

丰花月季愈伤组织的诱导及细胞悬浮培养

王艳红, 龚束芳, 车代弟*

(东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 分别以丰花月季叶片、叶柄和茎段为外植体诱导出愈伤组织, 并建立细胞悬浮系。结果表明, 丰花月季叶片和茎段是诱导愈伤组织和进行细胞悬浮培养的理想外植体; 诱导松散型愈伤组织的最佳激素浓度配比是 NAA $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 2,4-D $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + BA $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 细胞悬浮培养细胞最佳起始密度为 $1.5 \times 10^4 \sim 3.0 \times 10^4 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时; 继代培养 4~5 代时, 可得到稳定的悬浮细胞系。

关键词: 丰花月季; 组织培养; 细胞悬浮培养; 松散型愈伤组织

中图分类号: S685.12; S5/59/035.31

文献标识码: A

丰花月季(*Rosa chinensis* Var. *floribunda*) 是蔷薇科, 蔷薇属, 多年生木本花卉, 在切花、园林美化、盆栽等多个领域均占有重要地位, 具有极高的商业价值^[1]。目前, 世界各地栽培的月季均是以中国月季为亲本, 经长期不断的选育和反复杂交, 有限的基因来源大大地限制了新品种的出现, 常规育种已无法满足需要^[2-5]。近些年来, 随着生物技术与分子生物学技术的迅速发展, 国外许多研究者开始借助分子生物技术改良现代月季的某些品质^[6-13]。我国在月季生物技术与分子生物学研究上, 多是在组织培养等方面取得一定进展, 在丰花月季细胞悬浮培养方面尚未见报道^[14]。因此本研究在获得丰花月季松散型胚性愈伤组织的基础上, 进行了丰花月季悬浮细胞培养研究, 以期进一步用于建立丰花月季原生质体再生体系及原生质体或微原生质体融合体系, 为月季遗传转化、细胞突变体筛选、优良无性系的繁殖和人工种子制作等领域的研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

所用材料由东北农业大学园林系月季育种课题组提供。

收稿日期: 2005-09-21

基金项目: 哈尔滨市科技攻关项目(2005AA6CN071)

作者简介: 王艳红(1980-), 女, 山东, 硕士, 研究方向为园林植物分子植物育种。E-mail: yg-09@163.com

* 通讯作者 E-mail: daidiche@yahoo.com.cn

1.2 方法

1.2.1 丰花月季愈伤组织的诱导

1.2.1.1 无菌外植体的获得

接种材料为当年抽生侧芽饱满的幼嫩茎段, 自来水冲洗 10~20 min; 75%乙醇浸泡 30 s, 0.1%升汞表面消毒 3 min, 无菌水冲洗 4~5 次, 将侧芽切下接种在 MS 基本培养基上, 获得无菌苗备用^[15-16]。

1.2.1.2 愈伤组织的诱导

取无菌苗叶片切成约 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 的小块, 叶柄、茎段切成小段。为了研究几种常用植物激素对月季愈伤组织诱导的影响, 我们选取 BA, KT, NAA 和 2, 4-D 等 4 种激素(因素), 每个因素设 3 个水平进行激素的初步筛选, 见表 1^[9]。诱导和继代培养均在黑暗条件下进行, 培养温度为 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 3~4 周更换 1 次培养基。3 次重复。

表 1 愈伤组织诱导正交设计方案

Table 1 Orthogonal project of callus cultures ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)

水平 Levels	因素 Factors			
	BA	KT	NAA	2, 4-D
1	0	0	0	0
2	1	1	2	1
3	2	2	4	2

1.2.2 丰花月季细胞悬浮系的建立

将分散性好、疏松的愈伤组织, 接种在与继代

培养基相同的液体培养基中, 每 150 mL 的三角瓶中加入液体培养基 40 mL, 摇床转速为 $110 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 温度 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。每隔 10 d 继代 1 次, 连续培养 4~5 代后逐渐形成稳定的细胞系。每隔 1 d 在倒置显微镜下观察细胞形态、分散程度并照相, 进行细胞计数, 以建立细胞数量生长曲线。

1.2.3 细胞悬浮生长曲线的测定

取 0.5 g 悬浮培养物, 接入新鲜液体培养基中, 进行振荡培养, 每隔 1 d 取样 1 次, 共培养 13 d, 连续做 3 次平行实验。

1.2.4 悬浮细胞数目的测定

用血球计数板法对悬浮细胞计数, 每个结果为 4 次平行实验的平均值。

细胞数按下面公式计算: 1 mL 悬浮液中的总细胞数 $= A/5 \times 25 \times 10^4 \times B$ (A 为 5 个中方格总细胞数, B 为稀释倍数)。

