

杜鹃组织培养技术研究进展

张晓雅, 孙红梅, 田颖辉

(沈阳农业大学园艺学院, 辽宁省设施园艺重点实验室, 110161)

中图分类号: S685.21, S603.6 文献标识码: A

文章编号: 1001-0009(2006)04-0076-02

杜鹃是世界著名观赏植物,也是我国十大传统名花之一,为杜鹃花科杜鹃花属常绿或落叶灌木,仅我国云南有少数种类为乔木。全世界杜鹃花属约有 900 余种,分布于亚洲、北美洲和欧洲,亚洲最多,约 850 种,其中我国约 530 种,占世界种类的 59%,是杜鹃花的重要发源地和分布中心^[1]。杜鹃花色绚丽,成团成簇开于枝头,除园林庭院种植外,也常盆栽供屋前或厅室内美化,以其种类、形态、花与叶的多样性以及广泛的适应性,被誉为“花中西施”^[2]。根据形态性状和亲本来源,可将中国栽培的杜鹃品种分为东鹃、毛鹃、西鹃和夏鹃 4 类^[3],通常采用播种、扦插、嫁接等方法繁殖,而上述繁殖方法受母株材料和繁殖季节的影响,不宜进行大规模商业化生产,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,对于杜鹃优良品种的引进和规模化繁殖具有重要意义。

1 外植体的选取

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不同可导致外植体生理生化状态差异^[3],从而影响组织培养的形态发生。

1.1 取材部位

杜鹃花组培快繁采用的外植体种类较多,包括茎尖、茎段、叶片、种子、花芽等。目前,通常选取健壮植株的茎尖或带有侧芽的嫩茎段作为外植体。当培养材料增殖后,能较快地获得有应用价值的无数小植株。但由于杜鹃的芽有细小绒毛,消毒困难,污染问题成为影响组培成功的主要因素^[4]。采用种子为外植体,较易灭菌,但难以把握种子后代的分离状况,所得幼苗均需等待开花以后才能确定其价值,所以在商业繁殖时,一般不从种子开始培养。用叶片取材,可以获得较多的外植体,且取材受时间限制较少,还可以进一步扩大取材的范围。秦静远(2003)、杨乃博(1985)及 Fordham(1982)以叶片为外植体,通过脱分化、再分化途径获得了再生植株^[5],而 John E P 直接从叶片上得到丛生芽^[6]。

即使采用同一类型的外植体,目前研究结果也不尽一致。陈云志等采用茎尖培养,成功率只有 4%~5%,转而采用种子下胚轴为外植体,而胡宝忠、董春枝等采用茎尖培养,则取得了较好的效果。在茎尖和茎段对比试验中,前者无论在生长势与分化率方面都优于后者,虽然二者都含芽原基,但茎尖从形态结构上比茎段更趋于完整,具备更强的感受态^[7]。从外观形态上看,顶芽粗壮,长势旺,侧芽细小,长势弱些,一般认为这两类外植体在内源激素与营养等方面存在差异,其感受态也不一致,从而影响芽分化。因此,综合而

言,以顶芽茎尖为外植体更好,而且杜鹃多丛枝,可提供较多顶芽,完全能够满足组织培养所需外植体。另外,以花芽、子房、上胚轴为外植体都已经获得植株再生^[8]。

1.2 取材季节

取材季节对培养效果也有显著影响。罗承德等以西洋杜鹃为试材研究表明^[9],在 3~5 月取材,植物处于生长旺盛期,细胞分裂强烈,带菌少,表现为外植体粗壮,长势快,易消毒,接种后生长能力强,不容易发生褐变;而在 7 月取材时,顶芽瘦小,外被绒毛多,消毒困难,也容易褐变。这与大多数植物在生长开始的季节取材较好,如果在生长末期或已进入休眠期采样,外植体在培养中反应迟钝或不能培养成功的结论是一致的。

1.3 外植体的大小

一般认为过大的外植体易于污染,不宜采用,但是非常小的外植体导致存活率很低。一般形成较晚的组织,其生理年龄越老,即越接近发育上的成熟,越易形成花器官。幼年的组织一般都比老年组织具有较高的形态发生能力。杜鹃茎段产生根的能力,随着茎的年龄增加而削弱^[9]。

2 基本培养基的选择

培养基是外植体生长的营养物质来源,由于各种植物的遗传特性不一样,因而需求的营养成分也不相同。因此,选择合适的培养基至关重要^[9]。外植体的种类不同,选用的培养基也不相同。

