

月季茎段快繁体系的优化

周晓馥, 杨伟新, 丁雪, 杜丰平, 张鑫, 徐洪伟

(吉林师范大学, 生物资源与环境信息吉林省高校重点实验室, 吉林 四平 136000)

摘 要:以月季无菌苗茎段为试材, 以 MS 为基础培养基, 探究细胞分裂素 6-BA、TDZ 对茎段增殖的影响, TDZ 与 NAA 2 种激素的配比对株高、节间的影响, 及活性炭浓度对月季组培苗生根的影响。结果表明: 月季单芽茎段在激素浓度为 6-BA 4.0 mg/L 培养基上增殖数最高, 确定 MS+6-BA 4.0 mg/L+活性炭 0.6 g/L 为月季茎段最适芽增殖培养基; 当 TDZ 浓度为 1.0 mg/L, NAA 浓度为 0.05 mg/L 时, 株高最大达 5.02 cm, 节间长度最大达到 0.40 cm; 月季茎段的最适生根培养基为 1/2 MS+活性炭 1.0 g/L, 生根率为 92.9%。

关键词:月季; 外源激素; 活性炭; 离体再生体系

中图分类号:S 685.120.36 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)22-0098-05

月季(*Rosa chinensis*)属蔷薇科蔷薇属落叶或半落叶常绿灌木, 四大名花之一, 因其花色艳丽被誉为“花中皇后”。前人对月季离体快速繁殖体系的研究主要包括培养基激素及浓度^[1]、对外植体的选取^[2]、继代时间^[3]等方面; 关于组培苗生根问题, 已有很多研究^[4]。Misra 等^[5]认为在培养基中加入 GA₃ 有助于腋芽增殖, 活性炭在芽增殖与生根过程中是必需的, 最适生根培养基为 1/2 MS+IBA 4.92 μM+活性炭 250 mg/L; Kanchanapoom 等^[6]认为 MS+13.3 mM 6-BA+9.3 mM KT 为月季‘Heirloom’茎段最适芽诱导培养基。在植物再生体系或组织培养中, 一般认为植物器官分化的倾向是取决于内源激素的平衡, 外源激素通过改变内源激素的平衡而产生作用^[7]。活性炭作为一种吸附剂在组织培养中经常使用, 其主要作用是吸附培养过程中植物细胞分泌物及培养基中有害物质, 有利于生根^[8]。

该试验以月季无菌苗茎段为材料, 探究细胞分裂素 6-BA、TDZ 对茎段增殖的影响以及 TDZ 与 NAA 2 种激素的配比对株高、节间的影响; 并在生根培养基中加入活性炭, 确定最适生根的活性炭浓度。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为生长健壮的月季试管苗。

第一作者简介:周晓馥(1964-), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为植物分子生物学。E-mail:sunflower329@163.com。

责任作者:徐洪伟(1964-), 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为植物分子生物学。E-mail:zhouxiaofu@jlnu.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31070224)。

收稿日期:2014-07-17

1.2 试验方法

1.2.1 细胞分裂素对月季组培苗增殖的影响 于超净工作台中, 切取 1.5 cm 左右单芽茎段, 形态学下端接种于不同浓度 6-BA 和 TDZ 的芽增殖培养基中, 具体配比见表 1 和表 2, 以上培养基均含蔗糖 30 g/L, 琼脂 7 g/L, 活性炭 0.6 g/L, pH 5.83~5.85, 经 121℃ 高压灭菌 20 min。接种后培养条件为 25℃, 光照强度 2 000 lx, 光周期为 16 h/8 h。45 d 后分别观察组培苗生长状况并进行统计分析。

1.2.2 激素配比对月季组培苗增殖的影响 于超净工作台中, 切 1.5 cm 左右单芽茎段, 形态学下端接种于不同 TDZ 与 NAA 配比的 MS 培养基中, 具体配比见表 3, 培养基成分、灭菌方式和时间、接种后培养条件同 1.2.1, 45 d 后观察并测量株高及节间。

