

# 杜鹃属常绿杜鹃组织培养的研究进展

吴雅文, 李枝林, 张巧玲, 白天, 张小平, 张敬丽

(云南农业大学 园林园艺学院, 云南 昆明 650201)

**摘要:**常绿杜鹃树形优美, 花色艳丽, 具有较高的观赏价值和园林利用价值。但由于常绿杜鹃的繁殖困难, 培育年限长, 所以在市场上常常供不应求。随着植物组织培养技术的发展, 近年来常绿杜鹃的组培快繁技术也有了一定的进展。现从常绿杜鹃组培快繁技术的外植体的选择、外植体的消毒方法、培养基的选择、不同激素对外植体的影响、增殖培养和生根培养以及生根苗移栽等方面作以综合性论述, 以期常绿杜鹃组培快繁技术提供借鉴。

**关键词:**常绿杜鹃; 组织培养; 研究进展

**中图分类号:**S 685.21 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)07-0187-03

杜鹃属(*Rhododendron* L.)是杜鹃花科中最大的属, 也是中国和喜马拉雅植物区系成分中的大属之一。该属植物在园艺学上占有重要的位置, 自19世纪中期杜鹃属植物被大量发现到现在, 被引种栽培的杜鹃已不下600种, 遍及许多国家<sup>[1]</sup>。目前对杜鹃花的组培研究多集中在杜鹃花属的映山红亚组, 且技术已经基本成熟, 但对常绿杜鹃的研究则较少, 并多集中在国外引进的常绿杜鹃种类<sup>[2]</sup>。该研究所指的常绿杜鹃为杜鹃属常绿杜鹃亚属的植物种类。

常绿杜鹃花期较长, 通常采用播种、扦插、嫁接方法繁殖。而这些繁殖方法受母株材料和繁殖季节的影响, 不适宜进行大规模商业化生产, 无法满足市场的需要。应用植物组织培养技术进行观赏植物的大规模繁殖, 具有繁殖速度快、不受季节影响等优点, 对常绿杜鹃优良品种的引进和繁殖具有重要意义<sup>[3]</sup>。

## 1 外植体的选择

常绿杜鹃为多年生木本植物, 而且枝叶多有腺毛覆盖, 发粘, 材料大, 清洗消毒比较困难。所以通常组织培养时选用的材料为未木质化的幼嫩枝条的茎尖或茎段, 易于直接分化成芽。例如朱春艳等<sup>[4]</sup>在常绿阔叶杂交杜鹃组培体系的建立中采用嫩枝茎段为外植体。罗彭等<sup>[5]</sup>在常绿杜鹃的组织培养种采用的是当年生的幼嫩

茎段。何芳兰等<sup>[6]</sup>在研究影响高山杜鹃试管苗玻璃化的因素中采用当年生长的高山杜鹃茎尖作为外植体。汤桂钧等<sup>[7]</sup>在高山杜鹃组培快繁技术体系研究中, 外植体取尚未木质化的枝条上的嫩芽茎段, 包括茎段、茎尖。

由于采用当年生幼嫩茎段受季节的限制, 在现今的一些组织培养中有些采用叶片来做外植体。例如管耀义等<sup>[8]</sup>利用高山杜鹃的嫩叶作为外植体, 建立高山杜鹃组培快繁技术体系。李玉梅等<sup>[9]</sup>利用牛皮杜鹃的嫩叶作为外植体, 筛选适合的诱导培养基和生根培养基。也有选择用种子萌发的无菌苗作为外植体, 以求达到更好的无菌效果。例如苗永美等<sup>[10]</sup>利用大萼杜鹃的种子在无菌条件下发芽, 得到试管苗, 然后取试管苗的芽苗进行繁殖。

然而周艳等<sup>[11]</sup>关于马缨杜鹃组培过程中外植体褐变与多酚氧化酶的关系研究中, 利用马缨杜鹃叶片、茎尖、茎段进行组织培养, 测定不同外植体的总酚含量和PPO活性, 优选出褐变率最低的外植体, 结果表明, 茎段的总酚含量远远低于叶片、茎尖, 而且茎段的PPO活性水平也相对较低, 是马缨杜鹃组织培养的理想外植体来源。所以, 在常绿杜鹃的组培快繁技术研究中最常应用的外植体为当年生的幼嫩茎段。