杨乃博在培养春夏鹃、毛叶杜鹃时,采用了 1/4 MS 培养基,但没有调整 NH_4^+ 与 NO_3^- 的比值,而阙国宁在培养西洋杜鹃时,采用了改良的 MS 培养基,调整 NH_4^+ 与 NO_3^- 的比值为 1:1^[10]。陈云志等采用了 Anderson 的改良 MS 培养基,培养春鹃和西鹃的无菌种子苗切段^[5]。秦静远用 WPM 培养基诱导杜鹃——“Hellmut Vogel”的叶片,获得了再生植株^[5]。Economou 和 Read 以耐寒的落叶杜鹃为试材研究发现,在 MS 培养基上培养,外植体通常在 2~3 周内变褐,4~5 周后死亡,而有些外植体能在 Anderson 培养基上存活下来,于是修改 MS 培养基,使用浓度为原配方浓度的 1/4,同时减少 NH_4^+ 、 NO_3^- 和 KNO_3 的用量,加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,使 NH_4^+ 与 NO_3^- 的比例为 1:1,在微量元素中减去 KI, pH 值降至 5.0,实际上除氯化钙、硫酸镁没有改动以外,其它成分及含量已经与 MS 配方颇不相同。到目前为止,组培杜鹃广泛选用这几种培养基,但因种、品种及外植体而异,关于培养基配方及成分配比,还有待于深入研究。

MS、改良 MS、1/4MS、Anderson 和 Read 5 种培养基在许多方面存在差异,但主要的区别在于总盐含量和铵态氮与硝态氮的比值。罗承德等在西洋杜鹃上的研究表明^[9],在 Read 培养基上,外植体不仅生长良好,还可以分化出较多的幼芽;其次为 Anderson 培养基。在 1/4MS 培养基上材料仅能存活,而在改良 MS 及 MS 上,外植体叶片变脆,易落,生长衰弱,濒临死亡。分析几种基本培养基对杜鹃茎尖分化产生差异的原因,罗承德认为在其它条件相同时,培养基的总盐分浓度以及 NH_4^+ 与 NO_3^- 的比值尤为关键,Read 培养基即属该类型培养基,这和杜鹃花组织培养多选用低含盐量的培养基^[9]的结论是一致的。

3 植物激素的选择

植物激素是植物新陈代谢中产生的天然化合物,它能以极微小的量影响到植物的细胞分化、分裂和发育,影响到植物的形态建成、开花、结实和萌发等许多生理活动。在诱导培养物发生生理变化和形态建成过程中,适时、适量地选用适宜的植物激素,是促进这些变化发生发展的最主要方面。

一些人选用 2-*ip*(异戊稀基腺嘌呤)为嫩茎增殖的主要细胞分裂素,而有人认为 ZT(玉米素)更好,有人甚至指出 6-BA(六氨基嘌呤)有害于杜鹃的生长增殖^[10],其中差异主要是试验所用杜鹃的种和品种不同造成的。目前我国仍以采用 ZT, 6-BA 较多,如杨乃博培养毛叶杜鹃叶片,用 ZT 2 mg/L,诱导叶片大量出苗;阙国宁在培养西鹃时,发现 KT 0.5 mg/L+NAA(或 IBA)0.1~0.25 mg/L,或含有低浓度的 ZT 都能诱导产生大量嫩枝。宗宪春^[10]培养毛叶杜鹃与比利时杜鹃,用 ZT, 6-BA 诱导出了愈伤组织,但没有发生再分化,用 ZT 时,有腋芽及丛生芽产生。

培养在含 2-*ip* 或 ZT 培养基上的所有培养物,既能在茎上产生不定芽,也能在叶子的近轴端或远轴端表面产生出许多不定芽。在含 ZT 的培养基上,茎和叶子产生的不定芽,以及在 2-*ip* 培养基上叶子产生的不定芽,都易于分离成为单个的嫩茎。但是在 2-*ip* 培养基上,茎所产生的不定芽为细丝状,密集成团,难以分离。在 2-*ip* 和 ZT 培养基上产生的嫩枝,可能会出现玻璃化现象,但不妨碍进一步的生长或生根。

茎尖如果培养在无细胞分裂素的培养基上,将停止增殖,并且 90% 的茎尖会在插入培养基的部分长出不分枝的根来。可见杜鹃的一些种和品种生根并不困难。除注意细胞分裂素选用外, Economou 等研究表明,配合使用适当种类与浓度的生长素,也是需要的。

4 光照

光照对于杜鹃组培的影响主要表现在光照时间和强度两个方面。对于大多数植物来讲,每天 14~16h 的光照,8~10h 的黑暗即可满足生长发育的需要,但不同的植株及不同的培养目的有时也有一定的差异^[11]。通常培养的茎尖或再生植株,当其长出根来形成完整的小植株以后,花芽分化所需要的条件就与整体植物没有差异了。一般在用光诱导器官形成时,并不要求很强的光。对于杜鹃的组培来说,保持每天 16h 光照,8h 黑暗是适宜的^[3]。

