and abtain sprout with the good quanlity.

Key words: *Paeonia ostii*; root length; embryo; dormancy; exogenous hormone

牡丹(*Paeonia suffruticosa*)通常采用种子繁殖,但其种子具有休眠特性,包括上胚轴及下胚轴休眠,其中上胚轴休眠更为显著,从播种到长出幼苗,一般需要 8 个月甚至更长时间,且成苗率也不高,限制了牡丹的规模化生产,而利用成熟胚培养可缩短牡丹繁育周期及保持母株的优良性状^[1-4]。因此,开展牡丹解除上胚轴休眠研究,对牡丹规模化生产具有重要意义。胚培养可用于挽救杂种胚败育、打破种子休眠、缩短育种周期、提高发芽率等^[5-7],在小麦、橄榄、樱桃、梅花等植物中已取得了一定进展^[8-12]。而在牡丹育种中,利用胚培养技术能够实现缩短繁育周期、保持母株优良性状等的育种目标^[3-4]。郑相穆等^[1]研究表明,凤丹种子长出胚根后,会合成特定的促进物与内源激素相互协调,从而打破上胚轴休眠促进胚芽生长,利用 GA₃ 处理凤丹种子可以显著提高萌发率。林松明等^[13]研究表明,6-BA 对于凤丹种子上胚轴休眠的打破也有显著作用,而且认为种子的发芽率与 6-BA 浓度呈负相关。在田间试验中,植物生长调节剂和根长对解除上胚轴休眠有很大影响,但关于植物生长调节剂和根长对成熟胚打破上胚轴休眠的影响尚未见报道。鉴于此,以凤丹白成熟胚为试验材料,研究了不同质量浓度

GA₃、6-BA 配比以及根长度对凤丹白成熟胚打破上胚轴休眠的影响,以期为牡丹成熟胚培养提供理论基础和技术依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为 2013 年 8 月中旬采自河南农业大学第三试验区的大小一致、籽粒饱满、无病虫害的凤丹白种子。

1.2 方法

成熟胚处理:将采收得到的凤丹白种子放置到无菌超净工作台上进行消毒,然后放在培养皿上,用镊子取出幼胚,接种到 MS 基本培养基中,每瓶(40 mL)接种 3 个幼胚,每个处理接种 15 瓶,置于光照培养箱中,温度设定为(22±1)℃,黑暗培养。

GA₃、6-BA 连用对上胚轴休眠的解除:以 MS + 30 g/L 蔗糖 + 7 g/L 琼脂 + 1 g/L PVP 为对照组(CK),在对照基础上添加不同质量浓度的 GA₃、6-BA,每个处理接种 15 瓶,每瓶接种 3 个幼胚。定期观察培养物污染、褐化、愈伤、子叶生长状况、上胚轴、真叶抽生率等生长表现。30 d 后统计后统计胚苗各项指标。各处理组合如表 1 所示。

表 1 不同处理添加 GA₃ 和 6-BA 的质量浓度 mg/L

植物生长 调节剂	处理组合编号												
	CK	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
GA ₃	—	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5
6—BA	—	—	—	—	0.1	0.1	0.1	0.5	0.5	0.5	1.0	1.0	1.0

根长度对上胚轴休眠的影响:待黑暗培养的种胚根长分别生长至 0~1、1~2、2~3、3~4、4~5 cm 时转接到添加 6-BA 0.5 mg/L + GA₃ 1.0 mg/L 培养基上(记录根长生长所需时间),每瓶接种 3 个,每个处理接种 15 瓶,培养条件为温度(24±1)℃、光照强度 36 μmol/(m²·s)、光照时间 12 h/d,定期观察培养物污染、褐化、愈伤、子叶生长状况、上胚轴、真叶抽生率等生长表现,30 d 后统计各项指标,并且每组处理随机选取胚苗 10 株进行混合,混匀后分别测定可溶性糖、淀粉以及可溶性蛋白含量,均重复 3 次。可溶性糖含量、淀粉含量、可溶性蛋白含量分别参照赵世杰等^[14]的苯酚法、蒽酮法、考马斯亮蓝法测定。

真叶抽生率 = 长出真叶株数/诱导株数 × 100%,成苗率 = 成苗数/接种数 × 100%。

1.3 数据分析

本试验数据处理均采用邓肯氏新复极差测验法(SSR 法)测验其差异显著性,显著水平 P≤0.05。数据统计采用 DPS 和 Excel 2003 软件进行处理。

2 结果与分析

2.1 添加 GA₃、6-BA 对凤丹白上胚轴休眠解除的影响

从表 2 可以看出,在未添加植物生长调节剂的对照中,上胚轴未萌动。将胚苗接入到添加不同质量浓度植物生长调节剂的培养基中后,上胚轴在 2~

5 d 内萌动,其中萌动最早的为处理 4、处理 5、处理 6、处理 9;最先长出真叶的为处理 5。从胚苗生长状况来看,在不添加任何植物生长调节剂的 MS 培养基上胚苗不能长出真叶,未发育成正常植株。在添加植物生长调节剂的处理中,真叶抽生率以及成苗

