

三花杜鹃组培快繁技术的研究

肖东梅¹, 宣艳辉², 朱光杰², 熊丽²

(1. 云南农业大学 园林园艺学院 云南 昆明 650201; 2. 云南绿大地生物技术股份有限公司 云南 昆明 650217)

摘要:以菌子山采集的优良三花杜鹃单株的茎尖和茎段为外植体, 研究三花杜鹃组培快繁技术。结果表明: 三花杜鹃组织培养的外植体采用 0.1% HgCl₂ 消毒 3 min, 2% NaClO 消毒 8 min, 茎尖的诱导率最高为 80%, 采用 0.1% HgCl₂ 消毒 5 min, 2% NaClO 消毒 10 min, 茎段的诱导率最高为 75%。分别比较了不同培养基对外植体诱导、丛生芽增殖及试管苗生根的效果; 初代培养, 外植体诱导不定芽最适培养基 1/4 MS+ZT 3.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L, 三花杜鹃茎尖和茎段的诱导率最高, 达到 90%; 增殖培养基采用 1/4 MS+ZT 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L; 壮苗培养基采用 1/4 MS+ZT 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 效果最好; 三花杜鹃最适生根培养基是 1/4 MS+IAA 2.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L, 生根率为 90%。移栽采用泥炭土+珍珠岩+蛭石比例为 2:1:1 作为基质最好, 成活率为 86%。

关键词: 三花杜鹃; 组织培养; 成活率; 繁殖

中图分类号: S 685.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)23-0140-03

三花杜鹃(*Rhododendron triflora* Hook. f.) 属杜鹃亚属(*Subg. Rhododendron*)三花杜鹃亚组(*Subsect. Tri-flora* (Hutch) Sleumer)常绿灌木, 幼枝被鳞片, 常无毛或罕有柔毛或刚毛。叶革质, 常两面被鳞片或仅背面被鳞片, 通常被无毛。花序顶生, 短总状或近伞形, 有花 5~8 朵, 花瓣深裂, 花蕊长, 花朵平展, 花萼不发达, 花冠阔漏斗状, 红色、紫色、浅紫色、白色、白粉色或黄色, 外侧有时具鳞片或毛。雄蕊 10, 不等长, 花丝下部常具毛; 子房 5 室, 具鳞片; 花柱通常无毛无鳞片。硕果圆形或长圆状卵球形。

三花杜鹃花色丰富, 开花繁茂, 树形优美, 叶片有光泽, 极具园林观赏价值。三花杜鹃分布在海拔 1 500~2 500 m 山区, 抗逆性强。在 2010 年云南百年一遇的大旱气候条件下, 经考察发现在土壤极其干旱的原生地三花杜鹃开花仍十分繁茂, 因此认为三花杜鹃是十分具有开发利用前景的云南野生特色杜鹃花卉。从野生三花杜鹃资源中筛选园艺性状凸显的优良单株, 进行组培快繁技术研究, 对有效保护和规模化开发利用这一优势资源意义明显。当前国内外有关杜鹃花的组培快繁技术已有较多研究^[1-5], 但未见有三花杜鹃组培快繁技术完

整的、系统性的报道。该研究利用茎尖、茎段诱导分化、增殖培养, 成功获得大量的组培生根苗, 且移栽成活率高。

1 材料与方法

1.1 试验材料

来源于师宗菌子山野生三花杜鹃优良单株的茎尖和茎段。

1.2 试验方法

1.2.1 消毒处理 将采集来的新鲜茎尖、茎段修剪, 用洗洁精清洗, 再用自来水冲洗 30 min, 然后用 75% 的酒精消毒不超过 30 s; 茎尖用 0.1% 的 HgCl₂ 消毒 3 min, 再用 2% NaClO 消毒 8~15 min; 茎段用 0.1% HgCl₂ 消毒 5 min, 2% NaClO 消毒 8~15 min, 无菌水洗 4~5 次, 然后用滤纸吸干表面水分, 在无菌条件下接种进入组培瓶培养。

