

月季组织培养研究进展

刘会超¹, 郭丽娟^{1,2}, 贾文庆¹

(1. 河南科技学院 园林学院, 河南 新乡 453003; 2. 河南师范大学, 河南 新乡 453007)

摘要:从月季腋芽萌发、器官发生、体细胞胚胎发生三个方面综述了品种、外植体、基本培养基成分、激素浓度及配比、培养条件及不同的外植体处理方法等影响因素对月季组培体系的影响,并对今后的研究提出了展望。

关键词:月季;腋芽萌发;器官发生;体细胞胚发生

中图分类号: S681.9

文献标识码: A

文章编号: 1673-6060(2007)03-0045-03

Advance in Research of Rose Tissue Culture

LIU Hui - chao¹, et al

(1. College of Landscape Architecture, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract: The influence of the varieties, explants, medium compositions, hormone concentration, cultivating conditions and different treating with explants on germination, organogenesis and somatic embryogenesis of rose tissue culture are reviewed, and the trend of the research was also put forward in this paper.

Key words: rose; germination; organogenesis; somatic embryogenesis

月季是我国十大名花之一,被誉为“花中皇后”,具有极高的观赏价值和商业价值^[1]。目前世界各地栽培的月季,大多以中国月季为亲本,经长期不断的选育和反复杂交而成,部分杂交后代存在观赏价值高,但种子萌发率低的现象,利用组织培养技术,将使所有月季优良品种的快速繁殖成为可能,同时月季组织培养技术的研究也为月季的遗传转化研究打下基础。本文通过查阅20世纪60年代以来的研究文献,对月季组培体系主要技术环节进行综述,旨在为月季组织培养商业化生产和遗传转化研究提供参考。

1 通过腋芽萌发途径建立月季组培体系

1.1 腋芽的诱导萌发及增殖

1.1.1 外植体取材部位 月季的腋芽萌发受多种因子的影响,主要与供试材料的基因型有关,同时还与外植体的取材部位有关。李海燕等将切花月季的枝条均匀的分成七段(含腋芽)进行培养,结果发现顶部和基部的芽萌发生长较慢,需11~13 d,而中部的芽萌发较快,仅需5 d^[2];Douglas等以丰花月季

品种‘Queen Elizabeth’的侧芽,微型月季品种‘Sunburst Red’、‘Toy Clown’和地被月季品种‘Fiona’的顶芽为外植体,接种于MS + 6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ + GA₃ 0.1 mg · L⁻¹的培养基上,则每个培养周期其平均芽的增殖数分别为5.1, 3.1, 1.3, 2.5^[3]。

1.1.2 培养基 研究发现,适宜的激素种类和浓度配比是月季腋芽萌发和丛生芽增殖的关键。Kapchina - Toteva等认为细胞分裂素CPPU有助于提高月季品种‘Madelon’和‘Motrea’的芽增殖系数,且能够克服IBA对芽生长的阻碍作用^[4];Bredmose等发现细胞分裂素可有效诱导芽的萌发生长,且其与一定浓度的生长素适当配比,可有效提高芽的增殖倍数^[4-5];加入低浓度的GA₃能进一步改善芽的增殖,95%的外植体能产生7个以上的小芽^[6]。蔗糖、FeEDDHA对某些月季腋芽的萌发和丛生芽的增殖也起着非常重要的影响。月季培养基中添加蔗糖有增加芽数量的作用^[7];FeEDDHA代替FeEDTA能提高月季‘Moneyway’丛生芽叶绿素的含量,减少萎黄病的发生,从而促进芽体的生长^[8]。

收稿日期:2007-04-21

基金项目:河南省创新人才工程和河南科技学院博士基金资助项目

作者简介:刘会超(1964-),男,河南南阳人,博士,副教授,硕士生导师,主要研究方向为观赏植物生物技术。

1.1.3 外植体处理 Halmagyi 等对诱导 24h 后的离体芽尖实行冷藏处理,发现其能够有效提高芽的再生率,三个月季品种‘Kardinal’、‘Fairy’、‘Maidy’的再生率分别可达 64.44%、67.73% 和 57.57%^[9]。