2 结果与分析

2.1 外植体对愈伤组织状态的影响

不同外植体的脱分化能力不同, 诱导出愈伤组织的频率和愈伤组织的状态也存在较大差异。在丰花月季愈伤组织诱导时, 本实验采用三种外植体: 叶片、叶柄和茎段。

经过 30 d 观察发现, 两种外植体经过培养均诱导获得了愈伤组织。结果表现为: 以叶片和茎段为外植体诱导得到的愈伤组织形态上差异不明显, 愈伤组织多数呈乳黄色, 部分呈绿、白色, 松散程度不一, 叶片诱导率稍高于茎段能达到 90% 以上, 选取好的经 2~3 代的继代培养可获得较疏松的, 适宜于细胞悬浮培养的愈伤组织; 叶柄为外植体主要是在基部及切口处形成愈伤组织, 接种后生长极其缓慢, 接 10 d 时可见边缘切口处发生褐化, 得到的愈伤组织少; 因此认为叶片和茎段是诱导愈伤组织和进行细胞悬浮培养的理想外植体。

2.2 激素对愈伤组织形态的影响

不同的激素及激素浓度直接影响着愈伤组织的状态、质地和分散性, 而这些因素又是松散愈伤组织的关键, 也是进行细胞悬浮培养的必要前提。因此, 本实验诱导月季愈伤组织及继代培养设计了 9 种激素组合正交研究结果见表 2。

表 2 正交研究方案及结果

Table 2 Design and results of orthogonal experiment

处理 Treatments	因素 Factors				诱导率(%) Inducement ratio
	BA	KT	NAA	2, 4-D	
1	0	0	0	0	0
2	0	1	2	1	90
3	0	2	4	2	60
4	1	0	2	2	10
5	1	1	4	0	25
6	1	2	0	1	55
7	2	0	4	1	10
8	2	1	0	0	0
9	2	2	2	2	30
K1	150	20	55	25	
K2	90	115	130	155	
K3	40	145	95	100	
k1	50	6.7	18.3	8.3	
k2	30	38.3	43.3	51.7	
k3	13.3	48.3	31.7	33.3	
R	36.7	41.7	25	43.3	

由表 2 结果可见, 单独使用细胞分裂素没有愈伤组织形成, 对正交研究进行极差分析, 各因素对愈伤组织诱导率的影响作用: $2, 4\text{-D}$ 浓度 $>$ KT 浓度 $>$ BA 浓度 $>$ NAA 浓度。最佳愈伤组织诱导组合是: $\text{KT } 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 2, 4\text{-D } 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

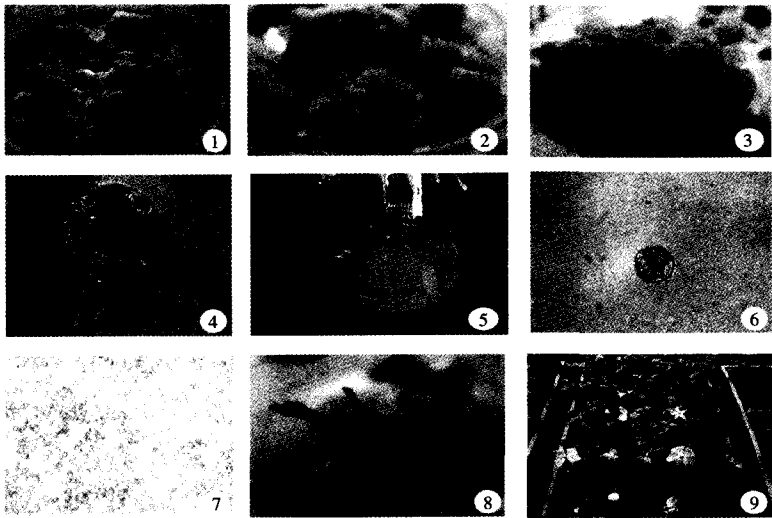
继代 2~3 次后获得的愈伤组织基本可分为三类: 黄色胚性愈伤组织、黄色非胚性愈伤组织、绿色非胚性愈伤组织。以黄色胚性愈伤组织质量为最好。没有生长素组合上继代获得绿色非胚性愈伤组织(见图版 I-1), 它生长缓慢, 硬度较大; 有生长素组合上继代获得黄色非胚性愈伤组织(见图版 I-2), 它生长旺盛, 含水量大, 比较坚硬。转接到 $2, 4\text{-D } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{BA } 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组合中可获得黄色胚性愈伤组织(见图版 I-3), 它质地松软, 有利于细胞悬浮培养。

2.3 继代次数与细胞形态之间的关系

继代过程中, 细胞悬浮液的颜色、细胞的形态、大小、数量不断在发生着变化。第 1, 2 次继代时, 细胞悬浮液为白色混浊, 有许多大颗粒, 倒置显微镜下观察, 细胞多数成团, 保持较旺盛的分裂能力(见图版 I-4), 单细胞大多呈长形、梭形、

