

月季 ‘萨蔓莎’ 愈伤组织的诱导及植株再生

高莉萍 包满珠*

(园艺植物生物学教育部重点实验室, 华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070)

摘要: 以试管苗的小叶为外植体, 探讨了月季品种 ‘萨蔓莎’ 愈伤组织诱导及植株再生的方法。结果表明: 高浓度的生长素能诱导小叶产生愈伤组织, 经 2,4-D 7.0 ~ 10.0 mg/L 光下诱导愈伤 15 d 的小叶外植体, 在含 TDZ 1.5 mg/L 的 MS 培养基上光下培养约 20 d 后有白色假珠芽形成, 此芽暗培养在含 NAA、ZT 和 GA₃ 的培养基上产生新的假珠芽和新的愈伤组织, 通过持续选择继代生活力高的组织, 约 1 年后获得可长期继代的愈伤组织, 到目前为止已保存了 16 个月。此愈伤组织在 TDZ 1.0 mg/L、NAA 0.01 mg/L 和 GA₃ 0.1 mg/L 的诱导下 30 d 内分化出不定芽, 在含 BA 2.0 mg/L 和 NAA 0.01 mg/L 的培养基上不定芽伸长形成正常植株。

关键词: 月季; 愈伤组织; 植株再生; 组织培养

中图分类号: S 685.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 03-0534-03

Callus Induction and Plant Regeneration of *Rosa hybrida* ‘Samantha’

Gao Liping and Bao Manzhu

(Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: White pseudobulbils were initiated from in vitro grown leaf explants of *Rosa hybrida* ‘Samantha’ following an induction period of 15 d on MS basal medium supplemented with 2,4-D 7.0 - 10.0 mg/L and a subculture of 20 d on MS medium with TDZ 1.5 mg/L under light. The pseudobulbils were subcultured on medium with NAA, ZT and GA₃, and during the process, new pseudobulbils and new callus were formed. After a year of continuous selection for fresh and nodular callus, callus that could be continuously subcultured was obtained, and has been maintained for 16 months till now. Adventitious buds could be induced from the callus on MS medium with TDZ 1.0 mg/L, NAA 0.01 mg/L and GA₃ 0.1 mg/L and elongated into shoots on MS medium with BA 2.0 mg/L and NAA 0.01 mg/L.

Key words: Rose; Callus induction; Plant regeneration; Tissue culture

1 目的、材料与方法

月季 (*Rosa hybrida*) 是最具经济价值的观赏植物之一, 建立高效的植株再生体系是利用月季基因工程技术对其进行遗传改良的基础。目前, 国外研究者们通过直接或间接的器官发生途径和体细胞胚发生途径, 以叶片、茎段、花瓣和花丝等为外植体在许多月季品种的植株再生上都获得了成功^[1~4]。本研究选择月季品种 ‘萨蔓莎’ 为材料, 试图通过诱导愈伤组织和不定芽, 建立理想、高效的月季再生体系, 为月季的遗传转化及培育新品种打下基础。

2001 年 4~5 月从露地栽培的 ‘萨蔓莎’ 植株上采下当年生枝条, 除去叶片后剪成 3~4 cm 的带芽茎段, 自来水冲洗干净后先用 70% 酒精消毒 30 s, 再用 0.1% 升汞消毒 10 min, 无菌水冲洗 3 次, 然后将茎段切至 2~3 cm 长, 接种到扩繁培养基 (BA MS + 0.5 mg/L + NAA 0.004 mg/L + 0.7% 琼脂 + 3% 蔗糖) 上, 约两周后将萌发的侧芽切下转入新的扩繁培养基, 每 4 周继代 1 次, 取无菌苗的叶

收稿日期: 2004 - 08 - 11; 修回日期: 2004 - 12 - 10

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: mzbao@mail.hzau.edu.cn)

片进行愈伤组织诱导和植株再生试验。

试验若未特别指出均采用 MS 基本培养基，添加不同生长调节剂，pH 5.8，并用 2.4 g/L Gelrite 使其凝固。光照培养 14 h/d，光强 2000 lx，培养温度 (25 ±1)，黑暗培养时温度 (23 ±1)。每次试验采用 20~40 个外植体。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

