

· 技术方法 ·

## 野蔷薇组培快繁和高效瞬时表达体系的建立

曹雪敏<sup>1,3†</sup>, 包颖<sup>2†</sup>, 张悦新<sup>1,3</sup>, 李瑞杰<sup>1,3</sup>, 苏健馨<sup>1,3</sup>, 张蔚<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>华中农业大学园艺林学学院, 果蔬作物种质创新与利用全国重点实验室, 武汉 430070; <sup>2</sup>唐山师范学院生命科学系, 河北省植物生物技术研究与应用重点实验室, 唐山 063000; <sup>3</sup>华中农业大学花卉研究所, 武汉 430070

**摘要** 以野蔷薇(*Rosa multiflora*)当年生带芽茎段为试材, 建立了其组培快繁体系。结果表明, 最佳外植体是带腋芽茎段, 外植体最佳消毒方法是先用75%乙醇浸泡30秒, 再用10%次氯酸钠溶液浸泡20分钟, 成活率可达96%; 带芽茎段萌芽最佳诱导培养基为MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.01 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.1 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>, 培养30天, 萌芽率可达98%; 无菌再生苗增殖最佳基础培养基为WPM, 增殖系数为2.87; 无菌再生苗生根最佳培养基为1/2MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA, 生根率可达93%; 无菌再生苗移栽成活率达98%。在此基础上, 以野蔷薇无菌再生苗为受体, 建立了野蔷薇瞬时表达体系。结果表明, 瞬时表达最佳转化条件是菌液OD<sub>600</sub>为0.8, 负压为-0.10 MPa, 真空抽吸2次, 每次15分钟, 瞬时表达效率可达96%。研究结果为建立野蔷薇再生及遗传转化体系奠定了基础, 并为蔷薇属植物基因功能研究提供技术支持。

**关键词** 野蔷薇, 快繁, 无菌再生苗, 真空渗透, 瞬时表达

曹雪敏, 包颖, 张悦新, 李瑞杰, 苏健馨, 张蔚 (2025). 野蔷薇组培快繁和高效瞬时表达体系的建立. 植物学报 60, 235–245.

野蔷薇(*Rosa multiflora*)又名多花蔷薇, 是蔷薇科(Rosaceae)蔷薇属(*Rosa*)落叶灌木, 其色彩艳丽, 花香清雅, 具蔓性, 是良好的春季观花植物, 在园林绿化中占有重要地位。由于野蔷薇易繁殖、生长快且适应性强, 因此常被用作嫁接月季(*R. chinensis*)的砧木, 同时也是现代月季栽培品种的重要亲本之一(Nakamura et al., 2018)。值得一提的是, 野蔷薇耐湿、耐热、抗寒且抗病; 其茎秆上皮刺种类单一, 着生位置较有规律, 自然界中存在野蔷薇无刺种质(Zhang et al., 2021)。此外, 野蔷薇为二倍体植物, 其基因组序列已公布(Nakamura et al., 2018)。因此, 野蔷薇是挖掘利用蔷薇属植物抗性基因和皮刺形成相关基因的天然优异基因资源库。

野蔷薇作为育种材料, 在现代月季的形成中发挥重要作用。但传统杂交育种仅能实现部分性状的改良, 且存在杂交不亲和性的问题, 导致杂交困难。即使杂交成功收获了种子, 其萌发率也较低, 或萌发不整齐(李增武等, 2011)。植物基因工程为定向改良植物性

状提供了可能。鉴定野蔷薇相关基因的功能, 并开展野蔷薇基因工程育种将为蔷薇属植物的抗性和皮刺等品质性状的定向改良提供基因资源和技术支撑, 而建立野蔷薇组培快繁体系是开展这些研究的基础。

有关蔷薇属植物组织培养的报道较多。闫海霞等(2016)建立了月季卡罗拉的组培快繁体系。李惠玲等(2020)以细梗蔷薇(*R. graciliflora*)的幼嫩茎段为试材, 探讨了不同消毒试剂、消毒时间以及植物生长调节剂配比对外植体腋芽诱导、丛生芽增殖及生根的影响, 并筛选出适宜各阶段培养的最佳培养基配方。鲁艺等(2022)以苦水玫瑰(*R. sertata* × *R. rugosa*)半木质化带芽茎段为外植体, 对消毒方式、增殖培养和生根培养等进行研究, 建立了组培快繁体系。然而, 有关野蔷薇的组织培养报道较少。丁萌(2012)以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, 筛选出不定芽诱导率最高的基因型和最佳诱导条件。目前尚未见野蔷薇带芽茎段组培快繁体系的报道。

收稿日期: 2024-04-24; 接受日期: 2024-08-20

基金项目: 国家自然科学基金(No.32072617)、河北省自然科学基金(No.C2021105002)和河北省现代农业产业技术体系建设专项(No.HBCT2024200405)

† 共同第一作者

\* 通讯作者。E-mail: zhangw@mail.hzau.edu.cn

由于野蔷薇尚未建立成熟稳定的遗传转化体系,因此目前对野蔷薇基因功能的研究多以模式植物为受体进行异源表达。瞬时转化方法是研究基因功能的有力工具,具有操作简捷、实验周期短、转化率高及表达量大等优势。它为尚未建立遗传转化体系的植物进行本源表达和反向遗传学研究提供了可能。刘雪梅等(2014)以棉花(*Gossypium hirsutum*)子叶为材料,以 $\beta$ -葡糖醛酸酶基因(*GUS*)和增强型绿色荧光蛋白基因(*eGFP*)为报告基因,对棉花子叶生长时间、农杆菌浓度和注射量以及共培养时间等进行分析并建立了农杆菌介导的棉花子叶瞬时表达系统。但目前关于野蔷薇瞬时表达体系的研究未见报道。

本研究以野蔷薇茎段为外植体进行离体培养研究,建立了野蔷薇快繁体系,以期野蔷薇规模化繁育提供技术支持。基于此,以野蔷薇无菌再生苗为受体开展野蔷薇瞬时表达效率研究,并建立野蔷薇瞬时表达体系,以期鉴定野蔷薇等蔷薇属植物的基因功能与启动子活性提供高效快捷的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

