

DOI:10.11937/bfyy.201502025

# 锈叶杜鹃愈伤组织诱导和增殖研究

周 敏<sup>1</sup>, 龙秀琴<sup>2</sup>, 刘 燕<sup>3</sup>

(1. 遵义医药高等专科学校, 贵州 遵义 563000; 2. 贵州省山地资源所, 贵州 贵阳 550001; 3. 贵州省生物研究所, 贵州 贵阳 550009)

**摘 要:**以锈叶杜鹃无菌种子萌发后的胚轴和子叶为试材,对影响其愈伤组织诱导和增殖的几个关键因子进行了研究。结果表明:MS培养基较适宜愈伤组织的诱导和培养;TDZ和NAA浓度对愈伤组织诱导有很大影响,TDZ 0.50 mg/L+NAA 0.05 mg/L对愈伤组织诱导效果较好,诱导率为77.78%;MS+TDZ 0.10 mg/L+NAA 0.05 mg/L对愈伤组织增殖效果较好,增殖率为96.67%,增殖倍数为4.50;愈伤组织需及时转瓶,转瓶时间较晚容易褐化死亡,转瓶时间以40 d为宜。

**关键词:**锈叶杜鹃;愈伤组织;诱导;增殖

**中图分类号:**S 685.21 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)02-0088-03

锈叶杜鹃(*Rhododendron siderophyllum* Franch.)为常绿野生杜鹃,花期3—6月,冬季偶见开花植株,株型优美,花冠筒状钟形,花色淡雅丰富,有白色、淡红色、淡紫色或偶见玫瑰红色,花冠内面上方通常有黄绿色、红色或杏黄色斑点<sup>[1]</sup>,有较高观赏价值。目前,锈叶杜鹃主要靠种子繁殖,但种子萌发率低、繁育时间长;扦插生根困难,加之季节和资源限制,需行之有效的快繁方法对其进行繁殖和保护。组织培养技术是当代兴起的一种快速繁殖的培养途径,不仅简单、迅速、繁殖速度快,更利于植物新品种的推广和规模化生产。愈伤组织诱导和增殖是组培快繁中的关键环节,关于锈叶杜鹃组织培养方面研究尚鲜见报道。现对锈叶杜鹃组培快繁中愈伤组织诱导和增殖方面做了细致研究,力求为今后锈叶杜鹃的快速育苗技术打下坚实基础,可为商品化生产

提供一定的科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为锈叶杜鹃无菌种子萌发后的胚轴和子叶,种子采自贵州百里杜鹃自然保护区和贵阳乌当区可龙村万亩杜鹃林多年生锈叶杜鹃植株。

### 1.2 试验方法

1.2.1 培养条件 试验所用培养基均加入30 mg/L蔗糖、10 g/L琼脂、1 g/L PVP(聚乙烯吡咯烷酮),pH 5.4~5.8。培养条件为温度(25±1)℃,光照时间1 h/d,光照强度1 500~2 000 lx。

1.2.2 筛选愈伤组织诱导最适培养基 以MS、1/2MS、1/4MS 3种培养基为基本培养基,附加TDZ 0.10 mg/L和NAA 0.05 mg/L,对愈伤组织进行诱导培养,筛选适合愈伤组织培养的培养基配方。50 d后记录诱导结果。

1.2.3 筛选愈伤组织诱导最适激素浓度 以MS培养基为基本培养基,以NAA 0.05 mg/L为基本生长素和浓度,附加不同浓度TDZ(0.10~1.50 mg/L),对愈伤组织诱导进行研究,筛选诱导愈伤组织的TDZ最适宜浓度。在筛选出TDZ适宜浓度基础上,以TDZ 0.50 mg/L为基本细胞分裂素,附加不同浓度NAA(0.01~

**第一作者简介:**周敏(1980-),女,贵州遵义人,硕士,讲师,现主要从事植物组培及栽培技术等研究工作。E-mail: minzhou211@126.com.

**责任作者:**刘燕(1981-),女,贵州贵阳人,硕士,副研究员,现主要从事花卉开发与繁殖等研究工作。

**基金项目:**贵州省科技厅重大专项基金资助项目(黔科合重大专项字[2011]6001);贵阳市科技局资助项目(筑科合同[2012]027)。

**收稿日期:**2014-07-28

**Abstract:** Taking sprawl cucumber(*Cucumis sativus* L.) '129' and dwarf cucumber 'D0462' as experimental materials, the effects of different light qualities on expression of the expansin were studied. The results showed that the hypocotyls length of 'D0462' was longer or shorter by different light treatment. The expression of expansin was detection by Real-time PCR. The red light inhibited the expression of expansin and blue light inhibited at first but promoted after that. It was inferred that the dwarf character of 'D0462' was related to the expression of expansin, especially with the Cs-EXPA1.

