

文章编号: 1001-1498(2010)04-0626-04

长白山区珍稀濒危植物野生玫瑰植株再生体系的建立

杨丽娟¹, 顾地周^{1*}, 秦莉², 何雪梅¹

(1. 通化师范学院生物系, 吉林 通化 134002; 2. 吉林省通化市林场 吉林 通化 134001)

关键词: 玫瑰; 离体培养; 均匀设计

中图分类号: S722.3

文献标识码: A

Plant Regeneration System of Rare and Endangered Wild Plant *Rosa rugosa* in Mountain Changbai

YANG Li-juan¹, GU Di-zhou¹, QIN Li², HE Xue-mei¹

(1. Department of Biology, Tonghua Normal University, Tonghua 134002, Jilin, China;

2. Forest Farm of Tonghua City, Jilin Province, Tonghua 134001, Jilin, China)

Abstract: The tender stem of *Rosa rugosa* was used as explant and its suitable medium compositions were screened through uniform design experiments. The results showed that the tissue culture of *Rosa rugosa* required different kinds of culture medium in different phases. The most suitable culture media were as follows: B₅ + 6-BA 2.90 mg · L⁻¹ for shoots regeneration immediately at base of tender stem, the rate of regeneration was 96%; 1/2 MS (macro-elements) + IBA 0.07 mg · L⁻¹ for rooting, the rooting rate was more than 98.5%. Plant regeneration system of *Rosa rugosa* had been successfully established.

Key words: *Rosa rugosa*; *in vitro* culture; uniform design

玫瑰(*Rosa rugosa* Thunb.) 又称玫瑰花, 是蔷薇科(Rosaceae) 蔷薇属(*Rosa* L.) 落叶灌木。该种为国家三级重点保护植物。《中国珍稀濒危保护植物名录(第一册)》中定为濒危种, 《中国物种红色名录》定为易危种^[1], 《吉林省野生动植物保护管理暂行条例》中定其为省级一类重点保护植物。是待开发的野生珍稀濒危药用植物, 花、果、根入药, 主治吐血、痛经、咯血、乳痛、月经不调等症。该种玫瑰具有喜光, 耐寒, 耐贫瘠, 抗风等特性, 可防止高山苔原带的水土流失, 对维护生态平衡, 美化天池环境以及引种驯化、开发利用于作护坡保土、园林绿化和培育玫瑰新品种; 对研究该属植物的系统发育与地理分布

也有重要科学价值。玫瑰在长白山区数量非常稀少, 仅在珲春市敬信乡有零星分布。近年来, 由于旅游设施及道路的修建等人为因素的干扰, 其生境遭到严重破坏。又因玫瑰的天然更新能力非常弱, 其种子成熟度小, 种子繁殖可操作性极差, 插条繁殖生根率和移栽成活率也极低, 使其开发及利用受到极大限制。因此, 在保护好现有野生资源的同时, 本研究以玫瑰新生嫩茎为外植体, 利用植物组织培养方法, 采用均匀设计法, 以期筛选出玫瑰嫩茎离体培养各阶段的培养基。目前, 与其同属的其他种植物的离体培养已有报道, 但关于该种玫瑰植株再生体系的研究迄今未见。

收稿日期: 2009-05-08

基金项目: 吉林省科技厅资助项目(200705C05)

作者简介: 杨丽娟(1965—), 女, 吉林通化人, 副教授, 主要从事长白山区珍稀濒危植物和药用植物的细胞生物学研究。E-mail: thpgjw@163.com

* 通讯作者: 顾地周(1973—), 男, 吉林通化人。gudizhou@163.com

1 材料与方 法

1.1 外植体材料的处理

2007年3月于吉林省珲春市敬信乡采玫瑰休眠枝条在实验室内水培促使休眠芽萌发,待休眠萌发并长至2 叶3 cm时剪下,将嫩枝条切割成2 叶3 叶一段,在超净工作台上用体积分数75%酒精涮洗10 s,用含质量浓度为2%青霉素的次氯酸钠(质量浓度为3%)溶液浸泡6 min,无菌水冲洗8次,无菌滤纸吸干表面水分,切除灭菌剂损伤的部分并切割成一叶一段后作为外植体备用^[2]。

1.2 玫瑰嫩茎基部直接再生芽苗诱导培养基的筛选

以B₅为基本培养基,内含蔗糖20 g·L⁻¹,琼脂粉7.5 g·L⁻¹,再附加不同质量浓度的细胞分裂素6-BA(由预试验确定为2.50 叶3.10 mg·L⁻¹)和生长素IBA(由预试验确定为0.02 叶0.06 g·L⁻¹),调节pH值为5.6,外植体在温度(22 ±2) °C、光照强度1 500 lx、光照周期14 h·d⁻¹条件下培养,为了提高玫瑰再生芽苗的速度和诱导率,采用均匀设计法^[3-4],每个处理接种茎段数为10,重复3次,选用U¹⁰(10²)均匀表(表1),考察6-BA和IBA不同质量浓度交叉配比对诱导率的影响。嫩茎培养50天统计诱导率,筛选最适合玫瑰嫩茎基部再生芽苗的诱导培养基^[4-7]。

