

高山杜鹃组织培养研究现状

何俊蓉¹, 袁 宁², 吴 洁¹, 阎文昭¹, 蒲志刚¹

(1. 四川省农业科学院生物技术核技术研究所, 成都 610066; 2. 西南交通大学生物工程学院, 成都 610031)

摘 要: 本文从外植体的选择与灭菌、基本培养基的选择、启动与增殖培养、生根培养和移栽等方面总结了近几年高山杜鹃的组织培养现状, 并提出了有待解决的一些问题。认为组织培养是进行高山杜鹃的快速繁殖生产的重要手段, 不仅能解决市场上高山杜鹃供不应求的现状, 还有利于高山杜鹃的引种和育苗。

关键词: 高山杜鹃; 组织培养; 研究进展

中图分类号: S723.132 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5508(2008)04-0052-04

杜鹃花分布在北半球温带及亚热带, 主产于东亚和东南亚地区, 生长于海拔 800 m ~ 5 000 m 的高山、中山或低丘。全世界约有 960 种, 亚洲约有 850 种, 中国约有 560 种, 是杜鹃花的原产地, 占世界种类的 59%, 主要分布在横断山地区。

杜鹃花是当今世界上最著名的花卉之一, 是举世公认的名贵观赏花卉, 被列入中国十大名花, 誉为“花中西施”。而高山杜鹃因其花冠硕大、颜色丰富、花姿优美、株型漂亮而且四季常绿, 更是杜鹃家族中的“精品”。英国著名植物学家威尔逊称其为: “绿色世界里的皇族没有一种开花植物能与之媲美”。^[1] 我国杜鹃资源虽然丰富, 但很少用于盆景, 盆景高山杜鹃是近几年才兴旺起来的, 且市场上销售的主要是从比利时进口。虽然引进国外优良品种对发展我国花卉具有重要的作用, 但是长期依赖进口将不利于我国花卉产业的长期发展和水平提高, 也会使我国的野生花卉资源白白浪费^[2]。

杜鹃的繁殖方式主要是种子繁殖、扦插繁殖、压条繁殖、嫁接繁殖等^[3]。但是由于高山杜鹃通常无种子, 而扦插繁殖又受母株材料和繁殖季节的影响, 往往无法满足市场的需要。应用组织培养技术进行观赏植物的繁殖, 具有繁殖速度快, 不受季节影响等特点, 对于优良品种的引进和推广意义重大^[4]。

植物组织培养是用从植物植株上得到的外植体(通常是植物体的部分组织或者器官)在培养基上进行离体培养, 基于植物的全能性, 这些外植体具有发育成为完整植株的可能性。这是 20 世纪之初以

植物生理学为基础发展起来的一门技术, 经过百年的发展和完善, 这项技术已在科研和生产上得到广泛应用, 成为举世瞩目的生物技术之一, 已经成为现代农业技术中一项快速、高效获得完整植株的重要无性繁殖方法^[5]。因此, 应用组织培养方法来进行高山杜鹃的快速繁殖生产, 不仅能解决市场上高山杜鹃供不应求的现状, 还有利于引进高山杜鹃的优良品种以及为工厂化育苗提供依据。

1 高山杜鹃简介

1.1 高山杜鹃的品种介绍

高山杜鹃 (*Rhododendron lapponicum* (L.)) 为杜鹃花科高山常绿灌木或小乔木, 是一种高档花卉植物, 自然生长状态下树高约 3 m, 生长在海拔 2 500 m ~ 4 000 m 山地阴坡的冷杉林中或林缘草坡上。叶簇生枝顶, 叶面无毛, 叶背被赤黄色密绵毛。花顶生, 总状伞形花序, 花冠钟状, 有白、粉、红等色, 一个花苞中有十几朵小花, 呈球形开放, 色泽鲜艳, 花期 4 至 5 月。植株丰满, 叶大, 花美观独特。西南地区的高山杜鹃资源丰富, 分布了很多野生的高山杜鹃品种, 如大王杜鹃, 银叶杜鹃, 团叶杜鹃, 腺果杜鹃, 美容杜鹃等等, 具有很高的观赏性和巨大的开发价值, 逐渐受到了人们的重视, 近几年不断地进行引种和野生高山杜鹃的资源开发。