植物组织培养中,主要依靠外来碳源作为能源,光照主要是满足植物形态建成的需要,所以 300~500Lx 的光强已经可以保证,但对于绝大多数花卉,2 000~3 000Lx 比较合适。杜鹃花要求光强为 1 500~2 500Lx^[3]。在生根阶段,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到 3 000~5 000Lx,甚至 10 000Lx。若补充浓度较高的 CO₂,可以促进增强小苗自身的光合作用,迫使其由异养型转变为自养型,从而使组培苗生长得更健壮。

5 温度

各种植物对组培环境中温度条件的要求不尽相同。一般来讲,植物组培生长的最适温度,大致与该植物原来生长所需的最适温度相同。喜欢冷凉的植物,培养温度一般比较低,以 20℃ 左右较好。而多数热带作物需要在 30℃ 左右的条件下才能获得较好的生长^[11]。多数观赏花卉在 25℃ 都能被诱导、增殖和生根,杜鹃花在 (25±2)℃ 生长较好,低于

10℃ 就会停止生长,高于 33℃ 则会抑制生长和发育。

6 继代培养

继代培养指在组织培养过程中,当外植体被接种一段时间后,将已形成愈伤组织或已经分化成苗的培养物重新切割,转接到新鲜的培养基上,进一步扩大增殖培养的过程^[11]。为了加快繁殖速度和尽快增大繁殖量,可以当苗刚分化时,就切割继代,而无需待苗长到很大时才进行继代。反之,若是在保持一定繁殖基数的前提下,进行定量生产时,为了有更多的大苗可以用来生根,可以间隔较长的时间继代,达到既可以维持一定的繁殖量,又可以提高组培苗产量的目的。通常杜鹃组培苗最初获得的微插条宜用于继代再增殖,而不宜用于生根,当继代 3~4 次后微插条的生根率才显著提高。汤桂钧^[12]等将初始无菌芽接种于新鲜的 S1 培养基(1/4 MS+MS 铁盐+维生素 B₆ 0.2 mg/L+KT 1.0 mg/L+CH 300 mg/L+蔗糖 30 g/L),2 个月后形成丛生芽,前期生长较慢,3 个月以后,丛生芽生长明显加快。试验发现,丛生芽增殖率 1:5 较适宜,新梢矮壮,叶色深绿,叶面积较大;增殖率超过 1:7 时,新梢细长叶片小,有玻璃化,不利于新梢的生根及质量的提高,这可能主要是丛生芽过多后,新梢拥挤,透光率与通气性变差的缘故。

7 展望

国内外对杜鹃花组织培养进行了几十年的研究,已经初步建立了快繁体系,但商品化生产还有众多问题需要解决。杜鹃花种和品种间的组培差异、各种外植体的消毒方法、不定芽分化率低和优良品种生根困难、完整的移栽体系等问题仍需大量研究和试验。杜鹃花离体快繁体系的完善,对优良品种的保存、种苗的工厂化生产及野生杜鹃花的开发利用具有重要意义。

参考文献:

- [1] 陈俊愉. 中国农业百科全书—观赏园艺卷[M]. 北京: 农业出版社, 1996, 78.
- [2] 包满珠. 花卉学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003, 441.
- [3] 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.
- [4] 苗永美, 简兴. 杜鹃组培的研究[J]. 北方园艺. 2004(3): 76~77.
- [5] 秦静远, 黄玉敏. 杜鹃的组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理学通讯. 2003, 39(11): 38.
- [6] John E P, Miles R I. Plant Regeneration from Leaf Explants of Rhododendron PJM Hybrids [J]. Scientia Horticulturae, 1999, (48): 159~170.
- [7] 黄学林, 李筱菊. 高等植物组织离体培养的形态建成及其调控[M]. 北京: 北京科学出版社, 1995.
- [8] 吴金寿, 林庆良. 西洋杜鹃花蕾离体培养再生植株与工厂化育苗[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2004, 43, (1): 128~132.
- [9] 钟宇, 张健, 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): 37~38.
- [10] 宗宪春, 李振山. 二种杜鹃花快速繁殖的研究[J]. 牡丹江师范学院学报(自然科学版), 1999(1): 5.
- [11] 汤桂钧, 张建安. 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.
- [12] 范玉清. 国外杜鹃花组织培养发展概况[J]. 生物学杂志, 1996, (2): 30~31.