

云锦杜鹃组培快繁技术研究

朱春艳¹, 李志炎¹, 鲍淳松¹, 顾宏辉², 朱丹华²

(¹杭州植物园, 杭州 310013; ²浙江省农业科学院作物与核技术利用研究所, 杭州 310021)

摘要: 云锦杜鹃是具有较高观赏价值和利用价值的野生珍稀植物。以新发茎段为外植体, 以 WPM 为基本培养基, 研究了云锦杜鹃的组培快繁技术。结果表明, 附加外源激素 1~5 mg/L 浓度的 ZT 能诱导腋芽分化, 6~8 周继代一次。不同浓度 ZT 对继代培养中的再生枝条数有显著影响, 以 0.5~1 mg/L ZT 处理的增殖系数和组培苗生长为优; 不同 pH 值对增殖系数没有显著影响, 但对组培苗长势有明显作用, 以 4.8~5.2 处理较为适宜。将组培苗扦插在无土基质中, 达到 85% 以上的瓶外生根率。

关键词: 云锦杜鹃; 组织培养; 快繁

中图分类号: S685.21; Q813.1+2 **文献标识码:** A

In Vitro Rapid Micropropagation of *Rhododendron Fortunei*

Zhu ChunYan¹, Li ZhiYan¹, Bao ChunSong¹, Gu HongHui¹, Zhu DanHua¹

(¹Hangzhou Botanical Garden, Hangzhou, 310013; ²Institute of Crops & Nuclear Technology Application, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021)

Abstract: *Rhododendron fortunei* is a wild ornamental plant with highly appreciative and useful value. *In vitro* micropropagation technology of *Rhododendron fortunei* was aimed to be established using shoots as explants and WPM as fundamental culture medium. The results indicated that axillary shoots could be induced by the medium supplemented with a concentration of 1~5 mg/L zeatin, and it needed 6~8 weeks for one regeneration. Different concentration of zeatin had a significant influence on regenerated shoots. The best hormone concentration for shoot regeneration was at 0.5~1 mg/L from quantitative and qualitative views. The pH value which had obvious effect on shoot growth was appropriate at 4.8~5.2, although showing no significant difference in regenerated shoots. *In vitro* rooting percentage of 85% was obtained when unrooted shoots were directly transplanted into soilless mixtures.

Key words: *Rhododendron fortunei*, Tissue culture, Micropropagation

云锦杜鹃 (*Rhododendron fortunei*) 别名天目杜鹃, 为杜鹃花科杜鹃花属常绿灌木或小乔木, 生于海拔 400~1900m 的沟谷阔叶林中或山顶灌草丛中, 零星分布于长江流域各省, 但在浙江省天台县华顶国家森林公园内分布着几十公顷连片的云锦杜鹃群落^[1,2]。云锦杜鹃花大色艳, 开花时略具芳香, 叶片深绿色、有光泽, 具有较高的园林观赏价值^[3], 并且富含较高药用价值的多种黄酮类化合物^[4]。早在 150 年前, 由 Robert Fortune 在中国发现并以其名字命名的云锦杜鹃被引入欧洲, 由于其花叶并美、有香味、抗热耐寒、种子结

实率高, 成为 20 世纪杜鹃花育种中最著名的亲本之一。用其作亲本培育出的 Loderi 和 Dexter 杂交组群的无数后代在全世界广泛传播, 近几年以常绿高山杜鹃身份也来到了中国^[5]。目前, 以种子或扦插等传统繁殖方式繁育云锦杜鹃存在如开花周期长、繁殖系数低、生根困难等诸多问题^[6], 迁移驯化方式, 也不利于野生珍稀种质资源的保护, 而通过组培快繁方法能迅速大量地获得再生群体。尽管国内外有关杜鹃花的组培快繁技术已有较多研究^[7-11], 但未见云锦杜鹃成功组培快繁的报道。研究利用腋芽增殖方式, 成功诱导

基金项目: 杭州市科技计划项目“高山杜鹃的引选及关键生产技术研究”(编号: 2004 年 235 号)。

第一作者简介: 朱春艳, 女, 1971 年出生, 在职硕士研究生, 工程师。主要从事植物引种驯化及应用研究。通信地址: 310021 浙江省杭州市桃源岭 1 号, 杭州植物园。Tel: 0571-87961089, E-mail: chunyanzhu31@yahoo.com.cn。

收稿日期: 2006-01-18, 修回日期: 2006-02-07。

腋芽分化;并且应用瓶外生根方法,成功获得大量组培苗,这将对野生云锦杜鹃资源的有效保护与开发应用具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验于2004—2005年在杭州进行。母株来自浙江省天台县华顶山的多年生已开花的野生云锦杜鹃。

