

李 雪,马媛春,程宗明. 抗盐玫瑰组培快繁体系的建立[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):50-53.

抗盐玫瑰组培快繁体系的建立

李 雪,马媛春,程宗明

(南京农业大学,江苏南京 210095)

摘要:以抗盐玫瑰当年生去叶的幼嫩单芽茎段为试验材料,建立体外无性快繁体系。结果表明,适宜玫瑰离体腋芽发芽的最佳培养基配方为 MS + 0.5 mg/L 6-BA 和 MS + 1.5 mg/L 6-BA;适宜丛生芽继代增殖的最佳培养基配方为 MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA 和 3/4MS + 0.3 mg/L IBA;适宜组培苗生根的最佳培养基配方为 1/2MS + 0.3 mg/L NAA,其生根率可达 95%。生根苗木移栽成活率可达 87% 以上。该体系可以用于抗盐玫瑰的快速大量繁殖。

关键词:抗盐玫瑰;组培快繁体系;培养基;萌发;继代培养;生根诱导;移栽驯化

中图分类号: S685.120.4⁺3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0050-04

玫瑰(*Rosa rugosa* L.)是蔷薇科蔷薇属植物,广泛分布在东亚、欧洲和北美洲地区。它花型秀美,色彩艳丽,气味芳香,形色俱佳。玫瑰花主要用于提炼香精玫瑰油,玫瑰油比等重量黄金价值还高,主要应用于化妆品、食品、精细化工等。玫瑰花瓣还可直接被腌制成食品,作调味剂使用,同时它的干燥花蕾也是一种重要的传统中药材^[1]。经测定,玫瑰的果实中含有大量的维生素 A、维生素 B、维生素 C,还含有 10 多种氨基酸、可溶性糖、生物碱和无机元素等^[2-4]。常食玫瑰果可以预防冠心病、肝病、急慢性传染病和阻止产生致癌物质等。玫瑰果实还常常被用来制作成浓缩维生素制剂。此外,玫瑰还具有较强的抗逆性^[5]。玫瑰种子发芽慢,扦插繁殖困难,采用组织培养的方法繁殖玫瑰,不但生产周期短,繁殖系数高,而且成本低,经济效益很高。江苏省东部沿海滩涂盐碱浓度高,极少园林和观赏植物能够在此生长。近几年来,笔者试种的一些抗盐玫瑰单株具有较强耐盐能力,利用这些耐盐单株建立玫瑰离体快繁体系,是实现良种快繁以及产业化发展的客观需求。

收稿日期:2014-04-05

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(14)2051]。

作者简介:李 雪(1987—),女,山东德州人,硕士研究生,主要从事园艺植物生物技术研究。E-mail:smilexueok@163.com。

通信作者:程宗明,博士,教授,主要从事果实系统生物学研究。E-mail:zmc@njau.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 试验材料

该供试材料为当年生实生苗,种子来自美国海滨,经过 3 个月沙藏保存后于翌年 3 月初播种,其盛花期见图 1。



图1 抗盐玫瑰盛花期

1.2 方法

1.2.1 外植体的消毒处理 3 月中旬从优良健壮植株剪取当年生枝条中段带芽的幼嫩茎段,用毛刷蘸取洗衣粉水轻轻刷洗后,剪成 5.0 cm 左右茎条,再流水冲洗 2 h 左右。在超净工作台上,先将茎段用 70% 乙醇溶液消毒 30 s,用无菌水冲洗 2~3 次,然后置于 0.1% HgCl₂ 溶液中消毒 3~5 min,再用无菌水冲洗 3~5 次。用无菌滤纸吸干材料表面的水分,最后将幼嫩茎条剪切成 1.0 cm 左右的带芽茎段,接种^[6]。

蒙古林业科技,2001,6(1):116.

[24]黄 平,王 荔,杨艳琼,等. 正交设计在灯盏花组织培养中的应用[J]. 云南农业大学学报,2006,21(2):160-163.

[25]林 春,刘鸿高,苏友波,等. 灯盏花快速繁殖研究简报[J]. 云南农业大学学报,2003,18(3):323-326.

[26]杨耀文,钱子刚,段 敏. 灯盏花组织培养初步研究[J]. 云南中医学院学报,2002,52(2):12-13.