本研究首先将成熟小叶外植体叶背朝下接种到添加不同种类和浓度生长素的培养基（表 1）上诱导愈伤组织，20 d 后统计小叶叶柄处产生 2 mm 以上大小愈伤组织的百分率。由表 1 可知，高浓度生长素 [2,4-D 5.0 mg/L, NAA 4.0 mg/L 和 pCPA (对氯苯氧乙酸) 3.0 mg/L 以上] 能诱导产生愈伤组织，愈伤组织形成于小叶柄及叶脉处（图版，a）。黑暗条件下愈伤组织生长快，但表面湿，与光培养相比易发生水渍化现象，生活力差，很快褐化死亡。因此，高浓度生长素光下培养 20 d 的愈伤组织状态更好。

2.2 假珠芽的发生

将来自黑暗或光下经生长素诱导的小叶外植体愈伤组织转入含不同种类和浓度的细胞分裂素，如 ZT（玉米素，0.2~0.6 mg/L）、TDZ（噻二唑苯基脲，0.5~2.0 mg/L）及 BA（0.1~2.0 mg/L）的培养基上光下培养，以诱导分化不定芽。结果愈伤组织逐渐褐化，几乎没有新的愈伤组织产生。20~30 d 后仅光下经 2,4-D 和 pCPA 诱导 15 d 后的愈伤组织在含 TDZ 1.5 mg/L 的培养基上有白色假珠芽发生于小叶褐化的愈伤组织上（见表 2，图版，b）。

2.3 可增殖愈伤组织的获得

将假珠芽从褐化的愈伤组织上分离下来，继代培养在保持培养基（改良 MS + KM-8P + ZT 1.5 mg/L + NAA 0.25 mg/L + GA₃ 1.0 mg/L + 3% 蔗糖 + 0.25% Gelrite）上，有新的愈伤组织和新的多叶状的假珠芽产生（图版，c），经过长期选择继代生活力高的愈伤组织，在 11 个月后获得了数团结构疏松、脆性、繁殖快速的愈伤组织。将这几团愈伤组织继续继代培养在保持培养基上，扩增出大量颗粒细小，状态均一，生活力强，可增殖的愈伤组织，至今已保持了 16 个月（图版，d），这种愈伤组织可为农杆菌介导的遗传转化提供大量的侵染材料。

表 1 不同种类及浓度的生长素对月季‘萨蔓莎’叶片愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of auxin on callus induction from leaflets of *Rosa hybrida* ‘Samantha’

生长素 Auxin	浓度 Concentration (mg/L)	愈伤组织分化率 Frequency of callus induction (%)	
		光下 Under light	黑暗 In the dark
2,4-D	0.5	0	0
	1.0	0	0
	3.0	0	0
	5.0	0	1
	6.0	100	100
	8.0	97.3	100
	10.0	100	100
	10.0	100	100
NAA	0.5	0	0
	2.0	0	0
	4.0	100	100
	6.0	100	100
	8.0	100	100
	10.0	100	100
	10.0	100	100
	10.0	100	100
pCPA	3.0	45	100
	5.0	100	100
	8.0	100	100
	10.0	100	100

表 2 光下经生长素诱导 15 d 后的愈伤组织在培养基上假珠芽的发生

Table 2 Initiation of pseudobulbils on medium following 15 d's culture under light on callus induction medium with auxin