1.2.3 生根培养 于超净工作台中, 切取 1.5 cm 左右单芽, 形态学下端接种于附加不同浓度活性炭的 1/2 MS 生根培养基中, 具体配比见表 5, 培养基成分、灭菌方式和时间、接种后培养条件同 1.2.1, 接种 25、50 d 后分别观察组培苗生根状况并进行统计。

2 结果与分析

2.1 6-BA 浓度对月季茎段离体再生的影响

单芽茎段接种于 6-BA 浓度梯度的芽诱导及增殖培养基 45 d 后, 对组培苗的芽增殖数进行统计, 由表 1 可知, 在 6-BA 浓度为 0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mg/L 的培养基中, 月季茎段的芽增殖数分别为 7.33、7.23、8.67、10.61、11.25、11.56 个, 在 6-BA 浓度为 4.0 mg/L 时, 其芽增殖数达到最大值 11.56 个(图 1-A、B)。

表 1 6-BA 浓度对月季茎段离体再生的影响

Table 1 Effect of 6-BA concentration on miniature rose stem *in vitro* regeneration

培养基编号	6-BA 浓度/(mg · L ⁻¹)	芽增殖数/个
1	0	7.33e
2	0.5	7.23e
3	1.0	8.67d
4	2.0	10.61c
5	3.0	11.25b
6	4.0	11.56a

2.2 TDZ 浓度对月季茎段离体再生的影响

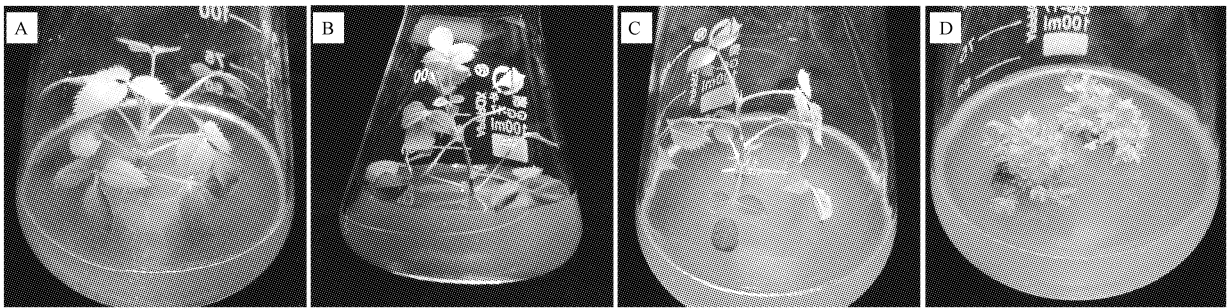
单芽茎段接种于 TDZ 浓度梯度的芽诱导及增殖培养基 45 d 后,对组培苗的芽增殖数进行统计,由表 2 可知,在 TDZ 浓度为 0、0.2、0.4、0.6、1.0、1.5 mg/L 的培养基中,月季茎段的芽增殖数分别为 6.75、6.89、6.38、

9.68、8.10、8.10 个;在 TDZ 浓度为 0.6 mg/L 时,其芽增殖数达到最大值 9.68 个(图 1-C);继续提高 TDZ 浓度,其芽增殖数降低,当 TDZ 浓度为 1.5 mg/L 时,月季丛生芽出现矮化现象(图 1-D)。

表 2 TDZ 浓度对月季茎段离体再生的影响

Table 2 Effect of TDZ concentration on miniature rose stem *in vitro* regeneration

培养基编号	TDZ 浓度/(mg · L ⁻¹)	芽增殖数/个
7	0	6.75d
8	0.2	6.89c
9	0.4	6.38e
10	0.6	9.68a
11	1.0	8.10b
12	1.5	8.10b



注:A. 1 号和 7 号培养基(MS,无外源激素)中生长 45 d 的丛生芽,芽增殖率低,长势弱;B. 6 号培养基(MS+6-BA 4.0 mg/L+活性炭 0.6 g/L)中生长 45 d 的丛生芽,芽增殖率高;C. 10 号培养基(TDZ 0.6 mg/L+活性炭 0.6 g/L)中生长 45 d 的丛生芽,芽增殖率较高;D. 12 号培养基(MS+TDZ 1.5 mg/L+活性炭 0.6 g/L)中生长 45 d 的丛生芽,芽增殖率较低,严重矮化。

Note:A. Mutiple bud in No. 1 and No. 7 medium for 45 days,proliferation rate is low,bud is weak;B. Mutiple bud in No. 6 medium for 45 days,proliferation rate is high;C. Mutiple bud in No. 10 medium for 45 days,proliferation rate is high;D. Mutiple bud in No. 12 medium for 45 days,proliferation rate is low,bud is low.