**Keywords:** light quality; expansin; dwarf; expression

0.50 mg/L),对愈伤组织进行诱导培养,筛选诱导愈伤组织的 NAA 最适宜浓度。50 d 后记录诱导结果。

1.2.4 筛选愈伤组织增殖最适激素浓度 在筛选出愈伤组织诱导最适宜培养基配方的基础上,进行植物激素浓度的优化调整试验,对愈伤组织进行继代增殖培养,筛选愈伤组织增殖的适宜激素和浓度。45 d 后记录增殖结果。

1.2.5 筛选愈伤组织继代增殖最适转瓶时间 愈伤组织增殖后,需及时转瓶来保持愈伤组织的活力,否则愈伤组织容易褐化、死亡。以 40、50、60 d 为转瓶时间,对愈伤组织的继代增殖进行了培养研究。转瓶 45 d 后记录培养结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养基对愈伤组织诱导的影响

由表 1 可知,MS 培养基较 1/2MS 培养基和 1/4MS 培养基对愈伤组织的培养效果好,在此培养基上,愈伤组织诱导率高,质量好,活力强,易于增殖。1/2MS 培养基和 1/4MS 培养基的诱导率结果相差甚微,但诱导出愈伤组织品质差异大。1/4MS 培养基诱导出愈伤组织颜色黄,致密,增殖后生长较慢,增值倍数低;1/2MS 培养基诱导出的愈伤组织的致密程度不及 1/4MS 培养基,愈伤组织略带绿色,增殖后生长速度较 1/4MS 培养基培养的愈伤组织效果好。

表 1 培养基对愈伤组织诱导的影响

Table 1 The effect of different media on callus induction

编号 Number	培养基 Medium	接种数 Inoculation number/个	出愈数 Callus number/个	诱导率 Induction rate/%	生长状态 Growth state	生长势 Growth potential
A1	MS	230	152	66.08	黄绿色,蓬松	*****
A2	1/2MS	90	42	46.67	黄色略带绿色,致密	***
A3	1/4MS	90	40	44.44	黄色,致密	***

注:“\*”表示生长状况,数量越多表示生长情况越好,下同。

Note:“\*”indicates the growth status, the more “\*” indicate the better of the growth situation, the same below.

### 2.2 TDZ 对愈伤组织诱导的影响

由表 2 可知,TDZ 浓度从 0.10~1.50 mg/L 均能诱导愈伤组织的产生,但诱导率差异较大。TDZ 0.10~0.50 mg/L 诱导效果好,不仅出愈率高,愈伤组织活力强,且易增殖;随着 TDZ 浓度升高,愈伤组织诱导率逐渐下降,尤其是当 TDZ 浓度增至 1.50 mg/L 后,诱导效果最差,诱导率仅达到 44.44%,与 TDZ 0.50 mg/L 诱导率相差 33.34 百分点。此外,愈伤组织的质量随着 TDZ 浓度的升高也逐渐降低。愈伤组织由低浓度黄绿色、蓬松状,逐步变为高浓度黄色、致密状,生长势变差。当 TDZ 浓度高于 1.00 mg/L 后,愈伤组织为白色,蓬松状,后期无增殖能力,继续培养褐化死亡。由此可见,TDZ 浓度控制在 0.10~0.50 mg/L 诱导效果较好,而 TDZ

0.50 mg/L 时诱导率最高,愈伤组织的活力最强,是诱导愈伤组织最适宜浓度。

表 2 TDZ 对愈伤组织诱导的影响

Table 2 The effect of different concentrations of TDZ on callus induction

编号 Number	TDZ (mg · L <sup>-1</sup> )	接种数 Inoculation number/个	出愈数 Callus number/个	诱导率 Induction rate/%	生长状态 Growth state	生长势 Growth potential
B1	0.10	60	40	66.67	黄绿色,蓬松	*****
B2	0.50	90	70	77.78	黄绿色,蓬松	*****
B3	1.00	80	40	50.00	黄色,致密	***
B4	1.50	90	40	44.44	白色,蓬松	*