[27]林丽飞,陶发清,刘春国,等. 药用植物灯盏花组织培养体系的建立[J]. 西南大学学报:自然科学版,2009,31(12):82-86.

[28]林丽飞,夏瑞娥,刘春国,等. 不同因素对短葶苈愈伤组织的影响[J]. 江苏农业科学,2013,41(2):52-54.

[19]林丽飞,胡先奇,江 楠. 短葶苈锈病的初步研究[J]. 华中农业大学学报,2004,23(5):513-514.

[20]林丽飞,刘春国,许 春,等. 云南省灯盏花根际土壤广东蛭蚓线虫的鉴定[J]. 西南大学学报:自然科学版,2008,30(6):88-90.

[21]林丽飞,刘春国,李卫芬,等. 云南省灯盏花根腐线虫病的病原鉴定[J]. 西南农业大学学报:自然科学版,2006,28(5):851-853.

[22]林丽飞,刘春国,李卫芬,等. 云南省灯盏花根际土壤螺旋线虫的鉴定[J]. 江苏农业科学,2007(1):62-63.

[23]许彩霞,孙成林,薛 伟. 灯盏花组织培养离体快速繁殖[J]. 内

1.2.2 腋芽的萌发诱导 将已处理的无菌茎段接种于腋芽诱导培养基上进行诱导培养。基本诱导培养基为 MS 培养基,对基本培养基添加不同浓度的细胞分裂素 6-BA(6-benzylaminopurine,6-苄氨基腺嘌呤)、大量元素和有机元素,共组成 5 种配方的培养基:MS + 0.5 mg/L 6-BA、MS + 1.5 mg/L 6-BA、MS + 2.5 mg/L 6-BA、3/2MS + 2.5 mg/L 6-BA、MS + 2.5 mg/L 6-BA(有机元素为 1.5 倍)。每种培养基上均接种 30 个离体茎段,每个处理重复 3 次,首先暗培养处理 5 d,以减轻外植体的褐化现象^[7-9],培养 4 周后统计腋芽萌发率。

1.2.3 继代增殖培养 将诱导培养基上已经萌发的嫩芽剪切下来转接到继代培养基上生长,共设 8 种继代培养基:MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L IBA、MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA、MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L IBA、MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA、MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA、MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L NAA、MS + 0.3 mg/L IBA、3/4MS + 0.3 mg/L IBA。每种培养基均接种 20 个 0.5~1.0 cm 长的单芽茎段,每个处理重复 3 次,培养 30 d 后,统计茎高≥2.0 cm 的苗的数量。

1.2.4 生根培养 从继代培养苗中选取生长健壮的幼苗,转接到生根培养基上,共组成 5 种生根培养基:1/2MS + 0.1 mg/L NAA、1/2MS + 0.3 mg/L NAA、1/2MS + 0.5 mg/L NAA、1/2MS + 0.3 mg/L IBA、1/2MS + 0.4 mg/L IBA。每种培养基均接种 20 个幼苗,每个处理重复 3 次,接种 20 d 后统计幼苗的生根情况。

1.2.5 组培苗的驯化移栽

1.2.5.1 组培苗的驯化 将长势良好、株高 5.0 cm 以上的生根组培苗的瓶盖拧松,放置 5 d 后开始每天倒入约 3 mm 厚的无菌水并逐渐开盖,7 d 后彻底揭开瓶盖,在持续该环境下观察 3 d。拧松瓶盖后须每天添加无菌水,这样不但能够防止培养基被彻底风干,还能为组培苗补充适当的水分。

1.2.5.2 组培苗的移栽 将长势依旧健壮且无污染的幼苗用镊子从组培瓶中取出,再用无菌水轻轻将附着的培养基洗掉,注意不要伤根。同时剪掉幼苗基部叶片,仅保留顶端 3~5 张复叶,再移栽到光照培养箱中。移栽所用的基质先 121 ℃、30 min 高压蒸汽灭菌,基质中蛭石:草炭土:珍珠岩为 9:3:1.5,移栽完毕后浇透水,并用 0.1% 多菌灵溶液喷雾育苗。培养箱温度设置为 22 ℃,昼夜温差 2~3 ℃,相对湿度为 90%,光照强度为 100 μmol/(m²·s),光照时间为 12 h/d,其间喷水 2~3 次/d,同时注意防治病菌。移栽 5 d 后可以增加光照强度并且适当降低浇水量^[10]。

