

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^[1], 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_4NO_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

收稿日期: 2006-01-14

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, 但不致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^[13]。

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 B₅ 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(1)——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.