维普资讯 http://www.cqvip.com

大萼杜鹃的快速繁殖研究

苗永美[1,2],王永清[1],庄 平[3],简 兴[2]
(1.四川农业大学林学园艺学院,四川 雅安 625014;
2.安徽科技学院生命科学学院,安徽 凤阳 233100;3.中国科学院华西亚高山植物园)

摘 要:大萼杜鹃的种子无菌发芽获得试管苗,然后选用试管苗的芽苗进行离体培养,并且通过正交试验设计并结合方差分析、多重比较,建立了大萼杜鹃快繁体系。试验结果表明:愈伤组织的诱导培养基是Read+TDZ(0.2~0.4mg/L)+NAA(0.01~0.1 mg/L);愈伤组织的再分化培养基是Read+TDZ 0.3 mg/L+NAA0.01 mg/L+AC0.2%;生根培养基是Read+IBA0.25 mg/L+NAA0.25 mg/L+AC0.20~0.60%+蔗糖15.00~30.00g/L。

关键词:活性炭;培养基;繁殖;杜鹃;组织培养

Study of rapid propagation technology of *Rhododendron Megacalyx*

Miao Yongmei[1,2], Wang Yongqing[1], Zhuang Ping[3], Jian Xing[2]
(1. College of Forestry and Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014;
2. College of Life Science, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100;
3. Western China Sub-alp Arboretum Chinese Academy of Sciences)

Abstract: The seeds of *Rhododendron megacalyx* Balf. f. et Ward germinated under aseptic conditions, then the shoots from *Rhododendron* tube seedlings were used as explants, the system of rapid propagation was established by means of the orthogonal experiment design, analysis of variance and multiple comparisons. The results were as follows: Induction medium of callus was Read+TDZ(0.2-0.4mg/L)+NAA(0.01-0.1 mg/L); Redifferentiation medium of callus was Read+TDZ0.3 mg/L+NAA0.01 mg/L+AC0.2%; The rooting medium was Read+IBA0.25 mg/L+NAA0.25 mg/L+AC0.20-0.60%+sugar15.00-30.00g/L.

Key word: Activated carbon; Medium; Propagation; *Rhododendron*; Tissue culture

醇浓度、固液比、提取温度、提取时间、提取次数作为正交试验五因素时各自的水平。由 $L_{16}(4^5)$ 正交试验得出最佳提取工艺条件如下:85%乙醇,固液比1∶12,50℃提取3次,每次8h。该工艺条件下提取物干粉得率为2.0%,总碱含量为6.4mg/g。

参 考 文 献

[1] 吴芳丽,李爱珍,毛慧芳等. RP-HPLC测定石蒜中加兰他敏含量[J]. 中国中药杂志,2005,30(7):523-525.
[2] 秦卫华,周守标. 石蒜药用价值[J]. 植物杂志,2003,(3):28.
[3] 邓传良,周坚. 石蒜属植物生物碱研究概况[J]. 中国野生植物资源,2004,23(6):13-14.
[4] 范华均,肖小华,刘玉竹等. 微波辐射溶剂回流法提取石蒜中石蒜碱、力可拉敏和加兰他敏[J]. 中山大学学报(自然科学版),2006,45(3):46-49.
[5] 洪山海,静芳,汝巽. 石蒜生物碱的研究Ⅵ加兰他敏和力可拉敏的薄层层析及纸层析鉴别法[J]. 植物学报,1981,23(4):334-337.
[6] 张俊梅,王明新,申雅维. 生物碱的研究Ⅶ薄层色谱鉴别石蒜生物碱和高效液相色谱法测定加兰他敏的含量[J]. 药物分析杂志,1999,19(6):399-400.
[7] 王晓燕,黄敏仁,韩正敏. 微波辅助提取石蒜属植物忽地笑中加兰他敏的研究[J]. 南京中医药大学学报,2005,21(6):374-375.
[8] 中国科学院上海药物研究所. 中草药有效成分提取与分离[M]. 上海:上海科学技术出版社,1983:277.
[9] 范华均,栾伟,李攻科. 微波辅助提取/HPLC分析石蒜中的生物碱[J]. 分析测试学报,2006,25(3):27-30.
[10] 刘产明,卢宇. 多因素评价莲子心总生物碱提取工艺[J]. 中药材,2005,28(1):50-52.
[11] 冯磊,吴洪军,么宏伟等. 微波辅助法萃取香菇柄中多糖工艺的优选[J]. 中国林副特产,2006(5):30-31.
[12] 朱丹,牛广财,孟宪军. 马齿苋多糖提取工艺的研究[J]. 中国农学通报,2006,22(8):119-122.
[13] 毛鹏,周乐,冉晓雅等. 博落回生物碱提取工艺初步研究[J]. 西北农业学报,2004,13(2):97-100.
[14] 刘莉,高鹏,李慧金. 益母草提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2003,9(2):3-5.

