

· 技术方法 ·

伊藤杂种‘和谐’组培快繁体系的建立

康敏^{1,4}, 张美莹^{1,4}, 齐秀双⁶, 佟宁宁^{4,5}, 李旻^{4,5}, 舒庆艳^{4,5}, 刘政安^{4,5}
吕长平^{2,3*}, 彭丽平^{4,5*}

¹湖南农业大学园艺学院, 长沙 410128; ²湖南农业大学风景园林与艺术设计学院, 长沙 410128; ³湖南农业大学湖南省中亚热带优质花木繁育与利用工程技术研究中心, 长沙 410128; ⁴中国科学院植物研究所植物多样性与特色经济作物全国重点实验室, 北京 100093; ⁵国家植物园, 北京 100093; ⁶天香源(辽宁)生物科技有限责任公司, 葫芦岛 125300

摘要 以伊藤杂种‘和谐’(Itoh hybrids ‘He Xie’)的鳞芽为材料建立离体快繁技术体系, 可克服传统方法繁育较慢的缺点, 加速伊藤杂种优良品种的繁育推广。采用单因子试验设计, 分别探究不同灭菌时间、不同植物生长调节剂浓度、不同根诱导时间以及不同生根苗等级对‘和谐’组培苗启动、增殖、生根和驯化效果的影响。结果表明, 用2%次氯酸钠溶液的最佳灭菌时间为12分钟, 鳞芽污染率为9.09%; 最佳初始培养基配方为MS+1.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ GA₃+0.5 mg·L⁻¹ AgNO₃; 最佳增殖培养基配方为MS+450 mg·L⁻¹ CaCl₂+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ IBA+0.2 mg·L⁻¹ GA₃+0.5 mg·L⁻¹ AgNO₃, 增殖系数为3.3; 无根苗在根诱导培养基1/2MS+1.0 mg·L⁻¹ 腐胺+2.0 mg·L⁻¹ IBA上, 经4℃低温暗培养8天后常温光照培养30天, 再转入根形成培养基1/2MS+1.0 g·L⁻¹ AC, 培养20天生根率达66.7%; 苗移栽的基质为珍珠岩:蛭石:草炭土=1:1:1 (v/v/v), 移栽60天后, 一级苗成活率最高为52.0%, 二级苗和三级苗则大部分死亡, 表明生根质量对移栽成活至关重要。

关键词 伊藤‘和谐’, 启动与增殖, 生根, 鳞芽, 移栽驯化

康敏, 张美莹, 齐秀双, 佟宁宁, 李旻, 舒庆艳, 刘政安, 吕长平, 彭丽平 (2024). 伊藤杂种‘和谐’组培快繁体系的建立. 植物学报 59, 441–451.

芍药科(Paeoniaceae)芍药属(*Paeonia*)分为牡丹亚属(Subgenus *Moutan*)、芍药亚属(Subgenus *Paeonia*)和芍药属亚属间杂交种(Intersubgeneric hybrids of *Paeonia*) (即伊藤杂种(Itoh hybrids)) (Zhou et al., 2021)。伊藤杂种是以牡丹(*Paeonia suffruticosa*)和芍药(*P. lactiflora*)为父母本得到的远缘杂交种, 兼具牡丹与芍药的共同特征和优点(郝青等, 2008)。截至目前, 在美国芍药协会上登记的伊藤品种有162个(<https://americanpeonysociety.org/cultivars>) (2023-10-08)。伊藤杂种是三倍体, 具有极强的杂种优势(杨柳慧等, 2017; 马翔龙等, 2018), 其茎秆挺拔、花头直立、花色奇特、抗逆性强(孙菊芳和成仿云, 2007; 庄倩等, 2011; 刘建鑫和于晓南, 2015)。尤其是伊藤牡丹花色和花形丰富, 花期较长,

开花时间介于牡丹与芍药之间, 适宜作鲜切花, 也可用于园林绿化中的专类观赏园及盆栽种植(吴敬需等, 2022), 以及会展布置等(李萍和成仿云, 2007; 吴国新等, 2011; 马翔龙等, 2018), 值得大力推广应用。

‘和谐’是国内首个伊藤杂种, 由郝青等(2008)发现与命名, 并从形态学和分子生物学两方面证实‘和谐’是紫斑牡丹与芍药远缘杂交形成的新材料, 其成功开花是我国芍药属育种史上的一个里程碑。

‘和谐’花单瓣, 呈浅紫红色, 基部有黑紫色花斑(图1A), 花青素和类黄酮的含量较高, 是芍药属花色发育研究的重要模式材料(韩鲲等, 2021; Li et al., 2022)。同时, ‘和谐’的花粉亲和率达4.1%, 是珍贵的育种材料(荆丹丹等, 2011), 具有一定的可育性(Gu et al., 2019)。此外, ‘和谐’根、茎和叶的化学成分

收稿日期: 2023-08-03; 接受日期: 2023-12-19

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(No.32201609)和中国科学院植物研究所企业横向项目(No.E0119C6001)

* 通讯作者。E-mail: changpinglv@sina.com; pengliiping@ibcas.ac.cn

含量高, 其中, 茎和叶富含单萜苷、酚类和黄酮类物质, 抗氧化能力强; 根部含有较高的没食子酸、肉桂酸和丹皮酚(Tong et al., 2021), 药用价值高, 应用前景广阔。

本研究以伊藤杂种‘和谐’鳞芽为外植体, 探究不同灭菌时间、植物生长调节剂(plant growth regulators, PGRs)浓度、根诱导时间对组培苗启动、增殖和生根的影响以及不同生根苗等级的驯化效果, 建立了‘和谐’快繁技术体系, 为其组培快繁技术研究提供理论支撑。

1 植物材料

2021年3月初, 从中国科学院植物研究所植物园(现国家植物园南园)牡丹芍药种质资源圃取伊藤杂种‘和谐’(Itoh hybrids ‘He Xie’)处于萌动期饱满的鳞芽, 用冰盒带回实验室作为外植体材料(图1B)。

2 培养基成分与培养条件

2.1 外植体消毒

剥去鳞芽外层带有泥土以及褐色的2层鳞片, 在超净工作台中使用75%乙醇表面消毒1分钟, 用2%次氯酸钠溶液分别灭菌8、10和12分钟, 再用无菌水清洗5次, 每次1分钟, 最后剥去剩余鳞片及小叶, 接种于MS+1.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA+0.3 mg·L⁻¹ GA₃培养基上。每处理组9瓶, 每瓶1个芽。培养7天后统计芽污染率及存活率, 筛选出最佳消毒时间。