## 2 外植体的消毒灭菌方法

常绿杜鹃的枝条通常都有大量的腺毛, 而且发粘, 表面附着很多真菌和细菌, 不利于清洗消毒和灭菌。消毒时间过长, 容易造成枝条死亡; 消毒时间不够, 则容易染菌。通常采用的灭菌方法, 如何芳兰等<sup>[6]</sup>使用的先把外植体在洗衣粉液中浸泡20 min, 流水冲洗干净, 然后将其置于无菌室超净工作台上, 按以下程序进行消毒: 75%的酒精浸泡25~30 s, 无菌水冲洗4~5次, 再用0.1的HgCl<sub>2</sub>消毒8~10 min, 最后用无菌水冲洗4~5次后

**第一作者简介:**吴雅文(1986-), 女, 在读硕士, 研究方向为园林植物与观赏园艺。

**责任作者:**张敬丽(1975-), 女, 博士, 硕士生导师, 研究方向为野生花卉资源的研究与应用。

**基金项目:**云南省自然科学基金资助项目(2009CD064); 大学生科研创新基金资助项目(NKZX2011CX022)。

**收稿日期:**2012-02-08

用无菌滤纸将外植体表面的水吸掉。也有用自来水冲洗 15 min,用洗洁精洗涤 2 次后吸干,然后,在无菌室超净台上用 75%酒精消毒 1 min;用 150 新洁尔灭液消毒 20 min;再用 0.1%氯化汞消毒 15 min,最后用无菌蒸馏水冲洗 3 遍后吸干<sup>[12]</sup>。但是因为升汞毒性太大,容易造成外植体严重褐变。因此何俊蓉等<sup>[13]</sup>用 5%次氯酸钠加 0.1%的山梨糖醇代替升汞。

采用种子萌发的无菌苗为外植体时,消毒就比较方便。苗永美等<sup>[10]</sup>先将种子在自来水下冲洗 2 h,在无菌操作台上再用 75%酒精漂洗 30 s,无菌水洗 2 次,最后用 0.1%升汞消毒 20 min,无菌水洗 4~5 次,然后用滤纸吸干水分备用。

### 3 培养基的选择

#### 3.1 基本培养基的选择

培养基是植物体在体外的基本营养来源,因此,选择合适的基本培养基,有利于外植体的发育和生长<sup>[13]</sup>。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。选用何种培养基,要因杜鹃的种、品种及外植体而异,需要试验来确定<sup>[3]</sup>。罗彭等<sup>[5]</sup>在对几种常绿杜鹃的组织培养中,以改良的 MS 培养基为基本培养基。朱春艳等<sup>[14]</sup>以 WPM 培养基为基本培养基成功培育了云锦杜鹃。苗永美等<sup>[15]</sup>在大树杜鹃的组织培养中选用 Anderson 的改良 MS、Read、WPM 3 种基本培养基进行离体培养,在 Anderson 的改良 MS 上不仅分化率低,且有的材料出现死亡,分析可能是 Anderson 的改良 MS 中高含量的铁对植物生长不利,同时证实了木本培养基(WPM)是培养这一木本杜鹃的最佳基本培养基。苗永美等<sup>[16]</sup>在对桃叶杜鹃的组织培养中发现在改良 MS 培养基上桃叶杜鹃生长不好,甚至有的芽苗死亡,在 Read 培养基上表现最好。

#### 3.2 诱导培养基的选择

诱导培养基是外植体能否进行组织培养的关键,不同的外植体对诱导培养基的要求各异,只有通过试验选择适合的培养基,才有利于外植体丛生芽的诱导。罗彭等<sup>[5]</sup>在培养常绿杜鹃时选择的诱导丛生芽培养基为改良 MS+NAA 0.02 mg/L+TDZ 0.08 mg/L,并成功诱导出丛生芽。管耀义等<sup>[8]</sup>在高山杜鹃叶片再生植株的研究中筛选的最佳叶片诱导芽再生培养基为 WPM+TDZ 0.2 mg/L+NAA 0.4 mg/L。陈妹幼<sup>[17]</sup>对高山杜鹃快繁研究结果表明,相对较优的芽诱导培养基为 1/4MS+ZT 2.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L。李玉梅等<sup>[9]</sup>筛选的最适合牛皮杜鹃嫩叶直接再生芽苗的诱导培养基为:1/4MS+ZT 3.70 mg/L+IAA 0.02 mg/L+KT 1.00 mg/L。

