

# 高山杜鹃茎段组织培养和优化体系的建立

刘晓青, 苏家乐, 项立平, 陈璐

(江苏省农业科学院 园艺研究所, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 以高山杜鹃茎段为外植体, 研究不同品种、不同激素组合对 5 个高山杜鹃品种无菌芽发生的影响, 并以品种 Jean de Marle Montague 为试验材料, 研究不同激素组合对试管苗生根和增殖的影响。结果表明: 茎段外植体均能诱导萌发, 最佳诱导培养基为 WPM + TDZ ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 诱导率为 90.4%; 试管苗继代增殖培养基为 WPM + TDZ ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + NAA ( $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 增殖系数达 7.96; 试管苗生根培养基为  $1/2$  WPM + NAA ( $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + IBA ( $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 生根率为 98.6%。试管苗移栽到泥炭、珍珠岩(体积比为 4:1)基质中, 成活率达 98% 以上。

**关键词:** 高山杜鹃; 茎段; 组织培养; 优化体系

中图分类号: S 685.21

文献标识码: A

文章编号: 1671-4652(2007)03-0091-04

## Study on the stem in vitro culture and establishment of optimization system for *Rhododendron lapponicum*

LIU Xiao-qing, SU Jia-le, XIANG Li-ping, CHEN Lu

(Inst of Hort, Jiangsu Acad of Agric Sci, Nanjing 210014, China)

**ABSTRACT:** The stems of *Rhododendron lapponicum* were used as explants to study the effect of different cultivars and hormone combinations on the generation of germ-free shoots. And the cultivar Jean de Marle Montage was used to compare effects of different hormone combinations on the rooting and propagation of the *R. lapponicum* test-tube plantlets. The results showed that all the stem segments were induced and bourgeoned. The optimal medium for callus inducement from stems was WPM + TDZ ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), and the inductivity reached 90.4%. WPM + TDZ ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + NAA ( $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) was suitable for multiplication of test-tube plantlets, and the coefficient of multiplication could reach 7.96.  $1/2$  WPM + NAA ( $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + IBA ( $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) was an appropriation medium for rooting, and the rooting rate was up to 98.6%. The survival rate was above 98% when the plantlets were transplanted to the substratum consisting of the peat and the pearl rock 4:1.

**KEY WORDS:** *Rhododendron lapponicum*; stem; in vitro culture; optimization system

高山杜鹃(*Rhododendron lapponicum* L.)是杜鹃花科杜鹃属灌木类高档观赏植物,原产我国中西部地区的高山密林中,后由德国、比利时等国引种栽培驯化,并杂交选育出许多优良品种。近年来,盆栽杜鹃花品种单一、档次不高等问题制约了杜鹃花产业的发展,而高山杜鹃因其花序巨大、四季常绿、花团锦簇、花叶俱美等特点,成为人们喜爱的高档花卉之一,具有广阔的市场开发前景<sup>[1]</sup>。

高山杜鹃枝粗叶少,繁殖系数只有普通西洋杜鹃的  $1/25$ ,且扦插生根十分困难<sup>[2]</sup>,故只能通过组织培养快繁来迅速扩大群体。20 世纪 80 年代以来,有关花卉组织培养的研究发展迅猛,但主要集中在高档花卉如蝴蝶兰、百合、大花惠兰等。而有关高山杜鹃的组织培养研究较少,起步较晚,且高山杜鹃的组织培养快繁品种之间差异很大。汤桂钧等<sup>[3]</sup>曾用组织培养方法对部分品种进行快繁,但无菌芽的诱导率较低,低于 50%。目前,高山杜鹃盆花几乎全部依赖于进口,其主要原因是种苗难以实现快速繁殖。本

收稿日期: 2007-03-02

基金项目: 江苏省“十一五”科技攻关项目(BE2006336)

