

网络出版时间:2023-11-01 13:34 DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2024.05.012  
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/61.1390.S.20231031.1640.012

# 继代培养周期对‘正午’牡丹不定根发生及生理指标的影响

文书生,崔慧颖,孙薛莹,朱葛

(南京林业大学 风景园林学院,江苏 南京 210037)

【摘要】【目的】研究继代培养周期对牡丹试管苗不定根发生的影响及其生理机制,为牡丹试管苗工厂化生产提供参考。【方法】以‘正午’牡丹试管苗为材料,在增殖培养过程中定期(20,30,40,50,60 d)选取单芽进行生根培养,测定试管苗生根指标(生根率、平均根数、平均根长)和不同培养时期内源激素吲哚乙酸(IAA)、脱落酸(ABA)、细胞分裂素(ZR)和赤霉素(GA<sub>3</sub>)含量,过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)、吲哚乙酸氧化酶(IAAO)活性,以及可溶性糖、可溶性蛋白和总酚含量,分析生根状况与生理指标的相关性。【结果】‘正午’牡丹继代培养 40 d 的试管苗生根效果最佳,此时的生根率(30.86%)显著高于其他处理,平均根数 1.17 条,平均根长 0.83 cm,愈伤组织小,生根质量较高。继代培养过程中,内源激素 IAA、ABA、ZR 含量的动态变化一致,而 GA<sub>3</sub> 含量与之相反;IAA、ABA 含量与平均根数呈显著正相关,而 GA<sub>3</sub> 含量与平均根数呈显著负相关;IAA/ZR、IAA/GA<sub>3</sub> 与平均根数呈显著和极显著正相关。POD、PPO、IAAO 活性波动较大,其中 PPO 活性与生根率呈显著负相关,IAAO 活性与平均根数呈显著正相关。可溶性糖含量与生根率呈极显著正相关。【结论】‘正午’牡丹试管苗的最佳继代培养周期为 40 d,该时期试管苗的生理状态更适宜生根,IAA、可溶性糖含量对试管苗生根的正向影响较大。

【关键词】‘正午’牡丹;继代培养周期;不定根;生根率

【中图分类号】S685.11

【文献标志码】A

【文章编号】1671-9387(2024)05-0124-09

## Effect of subculture cycle on *in vitro* adventitious rooting of *Paeonia × lemoinei* ‘High Noon’ and related physiological indexes

WEN Shusheng, CUI Huiying, SUN Xueying, ZHU Ge

(College of Landscape Architecture, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037, China)

**Abstract:**【Objective】The influence of subculture cycle on *in vitro* adventitious rooting of peony and its physiological mechanism were studied to provide reference for factory production of peony seedlings. 【Method】Single buds of *Paeonia × lemoinei* ‘High Noon’ *in vitro* were selected for root transfer culture periodically (20,30,40,50 and 60 days) during the proliferation and culture process. Rooting indicators of rooting rate, average number of roots and average root length, contents of endogenous hormones including indoleacetic acid (IAA), abscisic acid (ABA), zeatin riboside (ZR) and gibberellins (GA<sub>3</sub>), activities of enzymes such as peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO) and indoleacetic acid oxidase (IAAO), and contents of soluble sugar, soluble protein and total phenol were measured and their correlations were analyzed. 【Result】The rooting rate (30.86%) of *Paeonia × lemoinei* ‘High Noon’ *in vitro* seedlings subcul-

【收稿日期】2023-04-19

【基金项目】国家自然科学基金项目(32001359);南京林业大学大学生创新训练计划项目(2021NFU-SPITP0015)

【作者简介】文书生(1988—),女,安徽六安人,副教授,博士,硕士生导师,主要从事园林繁殖栽培与生物技术研究。

E-mail:shusheng0507@126.com

tured for 40 days was significantly higher than other treatments. The treatment also had average number of roots of 1.17, average root length of 0.83 cm, smaller callus and higher rooting quality. During subculture, changes of IAA, ABA and ZR contents were identical, whereas  $GA_3$  exhibited an inverse trend. Contents of IAA and ABA were positively correlated with average number of roots. The content of  $GA_3$  was negatively correlated with average number of roots. IAA/ZR and IAA/ $GA_3$  had significantly positive correlation with average number of roots. Activities of POD, PPO and IAAO fluctuated greatly, among which PPO activity was negatively correlated with rooting rate, while IAAO activity was positively correlated with average number of roots. Soluble sugar content was positively correlated with rooting rate, while soluble protein content was not. There was no significant correlation between total phenol content and rooting indexes.

**【Conclusion】** The length of 40 days was the best subculture period for *Paeonia*  $\times$  *lemoinei* ‘High Noon’ *in vitro* with physiological state more suitable for rooting, and contents of IAA and soluble sugar had greater positive effects on seedling rooting.

**Key words:** *Paeonia*  $\times$  *lemoinei* ‘High Noon’; subculture cycle; root; rooting rate

牡丹(*Paeonia* sect. *Moutan*)是芍药科芍药属的落叶亚灌木、中国传统十大名花之一,素有“花中之王”的美誉,至今已有 1 600 余年的栽培历史<sup>[1]</sup>。近年来,随着牡丹籽的油用价值逐渐被挖掘,牡丹成为了一种集观赏、药用和食用保健于一体的重要经济植物,具有巨大的市场需求。与传统繁殖方法(播种、扦插)相比,微繁殖技术具有繁殖系数高、周期短、不受时间限制等优势,被认为是商业化繁殖牡丹的最佳途径。牡丹微繁殖技术研究始于 1984 年<sup>[2]</sup>,目前已初步构建了基本技术体系。长期以来,牡丹试管苗生根技术研究主要集中于生根阶段的生长素筛选、生根方式改良和培养条件优化等方面,并初步构建了试管苗生根技术体系,但生根率仅为 30%~80%,甚至多数牡丹品种仍未获得生根苗,这显然无法满足高效生产的需求<sup>[3]</sup>。因此,提高牡丹试管苗生根率成为突破其微繁殖技术的首要问题。

目前关于牡丹试管苗不定根发生机理的研究主要集中在细胞组织学观察、生理指标测定以及分子调控方面。前人通过石蜡切片观察发现,牡丹不定根发生属于诱生根原基生根型,其不定根根原基主要源于维管束形成层细胞,也存在愈伤组织分化不定根的现象<sup>[4-5]</sup>。不定根发生依赖于外源生长素诱导,外源生长素诱导牡丹试管苗不定根发生过程中会影响其内源激素水平和氧化酶活性,牡丹不定根诱导需要高水平的内源生长素和氧化酶活性,但其伸长生长不需要高水平的内源激素<sup>[4,6]</sup>。研究表明,过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)和吲哚乙酸氧化酶(IAAO)与植物不定根发生密切相关<sup>[4]</sup>。此外,牡丹茎内富含多种酚类物质和单萜类物质,例如芍药酮、香草酮和芍药苷等,其与不定根发生也存在

