

DOI:10.11937/bfyy.201507028

新宁云锦杜鹃组织培养研究

唐映红^{1,2}, 沈帆¹, 刘芳¹, 郭清泉¹, 康用权³, 陈建荣¹

(1. 长沙学院 生物与环境工程系, 湖南 长沙 410022; 2. 湖南农业大学 农学院, 湖南 长沙 410128;

3. 湖南湘植园林科技有限公司, 湖南 长沙 410116)

摘要:以新宁云锦杜鹃茎段为外植体, 利用植物组织培养技术, 采用不同的外植体消毒方案, 以 1/4MS 为基本培养基, 添加了不同浓度的 6-BA、ZT 和 NAA 等植物生长调节物质, 研究了不同培养条件对云锦杜鹃离体芽诱导、增殖、生根的影响。结果表明: 最佳外植体消毒方案为 75% 乙醇 30 s + 5% 次氯酸钠 10 min, 转瓶 6 次去除内生菌, 芽诱导的最佳培养基配方是 1/4MS + 7 mg/L ZT + 0.15 mg/L NAA, 离体芽在 1/4MS + 1.0 mg/L ZT + 0.10 mg/L NAA 培养基上的增殖效果较好, 幼苗在 1/2MS + 0.1 mg/L 6-BA + 1.5 mg/L NAA 培养基上的生根效果较好。

关键词:云锦杜鹃; 组织培养; 培养基

中图分类号:S 685.210.36 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)07-0094-04

湖南是南方重点林区省份之一, 多样的地形因子和多变的小气候环境, 孕育了丰富的杜鹃花植物资源。目前, 湖南省已将杜鹃花旅游资源进行有效整合, 展现了杜鹃花品牌效应和生态旅游价值。新宁云锦杜鹃 (*Rhododendron fortunei*) 是湖南新宁舜皇山海拔 1 000~1 800 m 处的优势群落, 其生长海拔较高, 采集较困难, 作为“湖南杜鹃花生态文化旅游节”主要珍贵品种之一, 开发其旅游产品价值, 需要大量的苗木^[1]。传统的扦插繁殖系数低, 种子繁殖的方式存在开花周期长、种性变异等问题, 不能达到很好的育苗效果^[2]。为了克服传统繁殖方法的局限性, 保护品种资源特色, 有必要采用植物组织培养的方法, 进行快速繁殖和产业化育苗研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料采自湖南省森林植物园杜鹃林(引种地: 湖南省新宁县), 挑选健康无虫的云锦杜鹃枝条, 剪取带芽茎段作为组织培养的外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒 表面消毒: 采用带芽茎段作为外植体材料, 在自来水下冲洗干净。清洗干净之后修剪掉多

余的部分, 即可在超净工作台上进行消毒处理。采用设计的 6 种处理: ①75% 乙醇 30 s + 0.1% 升汞 8 min, ②75% 乙醇 30 s + 0.1% 升汞 10 min, ③75% 乙醇 30 s + 10% 次氯酸钠 8 min, ④75% 乙醇 30 s + 10% 次氯酸钠 10 min, ⑤75% 乙醇 30 s + 5% 次氯酸钠 8 min, ⑥75% 乙醇 30 s + 5% 次氯酸钠 10 min。消毒方案对外植体进行消毒处理, 每个方案处理 10 个外植体, 外植体消毒后接种于培养基中。观察并记录外植体污染和褐化情况, 2 周后统计污染率和褐化率(消毒剂造成的伤害)。内生菌的离体消除: 选取 20 瓶内生菌污染程度相近的培养基, 采用反复转瓶的方法消除茎段中的内生菌。每隔 48 h 对长菌的茎段进行转瓶, 每次转瓶切除茎段两端, 注意不要损坏腋芽, 尽量不要将菌落带入新培养基中。经过多次转瓶操作, 直至完全消除内生菌, 并得到无菌幼芽。

1.2.2 芽诱导培养设计 将消毒完全的外植体分别接种于 25 种芽诱导培养基(表 1), 以 1/4MS 为基本培养基, 按浓度梯度正交实验添加 ZT、NAA 植物生长调节物质, 每种培养基接种 10 个。观察并记录幼芽芽长和生长状况, 2 周后统计平均芽长和生长状况, 确定芽诱导的最佳培养方案。

