

# 滇南杜鹃的无菌播种与快繁研究

黄向群<sup>1</sup>, 宋杰<sup>2</sup>, 关文灵<sup>3</sup>, 李济倩<sup>3</sup>, 李叶芳<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>香格里拉市住房和城乡建设局园林绿化管理局, 云南 香格里拉

<sup>2</sup>云南省农业科学院花卉研究所, 云南 昆明

<sup>3</sup>云南农业大学园林园艺学院, 云南 昆明

收稿日期: 2022年1月5日; 录用日期: 2022年2月25日; 发布日期: 2022年3月4日

## 摘要

本实验以野生滇南杜鹃种子为试验材料, 通过组培的方法探究滇南杜鹃种子无菌播种与快繁技术体系。结果表明: 最佳消毒方法为: 70%酒精浸泡30 s + 0.1%升汞浸泡3 min (2次), 然后接种于WPM + 4 mg/L ZT + 0.01 mg/L NAA培养基中, 滇南杜鹃种子萌发率为76.67%、污染率16.67%。诱导不定芽的最佳培养是WPM + 2 mg/L ZT + 0.01 mg/L NAA, 30 d后每株平均分化芽数为2.92, 苗叶色深绿, 枝条粗壮, 丛生芽增多。较好的生根培养基是WPM + 1 mg/L NAA + 1 mg/L IBA, 30 d统计生根率为57%, 平均生根数是3.21, 根长势最好, 形态正常、生长整齐。研究结果为滇南杜鹃的扩大繁殖和资源保护提供了参考。

## 关键词

滇南杜鹃, 组织培养, 快繁, 无菌萌发, 种子

# Sterile Sowing and Rapid Propagation of *Rhododendron hancockii* Hemsl

Xiangqun Huang<sup>1</sup>, Jie Song<sup>2</sup>, Wenling Guan<sup>3</sup>, Jiqian Li<sup>3</sup>, Yefang Li<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Landscaping Bureau, Housing and Urban-Rural Development Bureau of Shangri-la City, Shangri-la Yunnan

<sup>2</sup>Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming Yunnan

<sup>3</sup>College of Landscape and Horticultural, Yunnan Agricultural University, Kunming Yunnan

Received: Jan. 5<sup>th</sup>, 2022; accepted: Feb. 25<sup>th</sup>, 2022; published: Mar. 4<sup>th</sup>, 2022

## Abstract

In this experiment, the technique system of aseptic seeding and rapid propagation of wild *Rhodo-*

\*通讯作者。

文章引用: 黄向群, 宋杰, 关文灵, 李济倩, 李叶芳. 滇南杜鹃的无菌播种与快繁研究[J]. 植物学研究, 2022, 11(2): 97-102. DOI: 10.12677/br.2022.112013

*dendron hancockii* Hemsl. seeds was studied by tissue culture. The results showed that the best disinfection method was: 70% alcohol soaked in 30 s + 0.1% mercury for 3 min (twice); then inoculated in the medium of WPM + 4 mg/L ZT + 0.01 mg/L NAA, the germination rate of *R. hancockii* Hemsl. seeds was 76.67% and the contamination rate was 16.67%. Induction of adventitious buds of the best culture was WPM + 2 mg/L ZT + 0.01 mg/L NAA. After 30 days per plant, average number of bud formation was 2.92; seedling leaf was dark green; cespitose bud increased. The best rooting medium was WPM + 1 mg/L NAA + 1 mg/L IBA, the rooting rate of 30 d was 57%, the average rooting number was 3.21, and the root grew best, and the shape was normal and the growth was regular. The results provide reference for expanding propagation and resource conservation of *Rhododendron hancockii* Hemsl.

## Keywords

*Rhododendron hancockii* Hemsl., Tissue Culture, Rapid Propagation, Aseptic Germination, Seed

Copyright © 2022 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(*Rhododendron* spp.)是我国的十大传统名花之一,也是世界著名的木本观赏植物[1]。滇南杜鹃(*Rhododendron hancockii* Hemsl.)隶属杜鹃花科(Ericaceae)杜鹃花属(*Rhododendron*)马银花亚属(Subgen. *Azaleastrum* Planch),常绿灌木或乔木[2],其花冠白色而具有芳香,枝繁叶茂,新叶红色,具有很强的观赏性[3]。