密切关联<sup>[7-8]</sup>。近年来随着分子生物学技术的迅速发展,对牡丹不定根发生机理的研究逐渐发展到分子水平,目前已鉴定了 1 个与不定根发生相关的基因和蛋白<sup>[9-10]</sup>。但总体而言,有关牡丹试管苗生根机理的研究仍较少。

目前有关牡丹最佳继代培养周期的研究集中于生根指标上。Harris 等<sup>[11]</sup>研究发现,继代周期 5 周获得的牡丹试管苗生根率显著高于 3 周和 4 周。随后, Bouza 等<sup>[12]</sup>研究发现,以 5 周为继代周期获得的试管苗内源激素吲哚乙酸(IAA)大量积累,吲哚丁酸(IBA)却大幅减少,因而促进了生根。‘紫斑’牡丹(*P. suffruticosa* var. *Papaveracea*)<sup>[11]</sup>和‘凤丹’牡丹(*P. ostii* ‘Feng Dan’)<sup>[13]</sup>都以 35 d 为继代培养周期获得的试管苗生根效果最佳。但是继代培养中试管苗的生理状态对不定根发生的影响机理仍鲜见报道。

‘正午’牡丹(*Paeonia*  $\times$  *lemoinei* ‘High Noon’)是美国著名育种家 Sunders 于 1952 年育出的一个亚组间杂种(*P. delavayi*  $\times$  *P. suffruticosa*)<sup>[14]</sup>,花黄色呈荷花型,一年可多次开花,适应性强,生产与应用前景广阔。本研究在‘正午’牡丹品种微繁殖技术体系<sup>[15]</sup>基础上,以其试管苗为材料,探究继代培养周期对试管苗生根及相关生理指标的影响,明确适用于生根的牡丹试管苗生理状态,以期牡丹试管苗工厂化生产提供技术支持和理论支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料及增殖培养

根据前人建立的牡丹‘正午’微繁殖技术体系,以生长状况良好的‘正午’牡丹试管苗为材料进行组

织培养,于第 9 次继代培养末期选取茎长约 1.0 cm 的健壮单芽为试验材料,将其接种到增殖培养基(WPM (Ca<sup>2+</sup> 加倍)+6-BA 0.5 mg/L+赤霉素(GA<sub>3</sub>)0.2 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6.5 g/L (pH=5.8))上,于南京林业大学风景园林学院组培室进行培养,培养温度(24±1)℃,光照强度 32.4 μmol/(m<sup>2</sup>·s)(荧光灯),光照周期 14 h/d,后续生根试验若无特殊说明,培养条件同此。

1.2 试验方法

1.2.1 生根培养 增殖培养过程中,定期(20,30,40,50,60 d)选取茎长约 1.0 cm 的健壮单芽进行生根培养,采用两步生根法,即先将试管苗接种于根诱导培养基(1/2MS (Ca<sup>2+</sup> 加倍)+腐胺 1.0 mL/L+IBA 1.0 mg/L)上,暗培养 30 d 以诱导根原基;再将试管苗转入根形成培养基(1/2MS (Ca<sup>2+</sup> 加倍)+活性炭 2.0 g/L)上,培养 20 d 以诱导根形成,促进根的伸长生长。生根培养结束后,观察记录生根率、根数、根长和愈伤组织等级(按愈伤组织直径分级)。

1.2.2 生理指标的测定 增殖培养过程中定期(0,20,30,40,50,60 d)取材,随机取长势一致的试管苗剪碎后充分混匀,液氮固定后置于一80℃冰箱保存备用。(1)激素含量。称取 0.3 g 样品,采用酶联免疫法分别测定内源激素吲哚乙酸(IAA)、脱落酸(ABA)、细胞分裂素(ZR)和赤霉素(GA<sub>3</sub>)含量。

(2)酶活性。称取 1.0 g 样品,分别测定过氧化

物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)、吲哚乙酸氧化酶(IAAO)活性,其中 POD 活性参照愈创木酚法<sup>[16]</sup>测定,PPO 活性参照邻苯二酚法<sup>[16]</sup>测定,IAAO 活性参照李合生<sup>[16]</sup>的方法测定。

(3)营养物质含量。称取 0.2 g 样品,用蒽酮比色法<sup>[16]</sup>测定可溶性糖含量;称取 0.15 g 样品,用考马斯亮蓝法<sup>[16]</sup>测定可溶性蛋白含量。

(4)总酚含量。称取 6.0 g 样品,60℃下烘干后研磨取 0.1 g,采用植物总酚试剂盒(购于苏州科铭生物技术有限公司)测定总酚含量。

1.3 数据统计与分析

试验均设 3 次重复,生根试验每重复 27 株试管苗。试验数据采用 SPSS 18.0 软件 One-Way ANOVA 及 LSD 法检验差异显著性;利用皮尔逊法分析生理指标与生根能力的相关性;利用 Origin 软件制图。

2 结果与分析

2.1 继代培养周期对牡丹试管苗生根的影响

由表 1 可以看出,继代培养周期对‘正午’牡丹试管苗生根存在较大影响。生根率随着继代培养周期的延长呈先升高后降低的趋势,在继代培养 40 d 时生根率达到最大值,且显著高于其他继代培养时期,生根质量较高,平均根数 1.17 条,平均根长 0.83 cm,试管苗基部愈伤组织较少。

表 1 继代培养周期对‘正午’牡丹试管苗生根的影响

Table 1 Effects of subculture cycle on rooting and growth of *Paeonia × lemoinei* ‘High Noon’

| 继代培养周期/d<br>Subculture cycle | 生根率/%<br>Rooting rate | 平均根数<br>Root number | 平均根长/cm<br>Root length | 愈伤组织等级<br>Callus classification |
|------------------------------|-----------------------|---------------------|------------------------|---------------------------------|
| 20                           | 12.35±5.66 c          | 1.18±0.17 b         | 0.46±0.04 b            | ++                              |
| 30                           | 22.22±0.00 b          | 1.56±0.20 ab        | 0.46±0.16 b            | ++                              |
| 40                           | 30.86±2.14 a          | 1.17±0.14 b         | 0.83±0.08 a            | +                               |
| 50                           | 22.22±0.00 b          | 1.44±0.25 a         | 0.60±0.29 ab           | +                               |
| 60                           | 22.22±3.70 b          | 1.73±0.07 ab        | 0.63±0.14 ab           | +                               |

注:表中数据为“均值±标准差”。同列数据后标不同小写字母表示在 P<0.05 水平差异显著。++、0.3 cm≤愈伤组织直径<1.0 cm;+、愈伤组织直径<0.3 cm。

Note: Data represent “means±standard error”. Different lowercase letters indicate significant differences at P<0.05. ++、0.3 cm≤Callus diameter <1.0 cm;+、Callus diameter <0.3 cm.