供试材料为采集于华中农业大学蔷薇科植物种质资源圃内的野蔷薇(*Rosa multiflora* Thunb.)。GV3101农杆菌感受态细胞购自上海唯地生物技术有限公司。DX2181G-*GUS*质粒由华中农业大学康春颖课题组惠赠。植物表达载体CaMV 35S::*GUS*由本课题组在此基础上插入35S启动子获得并保存。

硫酸卡那霉素(kanamycin sulfate, Kan)、利福平(rifampicin, Rif)和5-溴-4-氯-3-吲哚- $\beta$ -葡萄糖苷酸酯(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -glucuronide, X-Gluc)购自北京酷来搏科技有限公司。其它试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。GUS染色液配方见表1。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 外植体消毒

选取生长健壮的当年生野蔷薇带芽(顶芽/腋芽)茎段为外植体,去除叶片,再取适量的洗涤剂溶于水中,将外植体浸泡5–10分钟,然后用流水冲洗2小时。分别采用9种方案进行消毒处理(表2)。先用75%乙醇浸泡30秒,再用不同浓度次氯酸钠溶液浸泡不同时间,

表1 GUS染色液配方

Table 1 GUS staining solution formulation

Reagents	Required solvent dosage
0.2 mol·L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	38 mL
0.2 mol·L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	62 mL
100 mmol·L <sup>-1</sup> K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	1 mL
100 mmol·L <sup>-1</sup> K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	1 mL
0.5 mol·L <sup>-1</sup> NaEDTA	4 mL
0.1% Triton X-100	200 $\mu$ L
20% methanol	20 mL
X-Gluc	200 mg

表2 外植体消毒方案

Table 2 Explant disinfection scheme

Treatments	75% ethanol immersion time (s)	NaClO (%)	NaClO immersion time (min)
A	30	5	10
B	30	5	15
C	30	5	20
D	30	10	10
E	30	10	15
F	30	10	20
G	30	15	10
H	30	15	15
I	30	15	20

最后用无菌水冲洗3次,每次1分钟。在无菌滤纸上吸干水分,备用。每个方案接种15瓶,每瓶1个外植体,每个方案重复3次。接种后在光周期为16小时光照/8小时黑暗、温度为(22 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C、空气湿度为40%的条件下培养。4周后观察并统计污染率、褐化率和成活率。

污染率=(污染外植体数/接种外植体数) $\times$ 100%;

褐化率=(褐化外植体数/接种外植体数) $\times$ 100%;

成活率=(成活外植体数/接种外植体数) $\times$ 100%。

#### 1.2.2 启动培养

以野蔷薇消毒茎段为材料,在含不同浓度6-BA (0.5和1.0 mg·L<sup>-1</sup>)、NAA (0.01和0.1 mg·L<sup>-1</sup>)和GA<sub>3</sub> (0和0.1 mg·L<sup>-1</sup>)的启动培养基中培养(表3)。每处理接种10瓶,每瓶接种3个外植体,每处理重复3次。4周后统计萌芽率、苗高和复叶数。

萌芽率=(萌芽外植体数/接种外植体数) $\times$ 100%。

### 1.2.3 增殖培养

以野蔷薇无菌再生苗为材料, 在6种含不同类型基础培养基的增殖培养基中培养(表4)。每处理接种5瓶, 每瓶接种3个外植体, 每处理重复3次。4周后统计增殖系数。

增殖系数=接种后所得芽数/接种无菌再生苗总数。

### 1.2.4 生根培养

以野蔷薇无菌再生苗为材料, 在含有不同基础培养基(MS和1/2MS)、NAA (0.05和0.1 mg·L<sup>-1</sup>)和IBA (0.5和1.0 mg·L<sup>-1</sup>)的生根培养基中培养(表5)。每处理接种5瓶, 每瓶接种3个外植体, 每处理重复3次。4周后对生根率、平均生根数和根系状态进行统计分析。

生根率=(生根无菌再生苗数/接种无菌再生苗总数)×100%;

平均生根数=生根条数之和/接种无菌再生苗总数。

表3 野蔷薇启动培养的处理方案

Table 3 Treatment schemes for the initiation culture of *Rosa multiflora*

Treatments	Basic medium	6-BA (mg·L <sup>-1</sup> )	NAA (mg·L <sup>-1</sup> )	GA <sub>3</sub> (mg·L <sup>-1</sup> )
A1	MS	0.5	0.01	0
A2	MS	1.0	0.01	0
A3	MS	0.5	0.1	0
A4	MS	1.0	0.1	0
A5	MS	0.5	0.01	0.1
A6	MS	1.0	0.01	0.1
A7	MS	0.5	0.1	0.1
A8	MS	1.0	0.1	0.1

表4 野蔷薇增殖培养处理方案

Table 4 Treatment schemes for the propagation culture of *Rosa multiflora*

Treatments	Basic medium	Sucrose (%)	Agar (%)
B1	MS	3	0.75
B2	1/2MS	3	0.75
B3	QL	3	0.75
B4	1/2QL	3	0.75
B5	WPM	3	0.75
B6	B5	3	0.75

### 1.2.5 炼苗移栽

以野蔷薇4–5 cm生根苗为材料, 在22–24°C、光照强度为92.5 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>的生长室过渡培养3天, 再将瓶盖打开培养1周, 然后用流水清洗以去除根部培养基, 用多菌灵水(按1:1 000的比例稀释)浸泡根系30分钟, 稍微晾干根部水分后栽入泥炭:蛭石:珍珠岩质量比为4:2:1的混合基质中。每个重复移栽40株生根苗, 重复3次。1个月后统计成活率。

成活率=(成活植株数/移栽植株数)×100%。

### 1.2.6 农杆菌转化及鉴定

农杆菌转化采用冻融法。取–80°C保存的GV3101农杆菌感受态细胞于冰水浴中融化。在无菌条件下取50 μL感受态细胞加入1.5 mL离心管中, 并加入1 μL质粒DNA, 轻轻混匀, 冰水浴中静置5分钟。将离心管置于液氮中速冻5分钟, 快速将离心管置于37°C水浴中保持5分钟。将离心管放回冰水浴中保持5分钟。在无菌条件下向离心管中加入400 μL不含抗生素的LB液体培养基, 于28°C摇床内振荡培养1小时。取100–200 μL菌液涂布在含Kan的LB固体培养基上, 于28°C培养箱中倒置培养过夜。

