

牛皮杜鹃的组培快繁及种质试管保存技术

顾地周*, 孙忠林, 何晓燕, 张秋菊, 朱俊义

(通化师范学院生物系, 吉林通化 134002)

摘要: 以牛皮杜鹃休眠芽为外植体, 筛选最适合萌发、再分化、生根和种质试管保存的培养基。结果表明最适合休眠芽萌发的培养基为: $1/4$ MS + GA_3 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 维生素 C $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 基部直接再分化培养基为: $1/4$ MS + 6-BA $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 生根培养基为: MS + IBA $0.46 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 活性炭 $450 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 种质试管保存培养基为: $1/6$ MS (大量元素) + $1/4$ MS (微量元素) + $1/2$ MS (铁盐) + $1/4$ MS (有机物质) + B_9 $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。牛皮杜鹃组织培养的不同阶段需要不同的培养基, 常温条件下, 利用低营养矮化常温的方法在试管内保存种质资源。

关键词: 牛皮杜鹃; 组织培养; 再分化; 种质试管保存

中图分类号: S 685.21 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2008) 04-0603-04

Micropropagation and Germplasm Preservation in Tube of *Rhododendron chrysanthum* Pall.

GU Di-zhou*, SUN Zhong-lin, HE Xiao-yan, ZHANG Qiu-ju, and ZHU Jun-yi

(Department of Biology, Tonghua Normal University, Tonghua, Jilin 134002, China)

Abstract: Dormant buds of *Rhododendron chrysanthum* Pall. were used as explants for experiment. The most suitable media for inducement, differentiation, rooting and germplasm preservation in tube were screened. The results showed that $1/4$ MS + GA_3 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + vitamin C $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ was fit for sprouting of dormant buds, $1/4$ MS + 6-BA $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for differentiation, MS + IBA $0.46 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + active carbon $450 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for rooting, and $1/6$ MS (macro-elements) + $1/4$ MS (micro-elements) + $1/2$ MS (ferric salt) + $1/4$ MS (organic substances) + B_9 $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for germplasm preservation in tube. *Rhododendron chrysanthum* tissue culture required different kinds of culture media in different phases. The method of dwarfing with low nutrients and normal temperature was utilized for germplasm preservation in tube at normal temperature.

Key words: *Rhododendron chrysanthum* Pall.; tissue culture; differentiation; germplasm preservation in tube

牛皮杜鹃 (*Rhododendron chrysanthum* Pall.) 又称牛皮茶, 杜鹃花科常绿小灌木, 大多分布于长白山自然保护区内, 为我国国家三级保护的珍贵稀有植物。牛皮杜鹃可以盆栽观赏, 也是上好的绿化园艺品种, 其叶片具有药用价值, 可供制茶 (周繇, 2006)。牛皮杜鹃在我国分布甚狭, 仅在长白山国家级自然保护区内有较大的种群面积。由于人们乱采乱挖, 野生资源遭到极大破坏, 并且种子细小, 萌发率低 (张乐华 等, 2006), 扦插繁殖生根率低且根数少, 移栽成活率极低, 开发和利用受到极大的限制。因此, 在保护好现有野生资源的同时, 应用植物组织培养方法对这一宝贵野生资源进行快繁并大面积栽培, 同时采取试管保存其种质, 以防该物种灭绝。目前同属其他种植物的组织培养

收稿日期: 2007-11-06; 修回日期: 2008-03-10

基金项目: 通化师范学院自然科学基金项目 (XS060073); 吉林省科技厅项目 (200705C05)

* E-mail: gudizhou@163.com; Tel: 0435-3208073

已有报道,但牛皮杜鹃的组培快繁和种质试管保存在国内外迄今未见报道。

1 材料与方法

1.1 外植体材料及其培养条件

2005年6月于长白山北坡海拔1700 m针阔叶混交林下采牛皮杜鹃未开花休眠芽。将休眠芽带2 cm半木质化部分剪下,在超净工作台上用70%酒精涮洗60 s,用含0.2%链霉素的次氯酸钠(2%)溶液浸泡8 min,无菌水冲洗6次。用无菌滤纸吸干表面水分,切除木质部,将休眠芽作为外植体。