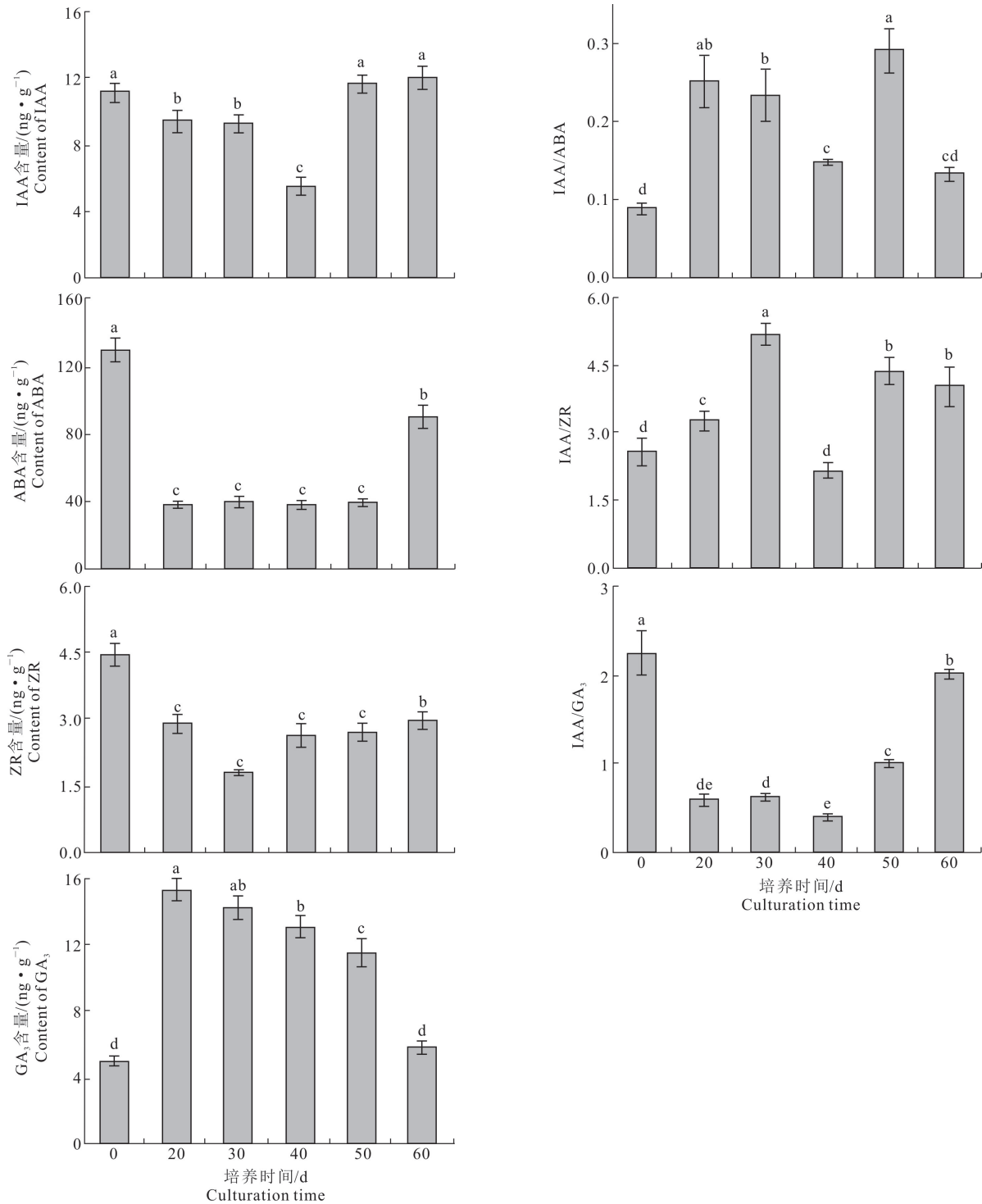
2.2 继代培养周期对牡丹试管苗生理指标的影响

2.2.1 内源激素含量及比值 由图 1 可以看出,在继代培养过程中,‘正午’牡丹试管苗的内源激素水平波动较大。随继代培养周期的延长,内源激素 IAA、ABA、ZR 含量均呈先下降后升高的趋势。其中,IAA 含量在继代培养 0 d 时较高,在 40 d 时达到最低 5.55 ng/g,然后逐渐上升,在 60 d 达到最高

11.95 ng/g;ABA 含量在继代培养 0 d 时达到最高 129.46 ng/g,之后急剧下降,20 d 时达到最低 37.77 ng/g;ZR 含量在继代培养 0 d 时达到最高 4.39 ng/g,随后逐渐下降,在 30 d 达到最低 1.79 ng/g。然而,随继代培养周期的延长,GA<sub>3</sub> 含量在继代培养过程中呈先升高后下降的趋势,为单峰曲线,在 20 d 时达到最高值 15.17 ng/g。

由图 1 还可以看出,内源激素比值在继代培养过程中具有显著变化。IAA/ABA、IAA/ZR 值在继代培养过程中呈升高一下降一升高一下降的趋势。其中,IAA/ABA 在继代培养 0 d 时最低为 0.09,50

d 时达到最高 0.29;IAA/ZR 在继代培养 30 d 时达到最高 5.19,在 40 d 时达到最低 2.10。IAA/GA<sub>3</sub> 呈先下降后上升的趋势,在继代培养 40 d 时最低为 0.42。



图柱上标不同小写字母表示在  $P < 0.05$  水平差异显著。下同。

Different lowercase letters indicate significant differences at  $P < 0.05$ . The same below.