### 2.3 NAA 对愈伤组织诱导的影响

由表 3 可知,NAA 浓度在 0.01~0.05 mg/L 间诱导效果好,逐步增加 NAA 浓度,诱导率降低,愈伤组织逐渐致密,变硬,生长势差。故诱导愈伤组织时 NAA 浓度控制在 0.10~0.05 mg/L 为宜。

表 3 NAA 对愈伤组织诱导的影响

Table 3 The effect of different concentrations of NAA on callus induction

编号 Number	NAA (mg · L <sup>-1</sup> )	接种数 Inoculation number/个	出愈数 Callus number/个	诱导率 Induction rate/%	生长状态 Growth state	生长势 Growth potential
C1	0.01	30	22	73.33	黄绿色,蓬松	*****
C2	0.05	30	23	76.67	黄绿色,蓬松	*****
C3	0.10	30	18	60.00	黄绿色,蓬松	****
C4	0.50	30	15	50.00	黄色,致密	***

### 2.4 TDZ 和 NAA 对愈伤组织继代增殖的影响

由表 4 可知,TDZ 浓度在 0.08~0.10 mg/L, NAA 浓度在 0.05 mg/L 时愈伤组织增殖效果较好,增殖率和增殖倍数都较高,尤其是 TDZ 0.10 mg/L 配以 NAA 0.05 mg/L 时诱导效果最好,增殖率达到了 96.67%,增殖倍数在 4.50 以上,愈伤组织活力强。继续增加 TDZ 浓度至 0.30 mg/L, NAA 浓度至 0.10 mg/L 后,愈伤组织增殖速度减慢。故选 TDZ 0.08~0.10 mg/L 配以 NAA 0.05 mg/L 对愈伤组织进行增殖培养为宜。

表 4 TDZ 和 NAA 浓度和配比对愈伤组织增殖的影响

Table 4 The effect of different concentrations of TDZ and NAA on callus multiplication

编号 Number	TDZ (mg · L <sup>-1</sup> )	NAA (mg · L <sup>-1</sup> )	增殖率 Proliferation rate/%	增殖倍数 Proliferation times	生长状态 Growth state	生长势 Growth potential
D1	0.08	0.05	93.33	4.50	绿色,蓬松	*****
D2	0.10	0.05	96.67	4.50	绿色,蓬松	*****
D3	0.30	0.05	83.33	2.50	黄绿色,致密	**
D4	0.50	0.05	66.67	3.00	黄绿色,致密	***
D5	0.08	0.10	83.33	3.50	黄绿色,致密	**
D6	0.10	0.10	80.00	3.50	黄绿色,致密	**
D7	0.30	0.10	73.33	2.50	绿色,致密	**
D8	0.50	0.10	73.33	2.00	黄色,致密	**

## 2.5 转瓶时间对愈伤组织继代的影响

由表 5 可知,继代转瓶时间对愈伤组织增殖和培养有很大影响。转瓶时间过晚,愈伤组织容易褐化、死亡,增殖率、增殖倍数都较低,转瓶后的愈伤生长势也较差,容易在转瓶 10 d 后死亡,故转瓶时间控制在 40 d 为宜。

表 5 转瓶时间对愈伤组织继代的影响

Table 5 The effect of different days of transferring medium on callus multiplication

编号 Number	转瓶时间 Change the bottle time/d	增殖率 Proliferation rate/%	增殖倍数 Proliferation times	生长状态 Growth state	生长势 Growth potential
E1	40	93.33	4.50	增殖正常	*****
E2	50	66.67	2.50	部分愈伤褐化	***
E3	60	40.00	2.00	部分愈伤褐化、死亡	**

## 3 结论与讨论

野生杜鹃因其极强的野生性和保守性,对培养基、培养条件、植物激素种类和浓度选择性都较强,只有根据不同的基因型选择合适的培养基、植物激素、培养条件才能得到理想的培养效果。大量研究表明<sup>[2-10]</sup>,低无机盐类培养基如 Read、1/4MS 适合杜鹃的离体培养,高盐培养基 MS 培养效果较差,不适合杜鹃类植物。该研究发现,1/4MS 未取得很好的培养效果,而 MS 较适宜锈叶杜鹃的组织培养,与前人结果不一致,可能受杜鹃种类的基因型影响有关。