图 1 外源激素及浓度对微型月季茎段离体再生的影响

Fig. 1 Exogenous hormones on *in vitro* regeneration

2.3 月季组培苗株高与 TDZ、NAA 配比间的关系

单芽茎段接种于不同 TDZ 与 NAA 配比的芽诱导培养基 30 d 后,对月季组培苗高度进行测量。由表 3 可知,当 TDZ 浓度不变时,随着 NAA 浓度的增加,组培苗高度先增加再降低,当 NAA 浓度为 0.05 mg/L 时,株高达最大值 5.02 cm(图 2)。

表 3 TDZ 与 NAA 配比对月季组培苗株高的影响

Table 3 Effect of TDZ and NAA ratio on plant height

培养基编号	TDZ 浓度 /(mg · L ⁻¹)	NAA 浓度 /(mg · L ⁻¹)	平均株高 /cm
1	1.0	0	3.34e
2	1.0	0.05	5.02a
3	1.0	0.10	4.65b
4	1.0	0.20	4.29d
5	1.0	0.50	4.43c

2.4 月季组培苗节间长度与 TDZ、NAA 配比间的关系

单芽茎段接种于不同 TDZ 与 NAA 配比的芽诱导培养基 45 d 后,对月季组培苗节间长度进行测量。由表 4 可知,当 TDZ 浓度不变时,随着 NAA 浓度的增加,组

培苗节间长度先增加再降低,当 NAA 浓度为 0.05 mg/L 时,节间长度达最大值 0.40 cm(图 2)。

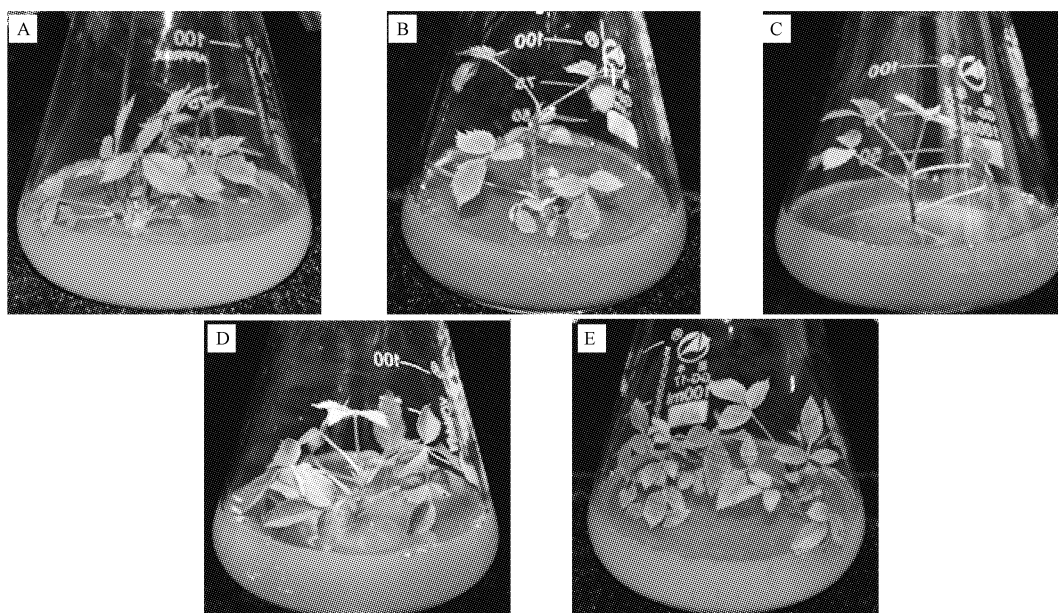
表 4 TDZ 与 NAA 配比对月季组培苗节间长度的影响

Table 4 Effect of TDZ and NAA ratio on internode length

培养基编号	TDZ 浓度 /(mg · L ⁻¹)	NAA 浓度 /(mg · L ⁻¹)	节间长度 /cm
1	1.0	0	0.25c
2	1.0	0.05	0.40a
3	1.0	0.10	0.34b
4	1.0	0.20	0.31b
5	1.0	0.50	0.26c

