

## 大树杜鹃组织培养技术研究

苗永美<sup>1,2</sup>,王永清<sup>1</sup>,庄平<sup>3</sup>,简兴<sup>2</sup>

(1. 四川农业大学 林学院园艺学院,四川 雅安 625014;2. 安徽科技学院 生命科学学院,安徽 凤阳 233100;3. 中科院华西亚高山植物园,四川 都江堰 611830)

**摘要:**选用大树杜鹃试管苗的带芽茎段进行离体培养,通过正交试验设计并结合方差分析、多重比较中选出了大树杜鹃组织培养的最佳培养基配方,建立起了大树杜鹃离体培养体系。结果表明:TDZ 是适合大树杜鹃离体培养的细胞分裂素,带芽茎段增殖培养基为 WPM + TDZO. 40 mg/L + IBA0. 05 mg/L; 壮苗培养为 WPM + TDZO ~ 0. 10mg/L + IBA0. 40mg/L + ACO. 20% 或者 TDZO. 10 ~ 0. 20mg/L + NAA0. 20mg/L + ACO. 20 ~ 0. 40%; 生根培养:WPM + 糖 15g/L + IBA1. 50mg/L + NAA1. 50 mg/L + ACO. 20%。

**关键词:**杜鹃;组织培养;TDZ;活性炭

中图分类号:S685. 21;Q813. 12 文献标识码:A 文章编号:1673 - 8772(2007)06 - 0023 - 04

## Study on Technique of Tissue Culture in *Rhododendron Protisum* Var *Giganteum*

MIAO Yong - mei<sup>1,2</sup>, WANG Yong - qing<sup>1</sup>, ZHUANG Ping<sup>3</sup>, JIAN Xing<sup>2</sup>

(1. College of Forestry and Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;

2. College of Life Science, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China;

3. Western China Sub - alp Arboretum Chinese Academy of Sciences, Dujiangyan 611830, China)

**Abstract:** Using the stem segment with buds as the explant, culture in vitro of *R. protisum* was studied. The best media for *R. protisum* tissue culture were chosen by means of the orthogonal experiment design, analysis of variance and multiple comparisons. So the system of culture in vitro was established. The results were as follows: TDZ was suited for *R. protisum* culture in vitro comparing 6 - BA and KT. The best medium for stem segment with buds propagation was WPM + TDZO. 40 mg/L + IBA0. 05 mg/L; the best strengthening medium was WPM + TDZO ~ 0. 10mg/L + IBA0. 40mg/L + ACO. 20% or TDZO. 10 ~ 0. 20mg/L + NAA0. 20mg/L + ACO. 20 ~ 0. 40%; the best medium for rooting was WPM + sugar15g/L + IBA1. 50mg/L + NAA1. 50 mg/L + ACO. 20%。

**Key words:** *Rhododendron*; Tissue culture; Thidiazuron; Activated carbon

大树杜鹃(*Rhododendron. protisum* var *giganteum*)是一种常绿杜鹃原种,是世界上最高大的杜鹃树,高达25m,号称“杜鹃之王”,这种杜鹃分布区域比较窄,仅在云南、西藏的某些地区有所发现<sup>[1]</sup>,非常珍贵且观赏价值极高,现面临濒危,已被列入《中国植物红皮书》。大树杜鹃种子较小,发芽条件要求高,靠播种繁殖很难达到挽救珍贵植物资源的目的<sup>[2]</sup>,通过植物组织培养技术可以实现大树杜鹃的快速繁殖。因此本研究对大树杜鹃进行离体培养,建立其植株再生体系,对保护名贵杜鹃的种质资源具有重要意义。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