现在园艺上应用的品种一般是由无鳞杜鹃花亚属, 有鳞杜鹃花亚属, 马银花亚属中的常绿杜鹃经过

收稿日期: 2008-01-22

基金项目: 四川省科技计划项目, 优质高效专用抗逆经济作物新品种选育(花卉)。

作者简介: 何俊蓉(1962-), 女, 副研究员, 主要从事经济植物组织培养和快繁研究。

上百年的杂交培育而成的栽培品种^[6],花色艳丽、花形丰富。如红粉佳人(Nova Zembla),神州福星系列(Furnivall's Daughter),粉冠军(Germania),珊瑚公主(Rocket 1412)等等。

1.2 高山杜鹃的生长习性

光照:高山杜鹃在微遮荫的条件下生长良好,但是要避免强光直射。对于大多数高山杜鹃而言,一般需要40%~60%的光照^[7]。

温度:高山杜鹃性喜冷凉气候,尤其能耐-26℃的低温,但是不适宜高温环境,最高气温35℃~39℃,这时生长受到抑制,应及时采取一些遮阳、降温、换气措施^[6]。高山杜鹃最适温度是15℃~25℃。

水分:高山杜鹃虽然具有较强的须根,但其根却很纤细,对水分反映十分敏感。对大多数高山杜鹃而言,较适宜的空气湿度为70%~90%^[7]。

土壤:具有团粒结构、疏松、肥沃、通气和排水良好的富含腐殖质的酸性土壤,是高山杜鹃栽培的必要条件。

2 高山杜鹃离体器官的组织培养

现在高山杜鹃组织培养使用得最多的是通过诱导顶芽和腋芽形成丛芽的增殖方式,因为不经过愈伤组织再生,从而可以有效地缩短快繁时间,保持原品种的遗传特性^[5]。

2.1 外植体的选择

现在高山杜鹃丛芽增殖的外植体主要是采用其茎尖^[3,7]和带芽的幼嫩茎段^[3,7,8],可以直接得到大量的丛生芽,而其中又以带芽的幼嫩茎段为更好。选取外植体的时间以3月下旬到4月上旬的晴天下午为佳,此时采集的外植体进行组培时污染率低,启动快。

2.2 外植体灭菌

高山杜鹃是木本植物,不仅其表面附着有很多细菌和真菌,并且在其内部还有内生菌,因此外植体的消毒困难,接种后污染较为严重。在高山杜鹃组培中,用于消毒的试剂一般都采用毒性较大的HgCl₂^[4,8-11]。较为普遍的灭菌步骤如下:先用自来水将所取材料冲洗干净,然后用洗衣粉浸泡20 min左右,用流水清洗干净,至于无菌工作台上,用75%酒精浸泡30 s,后用无菌水冲洗两次,再用0.1%

升汞溶液浸泡12 min~15 min,最后用无菌水冲洗干净。但是因为升汞毒性太大,容易造成外植体严重褐变。因此有人改用5%次氯酸钠+0.1%的山梨糖醇代替升汞^[12]。

