

## 继代培养温度对牡丹试管苗增殖及后续生根的影响

李爱民, 汪 凡, 齐兆凤, 杨玉洁, 张文珂, 文书生\*

(南京林业大学 风景园林学院, 南京 210037)

**摘 要:** 为探究继代培养温度对‘皇冠’牡丹 (*Paeonia × lemoinei* ‘Yellow Crown’) 试管苗增殖、生根的影响及其生理机制, 该研究设置 16、20、24、28 °C 四个温度处理, 试管苗培养 40 d 后测定增殖指标, 并统一转入生根培养并评估生根表现, 同时分析内源激素生长素 (IAA)、脱落酸 (ABA)、玉米素 (ZR) 和赤霉素 (GA<sub>3</sub>) 的含量, 超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT) 的活性、总酚含量及叶片显微结构。结果表明: (1) 24 °C 为适宜的继代培养温度, 试管苗增殖系数达 2.12, 芽质量优良 (+++), 后续生根率达 39.05%, 根系发育良好。(2) 相关性分析显示, IAA 含量、IAA/ABA 比值与生根率呈极显著正相关 ( $r$  分别为 0.82, 0.91), ABA 含量、SOD 活性与生根率呈极显著负相关 ( $r$  分别为 -0.83, -0.83); 茎叶总酚含量与根长显著正相关 ( $r = 0.71$ ), 气孔长轴长度与生根率显著负相关 ( $r = -0.68$ )。该研究结果表明继代培养温度通过调控内源激素平衡、抗氧化酶活性及叶片气孔形态等生理过程, 综合影响牡丹试管苗增殖与生根, 24 °C 可同步优化其快繁效果, 为牡丹高效微繁殖提供理论依据。

**关键词:** ‘皇冠’牡丹, 继代培养温度, 不定根, 生理指标, 相关性分析

中图分类号: Q945

文献标识码: A

## Effect of subculture temperature on the *in vitro* shoot multiplication and subsequent rooting of tree peony

LI Aimin, WANG Fan, QI Zhaofeng, YANG Yujie, ZHANG Wenke, WEN Shusheng\*

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

**Abstract:** This study aimed to investigate the effects of subculture temperature on shoot multiplication and subsequent rooting of *Paeonia × lemoinei* 'Yellow Crown' plantlets *in vitro*, and to explore the underlying physiological mechanisms. Four temperature treatments (16, 20, 24, and 28 °C) were applied during the subculture stage. After 40 days, proliferation parameters were measured, and plantlets were subsequently transferred to a rooting medium to evaluate rooting performance. Physiological analyses included endogenous hormones (IAA, ABA, ZR, GA<sub>3</sub>), antioxidant enzyme activities (SOD, POD, CAT), total phenolic content, and leaf microstructure. The results showed that: (1) 24 °C was the optimal temperature, yielding the highest proliferation coefficient (2.12), excellent shoot quality (+++), and a subsequent rooting rate of 39.05% with well-developed roots. (2) Correlation analysis revealed highly significant positive correlations of IAA content and IAA/ABA ratio with rooting rate ( $r = 0.82, 0.91$ ), while ABA content and SOD

**基金项目:** 国家自然科学基金 (32001359)。

**第一作者:** 李爱民 (2000—), 硕士研究生, 主要从事园林植物繁殖栽培研究, (E-mail) aiminlee@njfu.edu.cn。

**\*通信作者:** 文书生, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事园林繁殖栽培与生物技术研究, (E-mail) shusheng0507@126.com。

activity were highly significantly negatively correlated with rooting rate ( $r = -0.83, -0.83$ ). Total phenols content in stems and leaves was significantly positively correlated with root length ( $r = 0.71$ ), and stomatal long-axis length was significantly negatively correlated with rooting rate ( $r = -0.68$ ). These findings indicate that subculture temperature comprehensively influences proliferation and rooting in tree peony by modulating endogenous hormone balance, antioxidant enzyme activity, and stomatal morphology. The 24 °C treatment simultaneously optimized both multiplication and subsequent rooting, providing a theoretical basis for efficient micropropagation of tree peony.

**Key words:** *Paeonia* × *lemoinei* ‘Yellow Crown’, subculture temperature, adventitious root, physiological indexes, correlation analysis

牡丹 (*Paeonia* sect. *Moutan*) 是芍药科 (*Paeoniaceae*) 芍药属 (*Paeonia*) 落叶灌木, 原产于中国, 是我国传统十大名花之一和重要的药用植物 (Cheng, 2007)。近些年来, 牡丹在油用方面的价值被逐渐挖掘, 牡丹籽中含有丰富的不饱和脂肪酸尤其是 $\alpha$ -亚麻酸, 是食用油和营养补充剂的重要新型资源 (Li et al., 2015)。自此, 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作物, 具有良好的市场前景。牡丹的传统繁殖方式以播种、分株和嫁接为主, 但因繁殖系数低、周期长, 无法满足当下市场商品苗的规模化和规范化生产需求。植物微繁殖技术可在短期内大量繁殖苗木, 很大程度上弥补了传统繁殖方法的缺陷。牡丹微繁殖技术研究始于 1984 年 (李玉龙等, 1984), 迄今已经初步建立了 40 多个品种的微繁殖技术体系。‘皇冠’牡丹 (*Paeonia* × *lemoinei* ‘Yellow Crown’) 于 20 世纪 70 年代由日本育种家选育, 花色为黄色, 花瓣基部有紫红色斑点, 其观赏价值高、适应性强, 在园林、盆花与切花中有广阔的应用前景 (黄素娇, 2021)。前人已经初步建立了‘皇冠’牡丹的微繁殖技术体系 (黄素娇, 2021; 李胜皓等, 2024), 但在增殖和生根等关键环节仍存在增殖系数低和生根率低等问题。

试管苗能否高效增殖以及正常生长是决定牡丹微繁殖技术成败的关键。目前关于牡丹试管苗的增殖培养前人已经开展了大量研究, 牡丹试管苗增殖系数高低和生长状况好坏主要与基本培养基、植物生长调节剂种类、浓度、配比以及环境条件等因素密切相关 (Bouza et al., 1994; Wen et al., 2016a; 文书生等, 2016; 王新等, 2016)。其中培养环境条件尤其是温度也严重影响着牡丹微繁殖的效果。牡丹试管苗继代培养温度在 26 °C 下, 试管苗生长状况良好, 无玻璃化现象出现, 在高于 26 °C 培养时, 试管苗开始出现玻璃化现象, 随着培养温度持续上升, 玻璃化苗比例持续上升 (储成才和李大卫, 1992)。几个牡丹品种试管苗在 24~26 °C 条件下, 叶片浓绿、苗壮、生长较快, 超过 26 °C 时叶片开始黄化且生长缓慢 (张桂花等, 2001)。*‘洛阳红’*牡丹 (*P. suffruticosa* ‘Luo Yang Hong’) 试管苗在 20~25 °C 条件下, 其增殖不存在显著影响, 但在 30 °C 培养下的试管苗生长后期易褐化、枯死。可见上述不同牡丹品种的适宜继代培养温度之间差异较大, 整体分布在 20~26 °C 之间, 且其他品种适宜继代培养温度尚未见相关报道。

牡丹试管苗生根的影响因素较为复杂, 前人研究主要通过生根阶段的基本培养基改良、生根方式、生长素以及培养环境筛选等方法解决生根阶段存在的问题, 初步构建了牡丹试管苗的生根技术体系 (Bouza et al., 1994; Beruto et al., 2004; 邱金梅, 2010; 王新等, 2016; 文书生等, 2021)。但是, 上述研究主要集中在试管苗生根阶段, 初步构建了牡丹试管苗生根技术体系, 但既得生根率较低, 主要在 30%~80%, 甚至有的品种尚未获得生根试管苗。近年来, 在生根前提高试管苗质量被证实是进一步促进牡丹试管苗生根的重要途径, 例如将‘正午’牡丹 (*P. × lemoinei* ‘High Noon’) 试管苗在生根培养前进行复壮培养 20 d, 能够将其生根率由 54.0% 提高至 77.2% (文书生等, 2016); 将芍药与牡丹组间杂种 (*P. ‘Bartzella’*) 试管苗复壮培养 10 d, 能够将其生根率由 63.49% 提高到 75.51% (李刘泽

