

丰花月季‘美神’组织培养研究

蔺红苹, 吴飞凤

(湛江师范学院 生命科学与技术学院, 广东 湛江 524048)

摘要: 试验以丰花月季‘美神’带腋芽茎段为外植体进行离体技术研究。结果表明: 以枝条中部的腋芽为外植体进行组织培养效果最好, 在 8 d 内可萌发, 芽长势好; 在进行继代培养时, 摘心对嫩茎有较大的促进作用, 可促使芽快速长高和长粗; 利用含不同浓度 NAA 进行培养诱导生根时, 最适浓度为 0.1~0.5 mg/L, 芽高度为 2.0~3.5 cm 时最有利于其生根, 生根率达 91%, 且根系发达。

关键词: 丰花月季; 茎段培养; NAA

中图分类号: S 685.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)05-0143-03

月季是蔷薇科蔷薇属木本植物, 又名四季蔷薇, 原产于中国^[1], 是近代风靡世界的名花, 素有“花中皇后”之美誉^[2], 深受人们的喜爱, 成为切花的四大支柱之一。月季种类繁多, 丰花月季因其花头成聚状, 又称聚花月季^[3]。它具有耐寒、耐高温、抗旱、抗涝、抗病^[4]的特点, 对环境适应性极强; 每年多次开花, 花期长, 花径略小, 成束开放, 花色多样, 芳香怡人。因此既适合园林和路带绿化, 也宜于盆栽美化庭院居室, 是城市绿化和美化的上等佳品^[5]。

由于丰花月季为木本植物, 生长繁殖速度较慢, 受插穗量及其繁殖技术的限制而不能进行大批量繁殖和

应用。利用组织培养技术, 对丰花月季(*Rosa hybrida*) ‘美神’进行研究, 可大大缩短其增殖周期, 提高其繁殖系数, 能达到大批量生产和应用, 对加速新品种的推广和运用起到了积极作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选自湛江师范学院植物园内当年生丰花月季‘美神’健壮优良母株上未开花枝条。

1.2 试验方法

1.2.1 不同茎段腋芽诱导 将选取的外植体剪去叶片、叶柄, 用自来水冲洗干净, 将其剪成 3 段: 顶端 1~3 节、顶端以下 4~8 节^[6]和顶端以下 9~13 节各为 1 段。加入 0.1% 的升汞溶液消毒 10 min, 用无菌水清洗 3~4 次, 再转入 1%~1.5% 的次氯酸钠溶液中浸泡 8 min, 用无菌水冲洗 5 次。用手术刀将各段切成约

第一作者简介: 蔺红苹(1979-), 女, 硕士, 实验师, 研究方向为组织培养及病理研究。E-mail: yuzaidongji@yahoo.com.cn.
收稿日期: 2009-12-20

Methods of Breaking Spore Wall of *Monilinia fructicola* and DNA Extraction

LIU Hai-xi¹, GE Xi-zhen², TIAN Ping-fang¹

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029; 2. Bioengineering College of Beijing Union University, Beijing 100023)

Abstract: Ultrasonic method and repetitive freezing-thawing were employed to break the spore wall of *Monilinia fructicola*, ultrasonic method was found to be superior to repetitive freezing-thawing method. The ultrasonication conditions comprise ultrasonic of 3 s, interval of 2 s, frequency of 99 times, power of 500 W, and treated twice. To select appropriate methods for extracting genomic DNA, we compared benzyl chloride method, liquid nitrogen refrigeration and glass bead method, benzyl chloride method appeared to be the best. In this method, the mixture of 100mM Tris-HCl at pH 9.0 and 40 mM EDTA at pH 8.0 was chosen as the buffer, which enabled benzyl chloride under alkalinity condition to react with polysaccharide in spore wall of *M. fructicola* and therefore destroyed the cell wall. This method is simple, rapid and efficient for DNA extraction.