不规则形，细胞个体较大；3，4 次继代时，细胞悬浮液变为黄色，比较粘稠，颗粒大小分布均匀，倒置显微镜下观察，分裂的细胞团增多，有的细胞团明显可见有 20~30 个球形细胞组成，单细胞数目增多，而且大多呈球形；5 次继代时，细胞悬浮液呈透明的黄色，澄清，呈油状流动(见图版 I-5)，

颗粒分布很均匀，直径大多在 0.5~1 mm，倒置显微镜下观察，细胞团和单细胞很多，大多呈球形(见图版 I-6)，大小均匀；6，7 次继代以上时，悬浮液变得比较澄清，呈浅黄色，倒置显微镜下观察，多数是由小细胞团和少量单细胞组成的悬浮培养物(见图版 I-7)。



1-胚性愈伤组织；2-黄色非胚性愈伤组织；3-绿色非胚性愈伤组织；4-大的细胞团(20×)；5-球形细胞(20×)；

6-分散性良好的悬浮细胞系；7-黄色的细胞悬浮液；8-愈伤组织萌发出芽；9-完整植株

1-Embryogenic callus; 2-No-embryonic callus with yellow color; 3-No-embryonic callus with green color; 4-Big cell clusters (20×); 5-Global cell (20×); 6-Well-scattered suspension cultures initiating; 7-Yellow cell suspension; 8-The regenerated shoot of callus; 9-Plant regeneration

图版 I 月季胚性细胞悬浮培养及再生植株

Plate I Plant regeneration from embryogenic suspensions in rose

因此，继代培养过程中，随着继代次数的增多，细胞悬浮液由无色或浅黄色变为黄色，由混浊变为澄清、透明，颗粒大小由不均匀到均匀，最终直径在 0.5~1 mm，倒置显微镜下观察，单细胞由长形、梭形、不规则形变为规则的球形，细胞系逐渐趋于稳定。

随后，我们又从筛选出来的细胞系将细胞接种到不含激素的 MS 培养基上，10 d 后长出新的愈伤组织，30 d 后长出月季全苗并转入蛭石成活(见图版 I-8，9)，说明以细胞系转化为新的愈伤组织生成再生植株是成功的。

2.4 细胞起始密度对细胞悬浮培养的影响

起始密度过大过小不仅会影响细胞系筛选的时间而且不利于稳定细胞系的建立，对细胞培养周期也有影响。比较不同培养密度对丰花月季悬浮细胞

系生长的影响结果见表 3。

表 3 不同起始密度对悬浮细胞系生长的影响
Table 3 The variety of cell in the different initial density with the day

培养密度 (个·mL ⁻¹) Culture density	细胞数减少 时间(d) Time	增长率(%) Increase rate	备注 Remark
1.0 × 10 ³			不能增殖
0.5 × 10 ⁴	13	874.1	悬浮液呈浅黄色
1.5 × 10 ⁴	12	665.4	悬浮液呈黄色、透明
3.0 × 10 ⁴	10	547.3	悬浮液呈黄色
8.0 × 10 ⁴	9	364.7	悬浮液有些混浊

从表 3 可见, 培养密度对月季悬浮细胞系生长有很大影响, 能正常继代增殖的起始密度是 0.5×10^4 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$, 低于它, 则小细胞团和单细胞很难增殖, 只有较大的细胞团会继续生长, 只能得到很大的颗粒; 高于 0.5×10^4 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 每瓶的培养物生长量随接种量的增加而递增, 达到最大密度所需的时间也随之缩短, 而增长率却随之下降, 这是由于在高密度下培养养分很快消耗殆尽的结果。这表明, 从保持悬浮细胞系的角度看, 适宜的接种密度为 $0.5 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^4$ 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$; 如要尽快获得大量悬浮培养物的角度看, 适宜的接种密度为 3.0×10^4 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.5 悬浮细胞系的生长曲线

