

高山杜鹃组培快繁技术研究

刘玉冬, 刘艳军, 杨静慧, 朱文碧, 桂毓 (天津农学院, 天津 300384)

摘要 [目的]为高山杜鹃的快速繁殖提供技术指导。[方法]以高山杜鹃的侧芽为外植体, 先将其在 1/2MS 培养基中预培养 30 d, 再对其进行芽增殖、芽伸长和生根培养, 研究不同激素组合对其芽增殖、芽伸长和生根率的影响。[结果]当分裂素为 6-BA 时, 每芽增殖数较少(最多为 2.1 个), 当分裂素为 KT 时, 芽增殖数随 KT 浓度的增加而增加, 当 KT 为 0.5 mg/L 时, 每芽增殖数最多(4.8 个), 且芽质量较好; 培养基中 KT/IAA 为 1/4 时, 芽最长(平均为 5.1 cm), 且芽较健壮; 当培养基中加入 IAA 时, 每株平均生根数较少(最多为 1.2 条), 当加入 NAA 时, 生根率随 NAA 浓度的增加而增加, 当 NAA 为 2.0 mg/L 时, 每株平均生根数最多(6.2 条)。[结论]高山杜鹃组培苗增殖、芽伸长和生根的最佳培养基分别为 MS + KT 0.5 mg/L + IAA 0.5 mg/L、MS + KT 0.25 mg/L + IAA 1.0 mg/L 和 1/2 MS + NAA 2.0 mg/L。

关键词 高山杜鹃; 培养基; 快繁

中图分类号 S603.6 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)11-04874-02

Study on Technology of Tissue Culture and Rapid Propagation for *Rhododendron lapponicum*

LIU Yu-dong et al (Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384)

Abstract [Objective] The aim was to provide the technical guidance for rapid propagation of *Rhododendron lapponicum*. [Method] With the lateral buds of *R. lapponicum* as the explants, they were pre-cultured on 1/2 MS medium for 30 d and then were cultured for bud propagation, bud elongation and rooting. The effects of different hormone combinations on bud propagation, bud elongation and rooting rate were investigated. [Result] When the mitogen was 6-BA, the propagation number per bud was less (the most was 2.1). When the mitogen was KT, the propagation number per bud was increased with the increase of KT concn, and when KT. was 0.5 mg/L, the propagation number per bud was the most (4.8) with good quality. When the ratio of KT/IAA in medium was 1/4, the bud was the longest (being average of 5.1 cm) and strong. When IAA was added into medium, the rooting number per plant was less (the most was 1.2). When NAA was added, the rooting rate was increased with the increase of NAA concn, and when NAA was 2.0 mg/L, the rooting number per plant was the most (6.2) [Conclusion] The optimal mediums for bud propagation, bud elongation and rooting of *R. lapponicum* were MS + KT 0.5 mg/L + IAA 0.5 mg/L, MS + KT 0.25 mg/L + IAA 1.0 mg/L and 1/2 MS + NAA 2.0 mg/L resp.

Key words *Rhododendron lapponicum*; Medium; Rapid propagation

高山杜鹃 (*Rhododendron lapponicum*) 为杜鹃花科杜鹃属灌木类高档花卉植物, 原产于我国中西部地区的高山密林中, 后由德国、比利时等国引种栽培驯化, 并改良选育出许多优良品种, 其花色有红、粉、紫、黄、白等多种, 艳丽华贵, 深受人们喜爱^[1]。高山杜鹃通常无种子, 主要靠扦插繁殖^[2], 而扦插繁殖受母株材料和繁殖季节的影响, 往往无法满足市场的需要。应用组织培养技术繁育观赏植物, 具有繁殖速度快, 不受季节影响等特点, 对于优良品种的引进和推广具有重要意义。2002~2003 年邓百万等^[3]、王亦非等^[4]分别对西洋杜鹃 (*Rhododendron hybridum*) 的组织培养技术进行了研究, 在基本培养基的筛选等方面取得了一定的进展。

为了进一步利用国外珍贵的高山杜鹃属植物资源, 天津农学院园林植物教研室于 2008 年正式从加拿大引进杜鹃属植物高山杜鹃, 应用组织培养技术对该种花卉进行种苗快繁, 可实现高山杜鹃种苗的规模化生产^[5-6]。笔者旨在通过组织培养技术加快高山杜鹃的生长繁殖速度, 为这一园林植物的推广繁殖提供技术指导。