基础营养培养基为MS+3%蔗糖+7.0 g·L⁻¹琼脂, pH5.8–6.0, 121°C灭菌20分钟。培养条件: 温度为(24±1)°C, 光照强度为50 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光周期为14小时光照/10小时黑暗。

2.2 初代培养

将鳞芽接种至添加0.2 mg·L⁻¹ GA₃与不同浓度6-BA的培养基中, 同时添加0.5 mg·L⁻¹ AgNO₃防止褐化(闫晓芳和屈武斐, 2020)。设置不同6-BA浓度(0.5、1.0和1.5 mg·L⁻¹)。共3个处理组, 每处理组15个外植体, 3次重复。前3天暗培养, 培养条件同2.1节。30天后统计并记录芽诱导率、增殖系数(茎长≥1.0 cm的芽数)、单株茎长、单株叶片数和生长情况。

2.3 增殖培养

选取茎长≥1.0 cm的健壮单芽进行增殖培养, 分离腋芽后接种到添加不同浓度GA₃ (0.2、0.5和0.8 mg·L⁻¹)的培养基中, 另加450 mg·L⁻¹ CaCl₂、0.2 mg·L⁻¹ IBA、0.5 mg·L⁻¹ 6-BA与0.5 mg·L⁻¹ AgNO₃(闫晓芳和屈武斐, 2020)。共3个处理组, 每处理24个芽, 培养条件同2.1节。培养35天后, 统计增殖系数与褐化率。继续进行继代(1–5代)培养, 探究不同继代次数对增殖的影响, 每35天继代1次, 统计增殖率。

2.4 生根培养

生根培养采用改良的两步法, 以茎长≥1.0 cm的健壮单芽为材料, 旨在筛选出诱导生根的最佳天数及IBA浓度。

根诱导培养: 将增殖培养35天不保留叶的单芽(图2A)接入添加1/2MS、1.0 mg·L⁻¹腐胺与不同浓度(0.5、1.0、1.5、2.0和2.5 mg·L⁻¹) IBA的培养基中。共5个处理组, 每个处理组21株试管苗。先置于4°C冰箱暗处理8天, 再在(24±1)°C下全天暗培养, 分别在30、40和50天调查生根诱导情况。

根形成培养: 将根诱导培养各处理的试管苗转入添加1/2MS与1.0 g·L⁻¹活性炭(AC)的培养基中以促进根的伸长, 培养条件同2.1节。培养20天后统计并记录生根数、根长、生根率与愈伤组织质量。

2.5 驯化与移栽

将根形成20天后的生根苗置于4°C冰箱中暗处理30天(图2B)以解除休眠, (24±1)°C光照下闭瓶适应1周, 然后开瓶炼苗3–5天(Bouza et al., 1992, 1994a)。将生根苗从瓶内取出, 平行于地面放置, 测量最长根的横径, 并结合根茎发育情况将生根苗分为3级。三级苗(图2C): 基部愈伤化严重, 愈伤组织较大; 根数≤1条, 根较短、多呈白色透明状, 茎部褐色。二级苗(图2D): 基部膨大, 愈伤组织较小; 呈绿色或灰绿色, 端白; 根数1–3条, 茎部发育良好, 叶黄色或无叶。一级苗(图2E, F): 基本无愈伤组织, 根数≥3条, 根较长, 呈绿色, 端白; 茎部发育良好, 无茎尖坏死。将生根试管苗移栽至塑料花盆(长×宽×高=8 cm × 8 cm × 9 cm)中, 移栽基质为珍珠岩:蛭石:草炭土=1:1:1(v/v/v)。移栽苗在光照培养箱中培养, 常规水肥管理。培养条件: 温度为(20±1)°C, 湿度从70%逐渐降至

60%, 光照强度为 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光周期为14小时光照/10小时黑暗。每隔10天观察苗的生长状态并调查移栽苗的成活率, 每隔20天拍照并记录生长状况。

2.6 数据处理与分析

利用以下公式进行计算。

芽污染率=(芽污染数/接种外植体数) \times 100%;

芽褐化率=(芽褐化数/接种外植体数) \times 100%;

芽诱导率=(芽萌发外植体数/接种外植体数) \times 100%;

芽增殖系数=培养末期茎长 \geq 1 cm芽数/接种芽数;

生根率=(生根茎段数/培养茎段数) \times 100%。

采用SPSS 25.0软件对数据进行方差分析。利用Duncan法检验差异显著性($P\leq 0.05$)。

3 结果与讨论

3.1 不同消毒时间对外植体消毒效果的影响

外植体用2%次氯酸钠溶液进行消毒, 不同处理时间下的污染率见表1。结果表明, 外植体污染率随次氯酸钠灭菌时间的增加呈逐渐下降趋势, 灭菌12分钟效果最好, 此时芽的状态最佳, 污染率为9.09%。在同一灭菌处理下, 外植体从第3天开始出现污染, 培养1周后, 部分外植体长菌, 有的菌呈乳白色黏状,

表1 不同消毒时间下‘和谐’鳞芽的污染率和存活率
Table 1 Contamination rate and surviveal rate of ‘He Xie’ buds treated with different disinfection times

Treat-ments	Time (min)	Sodium hypochlorite	Contamina-tion rate (%)	Survival rate (%)
X1	8	2%	62.5	100
X2	10	2%	40.0	100
X3	12	2%	9.09	100

表2 不同浓度6-BA对‘和谐’鳞芽初代培养的影响

Table 2 Effect of different 6-BA concentrations on the primary culture of ‘He Xie’ buds

Treatments	GA ₃ (mg·L ⁻¹)	6-BA (mg·L ⁻¹)	Induction rate (%)	Browning rate (%)	Multiplication factor (n)	Stem length (cm)	Leaves per plant (n)
1	0.2	0.5	100	20	2.40 \pm 0.26 b	2.58 \pm 0.60 a	6.47 \pm 1.01 a
2	0.2	1.0	100	10	2.80 \pm 0.10 a	2.95 \pm 0.23 a	7.80 \pm 0.70 a
3	0.2	1.5	100	10	2.93 \pm 0.12 a	3.05 \pm 0.41 a	6.93 \pm 0.21 a

数据为平均值 \pm 标准误。同列不同小写字母表示用邓肯检验法差异显著($P\leq 0.05$)。
Data are means \pm SE. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences based on Duncan’s test ($P\leq 0.05$).