1.2.2 培养条件 每天光照时间 12 h, 光照强度 1 500~2 000 lx, 培养温度 (24±2) °C。

1.2.3 培养方法 不定芽的诱导: 将消毒灭菌后的茎尖接种于下列诱导培养基中; 1/4 MS 基本培养基, 附加不同种类和不同浓度的生长素 NAA (0.1、0.5 mg/L) 和细胞分裂素 ZT (4、3、2 mg/L), 添加蔗糖 30 g/L、琼脂 5 g/L, pH 调至 5.4。培养 40 d 后观察不同培养基对诱导率的影响。不定芽的增殖: 以 1/4 MS 为基本培养基添加 ZT (0.5、1 mg/L) 或 6-BA (1、1.5、2 mg/L)、NAA (0.1、0.5 mg/L) 或 IAA (0.5、1 mg/L), 蔗糖 30 g/L、琼脂 5 g/L, pH 调至 5.4。培养 30 d 后观察不同培养基对增殖率的影响, 调查各处理的出芽时间和生长状态。丛

第一作者简介: 肖东梅(1984), 女, 在读硕士, 研究方向为园林植物与观赏园艺。

通讯作者: 熊丽(1953), 女, 本科, 研究员, 现从事杜鹃花资源驯化及育种研究工作。E-mail: xi51487@163.com。

基金项目: 云南省科技创新强省资助项目(2007AB006)。

收稿日期: 2010-09-19

生苗的继代及壮苗: 以 1/4 MS 为基本培养基, 添加 ZT (0.5~1 mg/L)、NAA (0.1 mg/L)、蔗糖 30 g/L、琼脂 5 g/L、pH 调至 5.4。培养 30 d 后观察生长情况。生根与移栽: 选取高度为 3 cm 以上的健壮组培苗进行生根培养, 以 1/4 MS 为基本培养基, 添加 IBA (2、1.0 mg/L)、NAA (2、1.0 mg/L)、蔗糖 30 g/L、琼脂 5 g/L、pH 调至 5.4。30 d 后观察三花杜鹃生根情况, 待根长 1 cm 以上, 即可出瓶练苗。组培瓶在室内散射光条件下放置 1 周左右, 用镊子取出组培苗, 洗去根部粘连的培养基, 移入装满泥炭土+珍珠岩+蛭石(2 : 1 : 1)混合基质的穴盘中, 浇足定根水。

2 结果与分析

2.1 三花杜鹃初代培养结果

2.1.1 不同消毒时间对外植体成活率的影响 由表 1 可知, 采用 0.1% HgCl₂ 消毒 3 min, 2% NaClO 消毒 8 min, 茎尖的成活率最高为 80%; 采用 0.1% HgCl₂ 消毒 5 min, 2% NaClO 消毒 10 min, 茎段的成活率最高为 75%, 茎尖的成活率高于茎段。三花杜鹃的叶片及幼茎无毛(或鳞片), 并于春天选取刚抽生的幼茎作为外植体, 得到了灭菌成活率相对较高的效果。但三花杜鹃对杀菌剂的感应性强, 掌握适宜的灭菌浓度及时间也是提高成活率的重要因素。

表 1 不同消毒时间对外植体成活率的影响

试材	0.1%HgCl ₂	2%NaClO	每瓶接种数	每瓶成活数	成活率/%
茎尖	3	8	20	16	80
	3	10	20	8	40
	3	15	20	3	15
茎段	5	8	20	8	40
	5	10	20	15	75
	5	15	20	5	25

2.1.2 不同激素浓度对三花杜鹃诱导率的影响 试验发现, 经灭菌接种后的外植体, 其腋芽在附加 4~2 mg/L ZT 的 1/4MS 培养基中被诱导萌发。一般为接种 2 周后, 可看到腋芽开始膨大; 4 周左右, 小幼芽形成, 并带有叶片(图 1)。试验表明, 由表 2 可知, 在 1/4 MS +ZT 3.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 的培养基中, 三花杜鹃茎尖和茎段的诱导率最高, 达到了 90%。随着高度的增加, 将新发的带有多个腋芽的茎段切断, 进入增殖培养。

表 2 不同激素浓度对三花杜鹃诱导率的影响

培养基编号	培养基 / mg · L ⁻¹	接种瓶数/瓶	诱导瓶数/瓶	诱导率
A	1/4 MS+ZT 4.0+NAA 0.1	20	16	80
B	1/4 MS+ZT 3.0+NAA 0.1	20	9	45
C	1/4 MS+ZT 2.0+NAA 0.1	20	3	15
D	1/4 MS+ZT 4.0+NAA 0.5	20	17	85
E	1/4 MS+ZT 3.0+NAA 0.5	20	18	90
F	1/4 MS+ZT 2.0+NAA 0.5	20	8	40