1 材料与方法

1.1 材料 高山杜鹃, 由天津农学院园艺系园林植物实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 外植体消毒及预培养。将预选好的试验材料(高山杜鹃侧芽)用自来水冲洗 30 min, 在超净工作台上按以下程序进行表面消毒: 70% 酒精浸湿 30 s, 含有有效氯 2.8% 的次氯

酸钠水溶液消毒 15 min, 无菌水冲洗 3~5 次, 最后用无菌吸水纸吸干水分。将消毒后的侧芽接种到 1/2 MS 培养基中预培养 30 d 后备用。

1.2.2 芽增殖培养。将预培养 30 d 后的健壮侧芽分别接种到含不同激素组合的 MS 培养基中, 附加 3% 蔗糖、0.7% 琼脂, 调 pH 值至 5.8。在 (25 ± 2) °C, 12 h/d (光强 2 000 lx) 光照条件下培养 30 d, 统计芽增殖情况。

增殖培养基有: ①MS + 6-BA 0.5 mg/L + IAA 0.2 mg/L; ②MS + 6-BA 1.0 mg/L + IAA 0.5 mg/L; ③MS + 6-BA 2.0 mg/L + IAA 1.0 mg/L; ④MS + 6-BA 3.0 mg/L + IAA 1.0 mg/L; ⑤MS + KT 0.25 mg/L + IAA 0.2 mg/L; ⑥MS + KT 0.5 mg/L + IAA 0.5 mg/L; ⑦MS + KT 1.0 mg/L + IAA 0.5 mg/L。

1.2.3 芽伸长培养。将新增殖的芽分别接种到含不同激素组合的 MS 培养基中进行伸长培养, 培养基中附加 3% 蔗糖、0.7% 琼脂, 调 pH 值至 5.8。培养温度为 (25 ± 2) °C, 光照时间 12 h/d, 光照强度 2 000 lx。培养 30 d 后调查芽伸长情况。

伸长培养基有: ①MS + IAA 0.2 mg/L; ②MS + KT 0.25 mg/L + IAA 0.5 mg/L; ③MS + KT 0.25 mg/L + IAA 1.0 mg/L; ④MS + KT 0.25 mg/L + IAA 2.0 mg/L; ⑤1/2 MS + KT 0.25 mg/L + IAA 0.5 mg/L; ⑥1/2 MS + KT 0.25 mg/L + IAA 1.0 mg/L; ⑦1/2 MS + KT 0.25 mg/L + IAA 2.0 mg/L。

1.2.4 再生芽生根培养。当高山杜鹃组培苗长至 2~3 cm 时, 将生长健壮的小苗切成单苗接种于不同生根培养基中诱导生根。培养基中附加蔗糖 20 g/L, 调节 pH 值至 5.8, 每种培养基中接种 50 株, 培养 50 d 后统计试验结果。

生根培养基有: ①1/2 MS + IAA 0.5 mg/L; ②1/2 MS + IAA 1.0 mg/L; ③1/2 MS + IAA 2.0 mg/L; ④1/2 MS + IAA

基金项目 天津市委项目 (08ZHXHC07300); 国家级星火计划项目 (2008 GA610017)。

作者简介 刘玉冬 (1967-), 男, 天津人, 副教授, 从事园艺学研究。

收稿日期 2009-01-12

3.0 mg/L; ⑤1/2 MS + NAA 0.5 mg/L; ⑥1/2 MS + NAA 1.0 mg/L; ⑦1/2 MS + NAA 2.0 mg/L; ⑧1/2 MS + NAA 3.0 mg/L。

