

“恩钿”月季组培技术研究

龚维红, 尤伟忠, 李成慧, 葛彩燕

(苏州农业职业技术学院, 江苏 苏州 215008)

摘 要:以“恩钿”月季茎段上不同部位、不同季节的芽为外植体,研究了“恩钿”月季组培苗的最佳培养基。结果表明:外植体选取时间以春季为佳,选取部位以枝条中、上部为好,适宜的增殖培养基为:MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L,最佳生根培养基为:1/2MS+NAA 0.2 mg/L+300 mg/L 活性炭;练苗基质以蛭石为佳。

关键词:“恩钿”月季;组织培养;培养基

中图分类号:S 685.126.036 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)16-0083-03

月季是中国十大名花之一,素有“花中皇后”的美誉。月季具有花色多、花期长、枝繁叶茂、抗寒、抗旱、适应性强、管理容易等特点,是园林绿化和鲜切花市场上十分重要的材料,观赏价值和商业价值极高。“恩钿”月季是法国阿兰·梅昂先生在梅昂庄园培育出来的一个姿态优雅、芬香浓郁的月季新品种,是为纪念蒋恩钿女士对中国月季做出的贡献而命名的,“恩钿”月季的显著特点是花大,直径有 12~13 cm;花瓣多,约有 90~100 片;花香浓,人在 500 m 以外就能随风闻到花香。“恩钿”月季的极大的观赏价值,使得其非常适合绿地栽植、庭院绿化和盆栽。但目前该月季品种主要以扦插、嫁接等方法来繁殖,因受季节和插条、接穗数量的限制,繁殖速度慢,繁殖系数低,难以达到快速、高效的目的。而利用组织培养的方法进行繁殖,繁殖系数高,既可以满足工厂化大批量生产的需要,又能得到高品质、高标准的脱毒苗。现对“恩钿”月季的组织培养技术进行初步研究,以期规模化生产提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料“恩钿”月季取自太仓现代农业园和太仓月季培育基地。

1.2 试验方法

1.2.1 初代培养 外植体的取材:选茎段上不同位置 and 不同季节的芽作为外植体,比较它们的启动反应。外植

体材料的处理及无菌材料的获取:将采回的枝条去掉叶片和皮刺,用小毛刷蘸取含洗涤剂的水溶液,将茎及叶腋处的灰尘及杂物洗刷干净,在自来水下冲洗 0.5 h,剪成带 2~3 个芽的小段。将材料带入超净工作台,在超净工作台上将材料放入 75% 的酒精溶液中浸泡 30 s,用无菌水过滤 2~3 遍,然后用灭过菌的剪刀将材料剪成单芽小段,用 0.1% 的升汞消毒 10 min,将外植体从消毒液中取出马上用无菌水冲洗 4~5 次,每次冲洗无菌水量不少于 50 mL,用无菌滤纸吸干备用。初代培养:以 MS 为基本培养基,附加 3% 的蔗糖,0.8% 的琼脂,在此基础上添加 0.5 mg/L 的 6-BA 和 0.1 mg/L 的 NAA,用 1.0 mol/L 的 HCl 和 1.0 mol/L 的 NaOH 调节所配溶液的 pH 为 5.8。培养温度为 25℃ 左右,光照强度为 2 500 lx,光照时间为 12 h/d。将消过毒的材料接种到初代培养基上,每瓶插入 2~3 段,2~3 周后进行增殖培养。

1.2.2 增殖培养 初代培养基上接种的外植体长到 1.5 cm 左右时切断,转入增殖培养基上,每隔 30 d 继代 1 次,试验中每处理 20 瓶,3 次重复。激素浓度及其组合:仍以 6-BA 和 NAA 为生长调节剂,MS 为基本培养基,6-BA 分别采用 0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L, NAA 分别采用 0、0.05、0.1、0.2 mg/L,每处理接种 20 瓶,每瓶 2 个外植体,连续继代 3 次并调查增殖系数。增殖培养的培养条件与初代培养相同。

1.2.3 壮苗与生根 将分化出来的试管苗转入 MS 培养基内复壮,将复壮后长势旺盛、节间伸长适度的无根小苗转移到不同浓度的 NAA 的 1/2MS 培养基上,同时添加 300 mg/L 活性炭进行试管内生根试验,30 d 后,观察生根情况,筛选出最适宜生根的培养基。

1.3 练苗

将生有 3~5 条根 1.0 cm 左右新根的苗,先打开瓶

第一作者简介:龚维红(1966-),女,本科,副教授,高级农艺师,研究方向为植物种苗繁育及植物生理。

基金项目:江苏省高等学校大学生实践创新训练计划资助项目;苏州农业职业技术学院院级资助项目(NS1115)。

收稿日期:2012-03-29

口练苗 3~5 d, 环境温度为 25℃ 左右, 空气相对湿度为 70%~90%, 将练后的试管苗从培养瓶中取出, 洗去根部的培养基, 分别移栽于盛有不同基质的口径为 12 cm 的花钵中, 观察移栽成活情况。所有基质均经过高温灭菌, 移栽后搭设遮阳网并覆盖塑料薄膜, 1 周后逐渐通风通气, 移栽第 1 周使用蒸馏水培养, 第 2 周浇自来水, 同时每隔 1 周施 N、P、K 复合肥 1 次, 移栽 30 d 后统计苗情。