2.5 活性炭对月季组培苗生根的影响

丛生芽接种于生根培养基 50 d 后,进行观察及统计,由表 5 可知,丛生芽在 6 种活性炭浓度梯度的生根培养基中生长 50 d 时,生根率分别为 66.7%、71.4%、85.7%、85.7%、92.9%、89.3%,生根状况见图 3,此时的最高生根率为 92.9%,其所对应培养基活性炭浓度为 1.0 g/L。

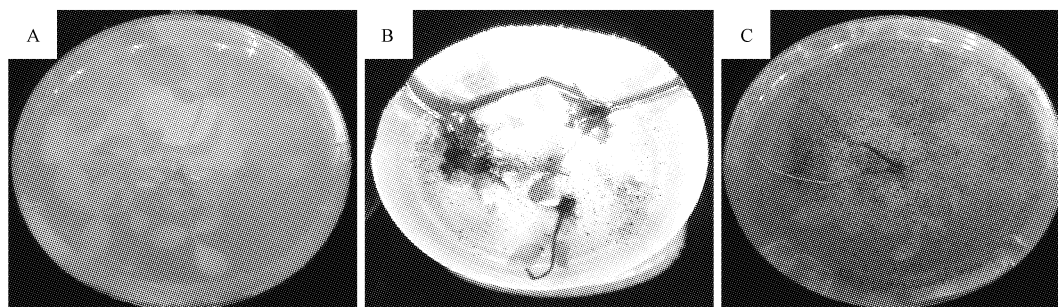


注:A:单芽茎段在激素浓度为 TDZ 1.0 mg/L+NAA 0 mg/L 的芽诱导培养基生长 30 d;B:单芽茎段在激素浓度为 TDZ 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L 的芽诱导培养基生长 30 d;C:单芽茎段在激素浓度为 TDZ 1.0 mg/L+NAA 0.10 mg/L 的芽诱导培养基生长 30 d;D:单芽茎段在激素浓度为 TDZ 1.0 mg/L+NAA 0.20 mg/L 的芽诱导培养基生长 30 d;E:单芽茎段在激素浓度为 TDZ 1.0 mg/L+NAA 0.50 mg/L 的芽诱导培养基生长 30 d。

Note: A. Single bud in TDZ 1.0 mg/L+NAA 0 mg/L bud inducing medium for 30 days; B. Single bud in TDZ 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L bud inducing medium for 30 days; C. Single bud in TDZ 1.0 mg/L+NAA 0.10 mg/L bud inducing medium for 30 days; D. Single bud in TDZ 1.0 mg/L+NAA 0.20 mg/L bud inducing medium for 30 days; E. Single bud in TDZ 1.0 mg/L+NAA 0.50 mg/L bud inducing medium for 30 days.

图 2 TDZ 与 NAA 对比对月季茎段离体再生的影响

Fig. 2 Effect of TDZ and NAA ratio on stem *in vitro* regeneration of miniature rose



注:A:月季丛组培苗在活性炭浓度为 0 g/L 生根培养基中 50 d 后生根状况;B:月季丛组培苗在活性炭浓度为 0.2 g/L 生根培养基中 50 d 后生根状况;C:月季丛组培苗在活性炭浓度为 1.0 g/L 生根培养基中 50 d 后生根状况。

Note: A. Rooting plantlets in rooting medium containing 0 g/L active carbon; B. Rooting plantlets in rooting medium containing 0.2 g/L active carbon; C. Rooting plantlets in rooting medium containing 1.0 g/L active carbon.

