

耿晓东. 微型月季“金太阳”组织培养技术研究[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(11): 41-43.

# 微型月季“金太阳”组织培养技术研究

耿晓东

(苏州农业职业技术学院, 江苏苏州 215008)

**摘要:**以微型月季品种“金太阳”腋芽为外植体诱导丛生芽, 采用正交设计方案, 进行微型月季初代和继代增殖最优培养基配方的筛选, 结果表明, 微型月季腋芽诱导最适宜培养基是  $1/2MS + 6 - BA \ 1 \text{ mg/L} + NAA \ 0.5 \text{ mg/L} + 3\%$  蔗糖  $+ 0.6\%$  琼脂; 丛生芽继代增殖最适宜培养基是  $MS + 6 - BA \ 2 \text{ mg/L} + NAA \ 0.5 \text{ mg/L} + KT \ 0.5 \text{ mg/L} + 3\%$  蔗糖  $+ 0.6\%$  琼脂, pH 值为 5.8。

**关键词:**微型月季; 组织培养; 增殖; 继代

**中图分类号:**S685.120.4<sup>+</sup>3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)11-0041-03

微型月季是蔷薇科蔷薇属多年生木本植物, 又称“迷你月季”或“袖珍月季”, 株型矮小紧凑, 花形小巧可爱, 花色丰富, 花期较长, 因具有较强的抗逆性, 便于粗放管理, 所以在园林绿化中应用较为广泛<sup>[1]</sup>。微型月季可通过种子、扦插和组培技术进行繁殖, 生产中一般用扦插繁殖较多, 但扦插繁殖成本高, 繁殖系数较低, 难以满足市场大批量的需求。组培技术具有繁殖效率高、周期短、遗传性状稳定、便于管理等优点<sup>[2]</sup>, 但关于微型月季组织培养的报道较少。因此, 本试验对微型月季的组织培养技术进行相关研究, 以期为规模化生产提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以盆栽微型月季品种“金太阳”为试材, 选取当年生无病虫害、生长健壮的枝条, 取其中部饱满的腋芽为外植体。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 初代培养** 去掉枝条上的皮刺和叶, 剪取带腋芽茎段 1.0~1.5 cm, 用洗衣粉溶液洗涤浸泡 30 min 后, 用流水冲洗 1 h。外植体冲洗干净后, 在超净工作台内将外植体放入 75%

乙醇中消毒 30 min, 用无菌水冲洗 1 次, 接着使用 0.1% 的氯化汞溶液浸泡处理 8 min, 用无菌水冲洗 5~8 次后接种<sup>[3]</sup>。将带腋芽的茎段接种到初代供试培养基上, 试验采用 4 因素 3 水平正交设计<sup>[4]</sup>, 设计方案详见表 1, 每个处理接种 10 瓶, 每瓶接种 1 个茎段, 重复 3 次; 培养 15 d 后统计腋芽诱导率。基本培养基设置 3 个水平:  $MS$ 、 $1/2MS$ 、 $1/3 \ MS$ ;  $6 - BA$  设置 3 个水平: 0.5、1、1.5 mg/L;  $NAA$  设置 3 个水平: 0.1、0.3、0.5 mg/L;  $KT$  设置 3 个水平: 0.1、0.2、0.3 mg/L。腋芽诱导率 = 腋芽萌发个数/接种外植体总数  $\times 100\%$ 。

**1.2.2 增殖培养** 将初代培养的外植体的约 1.5 cm 新芽, 在超净台内用解剖刀从腋芽基部切下, 接种在供试继代增殖培养基内, 每瓶接 1 个新芽, 每个处理接 10 瓶, 重复 3 次。培养 30 d 后统计丛生芽的增殖倍数。试验采用  $L_9(3^4)$  正交设计<sup>[4]</sup>, 同初代培养设计。基本培养基设置 3 个水平:  $MS$ 、 $1/2MS$ 、 $1/3 \ MS$ ;  $6 - BA$  设置 3 个水平: 1、2、3 mg/L;  $NAA$  设置 3 个水平: 0.1、0.3、0.5 mg/L;  $KT$  设置 3 个水平: 0.2、0.3、0.5 mg/L。腋芽增殖倍数 = 新芽萌发个数/接种腋芽总数。

### 1.3 培养条件

在培养室内进行光照培养, 初代培养和增殖培养的条件: 温度为  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ , 光照强度为 2 000 lx, 光照时间为 12 h/d。培养基除了试验设计的影响因子外, 另添加蔗糖 3%、琼脂 0.6%, 用 1 mol/L 的 HCl 和 NaOH 将培养基 pH 值调整为 5.8, 配制的培养基在  $121^\circ\text{C}$  高温下灭菌 17 min, 放置 1 周后备用<sup>[5]</sup>。

