

野蔷薇叶片直接再生的影响因素

丁萌 申玉晓 傅小鹏 包满珠 宁国贵

华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070

摘要 以华中地区分布的4种野蔷薇叶片为外植体,对其直接再生的影响因子进行研究,以筛选出不定芽诱导率最高的株系及最优的诱导条件。研究结果显示,4种野蔷薇的不定芽最高诱导率差异显著,野蔷薇2号为78.20%,3号为61.16%,4号为13.00%,1号仅5.93%;野蔷薇2号的田间叶片外植体的不定芽诱导率高于组培苗叶片;基因型、植物生长调节剂及叶片的状态对野蔷薇的直接再生影响显著,选择合适的基因型及培养条件极为重要。

关键词 野蔷薇;直接再生;基因型;不定芽;外植体

中图分类号 S 685.12 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)01-0029-05

野蔷薇(*Rosa multiflora* Thunb.)又名多花蔷薇,属于蔷薇科蔷薇属多年生落叶木本植物,具有较高的观赏价值和一定的药用价值。野蔷薇抗逆性强,分布广泛,具有大量的基因型,是现代月季的主要亲本之一。挖掘具有地域分布特色的优良野蔷薇种质资源对现代月季进行改良,是培育地方特色品种的有效方法。华中地区的野蔷薇具有繁殖容易、生长快、抗热性强及观赏价值高的特点,既可用作月季砧木,也可用作育种的亲本。

国内外研究者普遍以茎段、叶片、叶柄为外植体,通过直接或间接的器官发生途径和体细胞胚发生途径在许多木本植物上获得再生植株^[1-3]。国内对蔷薇属植物组织培养的研究主要集中在通过丛生芽途径进行离体快繁^[4],蔷薇属植物叶片直接再生技术也日趋成熟,通过器官发生途径的植株再生研究也有报道^[5-6],另外,研究表明多种因素影响蔷薇属植物器官的有效发生^[7-11]。

由于蔷薇属植物组织培养具有基因型依赖性,需要建立与各基因型相对应的高效再生体系。目前关于野蔷薇不定芽直接再生和不同株系的再生能力差异性的研究报道很少^[12],多花蔷薇再生技术复杂且再生周期长^[13-14]。本研究以华中地区不同基因型野蔷薇优良单株为材料,研究其叶片直接再生能力的差异,以期筛选出诱导率较高的野蔷薇,为其在园

林绿化中得到更广泛的应用及其近缘种玫瑰、月季等的遗传改良提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

4种基因型的野蔷薇采集于华中地区,种植于华中农业大学实验基地,分别命名为:野蔷薇1号、野蔷薇2号、野蔷薇3号、野蔷薇4号(图1)。4种野蔷薇均有刺,其中野蔷薇1号和4号的花为白色系,野蔷薇2号和3号的花为红色系。花期均在4月中下旬至5月中旬。果期较长,都在6月中下旬至12月。