木, 2016)；牡丹试管苗增殖阶段的常用植物生长调节剂 6-BA 对后续生根有抑制作用, 在增殖培养阶段以  $mT$  代替 6-BA 可以显著促进生根, 可将‘正午’和‘凤丹’牡丹 (*P. ostii* ‘Feng Dan’) 试管苗生根率均提高 13% 左右 (王新, 2016; Wen et al., 2016b)。综上, 生根前的培养条件 (复壮培养、植物生长调节剂等) 对试管苗生根具有延续性影响, 优化试管苗质量是促进其生根的有效途径, 但目前增殖阶段的培养温度对牡丹试管苗生根的影响尚未见相关报道。此外, 试管苗的生理状态是其增殖与生根能力的内在基础。研究表明, 内源 IAA 积累、IAA/ABA 与 IAA/ZR 比值与牡丹试管苗生根密切相关 (贺丹等, 2011; 尚文倩等, 2021)。同时, 抗氧化酶系统在清除活性氧 (ROS)、维持细胞氧化还原稳态中起关键作用, 其活性变化与植物对培养环境胁迫的耐受性及生长活力密切相关, 进而影响生根潜能 (Mittler et al., 2022)。此外, 牡丹酚类物质含量的变化也可能通过参与 IAA 代谢间接影响生根 (Shang et al., 2017)。牡丹叶片其显微结构特征 (如气孔形态、叶片厚度) 常被视为反映植株生理状态和环境适应性的敏感指标, 其变化与水分利用效率、光合能力存在关联 (García-Cervigón et al., 2021; 张冬勤等, 2024)。因此, 探究继代培养温度如何通过影响这些关键生理指标来调控牡丹试管苗的增殖与生根表现, 对于优化培养技术体系及深入理解其生理机制至关重要。

本研究以‘皇冠’牡丹试管苗为材料, 采用不同温度 (16、20、24、28 °C) 继代培养的方法, 通过比较增殖与后续生根指标、测定内源激素含量、抗氧化酶活性、总酚含量及观察叶片气孔结构, 并运用相关性分析, 拟探讨以下问题: (1) 继代培养温度如何影响试管苗的增殖效果及后续生根能力; (2) 继代培养温度如何调控牡丹试管苗生根的生理机制, 特别是内源激素平衡、抗氧化酶系统及酚类物质如何响应; (3) 叶片气孔结构对继代培养温度的适应性变化是否与生根效率存在关联。本研究以期对牡丹试管苗的增殖和生根技术体系的优化提供技术支撑, 并为牡丹不定根发生机理的研究提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

2022 年早春, 于山东省菏泽市古韵牡丹基地, 取长势良好、无病虫害的‘皇冠’牡丹, 剪取带有饱满鳞芽的枝, 剥下腋芽作为外植体, 并按照邱金梅 (2010) 构建的方法对外植体进行消毒后接种, 启动培养基为改良 WPM ( $3 \text{ 倍 } Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ) + 6-BA  $0.5 \text{ mg} \cdot L^{-1}$  + GA<sub>3</sub>  $0.1 \text{ mg} \cdot L^{-1}$  + 蔗糖  $30.0 \text{ g} \cdot L^{-1}$  + 琼脂  $6.5 \text{ g} \cdot L^{-1}$ , pH 5.9。根据前人研究 (文书生等, 2024), 牡丹试管苗的适宜继代培养周期为 40 d, 故本研究于第 8 次继代培养 40 d 时, 切取芽丛上的健壮单芽 (茎长  $\geq 1.0 \text{ cm}$ ) 作为试验材料。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 增殖培养

将健壮单芽切除其叶片后接种于增殖培养基, 即 WPM ( $3 \text{ 倍 } Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ) + 6-BA  $0.5 \text{ mg} \cdot L^{-1}$  + GA<sub>3</sub>  $0.1 \text{ mg} \cdot L^{-1}$  + 蔗糖  $30.0 \text{ g} \cdot L^{-1}$  + 琼脂  $6.5 \text{ g} \cdot L^{-1}$ , pH 5.9。于人工气候箱进行继代培养, 培养温度分别设置为 16、20、24、28 °C, 光照强度  $32.4 \mu\text{mol} \cdot m^{-2} s^{-1}$  (荧光灯), 光照周期  $14 \text{ h} \cdot d^{-1}$ 。增殖培养 40 d 后, 观察记录不同处理的增殖系数、株高、茎长、叶片数和芽质量, 其中芽质量等级区分标准如下: +, 茎浅绿、茎粗  $< 0.2 \text{ cm}$ , 叶片展开度  $< 40\%$ ; ++, 茎中绿、 $0.2 \text{ cm} \leq \text{茎粗} < 0.3 \text{ cm}$ ,  $40\% \leq \text{叶片展开度} < 80\%$ ; +++, 茎深绿、茎粗  $\geq 0.3 \text{ cm}$ , 叶片展开度  $\geq 80\%$ 。

#### 1.2.2 生根培养

继代培养 40 d 后, 将 1.2.1 上述不同继代培养温度处理获得的丛生芽分别进行继代剪切, 切取芽丛上茎长  $\geq 1.0 \text{ cm}$  的健壮单芽 (保留 2~3 枚叶片), 并统一采用两步生根法进行生根 (文书生等, 2016): (1) 根诱导, 将不同温度处理的试管苗分别接种于根诱导培养基  $1/2 \text{ MS} + \text{IBA } 0.5 \text{ mg} \cdot L^{-1} + \text{腐胺 } 1.0 \text{ mg} \cdot L^{-1} + \text{蔗糖 } 35.0 \text{ g} \cdot L^{-1} + \text{琼脂 } 7.0 \text{ g} \cdot L^{-1}$ , pH 5.95, 先将试

管苗进行 4 °C 冷藏处理 7 d, 再置于 (20±1) °C 的人工气候箱暗培养 23 d; (2) 根形成, 将试管苗转入根形成培养基 1/2 MS+活性炭 2.0 g·L<sup>-1</sup>+蔗糖 35.0 g·L<sup>-1</sup>+琼脂 7.0 g·L<sup>-1</sup>, pH 6.2, 于 (24±1) °C 的人工气候箱培养 30 d 以促进根的伸长生长, 除温度外其他培养条件同增殖培养。生根培养结束后, 观察记录生根率、根数、根长和基部愈伤组织等级, 其中愈伤组织等级区分标准如下: +, 愈伤组织极少; ++, 基部膨大, 有少数愈伤组织出现; +++, 基部严重愈伤化, 根从愈伤组织发出。

### 1.2.3 生理指标测定

继代培养 40 d 后, 从 1.2.1 上述不同温度处理中随机取 12 株试管苗, 每 4 株作为 1 个平行样, 重复 3 次, 将茎段和叶片剪碎后充分混匀, 液氮固定后置于 -80 °C 冰箱保存备用。

(1) 激素含量。称取 0.6 g 样品, 采用酶联免疫法分别测定内源激素 IAA、ABA、ZR 和 GA<sub>3</sub> 含量。从 -80 °C 超低温冰箱中取出样品, 于液氮中研磨至粉末状, 每个样品准确称量 0.6 g, 加入 2 mL 样品提取缓冲液置 4 °C 冰箱充分提取 4 h; 4 °C, 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 吸取上清液, 向剩余沉淀加入 1 mL 提取液后重复上述步骤, 样品提取液为 2 次上清液之和。之后将提取液置于 C<sub>18</sub> 固相萃取预处理小柱中萃取并收集得到粗提液, 将粗提液置于离心浓缩机进行浓缩, 再加入 0.9 mL 样品稀释液进行定容, 之后使用 ELISA 试剂盒采用酶联免疫法测定内源激素含量。

(2) 酶活性。称取 1.0 g 样品, 分别测定 POD、SOD 和 CAT 活性, 其中 POD 活性参照愈创木酚法测定 (李合生等, 2000), SOD 活性测定采用氮蓝四唑 (NBT) 法, CAT 活性参照杨兰芳的方法用过氧化氢测定 (杨兰芳等, 2011)。

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

### 1.2.4 叶片显微结构观察

继代培养 40 d 后, 从 1.2.1 上述不同温度处理材料中随机取不同温度处理的试管苗叶片各 10 枚, 共 40 枚, 每枚叶片剪取叶中部靠近主脉处的 0.5 cm × 0.5 cm 小块, 用标准固定液 FAA (70% 乙醇: 福尔马林: 冰乙酸 = 90: 5: 5) 固定。通过扫描电镜观测叶片下表皮结构和叶片截面结构, 经过处理后, 放入 2.5% 戊二醛溶液中进行固定 3 d (4 °C 低温), 经不同梯度的乙醇脱水, 每次 10 min, 临界点干燥后, 置镀膜仪上喷金 10 min, 在扫描电镜下进行观察和拍照, 观察其叶片下表皮气孔的形态, 同时观测叶片截面的结构特征。

