

芳纯月季组培快繁技术研究^①

刘亚娟¹, 杨小艳², 谢树章², 吴红², 高立均²

1. 重庆能源职业学院, 重庆 402260; 2. 重庆市农业科学院, 重庆 401329

摘要:以芳纯月季为材料进行组培快繁技术的研究, 结果表明, 芳纯月季茎段最佳消毒处理方法为先用 70% 的乙醇溶液处理 30 s 后, 再用 0.1% HgCl_2 溶液 + Tween-20 浸泡处理 15 min. 丛生芽最佳继代增殖培养基是 $\text{MS} + 3 \text{ mg/L } 6\text{-BA} + 0.1 \text{ mg/L TDZ} + 0.1 \text{ mg/L IBA}$, 增殖系数达 6.52. 最佳生根培养基是 $1/2 \text{ MS} + 0.1 \text{ mg/L IBA}$. 炼苗后幼苗移栽到泥炭和珍珠岩(4:1)中, 移栽驯化成活率能达到 96%.

关键词: 月季; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号: S685.12

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2018)08-0052-05

月季品种“芳纯”(Hojun)源于日本品种, 花型较大, 花色娇嫩, 花形优美, 勤花多花, 有浓玫瑰香味; 株势中型, 分枝多, 抗病能力强^[1]. 2013 年, 重庆雅香美源公司将其引种至重庆潼南崇龛镇试验栽培, 田间表现很好, 不仅适合作为观赏花卉, 同时花朵也可作为天然香料, 提取精油和纯露, 应用面广. 月季商品化生产主要采用扦插繁殖, 但存在插穗少, 速度慢, 品种退化等问题, 同时扦插繁殖种苗容易因病毒的积累造成质量降低. 而组织培养克服了常规繁殖方法繁殖系数低的缺点, 保持了品种的优良性状, 在短期内获得大量生长发育一致的苗木, 具有生产周期短、不受季节限制、经济效益显著等优势. 为此, 应用组织培养技术快速繁殖优质种苗是一种行之有效的措施. 近年来, 关于月季组培快繁的研究报道有所增多^[2-7], 积累了很多宝贵的经验可供借鉴. 本试验以芳纯月季茎段为材料, 研究了灭菌方式、不同植物生长调节剂和浓度对继代增殖、生根培养的影响, 以期建立该品种组培快繁技术体系, 为促进用于提取精油和纯露的香料月季优良品种种苗繁育技术以及规模化生产提供依据.

1 材料与方法

1.1 材料

芳纯月季茎段由重庆雅香美源公司提供. 植物生长调节剂及其他普通化学试剂均购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司.

1.2 外植体的消毒处理与诱导培养

选取生长旺盛、无病虫害、腋芽饱满的枝条, 剪去叶子和皮刺, 剪成小段, 先用洗衣粉泡洗, 在流水下冲洗 1~2 h. 然后置于 70% 乙醇溶液中浸泡处理 30 s, 倒掉 70% 乙醇溶液后, 用灭菌水冲洗 1 次. 再用

① 收稿日期: 2018-03-27

基金项目: 重庆市农业科学院良种创新暨一般科技推广项目(NKY-2017AB004); 重庆市科委科研院所绩效激励引导专项(cstc2017jxjl80001).

作者简介: 刘亚娟(1984-), 女, 硕士, 讲师, 主要从事园林植物与生物技术的研究.

通信作者: 高立均, 助理研究员.

0.1% HgCl₂ 溶液加 2 滴 Tween-20 分别消毒(5,10,15,20) min, 并不断摇动. 将 HgCl₂ 溶液倒出, 用灭菌水冲洗 5~6 次, 用无菌滤纸吸干水分, 每隔 1~2 腋芽切成一茎段, 接种于芽诱导培养基(MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.05 mg/L+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂)中, 温度 25 ℃, 光照强度 2 000~3 000 lx, 光暗交替 12 h, 15 d 后统计出芽情况. 每个处理设置 3 次重复. 计算公式如下:

污染率=污染数/接种数×100%

萌芽率=腋芽萌发的茎段数/接种数×100%

1.3 继代增殖培养

设置不同浓度 6-BA 和 TDZ 以筛选出最佳继代增殖培养基, 切下已经萌发的腋芽, 接种到以下培养基 MS+(1,2,3)mg/L 6-BA+(0.05,0.1,0.2,0.3)mg/L TDZ+0.1 mg/L IBA +30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂中. 每一个处理设 8 瓶, 每一瓶接种 5 个单芽, 光照强度为 2 500~3 000 lx, 光暗交替 12 h, 温度 25 ℃. 30 d 后统计增殖情况, 设置 3 次重复. 计算公式如下:

增殖系数=新芽数/接种数

1.4 生根培养

挑取健壮继代苗接至生根培养基 1/2MS+(0,0.05,0.1,0.2,0.5)mg/L IBA+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂中壮苗生根, 光照强度为 2 500~3 000 lx, 光暗交替 12 h, 温度 25 ℃. 20 d 后统计生根情况, 确定最佳生根培养基计算公式如下:

生根率=生根数/接种数×100%

1.5 炼苗移栽育苗

将生根后的瓶苗松盖炼苗 2 d, 然后取出洗净其根部培养基, 再用 0.2% 的多菌灵+0.1% 生根粉浸泡 10 min 处理后扦插至装有草炭:珍珠岩(4:1)的营养钵中, 盖膜保湿, 10 d 缓苗成功后可撤掉薄膜, 驯化温度控制在 25 ℃, 土壤保持湿润.

2 结果与分析

2.1 外植体的消毒处理与诱导培养

由表 1 可知, 0.1% HgCl₂ 溶液不同的处理时间对芳纯月季茎段的消毒效果不同. 处理 5 min 的消毒效果最差, 污染率达到 85%. 随着处理时间的加长, 污染率逐步下降, 且在 15 min 时腋芽生长情况最好, 萌芽率达到 75%. 因此, 确定芳纯茎段先用 70% 的酒精处理 30 s 后, 再用 0.1% HgCl₂ 溶液+Tween-20 浸泡处理 15 min 为最佳的消毒处理方法.

表 1 不同消毒处理情况统计

0.1% HgCl ₂ 溶液处理时间/min	接种数 /节段	污染率 /%	萌芽率 /%	腋芽生 长情况
5	100	85	8	正常
10	100	54	26	正常
15	100	11	75	正常
20	100	9	46	弱, 长势差

2.2 继代增殖培养

生长调节剂 6-BA 和 TDZ 的不同浓度组合对芳纯月季的增殖影响很大. 由表 2 可知, 随着 6-BA 浓度的增加, 丛生芽增多, 增殖系数得到提高. 而 TDZ 浓度在 0.1 mg/L 时, 芽苗比较健壮, 叶片正常, 随着 TDZ 浓度的继续增加, 芽变弱, 矮化, 基部出现愈伤, 甚至玻璃化, 叶片黄化. 因此, 培养基 MS+3 mg/L 6-BA+0.1 mg/L TDZ+0.1 mg/L IBA 上的芽苗健壮, 丛生芽增殖数较多, 增殖系数达到 6.52, 为继代增殖培养基(图 1).

表 2 不同培养基对丛生芽增殖的影响

培养基		接种数/个	增殖系数	备 注
6-BA/(mg·L ⁻¹)	TDZ/(mg·L ⁻¹)			
1	0.05	30	3.00	丛芽少, 正常
1	0.1	30	4.16	丛芽略少, 略带根
1	0.2	30	4.40	丛芽多, 基部膨大
1	0.3	30	3.86	芽多, 芽弱, 略微玻璃化
2	0.05	30	4.66	丛芽略少, 叶片正常
2	0.1	30	5.66	芽多, 正常, 叶片偏黄
2	0.2	30	4.86	芽弱, 底部愈伤, 叶片黄
2	0.3	30	4.66	矮化, 略微玻璃化
3	0.05	30	4.00	芽少, 正常
3	0.1	30	6.52	丛芽多, 健壮, 叶片正常
3	0.2	30	6.20	芽弱, 基部愈伤, 叶偏黄
3	0.3	30	4.66	矮化, 基部愈伤玻璃化