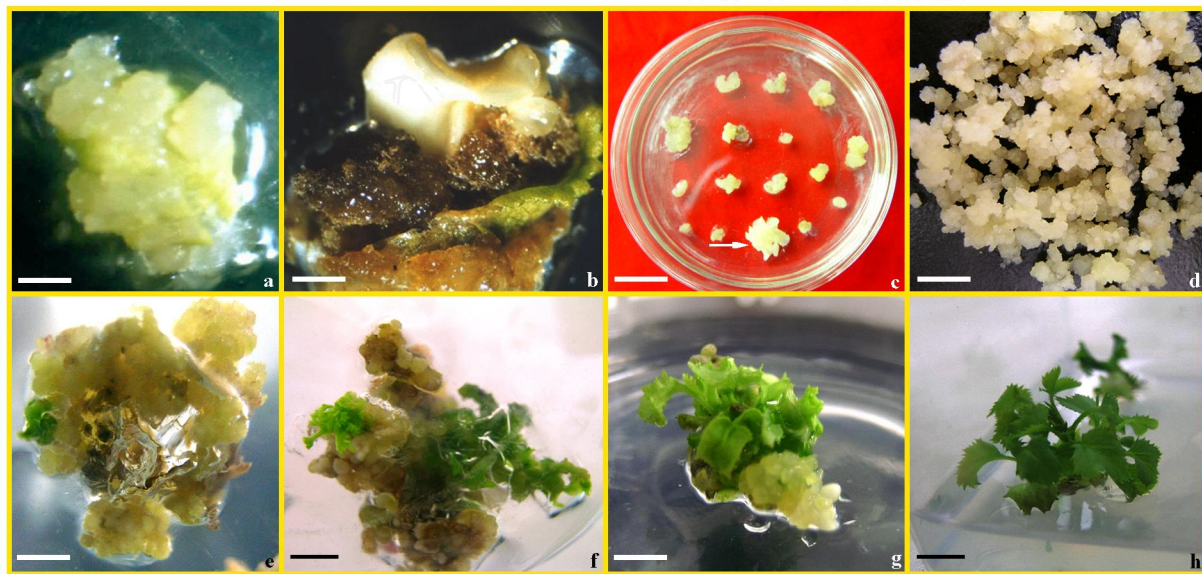
生长素 Auxin (mg/L)	TDZ (mg/L)		外植体数 No. of explants	假珠芽数 No. of pseudobulbils	假珠芽分化率 Frequency of pseudobulbil induction (%)
2,4-D	6.0	1.5	26	0	0
	7.0	1.5	26	1	3.8
	8.0	1.5	20	1	5.0
	9.0	1.5	28	1	3.6
	10.0	1.5	30	1	3.3
NAA	4.0	1.5	30	0	0
	6.0	1.5	28	0	0
	8.0	1.5	30	0	0
	10.0	1.5	28	0	0
pCPA	3.0	1.5	30	2	6.6
	5.0	1.5	40	0	0
	8.0	1.5	24	0	0

2.4 植株再生

选用继代培养 20~30 d 的愈伤组织, 以生长素 (BA 0.01~0.05 mg/L 或 NAA 0.01~0.1 mg/L) 与细胞分裂素 (BA 0.1~5.0 mg/L 或 / 和 KT 0.1~5.0 mg/L 或 / 和 TDZ 0.5~2.0 mg/L) 组合配以 GA_3 (0.1~0.5 mg/L) 在光下进行分化试验。约 3.3% 的愈伤组织在 TDZ 1.0 mg/L、NAA 0.01 mg/L 和 GA_3 0.1 mg/L 的诱导下, 20 d 后贴近培养基处的愈伤组织分化出绿色正常的芽 (图版, e, f), 而其它处理无不定芽的发生。30 d 后将带不定芽的愈伤组织转入含 BA 2.0 mg/L 和 NAA 0.01 mg/L 的培养基上培养, 不定芽迅速伸长长大, 形成丛芽 (图版, g), 伸长的不定芽可在无菌苗扩繁培养基上培养增殖 (图版, h)。

参考文献:

- 1 Rout G R, Samantaray S, Mottley J, Das P. Biotechnology of the rose: a review of recent progress. *Scientia Horticulturae*, 1999, 81: 201~228
- 2 Dohm A, Ludwig C, Nehring K, Debener T. Somatic embryogenesis in roses. *Acta Horticulturae*, 2001a, 547: 341~348
- 3 Li X Q, Krasnyanski S F, Korban S S. Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in *Rosa*. *Journal of Plant Physiology*, 2002, 159: 313~319
- 4 Kim C K, Chung J D, Jee S O, Oh J Y. Somatic embryogenesis from in vitro grown leaf explants of *Rosa hybrida* L. *Journal of Plant Biotechnology*, 2003, 5: 169~172



图版说明: a 小叶外植体愈伤组织的诱导; b 假珠芽发生于褐化的愈伤组织; c 假珠芽的继代培养 (箭头指向多叶状假珠芽); d 可增殖的愈伤组织; e, f 从可增殖愈伤组织诱导不定芽; g 不定芽的伸长; h 再生植株的增殖。

Explanation of plates: a Callus induction from in vitro leaf explant (bar=2 mm); b A pseudobulbil initiated on the brown callus (bar=2 mm); c Subculture of the pseudobulbs (the arrow points out the pseudobulbil with several leaf structures, bar=15 mm); d Proliferated callus (bar=10 mm); e, f Adventitious buds induced from the proliferated callus (bar=5 mm); g Elongated adventitious buds (bar=6 mm); h Regenerated plants (bar=6 mm).