

吊钟花的组织培养技术研究

杨建芬, 刘兴尧, 张寿洲*, 黄云香

(深圳市仙湖植物园, 广东 深圳 518004)

摘要:以吊钟花(*Enkianthus quinqueflorus* Lour.)茎尖及带腋芽的茎段为外植体进行组织培养。结果表明,改良 B₅ 培养基(B₅大量元素和钙盐+MS 有机物、铁盐、微量元素)最有利于吊钟花的培养,外植体在改良 B₅+2,4-D 1 mg L⁻¹ 的培养基中,愈伤组织诱导率可达 100%。在含 BA 1~2 mg L⁻¹+NAA 0.1~0.5 mg L⁻¹ 培养基中,可诱导产生不定芽。继代培养以改良 B₅+BA 1 mg L⁻¹+NAA 0.5 mg L⁻¹ 培养基的增殖系数最高。生根培养基以 1/2MS+IBA 2 mg L⁻¹ 为最佳,生根率可达 80% 以上。试管苗移栽成活率为 90% 以上。

关键词: 吊钟花; 组织培养; 茎

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2009)04-0383-05

Tissue Culture of *Enkianthus quinqueflorus* Lour.

YANG Jian-fen, LIU Xing-yao, ZHANG Shou-zhou*, HUANG Yun-xiang

(Shenzhen Fairy Lake Botanical Garden, Shenzhen 518004, China)

Abstract: The rapid propagation of *Enkianthus quinqueflorus* Lour. had been established by using shoot-tip or stem with auxiliary buds as explants. The modified B₅ medium as basal medium was optimum for callus induction. The callus induction rate was up to 100% cultured on B₅ medium with 1 mg L⁻¹ 2,4-D. The adventitious buds were induced on B₅ medium supplemented with 1~2 mg L⁻¹ BA + 0.1~0.5 mg L⁻¹ NAA. Propagation coefficient was the highest when adventitious buds were subcultured on modified B₅+1 mg L⁻¹ BA + 0.5 mg L⁻¹ NAA. The rooting could reach 80% when adventitious buds cultured on 1/2MS+2 mg L⁻¹ IBA, and the survival of plantlet could reach 90% after transferred into perlite bed.

Key words: *Enkianthus quinqueflorus* Lour.; Tissue culture; Stem

杜鹃花科(Ericaceae)植物全世界有 103 属 3 350 种,广布南北半球的温带和热带山区,极少分布在非洲和大洋洲,中国有 15 属 757 种,分布全国各地,以云南、四川和西藏最为丰富^[1]。许多种类是著名的观赏植物,如杜鹃花属(*Rhododendron*)、树萝卜属(*Agapetes*)、吊钟花属(*Enkianthus*),可用于园林种植,也可盆栽供屋前或室内观赏^[2]。由于杜鹃花科植物多分布在高山,物种收集和播种育苗难度大,通常采用扦插、嫁接等方式繁殖,由于多数种类难以生根,常规的繁殖方法具有一定局限性,不利

于规模化商业生产及新品种的选育^[3]。随着植物组织培养技术的发展,特别是木本植物培养基(WPM)的研制,对杜鹃花科植物的组织培养开展了大量研究^[3-14],使许多野生的杜鹃花科植物得到了合理的利用。

吊钟花(*Enkianthus quinqueflorus* Lour.)别名铃儿花、中国新年花,属吊钟花属植物,分布在我国福建、广东、广西、贵州、湖北、湖南、江西、四川和台湾等地,越南北部也有分布。吊钟花为落叶灌木,叶片簇生在枝顶,幼叶黄绿色、粉红甚至红色。吊钟

