

紫枝玫瑰的生物特性与组织培养研究

田新华, 张建瑛, 王艳敏, 李 晶, 张妍妍

(黑龙江省林业科学研究所 速生林木培育重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘 要:以紫枝玫瑰腋芽为材料,研究了抑制外植体褐变的方法,筛选出分化增殖和生根的最佳培养基。分化增殖的最佳培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+ZT 0.1mg/L,增殖倍数达 2.9 倍,芽苗生长速度快,茎秆粗壮,叶片浓绿;最佳生根培养基为 1/2MS+IAA 0.7 mg/L,试管苗根系发达,生根数量多,生根速度快,有利于移栽成活。

关键词:紫枝玫瑰, 组织培养, 培养基

中图分类号:S 685.12; S 603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)06-0048-03

紫枝玫瑰(*Rosa rugosa* 'Purple Branch')又称紫叶玫瑰、四季玫瑰,蔷薇科蔷薇属多年生落叶小灌木。通常株高 1~2 m,枝条表皮为紫红色,表皮、叶片上密布直刺和刚毛,叶为奇数羽状复叶,表面叶脉深陷,形成明显褶皱,深绿色。花为浅粉色,重瓣,有香味,花期长,具有一定的观赏价值。同时可以作为提取香料的原材料,具有广阔的市场需求。紫枝玫瑰是由传统玫瑰与蔷薇杂交而来,因此扦插易生根,耐旱、耐寒、耐贫瘠,是极具有开发前景的园林树种之一^[1]。

黑龙江省现有紫枝玫瑰引自加拿大,在黑龙江省植物园珍贵树种资源园中有少量种植。因其具有观赏价值和商用价值,具有广阔的国内外市场。该研究选择紫枝玫瑰健壮无病植株为供试材料,采用组织培养技术不仅可以节省试材,不受季节、地域等条件的限制,而且可在短期内提供大量优质苗木,保护和促进珍贵种质资源的推广与应用。

1 材料与方法

1.1 材料的采集与处理

2007 年 1 月中旬,从黑龙江省植物园珍贵树种资源园中选取健壮的紫叶玫瑰上部木质化的休眠枝条为试材,剪成约 50 cm 长的茎段,放入罐中水培催芽,温度控制在 18~20℃,10 d 嫩芽陆续萌发。剪取长约 1.0 cm 带嫩芽茎段,用清水反复冲洗,在超净工作台上用 0.1% 氯化汞溶液表面灭菌,灭菌时间分别为 3、5、7 min,灭菌后用无菌水冲洗 3 次,并于无菌水中浸泡 40~60 min 后吸干多余水分待用。

1.2 试验方法

第一作者简介:田新华(1976-),女,硕士,助理研究员,现主要从事森林培育方面的研究工作。E-mail: hrbtxh@163.com。

基金项目:黑龙江省科技攻关资助项目(GB07B303-02)。

收稿日期:2009-01-16

剪去茎段两端多余部分后,在无菌条件下将单芽茎段接种于初代培养基 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂粉 6 g/L, pH 调至 5.8。

1.2.1 抑制外植体褐化试验 将经初代培养的外植体分别转接于以下 3 种处理的培养基中:添加 1.0 g/L 的抗坏血酸;添加 2.0 g/L 的活性碳;转接后经 4℃低温处理 3 d,然后进行正常培养 20 d 统计芽的生长量、褐化率。

1.2.2 腋芽分化增殖培养基的筛选 将经过多次转接后未褐化的嫩芽分别接种于以下分化培养基中进行增殖培养:(1)MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+ZT 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L;(2)MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+ZT 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L;(3)MS+6-BA 0.5 mg/L+ZT 1.0 mg/L+蔗糖 30 g/L;(4)MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L+蔗糖 30 g/L。培养室培养 35 d 后统计苗高、分化倍数、茎粗、生长状况等指标。

1.2.3 生根培养基的筛选 剪取苗高约 1.5~2.0 cm 的分化苗分别转接于以下培养基:(I)1/2MS+IAA 0.7 mg/L+蔗糖 20 g/L;(II)1/2MS+NAA 0.2 mg/L+蔗糖 20 g/L;(III)MS+IBA 0.2 mg/L+蔗糖 20 g/L;(IV)MS+IBA 1.0 mg/L+蔗糖 20 g/L 进行生根培养。

1.3 培养条件与数据统计

白天温度(25±1)℃,夜间温度(20±1)℃,相对湿度 70%,光照强度 2 000 lx,光照时间 12 h/d。采用统计软件 DPS 7.05 进行方差分析和差异显著性测验(SSR 法)。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌时间对材料的影响

