

常绿阔叶杂交杜鹃组培体系的建立

朱春艳¹, 李志炎¹, 鲍淳松¹, 顾宏辉², 朱丹华², 袁群英²

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

摘 要:常绿阔叶杂交杜鹃具有较高的观赏价值和园林利用价值, 因而建立组培快繁体系具有重要意义。对 8 个材料的组培快繁研究表明, 茎段外植体均能诱导萌发, 平均诱导率达到 75.2%, 平均增殖系数达到 5~6 倍; 以 WPM 为继代培养基的组培苗枝条粗壮、叶色深绿, 优于 Anderson、Read 培养基; 继代培养过程中的 ZT 浓度以 0.5~1.0 mg/L, pH 值以 4.8~5.2 较为适宜; 通过瓶外扦插生根方法获得了大量组培苗, 其平均生根率达到 76% 左右, 从而建立了常绿阔叶杂交杜鹃组培快繁体系。

关键词:常绿阔叶杂交杜鹃; 组织培养; 繁殖

中图分类号: S685.21; Q813.1¹⁺²

文献标识码: A

文章编号: 1004-1524(2006)03-0163-04

In vitro proliferation of broadleaf evergreen rhododendron hybrids

ZHU Chun-yan¹, LI Zhi-yan¹, BAO Chun-song¹, GU Hong-hui², ZHU Dan-hua², YUAN Qun-ying²

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

Abstract: It is of significance to establish *in vitro* culture system for broadleaf evergreen rhododendron hybrids since its high appreciation and landscape value. The shoot node as explants from eight hybrids in the experiment could be all induced *in vitro* culture, where the average induction rate was 75.2% while regeneration rate was a 5-6 fold. The shoots from WPM subculture medium showed the strongest growth and deepest green leaves compared to Anderson and Read medium. It was optimal at shoot proliferation stage that the hormone concentration of zeatin was at 0.5-1.0 mg/L and pH value was at 4.8-5.2. A large number of plantlets could be obtained by *in vivo* rooting with an average survival rate of 76%, hence *in vitro* rapid shoot proliferation culture was established.

Key words: broadleaf evergreen rhododendron hybrids; *in vitro* culture; proliferation

杜鹃花是世界著名花卉, 也是我国传统名花, 因其花色绚丽、种类繁多、景观独特而倍受人们的青睐, 在花卉产业中占有重要地位。近年来, 盆花杜鹃品种单一、档次不高等问题制约了杜鹃花产业的发展, 而杜鹃花新贵常绿阔叶杂交杜鹃(即高山常绿杜鹃园艺种)以其花序巨大、四季常绿、花团锦簇、花叶并美等特点, 而成为人们

喜爱的高档花卉之一, 具有广阔的开发前景。欧美育种家经过一百多年的杂交育种, 现已培育出上万个常绿阔叶杂交杜鹃, 并注册于杜鹃花名录中^[3], 许多已广泛应用于园林和园艺生产中。

近年来, 有关花卉组培的研究发展迅猛, 但主要集中在高档花卉如蝴蝶兰、百合等^[1,2]。而有关常绿阔叶杂交杜鹃的组培研究较少, 起步较晚。国内尚未能实现规模化生产, 盆花销售依然依赖于进口, 其主要原因是种苗不能实现有效繁殖。由于常绿阔叶杂交杜鹃枝条粗壮、稀少, 扦插生根十分困难, 只能通过组培快繁方法来迅速扩大群体。国内有关杜鹃花的组培快繁技术虽

收稿日期: 2006-01-02

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”

作者简介: 朱春艳(1971-), 女, 浙江义乌人, 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。E-mail: chun-yanzhu31@yahoo.com.cn.

