

高山杜鹃组织培养快速繁殖技术研究

陈妹幼

(福建省厦门市忠仑苗圃,福建厦门 361009)

摘要 以比利时高山杜鹃茎段和叶片为外植体进行诱导试验,显示茎外植体诱导丛生芽效果好。分别比较了不同激素对外植体诱导、丛生芽增殖及组培苗生根试验的效果,表明:相对较优的芽诱导培养基为 $1/4MS_0+ZT 2.0mg/L+IAA 0.5mg/L$;继代增殖培养基为 $1/4 MS_0+ZT 0.5\sim 1.0mg/L+IAA 0.5mg/L+GA_3 1.0mg/L$;壮苗生根培养基为 $1/2MS+蔗糖 20g/L+活性炭 2g/L+IBA 0.5mg/L$,移栽成活率 80%以上。

关键词 高山杜鹃;组织培养;快速繁殖;技术研究

中图分类号 S685.2104⁺.3 **文献标识码** A **文章编号** 1007-5739(2008)17-0013-02

高山杜鹃为杜鹃花科杜鹃花属植物,高山常绿灌木或小乔木,生长在海拔 2 500~4 000m 山地阴坡的冷杉林中或林缘草坡上。高山杜鹃花形多种多样,色彩艳丽,颇具观赏价值,已成为木本花卉中重要的一族,在园林上占有重要的地位。近年来我国每年均有批量进口高山杜鹃,成品花价格特别高,且枝粗叶芽少,对扦插育苗和嫁接育苗均不利,成活率低,费用高。为了在短时间内繁殖出大批量的高山杜鹃苗木,我们对其进行了组培快繁技术研究和探讨,建立了高山杜鹃的组培再生体系。该体系的建立对高山杜鹃种苗快速繁殖和规模化生产有着重要的指导意义。

1 材料与与方法

供试材料为比利时引进的盆栽高山杜鹃。

1.1 无菌外植体材料的获得

选取当年生、长势好的高山杜鹃嫩枝,将所取材料先用流水冲洗干净,接着在加有适量洗衣粉的水中浸泡 10min,再用流水冲洗干净,然后在超净工作台上用 70%酒精消毒 10s,取出用无菌水冲洗 2 次,再用 0.1%升汞溶液消毒茎段和茎尖 8min,消毒后用无菌水冲洗 4~6 次,并用无菌滤纸吸去表面水分。将消毒好的茎尖和茎段端部切去,接种在琼脂固化的 $1/4MS_0$ (大量元素 $CaCl_2$ 改为 $Ca(NO_3)_2$) + IAA 0.2mg/L + 水解酪蛋白 500mg/L 培养基上生长,30d 后,腋芽萌发可长到 2~3cm,将萌发的无菌小芽苗叶片切成 $1cm^2$ 见方的小块,茎段切成 1cm 长的切段作外植体。

1.2 培养条件

培养温度为 $(25\pm 2)^\circ C$,每天 12~14h 光照,光照强度为 1 500~2 500Lx。

1.3 培养基

在选择基本培养基的基础上,以改良的 $1/4MS_0$ 为基本培养基,附加 3%蔗糖及 0.6%琼脂,灭菌前 pH 值调至 5.5,按不同的培养目标添加相应的激素,配制成诱导分化、继代增殖、生根成苗培养基,常规方法灭菌。

2 结果与分析

2.1 不同细胞分裂素对高山杜鹃丛生芽诱导的影响

为了寻找适合高山杜鹃丛生芽诱导的培养基,设计了 5 组配方处理(见表 1)。每个处理接种 10 瓶,每瓶接 5 个外植体,将叶片和茎段接种在含不同激素配比下的分化培养基中培养,培养 45d 后统计试验结果。不同的细胞分裂素对高山杜鹃丛生芽诱导能力不同,玉米素 ZT 具有较强的诱导分化能力,这与陈钟宇等人的研究结果一致^[2-4],BA 和激动素 KT 未出现芽分化。试验还观察到茎段的诱导效果好,叶片未能诱导出不定芽。其中,激素组合 1(ZT 2.0mg/L+IAA 0.5 mg/L)具有较强的诱导不定芽发生的能力,单个外植体最多可以分化出 10 个芽,平均达 4~6 个。而组合 5(KT 1.0mg/L+2,4-D 0.5mg/L)能诱导出大量胚性愈伤,继代后可观察到胚状体的发生。试验结果表明,高山杜鹃相对理想的丛生芽诱导培养基为 $1/4MS_0+ZT 2.0mg/L+IAA 0.5mg/L$,诱导率为 84%。