Key words: *Monilinia fructicola*; ultrasonic method; benzyl chloride; DNA extraction

1.0 cm的单腋芽茎段, 分别接种于诱导培养基: MS+6-BA 1.0 mg/L+蔗糖30 g/L+琼脂 8 g/L 中, 每段接种 50 个单腋芽, 接种 5 d 后观察芽萌发情况。芽高为腋芽基部到芽顶端的长度。增殖倍数为培养后总芽数/供试芽数。

1.2.2 继代培养(摘心对茎生长的影响) 将已萌发到约 1.5 cm 的丛生芽切成单芽, 转接到增殖继代培养基: MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖30 g/L+琼脂 8 g/L 中^[4]。分 2 组, 其中一组摘去顶芽, 俗称摘心; 另一组不摘心做对照。每组接种 50 个单芽。接种 10 d 后观察离体芽的增殖情况。增殖倍数为培养后总芽数/供试芽数。

1.2.3 试管芽的生根培养 芽高对生根的影响: 将初代及继代培养中生长健壮、高 2 cm 以上的无根苗切成单株(分为 2.0~3.5 cm、3.6~5.0 cm、5.1~6.5 cm 3 组试验), 转接到生根培养基: 1/2MS+NAA 0.5 mg/L+蔗糖30 g/L+琼脂 5 g/L+碳粉 300 mg/L 中^[7], 每个处理接种 35 个单株。接种 5 d 后观察幼苗的生根情况。

1.2.4 NAA 浓度对芽生根的影响 将继代培养中生长健壮、高 2.0~3.5 cm 的无根苗切成单株, 转接到生根培养基^[8-9]: 1/2MS+NAA 0.05 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 5 g/L; 1/2MS+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 5 g/L; 1/2MS+NAA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂

5 g/L; 1/2MS+NAA 1 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 5 g/L; 1/2MS+NAA 1.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 5 g/L 中, 每个处理接种 35 个单株, 接种时要去掉无根苗基部的愈伤组织, 接种 5 d 后观察。培养基 pH 值均为 5.8 于培养室中自然条件下培养。

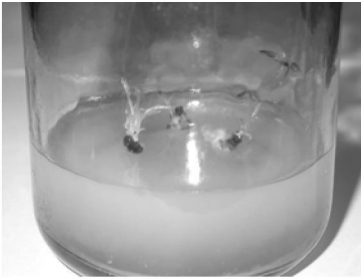
2 结果与分析

2.1 不同部位腋芽诱导情况

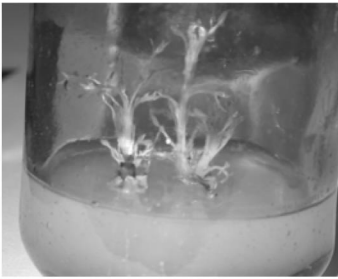
将带腋芽的丰花月季 美神 接种在 MS 培养基中, 对同一枝条上不同部位的腋芽诱导效果进行对比试验。由表 1 可知, 枝条中部(顶部以下 4~8 节)的腋芽萌发最早, 从接种到萌发约为 8 d。而枝条顶部和基部的腋芽萌发时间都比较迟, 分别为 13 d 和 12 d。据接种 25 d 后观察(其长势见图 1), 不同部位的腋芽增殖率及芽的长势有明显的区别。由表 1 明显看出枝条中部的腋芽长势较好, 增殖了 2.9 倍, 芽的平均高度达到了 3.6 cm, 丛生芽的长势健壮; 其次是枝条的基部(顶部以下 9~13 节)的腋芽, 增殖倍数为 1.7 倍, 平均芽高为 2.1 cm, 丛生芽长势一般; 枝条顶部(顶端 1~3 节)的腋芽增殖倍数最低, 为 1.1 倍, 平均芽高为 1.8 cm 且丛生芽苗较纤细。同时可观察到枝条中部茎段出现大量白色的愈伤组织, 顶部和基部的茎段也出现了少量的愈伤组织。综上所述, 以芽萌发时间及芽增殖和生长情况作为评价标准, 在选取外植体时取枝条中部的腋芽效果最好。

