

# 杜鹃杂交种子无菌萌发与组培快繁研究

尹杨萍, 杨颖颖, 关文灵\*, 何长春

云南农业大学园林园艺学院, 云南 昆明

Email: 506526661@qq.com, \*gwenling2008@sina.com

收稿日期: 2021年4月25日; 录用日期: 2021年5月13日; 发布日期: 2021年5月26日

## 摘要

本研究以比利时杜鹃“西玛”(母本)与滇南杜鹃(父本)的杂交种子为试验材料, 筛选种子无菌萌发与组培快繁的最佳方案, 建立杜鹃杂交后代的组培快繁体系。结果表明: 杂交种子无菌萌发最佳的杀菌方式是2.0% NaClO处理20 min, 其污染率为0, 萌发率为49.00%; 种子萌发的最佳基础培养基为1/4 WPM培养基, 萌发率为44.25%; 增殖培养基最佳配方为: 1/4 WPM + 30 g/L蔗糖 + 9 g/L琼脂 + 1.0 mg/L ZT + 0.5 mg/L NAA, 诱导率为100.00%, 增殖系数3.25; 比较生根培养基最佳配方为: 1/4 WPM + 30 g/L蔗糖 + 9 g/L琼脂 + 0.5 mg/LIBA + 1.0 g/L碳粉, 生根率为66.67%, 单株根数为4.80, 平均根长为2.68 cm, 生根速度快; 生根小苗炼苗移栽后成活率达96.10%。

## 关键词

比利时杜鹃, 滇南杜鹃, 无菌播种, 组培快繁

# Study on Aseptic Germination and Tissue Culture Rapid Propagation of Hybrid Seeds of Rhododendron

Yangping Yin, Yingying Yang, Wenling Guan\*, Changchun He

College of Horticulture and Landscape, Yunnan Agricultural University, Kunming Yunnan

Email: 506526661@qq.com, \*gwenling2008@sina.com

Received: Apr. 25<sup>th</sup>, 2021; accepted: May 13<sup>th</sup>, 2021; published: May 26<sup>th</sup>, 2021

## Abstract

In this study, the hybrid seeds of *Rhododendron hybrida* "Sima" (female parent) and *Rhododendron*

\*通讯作者。

*hancockii* (male parent) were used as experimental materials to select the optimal scheme of aseptical germination of seeds and tissue culture rapid propagation, so as to establish a tissue culture and rapid propagation system for the hybrid offspring of *Rhododendron*. The results showed that the best germicidal method was 2.0% NaClO treatment for 20 min, the contamination rate was 0, and the seed germination rate was 49.00%. The optimal basal medium for seed germination was 1/4 WPM medium, and the germination rate was 44.25%. The optimal formulation of proliferation medium was as follows: 1/4 WPM + 30 g/L sucrose + 9 g/L AGAR + 1.0 mg/L ZT + 0.5 mg/L NAA, the induction rate was 100.00%, the multiplication coefficient was 3.25; the optimal rooting medium was 1/4 WPM + 30 g/L sucrose + 9 g/L AGAR + 0.5 mg/LIBA + 1.0 g/L toner. The rooting rate was 66.67%, the number of roots per plant was 4.80, the average root length was 2.68 cm, and the rooting speed was fast. The survival rate of the rooting seedlings was 96.10% after acclimatization and transplantation.

## Keywords

*Rhododendron hybridum*, *Rhododendron hancockii*, Sterile Sow, Tissue Culture Rapid Propagation

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

杜鹃花为杜鹃花科(Ericaceae)杜鹃花属(*Rhododendron*)的著名木本观赏植物。近年来国内年宵花市场中杜鹃的火爆销售以及各类杜鹃花主题展的举办都表明杜鹃作为观赏植物越来越受到人们的重视[1]。我国拥有丰富的杜鹃花资源,但常见的栽培杜鹃种类和品种很少,园艺栽培总数不及400种[2][3],且目前杜鹃花市场上流通的品种数量不足20个,这与丰富的园艺栽培资源保存数量相比相距甚远[4]。在利用现有技术进行杜鹃的杂交育种时,大量学者将注意力集中在亲本的选配及合子胚形成前期的相关研究,但是对于后期杂交种子的培育缺乏系统研究,一定程度上制约了杜鹃远缘杂交的成效。近年来,国内外学者对野生杜鹃花种子展开了大量的研究,然而针对杜鹃的杂交种子萌发研究并不多[5]。杜鹃苗生长缓慢,杂交后代往往存在选育周期过长,杂交种子萌发率低、成苗弱、生根不良的问题,极大影响了新品种选育的速率。因此,可通过利用杂交种子进行无菌播种,探究其最佳萌发条件及无菌苗组培快繁体系,以此实现杜鹃花新种质的高效快速的培养,为成功获得目标杂交后代提供技术路径。