收稿日期: 2013-04-15

作者简介: 耿晓东 (1979—), 男, 江苏扬中人, 硕士, 高级工程师、讲师, 从事观赏植物栽培、园林植物应用等方面的教学与研究。Tel: (0512) 66098506; E-mail: gengxiaodong1088@126.com。

[10] 代文娟, 唐文秀, 邓 涛, 等. 狭叶坡垒基因组总 DNA 的提取和纯化方法研究[J]. 生物技术通报, 2011(7): 101-105, 116.

[11] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, 76(10): 5269-5273.

[12] 韦 霄, 韦记青, 蒋水元, 等. 迁地保护的金花茶遗传多样性评价[J]. 广西植物, 2005, 25(3): 215-218.

[13] 裴颜龙, 邹喻苹. 矮牡丹与紫斑牡丹 RAPD 分析初报[J]. 植物分类学报, 1995, 33(4): 350-356.

[14] 张继益, 董玉琛, 贾继增, 等. 旱麦草属种质资源的随机扩增多态性 DNA(RAPD)分析[J]. 遗传学报, 1999, 26(1): 54-60.

[15] 乔爱民, 刘佩瑛, 雷建军. 芥菜 16 个变种的 RAPD 研究[J]. 植物学报, 1998, 40(10): 915.

[16] 黄仕训, 陈 泓, 唐文秀, 等. 狭叶坡垒生物生态学特征及濒危原因研究[J]. 生物多样性, 2008, 16(1): 15-23.

[17] 张 玲, 肖春芬, 王 坚. 濒危植物狭叶坡垒的迁地保护[J]. 广西植物, 2001, 21(3): 277-280.

[18] Wright S. Evolution and the genetics of population: Variability within and among natural population[M]. Chicago: University of Chicago Press, 1978: 79-103.

[19] Gauli A, Gailing O, Stefanon V M, et al. Genetic similarity of natural populations and plantations of *Pinus roxburghii* Sarg. in Nepal[J]. Annals of Forest Science, 2009, 66: 703.

2 结果与分析

2.1 不同诱导培养基对微型月季腋芽诱导的影响

微型月季茎段接种 5 d 后陆续有腋芽开始膨大萌发,15 d 后统计 9 个处理 3 次重复的腋芽诱导率。由表 1 可见,9 个处理间诱导率存在明显的差异,诱导率最高的是处理 5,达到 65.5%,处理 6 次之;诱导率最低的是处理 7,只有 27.8%。

表 1 不同诱导培养基诱导微型月季腋芽 L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>) 正交试验设计与结果

处理号	基本培养基	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	KT (mg/L)	诱导率(%)			
					重复Ⅰ	重复Ⅱ	重复Ⅲ	平均
1	MS	0.5	0.1	0.1	40.0	36.7	36.7	37.8
2	MS	1.0	0.3	0.2	46.7	50.0	50.0	48.9
3	MS	1.5	0.5	0.3	43.3	33.3	40.0	38.9
4	1/2MS	0.5	0.3	0.3	46.7	50.0	46.7	47.8
5	1/2MS	1.0	0.5	0.1	60.0	73.3	63.3	65.5
6	1/2MS	1.5	0.1	0.2	56.7	53.3	46.7	52.2
7	1/3MS	0.5	0.5	0.2	30.0	26.7	26.7	27.8
8	1/3MS	1.0	0.1	0.3	43.3	36.7	33.3	37.8
9	1/3MS	1.5	0.3	0.1	33.3	26.7	33.3	31.1

表 2 不同诱导培养基诱导微型月季腋芽方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值
区组间	30.362 2	2	15.18	0.88
基本培养基	2 394.140 0	2	1197.07	69.64 **
6-BA	827.626 7	2	413.81	24.01 **
NAA	12.906 7	2	6.45	37.53 **
KT	50.166 7	2	25.08	1.46
处理间	3 284.840 0	8	410.61	23.89 **
误差	309.346 7	18	17.19	