以MS作基本培养基,附加蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (生根培养为 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),琼脂 $9.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5.5,附加各种植物生长调节剂,温度 $(24\pm 2)^{\circ}\text{C}$,光照强度1200 lx,光周期 $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

1.2 休眠芽萌发

将外植体接种到附加不同浓度 GA_3 的MS培养基上进行暗培养。加入维生素C $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以阻止酚类物质氧化为醌类物质损伤组织细胞。

1.3 休眠芽萌发的嫩芽基部直接再分化和继代增殖培养

以1/4MS作为培养基,将休眠芽萌发出的嫩芽接种到附加不同浓度6-BA和NAA的培养基上进行基部直接再分化培养。筛选最适宜基部直接再生植株的植物生长调节剂浓度配比。培养至40 d嫩芽基部直接再生植株形成丛生芽团。选择长势较好的丛生芽团或茎段(一叶一段)切割,再接种到再生植株诱导培养基(植物生长调节剂浓度酌减)上进行继代增殖培养。

1.4 生根培养

以MS作为基本培养基,附加不同浓度的IBA,筛选最合适的生根培养基。

1.5 种质试管保存

采用“低营养矮化常温”的方法,将基部含有少量芽锥的丛生芽团或茎段(一叶一段)接种到不同培养基上进行试管保存,温度为 $(24\pm 2)^{\circ}\text{C}$,光照强度1000 lx,光周期 $10\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$,蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,矮壮素采用 B_9 $2.0\sim 4.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。筛选最适合种质试管保存的培养基。

1.6 数据分析

数据分析与处理采用SPSS 11.0软件。

2 结果与分析

2.1 MS培养基中不同浓度 GA_3 对牛皮杜鹃休眠芽萌发的影响

从表1可以看出,牛皮杜鹃休眠芽离体培养需要一定浓度的 GA_3 ,1号单纯的MS培养基不起作用;5号培养基 GA_3 浓度过高对休眠芽萌发产生明显抑制作用;2号和3号培养基可使休眠芽萌发,但萌发时间长,生长不好;而4号培养基适合牛皮杜鹃休眠芽萌发及生长。以上试验表明: GA_3 $0.5\sim 1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 对休眠芽萌发有促进作用; $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上有抑制作用。因此,适合牛皮杜鹃休眠芽萌发较好的培养基为MS + GA_3 $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 维生素C $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (图版,a)。

表1 MS培养基中不同浓度 GA_3 对牛皮杜鹃休眠芽萌发的影响

Table 1 Effects of GA_3 with different concentrations on dormant buds sprouting of *Rhododendron chrysanthum* Pall. in MS medium

代号 Code	$\text{GA}_3/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	外植体数 Number of explants	萌发率/% Inducement rate
1	0.0	30	0.0
2	0.5	30	72.0
3	1.0	30	88.7
4	1.5	30	93.5
5	2.0	30	2.0

2.2 1/4MS 培养基中不同浓度 6-BA 对牛皮杜鹃基部直接再分化和继代增殖的影响

为防止继代增殖培养过程中生长素 (NAA) 积累过多, 造成再生植株变异的现象, 采取降低生长素 (NAA) 浓度 ($0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的措施。

不同浓度 6-BA 对牛皮杜鹃的基部直接再分化影响显著 ($F_{4,45} = 181.648$, $P < 0.05$)。

图 1 显示, NAA 浓度为 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 随 6-BA 浓度的增大, 嫩芽基部直接再分化率也随之增大, 分化出的丛生苗生长良好; 6-BA 浓度为 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时嫩芽基部分化率达到最高。而 6-BA 浓度达到 $4.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以后分化率下降幅度较大, 有些几乎不分化, 分化的苗叶片发生形态变化并且细弱。所以, 培养基 $1/4 \text{ MS} + 6\text{-BA } 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 最适合牛皮杜鹃嫩芽基部直接再分化和生长发育 (图版, b)。继代增殖培养时, 6-BA 浓度可略减 (图版, c)

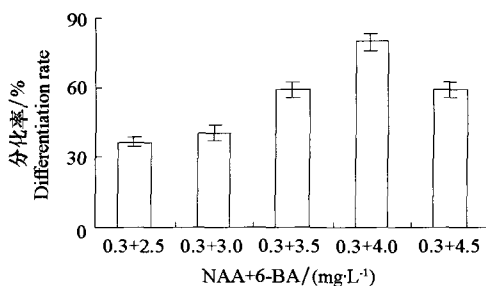


图 1 1/4MS 培养基中不同浓度 6-BA 对牛皮杜鹃基部直接再分化的影响

Fig. 1 Effects of 6-BA with different concentrations on differentiation of *R. chrysanthum* Pall. in 1/4 MS medium