1.2.6 统计分析 数据分析采用 Excel 和 SPSS 软件进行。

2 结果与分析

2.1 离体芽的诱导

之前预试验中采芽时间分别为 3 月中旬、5 月中旬、7 月中旬、9 月中旬、10 月中旬,结果以 3 月采芽试验效果最好,因此正式试验都采用 3 月的取样。玫瑰离体茎段接种 2 周后离体芽几乎全部萌发,但芽萌动后的生长状况却因培养基内生长调节剂浓度的不同而表现出差异。由表 1 可以看出,MS + 2.5 mg/L 6-BA 培养基上丛生芽少,节间极短,芽苗矮小;3/2MS + 2.5 mg/L 6-BA 培养基上分化率达 157%,但节间极短;培养基 MS + 2.5 mg/L 6-BA(有机元素为 1.5 倍)上,丛生芽最少,节间短,芽苗矮小。以上 3 种培养基上芽苗均长势矮壮,说明细胞分裂素 6-BA 浓度过高反而会抑制生长^[11],增加大量元素含量和有机元素含量也并不利于玫瑰腋芽萌发。培养基 MS + 1.5 mg/L 6-BA 和 MS + 0.5 mg/L 6-BA 上分化率都高达 170%,与其他处理差异显著,丛生芽多且生长健壮,虽然 6-BA 浓度为 0.5 mg/L 时茎秆稍细,但是并不影响其继代生长。重复试验筛选出适宜离体芽诱导分化的培养基配方为 MS + 0.5 mg/L 6-BA(图 2)和 MS + 1.5 mg/L 6-BA(图 3)。

表 1 不同培养基对玫瑰腋芽萌发的影响

培养基	接种芽数 (个)	丛生芽数 (个)	分化率 (%)	生长情况
MS + 2.5 mg/L 6-BA	30	34	113c	丛生芽少,芽苗矮小,节间极短
MS + 1.5 mg/L 6-BA	30	51	170a	丛生芽多,生长健壮
MS + 0.5 mg/L 6-BA	30	51	170a	丛生芽多,生长健壮
3/2MS + 2.5 mg/L 6-BA	30	47	157b	丛生芽较少,节间短
MS + 2.5 mg/L 6-BA(有机元素为 1.5 倍)	30	30	100d	丛生芽最少,芽苗矮小,节间短

注:培养基蔗糖浓度均为 30.0 g/L,琼脂浓度均为 5.6 g/L,pH 值均为 5.8,培养室温度均为(25±2) ℃,光照强度均为 100 μmol/(m²·s),光照时间为 14 h/d。同列数据后不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。下表同。

2.2 丛生芽的继代培养

继代增殖培养基采用的生长素为 NAA(1-naphthalene-acetic acid,萘乙酸)和 IBA(3-indolebutyric acid,3-吲哚丁酸)。玫瑰在 8 种继代增殖培养基上培养 4 周后,芽的增殖倍数和生长情况存在差异。由表 2 可以看出,玫瑰在培养基 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 和培养基 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L NAA 上分别于 3、5 d 后开始出现叶片萎蔫现象,不久后死亡,说明生长素 NAA 和 6-BA 的组合并不适合这种玫瑰的继代增殖培养。玫瑰在培养基 MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA 上增殖倍数高达 3.6,

与其他处理差异显著,丛生芽多且生长健壮;MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L IBA 培养基上丛生芽少且有畸形苗;MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA 培养基上丛生芽少,叶粗厚变脆;MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L IBA 培养基上丛生芽最少,节间极短,苗丛密集,微型化。说明细胞分裂素和生长素的用量及配比对玫瑰的继代增殖都有重要影响。MS + 0.3 mg/L IBA 培养基上丛生芽较少,速度慢,个别苗生长细弱,而 3/4MS + 0.3 mg/L IBA 培养基上增殖倍数高达 3.8,与其他处理差异显著,丛生芽多且生长健壮,说明调节大量元素含量可有效提高繁殖系数。重复试验筛选出适宜玫瑰继代增