且随时间的延长逐渐浸满整个培养基; 有的菌为绿色或白色带毛的霉菌。未被污染的外植体在不同处理时间下成活率均达100%。

3.2 不同浓度6-BA对鳞芽初代培养的影响

将‘和谐’鳞芽接种到启动培养基, 3天后芽开始膨大萌发, 体积变大; 15–20天, 鳞芽的新梢由嫩红色逐渐变为带红褐的绿色, 之后伸长的芽在其节处抽生出芽, 并逐渐展叶, 叶片呈绿色或紫红色, 数量随时间的延长增多。外植体在含不同浓度6-BA的培养基中, 丛生芽的诱导率均达100% (表2)。接种30天, 处理组1的增殖系数显著低于另两个处理组, 各处理组之间的单株茎长与单株复叶数无显著差异。处理组3的单芽数量多, 褐化率低, 单株茎长, 成活率高且增殖系数为2.93, 此时植株生长健壮, 叶面积更大(图1C–E)。因此, 确定添加 $1.5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA最适宜‘和谐’鳞芽启动培养。

3.3 不同浓度GA₃与继代次数对增殖培养的影响

将初代培养得到的健壮新梢(茎长 $\geq 1.0\ \text{cm}$)接入增殖培养基。结果表明, 0.2、0.5和 $0.8\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GA₃处理组的增殖系数分别为3.25、2.67和2.13, 且差异显著。处理组3的增殖系数最低, 且褐化率最高; 而处理组1的增殖系数最高, 且单芽生长健壮(图1F), 叶片较大, 褐化率最低, 仅为0.04% (表3)。因此, 确定 $0.2\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为增殖培养的最适GA₃浓度。在处理组3的培养基上进行继代培养, 结果显示, 第1、4和5代增殖率分别为39.47%、42.64%和64.75%, 继代5次效果最佳, 此时外植体侧芽分化能力强。

3.4 不同浓度IBA与诱导时间对生根培养的影响

生根率与IBA浓度及诱导时间显著相关(表4)。IBA浓



图1 ‘和谐’鳞芽启动与单芽增殖
(A) 花; (B) 外植体; (C)–(E) 鳞芽在不同浓度(0.5、1.0和1.5 mg·L⁻¹) 6-BA启动培养30天后试管苗生长状态; (F) 增殖培养30天后单芽生长状态。Bars=2 cm

Figure 1 Bud initiation and single bud proliferation of 'He Xie'
(A) Flowers; (B) Explants; (C)–(E) The performance of test-tube plantlets after bud initiation at different 6-BA concentrations (0.5, 1.0, and 1.5 mg·L⁻¹) for 30 days; (F) Growth situation of single shoot after proliferation culture for 30 days. Bars=2 cm

表3 GA₃浓度对‘和谐’试管苗增殖的影响

Table 3 Effect of GA₃ concentration on proliferation of 'He Xie' test-tube plantlets

Treatments	6-BA (mg·L ⁻¹)	IBA (mg·L ⁻¹)	GA ₃ (mg·L ⁻¹)	Multiplication factor (<i>n</i>)	Browning rate (%)
1	0.5	0.2	0.2	3.25±0.33 a	0.04±0.07 a
2	0.5	0.2	0.5	2.67±0.29 ab	0.08±0.07 a
3	0.5	0.2	0.8	2.13±0.33 b	0.17±0.07 a

数据为平均值±标准误。同列不同小写字母表示用邓肯检验法差异显著($P\leq 0.05$)。
Data are means±SE. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences based on Duncan's test ($P\leq 0.05$).

度为2.5 mg·L⁻¹ (组合14), 诱导天数为40天时‘和谐’无菌苗生根率最高, 为71.43%, 平均生根数为2.06, 平均根长为5.26 cm; 其次是IBA浓度为2.0 mg·L⁻¹ (组合10), 诱导30天时生根率为66.67%, 平均生根数为3.33, 根数最多为7条, 平均根长为4.77 cm; 其它IBA浓度及诱导时间组合的生根率和平均生根数均显著低于以上2个组合。组合14和组合10的生根率和平均根长差异不显著, 但组合10的平均根数高于组合14, 且诱导时间更短。综合考虑, 确定IBA浓度为2.0 mg·L⁻¹、诱导30天最适合生根诱导。

3.5 生根质量与生根数对驯化移栽的影响

依据生根数和愈伤组织大小将生根苗(图2B)分为3个等级(图2C–F), 其中一级苗占28.7%, 二级苗和三级苗占比分别为47.2%和24.1%。由表5可知, 移栽20天后, 一级苗的成活率达92%, 有3片小叶, 二级苗成活率为85.37%, 有1–2片小叶, 叶面积较小, 三级苗成活率仅有47.62%, 有0–1片未展开的小叶; 移栽40天后, 成活率降低, 但移栽苗一直在生长, 叶面积变大, 茎秆增高。综上表明, 根数>3条、无愈伤组织, 生根苗成活率更高, 移栽苗长势更好。移植30天是移栽苗

表4 IBA浓度与诱导时间对诱导生根的影响

Table 4 Effect of IBA concentration and induction time on induced rooting

Treatments	IBA (mg·L ⁻¹)	Induction time (d)	Rooting rate (%)	Rooting number (n)	Root length (cm)
1	0.5	30	1.59±2.75 h	0.67±1.15 cd	1.53±2.66 bc
2	0.5	40	19.05±2.75 fg	2.00±1.15 abc	5.20±2.66 a
3	0.5	50	14.29±0.00 g	1.33±0.58 cde	3.87±0.23 ab
4	1.0	30	19.05±8.24 fg	1.33±0.58 cde	5.33±1.94 a
5	1.0	40	3.17±5.50 h	0.67±1.15 cd	1.53±2.66 bc
6	1.0	50	0.00±0.00 h	0.00±0.00 d	0.00±0.00 c
7	1.5	30	14.29±0.00 g	1.67±1.15 abc	4.17±2.75 ab
8	1.5	40	33.33±8.25 de	2.00±0.50 abc	4.73±0.13 a
9	1.5	50	28.57±0.00 ef	2.67±1.15 ab	5.33±0.50 a
10	2.0	30	66.67±8.25 a	3.33±0.58 a	4.77±0.65 a
11	2.0	40	42.86±0.00 bcd	2.78±0.39 ab	5.33±0.62 a
12	2.0	50	47.62±8.24 bc	2.33±0.67 abc	4.95±1.58 a
13	2.5	30	38.10±8.25 cde	1.72±0.25 abc	4.85±1.73 a
14	2.5	40	71.43±0.00 a	2.06±0.42 abc	5.26±0.52 a
15	2.5	50	52.38±8.24 b	2.11±0.84 abc	5.38±0.98 a

数据为平均值±标准误。同列不同小写字母表示用邓肯检验法差异显著($P\leq 0.05$)。
Data are means±SE. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences based on Duncan's test ($P\leq 0.05$).