表 1 芽诱导培养基

Table 1 Bud induction medium

NAA/(mg · L ⁻¹)	ZT/(mg · L ⁻¹)				
	0	1	3	5	7
0.01	A ₁	A ₆	A ₁₁	A ₁₆	A ₂₁
0.05	A ₂	A ₇	A ₁₂	A ₁₇	A ₂₂
0.10	A ₃	A ₈	A ₁₃	A ₁₈	A ₂₃
0.15	A ₄	A ₉	A ₁₄	A ₁₉	A ₂₄
0.20	A ₅	A ₁₀	A ₁₅	A ₂₀	A ₂₅

第一作者简介:唐映红(1988-), 女, 湖南桑植人, 硕士研究生, 研究方向为作物遗传育种改良和植物组织培养。E-mail:462994081@qq.com

责任作者:陈建荣(1973-), 女, 湖南芷江人, 博士, 副教授, 现主要从事植物资源与应用研究及教学工作。

基金项目:长沙市科技计划资助项目(K1205040-31); 湖南省科技计划资助项目(2014CK4018); 长沙学院人才引进资助项目(SF080402)。

收稿日期:2014-11-10

1.2.3 芽增殖培养设计 芽诱导培养后,将诱导培养获得的生长状况相似的初始芽分别接种在 9 种不同的培养基(表 2),以 1/4MS 为基本培养基,按浓度梯度正交实验添加 ZT、NAA 植物生长调节物质,每种培养基接种 10 个,3 周后统计其生长状况,确定芽增殖培养最佳方案。

表 2 芽增殖培养基

Table 2 Buds multiplication culture medium

NAA/(mg·L ⁻¹)	ZT/(mg·L ⁻¹)		
	0.5	1.0	1.5
0.05	B ₁	B ₄	B ₇
0.10	B ₂	B ₅	B ₈
0.15	B ₃	B ₆	B ₉

1.2.4 幼苗生根培养设计 芽增殖培养后,将增殖培养获得的生长较健壮的芽分别接种在 9 种不同的培养基(表 3),以 1/2MS 为基本培养基,按浓度梯度正交实验添加 6-BA、NAA 植物生长调节物质,每种培养基接种 20 个,3 周后统计其生长状况,确定幼苗生根培养最佳方案。

表 3 幼苗生根培养基

Table 3 Seedlings rooting medium

NAA/(mg·L ⁻¹)	6-BA/(mg·L ⁻¹)		
	0.1	0.5	1.0
1.0	C ₁	C ₄	C ₇
1.5	C ₂	C ₅	C ₈
2.0	C ₃	C ₆	C ₉

1.2.5 培养条件 培养温度 25℃左右,每天光照 12 h,光照强度 3 000 lx。

1.3 数据分析

于芽诱导及芽生根试验结束时,目测生长情况并用 3 级表示,分别记为:“+”表示长势较差,幼芽未展开;“++”表示长势一般,幼芽稍微展开;“+++”表示长势较好,幼芽展开。污染率=污染瓶数/接种的总瓶数,褐化瓶数/接种的总瓶数,增殖倍数=增殖后的总株数/接种的外植体株数,生根率=生根株数/接种总株数,记录 3 次重复的平均数作为最终结果,用 DPS 数据处理软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同消毒方案对外植体成活率的影响

由表 4 可以看出,方案⑥(75%乙醇 30 s+5%次氯酸钠 10 min)的消毒效果最为理想,接种后可以很好的存活、生长,并萌发出新芽,此方案适合于新宁云锦杜鹃

表 4 表面消毒 2 周后培养基的污染情况

Table 4 Surface disinfection after 2 weeks of medium pollution

消毒方案	培养时间	污染率	褐化率
Solutions	Incubation time/d	Contamination rate/%	Browning rate/%
①	14	9.78±0.37 cC	70.36±1.22 bB
②	14	0.34±0.01 dD	90.95±4.12 aA
③	14	20.04±0.50 bB	10.26±0.12 dD
④	14	10.50±0.47 cC	20.53±0.96 cC
⑤	14	30.26±1.00 aA	0.06±0.01 eE
⑥	14	10.07±0.50 cC	0.14±0.01 eE