## 1.3 数据统计与分析

试验均设 3 次重复, 其中增殖与生根试验每次重复 28 株试管苗。试验数据采用 SPSS 22.0 软件 one-way ANOVA 进行方差分析及 Duncan 法检验差异显著性; 利用皮尔逊法分析生根指标与增殖、生理、叶片指标的相关性; 利用 Origin 软件制图。

## 2 结果与分析

### 2.1 继代培养温度对增殖和生根的影响

增殖阶段的培养温度处理对 ‘皇冠’ 牡丹试管苗的增殖存在显著影响 (表 1)。增殖系数随着继代培养温度的升高呈先上升后下降的趋势, 在培养温度 24 °C 时增殖系数达到最高, 且显著高于 16 °C 和 20 °C 处理, 其增殖系数 2.12, 叶片数 6.07 片, 试管苗整体生长健壮 (芽质量等级+++)。当温度达到 28 °C 时, 尽管试管苗的增殖系数与 24 °C 无显著差异、且株高和茎长均优于其他处理, 但该温度条件下试管苗质量较低 (芽质量等级+), 具体体现为徒长、茎浅绿、细弱和叶片枯黄萎蔫 (图 1: A-D)。

继代培养末期将不同温度处理获得的试管苗分别转入生根培养, 研究发现不同继代培养温度条件下获得试管苗的后续生根表现具有显著差异 (表 2, 图 1: E-H)。生根率随着

继代培养温度的升高呈先上升后下降的趋势，在继代培养温度为 24 ℃时生根率达到最大值 39.05%，显著高于其他温度处理，且生根质量较高，平均根数 1.46 条，平均根长 2.12 cm，试管苗基部愈伤组织较少（基部愈伤组织等级++）。

综上，24 ℃是适宜‘皇冠’牡丹试管苗的增殖和后续生根的培养温度，此时试管苗的增殖系数达到 2.12，后续生根率达到 39.05%。

表 1 继代培养温度对‘皇冠’牡丹试管苗增殖和生长的影响

Table 1 Effect of subculture temperature on the *in vitro* shoot multiplication and growth of *Paeonia × lemoinei* ‘Yellow Crown’

| 继代培养温度<br>Subculture temperature<br>(°C) | 增殖系数<br>Multiplication rate | 株高<br>Plant height<br>(cm) | 茎长<br>Stem length<br>(cm) | 叶片数<br>Leaf number | 芽质量等级<br>Quality of shoots |
|------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------|----------------------------|
| 16                                       | 1.23±0.08c                  | 1.91±0.14d                 | 0.54±0.06c                | 2.42±0.15c         | +                          |
| 20                                       | 1.67±0.14b                  | 3.21±0.29c                 | 0.72±0.03b                | 4.83±0.56b         | ++                         |
| 24                                       | 2.12±0.17a                  | 3.74±0.25b                 | 0.89±0.06a                | 6.07±0.31a         | +++                        |
| 28                                       | 1.83±0.2ab                  | 4.34±0.28a                 | 0.93±0.08a                | 5.32±0.57ab        | +                          |

注：使用 one-way ANOVA 进行方差分析，表中数据为均值±标准差；不同小写字母表示在  $P \leq 0.05$  水平差异显著（Duncan’s 检验）。+，茎浅绿、茎粗  $< 0.2$  cm，叶片展开度  $< 40\%$ ；++，茎中绿、 $0.2$  cm  $\leq$  茎粗  $< 0.3$  cm， $40\% \leq$  叶片展开度  $< 80\%$ ；+++，茎深绿、茎粗  $\geq 0.3$  cm，叶片展开度  $\geq 80\%$ 。

Note: One-way ANOVA is employed to analyze the data. Data represent means  $\pm$  standard error; different letters indicate significant differences at  $P \leq 0.05$  (Duncan’s test). +, stem light green, stem diameter  $< 0.2$  cm, leaf expansion  $< 40\%$ ; ++, stem medium green,  $0.2$  cm  $\leq$  stem diameter  $< 0.3$  cm,  $40\% \leq$  leaf expansion  $< 80\%$ ; +++, stem dark green, stem diameter  $\geq 0.3$  cm, leaf expansion  $\geq 80\%$ .

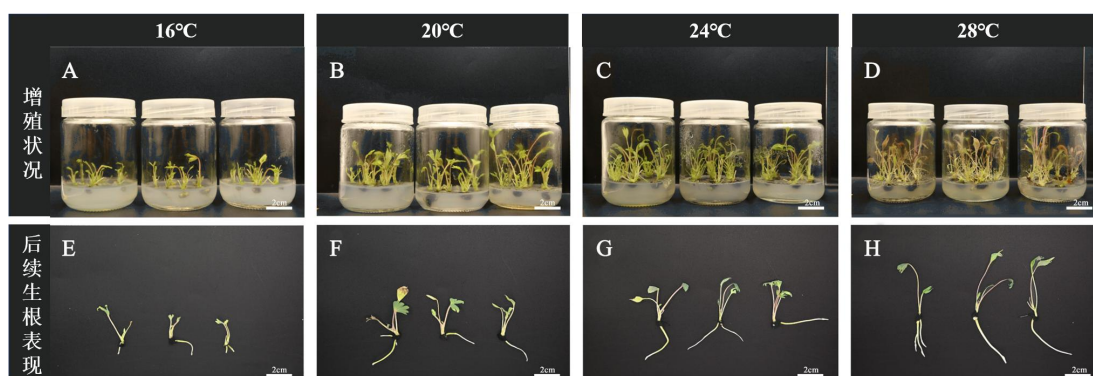
表 2 继代培养温度对‘皇冠’牡丹试管苗生根的延续性影响

Table 2 Carryover effects of subculture temperature during the multiplication stage on the *in vitro* rooting of *Paeonia × lemoinei* ‘Yellow Crown’

| 继代培养温度<br>Subculture temperature<br>(°C) | 生根率<br>Rooting rate<br>(%) | 根数<br>Number of roots | 根长<br>Root length<br>(cm) | 基部愈伤组织等级<br>Basal callus grade |
|------------------------------------------|----------------------------|-----------------------|---------------------------|--------------------------------|
| 16                                       | 11.23±2.83c                | 1.67±0.34a            | 1.26±0.41c                | +                              |
| 20                                       | 26.67±4.36b                | 1.65±0.22a            | 2.26±0.8ab                | ++                             |
| 24                                       | 39.05±3.3a                 | 1.46±0.2a             | 2.12±0.16ab               | ++                             |
| 28                                       | 31.43±2.86b                | 2±0.32a               | 2.53±0.39a                | +++                            |

注：使用 one-way ANOVA 进行方差分析，表中数据为均值±标准差；不同小写字母表示在  $P \leq 0.05$  水平差异显著（Duncan’s 检验）。+，愈伤组织极少；++，基部膨大，有少数愈伤组织出现；+++，基部严重愈伤化，根从愈伤组织发出。

Note: One-way ANOVA is employed to analyze the data. Data represent means  $\pm$  standard error; different letters indicate significant differences at  $P \leq 0.05$  (Duncan’s test). +, Callus is rare; ++, The base was enlarged with a few callus. +++, Severe callus at the base.