2.2 不同的细胞分裂素及浓度对三花杜鹃增殖的影响 由表 3、4 可看出, 三花杜鹃的丛生芽在含不同细胞分

裂素和生长素的培养基中萌发的数量不同。在 1/4 MS+ZT 1 mg/L+NAA 0.1 mg/L 培养基上三花杜鹃的增殖率相对较高, 而降低 ZT 为 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L 时, 虽然分化率降低, 但分化苗的粗度和高度增加。

在增殖培养基中, 经过 40 d 的培养后, 再次转接进行继代培育, 分化苗生长旺盛, 部分侧芽又会萌生丛生芽, 基部也会生长出大量的丛生芽, 有的多达 10 株以上, 甚至还有数量较多的小芽簇, 平均增殖系数大, 可达到短期内大量繁殖的目的, 不足的是多数丛生苗纤细。当降低 ZT 浓度至 0.5 mg/L 时, 可有效控制丛生苗及分化芽的数量, 分化苗增粗, 丛生苗纵向生长, 大苗增多(图 2)。由此可见, ZT 对三花杜鹃丛生芽增殖系数的影响很大, 继代次数越多, 增殖能力就越强。将三花杜鹃丛生苗切成单苗, 放进降低 ZT 浓度、增加 NAA 浓度的培养基中, 可达到壮苗的目的。采用苗高达到 4 cm 左右的健壮幼苗进入生根培养, 可提高生根苗的质量和组培苗的过渡成活率。

在 6-BA 和 IAA 的培养基上, 三花杜鹃的增殖效果不明显, 部分苗出现黄化, 还有少量的苗出现玻璃化现象, 腋芽萌发少, 伸长量较小, 长势较差。由此可见, 6-BA 和 IAA 组合的培养基不适宜用作三花杜鹃增殖培养基, 而 ZT 是三花杜鹃离体培养的最佳细胞分裂素。

表 3 外源激素 ZT 对三花杜鹃增殖率的影响

培养基编号	ZT 浓度 / mg · L ⁻¹	NAA 浓度 / mg · L ⁻¹	增殖系数	生长状况
G	1	0.1	10	侧芽伸长, 茎基部长出许多丛生芽, 芽小, 苗旺
H	1	0.5	8	侧芽伸长, 茎基部长出较多丛生芽, 芽小, 苗纤弱
I	0.5	0.1	6.5	侧芽伸长, 茎基部长出丛生芽, 茎细, 苗较高
J	0.5	0.5	3.16	侧芽伸长, 茎基部长出的丛生芽较少, 茎稍粗, 节长

表 4 外源激素 6-BA 对三花杜鹃增殖率的影响

培养基编号	6-BA 浓度 / mg · L ⁻¹	IAA 浓度 / mg · L ⁻¹	增殖系数	生长状况
K	1	0.5	2	茎尖与侧芽伸长 1~2 个节, 长势一般, 苗小
L	1	1	2.5	茎尖与侧芽伸长 1~2 个节, 长势一般
M	1.5	0.5	1	茎尖略微伸长, 侧芽萌动少, 长势弱
N	1.5	1	2	茎尖与侧芽伸长 1~2 个节, 长势一般
O	2	0.5	1.5	茎尖与侧芽伸长 1~2 个节, 长势较弱
P	2	1	3.5	茎尖与侧芽伸长 2~3 个节, 长势较强

2.3 生根培养

生长素对三花杜鹃组培植株不定根的诱导作用明显, 对不同生长素作用效果差异的研究发现^[9], NAA 与 IAA 共同作用比单独使用效果好, 可提高根的数量、质

量,且有利于移栽练苗。

由表 5 可知,经过 4 周的培养,R 号生根培养基上的生根效果最好,生根率达到 90%,根的数量和根长也达到所有处理的最佳结果。当使用 IBA 的浓度为 2 mg/L,NAA 的浓度为 0 时,生根率最低为 15%~20%;但改变激素 IBA 的浓度为 0 时,三花杜鹃生根率可达 50%~60%,表明生长素 NAA 应是三花杜鹃组培苗的有效生根物质。