取1.5 mL离心管, 加入85 μL 2×Taq、85 μL ddH<sub>2</sub>O、10 μL上游引物(DX-F: 5'-GTCCAGCTCG-ACCAGGATGGGC-3')及10 μL下游引物(DX-R: 5'-TGCCCGGCTTTCTTGTAACGCG-3')。高速涡旋混匀后脱壁离心, 在取样板的9个孔内分别加入20 μL上述混合底物, 在无菌条件下挑取农杆菌单克隆进行菌落PCR阳性鉴定。PCR反应程序: 94°C3分钟; 94°C30秒, 60°C1分钟, 72°C1分钟, 35个循环; 72°C10分钟。取PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

表5 野蔷薇生根培养处理方案

Table 5 Treatment schemes for the rooting culture of *Rosa multiflora*

Treatments	Basic medium	NAA (mg·L <sup>-1</sup> )	IBA (mg·L <sup>-1</sup> )
C1	MS	0.05	0
C2	MS	0.1	0
C3	1/2MS	0.05	0
C4	1/2MS	0.1	0
C5	MS	0	0.5
C6	MS	0	1.0
C7	1/2MS	0	0.5
C8	1/2MS	0	1.0

### 1.2.7 农杆菌侵染野蔷薇无菌再生苗及共培养

挑取鉴定的农杆菌阳性单菌落, 接种至5 mL含50 mg·L<sup>-1</sup> Kan和25 mg·L<sup>-1</sup> Rif的LB液体培养基中, 于28°C摇床内过夜培养。吸取3 mL菌液, 加入300 mL含50 mg·L<sup>-1</sup> Kan和25 mg·L<sup>-1</sup> Rif的LB液体培养基扩大培养, 待OD<sub>600</sub>值为0.6–0.8时停止培养。在50 mL离心管内取适量含农杆菌的LB液体培养基, 2 054 ×g离心8分钟, 去除上清液并加入30 mL重悬液(含1 mol·L<sup>-1</sup> MES (pH5.6)、2 mol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 和100 mmol·L<sup>-1</sup> AS), 高速涡旋混匀。

将启动培养30天的野蔷薇无菌再生苗浸没在含农杆菌的重悬液中, 用真空泵抽真空。设3因素(菌液密度、真空处理压强和真空处理时间) 3水平试验, 采用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交表(表6)。侵染后用灭菌水清洗无菌再生苗, 用滤纸吸干植株表面水分后置于培养基(MS+30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖+7.5 g·L<sup>-1</sup>琼脂, pH5.8–6.0)内进行共培养(24°C暗培养24小时, 再转入24°C、每天16小时光照/8小时黑暗, 培养24小时)。每处理接种3瓶, 每瓶接种3个外植体, 每处理重复3次。

### 1.2.8 GUS组织染色

将共培养后的无菌再生苗放入50 mL离心管内, 加入GUS染色液直至没过无菌再生苗, 用真空泵(气压设为–0.09 MPa)抽真空10分钟, 重复抽真空1次。将离心管用锡纸包裹后置于37°C培养箱内培养12小时以上。去除离心管内的废液, 加入95%乙醇进行脱色处理, 7–8小时更换1次乙醇直至野蔷薇无菌再生苗完全脱色并出现蓝色底物。对染色结果进行统计分析, 并

表6 野蔷薇无菌再生苗瞬时表达实验设计

Table 6 Experimental design for transient expression of sterile re-generated plantlets of *Rosa multiflora*

Treatments	Bacterium OD <sub>600</sub>	Vacuum pressure (MPa)	Vacuum processing time (min)
D1	0.6	–0.06	5
D2	0.8	–0.08	5
D3	1.0	–0.10	5
D4	1.0	–0.08	10
D5	0.8	–0.06	10
D6	0.6	–0.10	10
D7	0.6	–0.08	15
D8	0.8	–0.10	15
D9	1.0	–0.06	15

拍照记录。

$$\text{瞬时表达效率} = (\text{染蓝植株数} / \text{染色植株数}) \times 100\%。$$

### 1.2.9 统计分析

使用SPSS Statistics V22软件进行差异显著性检验(Duncan's多重比较)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同消毒方法对野蔷薇带芽茎段消毒效果的影响

9种消毒方案对带顶芽茎段的消毒效果(表7)表明, 方案A对带顶芽茎段的消毒效果最佳, 成活率最高, 为29.6%; 方案B和方案D次之, 均为7.41%; 其它6种方案消毒效果差, 成活率为0。采用次氯酸钠溶液消毒带顶芽茎段, 在消毒时间相同的情况下, 成活率随着次氯酸钠溶液浓度的增加而降低; 在次氯酸钠溶液浓度相同的情况下, 成活率随着消毒时间的增加而降低。综上, 确定方案A为野蔷薇带顶芽茎段的最佳消毒方案。

9种消毒方案对带腋芽茎段的消毒效果(表8)表明, 方案F对带腋芽茎段的消毒效果最佳, 成活率为96.3%; 方案C和方案D次之, 均为81.48%; 其它6种方案消毒效果差。采用次氯酸钠溶液消毒野蔷薇带腋芽茎段, 在消毒时间相同的情况下, 成活率随着次氯酸钠溶液浓度的增加呈先增加后降低的趋势, 消毒

表7 不同消毒方法对野蔷薇带顶芽茎段消毒效果的影响

Table 7 Effects of different disinfection methods on the stem segments with apical buds of *Rosa multiflora*

Treatments	Contamination rate (%)	Browning rate (%)	Survival rate (%)
A	11.11±0.00 a	59.26±6.42 b	29.60±6.42 a
B	0.00±0.00 b	92.59±6.42 a	7.41±6.42 b
C	7.41±6.42 ab	100.00±0.00 a	0.00±0.00 b
D	0.00±0.00 b	92.59±6.42 a	7.41±6.42 b
E	3.70±6.42 b	100.00±0.00 a	0.00±0.00 b
F	0.00±0.00 b	100.00±0.00 a	0.00±0.00 b
G	0.00±0.00 b	100.00±0.00 a	0.00±0.00 b
H	0.00±0.00 b	100.00±0.00 a	0.00±0.00 b
I	0.00±0.00 b	100.00±0.00 a	0.00±0.00 b