于接种后的第 4 天观察外植体,发现灭菌不彻底的茎段开始出现污染现象。经氯化汞灭菌 3 min 的试材污染率较高,灭菌后的试材均有褐化现象;灭菌 5 min 的效果较好,污染率较低;灭菌 7 min 的试材无污染,但大部分外植体切口处出现褐化,现象严重,甚至导致嫩芽死

亡。这说明氯化汞灭菌 5 min, 可以达到灭菌的目的, 并且对紫枝玫瑰外植体损伤较小(表 1)。

表 1 不同灭菌时间材料的表现

Table 1 The difference of explants on various sterilization time				
消毒时间 Sterilization time/ min	接种数 Inoculated number	污染数 Polluted number	污染率 Polluted Rate/ %	材料表现 Explants presentation
3	20	13	65	大部分污染 有褐化现象
5	20	3	15	污染率小 有褐化现象
7	20	0	0	无污染 褐化现象严重

表 2 不同处理对外植体褐化的影响

Table 2 The effect on explants browning of different treatments				
处理 Treatment	接种数 Inoculated number	褐化数 Browning number	生长量 Increment / cm	褐化率 Browning rate/ %
1.0 g/ L 抗坏血酸 1.0 Ascorbic acid	30	11	0. 42	36. 7
2.0 g/ L 活性炭 2.0 g/ L Ac	30	9	0. 79	30. 0
4℃低温处理 3 d 4℃ Treatment for 3 d	30	15	0. 66	53. 3

2.2 不同处理对外植体褐化的影响

将经初代培养的外植体分别采取不同措施进行抗褐化处理, 培养 20 d 的效果见表 2, 处理(a)、(b)的抗褐化效果明显高于处理(c), 说明培养基中加入褐变抑制剂

后外植体褐化率显著低于低温处理, 并且加入不同的褐变抑制剂对于芽的生长量、抗褐化效果也不尽相同, 存在一定差异。其中以加入 2.0 g/ L 活性炭的效果相对较好, 芽生长量较高, 生长速度较快, 为 0. 79 cm/ 20d, 既能有效抑制褐变又对植株生长影响小。

2.3 不同培养基对芽增殖的影响

将经过多次转接后未褐化的嫩芽分别接种于以下分化培养基中进行增殖培养。培养 1 周后观察, 节间伸长, 小叶片展开。对增殖培养 35 d 的苗木各项指标进行方差分析(表 3)表明, 不同培养基对试管苗苗高、芽增殖倍数、茎粗的影响达到极显著水平。利用 SSR 法多重比较分析表明(表 4), 以处理(2)苗木生长量较大、茎秆粗壮, 并且与其他处理差异显著($P<0.05$); 但从芽苗增殖的角度讲处理(4)培养的芽增殖倍数最大, 为 4.0 倍, 与处理(3)相比, 处理(4)的增殖效果好; 而处理(1)与(2)增殖倍数差异不显著。这说明玉米素(ZT)是紫枝玫瑰分化增殖生长的必需激素。但玉米素含量高培养的芽苗矮小丛生, 苗木生长速度慢, 茎秆细弱 叶片失绿严重, 仅叶脉仍保持绿色, 不利于芽苗长期扩大繁殖。综合上述原因, 筛选出 MS+6-BA 1.0 mg/ L+NAA 0.2 mg/ L+ZT 0.1 mg/ L 为紫枝玫瑰分化增殖培养基(即处理 2), 培养出的芽苗生长速度快 茎秆粗壮, 叶片浓绿。

表 3 芽苗不同性状方差分析

Table 3 Variance analysis of seedling traits						
性状 Traits	变异来源 Variation source	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F value	P 值 P value
苗高 Seedling height	区组间 Inter blocks	0. 009 1	1	0. 0091	2. 163	0. 237 7
	处理间 Within treatments	7. 513 6	3	2. 5045	594. 549	0. 000 1
	误差 Error	0. 012 6	3	0. 0042		
	总变异 Total variation	7. 535 4	7			
增殖倍数 Propagation times	区组间 Inter blocks	0. 000 4	1	0. 0004	0. 023	0. 889 3
	处理间 Within treatments	7. 572 6	3	2. 5242	128. 457	0. 001 1
	误差 Error	0. 058 9	3	0. 0196		
	总变异 Total variation	7. 632	7			
茎粗 Stem diameter	区组间 Inter blocks	0. 000 2	1	0. 0002	0. 103	0. 768 8
	处理间 Within treatments	0. 255	3	0. 085	43. 966	0. 005 6
	误差 Error	0. 005 8	3	0. 0019		
	总变异 Total variation	0. 261	7			

注: 表示 $P<0.05$ 水平为差异显著; $P<0.01$ 水平为差异极显著。

表 4 芽苗不同生长状况多重比较分析

Table 4 Multiple comparison of seedling growth state			
处理 Treatment	平均苗高 Average seeding height/ cm	平均增殖倍数 Average propagation times	平均茎粗 Average Stem diameter/ mm
(1)	3. 10b	3. 2b	1. 29b
(2)	4. 08a	2. 9b	1. 51a
(3)	3. 10b	1. 3c	1. 15c
(4)	1. 39c	4. 0a	1. 03c