注: $F_{0.05}=2.51$ , $F_{0.01}=3.71$ ; \*\* 表示差异极显著, \* 表示差异显著。下同。

表 3 试验处理因子各水平间差异显著性检验

处理	平均诱导率(%)	5%	1%	处理	平均诱导率(%)	5%	1%	处理	平均诱导率(%)	5%	1%
1/2MS	55.188 9	a	A	6-BA <sub>2</sub>	50.733 3	a	A	NAA <sub>3</sub>	44.066 7	a	A
MS	41.855 6	b	B	6-BA <sub>3</sub>	40.733 3	b	B	NAA <sub>2</sub>	42.600 0	a	A
1/3MS	32.222 2	c	C	6-BA <sub>1</sub>	37.800 0	b	B	NAA <sub>1</sub>	42.600 0	a	A

2.2 不同增殖培养基对微型月季腋芽继代增殖的影响

将 1.5 cm 左右的腋芽在超净台内切下后接入到继代增殖培养基内,10 d 左右腋芽切口处陆续有增殖的新芽出现,

对不同诱导培养基诱导微型月季腋芽的统计结果进行方差分析,结果(表 2)表明:基本培养基 6-BA、NAA、各处理间差异在  $\alpha=0.01$  水平上达到了极显著,表明基本培养基、6-BA 和 NAA 是腋芽诱导的主要影响因子;KT 因素效应在  $\alpha=0.05$  水平上未达到显著水平,表明 KT 对微型月季腋芽诱导影响不大,不是主导因子;在各供试因子中,最重要的是基本培养基,其次是 NAA 和 6-BA。

在  $\alpha=0.05$  水平上将不显著因子剔除后,进一步对基本培养基、6-BA 和 NAA 各水平间腋芽诱导率进行多重比较,结果(表 3)表明:基本培养基 3 个水平间差异在 1% 水平上达到了极显著,从平均诱导率看,1/2MS 最高,微型月季腋芽诱导的最佳培养基为 1/2MS;6-BA 1 mg/L 与其余 2 个水平间差异在 1% 水平上达到了极显著,微型月季腋芽诱导的最适 6-BA 用量为 1 mg/L;NAA 各水平间差异在 5% 水平不显著,但从腋芽诱导率看,NAA 比较适合 的浓度是 0.5 mg/L。因此,筛选出微型月季“金太阳”腋芽诱导最优培养基是 1/2MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L。

30 d 后统计增殖倍数,结果(表 4)表明:各处理间增殖倍数存在明显差异,增殖倍数最高的是处理 3,达到 6.52,增殖倍数最低的是处理 9,为 3.73。

表 4 不同增殖培养基对微型月季腋芽增殖 L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>) 正交设计与结果

处理号	基本培养基	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	KT (mg/L)	增殖倍数			
					重复Ⅰ	重复Ⅱ	重复Ⅲ	平均
1	MS	1	0.1	0.2	4.07	5.20	5.33	4.87
2	MS	2	0.3	0.3	6.17	5.63	6.07	5.96
3	MS	3	0.5	0.5	6.70	6.23	6.63	6.52
4	1/2MS	1	0.3	0.5	3.47	3.73	4.63	3.94
5	1/2MS	2	0.5	0.2	4.30	4.23	4.93	4.49
6	1/2MS	3	0.1	0.3	4.67	3.93	3.30	3.97
7	1/3MS	1	0.5	0.3	4.30	3.83	3.90	4.01
8	1/3MS	2	0.1	0.5	4.67	4.93	4.43	4.68
9	1/3MS	3	0.3	0.2	3.80	3.73	3.67	3.73

就不同增殖培养基对微型月季腋芽的增殖结果进行方差分析,结果(表5)表明:基本培养基、6-BA、KT各处理间差

表 5 腋芽增殖倍数方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值
区组间	0.116 8	2	0.058 4	0.3
基本培养基	16.236 4	2	8.1182	41.80 **
6-BA	2.686 7	2	1.343 3	6.92 **
NAA	1.399 6	2	0.699 8	3.60 *
KT	2.129 7	2	1.064 8	5.48 **
处理间	22.452 4	8	2.806 5	14.45 **
误差	3.495 1	18	0.194 2	

注: $F_{0.05}=2.51$ , $F_{0.01}=3.71$ 。

表 6 增殖试验处理因子各水平间增殖倍数差异显著性检验

处理	增殖倍数	5%	1%	处理	增殖倍数	5%	1%	处理	增殖倍数	5%	1%
MS	5.781 1	a	A	6-BA <sub>2</sub>	5.040 0	a	A	KT <sub>3</sub>	5.046 7	a	A
1/3MS	4.140 0	b	B	6-BA <sub>3</sub>	4.740 0	ab	AB	KT <sub>2</sub>	4.644 4	ab	A
1/2MS	4.132 2	b	B	6-BA <sub>1</sub>	4.273 3	b	B	KT <sub>1</sub>	4.362 2	b	A