有研究^[4-6],但未见成功进行常绿阔叶杂交杜鹃组培快繁的报道,相反国外组培技术相对较为成熟^[7]。本研究利用腋芽增殖方式,成功诱导腋芽分化,并且应用瓶外生根方法,成功获得大量组培苗。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试常绿阔叶杜鹃杂交种共8个,分别为 Lord Robert, Purpureum Grandiflorum, Rocket, Furnivall's Daughter, Taurus, Germania, Nova Zembla, English Roseum。另设小叶半常绿比利时杜鹃 R₁₀ 为对照(表1)。供试母株生长于盆钵中,常规管理。

1.2 外植体灭菌

摘取母株中的嫩枝为外植体。先在自来水中冲洗1~2 h,再在0.1% HgCl₂ 溶液中灭菌10~12 min,最后用无菌水冲洗4~5次。用吸水纸吸干,然后切成带有腋芽的茎段备用。

1.3 诱导与增殖

将灭菌处理过的茎段接种到以 WPM^[8] 为基本培养基的诱导培养基上,附加 ZT(玉米素)、NAA(萘乙酸)、30 g/L 蔗糖、8 g/L 琼脂, pH 4.8~5.4。待新枝诱导形成后,切取新发枝条,移入 WPM、Anderson^[9] 或 Read^[10] 增殖培养基中,一段时间后,在每个腋芽处出现待继代的新枝条或丛生芽。

1.4 生根与移栽

采取瓶内与瓶外生根两种方法。瓶内生根方法:切取生长粗壮的继代苗,接种于附加 NAA 和 IBA(吲哚丁酸)的基本培养基中,约培养1个月后可将生根苗移入无土栽培基质中。瓶外生根方法:选取生长良好的继代组培瓶苗,在室内散射光条件下炼苗1周左右,取出丛生苗,洗去与根部粘连的培养基,将丛生苗分成小枝条,移入无土栽培基质中。小枝条移入基质后均需浇足水份,喷施杀菌剂,加盖塑料薄膜。

2 结果与分析

2.1 诱导分化与增殖

不同常绿阔叶杂交种均能被诱导萌发(表1),其诱导率为58%~85%,平均达到75.2%。试验中发现约有10%左右的茎段在1~2周内发生污染,另有极少部分在2~6周内发生污染,还有一部分可能是由于灭菌时间过长等原因而不能萌发。接种2周后,可见腋芽开始膨大,约1个月左右,已有小枝条形成,约在2个月左右,小枝条高度达到2 cm以上。将新发枝条切成带有多个腋芽的茎段,进行增殖培养。约6~10周后,每一腋芽处又能长成新的小枝条,以后约每隔8周能继代一次。相同培养条件下,不同杂交种的增殖系数相差较大,最高与最低相差约2倍,平均增殖系数达到5~6倍左右。试验表明阔叶类型与小叶类型在诱导与增殖上无明显差异,经过继代培养后枝条粗细和叶片大叶也已无明显差异。为培育壮苗,在继代培养过程中,应适当控制培养基浓度和培养条件。

表1 常绿阔叶杂交杜鹃诱导与增殖情况

Table 1 Shoots induction and propagation in broadleaf evergreen rhododendron hybrids

杂交种	花色	诱导率/%	平均增殖倍数
Lord Robert	红	72	5.4
Purpureum Grandiflorum	紫	79	9.3
Rocket	红	82	9.8
Furnivall's Daughter	粉白	63	4.2
Taurus	红	87	5.6
Germania	粉红	72	5.8
Nova Zembla	红	58	3.6
English Roseum	紫红	79	3.0
R ₁₀	红	85	7.1

2.2 培养基对继代培养的影响

2.2.1 基本培养基对继代培养的影响

选择3种基本培养基 WPM、Anderson、Read 为继代培养基,考查不同培养基对常绿阔叶杜鹃杂交种继代培养中枝条增殖的影响。结果表明(表2),各杂交种对不同培养基的反应存在差异。对于增殖系数而言,4个供试品种以 Anderson 培养基为最高,并且其在 Rocket 与 Furnivall's Daughter 上与 WPM 基本培养存在显著差异;而3种培养基均对 Purpureum Grandiflorum 和 R₁₀ 不存在显著差异。从枝条质量和叶色而言,发现

WPM 培养基均优于其他两个培养基,表现为枝条粗壮、叶色深绿,而 Read 培养基表现出枝条前期生长快,后期落黄早的特点。阔叶类型与小叶类型表现出相似趋势。

表 2 不同培养基对枝条增殖的影响

Table 2 Effect of cultural media on shoot propagation in broadleaf evergreen rhododendron hybrids

培养基	枝条数/条			
	Rocket	Purpureum Grandiflorum	Furnivall's Daughter	R ₁₀
WPM	4.1 a	5.7 a	3.5 a	7.4 a
Anderson	6.0 b	5.8 a	5.8 b	7.6 a
Read	5.2 b	5.5 a	4.1 a	7.2 a