图 1 ‘正午’牡丹继代培养过程中内源激素含量的变化

Fig. 1 Changes of endogenous hormones contents in *Paeonia × lemoinei* ‘High Noon’

2.2.2 酶活性 由图 2 可以看出,在继代培养过程中,‘正午’牡丹试管苗的 POD、PPO、IAAO 活性均波动较大。POD 活性在继代培养 0~20 d 急剧上升,20 d 时达到最高 7.06 U/(g · min),40 d 时为 3.89 U/(g · min),60 d 时最低为 0.83 U/(g ·

min);PPO 活性在继代培养 20 d 时达到最高 2.20 U/(g · min),40 d 时最低为 1.33 U/(g · min);IAAO 活性在继代培养 30 d 时达到最高 238.38 U/g,在 40 d 时达到最低值 55.08 U/g。

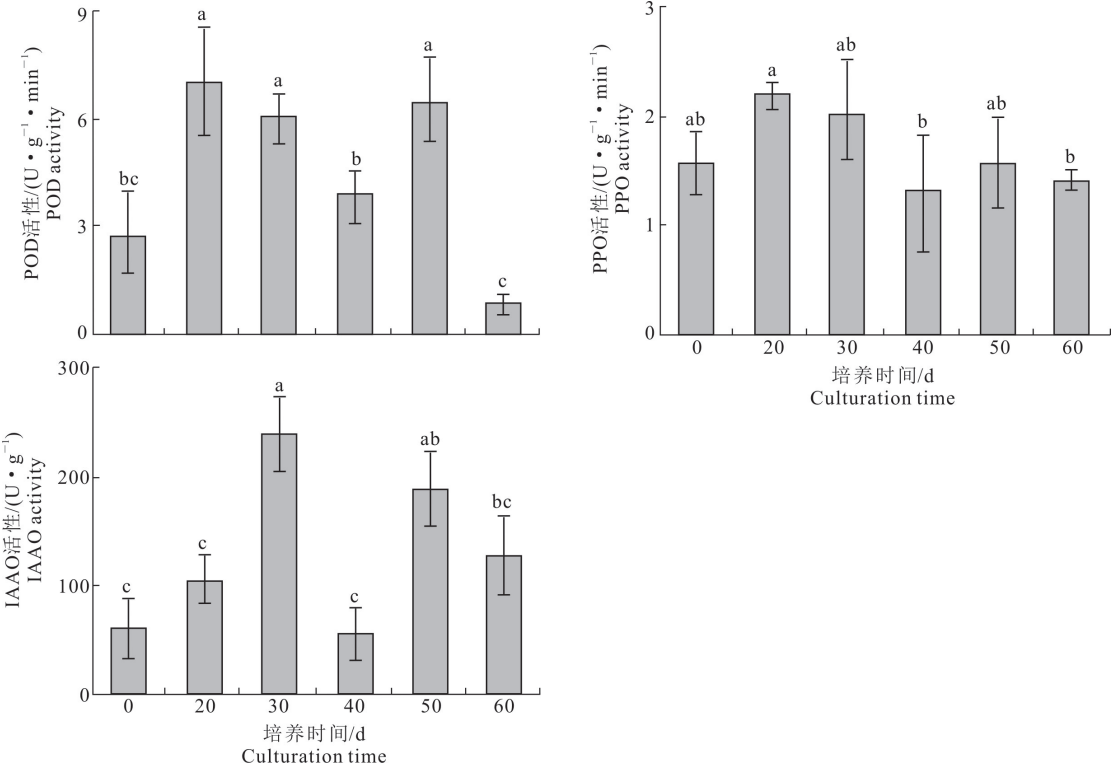


图 2 ‘正午’牡丹继代培养过程中相关酶活性的变化

Fig. 2 Changes in activities of related enzyme in *Paeonia × lemoinei* ‘High Noon’

2.2.3 营养物质含量 由图 3 可以看出,在继代培养过程中‘正午’牡丹试管苗的可溶性糖含量波动较大,总体呈升高趋势,在继代培养 20 d 时达到最低值 339.57 mg/g,40 d 时达到 941.55 mg/g,60 d 时

达到最高值 996.96 mg/g;可溶性蛋白含量总体波动较小,在继代培养 60 d 时达到最高值 3.74 mg/g,显著高于 0 d 时,而 20~50 d 无明显变化,整体平稳。

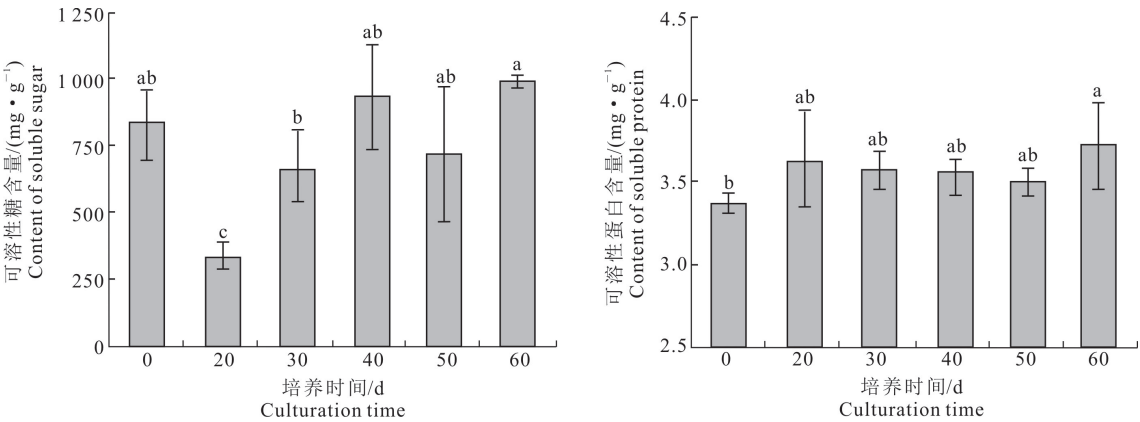


图 3 ‘正午’牡丹继代培养过程中营养物质含量的变化

Fig. 3 Changes in contents of related nutrients in *Paeonia × lemoinei* ‘High Noon’

2.2.4 总酚含量 由图 4 可以看出,在继代培养过程中,‘正午’牡丹试管苗总酚含量呈先下降后升高的趋势。在继代培养 0 d 时总酚含量较高,随后逐渐下降,40 d 时达到最小 0.48 mg/g,之后逐渐上升,50 d 时达到最大值 0.62 mg/g,之后维持在较高水平。

2.3 牡丹试管苗生根状况与生理指标的相关性

将‘正午’牡丹试管苗的生根状况与生理指标进行相关性分析,结果(表 2)表明,生根率与可溶性糖含量呈极显著正相关,而与 PPO 活性呈显著负相关;平均根数与 IAA 和 ABA 含量、IAA/ZR、IAAO 活性呈显著正相关,与 IAA/GA<sub>3</sub> 呈极显著正相关,而与 GA<sub>3</sub> 含量呈显著负相关;平均根长与 IAA/ZR 呈显著负相关。