图 3 不同活性炭浓度对月季组培苗生根的影响

Fig. 3 Effect of Activated carbon concentration on rooting

表 5 活性炭浓度对月季组培苗生根的影响

Table 5 Effect of activated carbon concentration on rooting(50 days)

生根培养基 编号	活性炭浓度 /(g·L ⁻¹)	生根数 /条	接种数 /株	生根率 /%
1	0	18	27	66.7e
2	0.2	20	28	71.4d
3	0.4	24	28	85.7c
4	0.6	24	28	85.7c
5	1.0	26	28	92.9a
6	1.5	25	28	89.3b

3 讨论

3.1 6-BA 和 TDZ 对月季茎段芽增殖的影响

6-BA 对月季茎段的芽增殖效果优于 TDZ。单芽茎段接种于不同浓度 6-BA 和 TDZ 的芽诱导及增殖培养基 45 d 后,对组培苗的芽增殖数进行统计得出:当 6-BA 浓度为 4.0 mg/L 时,其芽增殖数为 11.56 个,TDZ 浓度为 0.6 mg/L 时,其芽增殖数为 9.68 个;继续增加 TDZ 浓度,其芽增殖数降低,并产生矮化现象,且 TDZ 浓度越

高,矮化现象越严重,节间越不明显。由此可知,高浓度 TDZ 抑制芽增殖与伸长。Debnath^[9]在对越橘离体再生体系进行研究时,认为培养基中 TDZ 浓度为 1.1 mg/L 时,强烈抑制芽的伸长。

3.2 激素对比对株高及节间长度的影响

植物组织培养的成功与否与植物激素配比的相关性十分密切,不同种类的外源激素对外植体的诱导作用不同^[10]。该研究中,单芽茎段接种于不同 TDZ 与 NAA 配比的芽诱导培养基培养 30 d 后发现,TDZ 浓度不变时,随着 NAA 浓度的增加,组培苗节间长度先增加再降低,当 NAA 浓度为 0.05 mg/L 时,节间长度达最大值。这说明生长素与细胞分裂素 2 种植物外源激素同时存在时最适宜月季组培苗的生长。这与前人的研究有相似之处。刘军等^[11]研究表明,添加了生长素 2,4-D 的培养基比只有 6-BA 和 NAA 2 种激素的組合的叶片愈伤组织诱导率要高,并且愈伤组织也比后者的大,与细胞分裂素共同作用的效果明显好于单独使用的效果。此外,当 NAA 浓度在 0.05 mg/L 基础上继续提高时,月季组培苗株高及节间长度呈现降低趋势。陈丹萍等^[12]对草石蚕离体再生的研究表明,其生根数、根长、根系粗度及密度随着生长素 NAA 的浓度的适量增加而有所提高,但 NAA 浓度过高时又明显抑制根的生长,根长减小且密度下降。

3.3 组培苗生根率随活性炭浓度增加而升高

但在整个组织培养过程中,月季快速增殖后,组培生根存在一定难度。孙占育等^[13]研究表明活性炭可以为根提供黑暗环境,提高组培苗的生根率。该研究中,随着生根培养基中活性炭浓度的增加,月季组培苗生根率不断升高;组培苗在活性炭浓度为 1.0 g/L 的生根培养基中生根率最高,与不含活性炭的培养基相比,植株和根都更加健壮,这与前人的研究相一致。吴广宇等^[14]在大叶黄杨试管苗生根培养基中加入 0.5% 活性炭,生根率达 95%,若不加活性炭,产生的根易发褐色。李琳等^[15]发现在库拉索芦荟的生根培养基中加入 0.2% 和 0.4% 的活性炭容易生根,不加活性炭的培养基,外植体都褐化,基本不生根。

3.4 高浓度活性炭抑制组培苗生根

该研究中,当活性炭浓度升高 1.5 g/L 时,月季组培苗生根率降低,根也随之变细,由此可知,1.5 g/L 的活性炭抑制月季组培苗根部生长,这与前人研究有相似

之处。李树丽等^[16]认为在培养基中加入一定浓度活性炭可在一定程度上吸附植物激素,使植物生长素含量超过细胞分裂素,有利于生根,但当活性炭用量超过 2% 时生根率反而下降。王会^[17]在研究活性炭对红叶石楠的生根的影响时得出,低浓度(0.3%)的效果好于高浓度(0.5%)的活性炭,可能是 IBA 被高浓度的活性炭吸附,降低了生长素的作用效果。