增殖状况: *In vitro* shoot multiplication and growth of *Paeonia* × *lemoinei* 'Yellow Crown'

后续生根表现: Subsequent rooting performance of *Paeonia* × *lemoinei* 'Yellow Crown'

图1 继代培养温度对‘皇冠’牡丹试管苗增殖和生根的影响

Fig. 1 Effect of subculture temperature on the *in vitro* shoot multiplication and rooting of *Paeonia* × *lemoinei* 'Yellow Crown'

## 2.2 继代培养温度对生理指标的影响

### 2.2.1 内源激素含量及比值

继代培养温度对‘皇冠’牡丹试管苗的内源激素水平存在显著影响(图2)。随着继代培养温度的升高,ZR和GA<sub>3</sub>含量呈现先上升后下降的趋势,且均在继代培养温度为20℃时达到最高值分别为3.59、5.17 ng·g<sup>-1</sup>。ABA含量呈先下降后上升的趋势,并在16℃时达到最高值68.86 ng·g<sup>-1</sup>,在24℃时达到最低值43.48 ng·g<sup>-1</sup>,然后逐渐上升。然而,随着继代培养温度的升高,IAA含量呈持续上升的趋势,在16℃时最低为18.62 ng·g<sup>-1</sup>,在28℃时最高为57.03 ng·g<sup>-1</sup>。

此外,内源激素比值在不同的继代培养温度下具有显著变化(图2)。IAA/ZR和IAA/GA<sub>3</sub>在不同的继代培养温度下呈持续上升的趋势,且均在28℃时达到最高,分别是21.98和17.94。IAA/ABA呈现先上升后下降的趋势,在24℃时达到最高值1.14。

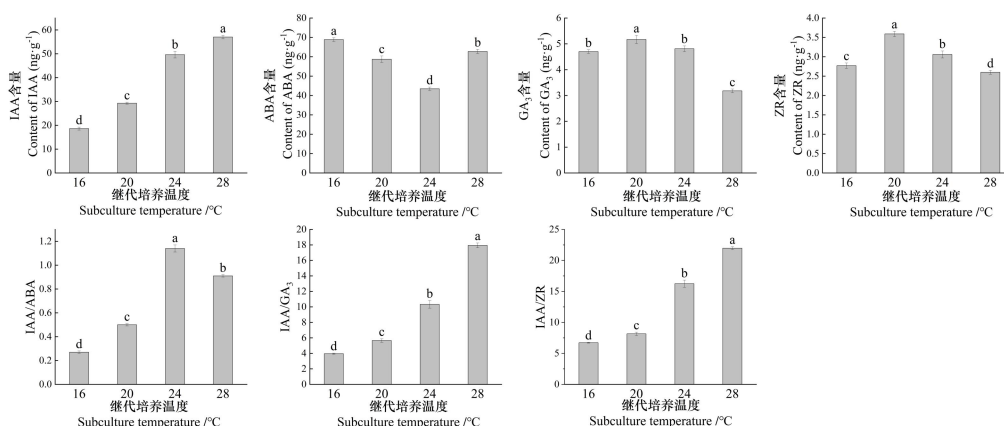


图2 ‘皇冠’牡丹不同继代培养温度下内源激素含量及比值

Fig. 2 The content and ratio of endogenous hormones on the *in vitro* *Paeonia* × *lemoinei* 'Yellow Crown' under different subculture temperatures

### 2.2.2 酶活性

继代培养温度对‘皇冠’牡丹试管苗的酶活性存在显著影响(图3)。随着继代培养温度的升高,POD和SOD的活性均逐渐下降。POD活性在16℃时最高,为250.00 U·g<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>,24~28℃时急剧下降,继代培养温度为28℃时最低,为1.59 U·g<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>。SOD活性在16℃时最高,为46.59 U·g<sup>-1</sup>,在28℃时最低,为17.23 U·g<sup>-1</sup>。CAT活性随着继代培养

温度的升高呈先上升后下降的趋势，在 24 °C 时达到最高值 6.82 U·g<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>，在 20 °C 时达到谷值 4.31 U·g<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>。

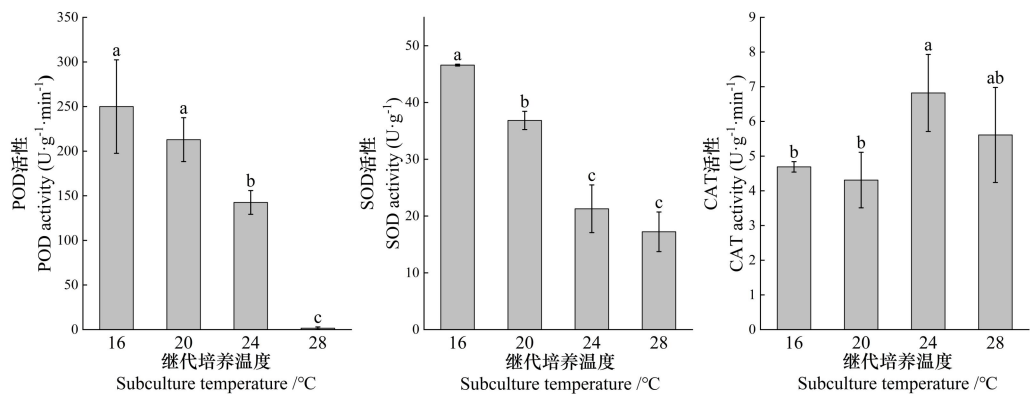


图3 ‘皇冠’牡丹不同继代培养温度下酶活性变化

Fig. 3 Changes in enzyme activity on the *in vitro* Paeonia × lemoinei ‘Yellow Crown’ at different subculture temperatures

### 2.2.3 总酚含量

继代培养温度对‘皇冠’牡丹试管苗的总酚含量存在显著影响（图4）。茎叶总酚含量随着继代培养温度的升高整体呈逐步上升的趋势，在 28 °C 时，达到最高 50.47 mg·g<sup>-1</sup>。试管苗基部愈伤组织总酚含量随着温度的上升呈先上升后下降的趋势，在 20 °C 时达到峰值 87.34 mg·g<sup>-1</sup>。

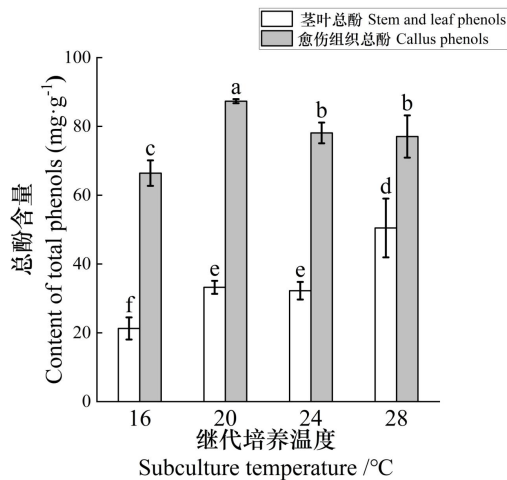


图4 ‘皇冠’牡丹不同继代培养温度下试管苗总酚含量变化

Fig. 4 Changes in the total phenols content of different parts under different subculture temperatures on the *in vitro* Paeonia × lemoinei ‘Yellow Crown’

### 2.3 继代培养温度对叶片结构的影响

在不同的继代培养温度下，‘皇冠’牡丹试管苗的叶片结构存在显著差异（表3，图5），随着继代培养温度的升高，叶片气孔长轴长度逐渐减小，4种继代培养温度下试管苗的气孔长轴长度均有显著（ $P < 0.05$ ）差异。观察发现随着继代培养温度的升高，其气孔长轴长度逐步变小，在 16~24 °C 的温度下培养的试管苗叶片细胞饱满充实，突出于叶表皮上，在 28 °C 时，其气孔开度减小，同时气孔密度增加。观察叶片的解剖结构，可以发现试管苗叶片的栅栏组织不明显，上表皮细胞排列规则，其中试管苗叶片厚度在各个温度处理下没有差异。



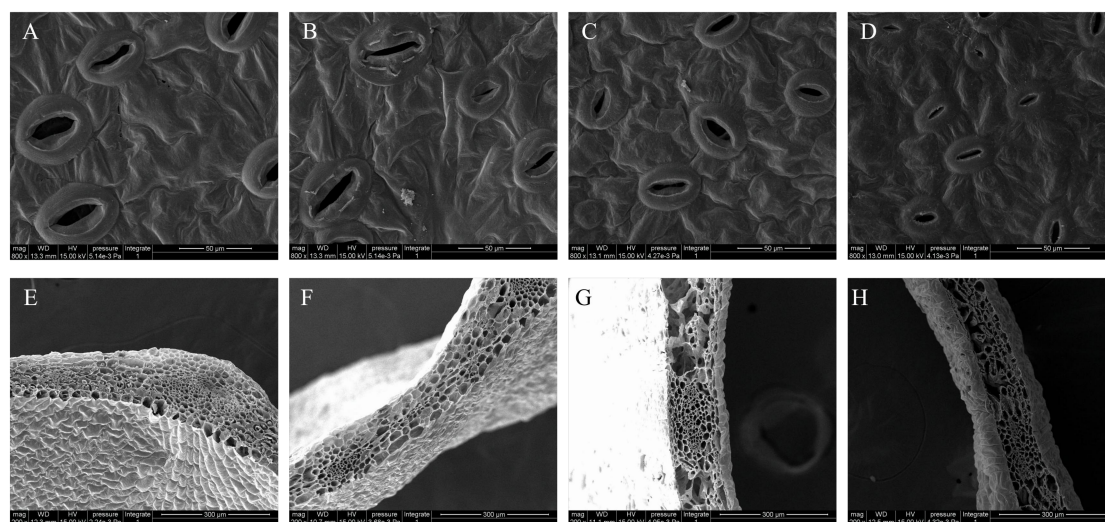
表 3 不同继代培养温度下‘皇冠’牡丹试管苗叶片指标

Table 3 Indexes of leaves under different subculture temperatures on the *in vitro* *Paeonia* × *lemoinei* ‘Yellow Crown’

