

毛毡杜鹃嫩叶直接再生芽苗及植株再生体系的建立

李玉梅, 姜云朋

(吉林师范大学 吉林 四平 136000)

摘要:以毛毡杜鹃嫩叶为外植体,应用均匀设计方法筛选最适合的培养基,建立毛毡杜鹃嫩叶直接再生芽苗及植株再生体系。结果表明:最适合嫩叶直接再生芽苗的培养基为:DR+2-ip 2.7 mg/L+NAA 0.02 mg/L+KT 1.00 mg/L,诱导率达 93.5%以上;生根培养基为:MS(改良)+IAA 0.10 mg/L+NAA 0.07 mg/L,生根率达 97%。

关键词:毛毡杜鹃;组织培养;均匀设计

中图分类号:S 685.21 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)05-0045-03

毛毡杜鹃 (*Rhododendron confertissimum* Nakai.), 是杜鹃花科杜鹃花属矮生常绿小灌木,《吉林省野生动植物保护管理暂行条例》中定为省级一类重点保护植物,为亟需保护植物。其花色泽艳丽,十分美观,可用于假山及地面的绿化,也可以驯化后制作为观赏盆景。因其在长白山区数量稀少,分布区域十分狭窄,仅集中分布在长白山国家级自然保护区海拔 2 000~2 500 m 的岳桦林带、高山苔原带和高山荒漠带上,可开发利用于耐寒、抗寒及抗病能力强的园艺新品种,是高山杜鹃育种的重要种质资源。对研究植物区系也具有十分重要的意义。因其种子繁殖萌发率低,扦插繁殖生根率和移栽成活率极低,开发及利用受到极大的限制。因此,在保护好现有野生资源的同时,急需对这一野生珍贵稀有植物进行离体快繁。通过愈伤组织再分化芽苗途径具有增殖系数高等优点,但仍存在外植体诱导愈伤组织周期较长、获得不定芽速度较慢、且愈伤组织长期连续增殖极易发生退化和变异等缺点。而相对于愈伤组织再分化芽苗过程,嫩叶直接再生芽苗途径不仅成苗速度快,繁殖系数高,而且遗传稳定性强,大大提高种苗生产效率。同时,应用均匀设计对毛毡杜鹃嫩叶直接再生芽苗和芽苗生根条件进行筛选,以期获得最佳培养条件。目前同属其他种植物的组织培养已有报道^[1-4]。但关于毛毡杜鹃嫩叶直接再生芽苗及植株再生的报道在国内外迄今未见。

1 材料与方法

1.1 外植体材料的处理

6月初,于长白山北坡采毛毡杜鹃新萌发嫩叶,在超净工作台上用 75%酒精涮洗 60 s,用饱和次氯酸钠溶液

浸泡 6 min,无菌水冲洗 10 次,用无菌滤纸吸干表面水分,切除被杀菌消毒剂损伤部分后作为外植体备用。

1.2 毛毡杜鹃嫩叶直接再生芽苗培养基的筛选

以 DR 为基本培养基,附加蔗糖 20 g/L,琼脂粉 9.0 g/L,pH 5.5,温度(24±2)℃,光照强度 1 200 lx,光照周期 10 h/d。将经过处理的嫩叶片正面朝上接种到附加不同浓度的 2-ip、NAA 和 KT 的 DR 培养基上进行培养。筛选最适宜嫩叶直接再生芽苗的培养基。

1.3 毛毡杜鹃再生芽苗生根培养基的筛选

以改良 MS(1/4 大量元素、1/3 微量元素、1/3 铁盐和 1/3 有机成分)为基本培养基,附加蔗糖 20 g/L,琼脂粉 8.5 g/L,pH 5.7,温度(24±2)℃,光照强度 1 500 lx,光照周期 10 h/d。待嫩叶直接再生的芽苗长至 2.0 cm 时,将其切下后转接到附加不同浓度的 IAA、IBA 和 NAA 的改良 MS 培养基上进行生根培养,筛选最适宜的培养基。

