

提高狗蔷薇离体培养植株再生频率*

余晓丽¹, 马剑民², 李玉英¹, 王世茹³

(1 南阳师范学院生物系, 河南 南阳 473061; 2 河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453002;

3 河南南阳农校园艺系, 河南 南阳 473000)

摘要: 以狗蔷薇 (*Rosa canina* Inermis) 为材料, 以 MS 为基本培养基, 通过对不同植物生长调节剂的组合, 大幅度提高了狗蔷薇离体培养植株再生频率。结果表明, 2.0 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L 2,4-D 的组合较为适宜, 其不定芽再生率为 87%, 增殖率为 3.0; 而 CPPU 和 2,4-D 的适宜组合为 1.5 mg/L + 0.3 mg/L, 其不定芽再生率高达 93%, 增殖率为 5.0。同时, 研究结果显示, 以 MS + 40 g/L 蔗糖 + 6.0 g/L 琼脂粉 + 3.5 mg/L AgNO₃ + 1.5 mg/L CPPU + 0.1 mg/L 2,4-D + 0.05 mg/L GA₃ 作增殖培养基效果最好, 不定芽诱导率为 89%, 增殖率为 5.5; 利于生根的培养基为 1/4MS + 20 g/L 蔗糖 + 3.5 g/L 琼脂 + 0.3% 活性炭 + 0.1 mg/L IBA + 0.1 mg/L NAA, 生根率为 91%。

关键词: 狗蔷薇; 植株再生; 组织培养

中图分类号: Q 945

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700(2006)02-203-05

Improving of *in vitro* Plant Regeneration Frequency of *Rosa canina* (Rosaceae) Inermis

YU Xiao-Li¹, MA Jian-Min², LI Yu-Ying¹, WANG Shi-Ru³

(1 Department of Biology, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, China; 2 College of Life Science of Henan Normal University, Xinxiang 453002, China; 3 Department of Horticulture, Nanyang Agricultural School, Nanyang 473000, China)

Abstract: An efficient regeneration system of *Rosa canina* Inermis was developed in this study. The results showed that the regeneration frequency of adventitious buds was 87% and the multiplication ratio was 3.0 when supplemented with 2.0 mg/L 6-BA and 0.3 mg/L 2,4-D on Murashige and Skoog (MS) medium, while the regeneration ratio was 93% and the multiplication ratio was 5.0 when the MS medium contained 1.5 mg/L CPPU and 0.2 mg/L 2,4-D. Moreover, the result also indicated that CPPU was more effective in the induction of adventitious buds. The optimal medium for the multiplication of shoots was MS + 40 g/L sucrose + 6.0 g/L agar + 3.5 mg/L AgNO₃ + 1.5 mg/L CPPU + 0.1 mg/L 2,4-D + 0.05 mg/L GA₃, in which the multiplication ratio was 5.5 and the adventitious bud induction frequency was 89%. The best medium for rooting and growing was 1/4MS + 20 g/L sucrose + 3.5 g/L agar + 0.3% activated carbon + 0.1 mg/L IBA + 0.1 mg/L NAA. The rooting frequency was 91%.

Key words: *Rosa canina*; Plant regeneration; Tissue culture

狗蔷薇 (*Rosa canina* Inermis), 原产欧洲, 落叶灌木, 其长势强健, 无刺、耐寒, 抗性较强 (梁艳华和彭春生, 2004), 在多种土壤中易于生

根。狗蔷薇作为树月季砧木, 在国外已普遍用于园林绿化, 在中欧、北欧各国、美国近海地区, 应用历史较长 (de Dood 等, 1990), 而我国对树

* 基金项目: 南阳师范学院 2003 年应用与科技开发项目 (nytc200318); 河南省南阳市 2004 年科技攻关项目 (200404016)

收稿日期: 2005-07-06, 2006-02-28 接受发表

作者简介: 余晓丽 (1963-) 女, 副教授, 主要从事细胞生物学教学和植物细胞培养研究。

E-mail: yx11268@125.com, 联系电话: 13838721912

月季的生产和应用刚刚起步。2002年从法国引种试验表明,在未加任何防寒措施的情况下,它们100%都能在北京露地越冬,但其成本较高。目前国内能生产树月季的基地不多,在园林绿化方面还要推广和示范,在生产上也需要改进和提高。