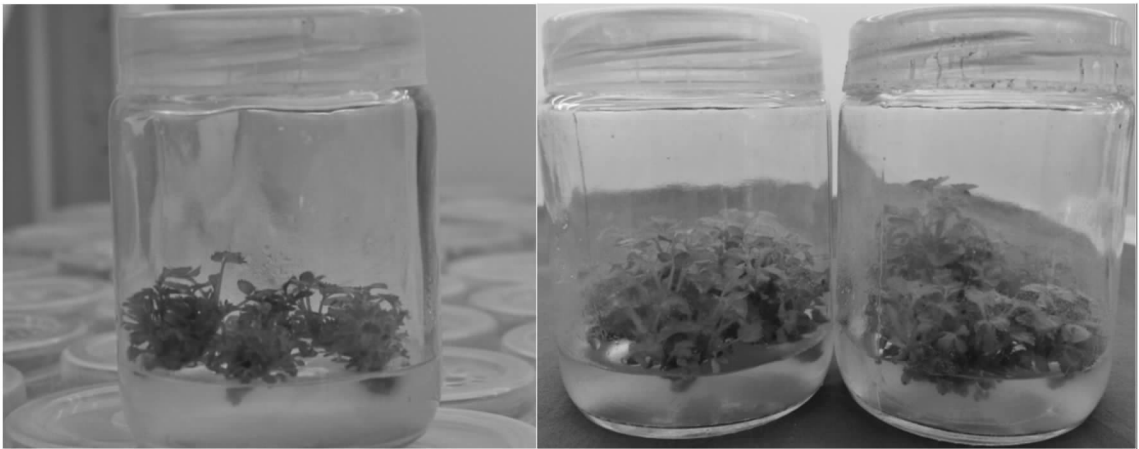


图 1 芳纯月季的增殖快繁(培养基 MS+3 mg/L 6-BA+0.1 mg/L TDZ+0.1 mg/L IBA)

2.3 生根培养

由表 3 可知, 随着 IBA 质量浓度的升高, 生根率逐步升高, 当 IBA 质量浓度在 0.1 mg/L 时, 生根率达到 96%, 差异有统计学意义. 当 IBA 质量浓度继续升高时, 生根率不再增长, 反而略有下降. 由此可见, 1/2 MS+0.1 mg/L IBA 培养基上植株新根多且健壮, 可作为芳纯月季生根壮苗培养基使用.

表 3 IBA 质量浓度对芳纯月季组培苗生根的影响

IBA/(mg·L ⁻¹)	生根率/%	平均根数/条	生长情况
0	37.5	1.3	根少, 根弱, 根基部愈伤
0.05	51.0	2.2	根少, 根短弱, 叶片微卷
0.1	96.0	9.0	根量多, 健壮
0.2	89.0	8.2	根量较多, 健壮
0.5	85.0	7.9	根量较多, 根细长微黑

2.4 炼苗移栽育苗

按照上述月季组培苗移栽驯化的方法, 移栽成活率能达到 96%. 组培苗移栽驯化成活后, 生长状态很好, 30 d 左右就能结出花苞, 开出鲜艳的花朵(图 2).



图 2 芳纯月季移栽驯化情况

3 讨论与结论

月季的组织培养主要可采用丛生芽诱导增殖^[8-10]和愈伤组织再分化^[11-13]2 种方式, 也有如 Bao 等^[14]一样采用月季体细胞胚胎发生途径的方法. 不同植物种类组织快繁对植物生长调节物质的种类、质量浓度及其比例要求不同^[15]. 在本研究中, 通过试验芳纯月季在不同质量浓度的 TDZ 和 6-BA 组合培养基中丛生芽增殖的效果, 确定了当 TDZ 为 0.1 mg/L, 6-BA 为 3 mg/L 时, 能达到较好的丛生芽增殖效果. 其中, TDZ 作为一种高效植物生长调节剂^[16], 细胞分裂素活性很强. 本研究显示较低质量浓度的 TDZ 可诱导月季不定芽快速增殖, 但 TDZ 质量浓度过高会引起新芽节间缩短、矮化, 部分出现玻璃化现象, 这与武慧等^[17]的研究结果相一致. 芳纯月季诱导生根 20 d 便可炼苗移栽, 而根长也无须过长, 0.5 cm 左右即可, 移栽成活率能达到 96%, 这与李坤峰等^[18]的研究结果相一致. 芳纯月季在移栽成活后能够在苗期短时间内结出花苞, 开出花朵, 这一现象目前相关报道较少, 相关原因机理还需进一步研究.

综上所述, 芳纯月季茎段的最佳消毒处理方式用 70% 的乙醇溶液处理 30 s 后, 再用 0.1% HgCl_2 溶液 + Tween-20 浸泡处理 15 min. 丛生芽最佳继代增殖培养基是 MS + 3 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L TDZ + 0.1 mg/L IBA, 最佳生根培养基是 1/2 MS + 0.1 mg/L IBA. 炼苗后幼苗移栽到泥炭和珍珠岩 (4 : 1) 中, 保温保湿缓苗, 移栽驯化成活率能达到 96%, 满足规模化生产的要求, 本文研究结果可为用于提取精油和纯露的香料月季进行组培繁殖和种苗生产提供数据参考.