2.3 基本培养基的选择

培养基是植物体在体外的基本营养来源,因此,选择合适的基本培养基,有利于外植体的发育和生长。选用何种培养基,因杜鹃的种、品种及外植体而异,需要试验来确定。1975年Anderson等人总结出可广泛应用于杜鹃属组培的Anderson培养基,李俊强^[9]采用此种培养基培养银叶杜鹃茎尖与茎段,成功获得再生植株。Read(1982)培养耐寒落叶杜鹃时,研制了Read培养基,现在也广泛应用在杜鹃的组织培养上,何芳兰^[11]用此种培养基和MS培养基进行了启动和丛芽增殖的对比试验,发现Read培养基对于丛芽的诱导效果更好。Lloyd与Mc Cown(1980)研制出木本培养基(woody plant medium)缩写为WPM,苗永美^[10]在实验中发现,WPM培养基对于诱导大叶杜鹃和桃叶杜鹃愈伤组织效果很好,而在诱导银叶杜鹃愈伤组织时,效果不及Read培养基。汤桂钧^[4]采用1/4MS进行外植体诱导、丛生芽增殖及试管苗生根实验时,也取得了很好的效果。

2.4 启动与增殖培养

现在高山杜鹃的启动与丛生芽增殖培养中,主要使用的植物生长素有NAA、IAA、IBA,细胞分裂素主要是使用ZT、KT,而6-BA被普遍认为会妨碍杜鹃的生长与繁殖。一种新型的细胞分裂素-噻苯隆(TDZ)现在也被运用到了杜鹃的组织培养中,并在丛生芽诱导时,取得了较好的效果。

对比王吉^[8]和黄萍萍^[9]实验发现,当丛生芽诱导培养中,ZT和NAA配合使用,诱导效果明显,NAA水平保持在0.05 mg·L⁻¹,当ZT浓度小于0.8 mg·L⁻¹时,丛生芽诱导率会随着ZT水平的升高而升高,当ZT达到3.0 mg·L⁻¹时,丛生芽诱导率最高达到90%左右,而这与使用的基本培养基种类基本无关,说明高山杜鹃丛生芽增殖主要是受到激素,特别是细胞分裂素的调控。但是何芳兰^[12]的正交实验结果却表明,高山杜鹃丛生芽诱导主要受到基本培养的影响,其中以Read培养基诱导效果最好,其次才是细胞分裂素的影响。

实验表明,在丛生芽增殖阶段,ZT是主导因素,当ZT达到3.0 mg·L⁻¹时,丛生芽增殖倍数最大,可以达

到9.0,但是此时试管苗细长瘦弱,有玻璃化现象,质量较差,适量降低 ZT 的浓度,并加入一些细胞生长素,如 IAA 等,可以提高试管苗的质量^[8]。但也有实验表明^[3],在 1/2 MS 中,KT 也能很好地促进丛芽增殖,最高增殖率可以达到 7.0,但叶片小,有玻璃化现象,调整 KT 浓度,使增殖降为 5.0 时,小苗质量最好。

2.5 生根培养

现在高山杜鹃普遍采用的生根培养基为 MS、1/2 MS、Read,而生长素以 NAA 最为有效。汤桂钧^[4]的实验表明,1/2 MS + NAA 5.0 mg · L⁻¹ + AC 0.5% 的效果最好,20 d 后,生根率能达到 95%。同时,汤桂钧还发明一种不用琼脂作固体的高山杜鹃生根培养基,他使用 50% 珍珠岩 + 50% 泥炭混物作为基质,灭菌后,将小苗基部切口处在生根粉中蘸一下,再接种至培养瓶中培养,也能很好促进高山杜鹃生根,且生根率能达到 91%,且能有效降低枝条易褐化和通风难的问题。

毛元荣^[14]等还考察了活性炭、pH 值、蔗糖浓度和培养基类型对于生根的影响。实验结果表明,活性炭对高山杜鹃的生根率、生根量基本上没影响,但是加入活性炭后,根生长整齐,形态正常,全部为细长的不定根,长度也长于未加活性炭的培养基,表明活性炭能够改善高山杜鹃不定根的生长与发育情况。适合杜鹃生根的 pH 值为 5.0 ~ 5.5,且在 5.5 时生根率最高,可达 90% 以上。蔗糖浓度对生根率无影响,但影响小苗根的生长速率,随着蔗糖浓度的升高,小苗根的生长速率就越快,但蔗糖浓度不易太高,在每升 30 g 最为合适,高于这个数值,不但不经济,而且高渗透压还会对植物产生损害。