表1 玫瑰嫩茎基部直接再生芽苗诱导培养基的U₁₀(10²)因素及水平设计

水平	因素/(mg·L ⁻¹)	
	6-BA(X ₁)	NAA(X ₂)
1	2.50	0.02
2	2.60	0.03
3	2.70	0.04
4	2.80	0.05
5	2.90	0.06
6	3.00	0.02
7	3.10	0.03
8	2.70	0.04
9	2.60	0.05
10	2.50	0.06

1.3 玫瑰再生芽苗生根培养基的筛选

以1/2MS(大量元素)为培养基,加入蔗糖15 g·L⁻¹,琼脂7.0 g·L⁻¹,并附加不同浓度的IAA(由预试验确定为0.10 叶1.00 mg·L⁻¹)、IBA(由预试验确定为0.10 叶0.30 mg·L⁻¹)和NAA(由预试验确定为0.02 叶0.07 mg·L⁻¹),调节pH值为5.6,

将生长健壮的再生芽苗切下接种到培养基中,在温度(23 ±2) °C、光照强度1 100 lx、光照周期8 h·d⁻¹条件下培养。为了提高玫瑰的生根率,采用均匀设计法,每个处理接种茎段数为10,重复3次,选用U₁₀(10³)均匀表(表2),考察生长素IAA、IBA和NAA不同质量浓度交叉配比对生根率的影响。再生芽苗茎段培养35天统计生根率,筛选最适合玫瑰组培苗生根的培养基。

表2 玫瑰再生芽苗生根培养基的U₁₀(10³)因素及水平设计

水平	因素/(mg·L ⁻¹)		
	IAA(X ₁)	IBA(X ₂)	NAA(X ₃)
1	0.10	0.10	0.02
2	0.20	0.15	0.03
3	0.30	0.20	0.04
4	0.40	0.25	0.05
5	0.50	0.30	0.06
6	0.60	0.30	0.07
7	0.70	0.25	0.05
8	0.80	0.20	0.04
9	0.90	0.15	0.03
10	1.00	0.10	0.02

1.4 数据处理与分析

采用均匀设计法进行初步规律设计性试验,数据分析处理应用均匀设计软件(Uniform Design 3.0V)。

2 结果与分析

2.1 B₅培养基中不同质量浓度6-BA和IBA配比对玫瑰嫩茎基部直接再生芽苗的影响

由表3试验结果可得回归方程 $Y = -56.1 + 46.8X_1$,经计算,复相关系数 $R = 0.9017$,剩余标准差 $s = 4.89$,检验值 $F_t = 34.81$,临界值 $F_{(0.01, 1, 8)} = 11.26$, $F_t > F_{(0.01, 1, 8)}$,表明回归方程有意义。对 X_1 方程项进行显著性检验可知: X_1 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: $X_1 = 3.10$,在此组合基础上求得最优解: $y = 88.2$,此解为回归方程的解析解,需按公式 $Y = y \pm u \cdot s$ (其中 u 为正态分布的双侧分位数, s 为剩余标准差)计算出优化值区间估计为 $Y = 88.2 \pm 16.4$,即71.8% 叶104.6%。通过表3试验结果和回归方程可知,IBA对诱导率 Y 值的影响不显著,6-BA超过3.00 mg·L⁻¹时芽苗诱导率下降,6-BA在2.90 叶3.00 mg·L⁻¹之间有较高的芽苗诱导率,又以6-BA为2.90、2.91、2.92、2.93、2.94、2.95、2.96、2.97、2.98、2.99、3.00和3.10 mg·L⁻¹,不添加IBA的情况下做了12个处理的试验,重复3次,发现6-BA在2.90

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时芽苗诱导率最高。因此,将玫瑰嫩茎接种到附加6-BA $2.90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 B_5 培养基上进行再生芽苗诱导培养,培养18天,基部产生颗粒状突起;继续培养至28天,颗粒状突起变为锥形突起并逐渐伸长为芽苗(图1a);培养至45天,可诱导出大量芽苗形成丛生芽团,再生芽苗可生长至1.30 cm以上,且苗壮而整齐(图1b),芽苗诱导率达96%以上,在估计区间内,且比表3中10个处理的诱导率均高。因此,玫瑰嫩茎直接再生芽苗的最佳诱导培养基为: $B_5 + 6\text{-BA } 2.90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表3 玫瑰嫩茎基部直接再生芽苗诱导培养基的 $U_{10}(10^2)$ 均匀设计试验安排与结果

处理号	因素/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		诱导率 Y/%
	X_1	X_2	
1	2.50	0.03	59.0
2	2.60	0.04	64.5
3	2.70	0.06	71.0
4	2.80	0.02	78.5
5	2.90	0.03	88.0
6	3.00	0.05	83.0
7	3.10	0.06	80.0
8	2.70	0.02	70.0
9	2.60	0.04	64.5
10	2.50	0.05	56.0