率最高的均为处理 8,另外,包括对照在内的各处理下的胚苗均存在褐化现象,处理 9 褐化最严重;对照处理和只添加低浓度 GA_3 的胚苗未出现愈伤化的现象,愈伤化比较严重的为添加植物生长调节剂浓度较高的处理 10、处理 11 和处理 12。

表 2 不同植物生长调节剂对凤丹白胚苗生长的影响

处理	初萌期/ d	长出真叶 时间/d	褐化	愈伤	子叶 畸形	真叶抽生率/ %	成苗率/ %
CK	—	—	+	—	—	0	0
1	3~4	15~17	+	—	+(—)	65.52	64.71
2	4~5	17~18	+	—	+(—)	61.76	56.25
3	3~4	15~17	+	+(—)	+	78.57	71.43
4	2~3	15~16	+	+(—)	+(—)	73.81	57.14
5	2~3	10~12	+	+(—)	+	91.49	80.85
6	2~3	13~15	+	+(—)	++	86.84	85.71
7	3~4	13~14	+	+(—)	++	84.88	80.00
8	3~4	13~14	+	+	++	97.87	91.49
9	2~3	15~17	+++	+(—)	+++	80.49	70.73
10	4~5	15~17	++	++	+++	91.49	85.11
11	4~5	13~14	++	++	+++	91.89	89.19
12	3~4	11~13	++	++	++	91.67	86.11

注:—表示现象没有发生;+表示程度一般;++表示程度严重;+++表示程度非常严重;+(—)表示存在明显的个体差异。

2.2 根长度对凤丹白上胚轴休眠解除的影响

2.2.1 根长对打破上胚轴休眠及胚苗生长的影响

从表 3 可以看出,在相同培养条件下,根长对上胚轴打破休眠的时间有一定的影响,其中处理 1 和处理 5 打破上胚轴休眠所需时间最短,从转入处理培养基到上胚轴萌动仅需 2~3 d,处理 4 次之,需要

2~4 d。从胚苗生长情况来看,处理 4 的生长状况最佳,成苗率相对最高达到 87.80%,其真叶抽生率也达到最高 93.75%,同时,黄化率最低,为 6.25%。在培养过程中,各个处理均出现不同程度的褐化、愈伤、子叶畸形、黄化的现象,同时根长越长,褐化和愈伤情况越严重。

表 3 不同根长对凤丹白胚苗生长的影响

处理	根长/cm	初萌期/d	褐化	愈伤	子叶畸形	黄化率/%	真叶抽生率/%	成苗率/%
1	0~1	2~3	+(—)	+(—)	+++	18.42	89.47	81.57
2	1~2	3~5	+	++	++	23.33	93.33	73.33
3	2~3	4~5	++	+(—)	+(—)	56.00	92.00	80.00
4	3~4	2~4	+(—)	++	+(—)	6.25	93.75	87.80
5	4~5	2~3	+++	+++	+(—)	36.00	92.00	72.00

注:—表示程度一般;++表示程度严重;+++表示程度非常严重;+(—)表示存在明显的个体差异。

2.2.2 根长对胚苗可溶性糖、淀粉及可溶性蛋白含量的影响 从表 4 可以看出,随着根长的增加,可溶性糖含量呈现上升的趋势,变化较平稳,差异不显著($P>0.05$),其中处理 5 可溶性糖含量达到最大,为 0.52%,处理 3 的可溶性糖含量最低;淀粉含量总体呈现下降的趋势,其中处理 1 和处理 2 含量最高,处理 4 含量最小;可溶性蛋白含量呈下降—上升—下降的趋势,其最大值为处理 4,且与其他处理差异显著;处理 2 可溶性蛋白含量最低,为 0.22 mg/g,与其他处理差异显著。

表 4 不同根长对凤丹白胚苗可溶性糖、淀粉、可溶性蛋白含量的影响

处理	根长/cm	可溶性 糖/%	淀粉/ (mg/g)	可溶性蛋 白/(mg/g)
1	0~1	0.44a	0.22a	0.38bc
2	1~2	0.47a	0.22a	0.22c
3	2~3	0.40a	0.20ab	0.56b
4	3~4	0.49a	0.15b	0.98a
5	4~5	0.52a	0.16ab	0.64b