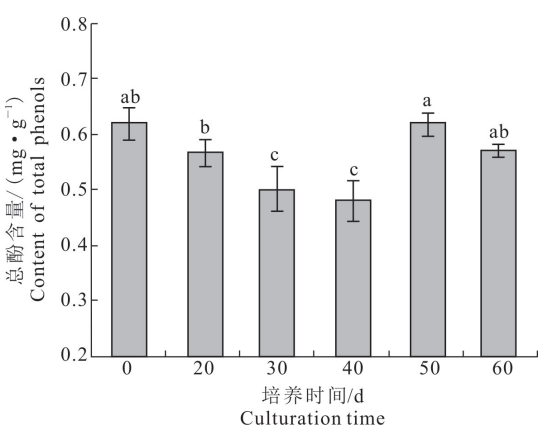


图 4 ‘正午’牡丹继代培养过程中总酚含量的变化  
Fig.4 Changes in contents of total phenols in *Paeonia × lemoinei* ‘High Noon’

表 2 牡丹试管苗生根指标与生理生化指标的相关性

Table 2 Correlation between rooting ability and physiological and biochemical indexes of peony *in vitro*

| 指标<br>Index                                   | 生根率<br>Rooting rate | 平均根数<br>Root number | 平均根长<br>Root length |
|-----------------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| IAA 含量 Content of IAA                         | −0.394              | 0.559 *             | −0.403              |
| ABA 含量 Content of ABA                         | 0.025               | 0.633 *             | 0.055               |
| ZR 含量 Content of ZR                           | −0.140              | 0.122               | 0.188               |
| GA <sub>3</sub> 含量 Content of GA <sub>3</sub> | −0.178              | −0.553 *            | −0.274              |
| IAA/ABA                                       | −0.419              | −0.197              | −0.451              |
| IAA/ZR                                        | −0.258              | 0.584 *             | −0.532 *            |
| IAA/GA <sub>3</sub>                           | −0.071              | 0.652 * *           | 0.008               |
| POD 活性 POD activity                           | 0.342               | −0.318              | −0.455              |
| PPO 活性 PPO activity                           | −0.549 *            | 0.083               | −0.369              |
| IAAO 活性 IAAO activity                         | −0.078              | 0.618 *             | −0.490              |
| 可溶性糖含量 Content of soluble sugar               | 0.671 * *           | 0.275               | 0.288               |
| 可溶性蛋白含量 Content of soluble protein            | 0.168               | 0.112               | −0.014              |
| 总酚含量 Content of total phenols                 | −0.372              | 0.248               | −0.143              |

注: \* \* 表示在 0.01 水平上显著相关; \* 表示在 0.05 水平上显著相关。  
Note: \* \* indicates significant correlation at α=0.01 level and \* indicates significant correlation at α=0.05 level.

3 讨 论

3.1 继代培养周期与试管苗生根的关系

Harris 等<sup>[11]</sup>发现牡丹试管苗以 5 周为继代周期获得的生根率显著高于 3 周和 4 周,‘紫斑’牡丹<sup>[11]</sup>和‘凤丹’牡丹<sup>[13]</sup>均以继代培养周期 35 d 时获得的试管苗生根效果最佳。本研究发现,继代培养周期对牡丹试管苗生根影响较大,继代培养 40 d 为‘正午’牡丹的最佳继代培养周期,此时试管苗生根率(30.86%)显著高于其他处理(12.35%~22.22%),且生根质量较高。

3.2 内源激素水平与试管苗生根的关系

内源激素特征的动态变化是诱导不定根发生的主导因子<sup>[17]</sup>。本研究发现,继代培养过程中‘正午’牡丹试管苗的内源激素 IAA、ABA、ZR 含量均呈先

下降后升高的趋势,而 GA<sub>3</sub> 与之相反。IAA 是促进不定根发生的主要激素,发挥关键调控作用<sup>[18]</sup>, IAA 含量出现高峰的时间与根原基出现高峰的时间一致<sup>[18-19]</sup>。尚文倩<sup>[20]</sup>在‘凤丹白’牡丹中发现,生根培养前 IAA 主要分布于茎基部的维管束内,在脱分化期 IAA 含量较低,有利于薄壁细胞的脱分化。对燕山红栗(*Castanea mollissima* cv. ‘Yanshanhong’)<sup>[21]</sup>的研究发现,在增殖阶段较高浓度的内源激素 IAA 可促进其侧根生长。本研究中 IAA 含量与平均根数呈显著正相关,这与前人研究结论<sup>[22-23]</sup>一致,推测是由于高含量的 IAA 可以增加根系分生组织细胞分裂次数。多数研究认为,ABA 是一种生根抑制激素<sup>[24-25]</sup>,然而在‘紫玉’紫薇(*Lagerstroemia indica*)<sup>[23]</sup>生根培养过程中发现,高浓度的内源激素 ABA 能够促进根原基分化。本研究同样发

现,ABA 对牡丹试管苗不定根发生具有促进作用,继代培养过程中内源激素 ABA 含量与平均根数呈显著正相关,这可能是由于不定根发生前期需要高浓度的 ABA 来提高自身抗逆性,以适应新环境,有利于根原基的分化形成。 $GA_3$  被普遍认为对不定根发生存在抑制作用,具体表现为抑制根原基分化、根数减少、推迟生根等<sup>[21,26]</sup>。本研究也发现,牡丹试管苗内源激素  $GA_3$  和 ABA 大致呈此消彼长的关系,且  $GA_3$  含量与平均根数呈显著负相关,可能是由于本研究添加外源激素导致  $GA_3$  含量较高,而高浓度的  $GA_3$  不利于牡丹茎基部成年组织向分生组织的转化,进而抑制不定根形成<sup>[27]</sup>。目前关于 ZR 对不定根发生的作用存在不同观点,有研究认为 ZR 在不定根发生过程中起促进作用<sup>[4,28]</sup>,有研究则认为 ZR 与生根率无显著相关性<sup>[24,29]</sup>,本研究支持后者的观点。综上可知,IAA、ABA 是影响牡丹继代培养周期不定根发生的重要激素,且表现为促进作用。