参考文献

- [1] 郝笃隽,赵杭苹,刘辉,等.两种不同花色微型月季组织培养生根试验研究[J].上海农业科技,2010(4):72-73.
- [2] 沈国正,钱丽华,赵杭苹.盆栽微型月季离体培养繁殖技术探讨[J].浙江农业科学,2006(4):398-400.
- [3] 宋丽莎,黎晓凌,黄希莲,等.微型月季组织培养技术的研究[J].农技服务,2010,27(7):925-926.
- [4] Rajendra P M, Ram C Y, Godara N R, et al. Beniwal. *In vitro* plant regeneration of rose(*Rosa hybrida* L.) CV. 'Benjamin Paul' through various explants[J]. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences, 2013, 1(2S):111-119.
- [5] Misra P, Chakrabarty D. Clonal propagation of *Rosa clinophylla* Thory. through axillary bud culture[J]. Scientia Horticulturae, 2009, 119: 212-216.
- [6] Kanchanapoom K, Sakpeth P, Kanchanapoom K. *In vitro* flowering of shoots regenerated from cultured nodal explants of *Rosa hybrida* cv. 'Heirloom'[J]. Science Asia, 2010, 36:161-164.
- [7] 卢小三,范素杰,张帅,等.杨树诱导芽分化中 6-BA 和 NAA 配比优化研究[J].湖北林业科技,2010(3):17-21.
- [8] 王清连.植物组织培养[M].北京:中国农业出版社,2000.
- [9] Debnath S C. A Two-step Procedure for adventitious shoot regeneration from in vitro-derived lingonberry leaves; Shoot induction with TDZ and shoot elongation using zeatin [J]. Hort Science, 2005, 40(1):189-192.
- [10] 何恩铭,齐香君,陈秀清,等.大豆愈伤组织的诱导与离体培养[J].陕西科技大学学报,2005(5):34-36.
- [11] 刘军,丰震,赵兰勇.影响月季叶片愈伤组织诱导因素的初步探讨[J].山东林业科技,2004(3):115-119.
- [12] 陈丹萍,耿广东,胡小京,等.不同激素对比对草石蚕不定芽诱导及生根的影响[J].贵州农业科学,2010,38(11):44-45.
- [13] 孙占育,孙志强,曹斌.活性炭在促进组培苗植物生根中的作用[J].湖南农业科学,2010(7):3-5.
- [14] 吴广宇,杨玲玲.大叶黄杨带腋芽茎段组织培养研究[J].安徽农业科学,2005,33(5):815,817.
- [15] 李琳,钟昌松,周香,等.活性炭在库拉索芦荟(*Aloe vera*)的组织培养中的应用[J].西南农业学报,2005,18(1):105-107.
- [16] 李树丽. Vc 液和活性炭对中华红叶杨外植体褐变的影响[J].安徽农业科学,2008,36(26):11232-11233.
- [17] 王会.红叶石楠组培苗生根培养的研究[J].北方园艺,2007(10):178-180.

Optimization of Rapid Propagation System of Rose Stems

ZHOU Xiao-fu, YANG Wei-xin, DING Xue, DU Feng-ping, ZHANG Xin, XU Hong-wei

(Key Laboratory for Plant Resources Science and Green Production, Jilin Normal University, Siping, Jilin 136000)

苹果矮化砧木新品系“矮砧 6 号”茎尖组培快繁研究

王 淼 淼, 马 晓 月, 张 学 英, 徐 继 忠

(河北农业大学 园艺学院, 河北 保定 071001)