注:同一列之间没有相同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。下同。

2.2.2 激素浓度对继代培养的影响

研究附加 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L 共 5 种不同浓度的 ZT 对组培继代苗增殖系数和生长的影响。结果表明(表 3), 随着 ZT 浓度的提高, 枝条发生数增加, 增殖系数提高。尽管 3 个供试品种对 ZT 的反应略有不同, 但 0(未加激素), 0.25, 1.0 mg/L 以上浓度处理间均存在显著差异。枝条生长情况表明, ZT 浓度低, 生长相对缓慢, 但枝条粗壮, 叶色深绿; 当 ZT 浓度超过 2 mg/L 时, 生长加快, 但细枝条增多, 可利用枝条数减少, 叶色变淡。综合增殖系数与生长情况, 在继代培养过程中以附加 0.5 ~ 1.0 mg/L ZT 较为适宜。

表 3 不同浓度 ZT 对枝条增殖系数的影响

Table 3 Effect of zeatin concentration on shoot propagation in broadleaf evergreen rhododendron hybrids

浓度 /mg. L ⁻¹	枝条数/条		
	Rocket	Purpureum Grandiflorum	R ₁₀
0	1.0 a	1.2 a	1.5 a
0.25	4.3 b	3.2 b	2.6 b
0.5	6.1 c	4.1 b	3.9 c
1.0	7.1 c	5.9 c	4.0 c
2.0	7.3 c	6.7 c	5.6 d

2.2.3 pH 值对继代培养的影响

在 ZT 浓度为 1 mg/L 的继代培养情况下, 将 pH 值分别调节至 4.0, 4.4, 4.8, 5.2, 5.6 共 5 个

处理, 调查不同 pH 值对常绿阔叶杂交杜鹃增殖与生长的影响。培养基配制过程中发现, 当 pH 值低于 4.4 时, 琼脂凝固性明显下降, pH 值在 4.8 以上时, 凝固性趋向正常。试验结果表明(表 4), 不同 pH 值对 Rocket 和 Purpureum Grandiflorum 的枝条数存在显著差异, 但对 Furnivall's Daughter 和 R₁₀ 没有显著影响, 当 pH 值较高(达到 5.6)时, 枝条数有下降的趋势。不同 pH 值对枝条生长也有明显影响, 当 pH 值较低(< 4.4)时, 叶色变淡绿, 生长势趋弱, 而当 pH 值相对较高时(> 5.2), 叶色变淡, 生长势又趋弱。综上所述, 在常绿阔叶杂交杜鹃继代培养中培养基以 pH 值 4.8 ~ 5.2 较为合适。

表 4 不同 pH 值对枝条增殖系数的影响

Table 4 Effect of pH value on shoot propagation in broadleaf evergreen rhododendron hybrids

pH 值	枝条数/条			
	Rocket	Purpureum Grandiflorum	Furnivall's Daughter	R ₁₀
4.0	5.6 b	4.9 b	3.9 a	6.4 a
4.4	5.5 b	5.6 c	3.2 a	6.8 a
4.8	5.3 ab	5.3 bc	3.3 a	6.6 a
5.2	5.5 b	5.3 bc	4.1 a	7.1 a
5.6	4.5 a	4.3 a	3.3 a	6.3 a

2.3 不同生根方法比较

为提高组培效益, 对瓶内与瓶外生根方法进行了比较研究。结果表明(表 5), 除 Furnivall's Daughter 外, 瓶内生根率一般要高于瓶外生根率。无土基质中的成活率亦显示, 瓶内生根方法成活率(约 95%)明显高于瓶外扦插生根方法(约 76%)。尽管瓶内未能生根的枝条瓶外依然能生根或瓶内生根后有较高的成活率, 但瓶内生根还需人工接种、在组培室多培养一个多月时间等步骤, 综合计算成本还是瓶外扦插生根有利。瓶外扦插约 1 个月后小枝条有根系形成, 3 个月根系能充满整个穴盘, 从而大大节约了在实验室生根的空间、时间和成本。

3 讨论

在本试验条件下, 以茎段为外植体, 在附加

表5 瓶内与瓶外生根方法的生根率

Table 5 *In vitro* and *in vivo* rooting in broadleaf evergreen rhododendron hybrids