1.2 野蔷薇无菌体系的建立

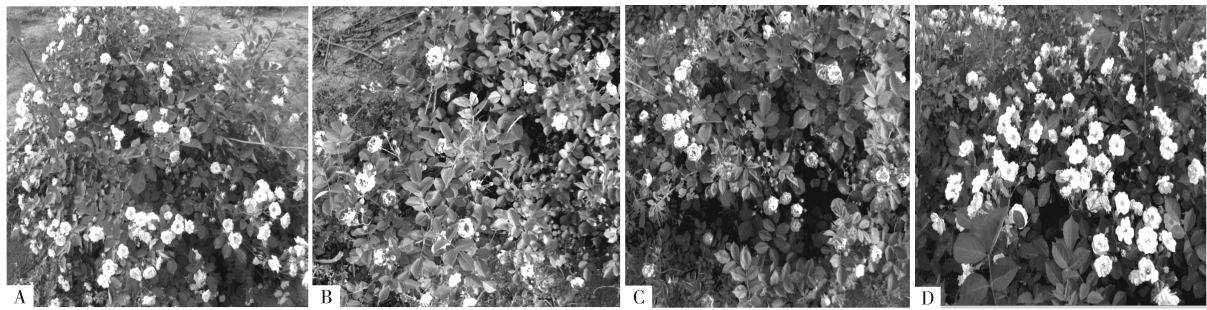
2010年9月,剪取地栽野蔷薇带芽枝条,去除叶片后将其剪成3~4 cm带芽茎段,自来水冲洗干净后先用70%乙醇消毒30 s,再用0.1% HgCl₂消毒10 min,用无菌水冲洗3次,然后将茎段切至2~3 cm长,接种到启动培养基上。培养基为MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.01 mg/L+蔗糖30 g/L+琼脂7.5 g/L。30 d继代1次。继代培养基与启动培养基相同。将长约1 cm的丛生不定芽接种到伸长培养基(MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.01 mg/L+蔗糖30 g/L+琼脂7.5 g/L)上。30 d继代1次。

收稿日期: 2012-02-15

基金项目: 国家高新技术研究发展计划(“863”)项目(2011AA100208)

丁萌,硕士研究生,研究方向: 园林植物遗传育种与生物技术, E-mail: dingmeng4193@126.com

通讯作者: 宁国贵,博士,副教授,研究方向: 园林植物遗传育种与生物技术, E-mail: ggning@mail.hzau.edu.cn



A:野蔷薇 1 号 *R. multiflora* 1; B:野蔷薇 2 号 *R. multiflora* 2; C:野蔷薇 3 号 *R. multiflora* 3; D:野蔷薇 4 号 *R. multiflora* 4.

图 1 处于盛花期的 4 种野蔷薇

Fig. 1 The four *R. multiflora* varities in the full-bloom stage

1.3 野蔷薇叶片再生影响因子分析

1)基因型对诱导率的影响。对 4 种野蔷薇的田间叶片消毒处理后,将其叶片接种于添加不同质量浓度(1.0~3.0 mg/L)TDZ 的基本培养基(1/2 MS+TDZ 1.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L+葡萄糖 30 g/L+植物凝胶 3 g/L)上,筛选出诱导率最高的株系。

2)叶片来源对诱导率的影响。以诱导率最高株系野蔷薇 2 号的组培苗叶片和田间种植植株的叶片为外植体,将其接种在分化培养基上,比较在相同培养条件下诱导率的差异。2011 年 4 月,剪取野蔷薇未展开叶片、自来水冲洗干净后先用 70%乙醇消毒 30 s,再用 0.1% HgCl₂消毒 5 min,用无菌水冲洗 4~5 次后,接种于分化培养基上,基本培养基为 1/2 MS+NAA 0.05 mg/L+AgNO₃ 10 mg/L+葡萄糖 30 g/L+植物凝胶 3 g/L。暗培养 12 d,30 d 后统计诱导率。

3)TDZ 质量浓度对诱导率的影响。以野蔷薇 2 号的组培苗叶片为外植体,每叶留约 1 mm 长的叶柄,接种于添加不同质量浓度(1.0~3.0 mg/L)TDZ 的分化培养基上,基本培养基为:1/2 MS+NAA 0.05 mg/L+AgNO₃ 10 mg/L+葡萄糖 30 g/L+植物凝胶 3 g/L。暗培养 12 d,光培养 18 d 后统计诱导率。比较在相同培养条件下,TDZ 高质量浓度(2.0、3.0 mg/L)的分化培养基上诱导率与 TDZ 低质量浓度(1.0、1.5 mg/L)的分化培养基上诱导率的差异。

1.4 野蔷薇生根培养

将长约 2 cm 的丛生不定芽接种到生根培养基(1/2 MS+IBA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7.5 g/L)上。