比利时杜鹃(*Rhododendron hybrida*)属于杜鹃花科(Ericaceae)杜鹃花属(*Rhododendron* L.)常绿灌木,最早由比利时园艺学家杂交选育而成,尤以比利时繁殖、栽培和输出最多,因此得名比利时杜鹃[6]。国内的比利时杜鹃也泛指近些年新引进的早花型西洋杜鹃,其株形矮壮,具有花期长、花型美、花色多的特点[7],是占有花卉市场很大份额的品种。但比利时杜鹃存在严重的退化现象,其适应性及抗病抗虫能力较差,在栽培后期容易出现观赏性不佳的情况[8]。滇南杜鹃(*R. hancockii*)同属杜鹃花属植物,在云南广泛分布,其株型紧凑,花大而密集且极具芳香,是很好的杜鹃杂交亲本材料。将本土野生滇南杜鹃与比利时杜鹃进行杂交并选育后代,以此改良比利时杜鹃的遗传性状,获得观赏性及适应性俱佳的优质杂交后代。

本研究以比利时杜鹃“西玛”(*R. hybridum* “Sima”)为母本与父本滇南杜鹃进行杂交,将获得的杂交种子进行无菌萌发与组培快繁的试验,探究杀菌方式及各培养阶段的最佳培养基配方,建立杜鹃杂交种子的无菌培养及快速繁殖体系,为缩短选育周期以及成功获得优质杂交后代提供技术支持。

## 2. 材料及方法

### 2.1. 试验材料

本试验无菌培养所用杂交种子以滇南杜鹃为父本，比利时杜鹃品种“西玛”(*R. hybridum* “Sima”)为母本杂交所得。于2019年10月采自云南农业大学园林园艺学院苗圃，干燥后收集于自封袋内，4℃保存。试验前将种子装入无纺布滤渣袋中浸于0.1%的GA<sub>3</sub>中24 h。

### 2.2. 试验方法

#### 2.2.1. 田间杂交授粉

杂交试验于2018年6月至次年3月于云南农业大学园林园艺学院大棚内进行。父本滇南杜鹃花粉贮藏于4℃冰箱，待母本比利时杜鹃品种“西玛”(*R. hybridum* “Sima”)花朵全开，柱头粘液分泌较多时进行常规授粉。每日授粉时间为上午10:00~11:00，至少重复50朵花，待蒴果变黄开裂前采收，置于室温下自然开裂后剥出种子。

#### 2.2.2. 种子杀菌处理方式

以NaClO为杀菌剂设计双因子实验，采用1.5%和2.0%两个浓度，10 min、15 min、20 min三个时长组合处理，共6个处理组合(表1)。将种子在75%的酒精中浸泡30s后冲洗3~4次，随后用NaClO以不同方式灭菌，灭菌期间持续震荡，保证种子与杀菌剂充分接触，无菌水冲洗5~6遍，用滤纸吸干水分。以WPM为培养基接种，接种时将种子均匀撒于培养基上。每瓶接50粒种子，每个处理重复4次，15 d后统计污染率及萌发率，根据结果得出最佳灭菌方式。

$$\text{污染率} = \text{污染种子数} / \text{接种种子数} \times 100\%$$

$$\text{萌发率} = \text{萌发种子数} / \text{接种种子数} \times 100\%$$

#### 2.2.3. 种子萌发培养基

将杂交种子以得出的最佳灭菌方式处理，接种于WPM、1/2 WPM、1/4 WPM三种培养基中，每瓶接50粒种子，重复4次，30 d后进行萌发率统计，60 d后进行存活率统计及生长状况观察，得出最适萌发培养基。