1.2 幼苗生根

1.2.1 培养基 月季嫩芽长到一定程度时,将其接种到生根培养基上,约经 20 d 后在 1/2MS + NAA 0.5 mg · L⁻¹ 的诱导培养基上长出不定根,其生根率达 96.70%^[2];何松林等在切花月季萨蔓莎的生根培养基中添加 IAA, IBA 和 NAA 均可有效诱导根的形成,其中以 1/2MS + IAA 1.0 mg · L⁻¹, 1/2MS + IBA 0.5 mg · L⁻¹, 1/2MS + NAA 0.5 mg · L⁻¹ 的诱导效果较好^[10]。说明低盐分的培养基和低浓度的生长素有利于诱导根的形成。

1.2.2 培养条件 Genoud 等发现一定强度的光照(光强为 100 μmol m⁻² s⁻¹)能够增强生根阶段月季小植株的光合作用,对光化学过程也没有影响,但当光强达到 300 μmol m⁻² s⁻¹ 时,则会造成光抑制,影响植物的生长^[11];Pati 等研究发现液体培养能有效提高香水月季品种‘R. damascene’和‘R. bourboniana’的生长和发育,特别是对其生根率有显著效果(‘R. damascene’的生根率达 96.7%,而‘R. bourboniana’则达 100%)^[12]。

2 通过器官发生途径建立月季组培体系

2.1 培养基

适宜的激素种类和浓度配比是诱导月季不定芽再生的关键。任桂芳等以月季的叶片为外植体,通过直接器官发生途径建立了月季植株再生体系^[13];高莉萍等以试管苗的小叶为外植体探讨了月季品种‘萨蔓莎’愈伤组织的诱导及植株再生的方法^[14]。

2.2 基因型、外植体及继代次数

Lloyd 等以月季品种‘R. persica x xanthina’的离体叶、根和愈伤以及‘R. Laevigata’和‘R. wichuraiana’的离体叶为外植体诱导不定芽,结果发现添加适当浓度的 BAP 和 NAA 的培养基均能诱导不定芽发生,但随着继代次数的增加,不定芽发生能力降低,且继代 12 周后,终止产生不定芽^[15]。任桂芳等对‘冰山’、‘金秀娃’、‘火球’等 24 个现代杂交月季品种再生体系进行了研究,发现 24 个现代月季品种中 12 个品种再生出了不定芽,‘冰山’品种的再生频率最高,可达 46.5%,且其叶片的幼嫩程度不同,再生情况也不同^[13]。

2.3 培养条件

Ibrahim 等以杂交月季的离体叶为外植体,通过

间接器官发生途径诱导不定芽,结果发现在愈伤继代阶段给予培养物 25 Gy (1 Gy = 1 J/Kg) 的 X 射线照射,其不定芽发生率在 50% 以下,且随着 X 射线强度的增加,诱导率降低,在 5 Gy 强度时,品种‘Clone RUI 317’不定芽再生率达最高,为 83.6%,而对照则为 89%,说明 X 射线的照射对不定芽的发生有明显的抑制作用^[16];一定时间的暗培养对某些月季品种不定芽的发生有显著的促进作用,任桂芳等研究发现现代月季品种‘冰山’幼叶暗培养 30 d 后的再生率可从无暗培养的 15.6% 提高到 45.6%^[13]。

3 通过体细胞胚胎发生途径建立月季组培体系

Hill 于 1967 年首次报道由月季品种‘The Doctor’的愈伤组织诱导出体细胞胚状体结构^[17]。近 40 年来的研究表明,通过体细胞胚状体发生途径形成月季再生植株技术已经实现。