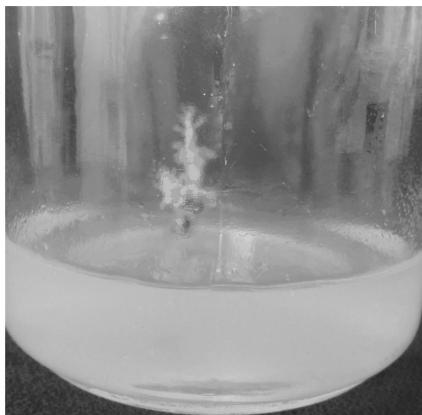


图2 培养基 MS+0.5 mg/L 6-BA 离体芽诱导情况



图3 诱导培养基 MS+1.5 mg/L 6-BA 离体芽诱导情况

殖的培养基配方为 MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA(图 4)和 3/4MS + 0.3 mg/L IBA(图 5)。

表 2 不同生长调节剂配比对芽继代增殖的影响

培养基	接种芽数 (个)	增殖芽数 (个)	增殖倍数 (倍)	生长情况
MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L IBA	20	36	1.8d	丛生芽少,有畸形苗
MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA	20	30	1.5e	丛生芽少,叶粗厚变脆
MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L IBA	20	24	1.2f	生芽最少,节间极短,苗丛密集,微型化
MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IBA	20	72	3.6b	丛生芽多,芽生长健壮
MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA	20	0	0g	3 d 后叶片枯黄,不久死亡
MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L NAA	20	0	0g	5 d 后叶片枯黄,不久死亡
MS + 0.3 mg/L IBA	20	60	3.0c	丛生芽较少,速度慢,个别苗生长细弱
3/4MS + 0.3 mg/L IBA	20	76	3.8a	丛生芽多,芽生长健壮



图4 培养基 MS+1.5 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IBA 继代培养情况



图5 培养基 3/4MS+0.3 mg/L IBA 继代培养情况

2.3 组培苗的生根培养

由表 3 可以明显看出,生长素 NAA 较 IBA 对抗盐玫瑰的组培诱导生根诱导效果更好。培养基 1/2MS + 0.1 mg/L NAA 和 1/2MS + 0.3 mg/L IBA 上组培苗生根率均为 50%,平均根数分别为 4 条和 5 条,并且根系粗短;1/2MS + 0.4 mg/L IBA 培养基上组培苗生根率达 75%,平均根数约为 3.33 条,虽然这种培养基比 IBA 浓度为 0.3 mg/L 时根系稍长,但由于根系细弱也不适于移栽(图 6);在培养基 1/2MS + 0.3 mg/L NAA 和培养基 1/2MS + 0.5 mg/L NAA 上,组培苗生根率均高达 95%,与其他处理差异显著,但是随着 NAA 浓度升高,

平均生根数反而减少,因此 NAA 浓度为 0.5 mg/L 时并不适合诱导生根。

在中间繁殖体增殖到一定数量即开始进行生根培养,由于嫩茎中细胞分裂素的累积,在转入生根培养基后增殖的趋势往往仍然很强,几乎没有不定根的发生。因此,生根培养要降低细胞分裂素浓度,增加生长素浓度^[12-13]。重复试验筛选出诱导玫瑰组培苗生根的最佳培养基配方为 1/2MS + 0.3 mg/L NAA(图 7),且根系良好,适于移栽。

2.4 组培苗的驯化移栽

玫瑰组培苗驯化移栽 15 d 后,就可以过渡到正常温室或自然条件下生长(图 8)。经重复试验发现,只要按照上述程

表 3 不同培养基对生根诱导的影响

培养基	接种芽数(个)	生根苗数(株)	生根率(%)	平均根数(条)	生长情况
1/2MS+0.1 mg/L NAA	20	10	50c	4c	根系粗短
1/2MS+0.3 mg/L NAA	20	19	95a	9a	根系健壮
1/2MS+0.5 mg/L NAA	20	19	95a	2e	生根数少
1/2MS+0.3 mg/L IBA	20	10	50c	5b	根系粗短
1/2MS+0.4 mg/L IBA	20	15	75b	3.33d	根系粗短