同列不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

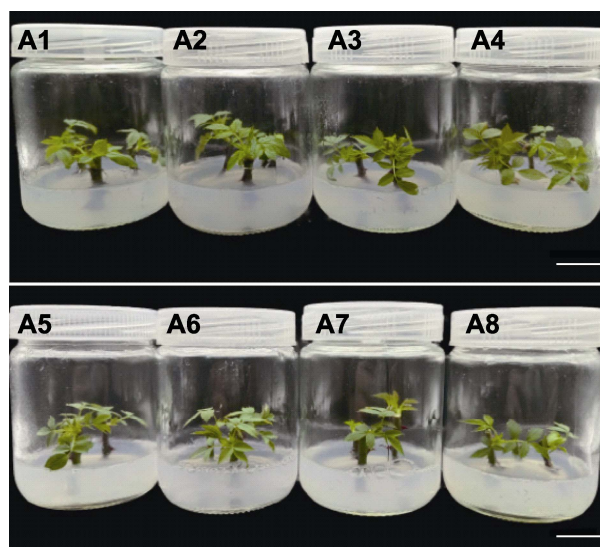
15分钟成活率最高;采用相同浓度的次氯酸钠溶液消毒时,次氯酸钠溶液浓度为5%或10%,在测试范围内成活率随着消毒时间的增加呈先降低后增高,次氯酸钠溶液浓度为15%,在测试范围内成活率随着消毒时间的增加而降低。综上,确定方案F为野蔷薇带腋芽茎段的最佳消毒方案。

综上,后续实验均采用带腋芽茎段,并使用消毒方案F。

## 2.2 不同类型植物生长调节剂及浓度对野蔷薇萌发效果的影响

野蔷薇带腋芽茎段在A1–A8培养基上的生长状态如图1所示。在8种培养基上启动培养的结果(表9)表明,在A4、A5和A6中的萌芽率最高,均为98.89%;在A2和A7中的萌芽率次之,为97.78%;再次为A3和A8,萌芽率为96.67%;在A1中的萌芽率最低,为92.22%。在A2中的苗高最高,为1.52 cm;A6中的苗高次之,为1.35 cm;其它7种培养基中的苗高均在1.1–1.3 cm之间。在A4中的复叶数最多,为5.17片;A6次之,为5.07片;其它7种培养基中的复叶数在4.17–4.94片之间。当GA<sub>3</sub>浓度为0时,萌芽率、苗高及复叶数随着6-BA浓度的增加而提高,6-BA最佳浓度为1.0 mg·L<sup>-1</sup>;当GA<sub>3</sub>浓度为0.1 mg·L<sup>-1</sup>时,萌芽率随着6-BA浓度的增加而降低,苗高和复叶数随着6-BA浓度的增加而提高。当GA<sub>3</sub>浓度为0时,萌芽率和复叶数随着NAA浓度的增加而增高,苗高随着

NAA浓度的增加而降低;当GA<sub>3</sub>浓度为0.1 mg·L<sup>-1</sup>时,萌芽率、苗高及复叶数随着NAA浓度的增加而降低(表9)。综上表明,A2为促进幼苗增高的最佳培养基;A4为促进幼苗叶片生长的最佳培养基;A6为萌芽综合效果最佳培养基。



**图1** 野蔷薇在不同启动培养基上的生长状态  
A1–A8同表3。每处理接种10瓶,每瓶接种3个外植体,每处理重复3次。Bars=1.5 cm

**Figure 1** Growth condition of *Rosa multiflora* on different initiation media

A1–A8 are the same as shown in Table 3. Each treatment is inoculated with 10 vials, each vial is inoculated with 3 explants, and each treatment is repeated 3 times. Bars=1.5 cm

**表9** 不同植物生长调节剂类型及浓度对野蔷薇萌发效果的影响

**Table 9** Effects of different plant growth regulator types and concentrations on the germination of *Rosa multiflora*

Treatments	Germination rate (%)	Plant height (cm)	Number of compound leaves (slice)
A1	92.22±7.70 a	1.30±0.50 bc	4.37±1.39 cd
A2	97.78±1.92 a	1.52±0.59 a	4.94±1.72 abc
A3	96.67±3.34 a	1.20±0.59 bc	4.45±1.46 cd
A4	98.89±1.92 a	1.25±0.50 bc	5.17±1.41 a
A5	98.89±1.92 a	1.11±0.39 c	4.74±1.64 abcd
A6	98.89±1.92 a	1.35±0.45 b	5.07±1.61 ab
A7	97.78±1.92 a	1.15±0.48 bc	4.17±1.71 d
A8	96.67±5.77 a	1.25±0.41 bc	4.69±1.77 abcd

A1–A8同表3。同列不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

A1–A8 are the same as shown in Table 3. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ( $P<0.05$ ).

**表8** 不同消毒方法对野蔷薇带腋芽茎段消毒效果的影响

**Table 8** Effects of different disinfection methods on the stem segments with axillary buds of *Rosa multiflora*

Treatments	Contamination rate (%)	Browning rate (%)	Survival rate (%)
A	3.70±6.42 a	18.52±6.42 ab	77.78±11.11 a
B	7.41±6.42 a	25.93±6.42 a	66.67±0.00 a
C	3.70±6.42 a	14.81±6.42 ab	81.48±6.42 a
D	7.41±6.42 a	11.11±0.00 b	81.48±6.42 a
E	14.81±16.97 a	14.81±6.42 ab	70.37±16.97 a
F	3.70±6.42 a	0.00±0.00 c	96.30±6.42 a
G	11.11±11.11 a	14.81±6.42 ab	74.07±16.97 a
H	0.00±0.00 a	25.93±6.42 a	74.07±6.42 a
I	18.52±12.83 a	11.11±0.00 b	70.37±12.83 a

同列不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ( $P<0.05$ ).