收稿日期:2008-07-08 接受日期:2008-11-02

基金项目:深圳市城市管理局科研基金项目资助

* 通讯作者 Corresponding author

花集中分布在海拔 50~600 m 的地带,野生吊钟花有鲜红色的、粉红色的、白玉色的、橙色的、浅紫色的、天蓝色等颜色。带有花苞或始花的枝条在岭南是传统点缀农历新年的喜庆佳品,作为吉祥的象征,深受岭南人民的喜爱。然而,资源匮乏难以满足市场的大量需求,从山上移植对自然资源造成了一定的破坏。为此,本文用深圳的野生吊钟花为材料,开展吊钟花组培快繁研究,为满足市场需要,保护野生资源,并进行合理开发利用提供依据。

1 材料和方法

吊钟花(*Enkianthus quinqueflorus* Lour.)采自深圳市梅沙尖海拔 350 m 的自然居群植株,分别在 3~4月、10~12 月间从生长旺盛、健壮的野生植株上摘取主枝或带腋芽的枝段作为外植体。

将采回来的外植体茎段除去叶,留一段叶柄,自来水洗净后,用流水冲洗 2~3 h,在接种室内,先用 75% 酒精浸泡 1~2 min,再用 0.1% HgCl_2 消毒 8~10 min,无菌水冲洗 5~6 次,去除外植体与消毒液接触的伤口部分,切成 0.5~1 cm 长的顶芽或带腋芽的茎段,接种于培养基进行分化培养,得到的初代无菌繁殖系,分割成单芽后,进行继代培养并筛选最佳培养基,继代培养得到的生长健壮的不定芽切割成单芽,接于生根培养基进行生根培养。

分化培养试验每处理 5 瓶,每瓶接种 1 个外植体,重复 5 次,去除污染外植体,对培养 50 d 后的愈伤组织诱导率和出芽率进行统计。增殖培养试验每处理 7 瓶,每瓶 1 个不定芽,重复 3 次,25 d 后统计不定芽增殖数,计算不定芽增殖系数。生根试验每处理 5 瓶,每瓶接 7 个不定芽,重复 3 次,培养 25 d 后,统计生根率。

外植体没有变化不计入产生愈伤组织及芽分化统计数据中,外植体既有愈伤组织又有不定芽产生时,两者都分别计入各自的统计结果;不定芽的统计以肉眼能够清晰分辨出独立的芽,而且看到叶片长出为准。愈伤组织诱导率为产生愈伤组织外植体数占接种外植体数的百分率,芽分化率为产生不定芽外植体数占接种外植体的百分率,增值系数为产生的不定芽数与接种不定芽数之比,生根率为生根芽数占接种芽数的百分率。

2 培养条件

基本分化培养培养基有 MS、改良 B_5 (B_5 大量元

素和钙盐 + MS 有机物、铁盐、微量元素)、改良 WPM(WPM 大量元素 + 钙盐 + MS 有机物、铁盐、微量元素);生根培养基用 MS、1/2MS。各培养基均附加 3% 蔗糖,0.65% 的琼脂及各种组合的生长调节剂,pH 为 5.8~6.0。培养温度为 $25 \pm 2^\circ\text{C}$,光照 16 h d^{-1} ,光强约为 $37 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 。

3 结果和分析

3.1 不定芽的分化与丛生芽的诱导

外植体经消毒处理后,接种于不同的培养基中(表 1),茎尖接种在以 MS、改良 B_5 为基本培养基,并含 BA 2 mg L^{-1} (单位下同) + NAA 0.1 和 BA 1 + NAA 0.1 培养基中 10 d 后,逐步增大长高,基部稍有膨大,开始有绿色愈伤组织产生;茎段在上述培养基中,侧芽萌发;而当培养基含有 2,4-D 时,不管是茎尖还是茎段,基部都膨大产生愈伤组织。接种 15 d 后,在以 MS、改良 B_5 为基本培养基(不含 2,4-D)中的外植体,在基部膨大的边缘产生白色的小突起(图版 I:1),小突起逐渐转绿,并于 30 d 后分化形成不定芽(图版 I:2);而其余培养基中的外植体,产生的愈伤组织,有的逐渐变大变绿,有的却逐渐变得比较疏松。