表5 不同生根数与生根质量对不同时间移栽苗成活率的影响

Table 5 Effect of different rooting number and rooting quality on the survival rate of transplanted seedlings at different time

Rooting quality	Survival rate (%)					
	10 d	20 d	30 d	40 d	50 d	60 d
Level 1	96.00	92.00	72.00	72.00	64.00	52.00
Level 2	87.80	85.37	73.17	62.85	60.98	48.78
Level 3	52.38	47.62	28.57	19.05	14.29	14.29

成活的关键时期, 此时应注重管理养护。

3.6 讨论

伊藤杂种是牡丹和芍药的杂交种, 大部分为三倍体, 不结实, 目前只能采用分株或嫁接的方式进行繁殖, 繁殖效率低, 育种时间长, 导致其价格昂贵(马翔龙等, 2018), 严重制约了产业化发展。因此, 建立植物离体培养体系对种质资源保护、种苗繁殖以及工厂化生产均具有重要意义(唐凤鸾等, 2019; 王亚琴等, 2020)。近年来, 对伊藤杂种的离体快繁技术鲜有研究, 仅有李刘泽木(2016)和孙茂桐等(2022)分别对美国选育的黄色伊藤杂种 ‘巴茨拉’ 进行微繁殖技术研究, 后者还建立了 ‘巴茨拉’ 愈伤组织诱导体系。目前尚未见对其它伊藤杂种鳞芽离体快繁的研究

报道。鳞芽离体培养过程包括灭菌培养、启动培养、增殖培养、生根培养和驯化移栽, 每个步骤的技术体系都是鳞芽离体培养的关键所在。本研究对伊藤杂种 ‘和谐’ 离体快繁的各阶段分别进行优化, 解决了伊藤杂种 ‘和谐’ 离体培养中增殖率低、生根难和移栽成活率低的难题, 建立了伊藤杂种 ‘和谐’ 的离体快繁技术体系。

3.6.1 外植体与消毒剂对鳞芽消毒效果的影响

研究表明, 早春的腋芽是最适宜牡丹繁殖的外植体(孔祥生和张妙霞, 1998)。因此, 本研究选择 ‘和谐’ 早春的鳞芽(活动芽)作为外植体。外植体的带菌状况对培养物的建立和生长有重要影响, 因此对外植体采取有效的消毒处理是组织培养中的关键步骤(胡凯等,

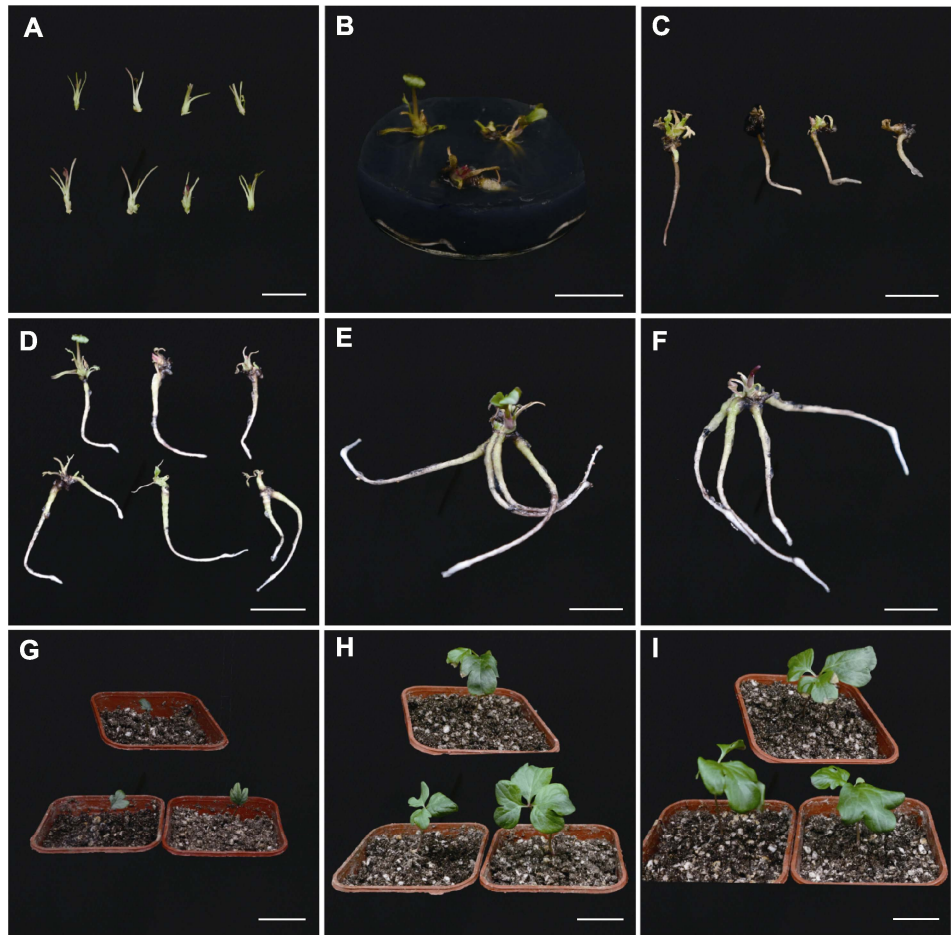


图2 ‘和谐’试管苗生根和驯化移栽的生长表现
(A) 用于生根诱导的单芽(bar=2 cm); (B) 春化30天(冷处理8天, 根诱导30天, 根伸长20天后于4℃冷藏30天)的生根苗(bar= 2 cm); (C)–(F) 不同生根质量的试管苗(C: 三级苗; D: 二级苗; E, F: 一级苗) (bars=2 cm); (G)–(I) 驯化60天不同生根质量的移栽苗(G: 三级苗; H: 二级苗; I: 一级苗) (bars=3 cm)

Figure 2 The growth performance for rooting and domesticated transplanting of ‘He Xie’ tube plantlet
(A) Single shoots used for root induction (bar=2 cm); (B) Rooted seedlings after 30 d of vernalization (cold treatment for 8 days, root induction for 30 days, and root elongation for 20 days, cold storage at 4°C for 30 days) (bar=2 cm); (C)–(F) The test tube plantlets with different rooting qualities (C: Tertiary; D: Secondary; E, F: Primary) (bars=2 cm); (G)–(I) The transplanted seedlings of different rooting quality for domesticating 60 d (G: Tertiary; H: Secondary; I: Primary) (bars=3 cm)