### 2.3 基础培养基类型对野蔷薇增殖系数的影响

在增殖培养阶段,野蔷薇叶片黄化及老叶萎蔫脱落的现象尤为严重,严重影响无菌再生苗的增殖,因此在增殖培养基筛选中将改善叶片黄化作为重要标准。

野蔷薇无菌再生苗在6种基础培养基上增殖培养结果(图2)表明,在以WPM为基础培养基的B5中增殖系数最高,为2.87;在以QL为基础培养基的B3中次之,增殖系数为2.60;在其它4种培养基中的增殖系数介于2.09–2.49之间。6种培养基中野蔷薇无菌再生苗生长状态(图3)显示,在以WPM为基础培养基的B5中,无菌再生苗生长状态最佳,植株健壮、叶片墨绿、有少量老叶黄化;在以1/2MS为基础培养基的B2中次之,植株较为健壮、叶片墨绿、有少量叶片黄化;再次为以1/2QL为基础培养基的B4中,植株较为健壮、叶片翠绿、有少量叶片黄化;在其它3种培养基中的植株生长状态较差,在B1中植株较小且主茎不明显,在B3中植株长势一般、叶片偏黄,在B6中植株极弱、叶片基本黄化。综上,最终确定WPM为增殖培养的基础培养基。

### 2.4 不同培养基配方对野蔷薇生根效果的影响

8种处理均获得了野蔷薇生根苗,根部状态如图4所示。生根结果(表10)表明,野蔷薇在C3和C4中的生根率最高,均为93.33%;在C1和C2中的生根率次之,均为88.33%;在C5–C8中的生根率较低,分别为81.67%、81.67%、78.33%和86.67%。在C3中的平均生根数最大,为9.78根;C2中次之,为9.30根;其

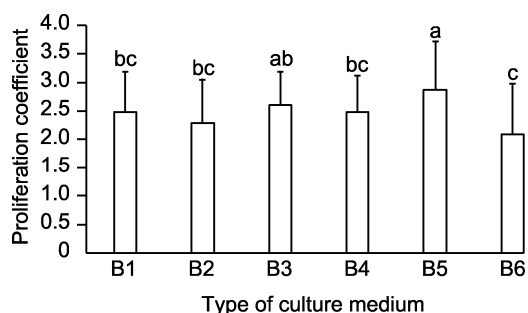


图2 基础培养基类型对野蔷薇增殖系数的影响  
B1–B6同表4。不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

Figure 2 Effects of basal medium types on the proliferation coefficient of *Rosa multiflora*  
B1–B6 are the same as shown in Table 4. Different lower-case letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ).

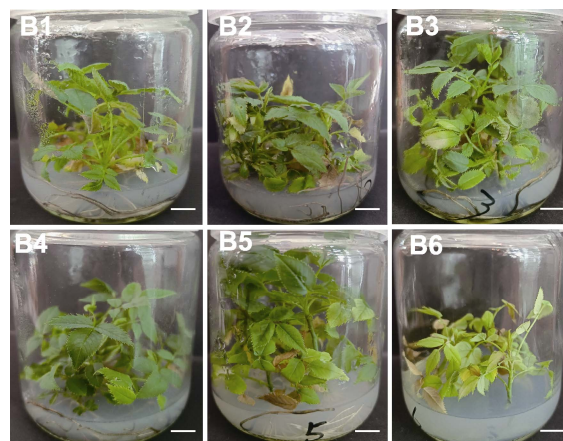


图3 野蔷薇在不同增殖培养基上的生长状态  
B1–B6同表4。每处理接种5瓶,每瓶接种3个外植体,每处理重复3次。Bars=1 cm

Figure 3 Growth condition of *Rosa multiflora* on different proliferation media  
B1–B6 are the same as shown in Table 4. Each treatment is inoculated with 5 vials, each vial is inoculated with 3 explants, and each treatment is repeated 3 times. Bars=1 cm

它7种处理的平均生根数介于6.68–8.85之间;9种处理之间无显著差异。在C4中的根系状态最佳,根粗壮且根系发达;C2和C6中次之,根粗壮且根系长势良好;其它6种处理的根较短且根系长势较弱。以MS为基础培养基时,随着NAA浓度的增加,生根率不变,平均生根数增加,根系状态改善;以1/2MS为基础培养基时,随着NAA浓度的增加,生根率增加,平均生根数降低,根系状态改善。以MS为基础培养基时,随着IBA浓度的增加,生根率增加,平均生根数增加,根系状态改善;以1/2MS为基础培养基时,随着IBA浓度的增加,生根率增加,平均生根数降低,根系状态不变。NAA与IBA均具有促进野蔷薇无菌再生苗生根的作用,且NAA对生根的促进作用大于IBA。综上,最终确定C4为野蔷薇无菌再生苗最佳生根培养基。

### 2.5 炼苗与移栽

野蔷薇生根苗移栽后长势良好(图5),叶片多数呈绿色,30天后统计成活率为98%。

### 2.6 不同处理对野蔷薇瞬时表达效率的影响

9种处理均获得了野蔷薇瞬时表达的阳性植株(表11;图6),不同处理下野蔷薇瞬时表达效率显示,D8的瞬

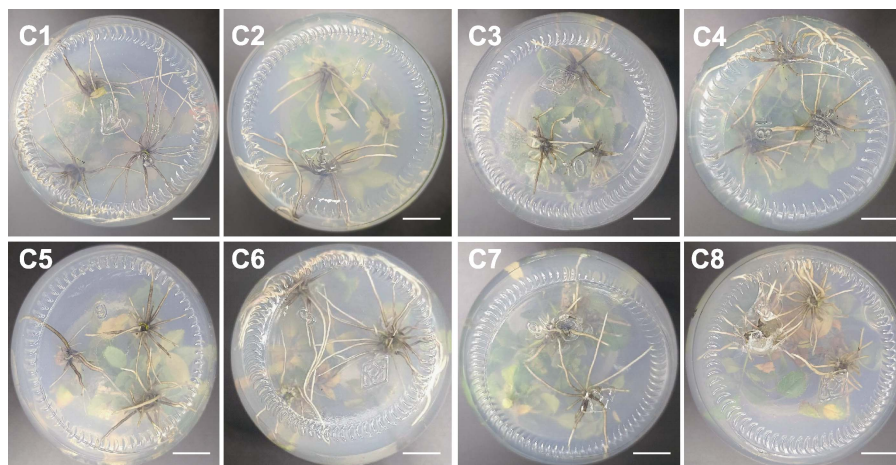


图4 野蔷薇在不同生根培养基上的根部状态

C1–C8同表5。每处理接种5瓶, 每瓶接种3个外植体, 每处理重复3次。Bars=1 cm

Figure 4 Root condition of *Rosa multiflora* on different rooting media

C1–C8 are the same as shown in Table 5. Each treatment is inoculated with 5 vials, each vial is inoculated with 3 explants, and each treatment is repeated 3 times. Bars=1 cm