图6 培养基 1/2MS+0.4 mg/L IBA 生根情况

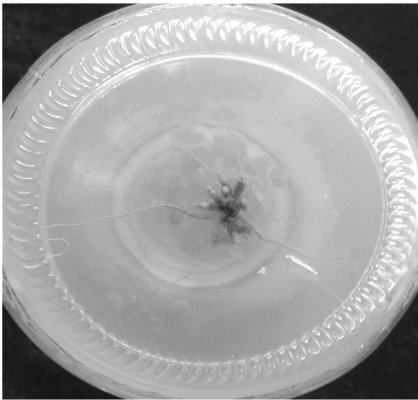


图7 最佳生根培养基1/2MS+0.3 mg/L NAA 生根情况



图8 移栽成活后的抗盐玫瑰

3 结论与讨论

在抗盐玫瑰的腋芽诱导时期,以 MS+0.5 mg/L 6-BA 和 MS+1.5 mg/L 6-BA 这 2 种培养基配方的效果最佳;在继代与增殖时期,以 MS+1.5 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IBA 和 3/4MS+0.3 mg/L IBA 这 2 种培养基的效果最佳;在组培苗的诱导生根时期,以 1/2MS+0.3 mg/L NAA 培养基的效果最佳。

在玫瑰的继代增殖培养阶段发现,不同生长调节剂的配比是影响丛生芽继代增殖的关键。生长素 IBA 与 6-BA 结合比 NAA 与 6-BA 结合更加适合这种玫瑰的继代增殖培养。然而在玫瑰的生根培养中,生长素 NAA 却比 IBA 更利于促进玫瑰的生根,应用生长素 IBA 诱导的根普遍细弱。因此不同的生长阶段对生长调节剂的需求不同。

采用组织培养的方法繁殖玫瑰,生产周期短,整个周期仅 4 个月,且繁殖系数高,成本低,应有很高的经济效益和社会效益。另外,组培快繁技术可以保证种苗生长一致,并且能够克服种子繁殖苗木所带来的观赏性状不一致的缺点,提高苗木的商品规格,有利于进行玫瑰的工厂化生产,为良种快繁以及产业化发展奠定基础。本试验建立了抗盐玫瑰从初代、继代到生根离体快繁的完整体系,将为工厂化生产提供依据,且该试验大量扩繁选育的抗盐玫瑰单株,也将于江苏省东部沿海进行区域试验。

参考文献:

[1] 俞德浚,陆玲娣,谷粹芝. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1985:467-468.

[2] 刘志诚,于守洋. 营养与食品卫生学[M]. 北京:人民卫生出版社,1987:27-32.

[3] 陈建军,王景辉,李亚东,等. 野生玫瑰果实的营养成分分析[J]. 营养学报,1992,14(4):419-421.

[4] 于孟杰,王惠,周永学. 玫瑰果实成分分析[J]. 陕西林业科技,1988(3):7-8.

[5] 杨志莹,赵兰勇,徐宗大. 盐胁迫对玫瑰生长和生理特性的影响[J]. 应用生态学报,2011,22(8):1993-1998.

[6] 王蒂,陈劲枫,朱延明,等. 植物组织培养[M]. 北京:中国农业出版社,2004:27-30.

[7] 杨博,韩振海,张永,等. 不同光照强度对玫瑰组织培养中初代培养物褐化的影响[J]. 中国农学通报,2003,19(6):194-196.

[8] Bonga J M, Durzan D J. 树木组织培养[M]. 阙国宁,郭达初,李金田,译. 北京:中国林业出版社,1988:25-26,141-143,175.

[9] Das S, Jha T B, Jha S. *In vitro* propagation of cashewnut[J]. Plant Cell Reports,1996,15(8):615-619.

[10] 殷建宝,郑艾琴. 玫瑰组培快繁试验研究[J]. 现代园艺,2011(17):5-7.

[11] 王冬梅,黄学林,黄上志. 细胞分裂素类物质在植物组织培养中的作用机制[J]. 植物生理学通讯,1996,32(5):373-377.

[12] 刘小梅,陈锡沐,陈炳铨. 沙漠玫瑰试管苗生根研究[J]. 湖北农学院学报,2003,23(2):91-94.

[13] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. Physiol Plant,1948,15:478-497.

序驯化移栽组培苗,苗木移栽成活率可达 87% 以上。