2007)。乙醇、升汞和次氯酸钠是植物组织培养中常用的消毒剂(张伟彬, 2022)。用乙醇对外植体进行消毒, 以70%–75%乙醇杀菌60秒效果较好。但乙醇不能彻底消毒, 一般不单独使用, 需与次氯酸钠溶液配合使用。然而, 使用乙醇和次氯酸钠消毒时间并非越长越好, 乙醇和次氯酸钠作用时间过长, 一方面会使外植体表面受损, 破坏植物组织器官; 另一方面可能会使乙醇或次氯酸钠残留在外植体表面。因此在消毒过程中, 需要用灭菌去离子水将外植体冲洗干净, 避免因消毒剂的残留导致外植体染菌(文书生等, 2016)。

本研究用2%次氯酸钠溶液对‘和谐’鳞芽进行消毒, 浸泡12分钟时, 液体呈微黄色, 外层鳞片无破损, 萌发率高, 污染率低, 然而具体消毒时间需根据外植体大小和取样时间等确定, 适当增加2–3分钟, 灭菌效果会更好。

3.6.2 植物生长调节剂对初代培养与增殖培养的影响

植物生长调节剂(PGRs)在植物组织培养中发挥至关重要的作用(Murashige, 1974)。生长素和细胞分裂素

的比例决定发育的细胞类型, 不同浓度PGRs诱导产生的形态发生过程不同(刘世强等, 1995)。初代培养时, 培养基中添加较多的细胞分裂素和少量的生长素更有利于不定芽的发生与伸长, 此时芽部的细胞会横向分裂与增殖, 从而促进芽的形成(刘东奇, 2013)。李孟悦等(2021)研究表明, 不同种类植物对培养基成分要求不同, 再生能力也存在差异, 原因可能与植物激素含量和植物种类有关。在芍药属组织培养过程中, 适量的植物生长调节剂有利于组培苗的生长, 浓度过高或过低均会对组培苗产生不利影响。通过比较玉米素(ZT)、异戊烯基腺嘌呤(2iP)、激动素(KT)、异戊烯腺苷(iPA)和BA对丛生芽诱导的影响, 发现BA诱导效果最佳(Bouza et al., 1994a)。大量研究表明, BA与GA₃配合使用可促进茎段生长, 提高增殖率(文书生等, 2016; 王新等, 2016; 刘政安等, 2021)。因此, 本研究参照李刘泽木(2016)与王新(2016)的配方进行改良与优化, 筛选出1.5 mg·L⁻¹ 6-BA与0.2 mg·L⁻¹ GA₃组合最适合‘和谐’启动培养, 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA、0.2 mg·L⁻¹ GA₃和0.2 mg·L⁻¹ IBA组合适合‘和谐’增殖培养。但用这种激素组合进行增殖培养时不能连续培养超过3代, 否则易造成茎尖及叶片坏死。研究表明, 将Ca²⁺浓度提高2倍或将只含6-BA的培养基与含6-BA和GA₃的培养基配合使用, 可以减缓此现象(Bouza et al., 1994a)。在植物组织培养中, 芍药属组培苗的增殖和生长除受植物生长调节剂的作用外, 还与外植体类型、不同种及品种的基因型、培养基添加物和培养条件等因素有关, 这些因素对‘和谐’组培苗的影响有待进一步研究。

3.6.3 生根培养基对不定根诱导与根伸长的影响

生根是芍药属离体快繁技术研究的难点, 提高生根率和生根质量是建立‘和谐’离体快繁技术的关键。目前, 最常用于生根的基础培养基为1/2MS, 诱导生根激素为IBA与1.0 mg·L⁻¹ 腐胺(李刘泽木, 2016; 文书生, 2016; 王新, 2016)。王金祥等(2005)研究表明, 启动不定根形成的重要因子中, IBA在根原基诱导阶段起重要作用, IBA可促进嫩叶和嫩芽中合成的IAA运至基部, 从而促进生根, 且比IAA生根作用更强更稳定。安佰义(2005)发现IBA对根的分化和生长的效果优于NAA, 因此选用IBA作为诱导生根的PGRs。根据IBA的使用方法不同, 牡丹试管苗生根可分为4种, 分别

是一步生根法(孔祥生和张妙霞, 1998)、速蘸法(Bouza et al., 1994b)、两步生根法(Beruto et al., 2004)与三步生根法(贾文庆等, 2012)。

三步生根法亦称改良的两步生根法, 即先将用于生根的无菌试管苗置于2–8℃低温下培养8–14天。低温配合黑暗处理可提高试管苗生根率, 原因可能是低温暗环境抑制一些酶的活性, 减少酚类氧化和PGRs物质分解, 有利于前期组培苗吸收营养物质(殷丽青等, 2012)。根诱导和根伸长培养后, 生根率明显高于未经低温预处理的材料(Beruto et al., 2004; 贾文庆等, 2012)。多数研究表明, 最佳生根方式为改良的两步生根法(Beruto et al., 2004; 邱金梅, 2010)。本实验也采用改良的两步生根法, 使用IBA和腐胺作为根诱导激素, 将试管苗转入根诱导培养基后, 在2–8℃低温下处理8天(王新, 2016), 暗环境下诱导30天, 最后在光下根伸长20天获得生根的幼苗。

根诱导过程中, 由于试管苗小叶会抑制芽的生长, 本研究选取无叶的单芽以利于植株生长(李刘泽木, 2016)。在根伸长过程中, 我们还加入了1.0 mg·L⁻¹ AC。前期研究表明, AC对芍药属生根苗有一定的影响, Bouza等(1994b)发现AC可提高生根质量。AC促进试管苗生根的原因可能是为根的生长发育创造了近似自然生长条件的黑暗环境, 且吸附了培养基中有毒副作用的物质, 降低了盐离子浓度(张倩和王华芳, 2012)。组培苗自身的生理状态对于生根有重要影响。后续可在诱导生根前先将单芽复壮培养10–20天, 芽健壮更利于生根, 但培养时间过长会使苗发黄老化; 或者增加继代次数和探索更合适的继代周期; 或是先在含有生长素的培养基中培养4–6天, 对新生根的生长发育更为有利。通过促进试管苗的生长来提高生根率和生根数, 还有待进一步研究。

3.6.4 移栽与驯化对幼苗成活率的影响

正确的炼苗移栽方法、上盆时间、栽培基质、环境条件及移栽后的温湿度调控与管理手段, 均是影响生根苗成活的重要技术环节。用于移栽的试管苗先在4℃下暗处理30天, 常温光下适应1周, 有利于打破茎叶休眠, 使茎叶萌发与伸长。安佰义(2005)研究表明, 生根苗移栽前拧松瓶盖, 在培养架上炼苗3–5天, 适当增加光照, 随后放入培养室内培养, 温度(25±1)℃, 湿度大于80%, 幼苗成活率可达80%。本研究