以上所有试验均设有 3 次重复,每次重复为 15~25 个外植体。培养条件为培养温度(24±2)℃,每天光照 14 h。培养 30 d 后统计叶片的不定芽分化率。ANOVA 进行方差统计分析。

2 结果与分析

2.1 不定芽的诱导和分化

1)基因型对诱导率的影响。将消毒后的田间叶片接种于添加不同质量浓度 TDZ 的分化培养基上,30 d 后发现 4 种野蔷薇都有不同程度的不定芽分化(图 2),但分化率有显著差异,以野蔷薇 2 号的分化率最高,达 78.20%,其分化培养基为 1/2 MS+TDZ 1.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L+葡萄糖 30 g/L+植物凝胶 3 g/L。其次为 3 号不定芽,诱导率为 61.16%,第三是 4 号不定芽,诱导率为 13.00%,最后是 1 号不定芽,诱导率为 5.93%(表 1)。

2)叶片来源对诱导率的影响。筛选出诱导率最高的野蔷薇 2 号,取其无菌苗叶片与田间叶片共同接种于含 1.5 mg/L TDZ 的分化培养基上。30 d 后在培养基上都有不定芽分化(图 2),结果显示田间叶片表现出了更强的分化能力,诱导率远远高于组培苗叶片(表 2)。

3)TDZ 对诱导率的影响。取野蔷薇 2 号无菌苗的叶片分别接种于含不同质量浓度 TDZ 的分化培养基上。30 d 后 4 种培养基上都有不定芽的分化,低质量浓度(1.0、1.5 mg/L)的 TDZ 之间及高质量浓度(2.0、3.0 mg/L)的 TDZ 之间的诱导率没有显著差异。但是在 2 种高质量浓度 TDZ 的分化培养基上,大多数叶柄基部严重愈伤化,部分叶片出现了不定根,分化率明显低于低浓度的 TDZ 分化培养基(表 3),且分化的不定芽大多表现畸形,难以正常成株。

表 1 基因型对小叶不定芽诱导的影响¹⁾

Table 1 Effects of genotype and TDZ on adventitious bud induction of leaflet

基因型 Genotype	TDZ/(mg/L)	接种叶片数 No. of leaf explants	发生不定芽的叶片数 No. of leaf explants forming adventitious bud	不定芽诱导率/% Frequency of adventitious bud induction
野蔷薇 1 号 <i>R. multiflora</i> 1	1.0	70	4	5.70±0.10 e
野蔷薇 2 号 <i>R. multiflora</i> 2		63	81	77.77±0.20 a
野蔷薇 3 号 <i>R. multiflora</i> 3		61	36	59.10±0.43 c
野蔷薇 4 号 <i>R. multiflora</i> 4		86	10	11.63±1.3 d
野蔷薇 1 号 <i>R. multiflora</i> 1	1.5	67	4	5.93±0.59 e
野蔷薇 2 号 <i>R. multiflora</i> 2		55	43	78.20±1.73 a
野蔷薇 3 号 <i>R. multiflora</i> 3		72	44	61.16±1.15 b
野蔷薇 4 号 <i>R. multiflora</i> 4		100	13	13.00±0.26 d

1)数据显示为平均值±标准误,不同字母表示在 $P<0.05$ 水平上差异显著;下同。Values shown are means±standard errors, values significantly different within columns at the 0.05 level of significance are indicated with different small letter, which have same meanings in the following table. The same as follows.