作者简介: 刘晓青(1970—),女,江苏南京人,江苏省农业科学院助理研究员,主要从事花卉研究与开发工作。

E-mail: liuxiaoqing884264@yahoo.com.cn

试验拟利用比利时高山杜鹃,应用组织培养技术对该花卉种苗进行快速繁殖,以实现高山杜鹃种苗、盆花的规模化生产。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试品种为市场热销的 5 个高山杜鹃优良品种,分别为 Jean de Marle Montage、Nova Zembla、Cosmopolitan、Germania、Donator,均来源于比利时。

### 1.2 试验方法

1) 培养基和培养条件:① 诱导培养基。以 WPM 为基本培养基,附加 0.05、0.10、0.50、1.00、2.00、5.00  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  等 6 种不同浓度的细胞分裂素 TDZ 或 ZT。② 增殖培养基。以 WPM 为基本培养基,附加不同浓度的 TDZ 和 NAA, TDZ 浓度为 0.3、0.5、0.7  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , NAA 浓度为 0.1、0.5、1.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。③ 生根培养基。以 1/2 WPM 为基本培养基,附加不同浓度的 NAA、IBA、NAA+IBA,浓度均为 0.1、0.5、1.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。各培养基中蔗糖浓度为 30  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,琼脂浓度为 7  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,pH 值为 5.0~5.7,培养温度为 23  $^{\circ}\text{C}$ ,光照度为 2 000~3 000 lx,每天光照时间为 13 h。

2) 外植体准备:将种苗栽植在塑料花盆中养护,成活后剪去枝条顶部,以促进分枝生长。当新生的分枝长至 6 cm 左右、叶片刚转绿平展时,剪下枝条,去除叶片,用自来水冲洗 15 min、洗洁精洗涤 2 次后吸干,在无菌室超净台上用 75%酒精消毒 1 min;再用 1  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化汞消毒 20~25 min,最后用无菌蒸馏水冲洗 4~5 次。用吸水纸吸干。

3) 细胞分裂素对茎段发芽的诱导试验:在超净台上将灭菌处理过的高山杜鹃嫩枝切成 1.5~2.5 cm 的茎段(每段带 1~3 个腋芽节),插于不同的芽诱导培养基中,每处理 10 瓶,每瓶接种 3 个茎段,30 d 后统计茎段诱导率,其间观察诱导出芽的生长状况。重复 3 次。

4) 激素组合对试管苗的增殖试验:将诱导培养基上已萌发的嫩芽切下,转接于增殖培养基上。每处理 10 瓶,每瓶接种 3 个芽,接种苗高 2 cm 左右。30 d 后统计嫩芽的分化率、增殖系数及苗高度。重复 3 次。

5) 生长素对试管苗的生根试验:取继代增殖培养基上生长健壮、高 2~3 cm、已半木质化的小苗接种在生根培养基上。每处理 10 瓶,每瓶接种 5 株,20 d 后统计苗生根情况。重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 细胞分裂素对茎段诱导芽的影响

将高山杜鹃 Jean de Marle Montage 茎段接种在含不同浓度(0.05~5.00  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )细胞分裂素 TDZ 或 ZT 的芽诱导培养基上。10 d 后观察,当 2 种激素浓度大于 0.1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,高山杜鹃的茎段均开始萌发无菌芽,但芽的生长情况因细胞分裂素浓度的不同而发生变化。30 d 后统计茎段诱导率和芽体生长状况(表 1)。结果表明,TDZ 浓度为 0.05~0.50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、ZT 浓度为 0.05~1.00  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,随着激素浓度的增加芽的萌发率亦增

表 1 细胞分裂素对茎段诱导芽的影响  
Tab. 1 The effects of cytokinin on induction of stem sprouts