从表 1 可以看出,外植体在含 2,4-D 的培养基中培养 50 d 的愈伤组织诱导率均可达 100%,而且,凡含 2,4-D 的培养基上的愈伤组织生长速度均较快,但均未见不定芽分化产生。改良 B_5 培养基的愈伤组织诱导率和芽分化率都较高,MS 较低,改良 WPM 的芽分化率为 0。

3.2 最适培养基的选择及不定芽的继代增殖

经初代培养后形成的不定芽(图版 I:3),切成单芽后,转接于以改良 B_5 为基本培养基,含不同植物生长调节剂配比的培养基中,以筛选最适培养基。25 d 后进行接种统计。从表 2 可见,改良 B_5 + BA 1 + NAA 0.5 培养基的增殖系数最高。改良 B_5 + BA 2 + NAA 0.5 和改良 B_5 + BA 2 + NAA 0.1 两培养基产生不定芽的同时,在不定芽基部还有大块绿色愈伤组织产生,影响了不定芽的增殖系数;改良 B_5 + BA 0.5 + NAA 0.1 和改良 B_5 + BA 0.5 + NAA 0.5 两种培养基的增殖系数低,但不定芽的长度及茎粗都大过其他几种培养基。因此,从增殖系数及生长状况来看,以改良 B_5 + BA 1 + NAA 0.1~0.5 为最佳的繁殖培养基;改良 B_5 + BA 2 + NAA 0.1~0.5 培养基上有大块绿色愈伤组织产生,会消耗过多的营养,

不利于不定芽的生长;改良 B₅+ BA 0.5 + NAA 0.1 ~ 0.5 培养基可于生根前壮苗。

表1 培养基对吊钟花愈伤组织诱导及芽分化的影响

Table 1 Effects of mediums on callus induction and adventitious buds differentiation

基本培养基 Basal medium	植物生长调节剂 Plant growth regulator (mg L ⁻¹)			外植体数 Number of explants	愈伤组织诱导率 Callus induction rate (%)	芽分化率 Bud differentiation rate (%)
	BA	NAA	2,4-D			
MS	1	0.1		25	92.6	15
	1	0.1	1	25	100	0
	2	0.1		23	94.4	23.8
改良 WPM	2	0.1	1	22	100	0
	1	0.1		24	57.1	0
Modified	1	0.1	1	22	100	0
WPM	2	0.1		25	52.4	0
	2	0.1	1	20	100	0
改良 B ₅	1	0.1		25	100	73.4
Modified B ₅	1	0.1	1	19	100	0
	2	0.1		24	100	28.6

表2 不同植物生长调节剂对芽增殖的影响

Table 2 Effects of plant growth regulators on adventitious bud propagation

植物生长调节剂 Plant growth regulator (mg L ⁻¹)	接种的不定芽数 Number of adventitious bud	产生的不定芽数 Number of buds produced	增值系数 Propagation coefficient (%)
BA 1 + NAA 0.1	21	232	11.04
BA 1 + NAA 0.5	21	298	14.19
BA 2 + NAA 0.1	21	174	8.29
BA 2 + NAA 0.5	21	185	8.81
BA 0.5 + NAA 0.1	21	104	4.95
BA 0.5 + NAA 0.5	21	138	6.57

表3 不同培养基对生根的影响

Table 3 The effects of medium on rooting

培养基 Medium (mg L ⁻¹)	接种数 Number of inoculation	生根芽数 Number of rooting buds	生根率 Rooting (%)
1/2MS + IBA 2.0 + 活性炭(AC)	105	86	81.9
1/2MS + IBA 2.0	105	88	83.81
1/2MS + IBA 5.0 + 活性炭(AC)	105	70	66.67
1/2MS + IBA 5.0	105	69	65.71
1/2MS + IBA 7.5 + 活性炭(AC)	105	52	49.52
1/2MS + IBA 7.5	105	54	51.43
1/2MS + IBA 10 + 活性炭(AC)	105	37	35.24
1/2MS + IBA 10	105	34	32.38
1/2MS + IAA 1.75 + 活性炭(AC)	105	23	21.90
1/2MS + IAA 1.75	105	24	22.85
1/2MS + IAA 1.5 + 活性炭(AC)	105	18	17.14
1/2MS + IAA 1.5	105	20	19.04