表 2 叶片来源对野蔷薇 2 号小叶不定芽诱导的影响

Table 2 Effects of leaf sources on adventitious bud induction of leaflet in *R. multiflora* 2

叶片来源 Source of leaf	接种叶片数 No. of leaf explants	发生不定芽的叶片数 No. of leaf explants forming adventitious bud	不定芽诱导率/% Frequency of adventitious bud induction
田间叶片 Leaves harvested directly from field	55	43	78.20±1.73 a
组培苗叶片 Leaves from sterile seedling	60	25	41.66±1.46 b

表 3 TDZ 浓度对野蔷薇 2 号小叶不定芽诱导的影响

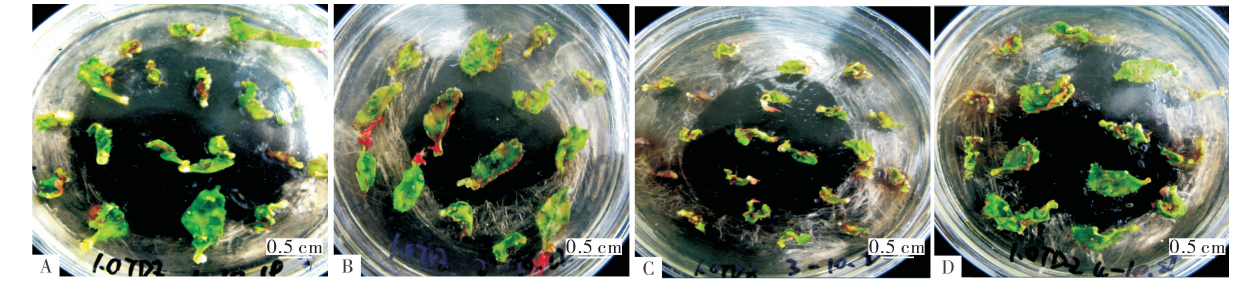
Table 3 Effects of TDZ concentrations on adventitious bud induction of leaflet in *R. multiflora* 2

TDZ/(mg/L)	接种叶片数 No. of leaf explants	发生不定芽的叶片数 No. of leaf explants forming adventitious bud	不定芽诱导率/% Frequency of adventitious bud induction
1.0	64	26	40.90±0.72 a
1.5	60	25	41.66±1.46 a
2.0	57	6	10.57±0.64 b
3.0	66	7	10.63±0.21 b

2.2 不定芽的伸长、增殖、生根

待不定芽长度大于 1 cm 后,将其从外植体上切下,接种到增殖培养基(MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.01 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7.5 g/L),约 30 d 后观察结果。结果(图 2)显示,4 种野蔷薇的不

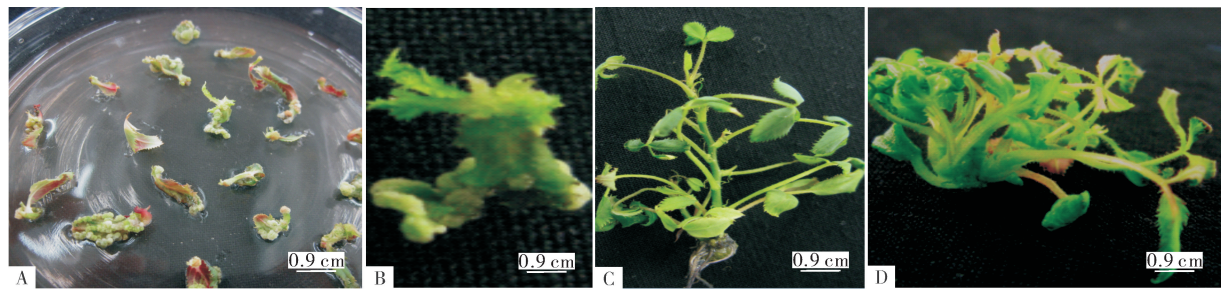
定芽正常发育,均能再生成植株。将不定芽长度大于 2 cm 的野蔷薇 2 号植株,接种于生根培养基(1/2MS+IBA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7.5 g/L),约 30 d 后观察,结果显示,所有的再生植株均能生根,生根率达到 100%(图 3)。



A:野蔷薇 1 号 *R. multiflora* 1; B:野蔷薇 2 号 *R. multiflora* 2; C:野蔷薇 3 号 *R. multiflora* 3; D:野蔷薇 4 号 *R. multiflora* 4.