1.4 数据分析

数据分析与处理采用均匀设计(Uniform Design)软件;回归分析均采用全回归(后退法)。

2 结果与分析

2.1 DR 培养基中不同植物生长调节物质浓度交叉对比对毛毡杜鹃嫩叶直接再生芽苗的影响

以 DR 为基本培养基,附加不同浓度的 2-ip、NAA 和 KT(由预试验可知:浓度范围分别控制在 2.00~2.70 mg/L,0.02~0.08 mg/L 和 1.00~1.50 mg/L)。为了提高毛毡杜鹃嫩叶再生芽苗的速度和芽苗诱导率,采用均匀设计法^[5],每个处理接种外植体数为 30 个。选用 U₁₀(10³)均匀表(见表 1),同时考察了 2-ip、NAA 和 KT 的浓度交叉对比对嫩叶直接再生芽苗的影响(在表 1 和方程中,X₁为 2-ip 浓度,X₂为 NAA 浓度,X₃为 KT 浓度,Y 为诱导率,结果见表 2)。

第一作者简介:李玉梅(1976-),女,吉林抚松人,硕士,讲师,现主要从事植物生理学研究。E-mail: mmmlym @126.com。

收稿日期: 2008-12-20

表 1 U₁₀(10³)因素及水平设计

Table 1	U ₁₀ (10 ³)Factors and levels design		
水平 Levels	因素 Factors/ mg · L ⁻¹		
	X ₁	X ₂	X ₃
1	2.00	0.02	1.00
2	2.10	0.03	1.10
3	2.20	0.04	1.20
4	2.30	0.05	1.30
5	2.40	0.06	1.40
6	2.50	0.07	1.50
7	2.60	0.08	1.20
8	2.70	0.04	1.30
9	2.60	0.03	1.40
10	2.70	0.02	1.50

表 2 U₁₀(10³)均匀设计试验安排及结果

Table 2	U ₁₀ (10 ³)Uniform design test plan and result			
处理号 Treatment code	因素 Factors/ mg · L ⁻¹			诱导率 Y Percentage/ %
	X ₁	X ₂	X ₃	
1	2.00	0.06	1.20	83.00
2	2.10	0.02	1.20	85.00
3	2.20	0.05	1.50	80.50
4	2.30	0.03	1.50	81.50
5	2.40	0.04	1.10	88.50
6	2.50	0.04	1.40	84.50
7	2.60	0.03	1.40	85.50
8	2.70	0.08	1.00	92.50
9	2.60	0.02	1.30	87.50
10	2.70	0.07	1.30	87.50

将所得数据经均匀设计软件处理得回归方程: $Y=86.5+8.65X_1-15.6X_2-16.3X_3$, 样本容量 $N=10$, 显著性水平 $\alpha=0.01$, 复相关系数 $R=0.9986$, 检验值 $F_t=705.3$, 临界值 $F_{(0.01,3,6)}=9.780$, $F_t>F_{(0.01,3,6)}$, 回归方程显著。对各方程项进行显著性检验可知: 各方程项对 Y 影响均显著。根据回归方程求出 Y 的最优组合为: $X_1=2.70$, $X_2=0.02$, $X_3=1.00$ 。在此组合基础上求得最优解: $y=93.2$ 。按公式 $Y=y\pm u_{\alpha}\cdot s$ 计算出优化值区间估计为 $Y=93.2\pm 0.861$, 即 $92.339\%\sim 94.61\%$ 。用试验得到的优化值 2-ip 2.70 mg/L+NAA 0.02 mg/L+KT 1.00 mg/L 进行验证试验。将毛毡杜鹃嫩叶接种到附加 2-ip 2.70 mg/L, NAA 0.02 mg/L 和 KT 1.00 mg/L 的 DR 培养基上进行芽苗直接再生培养, 在此组合的培养基上培养 28 d 后嫩叶逐渐增厚, 继续培养至 40 d 叶片表面局部出现颗粒状突起, 55 d 后突起逐渐伸长形成芽苗(图 1 a)。70 d 后苗高可达 1.0 cm 以上。诱导率达到 93.5% 以上, 在估计区间范围内, 且比所有试验 Y 值都大。因此, 毛毡杜鹃嫩叶直接再生芽苗的诱导培养基为: DR+2-ip 2.70 mg/L+NAA 0.02 mg/L+KT 1.00 mg/L。