将生根苗按生根数与愈伤组织质量分成3个等级,移栽60天后,一级苗成活率为52.0%,根数 ≥ 3 条,无愈伤组织,生根苗成活率更高,移栽苗的长势更好。本研究成功实现伊藤杂种‘和谐’生根移栽,移植30天是移栽苗成活的关键时期,这段时间应注重管理养护,加强光照(40%)、温度((21 \pm 1) $^{\circ}$ C)和湿度(60%–80%)等环境条件的控制,防止幼苗因管理不善导致萎蔫。李志军等(2006)及文书生等(2016)研究发现,移栽前使用多菌灵灭菌可提高幼苗的成活率并加速生根苗移栽后的生长,为进一步提高伊藤‘和谐’生根移栽成活率提供了可行思路。

作者贡献声明

康敏:完成实验与数据分析,撰写论文初稿;张美莹:参与实验并分析数据;齐秀双,佟宁宁,李旻,舒庆艳,刘政安:参与实验设计,提供技术支持;吕长平,彭丽平:构思并设计实验,指导数据分析、论文写作与修改。

参考文献

- An BY (2005). Studies on the Establishment of *In Viro* Regeneration System of *Peony suffruticosa*. Master's thesis. Harbin: Northeast Forestry University. pp. 38–39, 41. (in Chinese)
- 安佰义 (2005). 牡丹组培离体再生系统的建立. 硕士论文. 哈尔滨: 东北林业大学. pp. 38–39, 41.
- Beruto M, Lanteri L, Portogallo C (2004). Micropropagation of tree peony (*Paeonia suffruticosa*). *Plant Cell Tissue Organ Cult* **79**, 249–255.
- Bouza L, Jacques M, Miginiac E (1994a). *In vitro* propagation of *Paeonia suffruticosa* Andr. cv. ‘Mme de Vetry’: developmental effects of exogenous hormones during the multiplication phase. *Sci Hortic* **57**, 241–251.
- Bouza L, Jacques M, Sotta B, Miginiac E (1994b). The reactivation of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) vitropplants by chilling is correlated with modifications of abscisic acid, auxin and cytokinin levels. *Plant Sci* **97**, 153–160.
- Bouza L, Sotta B, Bonnet M, Jacques M, Arnaud Y (1992). Hormone content and meristematic activity of *Paeonia suffruticosa* Andr. cv. ‘Madame de Vetry’ vitropplants during *in vitro* rooting. *Acta Hortic* **320**, 213–216.
- Gu ZY, Men SQ, Zhu J, Hao Q, Tong NN, Liu ZA, Zhang HC, Shu QY, Wang LS (2019). Chalcone synthase is ubiquitinated and degraded via interactions with a RING-H2 protein in petals of *Paeonia* ‘He Xie’. *J Exp Bot* **70**, 4749–4762.
- Han K, Liang CA, Liu HF, Wang XH (2021). Garden application of Ito peony (hybrid). *Spec Econ Anim Plants* **24**(5), 50–52. (in Chinese)
- 韩鲲, 梁长安, 刘红凡, 王晓晖 (2021). 伊藤牡丹(杂种)的园林应用. 特种经济动植物 **24**(5), 50–52.
- Hao Q, Liu ZA, Shu QY, Wang LS, Chen FF (2008). Identification of intersectional hybrid between section moutan and section *Paeonia* found in China for the first time. *Acta Hortic Sin* **35**, 853–858. (in Chinese)
- 郝青, 刘政安, 舒庆艳, 王亮生, 陈富飞 (2008). 中国首例芍药牡丹远缘杂交种的发现及鉴定. 园艺学报 **35**, 853–858.
- Hu K, Zhang LJ, Bai XM, Cui YN, Ruan YY (2007). Analysis of the cause of contamination and explant sterilization in plant tissue culture. *J Anhui Agric Sci* **35**, 680–681. (in Chinese)
- 胡凯, 张立军, 白雪梅, 崔玉娜, 阮燕晔 (2007). 植物组织培养污染原因分析及外植体的消毒. 安徽农业科学 **35**, 680–681.
- Jia WQ, You Y, Liu HC (2012). Preliminary study on the adventitious bud induction and rooting of peony. *North Hortic* (12), 138–140. (in Chinese)
- 贾文庆, 尤扬, 刘会超 (2012). 牡丹顶芽不定芽诱导及生根的初步研究. 北方园艺 (12), 138–140.
- Jing DD, Liu ZA, Li XX, Xiao XJ (2011). Preliminary study on fertility of a distant hybrid ‘Hexie’ of tree peony. *Sci Silvae Sin* **47**(10), 59–62. (in Chinese)
- 荆丹丹, 刘政安, 李新旭, 肖雪霁 (2011). 牡丹远缘杂种‘和谐’育性的初步研究. 林业科学 **47**(10), 59–62.
- Kong XS, Zhang MX (1998). Study on the *in vitro* micropropagation of tree peony. *North Hortic* (3–4), 87–89. (in Chinese)
- 孔祥生, 张妙霞 (1998). 牡丹离体快繁技术研究. 北方园艺 (3–4), 87–89.
- Li LZM (2016). Micropropagation of *Paeonia* ‘Bartzella’ —A Hybrid Between Herbaceous and Tree Peony. Master's thesis. Beijing: Beijing Forestry University. pp. 26–39. (in Chinese)
- 李刘泽木 (2016). 芍药与牡丹组间杂种‘Bartzella’的离体快繁技术研究. 硕士论文. 北京: 北京林业大学. pp. 26–39.