3.3 壮苗和生根

不定继代培养 3~4 次后,在生根培养之前,转至改良 B₅ + BA 0.5 + NAA 0.1 培养基中进行壮苗培养(图版 I:4)。然后将生长健壮、高度在 3~4 cm 以上的不定芽转接到生根培养基上诱导生根(图版 I:5)。从表 3 可见大量元素减半的 1/2MS 培养基比 MS 更有利于生根。在培养基中是否添加活性炭的差别不大。培养基中添加 IBA 比添加 IAA 生根效果好,生根率以 1/2MS + IBA 2.0 培养基最高。

3.4 移栽

吊钟花的不定芽在瓶内的生根率不超过 85%,且未生根的不定芽多次在生根培养基中转接培养,始终不能生根,这些不定芽在培养瓶内可以长高,茎木质化程度增大,叶片也逐渐由浅绿变为深绿,革质层加厚。把不定芽上的残留培养基洗干净,移栽到珍珠岩为基质的苗床上。栽后淋足水分,用塑料薄膜遮盖保湿,再覆盖双层遮荫网,每天早晚大量淋水,20 d 后不定芽开始产生不定根,此时吊钟花幼苗可以通过不定根从基质中吸收水分,生根率可以达到 95% 以上。

吊钟花试管苗瓶内生根后 20 d 左右便可移栽,时间过长根部开始发黑,影响移栽成活率,时间过短,叶片较嫩移栽时容易失水萎蔫,也影响移栽的成活率。移栽基质用珍珠岩,移栽后必须淋足水分,并在 3~4 d 内每天必须大量淋水,覆盖塑料薄膜以保持湿度,一周后可以揭膜通风,开始时短时间通风,以后逐渐增加通风时间,而且在中午光线太强时,不宜进行通风并要采取遮荫保护措施,两周后完全去除塑料膜(图版 I:6)。去膜后一周内装袋,即转入营养基质中栽培。

4 讨论

在杜鹃花科植物的组织培养中,Lloyd 等^[1]研制的木本植物培养基 WPM 对杜鹃花科植物比较有效,其他培养基也有成功培养的报道。钟宇等^[4]报道 Read 培养基的无机盐离子浓度对 *Rhododendron hybridum* 茎尖的生长最为有利;宗宪春^[5]用 B₅ 培养基进行杜鹃花科植物的增殖培养;邓百万^[6]用 N₆ 培养基诱导 *Rhododendron hybridum* 不定芽发生所需的时间要短于 Read 培养基和 Anderson 培养基。本研究的结果表明,对吊钟花的茎尖及带腋芽的茎段培养最有利的培养基为

改良 B₅, WPM 培养基却很难进行增殖培养,可见不同植物的最适基本培养基不同。

吊钟花的外植体在含 2,4-D 的培养基中愈伤组织的诱导率可达 100%,但是不定芽的分化产生却很困难。同时在植物的组织培养中,外植体脱分化诱导愈伤组织产生再形成不定芽时,比较容易发生变异,因此在材料来源比较充分的情况下,尽可能的选择茎尖及带腋芽的茎段,直接诱导产生不定芽,以便保持植物的原有性状。本试验的结果,在激素配比为 BA 1~2 mg L⁻¹ + NAA 0.1~0.5 mg L⁻¹ 的培养基中,可直接诱导吊钟花的茎尖及带腋芽的茎段产生不定芽。