注:同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

3 结论与讨论

3.1 添加 GA₃、6-BA 对凤丹白胚苗上胚轴休眠解除的影响

植物离体培养时,生长调节机制不协调,需要外加生长调节剂来诱导特定器官或组织^[3]。GA₃ 在植物的发育过程中起着重要的作用,有利于细胞的纵向伸长即打破休眠^[15-16]。在种子开始打破休眠即萌动初期,GA₃ 可以利用种子储存的物质并刺激胚的伸长生长^[17]。尚旭岚等^[18]在青钱柳离体胚培养试验中证实了 GA₃ 的这种作用,认为青钱柳启动胚的萌发以 10 mg/L 的高浓度最佳,且 GA₃ 在成苗过程中有着一定的抑制作用。所以成熟胚培养单独使用 GA₃ 处理效果不佳。植物的休眠和打破休眠往往不是单个激素因子的作用,激素在发挥其生理作用时并不是孤立的^[19-20]。适宜浓度的 6-BA 能够促进芽的形成,也可以诱导愈伤组织的发生,是牡丹离体胚萌发所必需的植物生长调节物质^[15,19]。何桂梅等^[21]研究表明,6-BA 1.0 mg/L 对牡丹幼胚子叶的扩大、胚轴增粗有明显的促进作用,但是其浓度不能超过 2.0 mg/L,若超过会抑制上胚轴萌动。张小红等^[22]在小麦成熟胚植株再生试验中认为使愈伤组织分化率最高的处理是 2.0 mg/L 6-BA。严慧玲等^[23]认为甘蓝材料最适宜增殖的处理是 6-BA 0.5 mg/L,且不同材料的适宜 6-BA 浓度均不同。

本试验采用 GA₃ 和 6-BA 处理凤丹白离体成熟胚,结果表明,最快打破上胚轴休眠的植物生长调节剂配比是 6-BA 0.1 mg/L + GA₃ 1.0 mg/L,但 6-BA 0.5 mg/L + GA₃ 1.0 mg/L 的组合打破休眠所用时间也较短,且真叶抽生率和成苗率达到最高,胚苗生长状况也最好,综合以上试验结果认为,能够较快打破上胚轴休眠且诱导出的种苗成苗率高的最优配比为 6-BA 0.5 mg/L + GA₃ 1.0 mg/L。

同时,试验中还发现,在 2 种植物生长调节剂浓度上升时,胚苗出现了褐化和愈伤化的现象,但基本无玻璃化现象,这与何桂梅等^[21]的研究结果不同,之所以出现这样的差别可能与胚培养时期不同有关,而关于如何在提高成苗率的同时避免褐化和愈伤的产生还需要进一步的研究。

3.2 根长度对凤丹白胚苗上胚轴休眠解除的影响

牡丹离体胚具有上胚轴休眠的现象,在不添加任何植物生长调节剂的 MS 培养基上,离体胚只能进行胚轴伸长生长,长出胚根。而田间试验表明,不同的根长度对解除上胚轴休眠有一定的影响^[24]。

研究认为,凤丹种子胚根长到 4 cm 以上所采取的解除上胚轴休眠的方法最有效,因为此时上胚轴已达到感受低温或激素刺激信号所需的生长量^[1-2,24-27]。马宏等^[28]在大花黄牡丹种子解除休眠的试验中发现待根长长至 3 cm 时,打破上胚轴休眠最佳。

本研究结果表明,根长至 0~1 cm 和 4~5 cm 时通过植物生长调节剂打破上胚轴休眠所需时间最短,但最终的胚苗褐化和愈伤较为严重,根长为 3~4 cm 时使用植物生长调节剂打破休眠获得的胚苗所需时间也较短,同时其成苗率最高,胚苗生长状况最好,与马宏等^[28]的研究结果一致。

在胚生长发育过程中,淀粉降解的速度以及呼吸消耗速度直接影响着可溶性糖的含量,因此可溶性糖的绝对含量通常作为判定植株内可利用物质和能量基础的指标^[29]。对于植物来说,其体内有 50% 以上的可溶性蛋白是酶蛋白,所以,可溶性蛋白含量代表了植物体内各种代谢能力的强弱,与胚体的生长密切相关。通过对不同根长胚苗可溶性糖、淀粉及可溶性蛋白含量测定结果显示,各不同根长的胚苗可溶性糖含量波动幅度较小,表明各处理胚苗的物质和能量基础差异不大;淀粉含量以处理 4 (根长 3~4 cm) 最低,表明胚苗代谢活动要高于其他处理,显示了它在调动可利用糖类物质的能力方面优于其他处理。同时处理 4 (根长 3~4 cm) 的可溶性蛋白含量也最高,且与其他处理有明显差异性。因此,结合胚苗形态指标和生长情况,本试验认为 3~4 cm 是较适宜的打破上胚轴休眠的根长,既能快速打破休眠,也可获得品质优良的胚苗。