$$\text{存活率} = \text{存活苗数} / \text{萌发种子数} \times 100\%$$

#### 2.2.4. 增殖培养基

以1/4 WPM为基本培养基，添加不同浓度的NAA(0.01、0.5、1.0 mg/L)、ZT(2.0、1.0 mg/L)激素，共6个配方(表1)。以杂交种子萌发出来的无菌苗为材料接种，每种激素配方接3瓶，每瓶接5株，重复3次。60 d后观察杜鹃小苗增殖及生长状况，统计增殖系数。

$$\text{增殖系数} = \text{增殖芽数} / \text{小苗接种棵数}$$

#### 2.2.5. 生根培养及炼苗移栽

以1/4 WPM为基本培养基，添加不同浓度的IBA(0.5、1.0、2.0 mg/L)，NAA(0、0.1、0.2 mg/L)激素，共9个配方(表1)。选取生长健康的增殖苗，在超净工作台中切下茎段接种至生根培养基中。每个配方接2瓶，每瓶5株，重复3次。60 d后观察统计组培苗生根率、根数、根长。

$$\text{生根率} = \text{生根苗数} / \text{小苗接种棵数} \times 100\%$$

将生根苗移到培养室外打开瓶盖放置3 d进行炼苗，随后将杜鹃苗根部培养基清洗干净，移栽至草炭土：椰糠比例为4:1的基质中，覆膜保湿于室内培养30 d后观察成活率。

**Table 1.** Sterilization methods, proliferative culture and rooting culture medium formula**表 1.** 灭菌方式、增殖培养及生根培养的培养基配方

处理方式	浓度	灭菌时长	培养基编号	ZT	NAA	培养基编号	IBA	NAA
	(%)	(min)		(mg/L)			(mg/L)	
M1	1.5	10	Z1	2.0	0.01	S1	0.5	0
M2	1.5	15	Z2	2.0	0.50	S2	0.5	0.1
M3	1.5	20	Z3	2.0	1.00	S3	0.5	0.2
M4	2.0	10	Z4	1.0	0.01	S4	1.0	0
M5	2.0	15	Z5	1.0	0.50	S5	1.0	0.1
M6	2.0	20	Z6	1.0	1.00	S6	1.0	0.2
						S7	2.0	0
						S8	2.0	0.1
						S9	2.0	0.2

### 2.3. 培养条件

培养室温度 25℃, 光照强度 2000 lx, 光照时长 12 h。每瓶培养基约 30 mL, 添加 30 g/L 蔗糖及 9 g/L 琼脂, pH 调节至 5.4, 生根培养基中额外添加 1 g/mL 碳粉。所有培养基用蒸汽高压灭菌锅 121℃ 下灭菌 30 min 备用。

### 2.4. 数据分析

采用 EXCEL 对试验数据进行常规统计及整理, 利用 SPSS 进行方差分析和多重比较, 显著性水平为 0.05。

## 3. 结果与分析

### 3.1. 不同杀菌方式对种子污染率及萌发率的影响

由表 2 可见, 在污染率方面, 杀菌方式中除了 M1 的污染率为 1.5%, 其余方式杀菌后污染率均为 0。在萌发率方面, 在相同浓度 NaClO 杀菌处理时, 种子的萌发率随杀菌时间的延长而升高; 在不同浓度 NaClO 杀菌处理中, 总体上以 2.0% NaClO 杀菌的种子萌发率比 1.5% NaClO 杀菌后相较更高。在杀菌处理后, 种子的萌发率一定程度上代表着种子活力, 由此可得出杀菌方式 M6 (2.0% NaClO 处理 20 min) 最佳。

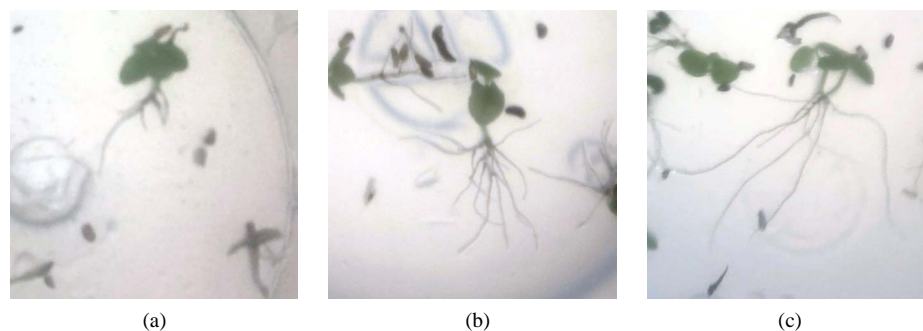
**Table 2.** Contamination rate and germination rate of seeds under different sterilization methods**表 2.** 不同杀菌方式下种子的污染率及萌发率