2 结果与分析

2.1 不同激素浓度培养基对高山杜鹃芽增殖的影响 由表 1 可知,当分裂素为 6-BA 时,随着培养基中 6-BA 浓度的增加,高山杜鹃每芽增殖数增加,但当 6-BA 浓度超过 2.0 mg/L 时,每芽增殖数变小。6-BA 浓度为 2.0 mg/L 时,每芽增殖数最多为 2.1 个。从芽生长情况来看,6-BA 浓度为 0.5 mg/L 时,再生芽生长健壮,但 6-BA 浓度为 2.0 mg/L 时,再生芽出现玻璃化现象,植株在短时间内变白死亡;当分裂素为 KT 时,随着 KT 浓度的增加,高山杜鹃每芽增殖数增加,但当 KT 浓度超过 1.0 mg/L 时,每芽增殖数变小。KT 浓度达到 0.5 mg/L 时,每芽增殖数最大。从芽生长情况来看,KT 浓度为 0.5 mg/L 时,再生芽生长健壮,但 KT 浓度为 1.0 mg/L 时,再生芽出现玻璃化现象,植株生长缓慢。因此,综合以上因素,高山杜鹃芽增殖的最适培养基为 MS + KT 0.5 mg/L + IAA 0.5 mg/L。

表 1 不同培养基对高山杜鹃芽增殖的影响

Table 1 Effects of different media on the proliferation of *Rhododendron lapponicum*

培养基 Media	接种芽数//个 Number of inoculated buds	每芽增殖数//个 Proliferated number per bud	芽生长情况 Growth status of buds
①	50	1.3	健壮
②	50	1.9	健壮
③	50	2.1	一般,有玻璃化现象
④	50	1.4	一般,有玻璃化现象
⑤	50	1.4	健壮
⑥	50	4.8	健壮
⑦	50	2.8	一般,有玻璃化现象

2.2 不同激素浓度培养基对高山杜鹃芽伸长的影响 由表 2 可知,当培养基中只加入生长素时,高山杜鹃芽平均生长速度较慢,芽细弱,生长不良;培养基中加入 KT 后芽平均生长速度略有加快,芽生长情况一般;KT/IAA 比值变化时,芽平均长度也随之变化,但变化不大,总体来看芽生长状况不好;当基本培养基为 1/2MS 时,植株生长状况变化很大,KT/IAA 的比值为 1/4 时,芽平均长度最长,且芽生长健壮。因此,综合以上因素,高山杜鹃芽伸长的最适培养基为 MS + KT 0.25 mg/L + IAA 1.0 mg/L。

表 2 不同培养基对高山杜鹃芽伸长的影响

Table 2 Effects of different media on the bud elongation of *R. lapponicum*

培养基 Media	接种芽数//个 Number of inoculated buds	每芽伸长高度//cm Elongation height per bud	芽生长情况 Growth status of buds
①	50	1.3	弱小,生长缓慢
②	50	1.8	一般,生长缓慢
③	50	2.1	一般,生长缓慢
④	50	1.6	一般,生长缓慢
⑤	50	3.2	健壮
⑥	50	5.1	健壮
⑦	50	2.7	一般,生长缓慢

2.3 生长素 IAA、NAA 对高山杜鹃无菌苗生根的影响 由表 3 可知,当培养基中加入 IAA 时,随着 IAA 浓度的增加(从 0.5 mg/L 增加到 3.0 mg/L),高山杜鹃组培苗生根率不断升高,但生根数仍然较少,且根的质量一般,根较细,且移栽时易脱落;当培养基中加入 NAA 时,组培苗生根率为 100%,随着 NAA 浓度的增加(从 0.5 mg/L 增加到 2.0 mg/L),生根数不断增加,当 NAA 浓度为 2.0 mg/L 时生根数最多,当 NAA 浓度为 3.0 mg/L 时,所产生根的质量下降,平均每株生根数也下降。综合考虑,高山杜鹃组培苗较理想的生根培养基为 1/2 MS + NAA 2.0 mg/L。

表 3 IAA、NAA 对高山杜鹃组培苗生根的影响

Table 3 Effects of IAA and NAA on the rooting of *R. lapponicum* tissue culture seedlings

处理 Treatment	接种数//个 Inoculated number	生根率//% Rooting rate	平均每株生根数//条 Average root number per plant	根的质量 Root quality
①	50	0	0	
②	50	0	0	
③	50	8.5	1.0	一般
④	50	9.1	1.2	差,粗短
⑤	50	100.0	3.4	较好,较细
⑥	50	100.0	4.7	正常
⑦	50	100.0	6.2	正常
⑧	50	100.0	5.1	差,粗短