大树杜鹃的种子(由华西亚高山植物园的工作人员从云南腾冲采回)无菌条件下发芽得到试管苗,然

收稿日期:2007 - 07 - 25

作者简介:苗永美(1976 - ),女,山东省临沂市人,硕士,讲师,主要从事林木、园林植物、观赏花卉、中药材等生物技术研究。

后将试管苗截成带单芽茎段,并进行离体培养研究。

## 1.2 试验方法

1.2.1 材料的消毒 种子先用无菌水浸泡2h,再用0.1%升汞消毒20min,无菌水洗4~5次,然后用滤纸吸于表面水分,接种培养。

1.2.2 培养方法 (1)种子接种在Read + 1mg/LGA<sub>3</sub>培养基上,无菌发芽得试管苗。

(2)试管苗截成带单芽茎段后接种到Read培养基附加不同浓度的6-BA、KT、TDZ和NAA,筛选出最佳细胞分裂素。

(3)带芽茎段培养的两组设计方案均用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交表设计。因素一为培养基,水平有改良MS、Read、WPM三种培养基;因素二为TDZ,设置0.20mg/L、0.30mg/L、0.40mg/L三个浓度水平;因素三为IBA或NAA,设置0.01mg/L、0.05mg/L、0.10mg/L三个浓度水平。(4)壮苗培养用WPM培养基,两种设计方案均用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交表。因素一为TDZ,水平有0mg/L、0.10mg/L、0.20mg/L三个浓度;因素二为IBA或NAA,分别设置0.10mg/L、0.20mg/L、0.40mg/L三个浓度水平;因素三为活性炭AC,设置1.0g/L、2.0g/L、4.0g/L三个水平。(5)生根培养用WPM培养基,设计方案均用L<sub>16</sub>(4<sup>3</sup>)正交表。因素一为蔗糖,水平有10g/L、15g/L、20g/L、30g/L四个浓度;因素二分别为IBA和NAA,都设置0.25mg/L、0.50mg/L、1.00mg/L、1.50mg/L四个浓度水平;因素四为活性炭AC,四水平分别是0、2.0g/L、4.0g/L、6.0g/L。

以上培养基添加琼脂粉5g/L,除生根培养外,其它培养均附加蔗糖30g/L,每处理接种材料40个左右,重复3次。

1.2.3 培养条件 培养温度为(25±2)℃,每天光照12h,光照强度2000lx±。将每个处理的3次重复试验结果用SPSS for windows 11.0分析软件,进行方差分析和多重比较。

## 1.3 移栽

将根系发育好的试管苗取出,用清水洗掉根上的琼脂,移栽到装有丰富有机质林下土的营养钵中,浇透水后置于温、湿条件适宜的温室中。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同细胞分裂素对大树杜鹃生长的影响

表1 不同细胞分裂素对大树杜鹃生长的影响

Table 1 Effect of different cytokinin on the growth of *R. protisum*

激素组合	长势及增殖
Read + 6-BA2.00 + NAA0.05	苗弱,叶黄,有的死亡,未增殖
Read + KT2.00 + NAA0.05	只进行少量伸长生长
Read + 6-BA1.00 + KT1.00 + NAA0.05	苗弱,叶黄,未增殖
Read + TDZ0.20 + NAA0.05	大部分腋芽萌发,长势正常

注:激素单位均为mg/L(下同)

在培养中发现,大树杜鹃的芽苗在含不同细胞分裂素的培养基上表现不同。在含6-BA的培养基上芽苗长势弱,有死亡迹象,未增殖;在含KT的培养基上,腋芽没有萌发,只进行了少量伸长生长。说明6-BA和KT两种细胞分裂素不适合大树杜鹃的离体繁殖,而在含TDZ的培养基上,大部分腋芽萌发,大树杜鹃有了一定的增殖。由此看出TDZ是大树杜鹃离体培养的最佳细胞分裂素,所以在下面的培养中选用TDZ细胞分裂素。

### 2.2 带芽茎段的增殖培养

培养一周时,发现有的处理顶芽萌动、腋芽萌发,有的处理基部开始膨大,但是有的处理出现死亡;20d左右腋芽及膨大的基部逐渐分化出不定芽。将三因素各个水平对杜鹃增殖倍数和平均分化芽数列于表2。在改良MS培养基上,材料生长不好,甚至有的死亡,Read和WPM培养基都较适合大树杜鹃的生长与增殖,且两者之间无明显差异。IBA是影响大树杜鹃增殖的显著因素,而NAA则不是显著因素。不论在哪个水平上,IBA的增殖倍数比NAA的都要高,说明IBA比NAA更适合大树杜鹃的增殖培养,当IBA0.01