2.2 1/2MS培养基中不同质量浓度生长素配比对玫瑰再生芽苗生根的影响

根据表4试验结果可得回归方程 $Y = 108 - 144X_2$,经计算,复相关系数 $R = 0.9651$,剩余标准差 $s = 3.09$,检验值 $F_t = 108.7$,临界值 $F_{(0.01,1,8)} = 11.26$, $F_t > F_{(0.01,1,8)}$,显著,说明回归方程有意义。对 X_2 方程项进行显著性检验可知: X_2 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: $X_2 = 0.10$,在此组合基础上求得最优解: $y = 93.6$,同理,按公式 $Y = y \pm u \cdot s$ 计算出优化值区间估计为 $Y = 93.6 \pm 10.4$,即83.2%~104.0%。通过表4试验结果和回归分析结果可知,仅IBA对生根率 Y 值影响显著,又因IBA与生根率 Y 呈负相关,猜测IBA

在 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下有较高的生根率,又以IBA为0.10、0.09、0.08、0.07、0.06、0.05、0.04、0.03、0.02、0.01、0.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 做了11个处理的试验,重复3次,发现IBA在 $0.07 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时再生芽苗茎段生根率最高。即待嫩茎基部分化产生的再生芽苗长至1.50 cm时,将生长健壮的苗切下,将其接种到附加IBA $0.07 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的1/2MS培养基中,培养14天发现茎段基部切口或近切口的茎部有独立的颗粒出现,继续培养至21天,颗粒经由锥形状逐渐伸长为根,培养至30天,有3~5条不定根(图1c),根长可达1.00 cm以上,苗高达2.00 cm以上,根和苗的形态、发育均正常,生根率达98.5%以上。在估计区间内,且比表4所列10个处理的生根率均高。可见,玫瑰组培苗的最佳生根培养基为:1/2MS + IBA $0.07 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表4 玫瑰再生芽苗生根培养基的 $U_{10}(10^3)$ 均匀设计试验安排与结果

处理号	因素/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)			诱导率 Y/%
	X_1	X_2	X_3	
1	0.10	0.30	0.05	65.0
2	0.20	0.10	0.04	93.0
3	0.30	0.25	0.02	77.0
4	0.40	0.15	0.07	86.0
5	0.50	0.20	0.03	81.0
6	0.60	0.20	0.03	80.5
7	0.70	0.15	0.06	88.0
8	0.80	0.25	0.02	72.0
9	0.90	0.10	0.04	90.5
10	1.00	0.30	0.05	59.0

待生根的苗长至2.50 cm时,从培养瓶中取出试管苗,在含有 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 高锰酸钾溶液中洗去苗上残留的琼脂,然后植入经100倍多菌灵消毒过的腐烂松针、泥炭土和细河砂(1:2:1)混合的基质中,用薄膜覆盖以保湿保温,湿度保持在80%,温度控制在 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$,每天自然光照9 h,3天后通风换气,7天后揭膜,每天适时喷洒清水2次,成活率达95%以上。

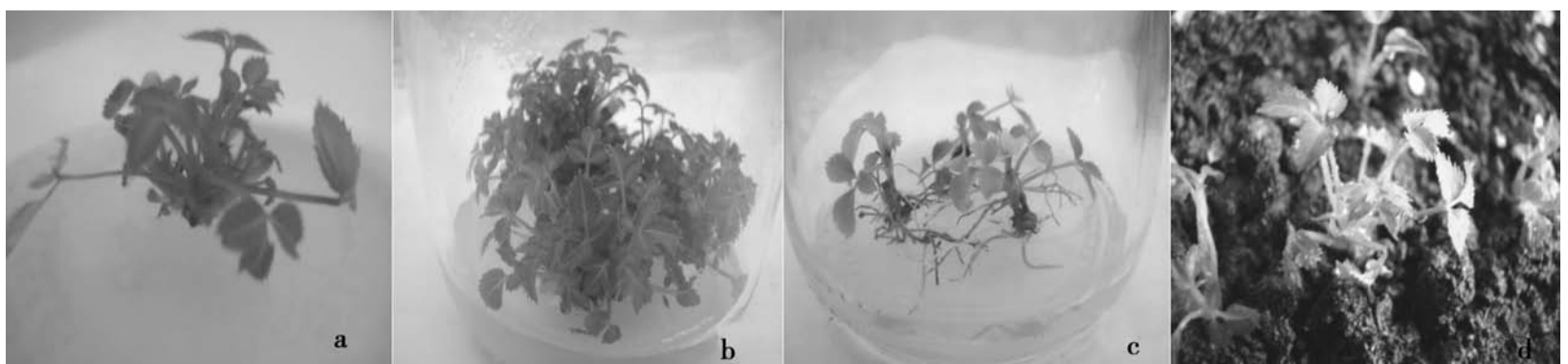


图1 玫瑰离体培养各阶段的培养物形态

图1 玫瑰离体培养各阶段的培养物形态