牡丹传统的无性繁殖受季节影响限制,无法实现快繁,利用成熟胚培养可以缩短繁育周期以及保持母株优良性状。关于凤丹白离体成熟胚培养,本试验认为当胚苗根长长至 3~4 cm 时,使用 1.0 mg/L GA₃ 和 0.5 mg/L 6-BA 同时处理,可以达到快速打破上胚轴休眠,且收获的种苗品质较好的效果。

参考文献:

- [1] 郑相穆,周阮宝,谷丽萍,等. 凤丹种子的休眠和萌发特性[J]. 植物生理学通讯,1995,31(4):260-262.
- [2] 刘心民,程逸远,张霁,等. 牡丹种子萌发特性与播种繁殖技术研究进展[J]. 河南林业科技,2005,25(4):38-40.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 于茜茜. 转基因 741 杨杂种胚培养与植株再生[J]. 东

- 北林业大学学报,2013,41(10):65-68.
- [6] 曾端香,袁涛,王莲英,等.两个牡丹杂交系种子胚培养技术研究[J].热带农业科学,2011,31(3):8-12.
- [7] 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.
- [8] 吕秀立,施季森.欧洲七叶树的离体培养及快速繁殖[J].南京林业大学学报:自然科学版,2004,28(3):41-44.
- [9] 李新玲,曲敏,闫玉清,等.影响小麦成熟胚培养及植株再生因素的研究[J].植物研究,2005,25(1):49-52.
- [10] 蔡汉权,赖钟雄,蔡燕文,等.橄榄成熟胚培养研究[J].江西农业大学学报,2005,27(4):548-552.
- [11] 杨红花,秦宏伟.樱桃种间杂种成熟胚培养及 RAPD 鉴定[J].西北植物学报,2009,29(6):1097-1103.
- [12] 陈瑞丹,张启翔,李青.梅花杂交种成熟胚培养及其无性系建立的初步研究[J].北京林业大学学报,2003,25(S2):46-48.
- [13] 林松明,徐迎春,蔡志仁,等.打破凤丹种子上胚轴休眠的研究[J].江苏农业科学,2006(1):84-86.
- [14] 赵世杰,刘华山,董新纯.植物生理学实验指导[M].北京:中国农业科技出版社,1998.
- [15] 陈怡平,丁兰,赵敏桂.用紫斑牡丹不同外植体诱导愈伤组织的研究[J].西北师范大学学报:自然科学版,2001,37(3):66-69.
- [16] 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.
- [17] 杨荣超,张海军,王倩,等.植物激素对种子休眠和萌发调控机理的研究进展[J].草地学报,2012,20(1):1-9.
- [18] 尚旭岚,徐锡增,方升佐.青钱柳离体胚的培养及快速繁殖[J].南京林业大学学报:自然科学版,2007,31(1):101-105.
- [19] 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.
- [20] 吕晓倩,王翠梅,董然然,等.不同预处理对‘香瑞白’梅种子萌发的影响[J].东北林业大学学报,2014,42(5):30-33.
- [21] 何桂梅,成仿云,李萍.两种牡丹胚珠与幼胚离体培养的初步研究[J].园艺学报,2006,33(1):185.
- [22] 张小红,赵雪晶,李波,等.小麦成熟胚离体培养及植株再生技术优化[J].草业学报,2013,22(4):334-339.
- [23] 严慧玲,方智远,刘玉梅,等.外源植物激素对甘蓝显性雄性不育材料离体快繁的影响[J].热带农业科学,2013,33(8):29-33.
- [24] 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.
- [25] 刘秀贤,张艳丽,马宏,等.滇牡丹种子休眠解除效应研究[J].种子,2013,32(2):9-12.
- [26] 黄青云.解除休眠处理对凤丹种子萌发和幼苗生长的影响[J].亚热带植物科学,2008,37(4):35-37.
- [27] 高水平,范丙友,刘改秀,等.牡丹、芍药种子上胚轴休眠解除效应初步研究[J].北方园艺,2008(5):116-118.
- [28] 马宏,李正红,张艳丽,等.大花黄牡丹种子休眠的解除[J].林业科学,2012,48(9):62-67.
- [29] 涂淑萍,穆鼎,刘春.百合鳞茎低温解除休眠过程中的生理生化变化研究[J].江西农业大学学报,2005,27(3):404-407.