不定根发生过程中不仅单一内源激素起重要作用,内源激素间的动态平衡也有重要作用。IAA/ABA 作为衡量生根率的重要指标,在‘太平红’牡丹 (*P. suffruticosa*)<sup>[4]</sup>、白桦 (*Betula platyphylloides*)<sup>[18]</sup>、麻楝 (*Chukrasia tabularis*)<sup>[28]</sup> 等植物的生根过程中,IAA/ABA 值高均有利于不定根的分化。本研究中 IAA/ABA 值在继代培养过程中波动较大,但 IAA/ABA 与生根指标皆无显著相关性,说明生根前的内源激素 IAA/ABA 对生根无显著影响,可能是由于 IAA/ABA 对不定根发生的作用主要依赖于生根处理的调节作用。本研究中内源激素 IAA/ZR 与平均根数呈显著正相关,这有利于不定根发生,与前人的研究结果一致<sup>[29-30]</sup>。而 ZR 含量与不定根发生无显著相关性,因此推断 IAA/ZR 促进作用可能主要由内源激素 IAA 含量主导。本研究中 IAA/ $GA_3$  值呈先下降后升高的趋势,且 IAA/ $GA_3$  与平均根数呈极显著正相关,这与前人研究结果<sup>[19,22]</sup>一致。综上可知,多种激素间的动态平衡共同调控着牡丹试管苗不定根的发生,其中较高的 IAA/ZR 和 IAA/ $GA_3$  对‘正午’牡丹不定根发生具有促进作用。

### 3.3 酶活性与试管苗生根的关系

POD、PPO 和 IAAO 被证实与植物不定根发生密切相关。本研究中 POD、PPO 和 IAAO 活性均波动较大。POD 是不定根发生过程中所必需的辅助因子<sup>[31]</sup>。在‘凤丹白’牡丹 (*Paeonia suffruticosa*) 的生根过程中发现,POD 活性升高有利于生根<sup>[32]</sup>。而本研究中 POD 活性与生根指标均无显著相关性,可能是因为 POD 活性在诱导期变化,通过氧化 IAA 来调控不定根发生,并且 POD 是参与木质素合成的关键酶,在维管组织的形成和根的木质化中不可或缺<sup>[33]</sup>,因此继代培养过程中 POD 活性变化对生根影响不大。PPO 对不定根发生具有双重作用,一方面,PPO 可与 IAA 结合形成一种生根辅助因子“IAA-酚酸复合物”,继而促进根原基诱导<sup>[34]</sup>;另一方面,PPO 也可促进酚类物质氧化形成醌类物质,进而导致试管苗褐化,从而抑制不定根的发生<sup>[32]</sup>。本研究发现,PPO 活性与生根率呈显著负相关,这可能是由于大量 PPO 用于酶促反应,氧化形成过多醌类物质而引起褐化。IAAO 通过降解 IAA 来调节内源激素 IAA 水平,从而影响生根能力。本研究发现,IAAO 活性与平均根数呈显著正相关,这与前人观点<sup>[4]</sup>一致,这是由于离体生根过程中低浓度的 IAA 有利于根诱导初期薄壁细胞的脱分化,而高活性的 IAAO 通过降低 IAA 含量促进不定根发生<sup>[20,35]</sup>。综上可知,在‘正午’牡丹试管苗继代培养过程中高活性 IAAO 和低活性 PPO 能够提高试管苗质量,有利于后续生根。

植物不定根发生过程中需消耗大量营养物质,可溶性糖和可溶性蛋白等营养物质水平对生根存在重要影响<sup>[36-37]</sup>。本研究发现,在继代培养过程中‘正午’牡丹试管苗的可溶性糖含量与生根率呈极显著正相关,在继代培养 0~20 d 时可溶性糖含量由于自身养分消耗骤降,之后随着光合作用的增强,在继代培养 60 d 时达到峰值。可溶性蛋白含量在继代培养过程中整体平稳,无显著变化,且与试管苗生根状况也无显著相关性。因此,可溶性糖含量是继代培养周期中影响牡丹试管苗生根的关键因子,其含量升高有益于生根。

### 3.4 营养物质与试管苗生根的关系

植物不定根发生过程中需消耗大量营养物质,可溶性糖和可溶性蛋白等营养物质水平对生根存在重要影响<sup>[36-37]</sup>。本研究发现,在继代培养过程中‘正午’牡丹试管苗的可溶性糖含量与生根率呈极显著正相关,在继代培养 0~20 d 时可溶性糖含量由于自身养分消耗骤降,之后随着光合作用的增强,在继代培养 60 d 时达到峰值。可溶性蛋白含量在继代培养过程中整体平稳,无显著变化,且与试管苗生根状况也无显著相关性。因此,可溶性糖含量是继代培养周期中影响牡丹试管苗生根的关键因子,其含量升高有益于生根。

### 3.5 总酚与试管苗生根的关系

酚类物质是植物体内重要的次生代谢物质,其通过参与 IAA 代谢调控植物不定根发生<sup>[20]</sup>。内源总酚含量与不定根发生的相关性在物种间存在较大差异,例如日本落叶松 (*Larix kaempferi*)<sup>[38]</sup>、欧洲云杉 (*Picea abies*)<sup>[19]</sup> 等植物的生根状况与总酚含量呈负相关;茶树 (*Camellia sinensis*) 扦插生根过程中酚类物质则是其生根增强剂<sup>[39]</sup>。本研究中内源总酚含量在继代培养过程中表现为先下降后升高的趋势,但总酚含量与‘正午’牡丹试管苗的生根率、平

均根数、平均根长相关性均不显著,与上述研究结果不一致。这可能是由于不同植物的单体酚种类和含量皆存在较大差异,而不同单体酚在 IAA 代谢中的作用不同,导致其对不定根发生的影响也不同,例如苯甲酸、4-羟基苯甲酸对牡丹试管苗生根具有促进作用,而没食子酸甲酯和莽草酸有抑制作用<sup>[8]</sup>。因此,在‘正午’牡丹试管苗生根过程中,总酚含量与生根状况不相关,后续还需深入探究各单体酚对牡丹不定根发生的影响及其作用机理。

## 4 结 论

本研究发现,40 d 为‘正午’牡丹的最佳继代培养周期,其试管苗生根率(30.86%)显著高于其他处理(12.35%~22.22%),且生根质量较高;继代培养过程中,内源激素中 IAA 发挥主要调控作用,其含量与平均根数呈显著正相关;可溶性糖是继代培养周期中影响牡丹试管苗生根的关键因子,其含量与生根率呈极显著正相关,有助于不定根的发生;此外 ABA 含量、IAAO 活性、IAA/ZR、IAA/GA<sub>3</sub> 与生根指标呈显著或极显著正相关,而 GA<sub>3</sub> 含量、IAA/ZR、PPO 活性与生根指标呈显著负相关。