1.2 外植体灭菌

从母株中摘取当年新发嫩枝为外植体,剪去叶片,先在自来水中冲洗1~2h,再在0.1% HgCl_2 溶液中灭菌10~12min,最后用无菌水冲洗4~5次。用吸水纸吸干消毒过的外植体,切成带有1~2个腋芽的小枝条备用。

1.3 诱导与增殖

将灭菌处理过的小枝条接种到以WPM为基本培养基的诱导培养基上,附加ZT(玉米素)、NAA(萘乙酸)、30g/L蔗糖、8g/L琼脂,pH5.0~5.4^[12]。待新枝诱导形成后,切取新发枝条,移入WPM增殖培养基中。约经8周后,在每个腋芽处出现新枝条,以后每隔6~8周继代一次。

1.4 生根与移栽

选取高度为2cm以上的继代组培苗,在室内散射光条件下炼苗1周左右。用镊子取出丛生苗,洗去根部粘连的培养基,用剪刀将丛生苗分成小枝条。选择2cm以上的小枝条,移入混有由泥炭和珍珠岩无土栽培基质组成的穴盘中,浇足水份,喷施杀菌剂,加盖塑料薄膜,进行瓶外生根。

2 结果与分析

2.1 外植体组织培养诱导分化生长状况

在各次试验中,经灭菌接种后的外植体,约有10%~30%在1~2周内发生污染,另有10%左右可能会在2~6周内发生污染。外植体中的腋芽能在附加1~5mg/L ZT的WPM培养基中被诱导萌发。接种2周后,可以看到腋芽开始膨大,在4周左右,已有2~4张叶的小枝条形成,在8周左右,小枝条的叶片数达到6~10张,高度达到2~4cm,这时的小枝条仍较粗壮。将新发枝条切成带有多个腋芽的茎段,进入增殖培养,约6~8周后在每一腋芽处又能长出新的小枝条,枝条比原来细,但生长速度加快(图1)。以后每隔6~8周继代一次,平均增殖系数为3~6倍。在继代培养过程中,可以逐渐降低ZT的浓度,控制增殖系数不要太大,以利于培育壮苗。

2.2 培养基对继代培养的影响

2.2.1 不同激素浓度对继代培养的影响 不同外源激



图1 云锦杜鹃组培苗继代培养生长情况

素对云锦杜鹃组培苗的增殖将产生明显的影响^[13]。试验中,不同浓度的BA、KT等外源激素均不能诱导或促进云锦杜鹃组培苗的生长分化,其增殖系数为零(数据未列出),但附加不同浓度的ZT对组培苗的增殖系数和生长有显著的影响。结果表明(表1),随着

表1 不同浓度ZT对云锦杜鹃继代培养的影响

浓度	枝条数	生长情况
0.1	3.4±0.6 a*	枝条少,枝条粗壮,叶色深绿
0.25	3.8±0.3 a	枝条较少,枝条粗壮,叶色绿
0.5	5.0±0.6 ab	枝条较多,枝条粗细均匀,叶色较绿
1	6.0±0.6 b	枝条多,枝条较细,叶色较绿
2	6.6±0.8 b	枝条细,可利用枝条少,叶色变淡绿

*不同小写字母表示在0.05水平下差异显著,下同。

ZT浓度的提高,枝条发生数增加,增殖系数提高。0.1~0.2 mg/L ZT处理的枝条数与0.5 mg/L处理没有显著差异,但与1~2 mg/L ZT处理存在显著差异。同时,ZT浓度低,表现出枝条较为粗壮,叶色深绿,ZT浓度达到2 mg/L时,细枝条增多,可利用枝条数减少,叶色变淡。由上可见,云锦杜鹃在继代培养过程中以附加0.5~1 mg/L ZT较为合理。

2.2.2 不同pH值对继代培养的影响 在ZT浓度为1 mg/L的WPM继代培养基中,调节不同pH值,调查不同pH值对云锦杜鹃增殖与生长的影响。培养基配制过程中发现,当pH值在4.4以下时,培养基琼脂凝固性明显下降,pH值在4.8以上时,凝固性趋向正常。

表2 不同pH值对云锦杜鹃继代培养的影响

pH	枝条数	生长情况
4.0	5.7±0.5 a	叶色较绿,生长势弱
4.4	6.2±0.3 a	叶色绿,生长势中
4.8	5.0±0.4 a	叶色深绿,生长势强
5.2	5.4±0.6 a	叶色深绿,生长势强
5.6	4.9±0.3 a	叶色绿,生长势中

表2中可见,在同一激素浓度下,不同pH值对枝条数没有显著影响,但对生长势有明显作用。pH值较低时

(<4.4), 叶色变淡绿, 生长势趋弱, 而 pH 值相对较高时 (=5.6), 叶色变淡, 生长势又趋弱。因此, 云锦杜鹃继代培养中培养基 pH 值在 4.8~5.2 间较为适宜。