编号	浓度(%)	时间(min)	污染率(%)	萌发率(%)
M1	1.5	10	1.5	37.33 ± 2.40b
M2	1.5	15	0	40.00 ± 2.16ab
M3	1.5	20	0	45.50 ± 3.30ab
M4	2.0	10	0	38.50 ± 3.86ab
M5	2.0	15	0	43.00 ± 2.083ab
M6	2.0	20	0	49.00 ± 3.32a

注: 同列不同的小写字母表示在 0.05 水平上差异显著, 下同。

### 3.2. 种子萌发培养基

杂交种子在不同萌发培养基中的萌发情况由图 1 和表 3 所示, 杂交种子在 3 种培养基上均可萌发。相较之下, 1/4 WPM 培养基萌发率(44.25%)高于 1/2 WPM (37.50%)和 WPM (34.00%), 60 d 后, 杂交小苗的存活率依旧是 1/4 WPM 培养基为最高(75.16%)且根长为最长。由此可得, 1/4 WPM 培养基能促进杂交种子萌发, 能保持较高存活率且促进根的生长, 为杜鹃杂交种子最佳萌发培养基。



**Figure 1.** Growth of hybrid seeds in different media: (a) WPM; (b) 1/2 WPM; (c) 1/4 WPM  
**图 1.** 杂交种子在不同培养基中的生长状况: (a) WPM; (b) 1/2 WPM; (c) 1/4 WPM

**Table 3.** Germination of hybrid seeds in different media

**表 3.** 杂交种子在不同培养基中的萌发情况

培养基	萌发率(30 d) (%)	存活率(60 d) (%)	根长(mm)
WPM	34.00 ± 2.71b	66.16 ± 7.62	<7
1/2 WPM	37.50 ± 3.40ab	63.21 ± 6.03	7~10
1/4 WPM	44.25 ± 2.02a	75.16 ± 2.96	>10

### 3.3. 增殖培养基

无菌萌发的杜鹃杂交小苗在不同增殖配方培养基下约 20 d 左右开始形成丛生芽, 增殖情况由表 4 所示, 不同激素浓度组合的培养基对杜鹃杂交小苗的增殖效果差异显著。其中 Z3 培养基内杂交苗增殖系数最低, 苗瘦弱且叶色淡, 生长状况为最差, Z5 培养基诱导率为 100.00%, 增值系数是 3.25 为最大, 苗生长健壮且叶色浓。由此说明 Z5 (1/4WPM + 30 g/L 蔗糖 + 9 g/L 琼脂 + 1.0 mg/L ZT + 0.5 mg/L NAA)为杂交杜鹃苗最佳增殖培养基。