参考文献:

- [1] 李文鲜. 月季 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2004.
- [2] 闫海霞, 蒋月喜, 黄昌艳, 等. 月季‘卡罗拉’的组培快繁技术 [J]. 热带作物学报, 2016, 37(9): 1741—1746.
- [3] 龚维红, 尤伟忠, 丁小晏. 3 个不同月季品种的组培技术研究 [J]. 现代农业科技, 2014(12): 170, 174.
- [4] 闫春霞. 藤本月季多特蒙特组培快繁技术 [J]. 湖北农业科学, 2017, 56(10): 1960—1962.
- [5] NOODEZH H M, MOIENI A, BAGHIZADEH A. In Vitro Propagation of the Damask Rose (*Rosa damascena* Mill.) [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2012, 48(5): 530—538.
- [6] ASADI A A, VEDADI C, RAHIMI M, et al. Effect of Plant Growth Hormones on Root and Shoot Regeneration in Rose (Morrasia) under in-Vitro Conditions [J]. Bioscience Research, 2009, 6(1): 40—45.
- [7] 周晓馥, 杨伟新, 丁雪, 等. 月季茎段快繁体系的优化 [J]. 北方园艺, 2014(22): 98—102.
- [8] 刘小夫, 李彩华, 张金柱, 等. 丰花月季 YJ‘2004—2’组培快繁技术研究 [J]. 作物杂志, 2012(6): 74—76.
- [9] 张艳秋, 屈连伟, 李生龙, 等. 月季‘红色恋曲’组培快繁研究 [J]. 辽宁农业科学, 2014(5): 27—29.
- [10] 刘慧. 微型月季茎段组培快繁技术研究 [J]. 北方园艺, 2011(14): 114—116.

[11] 王丰华, 管远清, 徐榕雪, 等. 6-BA 浓度对红色大花月季愈伤组织诱导的影响 [J]. 山东农业科学, 2014, 46(12): 54—56.

[12] 冯 欢, 易姝利, 谢佳恒, 等. 微型月季愈伤组织诱导及植株再生 [J]. 植物学报, 2014, 49(5): 595—602.

[13] 陈 雪, 张金柱, 潘兵兵, 等. 月季愈伤组织的诱导及植株再生 [J]. 植物学报, 2011, 46(5): 569—574.

[14] BAO Y, LIU G F, SHI X P, et al. Primary and Repetitive Secondary Somatic Embryogenesis in Rosa Hybrida ‘Samantha’ [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2012, 109(3): 411—418.

[15] 丰 锋, 徐玉梅, 李林锋. 鸦胆子的组织培养与快速繁殖 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2016, 41(7): 86—90.

[16] 徐晓峰, 黄学林. TDZ: 一种有效的植物生长调节剂 [J]. 植物学通报, 2003, 20(2): 227—237.

[17] 武 慧, 吕 杰, 付智坤, 等. TDZ 对微型月季不定芽生长的影响 [J]. 湖北农业科学, 2013, 52(13): 3178—3179, 3202.

[18] 李坤峰, 陈 志, 陈剑平, 等. Vendela 月季产业化快繁体系研究 [J]. 核农学报, 2014, 28(10): 1790—1797.

On Tissue Culture and Rapid Regeneration
of *Rosa Hybrida* ‘Hojun’

LIU Ya-juan¹, YANG Xiao-yan²,
XIE Shu-zhang², WU Hong², GAO Li-jun²

1. Chongqing Energy College, Chongqing 402260, China;
2. Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 401329, China

Abstract: The tissue culture and rapid regeneration of Rosa ‘Hojun’ have been studied in this paper. The results show that the optimal sterilization method was treating 75% alcohol with 30 second and 0.1% HgCl₂ plus Tween-20 with 15 minutes. The most suitable culture medium for multiplication was MS+3 mg/L 6-BA+0.1 mg/L TDZ+0.1mg/L IBA, the multiplication coefficient was 6.52; The optimum culture medium for rooting culture was 1/2 MS+0.1 mg/L IBA. 96% of survival rate could be obtained when plantlets are transplanted to the matrix consisting of peat and perlite as the rate of 4 : 1.

Key words: rosa hybrida; tissue culture; rapid regeneration

责任编辑 周仁惠