2.2 改良 MS 培养基中不同植物生长调节物质浓度交叉对比对毛毡杜鹃组培苗生根的影响

待嫩叶直接再生的芽苗长至 2.0 cm 时, 将其切下

后转接到附加不同浓度的 IAA、IBA 和 NAA 的改良 MS 培养基中进行生根培养, 由预试验可知浓度范围分别为 IAA 0.10~0.40 mg/L, IBA 0.10~0.30 mg/L 和 NAA 0.07~0.12 mg/L, 低于控制范围的植物生长调节物质不能促使毛毡杜鹃生根和腋芽生长伸长; 过高的植物生长调节物质导致幼苗基部膨胀或产生愈伤瘤和抑制腋芽萌发生长, 继续培养根从膨胀部或愈伤瘤上发出, 这样的苗在移栽时, 根随愈伤瘤从苗基部脱落, 移栽成活率几乎为零, 可能是根与苗茎的纤维疏导组织连接不完整所致。为了提高毛毡杜鹃组培苗生根的速度和生根率, 采用均匀设计法, 每个处理组培苗数为 30, 选用 U₁₀(10³)均匀表(见表 3), 同时考察了 IAA、IBA 和 NAA 浓度交叉对比对毛毡杜鹃组培苗生根的影响(在表 3、4 和方程中, X_1 为 IAA 浓度, X_2 为 IBA 浓度, X_3 为 NAA 浓度, Y 为生根率, 结果见表 4)。

表 3 U₁₀(10³)因素及水平设计

Table 3	U ₁₀ (10 ³)Factors and levels design		
处理号 Treatment code	因素 Factors/ g · mL ⁻¹ Y *		
	X ₁	X ₂	X ₃
1	0.10	0.10	0.07
2	0.15	0.15	0.0
3	0.20	0.20	0.09
4	0.25	0.25	0.10
5	0.30	0.30	0.11
6	0.35	0.30	0.12
7	0.40	0.25	0.10
8	0.30	0.20	0.09
9	0.35	0.15	0.08
10	0.40	0.10	0.07

表 4 U₁₀(10³)均匀设计试验安排及结果

Table 4	U ₁₀ (10 ³)Uniform design test plan and result			
处理号 Treatment code	因素 Factors/ mg · L ⁻¹			诱导率 Y Percentage/ %
	X ₁	X ₂	X ₃	
1	0.10	0.20	0.10	91.00
2	0.15	0.30	0.09	85.00
3	0.20	0.15	0.07	83.00
4	0.25	0.10	0.11	68.50
5	0.30	0.25	0.08	68.00
6	0.35	0.25	0.08	62.00
7	0.40	0.10	0.12	47.50
8	0.30	0.15	0.07	70.50
9	0.35	0.30	0.09	60.00
10	0.40	0.20	0.10	52.00

所得数据经均匀设计软件处理, 得回归方程 $Y=123-129X_1-0.441X_2-196X_3$, 样本容量 $N=10$, 显著性水平 $\alpha=0.01$, 复相关系数 $R=0.9995$, 检验值 $F_t=2098$, 临界值 $F_{(0.01,3,6)}=9.780$, $F_t>F_{(0.01,3,6)}$, 显著, 说明回归方程有意义。对各方程项进行显著性检验可知: 检验值 $F_{(2)}=2.928e^{-2}$, 临界值 $F_{(0.01,1,6)}=13.75$, $F_{(2)}\leq F_{(0.01,1,6)}$, 此方程项不显著, 需要剔除。剔除不显著方程项, 新建回归方程继续计算: 得回归方程 $Y=122-129$

X_1-195X_3 , 复相关系数 $R=0.9995$, 检验值 $F_t=3\ 653$, 临界值 $F_{(0.01, 2, 7)}=9.547$, $F_t>F_{(0.01, 2, 7)}$, 回归方程显著。同理对方程项进行显著性检验可知: 各方程项对 Y 影响均显著。根据回归方程求出 Y 的最优组合为: $X_1=0.10$ $X_3=0.07$, 在此组合基础上求得最优解: $y=96.0$, 此解为方程解析解, 需按公式 $Y=y\pm t_{\alpha}\cdot s$ 计算出优化值区间估计为 $Y=96.0\pm 1.75$, 即 $94.25\%\sim 97.75\%$ 。以最优组合做验证试验, 将嫩叶直接再生且长至 2.0 cm 的芽苗切下后转接到附加 IAA 0.10 mg/L +NAA 0.07 mg/L 的改良 MS 培养基中, 培养 20 d 嫩茎基部开始出现根锥, 继续培养至 30 d 嫩茎基部直接发出 $3\sim 5$ 条不定根(图 1 b), 45 d 后根长可达 2.0 cm , 有的产生了侧根, 苗高达 3.0 cm 以上, 根和苗的形态、发育均正常, 生根率达 97% 以上。在估计区间范围内, 且比所有试验 Y 值都大。可见, 毛毡杜鹃组培苗生根的最佳培养基为: MS(改良)+IAA 0.10 mg/L +NAA 0.07 mg/L 。