| 继代培养温度                 |             |             |               | 上表皮厚度                     | 下表皮厚度                     |
|------------------------|-------------|-------------|---------------|---------------------------|---------------------------|
| Subculture temperature | 气孔长轴长度      | 气孔短轴长度      | 叶片厚度          | Upper epidermis thickness | Lower epidermis thickness |
| (°C)                   | SL (μm)     | SW (μm)     | (μm)          | (μm)                      | (μm)                      |
| 16                     | 45.87±0.45a | 10.03±0.67a | 116.46±12.67a | 25.6±3.38ab               | 11.2±1.44b                |
| 20                     | 41.29±2.24b | 10.25±1.07a | 121.91±7.86a  | 27.05±4ab                 | 14.64±0.95ab              |
| 24                     | 30.13±0.53c | 9.42±1.21a  | 133.12±3.39a  | 22.23±3.12b               | 13.05±1.97ab              |
| 28                     | 19.48±1.31d | 6.31±0.54b  | 136.6±14.35a  | 31.19±1.79a               | 15.94±2.62a               |

注：SL. 气孔长轴长度；SW. 气孔短轴长度。

Note: SL. Length of the long axis of the stomatus; SW. Stomatal minor axis length.



A. 16 °C处理试管苗叶片下表皮结构形态；B. 20 °C处理试管苗叶片下表皮结构形态；C. 24 °C处理试管苗叶片下表皮结构形态；D. 28 °C处理试管苗叶片下表皮结构形态；E. 16 °C处理试管苗叶片横截面结构形态；F. 20 °C处理试管苗叶片横截面结构形态；G. 24 °C处理试管苗叶片横截面结构形态；H. 28 °C处理试管苗叶片横截面结构形态。

A. Structural morphology of the lower epidermis of leaf in 16 °C proliferation treatment; B. Structural morphology of the lower epidermis of leaf in 20 °C proliferation treatment; C. Structural morphology of the lower epidermis of leaf in 24 °C proliferation treatment; D. Structural morphology of the lower epidermis of leaf in 28 °C proliferation treatment; E. Cross-sectional structural morphology of leaf in 16 °C proliferation treatment; F. Cross-sectional structural morphology of leaf in 20 °C proliferation treatment; G. Cross-sectional structural morphology of leaf in 24 °C proliferation treatment; H. Cross-sectional structural morphology of leaf in 28 °C proliferation treatment.

图 5 ‘皇冠’牡丹不同继代培养温度下叶片显微结构

Fig. 5 Leaf structure at different subculture temperatures on the *in vitro* *Paeonia* × *lemoinei* ‘Yellow Crown’

## 2.4 增殖、生理、叶片指标与生根指标的相关性

将‘皇冠’牡丹试管苗的增殖、生理、叶片指标与生根指标进行相关性分析。结果显示，增殖、生理、叶片指标与生根相关指标（生根率、根数、根长）具有不同程度的相关性（图 6），具体如下。（1）增殖阶段：生根率与试管苗的增殖率、株高、茎长和叶片数均呈现极显著正相关关系（ $r = 0.85, 0.82, 0.83, 0.90$ ）；平均根长与试管苗的株高、茎长和叶片数呈显著正相关关系（ $r = 0.70, 0.66, 0.61$ ）。（2）生理指标：生根率与内源激素 IAA 含量、IAA/ABA 呈极显著正相关关系（ $r = 0.82, 0.91$ ），与 IAA/ZR、IAA/GA<sub>3</sub> 呈显著正相关关系（ $r = 0.69, 0.59$ ），与 ABA 含量、SOD 活性呈极显著负相关关系（ $r = -0.83, -0.83$ ）；平均根数与 GA<sub>3</sub> 含量呈显著负相关关系（ $r = -0.60$ ）；平均根数与 IAA 含量、茎叶



总酚含量呈显著正相关关系 ( $r = 0.60, 0.71$ ), 与 SOD 含量呈显著负相关关系 ( $r = -0.60$ )。(3) 叶片指标: 生根率与叶片气孔长轴长度呈显著负相关关系 ( $r = -0.68$ ), 平均根长与叶片下表皮厚度呈极显著正相关关系 ( $r = 0.77$ ), 与叶片厚度呈显著正相关关系 ( $r = 0.60$ )。

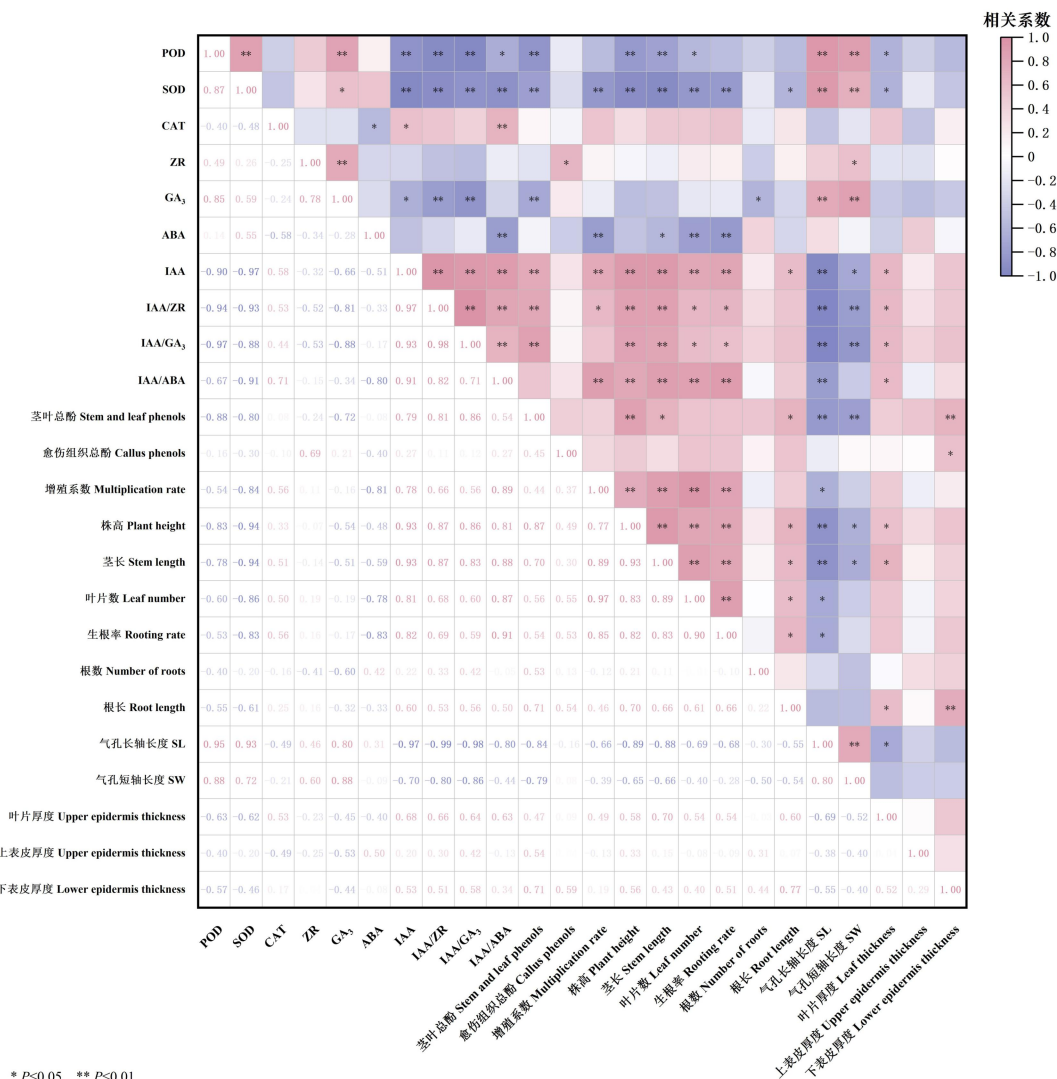


图6 ‘皇冠’牡丹试管苗的增殖、生理、叶片指标与生根指标的相关性分析  
Fig. 6 Correlation analysis of proliferation, physiological, leaf indexes and rooting indexes on the *in vitro* *Paeonia* × *lemoinei* ‘Yellow Crown’