3.1 外植体类型

外植体类型可直接影响胚性愈伤的形成。De Wit 等以切花月季品种‘Domingo’和‘Vickey Brown’的叶片为外植体通过体细胞胚胎发生途径诱导其植株再生^[18];Rout 等以杂交月季的幼嫩叶片和茎段为外植体,在 1/2MS + 6-BA 0.5 mg · L⁻¹ + NAA 1 mg · L⁻¹ + 2,4-D 0.5-2.0 mg · L⁻¹ + 蔗糖 30 g · L⁻¹ 诱导培养基上诱导出愈伤组织,将生长良好的愈伤组织转至 1/2MS + 6-BA 0.5 g · L⁻¹ + NAA 0.01 mg · L⁻¹ + GA₃ 0.1 mg · L⁻¹ + 脯氨酸 200-800 mg · L⁻¹ 培养基上培养 8 周后形成胚性愈伤,将胚性愈伤在 1/2MS + 6-BA 0.5 mg · L⁻¹ + GA₃ 0.1 mg · L⁻¹ + adenine sulphate 10 mg · L⁻¹ 培养基上培养,结果约有 12% 的子叶期胚形成^[19];Kintzios 等以四个月季品种‘Baccara’、‘Mercedes’、‘Ronto’和‘Soraya’的老叶为外植体诱导体细胞胚,结果仅‘Soraya’的叶片成功诱导出体细胞胚,且继代于相同的培养基上体胚发育成球形胚、心形胚以及鱼雷形胚^[20]。

3.2 培养基

研究发现,适宜的激素种类和浓度配比是诱导月季愈伤组织的形成及体细胞胚胎发生的关键。诱导愈伤组织的激素有 6-BA, NAA, 2,4-D, ZT 等。愈伤组织诱导过程中,单独使用细胞分裂素,不易形成愈伤组织。加入 NAA 或 2,4-D, 易形成愈伤组织。单独使用 2,4-D 时,浓度太大,愈伤组织发生率下降。若在 2,4-D 中添加低浓度的 BA 有利于愈伤组织的诱导,但 BA 浓度过高,则抑制愈伤组织

的形成^[21]。细胞分裂素/生长素比值高,有利于愈伤组织分化体细胞胚,比值低有利于保持脆的体细胞基因型组织,但细胞分裂素用量太高,易引起愈伤组织的褐化^[21]。Sarasan 等研究发现甲基月桂酸酯和 6-BA 能够促进杂交月季品种‘Alistar Stella Gray’体细胞胚不定芽的发生^[22]。Korban 等比较了不同浓度的 TDZ(0-20 mg·L⁻¹)、6-BA(0~10 mg·L⁻¹)、GA₃(1.0 mg·L⁻¹)单独或混合对杂交月季品种‘Carefree Beauty’、‘Grand Gala’和‘R. chinensis minima cv. Red Sunblaze’叶片体细胞胚诱导的影响,结果发现,三种激素单独或混合作用,‘Carefree Beauty’的愈伤组织和体细胞胚发生率最高^[23]; Kim 等通过控制不同种类和浓度的外源植物生长调节剂诱导月季栽培种的体细胞胚胎发生,结果发现未成熟的合子胚在 1/2MS 基本培养基上添加任意浓度的 2,4-D 都未能成功诱导出胚性愈伤或体细胞胚,而在含有 1.0mg·L⁻¹ 6-BA 的培养基上通过直接体细胞胚发生途径体细胞胚的形成率为 27.3%,在含有 2,4-D 0.3 mg·L⁻¹和 6-BA 1.0mg·L⁻¹的诱导培养基上,未成熟胚胚性愈伤的形成率为 25%^[24]。

3.3 外植体处理

外植体的处理对植物体细胞胚胎的诱导也有不同的影响。Tomaszewski 等研究了 4℃低温冷藏对植物‘Dactylis glomerata L.’叶片胚性愈伤的形成及其乙烯散发的影响,结果发现,4℃冷藏的叶片更有利于体胚的形成,且减少了乙烯的散发。实验将叶片从 4℃低温转移至 21℃的培养条件下,30min 内即伴随有乙烯散发的增多,但 20M 或 40M 的乙烯生物合成抑制剂 AOA (aminooxyacetic acid)虽减少了乙烯的散发,但并不刺激体胚的生成,表明低温对体胚生物合成的刺激很可能通过影响其它影响因子而非乙烯生物合成最终导致体细胞胚的生成^[25]。

4 展望

尽管国内外在月季组培方面取得了一定进展,但月季的再生受基因型的影响很大,不同的品种在愈伤诱导、胚状体及芽器官等的发生方面差异很大,且只有少数的品种能获得相对高频率的再生植株。因此,仍需加强月季植株再生研究,探索通过组织培养途径加快育种步伐和提高种苗的繁殖速度,早日实现月季种苗工厂化生产以满足市场的需求。