#### 3.3 增殖培养基的选择

增殖培养是为了得到大量的无菌苗,进行扩增繁殖。不同的外植体所适合的增殖培养基是有区别的。刘晓青等<sup>[2]</sup>为保证高山杜鹃试管苗的质量,当培养获得丛生芽后,以 WPM+TDZ(0.5 mg/L)+NAA(1.0 mg/L)的培养基进行增殖培养,效果较好。管耀义等<sup>[8]</sup>在高山杜鹃叶片再生植株的研究中,得出最佳丛生芽的增殖壮苗培养基为 WPM+KT 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L。陈妹幼<sup>[17]</sup>对高山杜鹃的继代增殖培养基采用的 1/4MS+ZT 0.5~1.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L+GA<sub>3</sub> 1.0 mg/L;也得到了良好效果。周艳等<sup>[18]</sup>在马缨杜鹃继代培养培养基配方研究选中得出 1/4MS+2-IP 1.50 mg/L+NAA 1.50 mg/L 的培养基进行增殖培养最为适。

#### 3.4 生根培养基的选择

常绿杜鹃是木本植物,生长周期较长,生根困难。选择合适的生根培养基有利于植株生长健壮,便于移栽练苗。陈妹幼<sup>[17]</sup>在高山杜鹃组培快繁技术研究中采用的壮苗生根培养基为 1/2MS+蔗糖 20 g/L+活性炭 2 g/L+IBA 0.5 mg/L,移栽成活率 80%以上;李玉梅等<sup>[9]</sup>在设计优化牛皮杜鹃嫩叶直接再生芽苗及植株再生体系时筛选的最适生根培养基为:MS(改良)+0.10 mg/L IAA+0.07 mg/L NAA。

### 4 植物激素的选择对外植体生长的影响

植物激素在植物的生长阶段有着至关重要的作用,在常绿杜鹃组织培养中常用的细胞分裂素有 ZT(玉米素)、KT(激动素)、TDZ(噻苯隆)、2-IP(N6-异戊烯基腺嘌呤)、6-BA 等,植物生长素有 NAA、IAA、IBA 等。ZT、KT 和 6-BA 是传统的常用细胞分裂素,而 2-IP 和 TDZ 是最近几年才应用于常绿杜鹃的组织培养中,并在外植体的诱导中有较好的效果。

朱春艳等<sup>[4]</sup>对常绿杜鹃茎段外植体培养结果表明,随着 ZT 浓度的提高,枝条发生数增加,增殖系数提高。而且枝条生长情况表明,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。管耀义等<sup>[8]</sup>在对高山杜鹃叶片组织培养研究表明,随着 NAA 的加入及浓度的升高愈伤组织长势越来越好,而随着 TDZ 浓度的增加愈伤组织的生长量也随之增加,而且随着 TDZ 浓度的增加,伤口愈伤组织生长变多、变好,可见 TDZ 对诱导高山杜鹃愈伤组织的生长有促进作用,但在 TDZ 用量为 0.4 mg/L 时没有不定芽发生,所以 TDZ 浓度应取 0.2 mg/L 为宜。周艳等<sup>[18]</sup>在马缨杜鹃的继代培养中发现 2-ip 能够促进马缨杜鹃单芽茎段的腋芽增殖,6-BA

不适于马缨杜鹃增殖,同一激素浓度过低和过高均不利于腋芽增殖生长发育。

## 5 展望

常绿杜鹃不但具有较高的观赏价值,还有一定的药用价值,目前市场上对常绿杜鹃的需求量较大。可见常绿杜鹃的组培快繁技术体系的建立,是市场发展的必然需求。但常绿杜鹃组织快繁技术仍然不完善,这是由于常绿杜鹃种和品种间的组培差异,外植体消毒困难、消毒不彻底,丛生芽分化困难等问题引起的。这就需要进行大量的试验和研究来进一步完善常绿杜鹃组织快繁体系,以利于常绿杜鹃优良品种的种质资源的保存和满足市场大量繁殖培育的需求。