## [参考文献]

- [1] Cheng F Y. Advances in the breeding of tree peonies and a cultivar system for the cultivar group [J]. International Journal of Plant Breeding, 2007, 1(2): 89-104.
- [2] 李玉龙, 吴德玉, 潘淑淑, 等. 牡丹试管苗繁殖技术的研究 [J]. 科学通报, 1984, 8(5): 500-502.
- Li Y L, Wu D Y, Pan S L, et al. Study on propagation technology of peony seedling *in vitro* [J]. Chinese Science Bulletin, 1984, 8(5): 500-502.
- [3] Wen S S, Chen L, Tian R N. Micropropagation of tree peony (*Paeonia* sect. *Moutan*): a review [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2020, 141(1): 1-14.
- [4] 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.
- He D, Wang Z, He S L. Adventitious root generating process and hormone and enzyme changes *in vitro* *Paeonia suffruticosa* [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2011, 38(4): 770-776.
- [5] 贾文庆, 徐小博, 刘会超, 等. 牡丹‘乌龙捧盛’组培苗生根及生根解剖学研究 [J]. 林业科学研究, 2013, 26(4): 516-520.
- Jia W Q, Xu X B, Liu H C, et al. Study on rooting culture and rooting anatomy of tree peony ‘Wulong Pengsheng’ regenerated shoots [J]. Forest Research, 2013, 26(4): 516-520.
- [6] 尚文倩, 王政, 何松林, 等. 牡丹试管苗生根过程中内源 IAA 及相关酶活性的变化 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2021, 49(2): 129-136.
- Shang W Q, Wang Z, He S L, et al. Changes of endogenous IAA and related enzyme activities during rooting of *Paeonia suffruticosa in vitro* [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2021, 49(2): 129-136.
- [7] Shang W Q, Wang Z, He S L, et al. Research on the relationship between phenolic acids and rooting of tree peony (*Paeonia suffruticosa*) plantlets *in vitro* [J]. Scientia Horticulturae, 2017, 224: 53-60.
- [8] 符真珠, 杜君, 何松林, 等. 牡丹试管苗生根过程中酚酸类物质变化差异的研究 [J]. 中国农学通报, 2016, 32(25): 59-64.
- Fu Z Z, Du J, He S L, et al. Variation differences of phenolic acids during *in vitro* rooting of *Paeonia suffruticosa* plantlets [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2016, 32(25): 59-64.
- [9] 贺丹, 李睿, 纪思羽, 等. 牡丹不定根形成相关基因 *PsARRO-1* 的克隆及表达分析 [J]. 植物生理学报, 2014, 50(8): 1151-1158.
- He D, Li R, Ji S Y, et al. Cloning and expression analysis of adventitious rooting related gene *PsARRO-1* of tree peony [J]. Plant Physiology Journal, 2014, 50(8): 1151-1158.
- [10] 王海云. 牡丹试管苗生根诱导过程中蛋白质表达变化的研究 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2010.
- Wang H Y. Study on protein expression variation of *Paeonia suffruticosa in vitro* in the period of rooting inducement [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2010.
- [11] Harris R A, Mantell S H. Effects of stage II subculture durations on the multiplication rate and rooting capacity of micro-propagated shoots of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) [J]. Journal of Horticultural Science, 1991, 66(1): 95-102.
- [12] Bouza L, Jacques M, Sotta B, et al. Relations between auxin and cytokinin contents and *in vitro* rooting of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) [J]. Plant Growth Regulation, 1994, 15(1): 69-73.
- [13] 王新. ‘凤丹’牡丹离体快繁技术研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2016.
- Wang X. *In vitro* rapid propagation of *Paeonia ostii* ‘Feng Dan’ [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2016.
- [14] Wister J C. The peonies hopkins; the American peony society [M]. La Vergne: Lightning Source Inc, 1995.
- [15] Wen S S, Cheng F Y, Zhong Y, et al. Efficient protocols for the micropropagation of tree peony (*Paeonia suffruticosa* ‘Jin Pao Hong’, *P. suffruticosa* ‘Wu Long Peng Sheng’, and *P. × lemoinei* ‘High Noon’) and application of arbuscular mycorrhizal fungi to improve plantlet establishment [J]. Scientia Horticulturae, 2016, 201: 10-17.
- [16] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004.
- Li H S. Principles and techniques of plant physiological and biochemical experiments [M]. Beijing: Higher Education Press, 2004.
- [17] Saini S, Sharma I, Kaur N, et al. Auxin: a master regulator in plant root development [J]. Plant Cell Reports, 2013, 32(6): 1055-1065.