### 3 讨论与结论

#### 3.1 继代培养温度对试管苗增殖和生根的影响

继代培养温度是影响牡丹试管苗增殖和生长的关键因素, 本研究发现 24 °C 为 ‘皇冠’ 牡丹的适宜继代培养温度, 此时试管苗的增殖系数 (2.12) 显著高于 16 °C 和 20 °C 处理, 且芽质量高 (++++)。综合比较这一结果与前人研究发现不同品种的牡丹试管苗适宜培养温度存在较大差异, 例如牡丹品种 ‘黑花魁’、‘豆绿’ 等试管苗继代培养温度在 (25±1) °C 时生长良好 (张桂花等, 2001); ‘洛阳红’ 牡丹试管苗的适宜继代培养温度为 20~25 °C (王燕霞等, 2008)。此外, 本研究还发现在 28 °C 培养条件下, ‘皇冠’ 牡丹苗质量差 (+), 叶片萎蔫枯黄。这与王燕霞等 (2008) 在 ‘洛阳红’ 牡丹中的研究结论一致, 而与储成才和李大卫 (1992) 在牡丹试管苗中的研究结论不一致, 其发现试管苗在培养温度超过 26 °C 时, 会产生玻璃化现象, 而这种不一致也进一步证实了不同牡丹品种对于

温度的差异性反应，牡丹离体快繁的增殖阶段需要根据品种筛选适宜的培养温度。在此基础上，我们进一步将不同温度处理下获得的试管苗统一转入生根培养，以探究继代培养温度对于生根的延续性影响。研究发现不同继代培养温度也会对后续的生根产生显著的延续性影响，生根率与增殖阶段试管苗增殖系数、株高、茎长和叶片数有极显著的正相关性，在 24 °C 继代培养温度下，试管苗后续的生根率（39.05%）显著高于其他温度处理（11.23%~31.43%），此时生根苗基部愈伤组织等级较小（++）有利于后续移栽成活。初步确定 24 °C 为适宜的继代培养温度。

### 3.2 继代培养温度对试管苗生理指标的影响

本研究结果表明，筛选适宜的继代培养温度可能是促进牡丹试管苗后续生根的有效途径。为了进一步探究继代培养温度影响后续生根的机理，我们测定了不同温度处理下牡丹试管苗内源激素水平、酶活性以及总酚含量等生理指标，并分析其与试管苗生根状况的相关性。

#### 3.2.1 内源激素水平与试管苗生根的关系

IAA 含量高峰与根原基出现在同一时期，它可以调控植物根系的生长发育以及相关基因的表达（Krajnc et al., 2013）。本研究发现，‘皇冠’牡丹试管苗 IAA 含量随继代培养温度的升高而逐渐上升，且 IAA 含量与生根率存在极显著正相关关系（ $r = 0.82$ ），表明内源 IAA 是牡丹试管苗生根的重要促进因子。这与前人研究结论相似，马尾松（*Pinus massoniana*）、杜梨（*Pyrus betulaeifolia*）和‘燕山红’栗（*Castanea mollissima* cv. ‘Yan Shan Hong’）试管苗在通过连续继代培养后，IAA 含量与生根均呈正相关关系，其中‘燕山红’栗的 IAA 含量与生根率存在显著正相关性（Hou et al., 2010; 王胤和姚瑞玲, 2020; 罗嘉亮等, 2020）。因此，适宜的继代培养温度下内源 IAA 含量与相关生根指标呈正相关性，推测可能与高水平 IAA 在不定根形成初期促进分生组织细胞去分化和分裂、诱导根原基有关（Taramino et al., 2007）。

多数研究认为 ABA 是一种生根抑制激素，根原基诱导期 ABA 含量会保持在较低水平，在杜梨和麻楝（*Chukrasia tabularis*）等植物中都得到了证实（闫帅等, 2019; 王青等, 2020）。本研究结果与上述一致，具体体现在 ABA 含量随着温度升高呈现先下降后上升的趋势，在 24 °C 时含量最低，显著低于其他温度处理，且此温度处理下的试管苗后续的生根率显著高于其他温度处理，ABA 含量与生根率呈极显著负相关关系（ $r = -0.83$ ）。这可能是由于低浓度的 ABA 含量有利于愈伤组织的形成与分化和细胞伸长，进一步促进根原基的诱导（Takatsuka & Umeda, 2019）。

GA<sub>3</sub> 能够促进植株生长，但对于不定根发生的影响存在物种间差异。有研究发现 GA<sub>3</sub> 含量与糙叶杜鹃（*Rhododendron scabrifolium*）和长蕊杜鹃（*R. stamineum*）插穗不定根的形成呈正相关性（赵云龙等, 2013）。但也有研究认为 GA<sub>3</sub> 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（Hou et al., 2010; 韩继红等, 2019; 王青等, 2020）。本研究发现，GA<sub>3</sub> 含量随着温度的上升呈现先上升后下降的趋势，尽管其与生根率关系不显著，但与平均根数呈显著负相关关系（ $r = -0.60$ ）。这和文书生等（2024）的研究结论一致，‘正午’牡丹的 GA<sub>3</sub> 含量与平均根数呈显著负相关关系。因此，牡丹试管苗的内源 GA<sub>3</sub> 含量与不定根发生呈负相关，可能是由于增殖阶段末期高浓度 GA<sub>3</sub> 会抑制牡丹茎基部细胞分裂，进而抑制不定根的形成（张晓平等, 2004）。

在植物的生根过程中，不仅仅是单一激素起主导作用，而是多个激素之间相互制约，共同发挥作用，不同激素含量比值的动态变化也能反映植物生根能力（吴文浩等, 2016）。IAA 作为植物离体再生的核心激素，其他激素对不定根发生的影响均与 IAA 有极大的关联性（Gallavotti, 2013）。本研究发现 IAA/ABA 比值与生根率呈极显著正相关关系（ $r = 0.91$ ），其比值在 24 °C 时最高且显著高于其他温度处理。这与前人在‘太平红’牡丹（*P.*

*suffruticosa* ‘Tai Ping Hong’）（贺丹等, 2011）和麻楝（王青等, 2020）等植物中的研究结果一致, 这表明 IAA/ABA 是衡量生根率的重要指标。本研究还发现 IAA/ZR 与生根率呈显著正相关 ( $r = 0.69$ ), 这与前人在杜梨和麻楝中研究结果一致（闫帅等, 2019; 王青等, 2020）。本研究中 IAA/GA<sub>3</sub> 与生根率呈显著正相关 ( $r = 0.59$ ), 这与王胤和姚瑞玲（2020）在马尾松上的研究一致。综上, 内源 IAA 与 GA<sub>3</sub>、ABA、ZR 间的平衡调控着牡丹试管苗不定根发育, 高比值的 IAA/ABA、IAA/ZR 和 IAA/GA<sub>3</sub> 有利于牡丹试管苗不定根的发生。

### 3.2.2 酶活性与试管苗生根的关系

SOD 被证实与根系发育密切相关, 目前关于 SOD 活性对于生根的影响存在两种观点, Wang 等（2021）发现在对‘凤丹白’牡丹根系进行修剪后, 牡丹幼苗的 SOD 活性在根原基诱导的第 3 天达到峰值, 表明高 SOD 活性可以促进不定根的产生; 而赵云龙等（2013）发现处于逆境状态时的糙叶杜鹃在根形成阶段, SOD 活性逐渐降低, 说明较低的 SOD 活性促进不定根形成。本研究结果与后一种观点较为一致, 发现试管苗的 SOD 活性与生根率呈极显著负相关关系 ( $r = -0.83$ ), 其活性随着继代培养温度的升高而逐渐降低。本研究中, 24 °C 下适度的 SOD 活性降低（相较于低温 16 °C 和 20 °C）可能允许维持促生根的 ROS 阈值（如 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的生理性累积）, 而非氧化损伤。此外, 本研究中 POD 活性随着继代培养温度的升高而逐渐降低, 但基于相关性分析发现 POD 活性与牡丹试管苗不定根的发生无显著相关性, 与文书生等（2024）在‘正午’牡丹中得出的结论一致, 表明继代培养时的 POD 活性变化对牡丹试管苗生根影响不大。CAT 活性与生根相关指标无显著相关性, 说明其不是影响生根的关键酶。综上, SOD 活性是影响牡丹试管苗不定根发生的关键因子, 其较低的活性有利于不定根的生成, 而 POD 活性和 CAT 活性与牡丹试管苗不定根的发生无显著相关关系。