组培苗的大量增殖会使得不定芽长势纤细,达不到直接生根的要求。因此在吊钟花不定芽增殖过快,丛生芽过于细小的情况下,降低 BA 的浓度,可减少不定芽的过多过快增殖,并有利于不定芽长得粗壮。

参考文献

- [1] Yang H B(杨汉碧), Fang R Z(方瑞征), Chin C L(金存礼). Flora Reipublicae Popularis Sinicae Tomus 57(1) [M]. Beijing: Science Press, 1999: 1-2.(in Chinese)
- [2] Fu L G(傅立国), Hong T(洪涛). Higher Plants of China, Vol. 5 [M]. Qingdao: Qingdao Publishing House, 2003: 721-732.(in Chinese)
- [3] Lloyd G, McCown B H. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. [J] Hort Sci, 1980, 15: 417-417.
- [4] Zhong Y(钟宇), Zhang J(张健), Luo C D(罗承德), et al. A study on the tissue culture in *Rhododendron* hybrid (I). Selection of medium and explant [J]. J Sichuan Agri Univ(四川农业大学学报), 2001, 19: 137-138.(in Chinese)
- [5] Zong X C(宗宪春). Rapid propagation on two species of *Rhododendron* [J]. J Mudanjiang Teach Coll(牡丹江师范学院学报), 1999(1): 5.(in Chinese)
- [6] Deng B W(邓百万), Cheng W Q(陈文强), Gao F F(高菲菲). Study on tissue culture of *Rhododendron hybridum* [J]. Amino Acid Biol Resour(氨基酸和生物资源), 2002, 24(3): 25-27.(in Chinese)
- [7] Anderson W C A. Revised tissue medium for shoot multiplication of *Rhododendron* [J]. J Amer Soc Hort Sci, 1975, 109: 343-347.
- [8] Hannapel D J, Dirr M A, Sommer H E. Micropropagation of native *Rhododendron* species [J]. HortScience, 1981, 16(3): 452.
- [9] Liang X H(梁晓华), Xu C D(徐成东), Xie M H(谢美华), et al. Explores into the tissue culture technology of *Rhododendron microphyton* [J]. J Yunnan Norm Univ (Nat Sci)(云南师范大学学报:自然科学版), 2006, 26(1): 55-57.(in Chinese)
- [10] Meyer M M. *In vitro* propagation of *Rhododendron catawbiense* from flower buds [J]. HortScience, 1982, 17(6): 891-892.
- [11] Miao Y M(苗永美), Wang Y Q(王永清), Zhuang P(庄平), et al.

Study on technique tissue culture in *Rhododendron anne* Franch [J]. *J Biol*(生物学杂志), 2006, 23(6): 29-31.(in Chinese)

[12] Tang G J(汤桂钧), Zhang J A(张建安), Jiang J P(蒋建平), et al. Study on rapid propagation of *Rhododendron japonicum* [J]. *Acta Agri Shanghai*(上海农业学报), 2004, 20: 9-11.(in Chinese)

[13] Wang Q(王荃), Hu B Z(胡宝忠). Study on the technique system of tissue culture in *Rhododendron L.* [J] *J NE Agri Univ*(东北农业大学学报), 2003, 34: 368-371.(in Chinese)

[14] Wang Y F(王亦菲), Sun Y F(孙月芳), Zhou R M(周润梅), et al. Rapid propagation of *Rhododendron hybridun* [J]. *Acta Agri Shanghai*(上海农业学报), 2003, 19(2): 9-11.(in Chinese)

图版说明

图版 I

1. 外植体开始产生小突起; 2. 开始产生不定芽; 3. 外植体产生不定芽 20 d 后; 4. 不定芽的继代增殖; 5. 生根幼苗; 6. 移栽在珍珠岩上的幼苗。

Explanation of plate

Plate I

1. Callus formed sporadically from shoot-tip; 2. Adventitious buds formed; 3. Adventitious buds formed after 20 days; 4. Adventitious buds on subculture; 5. Plantlets rooting; 6. Plantlets transferred in perlite bed.