细胞分裂素	浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	接种数 /个	芽诱导率* /%	芽生长状况
TDZ	0.05	30	45.3	芽长势弱,出芽慢,芽长约 1.5 cm
ZT	0.05	30	30.6	芽长势弱,出芽慢,芽长约 1 cm
TDZ	0.10	30	60.7	芽长势较弱,出芽较慢,芽 1.5~2.0 cm
ZT	0.10	30	40.5	芽长势弱,出芽较慢,芽长约 1.5 cm
TDZ	0.50	30	90.4	芽粗壮,出芽快,芽长 2.5 cm,叶绿色
ZT	0.50	30	45.1	芽体较粗壮,出芽较快,芽长约 1.5 cm
TDZ	1.00	30	79.6	芽体较粗壮,出芽较快,芽长约 2.0 cm
ZT	1.00	30	67.8	芽体较粗壮,出芽较快,芽长约 2.0 cm
TDZ	2.00	30	50.6	芽体较弱,部分叶片稍玻璃化
ZT	2.00	30	59.3	芽体较粗壮,出芽较慢,芽长 1.5 cm
TDZ	5.00	30	30.3	芽体长势差,出芽慢,叶片多玻璃化
ZT	5.00	30	43.2	芽体长势差,叶色泛黄

\* 芽诱导率=(出芽的外植体数/接种的外植体总数)×100%。

加,并表现出芽体长势粗壮、芽体长、诱导率高。但当 TDZ 浓度大于  $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、ZT 浓度大于  $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,芽的诱导受抑制。当 TDZ 浓度大于  $2.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,诱导产生的芽开始出现玻璃化现象,并随 TDZ 浓度的增加而加重。比较 TDZ 和 ZT 在相同浓度下对高山杜鹃茎段诱导的差异,当两者浓度均高于  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,ZT 对高山杜鹃诱导芽的效果略高于 TDZ,但诱导芽的质量下降;而当两者浓度为  $0.05 \sim 2.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,TDZ 对高山杜鹃茎段诱导芽的效果明显好于 ZT,且芽体质量高,表现为芽体长、粗壮、叶色深绿;当 TDZ 浓度为  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,诱导率达 90.4%,明显高于 ZT,两者差异显著( $P < 0.05$ )。因此,最适宜高山杜鹃品种 Jean de Marle Montage 茎段诱导芽的培养基为 WPM+TDZ ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )。

## 2.2 不同品种高山杜鹃茎段诱导的差异

将高山杜鹃 Nova Zembla、Cosmopolitan、Germania、Donator 的茎段接种于 WPM+TDZ ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 培养基上,以测试不同品种对培养基的适应性。培养期间观察无菌芽的生长情况,30 d 后统计诱导率。结果表明,不同品种间芽的诱导率及芽的生长状况存在差异(表 2)。品种 Nova Zembla、Cosmopolitan、Germania 的无菌芽生长表现为芽体粗壮、叶色绿(正常),而品种 Donator 则表现为芽体瘦弱、叶色暗红(不正常)。统计分析表明,只有 Donator 与其他 3 个品种的诱导率存在显著差异( $P < 0.05$ ),其他 3 个品种间诱导率无显著差异。即适宜于 Jean de Marle Montage 茎段诱导芽的培养基对品种 Nova Zembla、Cosmopolitan、Germania 亦适应,但不适应于品种 Donator。由此可见,相同的培养基对同种材料的不同品种有一定的适用性。

## 2.3 激素组合对试管苗增殖的影响

将诱导出的高山杜鹃 Jean de Marle Montage 嫩芽切下,转接到表 3 所示的增殖培养基上。当 TDZ 浓度为  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、NAA 浓度为  $0.1 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,芽的增殖系数及长势均一般;而当 TDZ 浓度为  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、NAA 浓度为  $0.1 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,芽的增殖十分明显,增殖系数达  $6.30 \sim 7.96$ 。尤其当 TDZ 浓度为  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、NAA 浓度为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,增殖系数达 7.96,且苗长势粗壮;而当 TDZ 浓度提高至  $0.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,增殖系数又有明显提高,但小苗长势细弱、叶色黄绿、没有主茎,且玻璃化程度严重,不利于继代增殖。经方差分析,以 TDZ 为主处理的 3 组处理间,即 TDZ 浓度为  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时的增殖系数和 TDZ 浓度为  $0.5$ 、 $0.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的增殖系数差异显著( $P < 0.05$ )。而各亚处理间的分化率无显著差异。综合各因素,最适宜高山杜鹃品种 Jean de Marle Montage 增殖的培养基为 WPM+TDZ ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + NAA ( $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )。