杜鹃花通常采取扦插繁殖的繁殖方式,但是常绿杜鹃类由于其生根困难,繁殖系数低,同时也受繁殖季节和母株材料的影响,很难进行快速大量繁殖,极大限制了常绿杜鹃的开发与利用[4]。目前杜鹃组织培养处理的外植体有茎尖、带腋芽的幼茎、幼叶、花蕾、种子等[5] [6] [7] [8]。通过植物组织培养技术可以实现部分种类杜鹃的快速繁殖,这对于保护与开发其种质资源具有重要意义。

杜鹃花种子量大,播种繁殖系数高,但幼苗生长缓慢,管理困难,通过无菌播种可以有效缩短杜鹃播种育苗的生长周期。用滇南杜鹃的种子进行无菌播种和快繁研究,可为滇南杜鹃的引种驯化和种质资源保护提供科学依据。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 试验材料

采用野生的滇南杜鹃种子,种子采自云南省玉溪市易门县。

### 2.2. 方法

#### 2.2.1. 种子的杀菌处理

用纱布将滇南杜鹃种子包好,进行消毒:放入70%的酒精消毒后用无菌水冲洗2~3次,用0.1%升汞浸泡后无菌水冲洗3~4遍,再次用0.1%升汞浸泡无菌水冲洗4~5遍,之后将种子接种于初代培养基WPM + 4 mg/L ZT + 0.01 mg/L NAA。每瓶接种10粒种子,接种45瓶,每处理重复3次。接种后观察并记录

不同消毒处理后的萌发率、污染率和死亡率。种子消毒方式详见表 1。

**Table 1.** Different germicidal treatments of seeds  
**表 1.** 种子不同的杀菌处理

处理	酒精消毒时间(s)	0.1%升汞消毒时间(min)	
		第 1 次	第 2 次
1	30 s	0	0
2	30 s	3	3
3	30 s	3	5
4	30 s	5	3
5	30 s	5	5

### 2.2.2. 继代培养基的筛选

取培养至 50~55 d 的滇南杜鹃无菌苗，切去顶芽和基部，留 1~2 cm 长的无菌苗茎段，接种于继代培养基中，每瓶接种 3~4 棵，接种 60 瓶，不定芽的诱导培养基以 WPM 为基本培养基，添加 0.01 mg/L NAA 和不同浓度的 ZT (2.0、4.0、5.0、6.0、7.0 mg/L)，每处理重复 3 次。接种后观察并记录每株分化的芽数和长势。

### 2.2.3. 生根培养基的筛选

取 30~35 d 的继代培养的滇南杜鹃丛生苗，并将带顶芽的芽苗单株切下，然后每棵苗切去基部留 2~3 cm，接种于生根培养基中，每瓶放 4 棵，接种 60 瓶。生根培养基以 WPM 为基本培养基，添加 1 mg/L NAA 和不同浓度的 IBA (0.5、0.7、1.0 mg/L)，每处理重复 3 次。接种后观察并记录苗的生根率和平均生根数。

### 2.2.4. 各指标计算公式

萌发率 = 发芽的种子数/处理种子数 × 100%

死亡率 = 未萌发种子/处理种子数 × 100%

污染率 = 污染种子数/处理种子数 × 100%

生根率 = 生根数/接种苗数 × 100%

### 2.2.5. 培养条件

试验所用培养基均附加 7 g/L 琼脂，30 g/L 蔗糖，pH 值控制在 5.6~5.7。将培养基置于 25℃ 条件下，12 h 光/12 h 暗下培养，光照强度为 3000~4500 lx。

## 3. 结果与分析

### 3.1. 不同杀菌处理的效果

由表 2 可以得出，随着消毒时间增加，滇南杜鹃污染率下降，但同时死亡率增加萌发率降低，说明在种子灭菌处理过程中，升汞长时间的浸泡容易让种子受到毒害而死亡。而短时间的消毒，如处理 1 又难以把种子携带的细菌消毒干净，容易产生污染。

灭菌处理后的种子接种于初代培养基中，培养 40 d 时，处理 2 和处理 3 的滇南杜鹃最先长出了苗，经过 50 d 的培养，发现处理 2 和处理 3 的滇南杜鹃总体长势很好，苗的生长速度较快，叶色浓绿、苗健壮。处理 4 和处理 5 很多苗都不生长，叶片发黄，苗矮小。综合各灭菌处理的效果，得出处理 2 即 70% 酒精浸泡 30 s + 0.1% 升汞浸泡 3 min (两次) 这个处理是最有效的消毒方法，污染率为 16.67%，死亡率为