目前蔷薇属植物的离体培养已多有报道,但不同种及个体的差异较大,有些再生较易,有些再生较困难。国外有多篇关于现代月季植株再生体系的研究报道,在他们的研究中多采用茎尖、叶片、侧芽,但再生频率普遍较低,对砧木的快繁少之又少(杨倩和彭春生,2003)。狗蔷薇离体培养植株再生体系的建立国内外尚未见报道。本试验用生产树月季中应用较多的狗蔷薇茎段进行再生研究,通过不同类型植物生长调节剂(plant grown regulator, PGR)组合的筛选,为提高狗蔷薇离体培养和植株再生频率的研究,为通过遗传转化途径进行树月季优良砧木选育、改良奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

采用的砧木材料—狗蔷薇(*Rosa canina* Inermis)法国购进。

1.2 材料处理

狗蔷薇无菌苗:取当年生带腋芽茎段自来水冲洗30 min后,75%酒精处理10 s,再用0.1%次氯酸钠(加0.1%吐温-20)浸泡8~10 min,稍加摇动,取出后用无菌水冲洗4~5次,接种于不定芽的诱导培养基上。

1.3 培养条件

不定芽的诱导:切去无菌茎段两端已褪色的组织,将茎段切成1~2.0 cm长的小段,接种于诱导分化的培养基上,培养基为改良(黄科和余小林等,2004)MS+40 g/L蔗糖+6.0 g/L琼脂粉+3.5 mg/L AgNO₃+2.0 mg/L 6-BA/1.0~3.5 mg/L CPPU+0.1~0.6 mg/L 2,4-D (pH

5.8)。每瓶接种一个,共30瓶,重复3次。培养室温度为(25±2)℃,光强约30 μmol/m²·s,每天光照10~12 h。30 d继代一次。

不定芽的增殖:将长约1~1.5 cm的芽接种到增殖培养基上继代培养。基本培养基为改良MS+40 g/L蔗糖+6.0 g/L琼脂粉+3.5 mg/L AgNO₃+1.5 mg/L CPPU+0.05~0.1 mg/L 2,4-D+0.05~0.1 mg/L GA₃。培养条件同上。30 d继代一次。

待不定芽生长到1.5~2 cm时,自基部切下,移至生根培养基,培养条件同上。不定根诱导成功后按常规方法对再生植株进行移栽。

上述数据均采用DPS统计软件进行统计分析(唐启义和冯明光,2002)。

2 结果与分析

2.1 不定芽的诱导

2.1.1 6-BA与2,4-D配合对不定芽分化的影响

根据文献报道与预试验(Barve等,1984;Debasis等,2000),确定AgNO₃的添加浓度为3.5 mg/L,6-BA的添加浓度为2.0 mg/L,生长素2,4-D设0.1~0.6 mg/L等6个浓度梯度配成1~6号分化培养基,并将无菌外植体接种于这些培养基上,30 d后在1、2、3、4、5、6号培养基上都有不定芽的分化(表1),以3号分化率最高,增殖率为3。

对表1中不定芽诱导频率作进一步的统计分析,结果显示,PGR组合的不定芽再生频率的F值为317.3813,P值为2.6E-12,F_{0.05}为3.1059,均达到极显著的差异水平。说明2,4-D的适宜浓度为0.3 mg/L。表2显示:3号处理与4、2、1、5、6之间差异极显著,说明3号配方是最佳配方。

2.1.2 CPPU与2,4-D配合对不定芽分化频率的影响

为了比较不同细胞分裂素对狗蔷薇离体培养

表1 6-BA与2,4-D组合对狗蔷薇不定芽诱导的影响

Table 1 Effect of combinations of 6-BA and 2,4-D on adventitious buds induction of *Rosa canina* Inermis

编号 No.	植物生长调节剂 PGR (mg/L)		接种数 Incubation No.	不定芽分化数 Differentiation No. of adventitious buds	不定芽诱导率 Induction rate of adventitious buds (%)	增殖率 The multiplication rate
	6-BA	2,4-D				
1	2.0	0.1	89	55	62	2.0
2	2.0	0.2	89	60	67	2.3
3	2.0	0.3	90	78	87	3.0
4	2.0	0.4	90	64	71	2.5
5	2.0	0.5	86	53	62	2.0
6	2.0	0.6	90	40	45	1.5

植株再生能力的影响,在筛选出2,4-D的浓度为0.3 mg/L以后,又添加6个不同的浓度的CPPU(1、1.5、2、2.5、3、3.5 mg/L),筛选出适宜的不定芽分化的CPPU浓度(表2)。