丰花月季悬浮细胞系生长动态大致呈“S”形曲线(见图 1)。

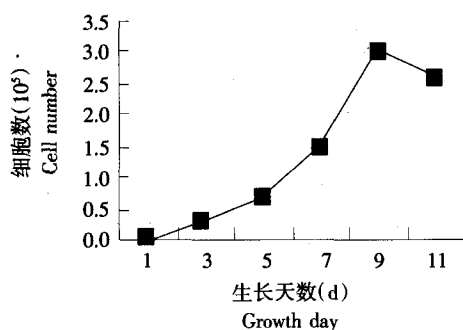


图 1 生长曲线

Fig.1 The growth curve

不同起始密度的细胞在进行细胞悬浮培养时, 一个培养周期内各个时期的长短和到达对数生长期时间是有差别的。细胞起始密度为 0.5×10^4 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 细胞延迟期较长约 3~5 d, 可能是细胞首先需要聚集到一定密度, 生长才比较明显。7 d 达到对数生长期, 但持续时间很短, 只有一天, 然后细胞数开始减少, 11 d 时细胞衰退; 细胞起始密度为 $1.5 \times 10^4 \sim 3.0 \times 10^4$ 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 1~3 d 为细胞延迟期, 细胞增值比较缓慢, 5 d 后, 细胞开始迅速增长, 7~9 d 达到对数生长期, 此时细胞数目增殖近 25 倍, 达到最高峰, 9~11 d 为细胞生长减慢期, 在此期间, 细胞数目增长缓慢; 细胞起始密度为 8.0×10^4 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 细胞延迟期较短只有 1~2 d, 7 d 达到对数生长期, 但细胞数目增殖不到 6 倍, 9 d 时, 细胞增长缓慢, 并很快衰退, 可能是由于细胞密度

过大, 培养基营养耗尽。可以得出结论: 进行月季细胞悬浮培养的最佳起始密度为 $1.5 \times 10^4 \sim 3.0 \times 10^4$ 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$, 其培养周期为 11 d。

[参 考 文 献]

- [1] 孙宪芝, 赵惠恩. 月季育种研究现状分析[J]. 西南林学院学报, 2003, 23(4): 65-69.
- [2] 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.
- [3] 李美茹, 李洪清, 孙梓健, 等. 月季的组织培养和基因转化研究进展[J]. 广西植物, 2003, 23(3): 243-249.
- [4] 王丽勉, 张启翔, 高亦珂. 月季抗黑斑病的基因工程研究[J]. 中南林学院学报, 2003, 23(5): 92-95.
- [5] 吕汰, 裴建文, 王娟. 丰花月季的组培快繁技术[J]. 甘肃农业科技, 2000(2): 44-46.
- [6] Kintzios S, Manos C, Makri O. Somatic embryogenesis from mature leaves of rose (*Rosa* sp.)[J]. Plant Cell Reports, 1999, 18: 467-472.
- [7] Xu Mingliang, Li Xiangqian, Schuyler S. DNA-methylation alterations and exchanges during *in vitro* cellular differentiation in rose (*Rosa hybrida* L.)[J]. Theor Appl Genet, 2004, 109: 899-910.
- [8] Kamo K, Jones B, Castillon J, et al. Dispersal and size fractionation of embryogenic callus increases the frequency of embryo maturation and conversion in hybrid tea roses[J]. Plant Cell Rep, 2004, 22: 787-792.
- [9] Chang K K, Jae-Dong C, Sun-Ok Jee, et al. Embryogenesis from *in vitro* grown leaf explants of *Rosa hybrida* L.[J]. J Plant Biotechnology, 2003, 5(3): 169-172.
- [10] Dohm A, Ludwig C, Nehring K, et al. Somatic embryogenesis in roses[J]. Acta Hort, 2001, 547: 341-347.
- [11] Hsia C N, Korban S S. Organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* and *Rosa chinensis* Minima[J]. Plant Cell Tissue Org Cult, 1996, 44: 1-6.
- [12] Kong L, Yeung E C. Effects of ethylene and ethylene inhibitors on white spruce somatic embryo maturation[J]. Plant Sci, 1994, 104: 71-80.
- [13] Marchant R, Davey M R, Lucas J A, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in floribunda rose (*Rosa hybrida* L. cvs). Trumpeter and glad tidings[J]. Plant Sci, 1996, 120: 95-105.
- [14] 翟晓巧, 翟翠娟, 刘新风. 木本植物体细胞胚胎发生及植株再生研究现状[J]. 河南林业科技, 2004, 24(2): 7-10.

- [15] 项艳, 江海洋, 李卞宗. 正交试验法在月季离体快繁中的应用[J]. 安徽农业大学学报, 2003, 30(3): 299-303.
- [16] 韩秀慧, 尹伟伦, 王华芳. 二次回归正交设计在微型月季组织培养中的应用[J]. 林业科学, 2004, 7(4): 189-192.

Study on callus induction and cell suspension cultures of rose (*Rosa floribunda*)

WANG Yanhong, GONG Shufang, CHE Daidi

(College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Cell suspension cultures were established from the callus tissues which were induced from leaf, leafstalk and stem segments of *Rosa floribunda*. The result indicated that both leaf and stem explants were suitable for cell suspension. Friable callus was obtained when cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-benzyl-adenine (6-BA). The best origination density was $1.5 \times 10^4 - 3.0 \times 10^4 \text{ number} \cdot \text{mL}^{-1}$; after 4-5 generations of sub-culture, stable cell suspension was obtained.

Key words: *Rosa floribunda*; tissue culture; cell suspension cultures; friable callus