2.6 生根苗移栽

当高山杜鹃生长至 3 cm ~ 4 cm 高时,就可以进行炼苗移栽了,先将组培苗置于室温和自然光下炼苗 7 d ~ 10 d,然后打开瓶盖,洗去根部的琼脂,移入基质中,并用塑料薄膜覆盖,保持相对湿度 85%,在移入基质之前,可以先用 1 000 倍的多菌灵溶液浸泡 3 min^[12]。基质的选择对于移栽成活率有较大影响,选用蛭石:泥炭土(1:1)混合基质,成活率可以达到 75%^[7,8],但是若选用含腐殖质的土壤,成活率可以达到 85%^[12]。

汤桂钧^[4]经过大量试验摸索,创立了“二步法”的试管苗假植育苗技术,经前后 4 个月左右的培养,

最后以穴盘苗的标准出圃,成活率可以达到 100%,其中前 2 个月假植移栽存活率达 98.6%,后 2 个月的穴盘苗存活率达 100%。

3 愈伤组织培养与植株再生

高山杜鹃的愈伤培养研究较少,何芳兰^[10]等人利用无菌苗的叶片和根段进行了愈伤培养,发现在 Read + TDZ 1.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.05 mg · L⁻¹ 中,叶片和根段均能诱导出大量愈伤组织,但仅有叶片愈伤组织能分化和诱导出芽,分化率较高,为 43.21%,根段的愈伤组织既没有分化,也没有出芽。笔者使用 WPM + TDZ 1.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ 和 WPM + TDZ 1.0 mg · L⁻¹ + IBA 0.2 mg · L⁻¹ 两种培养基对高山杜鹃(红粉佳人)的叶片进行了愈伤组织培养,在第 20 天左右开始出现愈伤组织,呈淡黄色,较为紧密,但未分化。

4 问题与展望

杜鹃以其千姿百态、花色斑斓、种类多、花期长、适应性强、分布广等特点,可作为很理想的园林植物,也可以用于盆栽、焦点种植,并在森林旅游和药用方面也有很好的开发价值^[15]。因此,深入研究高山杜鹃的快繁方式,满足市场需求,使高山杜鹃的培育形成商品化和产业化而不再依赖于从国外进口,这是必然趋势。虽然组织培养具有很大的优点,能够克服传统繁殖方式的缺陷,但是在高山杜鹃的组织培养技术中还有很多问题亟待解决。

首先是高山杜鹃的外植体灭菌。高山杜鹃是木本植物,在其枝干内部有多种微生物,在外植体灭菌时,很难将这些内部的微生物杀灭,因此,在外植体接入培养基后,染菌率极高,这在很大程度上降低了高山杜鹃组织培养的成功率。

第二,褐化严重。组织培养过程中,外植体褐变是影响组织培养成功的重要因素。褐变是由于组织中的酚氧化酶被激活,从而不断产生棕褐色的醌类物质,这类物质的堆积就会毒害培养的材料。要抑制褐化可以采取以下措施:选择较嫩的外植体;在生长旺盛时期采集外植体;添加 Vc 或者水解酪蛋白来缓解褐变程度;添加吸附剂,如 AC 等等。

第三,间接器官发生途径研究相对较少。愈伤

组织生成是组织培养中的一个重要阶段,在合适的培养条件下,愈伤组织可以向器官分化方向发展,再生出不定芽或生成胚状体,最后再生成植株。愈伤组织再生成植株研究在基因转化方面也有很大的用途,很多基因转化实验的瓶颈就是不能让已经导入了新基因的愈伤组织分化、再生成新植株。但是现在国内研究高山杜鹃间接器官发生途径的相关报导还太少,完全没有形成一个体系。