表2 6-BA与2,4-D组合中两两之间差异比较

Table 2 Comparison of different combinations of 6-BA and 2,4-D on induction of adventitious buds

处理	不定芽诱导率 (%)	差异显著性	
		0.05	0.01
3	87	a	A
4	71	b	B
2	67	c	C
1	62	d	D
5	62	d	D
6	45	e	E

将无菌外植体接种于1~6号分化培养基上,外植体5天后开始萌动,经过约25天的诱导逐

步诱导出丛生芽。结果表明, CPPU与2,4-D的PGR组合对不定芽的诱导率整体高于6-BA与2,4-D的PGR组合的诱导率;增殖率也明显高于6-BA与2,4-D的PGR组合。以1.5 mg/L CPPU + 0.3 mg/L 2,4-D的组合较为合适,增殖率为5。对CPPU与6-BA的效果差别做显著性测验, $t = 3 > t_{3,0.05} = 2.776$,表明差异显著。因此, CPPU的作用效果要比6-BA好。

对表3中不定芽诱导频率作进一步的统计分析,结果显示, PGR的组合的不定芽再生频率的F值为196.3, P值为4.48E-11, $F_{0.05}$ 为3.1059,均达到极显著的差异水平。说明2号配方为最佳不定芽诱导的培养基, CPPU的适宜浓度为1.5 mg/L。表4显示: 2号处理与4、3、1、5、6之间差异极显著,说明2号配方是最佳配方。

表3 CPPU与2,4-D组合对狗蔷薇不定芽诱导的影响

Table 3 Effect of different combinations of CPPU and 2,4-D on adventitious buds induction of *Rosa canina* Inermis

编号 No.	植物生长调节剂 PGR (mg/L)		接种数 Incubation No.	不定芽分化数 Differentiation No. of adventitious buds	不定芽诱导率 Induction rate of adventitious buds (%)	增殖率 The multiplication rate.
	2,4-D	CPPU				
1	0.3	1.0	90	60	67	4.0
2	0.3	1.5	89	83	93	5.0
3	0.3	2.0	88	65	74	4.3
4	0.3	2.5	89	70	79	4.5
5	0.3	3.0	90	58	64	3.5
6	0.3	3.5	87	46	52	3.0

表4 CPPU与2,4-D组合中两两之间差异比较

Table 4 Comparison of different combinations of CPPU and 2,4-D on induction of adventitious buds

处理	不定芽诱导率 (%)	差异显著性	
		0.05	0.01
2	93	a	A
4	79	b	B
3	74	c	C
1	67	d	D
5	64	d	D
6	52	e	E

2.2 不定芽的增殖

确定CPPU的浓度为1.5 mg/L,生长素2,4-D设0.05, 0.15, 0.1 mg/L 3个浓度梯度,赤霉素GA₃设0.05, 0.1 mg/L 2个浓度梯度配成1~6号增殖培养基(Davis, 1980; Debasis等, 2002),并将不定芽接种于这些培养基上,30天后在6种培养基上都有不定芽的分化(表3),以4号的增殖率最高,增殖率为5.5(表5)。

对表5中不定芽增殖诱导作进一步的统计分析,结果显示, PGR的组合的不定芽增殖频率的F值为104.1375, P值为1.86E-09, $F_{0.05}$ 为3.1059,均达到极显著的差异水平。说明4号配方为最佳不定芽增殖培养基, GA₃的适宜浓度为0.05 mg/L, 2,4-D的适宜浓度为0.1 mg/L。表6显示: 4号处理与3、6、2、1、5、之间差异极显著,说明2号配方是最佳配方。

2.3 生根及移栽成苗

待不定芽长至1.5~2 cm时,转至生根培养基。结果表明, 1/4 MS + IBA 0.1 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 20 g/L蔗糖 + 3.5 g/L琼脂 + 0.3 g/L活性炭的生根培养基最适于狗蔷薇的生根,生根率达91%,且均为丛生根。

30天形成完整的根系后,移植到过渡基质上,30天后小苗成活。

表5 不同生长调节物质组合对狗蔷薇不定芽增殖的影响

Table 5 Effect of combinations of different PGR on adventitious buds multiplication of *Rosa canina* Inermis