2.3 MS 培养基中不同浓度 IBA 对牛皮杜鹃组培苗生根的影响

采用 MS 培养基, 生长素采用 IBA, 牛皮杜鹃组培苗有根发生且生长较好。

IBA 浓度在 $0.1 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间时, 组培苗生根率随其浓度的增加而升高。IBA 浓度为 $0.1 \sim 0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 苗根直接从皮孔中发出, 生根率和移栽成活率都较高。IBA 浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 虽然生根率相对最高, 但根是从组培苗基部形成的愈伤瘤中发出, 这样的组培苗移栽成活率低。因此, 在 IBA 浓度为 $0.41 \sim 0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围做 10 个样本试验 (图 2)。单因子方差分析结果显示: IBA 浓度为 $0.46 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时生根效果最佳, 生根率达 89%, 且长势好; 超过 $0.46 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时茎基部便出现棒状膨大, 这样的苗即使生根, 移栽成活率也极低。所以, 牛皮杜鹃最佳生根培养基为 $\text{MS} + \text{IBA } 0.46 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{活性炭 } 450 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (图版, d)。

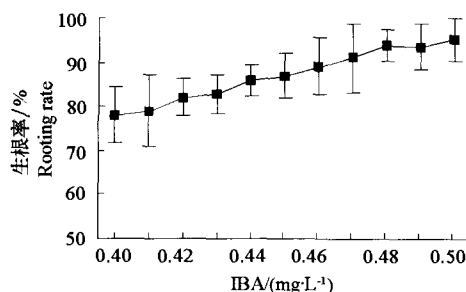


图 2 MS 培养基中不同浓度 IBA 对牛皮杜鹃组培苗生根的影响

Fig. 2 Effects of IBA with different concentrations on rooting of *R. chrysanthum* Pall. seedlings from tissue culture in MS medium

2.4 改良后的 MS 培养基中不同浓度 B₉ 对牛皮杜鹃种质试管保存的影响

牛皮杜鹃种质试管保存培养基采用改良后的 MS 培养基: $1/6 \text{ MS}$ 大量元素 + $1/4 \text{ MS}$ 微量元素 + $1/2 \text{ MS}$ 铁盐 + $1/4 \text{ MS}$ 有机物质, 并且附加一定浓度的 B₉, 对基部丛生芽团上芽锥的生长、发育及芽锥发出苗均较为理想。

在培养基中加入矮壮素 B₉ $2.0 \sim 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 矮壮素 B₉ 浓度为 $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时较为理想。采用低营养矮化常温的方法, 在室温下每年更换两次培养基可长期在试管内保存牛皮杜鹃种质 (图版, e), 并降低成本。