2.3 瓶外生根情况

为提高组培效益, 试验采取瓶外生根方法, 对组培苗小枝条进行瓶外扦插生根。选择继代培养中 2cm 以上的小枝条, 将其直接移入无土栽培基质中。结果表明, 云锦杜鹃组培苗小枝条能在基质中正常生根。扦插约 1 个月后小枝条开始有根系形成, 3 个月后根系已充满整个穴盘, 其生根存活率达到 85% 以上 (图 2), 从而大大节约了在实验室生根的时间和成本。3~6 个月后, 可将生根的穴盘苗定植到体积更大的容器中进行培养。



图 2 云锦杜鹃穴盘苗田间生长情况

3 讨论

在实验条件下, 以野生云锦杜鹃嫩茎段为外值体, 在附加 ZT 的 WPM 培养基上成功诱导出小枝条, 经过继代增殖和瓶外扦插生根后, 获得了大量组培苗, 从而建立了云锦杜鹃组培快繁体系, 这在国内外尚无报道。这将为云锦杜鹃资源的保护与开发利用提供了有效保障和科学依据。

与栽培种容易被诱导不同^[7,13-15], 野生高山云锦杜鹃由于生长在野外, 枝条粗壮, 灭菌困难, 诱导分化相对复杂。但研究中由于培养基与激素使用得当, 诱导率达到了 50% 以上。由于杜鹃花组培中外植体的诱导分化与使用的外源激素种类密切相关^[13], 试验中发现云锦杜鹃对 ZT 的反应较为敏感。但 ZT 价格较为昂贵, 笔者先用浓度相对较高的 ZT (2~5 mg/L) 进行诱导, 再用相对较低的 ZT (0.5~1 mg/L) 进行继代培养, 这样一方面节约了成本, 同时也获得了较好的增殖效果和组培苗质量。pH 值对增殖效果不显著, 但对组培

苗质量有明显的促进作用, 试验进一步证实了 WPM 培养基的 pH 值在 5 左右较为适宜^[12]。

由于杜鹃花是木本植物, 已有报道利用组培苗进行瓶外微条扦插生根方法获得成功^[10,11]。研究利用此方法, 在无土栽培基质上进行瓶外生根也获得成功, 其生根存活率达到 85% 以上, 因而大大节省了组培用工和成本, 使云锦杜鹃组培快繁技术更为有效实用。

参考文献

- 1 丁炳扬, 方云亿. 浙江杜鹃花属的研究. 杭州大学学报(自然科学版), 1989, 16(2): 194~200
- 2 浙江植物志编委会. 浙江植物志(第 5 卷). 杭州: 浙江科学技术出版社, 1992. 7~17
- 3 杨旭, 丁炳扬, 胡仁勇. 浙江杜鹃花属植物资源开发及利用. 中国野生植物资源, 2005, 24(2): 22~25
- 4 李钧敏, 金则新, 杨蓓. 云锦杜鹃总黄酮含量及成分分析. 西北林学院学报, 2004, 19(1): 110~112
- 5 张春英. 杜鹃花的育种发展及现代育种. 山东林业科技, 2005, 158(3): 77~79
- 6 于琼花, 张有珍, 周平, 等. 天目杜鹃嫩枝扦插繁育试验. 林业实用技术, 2004, 6: 23~24
- 7 范玉清. 国外杜鹃花组织培养发展概况. 生物学杂志, 1996, 70(2): 30~31
- 8 Anderson W C. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of rhododendron. Journal of the American Society for Horticultural Science. 1984, 109: 343~347
- 9 Economou A S, Read P E. *In vitro* shoot proliferation of Minnesota deciduous azaleas. Hortscience, 1984, 19: 60~61
- 10 Douglas G C. Propagation of eight cultivars of *Rhododendron* *in vitro* using agar-solidified and liquid media and direct rooting of shoots *in vivo*. Scientia Horticulturae, 1984, 24: 337~347
- 11 Read P E, Fellman C D. Accelerating acclimation of *in vitro* propagated woody ornamentals. Acta Horticulturae, 1985, 166: 15~20
- 12 Lloyd G B, McCown B H. Commercially-feasible micropropagation from mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Proceedings of International Plant Propagator's Society, 1980, 30: 421~437
- 13 Hsia C N, Korban S S. The influence of cytokinins and ionic strength of Anderson's medium on shoot establishment and proliferation of evergreen azalea. Euphytica, 1997, 93: 11~17
- 14 Samyn G, Schepper S D, Bockataele E V. Adventitious shoot regeneration and appearance of sports in several azalea cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2002, 70: 223~227
- 15 Mertens M, Werbrouck S, Samyn G, et al. *In vitro* regeneration of evergreen azalea from leaves. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1996, 45: 231~236

(责任编辑: 陶冶之)