生根方法	生根率/%			
	Rocket	Purpureum Grandiflorum	Furnivall's Daughter	R ₁₀
瓶内	75.6	88.9	55.0	82.4
瓶外	72.4	79.5	78.3	76.2

ZT的WPM培养基上成功诱导出小枝条,经过继代增殖培养和瓶外扦插生根后,获得了大量组培苗,从而建立了常绿阔叶杂交杜鹃组培快繁技术体系,这在国内尚未见报道,可为常绿阔叶杂交杜鹃的产业化开发利用提供技术依据。

小叶杜鹃组培快繁相对较为容易,这也印证了国内的有关研究报道^[5,6]。但常绿阔叶杂交杜鹃枝条粗壮,灭菌困难,诱导分化相对复杂。WPM、Anderson、Read等3种基本培养基在杜鹃花组培中已得到普遍应用^[11~15],在本试验中也均取得了较好的增殖效果,但从适用性和长期培养效果来看,WPM培养基对于常绿阔叶杂交杜鹃的组培快繁较为理想。ZT是杜鹃花组培诱导分化和增殖最为理想的外源激素^[13],这在本试验中也得到进一步证实。组培过程中,ZT浓度从诱导到增殖阶段可以采取从高到低的方法,这样一方面能节约成本,同时也能获得较好的增殖效果和质量较好的组培苗。从本试验的结果分析,pH值对增殖影响不显著,但对组培苗质量有明显的作用,这与植株在基质中生长所需的pH值相仿。

尽管瓶内生根率要高于瓶外扦插生根,但由于杜鹃花是木本植物,国外研究报道利用组培苗进行瓶外微条扦插生根方法获得成功,其优势也不可言喻^[14,15]。本研究利用此方法,在无土栽培基质上利用瓶外扦插生根方法获得大量生根苗,其生根存活率达到76%左右,因而大大节约了组培用工和成本。

参考文献:

[1] 徐晓薇,林绍生,姚丽娟,等.蝴蝶兰种胚萌发影响因素的

研究[J].浙江农业学报,2004,16(4):202-205.

- [2] 钱强秋,李彩琴,朱祝军.两个百合品种组织培养的比较研究[J].浙江农业学报,2004,16(4):198-201.
- [3] American Rhododendron Society. Search the ARS Rhododendron Database [DB/OL]. http://www.rhododendron.org/search_intro.htm, 2006-01-19.
- [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] 钟宇,张键,罗承德,等.西洋杜鹃组织培养技术体系研究(I)——基本培养基和外植体的选择[J].四川农业大学学报,2001,19(1):37-39.
- [6] 钟宇,张键,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.
- [7] 范玉清.国外杜鹃花组织培养发展概况[J].生物学杂志,1996,70(2):30-31.
- [8] Lloyd GB, McCown BH. Commercially-feasible micropropagation from mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture [J]. *Proceedings of International Plant Propagator's Society*, 1981,30:421-427.
- [9] Anderson WC. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of rhododendron[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 1984, 109: 343-347.
- [10] Economou AS, Read PE. *In vitro* shoot proliferation of Minnesota deciduous azaleas[J]. *Hortscience*, 1984, 19: 60-61.
- [11] Mertens M, Werbrouck S, Samyn G, et al. *In vitro* regeneration of evergreen azalea from leaves[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1996, 45: 231-236.
- [12] Samyn G, Schepper SD, Bockataele EV. Adventitious shoot regeneration and appearance of sports in several azalea cultivars [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2002,70:223-227.
- [13] Hsia CN, Korban SS. The influence of cytokinins and ionic strength of Anderson's medium on shoot establishment and proliferation of evergreen azalea [J]. *Euphytica*, 1997, 93: 11-17.
- [14] Douglas GC. Propagation of eight cultivars of *Rhododendron* *in vitro* using agar-solidified and liquid media and direct rooting of shoots *in vivo* [J]. *Scientia Horticulturae*, 1984, 24: 337-347.
- [15] Read PE, Fellman CD. Accelerating acclimation of *in vitro* propagated woody ornamentals[J]. *Acta Horticulturae*, 1985, 166: 15-20.

(责任编辑 陈华平)