**Table 4.** Effects of different hormone ratios on the proliferation of Rhododendron hybrid seedlings

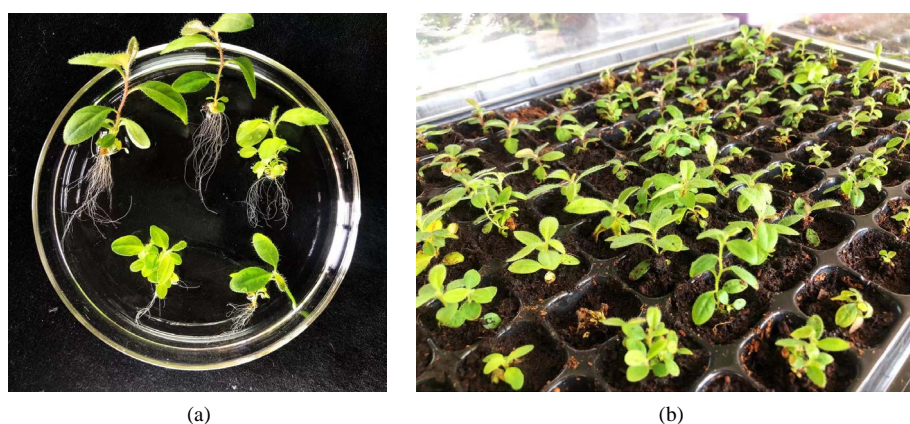
**表 4.** 不同激素对比对杜鹃杂交小苗的增殖影响

编号	ZT (mg/L)	NAA (mg/L)	诱导率(%)	增值系数	生长状况
Z1	2.0	0.01	72.22 ± 8.46b	2.42 ± 0.12bc	长势较弱, 叶小且色淡
Z2	2.0	0.50	87.5 ± 3.66ab	2.31 ± 0.26bc	长势较弱, 叶小且色淡
Z3	2.0	1.00	86.48 ± 3.45ab	1.90 ± 0.21c	长势弱, 苗小, 叶色较淡
Z4	1.0	0.01	79.79 ± 3.86b	2.73 ± 0.11ab	长势良好, 苗大, 叶色绿
Z5	1.0	0.50	100.00a	3.25 ± 0.31a	长势良好, 苗粗大, 叶色绿
Z6	1.0	1.00	72.92 ± 4.14b	2.61 ± 0.25abc	长势一般, 叶色较淡

### 3.4. 生根培养及炼苗移栽

杜鹃杂交无菌苗的生根培养在约 15 d 后小苗基部开始有白色须根冒出。生根情况见表 5 所示, 无菌苗整体生长状况差别不大, 但随着 NAA 的浓度提高, 生根率相应降低, 生根率高的培养基有 S1、S4、S7, 随即得出适合杜鹃杂交苗的生根培养基为 1/4 WPM + 30 g/L 蔗糖 + 9 g/L 琼脂 + 0.5 - 2.0 mg/LIBA + 1.0 g/L 碳粉。对比 S1、S4、S7 这 3 个培养基, 单株根数最高的为 S1 (4.80)且生根速度快, 综合比较 S1 (1/4 WPM + 30 g/L 蔗糖 + 9 g/L 琼脂 + 0.5 mg/LIBA + 1.0 g/L 碳粉)为最佳生根培养基生根情况如图 2 所示。

将生根小苗进行炼苗后移栽至草炭土:细椰糠(4:1)的基质中, 30 d 后小苗生长健壮, 成活率达 96.10%, 生长情况如图 2 所示。



**Figure 2.** Rooted seedlings and transplanted to survive. (a) Rooted seedlings of hybrid progeny; (b) Growth status 30 days after transplantation

**图 2.** 生根小苗及移栽成活。(a) 杂交后代生根小苗; (b) 移栽后 30 d 生长状况

**Table 5.** Effects of different hormone ratios on rooting of hybrid rhododendron seedlings

**表 5.** 不同激素对比对杜鹃杂交苗生根的影响

编号	IBA (mg/L)	NAA (mg/L)	生根率(%)	单株根数	平均根长(cm)	生根速度
S1	0.5	0	66.67 ± 15.20	4.80 ± 2.68	2.68 ± 0.43abc	生根快
S2	0.5	0.1	60.00 ± 10.33	3.80 ± 1.10	3.28 ± 0.26abc	生根快
S3	0.5	0.2	43.33 ± 12.02	4.80 ± 1.92	3.82 ± 0.53a	生根快
S4	1.0	0	70.00 ± 12.38	2.60 ± 1.52	2.56 ± 0.61abc	生根慢
S5	1.0	0.1	63.33 ± 10.85	4.80 ± 3.11	2.06 ± 0.40bc	生根快
S6	1.0	0.2	53.33 ± 8.43	2.00 ± 0.71	1.96 ± 0.45c	生根慢
S7	2.0	0	66.67 ± 8.43	3.60 ± 2.07	3.18 ± 0.38abc	生根慢
S8	2.0	0.1	53.33 ± 16.87	4.00 ± 1.87	3.74 ± 0.66ab	生根快
S9	2.0	0.2	51.67 ± 15.15	3.20 ± 2.49	3.70 ± 0.36ab	生根快