3 讨论

3.1 分裂素与生长素浓度的比值对高山杜鹃芽增殖的影响

随着 KT/ IAA 浓度比值的增加,高山杜鹃每芽增殖数增大,但当 KT/IAA 浓度比值达到一定量(1:1)时,每芽增殖数下降,说明 KT/ IAA 浓度比值适合时,芽增殖率才能达到最大;同时从再生芽的质量来看,当 KT/ IAA 浓度比值达到 2 时,再生芽开始出现玻璃化现象,说明高 KT/ IAA 浓度比值不利于芽增殖生长。

3.2 MS 培养基与 1/2 MS 培养基对高山杜鹃再生芽伸长的影响

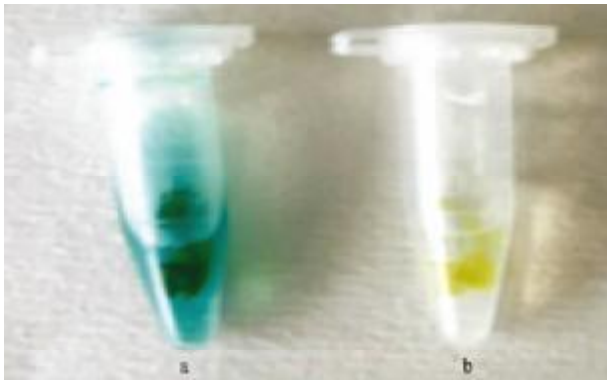
高山杜鹃再生芽在 MS 培养基中生长缓慢,而在 1/2 MS 培养基中生长速度较快。其原因可能是植物在高渗透压下细胞质浓度增大,从而导致细胞体积变小,表现出生长缓慢;而当将其置于低渗透压基质上时,细胞质浓度下降,液泡增大,表现为生长加快。同时,也可以判断高山杜鹃是对培养基渗透压反应敏感的植物。培养这类植物一般采用低渗透压培养基,或降低培养基中无机盐和蔗糖的含量,但还要根据植物种类视具体情况而定。

3.3 生长素 IAA、NAA 对高山杜鹃无菌苗生根的影响

NAA 诱导高山杜鹃无菌苗生根的效果明显好于 IAA,生根数量多、质量好,这说明高山杜鹃对生长素 NAA 的反应较强。同时高山杜鹃生根速度十分缓慢,一般要 60 d 时间才能生根,因此对其进行生根培养时应增加培养基用量,以防止培养时间过长而导致的培养基变干现象。

4 结论

通过试验,确定高山杜鹃组织培养快繁的最佳方案为:取高山杜鹃的侧芽,消毒后接种到 1/2MS 培养基中,30 d 后将生长健壮的侧芽分接到分化培养基 MS + KT0.5 mg/L +



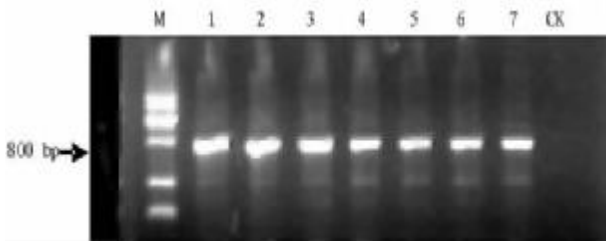
注: a 为抗性植株叶片; b 为对照。

Note: a, Leaves of resistant plants; b, Control.

图 2 *gus* 基因在小麦叶片中的表达

Fig. 2 Expression of *gus* gene in wheat leaves

2.3 目的基因 *ppc* 的 PCR 检测 将获得的 19 株抗性植株进行 PCR 分子检测, 共有 7 株扩增出目的条带, 结果见图 3。



注: M 为 DNA Marker (2 500 bp Ladder); 1 ~ 7 为转基因植株; CK 为阴性对照。

Note: M, DNA marker (2 500 bp Ladder); 1 - 7, Transgenic plants; CK, Negative control.