表 1 枝条不同部位茎段腋芽的诱导效果

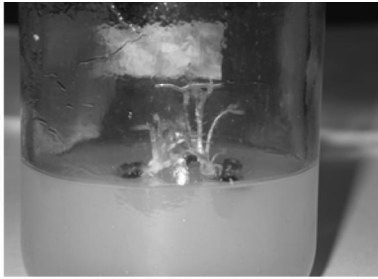
取材部位(腋芽)	供试数/个	萌发天数/d	丛生芽数/个	增殖数/倍	平均芽高/cm	芽生长情况
顶端 1~3 节	46	13	53	1.1	1.8	生长较弱 丛生芽少
顶端以下 4~8 节	50	8	143	2.9	3.6	生长健壮 丛生芽多
顶端以下 9~13 节	50	12	85	1.7	2.1	生长一般 丛生芽少



(1) 顶端 1~3 节腋芽长势



(2) 顶端以下 4~8 节腋芽长势



(3) 顶端以下 9~13 节腋芽长势

图 1 枝条不同部位腋芽的长势

2.2 继代培养(摘心对芽生长增殖的影响)

在继代培养中, 切去部分嫩芽的顶芽, 即摘心, 培养 27 d 后观察, 其摘心组和对照组的苗茎增殖及苗长势。由表 2 可知, 摘心对芽的生长有很大的促进作用, 平均芽高达到 2.9 cm, 且长势粗壮, 可直接用于生根。但摘心降低芽增殖, 芽增殖倍数为 1.3 倍, 而未摘心一组芽增殖倍数为 2.5 倍, 明显高于摘心组, 但未摘心组的芽长势一般, 平均芽高只有 2.1 cm, 还需进行壮苗培养才可以

生根。由此可见, 摘心对嫩芽的长粗和长高都具有很大的促进作用。

表 2 摘心对芽增殖的影响

处理方式	供试芽数 / 个	平均芽高 / cm	芽增殖 倍数/ 倍	芽生长情况
摘心组	47	2.9	1.3	增殖芽少, 苗长势粗壮
对照组	45	2.1	2.5	增殖芽多, 苗长势一般

2.3 试管芽生根培养

2.3.1 不同芽高对生根的影响 将粗细一致, 高度不同

的试管芽接种于生根培养基中培养 18 d 后观察。由表 3 可见,高度为 5.1 ~ 6.5 cm 芽大部分枯死,生根率非常低;高度处于 3.6 ~ 5.0 cm 的芽部分枯死,生根率比较低,为 46%,根少且生长一般;而高度处于 2.0 ~ 3.5 cm 的芽长势良好,生根率高达 91%,根粗壮且根条数较多。因此,高度为 2.0 ~ 3.5 cm 的芽最适合用于生根培养。

表 3 不同芽高对生根的影响					
芽高	供试芽数	生根苗数	生根率	平均根数	苗生长情况
/ cm	/ 个	/ 株	/ %	/ 条	
2.0 ~ 3.5	35	32	91	7	苗长势良好,根粗壮,根系发达
3.6 ~ 5.0	35	16	46	4	苗部分枯死,根少且生长一般
5.1 ~ 6.5	35	2	6	3	苗大部分枯死

2.3.2 NAA 对试管苗生根的影响 小苗接种到不同浓度的培养基中培养 7 d 后,其基部伤口基本愈合,10 d 可见基部分化出根点,16 d 则长出许多小白根,19 d 后统计各浓度培养基的生根苗数,由图 2 可见,NAA 浓度为 0.1 mg/L 和 0.5 mg/L 时丰花月季生根率高达 89%和 91%,同时可观察到处于这 2 个浓度的苗根数较多,根系发达。而 NAA 浓度过低或过高根的诱导呈下降趋势,而且根数量少,较细长。因此,最适于诱导丰花月季生根的 NAA 浓度为 0.1 ~ 0.5 mg/L。