表 1 不同激素配比对高山杜鹃芽分化的影响

| 序号 | 激素配比//mg/L | 接种外植体//个 | 形成丛生芽的外植体//个 | 丛生芽生长情况 |
|----|------------------|----------|--------------|-------------------------------|
| 1 | ZT 2.0+IAA 0.5 | 50 | 42 | 切口有少量愈伤,且有丛生不定芽 |
| 2 | ZT 2.0+2,4-D 0.5 | 50 | 0 | 腋芽不萌发,切口有致密块状愈伤 |
| 3 | ZT 2.0+NAA 0.2 | 50 | 8 | 少数外植体产生不定芽,大部分产生绿色的致密块状愈伤 |
| 4 | 6-BA 1.0+NAA 0.5 | 50 | 0 | 大部分褐化死亡,少数外植体保持绿色,腋芽不萌发,切口不分化 |
| 5 | KT 1.0+2,4-D 0.5 | 50 | 0 | 切口产生绿色的颗粒状愈伤 |
| 6 | CK | 50 | 0 | 外植体保持绿色,腋芽不萌发 |

注:基本培养基为 $1/4MS_0$ 。

2.2 不同细胞分裂素对高山杜鹃丛生芽增殖的影响

丛生芽在诱导培养基中培养 25~30d 后,形成非常密集的丛生芽而影响芽的生长。为了使芽得到更好地生长,在无菌条件下将丛生芽分割成 $1cm^2$ 小块,然后接种到不同细胞分裂素的继代培养基上进行继代培养。培养 30d 后统计株高大于 2cm 的苗数。由于细胞分裂素的持续作用,增殖培养

基中的不定芽不断分化和生长形成芽丛。由表 2 可知,在选用的 3 种细胞分裂素中,ZT 的效果最好,在供试浓度范围内,随着 ZT 浓度的升高,丛生芽增殖倍数也相应提高。当 ZT 浓度为 2.0mg/L 时,增殖倍数最高达 9 倍,但苗较细弱。综合考虑增殖倍数和小苗发育情况,认为处理组合 3 丛生芽增殖率较适宜, $1/4MS_0+ZT 0.5\sim 1.0mg/L+IAA 0.5mg/L$ 是理想的增殖培养基。

收稿日期 2008-07-08

表2 不同细胞分裂素对高山杜鹃丛芽增殖的影响

| 处理 | 激素配比//mg/L | 接种外植体//个 | ≥2cm的苗数//株 | 增殖倍数//倍 | 芽苗生长情况 |
|----|--------------------------------------|----------|------------|---------|--------|
| 1 | ZT 2.0+IAA 0.5+GA ₃ 1.0 | 20 | 183 | 9.0 | 细弱 |
| 2 | ZT 1.5+IAA 0.5+GA ₃ 1.0 | 20 | 146 | 7.0 | 一般 |
| 3 | ZT 1.0+IAA 0.5+GA ₃ 1.0 | 20 | 110 | 5.5 | 健壮 |
| 4 | ZT 0.5+IAA 0.5+GA ₃ 1.0 | 20 | 100 | 5.0 | 健壮 |
| 5 | 6-BA 0.5+IAA 0.2+GA ₃ 1.0 | 20 | 24 | 1.2 | 一般 |
| 6 | KT 0.5+IAA 0.2+GA ₃ 1.0 | 20 | 39 | 2.0 | 健壮 |

2.3 生根培养结果

生根阶段,为了使生根苗生长健壮,尽快地适应大田环境,要适当增加光照强度,一般控制在3 000~5 000Lx^[6]。将继代培养基上形成的粗壮芽(2~3cm)分株切割,扦插于生根培养基中培养20d后进行生根统计。对于生根培养基增加0.4g/L活性碳,其幼苗生长都比无活性碳时健壮。不同生长素间也存在差异,试验结果表3显示,生长素是高山杜鹃生根的重要因素,NAA、IAA、IBA等3种生长素均能诱导生根,但IBA 0.5mg/L对生根有明显的促进作用,在切口长出辐射状的不定根,生根多且粗壮,植株生长均衡,株型较好。

2.4 炼苗及移栽

高山杜鹃组培苗移栽能否成活是组培成败的关键之一,我们采用“二步法”的组培苗假植育苗技术^[9]。第1步是假植:当苗基部诱导出4~5条不定根且根长2cm左右时,培养瓶移到室温条件下适应3d后,将培养瓶的薄膜盖掀开,在常温和散射光下炼苗3~4d,再将培养苗从培养瓶中取出,并洗净根上附着的培养基,移栽于消毒过的基质穴盘中(1份珍珠岩+1份泥炭土)中,移栽成活率80%以上。塑料大棚上覆盖遮阳网,使苗处于半荫环境中,刚移入大棚时,要保持较高的环境湿度(≥85%),前2d每天要喷雾3~4次,大棚温度控制在20~25℃。第2步是上盆移栽:当苗高6~8cm,叶片6~8对,主茎粗0.2~0.3cm时,假植于穴盘中的苗就可移