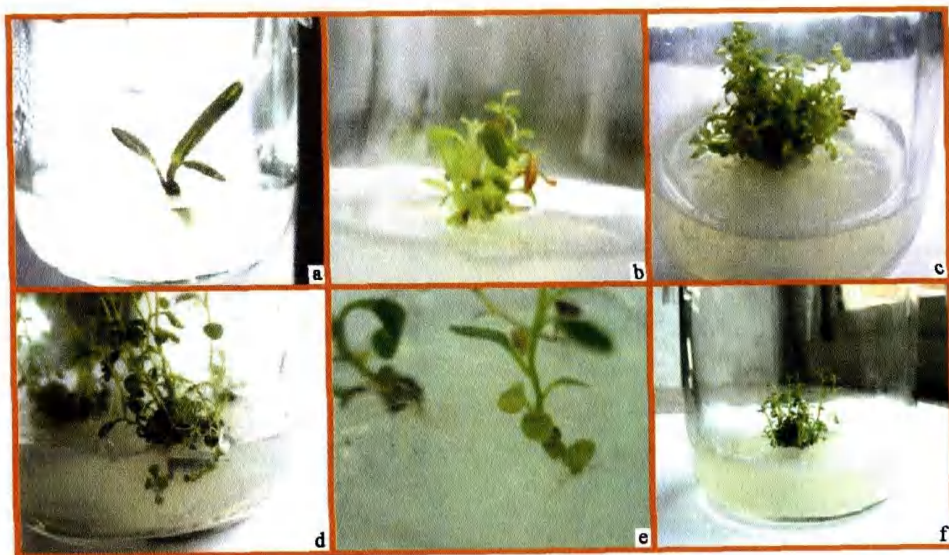
3 讨论

试验证明, 牛皮杜鹃休眠芽的离体萌发需要适宜浓度的 GA₃ 来打破休眠。MS 培养基中大量元素、微量元素、铁盐及有机物质浓度降低, 有利于牛皮杜鹃休眠芽萌发的嫩芽基部直接再分化和继代增

殖,但不利于生根培养。本研究与德国产粉红色高山杜鹃‘火箭’品种的组培技术(汤桂钧等, 2004)在配方和方法上略有不同之处,可能是由于品种、地域、生态环境等原因。植物种质试管保存大多采取低温处理、低温结合弱光照的方法(艾鹏飞和罗正荣, 2004; 钱剑林等, 2004)。牛皮杜鹃种质试管保存技术采取“常温低营养矮化”方法,需特殊改良的 MS 培养基且不需加生长素和细胞分裂素,这种方法可常温下在试管内保存牛皮杜鹃种质达 8 个月之久。分析其原因可能是不同的植物种质试管保存需要不同的理化条件。本研究应用植物组织培养技术对牛皮杜鹃进行组培快繁及其种质试管保存,得到预期结果,对其开发和利用有一定的参考意义。经过特殊改良后的 MS 培养基可大幅度降低成本,为今后长白山高山杜鹃引种、驯化、种质试管保存及工厂化育苗提供参考依据。

References

- Ai Peng-fei, Luo Zheng-rong. 2004. Conservation of *in vitro* shoots of persimmon and date plum by slow growth and genetic stability of recovered plantlets. *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (4): 441–446. (in Chinese)
- 艾鹏飞, 罗正荣. 2004. 柿和君迁子试管苗缓慢生长法保存及其遗传稳定性研究. *园艺学报*, 31 (4): 441–446.
- Qian Jian-lin, Zhu Xu-dong, Tian Song-qing, You Wei-zhong, Mao An-yuan. 2004. The preliminary study on growth and cold treatment of test-tube bulblet of ‘Sorbonne’. *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (6): 828. (in Chinese)
- 钱剑林, 朱旭东, 田松青, 尤伟忠, 毛安元. 2004. 东方百合‘Sorbonne’试管成球和低温处理的初步探讨. *园艺学报*, 31 (6): 828.
- Tang Gui-jun, Zhang Jian-an, Jiang Jian-ping, Hu Hai-feng, He Zheng-qi. 2004. Study in rapid propagation of *Rhododendron lapponicum*. *Acta Agricultrae Shanghai*, 20 (3): 15–18. (in Chinese)
- 汤桂钧, 张建安, 蒋建平, 胡海峰, 何正其. 2004. 高山杜鹃的组织培养快速繁殖技术研究. *上海农业学报*, 20 (3): 15–18.
- Zhang Le-hua, Liu Xiang-ping, Wang Kai-hong, Wang Zhao-hong, Li Xiao-hua. 2006. A study on seed germination and seedling growth of *Rhododendrons*. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (6): 1361–1364. (in Chinese)
- 张乐华, 刘向平, 王凯红, 王兆宏, 李晓华. 2006. 杜鹃属植物种子育苗研究. *园艺学报*, 33 (6): 1361–1364.
- Zhou You. 2006. Preliminary study of the evaluation system of precious and endangered wild officinal plants in Changbai Mountains. *Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica*, 26 (3): 599–605. (in Chinese)
- 周 繇. 2006. 长白山区野生珍稀濒危药用植物资源评价体系的初步研究. *西北植物学报*, 26 (3): 599–605.



图版说明: a. 休眠芽萌发; b. 再分化; c. 继代增殖培养; d. 生根培养; e. 种质试管保存。

Explanation of plates: a. Cultivated for bourgeoning of dormant buds; b. Differentiation; c. Cultivated for proliferation; d. Cultivated for rooting; e. Germplasm preservation in tube.