作者简介:胡娟(1983—),女,安徽宿松人,在读硕士,研究方向为天然植物资源开发利用。E-mail:hujuan_0101@163.com。*通讯作者:周守标,博士,教授,博士生导师。

维普资讯 http://www.cqvip.com

大萼杜鹃（*Rhododendron megacalyx* Balf. f. et Ward）是常绿灌木或小乔木，观赏价值很高，仅产于西藏东南部，云南西北部，生于海拔 2200～3000m 针一阔叶混交林中。大萼杜鹃的种子极小，靠播种较难繁殖[1]。杜鹃花是典型的喜酸性植物，由于自然界缺乏耐碱杜鹃种质资源，因而很难通过常规杂交育种方法获得耐碱品种，又由于目前对杜鹃花的耐碱机理尚不清楚，因此利用基因工程方法培育耐碱品种也很难实现[2]，这些原因都会限制了大萼杜鹃的开发和利用。通过组织培养可实现大萼杜鹃的快速繁殖，起到保护名贵杜鹃种质资源；另外在组织培养过程中，植物细胞经诱导或非诱导发生的体细胞无性系变异具有较高的频率，可通过有目的的筛选耐碱突变体，为杜鹃花耐碱育种提供种质资源。

1　材料与方法

1.1　试验材料

大萼杜鹃的种子（由华西亚高山植物园工作人员从云南腾冲采集）在无菌条件下发芽，得到试管苗，然后取试管苗的芽苗进行繁殖。

1.2　试验方法

1.2.1　材料的消毒。种子先在自来水下冲洗 2h，再用 75%酒精漂洗 30s，无菌水洗 2 次，最后用 0.1%升汞消毒 20min，无菌水洗 4～5 次。然后用滤纸吸干水分，用镊子将种子均匀接种到培养基中进行培养。

1.2.2　培养方法

1.2.2.1　种子接种在 Read＋1mg/L GA_3 培养基上，获得试管苗。

1.2.2.2　芽苗培养：Read 培养基，TDZ（0.2、0.3、0.4mg/L）和 6-BA（1.00、1.5、2.00 mg/L）分别和 NAA（0.01、0.05、0.1 mg/L）、活性炭 AC（0.05%、0.1%、0.20%）进行三因素三水平正交设计。取具有 4～5 片叶的芽苗继代增殖培养。每处理接种 20～32 个材料，重复 3 次。

1.2.2.3　愈伤组织再分化：Read 培养基，TDZ（0.2、0.3、0.4mg/L）、NAA（0、0.01、0.05mg/L）、AC（0、0.20%、0.40%）进行 3 因素 3 水平正交设计。大萼杜鹃芽苗产生的较小愈伤组织接入再分化培养基，每瓶 10 块，重复 4 次。

1.2.2.4　生根培养：切取＞1.5cm 的芽苗接入生根培养基上进行生根培养，基本培养基是 Read，采用四因素四水平正交设计，35d 时统计生根率和每苗平均根数。

1.2.2.5　移栽：将根系发育好的试管苗取出，用清水洗掉根上的琼脂，移栽到装有丰富有机质林下土的营养钵中，浇透水后置于温、湿条件适宜的温室中。

1.2.2.6　培养条件：如无特殊说明，均为温度（25±2）℃，每天光照 12h，光照强度 2000 lx±，蔗糖 30g/L，pH4.8，琼脂粉 5g/L。

1.3　统计分析

数据统计采用 SPSS10.0 软件进行方差分析和多重比较。

2　结果与分析

2.1　芽苗培养

把无菌芽苗接入芽苗培养基上，接种 10d 后，发现在不含有 AC 培养基上的小苗的顶芽、腋芽均未萌动，芽苗开始弯曲、呈畸形，并有玻璃化现象，同时在基部及腋芽处出现少量的绿色愈伤组织，最后整株苗都形成愈伤组织，但所形成的愈伤组织较小，呈透明状，增殖生长也较慢；同时发现在含有 TDZ 细胞分裂的培养基上比含有 6-BA 的培养基上愈伤组织的诱导能力强，且出愈时间早。在含有 AC 的培养基的芽苗只进行了少量的伸长生长，腋芽没有萌发，也没有分化出不定芽。