参考文献:

- [1] 陈琰芳.月季[M].北京:中国农业大学出版社,2000.
- [2] 李海燕,胡国富,胡宝忠.月季组培快繁技术的研究

- [J]. 东北农业大学学报,2004,35(1):84-88.
- [3] Gerard C. Douglas, Clare B. Rutledge, Angela D. Casey and David H. S. Richardson. Micropropagation of floribunda, ground cover and miniature roses[J]. Plant cell, Tissue and Organ Culture, 1989,19(1): 55-64.
- [4] Veneta Kapchina - Toteva, Hendrik - Jan van Telgen, Elena Yakimova. Role of phenylurea cytokinin CPPU in apical dominance release in In vitro cultured rosa hybrida L. [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2000, 19(2): 232-237.
- [5] Niels Bredmose, Kell Kristiansen. Changes in concentrations of cytokinins (CKs) in root and axillary bud tissue of miniature rose suggest that local CK biosynthesis and zeatin - type CKs play important roles in axillary bud growth[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2005, 24(3): 238-250.
- [6] Rout G R, Debata B K, DasP. In vitro clonal multiplication of roses [J]. Proc Natl Acad Sci, 1990, 60:311-318.
- [7] Langford P. J, Wainwright H. Effect of sucrose concentration on the photosynthetic ability of rose shoots in vitro [J]. Ann Bot, 1987, 60:633-639.
- [8] Theo P. M. Van der Salm, Caroline J. G. Van der Toorn, Charlotte H. Hanisch ten Cate, Lidwien A. M. Dubois, Dik P. De Vries and Hans J. M. Dons. Importance of the iron chelate formula for micropropagation of Rosa hybrida L. ‘Moneyway’ [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1994, 37(1): 73-77.
- [9] Adela Halmagyi, Ina Pinker. Plant regeneration from Rosa shoot tips cryopreserved by a combined droplet vitrification method[J]. Plant Cell, Tissue and Organ culture, 2006, 84(2): 100129-100137.
- [10] 何松林,朱道圩,任凝辉,鲁琳,白玉玲,粟纪轩,张艳萍.切花月季‘萨蔓莎’组织培养微繁的研究[J].华北农学报,1996,11(3):117-120.
- [11] Genoud C, Coudret A, Amalric C and Sallanon H. Effects of micropropagation conditions of rose shootlets on chlorophyll fluorescence[J]. Photosynthetica, 1999, 36(1-2):243-251.
- [12] Pratap Kumar Pati, Madhu Sharma, Anil Sood and Paramvir Singh Ahuja. Micropropagation of rosa damasceana and R. bourboniana in liquid cultures[M]. Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation, 2005: 373-385.
- [13] 任桂芳,王建红,冯慧,李毅,李燕,施雪波.现代月季(Rosa hybrida)叶片植株再生体系的建立[J].园艺学报,2004,31(4):533-536.
- [14] 高莉萍,包满珠.月季‘萨蔓莎’愈伤组织的诱导及植株再生[J].园艺学报,2005,32(3): 534-536.

(下转第 83 页)

A_1, A_4 , 不是一个。同理, 由尺寸链理论不难得到: 当工序尺寸 A_5 在 $[A_{5min}, A_{5max}]$ 内时, 零件肯定是合格品; 当工序尺寸 A_5 在 $[(A_{5min} - (TA_1 + TA_4)), A_{5min}] \cup [A_{5max}, (A_{5max} + (TA_1 + TA_4))]$ 内时, 工件会出现假废品; 当工序尺寸 A_5 在 $[(A_{5min} - (TA_1 + TA_4)), (A_{5max} + (TA_1 + TA_4))]$ 之外时, 零件便是真废品。

所以, 一般讲, 工序尺寸 A 在下述范围时, 零件可能出现假废品。

$[(A_{min} - TA_\Sigma), A_{min}]$ 和 $[A_{max}, (A_{max} + TA_\Sigma)]$

其中: A_{min}, A_{max} 为工序尺寸的最小值、最大值 (如 A_{5min}, A_{5max}), TA_Σ 为联系工序基准与设计基准的尺寸的公差之和 (即基准不重合误差)。