- Li MY, Liu L, Liu Y, Zhang XM (2021). Establishment of tissue culture system for axillary bud regeneration of *Primula × pubescens*. *Chin Bull Bot* **56**, 732–739. (in Chinese)
- 李孟悦, 刘柳, 刘艳, 张晓曼 (2021). 毛报春(*Primula × pubescens*)腋芽再生组织培养体系的建立. 植物学报 **56**, 732–739.
- Li P, Cheng FY (2007). Progress of peony tissue culture technology. *North Hortic* (11), 102–106. (in Chinese)
- 李萍, 成仿云 (2007). 牡丹组织培养技术的研究进展. 北方园艺 (11), 102–106.
- Li Y, Kong F, Liu ZA, Peng LP, Shu QY (2022). PhUGT78A22, a novel glycosyltransferase in *Paeonia* ‘He Xie’, can catalyze the transfer of glucose to glucosylated anthocyanins during petal blotch formation. *BMC Plant Biol* **22**, 405.
- Li ZJ, Liu ZG, Li HM (2006). Research on peony fast breeding technology. *Shandong For Sci Technol* **36**(3), 39–40. (in Chinese)
- 李志军, 刘志国, 李红梅 (2006). 牡丹组培快繁技术研究. 山东林业科技 **36**(3), 39–40.
- Liu DQ (2013). An insight into the rationing of growth factors and cytokinins during plant tissue culture. *Middle Sch Biol* **29**(5), 5–6. (in Chinese)
- 刘东奇 (2013). 植物组织培养过程中生长素和细胞分裂素的配比问题浅析. 中学生物学 **29**(5), 5–6.
- Liu JX, Yu XN (2015). Grey correlation analysis between blooming stage and related phenophases and prediction model establishment of blooming stage of herbaceous peony introduced in Beijing. *J Plant Resour Environ* **24**(4), 108–110. (in Chinese)
- 刘建鑫, 于晓南 (2015). 北京地区引进观赏芍药花期与相关物候期的灰色关联分析及其花期预测模型建立. 植物资源与环境学报 **24**(4), 108–110.
- Liu SQ, Wang FZ, An LJ (1995). Theory and Practice of Cell Engineering. Shenyang: Liaoning University Publishing House. pp. 48–49. (in Chinese)
- 刘世强, 王法政, 安利佳 (1995). 细胞工程的理论与实践. 沈阳: 辽宁大学出版社. pp. 48–49.
- Liu ZG, Zhao SZ, Shu QY (2021). A culture medium and method for the propagation of oil peony. China Patent, ZL201910627011.5. 2021-10-15. (in Chinese)
- 刘政安, 赵素珍, 舒庆艳 (2021). 一种用于油用牡丹繁殖的培养基及方法. 中国专利, ZL201910627011.5. 2021-10-15.
- Ma XL, Wu JX, Liu SH (2018). Current status and outlook of Ito peony development. *China Flowers Hortic* (16), 28–31. (in Chinese)
- 马翔龙, 吴敬需, 刘少华 (2018). 伊藤牡丹发展现状与展望. 中国花卉园艺 (16), 28–31.
- Murashige T (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Annu Rev Plant Physiol* **25**, 135–166.
- Qiu JM (2010). Study on the *In Vitro* Micropropagation of Tree Peony. Master's thesis. Beijing: Beijing Forestry University. pp. 3. (in Chinese)
- 邱金梅 (2010). 牡丹离体快繁技术的研究. 硕士论文. 北京: 北京林业大学. pp. 3.
- Sun JF, Cheng FY (2007). Preliminary report on the introduction of intersectional hybrids between tree and herbaceous peonies. *Chin Landsc Archit* **23**(5), 51–54. (in Chinese)
- 孙菊芳, 成仿云 (2007). 芍药与牡丹组间杂种引种栽培初报. 中国园林 **23**(5), 51–54.
- Sun MT, Li JH, Ren J, Qin YJ, Lu J, Meng FZ (2022). Establishment of aseptic system and callus induction of *Paeonia* Itoh ‘Bartzella’. *J Shandong For Sci Technol* **52**(3), 7–11. (in Chinese)
- 孙茂桐, 李际红, 任静, 秦永健, 卢洁, 孟凡志 (2022). 伊藤杂种‘巴茨拉’不同外植体无菌体系建立及愈伤组织诱导. 山东林业科技 **52**(3), 7–11.
- Tang FL, Zhao J, Zhao ZG, Xia K, Qiu S (2019). Tissue culture and rapid propagation of *Ardisia gigantifolia*. *Chin Bull Bot* **54**, 378–384. (in Chinese)
- 唐凤鸾, 赵健, 赵志国, 夏科, 仇硕 (2019). 走马胎的组织培养与快速繁殖. 植物学报 **54**, 378–384.
- Tong NN, Zhou XY, Peng LP, Liu ZA, Shu QY (2021). A comprehensive study of three species of *Paeonia* stem and leaf phytochemicals, and their antioxidant activities. *J Ethnopharmacol* **273**, 113985.
- Wang JX, Yan XL, Pan RC (2005). Relationship between adventitious root formation and plant hormones. *Plant Physiol Commun* **41**, 133–142. (in Chinese)
- 王金祥, 严小龙, 潘瑞炽 (2005). 不定根形成与植物激素的关系. 植物生理学通讯 **41**, 133–142.
- Wang X (2016). *In Vitro* Rapid Propagation of *Paeonia ostii* ‘Feng Dan’. Master's thesis. Beijing: Beijing Forestry University. pp. 5–38. (in Chinese)
- 王新 (2016). ‘凤丹’牡丹离体快繁技术研究. 硕士论文. 北京: 北京林业大学. pp. 5–38.
- Wang X, Cheng FY, Zhong Y, Wen SS, Li LZM, Huang NZ (2016). Establishment of *in vitro* rapid propagation system for tree peony (*Paeonia ostii*). *Sci Silvae Sin* **52**(5), 101–110. (in Chinese)