2.2　愈伤组织再分化

表 1　不同培养基对愈伤组织再分化的影响

TDZ/ mg·L^{-1}	NAA/ mg·L^{-1}	AC/ %	再分化率/ %	平均每块愈伤组织分化芽数
1(0.20)	1(0.00)	1(0.00)	50.00	11.25
1(0.20)	2(0.01)	2(0.20)	60.00	20.67
1(0.20)	3(0.05)	3(0.40)	50.00	7.92
2(0.30)	1(0.00)	2(0.20)	90.00	22.25
2(0.30)	2(0.01)	3(0.40)	80.00	26.00
2(0.30)	3(0.05)	1(0.00)	70.00	14.00
3(0.40)	1(0.00)	3(0.40)	70.00	14.38
3(0.40)	2(0.01)	1(0.00)	60.00	8.34
3(0.40)	3(0.05)	2(0.20)	100.00	18.00

将芽苗诱导出的较小愈伤组织转入再分化培养基上，20d 时愈伤组织发生明显的增殖并转绿，有的块上还出现绿色芽点，在此培养基上继续培养，愈伤组织不断增殖并继续分化芽，芽苗也能进行伸长生长，2 个月时，统计结果见表 1。分析表明 0.30mg/LTDZ 使更多的愈伤组织分化更多的芽，过低的 TDZ 不足以诱导芽的分化，而高浓度的 TDZ 却抑制芽的分化，可能是因为过高浓度的 TDZ 使细胞体积因强烈的分裂活动而急剧缩小，已形成的芽不能萌发生长。活性碳能促进出芽，不加 AC 的处理上，愈伤组织生长缓慢，芽分化率不仅低，且芽苗弱，发黄；过高的 AC 可能由于吸附性太强，使得芽分化率低。加入适量的 NAA 在一定程度上能促进苗的伸长生长，使有效芽数增多，0.20% AC 还起到了壮苗作用，2 个月时大部分苗较健壮，高 1～2cm，因此大萼杜鹃不需要壮苗培养。

2.3　生根培养

维普资讯 http://www.cqvip.com

表2 四因素对生根的影响

糖	IBA/ mg·L⁻¹	NAA/ mg·L⁻¹	AC/ %	生根率/ %	平均根数
1(10.00)	1(0.25)	1(0.25)	1(0.00)	29.00	2.00
1(10.00)	2(0.50)	2(0.50)	2(0.20)	87.50	3.67
1(10.00)	3(1.00)	3(1.00)	3(0.40)	100.00	3.14
1(10.00)	4(1.50)	4(1.50)	4(0.60)	100.00	3.57
2(15.00)	1(0.25)	2(0.50)	3(0.40)	100.00	2.68
2(15.00)	2(0.50)	1(0.25)	4(0.60)	100.00	2.67
2(15.00)	3(1.00)	4(1.50)	1(0.00)	75.00	4.25
2(15.00)	4(1.50)	3(1.00)	2(0.20)	25.00	1.00
3(20.00)	1(0.25)	3(1.00)	4(0.60)	100.00	2.75
3(20.00)	2(0.50)	4(1.50)	3(0.40)	40.00	3.50
3(20.00)	3(1.00)	1(0.25)	2(0.20)	100.00	2.71
3(20.00)	4(1.50)	2(0.50)	1(0.00)	100.00	4.60
4(30.00)	1(0.25)	4(1.50)	2(0.20)	85.00	3.38
4(30.00)	2(0.50)	3(1.00)	1(0.00)	100.00	3.63
4(30.00)	3(1.00)	2(0.50)	4(0.60)	18.50	1.88
4(30.00)	4(1.50)	1(0.25)	3(0.40)	87.50	3.88