~0.05mg/L时,有利于更多的芽发生增殖。在 TDZ - IBA 组合中,随 TDZ 浓度的升高,所考察的两个指标都明显提高,当 TDZ 是 0.40mg/L 时,达到最大,且与其它两个水平之间存在显著差异。

表2 增殖培养中的三因素多重比较

Table 2 Multiple comparisons of factors in propagation culture

因素	水平	增殖倍数	平均株分化芽数	因素	水平	增殖倍数	平均株分化芽数
培	改良 MS	1.09 Bc	0.78 Bb	培	改良 MS	1.18 Bb	0.89Bb
养	Read	2.27 Ab	2.07 Aa	养	Read	1.67 Aa	1.46 ABa
基	WPM	2.45 Aa	2.14 Aa	基	WPM	1.88 Aa	1.94 Aa
	0.20	1.48 Cc	1.24 Bb		0.20	1.27 Bb	0.89 Bb
TDZ	0.30	1.71 Bb	1.56 ABb	TDZ	0.30	1.76 Aa	1.85Aa
	0.40	2.62 Aa	2.19 Aa		0.40	1.70Aa	1.56 ABa
	0.01	2.04 Aa	1.48 b		0.01	1.42	1.15
IBA	0.05	1.96 ABab	1.42 b	NAA	0.05	1.66	1.54
	0.10	1.80 Bb	2.09 a		0.10	1.64	1.61

注:邓肯氏新复极差检验,大小写字母分别表示在 0.01、0.05 水平上存在显著差异(下同)

### 2.3 壮苗培养

在 TDZ - IBA 组合中,过高浓度的 TDZ 不利于大树杜鹃新叶的展开,不加或加入低浓度的 TDZ,有利于新叶展开。随着 IBA 浓度升高,新展叶数也增多,而随着 AC 量的增加,新展叶数先增多后减少,这可能与高浓度的 AC 的吸附力太强有关。在 TDZ - NAA 中,随着 TDZ 浓度提高,展叶数也增多,但 2 和 3 水平差异不明显;过低过高浓度的 NAA 不利于苗的生长,NAA0.2mg/L 时最好;0.20% ~ 0.40% AC 比 0.10% 的 AC 对大树杜鹃壮苗效果好。

表3 壮苗培养中的因素多重比较

Table 3 Multiple comparisons of factors in strengthening culture

因素	水平	平均每芽新长出的叶数	因素	水平	平均每芽新长出的叶数
	0.00	1.83 Aa		0.00	1.36 Bb
TDZ	0.10	1.99 Aa	TDZ	0.10	1.92 ABa
	0.20	0.81 Bb		0.20	2.05 Aa
	0.10	0.88 Bc		0.10	1.43 b
IBA	0.20	1.74 Ab	NAA	0.20	2.01 a
	0.40	2.03 Aa		0.40	1.89 a
	0.10%	1.06 Bb		0.10%	1.33 Bb
AC	0.20%	2.40 Aa	AC	0.20%	1.95 Aa
	0.40%	1.17 Bb		0.40%	2.06 Aa

### 2.4 生根培养

35d 统计生根率和平均生根数并将分析结果列于表 4。通过分析发现两种生长素和 AC 是影响大树杜鹃生根的主要因子,蔗糖只影响大树杜鹃的生根率,15g/L 的蔗糖有利于大树杜鹃生根,其它的三个蔗糖浓度对大树杜鹃的生根有抑制作用。大树杜鹃的生根率与平均根数随着 IBA 和 NAA 浓度的升高而升高,IBA4 水平与其它水平之间差异显著,NAA4 水平与 3 水平在生根率方面差异不明显,但高浓度的 NAA 可增加根数。不加 AC 时,大树杜鹃的生根情况也较好,但苗子发黄,长势弱;而过高浓度的 AC 可能由于较强的吸附作用,生根率和根数较低,加 0.20% AC 不仅有利于生根,而且还提高了苗的质量。