- 王新, 成仿云, 钟原, 文书生, 李刘泽木, 黄弄璋 (2016). 凤丹牡丹鳞芽离体培养与快繁技术. 林业科学 **52**(5), 101–110.
- Wang YQ, Wei LD, Wang WJ, Liu BJ, Zhang CL, Zhang JW, He YH (2020). The establishment and optimization of a regeneration system for marigold (*Tagetes erecta*). *Chin Bull Bot* **55**, 749–759. (in Chinese)
- 王亚琴, 韦陆丹, 王文静, 刘宝骏, 张春玲, 张俊卫, 何燕红 (2020). 万寿菊再生体系的建立及优化. 植物学报 **55**, 749–759.
- Wen SS, Cheng FY, Zhong Y, Wang X, Li LZM, Huang NZ (2016). Protocol for the micropropagation of tree peony (*Paeonia* × *lemoinei* ‘High Noon’). *Plant Sci J* **34**, 143–150. (in Chinese)
- 文书生, 成仿云, 钟原, 王新, 李刘泽木, 黄弄璋 (2016). ‘正午’牡丹微繁殖体系的建立. 植物科学学报 **34**, 143–150.
- Wu GX, Cui LH, Liu SH, Yao F, Si SX, Ren SH, Wu JX, Wang SQ (2011). Preliminary studying report of cultivating and demonstrating Itoh hybrids introduced from abroad. *North Hortic* (24), 67–71. (in Chinese)
- 吴国新, 崔玲华, 刘少华, 姚方, 司守霞, 任叔辉, 吴敬需, 王拴芹 (2011). 国外伊藤杂种牡丹引进栽培示范研究. 北方园艺 (24), 67–71.
- Wu JX, Liu SH, Sui CQ (2022). Intergroup hybridization of peony and peony introduced from abroad. *China Flowers Hortic* (5), 54–60. (in Chinese)
- 吴敬需, 刘少华, 隋承权 (2022). 国外引进的牡丹芍药组间杂种品种. 中国花卉园艺 (5), 54–60.
- Yan XF, Qu WF (2020). A tissue culture propagation method of peony. Chinese Patent, ZL202010129492.X. 2021-01-05. (in Chinese)
- 闫晓芳, 屈武斐 (2020). 一种牡丹的组织培养繁殖方法. 中国专利, ZL202010129492.X. 2021-01-05.
- Yang LH, Zhang JJ, Wang Q, Zhu W, Zhang T, Yu XN (2017). Ploidy identification and karyotype analysis of five Itoh hybrid peonies. *Bull Bot Res* **37**, 535–541. (in Chinese)
- 杨柳慧, 张建军, 王琪, 朱炜, 张滕, 于晓南 (2017). 5个芍药属伊藤杂种的倍性鉴定及核型分析. 植物研究 **37**, 535–541.
- Yin LQ, Wang XQ, Hu YH, Liu Z, Li XF, Zhang JJ (2012). Several factors influencing tissue culture of *Paeonia suffruticosa*. *Agric Acta Shanghai* **28**, 17–21. (in Chinese)
- 殷丽青, 王新其, 胡永红, 刘焰, 李秀芬, 张建军 (2012). 牡丹组织培养若干影响因子研究. 上海农业学报 **28**, 17–21.
- Zhang Q, Wang HF (2012). *In vitro* shoot rooting and plantlet transplanting of tree peonies. *Acta Hortic Sin* **39**, 1819–1828. (in Chinese)
- 张倩, 王华芳 (2012). 牡丹试管苗生根与移栽技术研究进展. 园艺学报 **39**, 1819–1828.
- Zhang WB (2022). Effects of disinfectant type and disinfection time on peony explants. *Agric Technol Serv* **39**(7), 46–48. (in Chinese)
- 张伟彬 (2022). 消毒剂种类及消毒时间对牡丹外植体的影响. 农技服务 **39**(7), 46–48.
- Zhuang Q, Zhu SY, Du XQ, Zhao LQ (2011). Introduction of interspecific hybrids of *Paeonia* to northeast China. *J North For Univ* **39**(4), 21–23. (in Chinese)
- 庄倩, 朱松岩, 杜晓琪, 赵立群 (2011). 芍药属组间杂种引进东北地区栽培试验. 东北林业大学学报 **39**(4), 21–23.

Establishment of a Fast Breeding System for Itoh Hybrid ‘He Xie’ in Tissue Culture

Min Kang^{1,4}, Meiying Zhang^{1,4}, Xiushuang Qi⁶, Ningning Tong^{4,5}, Yang Li^{4,5}
Qingyan Shu^{4,5}, Zheng'an Liu^{4,5}, Changping Lü^{2,3*}, Liping Peng^{4,5*}

¹College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; ²College of Landscape Architecture and Art Design, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; ³Hunan Provincial Engineering and Technology Research Center for Breeding and Utilization of Central-subtropical High-quality Flowering Trees, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; ⁴National Key Laboratory of Plant Diversity and Special Economic Crops, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; ⁵National Botanical Garden, Beijing 100093, China
⁶Tian Xiang Yuan (Liaoning) Biotechnology Co. Ltd., Huludao 125300, China

Abstract An *in vitro* rapid propagation system using scale buds of Itoh hybrids ‘He Xie’ can overcome the shortcomings of the slow traditional breeding methods and promote the adoption of the excellent Itoh hybrid varieties. In this study, we used the buds of ‘He Xie’ as explants to investigate the effects of various factors including disinfection time, plant growth regulators (PGRs) concentration and root induction time, and different rooted seedling grades on the initiation, proliferation, rooting and domestication of ‘He Xie’ with one-way experimental design. Our results showed: the optimal disinfection time of buds by 2% sodium hypochlorite solution was 12 min, with a contamination rate of 9.09%; the optimal initial culture medium was MS+1.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ GA₃+0.5 mg·L⁻¹ AgNO₃; the optimal proliferation culture medium was MS+450 mg·L⁻¹ CaCl₂+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ IBA+0.2 mg·L⁻¹ GA₃+0.5 mg·L⁻¹ AgNO₃ with a proliferation rate of 3.3. Rootless seedlings were cultured on root induction medium 1/2MS+1.0 mg·L⁻¹ putrescine+2.0 mg·L⁻¹ IBA for 8 d at 4°C in dark and then 30 d at room temperature under light, and finally transferred to root formation medium 1/2MS+1.0 g·L⁻¹ AC for 20 d, a rooting rate of 66.7% was observed. The rooted seedlings were transplanted on a growing matrix of perlite:vermiculite:charcoal soil=1:1:1 (v/v/v) for 60 d, with the highest transplant survival rate of 52.0% being observed for first-grade rooted seedlings, but most of the second- and third-grade seedlings being dead, suggesting that the quality of rooting is critical for transplant survival.

Key words Itoh ‘He Xie’, initiation and proliferation, rooting, scale buds, transplant domestication

Kang M, Zhang MY, Qi XS, Tong NN, Li Y, Shu QY, Liu ZA, Lü CP, Peng LP (2024). Establishment of a fast breeding system for Itoh hybrid ‘He Xie’ in tissue culture. *Chin Bull Bot* **59**, 441–451.

* Authors for correspondence. E-mail: changpinglv@sina.com; pengliping@ibcas.ac.cn

(责任编辑: 白羽红)

通讯作者/团队简介

吕长平, 湖南农业大学副教授, 硕士生导师, 主要研究方向为园林与观赏园艺植物栽培生理。曾获湖南省科技进步三等奖4次, 国家教学成果二等奖、湖南农业大学教学成果二等奖各1次; 以通讯作者和第一作者身份在 *Horticultural Science and Technology* 及湖南农业大学学报(自然科学版)等学术期刊上发表研究论文30多篇。

彭丽平, 中国科学院植物研究所副研究员。长期从事牡丹群体遗传、新品种培育、组织快繁以及有效成分功能评价等研究。以通讯作者和第一作者身份在 *Horticulture Research*、*Physiologia Plantarum* 和 *Foods* 等国际主流学术期刊上发表研究论文10余篇。