2.4 不同培养基对试管苗生根的影响

剪取高约 1.5 ~ 2.0 cm 的分化苗转接于生根培养基上, 培养 10 d 左右开始长出浅绿色的根。对培养 35 d 的试管苗(见表 5)进行方差分析和 SSR 法多重比较(见表 6)表明, 处理(1)培育的试管苗无论根长还是生根数均显著优于其他处理, 生根数量多, 生根速度快, 根系较长, 没有愈伤组织形成, 属于皮层生根, 有利于移栽成活。

表 5 苗木根系方差分析
Table 5 Various analysis of seeding root

性状 Traits	变异来源 Variation source	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F value	P 值 P value
根数 Root number	区组间 Inter blocks	0.0036	1	0.0036	1.069	0.3772
	处理间 Within treatments	27.8542	3	9.2847	2747.643	0.0001
	误差 Error	0.0101	3	0.0034		
	总变异 Total variation	27.8687	7			
根长 Root length	区组间 Inter blocks	0.0003	1	0.0003	0.176	0.7033
	处理间 Within treatments	1.9034	3	0.6345	356.616	0.0003
	误差 Error	0.0053	3	0.0018		
	总变异 Total variation	1.909	7			

表 6 苗木不同处理生根状况多重比较
Table 6 Multiple comparison of roots state in different treatments

处理 Treatment	平均根数 Average Root number/ 条	平均根长 Average Root length/ cm
(I)	5.2a	1.21a
(III)	3.4b	1.11ab
(II)	2.7c	1.04b
(IV)	0d	0c



图 1 生根的紫枝玫瑰
Fig.1 The rooting Rosa rugosa Purple Branch

3 结论与讨论

在植物组织培养中易出现外植体或培养物的酚污

染现象^[2]。主要是由于切割外植体使植物受到创伤刺激,细胞内的分类物质褐变流出,2 种物质接触后酚被多酚氧化物氧化为褐色的醌类物质,产生褐变,导致生长受阻,甚至死亡。在抑制外植体褐变的措施中,加入抗氧化剂、酚类物质吸附剂或低温处理是目前常用的方法^[3-4],但不同物种抑制褐变的方法也不尽相同。该试验在初代培养基中添加 2.0 g/L 活性炭效果较好,褐变率较低,芽苗生长较快。

一般认为利用腋芽进行繁殖,品种特性遗传相对稳定,其后代变异较少。因此采用芽接技术更适于优良品种的繁殖、推广。

通过该研究筛选出紫枝玫瑰腋芽分化增殖的最佳培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+ZT 0.1 mg/L,增殖倍数达 2.9 倍,芽苗生长速度快,茎秆粗壮,叶片浓绿,最佳生根培养基 1/2MS+IAA 0.7 mg/L,试管苗根系发达,生根数量多,生根速度快,皮层生根有利于移栽成活。

参考文献

[1] 郝洪波. 紫枝玫瑰硬枝快繁技术[N]. 中国花卉报, 2007-05-05(3).
[2] Torream, Maur>Lastovicka T, Rezzaian R. Totalphenolics and high performance liquid chromatography ofphenolicacids of avocado[J]. Agric Food Chem, 1987 35: 921-925.
[3] Walkey D G A. Production of apple plantlets from an axillary-bud meristems[J]. Canadiam Journal of Plant Science, 1972 52(6):1085-1091.
[4] 沈海龙. 植物组织培养[M]. 北京: 中国林业出版社, 2005: 79-80.

Study on Biological Characteristics and Tissue Culture in Vitro of Rosa rugosa ‘ Purple Branch’

TIAN Xin-hua, ZHANG Jian-ying, WANG Yan-min, LI Jing, ZHANG Yan-yan

(Key Laboratory of Fast-growing Tree Cultivating, Forestry Research Institute of Heilongjiang Province, Harbin, Heilongjiang 150081, China)

Abstract: The methods for restraining the explant browning were studied with the axillary bud of *Rosa rugosa* ‘ Purple Branch’. The optimal culture medium for reproduction and rooting were chosen. MS medium supplemented with MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+ZT 0.1 mg/L was best for reproduction and multiplication can reach 2.9 times after 35 days. The shoots grow fast with stem thick and leaf green. 1/2MS medium added IAA 0.7 mg/L was best for rooting. The roots of test-tube seeding grow fast, quickly and abundantly, which were beneficial to the survival ratio of planting.

Key words: *Rosa rugosa* ‘ Purple Branch’ ; Tissue culture; Culture medium