上述零件的合格品区、假废品区和真废品区可以借助于公差带位置用图4直观地表示出来, 图中

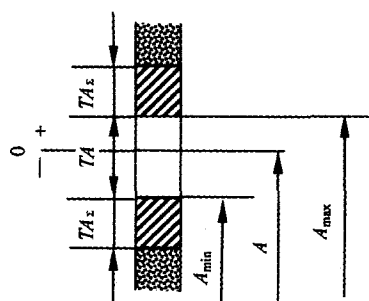


图4 基准不重合时假废品可能出现的区域

空白区域、沙纹区区域和网纹区域分别表示零件的合格品、假废品和真废品的区域。

4 结论

4.1 只要工艺 (测量、定位) 基准与设计基准不重合, 即会出现假废品。

4.2 真假废品的判断原则: 当工序 (测量) 尺寸超差时, 若超差量不大于其它组成环 (即连接工艺基准和设计基准的尺寸) 的公差之和 TA_Σ , 有可能出现假废品, 应复检其它组成环的尺寸来判别是真废品, 还是合格品; 如果超差量大于其它组成环公差之和, 则肯定是真废品, 不必复检。

4.3 零件假废品出现的区域是: $[(A_{min} - TA_\Sigma), A_{min}]$ 和 $[A_{max}, (A_{max} + TA_\Sigma)]$, 且 TA_Σ 越大, 零件出现假废品的区间越大。

参考文献:

- [1] 王先逵. 机械制造工艺学[M]. 北京: 机械工业出版社, 2003.
- [2] 曹立文, 林 晶, 刘汉成. 假废品现象的研究[J]. 佳木斯大学学报: 自然科学版, 2001(1): 45-46.
- [3] 王大力, 吴 锐. 基准不重合带来的假废品及判定方法[J]. 矿山机械, 2000(4): 57-58.

(上接第47页)

- [15] Davina Lloyd, Andrew V. Roberts and Keith C. Short. The induction in vitro of adventitious shoots in Rosa[J]. Euphytica, 1988, 37(1): 31-36.
- [16] Rusli Ibrahim, Wim Mondelaers and Pierre C. Debergh. Effects of X-irradiation on adventitious bud regeneration from in vitro leaf explants of Rosa hybrida[J]. Plant Cell, Tissue and Organ culture, 1998, 54(1): 37-44.
- [17] Hill GO. Morphogenesis of shoot primordia in cultured stem tissue of a garden rose[J]. Nature, 1967, 216: 596-596.
- [18] Joyce C. de Wit, Harald F. Esendam, Jarmo J. Honkanen and Ulla Tuominen. Somatic embryogenesis and regeneration of flowering plants in rose[J]. Plant Cell Reports, 1990, 9(8): 456-458.
- [19] Rout G R, Debata B K, Das P. Somatic embryogenesis in callus cultures of Rosa hybrida L. cv. Landora[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1991, 27: 65-69.
- [20] Kintzios S, Nikolaou A, Skoula M. Somatic embryogenesis and in vitro rosmarinic acid accumulation in Salvia officinalis and S. fruticosa leaf callus cultures[J]. Plant Cell Reports, 1999, 18(6): 462-466.
- [21] 郑玉梅, 刘青林. 月季遗传转化研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(2): 79-82.
- [22] Sarasan V, Roberts A, Rout G. Methyl laurate and 6-benzyladenine promote the germination of somatic embryos of a hybrid rose[J]. Plant Cell Reports, 2001, 20(3): 183-186.
- [23] Li X, Krasnyanski S. F, Korban S. S. Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in Rosa[J]. Journal of Plant Physiology, 2002, 159(3): 313-319.
- [24] Suk W. Kim, Seung C. Oh, Dong S. In and Jang R. Liu. Plant regeneration of rose (Rosa hybrida) from embryogenic cell-derived protoplasts[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2003, 73(1): 15-19.
- [25] Z. Tomaszewski Jr, Kuklin A. I, Sams C. E and Conger B. V. Influence of low temperature preincubation on somatic embryogenesis and ethylene emanation from orchardgrass leaves[J]. Plant Growth Regulation, 1994, 14(3): 229-234.