表10 不同培养基配方对野蔷薇生根的影响

Table 10 Effects of different media formulations on the rooting of *Rosa multiflora*

Treatments	Rooting rate (%)	Average number of roots (root)	Root status
C1	88.33±2.89 ab	8.22	Short roots, weak growth
C2	88.33±2.89 ab	9.30	Strong roots, grow well
C3	93.33±7.64 ab	9.78	Short roots, weak growth
C4	93.33±2.89 a	8.85	Strong roots, grow well
C5	81.67±5.77 ab	8.25	Short roots, weak growth
C6	81.67±2.89 ab	8.47	Strong roots, grow well
C7	78.33±5.77 b	6.68	Short roots, weak growth
C8	86.67±5.77 ab	7.18	Short roots, weak growth

C1–C8同表5。同列不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

C1–C8 are the same as shown in Table 5. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ( $P<0.05$ ).



图5 野蔷薇生根苗炼苗移栽过程

(A) 生根的无菌再生苗; (B) 移栽当天的植株; (C) 移栽30天后的植株。每个重复移栽40株生根苗, 重复3次。Bars=1 cm

Figure 5 The transplanting process of rooted plantlets of *Rosa multiflora*

(A) Rooted sterile regenerated plantlets; (B) Plantlets on the first day of transplanting; (C) Plantlets transplanted 30 days later. Transplant 40 rooted plantlets per replicate and repeat 3 times. Bars=1 cm

时表达效率最高, 为96.3%; D3的瞬时表达效率次之, 为65.27%; 其它7种方案的瞬时表达效率介于4.76%–52.89%之间。当真空负压时间为5分钟时, 瞬时表达效率随着菌液浓度的增加而增加; 当真空负压时间为10分钟时, 瞬时表达效率随着菌液浓度的增加先降低后增加; 当真空负压时间为15分钟时, 瞬时表达效率随着菌液浓度的增加先增加后降低。当真空负压时间为5分钟或10分钟时, 瞬时表达效率随着真空压强的增加而增加; 当真空负压时间为15分钟时, 瞬时表达效率随着真空压强的增加先降低后增加。综上, 最终确定D8为野蔷薇无菌再生苗瞬时表达最佳处理方案。

**表11** 不同处理对野蔷薇瞬时表达效率的影响**Table 11** Effects of different treatments on the transient expression efficiency of *Rosa multiflora*

Treatments	Transient expression efficiency (%)	Staining effect
D1	14.07±12.24 d	Pale blue, flake area blue
D2	30.63±2.44 cd	Pale blue, flake area blue
D3	65.27±17.71 b	Blue, flake area blue
D4	52.38±10.82 bc	Pale blue, leaf blue
D5	15.87±5.72 d	Blue, flake area blue
D6	52.89±17.16 bc	Blue, leaf blue
D7	4.76±8.25 d	Blue, leaf blue
D8	96.30±6.42 a	Blue, leaf blue
D9	31.19±7.84 cd	Blue, flake area blue

D1–D9同表6。同列不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

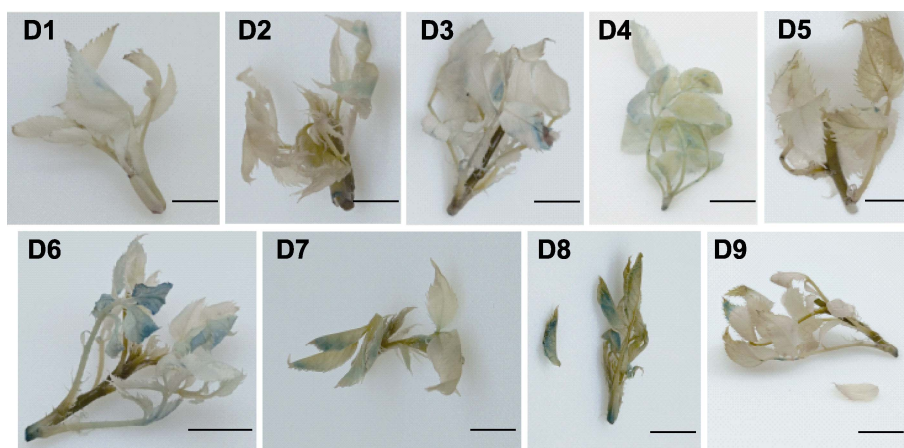
D1–D9 are the same as shown in Table 6. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ( $P<0.05$ ).

## 2.7 讨论

外植体消毒是实现组培快繁的前提,高效的消毒方法在保持低污染率的同时,还要确保对外植体活性影响较小(周玉洁等, 2019)。不同种类的植物采用相同的消毒方法,消毒效果存在较大差异(穆建鑫, 2021; 李佳慧等, 2022)。同一种植物采用不同种类的消毒液,或同一种消毒液的不同浓度,消毒效果也存在较大差

异(任菲宏等, 2023)。同一种植物不同取材部位,选择不同的消毒方法效果差异明显(赵月玲等, 2001; 强泽宇, 2015; 龚维红, 2022)。因此,根据前人对蔷薇科木本植物消毒的研究,我们选择2种外植体,在3种不同浓度的次氯酸钠溶液中浸泡不同时间。在相同的消毒条件下,带腋芽茎段均比带顶芽茎段的消毒效果好,这可能与茎段的幼嫩程度有关。茎段消毒效果还受到取材时间的影响,每年春季(3–4月)是最佳取材时间,该时段取材污染率低,消毒效果好,幼苗粗壮,生长较快;夏季(6–8月)取材的茎段消毒困难,真菌污染严重,这可能与材料生长环境炎热及病虫害严重有关。