## 2.4 生长素对试管苗生根的影响

将在 WPM+TDZ ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + NAA ( $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 培养基上生长健壮、高  $2 \sim 3 \text{ cm}$ 、半木质化的高山杜鹃品种 Jean de Marle Montage 小苗切下,接种到  $1/2$  WPM 及附加不同生长素的生根培养

表 2 不同高山杜鹃品种茎段诱导芽的差异\*

Tab. 2 The differences in induction of the stem sprout of plant varieties

品 种	接种数 /个	芽诱导率 /%	芽生长状况
Nova Zembla	30	85.7 <sup>a</sup>	芽体粗壮,叶色绿,叶片舒展
Cosmopolitan	30	88.6 <sup>a</sup>	芽体粗壮,叶色深绿,叶片扭曲
Germania	30	91.1 <sup>a</sup>	芽体粗壮,叶色亮绿,叶片舒展
Donator	30	40.6 <sup>b</sup>	芽体瘦弱,叶色暗红,叶片舒展

\* 同列不同字母数值间差异显著( $P < 0.05$ )。

表 3 激素组合(TDZ+NAA)对试管苗增殖的影响\*

Tab. 3 The effects of hormone and their concentrations on the multiplication of test-tube plantlets

TDZ+NAA /mg · L <sup>-1</sup>	外植体数 /个	分化率 /%	增殖系数	玻璃化 程度*	苗长势
0.3+0.1	30	93	3.78	+	一般
0.3+0.5	30	100	3.21	+	较好
0.3+1.0	30	95	3.84	+	较好
0.5+0.1	30	100	6.34	+	较粗壮
0.5+0.5	30	100	7.51	+	较粗壮
0.5+1.0	30	100	7.96	+	粗壮
0.7+0.1	30	91	9.36	+++	较细弱
0.7+0.5	30	100	9.90	++	一般
0.7+1.0	30	100	9.59	++	细弱

\* 分化率=(分化外植体数/外植体总数)×100%;增殖系数=(芽总数/产生芽外植体数);玻璃化程度:+, <5%, ++, 5%~15%, +++, >15%。

基上,以探讨生长素对高山杜鹃试管苗生根的影响。结果表明,尽管 NAA、IBA、NAA+IBA 这 3 种主处理均能提高高山杜鹃试管苗的生根率,但作用效果有差异(表 4)。当 3 种处理浓度相同时 NAA+IBA 处理生根率最高,生根数亦较多,根系亦较长;NAA 处理生根率相对较高,生根数低于 IBA 处理,但根系较 IBA 处理长。这表明不同生长素对高山杜鹃试管苗生根及根的质量具有不同的影响。

由表 4 可知,同一激素在 0.1、0.5、1.0 mg·L<sup>-1</sup> 浓度下对高山杜鹃试管苗生根影响明显,当 NAA、IBA 浓度分别为 0.25、0.25 mg·L<sup>-1</sup> 时,生根率高达 98.6%,随浓度的增加,生根率明显降低,表明低浓度 NAA+IBA 处理更有利于高山杜鹃试管苗生根。对试管苗生根率的统计分析显示,1/2 WPM+NAA (0.25 mg·L<sup>-1</sup>)+IBA (0.25 mg·L<sup>-1</sup>) 培养基与其他 9 种培养基相比,差异显著( $P<0.05$ );3 种处理对高山杜鹃生根率的影响随浓度的增加其作用趋势相似,均在 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 时达到最高。试验结果表明,适宜于高山杜鹃品种 Jean de Marle Montage 生根的最佳培养基为 1/2 WPM+NAA (0.25 mg·L<sup>-1</sup>)+IBA (0.25 mg·L<sup>-1</sup>)。