2 结果与分析

2.1 外植体的取材部位

芽在茎段上的位置对生长有一定的影响, 培养时将枝条顶部 1~3 个芽, 枝条中部 4~7 个芽, 枝条基部 8 节位(包括第 8 节位)以下的芽分别作为外植体, 比较其不同部位芽萌发的情况。由表 1 可知, 枝条中部的腋芽萌发最早, 从接种到萌发仅为 7 d, 而顶部和基部枝条则 10 d 后才陆续开始萌发, 且丛生芽数量少, 生长差, 这可能是因为着生在同一枝上不同节位的芽质量不同所造成的, 即芽本身的异质性所造成的。顶端芽形成较迟, 生长素含量虽较高, 但芽内营养有限, 且在消毒时受到一定的伤害(因和其它部位的芽消毒时间相同), 所以萌发较迟, 生长也较弱。中上部的芽芽体饱满, 营养充足, 激素含量也较高, 所以发育迅速, 生长良好。基部的芽形成较早, 营养不足, 激素含量低。

表 1 枝条不同部位茎段腋芽的生长情况

取材部位	供试数/个	发芽天数/d	芽生长情况
顶端 1~3 节	50	11	生长一般, 丛生芽较少
顶端以下 4~7 节	50	7	生长健壮, 丛生芽多
顶端 8 节以下	50	13	生长较差, 丛生芽较少

2.2 外植体的取材时间

外植体的萌动率和污染率随取材季节变化差异很大, 该试验于 2010~2011 年不同季节取枝条腋芽, 接种于 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 的诱导培养基上, 15 d 后观察比较接种效果。由表 2 可知, 在相同的培养条件下, 取材时间不同, 污染率差异很大, 7 月份取的芽污染率最高, 达 70%; 4 月份取的芽污染率最低, 仅为 6.25%, 这与外植体表面所带有的细菌有关。7 月份环境温度高, 微生物活动旺盛, 外植体带菌严重, 在相同灭菌时间下, 难以杀灭全部细菌, 污染率高。另外, 从萌发率看出, 4 月份萌发率最高, 7 月份萌发率最低, 这与植物的生长状况有关。4 月份植株生长旺盛, 经过冬季的休眠, 体内养分充足, 激素水平也适于芽的萌动, 7 月份因 5~6 月份月季大量开花, 消耗了体内较多的养料, 且天气炎热, 形成的腋芽较弱, 萌发率不高, 因此, 夏季枝条不适宜作外植体, 春季是取材的最好时期。萌发率=萌动茎段数/未污染的无菌茎段数。

表 2 不同取材时期外植体萌发率比较

外植体取材时间/年-月-日	接种数/段	污染数/个	污染率/%	萌发率/%
2010-10-9	80	27	33.75	71.7
2011-4-20	80	5	6.25	93.3
2011-7-25	80	56	70	58.3

2.3 增殖培养基的筛选

在初代培养基上当芽苗长到 1.5 cm 左右时, 将长势比较接近的芽进行继代增殖培养, 基本培养基为 MS, 同时加入 30 g 蔗糖, 8 g 琼脂, 附加不同浓度的 6-BA 和 NAA, 观察“恩钵”月季的增殖系数, 连续继代 3 次约 80 d 后, 调查其增殖率及生长发育情况。从表 3 可知, 当 6-BA 为 1.0 mg/L, NAA 为 0.1 mg/L 时, 增殖系数最高; 当 6-BA 为 2.0 mg/L 时, 增殖系数普遍较低; 当 NAA 浓度小于 0.2 mg/L 时, 增殖系数随 6-BA 浓度的增加而有所提高; 当 NAA 浓度提高到 0.2 mg/L 时, 增殖系数反而减少, 当 6-BA 和 NAA 的比值为中间时, 有较多愈伤组织形成, 侧芽的生长和分化受到抑制; 当 6-BA 浓度为 2.0 mg/L 时, 玻璃化现象较明显。

表 3 不同激素组合对“恩钵”月季增殖的影响

6-BA/mg·L ⁻¹	NAA/mg·L ⁻¹	平均增殖系数	备注
0.5	0	4.45	
0.5	0.05	4.95	
0.5	0.1	5.08	
0.5	0.2	4.78	有根原基形成
1.0	0	4.85	
1.0	0.05	5.65	
1.0	0.1	6.25	
1.0	0.2	5.35	愈伤组织较多
1.5	0	5.26	
1.5	0.05	5.73	
1.5	0.1	5.85	
1.5	0.2	5.19	有愈伤组织
2.0	0	4.06	有玻璃化出现
2.0	0.05	4.35	玻璃化
2.0	0.1	4.75	玻璃化
2.0	0.2	3.95	玻璃化现象严重