摘 要:以苹果矮化砧木新品系“矮砧 6 号”茎尖为外植体,研究了培养基中不同植物生长调节剂配比对芽苗增殖和生根的影响,以筛选出适合“矮砧 6 号”茎尖组培快繁的培养基配方。结果表明:苹果矮化砧木“矮砧 6 号”茎尖用 0.1% HgCl_2 杀菌处理的适宜时间为 8 min;以 MS 为基本培养基,附加蔗糖 30 g/L、琼脂 6 g/L,适宜增殖培养的植物生长调节剂配比为 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.05~0.10 mg/L,增殖系数可达到每 4 周 4.53 倍;有利于生根的继代培养基的植物生长调节剂配比为 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L,适宜组培苗生根的植物生长调节剂为 IAA 1.0 mg/L+IBA 0.4 mg/L,平均生根率为 90%以上,平均生根数为 6 条左右,根系发达,移栽后成活率达 90%以上。

关键词:苹果;矮化砧木;茎尖培养;组培快繁;植物生长调节剂

中图分类号:S 661.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)22-0102-03

苹果矮化密植以其经济利用土地、早果丰产、果实产量高且品质好、易于管理、适于机械化作业等优点,已成为现代苹果生产发展的趋势^[1]。应用适宜的矮化砧木是实现矮化密植的主要途径之一,各国都应该因地制宜选育苹果矮化砧。中国目前苹果矮化砧木的主要利用方式为应用矮化中间砧^[2-3],而欧美等生产国主要推广矮化自根砧^[4],矮化自根砧苗木个体生长差异小,整齐一致^[5]。自根砧的无性繁殖方式主要有扦插、压条与组织培养等^[6]。与扦插、压条相比,利用组织培养技术繁育自根苗不受季节限制,短时间内可以获得大量的砧木苗。

河北农业大学苹果课题组从苹果矮化砧木 SH₄₀ 实生后代中选出的“矮砧 6 号”,作为中间砧嫁接的“红富

士”表现早花、矮化性好^[7],为尽快进行自根砧苗木的试验与示范,以及资源的离体保存,现以苹果砧木新品系“矮砧 6 号”为试材,采用茎尖培养的方法,建立其快繁体系,以期无病毒苗木生产打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2013 年 3 月 19 日,河北省顺平县试验园取“矮砧 6 号”未萌芽枝条,水培于光照培养箱内,隔天更换清水 1 次,待芽萌发后取大于 1.5 cm 的嫩梢,用流水冲洗干净备用。

1.2 试验方法

1.2.1 HgCl_2 处理时间对外植体灭菌效果的影响 将冲洗干净的材料放入三角瓶中在超净工作台上用 70% 乙醇消毒 30 s,然后用 0.1% 的 HgCl_2 溶液分别处理 6、8、10 min,共 3 个处理,再用无菌水洗涤 4~5 次,接种在 MS+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L 的启动培养基上(表 1)。15 d 后统计污染率,25 d 后调查外植体成活情况。

1.2.2 6-BA 与 NAA 配比对组培苗继代增殖的影响 将组培苗的幼嫩茎段切成单芽茎段,接种在 MS 培养基+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L 附加不同浓度 6-BA、

第一作者简介:王淼淼(1989-),女,河北石家庄人,硕士研究生,研究方向为果树生物技术。E-mail:920487374@qq.com.

责任作者:张学英(1972-),女,博士,教授,现主要从事果树生物技术及果树栽培生理与生态等研究工作。E-mail:zhangxueying1996@163.com.

基金项目:河北省科技厅资助项目(14226307D-5);农业部公益性行业科研专项资助项目(201203075-05)。

收稿日期:2014-07-16

Abstract: Taking aseptic rose stem segments as materials and MS as basal medium, effect of exogenous 6-BA, TDZ on rose stem proliferation, TDZ and NAA on plant height and internode, active carbon concentration on rooting were explored. The results showed that 6-BA 4.0 mg/L had a maximum bud proliferation, so MS+6-BA 4.0 mg/L+active carbon 0.6 g/L was the optical proliferation medium. When TDZ was 1.0 mg/L, NAA was 0.05 mg/L, seedling had the maxium height of 5.02 cm and internode 0.40 cm. The optimum rooting medium was 1/2 MS+active carbon 1.0 g/L with a 92.9 rooting rate.

Keywords: rose; exogenous hormones; active carbon; *in vitro* regeneration system