编号 No.	植物生长调节剂 PGR (mg/L)		接种数 Incubation No.	分化数 Differentiation No.	不定芽诱导率 Induction rate of adventitious buds (%)	增殖率 The multiplication rate
	2,4-D	GA ₃				
1	0.05	0.05	86	55	64	2.5
2	0.05	0.1	89	63	71	4.5
3	0.1	0.1	87	69	79	4.0
4	0.1	0.05	90	80	89	5.5
5	0.15	0.1	84	54	64	2.3
6	0.15	0.05	90	68	76	3.0

表6 2,4-D和GA₃组合中两两之间差异比较Table 6 Comparison of different combinations of 2,4-D and GA₃ on induction of adventitious buds

处理	不定芽诱导率 (%)	差异显著性	
		0.05	0.01
4	89	a	A
3	79	b	B
6	76	c	B
2	71	d	C
1	64	e	D
5	64	e	D

3 讨论

目前,国内外对蔷薇属植物的组培报道 (Syamal and Singh, 1996; 杨倩和彭春生, 2003), 主要采用的细胞分裂素类物质包括 6-BA、KT、ZT 等, 以及生长素类如 IAA、NAA、IBA、2,4-D 等, 其中以 6-BA、NAA 的组合最多, 6-BA 的浓度一般为 1.0~2.5 mg/L, NAA 一般为 0.1~1.0 mg/L, 但离体植株再生频率均在 40%~50% (Ibrahim and Debergh, 2001; De Wit and Esendam, 1990), 再生频率较低。本实验以狗蔷薇的离体茎段为试材, 采用 6-BA 与 2,4-D 以及 CPPU 与 2,4-D 两种 PGR 组合来研究狗蔷薇不定芽发生情况, 建立高效的狗蔷薇离体培养再生体系。

CPPU 是苯基脲类细胞分裂素, 一种新型植物生长调节剂, 具有嘌呤型细胞分裂素更强的细胞分裂活性。具有良好的促进花芽分化、保花、保果、使果实膨大和诱导单性结实及延缓衰老等方面的作用 (李英等, 2001)。应用于蔷薇属植物的组培中还未见相关的报道。本实验采用 CPPU 和 6-BA 分别于 2,4-D 组合, 比较了两种细胞分裂素对狗蔷薇植株再生作用上的差异, 结果显示, CPPU 的作用效果要比 6-BA 好, 增殖倍数由 3 提高到 5。适宜的 CPPU 浓度为 1.5 mg/L。

生长素在组织培养中主要被用于诱导刺激细胞的分裂和根的分化, 对培养物的形态建成起着极其重要而明显的作用, 细胞分裂素和生长素的比值大时促进不定芽的形成 (Ibrahim and Debergh, 2001)。本实验表明, 在不定芽的诱导中 2,4-D 以 0.3 mg/L 浓度较适合, 在不定芽的增殖中 2,4-D 以 0.1 mg/L 的浓度较适合。

GA₃ 有促进不定芽和幼株伸长的作用。组培蔷薇属植物时, 往往在丛生芽的诱导阶段, 适量加入有利于芽的再生 (Barvet 等, 1984; Syamal and Singh, 1996)。本实验在继代培养中, 加入 0.05 mg/L GA₃ 可促进芽的增长。

〔参 考 文 献〕

- 唐启义, 冯明光著, 2002. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统 [M]. 北京: 科学出版社, 55—59
- Barve DM, Lyer RS, Kendurkar S, et al, 1984. An effective method for rapid propagation [J]. *Indian Journal of Horticulture*, **41** (1—2): 1—7
- De Dood J, Rademaker J, 1990. From the dtur trial in the Noordoostpolder [J]. *Vakblad voor de Bloemistery*, **45** (40): 72—73
- Davis DR, 1980. Rapid propagation of roses *in vitro* [J]. *Scientia Horticulturae*, (4): 385—389
- Debasis C, Azad MAK, Datta SK, 2000. *In vitro* propagation of rose cultivars [J]. *Indian Journal of Plant Physiology*, **5** (2): 189—192
- De Wit JC, Esendam HF, 1990. Matic embryogenesis and plant regeneration of flowering plants in rose [J]. *Plant Cell Rep*, (9): 456—458
- Huang K (黄科), YU XL (余小林), WU QY (吴秋云), et al, 2004. The Optimization of Plant Regeneration Protocol of Chinese Broccoli [J]. *Chinese Journal of Cell Biology* (细胞生物学杂志), **26** (3): 313—316
- Ibrahim R, Debergh PC, 2001. Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from *in vitro* leaf explants of rose [J]. *Scientia Horticulturae*, **88** (1): 41—57