- 741-757.
- [18] 詹彦光,杨传平,金贞福,等.白桦插穗生根的内源激素和营养物质[J].东北林业大学学报,2001,29(4):1-4.  
Zhan Y G, Yang C P, Jin Z F, et al. Endogenous hormones and nutritive material in softwood cuttings of *Betula platyphylla* during rooting [J]. Journal of Northeast Forestry University, 2001, 29(4): 1-4.
- [19] 欧阳芳群,付国赞,王军辉,等.欧洲云杉扦插生根进程中内源激素和多酚类物质变化[J].林业科学,2015,51(3):155-162.  
Ouyang F Q, Fu G Z, Wang J H, et al. Qualitative analysis of endogenesis hormone and polyphenol during rooting of cuttings in norway spruce (*Picea abies*) [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2015, 51(3): 155-162.
- [20] 尚文倩.牡丹内源酚类物质与 IAA 反应产物结构及生理功能解析[D].郑州:河南农业大学,2017.  
Shang W Q. Study on the structure and physiological function of reaction products from tree peony (*Peaonia suffruticosa*) endogenous phenolic compounds reacted with IAA [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2017.
- [21] Hou J W, Wang G. Effects of *in vitro* subculture on the physiological characteristics of adventitious root formation in microshoots of *Castanea mollissima* cv. 'Yanshanhong' [J]. Journal of Forestry Research, 2010, 21(2): 155-160.
- [22] 王胤,姚瑞玲.继代培养中马尾松生根能力及其与内源激素含量的相关分析[J].林业科学,2020,56(8):38-46.  
Wang Y, Yao R L. Rooting capacity of *Pinus massoniana* and the correlations endohormones levels during subculture [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2020, 56(8): 38-46.
- [23] 饶丹丹.紫薇新品种‘紫玉’组织培养及内源激素含量变化研究[D].长沙:中南林业科技大学,2020.  
Rao D D. Study on tissue culture and rapid propagation of *La-gerstroemia indica* [D]. Changsha: Central South University of Forestry & Technology, 2020.
- [24] 冷青云.红花荷组织培养及不定根发生机理研究[D].北京:北京林业大学,2011.  
Leng Q Y. Studies on tissue culture and adventitious root mechanism of *Rhodoleia championii* Hook. F [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2011.
- [25] 闫帅,张少瑜,徐锴,等.杜梨组培生根过程中多胺、内源激素及相关氧化酶活性的变化[J].果树学报,2019,36(3):318-326.  
Yan S, Zhang S Y, Xu K, et al. Dynamic changes in polyamines, endogenous hormones and oxidase activities during rooting of *in vitro* plantlets of *Pyrus betulifolia* Bunge [J]. Journal of Fruit Science, 2019, 36(3): 318-326.
- [26] 俞良亮.鹅掌楸扦插繁殖与植物生长物质的关系及苗期生长研究[D].南京:南京林业大学,2005.  
Yu L L. Studies on the relationship between cutting propagation and plant growth substances, growth dynamic of tulip tree [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2005.
- [27] 潘瑞炽.植物生理学[M].北京:高等教育出版社,2001.  
Pan R C. Plant physiology [M]. Beijing: Higher Education Press, 2001.
- [28] 王青,张捷,仲崇禄,等.麻楝扦插生根进程中内源激素和营养物质含量的变化[J].中南林业科技大学学报,2020,40(4):111-119.  
Wang Q, Zhang J, Zhong C L, et al. Variation of endogenesis hormone and nutritive matter concentration in *Chukrasia tabularis* cuttings during rooting [J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2020, 40(4): 111-119.
- [29] 罗嘉亮,李凡,李俊豪,等.继代培养次数对杜梨生根能力和叶形态及其激素水平的影响[J].西北植物学报,2020,40(2):304-310.  
Luo J L, Li F, Li J H, et al. Effects of subculture times on rooting ability, leaf morphology and hormone level of *Pyrus betulaefolia* [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2020, 40(2): 304-310.
- [30] 王京伟,魏佳祺,刘冬云.不同外源激素对山丹继代培养过程中内源激素的影响[J].河北农业大学学报,2017,40(6):39-43.  
Wang J W, Wei J Q, Liu D Y. Effect of different exogenous hormones on changes of endogenous hormones in *Lilium pumilum* DC in subculture process [J]. Journal of Hebei Agricultural University, 2017, 40(6): 39-43.
- [31] 付锦雪,黄恒,曹帮华,等.刺槐嫩枝扦插及生根酶活性的变化[J].西部林业科学,2020,49(1):107-113.  
Fu J X, Huang H, Cao B H, et al. Changes of rooting enzyme activity in cuttings and shoots of *Robinia pseudoacacia* [J]. Journal of West China Forestry Science, 2020, 49(1): 107-113.
- [32] 王政,王照路,申萍,等.牡丹试管苗与扦插苗生根过程中相关酶活性的变化[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2014,42(10):193-198.  
Wang Z, Wang Z L, Shen P, et al. Change in activities of related enzymes during rooting peony shoots *in vitro* and cutting seedling [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2014, 42(10): 193-198.
- [33] 卢善发,宋艳茹.维管组织分化的分子生物学研究[J].植物学通报,1999,16(3):28-36.  
Lu S F, Song Y R. Studies on molecular biology of vascular tissue differentiation [J]. Chinese Bulletin of Botany, 1999, 16(3): 28-36.
- [34] 付喜玲,郭先锋,康晓飞,等.IBA对芍药扦插生根的影响及生根过程中相关酶活性的变化[J].园艺学报,2009,36(6):849-854.  
Fu X L, Guo X F, Kang X F, et al. Effects of IBA on stem cutting and activity of related enzymes during rooting of *Paeonia lactiflora* Pall [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2009, 36(6): 849-854.

[39]

Hou J M,Yao E C,Zhu H J,et al. Effect on mechanical damage on castor germination and damage detection method [J]. Inmateh-Agricultural Engineering,2022,68(3):243-254.

[40]

Miyajima D. Seed coat rupture and endosperm protrusion in developing seeds of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. [J]. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2009,84(1):53-58.

[41]

Xie L H,Niu L X,Zhang Y L,et al. Pollen sources influence the traits of seed and seed oil in *Paeonia ostii* ‘Feng Dan’ [J]. Hort Science,2017,52(5):700-705.

[42]

何桂梅,成仿云. ‘正午’牡丹有性生殖败育的形态学观察 [J]. 园艺学报,2006,33(3):660-663.

He G M,Cheng F Y. Morphological observation of sexual reproduction abortion in ‘High Noon’ tree peony [J]. Acta Horticulturae Sinica,2006,33(3):660-663.

[43]

戴思兰. 园林植物育种学 [M]. 北京:中国林业出版社,2007.

Dai S L. Breeding of ornamental plants [M]. Beijing: China Forestry Press,2007.

(上接第 132 页)

[35]

刘玉民,刘亚敏,马明,等. 马尾松扦插生根过程相关生理生化分析 [J]. 林业科学,2010,46(9):28-33.

Liu Y M,Liu Y M,Ma M,et al. Analysis of relevant physiological and biochemical characteristics of *Pinus massoniana* during cuttings rooting [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2010, 46 (9):28-33.

[36]

Steffens B,Rasmussen A. The physiology of adventitious roots [J]. Plant Physiology,2016,170(2):603-617.

[37]

王政,申萍,王照路,等. 牡丹试管苗与扦插苗生根过程中营养物质含量变化研究 [J]. 河南农业大学学报,2015,49(3):349-352.

Wang Z,Shen P,Wang Z L,et al. Study on the change of nutrient content of peony cuttings and plantlets *in vitro* during root-inducing [J]. Journal of Henan Agricultural University, 2015,49(3):349-352.

[38]

麻文俊,王军辉,张守攻,等. 日本落叶松无性系扦插生根过程中多酚类物质研究 [J]. 北京林业大学学报,2011,33(1):150-154.

Ma W J,Wang J H,Zhang S G,et al. Qualitative analysis of phenolic compounds in the Japanese larch during the rooting of cuttings [J]. Journal of Beijing Forestry University,2011, 33(1):150-154.

[39]

Rout G R. Effect of auxins on adventitious root development from single node cuttings of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze and associated biochemical changes [J]. Plant Growth Regulation,2006,48(2):111-117.