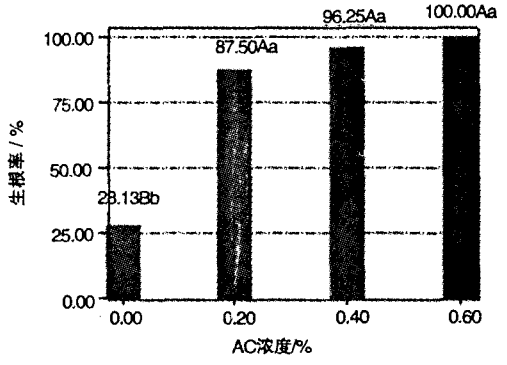

图1 AC对大萼杜鹃生根率的影响

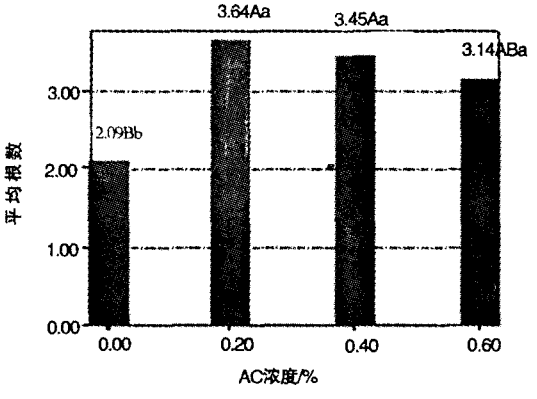

图2 AC对大萼杜鹃平均根数的影响

切取>1.5cm的芽苗接入生根培养基上进行生根培养，第10d时有的植株长出白色细小的根，35d时统计生根率和每苗平均根数结果见表2。并对结果进行方差分析，发现只有AC对大萼杜鹃的生根影响显著，其它因素在所试浓度范围内则不影响。AC对大萼杜鹃生根率和生根数的多重比较见图1和图2。从图1、2不难看出，加与不加活性炭对大萼杜鹃生根的影响差异极显著，并且发现，在所有无AC的处理上，小苗的长势较差，基部还有愈伤组织产生，根特别少且短。在加AC的3个水平之间对生根的影响不存在差异。

2.4 移栽

将根系发育好的试管苗取出，用清水洗掉根上的琼脂，移栽到装有丰富有机质林下土的营养钵中，浇透水后置于温、湿条件适宜的温室中，成活率在80%以上。

3 讨论

离体培养的材料形态发生能力与形态发生途径存在明显的基因效应。大萼杜鹃在培养过程中，小苗未发生增殖，而是出现畸形苗，先在茎基部及腋芽处产生了较少量的绿色愈伤组织，最后整株苗发生了愈伤组织；大萼杜鹃的小苗在附加活性碳的培养基上未产生不定芽和脱分化，小苗只进行了伸长生长，大萼杜鹃最终没有通过芽苗一芽苗这一途径获得再生，而是通过愈伤组织的再分化获得植株再生，这一试验结果很好地证明了由于基因型差异导致了植物形态发生途径不同这一结论的真实性。在本研究中，AC是大萼杜鹃再分化的主要影响因素。在无AC的培养基上，苗发黄，长势弱，甚至畸形，证明大萼杜鹃对有些物质较为敏感；而在含有过高的AC的培养基上，大萼杜鹃分化芽较少，说明AC的强吸附作用影响了大萼杜鹃不定芽的分化；适量的AC不仅能提高芽的分化率，还能保证苗的正常生长，不会出现畸形苗，在马铃薯和烟草花药培养及甘蔗腋芽诱导中，AC也能促进出芽率[3,4]。AC是许多植物生根必不可少的物质，同样AC是大萼杜鹃生根培养必要因素，一定浓度的AC促进生根。分析认为：(1)可能是因为AC吸附了一定量的大萼杜鹃对之敏感的物质，随着剩余物质逐渐被植物吸收利用，AC也逐渐将吸附的物质释放出来供植物利用。(2)可能AC有矫正畸形苗，起壮苗作用，进一步提高苗的生根能力。(3)AC减弱光照，保护了根尖产生的IAA，从而间接促进了根的生长。

参考文献

[1] 李长慧，孙海群，杨元武. 垄蜀杜鹃种子发芽率的研究[J]. 1998. 青海大学学报(自然科学版)，16(3)：15-17.

[2] 孙振元，徐文忠，刘淑兰. 毛白杜鹃耐碱突变体的离体筛选与鉴定[J]. 2003. 中南林学院学报，23(5)：53-55.

[3] 黄 莺，刘仁祥，武筑珠. 活性碳、微量元素、大量元素对烟草花药培养的影响[J]. 1999. 贵州农业科学，27(4)：1-5.

[4] 何为中，王天算. 活性碳对甘蔗腋芽诱导及增殖的影响[J]. 广西甘蔗，1992，(1)：1-3.

作者简介：苗永美(1976—)，女，汉，山东临沂人，硕士研究生，讲师，现工作于安徽科技学院生命科学学院，从事林木、园林植物、观赏花卉、中药材等生物技术教学与研究，主持和参加过安徽省科技厅、教育厅、院级科研课题共6项，发表论文4篇。E-mail：mym416@163.com