- Liang YH (梁艳华), Peng CC (彭春生), 2004. Select of rootstocks of tree roses [J]. *North Horticulture* (北方园艺), (4): 38—39
- Li Y (李英), Yu JQ (喻景权), Zhu ZJ (朱祝军), et al, 2001. Fruit growth, cell division and endogenous hormones level in parthenocarpic fruit formed by CPPU induction in *Lagenaria leucantha* [J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), 27 (2): 167—172
- Syamal MM, Singh SK, 1996. *In vitro* propagation of rose [J]. *Horticultural Journal*, 9 (1): 57—62
- Yang Q (杨倩), Peng CC (彭春生), 2003. Domesticate rapid propagation on rootstocks of tree roses [J]. *J Beijing Forest Univ* (北京林业大学学报), 25 (2): 85—93

* * * * *

资讯

能源植物专题资料汇编

能源缺乏逐步成为人类面临的最大危机, 同时矿物能源燃烧所产生的有害物质严重污染了环境, 导致温室效应等诸多生态问题。生物能源具有可再生性, 自我分解的绿色环保性, 正逐步替代矿物能源。

能源植物通常指那些具有合成较高还原性烃的能力, 可产生接近石油或柴油成分并可替代石油或柴油产品使用的植物, 以及富含大量油脂的植物 (费世民, 2005)。

能源植物主要分为三类, 其一富含类似石油成分的能源植物, 石油的主要成分是烃类, 富含烃类的植物是植物能源的最佳来源, 生产成本低, 利用率高。其二富含碳水化合物的能源植物, 利用这些植物所得到的最终产品是乙醇, 如甘蔗农作物。其三富含油脂的能源植物 (丁向阳, 2004)。

到目前为止, 能源植物有草本、乔木、灌木类, 主要集中在夹竹桃科、大戟科、萝藦科、菊科、桃金娘科以及豆科。全世界已经发现 40 多种能源植物, 有续随子、绿玉树、橡胶树、西蒙德木、甜菜、甘蔗、木薯、苦配巴树、油棕榈树、南洋油桐树、澳大利亚的阔叶木、黄连木、象草等。

中国植物区系成分复杂、种类繁多, 其中能源植物种类之多在世界上屈指可数。到目前为止, 含油植物资源有 151 科 697 属 1553 种, 其中种子含油量在 40% 以上的植物有 154 种 (王涛, 2005)。目前大部分的能源植物处于野生或半野生状态, 科研人员正在利用遗传改良、人工栽培或先进的生物技术手段, 通过生物质能转换技术提高利用生物能源的效率, 生产出各种清洁燃料。

研究著作:

1. Chris Hayhurst, 2003. 《Biofuel Power of the Future: New Ways of Turning Organic Matter Into Energy》. Rosen Publishing Group Inc.
2. N E Bassam, 1998. 《Energy Plant Species: Their Use and Impact on Environment and Development》. James & James/Earthscan Science publisher.
3. 李昌珠, 蒋丽娟编, 2005. 《清洁燃料丛书——生物柴油 (绿色能源)》, 化学工业出版社.
4. 袁振宏, 吴创之等编著, 2005. 《可再生能源丛书——生物质能利用原理与技术》, 科学出版社.
5. 张卫明 编著, 2005. 《植物资源开发研究与应用》, 东南大学出版社出版.
6. 中国科学院能源战略研究组 编, 2006. 《中国能源可持续发展战略专题研究》, 科学出版社.

综述文献:

1. Amber M. Roth et al., 2005. Grassland bird response to harvesting switchgrass as a biomass energy crop. *Biomass and Bioenergy*, 28 (5): 490—498
2. Dalia Streimikiene, et al., 2005. Review of renewable energy use in Lithuania. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 9 (1): 29—49
3. Fangrui Ma, Milford A. Hanna, 1999. Biodiesel production: a review, *Bioresource Technology*, 70 (1): 1—15
4. James S. McLaren, 2005. Crop biotechnology provides an opportunity to develop a sustainable future. *Trends in Biotechnology*, 23 (7): 339—342
5. Jan Cloin, 2005. Biofuels in the Pacific: Coconut oil as a biofuel in Pacific islands. *Refocus*, 6 (4): 45—48
6. Murphy JD, McCarthy K, 2005. Ethanol production from energy crops and wastes for use as a transport fuel in Ireland. *Applied Energy*, 82 (2): 148—166