## 4. 结论与讨论

### 4.1. 杀菌方式

能否有效控制污染是杜鹃杂交种子无菌播种成功与否的关键因素, 杜鹃杂交种子极为细小, 所以在

杀菌时一般将种子包裹后统一进行杀菌。试验选择了透水性强且无孔隙的无纺布滤渣袋，再配以持续不断的摇晃，就能保证种子无遗漏且能和杀菌剂全面接触，在杀菌剂发挥效用的前提下能最大限度地降低种子的污染率。本试验结果发现仅有 1.5% NaClO 处理 10 min 有污染，提高浓度或加长杀菌时间后均无污染，且通过种子萌发率可见萌发率随着 NaClO 的浓度升高以及杀菌时间的延长有提高的趋势，说明 NaClO 的强漂白性可增加种皮的透光能力从而促进种子萌发，与前人研究结果一致[9]。试验最终结论为杜鹃杂交种子最佳的杀菌方式是 2.0% NaClO 处理 20 min。

#### 4.2. 培养基与激素配比

基础培养基为植物组织的培养提供基础物质和能源，但是不同的杜鹃所适用的基础培养基各不相同，本试验中经过比较 WPM、1/2 WPM、1/4 WPM 对杂交种子的生长情况中发现显著差异，其中 1/4 WPM 的萌发率为最高，根长最长，为杂交种子的最佳基础培养基，此外，在统计存活率时发现死亡的几乎全是白化小苗，但还是有极少数白化苗能继续存活。在增值培养中以 ZT 和 NAA 不同浓度组合进行杂交小苗的增值试验，发现 1.0 mg/L ZT + 0.5 mg/L NAA 为最佳组合，诱导率达到了 100%，增值系数最大，为 3.25，以此培养基进行增值二代培养，观察到白化小苗有新叶转绿的现象。在生根培养中以 IBA 和 NAA 进行不同浓度搭配的培养，发现 IBA 对小苗的生根影响要大于 NAA，而通过生根率、单株根数和平均根长综合考虑认为最佳激素配方为 0.5 mg/L IBA 且不添加 NAA，在此配方下虽根长偏短，生根率也略低于浓度 1.0 mg/L，但是单株根数高且生根速度最快，考虑到组培苗的生产时间成本，应选其为最佳生根激素配方。结论为杜鹃杂交种子萌发效果最佳为 1/4 WPM 培养基；无菌小苗增值培养基最佳配方为：1/4 WPM + 30 g/L 蔗糖 + 9 g/L 琼脂 + 1.0 mg/L ZT + 0.5 mg/L NAA；综合比较生根培养基最佳配方为：1/4 WPM + 30 g/L 蔗糖 + 9 g/L 琼脂 + 0.5 mg/L IBA + 1.0 g/L 碳粉。

#### 4.3. 炼苗移栽

杂交小苗无菌培养出健壮根系后需进行炼苗移栽，在配制基质的时候要保证有良好通透性，若土壤中空气不足会导致杜鹃杂交小苗的生长发育不良。本试验中基质采用草炭土:细椰糠(4:1)，可保持良好的透气性，移栽 30 d 后存活率高达 96.10%。

#### 参考文献

- [1] 常宇航, 田晓玲, 张长芹, 等. 中国杜鹃花品种分类问题与思考[J]. 世界林业研究, 2020, 33(1): 63-68.
- [2] 兰熙, 张乐华, 张金政, 等. 杜鹃花属植物育种研究进展[J]. 园艺学报. 2012, 39(9): 1829-1838.
- [3] 刘晓青, 苏家乐, 李畅, 等. 我国杜鹃花产业发展的瓶颈及对策[J]. 江苏农业科学. 2011, 39(3): 14-16.
- [4] 李畅, 苏家乐, 刘晓青, 等. 杜鹃花不同品种的观赏性和耐旱性比较[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(22): 138-142.
- [5] 王伟, 何仲坚, 倪建中, 等. 杜鹃花品种(种)间杂交亲和性及其杂交种子萌发研究[J]. 亚热带植物科学, 2017, 046(4): 335-338.
- [6] 黄茂如. 杜鹃花[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998.
- [7] 余克菊. 盆栽西洋杜鹃花后的管理技术[J]. 江西园艺, 2001, 2(2): 36-36.
- [8] 李叶芳, 尹杨萍, 杜娟, 等. 比利时杜鹃与几种野生杜鹃杂交亲和性研究[J]. 西南林业大学学报(自然科学), 2019, 39(5): 177-181.
- [9] 张茂林, 樊金会. 杜鹃花种子休眠打破技术的研究[J]. 山东林业科技. 2011, 41(1): 19-22.