培养基中植物生长调节剂的种类及配比对植物生长和分化影响较大(宋常美和文晓鹏, 2015; 闫允青等, 2017; 刘亚娟等, 2018)。参照前人的相关研究,本研究设置多个6-BA、NAA和GA<sub>3</sub>的浓度组合。闫允青等(2017)发现6-BA对雪花梨(*Pyrus bretschneideri*)分化的影响较大。本研究也发现,当6-BA浓度从0.5增加到1.0 mg·L<sup>-1</sup>时,野蔷薇的萌芽率、苗高及复叶数也随之提高。彭奎莉等(2018)发现IBA有利于丰花月季北京红(*Rosa Beijing Red*)植株生根;而李晓亮等(2017)在筛选滇红食用玫瑰(*Rosa rugosa Dianhong*)的生根培养基时发现, NAA的生根效果优于IBA。本研究表明, NAA与IBA均具有促进野蔷薇无菌

**图6** 不同处理下野蔷薇无菌再生苗GUS染色效果

D1–D9同表6。每处理接种3瓶,每瓶接种3个外植体,每处理重复3次。Bars=1 cm

**Figure 6** Effects of different treatments on GUS staining of sterile regenerated plantlets of *Rosa multiflora*

D1–D9 are the same as shown in Table 6. Each treatment is inoculated with 3 vials, each vial is inoculated with 3 explants, and each treatment is repeated 3 times. Bars=1 cm

再生苗生根的作用,且NAA促进生根的作用大于IBA。值得一提的是,徐立军等(2015)发现大马士革玫瑰(*R. damascene* var. *kazanlika*)芽苗生根率随着NAA浓度的增加而降低;而本研究发现,NAA能促进野蔷薇无菌再生苗生根。但是,NAA浓度对生根率无显著影响,而影响根系的生长状态。当NAA浓度从0.05增加到0.1 mg·L<sup>-1</sup>时,野蔷薇的根系更加粗壮发达。

侵染方法是实现植物高效瞬时表达的关键,在提高转化效率的同时,还需确保受体材料在检测前保持良好的生长状态。研究发现,菌液浓度是瞬时表达的关键因素,不同浓度菌液对瞬时转化效率的影响差异较大(李静等,2006;张燕红,2008;王悦,2020)。此外,不同的真空压强和真空负压时间也会对瞬时转化效率产生较大影响(李静等,2006;杨丽萍等,2016)。近年来,有关蔷薇科木本植物瞬时表达体系的研究日益增多。Lu等(2017)用中国古老月季月月粉(*R. chinensis* cv. 'Old Blush')无菌再生苗建立瞬时表达体系,发现菌液OD<sub>600</sub>为0.2(菌株GV3101)、真空压强为-0.5 MPa、侵染5分钟时转化效率最高。李心悦等(2018)得出菌液OD<sub>600</sub>为0.6(菌株EHA105)、侵染3.5小时是新疆野苹果(*Malus sieversii*)无菌再生苗的最优转化条件。李刚等(2021)研究表明,瞬时转化杜梨(*Pyrus betulifolia*)叶片的最适条件是菌液OD<sub>600</sub>为0.8(菌株GV3101)或1.0(菌株EHA105),压强为-0.09 MPa,真空渗入20分钟。本研究发现,菌液OD<sub>600</sub>为0.8(菌株GV3101)、压强为-0.10 MPa、侵染时间为30分钟(负压2次,每次15分钟)时,野蔷薇组培苗的瞬时表达效率最高,可达96.3%。以上结果表明,由于实验材料本身木质化程度以及表皮质地的差异,其最适的瞬时表达条件会有所不同。

本研究采用“带芽茎段消毒、萌芽、增殖、生根、炼苗移栽”途径,实现带芽茎段扩繁。在此基础上,采用无菌再生苗真空侵染法,实现野蔷薇无菌再生苗瞬时表达,表达效率为96.3%。本研究建立了野蔷薇快繁体系和瞬时表达体系,为建立野蔷薇再生体系和遗传转化体系奠定了基础,并为实现野蔷薇的性状改良提供了技术支持。

## 作者贡献声明

曹雪敏,包颖:完成实验、分析数据和撰写论文初稿;

张悦新,李瑞杰:分析数据;苏健馨:提供技术支持;张蔚:构思并设计实验,修改论文。

## 参考文献

- 丁萌(2012). 野蔷薇再生体系的建立及其遗传转化的研究. 硕士学位论文. 武汉:华中农业大学. pp. 14-38.
- 龚维红(2022). 大马士革玫瑰组培与快繁技术研究. 安徽农学通报 28, 19-21.
- 李刚,宋平丽,王翔,马青翠,张海霞,张玉星,许建锋,亓宝秀(2021). 农杆菌介导的杜梨叶片瞬时转化方法的建立. 果树学报 38, 2006-2013.
- 李惠玲,罗玉兰,章漳,尹丽娟,李圃锦,张冬梅(2020). 细梗蔷薇种子发芽及组织培养技术研究. 中国农学通报 36(13), 89-93.
- 李佳慧,叶维雁,朱鹏锦,庞新华,张继,唐毓玮,韦俏宇(2022). 猫须草无菌短枝组织培养与快速繁殖体系的建立. 热带作物学报 43, 2063-2070.
- 李静,陈敏,刘现伟,沈法富,王鹏(2006). 莴苣高效瞬时表达体系的建立. 园艺学报 33, 405-407.
- 李晓亮,张军云,张钟,董春富,杨世先,王文智,张建康,张翠萍(2017). 滇红食用玫瑰生根培养基的试验筛选研究. 西南农业学报 30, 656-663.
- 李心悦,张克闯,张道远,李进,王玉成(2018). 新疆野苹果瞬时遗传转化方法建立及初步验证. 分子植物育种 16, 7315-7321.
- 李增武,钟玲,赵梁军(2011). 野蔷薇种子休眠和萌发整齐度研究. 种子 30(10), 42-44.
- 刘雪梅,王蕾,文添龙,何鹏,俞嘉宁(2014). 农杆菌介导的棉花子叶瞬时表达系统的建立. 植物学报 49, 587-594.
- 刘亚娟,杨小艳,谢树章,吴红,高立均(2018). 芳纯月季组培快繁技术研究. 西南师范大学学报(自然科学版) 43(8), 52-56.
- 鲁艺,史文君,黄淑丹,肖明(2022). 苦水玫瑰组培快繁技术研究. 青海大学学报 40(3), 41-46.
- 穆建鑫(2021). '中梨一号'梨再生体系建立及秋子梨遗传转化体系探索. 硕士学位论文. 南京:南京农业大学. pp. 13-24.
- 彭奎莉,孟繁博,周志达,郑关任,张金柱,杨涛,车代弟(2018). 不同基因型丰花月季快繁体系差异的研究. 见:张启翔. 中国观赏园艺研究进展2018. 北京:中国林业出版社. pp. 480-486.
- 强泽宇(2015). 中华金叶榆繁殖技术研究. 硕士学位论文. 保定:河北农业大学. pp. 6-12.