外植体的消毒。

由表 5 可以看出,在转瓶 3 次后,长菌瓶数明显降低,但是仍然存在长菌的培养基。在转瓶 6 次后,已基本不存在长菌培养基。对于新宁云锦杜鹃,转瓶 6~7 次可以完全消除内生菌得到无菌苗。

表 5 内生菌生长的培养基经反复转瓶后的情况

Table 5 Endophytes of growth medium after repeatedly turned a bottle

接种时间 Inoculation time/d	0	1	3	5	7	9	11	13
转瓶次数 Number of bottle turn	0	1	2	3	4	5	6	7
长菌瓶数 Long bottle bacteria	20	20	17	11	4	1	0	0

2.2 不同激素组合对云锦杜鹃芽诱导的影响

由表 6 可知,不同的激素组合对芽诱导有不同的影响,当 ZT 浓度不变时,随着 NAA 浓度的增大,芽的生长没有明显变化,由此可以看出 NAA 对云锦杜鹃芽诱导没有显著影响;当 NAA 浓度为 0.15 mg/L 时,随着 ZT 浓度的增大,芽的生长有明显变化,芽长长度呈先增长后变短的趋势,芽顶也有部分开始展开,新叶逐渐成型,说明 ZT 对云锦杜鹃芽的诱导有非常重要的作用,但 ZT 浓度不能太高,当浓度高于芽诱导的最适浓度时,将会抑制芽的生长。

表 6 芽诱导培养 2 周后幼芽的生长情况

Table 6 Bud induction training germ growth after 2 weeks

培养基编号	平均芽长	生长状况	培养基编号	平均芽长	生长状况
Number	The average buds length/cm	Status of growth	Number	The average buds length/cm	Status of growth
A ₁	0	+	A ₁₄	1.0	++
A ₂	0.4	+	A ₁₅	0.8	+
A ₃	0.4	+	A ₁₆	0.6	+
A ₄	0.4	+	A ₁₇	0.8	+
A ₅	0.4	+	A ₁₈	1.0	++
A ₆	0.6	+	A ₁₉	1.3	++
A ₇	0.6	+	A ₂₀	1.3	++
A ₈	0.8	+	A ₂₁	0.8	+
A ₉	0.8	+	A ₂₂	1.3	++
A ₁₀	0.6	+	A ₂₃	1.3	++
A ₁₁	0.6	+	A ₂₄	1.8	+++
A ₁₂	0.6	+	A ₂₅	1.4	++
A ₁₃	1.0	++			

注:A₁培养 1 周后幼芽萌发;B₁培养 2 周后幼芽展开。

Note: A₁ cultivate little bud germination after 1 week; B₁ cultivate germ after 2 weeks.

接种在 A₂₄号培养基上的外植体,芽诱导效果最为理想,幼芽在接种培养 1 周后开始萌发变绿(图 1-A)。培养 2 周后幼芽明显伸长 1.8 cm,并且芽顶已经打开,新叶开始成形,比其它各组生长要快,更为明显(图 1-B)。其中 A₁、A₂、A₃、A₄、A₅ 培养基的效果最不理想,由于没有添加 ZT,芽伸长不明显,基本没有太大变化;其余各组芽都开始伸长,有显著的生长趋势,但是没有 A₂₄号培养基中芽生长明显。综上可得,最适合云锦杜鹃芽诱导的培养基为 A₂₄号培养基:1/4MS+7 mg/L ZT+0.15 mg/L NAA。该培养基能够有效地诱导云锦杜鹃芽的萌发及生长。



图1 云锦杜鹃芽诱导培养

Fig.1 *Rhododendron fortunei* bud induction training

2.3 不同激素组合对云锦杜鹃芽增殖的影响

由表7可知,不同的激素组合对芽的增殖有不同的影响,当 ZT 浓度不变时,随着 NAA 浓度的增大,各组芽生长没有明显差异;当 NAA 浓度不变时,随着 ZT 浓度的增大,从生芽发生数增加,增殖系数提高。B₅ 号培养基中接种的初始芽培养 1 周后,分化出 3~4 个丛生芽(图 2-C)。增殖培养 3 周后,从生芽逐渐分化、生长,形成枝条(图 2-D)。综上可知,B₄、B₅、B₆ 号培养基适合用于云锦杜鹃的增殖培养,而 B₅ 号培养基枝条粗细更均匀,生长状况和 B₄、B₆ 号相比较也相对较好,得最适宜云锦杜鹃增殖培养的配方为:1/4MS+1.0 mg/L ZT+0.10 mg/L NAA。该培养基能够使云锦杜鹃快速有效地进行增殖。