23.33%，萌发率为 76.67%。

**Table 2.** Effects of different sterilization combinations on seeds

**表 2.** 不同灭菌组合处理对种子的影响

处理	酒精消毒 时间(s)	第一次升汞 消毒时间(min)	第二次升汞 消毒时间(min)	接种个数 (个)	污染率(%)	死亡率(%)	萌发率(%)
1	30 s	0	0	90	100	100	0
2	30 s	3	3	90	16.67	23.33	76.67
3	30 s	3	5	90	13.33	40	60
4	30 s	5	3	90	16.67	73.33	26.67
5	30 s	5	5	90	10	76.67	23.33

### 3.2. 不同激素比对对无菌苗继代增殖的影响

从表 3 可以看出，继代培养的苗，在不添加激素的 WPM 培养基中无生长量，且未发生增殖。在处理 2 条件下无菌苗生长情况最明显，9 d 后开始有绿色的小点突起，14 d 后，切口开始有芽点冒出，30 d 后之前苗上的芽点已经长成独立侧枝，40 d 后苗大多数已长成丛生苗，而且处理 2 普遍芽大，枝条粗壮，枝条多，叶色深绿，并且分化很快也很多，长势很好。与处理 2 相比，其它处理下无菌苗的长势都不好：处理 3 和处理 4 叶色变淡长势变慢。处理 5 和处理 6 玻璃化问题很严重，具体表现为苗的叶和嫩枝呈水晶透明或半透明水渍状，叶片皱缩成纵向卷曲，脆弱易碎。

随着 ZT 的浓度增加，苗的增殖效果减弱，同时出现玻璃化现象。高浓度的 ZT 下的杜鹃枝条少且细小，叶色发黄，组培苗较小，苗的分化变慢，苗的总体生长趋势在下降，而低浓度的成活率高，枝条多且粗壮，叶色深绿，最好的继代培养基是处理 2，即 WPM + 2 mg/L ZT + 0.01 mg/L NAA。

**Table 3.** Effects of different hormone combinations on Subculture and proliferation of aseptic seedlings

**表 3.** 不同激素比对对无菌苗继代增殖的影响

处理	培养基	每株分化的 芽数(个)	生长情况
1	WPM	0	无生长
2	WPM + 2 mg/L ZT + 0.01 mg/L NAA	2.92	芽粗壮，枝条粗壮，枝条数量少，叶色深绿，而且分化很快且多，长势良好。
3	WPM + 4 mg/L ZT + 0.01 mg/L NAA	2.6	芽粗壮，枝条粗壮，枝条数量少，叶色较绿，分化较快且多，长势较好。
4	WPM + 5 mg/L ZT + 0.01 mg/L NAA	2.24	芽粗壮，枝条粗细均匀，枝条数量多，叶色较绿，分化较快且多，有少数玻璃化苗，长势较好。
5	WPM + 6 mg/L ZT + 0.01 mg/L NAA	2.18	芽一般，枝条较细，枝条数量，多叶色是淡绿，分化较其他梯度较慢苗，玻璃化严重，长势缓慢。
6	WPM + 7 mg/L ZT + 0.01 mg/L NAA	2.25	芽比较瘦小，枝条较细，枝条数量多，叶色偏黄，苗玻璃化严重，分化长势缓慢。

### 3.3. 不同激素比对对继代培养苗生根的影响

继代培养得到的苗放进生根培养基中培养 7 d 后，发现大多苗基部开始有少量的愈伤组织出现，苗

的愈伤组织和基部有白色须根最先出现在 IBA 浓度为 0.7 mg/L 和 1 mg/L 的生根培养基中, 30 d 后开始统计生根率。由表 4 可看出, 在不添加任何激素的 WPM 培养基中, 无菌苗不能生根。在相同浓度的 NAA 条件下, 滇南杜鹃的组培苗生根率随着 IBA 浓度增加而上升, 当 IBA 浓度最高为 1 mg/L 时, 生根率也达到最高, 为 57%, 平均生根数为 3.21。得出滇南杜鹃最佳生根培养基是: WPM + 1 mg/L NAA + IBA。

**Table 4.** Effects of different hormone ratios on Rooting of aseptic seedlings

**表 4.** 不同激素对比对无菌苗生根的影响

编号	培养基	接种苗数(棵)	生根率(%)	平均根数(条)
1	WPM	60	0	0
2	WPM + 1 mg/L NAA + 0.5 mg/L IBA	60	37	2.8
3	WPM + 1 mg/L NAA + 0.7 mg/L IBA	60	42	2.85
4	WPM + 1 mg/L NAA + 1 mg/L IBA	60	57	3.21