### 2.5 移栽

将根系发育好的试管苗取出,用清水洗掉根上的培养基,移栽到装有含丰富有机质林下土的营养钵中,浇透水后置于温、湿条件适宜的温室中,成活率在 80% 以上。

表 4 大树杜鹃生根因素的多重比较

Table 4 Multiple comparisons of factors in rooting

因素	水平	生根率(%)	平均根数
蔗糖	10.00	37.50 b	2.45
	15.00	45.63 a	2.61
	20.00	36.87 b	2.45
	30.00	35.00 b	2.23
IBA	0.25	23.75 Cc	1.60 Cc
	0.50	33.75 BCb	2.23 Bb
	1.00	40.00 Bb	2.41 Bb
	1.50	57.50 Aa	3.50 Aa
NAA	0.25	25.63 Bc	1.91 Cc
	0.50	37.50 Ab	2.46 Bb
	1.00	44.38 Aab	2.49 Bb
	1.50	47.50 Aa	2.88 Aa
AC	0.00	43.13ABb	2.51 Bb
	0.20%	50.63 Aa	3.18 Aa
	0.40%	33.75 BCc	2.13 BCc
	0.60%	27.50 Cc	1.91 Cc

### 3 讨论

选用 Anderson 的改良 MS、Read、WPM 三种基本培养基离体培养大树杜鹃,在 Anderson 的改良 MS 上不仅分化率低,且有的材料出现死亡,分析可能是 Anderson 的改良 MS 中高含量的铁对植物生长不利,同时证实了木本培养基(WPM)是培养这一木本杜鹃的最佳基本培养基。6-BA 是植物组培较常用的一种细胞分裂素,能使大部分植物发生分化获得植株再生,然而对有些植物来说却不合适。Anderson 最早观察到,6-BA 对山杜鹃只能维持较低的嫩茎增殖,并常常表现出毒害<sup>[4]</sup>,在本研究中也出现了同样结果。范玉清认为 TDZ 由于活性较强,是用来培养较顽固的尤其是木本植物的一种较合适的细胞分裂素<sup>[5]</sup>。在本研究的芽苗培养中,发现 2.0mg/LKT 没有使大树杜鹃发生增殖,但是 0.20mg/LTDZ 却能使大树杜鹃发生了较多的增殖,这说明 TDZ 是一种具有较高生物活性的物质,在低质量浓度下具有较强的细胞增殖作用。虽然 TDZ 使大树杜鹃发生较为理想的增殖,但是用 TDZ 增殖出的小苗如果仍放在原来培养基上继续培养,发现小苗不容易长高,这同样在一杜鹃(*R. P. J. M. Hybrids*)叶片不定芽培养<sup>[6]</sup>和香椿腋芽增殖<sup>[7]</sup>中也发现类似现象发生,所以在试验中通过降低 TDZ 或不用 TDZ 并附加一定浓度的 AC 进行壮苗培养。大树杜鹃是一种较难生根的植物,需要较高的生长素才能生根。

#### 参考文献:

- [1] 余树勋. 杜鹃花[M]. 北京:金盾出版社,1992:25-27.
- [2] 李长慧,孙海群,杨元武. 莖蜀杜鹃种子发芽率的研究[J]. 青海大学学报(自然科学版),1998,16(3):15-17.
- [3] 孙振元,徐文忠,刘淑兰. 毛白杜鹃耐碱突变体的离体筛选与鉴定[J]. 中南林学院学报,2003,23(5):53-55.
- [4] Anderson W C. Propagation of Rhododendrons by Tissue Culture; PartI. Development of a Culture Medium for Multiplication of Shoots[J]. Proc. Intl. Plant Prop. Soc,1975,25:129-135.
- [5] 范玉清. 国外杜鹃花组织培养发展概况[J]. 生物学杂志,1996,13(2):30-31.
- [6] Preece. J E, Imel M R. Plant Regeneration from Leaf Explants of Rhododendron "PJM Hybrids" [J]. Scientia Horticulturae, 1991,(48):159-170.
- [7] 张小红,张红燕,武军. TDZ 对香椿愈伤组织诱导及芽增殖生长等的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2002,30(5):35-39.

(责任编辑:李孟良)