表7 芽增殖培养 3 周后的生长情况

Table 7 Bud multiplication culture growth after 3 weeks

培养基 Medium	增殖倍数 Proliferation rate	枝条粗细 Branch thickness	叶色 Leaf colour
B ₁	1.13±0.40 fF	粗壮	深绿
B ₂	1.07±0.45 fF	粗壮	深绿
B ₃	2.31±0.74 eE	粗壮	深绿
B ₄	3.00±0.72 dD	较细	较绿
B ₅	4.38±0.71 cC	粗细均匀	较绿
B ₆	4.26±1.36 cC	较细	较绿
B ₇	5.35±2.87 bB	很细	淡绿
B ₈	6.30±2.27 aA	很细	淡绿
B ₉	4.93±0.77 bB	很细	淡绿

注:C;增殖培养 1 周后分化出丛生芽;D:增殖培养 3 周后丛生芽长成枝条。

Note;C;multiplication culture after 1 week differentiate into multiple shoot clumps;
D;multiplication culture 3 weeks after multiple shoot clumps into branches.



图2 云锦杜鹃增殖培养

Fig.2 *Rhododendron fortunei* multiplication culture

2.4 不同激素组合对云锦杜鹃芽生根的影响

由表8可知,不同的激素组合对芽生根有不同的影响,当 6-BA 浓度为 0.1 mg/L 时,生根率没有呈线性增长,由此可以看出 NAA 浓度过高或者过低都不利于云锦杜鹃的生根;当 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时,随着 NAA 浓度的改变,生根率的变化不明显,说明 6-BA/NAA 比值高,不利于根分化。综上可得,最适合云锦杜鹃芽生根的培养基为 C₂ 号培养基:1/2MS+0.1 mg/L 6-BA+1.5 mg/L NAA。该培养基能够有效地诱导云锦杜鹃芽的生根(图 3)。

表8 芽生根培养 3 周后根的生长情况

Table 8 Buds rooting culture root growth after 3 weeks

培养基 Medium	生根率 Rooting rate/%	根长势 Root of growth vigour
C ₁	72.24±1.03 bB	++
C ₂	92.23±1.04 aA	+++
C ₃	70.15±1.06 bB	++
C ₄	41.059±1.12 dD	+
C ₅	42.29±1.17 dD	+
C ₆	60.52±0.56 cC	++
C ₇	20.98±1.13 fF	+
C ₈	33.16±1.72 eE	+
C ₉	20.06±1.03 fF	+

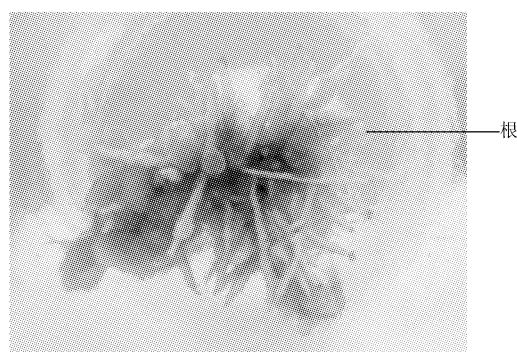


图3 云锦杜鹃生根培养

Fig.3 *Rhododendron fortunei* rooting culture

3 讨论与结论

培养基中的激素对植物的影响很大,该试验探究各激素比例对云锦杜鹃组培的影响,为云锦杜鹃的快繁做出一定贡献。该试验采用 75%乙醇消毒 30 s,5%次氯酸钠消毒 10 min 的方法对外植体表面进行消毒。试验证明,污染率仅为 10%,褐化率几乎为 0,朱春艳等^[3]、张杨军等^[4]使用的升汞消毒对植物的伤害较大,效果一般。可见,该试验使用的消毒方法伤害较小,褐化率低,能够大大提高试验的成功率。