图 2 4 种野蔷薇接种 30 d 后叶柄不定芽再生情况

Fig. 2 Adventitious shoots regenerating from petiole of leaves harvested from field of four *Rosa multiflora* cultivars



A:野蔷薇 2 号组培苗叶片接种 30 d 叶柄不定芽再生情况 Adventitious shoots regenerating from petiole after 30 days culture; B:接种 30 d 再生不定芽 A magnified adventitious shoot after culturing 30 days; C:不定芽增殖 Multiplication of adventitious shoots; D:长根的再生植株 A rooted regenerated plantlet.

图 3 野蔷薇再生

Fig. 3 Regeneration of *R. multiflora*

3 讨论

在蔷薇属植物茎段、叶片、叶柄等外植体的再生研究中,通过愈伤组织发生、体细胞胚胎发生等途径获得再生芽的离体培养对品种和外植体的依赖性 强,而且不定芽再生率普遍偏低^[7]。本研究的 4 种华中地区优良野蔷薇在培养中,野蔷薇 2 号的不定芽诱导率高达 78.20%,而其他几个株系再生率明显较低,说明基因型依然是影响野蔷薇再生能力的重要因素。进一步证实了蔷薇属植物遗传背景相对复杂,基因型对其叶片再生能力的影响尤为显著^[15]。通过花色与再生率的对应分析表明,同白花色系的野蔷薇 1 号和 4 号的诱导率比较接近,同红 花色系的野蔷薇 2 号和 3 号的诱导率也比较接近, 但是 2 组之间的诱导率差异较大,这也在一定程度 上说明野蔷薇的遗传背景(基因型)对叶片不定芽直 接诱导存在一定影响。

另外,在前人的一些研究报道中,叶片的来源对 蔷薇属植物种类的再生存在比较大的影响,而且各 报道结果有所不同^[6,15]。在相同培养条件下,田间 野蔷薇叶片的不定芽诱导率高于组培苗叶片。究其 原因,可能是因为野蔷薇田间叶片的生活力较强,经 过消毒后的叶片抗逆性变强,容易适应分化培养基。

诱导培养基中高质量浓度的 TDZ 对不定芽的 诱导和分化相对有利,但不利于不定芽的伸长和长 大,长时间在这种培养基上培养,可使不定芽畸形或 影响不定芽后期的发育,促进愈伤组织形成而降低 植株再生率^[6],本试验中也出现了类似现象。野蔷 薇不定芽诱导率随着 TDZ 质量浓度的升高而升高, 在 TDZ 1.5 mg/L 的时候达到最高,随着 TDZ 质量

浓度的升高,叶柄基部形成了大量的愈伤,愈伤不断 增殖,但难以形成正常植株,而且即使叶片基部形成 了不定芽但表现畸形,难以再生成正常的植株。另 外,研究表明野蔷薇的外植体在相同的培养基上能 产生不同的组织及结构,这种现象与梅花的再生研 究结果相一致^[16-17]。野蔷薇叶片的叶柄基部在相同 的培养条件下,还可形成愈伤组织和不定根,而且 有时在相同培养条件下,同基因型的不定芽的诱导 率有差异,可能是因为外植体的发育阶段不一,内源 生长激素的不均衡所致。

参 考 文 献

[1] LI X Q,KRASNYANSKI S F,KORBAN S S.Somatic embry- ogenesis,secondary somatic embryogenesis,and shoot organo- genesis in *Rosa* [J]. Journal of Plant Physiology, 2002, 159: 313-319.

[2] KIM C K,CHUNG J D,JEE S O,et al. Somatic embryogenesis from *in vitro* grown leaf explants of *Rosa hybrida* L. [J]. Jour- nal of Plant Biotechnology, 2003, 5(3): 169-172.