范玉清<sup>[7]</sup>、管耀义等<sup>[8]</sup>用杜鹃叶片诱导愈伤组织时发现,TDZ 配以 NAA 对诱导杜鹃叶片愈伤组织十分有效,愈伤组织在 TDZ 处理上的分化率较高。该试验发现,TDZ 0.50 mg/L 配以 NAA 0.05 mg/L 对胚轴和子叶愈伤组织诱导效果较好,不仅出愈率高,愈伤组织活力强,且易增殖。野生杜鹃的野生性强、保守性高,一般的细胞分裂素较难诱导出芽或愈伤组织,而 TDZ 具有

很强的细胞分裂素活性(CTK),因此,TDZ 诱导野生杜鹃的愈伤组织效果较好,配以生长素 NAA 的相互作用,使其生理活性与功能达到最佳。

杜鹃组织培养中愈伤组织褐化常常严重影响植株再生的效率。目前,已有研究者对光照强度、温度、抗氧化剂、吸附剂<sup>[9]</sup>、消毒方式<sup>[10]</sup>等抗褐化方面进行了研究,但对不同继代培养时间间隔的研究鲜有报道。该研究表明,继代转瓶时间对愈伤组织增殖和培养有很大影响。转瓶时间过晚,愈伤组织容易褐化、死亡,这可能与愈伤组织在瓶内对营养物质吸收和环境改变有关。锈叶杜鹃继代时间不宜过晚,以 40 d 为宜,这样可以保持愈伤的活力,有效的减少愈伤的褐化和死亡率。

## 参考文献

- [1] 陈训. 中国贵州杜鹃花[M]. 贵阳:贵州科技出版社,2003.
- [2] 顾地周,朱俊义,曹逊,等. 短果杜鹃组培快繁及其种质试管保存培养基的筛选[J]. 东北林业大学学报,2009,37(4):8-10.
- [3] Eric W M, Cynthia S J, Mark H B, et al. Anatomy of shoots and tumors of *in vitro* habituated *Rhododendron 'montego'* (ericaceae) cultures with tissue roliferation[J]. American Journal of Botany, 1998, 85(5): 616-628.
- [4] 童亚丽,张兰珍,付慧慧,等. 高山杜鹃的组培技术[J]. 中国花卉园艺,2009(18):27-29.
- [5] 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.
- [6] 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):12-14.
- [7] 范玉清. 杜鹃叶愈伤组织的培养与不定芽的形成[J]. 晋东南师范专科学校学报,2000(3):8-10.
- [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(B9):19-21.
- [9] 周艳,高贵龙,邹天才,等. 马缨杜鹃组织培养中抗褐技术研究[J]. 北方园艺,2010(7):141-142.
- [10] 杨丽娟,马立军,秦树林,等. 迎红杜鹃组培繁殖技术的研究[J]. 吉林农业大学学报,2010,32(2):172-176.

Study on the Callus Induction and Multiplication of *Rhododendron siderophyllum*

ZHOU Min<sup>1</sup>, LONG Xiu-qin<sup>2</sup>, LIU Yan<sup>3</sup>

(1. Zunyi Medical and Pharmaceutical College, Zunyi, Guizhou 563000; 2. Guizhou Research Center of Karst Resource Environment and Development, Guiyang, Guizhou 550001; 3. Guizhou Institutes of Biology, Guiyang, Guizhou 550009)

**Abstract:** Taking cotyledon and hypocotyl of seed of *Rhododendron siderophyllum* as experiment material, the several key factors on callus induction and multiplication of *Rhododendron siderophyllum* in tissue culture were studied. The results showed that MS medium was suitable for induction and multiplication of callus. The concentrations of TDZ and NAA had a strong influence on callus induction. The MS medium supplemented with TDZ 0.50 mg/L and NAA 0.05 mg/L had high induction effect, and the induction rate was 77.78%. The MS medium supplemented with TDZ 0.10 mg/L and NAA 0.05 mg/L was suitable for callus multiplication, the multiplication rate could reach 96.67%, the multiplication ratio was 4.50. In order to keep callus multiplication more and more, the callus needed to transfer medium again and again. The ideal time for transferring medium was 40 days, so that it could avoid browning of callus.

**Keywords:** *Rhododendron siderophyllum*; callus; induction; multiplication