2.4 生根培养基的筛选

将苗高长到 3 cm 左右的小苗接种到不同 NAA 浓度的 1/2MS 生根培养基上, 同时添加 300 mg/L 的活性炭, 30 d 后观察生根情况。由表 4 可知, 当 NAA 浓度为 0.1 mg/L 和 0.2 mg/L 时, 月季的生根率达 90% 和 91%, 同时可观察到这 2 个浓度的苗根数也最多, 当进一步提高 NAA 浓度时, 生根率和苗根数都呈下降趋势, 而且根变的细长柔软。因此, 最适宜诱导月季生根的 NAA 浓度应为 0.2 mg/L。

表 4 不同浓度 NAA 对生根的影响

NAA/mg·L ⁻¹	接种数/瓶	生根率/%	生根数/条
0.05	50	68	3.2
0.1	50	90	5.4
0.2	50	91	6.1
0.5	50	82	4.8
1.0	50	56	3.5

2.5 移栽基质及移栽时间对试管苗移栽成活率的影响

将长有 3~4 根以上根系的小苗在不同的季节移栽到不同的基质上,20 d 后观察月季生长情况。由表 5 可知,移栽时用蛭石做基质成活率高于草炭和珍珠岩的混合基质,这可能是蛭石的透气性和保水性优于草炭和珍珠岩的混合物;另外,4 月份移栽成活率高于 10 月份移栽的,8 月份移栽成活率最差,这可能与 8 月气温过高,蒸腾失水严重有关。

表 5 不同季节、不同基质对月季试管苗移栽成活率的影响

移栽时间	基质		平均成活率/%
	蛭石	75%草炭+25%珍珠岩	
4月15日	85.6	76.8	81.2
8月10日	56.2	48.6	52.4
10月25日	75.4	64.6	70.0
平均成活率	72.4	63.3	

3 讨论与结论

以月季茎段为外植体进行快繁时,对于“恩钿”月季而言,选取枝条中上部茎段的腋芽效果最好,顶部和基部芽萌发率较差,这可能和芽的异质性有关。顶芽因发育迟,内含营养物有限,且消毒时间长,影响了其萌发;基部芽则由于发育早,芽体本身较瘦弱,内含激素少,因此萌发也较差。

全年不同季节采集的“恩钿”月季培养效果不同,于春季 4 月份采集最为适宜,秋季 10 月份其次,夏季 7、8 月份采集最不宜。出现这一现象的原因可能是 4 月份腋芽正处于结束休眠,即将萌发之际,此时进行离体培养,因其生理活性最强,因此最易萌发;7 月份因气温高,且 5 月份开花消耗了植株大量养料,月季处于休眠与半休眠状态,此时进行离体培养,营养和激素水平均缺乏,因而芽不易萌发,不适宜取材。

该试验结果表明,在影响月季组织培养的各因素中,激素是关键。基本培养基只有配合使用植物生长调节剂,才能诱导芽、愈伤组织和根的形成。最适合“恩钿”月季增殖的培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

根据植物生根原理,植物的生根与植物体内生长素的含量有关,低浓度能促进根的生长,高浓度则抑制根的生长。通过该试验发现,对月季生根较为有利的培养基是:1/2MS+NAA 0.1 mg/L+300 mg/L 活性炭,不仅生根数量多,而且根粗,健壮。高浓度的 NAA 生根量少,根弱。

移栽季节和移栽基质影响移栽的成活率,适宜的移栽季节有利于提高移栽成活率,通过试验发现,4 月份移栽成活率最高,7~8 月最差,这可能以外界的环境因素有关,4 月份气候适宜,叶片蒸腾相对较弱,植物生长旺盛,移栽易成活;7 月份外界温度高,蒸腾强烈,易失水,移栽成活率下降。移栽基质的保水性和透气性与植物移栽的成活率关系密切,研究结果表明,用蛭石作移栽基质成活率高于草炭和珍珠岩的混合基质。

参考文献

- [1] 朱建华,汤晓.月季的初代培养研究[J].宁波职业技术学院学报,2007,11(5):1001.
- [2] 周俊辉,杨寅桂,刘义存,等.微型月季的试管开花诱导研究[J].江西农业大学学报,2008,30(3):125-129.
- [3] 吴雪,高成华.月季茎尖离体培养的研究[J].辽宁师专学报:自然科学版,2007(2):108-110.
- [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] 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.

Study on Tissue Culture Technique of China Rose of 'Entian'

GONG Wei-hong, YOU Wei-zhong, LI Cheng-hui, GE Cai-yan

(Suzhou Polytechnical Institute of Agriculture, Suzhou, Jiangsu 215008)

Abstract: Taking the bud of stem-segment in different seasons and different positions as the explants, the tissue culture technique was studied. The results showed that the spring was the best time for selection of explants; the medium and top portion of trees were the right position for the explants cut. The proliferation media formula was MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L; the media formula for rooting was 1/2MS+NAA 0.2 mg/L+300 mg/L active carbon. Vermiculite was taken as the media for domestication.

Key words: China rose of 'Entian'; tissue culture; media