[3] PHILIPPE V,MARION M E,GUILLAUME G,et al. Somatic embryogenesis and transformation of the diploid *Rosa chinensis* cv. *old blush* [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2010, 100: 73-81.

[4] XING W,BAO M Z,QIN H D,et al. Micropropagation of *Rosa rugosa* through axillary shoots proliferation[J]. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 2010, 52: 69-75.

[5] 任桂芳,王建红,冯慧,等. 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.

[6] 高莉萍,包满珠. 月季萨蔓莎不定芽的直接诱导和植株再生的研究[J]. 中国农业科学, 2005, 38(4): 784-788.

[7] 张常青,洪波,王海琴,等. 地被月季‘*Royal bassino*’ 高频再生体系的建立[J]. 园艺学报, 2005, 32(6): 1065-1069.

[8] IRAHIM R,DEBERGH P C. Improvement of adventitious bud formation and plantlet regeneration from *in vitro* leaflet ex-

plants of roses (*Rosa hybrida* L.) [J]. Acta Horticulturae, 2000, 520: 271-279.

[9] IRAHIM R, DEBERGH P C. Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from *in vitro* leaf explants of roses (*Rosa hybrida* L.) [J]. Scientia Horticulturae, 2001, 88(1): 41-57.

[10] JABBARZADEH Z, MORTEZA K K. Factors affecting tissue culture of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) [J]. Scientia Horticulturae, 2005, 105: 475-482.

[11] PATI P K, SHARMA M, SOOD A. Direct shoot regeneration from leaf explants of *Rosa damascene* Mill [J]. In vitro Cell Dev Biol Plant, 2004, 40: 192-195.

[12] 郭艳超, 田传卫, 尚爱芹, 等. 粉团蔷薇叶片不定芽的直接诱导及植株再生[J]. 分子植物育种, 2006, 4(1): 27-30.

[13] 陈颖, 梁建丽, 陈晓丽, 等. 多花蔷薇胚性细胞悬浮系原生质体分离及再生植株[J]. 园艺学报, 2008, 35(10): 1491-1496.

[14] 田传卫, 尚爱芹, 张建平, 等. 多花蔷薇假珠芽诱导、体细胞胚发生及植株高效再生[J]. 园艺学报, 2008, 35(3): 403-408.

[15] DUBOIS L, DEVRIES D P, KOOT A. Direct shoot regeneration in the rose: genetic variation of cultivars [J]. Gartenbauwissenschaft, 2000, 65: 45-49.

[16] NING G G, BAO M Z. Plant regeneration from callus derived from immature embryo cotyledons of *Prunus mume* [J]. Hort-Science, 2007, 42: 744-747.

[17] 宁国贵, 吕海燕, 张俊卫, 等. 梅花不同外植体离体培养及体细胞胚诱导植株再生[J]. 园艺学报, 2010, 37(1): 114-120.

Factors influencing direct regeneration from leaves of *Rosa multiflora*

DING Meng SHEN Yu-xiao FU Xiao-peng BAO Man-zhu NING Guo-gui

College of Horticulture and Forestry Sciences ,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Factors affecting plant regenerations of four rose cultivars (*Rosa multiflora* Thunb.) were studied with leaves harvested directly from fields to further determine the optional culture condition and high frequent regeneration genotypes. Results showed that there was significant difference among the adventitious bud regeneration. The highest one (78.20%) was from *R. multiflora* 2, the second (61.16%) from *R. multiflora* 3, the third (13.00%) from *R. multiflora* 4 and the fourth (5.93%) from *R. multiflora*. The regeneration rate of leaves harvested directly from field is higher than that of leaves from sterile seedling *in vitro* culture. The results indicted that genotypes, plant hormones and the source of the explants had significant effect on the adventitious shoots induction. It is important to select suitable genotype and optional condition *in vitro* tissue culture of *R. multiflora* species.

Key words *Rosa multiflora* ; direct regeneration; genotype; adventitious bud; explant

(责任编辑: 张志钰)