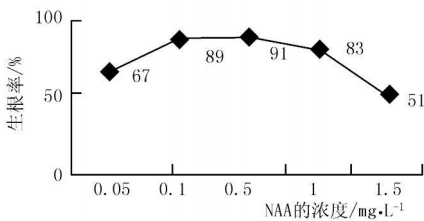


图 2 NAA 浓度对试管苗生根率的影响

3 讨论与结论

以丰花月季 美神 茎段为外植体进行快繁时,选取枝条中部茎段腋芽效果最好。这可能与月季枝条不同

部位的腋芽成熟程度及休眠状态不同等因素有关,但具体原因尚未明确。

在进行芽的增殖培养时,摘心对嫩芽的长粗和长高都有较大的促进作用,可能因为生长素总浓度适中有效地促进了细胞的生长;但摘心不利于丛生芽的增多,芽增殖率低。试验用的生根培养基中大量元素减半(即 1/2MS),张艳君等也用试验证明了用 1/2MS 诱导月季生根效果最好。丰花月季生根的 NAA 最适浓度为 0.1 ~ 0.5 mg/L。NAA 浓度过高或过低都不利于生根。因为从生长素的生理作用上看,其浓度过高或过低都不利于细胞的生长。

最适于生根的芽高度约为 2.0 ~ 3.5 cm,芽过高会导致芽的枯死,从而影响生根。芽的枯死可能原因是芽过高而纤细的茎难于运输足够的养料至顶芽,导致顶芽枯萎,从而导致整棵芽苗枯死。

参考文献

[1] 炎如,张艳君.月季的茎段培养与快繁[J].内蒙古农业科技,2000(5):9-10.

[2] Voryiatz, Chrysothemis L. An assessment of the in vitro germinayion capacity of pollen grains five tea hybrid rose cultivars Euphytica. 1995, 83(3): 199-204.

[3] 任维英,余有顺.丰花月季组织培养快速繁殖技术[J].石河子科技 1995(2): 32-35.

[4] 刘振祥,廖旭辉.植物组织培养技术[M].北京:化学工业出版社 2007.

[5] 官本馥,罗珍珍,唐坚志.丰花月季的组织培养和快速繁殖[J].植物生理学通讯 1992, 28(2): 129-134.

[6] 高彩云,季晓泉,李宝山.月季组织培养技术[J].现代农业,2005(7): 26-27.

[7] 海燕,胡国富,胡宝忠.月季组培快繁技术的研究[J].东北农业大学学报 2004 35(1): 84-88.

[8] 王正加,高云振,李军萍.月季组织培养过程中的影响因素[J].浙江林业科技,2003 23(4): 51-55.

[9] 叶贻勋,黄青峰,黄瑞芳,等.月季的离体快速繁殖技术[J].福建农业大学学报,2000 29(2): 172-175.

Study of the *Rosa hybrida* “Meishen” Tissue Culture

LIN Hong-ping, WU Fei-feng

(Institute of Life Sciences and Technology, Zhanjiang Normal University, Zhanjiang, Guangdong 524048)

Abstract: Used the Stem with axillary of *Rosa hybrida* “meishen” as explant to research *in vitro*. The results showed that the axillary of the central branches as explant to tissue culture was the best. They could germinate in 8 days and the growth of bud was good. When subcultured, topping was much useful for the young stem, which made the bud become higher and more rough. When cultured, used different concentration NAA to induct rooting, the optimum concentration was 0.1 ~ 0.5 mg/L. The height of bud in favor of taking root was 2.0 ~ 3.5 cm. The rate of rooting reached 91% and the root was developed.

Key words: *Rosa hybrida*; stem-segment culture; NAA