### 3.2.3 总酚含量与试管苗生根的关系

植物的生根与酚类物质密切相关（符真珠等, 2016; Shang et al., 2017; 韩继红等, 2019）。目前有关牡丹试管苗酚类物质的研究报道主要集中在酚类与基部褐化的关系以及酚类物质在 IAA 代谢中起的作用（Shang et al., 2017; Ghimire et al., 2022）。牡丹中芍药苷、没食子酸甲酯、莽草酸、苯甲酸、4-羟基苯甲酸可能与牡丹试管苗生根密切相关, 不同的酚酸对于生根所起作用也有不同（符真珠等, 2016）。本研究中牡丹试管苗茎叶总酚含量随着继代培养温度的升高而增加, 试管苗褐化程度也随之加重, 茎叶总酚含量与‘皇冠’牡丹试管苗的平均根长呈显著正相关关系 ( $r = 0.71$ ), 推测其原因可能是酚酸类物质刺激了 IAA 的生成, 促进根的伸长生长（Shang et al., 2017）。此外, 本研究还发现茎叶总酚含量与生根率、根数等指标无显著相关性, 猜测在牡丹试管苗的生根过程中有不同的酚类物质共同起作用, 不同的酚类物质在植物体内的代谢途径或产生的次生代谢产物不同, 从而导致其对试管苗生根的作用不同。

## 3.3 继代培养温度对试管苗叶片显微结构的影响

叶片是联系植物生理和外环境的桥梁, 通过调整叶片功能性状应对不同生境, 是植物适应环境变化的一种生存策略（García-Cervigón et al., 2021）。本研究中, 牡丹试管苗随着继代培养温度的逐步升高, 气孔长轴长度均逐渐减小, 且四个温度处理间差异显著, 其余叶片显微结构指标均无显著性差异。基于相关性分析可以发现叶片气孔长轴与生根率呈显著负相关关系 ( $r = -0.68$ )。叶片在温度较高的情况下, 为了使其具有较低的蒸腾速率, 提高水分利用效率, 其下表皮的气孔逐渐变小, 加快光合效率, 促进水分和营养物质运输（张冬勤等, 2024）。据此推测, 适宜温度下优化的气孔特征可能通过改善植株水分代谢和生理状态, 从而对后续生根产生积极影响。

综上所述, 继代培养温度显著影响‘皇冠’牡丹试管苗增殖及后续生根, 24℃为适宜继代培养温度, 此时增殖系数较高(2.12), 芽质量优良, 后续生根率达39.05%且根系发育良好。生理机制分析表明, IAA、ABA含量及IAA/ABA比值和SOD活性等是衡量生根的重要指标。表明温度通过调控内源激素平衡、抗氧化酶活性及叶片结构影响生根, 为牡丹高效快繁提供了理论依据与技术支持。

## 参考文献:

- BERUTO M, LANTERI L, PORTOGALLO C, 2004. Micropropagation of tree peony (*Paeonia suffruticosa*) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 79(2): 249-255.
- BOUZA L, JACQUES M, SOTTA B, et al., 1994. The reactivation of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) vitro plants by chilling is correlated with modifications of abscisic acid, auxin and cytokinin levels [J]. Plant Science, 97(2): 153-160.
- CHENG F Y, 2007. Advances in the breeding of tree peonies and a cultivar system for the cultivar group [J]. International Journal of Plant Breeding, 1(2): 89-104.
- CHU C C, LI D W, 1992. The vitrification in tree peony [J]. Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition), (1): 70-73. [储成才, 李大卫, 1992. 牡丹组织培养中玻璃化现象的出现及初步观察 [J]. 河南师范大学学报(自然科学版), (1): 70-73.]
- FU Z Z, DU J, HE S L, et al., 2016. Variation differences of phenolic acids during *in vitro* rooting of *Paeonia suffruticosa* plantlets [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 32(25): 59-64. [符真珠, 杜君, 何松林, 等, 2016. 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, 32(25): 59-64.]
- GALLAVOTTI A, 2013. The role of auxin in shaping shoot architecture [J]. Journal of Experimental Botany, 64(9): 2593-2608.
- GARCÍA-CERVIGÓN A I, GARCÍA-LÓPEZ M A, PISTÓN N, et al., 2021. Co-ordination between xylem anatomy, plant architecture and leaf functional traits in response to abiotic and biotic drivers in a nurse cushion plant [J]. Annals of Botany, 127(7): 919-929.
- GHIMIRE B K, KIM S H, YU C Y, et al., 2022. Biochemical and physiological changes during early adventitious root formation in *Chrysanthemum indicum* Linné cuttings [J]. Plants, 11(11): 1440.
- HAN J H, SHAO W H, LIU J F, et al., 2019. Content changes of endogenous hormone and polyphenols during hardwood cuttage progress in *Sapindus mukorossi* [J]. Non-wood Forest Research, 37(3): 37-43, 51. [韩继红, 邵文豪, 刘金凤, 等, 2019. 无患子硬枝扦插进程插穗内源激素和多酚类物质含量变化 [J]. 经济林研究, 37(03): 37-43, 51.]
- HE D, WANG Z, HE S L, 2011. Adventitious root generating process and hormone and enzyme changes *in vitro* *Paeonia suffruticosa* [J]. Acta Horticulturae Sinica, 38(4): 770-776. [贺丹, 王政, 何松林, 2011. 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, 38(4): 770-776.]

- HOU J W, GUO S J, WANG G Y, 2010. Effects of *in vitro* subculture on the physiological characteristics of adventitious root formation in microshoots of *Castanea mollissima* cv. ‘Yan Shan Hong’ [J]. Journal of Forestry Research, 21(2): 155-160.
- HUANG S J, 2021. Study on *in vitro* propagation technology of three cultivars of tree peony [D]. Beijing: Beijing Forestry University: 28-33. [黄素姣, 2021. 三个牡丹品种的离体快繁技术研究 [D]. 北京: 北京林业大学: 28-33.]
- KRAJNC A, TURINEK M, IVANČIČ A, 2013. Morphological and physiological changes during adventitious root formation as affected by auxin metabolism: stimulatory effect of auxin containing seaweed extract treatment [J]. Agricultura, 10(1/2): 17-27.
- LI CC, ZHAO Y L, ZHANG D L, et al., 2012. Changes of endogenous hormones and anatomical structure of *Rhododendron stamineum* during cutting propagation [J]. Forest Research, 25(3): 360-365. [李朝婵, 赵云龙, 张冬林, 等, 2012. 长蕊杜鹃扦插内源激素变化及解剖结构观察 [J]. 林业科学研究, 25(3): 360-365.]
- LI H S, SUN Q, ZHAO S J, et al., 2000. Principle and technology of plant physiological and biochemical experiment [M]. Beijing: Higher Education Press: 164-168, 186-197. [李合生, 孙群, 赵世杰, 等, 2000. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社: 164-168, 186-197.]
- LI L Z M, 2016. Micropropagation of *Paeonia* ‘Bartzella’ – a hybrid between herbaceous and tree peony [D]. Beijing: Beijing Forestry University: 38-40. [李刘泽木, 2016. 芍药与牡丹组间杂种 ‘Bartzella’ 的离体快繁技术研究 [D]. 北京: 北京林业大学: 38-40.]
- LI S H, ZHANG X Z, PAN Y, et al., 2024. Optimization of macro-elements composition in the multiplication medium of *Paeonia* × *lemoinei* ‘Yellow Crown’ based on response surface methodology [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 40(8): 1493-1506. [李胜皓, 张晓芝, 潘月, 等, 2024. 基于响应面法对皇冠牡丹(*Paeonia* × *lemoinei* ‘Yellow Crown’)增殖培养基大量元素配方的优化 [J]. 江苏农业学报, 40(8): 1493-1506.]
- LI S S, YUAN R Y, CHEN L G, et al., 2015. Systematic qualitative and quantitative assessment of fatty acids in the seeds of 60 tree peony (*Paeonia section* Moutan DC.) cultivars by GC-MS [J]. Food Chemistry, 173: 133-140.
- LI Y L, WU D Y, PAN S L, et al., 1984. *In vitro* propagation of *Paeonia suffruticosa* [J]. Chinese Science Bulletin (8): 500-502. [李玉龙, 吴德玉, 潘淑龙, 等, 1984. 牡丹试管苗繁殖技术的研究 [J]. 科学通报 (8): 500-502.]
- LUO J L, LI F, LI J H, et al., 2020. Effects of subculture times on rooting ability, leaf morphology and hormone level of *Pyrus betulaefolia* [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 40(2): 304-310. [罗嘉亮, 李凡, 李俊豪, 等, 2020. 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, 40(2): 304-310.]
- MITTLER R, ZANDALINAS S I, FICHMAN Y, et al., 2022. Reactive oxygen species signalling in plant stress responses [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 23: 663-679.