图 3 T_0 代转基因小麦 *ppc* 基因的 PCR 检测

Fig. 3 PCR detection of *ppc* gene in T_0 generation transgenic wheat

3 结论与讨论

(1) 该试验中, 将磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因 *ppc* 导入临优 145 小麦, 获得了 19 株抗性植株, 抗性再生植株频率达 22.4%, 说明小麦幼胚诱导出的胚性愈伤组织适合作为农杆菌转化的受体材料。前人研究结果表明, 农杆菌转化小麦具有明显的基因型特异性, 选用再生能力强的基因型作为受

体, 会大大提高转化效率^[6], 该研究证明临优 145 适合作为小麦转基因品种。

(2) 试验剪取抗性苗叶片, 用 X-Gluc 染色, 叶片被染成了深蓝色, 说明 *gus* 基因已经在小麦叶片中得到了很好的表达。从对转化植株的分子检测结果来看, 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPCase) 基因已整合到小麦基因组中, 获得了转基因小麦的再生植株。

(3) 抗性愈伤的筛选是转化过程中最关键的一步, 前人的研究也比较深入^[6-8]。笔者开始用较高浓度的潮霉素来直接筛选共培养后的愈伤组织, 发现由于愈伤组织受到农杆菌创伤, 直接筛选致使愈伤组织大批地褐化死亡, 所以先采用较低浓度的抗生素再逐步提高浓度的方法进行筛选, 有利于组织生长的恢复, 从而提高转化频率。

笔者将磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPCase) 基因转入重要的粮食作物小麦, 目的是要获得光合效率提高且适合农业耕作的小麦材料。对转基因后代进一步的分子及生理生化分析, 温室和大田栽培筛选而获得高光效的小麦新种质和新品系, 是笔者的下一步工作目标。

参考文献

- [1] DING Z S. Cloning of C4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene from millet (*Setaria italica*) and sugarcane (*Sacharum officinarum*) and improvement of photosynthetic efficiency in their transgenic rice [D]. Beijing: Chinese Academy of Sciences, 2004.
- [2] 陈续清, 张晓东, 梁荣奇, 等. 玉米 C4 型 *ppc* 基因的分子克隆及其在小麦的转基因研究 [J]. 科学通报, 2004 (19): 1976 - 1982.
- [3] XIA G M, LI Z Y, HE C X, et al. Transgenic plant regeneration from wheat (*Triticum aestivum* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Acta Phytophysiologica Sinica, 1999, 25 (1): 22 - 28.
- [4] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 585 - 586, 598.
- [5] 李明刚. 植物基因操作原理与技术手册 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 2000: 300 - 301.
- [6] WANG C T, WEI Z M. Factors influencing transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) immature embryos mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2003, 29 (6): 521 - 529.
- [7] HIEI Y, OHTA S, KOMARI T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA [J]. Plant J, 1994, 6: 271 - 282.
- [8] ALDEMITA R R, HODGES T K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of japonica and indica rice varieties [J]. Planta, 1996, 4: 612 - 617.

(上接第 4875 页)

IAA 0.5 mg/L 中; 45 d 后将分化出的芽切下, 接种到培养基 1/2MS + KT 0.25 mg/L + IAA 1.0 mg/L 中; 30 d 后将伸长到 2 ~ 3 cm 的芽切下, 接种到培养基 1/2 MS + NAA 2.0 mg/L 中生根; 60 d 后将生根组培苗栽植到基质中进行培养。

参考文献

- [1] 沈荫椿. 杜鹃花 [M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 1985: 3 - 6.
- [2] 张长芹, 冯宝钧, 刘昌礼, 等. 几种常绿高山杜鹃的扦插试验 [J]. 园艺

学报, 1994, 21 (3): 307 - 308.

- [3] 邓百万, 陈文强, 高非非. 比利时杜鹃的组织培养研究 [J]. 氨基酸和生物资源, 2002, 24 (3): 25 - 27.
- [4] 王亦非, 孙月芳, 周润梅, 等. 二种西洋杜鹃的组织培养 [J]. 上海农业学报, 2003, 19 (2): 9 - 11.
- [5] 汤桂钧, 张建安. 高山杜鹃的组织培养快速繁殖技术研究 [J]. 上海农业学报, 2004, 20 (3): 15 - 18.
- [6] 王吉, 张守琪, 张志勇, 等. 高山杜鹃离体快繁技术研究 [J]. 甘肃农业科技, 2006 (8): 11 - 13.