- 任菲宏, 王姣, 李晓松, 石丽妹, 任红艳, 吴茂宏 (2023). 外植体取样时间和消毒方式对沙子空心李诱导培养的影响. 现代农业科技 (12), 77–79.
- 宋常美, 文晓鹏 (2015). 4种贵州樱桃的高效离体再生. 西南大学学报(自然科学版) 37(9), 19–24.
- 王悦, 吴艳菊, 孟大伟, 郎晨婧, 赖薪宇, 刘佳, 葛禹凡, 杨丽萍 (2020). 植物瞬时表达体系真空侵染法的优化. 分子植物育种 18, 6743–6748.
- 徐立军, 李志斌, 蒋淑磊, 李振勤 (2015). 大马士革玫瑰组织培养技术研究. 河北林业科技 (2), 19–21.
- 闫海霞, 蒋月喜, 黄昌艳, 邓杰玲, 何荆洲, 王晓国, 卜朝阳 (2016). 月季‘卡罗拉’的组培快繁技术. 热带作物学报 37, 1741–1746.
- 闫允青, 姜桦韬, 谷超, 吴俊 (2017). ‘雪花梨’扩繁和叶片再生体系的建立. 南京农业大学学报 40, 68–75.
- 杨丽萍, 许亚男, 刘雨晴, 孟大伟, 金太成 (2016). 利用根部真空侵染法在烟草中瞬时表达外源蛋白. 分子植物育种 14, 3385–3389.
- 张燕红, 黄乐平, 周小云, 王冬梅 (2008). 农杆菌真空渗透法转化棉花花粉的初步研究. 棉花学报 20, 354–358.
- 赵月玲, 王汉海, 程贯召, 杜延飞 (2001). 枣组织培养中外植体取材部位的比较研究. 潍坊学院学报 1(2), 53–54, 43.
- 周玉洁, 韦雪芬, 申长青, 李焜钊, 孙朝辉, 黄久香 (2019). 濒危植物四药门花的组培快繁. 植物生理学报 55, 635–641.
- Lu J, Bai MJ, Ren HR, Liu JY, Wang CQ (2017). An efficient transient expression system for gene function analysis in rose. *Plant Methods* 13, 116.
- Nakamura N, Hirakawa H, Sato S, Otagaki S, Matsumoto S, Tabata S, Tanaka Y (2018). Genome structure of *Rosa multiflora*, a wild ancestor of cultivated roses. *DNA Res* 25, 113–121.
- Zhang Y, Zhao MJ, Zhu W, Shi CM, Bao MZ, Zhang W (2021). Nonglandular prickle formation is associated with development and secondary metabolism-related genes in *Rosa multiflora*. *Physiol Plant* 173, 1147–1162.

## Tissue Culture, Rapid Propagation and Efficient Transient Expression Systems of *Rosa multiflora*

Xuemin Cao<sup>1,3†</sup>, Ying Bao<sup>2†</sup>, Yuexin Zhang<sup>1,3</sup>, Ruijie Li<sup>1,3</sup>, Jianxin Su<sup>1,3</sup>, Wei Zhang<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>National Key Laboratory for Germplasm Innovation & Utilization of Horticultural Crops, College of Horticulture & Forestry Sciences of Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; <sup>2</sup>Hebei Key Laboratory of Plant Biotechnology Research and Application, Department of Life Science, Tangshan Normal University, Tangshan 063000, China

<sup>3</sup>Institute of Flowers Research, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract** A rapid propagation system via tissue culture for *Rosa multiflora* was established using the stem segments with buds of the current-year as the experimental material. The results showed that the best explants were stem segments with axillary buds. The best disinfection method was to soak the explants in 75% ethanol for 30 seconds, and then soak them in 10% sodium hypochlorite solution for 20 minutes. The survival rate can reach 96%. The optimal bud-induction medium was MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.01 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.1 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>. The budding rate can reach 98% after 30 days of cultivation. WPM was the best basal medium for the proliferation of sterile regenerated plantlets, and the proliferation coefficient was 2.87. The best medium for rooting was 1/2MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA, and the rooting rate can reach 93%. The transplanting survival rate of sterile regenerated plantlets was 98%. On this basis, the transient expression system of *R. multiflora* was established. The results showed that the optimal transformation conditions for transient expression were OD<sub>600</sub> of 0.8 for the bacterium culture medium, vacuum negative pressure of -0.10 MPa and vacuum suction twice for 15 minutes each time. The transient expression efficiency can reach 96%. The results of this study laid a foundation for the establishment of regeneration and genetic transformation system of *R. multiflora*, and also provided technical support for studying on the gene function of *Rosa* plants.

**Key words** *Rosa multiflora*, rapid propagation, sterile regenerated plantlets, vacuum infiltration, transient expression

Cao XM, Bao Y, Zhang YX, Li RJ, Su JX, Zhang W (2025). Tissue culture, rapid propagation and efficient transient expression systems of *Rosa multiflora*. *Chin Bull Bot* **60**, 235–245.

† These authors contributed equally to this paper

\* Author for correspondence. E-mail: zhangw@mail.hzau.edu.cn

(责任编辑: 白羽红)

### 通讯作者/团队简介

张蔚, 华中农业大学园艺林学学院副教授, 硕士生导师。长期从事园林植物种质资源创新与利用研究。以通讯作者身份在 *Journal of Experimental Botany*、*Environmental and Experimental Botany* 及《植物学报》和《园艺学报》等国内外学术期刊发表论文20余篇。目前其研究团队聚焦于园林植物生长发育与品质调控, 尤其是蔷薇属植物皮刺、株型和抗逆性等品质性状的形成机制及相关基因克隆和种质创新等。