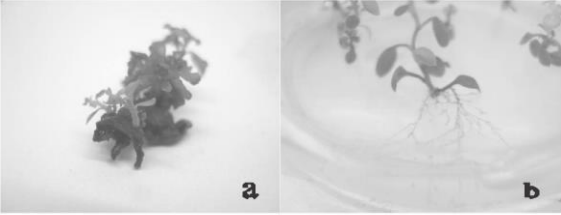


图1 a. 嫩叶直接再生芽苗; b. 生根培养

Fig. 1 Regeneration shoots directly form young leaves; b. Cultivated for rooting

3 讨论与结论

试验结果证明, 培养基 DR+2-ip 2.70 mg/L +NAA 0.02 mg/L +KT 1.00 mg/L 对毛毡杜鹃嫩叶直接再生

芽苗的诱导效果显著, 高浓度的 2-ip、低浓度的 IAA 和适当浓度的 KT 有利于诱导嫩叶直接再生芽苗, 可能是不同植物再生芽苗的机理不同; 培养基 MS(改良)+IAA 0.10 mg/L +NAA 0.07 mg/L 对毛毡杜鹃嫩叶直接再生的芽苗生根效果最好, IAA 和 NAA 的同时加入促进了毛毡杜鹃组培苗的生根速度和提高了生根率, 可能是不同生长素的作用机制不同等原因。毛毡杜鹃芽苗再生采用嫩叶直接再生途径遗传稳定性好、速度快、成苗率高、方法简捷、经济实用、可操作性强。应用均匀设计法处理和分析数据大大缩短了培养基配方的摸索周期。该研究结果证明, 已成功建立了毛毡杜鹃的嫩叶直接再生芽苗及植株再生体系, 达到了预期目的。

近些年以来, 德国、意大利、比利时等国家的高山杜鹃已驯化为园艺栽培种进入中国市场。中国仅甘肃, 云南等少许高山品种得到半引种。毛毡杜鹃系长白山高山杜鹃, 长白山高山杜鹃至今未得到引种。试验结果可能对长白山高山杜鹃的开发利用和工厂化育苗有一定的参考意义。

参考文献

[1] 顾地周, 孙忠林, 何晓燕, 等. 牛皮杜鹃的组培快繁及种质试管保存技术[J]. 园艺学报, 2008, 35: 603-606.
[2] 秦静远, 黄玉敏. 杜鹃的组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(1): 38.
[3] 宫汝淳, 姜云天, 顾地周, 等. 短果杜鹃的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(1): 133.
[4] 汤桂钧, 张建安, 蒋建平, 等. 高山杜鹃的组织培养快速繁殖技术研究[J]. 上海农业学报, 2004, 20(3): 15-18.
[5] 方开泰. 均匀设计—数论方法在试验设计的应用[J]. 应用数学学报, 1980, 3(4): 363-372.

(致谢: 试验和论文撰写过程中得到了通化师范学院生物系顾地周、姜云天两位老师的大力支持和帮助, 谨此致谢。)

Establishenet of Regeneration Shoots Directly form Young Leaves and Plant Regeneration System of *Rhododendron confertissimum* Nakai.

LI Yu-mei, JIANG Yun-peng
(Jilin Normal University, Siping, Jilin 136000, China)

Abstract: Young leaves of *Rhododendron confertissimum* were used as explants and suitable medium compositions for regeneration shoots directly form young leaves and rooting were screened through uniform design experiments. The results showed that DR+2-ip 2.70 mg/L +NAA 0.02 mg/L +KT 1.00 mg/L for *Rhododendron confertissimum* with a germination rate of 95.5% ; MS(modified) +IAA 0.10 mg/L +NAA 0.07 mg/L was most suitable for *Rhododendron confertissimum* with a rooting rate of 97% . Regeneration shoots directly form young leaves and plant regeneration system of *Rhododendron confertissimum* has been successfully established.

Key words: *Rhododendron confertissimum* Nakai.; Tissue culture; Uniform design