表3 不同生长素对高山杜鹃芽苗生根的影响

| 处理 | 生长素//mg/L | 生根率//% | 根生长情况 | 苗长势 |
|----|----------------|--------|---------------------------|--------------|
| 1 | NAA 0.5 | 60 | 基部有大量愈伤,根系较细弱分布不均匀,不定根易褐化 | 叶宽大,茎粗壮,节间长 |
| 2 | IAA 0.5 | 35 | 根较少,细弱 | 苗细弱,生长缓慢 |
| 3 | IBA 0.5(不加活性碳) | 70 | 根系丰富,粗壮,分布均匀 | 叶较宽大,茎粗壮,节间短 |
| 4 | IBA 0.5 | 86 | 根系丰富,粗壮,分布均匀 | 叶较宽大,茎粗壮,节间短 |
| 5 | CK | 5 | 少数有粗根 | 生长缓慢 |

注:基本培养基为1/2MS+蔗糖20g/L^[6]+活性碳2g/L。

栽上盆,移栽成活率达91%。

3 结论与讨论

(1)外植体供体植株的年龄、发育阶段、生长环境和外植体取材部位可导致外植体生理生化状态差异,从而影响组织培养的形态发生^[7];同时由于从盆栽的植株直接采摘的嫩枝,经消毒处理也会有部分污染而影响试验结果,且消毒液易使幼嫩组织受伤而影响其分化。本试验采用带腋芽的茎节和茎尖培养获得无菌苗作为外植体,使得试验在相同水平下进行,减少了误差。

(2)对高山杜鹃快繁研究表明,相对较优的芽诱导培养基为1/4MS₀+ZT 2.0mg/L+IAA 0.5mg/L;继代增殖培养基为1/4MS₀+ZT 0.5~1.0mg/L+IAA 0.5mg/L+GA₃ 1.0mg/L;壮苗生根培养基为1/2MS+蔗糖20g/L+活性碳2g/L+IBA 0.5mg/L,移栽成活率80%以上。

(3)在芽诱导试验中,激素组合KT 1.0mg/L+2,4-D 0.5mg/L能诱导出大量胚性愈伤,继代后可观察到胚状体的发生。胚状体的发生对于体细胞培养再生植株技术的建立至

关重要。胚胎发生过程和胚状体萌发成苗有待进一步深入研究。

(4)组织培养技术的应用成败很大程度上取决于试管苗移栽的成活率及成活质量。采用“二步法”的组培苗假植育苗技术大大提高了试管苗移栽的成活率及成活质量。

4 参考文献

- [1] 杨乃博.毛叶杜鹃叶片的不定芽分化[J].植物生理学通讯,1985(5):38.
- [2] 钟宇,张健,罗承德,等.西洋杜鹃组织培养技术体系研究(II)——培养物的增殖和生根[J].四川农业大学学报,2001,19(2):141-143.
- [3] 陈云志,何小弟,蒋佩尧,等.杜鹃的组织培养[J].江苏农学院学报,1985,6(3):2-4.
- [4] 董春枝,郑开文,蒋佩尧.三种杜鹃花组培快繁初步研究[J].北京农业大学学报,1989,15(2):164-166.
- [5] 胡宝忠,王荃.杜鹃花组织培养技术研究[J].东北农业大学学报,2003(4):459-464.
- [6] 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.
- [7] 张晓雅,孙红梅,田颖辉.杜鹃组织培养技术研究进展[J].北方园艺,2006(4):76-77.

(上接第12页)

霉素+绿旺2号的效果最好,坐果率分别高达55%和47%,产量分别为29.2kg和25.5kg;环割+绿旺2号的处理其坐果率也达到32%,产量为14.2kg,与对照相比达到差异极显著水平;而单用绿旺2号喷雾的处理与喷清水的对照效果差不多,即差异不显著,坐果率不高,分别为19%和13%,出现大

量的落果,产量也较低。因此,贡柑在谢花后至第2次生理落果前如果不进行任何处理,在自然情况下落果会相当严重,在树势不很旺盛的情况下,可以不进行环割,采用喷施赤霉素+绿旺2号效果也很好。本试验仅为1年的简比试验数据,为更好找出整套保花保果的技术措施还有待进一步探索。