此外,对于获得无菌苗方面,该试验还采用反复转瓶的方法消除内生菌,朱春艳等^[3]、张杨军等^[4]对外植体表面消毒后,并没与考虑内生菌的干扰,但往往内生菌会影响到试验的进展及结果。并且,若是用传统的再次消毒方法去除内生菌,则会对外植体再次造成一些伤害,将会使褐化率提高。该试验采用的反复转瓶的方法操作简便,在去除内生菌的同时,也尽可能的减小了对植物的伤害,有助于芽的诱导。

在芽诱导和芽增殖培养基配方中,该试验均采用 1/4MS 作为基本培养基,相对于朱春艳等^[3]使用的 WPM、

6,7-V 培养基,大大降低了培养基成本,为大批量生产新宁云锦杜鹃无菌苗节省了资金。

该试验的生根培养基能够使云锦杜鹃在 21 d 内生根,且根长势较好,张杨军等^[4]对云锦杜鹃的生根培养需要 30 d。可见,该试验用于云锦杜鹃生根的配方简单,生根时间短,长势好,能够使幼芽快速生根,成为云锦杜鹃幼苗,为大量栽培云锦杜鹃苗木做好必要的准备。该试验研究为云锦杜鹃无菌景观提供生产技术,能为云锦杜鹃的综合利用、生态旅游品牌提供新的途径,也为其产业化有一定的贡献。

云锦杜鹃不仅具有较高的园林美学观赏价值,还具有重要的药用价值,其含有的丰富的黄酮类化合物^[5],有清热解毒、抗菌消炎、生肌敛疮的功效。云锦杜鹃的组织培养,也为不久的将来云锦杜鹃细胞工程技术生产次生代谢产物提供了试验依据。

(致谢:感谢长沙学院教学改革研究项目(2014-14)“生物工程专业核心课程细胞工程教学改革研究与实践”和湖南省普通高校教学改革研究项目“湘教通[2010]243号文件412号项目“生物工程专业实践教学改革研究”指导。感谢湖南省“经济动植物品质调控及应用重点实验室”、湖南省重点建设学科“生物化学与分子生物学”对本研究的支持。)

参考文献

- [1] 康用权,彭春良,廖菊阳,等. 湖南杜鹃花资源及其开发利用[J]. 中南林业科技大学学报,2010,30(8):57-62.
- [2] 于琼花,张有珍,周平,等. 天目杜鹃嫩枝扦插繁育试验[J]. 林业实用技术,2004(6):23-24.
- [3] 朱春艳,李志炎,鲍淳松,等. 云锦杜鹃组培快速繁殖技术研究[J]. 中国农学通报,2006,22(5):335-337.
- [4] 张杨军,涂艺声,彭先全,等. 云锦杜鹃离体再生培养基的条件优化[J]. 安徽农业科学,2010,38(11):6008-6010.
- [5] 李钧敏,金则新,杨蓓. 云锦杜鹃总黄酮含量及成分分析[J]. 西北林学院学报,2004,19(1):11-12.

Study on Tissue Culture of *Rhododendron fortunei* in Xinning

TANG Ying-hong^{1,2}, SHEN Fan¹, LIU Fang¹, GUO Qing-quan¹, KANG Yong-quan³, CHEN Jian-rong¹

(1. Department of Biological and Environmental Engineering, Changsha University, Changsha, Hunan 410022; 2. Agricultural College, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128; 3. Hunan Xiang Zhi Garden Technology Co. Ltd., Changsha, Hunan 410116)

Abstract: Taking leaves and stems of *Rhododendron fortunei* as explants, using plant tissue culture techniques, different explant disinfection programs were conducted and using 1/4MS as the basic medium supplemented with different concentrations of ZT and NAA plant growth regulating substances, in order to study the effect of different culture conditions on *Rhododendron in vitro* bud induction and proliferation. The results showed that the best explant disinfection program was 75% ethanol for 30 seconds and 5% sodium hypochlorite for 10 minutes, and the shoot apex had the highest induced rate. The best bud induction medium program was 1/4MS mixed with 7 mg/L ZT and 0.15 mg/L NAA, *in vitro* shoots had the best proliferation effect in medium with 1/4MS mixed with 1.0 mg/L ZT and 0.10 mg/L NAA, seedling had the best rooting effect in medium with 1/2MS+0.01 mg/L 6-BA+1.5 mg/L NAA.

Keywords: *Rhododendron fortunei*; tissue culture; culture medium