尽管在高山杜鹃组织培养过程中还有很多问题需要解决,还有很多方面有待研究,但是高山杜鹃组织培养技术为其繁殖种苗提供了一种新方法。要成功实现高山杜鹃组织培养,并建立组织培养技术体系,实现规模化和产业化生产种苗,在现阶段还很难,道路还很曲折,但前途其应用却是光明的。

参考文献:

- [1] 李志斌,白霄霞,李萍,等.高山杜鹃将成为我国高档园林绿化的新秀[J].农业科技与信息(现代园林),2007,07:82~85.
- [2] 张石宝,胡虹,王华,等.云南的高山花卉种质资源及开发利用[J].中国野生植物资源,2005,3:19~22.
- [3] 张长芹,冯宝钧,刘昌礼,等.几种常绿高山杜鹃的扦插试验[J].园艺学报,1994,21(3):307~308.
- [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].海农业学报,2004,20(3):15~18.
- [5] 刘欣,薛金芝,赵丹,裴崎君,等.植物组织培养技术在林木育种中的应用[A].吉林林业科技,2007,5:8~10.
- [6] 李志斌.高山杜鹃栽培技术研究[J].中国花卉园艺,2005,6:22~23.
- [7] 张明丽,刘永强.高山杜鹃栽培技术研究[J].安徽农业科学,2005,33(6):1008~1009.
- [8] 王吉,张守琪,张志勇,等.高山杜鹃离体快繁技术研究[A].甘肃农业科技,2006,8:11~13.
- [9] 黄萍萍.高山杜鹃(蒙他瑰)快速繁殖技术研究[A].福建农业科技,2004,3:23~24.
- [10] 李俊强.银叶杜鹃组织培养技术体系研究[D].四川大学,2003,5.
- [11] 苗永美.几种杜鹃组织培养技术研究[D].四川大学,2004,6.
- [12] 何芳兰.高山杜鹃组织培养关键技术研究[D].甘肃农业大学,2006,6.
- [13] 范玉清.国外杜鹃组织培养发展概况[J].生物学杂志,1996,13(2):30~31.
- [14] 毛元荣,路群,汤敏,周根余,等.影响高山杜鹃生根的几个因素[A].曲阜师范大学学报,2004,1:88~91.
- [15] 汪源,鞠波.中国野生杜鹃资源开发利用探讨[B].生物学杂志,2006,2:43~44.

(上接第48页)

择难度较大,要使得毛叶木姜子优良品质得到保证,良种资源能够保存下去,并且不断的得到改良,优树选择仅仅是毛叶木姜子良种选育的起步,本次选择区域不大,还需要开展更为广泛、深入的研究工作。

参考文献:

- [1] 周应书.毕节地区板栗优树选择及分级[J].贵州林业科技,1996,24(4):49~51.
- [2] 吴际友,龙应忠,童方平,等.楷木优树选择研究[J].湖南林业科技,2004,31(6):10~12.
- [3] 陈强,周跃华,常恩福,等.西南桦优树选择的研究[J].浙江林学院学报,2005,22(3):291~295.
- [4] 王春生.湘西地区油桐优树选择初报[J].湖南农业科学,2006(2):89~91.
- [5] 郭军战,张奕,成密红,等.葛藤优良单株选择[J].西北林学院学报,2006,21(3):50~53.
- [6] 朱仁刚,邓桂香,范林元,等.云南省膏桐优良单株选择初报[J].西南林学院学报,2007,27(2).
- [7] 钟伟华,何昭珩,吴精南.大树法选优及其增益估测的研究[J].林业科学研究,2001,14(3):315~321.
- [8] 郑仁华,黄德龙,李金良,等.福建柏优树选择及种实表型变异研究[J].福建林业科技,2004,31(1).
- [9] 朱益川,赵世远,文斌,等.四川核桃优良单株选择的研究[J].四川林业科技,2000,21(4).
- [10] 王明庥.林木遗传育种学概论[M].北京:中国林业出版社,1989.
- [11] 章文波,陈红艳.实用数据统计分析及SPSS.12.0应用[M].北京:人民邮电出版社,2006.