- QIU J M, 2010. Study on *in vitro* micropropagation of tree peony [D]. Beijing: Beijing Forestry University: 13-16. [邱金梅, 2010. 牡丹离体快繁技术的研究 [D]. 北京: 北京林业大学: 13-16.]
- SHANG W Q, WANG Z, HE S L, et al., 2021. 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), 49(2): 129-136. [尚文倩, 王政, 何松林, 等, 2021. 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), 49(2): 129-136.]
- SHANG W Q, WANG Z, HE S L, et al., 2017. Research on the relationship between phenolic acids and rooting of tree peony (*Paeonia suffruticosa*) plantlets *in vitro* [J]. Scientia Horticulturae, 224: 53-60.
- TAKATSUKA H, UMEDA M, 2019. ABA inhibits root cell elongation through repressing the cytokinin signaling [J]. Plant Signaling & Behavior, 14(3): e1578632.
- TARAMINO G, SAUER M, STAUFFER J L, et al., 2007. The maize (*Zea mays* L.) RTCS gene encodes a LOB domain protein that is a key regulator of embryonic seminal and post-embryonic shoot-borne root initiation [J]. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology, 50(4): 649-659.
- WANG Q, ZHANG J, ZHONG C L, et al., 2020. Variation of endogenesis hormone and nutritive matter concentration in *Chukrasia tabularis* cuttings during rooting [J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 40(4): 111-119. [王青, 张捷, 仲崇禄, 等, 2020. 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, 40(4): 111-119.]
- WANG X, 2016. *In vitro* rapid propagation of *Paeonia ostii* ‘Feng Dan’ [D]. Beijing: Beijing Forestry University: 32-36. [王新, 2016. ‘凤丹’牡丹离体快繁技术研究 [D]. 北京: 北京林业大学: 32-36.]
- WANG X, CHENG F Y, ZHONG Y, et al., 2016. Establishment of *in vitro* rapid propagation system for tree peony (*Paeonia ostii*) [J]. Scientia Silvae Sinicae, 52(5): 101-110. [王新, 成仿云, 钟原, 等, 2016. 凤丹牡丹鳞芽离体培养与快繁技术 [J]. 林业科学, 52(5): 101-110.]
- WANG Y, YAO R L, 2020. Rooting capacity of *Pinus massoniana* and the correlations endohormones levels during subculture [J]. Scientia Silvae Sinicae, 56(8): 38-46. [王胤, 姚瑞玲, 2020. 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, 56(8): 38-46.]
- WANG Y X, SHI X X, DU G Q, et al., 2008. Micropropagation of ‘Luo Yang Hong’ peony *in vitro* [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, (10): 400-404. [王燕霞, 师校欣, 杜国强, 等, 2008. ‘洛阳红’牡丹组织培养快速繁殖技术研究 [J]. 中国农学通报, (10): 400-404.]



- WANG Z, SU G G, HE S L, et al., 2021. Effects of root pruning on adventitious root formation, enzyme activities, and hormone levels in *Paeonia suffruticosa* ‘Fengdanbai’ seedlings[J]. Horticultural Science and Technology, 39(1): 10-22.
- WEN S S, CHENG F Y, ZHONG Y, et al., 2016a. 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, 201: 10-17.
- WEN S S, CHENG F Y, ZHONG Y, 2016b. Micropropagation of tree peony ( *Paeonia × lemoinei* ‘High Noon’) and the assessment of genetic stability by SSR analysis[J]. Propagation of Ornamental Plants, 16(1): 19-27.
- WEN S S, CHENG F Y, ZHONG Y, 2021. Optimization of the micropropagation protocol of *Paeonia × lemoinei* ‘ High Noon’ [J]. Scientia Silvae Sinicae, 57(12): 68-78. [文书生, 成仿云, 钟原, 2021. ‘正午’牡丹微繁殖技术体系的优化 [J]. 林业科学, 57(12): 68-78.]
- WEN S S, CHENG F Y, ZHONG Y, et al., 2016. Protocol for the micropropagation of tree peony (*Paeonia × lemoinei* ‘High Noon’ ) [J]. Plant Science Journal, 34(1): 143-150. [文书生, 成仿云, 钟原, 等, 2016. ‘正午’牡丹微繁殖体系的建立 [J]. 植物科学学报, 34(1): 143-150.]
- WEN S S, CUI H Y, SUN X Y, et al., 2024. Effect of subculture cycle on *in vitro* adventitious rooting of *Paeonia × lemoinei* ‘High Noon’ and related physiological indexes [J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 52(5): 124-132, 143. [文书生, 崔慧颖, 孙薛莹, 等, 2024. 继代培养周期对‘正午’牡丹不定根发生及生理指标的影响 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 52(5): 124-132, 143.]
- WU W H, CAO F, LIU Z Z, et al., 2016. Effects of NAA treatment on the endogenous hormone changes in cuttings of *Carya illinoensis* during rooting [J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 40(5): 191-196. [吴文浩, 曹凡, 刘壮壮, 等, 2016. NAA 对薄壳山核桃扦插生根过程中内源激素含量变化的影响 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 40(5): 191-196.]
- YAN S, ZHANG S Y, XU K, et al., 2019. Dynamic changes in polyamines, endogenous hormones and oxidase activities during rooting of *in vitro* plantlets of *Pyrus betulifolia* Bunge [J]. Journal of Fruit Science, 36(3): 318-326. [闫帅, 张少瑜, 徐锴, 等, 2019. 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, 36(3): 318-326.]
- YANG L F, ZENG Q, LI H B, et al., 2011. Measurement of catalase activity in soil by ultraviolet spectrophotometry [J]. Chinese Journal of Soil Science, 42(1): 207-210. [杨兰芳, 曾巧, 李海波, 等, 2011. 紫外分光光度法测定土壤过氧化氢酶活性 [J]. 土壤通报, 42(1): 207-210.]
- ZHANG D Q, JIA W Q, HE S L, et al., 2024. Leaf anatomy of different peony and its environmental adaptability [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 44(7): 1153-1163.

[张冬勤, 贾文庆, 何松林, 等, 2024. 不同牡丹叶片解剖结构及其环境适应性 [J]. 西北植物学报, 44(7): 1153-1163.]

ZHANG G H, WANG H M, WANG L X, 2001. Study on tissue culture techniques for peony [J]. Shandong Agricultural Sciences, (5): 16-18. [张桂花, 王洪梅, 王连祥, 2001. 牡丹组织培养技术研究 [J]. 山东农业科学, (5): 16-18.]

ZHANG X P, FANG Y M, HUANG S H, 2004. The endogenous hormone's variation during the adventitious roots formation of hybrid tuliptrees by cutting [J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), (3): 79-82. [张晓平, 方炎明, 黄绍辉, 2004. 杂种鹅掌楸扦插生根过程中内源激素的变化 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), (3): 79-82.]

ZHAO Y L, CHEN X, LI C C, 2013. Dynamic of physiology and biochemistry during wild *Rhododendron scabrifolium* cutting propagation [J]. Scientia Silvae Sinicae, 49(6): 45-51. [赵云龙, 陈训, 李朝婵, 2013. 糙叶杜鹃扦插生根过程中生理生化分析 [J]. 林业科学, 49(6): 45-51.]