表 5 植物生长调节剂对三花杜鹃生根培养的影响

培养基 编号	IBA 浓度 /mg·L ⁻¹	NAA 浓度 /mg·L ⁻¹	生根率 / %	平均根数 /条	平均根长 / cm
Q	2	0	20	4	0.7
R	2	2	90	25	1.2
S	1	1	33	8	0.5
T	1	0	15	3	1.0
U	0	1	50	5	0.8
V	0	2	60	6	0.6

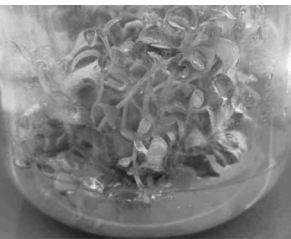


图 1 三花杜鹃的诱导培养 图 2 三花杜鹃的增殖培养

3 讨论

该研究中选择的外植体为多年生的野生三花杜鹃,由于其生长在野外环境,导致灭菌较困难,需把握好采芽时间和灭菌处理条件。茎尖虽比茎段的诱导率稍高,但茎段材料更易获取。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^[7],试验中发现,与

6-BA 相比,细胞分裂素 ZT 对三花杜鹃的诱导分化作用明显。

在应用组培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。ZT 对丛生芽增殖系数的影响很大,继代次数越多,增殖率也越高。分切三花杜鹃的幼小芽苗,进入降低 ZT 及增加 NAA 浓度的培养基,可达到壮苗的目的。ZT 价格昂贵,在三花杜鹃诱导分化前期,该试验选用了 ZT 浓度相对较高的培养基,对已分化出的小幼苗,使用 ZT 浓度相对较低的培养基进行继代及壮苗培养,既节约了成本,也获得了较好的增殖效果和提高了组培苗质量。

该研究通过对植物生长素、细胞分裂素及使用浓度的比较选择,探索出一套高效的三花杜鹃组培快繁技术,可在短期内达到三花杜鹃规模化生产、保护野生杜鹃资源和开发利用并举的目的。

参考文献

[1] 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.
[2] Anderson W C. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron* [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science 1984(109): 343-347.
[3] Economou A S, Read P E. *In vitro* shoot proliferation of Minnesota deciduous azaleas[J]. Hortscience 1984(19): 60-61.
[4] Douglas G C. 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.
[5] Read P E, Fellman C D. Accelerating acclimation of *in vitro* propagated woody ornamentals [J]. Acta Horticulturae 1985, 166: 15-20.
[6] 崔丽华. 植物生长调节物质对组织培养中不定芽不定根的作用[J]. 辽宁师专学报, 2000, 6(2): 97-99.
[7] 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 [J]. Euphytica 1997, 93: 11-17.

Study on Rapid Propagation of *Rhododendron triflora*

XIAO Dong-mei¹, XUAN Yan-hui², ZHU Guang-jie², XIONG Li²

(1. College of Horticulture and Landscape, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201; 2. Yunnan Greenland Biology Technological Stock Limited Company, Kunming, Yunnan 650217)

Abstract: The tip shoot and stalk node of *Rhododendron triflora* from Junzi Mountain were used as explants, the tissue culture rapid propagation of *Rhododendron triflora* were studied. The results showed that the tip shoot on inducing the plant regeneration and the inductivity had reached 80% by 0.1% HgCl₂ sterilizing for 3 minutes and 2% NaClO 8 minutes and stalk node had reached 75% by 0.1% HgCl₂ for 5 minutes and 2% NaClO for 10 minutes. The comparison of the effects of different media on the explants induction, the proliferation of clump sprouts and the test-tube plantlet rooting showed that in primary culture, the best medium for explants induction was 1/4 MS+ZT 3.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L, tip shoot and stalk node of *Rhododendron triflora* on inductivity had highly reached 90%. The best for proliferating clump sprouts was 1/4 MS+ZT 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L. The best medium for the strengthening culture was 1/4 MS+ZT 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L. The best medium for the rooting culture was 1/4 MS+IAA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L. The best stroma of the plantlets out of test-tube was Peat+perlite+roseite consisting of 2:1:1, the transplant survival percent reach 86%.

Key words: *Rhododendron triflora*; tissue culture; success ratio; propagation