## 参考文献

- [1] 胡琳贞,方明渊. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1994,57(2):7-339.
- [2] 刘晓青,苏家乐,项立平,等. 高山杜鹃茎段组织培养和优化体系的建立[J]. 扬州大学学报,2007,28(3):91-94.
- [3] 张晓雅,孙红梅,田颖辉. 杜鹃组织培养技术研究进展[J]. 北方园艺,2006(4):76-77.
- [4] 朱春艳,李志炎,鲍淳松,等. 常绿阔叶杂交杜鹃组培体系的建立[J]. 浙江农业学报,2006,18(3):163-166.
- [5] 罗彭,庄平,白洁,等. 大白杜鹃、美容杜鹃和喇叭杜鹃的组织培养[J]. 植物生理学通讯,2007,43(2):362.
- [6] 何芳兰,李毅,赵明,等. 影响高山杜鹃试管苗玻璃化的几个因素研究[J]. 西北林学院学报,2008,23(1):104-107.
- [7] 汤桂钧,覃娟. 高山杜鹃组培快繁技术体系研究[J]. 北方园艺,2009(3):114-116.
- [8] 管耀义,袁惠贞,杜鹃,等. 高山杜鹃叶片再生植株的研究[J]. 河北林业科技,2009(S1):19-21.
- [9] 李玉梅,姜云天,孙智慧,等. 基于均匀设计优化牛皮杜鹃嫩叶直接再生芽苗及植株再生体系[J]. 安徽农业科学,2009,37(2):678-680.
- [10] 苗永美,王永清,庄平,等. 大萼杜鹃的快速繁殖研究[J]. 中国林副特产,2007(4):12-14.
- [11] 周艳,陈训. 马缨杜鹃组织培养过程中外植体褐变与多酚氧化酶及酚类物质的关系[J]. 种子,2009,28(7):61-63.
- [12] 汤桂钧,张建安,蒋建平. 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.
- [13] 何俊蓉,袁宁,吴洁,等. 高山杜鹃组织培养研究现状[J]. 四川林业科技,2008,29(4):52-55.
- [14] 朱春艳,李志炎,鲍淳松. 云锦杜鹃组培快繁技术研究[J]. 中国农学通报,2006,22(5):335-337.
- [15] 苗永美,王永清,庄平,等. 大树杜鹃组织培养技术研究[J]. 安徽科技学院学报,2007,21(6):23-26.
- [16] 苗永美,王永清,庄平,等. 桃叶杜鹃组织培养技术研究[J]. 生物学杂志,2006,23(6):29-31.
- [17] 陈妹幼. 高山杜鹃组织培养快速繁殖技术研究[J]. 现代农业科技,2008(17):13-14.
- [18] 周艳,陈训. 马缨杜鹃继代培养培养基配方研究[J]. 安徽农业科学,2007,35(29):9213-9214.

# Research on the Tissue Culture of *Rhododendron* Species in Subgenus *hymanenthes* (Bl.) K. Koch (Ericaceae)

WU Ya-wen, LI Zhi-lin, ZHANG Qiao-ling, BAI Tian, ZHANG Xiao-ping, ZHANG Jing-li

(College of Landscape Architecture and Horticulture, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201)

**Abstract:** *Rhododendron* species in Subgenus *hymanenthes* (Bl.) K. Koch are not only possessed of beautiful tree forms, but have brightly colored flowers, and with high ornamental and landscape values. However, due to difficulties in breeding and nurturing life for a long time, so they are often short supply in the market. With the development of plant tissue culture technology in recent years, the tissue culture technology of *Rhododendron* species in Subgenus *hymanenthes* has made some progress. In order to bring some reference value to the tissue culture of *Rhododendron* species in Subgenus *hymanenthes*, the comprehensive introduction about the explant choice, the methods of explant disinfection, the medium choice, different influence in explant of different hormones, proliferation, rooting culture, and to the root regeneration in the tissue culture of *Rhododendron* species in Subgenus *hymanenthes* were summarized.

**Key words:** Subgenus *hymanenthes* (Bl.) K. Koch; tissue culture; research