NAA 虽不是主导因子,但其对腋芽增殖倍数有促进作用,因此,对 NAA 各水平间处理进行多重比较,结果(表 7)表明:NAA 各处理水平间差异不显著,但从均值看,水平 3 均值最高。因此,筛选出微型月季“金太阳”腋芽增殖最优培养基是 MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L。

表 7 NAA 各水平间增殖倍数差异显著性检验

处理	增殖倍数	5%	1%
NAA <sub>(3)</sub>	5.005 6	a	A
NAA <sub>(2)</sub>	4.544 4	a	A
NAA <sub>(1)</sub>	4.503 3	a	A

3 小结与讨论

对于植物离体培养而言,培养基是向植物细胞提供营养的场所,培养基的优化是确保组培快繁的首要条件。正交试验设计是一种研究多因素多水平、高效率、快速、经济的试验设计方法<sup>[4]</sup>。本试验选用正交设计旨在提高培养基的筛选效率。MS 是常用基本培养基,其无机盐与离子的浓度较高,是较为稳定的平衡培养液<sup>[9]</sup>,而 1/2MS 和 1/3MS 降低了基本培养中的无机盐浓度。在本试验中,无机盐离子浓度的降低对于微型月季腋芽诱导影响极显著,诱导过程所需无机盐离子浓度较低,在丛生芽增殖过程中,不同水平间也有显著差异,这可能是由于离子浓度调节着培养基的渗透压,通过对植物激素的调节来影响腋芽的生长发育<sup>[10]</sup>。试验结果显示,激素是影响微型月季组织培养的主导因子,不同浓度 6-BA 在腋芽诱导和丛生芽增殖过程中差异显著,丛生芽增殖过程所需 6-BA 浓度较高,但是更高浓度的 6-BA 会降低诱导率和丛生芽增殖倍数;NAA 对腋芽诱导影响较大,对丛生芽增殖有一定影响;KT 对腋芽诱导无明显影响,但对丛生芽增殖有

显著影响,这表明在丛生芽增殖过程中需要较高浓度的细胞分裂素。适当浓度的细胞分裂素与生长素配合有利于微型月季组培快繁,通过试验,筛选出微型月季腋芽诱导的最适宜培养基是 1/2MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L+3%蔗糖+0.6%琼脂;微型月季丛生芽继代增殖最适宜培养基是 MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L+3%蔗糖+0.6%琼脂。

在  $\alpha=0.01$  水平上进一步对各试验因子、各水平间腋芽增殖倍数进行多重比较,结果(表 6)表明:MS 基本培养基与 1/2MS、1/3MS 2 种基本培养基之间差异达到极显著,从均值来看,比较适合增殖基本培养基是 MS;6-BA 水平 1 和水平 2 之间差异达极显著,根据均值,腋芽增殖倍数较高时的 6-BA 浓度是 2 mg/L;KT 水平 1 和水平 3 之间差异显著,从均值来看,增殖倍数较高时的 KT 浓度是 0.5 mg/L。

参考文献:

[1] 刘庆超,王正加,王奎玲,等. 微型月季快速繁殖技术及产后管理研究[J]. 北方园艺,2006(2):115-118.

[2] 谭文澄,戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京:中国林业出版社,1991:147-171.

[3] 韩秀慧,满都拉,王华芳. 微型月季离体快速繁殖技术的研究[J]. 内蒙古师范大学学报:自然科学汉文版,2003,32(3):262-265.

[4] 盖钧镒. 试验统计方法[M]. 北京:中国农业出版社,2006:278-294.

[5] 于冰沁. 微型月季组织培养的研究[J]. 辽宁农业科学,2005(4):53-54.

[6] 宣继萍,郭忠仁,徐 菲,等. 正交设计优化秋海棠属植物 SRAP-PCR 反应体系及引物筛选[J]. 江苏农业学报,2011,27(6):1423-1425.

[7] 吴晓清,周玉珍,娄晓鸣,等. 利用正交设计法优化观赏贝母 ISSR-PCR 反应体系[J]. 江苏农业科学,2011(1):33-36.

[8] 高 凤,王 雪,张婷婷,等. 萱草引进新品种“Forgotten Dreams”的组织培养技术[J]. 江苏农业科学,2012,40(8):60-62.

[9] 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):100-102.

[10] 沈春修. 微型月季的组织培养技术研究[J]. 安徽农学通报,2009,15(17):37-38.