### 2.5 高山杜鹃试管苗的移栽

当试管苗生根约 20 d、根长约 2 cm 时,将培养瓶移至室外。炼苗 2~3 d 后取出小苗,小心洗去根部培养基,栽于透气性良好的泥炭和珍珠岩(体积比 4:1)配制的基质中,调整基质 pH 值为 4.8~5.4。试管苗在室温 24~28 ℃、遮光 30%~50% 条件下维持 7~10 d 即可成活,成活率在 95% 以上。

## 3 讨论

杜鹃属是杜鹃花科中最大的家族,本属植物的花形别致,色彩艳丽,观赏价值很高。个别杜鹃品种的组织培养研究有过报道<sup>[4-6]</sup>,但高山杜鹃的组织培养品种之间差异很大,不是一种培养基和激素就可以涵盖所有品种。本研究应用组织培养技术成功地培育出比利时高山杜鹃品种大量试管苗,发现不同品种对培养基和激素浓度配比反应存在很大的基因型差异。通过研究建立了快速繁殖的技术体系,并进行规模化生产,可以满足市场需求。在应用组织培养技术进行观赏植物的快速繁殖中,繁殖系数是决定试管苗生产效益和成本的一个重要因素。在高山杜鹃的组织培养过程中发现,繁殖系数的高低,主要取决于培养基中 TDZ 的用量,培养室温度的高低也有一定的调节作用。繁殖系数随 TDZ 浓度的提高而提高,但 TDZ 浓度过高,培养的试管苗细弱、容易形成玻璃苗。本研究中,为保证高山杜鹃试管苗的质量,当培养获得丛生芽后,以 WPM+TDZ (0.5 mg·L<sup>-1</sup>)+NAA (1.0 mg·L<sup>-1</sup>) 的培养基进行增殖培养效果较好。组织培养技术的应用效果在很大程度上取决于试管苗移栽的成活率及成活质量。作者在试验中发现,将试管无根新梢置于无任何激素的 1/2 WPM 培养基上壮苗培养 1 个月后再进行生根培养,对提高试管苗的质量及生根率具有促进作用。

本试验还发现,虽然在高山杜鹃诱导过程中有玻璃化苗出现,但随着时间的推移,玻璃化苗逐渐变为正常苗,只是苗质量欠佳。这与其他部分园艺作物有所不同。

### 参考文献:

- [1] 张长琴. 杜鹃花 [M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2002.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 王亦非, 孙月芳, 周润梅, 等. 二种西洋杜鹃的组织培养 [J]. 上海农业学报, 2003, 19(2): 9-11.
- [5] 邓百万, 陈文强, 高菲菲. 比利时杜鹃的组织培养研究 [J]. 氨基酸和生物资源, 2002, 24(3): 25-27.
- [6] 陈振光. 福建名贵杜鹃茎尖培养快速繁殖 [J]. 福建果树, 1984(2): 28-29.

表 4 不同生长素对高山杜鹃试管苗生根的影响  
Tab. 4 The effects of different auximone concentrations on rooting of test-tube plantlets

激素	浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	生根率 /%	平均 生根数	根长*
对照	0	67.3	3.6	+
NAA	0.1	87.3	5.1	卅
NAA	0.5	90.4	4.6	卅
NAA	1.0	79.2	5.3	卅
IBA	0.1	66.7	6.8	卅
IBA	0.5	76.9	7.9	卅
IBA	1.0	70.5	6.1	卅
NAA+IBA	0.05+0.05	89.9	7.8	卅
NAA+IBA	0.25+0.25	98.6	8.8	卅
NAA+IBA	0.50+0.50	83.7	7.2	卅

\* 根长: +. <0.5 cm; 卅. 0.5~1.0 cm;  
卅. 1.0~2.0 cm; 卅. >2.0 cm.