## 4. 讨论

有效的控制污染是滇南杜鹃无菌播种是否成功的关键技术之一。本试验中采用了 0.1% 的升汞溶液为主要的消毒灭菌剂, 控制其处理的次数为短时间的 2 次, 可以一定程度上避免种子在升汞中长时间的浸泡, 减少升汞对种子的毒害。本试验中: 70% 酒精浸泡 30 s + 0.1% 升汞浸泡 3 min (2 次) 是最适宜的灭菌处理, 这与吴雅文[9]等人对迷人杜鹃种子的灭菌试验中的结果相同。

适宜的 ZT 能提高苗的增殖率, 组培苗芽和枝条都生长粗壮, 叶片颜色为深绿, 但是过高的 ZT 浓度下的滇南杜鹃苗较小, 继代成活率低, 玻璃化严重, 具体表现为苗的叶和嫩枝呈水晶透明或半透明水渍状, 叶片皱缩成纵向卷曲, 脆弱易碎, 分化能力降低, 所以很难成活, 严重影响了组培苗繁殖率。本实验设置了 ZT 的几个浓度梯度对比滇南杜鹃的增殖效果, 发现与云锦杜鹃组培的结果一致[10], 即低浓度的 ZT 有利于杜鹃生长。另外通过试验后减少 ZT 浓度, 发现玻璃化问题得到缓解, 确定玻璃化问题主要来源于细胞分裂素的浓度过高。而且 ZT 费用相对较高, 综合考虑可以适当减少 ZT 用量。

本试验发现在 NAA 浓度(1 mg/L)不变, 而 IBA 浓度在 0~1 mg/L 的范围内时, 滇南杜鹃生根率随 IBA 的浓度增加而增多。但是最高的生根率仅为 57%, 未达到较为理想的生根效果。因此后续实验中, 应加大 IBA 浓度, 以便筛选更好的滇南杜鹃生根培养基。

## 5. 结论

在滇南杜鹃的组织培养过程中, 消毒的药剂的选择、消毒时间的把握、消毒操作都至关重要。滇南杜鹃的最适消毒方法是: 酒精浸泡 30 s + 0.1% 升汞浸泡 3 min (2 次), 滇南杜鹃种子在 WPM + 4 mg/L ZT + 0.01 mg/L NAA 培养基上的萌发率为 76.67%。植物生长调节剂在植物组织培养过程中起到了非常重要的作用, 在一定的激素比例下有助于愈伤组织的诱导, 不定芽和不定根的形成。诱导不定芽的最佳培养基是 WPM + 2 mg/L ZT + 0.01 mg/L NAA, 每株分化的芽数是 2.92。最佳生根培养基是 WPM + 1 mg/L NAA + 1 mg/L IBA, 生根率为 57%, 平均生根数为 3.21。

## 基金项目

本项目得到云南省现代农业花卉苗木产业技术体系建设项目(2017KJTX0010)资助。

## 参考文献

- [1] 张长芹. 杜鹃花[M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2003.

- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 第 57 卷. 北京: 科学出版社, 1980.
- [3] 马诗雨, 杜娟, 李叶芳, 陈鑫, 关文灵. 滇南杜鹃种子萌发特性研究[J]. 种子, 2019, 38(9): 73-76+80.
- [4] 耿芳, 张冬林, 李志辉, 等. IBA 生根剂对卡罗来纳杜鹃插条生根的影响[J]. 华中农业大学学报, 2008(1): 127-130.
- [5] 高文强, 樊金会, 赵红霞, 等. 杜鹃花组培快繁技术的研究[J]. 山东林业科技, 2011, 41(5): 47-49.
- [6] 王蔚琼, 肖建忠, 李志斌, 等. 高山杜鹃花苞组织培养和优化体系的建立[J]. 河北科技师范学院学报, 2012, 26(3): 17-22.
- [7] 资宏, 杨婧瑜, 方林川, 等. 杜鹃远缘杂交后代的无菌培养研究[J]. 湖北农业科学, 2018, 57(22): 90-95.
- [8] 刘晶, 王大勇. 兴安杜鹃愈伤组织培养的研究[J]. 吉林农业, 2016(11): 79.
- [9] 吴雅文, 李枝林, 白天, 等. 迷人杜鹃组培快繁技术的研究[J]. 种子, 2015, 34(3): 112-116.
- [10] 朱春艳, 李志炎, 鲍淳松, 等. 云锦杜鹃组培快繁技术研究[J]. 中国农学通报, 2006(5): 335-337.